



502527 7
2.07
UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA UNAM

RELACION ETIOLOGICA ENTRE ESCLERODERMIA Y
Borrelia burgdorferi AGENTE ETIOLOGICO DE LA
ENFERMEDAD DE LYME

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:
CLAUDIA ESTRADA ANGELES

MEXICO, D.F.

1995



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 está 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.

INDICE

INDICE

Tema	Páginas
Capítulo I	
INTRODUCCION	
1.1 Planteamiento del Problema	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo General	3
1.2.2 Objetivos Específicos	3
1.3 Hipótesis	3
Capítulo II	
ANTECEDENTES	
2.1 Esclerodermia	5
2.1.1 Definición	5
2.1.2 Historia	5
2.1.3 Clasificación	7
2.1.4 Etiopatogenia	9
2.1.5 Epidemiología	14
2.1.6 Cuadro Clínico	14
2.2 Enfermedad de Lyme	17
2.3 <u><i>Borrelia burgdorferi</i></u>	20
2.4 Acrodermatitis crónica atrófica	22
2.5 Esclerodermia y <u><i>Borrelia burgdorferi</i></u>	22
2.6 Hemiatrofia facial y <u><i>Borrelia burgdorferi</i></u>	25
2.7 Técnicas inmunofluorescentes	26
2.8 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta	27
2.9 Lyme-Spot IF	28

Capítulo III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama General	30
3.1.1 Diagrama Específico	31
3.2 Material, Reactivos y Equipo	32
3.2.1 Material Biológico	32
3.2.2 Material de Laboratorio	32
3.2.3 Reactivos	33
3.2.4 Equipo	33
3.3 Metodología	34
3.4 Análisis Estadístico	36

Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Resultados	38
4.2 Discusión	38
4.3 Conclusiones	44
Glosario	46
Bibliografía	51

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad de Lyme es una infección cutánea sistémica causada por *Borrelia burgdorferi*. Esta enfermedad es generalmente transmitida por la mordedura de una garrapata del género *Ixodes* y a menudo comienza con una lesión cutánea migratoria de tipo anular, llamada eritema crónico migratorio (Trevisan y Cinco, 1990).

Es generalmente aceptado que en la enfermedad de Lyme además de encontrarse un eritema crónico migratorio, se presenta también una linfadenitis benigna cutánea y una acrodermatitis crónica atrófica (ACA), entendiéndose que la infección por *Borrelia burgdorferi* es la responsable de estas manifestaciones (Halkier-Sorensen y Hansen, 1989). En los recientes años esta espiroqueta ha sido asociada con otros desórdenes cutáneos, entre estos se encuentra la morfea (esclerodermia localizada) y la esclerodermia diseminada (Aberer y cols., 1987).

La esclerodermia es una enfermedad dermatológica de la cual se desconoce aún su origen, se caracteriza por la aparición de lesiones hiper o hipocrómicas, adelgazamiento y al mismo tiempo endurecimiento de la piel afectada, siendo los sitios más afectados el tronco, las extremidades y la cara, en caso de esclerodermia localizada (morfea), o bien, cualquier sitio de la piel, con afectación de algunos órganos cuando se trata de esclerodermia generalizada, en cuyo caso existen manifestaciones sistémicas (Rook, 1988).

En 1985 tres grupos de investigadores estudiaron la enfermedad de Lyme en Basel, Munich y Viena y encontraron que de un 20 a un 50% de los pacientes con morfea (esclerodermia localizada) presentaban anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* agente etiológico de la enfermedad de Lyme (Aberer y cols., 1991).

Varias observaciones apuntan a un posible origen de esclerodermia localizada (morfea) por Borrelia:

1. La coexistencia de morfea con dermatitis crónica atrófica (ACA)(Muller,1969; Coulson,1989) y la relación clínica entre estas dos dermatosis (Rulli y cols. 1986).
2. La exitosa terapia con penicilina en algunos casos (Miescher,1949).
3. Observaciones de que la morfea inicia en el sitio de la mordedura de la garrapata.

Se han encontrado anticuerpos específicos contra B.burgdorferi en acrodermatitis crónica atrófica, eritema crónico migratorio y linfadenosis benigna cutánea, ya sea por inmunofluorescencia indirecta o por ELISA (Stanek y cols. 1986).

Recientemente se han detectado anticuerpos contra Borrelia burgdorferi en morfea (esclerodermia localizada) (Aberer y cols.,1985) y además se ha reportado la presencia de anticuerpos contra espiroquetas en casi el 100% de los pacientes con acrodermatitis crónica atrófica (ACA)(Asbrink y Hovmark,1984).

Años atrás varios autores reportaron acerca de la relación y la coexistencia entre la acrodermatitis crónica atrófica (ACA) y esclerodermia (Muller,1969). Miositis, artritis y alteraciones neurológicas han sido encontradas en ambas enfermedades (Gebhart y cols.,1971). De estas sorprendentes similitudes surgió la pregunta sobre si estas dos dermatosis son diferentes manifestaciones o si son una sola enfermedad.

1.2 OBJETIVO GENERAL.

1.2.1. Determinar si existe una relación entre esclerodermia y la infección con *Borrelia burgdorferi*, como causante de esta enfermedad en México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.2.1.1. Determinar la presencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, en los sueros de pacientes clasificados con esclerodermia localizada, esclerodermia diseminada y hemiatrofia facial, y en el suero de personas sanas.

1.2.1.2. Investigar si existe reacción cruzada a *Treponema pallidum* en sueros de personas clasificadas con esclerodermia localizada, esclerodermia diseminada y hemiatrofia facial.

1.3 HIPOTESIS.

Si hay una relación entre esclerodermia localizada, esclerodermia diseminada, hemiatrofia facial y *Borrelia burgdorferi* en México, entonces se encontrará la presencia de anticuerpos contra esta espiroqueta en el suero de los pacientes clasificados con estas enfermedades.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1. ESCLERODERMIA.

2.1.1. Definición.

Esclerodermia es un término aplicado a un grupo heterogéneo de situaciones que incluyen esclerodermias localizadas, así como esclerosis sistémica progresiva con extensión a otros órganos (Peyri, 1980) con tejido conectivo y cuya característica común es el proceso fibrótico.

La esclerodermia localizada se considera un padecimiento crónico, benigno, de causa todavía desconocida y que se caracteriza clínicamente por un endurecimiento de la piel, esto es, zonas de esclerosis escasas o no, que cursan de una manera asintomática (Ruiz Maldonado, 1989).

La esclerodermia diseminada (esclerosis sistémica progresiva) es una enfermedad crónica insidiosa de la cual se desconoce su etiología. El término esclerodermia se refiere a un endurecimiento insensible de la piel, y este cambio ocurre a la vez con una serie de enfermedades. La esclerosis sistémica progresiva (SSP) es un desorden sistémico del tejido conectivo caracterizado por un endurecimiento y falta de sensibilidad en la piel (escleroderma), con anomalías que envuelven el sistema microvascular (talangiectasia) y los grandes vasos (fenómeno de Raynaud), y cambios fibróticos degenerativos en varios órganos del cuerpo, incluyendo corazón, pulmones, riñones y el tracto gastrointestinal. En el mayor de los casos la esclerodermia consiste primeramente en lesiones cutáneas localizadas, las cuales avanzan a la forma sistémica (Rook, 1988).

2.1.2. Historia.

La esclerodermia es conocida desde tiempos antiguos por médicos como Hipócrates (460-370 a.C.), quien describió el caso de un ateneo cuya piel se encontraba indurada, condición por la cual era imposible pellizcarla. Galeno (130-200 d. C.) describió una enfermedad caracterizada por un tipo de obstrucción de los poros de la piel con condensación o empastamiento de la misma, manchas blancas, pigmentaciones y ausencia de glándulas sudoríparas. Sin embargo, las descripciones no son lo suficientemente precisas para ser aceptadas definitivamente como casos de esclerodermia, de la forma como en la actualidad se define a esta enfermedad. También es difícil por la falta de información detallada de las primeras descripciones de los tiempos modernos (Saul, 1991).

Diferentes autores han citado en varios escritos datos sobre la esclerodermia, como Zaculus en 1634, Curzio en 1753, Watson en 1754 y Thirial en 1845. Rodnan y Benedek en 1962, hicieron un estudio cuidadoso de la historia de la esclerodermia, primera descripción convincente de la enfermedad, fundamentada en una monografía escrita por Carlo Curzio, la cual fué publicada en Nápoles en 1753, traducida al inglés un año después en 1754 bajo el título "Un Relato de una Enfermedad Extraordinaria y su Remedio", posteriormente, en 1755 fué traducida al francés. Posteriormente fué notable una rara ausencia de observaciones subsiguientes de esta enfermedad, por casi una centuria, hasta 1847. Durante ese año se reportaron 3 casos de esclerodermia por Grisolle, Forguet y Thirial (Degos, 1904).

En el mismo año (1847) Gintrac revisó 8 casos que comprendieron aquellos antes citados y posiblemente los casos de Curzio, los que llamó enfermedad esclerodermia, nombre francés con que actualmente se conoce a la enfermedad. Siete años después, en 1854, Guillette recopiló los reportes de 12 casos. Para el año de 1878 un médico suizo describió los depósitos subcutáneos de calcio de algunos casos de esclerodermia, reportados posteriormente en 1910 por Thibierge y Weissenbach (Barnett, 1974).

Jonathan Huitchinson entre 1893 y 1895, además de reconocer las características del fenómeno de Raynaud y su asociación con la esclerodermia, también distinguió algunas variantes de la enfermedad, como aquella que afecta predominantemente las extremidades (esclerosis acotérica), la forma difusa y la forma localizada en parches (Barnett, 1974).

En 1895, Lewen y Heller publicaron una monografía en la que conjuntaron 507 casos. En 1898, Osler describió 8 casos de la forma generalizada, una de las más dramáticas y severas, comentando en su trabajo: ***"Dentro está la forma agravada de la esclerodermia, la difusa, una de las más terribles enfermedades de la humanidad"*** (Degos, 1904).

El primer estudio post-mortem de un paciente con esclerodermia fué reportado por Steven en 1898, quién nota los rastros de la enfermedad en los vasos y en órganos como el cordón medular y los riñones (Ruiz Maldonado, 1989).

Durante este siglo se han continuado los estudios de la entidad con seguimientos clínicos extensos que han ayudado a reconocer el daño a otros órganos y a dividir la enfermedad en dos tipos principales. Debe mencionarse también, que los estudios patológicos y fisiológicos han sido extensos. Las lesiones patológicas de la esclerodermia fueron descritas en detalle en 1924 por Matsui, quién fundamentó el incremento de la colágena y su condensamiento en los vasos pequeños de la piel, así como cambios semejantes en otros órganos (Degos, 1904).

Los aspectos fisiológicos de las alteraciones vasculares han sido estudiados también por diferentes autores: Brown y O'Leary en 1925, Brown y colaboradores en 1930 y Lewis y Landis en 1931 (Rook, 1988).

O'Leary y Nomland en 1930 en un extenso estudio clínico distinguieron las formas difusas o generalizadas de las formas localizadas o morfea. Otros autores que reconocieron esta diferencia fueron Sella en 1931 y Waisman en 1943. Este último además definió claramente la diferencia entre ambas (Barnett, 1974).

En este siglo, sobre todo a partir de la década de los cuarentas, aparecieron una serie de publicaciones en torno a las afecciones viscerales de la esclerodermia, mismas que únicamente se citan, sin comentario alguno, pues hablan solo de las formas sistémicas de la enfermedad (Muschella y Nurley, 1985).

Ya en la segunda mitad de este siglo, los trabajos de las dos formas son numerosos y aparecen por separado. Además incluyen aspectos inmunológicos, estudios de microscopía electrónica, del metabolismo de la colágena, de genética, de múltiples tratamientos, etc., que tratan de esclarecer todo aquello que implica la enfermedad.

2.1.3. Clasificación.

Existen numerosas clasificaciones pero la mayoría de los autores coinciden en dividir a la esclerodermia en formas localizadas y sistémicas, algunos agregan a la clasificación síndromes esclerodermiformes y separan además algunos tipos, nombrándolas formas especiales (Muschella y Nurley, 1985).

A continuación se expondrán algunas de las clasificaciones más representativas:

LA CLASIFICACIÓN DE J. PEYRI ES LA MÁS SENCILLA (Peyri,1980):

1. Esclerodermias cutáneas localizadas.
 - a) Morfea lineal
 - b) Morfea en placa(grandes o pequeñas gotas)
 - c) Morfea generalizada
 - d) Hemiatrofia facial

2. Esclerodermias sistémicas
 - a) CREST
 - b) Acroesclerosis
 - c) Esclerosis sistémica progresiva

3. Formas especiales
 - a) Fascitis eosinofílica (de Shulman)
 - b) Morfea invalidante panesclerótica infantil

DEGOS LA DIVIDE DE LA SIGUIENTE FORMA (Degos,1904):

1. Esclerodermia localizada
 - a) Monomélica
 - b) Circunscripta
 - placas o morfea
 - pigmentadas
 - deprimidas (Atrofodermia de Pasini y P.)
 - bulosas hemorrágicas
 - ulcerosas

2. Esclerodermia generalizada.
 - a) en gotas
 - b) en bandas
 - de miembros
 - golpe de sable
 - c) anular
 - congénita
 - ainhum

2.1.4. Etiopatogénia.

En realidad la causa básica de la enfermedad no se conoce hasta la fecha, pero existen una serie de teorías propuestas de diferente índole, para tratar de explicar los fenómenos que conllevan a su desencadenamiento, trataremos de documentar todas las causas posibles de producción de la enfermedad en este rubro del trabajo. La mayoría de los autores coinciden en que las alteraciones de la colágena originan a la esclerodermia tanto en su variedad sistémica como en la localizada, siendo en esta última solo afectadas las capas más superficiales de la piel. Además la fibrosis de la colágena es la alteración que primero salta a la vista en la esclerodermia lo que la implica en la fisiopatología básica de la enfermedad, haciendo suponer que alteraciones metabólicas de la misma son causantes de la esclerosis. Existe evidencia de que en ciertas etapas de la esclerodermia, la síntesis de colágena se incrementa y por consiguiente hay una producción excesiva de colágena joven (Ruiz Maldonado, 1989).

Hay estudios que sugieren la intervención de algunos factores de crecimiento en la patogénesis de la esclerodermia. Como son el detectar con mayor frecuencia en el suero de pacientes con esclerodermia a la IL-1-alfa, IL-2 y la IL-4, también se han detectado leves incrementos plasmáticos del factor de crecimiento derivado de las plaquetas, este último péptido junto con su receptor se ha detectado en la piel con esclerodermia (Falanga, 1992).

Se han demostrado alteraciones en la regulación de la síntesis de colágena tipo I por los fibroblastos, en el tejido de la matriz, debido a que la vida media del RNA mensajero para ello está aumentada (Ruiz Maldonado, 1989).

Las proporciones de colágeno de tipos I y III son muy similares a las de la dermis normal del adulto. Como consecuencia del incremento de la síntesis de colágena en la esclerodermia, muchas fibrillas son más delgadas que las de la piel normal, si bien el diámetro de estas últimas es de 70 a 140 nm, con un promedio de 100 nm, en una investigación 38% de las fibras de colágena de los pacientes con esclerodermia median menos de 50 nm (Lever, 1975), por lo que además de existir alteraciones cuantitativas, también las hay cualitativas.

Con frecuencia se ha debatido si la fibrosis colágena es un hecho primario en la enfermedad o secundario a los cambios vasculares que ocurren en la esclerodermia; de los que se han descrito inflamación y sobrepoblación de células endoteliales, engrosamiento de la lumen, degeneración hialina y fibrinoide, engrosamiento de la íntima en arterias de pequeño tamaño y reducción franca en el número de capilares de la piel y músculo (Ruiz Maldonado, 1989).

La proliferación concéntrica de la íntima se acompaña de un depósito de tejido mucoso, hay pocos cambios en la capa media de los vasos de pequeño calibre, y fibrosis de la adventicia, cambios que se han considerado consecuencia del daño repetido y persistente del endotelio capilar de las pequeñas arterias y capilares. Lo anterior clínicamente se traduce en el edema subcutáneo observado en las fases iniciales de la enfermedad, que reflejan un incremento en la permeabilidad capilar debido a una disfunción endotelial y varias reacciones como son la adherencia plaquetaria, proliferación endotelial y disminución de la luz de los vasos, activación de fibroblastos y finalmente fibrosis reactiva. No se sabe aún cual es el mecanismo responsable de este daño del endotelio. Se ha demostrado la existencia de un factor sérico citotóxico para las células endoteliales que puede ser bloqueado por inhibidores de proteasas, sugiriendo un mecanismo dependiente de proteasas (Lavalle, 1989).

Son demostrados los cambios a nivel de los vasos dérmicos de los pacientes con esclerodermia por examen de microscopía electrónica al inicio de la enfermedad, cuando los mismos no son percatados en la microscopía de luz. Siendo los hallazgos principales la vacuolización y destrucción ulterior de las células endoteliales, reduplicación de la membrana basal, infiltración perivascular con células mononucleares, y presencia de fibroblastos y pericitos con retículo endoplásmico rugoso prominente; indicador de mayor actividad, todo ello acompañado de fibrosis perivascular. Los infiltrados celulares y el daño de las células endoteliales parecen preceder a la etapa de fibrosis (Lever, 1975).

Otro elemento interrelacionado en la patogénesis de la esclerodermia, además de las alteraciones del tejido conectivo y las vasculares, es el mecanismo inmune.

Lo anterior es apoyado por una serie de estudios, como son la detección en el suero de pacientes con formas localizadas y generalizadas de morfea, de anticuerpos antinucleares (Ruiz Maldonado, 1989). Dicha demostración se favorece por el empleo de cultivos lisulares humanos como el HEP-2 (células del papiloma epitelial humano). En la morfea cuando se utilizan las células del cultivo mencionado, se detectan anticuerpos antinucleares en el 50% de los casos (Lever, 1975).

No se han detectado alteraciones en los niveles de inmunoglobulinas como en el caso de las formas sistémicas que cursan frecuentemente con hipergamaglobulinemia. Hablando de las alteraciones de la inmunidad celular, se refiere que generalmente se observa un infiltrado inflamatorio denso mononuclear compuesto por linfocitos T y algunos plasmocitos en las áreas activas e iniciales de la morfea, particularmente en la región perivascular, mientras que en etapas tardías predominan los fibroblastos e histiocitos. No se ha demostrado una correlación entre las anomalías inmunológicas y la presencia o severidad de los infiltrados celulares o la duración de la enfermedad (Lever, 1975).

Las linfocinas solubles de los linfocitos T activados y de los monocitos modulan el metabolismo de las células del tejido conectivo en crecimiento, incluyendo la síntesis de colágena. A ese respecto se han incriminado varias citoquinas como la interleucina 1, 4 y 6 y el factor beta de transformación de crecimiento, en cambio una disminución en la producción de interferón gama por las células mononucleares de la esclerodermia sugieren el incremento en la síntesis de colágena. También aunado a las citoquinas, la matriz extracelular muestra una profunda influencia en el metabolismo de los fibroblastos, mediante mecanismos de regulación por retroalimentación con varios grupos de receptores igualmente moléculas de la matriz extracelular como la misma colágena tipo I y fibronectina, así como sus productos de degradación, actúan como co-estimuladores para dirigir a los fibroblastos (Falanga,1992).

Se ha demostrado que productos solubles de células mononucleares son capaces de aumentar la síntesis de glicosaminglicanos por fibroblastos normales y de aquellos provenientes de pacientes con esclerodermia. También se ha encontrado un factor producido por los linfocitos T al que se le ha llamado factor inhibidor de la producción de colágena, capaz de inhibir in-vitro, la producción de la misma por los fibroblastos de los pacientes con esclerodermia, que ha hecho suponer que un defecto en la producción de este factor explicaría, en parte la acumulación excesiva de colágena en los fibroblastos (Lavalle,1989).

Existe un incremento en la función de las células T de ayuda, respuesta proliferativa temprana en cultivo mixto autólogo, en los niveles de IL-2 y del receptor para IL-2 de las células mononucleares de sangre periférica y un número mayor de lo esperado de linfocitos T que expresan antígenos Ia en el lavado bronquial (que indica activación celular). El estudio de inhibidores séricos de IL-2 ha probado ausencia de este inhibidor en el suero de los pacientes con esclerodermia, mismo que se encuentra presente en personas sanas; este fenómeno puede atribuirse a la ausencia real del inhibidor, o bien a una saturación del mismo con una ausencia relativa; no se conoce dicho inhibidor natural. Se sugiere una alteración en la inmunorregulación en la patogenia de la esclerodermia, ya que hay producción espontánea de la IL-1 en algunos pacientes con esclerodermia de corta evolución y se ha informado de una respuesta defectuosa de los linfocitos T a IL-1. La producción temprana aumentada de IL-1 podría producir proliferación de fibroblastos e incremento en la síntesis de colágena con su depósito subsecuente (Falanga,1992).

Las evidencias actuales de un síndrome de pérdida capilar observado en pacientes con neoplasia después de la administración de IL-2 asocian el daño vascular con los mecanismos mediados por la IL-2. La IL-2 induce adherencia de linfocitos al endotelio vascular y los linfocitos activados son en extremo citotóxicos a las células endoteliales. El daño quizá este mediado por linfotóxina (FNT-B), FNT-alfa e IFN-gama. En la enfermedad de injerto contra huésped hay un subgrupo de células T específicas de antígeno que producen predominantemente IL-4, la cual activa de manera directa a los fibroblastos. Las células T producen mitógenos para los mastocitos, como son la IL-3 e IL-4 (Falanga,1992).

La existencia de autoinmunidad celular a determinantes antigénicos tisulares como la laminina, también apoya la intervención de la inmunidad celular en la patogenia de la esclerodermia. Otro dato que apoya la hipótesis de que la inmunidad celular interviene en la patogenia de la esclerodermia, es el hecho de encontrar lesiones semejantes a la esclerodermia en pacientes con reacción de injerto contra huésped crónica, después de un trasplante exitoso de médula ósea, cuadro que es mediado por los linfocitos T y sus productos inmunológicamente competentes del donante, que reaccionan contra los tejidos del huésped (Harrison,1966).

Como conectivopatía más frecuente tras mamoplastia estética de aumento mediante la inyección de sustancias extrañas como el silicón aparece la esclerodermia; observación que apoya también la participación de la inmunidad mediada por células en la génesis de la esclerodermia. Aunque se considera que la silicona utilizada en medicina es química y físicamente inerte, ésta puede fluir a través de la firme cubierta de elastómero de silicona, de tal forma que se convierte biológicamente activa; pudiendo evocar una respuesta autoinmune si se convierte en sílice, así como un estímulo continuo para que los macrófagos liberarán moléculas como el ya conocido factor beta de transformación de crecimiento, o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, que como ya sabemos son capaces de reclutar y estimular a los fibroblastos para sintetizar colágena. El implante podría actuar como una fuente continua de material antigénico. La silicona podría actuar como coadyuvante asociado a un antígeno relacionado con una infección subclínica, o bien podría alterar las moléculas biológicas locales para crear un antígeno "endógeno". La presencia de abundantes macrófagos, células gigantes multinucleadas y granulomas (siliconomas), en el tejido periprotésico, en los ganglios linfáticos que drenan el implante e incluso en sitios lejanos se ha observado que aparecen frecuentemente, e indican una respuesta inflamatoria crónica (Sahn y Garen,1990).

Una hipótesis aceptada en la actualidad para explicar la patogénesis de la esclerodermia es que diversos antígenos probablemente endoleliales activan la inmunidad celular que puede iniciar y mantener una respuesta inflamatoria; los monocitos activados liberan factores solubles e interleucina-1 que son capaces de activar fibroblastos, la síntesis de colágena, fibronectina y glicosaminoglicanos, y desencadenar toda la gama de alteraciones inmunológicas e inflamatorias que finalmente llevan a la fibrosis de la esclerodermia (Lavallo, 1989).

También es importante señalar que no es infrecuente observar esclerodermia en ausencia de anomalías inmunológicas demostrables, por lo que no siempre ha sido posible implicar directamente a las alteraciones inmunológicas en la patogénesis de la enfermedad. Además de estas tres alteraciones básicas en la patogenia de la esclerodermia (colágena, vasculares e inmunológicas), existen otras ya estudiadas, como son disturbios metabólicos entre la serotonina y la monoaminooxidasa, que finalmente con llevarían a la fibrosis (Saul, 1991).

En ocasiones se ha referido una incidencia familiar, por lo que algunos casos de esclerodermia en golpe de sable podrían tener una base genética (Rook, 1988).

Otro factor implicado en la etiopatogenia es el infeccioso, se han encontrado bacilos y cuerpos de inclusión virales en los tejidos de los pacientes con esclerodermia (Arenas, 1987).

Recientemente se le atribuyen a la infección por *Borrelia burgdorferi* una serie de enfermedades cutáneas en las que se incluyen el líquen escleroso y atrófico, y esclerodermia localizada, motivo de este trabajo. La relación entre morfea y *Borrelia burgdorferi* se detallaran en otro capítulo.

Otras atribuciones etiológicas de tipo infeccioso son el presentarse el cuadro después de sufrir sarampión o varicela; también se han observado casos de morfea tras la aplicación de la vacuna BCG (Rook, 1988), este último hallazgo probablemente no sólo por el proceso infeccioso sino como disparador de una respuesta inmune celular.

En el mismo tratado del Doctor Rook hace mención de que puede aparecer o empeorar durante el embarazo y que además no está clara la relación con la menopausia; estos dos últimos factores son importantes cambios hormonales que no se sabe con seguridad como pueden interactuar en la patogénesis, o si son simplemente factores desencadenantes o tal vez eventos coincidentales.

2.1.5. Epidemiología.

La esclerodermia localizada es una enfermedad relativamente infrecuente, pero se presenta con mayor incidencia a diferencia que la forma sistémica (Fitz, 1990).

Se observa en cualquier edad, pero se sabe que en un 75% comienzan entre la segunda y quinta décadas de la vida, al parecer el tipo clínico lineal se presenta antes de los cuarenta años de edad (Fitz, 1990). En algunas series el 25% de los pacientes son pediátricos, y para algunos el 10% de los enfermos inician antes de los 10 años. Las placas localizadas aparecen en etapas posteriores de la vida. La enfermedad se presenta con menor frecuencia en la raza negra (Ruiz Maldonado, 1989).

Predomina en las mujeres, siendo afectadas tres veces más que los varones (Rook, 1988).

2.1.6. Cuadro Clínico.

Generalmente las lesiones aparecen aparentemente de manera espontánea, sin que existan factores desencadenantes específicos. Se puede localizar en cualquier topografía, aunque es más frecuente en el tronco (Saul, 1991), seguida por los miembros y cara, cuando se afectan piernas, abdomen inferior y/o nalgas es muy frecuente la asociación con espina bífida (Peyri, 1980). Con frecuencia las lesiones son bilaterales, múltiples pero asimétricas.

La variedad en placas es la más frecuente (Rook, 1988) y está caracterizada por la presencia de una o varias placas redondas u ovales con esclerosis, atrofia, brillantez, bien limitadas en su borde, donde se pierde el dibujo normal de la piel, son de tamaño variable que puede ir desde escasos centímetros hasta 15 o 20 cm o más, suelen estar rodeadas de un halo eritematovioláceo (lilac ring) indurado, en fases iniciales de la enfermedad, lo que además indica actividad de la misma, inmediatamente después de este halo puede haber un segundo de hiperpigmentación donde además puede haber telangiectasias diseminadas, también hay hipopigmentación observándose un tono blanco perlado o amarillento dentro de las placas, éstas son alopecicas y anhidróticas y pueden ser hipostéticas si la placa es muy gruesa; pueden verse claramente deprimidas y al tacto son induradas; se encuentran adheridas a planos profundos. Ocasionalmente se producen vesícula o ampollas y hemorragia (Rook, 1988; Lever, 1975; Degos, 1904).

Ocasionalmente los orificios foliculares son prominentes y en zonas aledañas a las lesiones pueden encontrarse telangiectasias (J. Peyri, 1980).

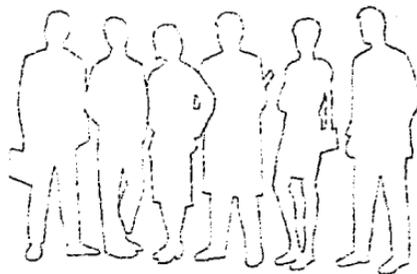
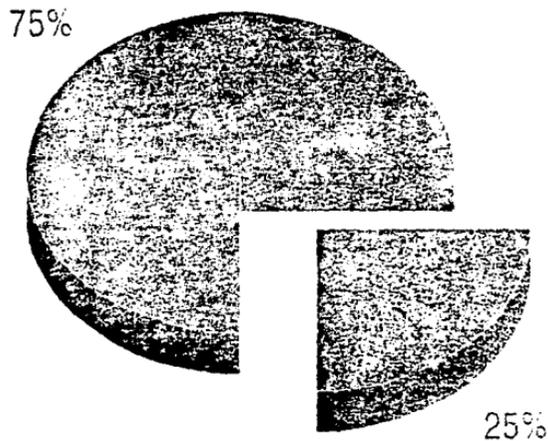
Existe una variedad puramente eritematosa la cual es la más difícil de diagnosticar, ya que carece de induración; con frecuencia es la lesión inicial. Aparece como una placa eritematoviolácea de bordes bien definidos los cuales son blandos al igual que el resto de la superficie que en ocasiones es lisa y brillante (Ruiz Maldonado, 1989).

En la piel con pelo es poco frecuente y puede ser única o múltiple. Los estados iniciales de la esclerodermia pocas veces son apreciables en la piel con pelo, a menos que se forme una zona alopecica. Suele manifestarse como una mancha lilácea que crece periféricamente con lentitud. El centro adquiere una coloración perlada o tipo marfil, se hace lisa, brillante y adherente a planos profundos. Si la enfermedad se conserva activa el halo liláceo persiste, lo que habitualmente sucede por tres a cinco años, aunque la placa puede seguir creciendo mucho más tiempo. Rápidamente se desprende el cabello para dejar una zona de alopecia cicatrizal, sin ninguna característica especial (Ruiz Maldonado, 1989).

La variedad lineal en la región frontal aparece en la línea media o a un lado llamada "en sablazo" o en golpe de sable por el parecido de la cicatriz a esta circunstancia, la primera manifestación puede ser leucotriquia o pérdida de los pelos en la línea paramedia y posteriormente surgen las características ya mencionadas, produciéndose rápidamente la lesión cicatrizal con un tamaño de 2 a 5 cms. o a veces un poco mayor. En estos casos se puede asociar con hemiatrofia facial, la cual es evidente habitualmente al cabo de un año (Rook, 1988), recibiendo el nombre de síndrome de Parry-Romberg, que raramente puede ser bilateral. Puede coexistir con lesiones en placa en otras regiones corporales. En menos del 10% de los casos produce la atrofia de la extremidad superior. La lesión frontal se puede extender hacia abajo en dirección de la nariz, pasando por la mejilla, mentón y cuello (Ruiz Maldonado, 1989).

La forma lineal, monomélica o en banda, origina placas escleróticas que siguen habitualmente el trayecto de un miembro por lo que las lesiones son lineales y dificultan el crecimiento de los mismos cuando se presentan en niños. En el muslo es frecuente que siga el trayecto del músculo sartorio (Saul, 1991). Afecta predominantemente a niños y adolescentes, generalmente inicia alrededor de los 7 u 8 años de edad y hay un ligero predominio en el sexo femenino.

EPIDEMIOLOGIA



Entre la Segunda y Quinta
Década de la vida

Las manifestaciones o características clínicas esenciales son prácticamente las de aquellas en placas, solo que el halo periférico de color lila es menos aparente; suelen ser únicas y por lo tanto asimétricas y afecta más frecuentemente a los miembros inferiores que a los superiores, en caso de afectar tanto a un miembro superior como a un inferior son homolaterales, también puede afectar la cara anterior del tórax, abdomen o glúteos y raramente involucrar a la mitad de toda la economía. En los casos más severos transforma a la extremidad afectada en un gran bloque esclerótico con las consecuentes retracciones tendinosas y articulares que aunado a la afección del hueso subyacente provocan detención del crecimiento del mismo, originando una extremidad acortada de manera permanente (Ruiz Maldonado, 1989).

Rara vez existe calcinosis en el interior de una lesión de esclerodermia lineal (Fitzpatrick, 1985). De manera infrecuente puede ocurrir melorreosis que es una hiperostosis cortical lineal y densa en un miembro afectado (Fitz, 1990), al parecer se presenta con una incidencia del 17%, pero en la serie estudiada no solo incluían alteraciones esclerodermiformes lineales (16 casos en la literatura mundial), sino también aquellas con proliferación y malformación de vasos sanguíneos y linfáticos, es una rara enfermedad de causa desconocida, que se caracteriza por esclerosis ósea que afecta predominantemente a una extremidad pero puede ser generalizada; progresa con rapidez en los niños y lentamente en los adultos, provocando contracturas y deformidades de las articulaciones afectadas; radiológicamente la imagen de la melorreostosis ha sido comparada con la cera fundida fluyendo por los bordes de una vela encendida. Al parecer la hiperostosis cortical podría estimular la proliferación del tejido subcutáneo y dermis profundo cercanos a la alteración ósea, por lo que las alteraciones óseas preceden a las cutáneas, las cuales son esclerodermiformes y no esclerodermia localizada para algunos autores (González y Soler, 1987).

El ainhum es una brida anular de la base del quinto dedo de los pies que lleva finalmente a la amputación del dedo afectado por isquemia secundaria; se observa exclusivamente en los varones de la raza negra y su origen es desconocido (Degos, 1904; Arenas, 1987).

La morfea subcutánea, nodular y queloidea son en realidad variantes de la misma que dependen de la cantidad y la profundidad de las lesiones inflamatorias y la esclerosis (Rook, 1988).

La esclerodermia en gotas se localiza en tronco anterior a nivel del pecho y el cuello, también puede involucrar hombros y otras regiones corporales; son placas con esclerosis, atrofia, en ocasiones cubiertas de escama, con crificios foliculares dilatados, son múltiples de 2 a 6 mm. de diámetro (Arenas, 1987), y es la variedad que sigue en frecuencia a la forma lineal (Rook, 1988), aunque es realmente infrecuente. En realidad las lesiones son semejantes a las de la esclerodermia en placas pero más pequeñas y numerosas, aunque la esclerosis no es tan evidente, la mayoría de los casos diagnosticados de esta forma son más bien casos de liquen escleroso y atrófico; sin embargo, ambas entidades pueden aparecer simultáneamente en el mismo paciente (Rook, 1988).

En la variedad diseminada, que es más frecuente en mujeres de 30 a 50 años de grandes placas esclerosas que pueden afectar a todo un segmento, tendiendo en ocasiones a la generalización, pero predominan en tronco y muslos. Puede haber sintomatología articular y fenómeno de Raynaud, sin otros datos de afectación sistémica; aunque de un 4.5 a 5.4% de estos pacientes su enfermedad puede pasar a una forma sistémica (Arenas, 1987).

Típica de adultos jóvenes o niños es la morfea generalizada que inicia de manera incidiosa pero progresiva, primero en el tronco para generalizarse en 1 a 2 años al resto de los segmentos corporales con grandes placas. Por la afección tan generalizada la apertura de la boca puede ser dificultada pero no aparecen los surcos radiales periorales que caracterizan a la esclerosis sistémica progresiva. No hay esclerodactilia en las lesiones de manos y pies. Es infrecuente la presencia del fenómeno de Raynaud. Presentan grandes problemas secundarios las enormes contracturas y deformidades, así como por la frecuente formación de ampollas, con exulceraciones, úlceras y atrofas residuales con sobreinfecciones. Desde el punto de vista analítico existe ocasionalmente eosinofilia, aumento de la velocidad de sedimentación globular, hipocomplementemias y factor reumatoide, se han descrito anticuerpos antinucleares de patrón homogéneo y de manera infrecuente anti DNA y anti RNA (Peyri, 1980).

2.2. Enfermedad de Lyme.

La enfermedad de Lyme es una infección cutánea sistémica causada por *Borrelia burgdorferi*. La enfermedad es generalmente transmitida por la mordedura de una garrapata (género *Ixodes*) y a menudo comienza con una lesión anular en la piel de tipo migratorio, llamada eritema crónico migratorio (ECM) (Trevisan y Cinco, 1990).

La historia de la enfermedad comienza en octubre de 1975, cuando dos mujeres de Lyme, Connecticut, reportaron al departamento de salud que sus niños y otros, presentaban artritis reumatoide juvenil. El brote fué en esa comunidad pero pronto comenzó a extenderse por los alrededores. Esto llevo a la Universidad de Yale donde comenzaron a investigar acerca de esta enfermedad y encontraron que después de comenzar con la artritis el 25% de los pacientes habían sido afectados por una dermatitis del tipo del ECM (Steere y cols.,1977).

La primera hipótesis hablaba de ser una infección transmitida por picadura de artrópodos; se creía que la artritis tenía el mismo agente causal que el ECM, una lesión asociada con picadura de garrapatas, sabido en Europa desde 1909. En 1977 Ixodes dammini fue identificada como el vector en algunos casos de la enfermedad de Lyme después de que los pacientes habían conservado la garrapata que les había picado. En 1982 fue identificada la espiroqueta responsable de la enfermedad la cual fue llamada Borrelia burgdorferi (Azelius,1910).

La enfermedad de Lyme es transmitida por el piquete de un arácnido hematófago generalmente perteneciente al género Ixodes o garrapatas, descritas de esta forma porque presentan un caparazón, y se caracterizan por su plasticidad ecológica y su baja especificidad parasitaria. Durante su ciclo de vida (larva-ninfa-imago) pueden infectar diferentes tipos de mamíferos domésticos y salvajes, pequeños roedores y aves (Manilla,1985).

Después de la picadura Borrelia burgdorferi, se disemina a través de la ruta hematogena y se origina una infección generalizada. Pocas espiroquetas han sido detectadas en sangre y en los tejidos. A pesar de la fagocitosis y del complemento mediado por IgG (Peterson y Clauson,1984; Kochi y Johnson 1986), la infección por Borrelia burgdorferi puede persistir por 10 años durante estados crónicos de la enfermedad. Las razones de esta persistencia son aún desconocidas.

Ya que durante la fase activa de la enfermedad se presentan concentraciones de anticuerpos, las características patológicas de la enfermedad de Lyme (miocarditis, artritis, síntomas neurológicos, acrodermatitis atrófica) pueden estar relacionadas con mecanismos reactivos del huésped, tal como complejos inmunológicos circulantes. Aunque no hay producción de toxinas, algunos lipopolisacáridos (LPS) asociados con la estructura de la bacteria se cree que inducen la liberación de interleucina-1 a partir de los monocitos (Beck y cols.,1986). Esta molécula podría ser responsable de las alteraciones en las articulaciones y modula otros efectos inflamatorios en la piel.

La enfermedad de Lyme ocurre en tres estados:

Estado 1.

Los primeros signos de la infección aparecen después de un periodo de 4 a 25 días. La lesión típica en la piel es el eritema crónico migratorio (ECM), una lesión papuloeritematosa que aparece algunos días o semanas a lado de la mordedura y tiende a expandirse con una zona central aparentemente clara. Después de algunos meses, el ECM puede medir 50 cm.

El ECM puede estar acompañado por una linfadenopatía, la cual si no es tratada adecuadamente puede durar por varios meses y presentarse intermitentemente.

En algunos casos particularmente en los niños, poco después de la aparición del ECM, múltiples lesiones anulares pueden ocurrir en otras partes del cuerpo. Desde su comienzo, de cualquier forma, la borreliosis puede tener una disfunción sistémica con elevación de la temperatura, malasia y comprometer otros órganos, conjuntivitis, dolor de cabeza, dolor de cuello, artralgias, los no productiva e hinchazón de testículos (Trevisan y Cinco,1990).

Estado 2.

Este estado ocurre entre el segundo y el séptimo, mes y principalmente compromete al sistema nervioso, músculos y articulaciones, corazón y piel.

Hay una afectación a los nervios craneales (aplasia facial generalmente bilateral) y de los nervios periféricos. Otras manifestaciones como paraparesias espásmicas o ataxia cerebral son menos frecuentes. Las mialgias y las artralgias generalmente envuelven músculos y articulaciones cerca del sitio ECM. Las crisis son muy severas y pueden durar por 2 o 3 días; estas no pueden ser aliviadas con drogas comunes para el dolor. Con el tiempo las crisis se vuelven más frecuentes y más duraderas (Trevisan y Cinco,1990).

Las manifestaciones cardíacas ocurren en 1 al 2% de los casos. Las típicas manifestaciones cardíacas son bloqueo atrioventricular y miocarditis, algunas veces conducen a una falla ventricular aguda (Trevisan y Cinco,1990).

Las manifestaciones cardíacas son generalmente cortas y si no son fatales, pueden durar de 3 días a 3 semanas sin recaídas.

La piel también es afectada en particular con linfadenosis benigna cutánea (LABC), localizada junto al sitio del ECM (Fritz y Lagerholm, 1983). Las mujeres y los niños tienden a ser más afectados. Los nódulos cianóticos eritematosos tienen un diámetro de 2 a 4 cm, desde el punto de vista histológico, son muy similares a los linfomas; tiende a crecer por algunos meses, después se detienen por varios años (hasta 8 o 19), y finalmente desaparecen (Trevisan y Cinco, 1990).

Estado 3.

La Acrodermatitis crónica atrófica (ACA), puede ser algunas veces encontrada. Esta dermatosis es caracterizada por una atrofia cutánea acral, desarrollada después de un estado flogístico con infiltración en la piel afectada en forma de placas cerca de las articulaciones. Estas lesiones raramente producen paraparesia y dolor, y tienden a envolver toda el área acral bilateralmente. El resultado es una piel delgada y resplandeciente, donde se puede ver fácilmente la arquitectura venosa. Después de 2 o 3 años de episodios intermitentes, la artritis se vuelve crónica y afecta principalmente a las rodillas y a las muñecas. Neurologicamente, las manifestaciones clínicas del estado 2 se vuelven crónicas (Trevisan y Cinco, 1990).

Tratamiento.

No hay ninguna droga de elección para el tratamiento de la borreliosis. El tratamiento opcional para este agente no ha sido bien establecido. Varios esquemas han sido reportados como efectivos; fenoximetil-penicilina, tetraciclinas y algunas cefalosporinas son las más favorecidas. La penicilina ha sido mayormente usada en Suiza, por su seguridad y su larga experiencia con esta droga. En los Estados Unidos, las tetraciclinas han sido más comúnmente usadas ya que se ha reportado un menor índice de recurrencia y una mejor penetración tisular. La dicloxacilina ha sido también usada para la fase neurológica con buenos resultados (Steere, 1989).

2.3. Borrelia burgdorferi.

Borrelia burgdorferi representa una de las nuevas especies del género Borrelia en el orden de los Spiroquetales (Johnson y Hyde, 1984) determinado esto con base a estudios de fenotipo y similitud de DNA con el de la Borrelia hamessi (Burgdorfer y cols., 1982).

En 1982 Willy Burgdorfer y cols. del Laboratorio de las montañas rocallosas aislaron del intestino medio de la garrapata Ixodes damini una espiroqueta la cual fué nombrada por él mismo como, Borrelia burgdorferi (Burgdorfer y cols., 1982).

En 1983 fue aislada exitosamente de la sangre, fluido o líquido espinal y piel de pacientes en Norteamérica (Steere y Grootzicki, 1983; Benach y cols., 1983).

Esta especie, *Borrelia burgdorferi*, es una espiroqueta gram negativa, helicoidal y móvil que mide de 3 a 20 micras y posee de 3 a 10 espirales (Abele y Anders, 1990). Además ha sido identificada como el agente etiológico de la enfermedad de Lyme (Trevisan y Cinco, 1990; Krafchek, 1989), la acrodermatitis crónica atrófica (Asbrik, 1985) y linfadenitis benigna cutánea (Asbrik y Hovmark, 1987). También se ha postulado como agente etiológico de algunas formas de morfea (Lecerf y cols., 1989; Tuffaneli, 1987) del liquen escleroso y atrófico (Tuffaneli y cols., 1966) y la hemialtrofia facial.

El mejoramiento del medio de cultivo creado por Barbour (Barbour y Burgdorfer, 1983) ayudo en el camino para detallar los estudios de este microorganismo y su definitiva identificación como el agente etiológico de la enfermedad de Lyme, no solo en Estados Unidos sino también en Europa, donde la enfermedad ha sido llamada por otros nombres tales como síndrome de Bannwarth, eritema crónico migratorio y acrodermatitis crónica atrófica.

Borrelia burgdorferi es microaerófila, tiene una enzima superóxido dismutasa, pero no catalasa ni peroxidasa (Johnson y Hyde, 1984), con la adición de factores esenciales de crecimiento como N-acetilglucosamina, albúmina bovina, suero de conejo y gelatina al cultivo para enriquecerlo, *B. burgdorferi* puede crecer en un medio líquido (Barbour y Burgdorfer, 1983). La gelatina proporciona viscosidad al medio, la cual es requerida por la espiroqueta para nadar utilizando su capacidad locomotora. *B. burgdorferi* en medio sólido produce colonias con diversas morfologías (3 % de agarosa) (Kurtli y cols., 1987).

Por medio de anticuerpos policlonales (obtenidos a partir de la primera *B. burgdorferi* aislada), algunas proteínas importantes inmunológicamente fueron mostradas por inmunoaglutinación. La mayor proteína inmunogénica es la 41 kd, la cual es específica de género y corresponde a la flagelina (Barbour, 1984). Otras dos proteínas mayores de superficie son la OspA (31 kd) y la OspB (34 kd).

Por medio de inmunoaglutinación se demostró la existencia de los epitopos en ambas proteínas, lo cual indicó que hay diferencias entre las proteínas OspA y OspB entre las espiroquetas aisladas a lo largo de Norteamérica y Europa (Barbour y Burgdorfer, 1985; Wilske y Preac-Mursic, 1986), las formas heterogéneas que se encontraron de la OspA, llamadas OspA-like varían entre 30 a 33 kd. Se encontraron también formas heterogéneas para la OspB. Algunos cultivos europeos no demuestran una proteína mayor equivalente a la OspB; y por el contrario tienen una proteína principal en el rango de 22 kd (Beck y cols., 1986). Esta proteína ha sido llamada por Wilske y cols. como pC; ésta parece ofrecer una distinción mejor entre los cultivos aislados (inclusive entre proteínas OspA) e induce una respuesta inmune específica contra *B. burgdorferi* en humanos (Wilske y Preac-Mursic, 1986).

2.4. Acrodermatitis Crónica Atrófica.

La acrodermatitis crónica atrófica es muy poco frecuente y aparece casi exclusivamente en pacientes de origen europeo. Al principio la piel es adematosa y roja, pero pronto se atrofia, se arruga y adquiere un color azulino. Las venas subcutáneas se aprecian fácilmente, confundiendo a veces, con varicosidades. Esta dermatosis puede ser unilateral o bilateral; su etiología no se conoce. Al cabo de los años se ha señalado sobre esta piel atrófica la existencia de carcinomas epidermoides y sarcomas (Moschella y Nurley, 1985).

2.5. Esclerodermia y *Borrelia burgdorferi*.

Puede haber una relación entre morfea y acrodermatitis atrófica, enfermedad inducida por la infección de *Borrelia burgdorferi* (Aberer y Neumann, 1985). Estos autores han encontrado niveles elevados de anticuerpos contra este organismo en pacientes con morfea comparado con controles, y describen la presencia de organismos viables en biopsias de lesiones morféicas. Estos descubrimientos no han sido confirmados, y varios estudios no han encontrado con frecuencia el incremento de estos anticuerpos (Halkier-Sorensen y Hansen, 1989).

La etiología de la acrodermatitis crónica atrófica (ACA) (Pick, 1894 y Herxheimer, 1902), eritema crónico migratorio (ECM) (Afzelius, 1910), y linfadenosis benigna cutánea (LBC) (Balverstedt, 1947) ha sido recientemente discutida (Frithz, 1983).

Concerniente a ACA y ECM, varios agentes infecciosos han sido propuestos. Asumiendo que ACA y ECM son enfermedades producidas por espiroquetas Thyresson y Hollstrom trataron exitosamente estas enfermedades con penicilina, Von Bianchi reportó resultados positivos con penicilina en el tratamiento de LBC. Lennhoff fué el primero en visualizar la presencia de estructuras espiroquetales en varias enfermedades etiologicamente desconocidas. Durante la investigación de estas enfermedades, Lennhoff observó la presencia de estructuras espiroquetales en ECM y LBC. Intentó probar que las estructuras espiroquetales que él observó eran los agentes etiológicos de estas enfermedades pero no logró esa conclusión finalmente. Recientemente la espiroqueta agente etiológico de la enfermedad de Lyme ha sido propuesta por varios autores (Halkier-Sorensen y Hansen, 1989).

Reportes recientes basados en experimentos serológicos han indicado que la morfea (Escleroderma) puede ser un desorden espiroquetal relacionado a la borreliosis de Lyme (Neubert y Gerstmeier, 1986; Rulli y cols., 1986). Otros estudios no han sido capaces de demostrar estos resultados (Halkier-Sorensen y Hansen, 1989). Una espiroqueta parecida a Borrelia burgdorferi fué aislada a partir de un paciente seropositivo cuya condición hablaba de tener acrodermatitis crónica atrófica (ACA) con pseudoesclerodermia (Aberer y cols., 1987). Los pacientes con (ACA) casi invariablemente tienen elevada la concentración de anticuerpos IgG contra Borrelia burgdorferi (Neubert y Gerstmeier, 1986; Weber y PreaK, 1988).

Morfea (esclerodermia localizada) y la erupción papular esclerosa y atrófica han sido sugeridas como manifestaciones dermatológicas posibles de la enfermedad de Lyme. Anticuerpos contra Borrelia burgdorferi han sido encontrados por varios investigadores (Neuvert y Gerstmeier, 1986; Aberer y cols., 1991), en alrededor del 20 al 50% de los pacientes con morfea. De cualquier forma otros dos investigadores no pudieron encontrar una concentración de anticuerpos específicos significativa (Mushlemann y cols., 1986; Hansen y Serup, 1987).

Las infecciones por Borrelia burgdorferi son a menudo caracterizadas por un curso altamente variable (Steere y Grollzick, 1983). Actualmente una serie de manifestaciones neurológicas han sido asociadas con esta infección (Halperin y Luft, 1989) y hay evidencia que en el estado tardío de las infecciones por esta espiroqueta se produce ocasionalmente esclerosis múltiple (SM) (Benoit y Dournon, 1986). Por ejemplo, placas y lesiones periventriculares, que reflejan posiblemente una desmielinización cerebral han sido observadas en infecciones por Borrelia burgdorferi (Pachner y Steere, 1985). Debido al interés en esta conexión se ha encontrado una posible habilidad de Borrelia burgdorferi para inducir reacciones autoinmunes de células T en el sistema nervioso central (Martin y Ortlaf, 1988).

Usando estudios serológicos, varios de éstos no han proporcionado evidencia acerca de la relación entre esta espiroqueta y las esclerosis múltiples (Halperin y Luft, 1989; Coyle, 1989). De cualquier forma varias observaciones no permiten excluir la posible asociación entre este agente y un número de pacientes con una forma crónica progresiva de esclerodermia múltiple (Schmutzhard y Stanek, 1988). En las manifestaciones neurológicas de la enfermedad de Lyme se incluyen meningitis, neuritis craneal, reticuloneuritis (Pachner y Steere, 1985; Kristoferritsch y Spiel, 1983) y síndromes de esclerosis múltiple, así como enfermedades psiquiátricas (Pachner y Steere, 1985). Las anomalías neurológicas en morfea son bien conocidas. manifestaciones en el sistema nervioso central y tipos de esclerosis múltiple han sido observadas en morfea tal como neuritis intersticial proliferativa del nervio trigémino en atrofia facial progresiva (Archambault y Fram, 1932) Miopatía neurogénica y cambios degenerativos en los nervios vegetativos terminales (John F., 1949) también han sido reportados en la esclerodermia localizada. No se ha considerado que la esclerodermia localizada comprometa órganos internos, pero si que produzca desfiguraciones cuando la lesión cutánea se expande o afecta a niños. No hay un tratamiento aprobado para la esclerodermia localizada. El caso de 11 pacientes con una severa y extensa esclerodermia localizada, que fué tratada con D-penicilamina, se juzgó tener un efecto favorable sobre la enfermedad en curso, en 7 (64%) de 11 pacientes. Se continuó el tratamiento por 3 o 6 meses y las lesiones desaparecieron en estos 7 pacientes. Los dolores de articulaciones disminuyeron también. Este dato sugiere que la D-penicilina puede servir efectivamente en los casos de esclerodermia localizada (Falanga y Medsger, 1990).

La acrodermatitis crónica atrófica (ACA) y la morfea son enfermedades dermatológicas clínicamente distintas con algunas características en común y una posible coexistencia. Aberer y Stanek encontraron anticuerpos contra Borrelia burgdorferi en 8 de 15 pacientes con morfea. Seis de ellos tenían anticuerpos IgG y el resto ambas IgG e IgM. Cuatro de los 8 pacientes seropositivos y 5 de los pacientes seronegativos fueron tratados con altas dosis de penicilina. El cuadro clínico similar entre ACA y morfea, la respuesta al tratamiento con penicilina en las dos entidades, la presencia de anticuerpos contra espiroquetas, el aislamiento de espiroquetas en cultivo y la detección de organismos espiroquetales en cortes histológicos, sugieren una relación cercana entre estas dos enfermedades.

2.6. Hemiatrofia facial y Borrelia burgdorferi.

La enfermedad de Parry-Romberg es una displasia del tejido celular subcutáneo, músculo y en ocasiones hueso, que fué descrita por Parry en 1825, y Romberg en 1846. Es una enfermedad rara, más común en el sexo femenino y generalmente se manifiesta entre la primera y la segunda década de la vida. La topografía de elección es la cara, afectando principalmente el mentón, las mejillas y la frente y casi siempre es unilateral.

La primera manifestación es un cambio de coloración que puede ser hipo e hiperpigmentación. Lenta y progresivamente se desarrolla atrofia. La piel es blanda, delgada y no adherida a planos profundos. La evolución es de años y en ocasiones no se desarrolla completamente.

Una serie de alteraciones neurológicas se han relacionado con la hemiatrofia facial, entre las que se encuentra el síndrome de Horner (Hickman y Sheils, 1964), neuralgias del trigémino, parestesias de las lesiones, espasmos musculares y migraña ipsilateral.

La causa es desconocida, sin embargo muchos la consideran íntimamente relacionada con la morfea, sobre todo con la forma lineal (Tuffaneli y cols., 1966), por los cambios histológicos que comparten porque en algunos pacientes han coincidido los dos cuadros.

Más recientemente (Abele y Anders, 1990) se ha relacionado algunos casos de este síndrome con una especie de Borrelia, aislada en 1982. Tradicionalmente diversas especies de Borrelia fueron identificadas como agentes etiológicos de la enfermedad febril intermitente.

En la enfermedad de Lyme como ya se mencionó, se presenta a menudo una secuela en el tercer estado de la enfermedad, llamada acrodermatitis crónica atrófica, la cual aparece clínicamente en forma de esclerodermia localizada, que con el conjunto de manifestaciones neurológicas que incluye meningitis, neuritis craneal, reticuloneuritis (Pachner y Steere, 1986; Kristoferitch y Spiel, 1983) y tipos de síndromes de esclerosis múltiple, así como enfermedades psiquiátricas (Pachner y Steere, 1985) se han llegado a asociar con hemiatrofia facial, suponiendo que ambas son causadas por la misma entidad.

2.7. Técnicas Inmunofluorescentes.

El marcamiento con sustancias fluorescentes, es otro método para la demostración de complejos antígeno-anticuerpo (Fig. 1). Las moléculas fluorescentes, son usadas como sustitutos de marcadores radioisotópicos y enzimáticos. La técnica del anticuerpo fluorescente consiste en el marcamiento de un anticuerpo con isotiocinato de fluoresceína (FITC), un compuesto fluorescente que tiene afinidad por las proteínas, para formar complejos (conjugado). Este conjugado es capaz de reaccionar con un antígeno anticuerpo-específico.

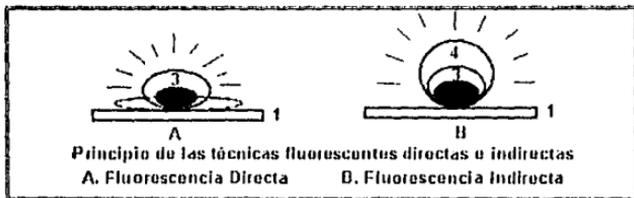


Fig.1

Las técnicas fluorescentes son extremadamente específicas y sensibles. Los anticuerpos pueden ser conjugados con otros marcadores para aumentar la fluorescencia; estos marcadores son llamados detectores inmunocolorimétricos. El uso de sistemas de marcadores enzima-sustrato se han expandido. La peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y los marcadores enzimáticos de conjugados avidina-biotina, han sido todos usados como marcadores visuales para detectar la presencia de anticuerpos. Estos reactivos tienen la ventaja de requerir solo un microscopio de luz estándar.

Los conjugados fluorescentes son usados en los siguientes métodos básicos:

1. Ensayo de inmunofluorescencia directa.
2. Ensayo de inmunofluorescencia por inhibición.
3. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

2.7.1. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA).

El método indirecto está basado en el hecho de que los anticuerpos (inmunoglobulinas), no sólo reaccionan con un antígeno homólogo, sino también pueden actuar como antígenos y reaccionar con antiinmunoglobulinas.

El ensayo de inmunofluorescencia indirecta consiste en la detección de anticuerpos circulantes, que van a actuar como antígenos, por medio de una inmunoglobulina marcada con una sustancia fluorescente (anticuerpo-fluoresceína), el cual se va a adherir al anticuerpo circulante (antígeno), formando un complejo antígeno (anticuerpo circulante) - anticuerpo (anticuerpo marcado fluorescentemente).

El método serológico más ampliamente usado para la detección de diversos anticuerpos es el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA). La inmunofluorescencia es usada extensamente en la detección de autoanticuerpos, anticuerpos de tejido y antígenos celulares. Por ejemplo, anticuerpos antinucleares (ANAs); un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas circulantes que reaccionan con los núcleos enteros y con componentes nucleares, como las proteínas nucleares, ácido desoxirribonucleico (DNA), o histonas en tejidos huéspedes, los cuales son frecuentemente detectados por IFA. En el uso de secciones tisulares, que contengan un gran número de antígenos, es posible identificar anticuerpos a varios antígenos diferentes en una sola prueba. Los antígenos se diferencian de acuerdo a sus patrones de intensidad diferentes (Tabla 2)

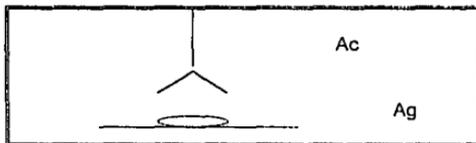
TABLA 2 Ejemplos de Ensayos Inmunológicos que se practican por la técnica de inmunofluorescencia indirecta

Anticuerpos antiadrenales
Anticuerpos anticentriolos
Anticuerpos anticentromeros
Anticuerpos antimembrana glomerular
Anticuerpos Borrelia burgdorferi
Antimitocondiales
Antimielin
Antimitocondrial
Anticuerpos antinucleares
Anticélulas parietales
Antiplacentarios
Antiribosomás
Citomegalovirus
Virus de la Inmunodeficiencia Humana VIH
Anticuerpos IgM
Tipificación de linfocitos
Rubeola
Toxoplasma gondii

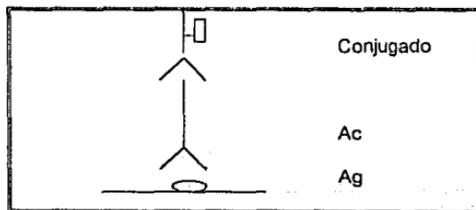
La inmunofluorescencia puede ser usada también para identificar antígenos específicos sobre células vivas en suspensión, por ejemplo, en la citometría de flujo celular. Cuando una suspensión de células marcadas se pone a través de un clasificador fluorescente de células activas (FACS), que mide la intensidad de fluorescencia, las células son separadas de acuerdo a su brillo fluorescente particular. Esta técnica permite el aislamiento de poblaciones celulares diferentes con antígenos de superficie diferentes, por ejemplo, linfocitos OKT4 y OKT8.

2.7.2. Lyme-Spot IF.

Este método de inmunofluorescencia indirecta usado en la detección de anticuerpos circulantes contra la bacteria *Borrelia burgdorferi* (agente etiológico de la Enfermedad de Lyme) consiste en la adhesión de estos anticuerpos circulantes al antígeno total de la bacteria, fijado a una superficie sólida (portaobjetos).



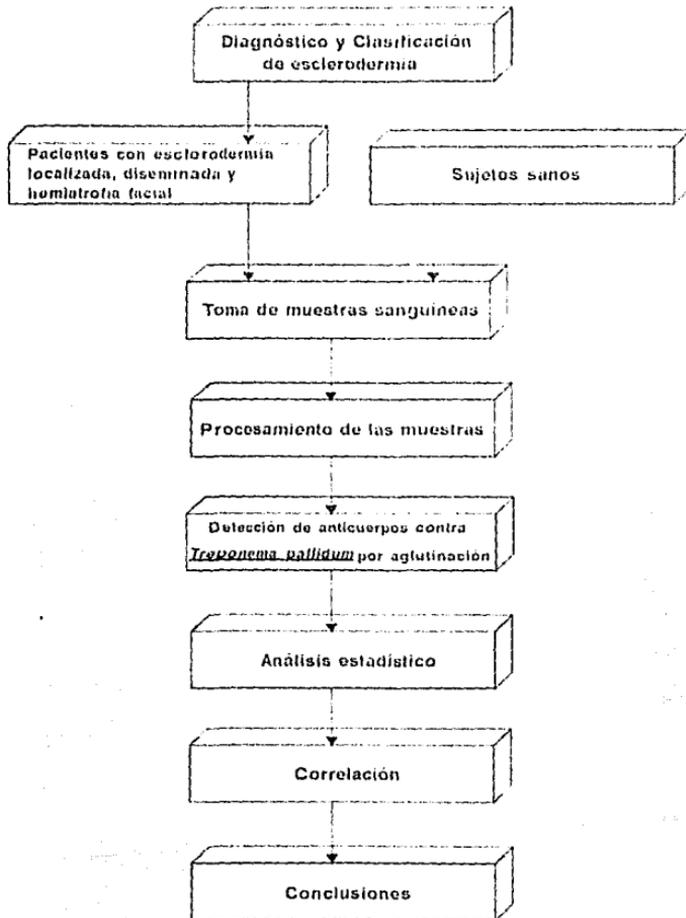
Una vez ya fijado el anticuerpo circulante al antígeno total fijado, se adhiere el anti anticuerpo (inmunoglobulina) marcado con fluoresceína, para ya así, en caso de estar presentes los anticuerpos buscados, al revisar la preparación, se observa la fluorescencia al microscopio.



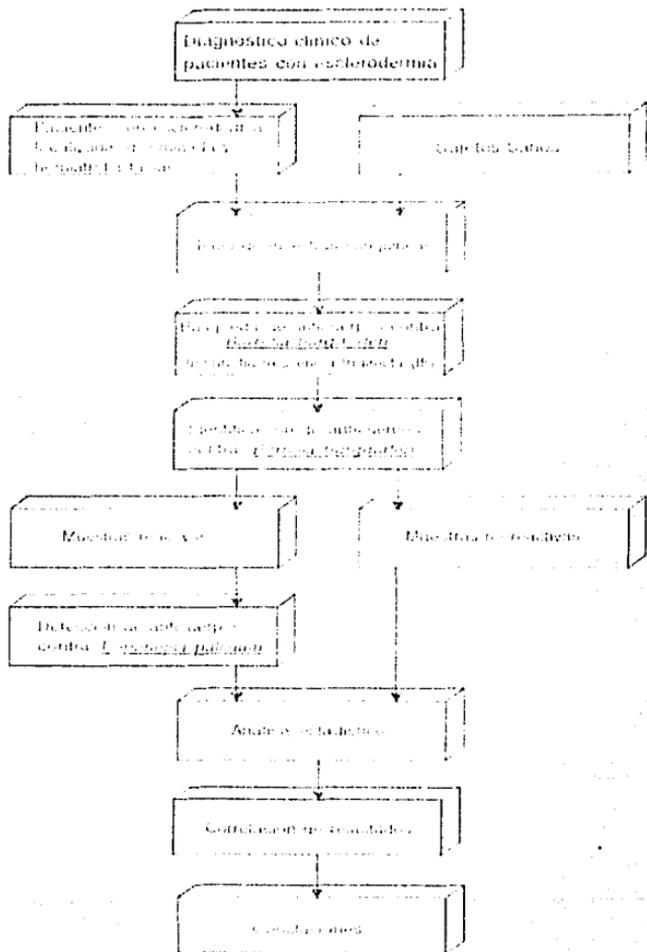
CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA GENERAL



3.1.1 DIAGRAMA ESPECIFICO



3.2 Material, reactivos y equipo.

3.2.1 Material Biológico.

Suero proveniente de 20 pacientes clasificados con Esclerodermia localizada en placa (Loc Plac), Esclerodermia localizada en golpe de sable (Loc.Golpe Sable), Esclerodermia lineal (Loc.Lineal), Esclerodermia disseminada (Dis) y Hemiatrofia Facial.

Suero proveniente de 20 controles negativos, personas totalmente ajenas a la enfermedad y sin ningún antecedente dermatológico importante.

3.2.2 Material de Laboratorio.

- tubos estériles sin anticoagulante (Vacutainer)
- adaptadores (Vacutainer)
- agujas estériles (Vacutainer)
- aplicadores de madera
- pipetas Pasteur de tallo largo
- perilla de seguridad
- pipetas automáticas con capacidad de :
10.0 ml, 1.0 ml, 0.5 ml, 0.1 ml, 50.0 microlitros, 20.0 microlitros.
- cajas de Petri de vidrio
- cubreobjetos (60 x 24 mm)
- aceite de inmersión
- piseta
- una lámina de vidrio excavada
- solución salina fisiológica

3.2.3 Reactivos.

LYME-SPOT IF

Reactivo 1

Lyme Spot IF: Portaobjetos con 10 círculos cada uno en los cuales se encuentra fijado el antígeno (*Borrelia burgdorferi* cepa americana B 31 obtenida por cultivo).

Conservar de 2-8°C en el sobre hermético.

Reactivo 2

Suero Control Positivo (Humano)

Reactivo 3

Solución amortiguadora BABS pH 8.95 (0.05 mol/l)

Reactivo 4

Fluoline H :Globulina antiinmunoglobulinas totales humanas

Reactivo 5

PBS (Solución amortiguadora de fosfatos) pH 7.2

Reactivo 6

Fluoprep: Medio de montaje para IFI (Glicerol)

Reactivo 7

PBS-Tween 80

SÍFILIS (VDRL) Método inmunodiagnóstico de floculación en placa.

Reactivo 1

Suspensión antigénica estabilizada (VDRL) 3ml.

Reactivo 2

Control positivo. Liofilizado.

3.2.4 Equipo.

☞ Microscopio de Fluorescencia luz UV (objetivo 40 x)

☞ (NIKON-Alphaphot,YS) 232912.

☞ Centrifuga (SOL-BAT) No.3815. V 115.

3.3 Metodología.

TECNICA BORRELIOSIS

1. Sacar el número de portaobjetos necesarios. Dejarlos a temperatura de laboratorio unos 15 min. antes de abrir el sobre.
2. Dilución de los sueros:
Detección: Diluir los sueros al 1:80 y al 1:160 en solución amortiguadora BABS. Suero control positivo: Hay que efectuar las mismas diluciones que para los sueros problema.
3. Poner en cada pocillo 10 microlitros de cada una de las diluciones de los sueros. En uno de ellos poner solución amortiguadora BABS (= testigo conjugado).
4. Incubar 30 min. a 37°C en cámara húmeda. Escurrir y lavar los portaobjetos en PBS-Tween, 2 veces durante 5 min. Escurrir de nuevo.
5. Poner en cada extensión, incluyendo en la que no ha recibido suero, 10 microlitros de Fluoline H diluida en solución amortiguadora BABS.
6. Incubar 30 min. a 37°C en cámara húmeda.
7. Lavar los portaobjetos 2 veces durante 5 min. en PBS-Tween. Pasar rápidamente los portaobjetos por un baño de agua destilada. Sacar. Poner un cubreobjetos (montaje con 2 gotas de Fluoprep).

LECTURA.

1. Verificar la ausencia de fluorescencia en el testigo del conjugado.
2. Reacción negativa: sin fluorescencia. La Borrelia tiene color verdoso.
3. Reacción positiva: clara fluorescencia de la Borrelia (de 1 a 4 x).
4. Suero de control positivo (R2): se debe observar una fluorescencia de la Borrelia hasta la dilución correspondiente al título indicado en el frasco.

INTERPRETACION.

El título 160 corresponde al umbral patológico habitualmente admitido. Los anticuerpos pueden ser detectados desde las primeras semanas de la infección. A principio el examen de dos muestras de suero, extraídas con 16 días de intervalo, permite detectar un aumento significativo de la tasa de anticuerpos. La presencia de éstos en el líquido cefalorraquídeo (LCR), se considera como prueba de la infección neuromeningea.

Ciertas afecciones producidas por otras espiroquetas pueden dar reacciones cruzadas con las pruebas serológicas de la enfermedad de Lyme. Hay que tomar en cuenta el contexto clínico y epidemiológico en la interpretación de los resultados

Las infecciones por Treponema pallidum producen habitualmente reacciones cruzadas en las pruebas por IF, por ello toda reacción positiva debe controlarse obligatoriamente por una serología de sífilis (VDRL). La confirmación del diagnóstico de la enfermedad de Lyme puede hacerse sólo si las reacciones de VDRL son negativas.

TECNICA V.D.R.L.(Detección de anticuerpos contra Treponema pallidum)

La suspensión antigénica de VDRL deberá estar a temperatura ambiente antes de ser empleada (+15° C y +25° C). A temperaturas menores el reactivo es menos sensible.

Esta solución debe agitarse vigorosamente durante 2 min. antes de su empleo, comprobando que sea homogénea, utilizando si es necesario 50 microl. que se colocan en la placa excavada y se observan al microscopio, con un aumento de 100 x.

Prueba cualitativa .

Pipetear en una placa excavada:

Muestras y Control R2	50 microlitros
Suspensión VDRL R1	20 microlitros

Agitar manualmente con movimiento rotatorio, durante 8 min. o con agitador tipo Kline, de 180 rpm durante 3 min.

LECTURA.

Leer inmediatamente, en el centro de la excavación de la placa, utilizando un microscopio, con un aumento de 100x. Un retardo en la lectura puede causar sedimentación y dificultar la interpretación del resultado.

INTERPRETACION.

- Presencia de flóculos desde pequeños a grandes. **POSITIVO.**
- Suspensión con aspecto heterogéneo. **POSITIVO.**
- Ausencia de floculación. **NEGATIVO.**
- Suspensión con aspecto homogéneo. **NEGATIVO.**

3.4 Análisis Estadístico.

Se utilizó el programa Hit & Run del Dr. Armando Guerra Trejo de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Se siguió la distribución normal con un intervalo de confianza del 5 %.

CAPITULO IV

RESULTADOS.

Se llevó a cabo la búsqueda de anticuerpos contra la bacteria *Borrelia burgdorferi*, en 20 sueros de pacientes clasificados con esclerodermia localizada, esclerodermia diseminada y hemiatrofia facial, todos con diferentes períodos de evolución, y a la vez se usaron 20 sueros negativos de personas sin ninguna afectación dermatológica, como sueros controles negativos.

A cada una de las muestras reactivas a anticuerpos contra *Borrelia*, se les aplicó la prueba de V.D.R.L., con el fin de detectar un posible cruce antigénico entre las espiroquetas, *B. burgdorferi* y *Treponema pallidum*.

Las diluciones que se utilizaron para cada uno de los sueros problema y controles negativos, fué 1:80, 1:160 y 1:320, todas diluidas en solución amortiguadora BABS..

De acuerdo a la distribución normal con un intervalo de confianza del 5%, la cantidad de sueros reactivos a anticuerpos contra *B. burgdorferi* de pacientes clasificados con esclerodermia localizada, comparados con la cantidad de sueros que resultaron reactivos en pacientes sin ninguna afectación dermatológica, no son estadísticamente significativos.

Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas 1 y 2.

DISCUSION.

Los resultados obtenidos muestran la presencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en tres pacientes clasificados con esclerodermia localizada en placa (Tabla II).

El título registrado en cada una de las muestras fué, muestra 11, título 1:160, muestra 14, título 1:320, muestra 16, título 1:320.

TITULOS REGISTRADOS EN CADA MUESTRA

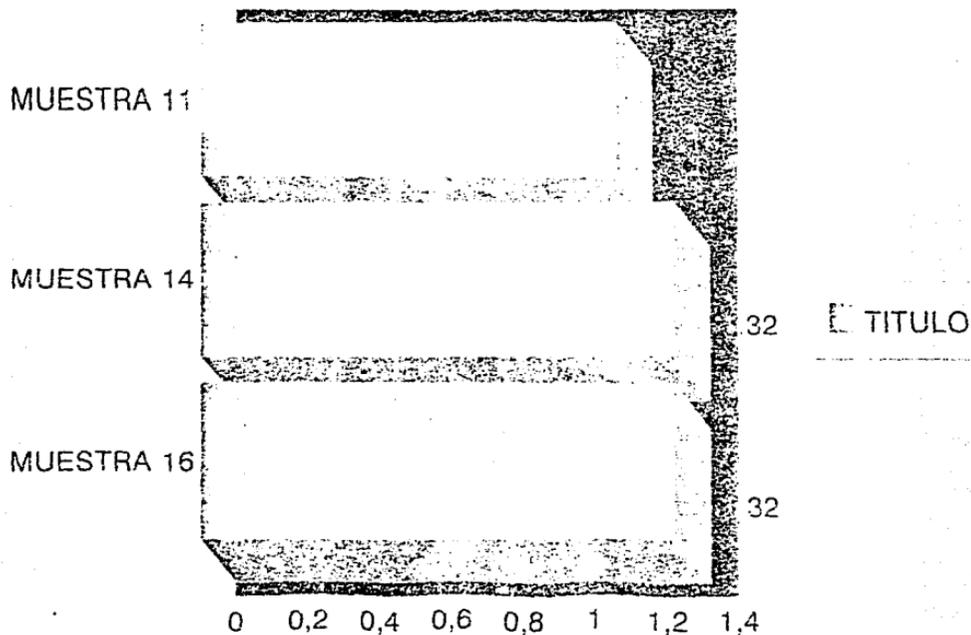


TABLA I. CONTROLES NEGATIVOS

Controles Negativos	Anticuerpos contra <i>B. burgdorferi</i>	V.D.R.L
C - 1	SNR	SNR
C - 2	SNR	SNR
C - 3	(1:80)	SNR
C - 4	SNR	SNR
C - 5	SNR	SNR
C - 6	SNR	SNR
C - 7	SNR	SNR
C - 8	SNR	SNR
C - 9	SNR	SNR
C - 10	SNR	SNR
C - 11	(1:80)	SNR
C - 12	SNR	SNR
C - 13	SNR	SNR
C - 14	SNR	SNR
C - 15	SNR	SNR
C - 16	SNR	SNR
C - 17	SNR	SNR
C - 18	SNR	SNR
C - 19	SNR	SNR
C - 20	SNR	SNR

Nota : SNR. Suero no reactivo

TABLA II. MUESTRAS

Muestra	Anticuerpos contra <i>B. burgdorferi</i> (Título)	V. D. R. L	Clasificación Esclerodermia	Evolución
1	SNR	SNR	Loc. Placa	2 m
2	SNR	SNR	Loc. Linear. Dis	1 a
3	SNR	SNR	Loc. Linear. Placa	2 a
4	SNR	SNR	Loc. Golpe de Sable	5 m
5	SNR	SNR	Hemiatrofia Facial	
6	SNR	SNR	Loc. Placa	
7	SNR	SNR	Hemiatrofia Facial	2 a
8	SNR	SNR	Loc. Placa, Dis	6 m
9	SNR	SNR	Loc. Placa	
10	SNR	SNR	Loc. Placa	1 a
11	(1:160)	SNR	Loc. Placa	2-3 a
12	SNR	SNR	Loc. Linear. G. Sable	2 m
13	SNR	SNR	Loc. Placa	3 m
14	(1:320)	SNR	Loc. Placa	2 a
15	SNR	SNR	Loc. Placa	3-4 a
16	(1:320)	SNR	Loc. Placa	2 a
17	SNR	SNR	Loc. Placa	3 a
18	SNR	SNR	Loc. Placa	5 m
19	SNR	SNR	Loc. Placa	3 m
20	SNR	SNR	Loc. Placa	4 a

Nota : SNR, Suero no reactivo.

La menor dilución que se usó para cada uno de los sueros, de la cual partió la titulación fué 1:80; la mayoría de los sueros a esta dilución no presentaron fluorescencia alguna, y en ciertos casos solo algo de fluorescencia de contraste, la cual era muy clara y no hubo duda alguna de que se trataba de sueros no reactivos, por otro lado, hubo sueros que presentaron una fluorescencia en esta dilución y fué necesario diluirlos a 1:160, donde las muestras No. 11, 14 y 16, presentaron fluorescencia también, entonces se prosiguió a diluirlos a 1:320, donde solo las muestras No. 14 y 16 presentaron fluorescencia, por último se diluyeron las muestras a 1:640, donde ninguna presentó fluorescencia.

Como se explicó anteriormente se llevó a cabo la detección de anticuerpos contra Borrelia, a diferentes diluciones comenzando con 1:80, la cual fué la más concentrada, y de ahí en caso de presentarse una fluorescencia reactiva, se proseguía a la siguiente dilución, y así sucesivamente; cada una de las determinaciones se llevó a cabo por duplicado.

Al observar el periodo de evolución de las muestras reactivas, en el caso de los sueros que presentaron un título mayor (1:320), nos refieren que los pacientes padecen la enfermedad desde hace dos años, esto explica el título de anticuerpos obtenidos, el cual se consideraría alto, por otro lado, si se observa el periodo de evolución de la muestra que presentó el título de 1:160, el cual es alrededor de dos a tres años, y se comparan, en este caso el título que se debió haber obtenido tendría que haber sido mayor, y no fue así, pero la historia clínica de esta paciente nos muestra que la enfermedad no es tan severa, con lo que se explicaría el título de anticuerpos obtenido.

Al analizar los casos reactivos y los títulos obtenidos, al compararlos con los cuadros clínicos de los pacientes y al ver que estos coinciden, podríamos pensar en una posible presencia de Borrelia burgdorferi en estos pacientes como causante de la enfermedad, pero al ver la reactividad obtenida en los sueros controles negativos, la cual fué de dos pacientes, entonces, no se puede hablar con tanta certeza de la etiología presuntiva

El título obtenido en los dos controles negativos fué de 1:80, el cual al compararlo con los títulos de los sueros reactivos (1:160 y 1:320), el título 1:80 quedaría por debajo del título menor obtenido, el cual fué de 1:160, esto no descarta una posible presencia de anticuerpos contra Borrelia en los pacientes clasificados con esclerodermia en placa, sin embargo, la reactividad positiva en los controles negativos, hacen pensar que la reactividad positiva en ambos - pacientes enfermos y personas sanas -, puede ser debida a otra circunstancia, como algún cruce antigénico o cierta inespecificidad de los anticuerpos circulantes.

La suposición de la presencia de inespecificidad en la formación del complejo antígeno-anticuerpo, se podría tener como opción ya que el antígeno que se ocupa en la determinación es un antígeno total, es decir, son espiroquetas de una cepa americana de Borrelia burgdorferi, fijadas en forma total al soporte, por lo que es posible que los anticuerpos pudieran haberse fijado a algún epitopo diferente o que éstos no eran anticuerpos específicos contra Borrelia, lo cual es difícil de comprobar, y más teniendo la referencia teórica de que el método de inmunofluorescencia es altamente específico.

El caso de un posible cruce antigénico entre Borrelia burgdorferi y Treponema pallidum, se descartó, ya que ninguna de las muestras reactivas presentó reactividad a esta última espiroqueta.

El análisis estadístico que se aplicó a los resultados obtenidos, revela que la cantidad de muestras reactivas en pacientes clasificados con la enfermedad no es estadísticamente significativa, tomando en cuenta que sólo tres pacientes enfermos fueron los que resultaron con un título aceptable de anticuerpos contra Borrelia y que dos personas sin ninguna afectación dermatológica (Sueros Controles Negativos) también resultaron con anticuerpos contra la espiroqueta lo cual, al comparar se aprecia que no existe un dato significativo para proponer que los pacientes con esclerodermia padecen la enfermedad a causa de Borrelia Burgdorferi.

Existe evidencia tanto en Europa como en Estados Unidos de que la enfermedad esclerodermia es causada por la espiroqueta Borrelia Burgdorferi, donde varias investigaciones, basándose en resultados obtenidos de pruebas que se han practicado a pacientes con esta enfermedad lo afirman (Aberer y Klade, 1991, Aberer y Neumann, 1985; Aberer y Stanek, 1987, Asbrink y Hovmark, 1984).

Investigadores como Aberer (1991), Stanek (1987) y Neumann (1985), en Viena Austria, proponen esta relación etiológica en base a experimentos de inmunofluorescencia con sueros de pacientes con esclerodermia, búsqueda de espiroquetas en cortes histológicos de lesiones de estos mismos pacientes y determinación de anticuerpos con otras técnicas tales como ELISA, pero no sólo ellos sino también Weber, Preac-Mursic y Reimers (1988), quienes aislaron espiroquetas de la piel de pacientes clasificados con morfea (esclerodermia localizada), quienes proponen también una posible etiología espiroquetal para esta enfermedad, también está Anders y Frithz (1983), quienes también observaron restos espiroquetales en la piel de pacientes con esclerodermia.

De estos experimentos se desprende una serie de más investigaciones, en búsqueda de evidencia que delate la presencia de la espiroqueta en pacientes con morfea. De éstos, los más se han realizado en Europa donde ya se tiene a la enfermedad de Lyme, bien identificada, (Kralcheck, 1989), por lo que es más factible de que sea en este continente, donde la bacteria se encuentra circulando, que se encuentren casos positivos entre esclerodermia y Borrelia burgdorferi (Benoit y Dournon, 1986).

En el continente americano las investigaciones de Tuffanelli, Vaillant y Goudeau (1992), en Estados Unidos, proponen que en Norteamérica la esclerodermia no es producida por Borrelia burgdorferi, a pesar de que la enfermedad de Lyme en Estados Unidos se viene presentando desde hace ya años (Trevisan y Cinco, 1990).

En México, las investigaciones que se han llevado a cabo en búsqueda de una posible etiología, son en el estado de Morelia, en Hospital Vasco de Quiroga, donde el Doctor Luis Gerardo Vega González (1993), investigó la presencia de anticuerpos contra Borrelia en tres pacientes con hemiparálisis facial, en los cuales no encontró evidencia alguna de esta espiroqueta (Vega, 1993).

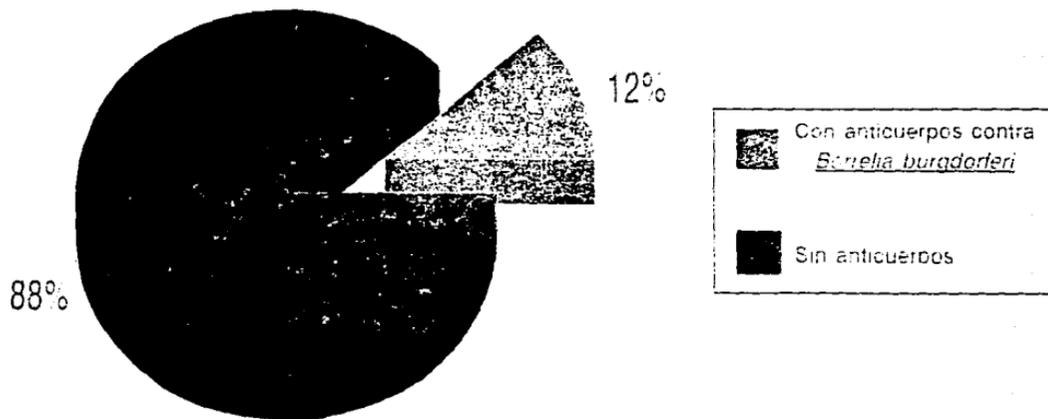
Desde siempre la etiología de la esclerodermia ha sido desconocida. Existen algunos informes de hallazgo de Borrelia burgdorferi en pacientes con morfea.

El poder comprobar que este cuadro fuera de origen infeccioso sería un gran apoyo para su tratamiento. Sin embargo hay otros informes de casos de esclerodermia, que junto con los que aquí se exponen han sido negativos para el hallazgo de Borrelia, lo que sugiere que para poder definir si la esclerodermia es ó no una Borreliosis, se necesita hacer la búsqueda en más pacientes, perfeccionar las técnicas de búsqueda y establecer si hay ó no variantes antigénicas de la bacteria.

CONCLUSIONES.

1. Se determinó la presencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi*, a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, en los sueros de pacientes clasificados con esclerodermia localizada, esclerodermia diseminada y hemiatrofia facial, y en el suero de personas sanas.
2. Se encontró solamente que el 12 % de los pacientes clasificados con esclerodermia localizada presentaron anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi*, con títulos significativos, comparados estos con los títulos obtenidos de los sueros controles negativos.
3. El porcentaje de pacientes en los que se encontró títulos positivos a *Borrelia burgdorferi* no es estadísticamente significativo, por lo que podemos proponer que no existe una relación etiológica entre esclerodermia localizada, esclerodermia diseminada, hemiatrofia facial y *Borrelia burgdorferi*, como se propuso en la hipótesis de este trabajo.
4. No existe reacción cruzada a *Treponema pallidum* en sueros de personas clasificadas con esclerodermia localizada, esclerodermia diseminada y hemiatrofia facial.

PACIENTES CLASIFICADOS CON ESCLERODERMIA



GLOSARIO

GLOSARIO

Acral:	Perteneiente o relativo a las extremidades o ápices; que afectan las extremidades.
Acroesclerosis:	Estado en el cual se combinan las características de la enfermedad de Raynaud con esclerodermia de las porciones distales de las extremidades, especialmente de los dedos de las manos (esclerodactilia) y del cuello y la cara, en particular la nariz.
Acrodermatitis:	Inflamación de la piel de las manos o pies.
Alnhum:	Enfermedad que se observa en los individuos de raza negra de las zonas tropicales, caracterizada por la retracción lineal de un dedo del pie en especial el pequeño, que poco a poco provoca su amputación por propia ligadura o contracción.
Alopecia:	Enfermedad por la cual cae el cabello.
Anhidrótico:	Que inhibe la secreción de sudor.
Anular:	En forma de anillo.
Artralgias:	Neurología o dolor articular.
Artritis:	Reumatismo en el cual las lesiones inflamatorias se circunscriben a las articulaciones.
Asintomático:	Que no muestra síntomas o que no los causa.
Ataxia:	Falta de coordinación muscular; irregularidad de la acción muscular.
Atrioventricular:	Perteneiente o relativo a una aurícula y a un ventrículo del corazón.
Atrofia:	Disminución de las dimensiones de células, tejidos, órganos o partes.
Atrofoderma:	Atrofia de la piel o de cualquier parte de ella.
Buloso:	Perteneiente o relativo a bulas o ampollas o caracterizado por ellas.
Carcinoma:	Neoplasia maligna constituida por células epiteliales, que tienden a infiltrar los tejidos adyacentes y origina metástasis.
Circunscrito:	Reducido a ciertos límites.

Congénito:	Que se presenta al nacer y por lo regular antes; denota estados que se advierten en el nacimiento, sea cual sea la etiología. Hereditario.
Crónico:	Que permanece mucho tiempo.
Cutáneo:	Perteneiente o relativo a la piel.
Dermatitis:	Inflamación de la piel.
Dermatología:	Especialidad médica dedicada al diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de la piel.
Dermatológico:	Perteneiente o relativo a la Dermatología.
Eritema:	Enrojecimiento de la piel producido por congestión de los capilares, que puede deberse a diversas causas.
Esclerodermia:	Endurecimiento y contracción crónicos de los tejidos conectivos de cualquier parte del cuerpo, incluidos piel, corazón, esófago, riñones y pulmones. La piel puede estar engrosada, dura y rígida y en ocasiones hay placas pigmentadas. Puede ser generalizado (escleroderma sistémico o difuso), limitado a las porciones distales de las extremidades y la cara (acrosclerosis), los dedos (esclerodactilia) o localizada a áreas ovaladas o lineales de algunos centímetros de ancho (morfea).
Esclerosis:	Endurecimiento especialmente de una parte por inflamación y en enfermedades del parénquima intersticial; el nombre se emplea para denotar un endurecimiento del sistema nervioso que depende de hiperplasia del tejido conectivo o para designar endurecimiento de los vasos sanguíneos.
Espásmo:	Contracción involuntaria súbita y violenta de un músculo o un grupo de músculos, que se acompaña de dolor o interferencia de la función, produce movimientos y deformaciones involuntarias. Contricción súbita pero transitoria de un paso, conducto u orificio.
Espina bífida:	Anomalia del desarrollo que se caracteriza por cierre defectuoso de la protección ósea de la médula espinal, a través de la cual pueden hacer protusión la médula espinal y las meninges.
Ulceración:	Ulceración superficial.
Fascitis:	Inflamación de una fascia o aponeurosis.

Febril:	Pertenciente o relativo a la fiebre o que la sufre.
Fibrósia:	Formación de tejido fibroso; degeneración fibroide o fibrosa.
Flogístico:	Inflamatorio
Hemiatrótia:	Atrofia de un lado del cuerpo o de una mitad de un órgano o una parte.
Hipercrómico:	Dícese de los que está intensa o excesivamente teñido o coloreado.
Hipocromía:	Disminución del contenido de la hemoglobina en los eritrocitos.
Hipocrómico:	Pertenciente o relativo a la hipocromía o caracterizado por ella.
Hipostenia:	Estado de debilitamiento; debilidad.
Idiopática:	Estado mórbido de origen espontáneo; el que no es simpático ni traumático.
Induración:	Cualidad de ser duro; proceso de endurecimiento.
Ipsolateral:	Situado en el mismo lado, relativo a éste o que lo afecta en contraste con contralateral.
Isquemia:	Deficiencia del riego sanguíneo en una parte a causa de constricción funcional o destrucción real de un vaso sanguíneo.
Linfadenosis:	Hipertrofia o proliferación del tejido linfoide.
Liquen escleroso y atrófico:	Enfermedad cutánea atrófica crónica caracterizada por pápulas blancas, angulares, planas, bien definidas e induradas que tienen un halo eritematoso y tapones queratósicos foliculares negros.
Mialgia:	Dolor en uno o varios músculos.
Migración:	Cambio al parecer espontáneo de sitio, como sucede con los síntomas.
Miocarditis:	Inflamación del miocardio o de las paredes musculares del corazón.
Miositis:	Inflamación de un músculo voluntario.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Monomélico:	Que afecta a un miembro.
Panescclerosis:	Induración completa de una parte u órgano.
Pápula:	Elevación sólida pequeña, circunscrita y superficial de la piel.
Parestesia:	Sensación mórbida o pervertida. Sensación anormal, como ardor, punciones, hormigueo, etc.
Paraparesis:	Parálisis parcial de las extremidades inferiores.
Queloides:	Cicatriz elevada de forma irregular y de crecimiento progresivo, causada por la formación de cantidades excesivas de colágena en el corion durante la reparación del tejido conjuntivo.
Sarcoma:	Tumor constituido por una sustancia del tipo del tejido conjuntivo embrionario; tejido compuesto de células muy apiñadas embebidas en una sustancia fibrilar u homogénea. Los sarcomas suelen ser muy malignos.
Sistémico:	Pertenciente o relativo a un organismo considerado como totalidad, o que lo afecta en general.
Raynaud fenómeno:	Trastorno vascular primario o idiopático, caracterizado por ataques bilaterales del fenómeno de Raynaud. Ataques bilaterales intermitentes de isquemia en los dedos de las manos o de los pies y a veces, de las orejas o de la nariz, caracterizados por palidez intensa y a menudo acompañados de parestesias y dolor; se desencadenan de manera característica por acción del frío o de los estímulos emocionales y se alivian con calor; la causa es una enfermedad o una anomalía anatómica subyacente.
Talangiectasia:	Región cutánea que presenta excesiva irrigación sanguínea.
Úlcera:	Defecto o escavación local de la superficie de un órgano o tejido, producida por el esfacelo de tejido necrótico inflamatorio.
Varice:	Vena, arteria o vaso linfático tortuoso y aumentado de tamaño.
Varicosis:	Estado varicoso de las venas de cualquier región del cuerpo.
Varicoso:	Pertenciente o relativo a las varices o de su naturaleza; distendido de manera no natural y permanentemente.
Vasícula:	Vejiga o sacos pequeños que contienen líquido.

BIBLIOGRAFIA

- Uj Abele DC. Anders KH. The many faces and phases of borreliosis II. J Am Acad Dermatol. 23:167-186.1990.
- Aberer E. H. Klade. G. Stanek. W. Gebhart. Borrelia burgdorferi and different types of morphea. Dermatologica 182: 145-154-1991.
- Aberer E.G, H. Kollegger M. Neuroborreliosis in Morphea and lichen sclerosus et atrophicus . J Am Acad Dermatol 19 : 820-825. 1988.
- Aberer E.G., R. Neumann, G. Stanek. Is localised scleroderma a Borrelia infection ? . Lancet 11: 273 . 1985.
- Aberer E.G., Stanek, M. Ertl, R. Neumann. Evidence for spirochetal origin of circumscribe scleroderma (Morphea). Acta Derm Venereol .67: 225-231. 1987.
- Afzelius A. Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. Arch Dermatol Syph. 101:404.1910.
- Archambault L. Främ NK. Progressive facial hemiatrophy: report of 3 cases. Arch Neurol Psychiatr. 27:529-35.1932.
- Arenas R. DERMATOLOGIA . Ed. Mc. Graw Hill. 3ra ed. Mexico. 1987.
- Asbrink E. Erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. Early and late manifestations of Ixodes ricinus borne Borrelia spirochetes. Acta Derm Venereol. 37:118.1985.
- Asbrink E. Hovmark A. Cutaneous manifestations in Ixodes borne Borrelia spirochetosis. Int J Dermatol. 26:215-223.1987.
- Asbrink E. Hovmark SH. The spirochetal etiology of acrodermatitis chronica atrophicans herxheimer. Acta Derm Venereol Suppl. 64:506-512.1984.

- Barbour AG: Immunochemical analysis of Lyme disease spirochetes. Yale J Biol Med. 57:581-586.1984.
- Barbour A.G. Heiland RA. Heterogeneity of major proteins of Lyme disease borreliae:a molecular analysis of North America and European isolates. J Infect Dis. 152:478-484.
- Barbour A.G., W. Burgdorfer. Isolation of a cultivable spirochete from Ixodes ricinus ticks of Switzerland. Curr Microbiol 8: 123.1983.
- Barnett AJ. SCLERODERMA. PROGRESSIVE SYSTEMIC SCLEROSIS. Ed. Charles C.Thomas Publisher. Springfield.USA.1974.
- Beck G. Habicht GS. Benach JL. A role for Interleuchin-1 in the pathogenesis of Lyme disease. Zbl Bakt Hyg. 263:133-136.1986.
- Benach L.J., D. Edward D., Bosler D. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme Disease. N. Engl J Med.308: 740-142.1983.
- Benoit P. Dournon E. Spirochaetes and Lyme disease. Lancet. ii:1223.1986.
- Coulson I.H., P. Smith N., C. Holden A. Acrodermatitis chronica atrophicans with coexisting Morphea. Br J Dermatol 121: 263-269.1989.
- Coyle PK. Borrelia burgdorferi antibodies in multiple sclerosis patients.Neurol. 39:760-761.1989.
- Degos Robert. DERMATOLOGIA. Ed.Publs Medicas Noguer.1ra ed. Barcelona. 1904.
- Dornald. DICCIONARIO ENCICLOPEDICO ILUSTRADO DE MEDICINA. Ed. Interamericana. 26o. ed. Mexico. 1986.
- Duffy J. Lester E., Mertz E. Diagnosing Lyme Disease : The Contribution of Serologic Testing. Mayo Clin Proc. 63: 116-1121.1988.

- Falanga V. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 35: 67-72. 1992.
- Falanga V., Medsger T. D. Penicillamine in the treatment of localized scleroderma. *Arch Dermatol.* 126:1990.
- Fitz. TRATADO DE DERMATOLOGIA. De. Mc.Graw Hill. 2da. Ed. Philadelphia. 1990.
- Fitzpatrick Thomas. DERMATOLOGY IN GENERAL MEDICINE. TEXT BOOK AND ATLAS. Ed. Mc Graw Hill. 2da ed. New York. Mexico. 1985.
- Frithz A., Lagerholm B. Acrodermatitis chronica atrophicans, eritema cronico migrans and lymphadenosis benigna cutis. Spirochetal diseases?. *Acta Derma Venerol.* 63: 432-436. 1983.
- Gebhart W., Lindemayr H., Patsch H., Ulceromulifierende Neuropathie bei Acrodermatitis chronica atrophicans. *Z Hautkr.* 46:171-178. 1971.
- Gomez D., Leston S. Esclerodermia lineal con hemiatrofia facial versus Sindrome de Romberg: A proposito de un caso. *Actas Dermo-Sif.* 11: 846-848. 1989.
- Gonzalez F., Soler S. Melorreostosis asociada a alteraciones cutaneas esclerodermiformes. *Actas Dermo Sif.* 10:691-695. 1987.
- Halkier-Sorensen L., Hansen K. Antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum in patients with Scleroderma, Granuloma Annulare and Porphyria Tarda. *Acta Derm Venereol* 69: 116-119. 1989.
- Halperin JJ. Luft BJ. Lyme neuroborreliosis: central nervous system manifestations. *Neurol.* 39:753-759. 1989.
- Hansen K. Serup J. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* and localised scleroderma. *Lancet.* 1:682. 1987.
- Harrison Charles Victor. RECENT ADVANCES IN PATHOLOGY. Ed. Little Brown. 8o. ed. Boston. 1966.
- Haustein U., Ziegler V., Herrmann K. Silica induced escleroderma. *J Am Acad Dermatol.* 22: 444-448. 1990.

- Hickman JW, Sheils W. Progressive facial hemiatrophy report of a case with marked homolateral involvement. Arch Intern Med. 113: 716-720.1964.
- Hovmark A., Asbrink E. The spirochetal etiology of lymphadenosis benigna cutis solitaria. Acta Derm Venereol. 66:479-484.1986.
- Hovmark A., Hederstedt B. The spirochetal etiology of acrodermatitis chronica atrophicans. Acta Derm Venereol. 64: 506-512.1984.
- ☐ John F. Sklerodermie und vegetatives terminalreticulum. Arch Dermatol Syph. 188:374-415.1949.
- ☐ Krafchek B. Lyme Disease. In J Dermatol .28:71-74.1989.
- Kristoferitsch W. Spiel G. Meningopolyneuritis. Klinik und Laborbefunde. 54:640-6.1983.
- Krochi SK, Johnson RC. The role of immunoglobulin G in killing of *B. burgdorferi* by the classical complement pathway. Infect Immun. 56:314-321.1988.
- Kurtli TJ, Munderloch UG, Johnson RC. Colony formation and morphology in *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol. 25: 2054-2058.1987.
- ☐ Lavalle Montalvo C. REUMATOLOGIA. Ed.Limusa. 3ra ed. Mexico. 1989.
- Lecerf V, Bagor M, Revuz J. *Borrelia burgdorferi* and localizad scleroderma (carta). Arch Dermatol. 125:297.1989.
- Lever Walter F HISTOPATHOLOGY OF THE SKIN. Ed.J.B. Lippincott C.O. 5ta ed. Philadelphia.1975.
- López E., Sanchez A. Hemiatrofia facial progresiva (Sindrome de Parry Romberg). A propósito de dos casos. Actas Dermo-Sif. 83,5:281-284.1992.
- ☐ Magnarelli L., Anderson F., Russell C. Cross Reactivity in serological tests for Lyme Disease and other spirochetal infections. The Journal of Infectious Disease. 156:1987.
- Manilla G. On the role of birds in the spread and circulation of tick- borne viruses. Riv Parassitologia. 46:5-16.1985.

- Martin R. Ortlaf J. *Borrelia burgdorferi* as a trigger for autoimmune T-cell reactions within the central nervous system. ANN NY Acad Sci.539:400-401.1988.
- Mary Louise Turgeon. IMMUNOLOGY AND SEROLOGY IN LABORATORY MEDICINE. Ed. The C.V. Mosby Company. Philadelphia. 1990.
- Miescher V. In und ausländische Erfahrungen mit neueren Behandlungsmethoden in der Dermatovenerologie. Arch Dermatol Syphilol. 42:189.1949.
- Moshella Samuel L. J. Nurley N. DERMATOLOGY UPDATE. Ed. WB Saunders Company. 1ra ed. 1106-1117. Philadelphia. 1985..
- Muhlemann MF. Wright D. Black C: Serology of Lyme Disease. Lancet.1:553-4.1986.
- Muller H. Akrodermatitis Chronica Atrophica con Pseudoesclerodermia. Sclerodermia circumscriba y vitiligo. Z Haut Geschlechtskr. 44: 1-12.1969.
- Ⓛ Neubert U. Gerstmeier H. Spirochetal antibodies in morphea. J invest Dermatol. 86:336.1986.
- Neubert U. Krampitz HE. Microbiological findings in erythema migrans and related disorders. Bacteriol Hyg A. 263:237-252.1986.
- Ⓛ Pachner AR. Steere AC. CNS manifestations of third stage Lyme disease. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg. 263:301-6.1986.
- Pachner AR. Steere AC. The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis and radiculoneuritis. Neurology. 35:47-53.1985.
- Peyri J. MANUAL DE DERMATOLOGIA. Ed. Limusa. 3ra ed. Mexico.1980.
- Ⓛ Rook Arthur. TRATADO DE DERMATOLOGIA. Ed.Doyma. 4ta ed. Mexico.1988.
- Ruffi T., Lehner S., Chamot E. Zum erweiterten spektrum zeckenubertragener spirochatsen. Hautartz. 37: 597-602.1986.
- Ruiz Maldonado R. TEXTBOOK OF PEDIATRIC DERMATOLOGY. Ed.Grune-Stralton. 2da ed. Philadelphia.1989.

- Sahn E. Garen MD. Scleroderma Following augmentation mammoplasty. Arch Dermatol. 126:1198-1202.1990.
- Saul Amado. LECCIONES DE DERMATOLOGIA. Ed.F. Mendez Cervantez. 12o.ed. exico. 1991.
- Schmutzhard E. Stanek G. Borrelia burgdorferi antibodies in patients with relapsing remitting form and chronic progressive form of multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 51:1215-1218.1988.
- Steere AC. Grootzicki RL. The spirochetal aetiology of Lyme disease. N Engl J Med. 308:733-740.1983.
- Steere AC. Malawista SE. Snyderman DR. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arthritis Rheum. 20:7.1977.
- Stanek G., Hirschi A., Kristoferitsch W. IIFT und ELISA in der serologischen Diagnose der Lyme Borreliose. Parasitol. 8: 1-6.1986.
- Stern SH., Franklin E., Beegle P. Progressive Hemifacial Atrophy Associated with Lyme Disease. Plastic and reconstructive Surgery. 90:1990.
- Trevisan G., Cinco M. Lyme Disease. A general survey. Int J Dermatol.29:1-8.1990.
- Tuffaneli D. Do some patients with morphea and lichen sclerosus et atrophicus have a Borrelia infection?. Am J Dermatopathol. 9:371-373.1987.
- Tuffaneli DL. Marmelzat WL. Dorsey CS. Linear scleroderma with hemiatrophy: report of three cases associated with collagen-vascular disease. Dermatologica . 132:51-58.1966.
- Valliant L., Goudeau A. Localized Scleroderma is not a Borrelia burgdorferi infection in France. Dermatology. 184-286:1992.
- Vega González L. La Hemiatrofia Facial. Una Borreliosis. Dermatologia Rev Mex. 37:482-8.1993.

11] Weber K., Preak V. Spirochetes Isolated from two patients with morphea . *Infection*. 16: 1988.

Whyman R., Terence C., Doyle M. An unusual case of hemifacial atrophy. *Oral Surg Pathol*. 73:564-9.1992.

Wilske B. Preac-Mursic V. Immunochemical and immunological analysis of European *B. burgdorferi* strains. *I orig Reihe A*. 263:92-102.1986.