

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**SECRETARÍA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
CENTRO DERMATOLÓGICO “DR. LADISLAO DE LA PASCUA”**

**CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN
DERMATOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COLÁGENA-
POLIVINILPIRROLIDONA EN PACIENTES CON
ESCLERODERMIA LOCALIZADA**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
COMPARATIVO DOBLE CIEGO**



**PRESENTADO POR: DRA. MARGARITA ORTIZ AVALOS
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA**

**DIRECTOR: DR. FERMÍN JURADO SANTA CRUZ
ASESORES : DRA. GUADALUPE JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA
DRA. GISELA NAVARRETE FRANCO
DRA. VIRGINIA MARTINEZ ESTRADA**

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**Evaluación del efecto de la Colágena – Polivinilpirrolidona
en pacientes con Esclerodermia Localizada.**

Dra. Margarita Ortiz Avalos

Vo. Bo.

**Dr. Fermín Jurado Santa Cruz
Profesor Titular del Curso de Especialización
en Dermatología**

Vo. Bo.

**Dr. Antonio Fraga Mouret
Director de Educación e Investigación**

ÍNDICE

INDICE.....	1
RESUMEN.....	3
SEDE.....	3
INTRODUCCIÓN	4
CLASIFICACIÓN.....	4
ESCLERODERMIA LOCALIZADA	6
1. DEFINICIÓN	6
2. EPIDEMIOLOGÍA	6
3. ETIOLOGÍA.....	7
4. CUADRO CLÍNICO	7
5. FORMAS CLÍNICAS	8
6. MANIFESTACIONES SISTÉMICAS DE ESCLERODERMIA LOCALIZADA	11
7. DIAGNÓSTICO	11
8. HISTOPATOLOGÍA	12
9. FISIOPATOLOGIA	13
10.EXÁMENES DE LABORATORIO	17
11.DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	18
12.TRATAMIENTO	18
ANTECEDENTES	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
JUSTIFICACIÓN	37
OBJETIVOS.....	38
HIPÓTESIS	39

DISEÑO	40
MATERIAL Y MÉTODOS	42
INTERVENCIÓN	45
VARIABLES DE ESTUDIO	46
DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS	49
CONSIDERACIONES ÉTICAS	55
RESULTADOS	57
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	78
ANEXOS	80
BIBLIOGRAFÍA	83

Resumen

Evaluación del efecto de la Colágena-Polivinilpirrolidona en 31 pacientes con Esclerodermia Localizada. Estudio prospectivo, doble ciego comparado con metilprednisolona de depósito. A quienes se aplicó de manera semanal uno de los tratamientos durante 3 meses y se llevó un seguimiento de 6 meses más; realizando evaluación clínica, histológica y sérica de células T y citocinas como IL-17, Foxp3, IL-22, TGF- β 1. Reportándose resultados con significancia estadística en la expresión de IL-17, FoxP3 y TGF- β 1 al compararlos con niveles basales de ambos grupos y con el grupo de controles sanos. Aunque no hubo tal significancia en la evaluación clínica. La colágena –PVP se propone como una alternativa para el tratamiento de la esclerodermia localizada que a diferencia de los glucocorticoides tienen la ventaja de no causar efectos adversos. Pudimos observar que la esclerodermia localizada es una enfermedad en donde participan además de células Th1 y 2 las células Th17.

Tipo de Investigación:

Experimental

Sede:

Proyecto clínico: centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”

Proyecto básico: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

INTRODUCCIÓN

La palabra esclerodermia deriva del griego skleros (duro) y dermis (piel) que significa “endurecimiento de la piel.”

La esclerodermia es una enfermedad crónica de etiología desconocida caracterizada por engrosamiento y fibrosis de la piel, aunque en la forma sistémica también afecta a pulmones, tracto gastrointestinal, riñones y corazón. ^{1,2}

Hipócrates (460-370 a.c.), fue el primero en describir por primera vez pacientes con “endurecimiento de la piel, obstrucción de poros, pigmentación y ausencia de glándulas sudoríparas”. ³

Curzio en 1753 fue el primero en proporcionar una descripción detallada de la esclerodermia; sin embargo, fue hasta 1847 cuando Gintrac introduce el término de esclerodermia y enfatiza que la piel es el órgano más afectado. ⁴

En 1924 Matsui describe las características histopatológicas de la esclerodermia como zonas con aumento de la colágena y engrosamiento de las paredes de los pequeños vasos. ^{3,5}

Brown y O’learly en 1925 mencionaron los aspectos fisiopatológicos de las alteraciones vasculares y describen los cambios a nivel de capilaroscopia.

Wilson y Fagge separan a la Morfea de la esclerosis sistémica, éste último describe las diferentes formas clínicas de la Esclerodermia localizada. Finalmente en 1942, Klemperer clasifica a la esclerodermia como una enfermedad colágeno-vascular. ⁵

CLASIFICACIÓN DE ESCLERODERMIA

En general se sabe que existen dos formas clínicas de esclerodermia:

a) La forma localizada, llamada así porque la piel es el único órgano afectado; b) Forma sistémica, se caracteriza por presentar esclerosis tanto en piel como en algunos órganos internos.

Los denominados síndromes esclerodermiformes, relacionados con la exposición a múltiples sustancias químicas, que clínicamente semejan esclerodermia fueron durante muchos años incluidos en las clasificaciones de esclerodermia, actualmente se reconocen como entidades distintas.

Con el paso de los años se han realizado numerosas clasificaciones clínicas de esclerodermia adoptando la siguiente como la más práctica.^{4,6-8}

1) Esclerodermia localizada:

- a) Placas (morfea)
- b) Gotas
- c) Lineal
 - banda "Golpe de Sable" (Coup de sabre)
 - Monomérica
- d) Subcutánea (Nodular o profunda)
- e) Panesclerótica
- f) Ampollosa
- g) Macular
- h) Generalizada

2) Esclerosis Sistémica Progresiva:

- a) Con esclerodermia limitada
 - Acroesclerosis
 - CREST
- b) Con esclerodermia difusa

c) “ Sin esclerodermia”

3) Síndromes Esclerodermiformes:

a) Genéticos

b) Inducidos por tóxicos

c) Metabólicos

d) Inmunológicos

e) Neoplásicos

f) Postinfecciosos

g) Neurológicos

ESCLERODERMIA LOCALIZADA

DEFINICIÓN

La esclerodermia localizada se caracteriza por esclerosis cutánea, la cual impide su desplazamiento sobre los tejidos subyacentes. Carece de compromiso visceral, es autolimitada y presenta buen pronóstico para la vida, aunque no siempre para la función.

EPIDEMIOLOGÍA:

Se considera una enfermedad multifactorial, de tipo autoinmune, predomina en las mujeres en una proporción de 4:1 con respecto a los hombres.³ La incidencia anual de la esclerodermia localizada se calcula en 20 casos / 1, 000,000 de personas³. La edad de presentación es bimodal pues puede presentar entre los 5-15 años de edad en la forma monomélica y entre los 20 y 40 años en la morfea con mayor frecuencia.

En el Centro Dermatológico Pascua existe una prevalencia de 8 casos por cada 10,000 pacientes de primera vez. La mayor incidencia de esclerodermia localizada se presentó en el año 2004 con 54 pacientes.⁷

ETIOLOGIA:

La esclerodermia no tiene un patrón de herencia, no obstante que algunos estudios han demostrado una asociación con marcadores genéticos,⁹ otros factores como los infecciosos, autoinmunes, químicos o traumáticos también han sido relacionados con la etiopatogenia de la esclerodermia. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce la etiología exacta. En años recientes se ha tratado de relacionar su origen con el llamado “factor atrófico” que no ha sido identificado, así como con infecciones como varicela o por *Borrelia burgdorferi*, ya que se han encontrado títulos altos de anticuerpos en los pacientes con esclerodermia en placas.¹⁰⁻¹²

Se ha documentado una asociación del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) con el aumento en la incidencia de anticuerpos órgano-específicos, principalmente con los haplotipos HLA-DR5 y DR3 en americanos y europeos y del HLA-DR2 en japoneses y nativos americanos.¹³

CUADRO CLÍNICO:

La esclerodermia se caracteriza por tener 3 estadios clínicos: Inflamatorio, esclerótico y atrófico³:

1. Inflamatorio: Estadio edematoso o infiltrativo, hay cambios inflamatorios, manifestados por una coloración violácea en la periferia, que se denomina “anillo lila”, puede coexistir en la parte central con esclerosis o hiperpigmentación café marrón. Se considera la fase inicial (**Fig. 1**)
2. Esclerosis: Es el estadio más evidente, predomina en el tronco, extremidades y cara. Se presenta como placas esclerosas, definidas, que pueden ser únicas o múltiples, bilaterales y generalmente asimétricas,^{8,13.}

La fase activa de la enfermedad está asociada con el crecimiento de lesiones existentes, aparición de nuevas lesiones y la presencia del halo eritematovioláceo. **(Fig. 2)**

3. Estadio atrófico: Es la fase residual, la piel está adelgazada, los vasos sanguíneos son fácilmente visibles a través de la piel, existe alopecia e hipohidrosis local, secundarias a la atrofia del folículo piloso y las glándulas sudoríparas, puede haber hiperpigmentación en la periferia. **(Fig.3)**



Fig. 1. Fase inflamatoria halo eritematovioláceo indicativo de actividad



Fig. 2. Fase de esclerosis



Fig. 3. Fase atrófica

FORMAS CLÍNICAS:

1) Morfea o en placas: Es la forma más frecuente, con una prevalencia del 56%. Predomina en el tronco y extremidades. Se caracteriza por placas esclerosas, generalmente ovales, con borde eritemato-violáceo (signo de actividad), bien definido. **(Fig. 4)**.^{8,14-16}

2) Esclerodermia generalizada: Se denomina así cuando confluyen múltiples placas en 2 o más regiones de la superficie corporal (prevalencia 13%) **(Fig. 5)**.^{15,16}

3) En gotas: Considerada como una variedad de la morfea generalizada, se presentan múltiples lesiones puntiformes ligeramente xantocrómicas o blanquecinas, con esclerosis mínima, de superficie brillante, predominan en

cuello y parte superior del tronco, clínicamente pueden ser indistinguibles del liquen escleroso y atrófico extragenital.^{13,14,16,17}

- 4) Macular: Es una variedad que aún se encuentra en discusión, clínicamente se presenta como manchas hiperpigmentadas sin evidencia clínica de esclerosis con imagen histológica de esclerodermia **(Fig. 6)**.
- 5) Subcutánea (nodular o profunda): Es una variedad rara, se presenta en tronco y antebrazos, se caracteriza por la presencia de placas esclerosas de aspecto nodular, algunas simulan una cicatriz queloide. Otras pueden presentar un aspecto de “piel de naranja”. La coexistencia de lesiones típicas de la morfea localizada puede contribuir al diagnóstico, afecta dermis profunda y tejido celular subcutáneo.^{13,18}
- 6) Ampollosa: Cursa con ampollas tensas, que asientan sobre placas esclerosas, se presenta en extremidades, tronco, cara y cuello, la formación de las ampollas se ha atribuido al trauma u obstrucción linfática causada por la esclerosis.^{13,16}
- 7) Esclerodermia lineal o en banda: Corresponde a placas circunscritas, dispuestas en forma lineal, con hiperpigmentación, confinada a un solo segmento corporal, generalmente en cara y extremidades, tiene una prevalencia del 20%, es la forma más frecuente en niños **(Fig. 7)**.^{15,17,19-22} El daño puede incluir estructuras articulares ocasionando contracturas de ligamentos, hipotrofia o atrofia de músculo o hueso, alterando el crecimiento o desarrollo del segmento afectado.

Se denomina en golpe de sable cuando afecta la región medio-frontal, se puede asociar a crisis convulsivas, signos extrapiramidales así como calcificaciones intracraneales y afecciones oftalmológicas.

- 8) Esclerodermia panesclerótica: Tiene una prevalencia del 11%. Habitualmente es diseminada, afecta estructuras superficiales como profundas, incluyendo músculos y tendones, es rápidamente progresiva **(Fig. 8)**.^{8,15}



Fig. 4. Esclerodermia en placa



Fig. 5. Esclerodermia generalizada



Fig. 6. Esclerodermia macular



Fig. 7. Esclerodermia en golpe de sable

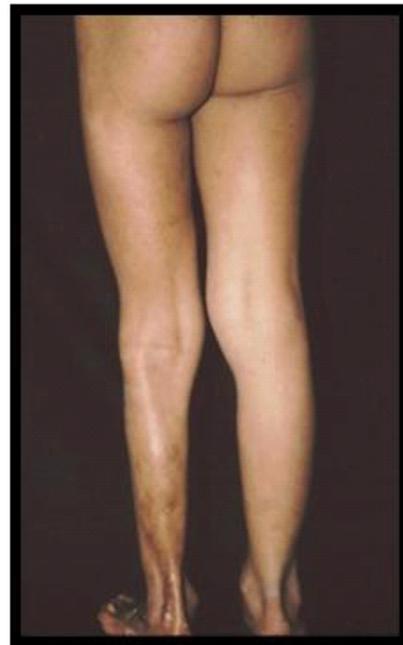


Fig. 8. Esclerodermia monomélica
(cortesía clínica colágenas)

ESCLERODERMIA LOCALIZADA: MANIFESTACIONES SISTÉMICAS

La esclerodermia localizada generalmente no se asocia con manifestaciones sistémicas, aunque hasta una cuarta parte de los pacientes presenta a lo largo de la enfermedad manifestaciones extracutáneas, de las cuales la afectación articular es la complicación más frecuente principalmente en el tipo lineal, puede causar discapacidad por sinovitis o contracturas. Es posible que presenten artralgias, uveítis, alteraciones en la mecánica vertebral y síndrome del túnel del carpo.^{15,23} Las manifestaciones neurológicas más frecuentemente asociadas son: convulsiones, cefalea, así como cambios de conducta.²⁴

La progresión a esclerosis sistémica progresiva varía entre el 0.8 al 5.6% de las esclerodermias localizadas, siendo las de mayor riesgo las formas generalizadas.

25

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la esclerodermia localizada es clínico y se confirma mediante estudio histopatológico. Es necesario completar el protocolo de estudio de los pacientes a través de la realización de estudios de laboratorio y gabinete con la finalidad de descartar manifestaciones sistémicas.

El aumento de colágena puede ser medido con métodos como ultrasonido cutáneo,^{26,27} resonancia magnética, plicómetro, durómetro o flujometría por láser doppler, ninguno de ellos hasta el momento han sido aprobados como métodos diagnósticos para Morfea.^{1,28} Asimismo se han propuesto mediciones séricas de péptidos de degradación de colágena como el propéptido sérico aminoterminal de la procolágena tipo III (PHINP), que es un marcador de la síntesis de colágena III.²⁹

Actualmente la escala modificada de Rodnan (MSS) para esclerosis sistémica descrita por Zachariae, divide el cuerpo en 17 regiones y mide el grosor y plicabilidad de la piel en combinación con el área afectada. Es un método que se

utiliza en morfea para la evaluación clínica de la esclerosis pero no para establecer el diagnóstico.²⁸⁻³⁰

Por todo lo anterior, el análisis histopatológico se considera el estándar de oro.¹⁶

Por lo tanto el diagnóstico se realiza mediante la correlación clínico-patológica.²⁹

HISTOPATOLOGÍA

Los estadios histológicos de la esclerodermia localizada se dividen en inflamatorio temprano y escleroso o tardío.³¹

El estadio inflamatorio temprano se caracteriza por un ligero engrosamiento de haces de colágena y un infiltrado linfocitario que inicia en tejido celular subcutáneo y se extiende a dermis profunda, con edema dérmico moderado, las fibras elásticas están disminuidas en número, grandes áreas de tejido subcutáneo son reemplazadas por colágena recién formada. Por microscopia electrónica se puede identificar que estos haces de colágena tienen un diámetro disminuido, mayor grosor pero su estructura es normal. Además, se presenta aumento de colágena tipo I, III, fibronectina y proteoglicanos.³¹

En el estadio tardío los haces de colágena son gruesos, con apariencia homogénea predominantemente en la dermis reticular y en zonas más profundas éstas han sustituido la gran mayoría del tejido celular subcutáneo. Como resultado, puede haber desplazamiento y/o atrofia de las glándulas ecrinas, ausencia de folículo piloso y glándulas sebáceas, disminución de los vasos sanguíneos que a menudo tienen una pared fibrosa y lumen disminuido.³¹ La epidermis puede ser normal o con discreta acantosis.

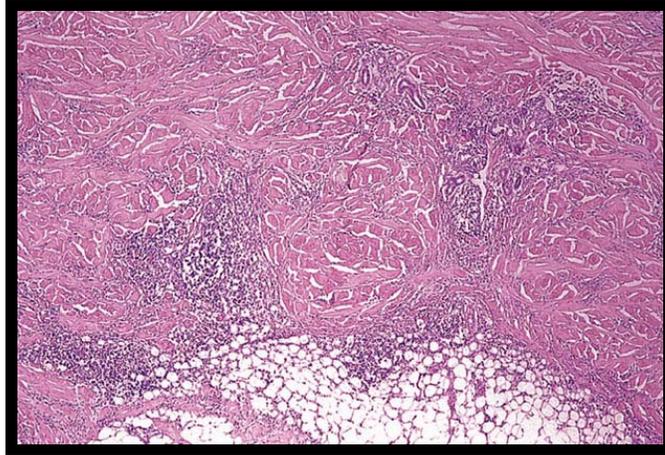


Fig 9. Histopatología de Esclerodermia. Infiltrados moderados focales

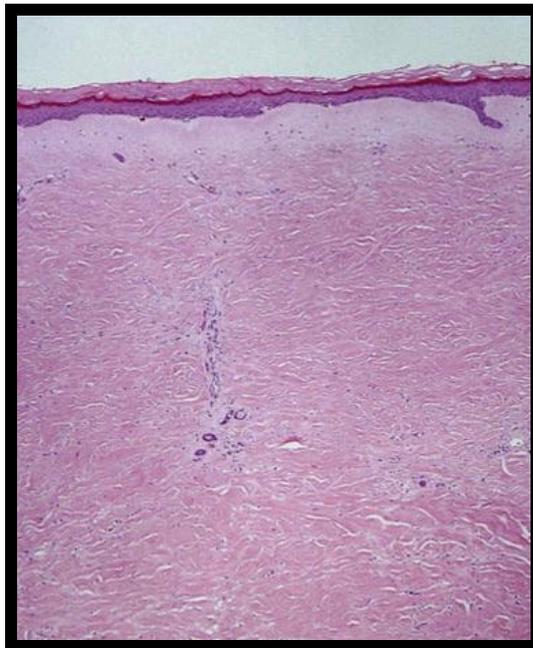


Fig 10. Histopatología de Esclerodermia. Estadio tardío con homogeneización de colágena en toda la dermis

FISIOPATOLOGIA

La característica principal de la esclerodermia es el aumento en la colágena y en la proliferación de fibroblastos, a partir de la cual surgen todas las posibilidades etiopatogénicas de la enfermedad, que depende principalmente de 3 factores: ^{8,9,31}

a) Sistema inmune activado

Los linfocitos T y B han sido identificados en la esclerodermia localizada sobre todo en estadios inflamatorios tempranos,^{9,31} lo que sugiere que tanto la inmunidad celular como humoral están implicadas en la fisiopatología de la esclerodermia.

La evidencia de que las células T se encuentran activadas en la esclerodermia localizada incluye niveles séricos elevados de IL-2 (propuesta como marcador de la actividad de la enfermedad),^{8,32} IL-4 e IL-6 (promotores de la síntesis de colágena y glucosaminoglucanos) así como los receptores solubles de IL-2,3,4,13,17,^{26,27,32} El TNF- α y la IL-13 son citocinas fibrogénicas y están elevadas en un 25% de los pacientes. Los niveles de TNF- α parecen estar inversamente relacionados con la duración de la enfermedad, sugiriendo que tiene un papel importante en la patogenia de la enfermedad, principalmente en el estadio temprano, este factor induce la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, las cuales favorecen la formación de focos inflamatorios.³³⁻³⁷

El TGF- β 1 es un factor de crecimiento con actividades fundamentalmente fibrogénicas, ya que estimula la síntesis de la matriz extracelular y la activación de fibroblastos.^{34,36} Otro indicador de la participación de los linfocitos T cooperadores (Th2) son los niveles de CD30 séricos elevados.³³⁻³⁷

La IL-17 una citocina producida por células TH 17 (diferentes de TH1 y TH2) se encuentra elevada en el suero de pacientes con esclerosis sistémica progresiva y se ha relacionado con la fisiopatogenia de la enfermedad.³⁸

Los niveles séricos de CD23 indican que la activación de células B ocurre en un estadio temprano de la diferenciación; demostrado por la activación de células B y por la presencia de diversos anticuerpos como los antinucleares, antihistona, factor reumatoide y anti-ADN de doble cadena. La presencia de hipergammaglobulinemia con elevación sérica policlonal de IgG e IgM se ha comunicado en el 50% de los pacientes sobre todo en la fase activa de la enfermedad.^{31,33}

Las β -defensinas, péptidos ricos en cisteína, se han detectado en piel inflamada principalmente la hBD 2 y 3 que se unen al factor de transcripción nuclear NF- κ B, el cual está relacionado a la inducción de múltiples citocinas proinflamatorias y funciona como una molécula efectora del TNF- α , integrando tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa en respuesta a un daño tisular. En este contexto se considera que la esclerodermia es un “fenómeno de reparación del daño fuera de control” en el que las citocinas proinflamatorias y profibróticas estimulan a los fibroblastos resultando una señalización autocrina/paracrina desregulada.^{34,39-41}

b) Daño vascular:

El endotelio puede ser el sitio primario de daño en morfea. Se ha demostrado que las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la dermis profunda favorecen los fenómenos de apoptosis. Se ha propuesto la participación de anticuerpos dirigidos contra las células endoteliales que median la citotoxicidad como un mecanismo para la inducción del daño y su muerte. La citotoxicidad es mediada por la vía de Fas (CD95) mediante IL-2 que a su vez estimula a las células natural Killer.^{4,39,42}

La proteína cofactor de membrana (MCP) y el factor acelerador del decaimiento (DAF) son moléculas reguladoras del complemento encontradas en las células endoteliales que inhiben la formación de las convertasas C3/C5 de las vías clásica y alterna del complemento y de esta manera protegen a las células del daño mediado por el complemento; dichas moléculas son indetectables en el endotelio de la piel afectada con morfea lo que hace al endotelio vascular susceptible al daño.³¹ Las consecuencias del daño de las células endoteliales y la apoptosis incluyen la actividad pro-coagulante y el incremento localizado de citocinas proinflamatorias como la IL-1 y de moléculas de adhesión.

c) Síntesis excesiva de componentes de la matriz extracelular:

Las fibras de colágena constituyen el 75% del peso seco de la dermis. Pertenecen a una familia de glucoproteínas altamente especializadas al menos con 27 miembros.⁴³⁻⁴⁶ Las colágenas tipo I y III son las responsables de la tensión y

elasticidad de la piel. La colágena tipo I ocupa el 80% del total de la colágena de la dermis del adulto mientras que la tipo III representa el 10% del total.⁴⁷ La colágena tipo I pertenece a la clase fibrilar, su estructura de triple hélice consiste en 2 subunidades que son sintetizadas como las cadenas precursoras pro α 1(I) y pro α 2(I), codificadas por genes diferentes, se expresan en el hueso, tendón y piel.⁴⁸ La transcripción de los genes se regula por numerosos factores de crecimiento (TGF- β 1), hormonas, citocinas y factores nutricionales y están elevadas en patologías fibróticas.⁴⁹⁻⁵⁵

Las colágenas son degradadas por múltiples proteinasas extracelulares las más importantes son las metaloproteinasas de matriz 1,8 y 13 (MMPs),⁴⁷ su actividad está controlada por inhibidores específicos llamados inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) ambos sintetizados por los fibroblastos dérmicos.⁴⁴⁻⁴⁷ El balance entre las MMPs y los TIMPs es esencial para remodelar la matriz extracelular.⁴⁴⁻⁴⁶ En las lesiones cutáneas el TIMP-3 se encuentra elevado. Así la fibrosis puede resultar tanto de un incremento en el depósito de colágena como de una disminución del recambio de la matriz extracelular.

Los fibroblastos son el principal componente de la dermis y los responsables de la síntesis de colágenas, un incremento de su proliferación causa producción excesiva de colágena tipo I y III y la disrupción endotelial a su vez causa la activación plaquetaria.⁹ Diferentes citocinas como el TGF- β , IL-1, TNF- α , PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas),^{50-53,56} CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo) influyen sobre la actividad de los fibroblastos, activando su proliferación y con ella incrementando directamente la producción de colágena.³¹ El factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) presenta actividades angiogénicas, induce la proliferación y quimiotaxis de fibroblastos y la expresión de colagenasas, sugiriendo su participación en la respuesta fibroproliferativa.⁵⁶

Estudios in vitro han demostrado que el IFN- γ es un potente inhibidor de la síntesis de novo de colágena, aunque no ejerce ningún efecto sobre las enzimas colagenolíticas.⁵⁷

La proteína AP-1 es un factor de transcripción importante en la regulación de la síntesis de colágena mediada por IL-4.^{35,57}

La activación de los mastocitos parece tener un papel importante ya que éstos aumentan en las lesiones de la fase inflamatoria de la esclerodermia, estas células secretan heparina, la cual interactúa con factores de crecimiento de unión de heparina (TGF- β 1, IGF, etc.) que estimulan la proliferación de los fibroblastos.³¹

La esclerosis de la piel en la morfea está asociada con mayor número de entrecruzamientos de la colágena,⁴² que en presencia de infiltrados inflamatorios perivasculares causan la hiperreactividad clonal de los fibroblastos.¹⁶

EXÁMENES DE LABORATORIO

La eosinofilia ocurre en las formas generalizada y lineal, puede correlacionar con la actividad del padecimiento.^{13,31} En las formas generalizadas puede encontrarse elevación de la velocidad de sedimentación globular.

Los anticuerpos antinucleares (ANA) se presentan en el 46-80% de los pacientes, por inmunofluorescencia indirecta con un patrón moteado u homogéneo.

Los anticuerpos anti-ADN se encuentran en aproximadamente en el 50% de los casos de esclerodermia localizada.^{13,36,59}

Se han identificado anticuerpos anticardiolipina y anticoagulante lúpico en el 70% de los pacientes con morfea generalizada.

Uno de los principales autoanticuerpos en esclerodermia localizada es el anti-histona que se ha detectado hasta en un 47% en esclerodermia localizada, en 87% en morfea generalizada, 32% en esclerodermia lineal y 25% en morfea. Los autoanticuerpos anti H1, H2A y H2B se han propuesto como un buen marcador de actividad para morfea generalizada con un valor de 87% de sensibilidad y 74% de especificidad.^{36,59-61}

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

La relación entre morfea con liquen escleroso y atrófico en general es discutido, se han presentado casos en los que coexisten ambas entidades.¹³ Por histopatología la esclerodermia localizada muestra cambios en las zonas profundas de dermis mientras que en el liquen escleroso y atrófico son a nivel de dermis papilar, así como una alteración vacuolar en la unión dermoepidérmica.¹³

Otros diagnósticos diferenciales a considerar deben ser los síndromes esclerodermiformes como: escleredema; enfermedad injerto contra huésped; fascitis eosinofílica; síndromes esclerodermiformes por sustancias químicas, aceite de colza adulterado, bleomicina, benceno, cloruro de vinilo, L-triptófano contaminado, metafenilendiamina, percloroetileno, pentazocina, polvo de sílice, silicona, tricloroetileno, tricloroetano, tolueno; pseudoesclerodermia, síndrome de envejecimiento prematuro, fenilcetonuria, escleromixedema.¹³

TRATAMIENTO

Debido a que no existe una guía universal de tratamiento en esclerodermia el manejo de la misma depende de la variedad clínica.^{8,16,29}

Cuando existe un riesgo importante de discapacidad como en la esclerodermia lineal así como en los tipos profundos en caso de enfermedad muy extensa, con datos de actividad de la enfermedad se aconseja utilizar terapia sistémica.^{13,23}

Los tratamientos actuales en morfea van dirigidos a prevenir la síntesis y liberación de citocinas profibróticas, así como a disminuir la esclerosis mediante la reducción de la síntesis de colágena o incremento en la producción de colagenasas; todos ellos con resultados variables.^{3,8}

Tabla 1: Tratamiento de esclerodermia localizada

FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	GRUPO	INDICACIÓN	EFFECTIVO/ NO EFFECTIVO	NIVEL DE EVIDENCIA
Glucocorticoides	Disminuyen la producción de matriz extracelular, inhiben la inflamación, proliferación de fibroblastos y la fibrosis.	Inmunomodulador	1ª elección De manera tópica en cualquier variedad clínica; y de manera sistémica en formas subcutáneas y generalizadas. Mejores resultados en asociación con metotrexate.		
Metotrexate	Antagonista del ácido fólico que inhibe el DNA, RNA y la síntesis de proteínas.	Inmunomodulador	2a elección en casos generalizados en combinación con esteroides y en formas lineales	Efectivo: Combinado con esteroides	IIB
Delta-Penicilamina	Bloquea los grupos aldehído en los enlaces intra e intermoleculares de la colágena afectando su metabolismo	Antifibrótico	2a elección para variedades subcutánea y generalizada	Efectivo	III
Radiación UV	Efectos sobre la producción de citocinas y estimula de la actividad de colagenasa.	Antifibrótico	2ª elección para formas lineales 1ª elección en casos generalizados	Efectivo	UVB: IIB UVA en todas las dosis: IIB PUVA: IIB
Colchicina	Evita la polimerización de la tubulina e inhibe la migración de leucocitos y la fagocitosis	Antifibrótico		Efectivo	III
Ciclosporina A	Inhibe la transcripción del gen de IL-2, IL-3, INF- γ .	Inmunomodulador	Indicado en asociación con glucocorticoides	Efectivo	III
Antimaláricos	El mecanismo de acción aún no es comprendido totalmente.	Inmunomodulador	En combinación con glucocorticoides o delta-penicilamina mejores resultados		

Calcitriol	Inhibe crecimiento de fibroblastos y la síntesis de colágena.	Antifibrótico	3ª línea en casos severos, por efectos adversos. Mejores resultados con placebo que con calcitriol	No efectivo	IB
Calcipotrieno	Inhibe la proliferación de fibroblastos, incrementa IL-10 y disminuye IL-8	Antifibrótico	2ª elección en casos refractarios a glucocorticoides tópicos	Efectivo: Combinado con betametasona	IIB
Tacrolimus	Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, ligadas a la inhibición de la activación de linfocitos T.	Inmunomodulador	2a elección en casos refractarios a glucocorticoides tópicos	Efectivo	IB
Imiquimod 5%	Incrementa la producción de INF- γ que a su vez inhiben la producción de fibroblastos	Antifibrótico	3ª elección en casos refractarios a glucocorticoides tópicos, tacrolimus y calcipotrieno	Efectivo	IIB
Fotoforesis	Suprime los efectos del TFG- β	Antifibrótico		Efectivo	III
IFN-gamma	Inhibe la producción de fibroblastos	antifibrótico		No efectivo	IB

Modificado de Fett N, Werth P ⁽⁸⁵⁾

AGENTES ANTIFIBRÓTICOS

Se utilizan para reducir la síntesis, liberación o polimerización de las fibras de colágena, incrementar la actividad colagenolítica y/o las neutralizar citocinas profibróticas como TGF- β 1, IL-4 y 6.

Delta-penicilamina

La D-penicilamina es un agente quelante que bloquea los grupos aldehído en los enlaces intra e intermoleculares de la colágena, afectando su metabolismo. Se ha utilizado a dosis de 250 mg 3 veces al día, considerando que disminuye la esclerosis y mejora la sobrevida a 5 años cuando se inicia el tratamiento en etapas iniciales, aunque aún los resultados son variables. ^{9,30,62,63}

Colchicina

La colchicina regula la inflamación evitando la polimerización de la tubulina y en consecuencia inhibiendo la migración de leucocitos y la fagocitosis. Por sus efectos antifibróticos en esclerodermia se utiliza en dosis de 0.6 mg dos veces al día con buenos resultados.

Calcitriol

1,25-dihidroxitamina D3, puede mejorar la esclerodermia localizada a través de sus efectos inmunomoduladores y por medio de la inhibición del crecimiento de fibroblastos y la síntesis de colágena. Se han reportado receptores de calcitriol en fibroblastos y linfocitos dérmicos. El calcitriol inhibe la diferenciación de las células B y la subsecuente producción de inmunoglobulinas, su uso sistémico debe ser monitoreado con calciuria para evitar el desarrollo de nefrocalcinosis.^{3,10} Además tiene un efecto inmunorregulador en la proliferación de linfocitos T cooperadores. En estudios comparados con placebo se ha reportado un porcentaje medio de mejoría del 46.6% para el placebo contra 59.9% para el calcitriol. Se recomienda en pacientes con enfermedad severa y progresiva por la probable presencia de efectos adversos como síndrome nefrótico, proteinuria, leucopenia o trombocitopenia, debiendo valorar por lo tanto el riesgo –beneficio.⁶⁴⁻⁶⁷

Calcipotrieno en ungüento

Ha sido utilizado para esclerodermia localizada que no responde a esteroides tópicos, sus efectos son a nivel del sistema inmune y de la síntesis de colágena, dicho efecto fue evaluado en un estudio abierto en pacientes con morfea tratados con el ungüento durante 3 meses. El resultado fue incipiente aunque se requiere de un estudio controlado para demostrar su eficacia; se han utilizado también combinaciones de calcipotriol-dipropionato de betametasona, con resultados variables.^{15,68}

Interferón gamma

Se ha usado en esclerodermia debido a su habilidad para inhibir la proliferación de fibroblastos y la producción de colágena, además de sus propiedades inmunomoduladoras. Sin embargo también incrementa la producción de glucosaminoglucanos y fibronectina. Se han realizado múltiples estudios en pacientes con esclerodermia con resultados variables, en la mayoría de ellos sin demostrar diferencia alguna comparado con placebo.^{15,57}

Imiquimod 5%

Es un fármaco inductor de INF-gamma el cual inhibe la proliferación de fibroblastos y la producción de colágena, únicamente se cuentan con serie de reporte de casos.⁶²

Fotoféresis

Aumenta el número de células T supresoras circulantes, estimula la producción de TNF- α que a su vez suprime los efectos del TFG- β e induce la expresión de colagenasa intersticial.

Radiación ultravioleta

La Radiación ultravioleta tiene efectos sobre la producción de citocinas y mediante el estímulo de la actividad de colagenasa.¹⁵ La UVA1 demuestra sus efectos mediante la expresión del ARNm específico de metaloproteinasas de matriz y la depleción de infiltrados de células T y de citocinas proinflamatorias como IL-1 y 6. No se han realizado ensayos controlados con el uso de esta terapia por lo que únicamente se cuenta con reportes de casos, el mayor de ellos con 12 pacientes cuya mejoría fue del 90% en las placas de menor tiempo de evolución y del 50% en aquellas en estadio de esclerosis. El principal efecto adverso fue la hiperpigmentación.⁶⁹⁻⁷⁶ Se ha reportado resultados similares con dosis bajas media y altas de UVA, UVA de banda estrecha, UVB y PUVA.

AGENTES INMUNOMODULADORES

Metotrexate

Su mecanismo de acción en esclerodermia se desconoce, es un antagonista del ácido fólico que inhibe el DNA, RNA y la síntesis de proteínas. Disminuye las concentraciones séricas de IL-6 y de IL-2 soluble en otras patologías.^{9,15} Se llevó a cabo un estudio en 34 pacientes tratados con pulsos intravenosos de metilprednisolona seguido por prednisona oral y finalmente un esquema en reducción de metotrexate, en 94% de los pacientes se detuvo la evolución de la enfermedad, en 16 pacientes se suspendió el tratamiento por considerarse que la enfermedad se encontraba inactiva; 44% de los pacientes tuvo recaída requiriendo reinicio del tratamiento, 2 de los pacientes presentaron como efecto adverso una diabetes mellitus-like. La combinación de corticoesteroides y metotrexate resulta ser una buena alternativa debiendo tomar las precauciones pertinentes limitando su uso a casos generalizados.⁷⁷

Ciclosporina A

Actúa mediante la inhibición de la transcripción del gen de IL-2, IL-3, INF- α , razón por la que se ha utilizado en algunos pacientes con morfea a dosis de 4-6 mg/kg.¹³

Antimaláricos

Hidroxicloroquina (200mg/día). Los fármacos antimaláricos han sido utilizados por sus efectos inmunomoduladores, aunque el mecanismo de acción aún no es comprendido totalmente. En los subtipos lineales y profundo, puede ser necesario un tratamiento agresivo que incluya esteroides sistémicos más antimaláricos. Otros fármacos modificadores de la enfermedad como ciclofosfamida o D-penicilamina pueden ser necesarios para controlar la inflamación.

Tacrolimus tópico al 0.1%

Induce regresión de las lesiones probablemente por su actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, ligadas a la inhibición de la activación de linfocitos T y a la reducción de la producción de citocinas inflamatorias; se cuenta únicamente con una serie de 7 casos con buenos resultados.⁷⁸

Glucocorticoides

Los esteroides de alta potencia han sido la “primera línea” de tratamiento para pacientes con esclerodermia en placas durante años, a pesar de que no existen estudios prospectivos ni controlados de su efectividad, se han usado en forma oclusiva, así como de manera intralesional con una frecuencia cada 3-4 semanas.⁶⁴

Los efectos antiproliferativos de los glucocorticoides en los fibroblastos son causados por una disminución en la tasa de mitosis, disminuyen la producción de la matriz extracelular, han mostrado inhibir la inflamación, la proliferación de fibroblastos y la fibrosis.^{9,70}

Los glucocorticoides tienen efectos pleiotrópicos, causando muchas reacciones adversas, como osteoporosis, retardo en el crecimiento, síndrome de Cushing, glaucoma, posterior a altas dosis de tratamiento sistémico o por periodos largos de exposición con terapia tópica o intralesional.^{70,79,80}

Tanto los esteroides sistémicos como tópicos pueden producir atrofia. Los factores que determinan el potencial atrofogénico de un glucocorticoide tópico son: su potencia, duración de la terapia, frecuencia de aplicación y otros factores aún desconocidos.^{70,81}

La presencia de efectos adversos es mayor con el uso de esteroides de mayor potencia y con una dosis que incrementa gradualmente, en tronco por ejemplo hasta 500 g en 6 meses, en cara con una aplicación de 20 g en un periodo de 6 meses puede ocasionar la presencia de telangiectasias y atrofia; por lo cual, la terapia por largo tiempo en los pacientes con esclerodermia a base de

glucocorticoides no se recomienda y nos obliga a buscar nuevas alternativas de tratamiento como las mencionadas previamente, de las cuales no se ha demostrado una eficacia completa.^{79,80,82-84}

ANTECEDENTES

El hallazgo principal en la esclerodermia localizada es el aumento de la actividad de los fibroblastos y su respuesta exagerada para la formación de proteínas de la matriz extracelular principalmente colágena tipo I y III. Para esta respuesta se han involucrado múltiples factores, de los cuales uno de los más estudiados hasta nuestros días es el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) conocido como una citocina profibrótica que induce la acumulación de la matriz extracelular por medio de la inhibición de las metaloproteinasas de matriz y del incremento de sus inhibidores^{70,86,87}, es una citocina multifuncional que regula el crecimiento, diferenciación y función de varios tipos de células, se encuentra abundantemente en plaquetas, macrófagos activados y linfocitos, su principal efecto sobre las células mesenquimales es la estimulación del depósito de la matriz extracelular. Los receptores de TGF- β se encuentran elevados en los fibroblastos de pacientes con esclerodermia localizada.^{55,87}

Se ha demostrado que el TGF- β 1 estimula la expresión de la colágena tipo I, III, VI y X, fibronectinas y proteoglicanos a través de los fibroblastos; modula los receptores de moléculas de adhesión de las células de la matriz y regula la producción de proteínas que pueden modificar la matriz extracelular por medio de su acción proteolítica, como el activador de plasminógeno (PA), un inhibidor del plasminógeno, o procolagenasa. Además el TGF- β es capaz de estimular su propia síntesis por los fibroblastos mediante autoinducción.^{55,56,86} Una vez que los fibroblastos se ponen en contacto con el TGF- β éste mediante 2 vías de señalización diferentes inicia la transcripción de los genes $\text{pro}\alpha$ 1 (I) y $\text{pro}\alpha$ 2(I) para la producción de colágena tipo I.

Otras de las citocinas estudiadas en gran medida son la IL-4 y la IL-6 que se consideran profibróticas y están elevadas en esclerodermia localizada tanto en suero como en las lesiones, así como moléculas de adhesión endotelial como VCAM e ICAM.

Glucocorticoides

Los medicamento utilizados en mayor medida en la esclerodermia localizada son los glucocorticoides que tienen como función principal disminuir la síntesis de colágena mediante mecanismos diferentes actuando en las principales vías fisiopatológicas de la esclerodermia como el TGF- β , esta disminución de la producción de colágena inducida por los glucocorticoides está regulada a nivel del núcleo por el TGF- β a través de la unión de éste con el complejo activador de proteína de TGF- β 1 el cual se une al promotor distal del gen α 1 de la colágena tipo I.^{6,87-89}

El gen de TGF- β 1 se autorregula a la baja mediante los glucocorticoides, probablemente a través de un GRE (elemento de respuesta a glucocorticoides) presente en el promotor del TGF- β 1.⁴⁷

Disminuyen también la expresión del gen de la colágena tipo III con un efecto más devastador que el encontrado con la tipo I, lo que refleja la situación de que la colágena tipo III es más sensible a los glucocorticoides comparada con la tipo I.^{43,90,91}

Los glucocorticoides afectan la síntesis de colágena de manera indirecta reduciendo la actividad de la prolil hidroxilasa o por medio de un incremento de la degradación de la colágena. La prolil hidroxilasa es una enzima importante en la síntesis de colágena que cataliza la formación de hidroxiprolina en colágenas por medio de la hidroxilación de residuos de prolina, a su vez la hidroxiprolina ayuda a dar estabilidad a la colágena por medio de la formación de uniones de hidrogeno.⁴³

Además de las colágenas, otras proteínas de la matriz extracelular se encuentran también afectadas, como los proteoglicanos cuyas funciones mayores son retardar la retención de agua y proveer el ensamble de las fibras de colágena (fibrinogénesis).

La decorina es un proteoglicano que inhibe la fibrinogénesis de las colágenas I y III, es inducida por los glucocorticoides.⁴³

El GR (receptor de glucocorticoides) puede interferir con factores de transcripción como AP-1 a través de una interacción directa sin unirse al DNA o mediante su unión a un GRE (elemento de respuesta a glucocorticoides).^{47,49}

Los glucocorticoides previenen la expresión de citocinas como el TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , que estimulan la expresión de factores quimiotácticos y de adhesión molecular incluyendo VCAM-I, ICAM-I. También inhiben directamente la expresión de quimiocinas inducidas por citocinas proinflamatorias y de esta manera interfieren con la atracción leucocitaria así como la activación de integrinas sobre la superficie de leucocitos.⁴⁸

Se ha demostrado que la dexametasona antagoniza los efectos fibrogénicos que incrementan la síntesis de proteínas de matriz extracelular así como también los niveles de ARNm de TIMP-1 y 2 están disminuidos.⁴⁷

La metilprednisolona disminuye la expresión del ARNm de las colágenas tipo I y III.⁸⁷ Estudios realizados con metilprednisolona intraarticular sugieren que es capaz de suprimir la síntesis de matriz extracelular, así como se ha observado con hidrocortisona que existe una supresión total de la síntesis de colágena cuando se administra por vía intraarticular.⁸¹

Los cambios patológicos descritos en el cartílago de articulaciones normales que fueron inyectadas con acetato de metilprednisolona o de betametasona incluyen: pérdida de la basofilia y disminución de la intensidad de la tinción de safranina, necrosis de condrocitos e hipocelularidad, disminución del contenido de proteoglicanos, de la síntesis de colágena, incremento del contenido de agua. Estos cambios degenerativos alteran la composición del cartílago articular y vuelve al cartílago más susceptible al daño mecánico in vitro e in vivo. Sin embargo, el mecanismo del daño causado por los esteroides, se desconoce.⁹²⁻⁹⁴

La disminución de la tensión y elasticidad en la piel se produce por una reducción en la síntesis y una inducción en el aumento de la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, que incluyen colágenas, proteoglicanos y elastina. Las

alteraciones en la dermis resultan principalmente de efectos de los glucocorticoides sobre el recambio de la matriz.⁴³

Los glucocorticoides tienen muchos efectos tóxicos in vivo y están contraindicados en muchos tipos de enfermedades. Se ha demostrado que los esteroides tienen efectos adversos tóxicos mediante la inhibición de proteínas no colagénicas.⁸⁷

Los glucocorticoides disminuyen la síntesis de pro colágena tipo I y III en la dermis y sugiere que la mayoría de los efectos adversos de estas drogas como atrofia de la piel se debe a la misma inhibición de la colágena.^{87, 95-97}

Toda la información con la que se cuenta con respecto al mecanismo de acción de la metilprednisolona sobre la matriz extracelular y las fibras de colágena se ha obtenido por estudios realizados en el campo de la ortopedia y traumatología, bajo este precepto y puesto que no se cuentan con estudios controlados de su empleo en pacientes con esclerodermia y pese a lo cual siguen siendo los fármacos más utilizados en esta enfermedad, se propone como un fármaco útil y como parámetro para poder medir la eficacia de nuevos medicamentos.

Colágena-Polivinilpirrolidona (PVP)

La Colágena-PVP es la mezcla irradiada por rayos gamma de colágena porcina atelopectídica tipo I y la polivinilpirrolidona (PVP) en una solución amortiguadora de citratos, que estabiliza el pH. En condiciones de cultivo a 37°C y pH neutro el biofármaco no forma un gel, como la colágena, y sus propiedades electroforéticas, fisicoquímicas y farmacológicas se encuentran modificadas por la unión covalente entre la proteína y la PVP.⁹⁸ Se ha demostrado tanto in vitro como in vivo que el compuesto actúa diferente de como lo hacen sus componentes por separado (colágena y PVP).

Este biofármaco tiene efectos moduladores sobre el metabolismo de la colágena y la expresión de citocinas pro-inflamatorias. La Colágena-PVP administrada por la vía intramuscular, cutánea o subcutánea se metaboliza de la misma manera que la colágena endógena, principalmente por medio de las colagenasas. Los péptidos

generados son rápidamente metabolizados por las enzimas gelatinasas y posteriormente por otras enzimas inespecíficas, dando como subproductos oligopéptidos y aminoácidos libres. Dada su antigenicidad característicamente baja, se considera un material inmunológicamente inocuo, excepto en pacientes que manifiestan hipersensibilidad a la proteína (IPP). Por su parte, la PVP ha sido ampliamente utilizada en muchas formulaciones farmacéuticas, de alimentos, cosméticos, etc. Debido a su naturaleza (homopolímero de N-vinil-2-pirrolidona) biológicamente inerte. Existe un gran número de datos experimentales que fundamenta su seguridad e inocuidad. La PVP empleada para la fabricación de la Colágena-PVP es de bajo peso molecular, por lo que no induce la formación de granulomas y se excreta por vía renal (95%) en un periodo menor a 24 horas. No se han reportado efectos adversos por la administración intravenosa como expansor de plasma o post-administración de grandes cantidades vía oral, subcutánea o intramuscular.

Estudios de bioseguridad y farmacovigilancia

Los análisis clínicos y pruebas de laboratorio en voluntarios sanos y pacientes de cicatrices hipertróficas o esclerodermia, muestran que la citología hemática, el examen general de orina y el perfil hepático permanecen sin alteraciones aun después de largos periodos de empleo de la Colágena-PVP. También, se ha demostrado que el biofármaco no produce fibroproliferación, ni linfoproliferación y no tiene efectos genotóxicos o mielotóxicos.⁹⁹

No se ha observado la inducción de anticuerpos anti-colágena, anticolágen-PVP, anti ribonucleoproteínas o anti-DNA de doble cadena con el uso de colágena-PVP por periodos mayores a 12 meses.⁹⁹

La eficacia del biofármaco se ha demostrado en la resolución de padecimientos fibrosantes dérmicos, como las cicatrices hipertróficas en humanos, la aplicación intralesional en dosis de 0.2 ml por cada 5 cm de cicatriz, de forma semanal durante un período máximo de 6 meses eliminó la sensación urente, el prurito, el dolor, el exceso de tejido fibroso en la cicatriz y restableció la normocromía.

Histológicamente, se observó menor cantidad de haces gruesos de colágena tipo I, recuperación de colágena tipo III de la dermis papilar, arreglo de las fibras de tejido conjuntivo semejante al de la piel normal, disminución del infiltrado celular y corrección del contorno epidérmico. Esto incluye la presencia de anexos cutáneos (glándulas sebáceas y folículos pilosos) y rearrreglo en la disposición de las fibras de colágena y elastina, el cual es similar al de la piel normal.¹⁰⁰

Inmunohistoquímicamente, se determinó que algunas citocinas pro-inflamatorias/fibrogénicas (IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 y PDGF) y moléculas de adhesión (ELAM-1 y VCAM-1) se expresaban abundantemente en el tejido de las cicatrices hipertróficas sin tratamiento, no así en las tratadas con el biofármaco cuyos niveles fueron similares a los de la piel normal.¹⁰⁰

El efecto modulador de la inflamación por la Colágena-PVP también fue observado en las lesiones cutáneas de esclerodermia, ya que las placas tratadas con 0.2 ml del biofármaco/semana durante 3 meses, mejoraron su textura y apariencia. Histológicamente, se observó la remodelación del tejido fibroso que permitió el restablecimiento de la proporción de las colágenas tipos I y III, la recuperación de la colágena tipo III de la dermis papilar, se conservó el contorno epidérmico y además, se presentaron anexos cutáneos. Inmunohistoquímicamente, se determinó que la Colágena-PVP reguló negativamente la expresión de IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, ELAM-1 y VCAM-1.¹⁰¹

Estudios pre-clínicos en fracturas y clínicos en pseudoartrosis

En las fracturas producidas en ratas la aplicación de Colágena-PVP induce la síntesis de osteopontina y osteonectina (proteínas que participan en la mineralización), mejorando la calidad de la reparación y acelerando la formación y consolidación ósea.^{98,102,103} La Colágena-PVP estimula rápidamente la formación del callo fibroso y disminuye el dolor de la extremidad lesionada. Mejora el tono y la fuerza muscular del miembro afectado.¹⁰⁴

Estudios in vitro en Artritis Reumatoide (AR)

En cultivos por duplicado de fragmentos de sinovia de 10 pacientes con AR y de 5 individuos sanos, tratados sin o con Colágena-PVP al 1% durante 7 días, la Colágena-PVP incrementó 1.7 veces la colágena tipo III de forma tiempo dependiente. La expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-8, así como de ICAM-1, VCAM-1 y Cox-1 fue regulada negativamente en un 40 a 50% con respecto a los controles, mientras que la del TIMP-1 y Fas/Apo95 se incrementó de 1.5 a 2 veces en la sinovial tratada con Colágena-PVP versus los cultivos de los controles. La apoptosis se aumentó 2.5 veces en los vasos sanguíneos de los cultivos tratados. En los sobrenadantes de los cultivos tratados la actividad colagenolítica, la concentración del TIMP-1, así como de IL-1 β y TNF- α se encontró disminuida a niveles estadísticamente significativos. Lo anterior sugiere que la adición de Colágena-PVP a los cultivos de tejido sinovial de pacientes con AR induce la regulación negativa de algunas citocinas pro-inflamatorias e incrementa la apoptosis de las células sinoviales. ^{105,106}

Estudio preclínico del efecto de la Colágena-PVP en un modelo de artritis inducida por colágena (CIA).

El objetivo del trabajo fue el de evaluar el efecto de la aplicación subdorsal de la Colágena-PVP en un modelo murino de CIA. Los ratones fueron tratados dos semanas después de la inducción con 100 μ g de Colágena-PVP, por semana durante un mes. Mediante FACS se determinó el porcentaje de las poblaciones de células Th1, Th2, Treg y Th17. La incidencia de CIA fue de 100% al día 28. El análisis clínicomorfológico mostró que la Colágena-PVP reguló negativamente la inflamación y la destrucción articular vs. placebo ($p < 0.05$). El análisis histológico demostró que en el grupo con CIA la erosión ósea, el pannus y la degradación del cartílago articular era intensa y correlacionaba con el grado de inflamación. Mientras que los ratones tratados con Colágena-PVP presentaban una arquitectura tisular normal. La Colágena-PVP moduló las proporciones de células Th1, Treg y Th17 sin producir modificación de las Th2. Conclusiones. La

Colágena-PVP ejerció un efecto antiinflamatorio inhibiendo el daño articular en el modelo de CIA sin producir efectos adversos.¹⁰⁷

Estudio piloto de seguridad y eficacia del uso de Colágena-PVP aplicada por vía subcutánea en pacientes con artritis reumatoide (No Ref del CIIBH: 981)

Las proteínas exógenas han demostrado ser de utilidad terapéutica en la AR, puesto que su adición en cultivos de linfocitos T es capaz de modular su respuesta y la administración oral de colágena tipos I, II ó III regula el sistema inmune periférico en pacientes con AR y por tanto la inflamación. Debido a lo anterior y a los resultados encontrados in vitro con la Colágena-PVP, el objetivo del estudio fue determinar si la aplicación de ésta vía subcutánea tenía alguna eficacia clínica y si era segura y bien tolerada por los pacientes con AR.

El estudio incluyó a 10 pacientes con AR activa. Los pacientes bajo dosis estables de metotrexate y/o AINES fueron tratados durante 3 meses con administración subcutánea semanal de 0.2 ml de Colágena-PVP (1.66 mg de colágena) en las 8 articulaciones más dolorosas. Los resultados mostraron que los pacientes toleraron bien el tratamiento con Colágena-PVP. La respuesta a la terapéutica mostró una mejoría estadísticamente significativa ($p < 0.05$) No hubo cambios en los parámetros serológicos ni sanguíneos. En conclusión, la Colágena-PVP mostró ser un biofármaco eficaz y seguro en el tratamiento a corto plazo de la AR, es decir, confirmamos in vivo los efectos anti-inflamatorios observados previamente in vitro. La Colágena-PVP es un coadyuvante efectivo en el tratamiento de la AR y no produce efectos adversos.¹⁰⁸

Estudio doble ciego del uso de Colágena-PVP aplicada por vía intramuscular comparada con placebo en pacientes con artritis reumatoide (No. Ref. CIIBH: 1198, IRE 101-03/04-1, SALUD-2002-C01-7421)

Con el estudio anterior se demostró que la Colágena-PVP administrada por vía subcutánea (supracapsular) en la articulación en pacientes con AR era segura y clínicamente eficaz en el tratamiento a corto plazo. Por lo que el objetivo del estudio era determinar si la Colágena-PVP administrada por vía intramuscular

también tenía eficacia clínica en los pacientes con AR versus el placebo a largo plazo. Incluyó a 30 pacientes con AR activa de acuerdo a los criterios del ACR. Los pacientes que en los 3 meses previos al estudio estuvieran bajo dosis estables de metotrexato fueron tratados durante 6 meses por vía intramuscular de acuerdo al esquema de Freyberg con 2.0 ml de Colágena-PVP (3.33 mg de colágena) ó 2.0 ml de placebo (fase de tratamiento). Posteriormente todos los pacientes fueron evaluados bimestralmente durante 6 meses (fase de farmacovigilancia), tiempo en el cual no se administró ni Colágena-PVP, ni placebo. El grupo de pacientes que recibió el principio activo toleró bien el tratamiento y mostró una mejoría estadísticamente significativa ($p < 0.05$) versus el placebo en el número de: articulaciones inflamadas, articulaciones dolorosas, rigidez matutina, HAQ-DI , ACR20, ACR50, ACR70, PCR y factor reumatoide. No se presentaron reacciones adversas en ningún paciente del grupo placebo o tratado con Colágena-PVP. Basados en los resultados anteriores se concluyó que, la Colágena-PVP es un biofármaco eficaz, seguro, de bajo costo y de fácil administración ya que no requiere de hospitalización por lo que podría ser de utilidad como un coadyuvante biológico en la terapia de la AR. ¹⁰⁹

Estudio comparativo doble ciego de la eficacia del uso de colágena-polivinilpirrolidona (colágena-pvp) vs. placebo, aplicado por vía intrarticular en pacientes con osteoartrosis de rodilla (CONACyT SALUD-2002-C01-127/B1 y CONACyT SALUD 2004-01-065)

El objetivo del trabajo fue el de evaluar el efecto in vitro e in vivo de la Colágena-PVP en pacientes con Osteoartrosis (OA) de rodilla. Incluyó a 53 pacientes con OA de rodilla, fueron aleatorizados en dos grupos y tratados con 12 inyecciones intraarticulares (IA) de 2 ml de Colágena-PVP (16.6 mg de colágena) (n=27) ó 2 ml de placebo (n=26) durante 6 meses (fase de tratamiento). Posteriormente todos los pacientes fueron evaluados trimestralmente durante 6 meses, tiempo en el cual no se administró Colágena-PVP o placebo (fase de fármacovigilancia). Los pacientes tuvieron una mejoría estadísticamente significativa de los criterios primarios y secundarios ($p < 0.05$) en el grupo tratado con Colágena-PVP versus

las determinaciones basales y versus el grupo placebo a los 6 y 12 meses . No hubo cambios en la BH, PFH y EGO. Las reacciones adversas fueron el dolor en el sitio de la inyección durante 12 a 24 h y en 2 pacientes (7%) del grupo tratado con Colágena-PVP se desarrolló artritis química. In vitro, la Colágena-PVP indujo un incremento de 3 a 6 veces la concentración de los proteoglicanos altamente sulfatados, COMP, colágena tipo II, IL-10 y de la proliferación de los condrocitos (antígeno Ki-67) y reguló negativamente la IL-1 β y el TNF- α La Colágena-PVP tiene un excelente perfil de eficacia clínica, bioquímica y de seguridad cuando se aplica por vía intraarticular. Actúa modificando el curso de la enfermedad cuando se aplica por vía IA. Así la Colágena-PVP induce la proliferación de condrocitos, regula positivamente la expresión y la síntesis de proteoglicanos altamente sulfatados, colágena tipo II, COMP e IL-10 y negativamente las citocinas pro-inflamatorias, particularmente IL-1 β y TNF- α .¹¹⁰⁻¹¹²

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Presenta el tratamiento con colágena–PVP menores efectos adversos y que tan efectivo es cuando se compara con metilprednisolona de depósito en el tratamiento de la esclerodermia localizada?

No existen guías para estandarizar el tratamiento de los pacientes con esclerodermia localizada. Recientemente Cochrane está realizando una, la cual se encuentra publicada en fase de protocolo.¹¹³

La esclerodermia es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida, caracterizada por depósito de colágena y otras proteínas de matriz extracelular. Debido a que la etiología es desconocida es difícil definir una estrategia terapéutica efectiva. La esclerodermia es de larga evolución y puede involucrar grandes áreas de la piel así como causar según su topografía complicaciones como limitar la movilidad articular; en la variedad de golpe de sable puede evolucionar a un Síndrome de Parry Romberg, caracterizado por atrofia hemifacial que puede llevar a complicaciones serias. Por otra parte, los medicamentos efectivos para el tratamiento de esta patología son utilizados por períodos largos, lo que incrementa el número de efectos adversos, limitando su empleo y aumentando el riesgo-beneficio.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente los glucocorticoides son los fármacos más utilizados en la esclerodermia localizada. Sus efectos adversos incluyen desde la presencia de corticodaño localizado a piel manifestado por atrofia (más frecuente, 90%) y telangiectasias hasta efectos sistémicos como síndrome de Cushing, glaucoma y retraso en el crecimiento (cuando se utiliza en pacientes jóvenes). Dichos efectos pueden variar en gravedad, dependiendo de factores como la vía de administración, la dosis administrada, así como el tiempo que sea administrado el fármaco, la superficie corporal afectada, es directamente proporcional a la dosis del fármaco, etc. Los glucocorticoides prácticamente inhiben los factores asociados con la patogenia de la enfermedad (hasta 97%), por lo que lejos de inducir una homeostasis tisular, evitan la reparación e inducen otro tipo de patologías produciendo efectos adversos importantes, tal como se demuestra en el trabajo realizado por Furuzawa-Carballeda y cols., primer estudio piloto que compara la efectividad en la mejoría clínica de esclerodermia de glucocorticoides comparados con colágena-PVP, en el que se demostró una mejoría del 97% con glucocorticoides y del 45% con colágena-PVP.¹¹⁴

Por lo anterior se sugiere el empleo de la Colágena-PVP ya que este biofármaco es un modulador negativo de algunas citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-8 y TNF- α , TGF- β), moléculas de adhesión y proteasas, induce la regeneración tisular y regula el recambio de la matriz extracelular, particularmente de colágena. Se ha reportado que el efecto modulador negativo puede ser de un 45%, lo que sugiere que el biofármaco no inhibe los factores que finalmente son importantes para recuperar la homeostasis tisular como lo hacen los corticoides. La Colágena-PVP no produce los efectos adversos que inducen los glucocorticoides los cuales pueden ser irreversibles y además permite recuperar en parte la estructura tisular incluyendo los anexos cutáneos como los folículos pilosebáceos las glándulas sudoríparas, tendiendo como único efecto adverso el dolor que puede ocasionar durante la aplicación, mismo que es pasajero tolerable (menor a 5 minutos) y el cual puede disminuir ante una correcta técnica de aplicación.

OBJETIVOS

Objetivo Primario:

a) Evaluar el efecto clínico e histológico así como los efectos adversos de la colágena-PVP comparada con metilprednisolona de depósito en el tratamiento de pacientes con esclerodermia localizada.

Objetivos secundarios:

a) Caracterizar las subpoblaciones de linfocitos T y células dendríticas en la sangre periférica.

b) Determinar si la esclerodermia localizada es una enfermedad de tipo Th17 y si esta subpoblación celular es regulada post-administración de colágena-PVP.

c) Determinar el grado de mejoría clínica de los pacientes de acuerdo a la escala de Rodnan en el grupo tratado con colágena-PVP y en el grupo tratado con metilprednisolona de depósito.

d) Determinar por citometría de flujo (FACS) el perfil de citocinas intracelular producidas por los linfocitos T CD4+ de sangre periférica [Th1(IFN- γ)/Th2(IL-4)/Th17(IL-17)/Treg(FoxP3)].

e) Evaluar por inmunohistoquímica el contenido de células Treg y Th17 en biopsias de lesiones cutáneas de esclerodermia localizada.

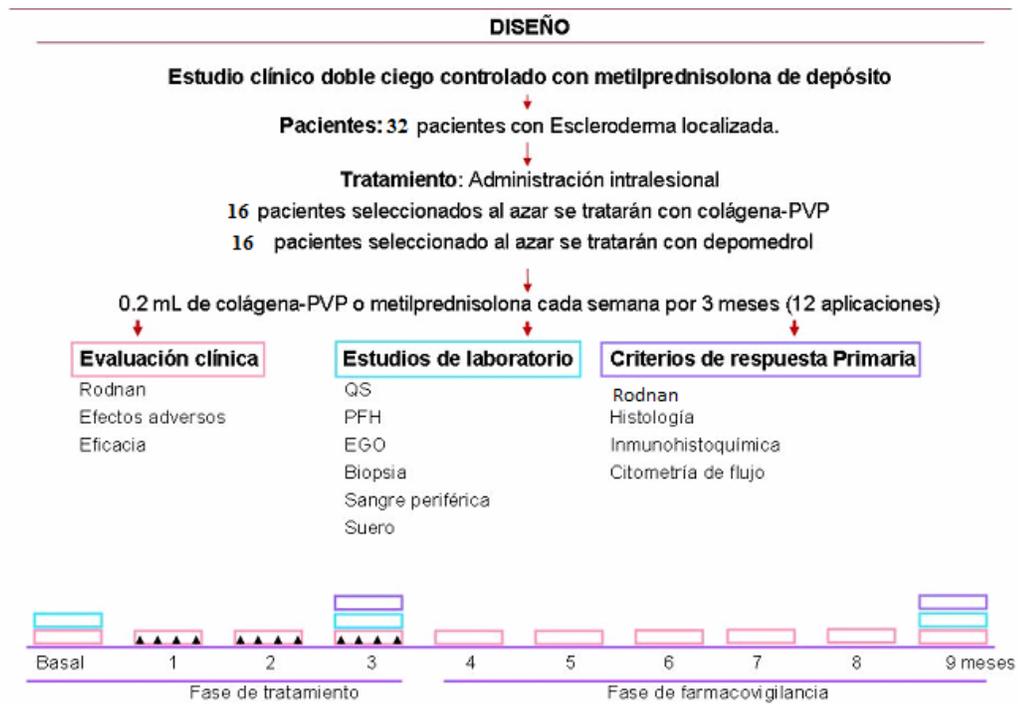
f) Evaluar por inmunohistoquímica el contenido de TGF- β 1 en biopsias de lesiones cutáneas de esclerodermia localizada

HIPÓTESIS

El tratamiento de la de esclerodermia localizada con colágena-PVP tendrá un menor número de eventos adversos y menor efecto antifibrótico comparado con el tratamiento a base de metilprednisolona de depósito.

DISEÑO

Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego paralelo comparado con metilprednisolona de depósito (Fig. 11).



Análisis estadístico: ANOVA de una vía, Holm-Sidak; $p < 0.05$

Figura 11. Diseño metodológico del estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Pacientes de primera vez y subsecuentes de 17 a 70 años de edad con diagnóstico de esclerodermia localizada confirmado por histología, que acuden a la consulta del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”, sin importar que hayan recibido o no tratamiento tópico o sistémico previamente.

Criterios de inclusión

- Se incluirán pacientes con diagnóstico clínico de esclerodermia localizada y confirmada por histología en estadio de esclerosis, de por lo menos 5 cm de diámetro.
- Pacientes entre 17 y 70 años de edad
- Pacientes que acepten firmar consentimiento informado
- Pacientes con disponibilidad de tiempo para acudir semanalmente a la aplicación del tratamiento

Criterios de no inclusión

- Pacientes con antecedentes de cáncer, linfomas o tratamiento con quimioterapia
- Pacientes con diabetes mellitus u otra enfermedad crónico-degenerativa descontrolada
- Pacientes con tratamiento sistémico durante los 2 meses previos al inicio del estudio
- Pacientes con tratamiento tópico o sistémico para esclerodermia durante 1 mes previo al inicio
- Pacientes con hipersensibilidad a los medicamentos
- Pacientes sin método de planificación familiar

Tamaño de la muestra

No existen guías de tratamiento ni estudios controlados para esclerodermia localizada, únicamente contamos con un estudio piloto realizado con esteroides intralesionales vs. colágena-PVP. Tomando en cuenta que el principal factor fibrogénico en esta enfermedad es el TGF-β1, se ha considerado pertinente evaluar la efectividad de ambos medicamentos considerando la regulación negativa más no la inhibición de los parámetros inflamatorios, misma que se ha reportado del 45.5% en los pacientes con colágena-PVP y del 97.3% con esteroides de depósito se espera un valor de Δ mínimo del 51.9%

Así utilizando la fórmula de Comparación de dos proporciones:

$$n = \frac{\left[Z_{\alpha} * \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta} * \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Tenemos:

n = sujetos necesarios en cada una de las muestras

Z_α = Valor Z correspondiente al riesgo deseado, 1.960

Z_β = Valor Z correspondiente al riesgo deseado, 0.842

p₁ = Valor de la proporción en el grupo de referencia: 0.973

p₂ = Valor de la proporción en el grupo del nuevo tratamiento: 0.454

p = Media de las dos proporciones p₁ y p₂, 0.713

Se requieren estudiar 13 pacientes. Sin embargo, calculando un 20% de pérdida durante el seguimiento se propone estudiar 16 pacientes por grupo.

Duración del estudio:

Seguimiento de los pacientes: 12 semanas (3 meses) de aplicación de medicamento y 24 semanas (6 meses) de farmacovigilancia dando un total de 36 semanas (9 meses) de seguimiento total.

Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio: Aleatoria

Criterios primarios de mejoría

Mejoría clínica. Consiste en valorar mediante la escala modificada de Rodnan³⁰ la capacidad de pellizcar la piel y de esta forma de manera indirecta evaluar la disminución de la esclerosis. Se valora la puntuación de la escala que de acuerdo a la mejoría debe ir disminuyendo. Se valorarán también las placas que no reciben tratamiento para poder evaluar el efecto a distancia que los fármacos puedan tener. Dicha valoración será realizada por un médico de la clínica de enfermedades colágeno-vasculares del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” de manera ciega cada mes hasta concluir el estudio.

Escala de Rodnan modificada**Escala de engrosamiento:**

0 = Piel normal

1 = Piel con engrosamiento leve pero definitivo

2 = Piel con engrosamiento leve-moderado

3 = Piel con engrosamiento severo

La afectación de cada parte del cuerpo se mide igualmente con una escala de 3 donde:

0= sin afectación

1= 33% de afectación

2= 33-67% de afectación

3= 67% o más de afectación

Dividiendo al cuerpo en:

1= Cabeza y cuello

1=Tórax

1= Abdomen

2=Brazos

2=Antebrazos

2= Manos

2= Dedos manos

2= Muslos

2=Piernas

2=Pies

Mejoría de la arquitectura tisular

La evaluación histológica de la arquitectura tisular se llevará a cabo en los tejidos teñidos con hematoxilina y eosina y PAS de las biopsias basales y post-tratamiento de manera ciega por un dermatopatólogo del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”. Los criterios de mejoría a considerar serán los siguientes:

- 1) Presencia de anexos cutáneos (folículos pilosebáceos y glándulas sudoríparas)
- 2) Disminución de infiltrado linfohistiocitario (dato de actividad de la enfermedad).

De manera secundaria se puede considerar:

- 3) Ausencia de atrofia (disminución de todas las capas de la epidermis)
- 4) Disminución de homogeneización de fibras de colágena

Mejoría de los parámetros inflamatorios

Disminución de al menos un 45% en el número de células Th17 de sangre periférica, así como la expresión de IL-17 en la piel con respecto a la basal.

INTERVENCIÓN (TRATAMIENTO)

El estudio será prospectivo, doble ciego y comparado con metilprednisolona de depósito. Se incluirán 32 pacientes con esclerodermia localizada con una lesión de al menos 5 cm los cuales se dividirán de manera aleatoria en 2 grupos:

- a) Tratados con metilprednisolona de depósito
- b) Tratados con colágena-PVP

Un tercer grupo estará integrado por los pacientes sanos y que servirá como control en los cuales se realizarán las mediciones de citocinas en suero para tener un valor basal y comparativo.

Los pacientes serán tratados con 0.2 ml (1.6 mg) de colágena-PVP por cada 5 cm de superficie cutánea enferma empleando como dosis máxima 1 ml por semana durante 3 meses; o bien 0.1 ml de metilprednisolona de depósito, con un centímetro de distancia entre cada inyección sin exceder una dosis de 20 mg (0.5ml) la cual se administrará cada 4 semanas, alternando con aplicaciones semanales (en total 3 aplicaciones mensuales) del vehículo de la colágena-PVP (amortiguador de citratos).¹¹⁴ De esta manera todos los pacientes independientemente del grupo de tratamiento al que fueron asignados acudirán de manera semanal a aplicación de medicamento durante 3 meses.

La farmacovigilancia se llevará a cabo durante los 6 meses posteriores a la última aplicación.

La obtención de muestras biológicas: sangre periférica y suero se llevará a cabo en la visita basal (semana 0), una semana después de la última aplicación (semana 13) y al finalizar el periodo de la farmacovigilancia (semana 37).

Las biopsias se obtendrán en la visita basal y en la última visita del periodo de farmacovigilancia (semana 37).

La evaluación de la eficiencia terapéutica de la colágena-PVP vs. la metilprednisolona de depósito se determinará por medio de la escala de Rodnan, de la arquitectura tisular y de la presencia de IL-17 en el tejido y del porcentaje de células Th17 de sangre periférica.

VARIABLES DE EVALUACIÓN

Definición de esclerodermia localizada: la esclerodermia localizada es una enfermedad autoinmune que clínicamente se caracteriza por presentar placas eritematosas que progresan a esclerosis y borde color eritematovioláceo (dato clínico de actividad de la enfermedad) bien definidas de tamaño variable y finalmente progresan a hiperpigmentación residual acompañada de atrofia, afecta cualquier topografía siendo las más frecuentes, tronco extremidades y cabeza.

(tabla 2)

Tabla 2: Variables de estudio

Variables de estudio				
Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Escala	Unidad de Medida
efectos adversos	Respuesta a un fármaco que es nociva o tóxica y se produce a dosis utilizadas normalmente en el hombre para la profilaxis, diagnóstico o	Evaluated según la escala análoga visual aplicada a los pacientes y a los cuestionarios aplicados a lo largo del estudio, tanto locales como pueden ser prurito, ardor, dolor, eritema, atrofia, telangiectasias, como sistémicos incluyendo fiebre, cefalea, malestar general, nauseas, vómito.	Cualitativa nominal	Si No

	tratamiento de una enfermedad			
Disminución de la esclerosis	Aumento de la capacidad de pellizcar la piel por disminución del engrosamiento	<p>Clínica:</p> <p>Es la disminución en la severidad de la esclerosis evaluada con la escala modificada de Rodnan, la cual se evalúa según la respuesta con disminución del grado que puede cambiar de un grado 3 a un grado 0</p> <p>Histología:</p> <p>Esta disminución de la esclerosis se deberá corroborar mediante el estudio histopatológico comparándola con los resultados al inicio del estudio.</p>	Cualitativa ordinal	<p>Clínica:</p> <p>0 = piel normal</p> <p>1= piel con engrosamiento leve</p> <p>2= piel con engrosamiento moderado</p> <p>3= piel con engrosamiento severo</p> <p>Histología:</p> <p>0=Homogeneización de la colágena leve</p> <p>1= Homogeneización de la colágena moderada</p> <p>2= Homogeneización de la colágena severa</p>
Efectividad	Grado en que una determinada intervención sanitaria o procedimiento logran lo que se pretende conseguir en una población determinada	Se evalúa en base a la respuesta observada con ambos tratamientos aplicados durante 3 meses y con un periodo de farmacovigilancia de 6 meses, duración total de evaluación de 9 meses	Cualitativa ordinal	<p>0 = piel normal</p> <p>1= piel con engrosamiento leve</p> <p>2= piel con engrosamiento moderado</p> <p>3= piel con engrosamiento severo</p>
Variables de la enfermedad				
Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Escala	Unidad de Medida
Porcentaje de superficie corporal	Se refiere a la superficie corporal afectada ya sea con una placa o múltiples	Se considera la topografía en que se presentan las placas registrándolas para el seguimiento, se aplica la	Cualitativa Ordinal	Escala modificada de Rodnan:

afectada	placas.	escala de Rodnan modificada para evaluar un total máximo de 42 puntos dividiendo al cuerpo en 17 regiones diferentes.		<p>Evalúa que porcentaje de cada área está afectada:</p> <p>0= sin afectación</p> <p>1= 33% afectación</p> <p>2=33-67% de afectación</p> <p>3= 67% o más de afectación</p>
Tiempo de evolución de la esclerodermia localizada	Evalúa el tiempo transcurrido entre el inicio de la aparición de las placas y la primera vez que el investigador lo valora	Se registra en años transcurridos desde el inicio de la enfermedad hasta la primer entrevista con el investigador	Cuantitativa discreta	<p>1) Menos de 1 año</p> <p>2) 1 años</p> <p>3) 2 años</p> <p>4) 3 años</p> <p>5) 4 años</p>
Actividad de la enfermedad	Se refiere a la aparición de nuevas placas, o bien a la aparición del anillo eritematovioláceo en la periferia de las placas o al incremento del tamaño de las mismas	Se registra según los datos proporcionados por el paciente, y de la exploración clínica del paciente en el transcurso del estudio	Cualitativa nominal	<p>Si</p> <p>No</p>
Variables Demográficas				
Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Escala	Unidad de Medida
Edad	Tiempo que una persona ha vivido desde su nacimiento.	Edad en años al inicio del estudio	Cuantitativa continua	Años
Sexo	Fenotipo expresado por el genotipo de una persona	Se registra en base al sexo	Cualitativa nominal	<p>Femenino</p> <p>Masculino</p>

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS

Se solicitará el envío a los investigadores de pacientes con diagnóstico clínico e histológico de esclerodermia localizada vistos por primera vez o subsecuentes en consulta externa así como en la clínica de enfermedades colágeno-vasculares con edades comprendidas entre 17 y 70 años de edad del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”.

Una vez reclutados los pacientes se explicará ampliamente el estudio a realizar y se solicitará su participación en el mismo.

Toda vez que el paciente acepte participar en el estudio se firmará la carta consentimiento de la cual se entregará una copia al paciente y una se anexará al expediente.

Se realizará una historia clínica y exploración física completa para seleccionar a los pacientes en función de los criterios de inclusión y de exclusión descritos previamente.

Se distribuirá de manera aleatoria a los pacientes a cada uno de los grupos de estudio.

El tratamiento será administrado de forma ciega para el paciente y el médico.

En la visita 0 se tomará la biopsia basal con un sacabocados de 4mm, muestra de sangre 10 ml y se realizará una prueba de intradermorreacción con colágena-PVP misma que se leerá a las 48 horas, registrando los hallazgos encontrados.

Los 10 ml de sangre tomados a cada paciente se utilizarán para realizar la citometría de flujo con el fin de cuantificar las subpoblaciones de linfocitos T.

La biopsia de piel se congelará en nitrógeno líquido y se realizarán cortes por congelación para la determinación por inmunohistoquímica de IL-17A (Th17), de Foxp3 (Tregs) y TGF- β 1.

Se tomarán controles fotográficos en la semana 0 y cada mes, fecha en la cual también se llenarán cuestionarios tanto por el paciente como por el evaluador, para valorar la mejoría clínica.

Los pacientes serán tratados con 0.2 ml de colágena-PVP (1.6 mg de colágena) por cada 5 cm de lesión cutánea empleando como dosis máxima 1 ml, por semana durante 3 meses, o bien con 0.1ml por área entre las cuales se dejará 1 cm de distancia con una dosis máxima por aplicación de 5ml la cual se administrará cada 4 semanas alternando con administración del vehículo (amortiguador de citratos) el resto de las semanas (3) durante 3 meses, mediante vía subcutánea y con una jeringa de insulina.

Al final del tratamiento (13 semanas) y al final del periodo de farmacovigilancia (semana 37) se tomarán muestras de sangre y se realizará el registro fotográfico y solo en la semana 37 se obtendrá una biopsia de la placa tratada.

Determinación de las subpoblaciones de células Th1 (CD4+/ IFN- α +), Th2 (CD4+/ IL-4+), Th17 (CD4+/ IL-17+), T reguladoras (CD4+/Foxp3+) en células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) por FACS

De las muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA al 2% se aislarán las células mononucleares mediante un gradiente de densidad con lymphoprep. Se tomarán 50 μ L para cada prueba, a éstos se adicionaran 5 μ L del anticuerpo anti-CD4-PeCy y 5 μ L del anti-CD14-FITC (BD Biosciences, San Diego, CA;). Las muestras se incubaran durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente las muestras se lavarán una vez con 1.0 mL de PBS 0.05 M, pH 7.2-7.4, centrifugando a 1500 rpm, durante 5 minutos y se adicionarán 200 μ L de la solución Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA. No. Cat. 554714) incubando durante 20 min en hielo y en oscuridad. Se adicionará 1 mL de solución de lavado (permwash diluida 1 mL del concentrado en 9 mL de agua destilada) y se centrifugarán durante 8 min a 1500 rpm. Se aspirara el sobrenadante totalmente y se adicionarán 50 μ l de solución de lavado y 7 μ l del anticuerpo anti-IFN- γ -PE, anti-IL-17A-PE, anti-IL-4-PE y anti-Foxp3-PE. Las células se incubarán

durante 30 min en hielo y en oscuridad. Las células se lavarán con 1.0 mL de la solución de lavado y se centrifugarán durante 5 min a 1500 rpm. Se eliminará el sobrenadante y las células se resuspenderán en 0.5 mL de paraformaldehído al 3% en PBS. Las muestras se evaluarán en un citómetro FACScan empleando el programa Cell Quest para su análisis. Se adquirirán al menos 50000 eventos y se analizarán realizando una ventana para la subpoblación de linfocitos empleando el programa CellQuest.

Inmunohistoquímica para determinar la expresión de IL-17A y células Foxp3

Para determinar la producción de IL17-A y Foxp3 se utilizará la técnica inmunohistoquímica. Para la técnica de inmunoperoxidasa se emplearon cortes de tejido embebidos en parafina. Los tejidos hidratados se incubaron con una solución de H₂O₂ al 3 % (JT Baker) durante 20 min. Los sitios de pegado inespecífico se bloquearon con un suero no relacionado (Santa Cruz, CA) durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los tejidos se incubaron durante 18 h a 4°C con el anticuerpo primario, una inmunoglobulina monoclonal de tipo IgG/k preparado en ratón IL-17A o anti-Foxp3 humanos a una concentración de 10 µg/ml (Santa Cruz, CA). Se empleó el anticuerpo secundario biotinado correspondiente y los tejidos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación se empleó el complejo avidina-peroxidasa (VECTASTAIN Elit ABC Kit, Vector Lab), con el que se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se desarrolló en 10 min, empleando una solución de 6 mg de diaminobencidina en 10 ml de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4 y 10 µl de H₂O₂ que produce un precipitado color sepia en las células inmunorreactivas. Las muestras se contratiñeron con hematoxilina de Harris durante 10 min, se deshidrataron con alcohol y xileno y finalmente se montaron con resina. Durante el ensayo se corrió un control negativo en el que se sustituyó el primer anticuerpo por uno no relacionado (suero normal de caballo diluido 1:100) y un blanco de reactivos en el que se reemplazó el anticuerpo primario por albúmina de huevo al 3% en PBS 0.01 M, pH 7.4. Al menos 2 secciones de 2 diferentes tejidos fueron analizadas en cada paciente en un análisis ciego. La expresión de las moléculas

analizadas se reportó determinando el número de células inmunorreactivas al anticuerpo de un total de 400 células a lo largo de un campo (16X) elegido al azar. La cuantificación se realizó de forma automatizada empleando el programa analizador de imágenes Image-Pro Plus 5.1. Los valores representan el promedio del porcentaje de las células inmunorreactivas + error estándar (E.S.)

Análisis estadístico

Se calculó el tamaño de muestra con la fórmula para calcular una muestra para proporciones, considerando un 20% de tasa de pérdidas. Para el análisis primario, las medias de las puntuaciones serán comparadas entre los dos grupos de tratamiento con intención a tratar (IAT) (todos los pacientes que recibieron una dosis del medicamento en estudio y tuvieron al menos una eficacia observada a lo largo del tratamiento). Para el análisis estadístico se utilizará el programa SigmaStat3.2 por el Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks y por el método Holm-Sidak para los procedimientos de comparación múltiple. Los resultados se expresarán como media \pm E.S. Los valores de P menores o iguales a 0.05 serán considerados como significativos.

Estudios con riesgo.

Ninguno.

Métodos de detección de eventos secundarios

Las experiencias adversas pueden tener lugar en el transcurso del uso de cualquier fármaco o biofármaco. Éstas se registrarán durante todo el estudio y en cada examen del paciente.

Una experiencia adversa se define como cualquier cambio desfavorable e impensado en la estructura, función, o química del cuerpo asociado temporalmente con el uso de la colágena-PVP o metilprednisolona de depósito, ya sea que se le considere o no relacionado a dicho uso. También se define como experiencia adversa, cualquier empeoramiento (por ejemplo: cualquier cambio

clínicamente adverso en la frecuencia y/o intensidad) de una enfermedad preexistente, asociado al uso de los fármacos.

El investigador evaluará todas las experiencias adversas en lo que se refiere a:

Máxima intensidad:

Leve (conciencia de los signos y síntomas, pero fácilmente tolerables);

Moderada (molesta lo suficiente como para provocar interferencia con la actividad normal);

Grave (inhabilitante con incapacidad para trabajar o para realizar la actividad normal)

Gravedad:

Una experiencia adversa grave es una experiencia adversa que tiene lugar a cualquier dosis que:

*Tenga como resultado la muerte; o

*Ponga en peligro la vida (coloca al paciente, a los ojos del investigador, ante un inmediato riesgo de muerte debida a la experiencia cuando se produce); o

*Resulte en hospitalización o prolongue una hospitalización existente (la estadía por una noche en el hospital, independientemente de la duración de dicha estadía, aún cuando dicha hospitalización sea una medida precautoria para poder realizar la observación continua del paciente); o

*Produzca una anomalía congénita/defecto de nacimiento (en la progeñie de pacientes que toman el producto independientemente del tiempo hasta el diagnóstico); o

Produzca un cáncer; o

Produzca una sobredosis (ya sea accidental o intencional)

Se pueden considerar como experiencias adversas graves otros eventos médicos de importancia que pueden no resultar en muerte, poner en peligro la vida, ni requerir hospitalización, cuando, en base a un criterio médico apropiado, dichos eventos puedan poner en peligro al paciente y requerir intervención médica o quirúrgica para prevenir cualquiera de los resultados antes detallados (marcados con un * en el apartado precedente).

Duración:

Registro de las fechas de inicio y finalización de la experiencia adversa. Si es de menos de 1 día, indique el tiempo de duración correspondiente y las unidades.

Acción tomada:

¿Provocó la experiencia adversa que el medicamento bajo investigación fuera discontinuado?

Relación con el medicamento investigado:

¿Provocó el medicamento bajo investigación la experiencia adversa?

La determinación de la probabilidad de que el medicamento bajo investigación provoque la experiencia adversa, será efectuada por el investigador. Las iniciales firmadas/fechadas del investigador sobre el documento o plantilla fuente, respalda la causalidad anotada en el formulario de efectos adversos, garantiza que se realizó una evaluación profesionalmente calificada para la causalidad. Dicho documento inicialado deberá ser devuelto de acuerdo al marco de tiempo regulatorio requerido. Los siguientes criterios tienen la intención de servir como guía de referencia para asistir al investigador en la evaluación de la probabilidad de una relación entre el medicamento bajo investigación y la experiencia adversa basándose en la información que se tiene disponible.

Los siguientes componentes deben utilizarse para evaluar dicha relación; cuanto mayor sea la correlación con los componentes y sus respectivos elementos en

cuanto a cantidad y/o a intensidad), mayor probabilidad habrá de que el medicamento haya provocado el evento adverso:

-Exposición: ¿Existen pruebas de que el paciente estuvo realmente expuesto al medicamento bajo investigación, como ser: historia confiable, evaluación de cumplimiento aceptable, efecto farmacológico esperado?

-Curso del tiempo: ¿Se produjo la experiencia adversa en una secuencia temporal razonable desde la administración del medicamento bajo investigación?

¿Es compatible el tiempo en que comenzó la experiencia adversa con un efecto inducido por el medicamento?

ESPECIFICACIÓN DE LA MANERA EN QUE SERÁN OBSERVADOS LOS PRECEPTOS ÉTICOS PARA LA INVESTIGACIÓN.

El protocolo deberá tener la aprobación del Comité de Bioética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”. Este estudio se realizará siguiendo los lineamientos éticos de la Declaración de Helsinki, del Reglamento de Investigación en Salud de la Ley General de Salud.

Se dará a firmar una carta de consentimiento informado donde de manera clara expresa las intervenciones y posibles efectos adversos los cuales en caso de presentarse serán tratados y se llevará el seguimiento.

Recursos

Recursos humanos

Investigador principal: Dra. Margarita Ortiz Ávalos CDP

Investigador responsable INCMNZS: Dra Janette Furuzawa Carballeda

Investigador responsable CDP: Dr. Fermín Jurado Santa Cruz

Investigador Asociado histopatología: Dra. Gisela Navarrete Franco

Investigador Asociado clínico: Dra. Virginia Martínez Estrada CDP

Recursos financieros

Fondos propios del investigador

Apoyo AMALAC

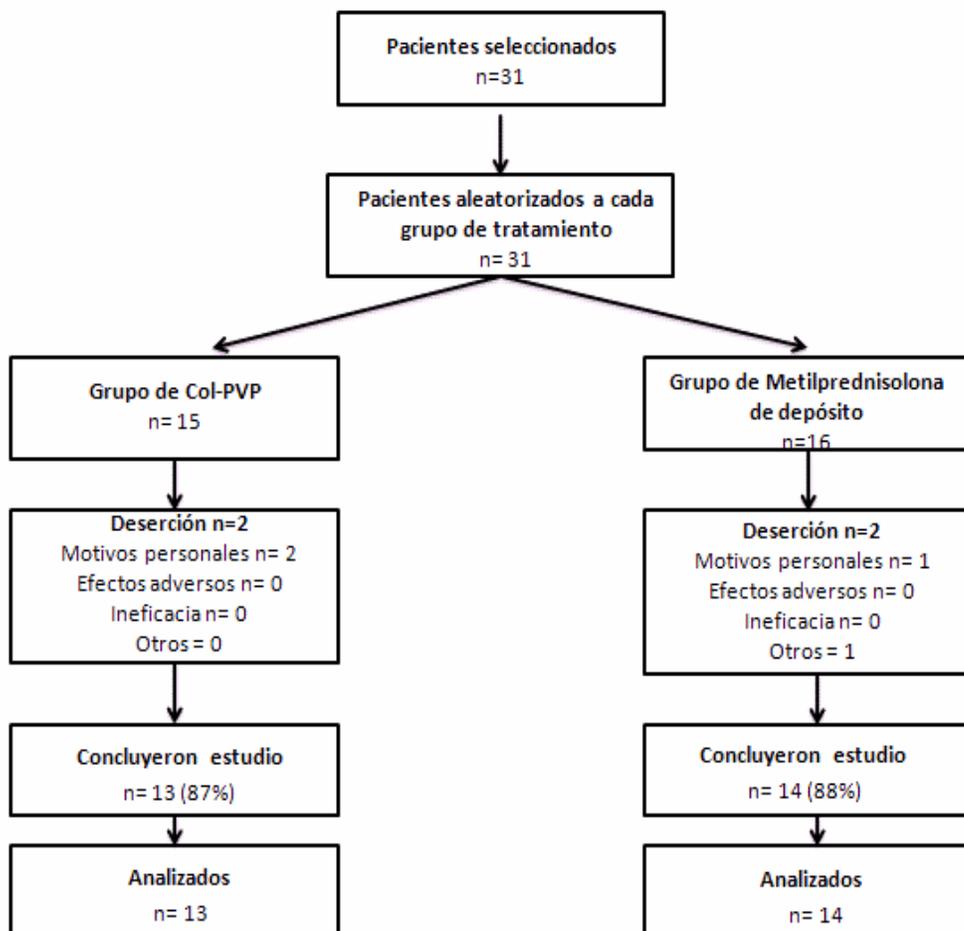
Proyecto Clínico (Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua)

Proyecto Básico (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán)

RESULTADOS

En el estudio se incluyeron 10 controles sanos y 31 pacientes a quienes se aplicó medicamento, de los cuales 15 (48%) fueron asignados aleatoriamente al grupo de colágena-PVP y 16 (52%) al grupo tratado con metilprednisolona de depósito. De éstos 13 (88%) y 14 (87%) respectivamente, concluyeron el estudio (**Fig. 12**). Dos pacientes del grupo de colágena-PVP abandonaron el estudio argumentando razones personales, recibieron 4 y 6 aplicaciones respectivamente del medicamento. Mientras que los 2 pacientes que desertaron del grupo que fue tratado con metilprednisolona de depósito, uno argumentó motivos personales y el otro por no contar con método de planificación familiar por escrito, recibieron 3 y 2 aplicaciones del medicamento, respectivamente. Todos los pacientes fueron analizados por una prueba de intento de tratamiento (ITT, por sus siglas en inglés).

Figura 12. Reclutamiento y desenlace de los pacientes del estudio.



Datos clínicos y demográficos de los pacientes

Los datos demográficos y clínicos se muestran en las tablas 1 a 6

El 90% (9), 77% (10) y 93% (13) de los individuos del grupo control y de los pacientes tratados con colágena-PVP y metilprednisolona respectivamente, fueron mujeres. La edad promedio, el tiempo de evolución, la edad al inicio de la enfermedad, la escala de Rodnan y las variables de laboratorio no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio.

Sexo

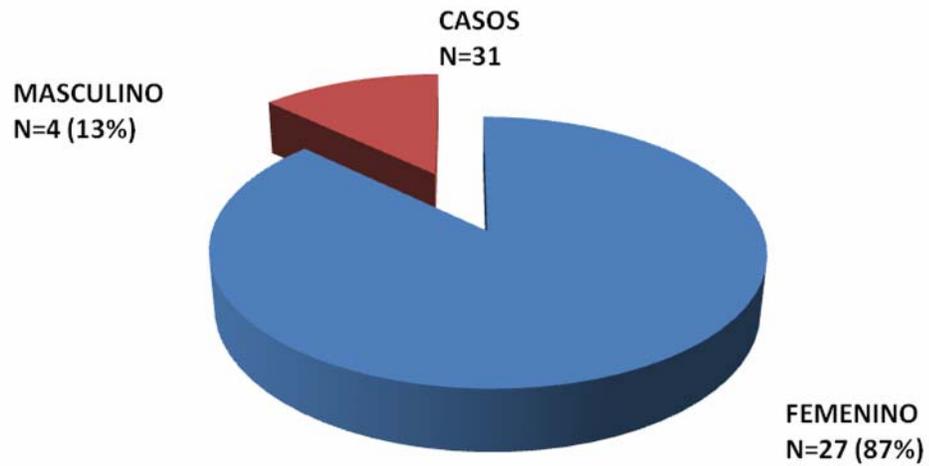
Del total de pacientes en estudio, 27 (87%) fueron del sexo femenino y 4(13%) del sexo masculino (**Tablas 3 y 4; Gráfica 1**)

Tabla 3

Genero	Casos	%
Femenino	27	87%
Masculino	4	13%
Total	31	100

Tabla 4

	Controles sanos	Tratamiento Colágena-PVP	Tratamiento Metilprednisolona
Género	9/1	10/3	13/1
Mujer/Hombre			

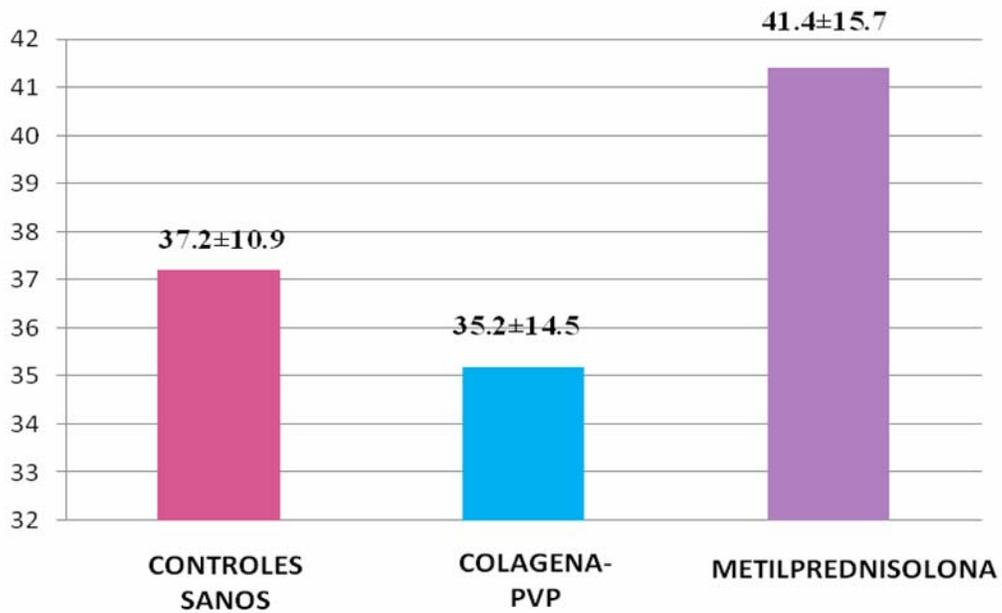


Grafica 1: pacientes incluidos en el estudio 4 hombres, 27 mujeres con un total de 31 pacientes

Tabla 5

EDAD (años)

	Controles sanos	I Tratamiento Colágena- PVP	Tratamiento Metilprednisolona
Promedio ± D.E.	37.2 ± 10.9	35.2 ± 14.5	41.4 ± 15.7
Intervalo	20 - 57	17 - 62	17 - 73

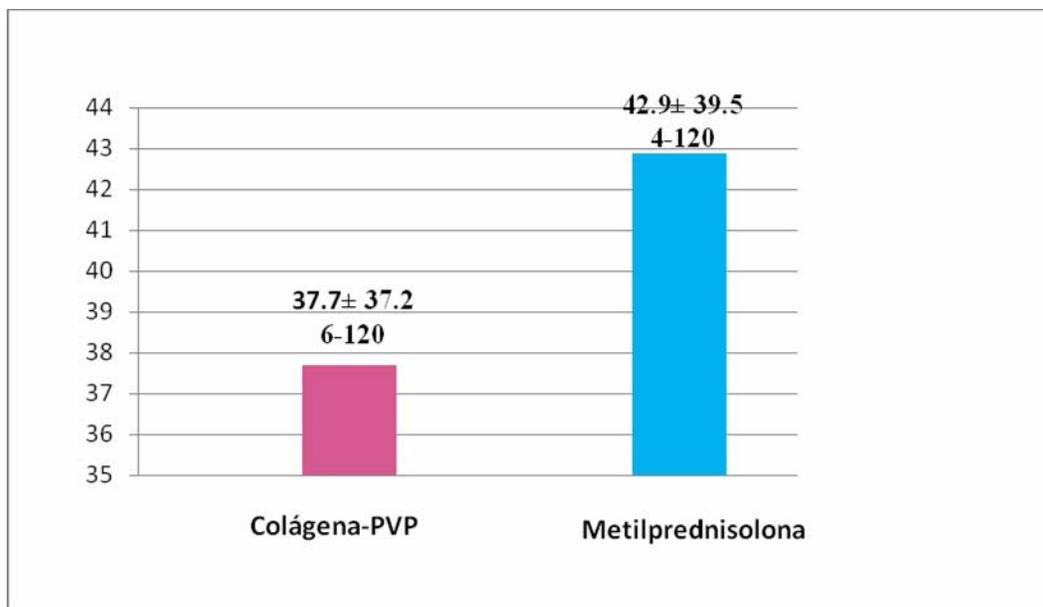


Gráfica 2: Edad de los pacientes incluidos en ambos grupos de tratamiento y de grupo control

Tabla 6

TIEMPO DE EVOLUCIÓN (meses)

	Tratamiento Colágena-PVP	Tratamiento Metilprednisolona
Promedio ± D.E.	37.7 ± 37.2	42.9 ± 39.5
Intervalo	6 - 120	4 - 120



Gráfica 3: Tiempo de evolución de las lesiones en ambos grupos de tratamiento

Tabla 7

EDAD DE INICIO DE ENFERMEDAD (años)

	Controles sanos	Basal Tratamiento Colágena-PVP	Basal Tratamiento Metilprednisolona
Promedio ± D.E.		32.3 ± 15.9	37.9 ± 17.3
Intervalo		10 - 61	8 - 73

CRITERIOS PRIMARIOS DE MEJORÍA

Escala de Rodnan modificada

Los pacientes que recibieron el tratamiento a base de metilprednisolona disminuyeron en un 25.6, 43.6 y 46.2% a los 3, 6 y 9 meses respectivamente, el puntaje de la escala de Rodnan modificada, cuando se comparó la determinación basal con la evaluación final (**Fig. 13, Tabla 8, gráfica 4**). Mientras que los pacientes tratados con colágena-PVP disminuyeron un 5.5, 18.3 y 39.3% la escala de Rodnan con respecto al valor basal (**Tabla 8**)



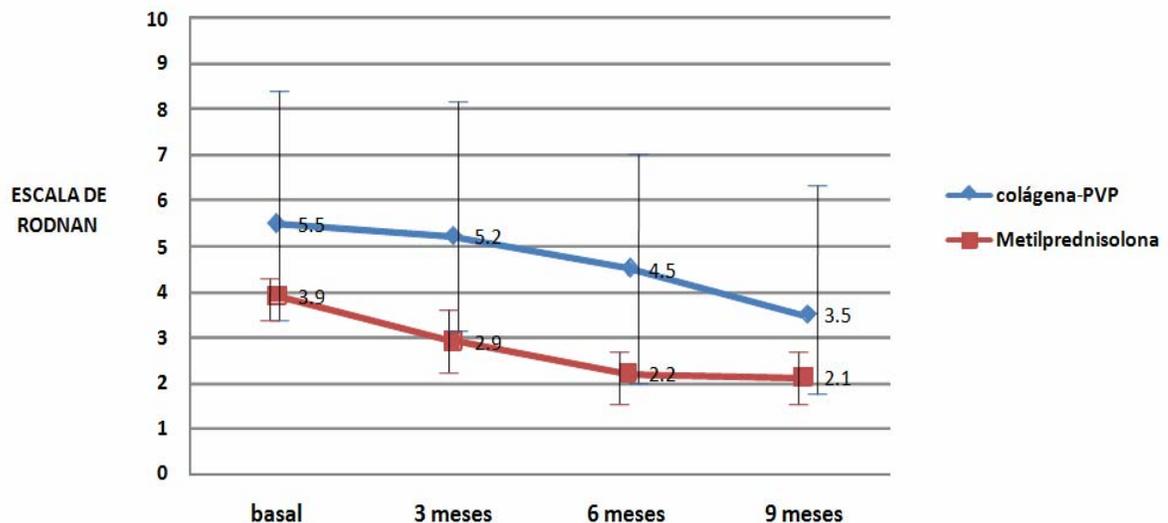
Figura 13. Lesión cutánea a los 0 meses (pre-tratamiento) y a los 9 meses (post-tratamiento).

Tabla 8 VARIABLES CLINICAS

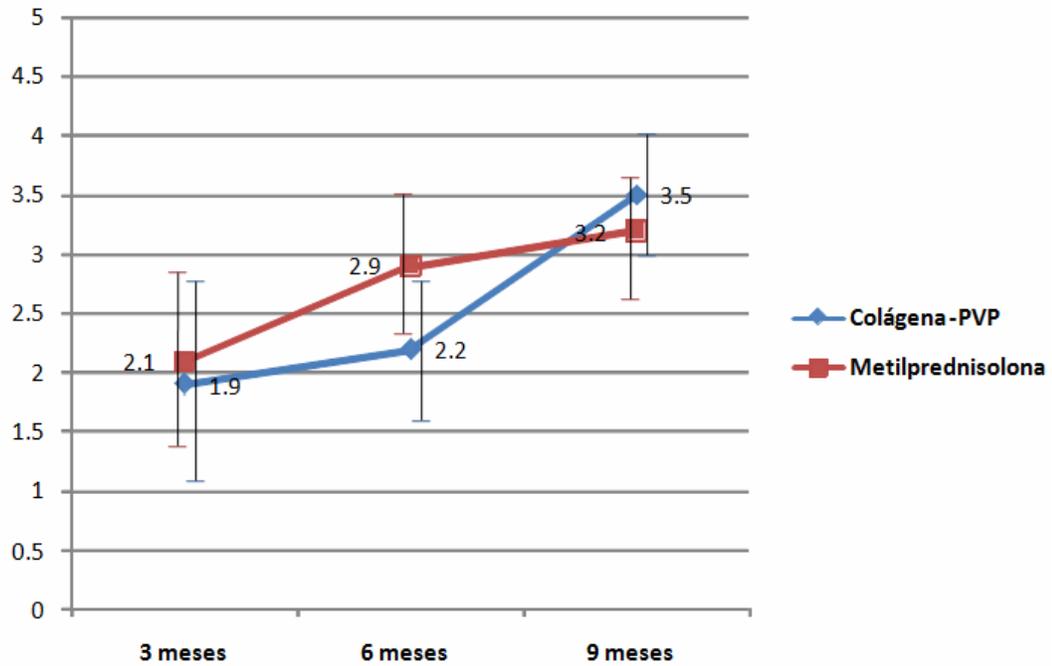
	Basal Tratamiento Colágena-PVP	Basal Tratamiento Metilprednisolona	3 Meses Tratamiento Colágena-PVP	3 Meses Tratamiento Metilprednisolona	6 Meses Tratamiento Colágena-PVP	6 Meses Tratamiento Metilprednisolona	9 Meses Tratamiento Colágena-PVP	9 Meses Tratamiento Metilprednisolona
RODAN								
Promedio ± D.E.	5.5 ± 2.9	3.9 ± 0.5	5.2 ± 2.9	2.9 ± 0.7	4.5 ± 2.5	2.2 ± 0.5^a	3.5 ± 2.6	2.1 ± 0.5
Intervalo	2 - 12	3 - 5	2 - 11	2 - 4	2 - 10	1 - 3	1 - 9	1 - 3

Grado de Mejoría ¹								
(Médico)								
Promedio ± D.E.			1.9 ± 0.8	2.1 ± 0.7	2.2 ± 0.6	2.9 ± 0.6 ^{b,c}	3.5 ± 0.5 ^{d,e}	3.2 ± 0.4 ^f
Intervalo			1 - 3	1 - 3	1 - 3	2 - 4	3 - 4	3 - 4
Grado de Mejoría								
(Paciente)								
Promedio ± D.E.			1.9 ± 0.9	2.4 ± 0.7	2.6 ± 0.7 ^g	3.0 ± 0.8	3.5 ± 0.5 ^{h,i}	3.4 ± 0.5 ^j
Intervalo			1 - 3	1 - 3	2 - 4	2 - 4	3 - 4	3 - 4

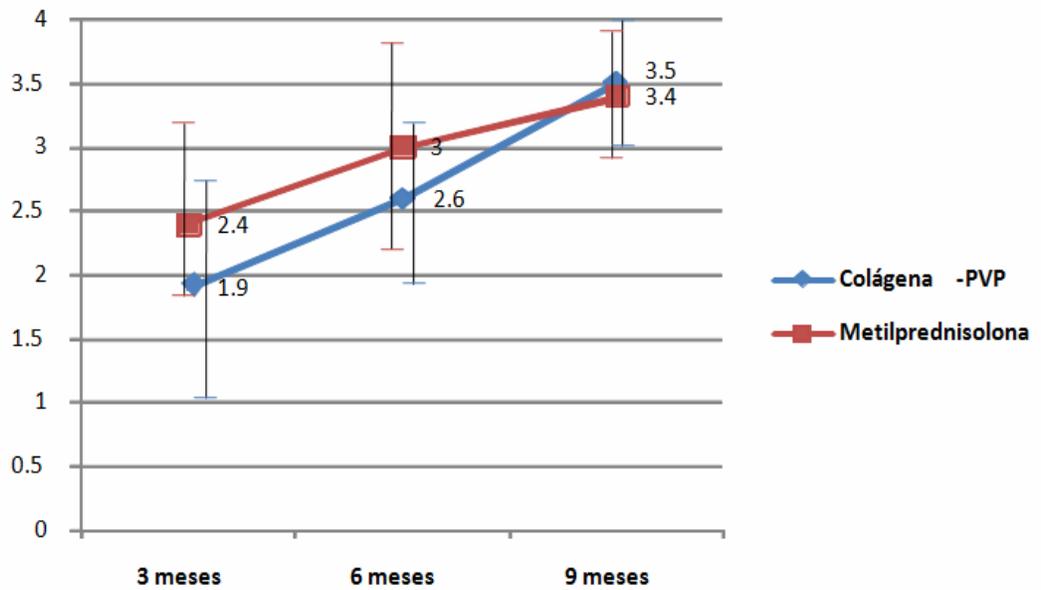
^aColágena-PVP 6 meses vs. Metilprednisolona 6 meses; ^bMetilprednisolona 3 meses vs. 6 meses; ^cColágena-PVP 6 meses vs. Metilprednisolona 6 meses; ^dColágena-PVP 3 meses vs. 9 meses; ^eColágena-PVP 6 meses vs. 9 meses; ^fMetilprednisolona 3 meses vs. 9 meses; ^gColágena-PVP 3 meses vs. 6 meses; ^hColágena-PVP 3 meses vs. 9 meses; ⁱColágena-PVP 6 meses vs. 9 meses; ^jMetilprednisolona 3 vs. 9 meses; ¹Grado de Mejoría: 0 = Ninguna, 1 = Poca, 2 = Regular, 3 = Buena, 4 = Excelente.



Gráfica 4: Grado de mejoría evaluada por escala de Rodnan modificada, los valores entre ambos grupos no mostraron significancia estadística.



Gráfica 5: Grado de mejoría. Evaluación por el médico. Resultados sin valores estadísticamente significativos al comparar ambos grupos de tratamiento



Gráfica 6: Grado de mejoría. Evaluación del paciente

Tabla 9

VARIABLES DE LABORATORIO

	Controles sanos	Basal Tx Colágena-PVP	Basal Tx MPD	3 Meses Tx Colágena-PVP	3 Meses TxMPD	6 Meses Tx Colágena-PVP	6 Meses Tx MPD	9 Meses Tx Colágena-PVP	9 Meses Tx MPD
Leucocitos (cel/ml)									
Promedio ±	6618.2 ± 1475.0	5998.2 ± 1681.3		6966.7 ± 2238.7				6878.3 ± 1376.3	
D.E.			6101.8 ±		5975.3 ±				6076.7 ±
Intervalo	4800-9100	3320-9200	1665.1	3850-10600	2196.3			3850-9000	1438.0
			3600-9200		1500-11900				4100-8800
Linfocitos (%)									
Promedio ±	29.3 ± 7.5	35.7 ± 5.9	36.6 ±	33.3 ± 7.5	33.1 ± 8.9			35.4 ± 8.9	33.42 ±
D.E.			12.1						10.4
Intervalo	19.2-40.6	26.4-43.0	17.0-61.0	18.0-41.0	16.8-47.0			18.0-49.5	6.0-53.0

Tx: tratamiento MPD: Metilprednisolona

Mejoría de la arquitectura tisular

La evaluación histológica se llevó a cabo en los tejidos teñidos con hematoxilina y eosina en las biopsias basales y post-tratamiento de manera ciega por 1 dermatopatólogo del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”.

Las biopsias de los pacientes tratados con metilprednisolona de depósito presentaron:

- 1) Atrofia
- 2) Disminución de la hialinización de fibras de colágena
- 3) Infiltrados inflamatorios ausentes o escasos

4) Folículos pilosos, glándulas sudoríparas y sebáceas ausentes o atróficas (**Fig. 14, panel superior**)

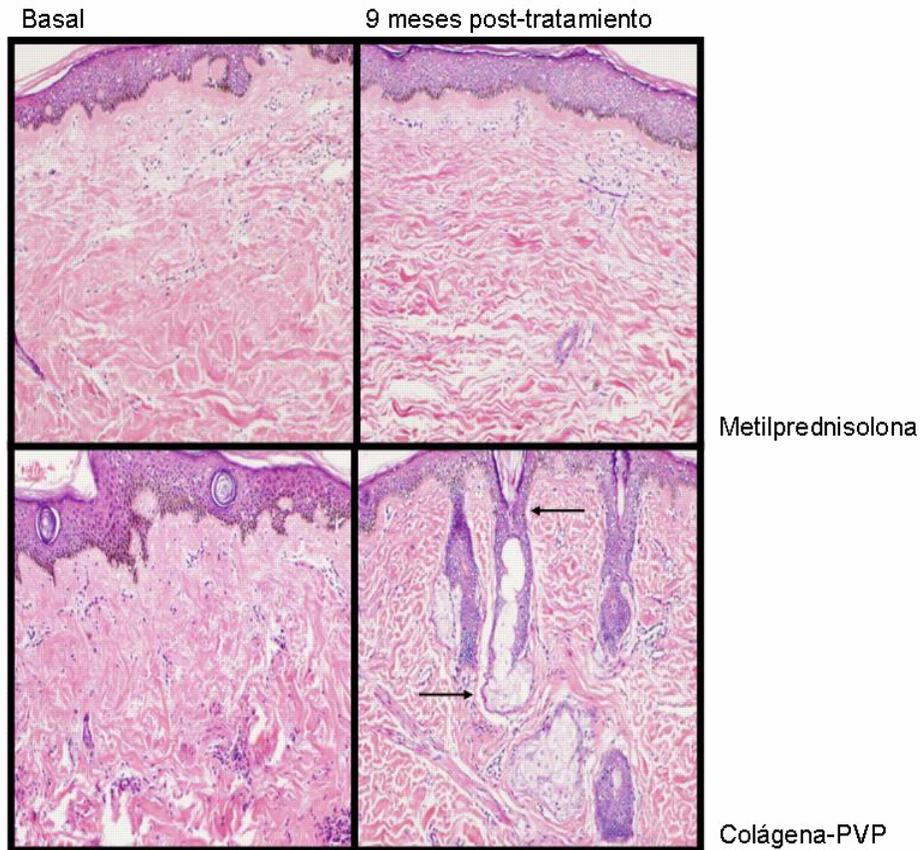


Figura 14. Hallazgos histológicos del efecto colágena-PVP comparado con la metilprednisolona de depósito a los 9 meses post-tratamiento. Las flechas señalan la presencia de anexos cutáneos.

Mientras que los pacientes tratados con la colágena-PVP presentaron las siguientes características histológicas:

- 1) Ausencia de atrofia
- 2) Disminución de la hialinización de fibras de colágena
- 3) Disminución más no inhibición del infiltrado inflamatorio, el cual fue de leve a moderado, de localización perivascular y perianexial
- 4) Recuperación de folículos pilosebáceos y glándulas sudoríparas (**Fig. 14, panel inferior**)

Mejoría de los parámetros inflamatorios en biopsias de piel

Como se mencionó anteriormente, una disminución de al menos un 45% en el número de células inmunorreactivas al anticuerpo anti IL-17 a los 9 meses post-tratamiento con respecto a la basal, se consideró como una mejoría clínicamente significativa.

Efecto de la colágena-PVP y de la metilprednisolona sobre la expresión de IL-17A y de Foxp3.

La presencia de IL-17, una citocina proinflamatoria e inductora de la proliferación de fibroblastos, disminuyó su expresión en los pacientes tratados con colágena-PVP ($20.6 \pm 1.3\%$ vs. $7.7 \pm 0.4\%$ de células inmunorreactivas; $\square \approx -62.6\%$; $p < 0.05$. **(Figura 15 panel inferior y grafica 7)** a niveles estadísticamente significativos. Mientras que los pacientes que recibieron metilprednisolona de depósito no presentó cambios ($18.0 \pm 2.1\%$ vs. $18.4 \pm 3.0\%$ de células inmunorreactivas; $\square \approx 2.6\%$. **(Fig. 15 panel superior y Gráfica:7)**.

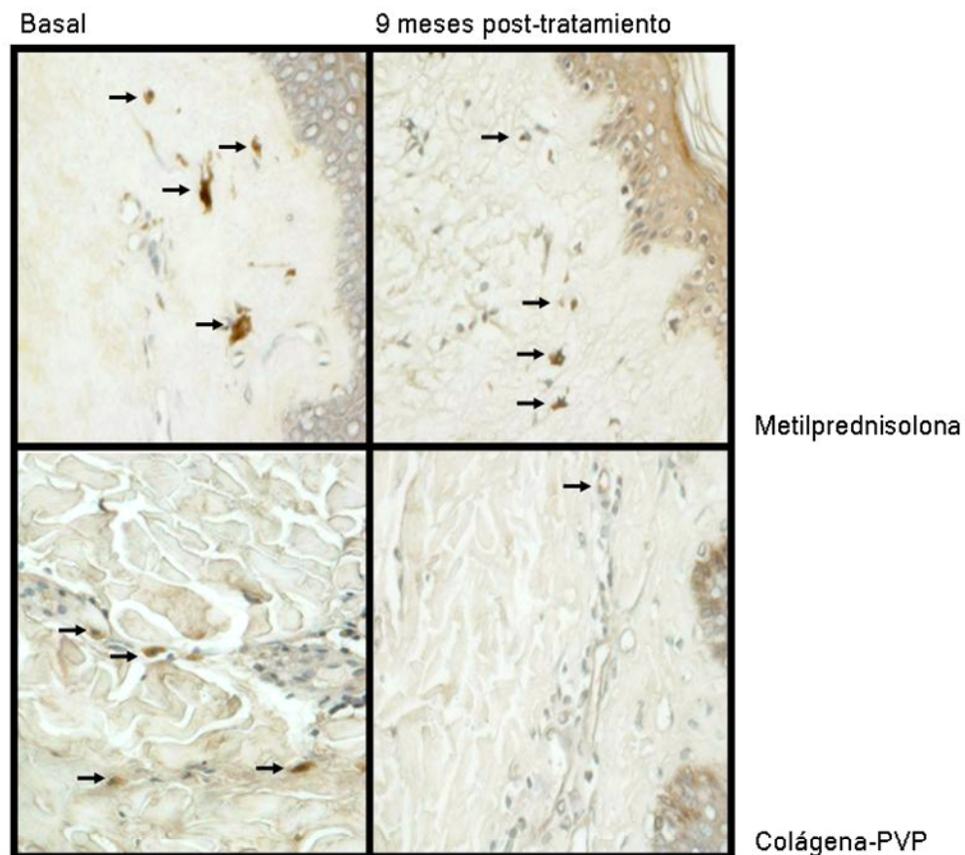


Figura 15. Expresión de IL-17 (Th17) en las lesiones cutáneas pre-tratamiento y 9 meses post-tratamiento.

Lo contrario fue observado cuando se determinó la presencia de células T reguladoras mediante la identificación de la proteína Foxp3. La presencia de este factor aumentó a niveles estadísticamente significativos en los pacientes tratados con colágena-PVP ($9.3 \pm 1.4\%$ vs. $18.0 \pm 0.9\%$ de células inmunorreactivas; $\square \approx 93.5\%$; $p < 0.05$). (**Fig. 16 panel inferior y Gráfica 7**); no así en los que recibieron metilprednisolona de depósito ($10.2 \pm 1.1\%$ vs. $9.2 \pm 1.6\%$ células inmunorreactivas; $\square \approx -9.0\%$; (**Fig. 16 panel superior y Gráfica 7**).

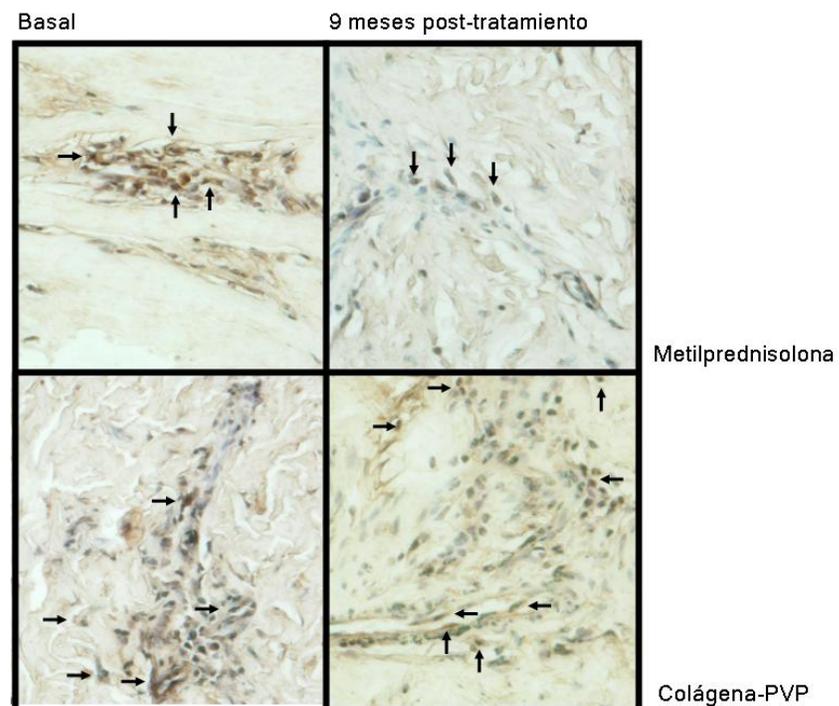
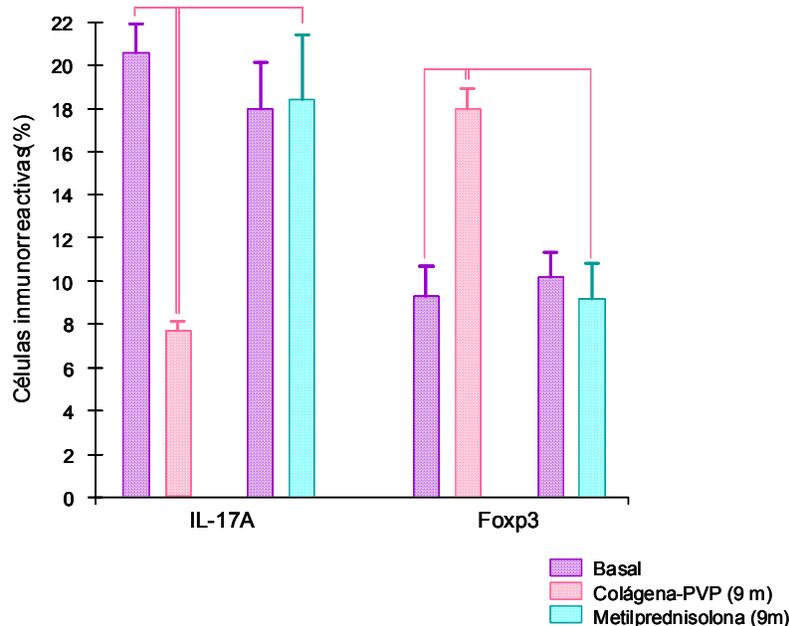


Figura 16. Expresión de células Treg en las lesiones cutáneas pre-tratamiento y 9 meses post.-tratamiento.



Gráfica 7. Porcentaje de células inmunorreactivas para IL-17 (células Th17) y Foxp3 (células Treg) en las lesiones cutáneas de esclerodermia en condiciones basales o pre-tratamiento y 9 meses post-tratamiento. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba de ANOVA de una vía por el método de Holm-Sidak con ayuda del programa SigmaStat 3.0. Las líneas en rosa representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) del tratamiento con colágena- PVP con respecto a la determinación basal y entre los tratamientos.

Efecto de la colágena-PVP y de la metilprednisolona sobre la expresión de TGF- β 1 y de IL-22

El factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) es una citocina profibrótica, estimula la expresión de la colágena tipo I, III, VI y X, fibronectinas y proteoglicanos; disminuyó su expresión en los pacientes tratados con colágena-PVP ($2.2 \pm 0.3\%$ vs $7.3 \pm 1.2\%$) (**figura 17 panel inferior, gráfica 8**) mostrando una $p < 0.05$ con respecto a los niveles basales y al grupo tratado con Metilprednisolona en el cual no se demostró significancia estadística (**figura 17 panel superior y gráfica 8**). Mientras que la IL-22 que es una citocina producida por estimulación de los linfocitos Th17, disminuyeron su expresión con valores estadísticamente significativos en el grupo de Metilprednisolona ($19.5 \pm 1.9\%$ vs $26.1 \pm 2.1\%$, $p < 0.05$) (**figura18 panel superior, gráfica 8**) y en el grupo de colágena-PVP ($8.2 \pm 1.1\%$ vs $26.1 \pm 2.1\%$, $p < 0.05$) (**figura18 panel inferior, gráfica 8**). Al mismo tiempo al comparar ambos grupos se obtuvo una $p < 0.05$ para el grupo de colágena-PVP ($8.2 \pm 1.1\%$ vs $19.5 \pm 1.9\%$) (**Gráfica 8**)

Expresión de TGF- β 1

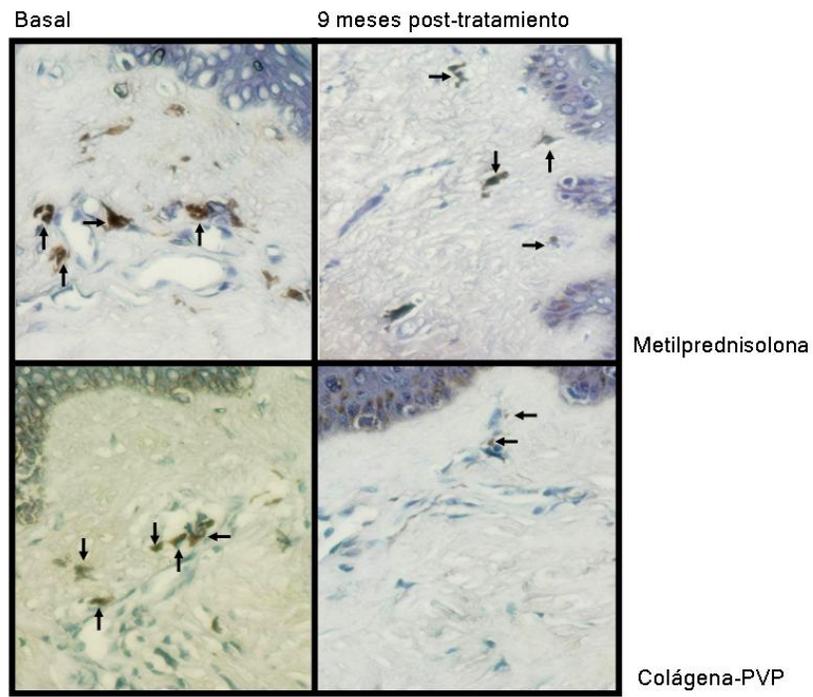


Figura 17. Expresión de TGF- β 1 en las lesiones cutáneas pre-tratamiento y a los 9 meses (post.-tratamiento)

Expresión de IL-22

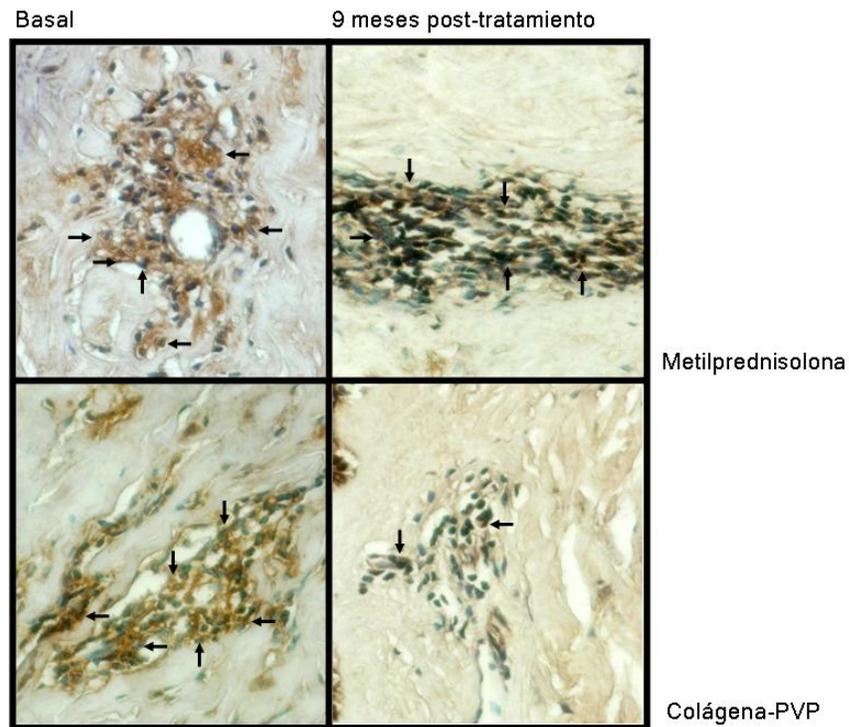
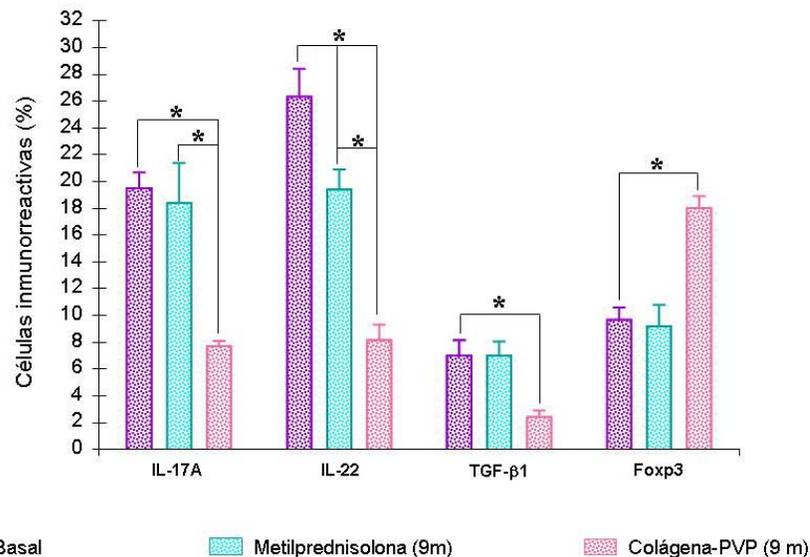


Figura 18. Expresión de IL-22 en las lesiones cutáneas pre-tratamiento y a los 9 meses (post.-tratamiento.)



Gráfica 8. Porcentaje de células inmunorreactivas para IL-17a,IL-22 (células Th17), TGFβ1 y Foxp3 (células Treg) en las lesiones cutáneas de esclerodermia en condiciones basales o pre-tratamiento y 9 meses post-tratamiento. Los asteriscos representan las diferencias

estadísticamente significativas ($p < 0.05$) del tratamiento con colágena- PVP con respecto a la determinación basal y entre los tratamientos.

Mejoría de los parámetros inflamatorios en sangre periférica

El parámetro de mejoría clínicamente significativa relacionado a la inflamación sistémica consideró una disminución de al menos un 45% en el número de células Th17 de sangre periférica.

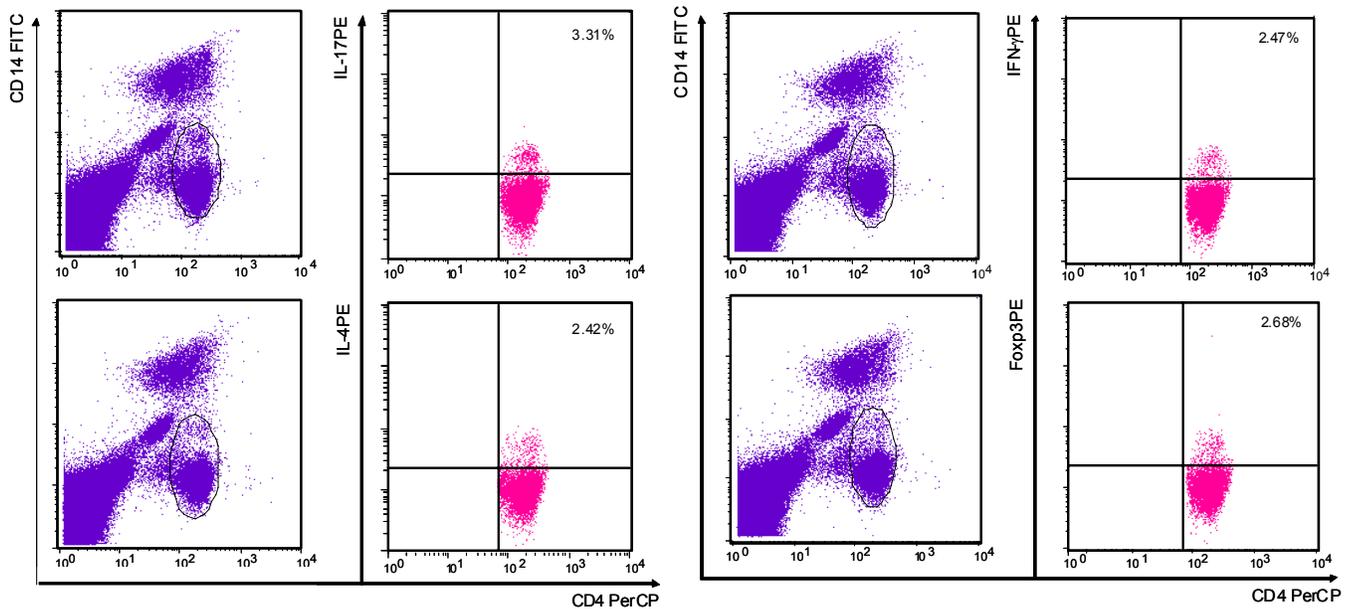


Figura 19. Citograma representativo de las distintas subpoblaciones de células T (Th17, Th2, Th1 y Treg) evaluadas en la sangre periférica de los pacientes con lesiones cutáneas de esclerodermia.

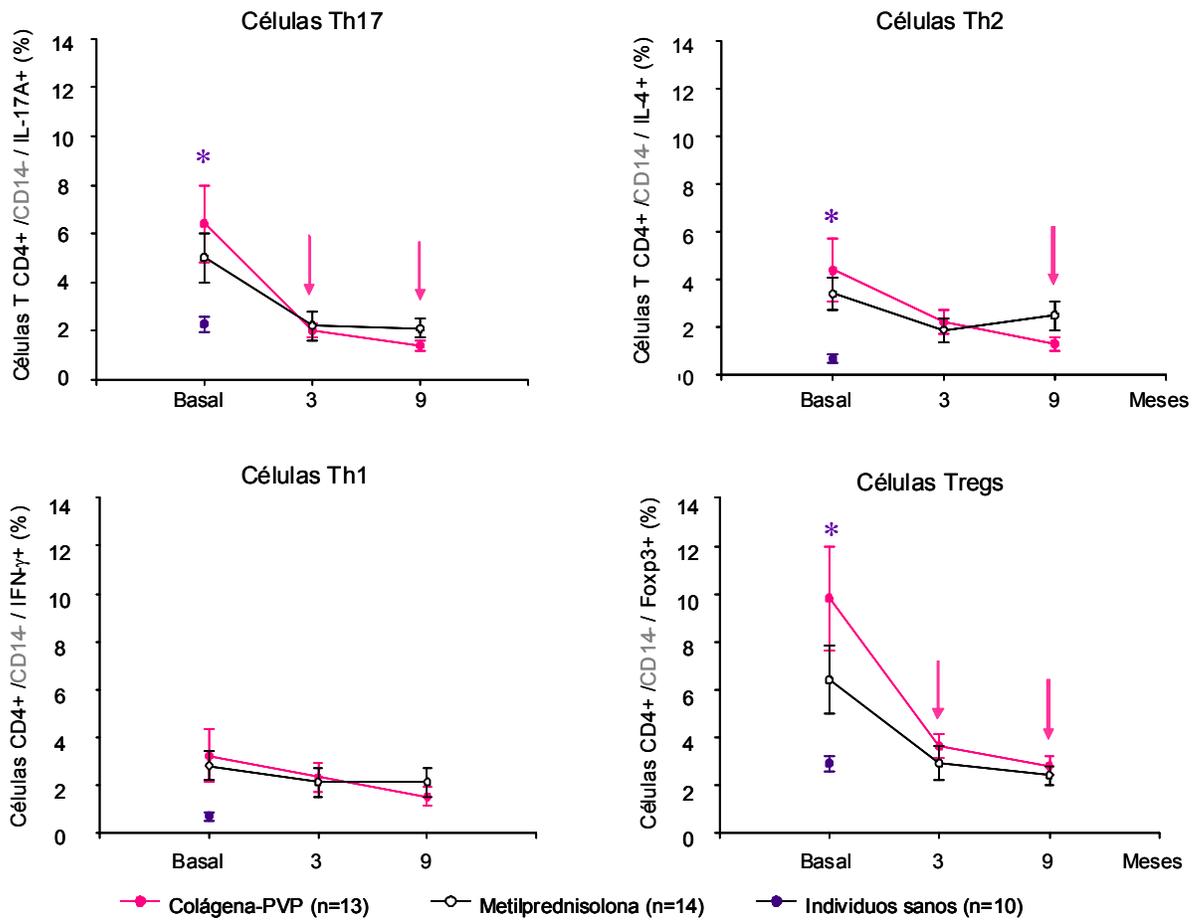
Los pacientes con lesiones cutáneas de esclerodermia presentaron un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de células T cooperadoras y reguladoras con respecto a los individuos sanos (**Figura 19, Tabla 10, gráfica 9**). El incremento en el porcentaje de células Th17, Th2, Th1 y Treg disminuyó a niveles similares a los determinados en los individuos sanos con cualquiera de los tratamientos de manera tiempo-dependiente (**Fig. 19, Tabla 10**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento (**Fig. 19, Tabla 10**). Sin embargo, si se determinaron diferencias significativas en el grupo tratado con colágena-PVP con respecto a la determinación basal, en el porcentaje de células Th17, Th2 y Treg (**Fig. 19, Tabla 10**).

Tabla 10

Porcentaje de células Th17, Th2, Th1 y Tregs de sangre periférica en los pacientes con esclerodermia localizada.

	Controles sanos	Basal Clg-PVP	Basal Metilprednisolona	3 Meses Clg-PVP	3 Meses Metilprednisolona	9 Meses Clg-PVP	9 Meses Metilprednisolona
Células (%)							
CD4+/CD14-/IL-7A+							
Promedio ± ES	2.3 ± 0.3	6.4 ± 1.6*	5.0 ± 1.0	2.0 ± 0.3*	2.2 ± 0.6	1.4 ± 0.2*	2.1 ± 0.4
(Intervalo)	(1.2-3.4)	(0.4-17.2)	(0.8-10.4)	(0.3-4.4)	(0.3-9.1)	(0.2-2.4)	(0.5-6.3)
CD4+/CD14-/IL-4+							
Promedio ± ES	0.7 ± 0.2	4.4 ± 1.3*	3.4 ± 0.7	2.2 ± 0.5	1.9 ± 0.5	1.3 ± 0.3*	2.5 ± 0.6
(Intervalo)	(0.2-1.9)	(0.1-15.1)	(0.4-6.7)	(0.3-6.5)	(0.1-7.3)	(0.4-4.2)	(0.5-7.9)
CD4+/CD14-/IFN-γ+							
Promedio ± ES	0.7 ± 0.2	3.2 ± 1.1	2.8 ± 0.6	2.3 ± 0.6	2.1 ± 0.6	1.6 ± 0.4	2.1 ± 0.6
(Intervalo)	(0.2-1.8)	(0.02-12.7)	(0.3-6.4)	(0.2-7.6)	(0.03-7.2)	(0.4-5.3)	(0.1-7.8)
CD4+/CD14-Foxp3+							
Promedio ± ES	1.9 ± 0.3	9.8 ± 2.2*	6.4 ± 1.4*	3.6 ± 0.5*	2.9 ± 0.7	2.7 ± 0.4*	2.4 ± 0.4*
(Intervalo)	(0.8-3.3)	(0.6-25.7)	(2.1-13.9)	(1.2-8.0)	(0.5-9.4)	(1.2-5.4)	(1.0-6.5)

*Sanos vs. Basal, *Basal vs. Colágena-PVP, *Basal vs. Metilprednisolona de depósito. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba de ANOVA de una vía por el método de Holm-Sidak con ayuda del programa SigmaStat 3.0. * = p<0.05.



Gráfica 9: Determinación del porcentaje de células Th17 y Tregs en sangre periférica por citometría de flujo. Los asteriscos en morado indican una diferencia estadísticamente significativa de los niveles de los pacientes con respecto a los individuos sanos. Las flechas en rosa señalan una diferencia significativa de la determinación basal o pre-tratamiento con respecto al tratamiento final con colágena-PVP.

Seguridad y eficacia de la colágena-PVP.

La administración de colágena-PVP mostró ser segura y eficaz, ya que los pacientes sólo refirieron dolor en el sitio de aplicación, que persistió durante 5 minutos post-administración (**Tabla 11**). No obstante, el tratamiento con metilprednisolona de depósito se asoció con prurito persistente, dolor (no relacionado con la aplicación del fármaco) e incremento de esclerosis en dos pacientes.

Tabla 11 Eventos adversos

Colágena-PVP	Dolor en el sitio de aplicación que persistió durante 5 minutos post-aplicación.
Metilprednisolona	Incremento de esclerosis 1 mes después de concluir el protocolo. Prurito persistente. Dolor.

DISCUSIÓN

Se estudiaron 31 pacientes con diagnóstico de esclerodermia localizada

Desde 1987, los trabajos de Bos y cols. evidenciaron la presencia de células T (CD4+ o CD8+) residentes en la piel de individuos sanos.

Posteriormente, Rachel Clark (2006) cuantifica a los linfocitos Th, señalando que un individuo sano posee un millón de células/cm² y esto es equivalente a 20 billones de células en total, es decir el doble de lo que encontramos en la circulación.

Clark, también determinó que el 95% eran células T CD4+/CD45RO+/CCR4+/CLA+ (adhesinas de piel) a las que denominó células TEM, mientras que un 5% eran TCD4+/CCR7+/L-selectina+ o células TMC con capacidad de migrar a los órganos linfoides secundarios.

De tal suerte que en condiciones de no estimulación o reposo, los TEM pertenecen a una subpoblación de un tiempo de vida media muy larga de aproximadamente 1 década, y que conforman parte del grupo de células residentes de la piel, lo cual evita el compromiso inmunológico ante un reto antigénico local.

Bajo estas premisas resultaba fácil, a través de la óptica de un raciocinio lineal el asumir que estas células Th CD4+ pudieran ser tipo Th1 o Th2, como se había descrito previamente en el paradigma Th1/Th2 por Mossman y Coffman en 1986.

Sin embargo en este estudio demostramos que las proporciones de células Th17 en sangre periférica y tejido se encuentran elevadas en pacientes con esclerodermia localizada, cuando los valores son comparados con los de individuos sanos. Evidencias previas a este estudio, sugieren el papel patogénico de las células Th17 en la esclerodermia y su participación no se encuentra limitada a las fases iniciales o a ciertos subtipos de la enfermedad.¹¹⁶

La presencia de la subpoblación de células Th17 tanto en sangre periférica como a nivel tisular, sugiere la inducción de la expresión de IL-17, TNF- α , la IL-1 β y la IL-6. El efecto biológico de estas citocinas, en conjunto con la IL-4 e IL-13 sintetizadas por las células Th2, podría explicar el fenotipo proinflamatorio y profibrótico de los pacientes con esclerodermia¹¹⁷. Es conocido que la IL-17 induce la proliferación de los fibroblastos, la expresión de moléculas de adhesión y la producción de IL-1 β por las células endoteliales de manera dosis-dependiente¹¹⁸. La IL-1 β a su vez, es una citocina proinflamatoria muy potente, capaz de inducir la producción de IL-6 y de PDGF en fibroblastos normales y derivados de lesiones cutáneas de pacientes con esclerodermia¹¹⁹. Asimismo, los fibroblastos de esclerodermia sintetizan constitutivamente esta citocina y su receptor^{119,120}.

Por otro lado, los pacientes con esclerodermia también presentan niveles séricos elevados de IL-6, los cuales correlacionan con el grado de gravedad de la enfermedad¹²⁰⁻¹²³. Tanto IL-1 como IL-6 son necesarias para inducir la diferenciación de las células Th17 a partir de precursores vírgenes o naïve¹²⁴.

En el presente estudio se determinó un incremento de células Th1 lo cual podría encontrarse relacionado a un estado de inflamación crónica, reflejo de una constante activación policlonal.

Las células Treg son las encargadas de mantener la tolerancia y se han encontrado incrementadas o con funciones alteradas en muchas enfermedades autoinmunes, incluyendo el lupus eritematoso generalizado, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple, aunque también juegan un papel patogénico en la respuesta a infecciones, neoplasias y trasplantes de órganos. Algunos estudios previos han demostrado aumento en el número de células CD4+CD25+FoxP3+ en los pacientes con esclerodermia, en particular en las fases iniciales de la enfermedad^{116,125}.

El TGF- β 1 es una citocina profibrótica implicada en la fisiopatogenia de la esclerodermia, se identificó en las biopsias de piel al inicio del protocolo demostrando su presencia y final del tratamiento se identificó una disminución de

su expresión estadísticamente significativa en el grupo del tratamiento con colágena-PVP con respecto al nivel basal y al grupo de Metilprednisolona.

Uno de los criterios de inclusión fue la presencia de placas clínicamente esclerosas, cuya traducción histológica es la presencia de homogeneización de la colágena, hallazgo que no es posible revertir con el tratamiento pero sí disminuirlo a tal grado que los anexos cutáneos desplazados o ausentes puedan ser recuperados. La presencia de infiltrado linfocitario traduce actividad de la enfermedad y disminuyó en ambos grupos. Con respecto a la evidencia de efectos adversos de los medicamentos como la atrofia epidérmica, se observó que los pacientes tratados con metilprednisolona de depósito la presentaron en mayor porcentaje. Por lo anterior si consideramos como criterios primarios de mejoría a la disminución de infiltrado linfocitario y recuperación de anexos cutáneos, pese a que no se tiene algo objetivo para medirlos; podemos concluir que los efectos encontrados con la colágena-PVP fueron mejores que los encontrados con la Metilprednisolona. **(Los resultados más relevantes se muestran en la tabla 12)**

Según la experiencia publicada en la literatura aunque como ya se mencionó previamente no existen guías de tratamiento para la esclerodermia localizada; el mejor glucocorticoide de depósito para el tratamiento de la morfea es la triamcinolona, sin embargo no contamos con el medicamento en México y debido a que la metilprednisolona es el glucocorticoide de depósito con el que comparte mayor número de características farmacológicas se decidió utilizarlo en este estudio.

Los pacientes que fueron incluidos en el grupo de tratamiento de colágena-PVP durante la vigilancia postratamiento no presentaron datos de reactivación de la enfermedad ni aumento de esclerosis, mientras que para 2 de los pacientes del grupo de metilprednisolona presentaron mayor esclerosis de la lesión tratada, asociada a sintomatología como prurito y presencia de datos de actividad clínica como el halo eritematovioláceo.

Únicamente en 2 pacientes con lesiones múltiples y del grupo de colágena-PVP refirieron mejoría de lesiones no tratadas, por lo que podría tratarse de un efecto a distancia de este biofármaco, lo que se justifica si analizamos los resultados obtenidos de Th17 e IL-17.

Se corrobora nuestra hipótesis que plantea que la colágena-PVP es menos eficaz que la metilprednisolona de depósito, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos.

TABLA 12: RESULTADOS DEL ESTUDIO ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS

	PIEL				SUERO			
	BASAL MPD	9 MESES MPD	BASAL COL-PVP	9 MESES COL PVP	BASAL MPD	9 MESES MPD	BASAL COL-PVP	9 MESES COL - PVP
IL-17 (Th17)	18.4 ± 3.0%	18.0 ± 2.1%	20.6 ± 1.3%	7.7 ± 0.4% *	5.0 ± 1.0%	2.1 ± 0.4%	6.4 ± 1.6%	1.4 ± 0.2%*
FOX P3 (T-reg)	10.2 ± 1.1%	9.2 ± 1.6%	9.3 ± 1.4%	18.0 ± 0.9% *	6.4 ± 1.4%	2.4 ± 0.4% *	9.8 ± 2.2%	2.7 ± 0.4% *
TGF-B1	7.3±1.2%	7.3±1.2%	7.3±1.2%	2.2±0.3% *				

MPD: Metilprednisolona, COL-PVP: Colágena-PVP, *P<0.05, * P<0.05 comparando los valores basales y resultados entre un mismo grupo, no entre ambos grupos de tratamiento

CONCLUSIÓN

- La colágena-PVP es un biofármaco más seguro que la metilprednisolona de depósito.
- Su mecanismo de acción incluye la regulación negativa de la inflamación (células Th17 e IL-17) más no su inhibición, como en el caso de la metilprednisolona de depósito, permitiendo que el tejido cutáneo se acerque lo mayor posible a las características normales.
- Mejora la arquitectura tisular incluyendo la regeneración de glándulas sebáceas y folículos pilosos sin producir efectos adversos, ni recidivas.
- Mientras no contemos con una guía de tratamiento para la esclerodermia, la colágena- PVP se propone como una excelente alternativa para los pacientes con esclerodermia localizada. Este fármaco ya se encuentra incluido en el cuadro básico institucional.
 - Se logró demostrar que la esclerodermia localizada es una enfermedad en la que intervienen las células TH17 y Th 22

COMENTARIOS:

- Una de las limitantes del estudio es el no poder contar con una escala clínica ni histológica objetivas, para lograr una evaluación cuantitativa de la mejoría lo que impide una evaluación más exacta.
- Aún falta corroborar el efecto a distancia de la colágena-PVP, para poder fundamentar si es necesaria la aplicación de todas las placas o bien es suficiente con el hecho de inyectar el fármaco únicamente en algunas de ellas.

Anexo I

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

INTRODUCCIÓN

Aquí se describe el estudio de investigación y la labor que usted desempeña como participante en el mismo el doctor.y/o sus colaboradores contestarán todas las preguntas que usted pudiera tener acerca de este consentimiento y sobre el estudio en general. Sírvase leerlo cuidadosamente y no dude en hacer todas las preguntas que tenga sobre la información contenida en este documento.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio es evaluar la seguridad, eficacia, tolerancia y la dosis clínicamente efectiva de la colágena-PVP en pacientes con esclerodermia.

PROCEDIMIENTOS QUE SE SEGUIRÁN DURANTE EL ESTUDIO

Usted será uno de aproximadamente 32 hombres y mujeres de 17 años o más que participarán en esta investigación, la cual durará aproximadamente 37 semanas. El estudio incluirá algunos exámenes previos al tratamiento además de las 13 y 36 semanas de tratamiento con el medicamento de estudio. Usted recibirá colágena-PVP o metilprednisolona de depósito semanalmente. El medicamento de estudio será administrado por vía subcutánea. Durante el estudio deberá acudir a 14 visitas al Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua.

En su primer consulta, el Dr. y/o sus colaboradores determinará si usted es elegible para participar con base a su historia médica y los resultados de diversas pruebas tales como examen físico, medición de la presión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, temperatura oral, peso, intradermorreacción (respuesta de hipersensibilidad tardía a la colágena-PVP) y análisis de sangre.

El Dr. y/o sus colaboradores evaluarán su esclerodermia a fin de determinar si puede entrar en el estudio.

En su segunda visita, el Dr. y/o sus colaboradores evaluarán su estado de salud. Como en la primera visita, usted llenará algunos cuestionarios. Si cumple con todos los requisitos del estudio, podrá continuar en el mismo y recibirá el tratamiento con el medicamento de estudio.

Si es elegible para el estudio, recibirá una tarjeta de identificación que indicará que usted participa en un estudio de investigación, el nombre y el teléfono de la persona a la que se deberá llamar en caso de emergencia.

En cada visita se le pedirá que conteste cuestionarios como en sus primeras dos visitas. Se le tomarán la presión arterial, la frecuencia cardiaca y el peso. El Dr. y/o sus

colaboradores realizarán un detallado de sus lesiones y evaluará la placa y la respuesta al medicamento.

Si por alguna razón no puede seguir participando en el estudio, se le hará una consulta adicional durante la cual se repetirán los procedimientos y las evaluaciones. Se le tomará una muestra de sangre y se le hará un examen físico. Se le preguntará la razón principal por la que abandona el estudio.

MOLESTIAS Y RIESGOS

Pueden ocurrir otros efectos colaterales que todavía se desconocen.

Como sucede en cualquier tratamiento farmacológico o biológico pueden ocurrir reacciones alérgicas graves que pueden poner en riesgo la vida.

Además de los efectos secundarios potenciales, pueden presentarse ciertas molestias por las pruebas de sangre, tales como moretones o dolor en el lugar de la toma de la muestra, o desmayos por la prueba de sangre en sí. La cantidad de sangre total que se extraerá durante todo el tiempo del estudio será de aproximadamente 20 ml (aproximadamente ¼ de vaso de agua chico, en total). Además de tomar una biopsia.

BENEFICIOS DE LA PARTICIPACIÓN

Podrá recibir beneficios terapéuticos o directamente sobre la salud al participar en este estudio. La sociedad también resultará beneficiada con la información que se obtenga sobre la respuesta al medicamento de estudio. Sin embargo, es posible que no obtenga ningún otro beneficio terapéutico o directamente sobre su salud durante este estudio o después de concluirlo.

ALTERNATIVAS

Si decide no participar en este estudio, existen otros tratamientos para la esclerodermia, por ejemplo medicamentos convencionales orales. Su doctor también podrá prescribirle medicamentos más potentes que requieran receta médica.

CONFIDENCIALIDAD

La información de este estudio se presentará al patrocinador y a las autoridades de Salud de nuestro país que la requieran. Los registros médicos que identifican a usted y la forma de consentimiento que usted firmó serán revisados por el patrocinador y podrán ser inspeccionados por agencias reguladoras gubernamentales y por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos del Hospital. Ya que es necesario revelar la información a estas partes, no puede garantizarse una confidencialidad absoluta. Los resultados de este estudio podrán presentarse en reuniones y publicaciones; sin embargo, su identidad nunca será divulgada en tales presentaciones.

NUEVOS HALLAZGOS

Se le informará sobre todos los nuevos hallazgos importantes hechos durante el estudio que pudieran afectar su voluntad de continuar participando en el mismo.

CONTACTOS

El Dr. o la(s) persona(s) que él designó han contestado y contestarán todas sus preguntas. Si usted tiene preguntas adicionales durante el estudio acerca de la investigación o en caso de una lesión relacionada con la investigación o de cualquier otro problema, sírvase ponerse en contacto con:

INVESTIGADOR Nombre:

Domicilio:

Teléfono:

No firme esta forma a menos que haya tenido la oportunidad de plantear sus preguntas y haya recibido respuestas satisfactorias a todas ellas.

PARTICIPACIÓN/RETIRO VOLUNTARIO

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a participar o puede interrumpir su participación en cualquier momento durante el estudio sin penalidad alguna ni pérdida de beneficios a los que tiene derecho de otro modo. Podrá interrumpir su participación sin perjuicio alguno de su tratamiento médico o de su participación en estudios futuros en el Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua. Además, el investigador o el patrocinador pueden dar por terminada su participación, independientemente de su consentimiento, si usted requiere un medicamento adicional, ha violado el protocolo del estudio, ha sufrido una lesión relacionada con el estudio o por razones administrativas. En el momento en que se interrumpa su participación en el estudio, le pediremos, por su propia seguridad, que colabore con los procedimientos de terminación, incluyendo examen físico y de sangre.

CONSENTIMIENTO

Entiendo que recibiré una copia de la forma de consentimiento firmada.

(Firma del paciente y fecha)

(Firma del testigo y fecha)

BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- Enomoto D, Mekkes A, Bossuyt P, Quantification of cutaneous sclerosis with a skin elasticity meter in patients with generalized scleroderma; J Am Acad Dermatol 1996;35:381-7
- 2.- Ostojić P, Damjanov N, Different clinical features in patients with limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis, Clin Rheumatol 2006 25: 453–457.
- 3.- Drake L, Dinehart Ch, Farmer E, Guidelines of care for scleroderma and sclerodermoid disorders J Am Acad Dermatol 1996;35:609-14.
- 4.- Bernal E, Jurado F. Características clínico epidemiológicas de la esclerodermia localizada. Tesis de posgrado. Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”. 2007
- 5.- Roberts-Thomson PJ, Walker JG, Scleroderma: it has been a long hard journey, Internal Medicine Journal 2006; 36: 519–523
- 6.- Rodnan GP, Jablonska S, Medsger TA, Classification and nomenclature of progressive systemic sclerosis (scleroderma), Clin Rheum Dis 1976; 5:5-13
- 7.- Siu C, Jurado F. Ultrasonido de 10 Mhz como prueba diagnóstica para pacientes con esclerodermia localizada, Tesis de posgrado. Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” 2009
- 8.- Rosenkranz M, Agle L, Efthimiou P, Systemic and Localized Scleroderma in Children Current and Future Treatment Options Pediatr Drugs 2006; 8 (2): 85-97
- 9.- Bawa S. Scleroderma, London, 2006; 3: 40
- 10.- Weide B, Walz T, Garbe C. Is morphea caused by Borrelia burgdorferi?. Br J Dermatol 2000;142(4):636-644
- 11.- Goodlad JR, Davidson MM, Gordon P, Morphea and Borrelia burgdorferi: results from the Scottish Highlands in the context of the world literature J Clin Pathol: Mol Pathol 2002;55:374–378
- 12.- Maeda M, Mori Shunji. Occupational or extrinsic stimulation factors and initial signs of progressive systemic sclerosis. In J of Dermatol 1992; 31: 257-60
- 13.- Murray JK, Laxer MR, Scleroderma in children and adolescents. Rheum Dis Clin N Am 2003:603-624

- 14.- Ghersetich I, Teofoli P, Benci P, Localized Scleroderma, Clinics in Dermatology 1994;12:237-242
- 15.- Mayes M , Classification and Epidemiology of Scleroderma, Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery, 1998; 17(I): 22-26
- 16.- Peterson L, Nelson A, Su D., Classification of Morphea (Localized Scleroderma), Mayo Clin Proc 1995; 70 (11):1068-1076
- 17.- Sehgal NV, Srivastava G, Aggarwal A. Localized scleroderma/morphea. Int J Dermatol 2002;41:467-475
- 18.- Barzilai A, Lyakhovitsky A, Horowitz A. Keloid-like Scleroderma. Am J Dermatopathol 2003;25(4):327-330
- 19.- Tollefson MM, Patricia M. En coup de sabre morphea and Parry-Romberg syndrome: A retrospective review of 54 patients, J Am Acad Dermatol 2007;56:257-63
- 20.- Martínez EV, Ramos FA, Estrada AI. Esclerodermia en golpe de sable. Reporte de un caso. Rev Cent Dermatol Pascua 2005;14:39-42
- 21.- Burney EI, Galen W, Reed R. Linear Scleroderma in Children. Int J Dermatol 1996;35:330-336
- 22.- Sommer A, Gambichler T, Bacharach-Buhles M, Clinical and serological characteristics of progressive facial hemiatrophy: A case series of 12 patients. J Am Acad Dermatol 2006;54:227-33
- 23.- Zulian F, Scleroderma in Children, Pediatr Clin N Am 2005;52:521– 545
- 24.- Laxer R, Zulian F., Localized scleroderma, Current Opinion in Rheumatology 2006, 18:606–613
- 25.- Birdi N, Laxer RM, Thorner P, Localized scleroderma progressing to systemic disease: case report and review of the literature. Arthritis Rheum, 1993;36:410-5
- 26.- Cosnes A, Anglade MC, REvus J, Thirteen-megahertz ultrasound probe: its role in diagnosing localized scleroderma, Bri J Dermatol 2003; 148: 724–729
- 27.- Bendeck S, Jacobe H, Ultrasound as an outcome measure to assess disease activity in disorders of skin thickening: an example of the use of radiologic techniques to assess skin disease, Dermatologic Therapy, Vol. 20, 2007, 86–92

- 28.- Seyger M, Van den Hoogen F. Reliability of two methods to assess morphea: Skin scoring and the use of a durometer, *J Am Acad Dermatol* 1997;37:793-6.
- 29.- Kreuter A, Gambichler T, Breuckmann F, Pulsed High-Dose Corticosteroids Combined With Low-Dose Methotrexate in Severe Localized Scleroderma, *Arch Dermatol*. 2005;141:847-852
- 30.- Steen V, Steen VD, Medsger TA, Rodnan GP. D-penicillamine therapy in progressive Systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Int Med* 1982;97:652-9.
- 31.- Vierra E, Cunningham B, Morphea and Localized Scleroderma in Children, *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 1999;18(3): 210-225
- 32.- Bruns M et al. Serum levels of soluble IL-2 receptor, soluble ICAM-1, TNF-alpha, interleukin-4 and interleukin-6 in scleroderma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1997;8:222-228
- 33.- Ihn H , Tamaki K, Takehara K, Soluble CD4 and CD8 in serum from patients with localized scleroderma, *Arch Dermatol Res* 1996;288 : 358–352
- 34.- Kreuter A, Hyun K, Skrygan M, Sommer A, Ultraviolet A1-induced downregulation of human b-defensins and interleukin-6 and interleukin-8 correlates with clinical improvement in localized scleroderma, *Br J Dermatol* 2006; 155:600–607
- 35.- Peterkofsky B, Gosiewska A, Singh K, Species Differences in cis-Elements of the Proa1(I) Procollagen Promoter and Their Binding Proteins, *Journal of Cellular Biochemistry* 1999; 73:408–422
- 36.- Takehara K, Sato S. Localized scleroderma is an autoimmune disorder, *Rheumatology* 2005;44:274–279,
- 37.- Winkelmann RK, Pathogenesis and staging of scleroderma. *Acta Derm Venereol* 1976;5:5-13
- 38.- Murata Maki, et al., Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: Is systemic sclerosis a Th17 disease?, *J Dermatol Sci* 2008:1-3
- 39.- Krieg T. Meurer M. Systemic Scleroderma. *J Am Acad Dermatol*, 1988;18:457-81
- 40.- Carwile LE. The control of fibrosis in systemic sclerosis: a strategy involving extracellular matrix, cytokines and growth factors. *J Dermatol* 1994; 21:1-4

- 41.- Singer A, Clark R. Cutaneous Wound Healing, *N Engl J Med* 1999;341(10):738-746
- 42.-Kowalewski C, Kozłowska A, Alterations of Basement Membrane Zone and Cutaneous Microvasculature in Morphea and Extragenital Lichen Sclerosus. *Am J Dermatopathol* 2005; 27 (6):489-496
- 43.- McGaha T, Le M, Koderer T, Molecular Mechanisms of Interleukin-4–Induced Up-Regulation of Type I Collagen Gene Expression in Murine Fibroblasts, *arthritis & rheumatism* 2003; 48(8): 2275–2284
- 44.- Myllyharju J, Kivirikko K. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms, *TRENDS in Genetics* 2004; .20(1): 33-43
- 45.- Gelse K, E.Pöschl, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003;55 :1531– 1546
- 46.- Lauer-Fields Juska D, Fields G, Matrix Metalloproteinases and Collagen Catabolism *Biopolymers Pept Sci* 2002; 66: 19–32
- 47.- Tessier P, Ca'itaruzzi P, coll S, Inhibition of lymphocyte adhesion to Glucocorticoids involves the attenuation of vascular cell Adhesion Molecule 1 And Intercellular Adhesion Molecule 1 Gene Expression Cytokine-Activated Synovial Fibroblasts By, *Arthritis & Rheumatism* 1990;39(2):226-234
- 48.- Cutroneo K, How Is Type I Procollagen Synthesis Regulated at the Gene Level During Tissue Fibrosis, *Journal of Cellular Biochemistry* 2003; 90:1–5
- 49.- Kawakami T, Ihn H, Xu W, Increased Expression of TGF- β Receptors by Scleroderma fibroblasts: Evidence for Contribution of Autocrine TGF- β signaling to Scleroderma Phenotype, *J Invest Dermatol* 1998; 110:47–51
- 50.- Ihn H, Yamane K, Kubo K. Blockade of Endogenous Transforming Growth Factor β Signaling Prevents Up-Regulated Collagen Synthesis in Scleroderma Fibroblasts Association With Increased Expression of Transforming Growth Factor β Receptors. *Arthritis and Rheumatism* 2001; 44(2):474-480
- 51.- Basith S, Carachi R, Edward M. Keratinocyte regulation of TGF- β and connective tissue growth factor expression: A role in suppression of scar tissue formation. *Wound Rep Reg* 2007; 15: 748–755
- 52.- Branton M, Kopp J. TGF- β and fibrosis. *Microbes and Infection*,1999;1:1349–1365

- 53.- Shuan S., Huang S. TGF- β Control of Cell Proliferation. *Journal of Cellular Biochemistry* 2005;96:447–462
- 54.- Jenkins G. The role of proteases in transforming growth factor- β activation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008;40: 1068–1078
- 55.- Asano Y, Ihn Y, Involvement of α v β 5 Integrin in the Establishment of Autocrine TGF- β Signaling in Dermal Fibroblasts Derived from Localized Scleroderma, *J Invest Dermatol* 2006;126, 1761–1769.
- 56.- Yamamoto T, Nishioka K . Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective *Experimental Dermatology* 2005;14: 81–95
- 57.- Hunzelmann N, Anders A, Fierlbeck G, Double-blind, placebo-controlled study of intralesional interferon gamma for the treatment of localized scleroderma, *J Am Acad Dermatol* 1997;36:433
- 58.- Yamamoto Y, Eckes B, Mauch C, Monocyte Chemoattractant Protein-1 Enhances Gene Expression and Synthesis of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Fibroblasts by an Autocrine IL-1 α Loop, *J Immunol*, 2000, 164: 6174–6179
- 59.- El-Azhary R A. Do Antihistone Autoantibodies Reflect Disease Activity in Linear Scleroderma? *Arch Dermatol* 2004, 140::759-60
- 60.- Sato S, Kodera M, Hasegawa M. Antinucleosome antibody is a major autoantibody in localized Scleroderma, *Br J Dermatol* 2004; 151: 1182–1188.
- 61.- Bielsa MI. Autoanticuerpos específicos de esclerodermia sistémica. Correlación clínica y significado biológico. *Piel* 1995;10:285-287
- 62.- Sapadin NA. Fleischmajer R, Treatment of Scleroderma. *Arch Dermatol* 2002; 138:99-105
- 63.- Falanga V, Medsger JT. D-penicillamine in the treatment of localized scleroderma. *Arch Dermatol* 1990;126:609-12
- 64.- Hulshof M, Bouwes B, Double-blind, placebo-controlled study of oral calcitriol for the treatment of localized and systemic scleroderma; *J Am Acad Dermatol* 2000;43:1017-23.
- 65.- Hulshof MM, Pavel S, Breedvel FC. Oral calcitriol as a new therapeutic modality for generalized morphea. *Arch Dermatol* 1994;130:1290-3

- 66.- Elst EF, Van Suijlekom-Smit LW, Oranje AP. Treatment of linear scleroderma with oral 1,25-dihydroxvitamin D3 (calcitriol) in seven children. *Pediatric Dermatol*; 16:53-8
- 67.- Piraccini BP, Vincenzi C, Lorenzi S. Oral calcitriol in the treatment of scleroderma 'en coupe de sabre', *Journal of Dermatological Treatment*, 2000 ; 11, 207–208
- 68.- Dytoc M., Kossintseva I, Ting P. First case series on the use of calcipotriol–betamethasone dipropionate for morphea, *Br J Dermatol* 2007 157,609–11
- 69.- Janiga J, Ward D, Lim H, UVA-1 as a treatment for scleredema. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004; 20: 210–211
- 70.- Gambichler T, Skrygan M. Differential expression of decorin in localized scleroderma following ultraviolet-A1 irradiation , *J Am Acad Dermatol* 2007;56:956-9.
- 71.- Brenner M, Herzinger T, Berking, Phototherapy and photochemotherapy of sclerosing skin diseases, *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005; 21: 157–165
- 72.- Eberlein-König, B, Vogel M, Katzer K, Successful UVA1 phototherapy in a patient with scleredema Adultorum, *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19: 203–204
- 73.- Kreuter A, Hyun J, Stücker M, A randomized controlled study of low-dose UVA1, medium-dose UVA1, and narrowband UVB phototherapy in the treatment of localized scleroderma, *J Am Acad Dermatol* 2006;54:440-7
- 74.- Kreuter A, Gambichler T, Avermaete A. Combined treatment with calcipotriol ointment and low-dose ultraviolet A1 phototherapy in childhood morphea. *Pediatric Dermatol* 2001;18:241-5
- 75.- Kerscher M, Volkenandt M, Gruss C. Low dose UVA phototherapy for treatment of localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:21-6
- 76.- Grundmann-Kollmann M, Oschendorf F, Zollner TM. PUVA-cream photochemotherapy for the treatment of localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 2000;43:675-8
- 77.- Weibel L ,Sampaio C, Evaluation of methotrexate and corticosteroids for the treatment of localized scleroderma (morphea) in children, *Br J Dermatol* 2006; 15:1013–1020

- 78.- Mancuso, Berdondini RM., Localized scleroderma: response to occlusive treatment with tacrolimus ointment, *Br J Dermatol* 2005 152, pp176–198
- 79.- Serrano P. Corticosteroides tópicos (I): desarrollo, mecanismo de acción, farmacología, Actualización. *Med Cutan Iber Lat Am* 2005; 34:33-38
- 80.- Giménez AM. Corticosteroides tópicos (I): desarrollo, mecanismo de acción, farmacología *Act. Dermatológ.* 1997; 7: 495-508
- 81.-Robion F, Doizk B, Bourk L, Use of synovial fluid markers of cartilage synthesis and turnover to study effects of repeated intra-articular administration of methylprednisolone acetate on articular cartilage in vivo, *Journal of Orthopaedic Research* 2001; 19: 250-258
- 82.- Joly P, Bamberg N, Crick B. Treatment of severe forms of localized scleroderma with oral corticosteroids: follow-up study on 17 patients. *Arch Dermatol* 1994;130:663-4
- 83.- Silva P. Calderón P. Corticoides Sistémicos. Uso Racional en Dermatología. *Rev. Chilena Dermatol.* 2008; 24(3):197-204
- 84.- Rhen T, Cidlowski J. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs *N Engl J Med* 2005;353:1711-23.
- 85.- Fett N, Werth P, Update on morphea part II measures and treatment, *J Am Acad Dermatol* 2011; 64:231-4
- 86.- Cutroneo K, Sterling K, How do Glucocorticoids Compare to Oligo Decoys as Inhibitors of Collagen Synthesis and Potential Toxicity of These Therapeutics?, *Journal of Cellular Biochemistry* 2004; 92:6–15
- 87.- Oishi Y, Fu Z, Ohnuki Y, Cutaneous Biology Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases, *Br J Dermatol* 2002; 147: 859–868
- 88.- Meisler N, Keefer K, Ehrlich P. Dexamethasone Abrogates the Fibrogenic Effect of Transforming Growth Factor- β in Rat Granuloma and Granulation tissue Fibroblast, *Dermatol* 1997;108:285-289
- 89.- Wen F, Kohyama T, Sköld C. Glucocorticoids Modulate TGF- β Production. *Inflammation*, 2002; 26(6):279-290

- 90.-Furue M, Terao H, Rikihisa W, Clinical dose and adverse effects of topical steroids in daily management of atopic dermatitis, *Br J Dermatol* 2003; 148: 128–133.
- 91.- Gu Y, Talts J, Gullberg D, Glucocorticoids down-regulate the extracellular matrix proteins fibronectin, tubulin-1 and tubulin-2 in bone marrow stroma down-regulate the extracellular matrix proteins *Eur J Haematol* 2001; 67: 176±184
- 92.- Priestley G, Brown J, Effects of corticosteroids on the proliferation of normal and abnormal human connective tissue cells , *Br J Dermatol* 1998;102:35.
- 93.-Scha S, Asadullah K, Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy, *Experimental Dermatology* 2006; 15: 406–420
- 94.- Fubini S, Todhunter R, Burton-Wurster N., Corticosteroids alter the differentiated phenotype of articular chondrocytes, *Journal of Orthopaedic Research* 2001; 19:688-695
- 95.- Hengge U, Ruzicka T, Schwartz R. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:1-15
- 96.- Lee JY, Maibach HI, Corticosteroid skin atrophogenicity: assessment methods, *Skin Research and Technology* 1998; 4: 161-166
- 97.- Schoepe S, Scäcke H, May E,Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy *Exp Dermatol* 2006; 15: 406–420.
- 98.- Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Krötzsch-Gómez FE, Implantes de Fibroquel aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. *Rev Biomed* 1997;8:81-8.
- 99.- Furuzawa-Carballeda J, Cabral AR, Zapata-Zuñiga M, Subcutaneous administration of polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. An open-label pilot trial. *J Rheumatol*, 2003;30,140-9.
- 100.-Krötzsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes-Márquez R, et al. Cytokine expression is downregulated by collagen-polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol* 1998;111:828-34.
- 101.-Furuzawa-Carballeda J, Krötzsch E, Espinosa-Morales R, Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down-regulates IL-1beta, TNF-alfa, TGF-alfa1, ELAM-1 and VCAM-1 expression in scleroderma skin lesions. *Clin Exp Dermatol* 2005;30:83-6.

- 102.-Almazán Díaz A, de la Cruz García JC, Lira Romero JM, et al. Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena I polimerizada: Estudio radiológico, histológico e inmunohistoquímico. *Rev Mex Ortop Traum* 1996;10:142-52.
- 103.-Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Furuzawa-Carballeda GJ, et al. Colágena Tipo I Co-polimerizada accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat skull and promotes the expression of osteopontin and SPARC during bone repair of rat femoral fractures. *Ann NY Acad Sci* 1998;857:232-6.
- 104.- Bermúdez-Hickey R, Nesme-Avila W, Lydia Ruiz Flores, Tratamiento de la pseudoartrosis de tibia con colágena-polivinilpirrolidona. *Rev Mex Traum* 1999;13:148-51.
- 105.-Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J. IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 expression levels are higher in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis than in osteoarthritis. *Scan J Immunol* 1999;50:215-22.
- 106.-Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J, Díaz de León L. Mediators of inflammation are down-regulated meanwhile apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized-collagen. *Clin Exp Immunol*, 2002;130:140-9.
- 107.-Furuzawa-Carballeja J, Macip-Rodríguez PM, Cruz-Robles D, et al. Anti Inflammatory effect of polymerized type I Collagen (Polymerized-Clg) vs. other modified extracellular matrix proteins (MECMPs) in CIA. *Int Proc Div Immunol*, 2007;269-75.
- 108.-Furuzawa-Carballeda J., Rojas E, Valverde M, et al. Cellular and humoral responses to collagen-polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:1029-35.
- 109.- Furuzawa-Carballeda J, Fenutria-Ausmequet R, Gil-Espinosa V, et al. Polymerized-type I Collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. Effect of intramuscular administration in a double blind placebo-controlled clinical trial. *Clin Exp Rheumatol*, 2006;24:521-8.
- 110.-Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J, Díaz de León L. Colágena Tipo I Co-polimerizada decreases collagen turnover in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis patients. *Ann NY Acad Sci* 1999;878:508-602.

- 111.- Furuzawa-Carballeda J, Muñoz-Chablé OA, Barrios-Payán J, Hernández-Pardo R. Effect of Polymerized-Type I collagen in knee osteoarthritis I. in vitro Study. *Eur J Clin Invest* 2009; 39 (7):591-7
- 112.- Furuzawa-Carballeda J, Muñoz-Chablé OA, Macías-Hernández SI, Agualimpia-Janing A. Effect of Polymerized-Type I collagen in knee osteoarthritis II. in vivo Study. *Eur J Clin Invest* 2009; 39 (7):598-606
- 113.- Barrio VR, Cunningham BB, Interventions for morphea (protocol), the Cochrane library, 2008, 1
- 114.- Furuzawa Carballeda J, Krötzsch-Gómez F, Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down regulates IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 and VCAM-I expression in scleroderma skin lesions, *clinical and experimental dermatology*, 2005;30:83-86
- 115.- Price VH: Authors' conflicts of interest: A disclosure and editors' reply *N Engl J Med* 1999; 341 (21): 1618
- 116.- Radstake TR, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y et al. The Pronounced Th17 Profile in Systemic Sclerosis (SSc) Together with Intracellular Expression of TGF β and IFN γ Distinguishes SSc Phenotypes. *Plos One* 2009;4:1-9. e5903.
- 117.- Rankin AL, Mumm JB, Murphy E, Turner S, Yu N, McClanahan TK et al. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *J Immunol* 2010;184:1526-35
- 118.- Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2455-63.
- 119.- Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM. Endogenous IL-1 β from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J Clin Invest* 1999;103:1253-60.
- 120.- Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2001;27:140-6.
- 121.- Piguet PF, Vesin C, Grau GE, Thompson RC. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. *Cytokine* 1993;5:57-61.
- 122.- Bamber B, Reife RA, Haugen HS, Clegg CH. Oncostatin M stimulates excessive extracellular matrix accumulation in a transgenic mouse model of connective tissue disease. *J Mol Med* 1998;76:61-9.

- 123.- Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *J Rheumatol* 1992;19:1207-11.
- 124.- Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells?. *Eur J Immunol* 2009;39:637-40.
- 125.- Fiocco U, Rosada M, Cozzi L, Ortolani C, De Silvestro G, Ruffatti A et al. Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity. *Ann Rheum Dis* 1993;52:272-7.