

TESIS DOCTORAL

**LA TERAPIA FOTODINÁMICA Y SUS IMPLICACIONES  
EN LA PREVENCIÓN DE QUERATOSIS ACTÍNICAS Y  
CARCINOMA EPIDERMOIDE**

Lorea Bagazgoitia Sáez de Vicuña  
Madrid, año 2010

Dirigida por:

Dr. Pedro Jaén

Dra. Ángeles Juarranz

Dr. Jesús Cuevas



Departamento de Medicina

*A mi familia...*

## Agradecimientos

---

En este punto me gustaría dar las gracias a todas las personas que han ayudado a terminar este trabajo de investigación.

A la **Dra. Ángeles Juarranz**, por orientarme desde el principio, solucionar me dudas y levantar mis ánimos en momentos de frustración. Al **Dr. Jesús Cuevas**, por su pragmatismo y buenos consejos. Al **Dr. Pedro Jaén**, por apoyarme en la decisión de seguir con la investigación en el Ramón y Cajal.

A todos mis compañeros del hospital que me ayudaron a reclutar los pacientes necesarios para iniciar este proyecto: **Luis, Manolo, Walter, Elena, Carmen, Alicia, Sonso**, ¡gracias mil! A **Juanlu y Sònia**, inmejorables compañeros de residencia quienes tantas veces me han animado para seguir adelante con este trabajo. ¡Ánimo también con vuestras tesis!

A todos las personas del laboratorio quienes tanto me han ayudado con los western blot, arrays, inmunohistoquímica. Gracias **Ali** por esforzarte en compartir tus conocimientos sobre western blot conmigo. Gracias **Eli** por seguirme en mis elucubraciones sobre la producción de PpIX. Gracias **Joyce** por todas las horas empleadas en teñir muestras de los pacientes. Gracias **María** por explicarme una y otra vez los arrays. Gracias igualmente a todos los demás, **Mamen, Paco, Cristina**, sin vosotros, gran parte de esta tesis nunca habría podido llevarse a cabo.

A la gente de Guadalajara, especialmente a **Gerardo**, por teñir y sobre todo organizar tantas y tantas muestras.

Al **Dr. Javier Regadera** por ayudarme a perfeccionar la valoración de inmunohistoquímicas. Gracias por resolver mis dudas y compartir sus conocimientos.

Gracias al **Dr. Salvador González**, por estar en contacto con nosotros e interesarse por la marcha de las investigaciones.

Gracias a la gente de *Galderma*: **Jose, Rosa, Eva**. Os agradezco enormemente el interés mostrado en todo momento por mi trabajo y el apoyo en congresos, charlas, etc.

A **Soco, Mayte y Paloma**, siempre dispuestas a ayudarme en la organización de los tratamientos y tomas de biopsias.

A todos los pacientes que consideraron que hacerse una “*biopsia extra*” para contribuir con este proyecto. Indudablemente, sin su colaboración, este trabajo no habría ni existido.

A mis amigas que han aguantado durante casi 4 años mis venturas y desventuras con la tesis. Gracias **Diana, Argi, Inge, Agur, Olalla, María, Marga, Edur, Elisa...**

A **Nacho**, que desde la distancia o la cercanía, siempre me ha apoyado y animado.

Y por último, no puedo terminar esta memoria sin dar las gracias a las personas que nunca me han fallado y sé que nunca lo harán: gracias **Aita, Ama** y **Josu** por ser como sois y apoyarme siempre. Os dedico esta tesis que tanto esfuerzo me ha llevado.

## Resumen

---

La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento de eficacia probada para distintos tipos de cáncer cutáneo no melanoma, entre ellos, las queratosis actínicas. Existe, por otro lado, evidencia de su efectividad para la prevención de la aparición de lesiones malignas y premalignas, especialmente en pacientes trasplantados con tratamiento inmunosupresor.

El presente trabajo persigue describir los cambios moleculares que subyacen a este efecto preventivo. Para ello se estudiaron biopsias tomadas antes y seis semanas después de una sesión de TFD con metilaminolevulinato (MAL) en 22 pacientes. Se estudiaron los cambios histológicos e inmunohistoquímicos de expresión de proteínas de proliferación y oncogénesis. Igualmente se realizaron técnicas de western blot y microarrays (4 casos) tras extraer proteínas y RNA respectivamente de las muestras cutáneas.

Se observó disminución del grado de displasia y elastosis, así como reducción de la expresión de ki-67 y p53. Los hallazgos anormales no desaparecieron totalmente en todos los casos tras el tratamiento. La expresión de ciclina D1 se mantuvo estable y la de COX-2 presentó cierta tendencia a la elevación. No se observaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de expresión génica.

Estos hallazgos demuestran que la TFD tiene capacidad de reducir los signos específicos de fotoenvejecimiento cutáneo a nivel histológico. Igualmente, la reducción de ki-67, indicador de la actividad proliferativa, y el p53, marcador de oncogénesis precoz en la piel, indican que induce reversión del proceso de carcinogénesis. No obstante, tanto el significado del mantenimiento de la expresión de ciclina D1 como la tendencia al aumento de COX deberá ser evaluado. La ausencia de diferencias estadísticamente significativas en los arrays podría deberse a la alta variabilidad genética del ser humano y al reducido número de muestras.

Por otro lado, el hecho de que únicamente con una sesión no haya sido posible la desaparición de la displasia y expresión de p53, así como la persistencia de expresión de ciclina D1 en la piel tratada, indican que un único tratamiento, a pesar de presentar buenos resultados clínicos, no es suficiente para eliminar por completo los signos de daño actínico crónico y por tanto el riesgo de CCNM. Esto se va apoyado por el hecho de no haber encontrado alteraciones significativas en los estudios de arrays de expresión.

## Abstract

---

Photodynamic therapy (PDT) has been shown to be effective to treat non-melanoma skin cancer (NMSC), especially, actinic keratosis (AK). Moreover there is sufficient evidence of its effectiveness to prevent the appearance of premalignant and malignant lesions in organ transplant recipients.

The aim of this study is to describe the molecular and genetic changes underlying this preventive effect. Therefore 22 patients were treated with using methylaminolevulinate and red light. Biopsies were performed before and six weeks after the treatment. Conventional histopathology and immunohistochemistry were carried out. In addition western blot and RNA-microarrays were performed using proteins and RNA extracted from the skin samples.

Not only was a reduction in the dysplasia and elastosis observed, but also a decreased expression of ki-67 and p53. These abnormal findings did not disappear completely in all cases. The expression of cyclin D1 remained stable and COX-2 showed a slight tendency to overexpression. No statistically significant differences were found in the gene expression profiling.

These findings show that PDT has the potential to reduce the histological signs of photoaging. Moreover, the reduction of ki-67, marker of proliferation, p53, marker of early skin carcinogenesis, indicate a reversion of the carcinogenic process. The meaning of the tendency to overexpression of COX-2 should be studied more deeply. The fact that no changes were found in the arrays might be due to the high genetical variability of the human being and the low number of cases studied.

On the other hand the fact that one treatment does not clear dysplasia and expression of p53 completely, and the persistence of cyclin D1, indicate that one single treatment, despite showing good clinical results, is not sufficient to clear completely the signs of chronic actinic damage, and thus the risk of NMSC.

## Abreviaturas

---

AINE: antiinflamatorio no esteroideo  
ALA: ácido  $\alpha$ -aminolevulínico  
ALD: ALA deshidratasa  
CB: carcinoma basocelular  
Ccdn1: ciclina D1  
CCNM: cáncer cutáneo no melanoma  
CDK: kinasa dependiente de ciclina, *cyclin dependent kinase*  
CE: carcinoma epidermoide/epinocelular  
CIN: neoplasia intraepitelial cervical, *cervical intraepidermal neoplasia*  
COX-1: ciclooxigenasa 1  
COX-2: ciclooxigenasa 2  
cRNA: RNA complementario, *complementary RNA*  
DNA: ácido desoxiribonucleico, *desoxiribonucleic acid*  
Dnmt3a: DNA metiltransferasa-3  
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico, *epidermal growth factor receptor*  
FDR: Tasa de descubrimientos falsos, *false discovery rate*  
FS: fotosensibilizante  
Hp: hematoporfirina  
IHQ: inmunohistoquímica  
IL-4: interleuquina 4  
IL-10: interleuquina 10  
IPL: luz intensa pulsada, *intense pulsed light*  
KIN: neoplasia intraepidérmica queratinocítica, *keratinocytic intraepidermal neoplasia*  
LED: diodo emisor de luz, *light emitting diode*  
MAL: 5-metil aminolevulinato  
Mapk6: proteína quinasa activada por mitógenos-6  
NER: sistemas de reparación por escisión de nucleótidos, *nucleotide excision repair*  
PAS: ácido periódico de Schiff, *periodic acid-Schiff*  
PBG: porfobilinógeno  
PBGD: porfobilinógeno deaminasa  
PG: *prostaglandina*  
PpIX: protoporfirina IX  
Prkcb1: proteína quinasa C beta-1  
PUVA: psoralenos y ultravioleta A  
QA: queratosis actínica  
Rb: proteína del retinoblastoma  
RIF: células de fibrosarcoma inducido por radiación, *radiation induced fibrosarcoma*  
RIN: número de integridad del RNA, *RNA integrity number*  
RNA: ácido ribonucleico, *ribonucleic acid*  
RNAm: RNA mensajero  
ROS: especies reactivas de oxígeno, *reactive oxygen species*  
TFD: terapia fotodinámica  
TLR-7: Toll-like receptor 7

TXA2: tromboxano A2.

UV: ultravioleta

UVA: ultravioleta A

UVB: ultravioleta B

UVC: ultravioleta C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VIN: neoplasia intraepitelial vulvar, *vulvar intraepidermal neoplasia*

VPH: virus del papiloma humano

VPL: luz pulsada variable, *variable pulsed light*

XP: xeroderma pigmentoso

5-FU: 5-fluorouracilo

8-oxoG: 8-hidroxiguanina

## Índice de contenidos

---

Agradecimientos	i
Resumen	iii
Abstract	iv
Abreviaturas	v
Índice de contenidos	vii
A. INTRODUCCIÓN	1
A.1. Cáncer cutáneo no melanoma	2
A.1.1. Tipos	3
A.1.1.1. Carcinoma basocelular	3
A.1.1.2. Carcinoma espinocelular	3
A.1.2. Causas /Factores de riesgo	4
A.1.2.1. Extrínsecas	4
♦ Radiación ultravioleta	4
♦ Radiaciones ionizantes	7
♦ Químicas	7
A.1.2.2. Intrínsecas	7
♦ Virus del Papiloma Humano	7
♦ Inmunosupresión	8
♦ Síndromes genéticos	8
♦ Lesiones precursoras	9
A.2. Queratosis actínicas y carcinoma espinocelular	9
A.2.1. Patogénesis	13
A.2.1.1. La radiación UV	14
A.2.1.2. Cancerización de campo	16
A.2.1.3. p53	17
A.2.1.4. Otros factores implicados en el proceso de carcinogénesis epitelial	19
♦ Ciclina D1	19
♦ Ciclooxygenasa-2	20
A.2.2. Tratamiento	22
A.2.2.1. Crioterapia	22
A.2.2.2. Dermabrasión	23
A.2.2.3. 5-Fluorouracilo	23
A.2.2.4. Diclofenaco 3%	23
A.2.2.5. Imiquimod tópico	24
A.2.2.6. Terapia fotodinámica	24
A.3. La Terapia Fotodinámica	24
A.3.1. Fotosensibilizantes	25
A.3.1.1. Sistémicos	26
A.3.1.2. Tópicos	26
♦ ALA	27
♦ Me-ALA	27
A.3.2. Mecanismo de acción	27
A.3.2.1. Vía de síntesis del grupo Hemo	27
A.3.2.2. Acúmulo selectivo de PpIX	28
♦ Actividad enzimática diferencial en células neoplásicas	29
♦ Actividad enzimática diferencial en células	

diferenciadas	29
♦ Actividad enzimática diferencial en células en proliferación	29
♦ Mayor absorción de ALA/MAL en tejidos patológicos	29
A.3.2.3. Reacción fotodinámica	30
A.3.3. Fuentes de luz	31
A.3.4. La aplicación clínica en Dermatología	33
A.3.4.1. Evidencia científica para QA	33
A.3.4.2. La TFD como tratamiento preventivo	34
♦ Modelo murino	34
♦ Estudios clínicos	35
A.3.5. Efectos adversos	35
B. OBJETIVOS	36
C. MATERIAL Y MÉTODOS	38
C.1. Selección de pacientes	39
C.2. Obtención de biopsias	39
C.3. Estudio histoquímica	40
C.3.1. Procesamiento	40
C.3.2. Valoración de las preparaciones	40
C.4. Estudio inmunohistoquímico	41
C.4.1. Procesamiento	41
C.4.2. Valoración de las preparaciones	41
C.5. Western blot	43
C.6. Arrays de expresión génica	44
C.7. Tratamiento	46
C.8. Estadística	46
D. RESULTADOS	48
D.1. Pacientes	49
D.2. Resultados histológicos	50
D.2.1. Histoquímica	50
D.2.1.1. Hematoxilina/eosina	51
D.2.1.2. Determinación de la elastosis mediante orceína	52
D.2.2. Inmunohistoquímica	52
D.2.2.1. Expresión de ki-67	52
D.2.2.2. Expresión de p53	54
D.2.2.3. Expresión de ciclina D1	54
D.2.2.4. Expresión de COX-2	55
D.3. Western blot	56
D.3.1.1. Ciclina D1	57
D.3.1.2. COX-2	57
D.4. Arrays de expresión génica	58
E. DISCUSIÓN	60
E.1. Hallazgos histológicos	64
E.1.1. Hematoxilina/eosina	64
E.1.2. Orceína	65
E.2. Expresión de ki-67	65
E.3. Expresión de p53	66
E.4. Expresión de ciclina D1	67
E.5. Expresión de COX-2	68

E.6. Arrays de expresión génica	70
E.7. Implicaciones de los resultados	71
E.8. Limitaciones del trabajo	72
F. CONCLUSIONES	73
G. BIBLIOGRAFÍA	85
H. ANEXOS	89
H.1. Anexo 1	90
H.2. Anexo 2	95
H.3. Anexo 3	98

## **A. INTRODUCCIÓN**

## A.1. Cáncer cutáneo no melanoma

---

La piel es el órgano con mayor superficie del cuerpo (1,5-2 m<sup>2</sup>) y constituye la principal barrera frente a agentes externos físicos, químicos y biológicos.

Está formada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. La capa más externa, la epidermis, está formada esencialmente por queratinocitos aunque contiene también otros tipos celulares como melanocitos, células de Merkel y de Langerhans. La epidermis se organiza en diferentes capas: basal, espinoso, granuloso y córneo, formando un epitelio estratificado queratinizado. La proliferación ocurre en la capa basal, desde donde los queratinocitos se desplazan hacia capas más externas a medida que se diferencian. Por su parte, la dermis actúa como sustrato y soporte para la epidermis y contiene como tipo celular esencial el fibroblasto.

La piel sufre una continua agresión de naturaleza física, química y biológica por parte de agentes ambientales, pero de manera especial por la exposición repetida al sol. Una de cada 5 personas en los EEUU desarrollará cáncer de piel y sólo durante el año 2008 se diagnosticaron más de un millón de casos en este país <sup>(1)</sup>. Existe un incremento gradual en la incidencia de lesiones de piel, en particular del cáncer de piel: melanoma y cáncer cutáneo no melanoma (CCNM).

El término CCNM incluye al carcinoma basocelular (CB) y carcinoma epidermoide (CE), ambos con diferenciación epitelial queratinocítica. También incluye a otros tipos de tumores cutáneos de estirpe no queratinocítica y menor prevalencia. Aunque supone aproximadamente el 20% de todos los diagnosticados, en comparación con otros cánceres de origen epitelial, el CCNM tiene una baja tasa de metástasis y por tanto baja mortalidad. Ello hace que seguramente no se registren todos los casos por lo que los datos epidemiológicos de los que se disponen probablemente infraestimen su frecuencia real. En cualquier caso, se ha visto un aumento de la incidencia de CCNM en todo el mundo en los últimos 30-40 años <sup>(2)</sup>.

Establecer comparaciones entre la incidencia y prevalencia de CCNM entre diferentes países y comunidades resulta complejo por las diferencias metodológicas utilizadas en los distintos trabajos. Se ha descrito que la incidencia en Australia era entre 3 y 4 veces mayor que en el norte de Europa <sup>(2)</sup>.

La alta incidencia del CCNM también tiene una gran repercusión a nivel de economía sanitaria. El trabajo realizado en 5 hospitales españoles durante los años 2000-2005 mostró que el coste sanitario aproximado por lesión tratada de CE osciló entre 1.350€ y 3.131€ y en CB, entre 1.063€ y 2.558€. El coste aproximado durante el año 2006 a nivel nacional fue de 18.020.842,12€ en el caso del CE y de 50.072.698,42€ en el caso del CB <sup>(3)</sup>.

El presente trabajo se centrará fundamentalmente en el CCNM y más concretamente en el CE y de su lesión precursora más frecuente, la queratosis actínica (QA).

### **A.1.1. Tipos**

#### **A.1.1.1. Carcinoma basocelular**

El CB es el tipo más frecuente de cáncer de piel. Supone aproximadamente el 70% de los CCNM <sup>(4,2)</sup>. Su incidencia en España durante el año 2005 fue de 84,9 (por 100.000 habitantes) <sup>(3)</sup>. Afecta predominantemente a varones y fototipos claros, apareciendo típicamente en áreas fotoexpuestas.

Clínicamente el CB se presenta habitualmente en pacientes ancianos de piel clara, dada su clara relación causal con la exposición solar, como se verá posteriormente. Las lesiones crecen lentamente y de forma progresiva. El crecimiento es local pudiendo extenderse a tejidos y estructuras adyacentes, incluyendo nervios, hueso o incluso cerebro en los casos histológicamente más agresivos. Sin embargo la metástasis en este tipo de tumor es extremadamente rara.

Las células del CB presentan típicamente núcleos hiper cromáticos y un escaso citoplasma, siendo uniformes y con escasas imágenes mitóticas. Es característica su disposición en empalizada periférica. Aunque el subtipo histológico del tumor y la edad del paciente son importantes a la hora de identificar los CB de alto riesgo, la localización anatómica parece ser el factor más importante. La región centrofacial (dorso nasal, punta nasal, ala nasal, frente, surco nasogeniano, filtrum y canto interno de ambos ojos) tiene la mayor tasa de recurrencia <sup>(5)</sup>.

Hay diferentes tipos de CB, cada uno con diferente grado de agresividad y pronóstico: nodular, pigmentado, superficial, infiltrativo y morfeiforme.

#### **A.1.1.2. Carcinoma espinocelular**

El CE es el segundo cáncer cutáneo más frecuente tanto en España como en los Estados Unidos, precedido únicamente por el basocelular <sup>(4,3)</sup>. Es 2 a 3 veces más frecuente en hombres que en mujeres. La incidencia de CE en España durante el año 2005 fue de 18,9 por 100.000 habitantes <sup>(3)</sup>. El perfil epidemiológico del CE ha variado notablemente en los últimos 50 años, habiendo disminuido claramente la relación con la exposición laboral y aumentando la relación con la radiación ultravioleta (UV). Además, la infección por VIH, y los tratamientos como el PUVA o inmunosupresores, han generado subgrupos de población con mayor susceptibilidad para desarrollar este tipo de lesiones.

Como se ha indicado, el riesgo de desarrollar un CE en la piel es proporcional al grado de exposición solar. Por ello éste aumenta con la edad y disminuye con la distancia desde el Ecuador. Estos tumores presentan una correlación mucho mayor con el daño actínico que los CB <sup>(4)</sup>, siendo más susceptibles de desarrollar un tumor de este tipo las personas de piel y ojos claros que aquéllas con piel más pigmentada.

Clínicamente se suele presentar como una pápula, nódulo o placa de color de piel normal sobre piel fotoenvejecida, con múltiples telangiectasias, superficie irregular o áreas descamativas. Habitualmente son hiperqueratósicos, con necrosis central,

ulceración o sangrado. La localización más habitual del CE es la propia de áreas frecuentemente expuestas al sol: dorso de manos, antebrazos, parte alta de la cara, labios y cuero cabelludo. Aproximadamente el 70% de los casos se dan en la cabeza y cuello.

Su comportamiento biológico viene determinado por su localización, tamaño, profundidad y grado de diferenciación histológica <sup>(6,5)</sup>. Puede experimentar tanto crecimiento local como a distancia en forma de metástasis, aunque ésta es infrecuente si se sigue un tratamiento adecuado. Los CE de labio, oreja y cuero cabelludo presentan una mayor tasa de metástasis, pudiéndose observar adenopatías regionales debidas tanto a una sobreinfección de la lesión como a la diseminación metastásica <sup>(2)</sup>.

El precursor más frecuente de CE es la queratosis actínica (QA) y es considerada por algunos autores como un CE in situ.

La morfología de las células del CE varían de grandes, poligonales y bien diferenciadas, a células anaplásicas, con citoplasma basófilo, escasamente diferenciadas que pueden implicar dificultad a la hora del diagnóstico diferencial con otros tumores pobremente diferenciados <sup>(2)</sup>.

Los tumores bien diferenciados presentan áreas de hiperqueratosis, paraqueratosis y perlas córneas. A menor diferenciación se observan núcleos más hipercromáticos, menor eosinofilia, mayor número de mitosis y menor adhesión celular <sup>(2)</sup>.

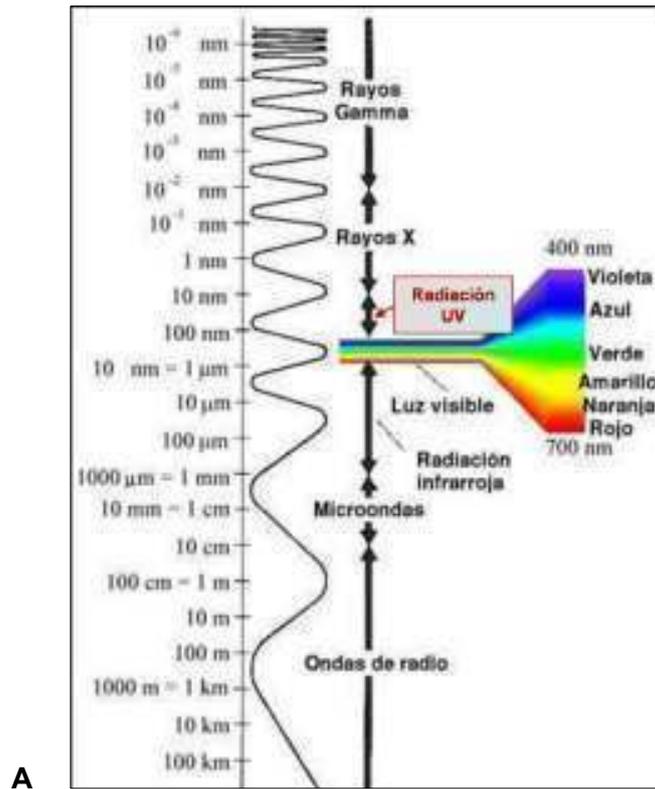
### **A.1.2. Causas /Factores de riesgo**

El CCNM tiene causas multifactoriales que pueden dividirse en extrínsecas que incluyen a las causadas por el entorno, o intrínsecas que corresponden a las derivadas del propio paciente.

#### **A.1.2.1. Extrínsecas**

##### **◆ Radiación ultravioleta**

La radiación UV está considerado el factor de riesgo más importante para CCNM; es igualmente, el mejor comprendido. La relación entre exposición solar y cáncer de piel fue observada por primera vez por Hyde y Dubreuilh a finales del siglo XIX y principios del siglo XX respectivamente. El aumento del hábito de exposición solar con el fin de obtener un bronceado está en relación directa con el aumento de incidencia del CCNM en los últimos 30 años <sup>(2)</sup>.



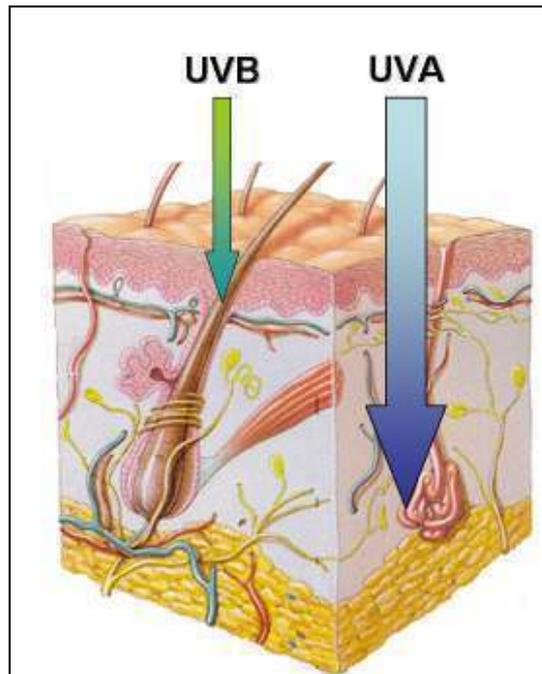
**Figura 1. A:** Situación de la radiación UV dentro del espectro electromagnético. **B:** Luz visible y radiación UV.

La radiación UV se localiza en la región central del espectro electromagnético (Fig.1A) (100 -400 nm) y es de tres tipos (Fig. 1B) <sup>(4)</sup>:

UVC (100-280 nm): no llega a la superficie terrestre dado que es absorbida por la capa de ozono de la atmósfera.

UVB (280-315 nm): la mayoría de la radiación UVB también es absorbida por la capa de ozono, pero un pequeño porcentaje de la misma alcanza la superficie terrestre. Este tipo de radiación penetra hasta la membrana basal de la epidermis (Fig. 2).

UVA (315-400 nm): supone más del 95% de la radiación UV que alcanza la superficie terrestre. La penetración en la piel de la radiación UVA es mayor que UVB (Fig. 2); por esto no causa clínica de heliodermatitis, pero está más implicada en el fotoenvejecimiento y daño crónico de la dermis.



**Figura 2.** Penetración de la radiación UVA y UVB en la piel

La capa de ozono bloquea la inmensa mayoría de la radiación UV, de tal manera que sólo el 2,5% alcanza la superficie terrestre, predominando la radiación UVA.

Mientras que la radiación UVB ejerce un daño directo en el DNA y suprime la inmunidad celular, el daño ocasionado por la UVA se da por medio de radicales libres de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) (más detallado en apartado A.2.1. Patogénesis).

Por otro lado, existen también fuentes no naturales de radiación UV. En el ámbito de la Dermatología es importante señalar la fototerapia utilizando fuentes, ya sea UVA o UVB. Éstas se utilizan ampliamente por dermatólogos para el tratamiento de diversas enfermedades cutáneas. Su eficacia está probada y hay suficiente evidencia para recomendar este tratamiento en ciertas enfermedades como en psoriasis, si bien es interesante tener siempre en cuenta los efectos carcinogénicos de la luz UV y monitorizar la dosis acumulada a largo plazo. Hasta el momento no se ha hallado evidencia de que el tratamiento con UVB aumente el riesgo de CCNM <sup>(7)</sup>. Sin embargo, sí hay una clara asociación estadística entre haber recibido tratamiento con PUVA y CCNM, especialmente CE <sup>(2)</sup>.

No puede olvidarse, por otra parte, que además del ya mencionado tratamiento de ciertas enfermedades inflamatorias de la piel, la radiación UV puede tener efectos beneficiosos. El de mayor importancia es su implicación en la síntesis de vitamina D, necesaria para el metabolismo óseo. La mayor fuente en humanos de vitamina D es la piel expuesta a radiación UV, de tal manera que hasta un 90% de la vitamina D circulante tiene este origen. El resto proviene de la administración oral ya sea en forma de alimentos o suplementos. La síntesis de vitamina D tiene lugar mediante una reacción fotoquímica con una efectividad máxima alrededor de los 297nm, que lleva a

la formación de provitamina D a partir del 7-dehidrocolesterol en todos los estratos de la epidermis. Para que esta reacción tenga lugar son suficientes dosis suberitematosas, de tal manera que una exposición mayor no aporta nada adicional a este fenómeno fisiológico. En este sentido, es importante obtener un equilibrio entre las medidas de fotoprotección y una exposición solar mínima que asegure unos niveles de vitamina D adecuados (400-800 UI/día) ya que se ha visto que ayuda a la prevención del cáncer de mama y fracturas óseas <sup>(8)</sup>.

Igualmente se ha postulado un efecto positivo en el estado de ánimo, pero este parece más probablemente debido a la estimulación lumínica del ojo que a la propia radiación UV <sup>(9)</sup>.

#### ◆ **Radiaciones ionizantes**

Aunque con menor frecuencia que la radiación UV, los rayos X y otras radiaciones ionizantes también pueden ser causa de CCNM, especialmente de CE. Suele darse en personas con profesiones de riesgo por el uso frecuente de estas radiaciones (radiólogos, traumatólogos, odontólogos). Igualmente pueden desarrollarse lesiones de CCNM en áreas que han recibido radioterapia por diversos cánceres o tiña de cuero cabelludo (tratamiento ya obsoleto) <sup>(2)</sup>.

#### ◆ **Químicas**

Se consideran carcinógenos químicos el arsénico y los hidrocarburos aromáticos <sup>(4)</sup>. Años atrás el contacto con el arsénico se daba fundamentalmente por uso de medicación indicada para asma y psoriasis. Actualmente, la contaminación de aguas profundas por arsénico es frecuente por lo que puede darse carcinogénesis en áreas con consumo de agua subterránea, como es el caso de Bangladesh <sup>(10)</sup>. Sin embargo, en el caso de los hidrocarburos aromáticos la exposición es profesional.

### **A.1.2.2. Intrínsecas**

#### ◆ **Virus del Papiloma Humano**

La infección por virus del papiloma humano (VPH) es un factor de riesgo para el desarrollo de CE. Existen diferentes lesiones cutáneas en el espectro del CCNM causadas por este virus como el carcinoma verrucoso y la papulosis bowenoide, que puede progresar a CE hasta en un 2,6% de los casos. Esta relación entre CE y VPH se da especialmente en pacientes inmunodeprimidos.

La detección de VPH en CE de pacientes inmunocompetentes es muy variable, habiéndose hallado frecuencias de entre 27-70% <sup>(11)</sup>. Esta variabilidad puede ser debida a diferencias en las técnicas de detección.

Por otra parte, se ha visto que la infección por VPH es más prevalente en piel crónicamente expuesta a UV que en piel no fotoexpuesta. Esto hace pensar en una relación entre la infección por VPH y la radiación UV. Algunos autores han sugerido que la inmunosupresión, originada por la exposición crónica a UV, induciría una mayor

susceptibilidad para la infección por VPH; que a su vez sería un cofactor en el proceso de carcinogénesis estimulando la división celular e inhibiendo la muerte celular por apoptosis inducida por la luz UV <sup>(11)</sup>.

Respecto a la infección genital por VPH se han definido dos grupos de riesgo de desarrollo de CCNM (alto y bajo) en función del serotipo de VPH <sup>(2)</sup>.

#### ◆ **Inmunosupresión**

La frecuencia de CCNM es mayor en pacientes inmunodeprimidos. Los tumores no sólo se presentan en edades más tempranas de lo habitual, sino que suelen tener una mayor agresividad.

La inmunodepresión puede estar causada por una enfermedad propia del paciente, (VIH), o tener origen iatrogénico, como es el caso de pacientes trasplantados sometidos a tratamiento inmunosupresor crónico. En países de clima templado entre 35% y 50% de pacientes trasplantados desarrollarán uno o más cánceres de piel en los 10 años siguientes al trasplante. Esta cifra se eleva al 80% en pacientes con mayor radiación UV, como Australia <sup>(12)</sup>. Este hecho pone de manifiesto que, el sistema inmune está implicado en la limitación del desarrollo de tumores en humanos.

En la población inmunocompetente el riesgo de desarrollar CB es mayor que CE, sin embargo, este cociente se invierte en los pacientes inmunodeprimidos, quienes presentan un riesgo entre 64 y 250 veces mayor de desarrollar un CE que la población normal y sólo 10 veces mayor de desarrollar CB <sup>(11)</sup>. Se ha descrito que la incidencia de CCNM tras la suspensión del tratamiento inmunosupresor disminuye. Los tumores aparecen, al igual que en la población normal, frecuentemente en áreas fotoexpuestas <sup>(13)</sup>.

#### ◆ **Síndromes genéticos:**

Existen condiciones genéticamente determinadas que implican un aumento de riesgo de desarrollo de CCNM. Estos síndromes pueden presentar bien una mayor incidencia de CE o bien de CB.

##### Xeroderma pigmentoso (XP):

Se trata de un síndrome muy poco frecuente que se hereda de forma autosómica recesiva. Se presenta como fotosensibilidad extrema y desarrollo precoz tanto de signos de fotoenvejecimiento como de tumores malignos y lesiones premalignas. Los tumores cutáneos suelen aparecer en superficies fotoexpuestas alrededor de los 8 años. Se ha estimado que los pacientes con XP tienen un riesgo aproximadamente 1.000 veces mayor de desarrollar cáncer de piel que la población normal.

Esta elevada susceptibilidad al desarrollo de tumores es debida a la persistencia de daño en el DNA causado por la radiación UV ya que estos pacientes carecen de sistemas de reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*, NER)

eficaces. Existe un subgrupo de XP en el que los sistemas NER están intactos y el fallo se encuentra en algún punto de la regulación postranscripcional <sup>(2,14)</sup>.

#### Síndrome de Gorlin:

El síndrome de Gorlin o síndrome del nevus basocelular es un síndrome autosómico dominante que cursa con alta incidencia de CB a edades tempranas asociada a otras anomalías fenotípicas como facies peculiar, quistes odontogénicos, alteraciones óseas, pits palmares, disgenesia del cuerpo calloso, calcificación de la hoz del cerebro y macrocefalia.

El síndrome de Gorlin se debe a una mutación en el gen de PTCH1 que impide el correcto funcionamiento de la vía de señalización del factor paracrino Hedgehog (Hh).

#### Otros:

El síndrome de Bazex-Dupré-Christol es una genodermatosis rara, de herencia dominante ligada a X, que cursa con aumento de incidencia de CB asociados a atrofodermia folicular, quistes de millium, hipotricosis e hipohidrosis.

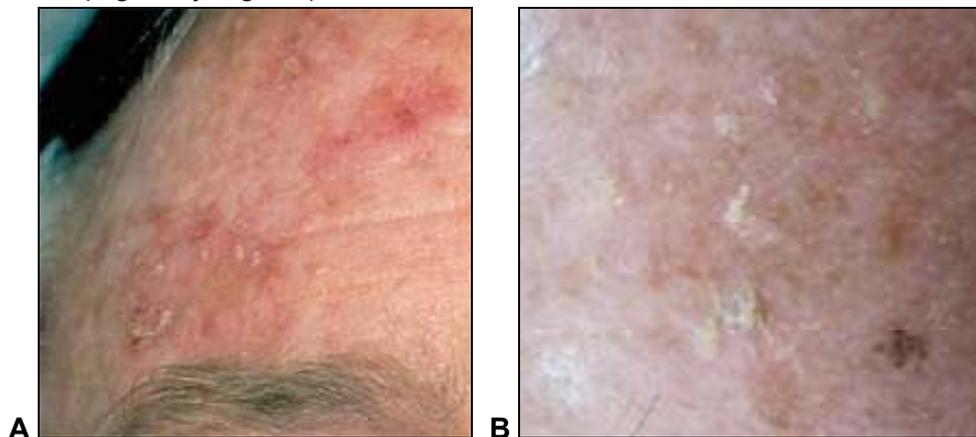
Por otro lado, el síndrome de Rombo se trata de una enfermedad muy rara con herencia autonómica dominante. Asocia, además de alta incidencia de CB, atrofia vermiculata, quistes de millium, tricoepiteliomas y vasodilatación periférica.

#### ◆ **Lesiones precursoras**

Además de la QA, precursor más frecuente del CE, también pueden evolucionar a CE otras lesiones cutáneas como cicatrices, úlceras crónicas o el liquen erosivo de mucosas. Se describe a continuación en más detalle esta lesión.

## **A.2. Queratosis actínicas y carcinoma espinocelular**

Queratosis actínica (QA) significa literalmente “lesión con aumento de la queratinización causada por la luz”. Consiste en máculas o pequeñas placas, habitualmente menores de 1 cm, eritematosas, descamativas e hiperqueratósicas en algunos casos, salpicadas en superficies cutáneas con historia de fotoexposición continuada (Fig. 3A y Fig. 3B).



**Figura 3. A:** QA en frente. **B:** QA hipertrófica en cuero cabelludo

Histológicamente estas lesiones se caracterizan por presentar queratinocitos desorganizados y atípicos de predominio en estratos basales (displasia queratinocítica basal). Se observa pleomorfismo y núcleos grandes, hipercromáticos, disqueratóticos y apoptóticos. En muchos casos la ausencia de capa granulosa lleva a la formación de paraqueratosis en la superficie de la lesión. La dermis superficial suele mostrar un infiltrado linfoide, más o menos denso, acompañado de elastosis solar.

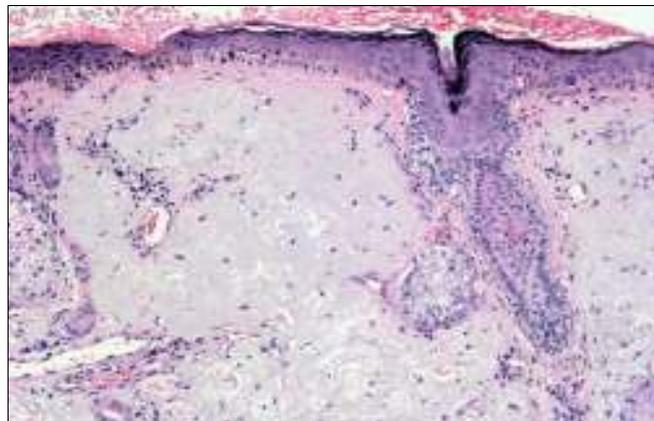
En ocasiones es difícil discernir el límite entre la piel sana y aquella con QA. Existen cinco tipos histológicos de queratosis actínicas <sup>(15)</sup>:

- QA hipertrófica: presenta hiperqueratosis marcada, con áreas de paraqueratosis y engrosamiento epidérmico con papilomatosis (Fig. 3A y Fig. 4).



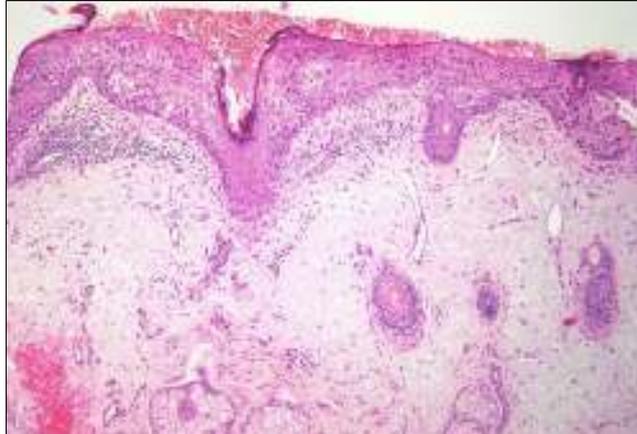
**Figura 4. QA hipertrófica:** Displasia queratinocítica basal, acompañada de papilomatosis e intensa hiperqueratosis.

- QA atrófica: no presentan hipertrofia epidérmica. El resto de hallazgos son similares a lo comentado anteriormente (Fig. 5).



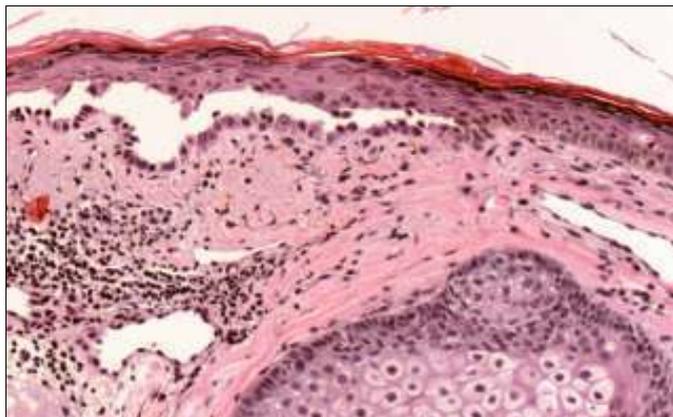
**Figura 5. QA atrófica:** epidermis atrófica con displasia queratinocítica basal. Marcada elastosis solar en la dermis.

- QA bowenoide: caracterizadas por atipia celular en todos los niveles de la epidermis (displasia queratinocítica total). En ocasiones, indistinguible de la enfermedad de Bowen (carcinoma espinocelular in situ) (Fig. 6).



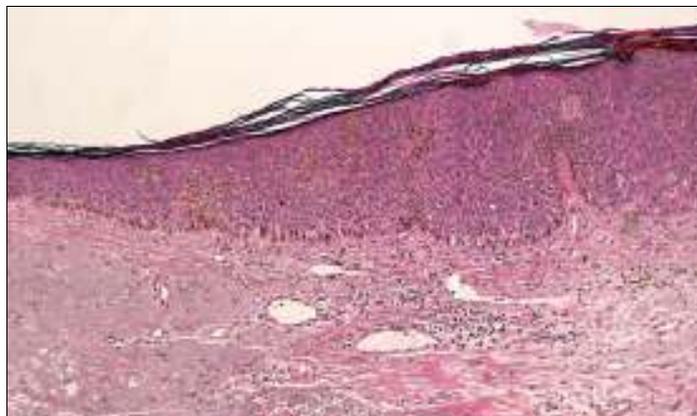
**Figura 6. QA bowenoide:** displasia queratinocítica que afecta a todo el grosor de la epidermis.

- QA acantolítica: presenta separación intraepidérmica de los queratinocitos que puede simular un patrón glandular (Fig. 7).



**Figura 7. QA acantolítica:** acantolisis suprabasal de la epidermis, que presenta displasia en estratos basales.

- QA pigmentada: cualquiera de los tipos anteriores con mayor contenido de melanina (Fig. 8).



**Figura 8. QA pigmentada:** displasia queratinocítica de patrón bowenoide, con alto contenido en melanina.

Las QA se presentan comúnmente en ancianos, habitualmente caucásicos con historia de exposición solar prolongada. Se considera que la QA es la lesión precursora de cáncer o cancerosa *in situ* más frecuente. La prevalencia global de estas lesiones varía considerablemente. En Europa del este ronda el 23%, mientras que en Queensland, el estado más al norte de Australia, son mucho más frecuentes, con una prevalencia de 60% en personas por encima de los 40 años <sup>(16,17)</sup>.

En poblaciones específicas, como pacientes inmunodeprimidos, la frecuencia de QA es mayor que en individuos inmunocompetentes. Las QA son raras en pacientes de raza negra.

Si las QA se dejan sin tratamiento, potencialmente pueden evolucionar a CE. Existen factores de riesgo que facilitan esta evolución como son una exposición mantenida a UV o el tratamiento inmunosupresor. La probabilidad de desarrollar un CE a partir de una QA se ha estimado que es desde 0,075-0,096% por lesión y por año hasta valores de incluso 20% por lesión al año <sup>(18,19)</sup>. Igualmente se ha visto que hasta más de una cuarta parte de las QA pueden regresar espontáneamente.

Hasta el momento no se han encontrado parámetros que puedan ser usados para predecir qué QA va a progresar a CE y cuál regresará, pero las lesiones clínicamente induradas, dolorosas o ulceradas tiene un riesgo mayor de progresar, especialmente en pacientes inmunodeprimidos.

A lo largo de los últimos años la relación entre las QA y los CE ha dado motivo de debate. Algunos autores consideran que las QA y el CE constituyen una entidad única entendiendo que la QA no es una lesión premaligna, sino un carcinoma *per se* con localización *in situ* <sup>(20)</sup>. Se han propuesto diferentes esquemas de clasificación de QA por diferentes autores, reflejando la existente controversia sobre su naturaleza. Aún hoy en día no existe un consenso sobre cuál es la mejor clasificación para reflejar el comportamiento biológico de estas lesiones y facilitar el diferenciar las QA “benignas” de aquellas potencialmente peligrosas.

Yantsos y colaboradores (1999) propusieron una clasificación, paralela a las clasificaciones tradicionales CIN o VIN (*cervical intraepidermal neoplasia/vulvar intraepidermal neoplasia*) de cérvix y vulva, en función de la extensión de la atipia en la epidermis que denominaron KIN (*Keratinocytic Intraepidermal Neoplasia*) (Tabla 1).

	CLÍNICA	HISTOLOGÍA
<b>KIN I</b>	- Máculas eritematosas o piel con daño actínico - No hiperqueratosis ni escamas	- Atipia focal de los queratinocitos, no superando el 1/3 inferior de la epidermis
<b>KIN II</b>	- Lesiones eritematosas, con superficie - Hiperqueratosis e induración variable	- Atipia focal de los queratinocitos de los 2/3 inferiores de la epidermis - Paraqueratosis focal
<b>KIN III</b>	- Lesiones eritematodescamativas, induradas	- Atipia transepidérmica, incluyendo anejos - Acantosis - Paraqueratosis - Papilomatosis

**Tabla 1.** Clasificación de las QA. Modificado de Yantsos y colaboradores (1999).<sup>(21)</sup>

Esta clasificación mejoró la evaluación histológica de las QA, pero ha sido criticada por varios motivos. En primer lugar, depende tanto de la clasificación clínica como histológica, lo cual no es siempre factible en la práctica diaria. En segundo lugar, el término KIN no describe únicamente a las QA y a la enfermedad de Bowen, sino también otras lesiones, como lesiones benignas tipo queratosis seborreicas. En tercer lugar, implica una progresión de KIN I a KIN III antes de que ocurra la microinvasión de la dermis, lo cual no es siempre correcto, dado que las KIN de bajo grado (I-II) pueden evolucionar directamente a CE. Esto podría llevar a error y considerar las KIN I más benignas que las KIN III, infravalorando el potencial maligno de aquéllas <sup>(22)</sup>.

Recientemente Rówert-Huber y colaboradores (2007) propusieron un cambio de terminología en la clasificación KIN. Éstos consideraron que la clasificación propuesta por Yantsos y colaboradores no llama a las QA lo que realmente son, es decir CE. Por ello, proponen cambiar el término KIN por CE *in situ*, subdividiéndolos igualmente en tres categorías: grado I-III, análogamente a la clasificación KIN <sup>(20)</sup>.

### **A.2.1. Patogénesis**

El conocimiento acerca del cáncer y su patogénesis ha aumentado sustancialmente en el último cuarto de siglo, habiéndose obtenido datos que conciben el cáncer como un conjunto de enfermedades caracterizadas por la acumulación secuencial de alteraciones dinámicas en el genoma. Estos conocimientos se basan en el descubrimiento de múltiples mutaciones que se producen en oncogenes con ganancia de función y genes supresores de tumores que perderían su función; ambos tipos de genes se han identificado a través de su alteración en células de cáncer.

El proceso de carcinogénesis consta de múltiples etapas que reflejan las alteraciones genéticas que conllevan a la transformación de células humanas normales en otras con alta malignidad, pasando previamente por estados *pre malignos*. Todo esto se da porque las células sufren cambios genéticos que les confieren ventajas para el crecimiento, llevando a la progresiva conversión de células normales en células de cáncer.

Este proceso que consta de tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión, con cambios celulares y moleculares característicos de cada una de ellas <sup>(23)</sup>.

En la iniciación, tiene lugar la transformación de células sanas en células precancerígenas, caracterizadas por presentar fallos en los mecanismos de regulación del ciclo celular y en la señalización intercelular. Para que esto ocurra es necesario que lesiones sufridas en el DNA se hayan fijado y que ocurra un fallo en los procesos que desencadenan la muerte de las células dañadas. Si se dan estas dos condiciones, la célula portadora de mutaciones puede proliferar transmitiendo los daños a las células hijas que, a su vez, podrán acumular nuevos daños. Las mutaciones clave son aquellas que ocurren en protooncogenes, dando lugar a oncogenes, y en genes supresores de tumores. Debido a estas mutaciones, las células se hacen resistentes a las señales de terminación del crecimiento y de diferenciación. En este punto se puede

hablar de células transformadas, iniciadas o precancerígenas y puede decirse que se ha iniciado el proceso de tumoración.

La segunda etapa del desarrollo del tumor es la promoción. Ésta se caracteriza por la expansión clonal de células transformadas y por la inducción de la proliferación y/o inhibición de la apoptosis. Estos hechos conducen a la formación de una masa local preneoplásica que requiere la presencia continua de estímulos promotores de tumor para su mantenimiento. En este punto, el correcto funcionamiento del sistema inmune es de vital importancia; tanto en el reconocimiento de las células transformadas, como en la generación de una respuesta citotóxica frene a dichas células.

En el tercer estadio del desarrollo tumoral, la progresión, se da la conversión de las lesiones premalignas o malignas en tumores con capacidad invasiva y metastática. Junto con el acúmulo de un mayor número de daños en el genoma, tiene lugar la aparición de vasos sanguíneos de nueva formación para la irrigación de las células neoplásicas.

A nivel celular, Hanahan y Weinberg (2000) propusieron seis alteraciones que conjuntamente llevan a un crecimiento maligno: (i) autosuficiencia en señales de crecimiento, (ii) insensibilidad ante señales inhibitoras del crecimiento, (iii) evasión de los mecanismos de apoptosis, (iv) potencial replicativo ilimitado, (v) angiogénesis sostenida, (vi) invasión tisular y metástasis <sup>(24)</sup>. Esto implica que el desarrollo del cáncer depende, no sólo de aquellos cambios que se den a nivel intracelular, sino también de interacciones entre las células tumorales incipientes y sus vecinos normales.

#### **A.2.1.1. La radiación UV**

En el caso de los tumores cutáneos estos cambios celulares y tisulares tienen su causa principal en las agresiones externas (mencionadas anteriormente), y especialmente, en la radiación UV. Se considera que la radiación UV solar es el principal iniciador y promotor del CCNM.

Este efecto carcinogénico se da por diferentes mecanismos en función de la longitud de onda UV de la que se trate.

La radiación UVC tiene alta energía y capacidad mutagénica. De cualquier modo, no atraviesa la capa de ozono, con lo que su influencia en el desarrollo del CCNM es despreciable.

La radiación UVB origina dímeros pirimidin-ciclobutano y 6-4 pirimidina-pirimidonas en puntos con dos pirimidinas adyacentes en la misma hebra de DNA. Estos fotoproductos causan fundamentalmente transiciones de citosina (C) a timina (T), que son altamente mutagénicas. Estas mutaciones producidas en el DNA de los queratinocitos son absolutamente específicas de la radiación UVB, por lo que son denominadas “mutaciones firma” <sup>(25)</sup>. Se han hallado mutaciones firma en los

oncogenes RAS y en los genes supresores de tumores p53 y PTCH, como se detallará más adelante, pudiendo alcanzar una frecuencia del 50-90% en CCNM <sup>(26)</sup>.

Para que una célula se enfrente a estos ataques genotóxicos de los UVB, son fundamentales los sistemas de reparación de DNA, los cuales en condiciones normales eliminan los dímeros de timina, reestableciendo así la integridad génica.

Su importancia se ve reflejada en pacientes con XP, que carecen genéticamente de mecanismos reparadores de DNA, y en los que ocurre una producción rápida y agresiva de tumores cutáneos <sup>(14)</sup>, como ya se ha mencionado.

Por otro lado, el daño ocasionado por la radiación UVA se da a través de la formación ROS, que son una fuente de daño en el DNA en forma de oxidación de bases y de roturas sencillas <sup>(14)</sup>. La oxidación del DNA por radicales hidróxido, puede resultar en la formación de 8-hidroxi guanina (8-oxoG), que puede llevar a la transición de G en T <sup>(27)</sup>. De este modo, contribuyen no sólo a la acumulación de mutaciones, sino también a la inestabilidad cromosómica.

Recientemente se ha visto que p53 tiene también una función antioxidante, con lo que la inactivación de esta proteína por UVB contribuiría a aumentar el estrés oxidativo causado por UVA. En modelos animales se ha visto que la radiación UVA1 (340-400nm) induce carcinomas espinocelulares fenotípicamente similares a aquellos causados por UVB sin que el gen de p53 contribuya a la génesis de éstos. Esto confirma la idea de que las vías oncogénicas de UVB y UVA1 son diferente <sup>(28)</sup>.

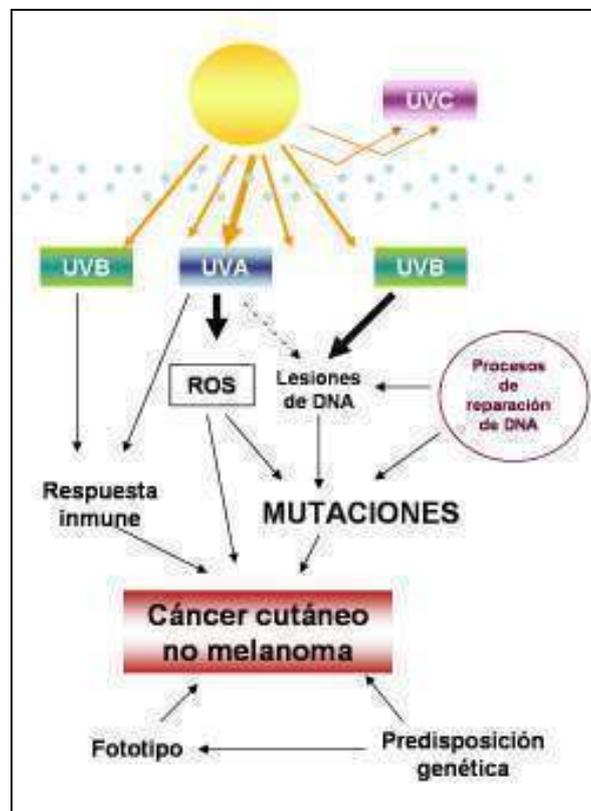


Figura 9. Adaptado de Sarasin (1999) <sup>(14)</sup>

En este sentido el recambio continuo que experimenta la epidermis es de crucial importancia para evitar la acumulación de daño y la pérdida de funciones fisiológicas de sus células.

Por otro lado, con el fin de comprender la implicación de la radiación UV en la carcinogénesis es importante entender los efectos inmunosupresores de la misma sobre la piel. Este efecto aumenta la tolerancia a la transformación celular y las infecciones intracelulares.

Las vías por las que se produce la inmunosupresión mediada por radiación UV no están del todo claras, existiendo un gran número de moléculas y células implicadas en este fenómeno. La inmunosupresión puede darse a dos niveles: local y sistémico.

Localmente la radiación UV reduce el número de células de Langerhans. Ello puede ser debido a diferentes factores. En primer lugar a que los cambios inducidos en la epidermis por la radiación UV inducen la respuesta migratoria de estas células a los ganglios linfáticos <sup>(29)</sup>. Por otro lado, el propio daño en el genoma de estas células conduce a una pérdida de eficacia en su función <sup>(30)</sup>. Por todo esto, la radiación UV compromete la inmunidad de la epidermis conduciendo a inmunotolerancia a nivel local.

A nivel sistémico la radiación UV aumenta la liberación de prostaglandinas (PG) proinflamatorias, fundamentalmente PGE2, sintetizada por la ciclooxigenasa-2 (COX-2), que se activa directamente por la propia radiación UV. Esto ocasiona un aumento de producción de IL-4 e IL-10, que tienen efecto inmunosupresor sistémico <sup>(31)</sup>. Como consecuencia de esto aumenta la susceptibilidad a infecciones (fundamentalmente intracelulares) y disminuye el reconocimiento de células tumorales, con lo que se facilita el desarrollo de tumores.

#### **A.2.1.2. Cancerización de campo**

El concepto de “cancerización de campo” fue acuñado en 1953 por Slaughter <sup>(32)</sup>. Ya en 1944 este autor planteó que el inicio de un cáncer no se daba por un cambio a nivel de una única célula sino como un proceso anaplásico que afecta a varias células simultáneamente. Observó que los epitelios circundantes a tumores presentaban una o más áreas de malignidad. No se conocía la causa molecular de este fenómeno pero se sospechaba que era debido al efecto de la exposición al carcinógeno.

En este sentido, se sabe que el carcinógeno más importante en la piel, la radiación UV está claramente asociada con la iniciación, promoción y progresión de los tumores cutáneos. La irradiación crónica de la piel origina cambios genéticos y moleculares en toda la superficie afecta. Estos cambios están presentes incluso en ausencia de lesión clínica. Igualmente se considera que la QA no es una lesión aislada clínicamente aparente, sino una enfermedad “de campo” que traduce el daño genético y molecular que está teniendo lugar en los tejidos circundantes expuestos, en el caso de la piel, a UV <sup>(33)</sup>.

A continuación se describen las alteraciones moleculares descritas en piel fotoexpuesta y que reflejan esta cancerización de campo.

### A.2.1.3. p53

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. Consta de 4 fases (G1, S, G2 y mitosis o M), de duración variable según el tipo celular. La fase S tiene especial importancia dado que en ella tiene lugar la replicación del DNA, de tal manera que a su fin la célula tiene doble carga genética que será repartida en las dos células hijas tras la mitosis.

La proteína p53 es un factor de transcripción de 53 kDa que actúa entre la fase G1 y S, impidiendo el paso de una a otra mediante el control de la transcripción de genes de proteínas reguladoras de ciclo (Fig. 12). Entre ellas se encuentra la quinasa dependiente de ciclina (*cyclin dependent kinase*, CDK) que, en condiciones normales, se une a la ciclina (ver punto A.2.1.4) para juntas permitir el paso de la fase de G1 a S<sup>(34)</sup>.

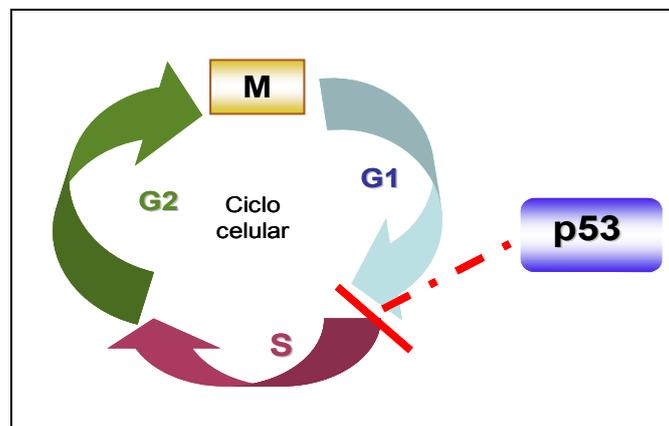


Figura 10: Ciclo celular y acción de p53 entre la fase G1 y S.

El gen supresor tumoral p53, es el más frecuentemente mutado en los tumores malignos de humanos, codifica para una proteína nuclear, considerada “el guardián del genoma”<sup>(35)</sup>. Se activa cuando la célula recibe agresiones externas, entre las cuales se encuentra la radiación UV induciendo fundamentalmente diferenciación, senescencia, mediante la parada del ciclo celular, para permitir a la célula reparar su DNA.

Si la función de p53 no se completa, éste induce muerte celular por apoptosis, con lo que se evita la perpetuación de una célula con DNA mutado. A nivel histológico, la “apoptosis fisiológica” inducida por p53 a consecuencia de la radiación UV es la responsable de las llamadas “células en huevo frito” o “sunburn cells”. Se trata de queratinocitos aislados en la epidermis con un citoplasma eosinófilo y núcleo picnótico sin signos de inflamación reactiva<sup>(36)</sup>.

Por todo esto, se considera que probablemente la inactivación mutacional de la proteína p53 sea una de las primeras aberraciones fundamentales en el proceso de carcinogénesis cutáneo<sup>(37)</sup>.

Se ha visto que p53 está mutado en piel sana fotoexpuesta <sup>(38)</sup>, en un 50% de QA, 50% de CB y hasta un 90% de espinocelulares <sup>(39)</sup>. Todo ello, apoya su implicación en las fases más iniciales del proceso de oncogénesis en el CCNM <sup>(34)</sup>.

Se han descrito más de 150.000 mutaciones de diferentes orígenes, pero hay regiones en las que las mutaciones se detectan más frecuentemente, son los denominados “hotspots” (codones 177, 196, 245, 248 y 278). En el caso de CCNM, el codón 248 es el más frecuentemente afectado, sustituyéndose una arginina por triptófano, si bien el 278 es el más específico de CE. Un mismo tumor puede tener dos mutaciones diferentes, una en cada alelo <sup>(40)</sup>. Por otro lado, se ha visto que el espectro de mutaciones presenta diferencias estadísticamente significativas entre CE y CB <sup>(41)</sup>. Igualmente, parece que la mutación de p53 sirve como marcador de UVB y no UVA <sup>(28)</sup>.

La mutación en p53 se produce mucho antes de la aparición clínica e histológica de la lesión, ya sea una QA o un CE. En ratones irradiados con UVB se pueden observar mutaciones en p53 tras 4 semanas, mientras que los tumores no aparecen hasta 20 semanas después de la exposición <sup>(42)</sup>. Ésta se da en forma de agregados de células “mutadas” salpicados en la superficie cutánea dañada de tal modo que en piel fotoexpuesta clínicamente sana, se pueden hallar miles de clones de células con p53 mutado. Así, cada lesión (QA) en un único paciente es un clon único, portador de una mutación diferente, derivado de uno de estos agregados. Se ha visto que diferentes mutaciones en p53, confieren diferentes grados de capacidad para la supervivencia o la proliferación a los progenitores de queratinocitos. Sin embargo, no se ha conseguido correlacionar el tipo de mutación en p53 con la agresividad del CE, indicando que probablemente sean pasos posteriores a la mutación de p53 los implicados en la progresión tumoral <sup>(27)</sup>. Melnikova y colaboradores (2005) observaron que tras la interrupción de la irradiación UVB en ratones, en algunos casos desaparecía el clon mutado, fundamentalmente debido a diferenciación de la epidermis y descamación, y en otros, probablemente aquéllos en que la mutación tuvo lugar en células progenitoras de queratinocitos, la mutación persistió, dando eventualmente lugar a tumores cutáneos tipo CE. De este modo, un gen mutado por UVB, incluso en la infancia, puede contener esta mutación en un eventual tumor que se produjera en la edad adulta. Igualmente observaron, que la interrupción de la irradiación no evitaba, pero sí retrasaba el desarrollo de tumores en los ratones estudiados <sup>(26)</sup>.

Para el desarrollo de una queratosis actínica o un CE es necesaria la expansión clonal de los agregados portadores de cierta mutación en p53, de modo que va aumentando la superficie de “tejido diana” para que futuras mutaciones sigan contribuyendo al desarrollo de la lesión. Se ha propuesto que hay dos mecanismos que subyacen a esta expansión clonal selectiva de las células portadoras de p53 mutado. En primer lugar, la resistencia que adquieren estas células a la apoptosis inducida por UV, la cual es fisiológica. De este modo las células portadoras de la mutación no sufren muerte celular y ocupan los espacios dejados por los queratinocitos normofuncionantes, que sí sufrirían apoptosis (serían las denominadas *sunburn cells* o células en huevo frito)

<sup>(43)</sup>. Además, se propone que estas células con p53 mutado tengan una mayor capacidad proliferativa en comparación con el resto de queratinocitos normales <sup>(26)</sup>.

La expresión de p53 es patente en piel fotoexpuesta, pretumoral y tumoral <sup>(44)</sup>. Ésta se da en forma de agregados, que representarían los clones de células portadoras de p53 mutado presentes en el campo de cancerización.

#### A.2.1.4. Otros factores implicados en el proceso de carcinogénesis epitelial:

##### ◆ Ciclina D1

La ciclina D1 pertenece al grupo de proteínas reguladoras de ciclo celular. Su función se desarrolla en la fase temprana G1, donde permite el paso a fase S mediante su unión a las CDK 4 ó 6 responsables de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb). Por otra parte, las CDKs están inhibidas por p53, y la CDK4 específicamente por p16.

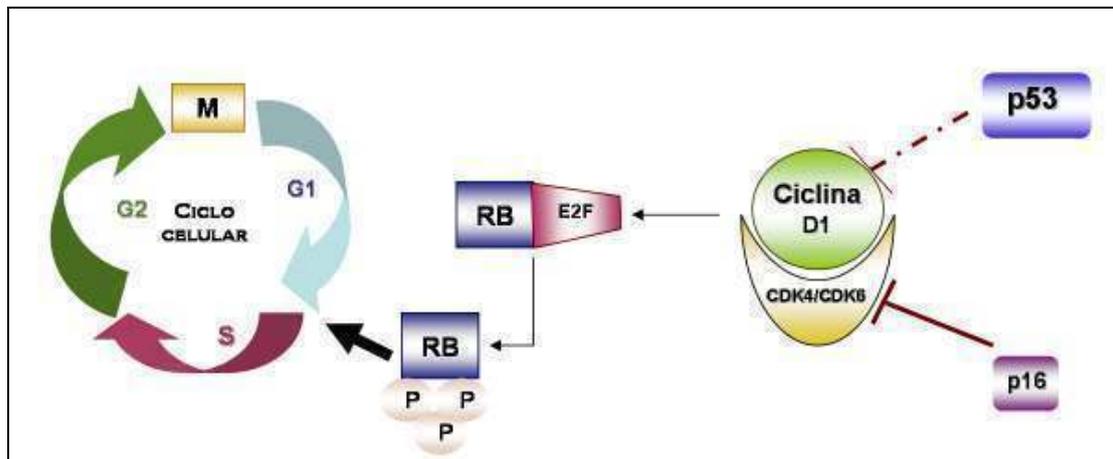


Figura 11. Control del ciclo celular por la ciclina D1.

La ciclina D1 es una de las moléculas más frecuentemente implicadas en el proceso de carcinogénesis. Hay evidencias de que el aumento de expresión de ciclina D1 acorta la fase G1 del ciclo celular, y participa en la transformación maligna en el carcinoma de vesícula biliar <sup>(45)</sup>. Se ha visto igualmente, que es un marcador pronóstico tanto para carcinoma de mama, esófago, hígado, páncreas, lengua, oral, faríngeo y laríngeo, como para el CE cutáneo en el cual está asociado con el grado de agresividad <sup>(46)</sup>. La inhibición selectiva de su función induce apoptosis y reducción tumoral en CE humanos <sup>(47)</sup>. Narbutt y colaboradores (2009) observaron que dosis suberitematosas de UVB inducían sobreexpresión de diversas proteínas de ciclo, entre ellas ciclina D1 <sup>(48)</sup>.

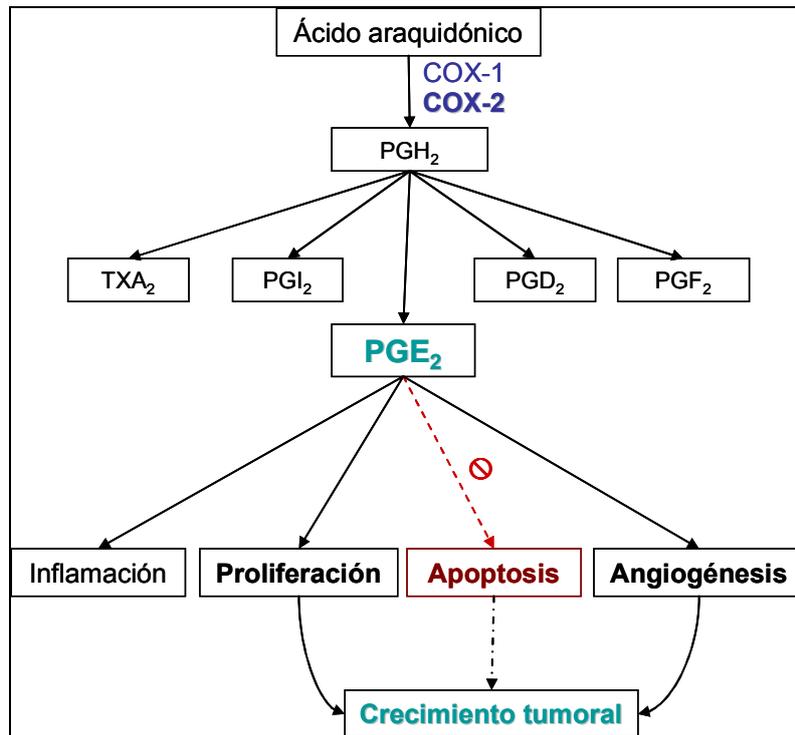
La sobreexpresión de ciclina D1 se da desde etapas iniciales del desarrollo de cáncer cutáneo, observándose en aproximadamente la mitad de las QA <sup>(49)</sup>. Además se ha visto que causa organización y diferenciación tisular anormal <sup>(37)</sup>.

Por otro lado, utilizando queratinocitos humanos (HaCaT) con sobreexpresión de ciclina D1, Burnworth y colaboradores (2007) demostraron que esta molécula, además de su implicación en proliferación y diferenciación, estimula la liberación de factores proinflamatorios, que inducen la destrucción del tejido epitelial <sup>(37)</sup>.

### ◆ Ciclooxygenasa-2

La ciclooxygenasa (COX) es un enzima que permite al organismo sintetizar PGs a partir del ácido araquidónico de la membrana celular. Las PGs son miembros de la familia de los eicosanoides y se encuentran en la mayoría de los tipos celulares. El paso inicial en la síntesis de PGs es la síntesis de  $\text{PGH}_2$  por parte de las COX, que es metabolizado después a  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGD}_2$  y  $\text{PGF}_2\alpha$  y tromboxano A2 ( $\text{TXA}_2$ ) por otras sintetas específicas de cada tipo de PG. En función del tejido, se sintetizan unas u otras moléculas, con diferentes funciones. De este modo en el pulmón y el bazo son capaces de sintetizar toda la gama de PGs, mientras en las plaquetas se sintetiza  $\text{TXA}_2$  o en el endotelio prostaglandina I2 ( $\text{PGI}_2$ ).

Existen dos isoformas de la COX, la COX-1 y la COX-2. La COX-1 es una enzima constitutiva implicada en procesos fisiológicos como la protección gástrica, mantenimiento del flujo renal, agregación plaquetaria y mantenimiento del tono vascular.



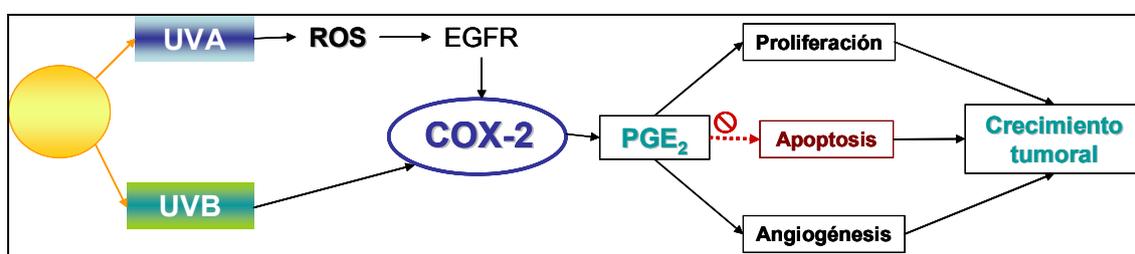
**Figura 12.** Síntesis de PGs y funciones de  $\text{PGE}_2$ . (Modificado de Fecker y colaboradores (2004) <sup>(50)</sup>)

Sin embargo, la isoforma COX-2 está claramente relacionada con situaciones no fisiológicas como la inflamación o el cáncer, induciéndose por citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento. Es conocida su implicación en procesos

inflamatorios como la artritis o la enfermedad inflamatoria intestinal <sup>(51,52)</sup>. Además se sobreexpresa tanto en carcinoma colorrectal <sup>(53,54)</sup>, adenocarcinoma prostático <sup>(55)</sup>, neoplasias pancreáticas <sup>(56)</sup>, cáncer de pulmón no microcítico <sup>(57)</sup>, carcinoma de vías urinarias <sup>(58)</sup> y de endometrio <sup>(59)</sup> como en en QA, CE y CB <sup>(60)</sup>.

Específicamente la PGE<sub>2</sub> es aquella que tiene función más destacable en el proceso de inflamación y crecimiento tumoral <sup>(50)</sup>; ésta puede inactivarse por medio de la 15-prostaglandin-deshidrogenasa. El rol de la COX-2 en el proceso de carcinogénesis del CE se ha resaltado por diversos hallazgos epidemiológicos y experimentales con inhibidores de la COX, como antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como el celexib, que han demostrado inhibir el desarrollo de carcinomas en ratones <sup>(61)</sup>. Se ha observado un efecto proapoptótico al utilizar AINEs en ciertos tumores. Se piensa que este efecto es fundamentalmente debido a la inhibición de la COX-2, que estaría activada en células tumorales induciendo la proliferación mediante síntesis de PGE<sub>2</sub>. Igualmente, diversos estudios han demostrado la efectividad de una preparación tópica de diclofenaco al 3% en combinación con ácido hialurónico para el tratamiento de QA <sup>(62,63,64)</sup>.

Hay evidencia de que la sobreexpresión de COX-2 está en relación con la activación del receptor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor, EGFR) a través de ROS <sup>(65,27)</sup>. La actividad de COX-2 y de la PGE<sub>2</sub> sintetizada por la misma, son reguladores positivos de la proliferación en células tumorales así como supresores de apoptosis. Este efecto se da por medio de las vías Ras/Raf/MAPK, activadas en múltiples tumores.



**Figura 13.** Influencia de la radiación UV en la activación de COX-2 y su implicación en la carcinogénesis.

Con respecto a la implicación de la COX-2 en la carcinogénesis a nivel cutáneo es de destacar que Isoherranen y colaboradores (1999) demostraron que la exposición a UVB induce expresión de RNA mensajero (RNAm) de COX2 en células HaCaT, mientras que el RNAm correspondiente a la COX-1 permanecía estable. Igualmente valoraron los efectos de UVB in vivo, mediante inmunohistoquímica en biopsias piel glútea, observando un aumento de la expresión de COX-2, especialmente en las capas más superficiales de la epidermis 24 a 72h después de la exposición a UVB <sup>(66)</sup>. Estos resultados fueron confirmados por An y colaboradores (2002) en lesiones derivadas de la radiación UVB, tanto en ratones hairless como en pacientes <sup>(60)</sup>.

De la misma manera Higashi y colaboradores (2000) encontraron no sólo que la expresión de COX-2 está aumentada en células en cultivo de cáncer cutáneo sino también que su inhibición frenaba la proliferación de estas células <sup>(67)</sup>.

Por otro lado, se ha visto que la expresión de COX-2 aumenta en estadios tempranos de la progresión tumoral al igual que la angiogénesis, por lo que se ha postulado una posible relación entre ambos hechos, que aún no ha sido investigada en detalle <sup>(68)</sup>.

Por tanto, la COX-2 es un marcador precoz de daño actínico fundamentalmente por UVB y está claramente implicado en el proceso de carcinogénesis del CE.

## **A.2.2. Tratamiento**

Hoy día se acepta que las QA son el reflejo clínico del daño genético y molecular que la radiación UV genera en la piel fotoexpuesta.

En general el riesgo exacto de una QA de evolucionar a CE no está bien definido. Igualmente no existe ningún marcador pronóstico que identifique aquella lesión con mayor potencial de malignidad. Por todo esto se acepta que es conveniente tratarlas en todos los casos con el fin de prevenir la invasión dérmica y CE que implicaría tratamientos más agresivos (cirugía, radioterapia) y un peor pronóstico. Las QA pueden extirparse mediante cirugía convencional o curetaje, lo cual permite un estudio histológico en casos dudoso. De cualquier modo, la mayoría de pacientes no presentan una única lesión, sino numerosas en una misma superficie con historia de fotoexposición. Por ello, a extirpación de todas y cada una de las QA no resultaría práctica y la mayoría de los tratamientos utilizados tienen un enfoque más conservador. En este sentido, el 5-fluorouracilo, el imiquimod y la terapia fotodinámica (TFD) permiten el tratamiento no sólo de las lesiones clínicamente visibles, sino también de todo el campo de cancerización, lo cual implica una clara ventaja, sobre todo a nivel preventivo. Se resumen a continuación los tratamientos más comúnmente utilizados para la QA.

### **A.2.2.1. Crioterapia**

Es el método más frecuentemente usado para el tratamiento de las QA. Se basa en el uso de un criógeno, que por congelación, produce muerte celular. El criógeno más frecuentemente utilizado es el nitrógeno líquido, con una temperatura de  $-195.8^{\circ}\text{C}$  que suele aplicarse por medio de un spray o bastoncillo de algodón. Los queratinocitos sufren muerte celular a una temperatura aproximada de  $-40-50^{\circ}\text{C}$ . Otras estructuras, como el colágeno, los vasos sanguíneos y los nervios, son más resistentes al frío de tal modo que no se dañan con esta terapia. Los melanocitos, por el contrario, son más sensibles que los queratinocitos, por lo que este tratamiento puede dejar hipopigmentación residual.

Se obtienen tasas de curación entre 67-98,8% <sup>(69,70,71)</sup>, si bien se ha observado que su efectividad depende, en gran medida, de la duración e intensidad de la congelación <sup>(69)</sup>.

Se trata de un tratamiento habitualmente bien tolerado, con baja tasa de complicaciones cuando es aplicado por personal bien formado. Los resultados cosméticos son también buenos.

#### **A.2.2.2. Dermabrasión**

Terapia poco usada en la actualidad. Ésta puede llevarse a cabo mediante técnicas químicas (ácido tricloroacético) o láser (láser CO<sub>2</sub>).

#### **A.2.2.3. 5-Fluorouracilo**

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un antimetabolito cuya acción es bien conocida. Una vez que éste entra en la célula se ribosila y fosforila, de tal manera que el producto final de estas reacciones se asemeja a los nucleótidos naturales. Posteriormente, el 5-FU se une al enzima timidilato sintasa, inhibiéndola, de tal manera que se produce una depleción de timina. Esta disminución en timina lleva a una disminución en la síntesis de DNA y por tanto reducción de la proliferación y muerte celular. La interferencia del 5-FU es a nivel de la replicación, los tejidos con una proliferación más intensa sufren un mayor efecto citotóxico. Se obtienen reducciones medias del número de lesiones en torno a 79,5% con 5-FU al 5% y de 81,5% con concentraciones de 0,5% <sup>(72,73)</sup>.

Para una respuesta adecuada se requieren alrededor de 4 semanas. Por otro lado, los efectos adversos locales como eritema, exudación, costras e incluso ulceración son relativamente frecuentes.

#### **A.2.2.4. Diclofenaco**

El diclofenaco es un AINE, que formulado en ácido hialurónico al 3%, ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de las QA, habiéndose observado un aclaramiento de más del 75% de las lesiones a los 30 días en el 70% de los pacientes <sup>(64,62)</sup>.

El efecto terapéutico del diclofenaco 3% probablemente sea debido al efecto inhibitor del enzima COX-2 de los queratinocitos. Éste se encuentra activado en áreas fotoexpuestas y en QA, impidiendo la apoptosis por medio de la síntesis de PGE2. El fármaco, al inhibir la acción de COX-2, favorecería la apoptosis y la resolución de las lesiones (ver apartado A.2.1.4). En este sentido, Fecker y colaboradores observaron que este AINE inducía significativamente la apoptosis en cultivos celulares de células de carcinoma epidermoide cutáneo través de la activación de la cascada de caspasas <sup>(50)</sup>.

El tratamiento se aplica dos veces al día por un período de hasta 3 meses. Los efectos adversos más frecuentes son xerosis, dermatitis de contacto y prurito <sup>(74)</sup>.

#### **A.2.2.5. Imiquimod tópico**

El imiquimod es un agonista del toll-like receptor 7 (TLR7) que estimula la respuesta inmune induciendo la liberación de citoquinas involucradas en la inmunidad celular.

Pertenece al grupo de los modificadores tópicos de la respuesta inmune y ha sido aprobado para el tratamiento de QA en EEUU y Europa en crema al 5%.

Se han realizado diversos ensayos clínicos aleatorizados que demuestran la efectividad del tratamiento, que se aplica 3 veces en semana, durante dos ciclos de cuatro semanas<sup>(75)</sup>. Las tasas de aclaración son variables, entre 45-84%<sup>(76)</sup>.

Durante los primeros días del tratamiento el imiquimod tópico ejerce un efecto paradójico, aumentando el número de lesiones en el área tratada. Se piensa que esto es debido que provoca la aparición de lesiones hasta ese momento subclínicas y no a un desarrollo de nuevas lesiones por parte del paciente.

El imiquimod causa inflamación de la zona tratada, con eritema y reacciones locales tipo exudación, costras y erosiones. Igualmente se han visto casos de clínica similar en pacientes del grupo control, que utilizaban la crema placebo, por lo que se piensa que en parte esta toxicidad puede ser también debida a los excipientes de la crema<sup>(76)</sup>.

Recientemente se ha visto en un estudio piloto que una pauta semanal más prolongada (hasta 24 semanas) podría ser también eficaz, disminuyendo considerablemente los efectos adversos<sup>(77)</sup>.

#### **A.2.2.6. Terapia fotodinámica**

La terapia fotodinámica utiliza un compuesto fotosensibilizante, oxígeno y luz para inducir muerte celular en tejidos seleccionados.

Se ha demostrado que es eficaz para el tratamiento de QA<sup>(78)</sup>, con buenos resultados cosméticos. Esta técnica se tratará en más profundidad en el apartado siguiente, dado que es el objetivo fundamental de esta tesis.

### **A.3. La Terapia Fotodinámica**

---

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento relativamente novedoso en Dermatología destinado fundamentalmente al tratamiento de CCNM y de lesiones precursoras. Mediante la combinación de tres elementos, un fotosensibilizante, luz y oxígeno, la TFD consigue la eliminación selectiva de las células malignas o premalignas de la piel sin necesidad de procedimientos invasivos. Esta técnica se basa en la fotooxidación de moléculas biológicas inducida por el fotosensibilizante, el cual se localiza selectivamente en determinadas células o tejidos tumorales, de forma

que al ser iluminadas con una luz de adecuada longitud de onda y en dosis suficiente, dichas células resultan destruidas.

Es una técnica prometedora cuyo uso se está generalizando en la práctica dermatológica diaria y cuyas aplicaciones son cada vez mayores. Igualmente, esta técnica puede ser utilizada como método diagnóstico, ya que mediante la fluorescencia emitida por el fotosensibilizante, al ser excitado por luz, se pueden detectar tejidos tumorales, diferenciándolos de los sanos.

El origen de la TFD se remonta a hace 4.000 años cuando los egipcios usaban una combinación de la planta *Mani majus*, administrada oralmente y luz del sol para el tratamiento del vitíligo. Fue "redescubierta" en el siglo XX por Germans Oscar Raab y Herman von Tappeiner, quienes describieron las propiedades sensibilizantes de la acridina y acuñaron el término "fotodinámica", mientras estudiaban sus efectos en protozoos <sup>(79,80)</sup>. Sin embargo, no fue hasta 1970 cuando Dougherty, pionero en el uso de la TFD, aplicó estos principios para el tratamiento del cáncer utilizando un derivado de la hematopofirina como fotosensibilizante. Su desarrollo ha sido máximo en los últimos 15 años debido al desarrollo de nuevas sustancias fotosensibilizantes y fuentes de luz más convenientes.

### **A.3.1. Los fotosensibilizantes**

Los fotosensibilizantes (FS) son compuestos químicos, que se excitan mediante la absorción de fotones desencadenando una reacción fotoquímica la cual lleva a la muerte celular.

Se considera que las características que debería reunir el fotosensibilizante ideal son las siguientes <sup>(81)</sup>:

- Capacidad de localizarse selectivamente en las células o tejido diana (buena razón lesión/tejido sano), con el fin de tratar únicamente aquellas células patológicas.
- Tener distribución homogénea dentro del tejido diana, para obtener resultados similares en todo el tejido a tratar.
- Ser capaz de activarse con una luz con longitud de onda suficiente para penetrar el tejido a tratar.
- Tener un rendimiento fotodinámico alto (alta producción de singletes de oxígeno en el menor tiempo posible).
- Corto intervalo de tiempo entre la administración y la acumulación máxima del fotosensibilizante en los tejidos tumorales.
- Vida media corta y rápida eliminación de los tejidos normales con el fin de minimizar los efectos tóxicos.

Los diferentes fotosensibilizantes utilizados en Dermatología pueden clasificarse en función de su origen o de su forma de aplicación. A continuación se detallarán los más destacables, clasificados de acuerdo a si se aplican de forma sistémica o tópica.

### A.3.1.1. Sistémicos

Los fotosensibilizantes con un anillo tetrapirrólico en su estructura química se administran preferentemente por vía intravenosa ya que la mayoría de ellos no penetran significativamente a través de la piel.

Este grupo de sustancias químicas incluye a compuestos de “primera generación” como el derivado hematoporfínico y su forma comercializada (Photofrin®) que se desarrollaron hace unos 30 años y a un nuevo y amplio grupo de “segunda generación” que actualmente se están investigando.

Los dos primeros compuestos utilizados para TFD fueron la hematoporfirina (Hp) y el porfímero sódico. La Hp se aisló por primera vez de hemoglobina de sangre seca, usando ácido sulfúrico concentrado, mientras que el porfímero sódico (Photofrin®) es un derivado lipolizado y concentrado de la Hp. Su espectro de absorción es similar al de las porfirinas presentando un máximo de absorción en la región azul (430 nm, banda de Soret) y varios picos en la zona roja del espectro <sup>(82)</sup>. Al ser administrados por vía intravenosa se acumulan en el estroma vascular del tumor. Aunque tanto la Hp como el Photofrin® son buenos fotosensibilizantes, tienen el inconveniente de eliminarse con dificultad, presentando una prolongada vida media en la piel lo que da lugar a una elevada fotosensibilidad cutánea, que dura de 4 a 6 semanas. Éste es uno de los principales motivos para su utilización limitada <sup>(80)</sup>.

En los últimos años se han desarrollado nuevos compuestos, fotosensibilizantes sistémicos de segunda generación, con mejores propiedades que la Hp y el Photofrin®. Estos compuestos son derivados del anillo tetrapirrólico con máximos de absorción entre los 660 nm y 850 nm, correspondientes al rojo e infrarrojo, que permiten una mayor penetrabilidad de la luz en los tejidos biológicos, en torno a los 20 mm <sup>(82)</sup>. Esta característica, junto con su más rápido aclaramiento en comparación con los fotosensibilizantes de primera generación, permiten el tratamiento fotodinámico a niveles más profundos de la piel, así como su utilidad en el tratamiento de tumores pigmentados (que no se afectan con fotosensibilizantes cuyo espectro de absorción se encuentra en el rango de la luz visible) <sup>(83)</sup>.

Dentro de los FS sistémicos de segunda generación se encuentran las clorinas, las cianinans, las ftalocianinas, los porfícenos, otras porfirinas, etc. <sup>(81)</sup>

### A.3.1.2. Tópicos

Los dos fotosensibilizantes tópicos más utilizados en Dermatología son el ácido  $\alpha$ -aminolevulínico (ALA) y su derivado, el 5-metil-aminolevulinato (MAL) (Fig. 14).



Figura 14. A: Estructura química del ALA. B: estructura química del MAL, derivado del ALA

Estos compuestos no son moléculas FS *per se*, sino que son metabolitos precursores del grupo Hemo, favoreciendo la producción de protoporfirina IX (PpIX), la cual sí es la molécula fotosensibilizadora.

#### ◆ ALA

El ALA es un compuesto hidrofílico, por lo que presenta una relativa dificultad para atravesar las barreras biológicas como el estrato córneo. Esto implica que sea necesaria una concentración relativamente alta del compuesto y un largo tiempo de incubación (hasta 18h) para su absorción completa por el tejido diana, aunque recientemente se ha visto que tiempos de incubación más cortos no son menos eficaces <sup>(84)</sup>.

A nivel celular atraviesa la membrana mediante transporte activo, a través de los transportadores de membrana de glicina y GABA. Este transporte activo requiere energía y depende del pH y la temperatura, estando ligeramente acelerado en células tumorales <sup>(85,86)</sup>.

Recientemente se han desarrollado unos parches con este compuesto que facilitan la técnica, obteniendo resultados clínicos y cosméticos similares <sup>(87)</sup>.

#### ◆ Me-ALA

El MAL es más lipofílico que ALA, de modo que su paso a través de la membrana celular se da predominantemente por transporte pasivo por lo que no requiere energía. Además este mecanismo no es saturable. Esto explica la más rápida y eficaz absorción del MAL frente al ALA. Esta diferencia es aún más marcada en células malignas, obteniéndose así una localización más selectiva en el tejido tumoral <sup>(88)</sup>.

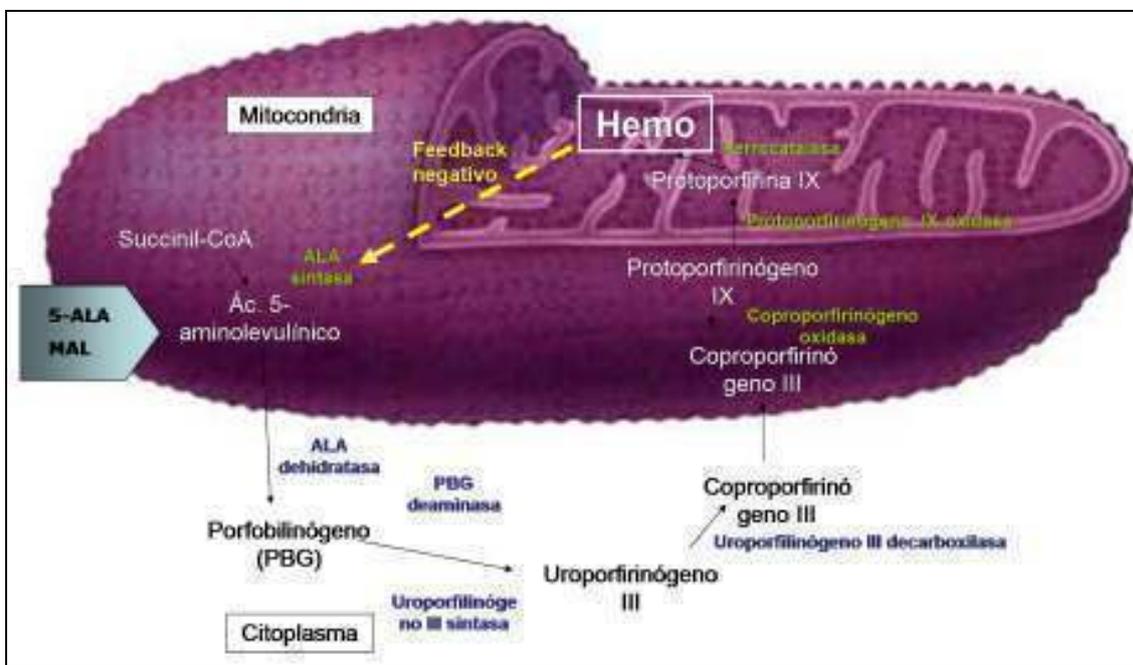
Inmediatamente después de la entrada del MAL en la célula sufre una desmetilación que lo convierte en ALA, siendo los pasos metabólicos subsiguientes idénticos en ambos casos.

### **A.3.2. Mecanismo de acción**

#### **A.3.2.1. Vía de síntesis del grupo Hemo (Fig. 15)**

El ALA no es un FS por el mismo, sino un metabolito precursor del compuesto fotoactivo PpIX, el cual es un producto intermediario en la ruta de síntesis intracelular del grupo Hemo en la que intervienen moléculas como la hemoglobina, los citocromos y la vitamina B<sub>12</sub>. El primer paso de la ruta de síntesis del grupo Hemo ocurre en el citoplasma de la célula y consiste en la formación de ALA a partir de glicina y succinil-CoA catalizado por la enzima ALA sintetasa. Posteriormente, en el citoplasma ALA es metabolizado por la ALA deshidratasa (ALD) para producir porfobilinógeno (PBG). La acción coordinada de porfobilinógeno deaminasa (PBGD) y la uroporfobilinógeno III sintasa combina cuatro moléculas de PBG y forma uroporfirinógeno III. Después, la uroporfirinógeno decarboxilasa retira cuatro grupos carboxilos de ácido acético para formar coproporfirinógeno III. Éste, está expuesto a la coproporfirinógeno oxidasa

mitocondrial, que la descarboxila y oxida las cadena de ácido propiónico a grupos vinilo, formando protoporfirinógeno IX. Las oxidaciones siguientes de los anillos tetrapirrólico es catalizado por la protoporfirinógeno oxidasa en la mitocondria y éste es el paso final en la síntesis de PpIX. A partir de ésta, la ferroctalasa, sintetizará el grupo Hemo.



**Figura 15.** Vía de síntesis del grupo Hemo. La administración exógena de ALA activa constantemente el ciclo, aumentando la producción de PpIX.

### A.3.2.2. Acúmulo selectivo de PpIX

La síntesis de ALA está estrictamente regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa en el que el grupo Hemo inhibe la formación de dicho compuesto. Al administrar ALA exógeno (o MAL que sufre una desmetilación inmediatamente tras entrar en la célula) a una célula, en la TFD, dicha ruta queda sobrecargada originando una sobreproducción celular de porfirinas, particularmente de PpIX<sup>(82,80,89)</sup>.

El tratamiento ideal para las QA sería aquel que afectara exclusivamente a la piel lesional, dejando intacta la piel circundante. En este sentido, se sabe que la acumulación de PpIX es mayor en células neoplásicas o preneoplásicas<sup>(88)</sup> ya que la presencia de PpIX intracelular puede detectarse mediante diagnóstico de fluorescencia. Se ha observado que en piel de pacientes a los que se les había aplicado previamente ALA tópico, la intensidad de fluorescencia mayor en la piel lesional que en la piel sana adyacente, si bien la intensidad de fluorescencia no permite la discriminación entre los diferentes grados de displasia<sup>(22)</sup>. De cualquier modo, el mecanismo por el cual ocurre esta acumulación selectiva no está completamente aclarado. Se han postulado diferentes hipótesis:

#### ◆ **Actividad enzimática diferencial en células neoplásicas**

Diversos estudios <sup>(90,91,92,93,94)</sup> en diferentes líneas celulares han demostrado una síntesis de porfirinas aumentada, secundaria a una actividad enzimática en algún punto de la vía de síntesis del grupo Hemo. En consecuencia, estas células serían más sensibles a la fotoactivación, comparadas con células sanas <sup>(95)</sup>. Estos trabajos han sido realizados en células de carcinomas de mama, cervix y vejiga. Sin embargo, hasta el momento no se ha podido confirmar que esto ocurra en el caso de las QA. No se han descrito aberraciones enzimáticas en la vía de síntesis del grupo Hemo de QA que puedan justificar la acumulación preferente de PpIX en ellas. Smits y colaboradores (2007) observaron que no existían diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de fluorescencia de QA con diferente grado de displasia (clasificadas como KIN I, II y III) <sup>(22)</sup>. Igualmente, han comprobado recientemente que no existen diferencias significativas en la producción de PpIX entre células en cultivo procedentes de QA y de piel no fotoexpuesta tras la incubación con ALA <sup>(96)</sup>, enfatizando el hecho de que probablemente sean otros los mecanismos implicados en la acumulación preferente de PpIX en células patológicas.

#### ◆ **Actividad enzimática diferencial en células diferenciadas**

Por otro lado, se ha postulado que exista algún tipo de relación entre la actividad de la vía Hemo y la diferenciación celular, dado que se ha observado una fluorescencia significativamente mayor, tras administración de ALA, en queratinocitos suprabasales, en comparación con los basales <sup>(96)</sup>. La razón por lo que esto ocurre no está aclarada.

#### ◆ **Actividad enzimática diferencial en células en proliferación**

Igualmente se ha postulado que exista una relación entre la actividad proliferativa de un determinado tejido y la producción de PpIX por sus células, pero no ha podido ser confirmado en tejido epidérmico. Smits y colaboradores (2007) evaluaron la intensidad de fluorescencia PpIX en 86 QA y estudiaron la relación de ésta con el grado de displasia (clasificación KIN) y la proliferación, medida por la expresión de Ki-67. No se encontró relación entre la proliferación y la intensidad de fluorescencia de las lesiones <sup>(97)</sup>.

#### ◆ **Mayor absorción de ALA/MAL en tejidos patológicos**

La penetración de ALA en la piel parece ser un factor importante en la acumulación de PpIX en las células de QA. La baja acumulación de ALA o MAL después de su aplicación en piel normal puede ser explicada por la penetración limitada del fotosensibilizante a través de un estrato córneo intacto. Como consecuencia del crecimiento de una neoplasia subyacente, podrían aparecer pequeñas modificaciones estructurales en el seno del estrato córneo, así como alteraciones en el crecimiento epidérmico y la queratinización que conllevarían un daño de la integridad de la estructura lamelar. Esto otorgaría al ALA o MAL un terreno más accesible para alcanzar la lesión subyacente <sup>(98)</sup>.

Por otro lado, este daño del estrato córneo y el aumento penetración de ALA o MAL puede ser causado por un daño crónico secundario a la exposición UV. Esto fue confirmado en un modelo murino en el cual se demostró que el ALA penetra más en lesiones inducidas por UVB, debido a un alteración funcional del estrato córneo <sup>(99)</sup>.

Estos datos se ven apoyados por el hecho de que la eliminación de áreas hiperqueratósicas previa al tratamiento aumenta la fluorescencia PpIX <sup>(97)</sup>.

### A.3.2.3. Reacción fotodinámica

El espectro de absorción de la PpIX está caracterizado por tener dos picos: uno máximo a nivel de la luz azul (Banda Soret, 400nm) y otro en la región del rojo del espectro visible. La luz roja, a pesar de ser absorbida en menor medida que la azul, puede ser más útil para el tratamiento de lesiones cutáneas, por su mayor capacidad de penetración (Fig. 16).

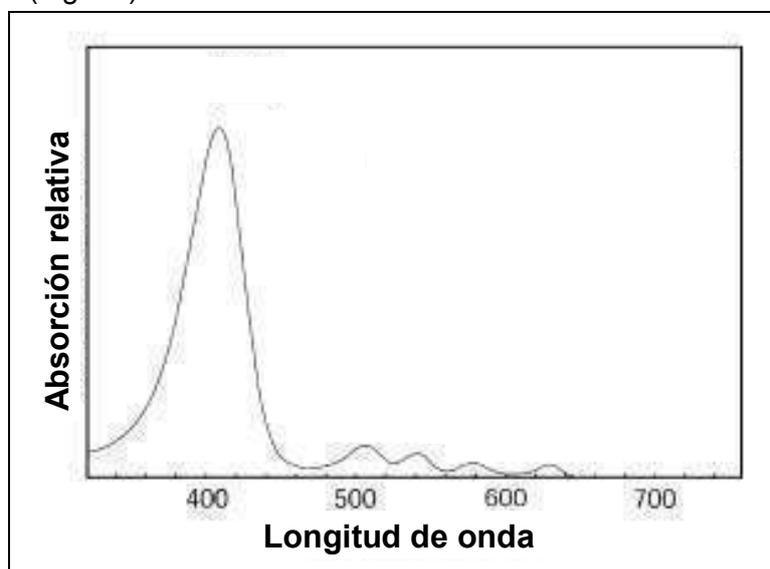
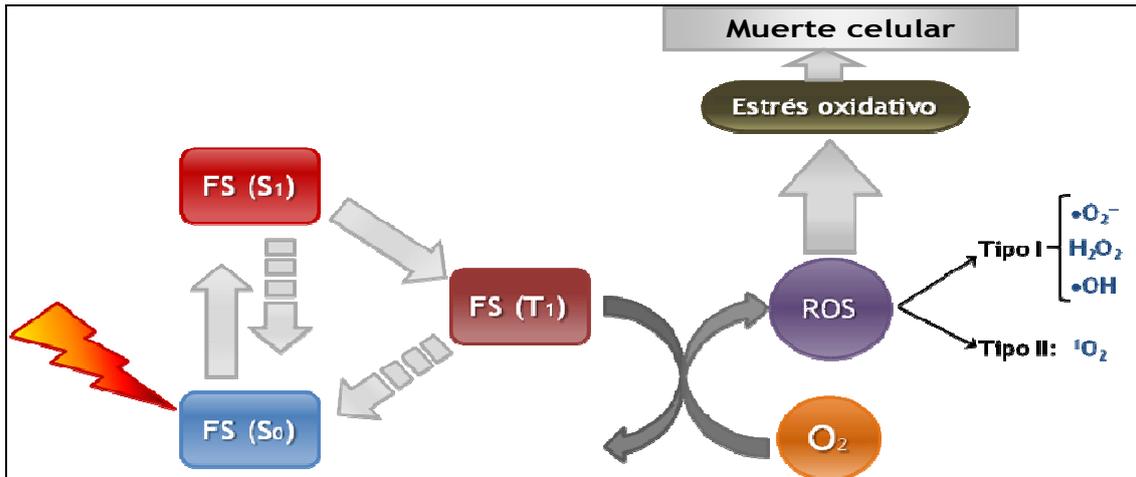


Figura 16. Espectro de absorción de la PpIX.

Tras iluminar la superficie a tratar con una longitud de onda apropiada la PpIX puede pasar a estado singlete, de muy corta vida media ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ s), por lo que el fotosensibilizante vuelve casi inmediatamente a su estado basal, liberando fluorescencia roja. No obstante, desde dicho estado y a través de un proceso conocido como cruce intersistema, puede pasar a un estado de triplete excitado ( $T_1$ ). En el estado  $T_1$  (de vida media larga), el FS puede desencadenar una reacción fotoquímica denominada tipo I, interaccionando con biomoléculas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) y generando radicales que reaccionan con el  $O_2$  para producir ROS tales como el anión superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Alternativamente, el FS en el estado  $T_1$  transfiere su energía directamente al oxígeno molecular ( $^3O_2$ ) para producir oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), reacción fotoquímica denominada tipo II. Las ROS, y en particular el  $^1O_2$ , resultantes de estas reacciones fotoquímicas, constituyen los intermediarios citotóxicos que dan lugar a la destrucción selectiva del tejido tumoral en la zona iluminada (Fig. 17).



**Figura 17.** Esquema ilustrativo del mecanismo de acción de la TFD, basado en Dolmans y colaboradores (2003) <sup>(100)</sup>

El  $^1\text{O}_2$  presenta una corta vida media en los sistemas biológicos ( $< 0,04\mu\text{s}$ ) que limita su radio de acción ( $< 0,02\mu\text{m}$ ), por lo que el daño producido está estrechamente relacionado con la localización del compuesto fotosensibilizador. Esto favorece la preservación simultánea de las estructuras sanas que rodean la lesión <sup>(101,102,103,82)</sup>. El mecanismo exacto a nivel celular no está claramente determinado.

Cuando la PpIX se activa con la fuente de luz, se metaboliza completamente en 24 a 48h sin dejar fotosensibilidad residual en el tejido. Este fenómeno se denomina *fotoblanqueamiento* <sup>(104)</sup> y es claramente ventajoso en lo que efectos adversos se refiere, ya que la fotosensibilidad residual postratamiento es casi inexistente.

### A.3.3. Fuentes de luz

Una fuente de luz con un espectro de emisión que corresponda con el espectro de absorción del fotosensibilizante junto con una adecuada penetración en los tejidos determina una efectividad máxima de la TFD.

La penetración de la luz en la lesión depende tanto de la longitud de onda de la luz utilizada (a mayor longitud de onda, más penetración) como del tipo de tejido el cual puede modificar la absorción por los siguientes factores:

- la absorción óptica de cromóforos tisulares endógenos (hemoglobina)
- la dispersión óptica dentro del tejido
- la sustancia fotosensibilizante

Los dos picos principales de absorción de la PpIX se encuentran en los de la luz roja y la azul, siendo la luz roja (620-750nm, hasta 6mm) la que tiene mayor capacidad de penetración que la azul (450-495nm; 1-3mm) debido a su mayor longitud de onda. De cualquier modo la piel causa una gran dispersión con lo que la penetración real de la luz roja de 630nm es de 1-3mm <sup>(105)</sup>.

Para la iluminación durante la TFD pueden utilizarse diferentes dispositivos <sup>(82)</sup>:

- Luces incoherentes/fluorescentes:

Abarcan todo el espectro de la luz, incluyendo ultravioleta e infrarrojos. En TFD la única que se utiliza es la lámpara Blue-U® (Dusa).

- LEDs (Light emitting diodes):

Son dispositivos semiconductores de pequeño tamaño que emiten longitudes de onda estrecha, entre 20 y 50nm, sin emisión infrarroja ni ultravioleta. Son las más utilizadas en la actualidad (ej: Aktilite®).

Recientemente se ha demostrado que las tasas de aclaramiento en QA después de TFD con 5-ALA son similares usando un LED y una fuente de luz incoherente de banda ancha <sup>(106)</sup>.

Se han realizado trabajos utilizando LEDs portátiles, creándose el concepto de "TFD ambulatoria", que elimina esperas innecesarias en el hospital posibilitando al paciente realizar el tratamiento en casa <sup>(107)</sup>.

- Láser:

Los láseres emiten una longitud de onda concreta, de luz coherente. Se puede seleccionar de este modo la longitud de onda deseada para cada fotosensibilizante. Además, permiten un tiempo más corto de tratamiento, obteniéndose un mínimo daño en tejidos circundantes al diana.

El inconveniente fundamental de los láseres es su elevado precio, así como la imposibilidad de tratar grandes superficies de una vez. Por otro lado, no se ha demostrado que existan ventajas terapéuticas para el tratamiento de lesiones cutáneas con TFD- láser frente a otras fuentes de luz incoherentes.

Luz intensa pulsada (IPL):

Se han utilizado IPL para la TFD con buenos resultados en acné y fotorrejuvenecimiento <sup>(108,97)</sup>. Sin embargo, los resultados en QA varían ampliamente (tasas de respuesta 50-91%) entre los diferentes estudios, dependiendo de las especificaciones utilizadas en cada uno <sup>(97)</sup>.

La luz pulsada variable (VPL) es un subtipo de IPL cuyo aparato permite la modificación del número anchura y retardo de los micropulsos utilizados. Se ha visto que ésta es igual que eficaz para TFD que los LEDs pero causa menos dolor <sup>(109)</sup>.

Luz natural:

Recientemente se ha demostrado que la TFD realizada con luz natural es tan efectiva como aquella realizada con LEDs. Además, parece que este procedimiento resulta menos doloroso <sup>(110)</sup>.

### A.3.4. La aplicación clínica en Dermatología

La TFD está indicada para el tratamiento de QA, CB superficial y enfermedad de Bowen. Hay numerosos estudios que avalan la efectividad de esta terapia para este tipo de lesiones.

Se trata de una terapia que, a nivel dermatológico, presenta claras ventajas como la selectividad y conservación de la piel no afecta, el carácter no invasivo y los excelentes resultados cosméticos. Además al ser un tratamiento que se realiza en presencia de un médico, permite un control de su correcta aplicación, a diferencia de otros tratamientos de uso domiciliario.

Por otro lado, existen numerosas publicaciones señalando la efectividad en casos y series de casos de enfermedades cutáneas de muy diferente índole (Tabla 2). Esto podría ser debido tanto a un efecto citotóxico como a un efecto inmunomodulador de la TFD que justificaría su efectividad en condiciones muy dispares. Sin embargo, no existen ensayos clínicos controlados en este sentido.

Linfoma cutáneo de células T	Hidradenitis supurativa
Enfermedad de Paget extramamaria	Hiperplasia sebácea
Sarcoma de Kaposi	Morfea
Carcinoma vulvar in situ	Liquen escleroso y atrófico
Psoriasis	Queloides
Enfermedad de Hailey-Hailey	Verrugas
Enfermedad de Darier	Molluscum contagiosum
Pseudolinfomas	Tinea pedis
Liquen plano genital	Onicomycosis
Necrobiosis lipóidica	Leishmaniasis
Rosace	Fotoenvejecimiento
Acné	

**Tabla 2:** otras indicaciones de la TFD.

#### A.3.4.1. Evidencia científica para QA

Lo que llevó a la FDA a aprobar la TFD fueron una serie de ensayos con ALA y luz azul, en los que se obtuvieron respuestas completas desde 50% hasta 90% <sup>(84)</sup>. Éstos están resumidos en la tabla 3.

Autor	Estudio	Diseño	Tamaño	Dosis	Resultados
Pariser 2003 <sup>(111)</sup>	2x MAL-TFD vs placebo	Aleatorizado, doble ciego	80 pacientes	2 sesiones de TFD separadas una semana	89% > 38%
Tarsted 2005 <sup>(112)</sup>	Comparación de 2 regímenes	Aleatorizado, multicéntrico	211 pacientes	1 vs 2 sesiones de TFD	Una sesión no es inferior a 2 en QA finas.
Piaccquadio 2004 <sup>(113)</sup>	Fase III	Aleatorizado	243 pacientes	ALA luz azul. Si no respuesta, se daba 2º tto.	Aclaramiento total (1 tto) > 70% 2 tto: 88%

**Tabla 3:** Ensayos clínicos controlados en TFD para QA.

También se han hecho múltiples estudios de comparación entre TFD y otras técnicas terapéuticas. En un estudio randomizado multicéntrico europeo se comparó la MAL-TFD (un tratamiento) con la crioterapia (doble ciclo de congelación), obteniéndose tasa de respuesta a los 3 meses de 69% para TFD y 75% para crioterapia. Los resultados cosméticos se consideraron más aceptables en el caso de la TFD <sup>(114)</sup>. También ha demostrado una eficacia similar al 5-FU <sup>(115)</sup>, con un mejor perfil de tolerancia para la TFD.

#### A.3.4.2. La TFD como tratamiento preventivo

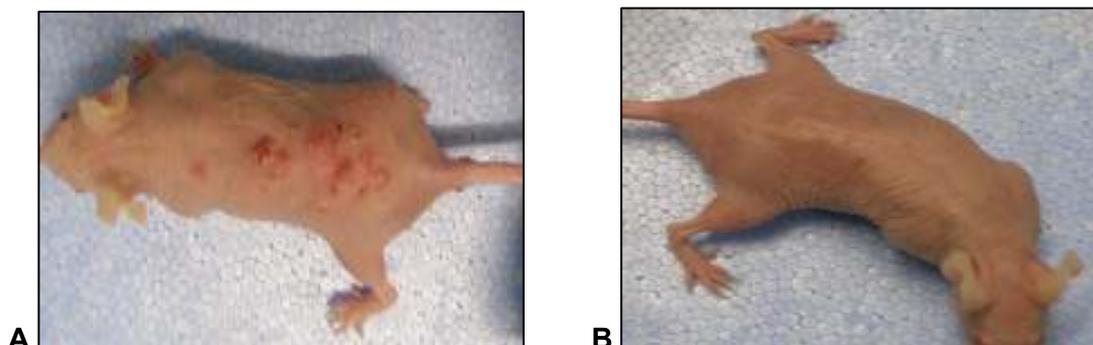
Estudios preclínicos y clínicos sugieren que la TFD puede prevenir la aparición de QA. Los pacientes que más podrían beneficiarse de este efecto de la TFD son los pacientes trasplantados, debido a que la inmunosupresión crónica los hace especialmente propensos a desarrollar QA y CE. En ellos se han centrado la mayoría de estudios, si bien las pautas y el fotosensibilizante óptimo para ello están aún sin determinar.

##### ◆ Modelo murino

Los primeros estudios en este sentido se realizaron en modelos animales, utilizando ratones *hairless*, los cuales desarrollan QA y CE tras la exposición UV, mientras que no desarrollan CB ni melanoma.

Stender y colaboradores (1997) utilizaron 120 ratones a los que irradiaban con UV o UV y ALA-TFD simultáneamente <sup>(116)</sup>. Observaron un retraso significativo en la aparición de QA en los ratones sometidos a TFD. Liu y colaboradores (2004) realizaron un experimento similar al de Stender, en el que aplicaban ALA-TFD tópico periódicamente a ratones irradiados con UV; observando igualmente un retraso en la aparición de QA <sup>(117)</sup>.

Sharfei y colaboradores (2002) utilizaron MAL-TFD con el mismo fin. Aplicaron MAL únicamente en medio lomo de ratones irradiados con UV. La superficie que recibía MAL-TFD mostró un retraso en la aparición de cáncer cutáneo <sup>(118)</sup>. Resultados similares han sido obtenidos por nuestro grupo utilizando también ratones *hairless* y MAL-TFD (datos no publicados) (Fig. 18).



**Figura 18. A:** Ratones *hairless* sometidos a UVB, sin TFD concomitante. **B:** con TFD concomitante. Obsérvese la diferencia en el número de tumores desarrollados en el dorso

### ◆ Estudios clínicos

Wulf y colaboradores (2004) utilizaron MAL-TFD en 27 pacientes trasplantados a los que siguieron durante 1 año. Se trató con una única sesión de TFD un área de 5cm<sup>2</sup>, y se comparó al cabo del año con otra área control. Se observó un retraso en la aparición de QA en las áreas tratadas respecto al control <sup>(119)</sup>.

Sin embargo, De Graaf y colaboradores (2006) trataron un antebrazo de 40 pacientes trasplantados con ALA-TFD manteniendo el otro como control. No observaron diferencias en el número de lesiones queratósicas desarrolladas en cada antebrazo ni en el número de CE desarrollados en cada antebrazo en un plazo de 2 años. Según estos resultados, no pudieron demostrar un efecto preventivo de la TFD en estos pacientes <sup>(120)</sup>.

Por otro lado, Dragieva y colaboradores (2004) observaron que las tasas de curación de QA a partir de las 12 semanas del tratamiento diferían entre pacientes inmunocompetentes y transplantados, siendo más bajas en aquellos inmunodeprimidos <sup>(121)</sup>.

### A.3.5. Efectos adversos

Los efectos adversos más frecuentes son las reacciones localizadas en el área de tratamiento durante la iluminación, que puede causar un grado variable de dolor.

Frecuentemente se observa eritema y edema en el área del tratamiento que puede durar hasta 2 semanas. También pueden darse prurito, descamación, prurito e hiperpigmentación postinflamatoria. Menos frecuentes son la ulceración, costras, pústulas, erosiones, vesículas/ampollas. Las reacciones menos frecuentes son urticaria, infección o dermatitis de contacto <sup>(122)</sup>.

Por otra parte, puede presentarse dolor durante la iluminación del área a tratar. Algunos pacientes pueden experimentar igualmente ardor, escozor o prurito en esta zona tras el tratamiento, con una duración máxima aproximada de un día. El dolor suele ser proporcional a la extensión de la superficie tratada.

Este dolor puede minimizarse de diferentes maneras <sup>(122)</sup>:

- Informando al paciente
- Paracetamol 1g antes de la exposición
- Infiltración subcutánea de anestesia sin adrenalina
- Bloqueo nervioso.
- Agua vaporizada durante la iluminación
- Reducción de la energía de la luz
- Pausas durante la iluminación.

## **B. OBJETIVOS**

La TFD se ha erigido como una de las terapias claves para el tratamiento de CCNM, más específicamente de CB y QA. Esta terapia no sólo tiene buenas tasas de respuesta con escasos efectos adversos, sino también excelentes resultados cosméticos.

Desde el punto de vista oncológico, el hecho de ser aplicada sobre todo un campo de cancerización y no individualmente en las lesiones de QA hace que, además de su acción curativa, tenga un interesante potencial preventivo. Este efecto sería fundamentalmente debido a su acción sobre áreas de piel con daño genético o molecular secundario a UV, que pueden estar presentes en piel clínicamente sana y que prevendría la aparición posterior de QA y por tanto de CE. En poblaciones con mayor riesgo de desarrollar CCNM, como los pacientes transplantados o albinos, esta aplicación tendría un especial interés.

De acuerdo con lo anterior, el objetivo general del proyecto consiste en identificar en lesiones cutáneas de tipo QA marcadores específicos del daño actínico, y determinar si esta terapia modifica su expresión. Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar histológicamente biopsias tomadas de pacientes afectados de QA, antes y después del tratamiento con TFD, con el fin de **describir los cambios celulares y estructurales** que tienen lugar en la piel tras el tratamiento.
2. Estudiar mediante inmunohistoquímica y western blot la **expresión de proteínas implicadas en carcinogénesis** sobre las muestras pre y postratamiento, con el fin de caracterizar el efecto de la TFD sobre estos marcadores.
3. Analizar mediante la técnica de microarrays la **variación de la expresión génica** en forma de RNA, extraído de biopsias de QA antes y después del tratamiento con el fin de avanzar en el conocimiento de **mecanismos moleculares** implicados en el efecto preventivo de la TFD.

## **C. MATERIAL Y MÉTODOS**

## C.1. Selección de pacientes

---

El estudio que se ha llevado a cabo ha sido aprobado por el Comité Ético del Hospital Ramón y Cajal (CEIC RyC, Acta nº 173).

Se seleccionaron aleatoriamente en las consultas de nuestro centro 22 pacientes con lesiones cutáneas compatibles con queratosis actínicas que tuvieran indicación de terapia fotodinámica. Se establecieron los siguientes criterios de exclusión:

- Alergia al ALA o derivados
- Inmunosupresión
- Tratamiento previo de las lesiones en los 6 meses previos mediante TFD, crioterapia, - 5-fluoruracilo, imiquimod tópico o cirugía.
- Radioterapia previa
- Porfiria
- Lupus eritematoso
- Embarazadas y lactantes
- Tratamiento previo con medicación fotosensibilizante

Los pacientes fueron informados debidamente del procedimiento que iba a llevarse a cabo, así como de los efectos adversos del tratamiento. Firmaron igualmente dos documentos de consentimiento informado: uno de consentimiento al tratamiento en sí, y otro de participación en un estudio de investigación (ver anexos 1 y 2).

## C.2. Obtención de biopsias

---

Se realizó biopsia cutánea en todos los casos antes del tratamiento con TFD y 6 semanas después del mismo.

Para la obtención de las biopsias se utilizó anestesia local con mepivacaína al 2%. En cada ocasión se tomaron dos muestras; una, mediante un punch de 4mm y la otra con uno de 2mm (Stiefel®). El defecto se cerró en todos los casos utilizando suturas de 4 ceros.

La muestra de 4mm se conservó en formol para procesamiento histopatológico convencional, mientras que la muestra de 2mm fue congelada inmediatamente tras la toma en nitrógeno líquido y posteriormente conservada a una temperatura de -80°C para los estudios moleculares.

Las heridas de los pacientes fueron curadas con povidona yodada cada 12h durante una semana. A los 7 días fueron retirados los puntos.

La biopsia inicial y final de cada paciente se obtuvieron de la misma zona.

### C.3. Estudio histoquímica

#### C.3.1. Procesamiento

Tras la recepción y fichado, las biopsias se tallaron con una cuchilla fina nueva para evitar perder capa córnea. Se procesaron y se incluyeron en bloques de parafina por personal técnico cualificado, que también realizó cortes de todos los bloques y tinción con hematoxilina eosina (HE) según la técnica habitual. También se realizó en todas ellas, la técnica de orceína para fibras elásticas y diversas técnicas inmunohistoquímicas que se detallarán posteriormente.

#### C.3.2. Valoración de las preparaciones

##### C.3.2.1. Grado de displasia

La displasia queratinocítica basal fue valorada mediante una escala de 0 a +++, de acuerdo a la tabla 4.

Epidermis normal	0
Displasia ligera	+
Displasia moderada	++
Displasia severa	+++

Tabla 4: Grados de displasia.

##### C.3.2.2. Elastosis

La elastosis fue valorada en las muestras teñidas mediante orceína.

Las observaciones y fotografías fueron realizadas utilizando un microscopio de Olympus BX61 acoplado a una cámara de captura digital Olympus DP50. Las imágenes fueron procesadas con el programa Photoshop CS2 version 9.0 (Adobe®). La medición se efectuó desde la membrana basal de la epidermis hasta la parte más profunda de la zona de elastosis utilizando la barra de escala acoplada al microscopio (Fig. 19). El grosor del área de elastosis fue medido en micras.

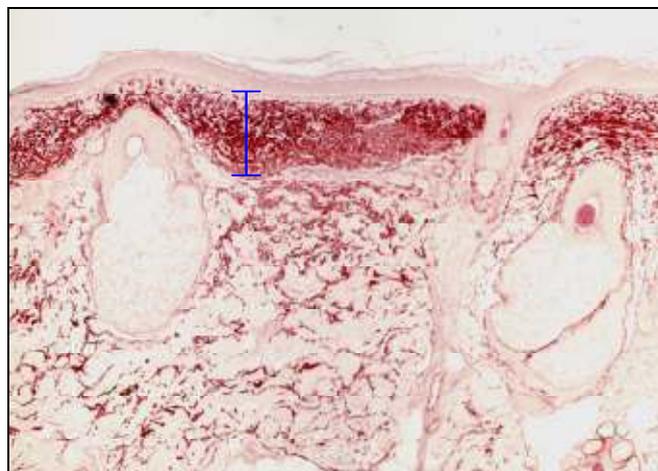


Figura 19. Método de medición del grosor de elastosis en cortes teñidos con orceína

## C.4. Estudio inmunohistoquímico

### C.4.1. Procesamiento

La técnica inmunohistoquímica (IHQ) empleada fue estreptavidina-biotina con la pauta que se describe en la tabla 5.

- 1.- Desparafinar los cortes de 3 micras.
- 2.- Hidratar (lavar en agua corriente).
- 3.- Digestión: Tripsina o pepsina según anticuerpo primario a 37% (Tripsina al 0,1% en CaCl<sub>2</sub> al 0,1%. 15min; Pepsina al 0,4% en HCl al 0,01% 22min).
- 4.- Lavar en agua destilada tibia.
- 5.- Bloqueante "caseína" (30min): Leche en polvo Molico al 5%.; Triton X-100 (SIGMA) al 0,2%.
- 6.- Varios lavados en agua destilada.
- 7.- Lavado en Buffer Tris 3min.
- 8.- Anticuerpo primario específico 30-45min (en cámara húmeda).
- 9.- Dos o tres lavados en Buffer Tris 6min.
- 10.- Anticuerpo secundario biotinado polivalente 30min. (DAKO, Multilink, Código E.453).
- 11.- Dos o tres lavados en Buffer Tris 6min.
- 12.- Estreptavidina-Biotina, 30min.(DAKO).
- 13.- Dos o tres lavados en Buffer Tris, 6min.
- 14.- Revelador (Diaminobenzidina de SIGMA), +/- 10min.
- 15.- Lavar en agua destilada.
- 16.- Contrastar con Hematoxilina acuosa, 1 ó 2min.
- 17.- Montar en medio acuoso (AQUATEX MERCK).

**Tabla 5.** Pauta de realización de la IHQ.

Para este estudio inmunohistoquímico se usaron anticuerpos monoclonales comercializados tanto de ratón (ki-67 y p53) como de conejo (ciclinaD1 y COX-2). De esta forma, los resultados pueden ser fácilmente homologados y contrastados.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	CLON	DILUCIÓN	Anticuerpo monoclonal	RECUPERACIÓN
ki - 67	Dako Cytomation	MIB-1	1 / 50	ratón	CITRATO pH 6
p-53	Dako Cytomation	DO - 7	1 / 50	ratón	CITRATO pH 6
Ciclina D1	LAB VISION	SP 4	1 / 50	conejo	EDTA pH 8
COX-2	Cayman	CX-222	1/50	conejo	CITRATO pH 6

**Tabla 6.** Anticuerpos monoclonales usados para inmunohistoquímica en el trabajo de investigación.

### C.4.2. Valoración de las preparaciones

Las muestras fueron evaluadas de forma ciega por dos observadores independientes. Éstos otorgaron a cada preparación una valoración de 0 a 3 en función de la intensidad y extensión de la inmunoexpresión, de acuerdo con la tabla 7.

Valor/ intensidad	ki-67	p53	Ciclina D1	COX-2
<b>Localización</b>	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Citoplasma
<b>Patrón</b>	Mitad inferior de la epidermis	Parcheado/clusters	Mitad inferior de la epidermis	Capa basal/parcheado
<b>0</b>	Ausencia de inmunorreactividad	Ausencia de inmunorreactividad	Ausencia de inmunorreactividad	Ausencia de inmunorreactividad
<b>1</b>	>0-33% de núcleos en zona <u>basal</u> positivos	>0-33% de núcleos positivos	>0-33% de núcleos positivos	>0-33% de queratinocitos marcados
<b>2</b>	33-66% de núcleos en zona <u>basal</u> positivos	33-66% de núcleos positivos	33-66% de núcleos positivos	33-66% de queratinocitos marcados
<b>3</b>	66%-100% de núcleos en zona <u>basal</u> positivos	66%-100% de núcleos positivos	66%-100% de núcleos positivos	66%-100% de queratinocitos marcados

**Tabla 7.** Valoración de la inmunexpresión en las muestras estudiadas.

Se realizó un test de concordancia entre los dos observadores, obteniéndose un índice kappa *casi perfecto* en todas las observaciones (ver apartado C.8.) (tablas 8-15).

		ki-67 Obs. 2			Total
		1	2	3	
ki-67 Obs. 1	1	3	0	0	3
	2	0	3	0	3
	3	0	4	12	16
Total		3	7	12	22

**Tabla 8.** Tabla de contingencia interobservador para ki-67.

Observación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Error estándar	z	Prob-<z
ki-67	95,45%	73,45%	<b>0,8288</b>	0,2066	4,01	0,0000

**Tabla 9.** Test de concordancia en ki-67.

		p53 Obs.2			Total
		1	2	3	
p53 Obs. 1	1	6	0	0	6
	2	0	4	0	4
	3	0	2	10	12
Total		6	6	10	22

**Tabla 10.** Tabla de contingencia interobservador para p53.

Observación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Error estándar	z	Prob-<z
p53	97,73%	63,84%	<b>0,9371</b>	0,2119	4,42	0,0000

**Tabla 11.** Test de concordancia en p53.

		Ciclina D1 Obs.2				Total
		0	1	2	3	
Ciclina D1 Obs.1	0	5	0	0	0	5
	1	0	4	1	0	5
	2	0	0	2	0	2
	3	0	0	0	10	10
Total		5	4	3	10	22

**Tabla 12.** Tabla de contingencia interobservador para ciclina D1.

Observación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Error estándar	z	Prob-<z
Ciclina D1	99,49%	66,07%	<b>0,9851</b>	0,2130	4,62	0,0000

**Tabla 13.** Test de concordancia en ciclina D1.

		COX-2 Obs.2			Total
		1	2	3	
COX-2 Obs. 1	1	8	2	0	10
	2	0	8	0	8
	3	0	2	2	4
Total		8	12	2	22

**Tabla 14.** Tabla de contingencia interobservador para COX-2.

Observación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Error estándar	z	Prob-<z
COX-2	95,45%	76,45%	<b>0,80701</b>	0,2092	3,86	0,0001

**Tabla 15.** Test de concordancia en COX-2.

## C.5. Western blot

La extracción de proteínas de las biopsias de piel se realizó utilizando TriPure™ Isolation Reagent (Roche), una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina que permite aislar RNA, DNA y proteínas totales de una misma muestra en un único paso por separación de fases. Para ello, el tejido (entre 50 y 100 mg de muestra) fue disgregado con ayuda de un bisturí y homogeneizado en 1 ml de la solución TriPure mediante un homogeneizador Polytron (PT 1200 E, Kinematica). Mediante la adición de cloroformo (Merck) y la posterior centrifugación a 12000 r.p.m, se obtuvieron tres fases: una fase superior incolora, de la que se aisló el RNA; una interfase de la que se aisló el DNA; y una fase orgánica inferior a partir de la cual se aislaron las proteínas.

Para separar las fases, se añadió cloroformo (Merck) al homogeneizado y, tras su centrifugación, se procedió al aislamiento de las proteínas a partir de la fase orgánica inferior. Para ello, se añadió etanol absoluto (Panreac), se centrifugó, se añadió isopropanol (Merck) al sobrenadante y, finalmente, se volvió a centrifugar con el fin de precipitar las proteínas. El precipitado se lavó con hidrócloruro de guanidina (Sigma) 0,3 M en etanol al 95% y con etanol absoluto. Finalmente, el precipitado se resuspendió en SDS (Sodio Dodecilo Sulfato, Panreac) 1% en agua.

La concentración de proteínas de los extractos obtenidos de cada una de las muestras fue determinada mediante el método de cuantificación colorimétrico basado en el ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit, Pierce).

A continuación se procedió a la realización de 2 “pools”, cada uno formado por 5 $\mu$ L de cada uno de los extractos de las muestras pretratamiento por un lado, y postratamiento por otro. Los extractos después se diluyeron en tampón Laemmli (BioRad) y las electroforesis se realizaron en geles de acrilamida al 7,5, 10 y 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), con un soporte “Miniprotean” (BioRad). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de Immobilon-P (Millipore). Las membranas se bloquearon en PBS-Tween al 0,1% con leche desnatada al 5% durante toda la noche y a 4°C. Después se incubaron con los anticuerpos primarios para ciclina D1 y COX-2 (tabla 16) diluidos en la misma solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente, se lavaron con Tween al 0,1% en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, durante 1 h a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham) y las bandas correspondientes a las diferentes proteínas fueron digitalizadas utilizando el programa Photoshop CS2, versión 9.0.2 (Adobe), obteniéndose los diagramas de barras correspondientes.

		CASA COMERCIAL	CLON	DILUCIÓN	ORIGEN
Anticuerpos primarios	Ciclina D1	LAB VISION	SP 4	1/200	conejo
	COX-2	Cayman	CX-222	1/100	conejo
Anticuerpo secundario	Anti-rabbit IgG - HRP	Amersham	-	1/1000	asno

Tabla 16. Anticuerpos monoclonales usados para western blot en el trabajo de investigación.

## C.6. Arrays de expresión génica

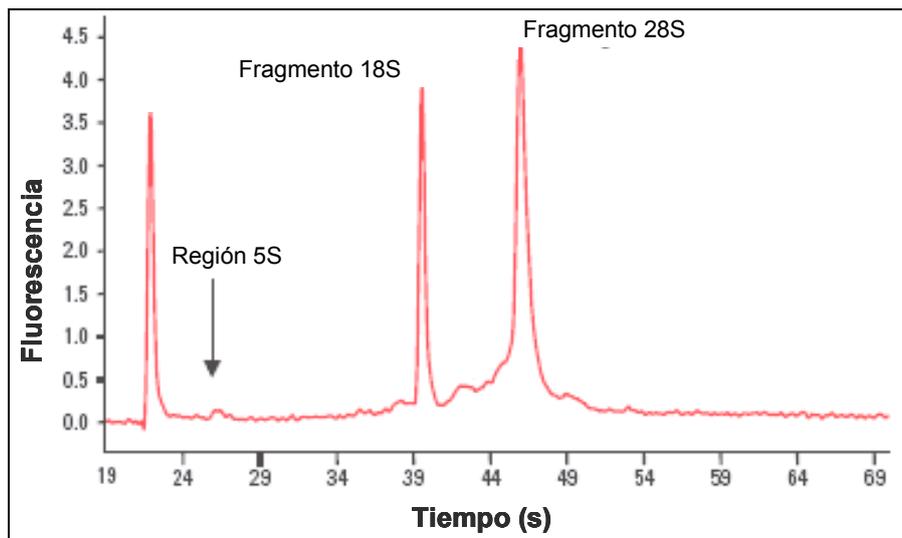
La extracción de RNA de las muestras de tejido, conservado hasta ese momento a -80°C, también se realizó utilizando TriPure™ Isolation Reagent (Roche).

El aislamiento y purificación del RNA de cada una de las muestras a partir de la fase superior incolora, se llevó a cabo mediante un kit específico: RNeasy® Mini Kit 50 (Qiagen). El protocolo de aislamiento se realizó siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial del producto.

La ausencia de contaminación con DNA genómico se aseguró mediante el tratamiento con DNasa durante el proceso de extracción. Mediante espectrofotometría (Nanodrop ND1000, Nanodrop Technologies) se determinó la concentración del RNA y también su pureza (ratio  $A_{260}:A_{280} \geq 1,8$ ). Además, para asegurar la buena calidad del ácido nucléico extraído, se comprobó la presencia de las dos bandas de RNA ribosómico de 28S y 18S, bien definidas, con ratio 2:1, mediante geles de agarosa con formaldehído en los que se cargaron las muestras previamente diluidas en tampón de carga con azul de bromofenol y bromuro de etidio. Para verificar la presencia de las bandas de

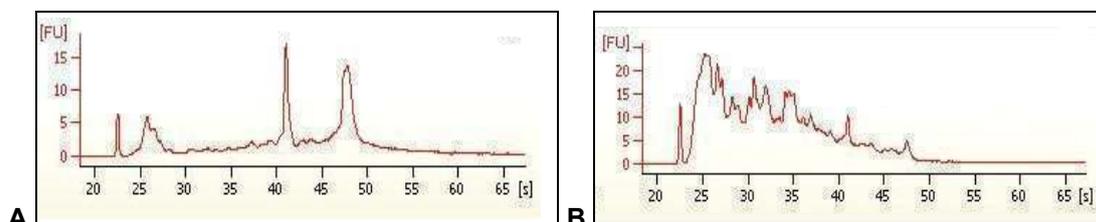
RNA ribosómico, se observó la fluorescencia del bromuro de etidio gracias a un transiluminador de luz UVB.

La integridad del RNA es un factor fundamental en el análisis de expresión génica. Mediante el bioanalizador de Agilent 2100 se cuantificó el estado del RNA aislado de las biopsias de los pacientes. Las muestras de RNAs se separaron mediante electroforesis de agarosa y, utilizando un software específico, se obtuvo un resultado cualitativo y cuantitativo reflejado en los correspondientes electroferogramas (perfiles de picos) que recogen los elementos importantes en estos análisis: 5S, 18S y 28S RNAs (Fig. 20).



**Figura 20.** Electroferograma que detalla las regiones indicativas de la calidad del RNA.

Estos perfiles nos indicaron no sólo la concentración de RNA total de cada muestra, sino también la integridad de los RNA ribosomales de 18S (subunidad menor del ribosoma, 40S) y de 5S y 28S (subunidad mayor del ribosoma, 60S). La relación 18S/28S es utilizada para caracterizar el estado del RNA de la muestra y se expresa como el RIN (número de integridad del RNA, *RNA integrity number*). El RIN varía desde 0 a 10, correspondiendo el valor de 1 al de un RNA degradado y el de 10 al de un RNA integro <sup>(124)</sup>. Se muestra a continuación un ejemplo de RIN de buena calidad y otro de mala (Fig. 21).



**Figura 21.** **A:** ejemplo de muestra de alta calidad de RNA (RIN=8). **B:** ejemplo de muestra con baja calidad de RNA (RIN=2,7)

Los valores correspondientes a las distintas muestras de RNA fueron calculados a partir de los electroferogramas. Para los estudios de arrays de expresión, sólo se

seleccionaron muestras de pacientes con valores de RIN superiores a 7 a fin de asegurar la fiabilidad de los resultados. La obtención de los RIN así como los arrays de expresión fueron llevados a cabo por la empresa Nimgenetics (Madrid, España) siguiendo los protocolos indicados por la casa Agilent.

En los cuatro casos seleccionados, con valor de RIN superior a 7 (4 casos pretratamiento y 4 postratamiento), (ver apartado de resultados), se prepararon cRNAs para ser hibridados en la plataforma de expresión Agilent Whole Human Genome Microarray 44k, usando el sistema de marcaje de un color siguiendo las instrucciones del fabricante. Los microarrays de expresión indicados representan, con sus aproximadamente 44000 sondas de 60 oligonucleótidos, a más de 41000 secuencias correspondientes a genes y transcritos de humano.

El análisis de los datos del microarray se realizó mediante el software GeneSpring de Agilent Technologies.

## C.7. Tratamiento

---

Todos los pacientes recibieron una sesión de terapia fotodinámica para el tratamiento de sus QA, conforme al protocolo del hospital.

Los pacientes con lesiones hiperqueratósicas realizaron tratamiento con vaselina salicilica al 10% los días previos al tratamiento con TFD. Igualmente, aquellas áreas persistentemente hiperqueratósicas o costrosas fueron eliminadas mediante curetaje antes de iniciar el tratamiento.

Se limpió la superficie cutánea a tratar con suero fisiológico, secándose después con una gasa seca. A continuación, se aplicó la crema de MAL (160 mg/g, Metvix®, Galderma) uniformemente por toda la superficie a tratar. La zona se ocluyó con un apósito plástico (Tegaderm®) y otro opaco sobre el mismo durante 3h.

Tras la incubación del MAL, los apósitos fueron retirados, eliminando el exceso de crema de la superficie a tratar mediante suero salino 0,9% y una gasa. Para la irradiación se utilizó la lámpara Aktilite® la cual emite luz roja, durante 7min ( $37 \text{ J/cm}^2$ ).

Con el fin de paliar el dolor derivado de la irradiación se utilizó agua vaporizada en todos los casos. En un paciente fue necesario realizar un bloqueo bilateral de los nervios supratrocleares con lidocaína al 1%.

Los pacientes fueron revisados a las 6 semanas y a los 3 meses. Aquellos en los que persistieran QA en la biopsia postratamiento, recibieron un nuevo ciclo de TFD.

## C.8. Estadística

---

La evaluación de la concordancia interobservador se realizó mediante el *índice de kappa con suma bicuadrados de Cohen*. Este estadístico tiene en cuenta la

concordancia que es esperada por azar y se la resta a la obtenida entre los observadores. El grado de concordancia se clasifica según la siguiente tabla:

$\kappa$	Interpretación
<0	Sin acuerdo
0,0-0,20	Ligero acuerdo
0,21-0,40	Acuerdo justo
0,41-0,60	Acuerdo moderado
0,61-0,80	Acuerdo sustancial
0,81-1,00	Acuerdo casi perfecto

**Tabla 17.** Grados de concordancia según el índice kappa con suma bicuadrados de Cohen

La comparación entre los diferentes parámetros de la muestra pretratamiento y la postratamiento (valoración de displasia e IHQ) se hizo utilizando el *test de Wilcoxon*, dado que se trataban de variables ordinales.

Se trata de un test no paramétrico para muestras apareadas, el cual valora rangos y cuantifica el número de casos en que la expresión, aumenta, permanece estable o disminuye. De esta manera evalúa si la tendencia predominante es estadísticamente significativa.

En el caso de la elastosis, que fue cuantificada en micras, se utilizó el *test T de Student* para comparación de dos medias, ya que se trataba de una variable continua.

Para determinar la significación estadística, en el caso de los microarrays, entre las muestras cutáneas pretratamiento y postratamiento, se utilizó el test T de Student para datos emparejados con la corrección para comparaciones múltiples de Benjamin-Hochberg y la FDR (*False Discovery Rate*), tomándose un valor de  $FDR < 0,1$  como significativo. Además, sólo se aceptaron aquellas sondas con una diferencia del Fold-Change (cambio en expresión génica) del doble, sea aumento de expresión o disminución de la misma, para caracterizar un gen como regulado diferencialmente.

## **D. RESULTADOS**

## D.1. Pacientes

Las características de los pacientes participantes quedan recogidas en las tablas 18 y 19. De los 22 pacientes estudiados, 3 fueron mujeres y 19 varones con edades comprendidas entre 59 y 90 años (media 74 años). Doce pacientes tenían lesiones en la frente, 11 en el cuero cabelludo, 2 en la mejilla y 1 en el dorso nasal. Algunos tenían lesiones en dos de las localizaciones mencionadas.

La mayoría de los pacientes (14/22) eran fototipo II, seguido del fototipo III (5/22) y I (3/22).

Nueve de los 22 pacientes tenían antecedentes de CCNM, siendo el CB el más frecuente (5/22 pacientes), seguido del CE (3/22 pacientes). Un paciente tenía antecedentes tanto de CE como de CB.

Todos los pacientes completaron el tratamiento y acudieron a la revisión a las 6 semanas como indicado.

CASO	Sexo	EDAD	Fototipo	Antecedentes CCNM	Localización
1	M	84	II	CB	Raíz nasal
2	H	88	III	CB	Frente
3	H	73	II	CB	Cuero cabelludo Frente
4	H	64	II	No	Cuero cabelludo
5	H	No registrada	II	No	Cuero cabelludo
6	H	69	II	Sí	Cuero cabelludo Frente
7	H	73	I	CE	Cuero cabelludo
8	M	90	I	CE	Frente
9	H	63	II	No	Mejilla izquierda
10	H	69	II	No	Cuero cabelludo
11	H	76	II	No	Cuero cabelludo
12	M	72	II	No	Frente
13	H	72	II	No	Frente
14	H	59	II	No	Cuero cabelludo Frente
15	H	No registrada	III	CB, CE	Frente
16	H	74	II	No	Cuero cabelludo Frente
17	H	79	III	CB	Sien derecha
18	H	75	I	No	Frente Mejilla izquierda

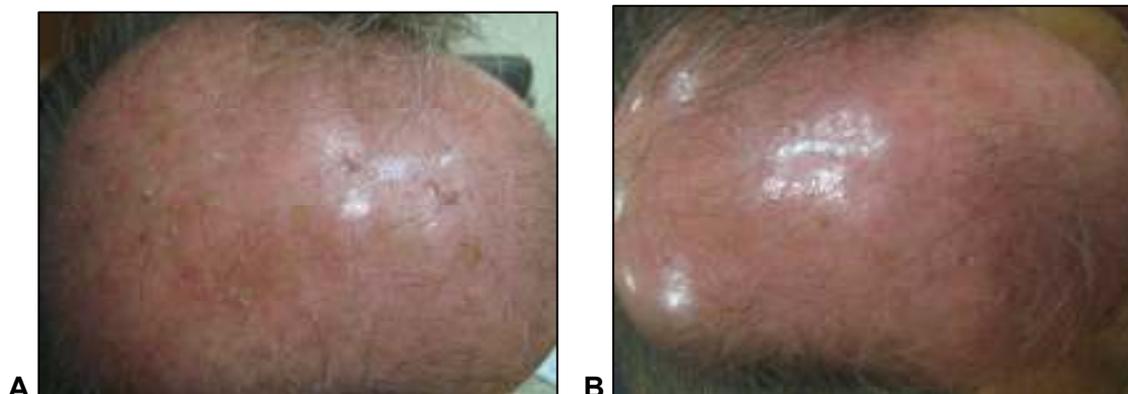
19	H	62	II	CE	Frente Cuero cabelludo
20	H	87	II	CB	Cuero cabelludo
21	H	No registrada	III	No	Frente
22	H	84	III	No	Cuero cabelludo

**Tabla 18.** Características clínicas de los pacientes participantes en el estudio. M: mujer. H: hombre.

Característica	Número de pacientes
Varón:mujer	19:3
Edad media (años)	74 (59-90)
Localización	Frente 12/22 Cuero cabelludo 11/22 Mejilla 2/22 Nariz 1/22
Fototipo	I: 3/22 II: 14/22 III: 5/22
Antecedentes de CCNM	CB: 5/22 CE: 3/22 CE + CB : 1/22
Fotoprotección (por lo menos, en los 5 años previos)	6/22

**Tabla 19.** Distribución de los pacientes de acuerdo a sus características clínicas.

Todos los pacientes presentaron una mejoría clínica de las lesiones, con desaparición de lesiones hiperqueratósicas y descamación del área tratada con TFD (Fig. 22).



**Figura 22. A:** Múltiples QA en cuero cabelludo antes del tratamiento. **B:** Desaparición de las mismas tras el tratamiento con TFD.

## D.2. Resultados histológicos

### D.2.1. Histoquímica

Se analizaron independientemente las muestras pretratamiento y las postratamiento. En todos los casos, las biopsias realizadas antes del tratamiento eran diagnósticas de QA, que se acompañaban de un grado variable de elastosis.

### D.2.1.1. Hematoxilina/eosina

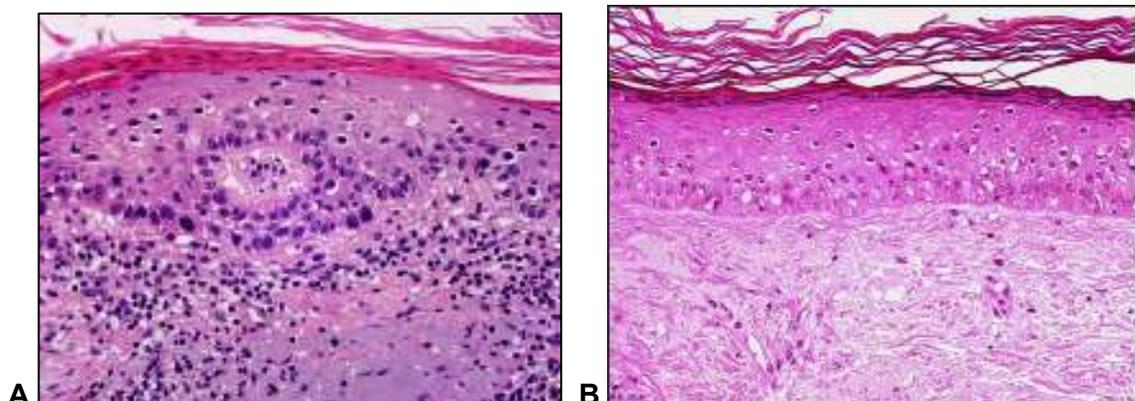
En todos los casos, 6 semanas después del tratamiento con TFD se observó una disminución de la displasia queratinocítica basal, entendiéndose por displasia una pérdida de polaridad de las células, las cuales se verticalizan y una relación núcleo-citoplasma que se mantiene anormalmente aumentada. Igualmente disminuyó la paraqueratosis tras el tratamiento.

En 10 (45%) de los pacientes se observó persistencia de displasia en la capa basal, mientras que en 12 (55%) se observó la desaparición completa de dicha displasia, si bien la elastosis actínica persistía en grado variable.

Caso	Displasia pretratamiento	Displasia postratamiento
1	+++	++
2	+++	+
3	+++	+
4	+++	+
5	+++	+
6	+++	+
7	+++	+
8	+++	+
9	+++	+
10	+++	+++
11	+++	0
12	+++	0
13	+++	0
14	+++	0
15	+++	0
16	+++	0
17	+++	0
18	+++	0
19	+++	0
20	+++	0
21	+++	0
22	+++	0

**Tabla 20.** Evolución de la displasia tras TFD.

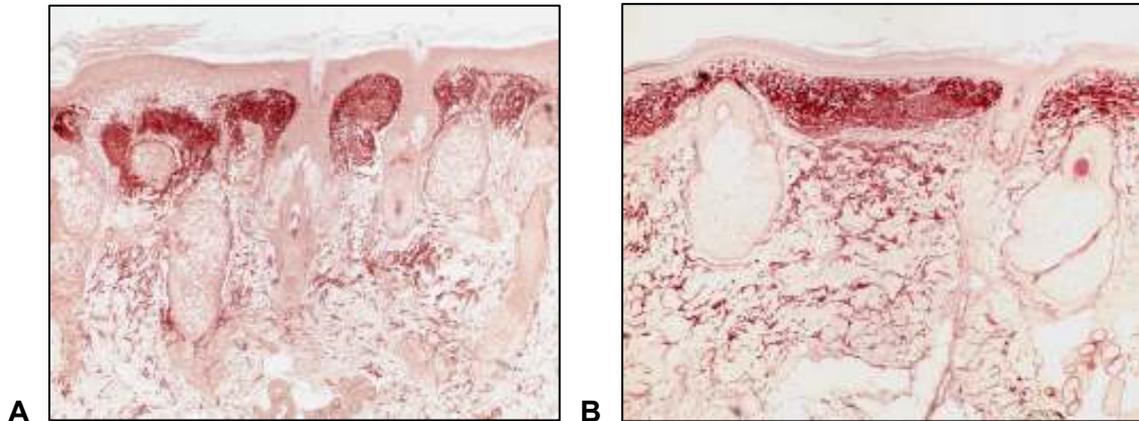
La reducción en la displasia fue estadísticamente significativa con un valor  $p < 0,0001$ .



**Figura 23. A:** Hematoxilina eosina antes del tratamiento Displasia queratinocítica basal, paraqueratosis y desorganización arquitectural. Se observa elastosis en dermis reticular superficial, que se acompaña de discreto infiltrado linfohistiocitario. **B:** Misma tinción tras el tratamiento: piel normal.

### D.2.1.2. Determinación de la elastosis mediante orceína

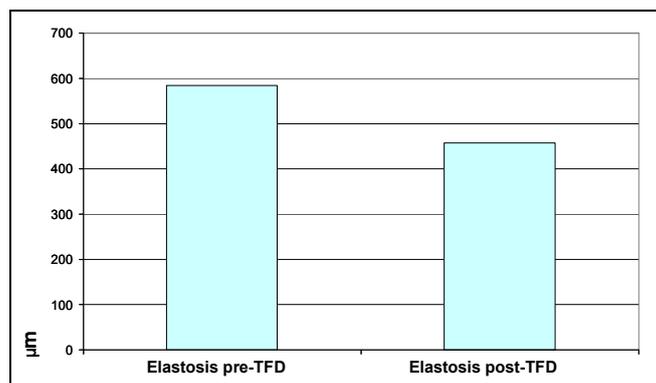
El grosor del área de elastosis se redujo significativamente tras el tratamiento ( $p=0,005$ ) (Tabla 21-22 y Fig. 24), habiéndose observado reducción de la misma en 17 de 22 pacientes (82%).



**Figura 24. A:** Tinción de fibras elásticas mediante orceína antes del tratamiento fotodinámico. Elastosis en dermis papilar. **B:** Tinción de de fibras elásticas con orceína tras el tratamiento. Obsérvese la disminución en el grado de elastosis solar

Mediana pretratamiento	Mediana postratamiento	Valor p
585,1 $\mu$ m	458,1 $\mu$ m	$p<0,005$

**Tabla 21.** Medias del grosor del área elastótica. Significación estadística de su variación.



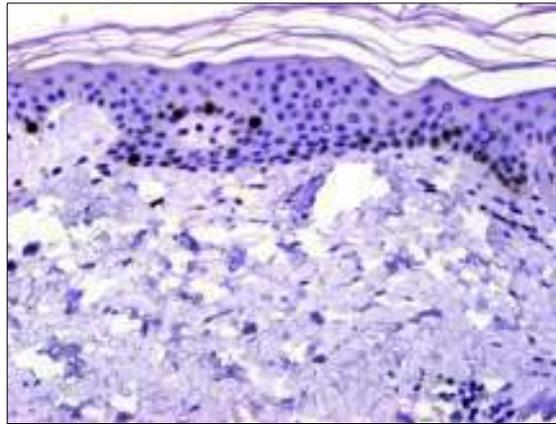
**Tabla 22.** Reducción del grosos del área elastótica tras TFD.

## D.2.2. Inmunohistoquímica

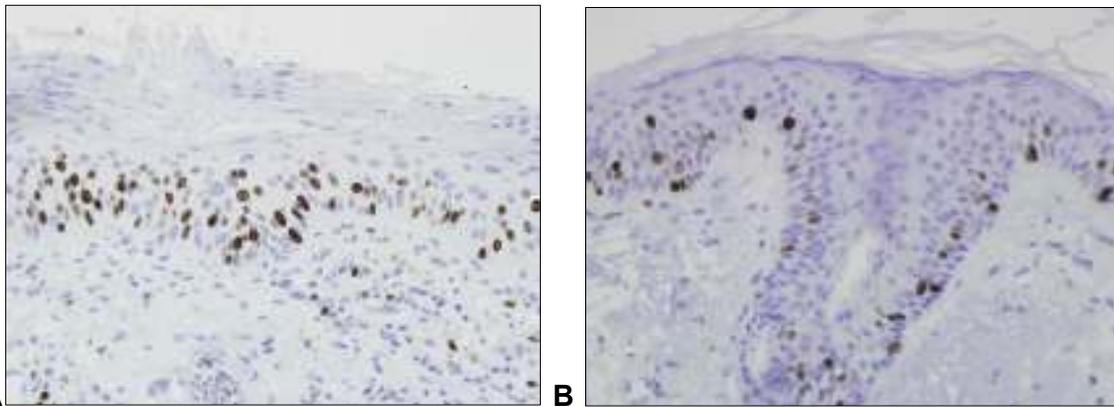
### D.2.2.1. Expresión de ki-67

Dado que la expresión de ki-67 es normal en la epidermis, todas las muestras pretratamiento presentaron positividad para esta proteína. De cualquier modo, su intensidad era mayor en la piel afecta que en la piel sana. En las muestras posteriores al tratamiento se observó una clara disminución en la expresión de ki-67 (Fig. 26), que

fue estadísticamente significativa (Tabla 23-24). La expresión de ki-67 en las muestras postratamiento fue similar a la observada en las muestras control.



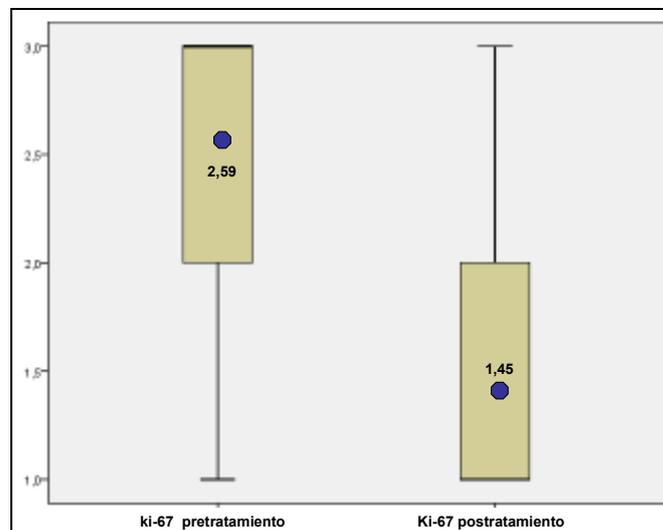
**Figura 25.** Expresión de ki-67 en piel normal.



**Figura 26. A:** Muestra pretratamiento. Positividad de ki-67 en los dos tercios inferiores de la epidermis. El número de núcleos positivos en las QA es mayor que en la piel normal. **B:** Expresión de ki-67 tras el tratamiento con TFD. La expresión es similar a la muestra control.

Mediana pretratamiento	Mediana postratamiento	Valor p
3	1	<b>p&lt;0,0001</b>

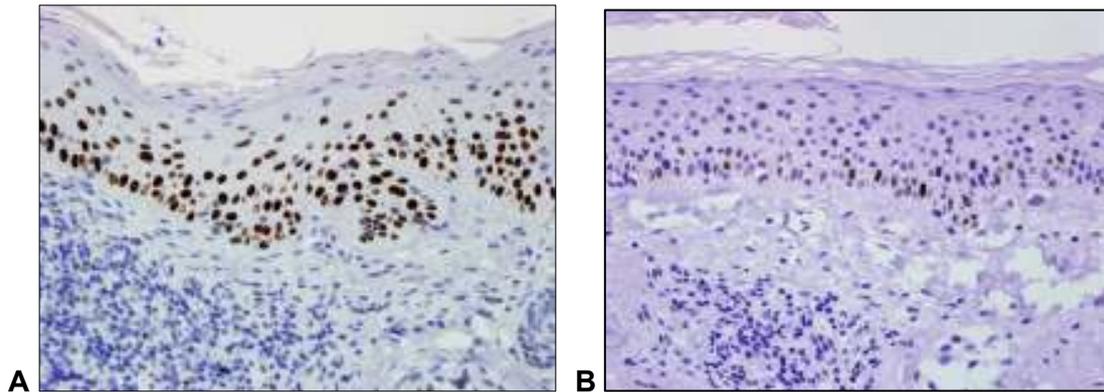
**Tabla 23.** Medianas de la expresión de ki-67. Significación estadística de su variación.



**Tabla 24.** Diagrama de cajas representando la variación en la expresión de ki-67.

**D.2.2.2. Expresión de p53**

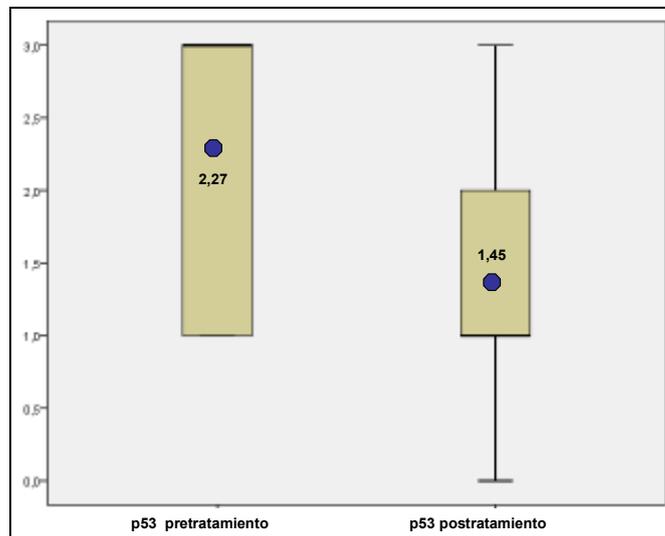
La expresión de p53, que presentó un patrón parcheado y estaba presente en todas las muestras pretratamiento, se redujo de forma significativa tras el tratamiento (Fig. 27). Sin embargo, solamente una de las muestras (5%) se negativizó por completo para esta proteína tras la TFD.



**Figura 27.** **A:** expresión de p53 aumentada en QA antes del tratamiento. **B:** reducción de la expresión de p53, si bien persisten escasa células positivas.

Mediana pretratamiento	Mediana postratamiento	Valor p
3	1	p<0,002

**Tabla 25.** Medianas de la expresión de p53. Significación estadística de su variación.

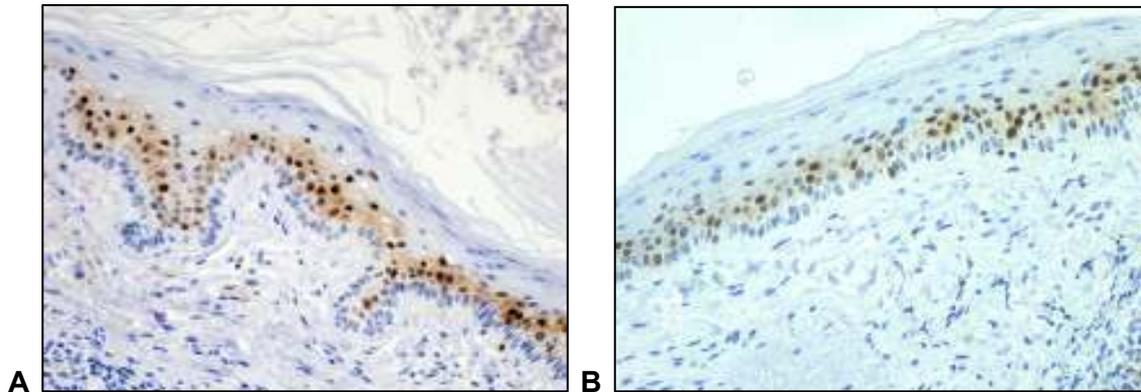


**Tabla 26.** Disminución de la expresión de p53 epidérmica tras TFD. Persistencia de expresión tras el tratamiento.

**D.2.2.3. Expresión de ciclina D1**

Se observó expresión de ciclina D1 en 17/22 (77%) muestras antes del tratamiento, y este porcentaje permaneció estable después de la TFD (Fig. 28). Se observó aumento

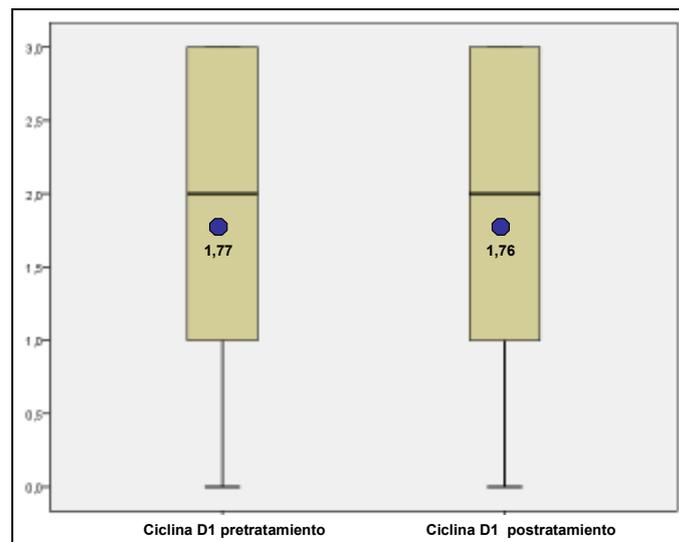
de expresión en 6 casos, disminución en 5 y estabilidad en 11. No se observaron por tanto cambios estadísticamente significativos en su expresión.



**Figura 28.** **A:** expresión de ciclina D1 aumentada en QA antes del tratamiento. **B:** persiste la expresión, la cual es anormal en piel sana, tras el tratamiento.

Mediana pretratamiento	Mediana postratamiento	Valor p
2	2	p<0,783

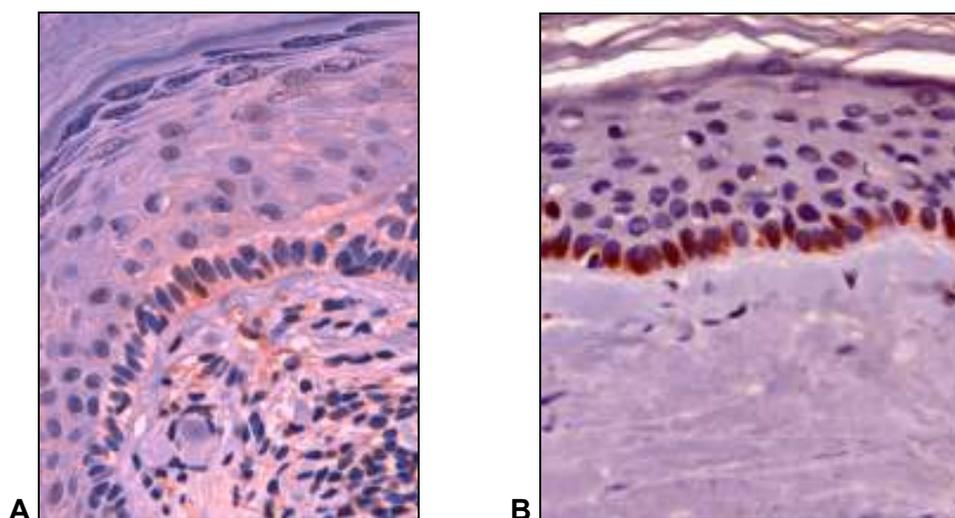
**Tabla 27.** Medianas de la expresión de ciclina D1. Significación estadística de su variación.



**Tabla 28.** Estabilidad en la expresión de ciclina D1 tras el tratamiento con TFD.

#### D.2.2.4. Expresión de COX-2

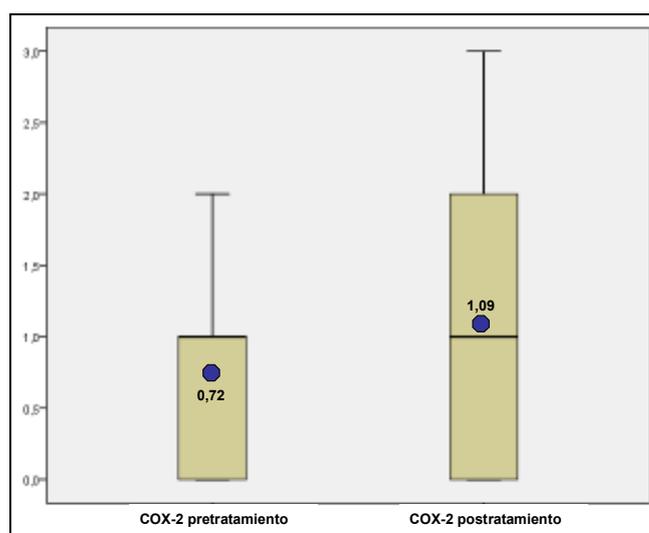
La COX-2 es un enzima citoplasmática que presenta un patrón inmunohistoquímico granulado. Si bien su expresión es escasa y ha de valorarse a gran aumento, se ha observado una expresión predominante en capas basales de la epidermis. La variación de la expresión no resultó estadísticamente significativa, pero se observó una tendencia al aumento en la media (Fig. 29).



**Figura 29.** A: expresión de COX-2 en QA antes del tratamiento. B: persiste y aumenta ligeramente la expresión tras el tratamiento.

Mediana pretratamiento	Mediana postratamiento	Valor p
2	2	$p < 0,101$

**Tabla 29.** Medianas de la expresión de COX-2. Significación estadística de su variación.



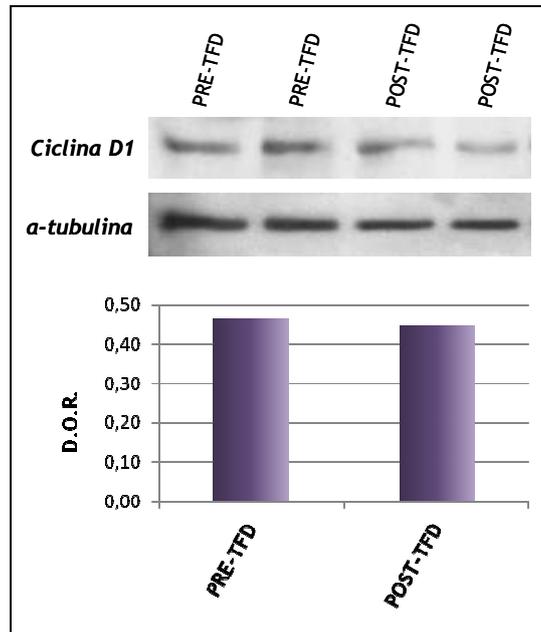
**Tabla 30.** Estabilidad en la expresión de COX-2 tras el tratamiento con TFD. Tendencia al aumento en la media.

### D.3. Western blot

Se realizó western blot para la ciclina D1 y COX-2, dado que en ambos casos no se observaron variaciones estadísticamente significativas en el estudio inmunohistoquímico.

#### D.3.1. Ciclina D1

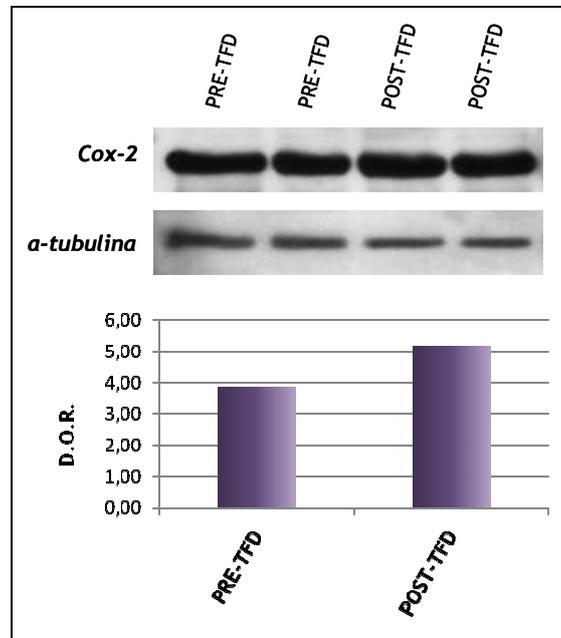
Los resultados obtenidos mostraron que no existen cambios significativos en la expresión de ciclina D1 antes y después del tratamiento. (Fig. 30).



**Figura 30.** Ausencia de variación en la cantidad de proteína ciclina D1 tras el tratamiento de TFD.

### D.3.2. COX-2

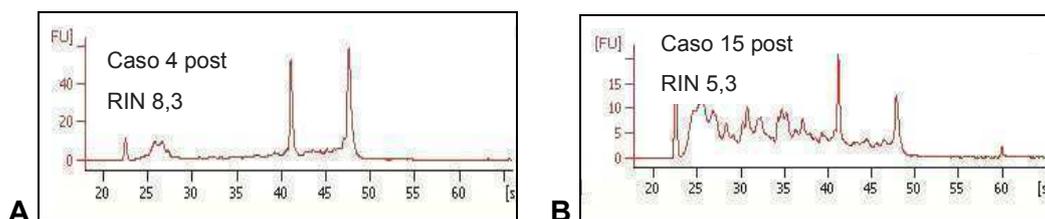
Se observó un aumento en la expresión de proteína en las muestras tomadas después del tratamiento (Fig. 31).



**Figura 31.** Aumento de expresión de proteína COX-2 tras el tratamiento de TFD.

## D.4. Arrays de expresión génica

La tabla 31 muestra los valores de RIN obtenidos de los RNAs aislados de las biopsias de los pacientes, antes y después del tratamiento con TFD. Asimismo, en la figura 32 se recoge el electroferograma de un paciente con RIN superior (caso 4) a 7 en la que se muestra el patrón de picos característico del RNA ribosomal de 5S, 18S y 28S. En la misma figura, se muestra el electroferograma de un paciente (caso 15) con RIN inferior a 7 con escasa definición de los picos observados en el caso anterior debido a la degradación del RNA. De acuerdo a los valores de RIN obtenidos, solamente los valores alrededor de 7 y con electroferograma con buena definición de los picos de RNA 18S y 28S fueron seleccionados para los estudios posteriores de arrays de expresión.



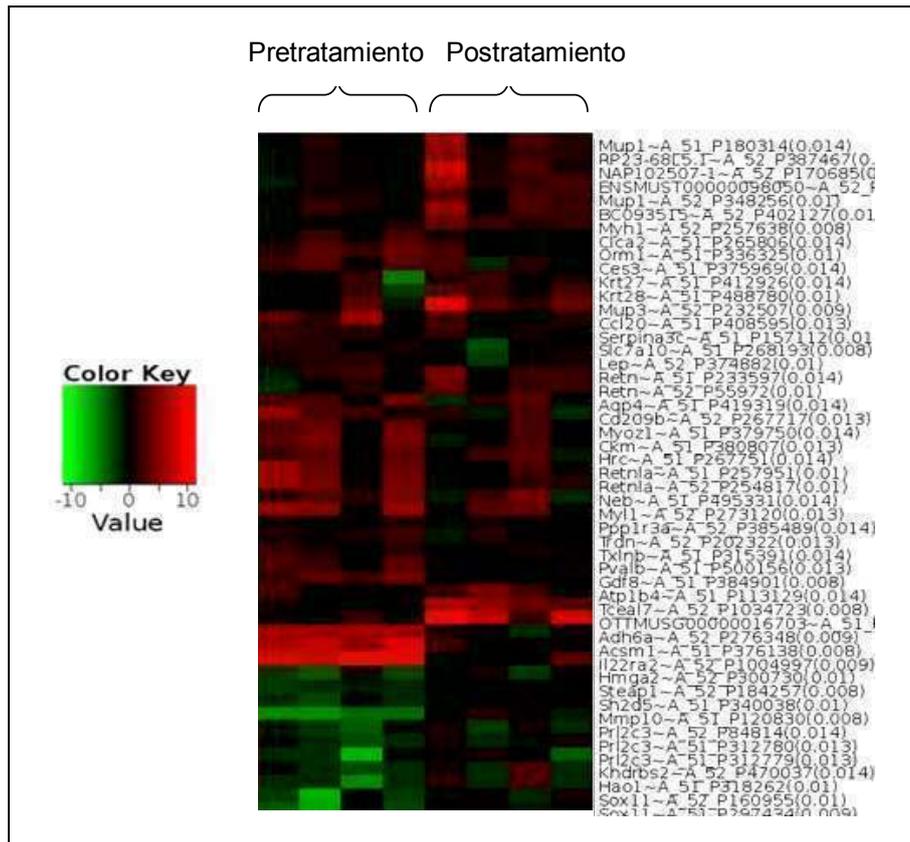
**Figura 32.** A: electroferograma del caso 4, presentando un RIN de buena calidad. B: caso 15, RIN de mala calidad, no apto para microarrays.

CASO	RIN pre	RIN post
1	ND	ND
2	7,50	2,20
3*	>7	>7
4*	7,00	8,30
5	6,90	3,10
6	7,40	2,90
7	7,00	1,00
8	2,60	7,90
9	8,40	7,70
10	8,60	8,70
11	ND	ND

CASO	RIN pre	RIN post
12	7,40	6,60
13	8,10	9,20
14	6,80	8,40
15	2,00	3,70
16	8,00	2,30
17	8,60	6,20
18*	7,70	6,80
19	5,90	6,40
20*	8,70	7,40
21	5,80	8,30
22	7,00	ND

**Tabla 31.** RIN obtenido en las muestras de cada paciente. ND: no determinado. \*Caso seleccionado para microarrays.

En contra de lo esperado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $FDR > 0,1$ ) en el perfil de expresión génica entre las 4 muestras tomadas antes del tratamiento con TFD y aquellas tomadas 6 semanas después del tratamiento (Fig. 33). No obstante, los alrededor de 40000 genes analizados, así como su expresión, aparecen recogidos en el anexo 3.



**Figura 33.** Matriz de expresión génica en que se observa ausencia de diferencias significativas entre las muestras pre-tratamiento y post-tratamiento.

## **E. DISCUSIÓN**

El CCNM es el cáncer más frecuente en el ser humano. Dentro de este grupo, el CE, es el segundo en frecuencia, después del CB, aunque su mortalidad es mayor. La incidencia de CCNM sigue una tendencia creciente. Entre los años 1978-2002 las cifras se doblaron en España tanto en varones como en mujeres, si bien el aumento de incidencia es más marcado en varones <sup>(123)</sup>. Su aparición está directamente vinculada a la exposición solar recibida a lo largo de la vida, aunque puede verse claramente también influida por otros factores como la inmunosupresión o la infección el VPH.

El cáncer de piel es uno de los pocos cánceres en los que la causa más frecuente, además de estar bien definida, es evitable (exposición solar excesiva). Por esta razón, sería esperable que una disminución en la exposición individual a radiación UV evitara el desarrollo posterior de cáncer cutáneo. Un simple cambio de costumbres como el protegerse de la radiación UV puede disminuir el riesgo de cáncer cutáneo. Las prendas de vestir convencionales no protegen completamente. Igualmente, las nubes sólo protegen de la radiación UV en un 20-40%, por lo que es recomendable utilizar fotoprotectores diariamente, independientemente de que se trate de un día soleado o no. Por otro lado, el cristal bloquea la radiación UVB pero permite el paso del 40% de la radiación UVA<sup>(4)</sup>.

Se ha observado, además, la necesidad de protección tanto frente a UVB como UVA, de manera que los fotoprotectores de amplio espectro tienen un mayor efecto a la hora de prevenir tanto el cáncer como sus precursores y el fotoenvejecimiento <sup>(125)</sup>. Esto podría estar relacionado con la prevención del efecto inmunosupresor ejercido por los UVA en la piel <sup>(126)</sup>.

A diferencia del caso del melanoma, parece que los programas de prevención primaria implantados hasta el momento para CCNM, orientados a una reducción en la exposición solar, tienen un efecto positivo en la disminución de la incidencia de CE <sup>(127,128)</sup>.

Es de especial interés la prevención en aquellos subgrupos de población más predispuesta al desarrollo de CCNM, como los pacientes transplantados, y por tanto inmunodeprimidos debido a los fármacos indicados para evitar el rechazo. Estos pacientes presentan QA y CE de forma temprana, y éstos son, además, más agresivos que en personas inmunocompetentes. Parece, por tanto, sensato recomendar el uso diario de fotoprotección en estos pacientes, habiéndose visto que su uso reduce la incidencia de CE <sup>(12)</sup>.

Si bien la estrategia preventiva fundamental debe de ir encaminada a minimizar la exposición solar puede ser interesante una terapia orientada a la prevención secundaria de CCNM, es decir aquella a realizar una vez instaurado el daño actínico. Con este fin se han utilizado tradicionalmente los retinoides, y más recientemente, los AINEs o la TFD.

Los retinoides, derivados de la vitamina A, se sabe que están implicados en la maduración y diferenciación epitelial. El acitretino <sup>(129)</sup>, el etretinato y la isotretinoína se han utilizado con fines preventivos en pacientes con alta tasa de desarrollo de CE, en los cuales el manejo quirúrgico podría ser complicado. A pesar de ello, el mecanismo de acción sigue sin estar claro <sup>(2)</sup> y las pautas de administración óptimas no están bien establecidas. Los efectos adversos de los retinoides a largo plazo también pueden ser un freno para el uso crónico de estos fármacos <sup>(130)</sup>, ya que además de la habitual xerosis cutánea, pueden causar hipertrigliceridemia, alteración de la función hepática teratogénica, desmineralización ósea y cambios hiperostóticos. La adecuación de la terapia, así como un abordaje adecuado de estos efectos secundarios, podría permitir optimizar el tratamiento para la prevención de CCNM <sup>(131)</sup>.

De la misma manera, se ha visto que un tratamiento mantenido con AINEs puede tener cierto efecto preventivo en el desarrollo de CCNM <sup>(132)</sup>, lo cual está en relación con la implicación de la COX-2 en el proceso de carcinogénesis cutánea.

En este contexto, la TFD se erige como un tratamiento con un importante papel preventivo en el campo del CCNM. Existen estudios realizados tanto en modelos murinos como en humanos que apoyan la efectividad de esta terapia en la prevención secundaria.

Los trabajos de prevención en modelo murino se han realizado utilizando el ratón *hairless*, modelo inmunocompetente manipulado genéticamente. Es homocigoto para el gen (*Hr*), un correpresor frecuentemente expresado en mamíferos que en homocigosis origina un primer ciclo de pelo normal, y posterior alopecia de por vida <sup>(133)</sup>. Estos ratones al ser expuestos a radiación UV desarrollan lesiones similares a las QA y CE, pero no CB ni melanoma.

Diferentes estudios utilizando tanto TFD sistémica como tópica han demostrado la efectividad de ésta para retrasar la aparición de lesiones tumorales en ratones *hairless*; todos ellos utilizando ALA y luz azul <sup>(134,117,116)</sup>.

De la misma manera, nuestro grupo ha realizado un trabajo con 70 ratones a los que se dividió en 5 grupos: (i) exposición a UVB, (ii) exposición a UVB y luz roja, (iii) exposición a UVB y MAL, (iv) control (v) exposición a UVB y TFD. Los tres primeros grupos desarrollaron abundantes tumores, que histológicamente fueron CE, mientras que tanto el grupo sometido a TFD experimentó una reducción significativa en el número y tamaño de los tumores desarrollados en relación con los otros grupos.

Se realizaron igualmente arrays de expresión génica donde se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de los ratones control y sometidos a TFD, respecto a aquellos que desarrollaron CE. Es especialmente relevante la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre el perfil de expresión génica de los ratones control y aquellos sometidos a TFD preventiva. Este hallazgo indica que de alguna manera la TFD en este modelo de estudio está consiguiendo

frenar el proceso de carcinogénesis (que tiene lugar en los demás grupos de ratones) inducido por UVB (Zamarron y colaboradores, datos no publicados).

Los genes más significativamente subexpresados en carcinomas respecto a muestras de ratones tratados con TFD preventiva fueron Dnmt3a (DNA metiltransferasa-3) y Prkcb1 (proteína quinasa C beta-1). Por otro lado, los genes más significativamente sobreexpresados fueron Mapk6 (proteína quinasa activada por mitógenos-6) y Ccdn1 (ciclina D1). En relación con los tres primeros genes no se han hallado referencias en la literatura en el campo del CCNM ni la prevención del mismo, sin embargo, la ciclina D1 ha sido más ampliamente estudiada (ver introducción, punto A.2.1.4). En cualquier caso, se están confirmando la sobreexpresión y subexpresión de estos genes en el modelo animal en nuestro laboratorio.

A nivel clínico, diversos autores han realizado trabajos en pacientes trasplantados con el fin de comprobar la efectividad de la TFD. La mayoría de trabajos han objetivado un retraso y una reducción en el número de QA en las áreas tratadas con TFD, en comparación con áreas no tratadas <sup>(121,119,135)</sup>.

Cabe destacar el trabajo publicado por Graaf y colaboradores (2006), en el cual no se observaron diferencias en la aparición de lesiones hiperqueratósicas entre el brazo tratado con TFD en pacientes trasplantados, respecto al contralateral, el cual no recibió tratamiento preventivo. Este trabajo ha sido ampliamente criticado por diferentes motivos metodológicos y terapéuticos.

En primer lugar, el hecho de la cuantificación de lesiones hiperqueratósicas en general, sin discernir entre queratosis seborreicas, verrugas víricas o QA puede introducir un sesgo tipo *composite endpoint* que modifique la evaluación de los resultados. Por otro lado, los autores no realizaron curetaje antes del tratamiento, con lo que la incorporación del fotosensibilizante a las células pudo no ser óptima. Igualmente utilizaron luz azul, que presenta peor penetración que la roja. Del mismo modo, uno o dos tratamientos pueden no ser suficientes para el efecto preventivo.

Parece, por tanto, y a pesar de lo expuesto por Graaf y colaboradores (2006), que la TFD tiene la capacidad de, cuanto menos, retrasar el proceso de carcinogénesis. El mecanismo exacto por el cual esto ocurre no ha sido estudiado hasta el momento. En el presente trabajo se pretenden valorar una serie de marcadores de daño actínico y de carcinogénesis precoz, tanto a nivel histológico como inmunohistoquímico, evaluando su evolución tras el tratamiento con TFD.

En este sentido, además de los signos histológicos de fotoenvejecimiento como la displasia basal y la elastosis, se ha valorado ki-67, como marcador de proliferación epidérmica y p53, ciclina D1 y COX-2, como marcadores precoces de carcinogénesis. Todas estas proteínas están expresadas en piel fotoexpuesta y en QA, siendo su expresión mayor en CE. Sin embargo, ninguna de ellas se expresa en piel sana no fotoexpuesta, con lo que su normalización o la reducción de su expresión, tras una intervención terapéutica, implicarían regresión en el proceso de carcinogénesis

cutáneo. En la tabla 32 se muestran los patrones descritos en la literatura de las proteínas estudiadas.

	Piel normal	Piel fotoexpuesta	QA	CE
p53 <sup>(44)</sup>	-	+	50%	90%
Ciclina D1 <sup>(41)</sup>	-	+	46%	60%
COX-2 <sup>(60,66)</sup>	-	+	83%	91%

**Tabla 32.** Expresión de marcadores de carcinogénesis en piel humana.

## E.1. Hallazgos histológicos

### E.1.1. Hematoxilina/eosina

Como ya ha sido descrito en el apartado de resultados, de modo global tras la TFD se observó en nuestros pacientes una reducción en signos histológicos propios de QA, es decir recuperación de la polaridad de los queratinocitos basales, recuperación del cociente núcleo/citoplasma y un adecuado patrón de maduración queratinocítico.

Estos hallazgos son consistentes con todo lo descrito previamente en la literatura, estando en concordancia con el efecto terapéutico de la TFD y su efectividad en el tratamiento de las QA.

Por otro lado, el hecho de que en 45% (10/22) de los casos, aunque en menor grado, persista cierta displasia indica que un único tratamiento no es suficiente para eliminar estas lesiones por completo en todos los casos. Sería esperable en estos casos que con los subsiguientes tratamientos la histología de la epidermis se normalizara por completo.

Esto, está avalado por varios estudios, que apoyan una mayor efectividad de dos sesiones de TFD frente a una. Pariser y colaboradores (2003) observaron una tasa de respuesta de 38% en una sesión frente a 89% tras la segunda lesión <sup>(139)</sup>. Igualmente Piacquadio y colaboradores (2004) observaron tasas de respuesta de 70% (1 sesión) frente a 88% (2 sesiones) <sup>(113)</sup>. De cualquier modo, estos estudios se han hecho sin confirmación histológica, con lo que la persistencia real (histológica) de las QA podría ser mayor. Por el contrario, Tarstedt y colaboradores (2005) observaron diferencias significativas entre la realización de un tratamiento con TFD y dos únicamente en el caso de las QA gruesas o con mala respuesta. Afirman que en las QA finas los resultados con dos sesiones son similares a un único tratamiento <sup>(112)</sup>.

La objetivación a nivel histológico de que la TFD es capaz de eliminar por completo los signos de QA indica su probable efectividad para revertir los daños epidérmicos ocasionados por el la radiación UV en la epidermis. De este modo, puede utilizarse de un modo preventivo en piel con daño actínico severo así como en pacientes, aunque clínicamente aún no se observen las QA.

### **E.1.2. Orceína**

En el presente trabajo se observó una reducción del depósito de material elastótico degenerado tras el tratamiento fotodinámico, si bien en ningún caso éste desapareció por completo. Este hallazgo se traduciría clínicamente como una disminución de la profundidad y el número de las arrugas cutáneas, sin embargo este parámetro no fue valorado en las fotografías dado que en su gran mayoría se trataba de muestras del cuero cabelludo. En cualquier caso, aunque la utilidad de este efecto de la TFD sea fundamentalmente estético, es igualmente importante dado que la elastosis acompaña casi inevitablemente al proceso de carcinogénesis cutánea por UV y su reversión indicaría de alguna manera el frenado de este proceso.

Estos datos son consistentes con lo ya observado por otros autores utilizando tanto ALA como MAL <sup>(140,141)</sup>. A diferencia de lo realizado por nuestro grupo, en dichos trabajos se aplicó un mínimo de 2 ciclos de terapia fotodinámica. Es probable que, a pesar de haber obtenido resultados estadísticamente significativos con una única sesión de TFD, este efecto esté relacionado con el número de tratamientos y siendo así, se podría alcanzar una desaparición completa del material elastótico degenerado.

### **E.2. Expresión de ki-67**

El ki-67 es un marcador nuclear que se expresa en todas las fases del ciclo celular, salvo en G0. Es, por tanto, un marcador de proliferación celular que se expresa de forma fisiológica en células de la capa basal de la epidermis.

La expresión de ki-67 está aumentada en QA <sup>(44)</sup> indicando una mayor actividad proliferativa que en piel sana no fotoexpuesta. Esta hiperactividad proliferativa en las QA da lugar a un crecimiento desordenado de los queratinocitos que es lo que histológicamente se traduce en la displasia queratinocítica, predominantemente basal.

Tras TFD se observó una reducción en el número de células positivas para ki-67, lo que traduce una disminución de la proliferación queratinocítica.

Este resultado es concordante con los resultados obtenidos en el modelo murino sometido a exposición crónica a luz UV en nuestro laboratorio. Se ha observado que los animales que recibieron tratamiento preventivo con TFD, la expresión de ki-67 es similar a la observada en la piel de ratones del grupo control (Zamarrón y colaboradores, datos no publicados).

La reducción del número de células en proliferación ocasionado por la TFD podría ser causado por dos mecanismos. En primer lugar por un daño no selectivo del área lesional dada la mayor penetración del fotosensibilizante por defectos en el estrato córneo, propios de las QA (hiperqueratosis, orto o paraqueratósica). En este caso, la reacción fotodinámica se daría de forma homogénea en toda la QA, destruyéndola en su conjunto y quedando tejido sano sin hiperactividad proliferativa.

En segundo lugar, en otros tejidos diferentes a la epidermis se ha observado mayor actividad de la vía del grupo Hemo en células con alta tasa proliferativa <sup>(94,91)</sup>, aunque no ha podido ser confirmado en la epidermis <sup>(97)</sup>. En este sentido un aumento en la producción de PpIX en las células con expresión de ki-67, en comparación con el resto de queratinocitos epidérmicos, podría ocasionar la eliminación selectiva de estas células por la TFD.

### **E.3. Expresión de p53**

---

Como ya se ha expuesto en la introducción de este trabajo, p53 no se expresa en piel normal. Sin embargo, su expresión es patente en piel fotoexpuesta, pretumoral y tumoral <sup>(44)</sup>. En la valoración inmunohistoquímica no es posible saber si la sobreexpresión observada es de p53 mutado o nativo <sup>(39)</sup>. De cualquier modo se sabe que la proteína mutada es mucho más estable, y que la funcional, al ser más lábil sería más difícil detectarla por IHQ, por lo que habitualmente se asocia la sobreexpresión a mutación.

El patrón de tinción de p53 en las QA es en pequeños agregados o “clusters”, que representarían los clones de células portadoras de p53 mutado. Estos agregados de células que sobreexpresan p53 (probablemente mutada) van expandiéndose dando origen a las QA, cada una de las cuales se ha originado a partir de una mutación diferente de p53.

En torno al 50% (12-64%) de los CE sobreexpresan p53, mientras que las QA lo expresan en un 26%-50% de los casos <sup>(136,39,137)</sup>. P53 se expresa también en piel normal fotoexpuesta <sup>(44)</sup>.

El patrón de p53 observado en el presente trabajo coincide con lo ya descrito en la literatura: pequeños agregados de células p53-positivas salpicados en la epidermis con QA.

El gen p53 es uno de los genes supresores de tumores más frecuentemente implicado en los cánceres humanos. Su papel en el CCNM está bien definido, siendo su mutación específica de la radiación UVB. Además, puede dañarse indirectamente por medio de mecanismos oxidativos inducidos por UVA. Fisiológicamente tiene la función de detener el ciclo celular para la reparación del DNA. Por otro lado, en el caso de que este mecanismo falle, induce apoptosis con el fin de evitar la perpetuación de la célula portadora del DNA dañado. Si ocurre una mutación en el gen de p53, puede alterarse su función, con lo que esta “vigilancia” del DNA no se lleva a cabo de forma correcta.

Aparentemente la TFD es capaz de eliminar más o menos selectivamente los agregados de células portadoras de mutación en p53. La reducción significativa de su expresión tras TFD en epidermis con daño solar crónico indica la ausencia de p53 disfuncionante, lo cual supone una reversión en el proceso de carcinogénesis.

El mecanismo por el que esto ocurre no está claramente definido. Tradicionalmente se ha postulado que esta selectividad de la TFD por las células malignas o premalignas se debía a algún tipo de activación metabólica, probablemente en la vía del grupo Hemo, que implicaría una mayor producción de PpIX<sup>(90,91,92,93,94)</sup>. Sin embargo, aunque sí se haya visto en otros tejidos, como mama, cérvix o vejiga, esto no ha podido ser demostrado en tejido epidérmico hasta la actualidad<sup>(97)</sup>. De hecho, se ha visto que una mayor producción de PpIX en queratinocitos malignos podría ser debida a los defectos presentes en la capa córnea de este tipo de lesiones, que permitirían un mayor paso del fotosensibilizante y por tanto una mayor cantidad de sustrato que participaría en la vía de síntesis del grupo Hemo, aumentando así también la cantidad de PpIX final.

Al ser la expresión de p53 más frecuente en piel lesional (QA, CE), parece lógico pensar que las células portadoras de la mutación serán más fácilmente destruidas por la reacción fotodinámica.

De todos modos, aunque la disminución de la expresión de p53 es significativa, tan sólo se observó negativización total de este marcador en un caso de 22 (5%). Estos resultados indican que, si bien la TFD ha demostrado ser efectiva para la reducción de este marcador, un único tratamiento no es suficiente para la desaparición de su expresión y por tanto la reversión del daño actínico, entendiendo como indicador del mismo la positividad de p53, no es completa.

Todos estos resultados concuerdan con los obtenidos en el experimento realizado por nuestro grupo en el modelo animal, en el que se observan unos niveles de p53 equiparables entre el grupo de animales control y el grupo sometido a UV+TFD (Zamarron y colaboradores, datos no publicados). En este caso, todos estos ratones sometidos a TFD recibieron un total de 5 sesiones con TFD, lo que sugiere que probablemente en el caso humano con un mayor número de sesiones puedan obtenerse resultados similares y que por tanto los efectos de la TFD son claramente dosis-dependientes.

#### **E.4. Expresión de ciclina D1**

En relación a la expresión de ciclina D1, Bito y colaboradores (1995) observaron que un 46% y un 60% de QA y CE respectivamente expresan ciclina D1, mientras que la expresión es nula en piel normal y queratosis seborreicas<sup>(49)</sup>. Por otro lado, tampoco se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre CE mal y bien diferenciados<sup>(138)</sup> ni entre CE inducidos por UV y por agentes químicos. Por todo esto, aparentemente esta sobreexpresión no es tan específica de UV como el p53, si bien sí se ha observado aumento de la expresión en piel fotoexpuesta<sup>(48)</sup>. La expresión de ciclina D1 predomina en la mitad inferior de la epidermis, coincidiendo con las anomalías citológicas más prominentes<sup>(49)</sup>.

De acuerdo con lo descrito en la literatura, se observó la expresión de ciclina D1 en los 2/3 basales de la epidermis. De cualquier modo, no se pudo observar una reducción en su expresión en las muestras postratamiento. La expresión permaneció estable

tanto en el nivel de expresión, como en el número de casos positivos antes y después del tratamiento. Igualmente, tras realizar western blot no pudieron hallarse diferencias entre las muestras pre y postratamiento.

Dado que en piel sana no fotoexpuesta, similarmente al p53, no debería observarse expresión de ciclina D1 y dado que en otros aspectos se ha observado que la TFD negativiza signos histológicos (displasia) e inmunohistoquímicos (p53) de daño actínico crónico, era esperable que la ciclina D1 se negativizara de igual manera.

Que esto no ocurra, podía deberse una vez más al hecho de que, aunque clínicamente se observe mejoría, una única sesión de TFD no sea suficiente para aclarar los cambios implicados en la carcinogénesis, lo cual estaría en línea con lo observado en el caso de la histología de QA y p53.

Además, la estabilidad de ciclina D1 contrasta con los resultados obtenidos por nuestro grupo en los arrays de RNA del modelo murino, donde las diferencias entre las muestras de los ratones que desarrollaron CE y las de los tratados con TFD preventiva fueron estadísticamente significativas (el gen *Ccdn1*, que se corresponde con ciclina D1 estaba subexpresado) (resultados no publicados). Por eso era esperable observar una reducción en la expresión de la misma (positiva en 67% de los casos) tras TFD, paralelamente a lo observado en ratones.

Sin embargo, dada la implicación de la ciclina D1 en el ciclo celular, su expresión tras el tratamiento podría ser debido a un estado regenerativo de la epidermis tras la terapia fotodinámica, que habría inducido muerte celular de las zonas más patológicas de la epidermis. Para confirmar esto sería interesante evaluar la expresión de este marcador a lo largo de los meses siguientes al tratamiento para valorar si tras un tiempo mayor de 6 semanas (tiempo tras el cual se realizó la biopsia en este estudio) la IHQ se negativiza.

## **E.5. Expresión de COX-2**

---

La COX-2 no se expresa en epidermis normal no fotoexpuesta, si bien puede observarse afectación salpicada en tejido celular subcutáneo y en glándulas sebáceas. Se ha observado expresión de COX-2 en el 83% de las QA y 91% de CE. Igualmente aumenta su expresión en piel fotoexpuesta. Se ha descrito que la positividad se localiza predominantemente en estratos altos de la epidermis <sup>(60)</sup>.

En el presente trabajo se ha observado un predominio de la expresión de COX-2 a nivel de la capa basal de la epidermis, tanto en los casos pretratamiento como en aquellos postratamiento. Este dato contrasta con lo previamente descrito en la literatura, donde se detalla que este enzima predomina en capas altas de la epidermis y que igualmente se observa, de forma salpicada, en las glándulas sebáceas y la dermis <sup>(142,143)</sup>. Los datos e imágenes aportadas en estos trabajos son escasos y de baja calidad. En estas imágenes se observan áreas de tinción marrón homogénea, predominantemente citoplasmática (aunque también con cierta tinción nuclear) que

también fueron observadas en nuestro trabajo. Esta tinción homogénea de las glándulas sebáceas y capas altas de la epidermis se atribuyó a un artefacto de procesamiento de la inmunohistoquímica ya que no era homogéneo en todas las muestras ni entre los diferentes cortes de un mismo cristal.

La expresión de COX-2, sin embargo, se observa claramente en las capas basales, en forma de gránulos, equivalentes a los observados en algunas células inflamatorias (tomadas como control positivo) salpicadas en la dermis que tiene alta expresión de esta proteína.

Por otro lado, al ser la COX-2 una enzima implicada en la carcinogénesis del CCNM, y dado que la TFD ha demostrado a nivel clínico y en modelos murinos la efectividad en prevención del mismo, se valoró la opción de que ésta ejerciera cierto efecto supresor en la actividad de COX-2. Por el contrario, no se observó una reducción significativa de la expresión de este enzima, sino una estabilidad. De este modo, no ha sido posible confirmar que una disminución en la actividad o expresión de COX-2 esté implicada en el efecto preventivo o terapéutico de la TFD.

De cualquier modo, la tendencia de la expresión de COX-2, a diferencia de lo observado en el caso de la ciclina D1, es a aumentar después del tratamiento, estando la *p* obtenida mediante el test de Wilcoxon muy próxima a la significación estadística. Además, puede observarse en el diagrama de cajas que la media de la expresión aumenta tras el tratamiento, lo que indica dicha tendencia. Igualmente, se observó un aumento de expresión de este enzima en el western blot, lo cual apoyaría que efectivamente, parece que el tratamiento con TFD aumenta la expresión de COX-2.

Un aumento de la expresión de COX-2 ya había sido observado previamente mediante microarrays con la utilización de TFD sistémica en células RIF (*radiation induced fibrosarcoma*) murinas, donde se vio que su expresión aumentaba 25 veces<sup>(144)</sup>. Esta sobreexpresión de COX-2 está regulada de forma postranscripcional y mediada por el factor de transcripción NF-κB<sup>(145)</sup>

Probablemente el resultado obtenido no haya sido estadísticamente significativo debido a la escasa variabilidad en la expresión de esta proteína, cuyos cambios fueron muy sutiles. Igualmente, el tiempo transcurrido desde la TFD hasta la toma de la biopsia pueden haber influido en que los cambios observados no sean tan marcados, dado que en la literatura se ha descrito un aumento de expresión en las horas subsiguientes a la aplicación de TFD<sup>(146)</sup>. Por último, el número de pacientes puede haber sido insuficiente para la valoración de esta enzima en concreto.

De cualquier modo, la tendencia al aumento de COX-2 tras TFD es especialmente reseñable dada la clara implicación de COX-2 en tumorigénesis. Este hecho podría indicar cierto efecto nocivo de la TFD sobre las células que están siendo tratadas, favoreciendo mediante su activación la inhibición de la apoptosis, la angiogénesis, la proliferación celular y por todo ello, la carcinogénesis. Se trata de un efecto apenas mencionado de este tratamiento que sin duda ha de tenerse en cuenta.

El hecho de que este efecto activador de COX-2 de la TFD sea negativo para su efecto terapéutico en lesiones cancerosas o precancerosas, se ve apoyado por dos estudios que demuestran que la inhibición selectiva de este enzima, aumenta la actividad de TFD <sup>(147,144)</sup> y que su utilización conjunta puede optimizar los resultados <sup>(148)</sup>.

En cualquier caso, ninguno de estos trabajos ha sido hecho específicamente con MAL-TFD, si bien dado el mecanismo de acción de la TFD, el fotosensibilizante no debería influir en una mayor o menor expresión de COX-2 y consideramos por tanto que nuestros hallazgos son consistentes con lo ya descrito en la literatura.

## **E.6. Arrays de expresión génica**

La tecnología de arrays de DNA o RNA ha aportado importantes datos recientemente sobre carcinogénesis. Sin embargo, existen pocos trabajos, y muy heterogéneos, realizados en el ámbito del CCNM. Van Haren y colaboradores (2009) revisaron todos ellos e intentaron establecer puntos comunes. De este modo, observaron que había muy poco solapamiento entre los hallazgos presentados en los diferentes trabajos. En el caso del CE revisaron 6 trabajos en los cuales había solapamiento y modificación en la misma dirección al menos en dos de los trabajos de 7 genes: KRT15 (queratina 15), WNT5A (codifica para la proteína de señalización Wnt-5a), VEGFC (factor de crecimiento vascular C), MMP1 (metaloproteinasa 1), YY1 (codifica la proteína represora transcripcional del mismo nombre), CDH3 (cadherina 3) y FN1 (fibronectina) <sup>(149)</sup>.

Posteriormente, Padilla y colaboradores (2010) estudiaron las diferencias genéticas entre QA y CE. Encontraron 89 genes que pueden contribuir a la carcinogénesis del CE, viéndose que aquellos genes sobrerregulados en QA y CE están infrarregulados en piel sana, y viceversa <sup>(150)</sup>.

En el presente trabajo se realizaron microarrays de RNA con las biopsias obtenidas de cuatro pacientes. Se pretendía valorar la expresión génica diferencial entre la piel patológica y la ya tratada con TFD. Los resultados esperados podrían explicar y abrir nuevas vías de investigación sobre los mecanismos moleculares de acción de la TFD.

Sin embargo, las diferencias observadas en la expresión génica en ambos casos no fueron estadísticamente significativas, no pudiendo atribuir ningún cambio en concreto al tratamiento con TFD.

Los resultados obtenidos son explicables fundamentalmente por la alta variabilidad génica que existe en los humanos, en comparación con los modelos animales (donde nuestro grupo sí que obtuvo resultados significativos).

Igualmente, el hecho de haber estudiado únicamente cuatro casos, puede haber repercutido en estos resultados. Para la obtención de resultados estadísticamente

significativos, se habría necesitado probablemente una muestra mayor, que por el momento excedía las posibilidades técnicas del equipo. Sin duda, nuevos análisis en esta dirección deben ser llevados a cabo.

## **E.7. Implicaciones de los resultados**

---

Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con otros publicados en la literatura, tanto de carácter básico como clínico y apoyan el papel no sólo terapéutico sino también preventivo de la TFD, el cual es de especial interés en pacientes inmunodeprimidos o con genodermatosis.

Refleja a nivel molecular modificaciones ocasionadas por este tratamiento que son clave a la hora de comprender los mecanismos implicados en el mencionado efecto preventivo. La desaparición histológica de la displasia basal, así como la disminución de la actividad proliferativa epidérmica, medida por ki-67 y la expresión de p53, apuntan a un efecto de reversión de cambios histológicos y genéticos bien descritos y fundamentales en el desarrollo del CE.

Por el contrario, el posible aumento de la expresión de COX-2 indica que la TFD tiene también cierto efecto activador de la cascada de las PGs, específicamente PGE2, la cual tiene un efecto procarcinogénico bien definido. Esto es de especial interés dado que la TFD es un tratamiento dirigido a patología tumoral y estas alteraciones moleculares podrían tener consecuencias no deseables a largo plazo, aún no conocidas. No obstante, estudios adicionales de expresión de esta proteína en el período postratamiento deben ser llevados a cabo, a fin de relacionar su expresión con posibles recidivas.

Por otra parte, queda por definir si la desaparición de los marcadores estudiados, es debida a una selectividad de la TFD (como tradicionalmente se ha postulado) o sólo a un daño grosero de aquellas áreas de piel con un estrato córneo imperfecto, como se postularon Gerritsen y colaboradores <sup>(99)</sup>. El hecho de que exista una relación entre expresión de marcadores de carcinogénesis (y por tanto daño genético inducido por UV) y una mayor producción de PpIX que facilitara la reacción fotodinámica selectiva para las células más “patológicas” sería indudablemente interesante. De cualquier modo, esto no ha podido ser demostrado hasta el momento y son necesarios más trabajos encaminados a confirmarlo.

Por todo esto, la realización de este trabajo permite la apertura de nuevas líneas de investigación en este campo, optimizando factores que han podido limitar este trabajo. Esto permitiría una más precisa explicación de resultados como la estabilidad de ciclina D1, la no diferencia en el patrón de expresión génica o la selectividad de la TFD.

## E.8. Limitaciones del trabajo

---

El presente trabajo puede contar ciertas limitaciones que pueden influir en los resultados. En primer lugar, un mayor número de casos habría aportado una potencia estadística mayor, con lo que algunos de los resultados como los arrays o la expresión de ciclina D1 o COX-2 podrían aportar un mayor grado de conocimiento respecto a lo ya expuesto.

En segundo lugar el trabajo en humanos no es totalmente comparable con otros modelos experimentales, como los modelos *in vitro* o los murinos. Esto hace que exista cierta limitación ética que impide optimizar al máximo lo metodológicamente deseable. Las muestras obtenidas han sido tomadas de acuerdo al protocolo de tratamiento con TFD de nuestro centro y ha sido aprobado por el Comité Ético del Hospital. Un mayor tamaño de las muestras y un mayor número de las mismas (seriadas tras el tratamiento) habría sido deseable para una mayor concreción de los resultados. Sin embargo, este tipo de protocolos son difíciles de llevar a cabo con un número grande de pacientes.

En tercer lugar, el haber realizado dos tratamientos en todos los casos podría haber permitido la obtención de diferencias más significativas, apreciándose mejor los cambios causados por la TFD. Habiéndose descrito clínicamente una mejor respuesta en QA tratadas con 2 sesiones de TFD frente a una, es razonable pensar que las diferencias histológicas y genéticas también habrían sido mayores con esta pauta.

En cuarto lugar, existen limitaciones logísticas que podrían introducir un sesgo de selección. La biopsia pretratamiento se tomó de las lesiones clínicamente más exuberantes, habitualmente más hiperqueratósicas, dentro del campo de cancerización del paciente. Aunque es probable, no está definido que las lesiones más hiperqueratósicas o clínicamente visibles tengan que ser necesariamente las que más daño molecular acumulen. La biopsia postratamiento se tomó en todos los casos de piel adyacente (no más de 1cm de distancia) del área de la biopsia previa. Dado que se trata de áreas muy próximas dentro de un mismo campo de cancerización, es esperable que los cambios moleculares presentes en esta zona antes del tratamiento fueran muy similares a los observados en la biopsia previa, con lo que consideramos válida la comparación realizada entre muestra pretratamiento y postratamiento. De cualquier modo, esto no puede afirmarse con una seguridad total, dado que como se ha expuesto, cada QA proviene de un agregado de células con una mutación común dentro de un mismo campo y mediante la técnica de biopsia, aun siendo próximas macroscópicamente, podrían presentar características microscópicas y/o genéticas distintas.

## **F. CONCLUSIONES**

El presente trabajo, llevado a cabo en 22 pacientes con QAs, demuestra que:

1.- El tratamiento con TFD tiene efectos celulares y moleculares que apoyan su **efecto preventivo** en **QA** ya que:

- a) **Reduce** la displasia queratinocítica basal y la elastosis solar, ambos indicadores de **daño actínico crónico**.
- b) **Reduce la proliferación celular de la epidermis**, reflejada por una disminución significativa de la expresión de ki-67 en todos los casos analizados.
- c) **Reduce** la expresión de **p53**, marcador precoz de **oncogénesis** en la epidermis.

2.- **Un único tratamiento** de TFD parece **no ser suficiente** para eliminar por completo los signos histológicos y moleculares de daño actínico ya que, tras el tratamiento, persisten la displasia, elastosis, positividad de p53, ciclina D1 y COX-2 en un porcentaje variable de pacientes. Esto apoya lo ya publicado en diversos estudios clínicos que postulan una mayor eficacia de dos tratamientos de TFD frente a uno.

3.- Tras el tratamiento con TFD existe una tendencia al **incremento** de la expresión de **COX-2**, considerado marcador de carcinogénesis, cuyas implicaciones deberán ser evaluadas.

## **G.BIBLIOGRAFÍA**

1. Rigel, D. S. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol*. 58:S129-S132. 2008
2. MacKie RM and Quinn AG. Non-melanoma skin cancer and other epidermal tumours. En BurnsT, Breathnack S, Cox N, Griffiths C. *Rook's Textbook of Dermatology*. 7th Ed. Capítulo 36.1-36.50. 2004
3. Herrera E. Proyecto INCACES (Incidencia de Cáncer Cutáneo en España). Informe elaborado por *Técnicas Avanzadas de Investigación en Servicios de Salud (TAISS)*. 2007
4. Arora, A. and Attwood, J. Common skin cancers and their precursors. *Surg Clin North Am*. 89:703-712. 2009
5. McGuire, J. F., Ge, N. N., and Dyson, S. Nonmelanoma skin cancer of the head and neck I: histopathology and clinical behavior. *Am J Otolaryngol*. 30:121-133. 2009
6. Cassarino, D. S., Derienzo, D. P., and Barr, R. J. Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification--part two. *J Cutan Pathol*. 33:261-279. 2006
7. Hearn, R. M., Kerr, A. C., Rahim, K. F., Ferguson, J., and Dawe, R. S. Incidence of skin cancers in 3867 patients treated with narrow-band ultraviolet B phototherapy. *Br J Dermatol*. 159:931-935. 2008
8. Lehman B and Beurer M. Vitamin D metabolism. *Dermatol Ther*. 23:2-12. 2010
9. J.L.M.Hawk, A.R.Young, and J.Ferguson. Cutaneous photobiology. En BurnsT, Breathnack S, Cox N, Griffiths C. *Rook's Textbook of Dermatology*. 7th Ed. Capítulo 24. 24.6. 2004
10. Chen, Y., Parvez, F., Gamble, M., Islam, T., Ahmed, A., Argos, M., Graziano, J. H., and Ahsan, H. Arsenic exposure at low-to-moderate levels and skin lesions, arsenic metabolism, neurological functions, and biomarkers for respiratory and cardiovascular diseases: review of recent findings from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study (HEALS) in Bangladesh. *Toxicol Appl Pharmacol*. 239:184-192. 2009
11. Dubina, M. and Goldenberg, G. Viral-associated nonmelanoma skin cancers: a review. *Am J Dermatopathol*. 31:561-573. 2009
12. Ulrich, C., Jurgensen, J. S., Degen, A., Hackethal, M., Ulrich, M., Patel, M. J., Eberle, J., Terhorst, D., Sterry, W., and Stockfleth, E. Prevention of non-melanoma skin cancer in organ transplant patients by regular use of a sunscreen: a 24 months, prospective, case-control study. *Br J Dermatol*. 161 Suppl 3:78-84. 2009
13. Geusau, A., Dunkler, D., Messeritsch, E., Sandor, N., Heidler, G., Rodler, S., Ankersmit, J., Zuckermann, A., and Tschachler, E. Non-melanoma skin cancer and its

risk factors in an Austrian population of heart transplant recipients receiving induction therapy. *Int J Dermatol.* 47:918-925. 2008

14. Sarasin, A. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat Res.* 428:5-10. 1999

15. Elder DE., Elenitsas, R, Bennett JB, Iofreda M, Miller J, and Miller F. Localized Superficial Epidermal or Melanocytic Proliferations. En *Lever's histopathology of the skin.* 18-18. 2007

16. Harvey, I., Frankel, S., Marks, R., Shalom, D., and Nolan-Farrell, M. Non-melanoma skin cancer and solar keratoses. I. Methods and descriptive results of the South Wales Skin Cancer Study. *Br J Cancer.* 74:1302-1307. 1996

17. Schwartz, R. A. Premalignant keratinocytic neoplasms. *J Am Acad Dermatol.* 35:223-242. 1996

18. Callen, J. P., Bickers, D. R., and Moy, R. L. Actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol.* 36:650-653. 1997

19. Marks, R., Rennie, G., and Selwood, T. S. Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet.* 1:795-797. 1988

20. Rowert-Huber, J., Patel, M. J., Forschner, T., Ulrich, C., Eberle, J., Kerl, H., Sterry, W., and Stockfleth, E. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol.* 156 Suppl 3:8-12. 2007

21. Yantsos, V. A., Conrad, N., Zabawski, E., and Cockerell, C. J. Incipient intraepidermal cutaneous squamous cell carcinoma: a proposal for reclassifying and grading solar (actinic) keratoses. *Semin Cutan Med Surg.* 18:3-14. 1999

22. Smits, T., Kleinpenning, M. M., Blokx, W. A., van de Kerkhof, P. C., van Erp, P. E., and Gerritsen, M. J. Fluorescence diagnosis in keratinocytic intraepidermal neoplasias. *J Am Acad Dermatol.* 57:824-831. 2007

23. Valko, M., Rhodes C.J, Moncol J., Izakovic M., and Manzur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160:1-40. 2006

24. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70. 2000

25. Sarasin, A. and Giglia-Mari, G. p53 gene mutations in human skin cancers. *Exp Dermatol.* 11 Suppl 1:44-47. 2002

26. Melnikova, V. O., Pacifico, A., Chimenti, S., Peris, K., and Ananthaswamy, H. N. Fate of UVB-induced p53 mutations in SKH-hr1 mouse skin after discontinuation of irradiation: relationship to skin cancer development. *Oncogene.* 24:7055-7063. 2005

27. Rodust, P. M., Stockfleth, E., Ulrich, C., Leverkus, M., and Eberle, J. UV-induced squamous cell carcinoma--a role for antiapoptotic signalling pathways. *Br J Dermatol.* 161 Suppl 3:107-115. 2009
28. de Gruijl, F. R. p53 mutations as a marker of skin cancer risk: comparison of UVA and UVB effects. *Exp Dermatol.* 11 Suppl 1:37-39. 2002
29. Dandie, G. W., Clydesdale, G. J., Jacobs, I., and Muller, H. K. Effects of UV on the migration and function of epidermal antigen presenting cells. *Mutat Res.* 422:147-154. 1998
30. Vink, A. A., Shreedhar, V., Roza, L., Krutmann, J., and Kripke, M. L. Cellular target of UVB-induced DNA damage resulting in local suppression of contact hypersensitivity. *J Photochem Photobiol B.* 44:107-111. 1998
31. Shreedhar, V., Giese, T., Sung, V. W., and Ullrich, S. E. A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol.* 160:3783-3789. 1998
32. Slaughter D.P., Southwick.H.W., and mejkall, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 6:963-968. 1953
33. Vatve, M., Ortonne, J. P., Birch-MacHin, M. A., and Gupta, G. Management of field change in actinic keratosis. *Br J Dermatol.* 157 Suppl 2:21-24. 2007
34. Benjamin, C. L. and Ananthaswamy, H. N. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 224:241-248. 2007
35. Berking, C. [Photocarcinogenesis. Molecular mechanisms and preventive strategies]. *Hautarzt.* 58:398-405. 2007
36. Murphy, G., Young, A. R., Wulf, H. C., Kulms, D., and Schwarz, T. The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp Dermatol.* 10:155-160. 2001
37. Burnworth, B., Arendt, S., Muffler, S., Steinkraus, V., Brocker, E. B., Birek, C., Hartschuh, W., Jauch, A., and Boukamp, P. The multi-step process of human skin carcinogenesis: a role for p53, cyclin D1, hTERT, p16, and TSP-1. *Eur J Cell Biol.* 86:763-780. 2007
38. van der Pols, J. C., Xu, C., Boyle, G. M., Parsons, P. G., Whiteman, D. C., and Green, A. C. Expression of p53 tumor suppressor protein in sun-exposed skin and associations with sunscreen use and time spent outdoors: a community-based study. *Am J Epidemiol.* 163:982-988. 2006
39. Stratigos, A. J., Kapranos, N., Petrakou, E., Anastasiadou, A., Pagouni, A., Christofidou, E., Petridis, A., Papadopoulos, O., Kokka, E., Antoniou, C., Georgala, S., and Katsambas, A. D. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma

skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 19:180-186. 2005

40. Boukamp, P. UV-induced skin cancer: similarities--variations. *J Dtsch Dermatol Ges.* 3:493-503. 2005

41. Giglia-Mari, G. and Sarasin, A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat.* 21:217-228. 2003

42. Ananthaswamy, H. N., Loughlin, S. M., Cox, P., Evans, R. L., Ullrich, S. E., and Kripke, M. L. Sunlight and skin cancer: inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. *Nat Med.* 3:510-514. 1997

43. Brash, D. E. Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas. *Br J Dermatol.* 154 Suppl 1:8-10. 2006

44. Carpenter, P. M., Linden, K. G., McLaren, C. E., Li, K. T., Arain, S., Barr, R. J., Hite, P., Sun, J. D., and Meyskens, F. L., Jr. Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13:1996-2002. 2004

45. Hui, A. M., Li, X., Shi, Y. Z., Takayama, T., Torzilli, G., and Makuuchi, M. Cyclin D1 overexpression is a critical event in gallbladder carcinogenesis and independently predicts decreased survival for patients with gallbladder carcinoma. *Clin Cancer Res.* 6:4272-4277. 2000

46. Mastoraki, A., Ioannidis, E., Apostolaki, A., Patsouris, E., and Aroni, K. Pgp 9.5 and Cyclin D1 Co-Expression in Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Int J Surg Pathol.* 2009

47. Sauter, E. R., Nesbit, M., Litwin, S., Klein-Szanto, A. J., Cheffetz, S., and Herlyn, M. Antisense cyclin D1 induces apoptosis and tumor shrinkage in human squamous carcinomas. *Cancer Res.* 59:4876-4881. 1999

48. Narbutt, J., Norval, M., Slowik-Rylska, M., Jochymski, C., Kozlowski, W., Sysa-Jedrzejska, A., Rogowski-Tylman, M., and Lesiak, A. Suberythemal ultraviolet B radiation alters the expression of cell cycle-related proteins in the epidermis of human subjects without leading to photoprotection. *Br J Dermatol.* 161:890-896. 2009

49. Bito, T., Ueda, M., Ahmed, N. U., Nagano, T., and Ichihashi, M. Cyclin D and retinoblastoma gene product expression in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma in relation to p53 expression. *J Cutan Pathol.* 22:427-434. 1995

50. Fecker, L. F., Stockfleth, E., Nindl, I., Ulrich, C., Forschner, T., and Eberle, J. The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Br J Dermatol.* 156 Suppl 3:25-33. 2007

51. Anderson, G. D., Hauser, S. D., McGarity, K. L., Bremer, M. E., Isakson, P. C., and Gregory, S. A. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest.* 97:2672-2679. 1996
52. Portanova, J. P., Zhang, Y., Anderson, G. D., Hauser, S. D., Masferrer, J. L., Seibert, K., Gregory, S. A., and Isakson, P. C. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med.* 184:883-891. 1996
53. Maekawa, M., Sugano, K., Sano, H., Miyazaki, S., Ushiyama, M., Fujita, S., Gotoda, T., Yokota, T., Ohkura, H., Kakizoe, T., and Sekiya, T. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol.* 28:421-426. 1998
54. Wang, D. and Dubois, R. N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene.* 2009
55. Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D. G., and Mukhtar, H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate.* 42:73-78. 2000
56. Kokawa, A., Kondo, H., Gotoda, T., Ono, H., Saito, D., Nakadaira, S., Kosuge, T., and Yoshida, S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer.* 91:333-338. 2001
57. Khuri, F. R., Wu, H., Lee, J. J., Kemp, B. L., Lotan, R., Lippman, S. M., Feng, L., Hong, W. K., and Xu, X. C. Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 7:861-867. 2001
58. Ristimaki, A., Nieminen, O., Saukkonen, K., Hotakainen, K., Nordling, S., and Haglund, C. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol.* 158:849-853. 2001
59. Fujiwaki, R., Iida, K., Kanasaki, H., Ozaki, T., Hata, K., and Miyazaki, K. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer: correlation with microvessel count and expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. *Hum Pathol.* 33:213-219. 2002
60. An, K. P., Athar, M., Tang, X., Katiyar, S. K., Russo, J., Beech, J., Aszterbaum, M., Kopelovich, L., Epstein, E. H., Jr., Mukhtar, H., and Bickers, D. R. Cyclooxygenase-2 expression in murine and human nonmelanoma skin cancers: implications for therapeutic approaches. *Photochem Photobiol.* 76:73-80. 2002
61. Pentland, A. P., Schoggins, J. W., Scott, G. A., Khan, K. N., and Han, R. Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis.* 20:1939-1944. 1999

62. Nelson, C., Rigel, D., Smith, S., Swanson, N., and Wolf, J. Phase IV, open-label assessment of the treatment of actinic keratosis with 3.0% diclofenac sodium topical gel (Solaraze). *J Drugs Dermatol.* 3:401-407. 2004
63. Rivers, J. K. Topical 3% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel for the treatment of actinic keratoses. *Skin Therapy Lett.* 9:1-3. 2004
64. Rivers, J. K. and Wolf, J. Assessing clinically meaningful end points for the management of actinic keratosis with diclofenac 3% gel. *Acta Derm Venereol.* 87:188-189. 2007
65. Yoshimoto, T., Takahashi, Y., Kinoshita, T., Sakashita, T., Inoue, H., and Tanabe, T. Growth stimulation and epidermal growth factor receptor induction in cyclooxygenase-overexpressing human colon carcinoma cells. *Adv Exp Med Biol.* 507:403-407. 2002
66. Isoherranen, K., Punnonen, K., Jansen, C., and Uotila, P. Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br J Dermatol.* 140:1017-1022. 1999
67. Higashi, Y., Kanekura, T., and Kanzaki, T. Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer.* 86:667-671. 2000
68. Nijsten, T., Colpaert, C. G., Vermeulen, P. B., Harris, A. L., Van, Marck E., and Lambert, J. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. *Br J Dermatol.* 151:837-845. 2004
69. Thai, K. E., Fergin, P., Freeman, M., Vinciullo, C., Francis, D., Spelman, L., Murrell, D., Anderson, C., Weightman, W., Reid, C., Watson, A., and Foley, P. A prospective study of the use of cryosurgery for the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol.* 43:687-692. 2004
70. Kaufmann, R., Spelman, L., Weightman, W., Reifenberger, J., Szeimies, R. M., Verhaeghe, E., Kerrouche, N., Sorba, V., Villemagne, H., and Rhodes, L. E. Multicentre intraindividual randomized trial of topical methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy vs. cryotherapy for multiple actinic keratoses on the extremities. *Br J Dermatol.* 158:994-999. 2008
71. Lubritz, R. R. and Smolewski, S. A. Cryosurgery cure rate of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol.* 7:631-632. 1982
72. Askew, D. A., Mickan, S. M., Soyer, H. P., and Wilkinson, D. Effectiveness of 5-fluorouracil treatment for actinic keratosis--a systematic review of randomized controlled trials. *Int J Dermatol.* 48:453-463. 2009

73. Moore, A. Y. Clinical applications for topical 5-fluorouracil in the treatment of dermatological disorders. *J Dermatolog Treat.* 20:328-335. 2009
74. Zhan, H. and Zheng, H. The role of topical cyclo-oxygenase-2 inhibitors in skin cancer: treatment and prevention. *Am J Clin Dermatol.* 8:195-200. 2007
75. Ferrandiz, C. Update on actinic keratosis in clinical trial experience with imiquimod. *Br J Dermatol.* 157 Suppl 2:32-33. 2007
76. Falagas, M. E., Angelousi, A. G., and Peppas, G. Imiquimod for the treatment of actinic keratosis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Acad Dermatol.* 55:537-538. 2006
77. Zeichner, J. A., Stern, D. W., Uliasz, A., Itenberg, S., and Lebwohl, M. Placebo-controlled, double-blind, randomized pilot study of imiquimod 5% cream applied once per week for 6 months for the treatment of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol.* 60:59-62. 2009
78. Braathen, L. R., Szeimies, R. M., Basset-Seguin, N., Bissonnette, R., Foley, P., Pariser, D., Roelandts, R., Wennberg, A. M., and Morton, C. A. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. *J Am Acad Dermatol.* 56:125-143. 2007
79. Choudhary, S., Nouri, K., and Elsaie, M. L. Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med Sci.* 24:971-980. 2009
80. Gilaberte, Y., Serra-Guillen, C., de las Heras, M. E., Ruiz-Rodriguez, R., Fernandez-Lorente, M., venuto-Andrade, C., Gonzalez-Rodriguez, S., and Guillen-Barona, C. [Photodynamic therapy in dermatology]. *Actas Dermosifiliogr.* 97:83-102. 2006
81. Stapleton, M. and Rhodes, L. E. Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous disease. *J Dermatolog Treat.* 14:107-112. 2003
82. Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M., and Sala, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 21:293-302. 2007
83. Stapleton, M. and Rhodes, L. E. Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous disease. *J Dermatolog Treat.* 14:107-112. 2003
84. Tierney, E., Barker, A., Ahdout, J., Hanke, C. W., Moy, R. L., and Kouba, D. J. Photodynamic therapy for the treatment of cutaneous neoplasia, inflammatory disorders, and photoaging. *Dermatol Surg.* 35:725-746. 2009
85. Uehlinger, P., Zellweger, M., Wagnieres, G., Juillerat-Jeanneret, L., van den, Bergh H., and Lange, N. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical

properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B*. 54:72-80. 2000

86. Gaullier, J. M., Berg, K., Peng, Q., Anholt, H., Selbo, P. K., Ma, L. W., and Moan, J. Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Res*. 57:1481-1486. 1997

87. Szeimies, R. M., Stockfleth, E., Popp, G., Borrosch, F., Bruning, H., Dominicus, R., Mensing, H., Reinhold, U., Reich, K., Moor, A. C., Stocker, M., Ortland, C., Brunnert, M., and Hauschild, A. Long-term follow-up of photodynamic therapy with a self-adhesive 5-aminolaevulinic acid patch: 12 months data. *Br J Dermatol*. 2009

88. Siddiqui, M. A., Perry, C. M., and Scott, L. J. Topical methyl aminolevulinate. *Am J Clin Dermatol*. 5:127-137. 2004

89. Blume, J. E. and Oseroff, A. R. Aminolevulinic acid photodynamic therapy for skin cancers. *Dermatol Clin*. 25:5-14. 2007

90. Fritsch, C., Abels, C., Goetz, A. E., Stahl, W., Bolsen, K., Ruzicka, T., Goerz, G., and Sies, H. Porphyrins preferentially accumulate in a melanoma following intravenous injection of 5-aminolevulinic acid. *Biol Chem*. 378:51-57. 1997

91. Gallegos, E. R., DeLeon, Rodriguez, I, Martinez Guzman, L. A., and Perez Zapata, A. J. In vitro study of biosynthesis of protoporphyrin IX induced by delta-aminolevulinic acid in normal and cancerous cells of the human cervix. *Arch Med Res*. 30:163-170. 1999

92. Krieg, R. C., Fickweiler, S., Wolfbeis, O. S., and Knuechel, R. Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. *Photochem Photobiol*. 72:226-233. 2000

93. Navone, N. M., Polo, C. F., Frisardi, A. L., Andrade, N. E., and Battle, A. M. Heme biosynthesis in human breast cancer--mimetic "in vitro" studies and some heme enzymic activity levels. *Int J Biochem*. 22:1407-1411. 1990

94. Riesenber, R., Fuchs, C., and Kriegmair, M. Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin on human bladder carcinoma cells in vitro. *Eur J Cancer*. 32A:328-334. 1996

95. Smits, T. and Moor, A. C. New aspects in photodynamic therapy of actinic keratoses. *J Photochem Photobiol B*. 96:159-169. 2009

96. Smits, T., van Laarhoven, A. I., Staassen, A., van de Kerkhof, P. C., van Erp, P. E., and Gerritsen, M. J. Induction of protoporphyrin IX by aminolaevulinic acid in actinic keratosis, psoriasis and normal skin: preferential porphyrin enrichment in differentiated cells. *Br J Dermatol*. 160:849-857. 2009

97. Smits, T., Kleinpenning, M. M., Blokx, W. A., van de Kerkhof, P. C., van Erp, P. E., and Gerritsen, M. J. Fluorescence diagnosis in keratinocytic intraepidermal neoplasias. *J Am Acad Dermatol.* 57:824-831. 2007
98. Moan, J., Ma, L. W., and Iani, V. On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters. *Int J Cancer.* 92:139-143. 2001
99. van den Akker, J. T., Holroyd, J. A., Vernon, D. I., Sterenberg, H. J., and Brown, S. B. Chronic UVB exposure enhances in vitro percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid in hairless mouse skin. *Lasers Surg Med.* 34:141-145. 2004
100. Dolmans, D. E., Fukumura, D., and Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer.* 3:380-387. 2003
101. Juarranz, A., Jaen, P., Sanz-Rodriguez, F., Cuevas, J., and Gonzalez, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol.* 10:148-154. 2008
102. Robertson, C. A., Evans, D. H., and Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B.* 96:1-8. 2009
103. Braathen, L. R., Szeimies, R. M., Basset-Seguin, N., Bissonnette, R., Foley, P., Pariser, D., Roelandts, R., Wennberg, A. M., and Morton, C. A. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. *J Am Acad Dermatol.* 56:125-143. 2007
104. Redondo Bellón, P and Sánchez Viera, M. Terapia fotodinámica. Editado por laboratorios Galderma. 2007
105. Morton, C. A., Brown, S. B., Collins, S., Ibbotson, S., Jenkinson, H., Kurwa, H., Langmack, K., McKenna, K., Moseley, H., Pearse, A. D., Stringer, M., Taylor, D. K., Wong, G., and Rhodes, L. E. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol.* 146:552-567. 2002
106. Babilas, P., Kohl, E., Maisch, T., Backer, H., Gross, B., Branzan, A. L., Baumler, W., Landthaler, M., Karrer, S., and Szeimies, R. M. In vitro and in vivo comparison of two different light sources for topical photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 154:712-718. 2006
107. Moseley, H., Allen, J. W., Ibbotson, S., Lesar, A., McNeill, A., Camacho-Lopez, M. A., Samuel, I. D., Sibbett, W., and Ferguson, J. Ambulatory photodynamic therapy: a new concept in delivering photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 154:747-750. 2006
108. Ruiz-Rodriguez, R. and Lopez-Rodriguez, L. Nonablative skin resurfacing: the role of PDT. *J Drugs Dermatol.* 5:756-762. 2006

109. Babilas, P., Knobler, R., Hummel, S., Gottschaller, C., Maisch, T., Koller, M., Landthaler, M., and Szeimies, R. M. Variable pulsed light is less painful than light-emitting diodes for topical photodynamic therapy of actinic keratosis: a prospective randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 157:111-117. 2007
110. Wiegell, S. R., Haedersdal, M., Philipsen, P. A., Eriksen, P., Enk, C. D., and Wulf, H. C. Continuous activation of PpIX by daylight is as effective as and less painful than conventional photodynamic therapy for actinic keratoses; a randomized, controlled, single-blinded study. *Br J Dermatol.* 158:740-746. 2008
111. Pariser, D. M., Lowe, N. J., Stewart, D. M., Jarratt, M. T., Lucky, A. W., Pariser, R. J., and Yamauchi, P. S. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol.* 48:227-232. 2003
112. Tarstedt, M., Rosdahl, I., Berne, B., Svanberg, K., and Wennberg, A. M. A randomized multicenter study to compare two treatment regimens of topical methyl aminolevulinate (Metvix)-PDT in actinic keratosis of the face and scalp. *Acta Derm Venereol.* 85:424-428. 2005
113. Piacquadio, D. J., Chen, D. M., Farber, H. F., Fowler, J. F., Jr., Glazer, S. D., Goodman, J. J., Hruza, L. L., Jeffes, E. W., Ling, M. R., Phillips, T. J., Rallis, T. M., Scher, R. K., Taylor, C. R., and Weinstein, G. D. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch Dermatol.* 140:41-46. 2004
114. Szeimies, R. M., Karrer, S., Radakovic-Fijan, S., Tanew, A., Calzavara-Pinton, P. G., Zane, C., Sidoroff, A., Hempel, M., Ulrich, J., Proebstle, T., Meffert, H., Mulder, M., Salomon, D., Dittmar, H. C., Bauer, J. W., Kernland, K., and Braathen, L. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol.* 47:258-262. 2002
115. Kurwa, H. A., Yong-Gee, S. A., Seed, P. T., Markey, A. C., and Barlow, R. J. A randomized paired comparison of photodynamic therapy and topical 5-fluorouracil in the treatment of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol.* 41:414-418. 1999
116. Stender, I. M., Bech-Thomsen, N., Poulsen, T., and Wulf, H. C. Photodynamic therapy with topical delta-aminolevulinic acid delays UV photocarcinogenesis in hairless mice. *Photochem Photobiol.* 66:493-496. 1997
117. Liu, Y., Viau, G., and Bissonnette, R. Multiple large-surface photodynamic therapy sessions with topical or systemic aminolevulinic acid and blue light in UV-exposed hairless mice. *J Cutan Med Surg.* 8:131-139. 2004

118. Sharfaei, S., Juzenas, P., Moan, J., and Bissonnette, R. Weekly topical application of methyl aminolevulinic acid followed by light exposure delays the appearance of UV-induced skin tumours in mice. *Arch Dermatol Res.* 294:237-242. 2002
119. Wulf HC, Pavel S, and Stender IM. Topical photodynamic therapy for prevention of new skin lesions in renal transplant recipients. Presented at the 13th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), Florence, Italy, November 18-24, 2004:2004
120. de Graaf, Y. G., Kennedy, C., Wolterbeek, R., Collen, A. F., Willemze, R., and Bouwes Bavinck, J. N. Photodynamic therapy does not prevent cutaneous squamous-cell carcinoma in organ-transplant recipients: results of a randomized-controlled trial. *J Invest Dermatol.* 126:569-574. 2006
121. Dragieva, G., Prinz, B. M., Hafner, J., Dummer, R., Burg, G., Binswanger, U., and Kempf, W. A randomized controlled clinical trial of topical photodynamic therapy with methyl aminolaevulinic acid in the treatment of actinic keratoses in transplant recipients. *Br J Dermatol.* 151:196-200. 2004
122. Christiansen, K., Bjerring, P., and Troilius, A. 5-ALA for photodynamic photorejuvenation--optimization of treatment regime based on normal-skin fluorescence measurements. *Lasers Surg Med.* 39:302-310. 2007
123. Aceituno-Madera, P., Buendia-Eisman, A., rias-Santiago, S., and Serrano-Ortega, S. Changes in the incidence of skin cancer between 1978 and 2002. *Actas Dermosifiliogr.* 101:39-46. 2010
124. Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 7:3-2006
125. Seite, S. and Fournier, A. M. The benefit of daily photoprotection. *J Am Acad Dermatol.* 58:S160-S166. 2008
126. Moyal, D. D. and Fournier, A. M. Broad-spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet-simulated radiation and natural sunlight-induced immunosuppression in human beings. *J Am Acad Dermatol.* 58:S149-S154. 2008
127. Huncharek, M. and Kupelnick, B. Use of topical sunscreens and the risk of malignant melanoma: a meta-analysis of 9067 patients from 11 case-control studies. *Am J Public Health.* 92:1173-1177. 2002
128. Vainio, H., Miller, A. B., and Bianchini, F. An international evaluation of the cancer-preventive potential of sunscreens. *Int J Cancer.* 88:838-842. 2000
129. Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Somchand N, Webster AC, Delitt J, and Perkins W. Interventions for preventing of non-melanoma skin cancers in high-risk groups. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 4. 2007

130. Wright, T. I., Spencer, J. M., and Flowers, F. P. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. *J Am Acad Dermatol.* 54:933-946. 2006
131. Otley, C. C., Stasko, T., Tope, W. D., and Lebwohl, M. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer with systemic retinoids: practical dosing and management of adverse effects. *Dermatol Surg.* 32:562-568. 2006
132. Clouser, M. C., Roe, D. J., Foote, J. A., and Harris, R. B. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on non-melanoma skin cancer incidence in the SKICAP-AK trial. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 18:276-283. 2009
133. Benavides, F., Oberyshyn, T. M., VanBuskirk, A. M., Reeve, V. E., and Kusewitt, D. F. The hairless mouse in skin research. *J Dermatol Sci.* 53:10-18. 2009
134. Bissonette, R., Bergeron, A., and Liu, Y. Large surface photodynamic therapy with aminolevulinic acid: treatment of actinic keratoses and beyond. *J Drugs Dermatol.* 3:S26-S31. 2004
135. Wennberg AM, Keohane S, and Lear JT. A multicenter study with MAL-PDT cream in immuno-compromised organ transplant recipients with non-melanoma skin cancer. Poster presented at the EuropeanAcademy of Dermatology and Venereology(EADV) meeting, London. 2005
136. Talghini, S., Halimi, M., and Baybordi, H. Expression of P27, Ki67 and P53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen disease. *Pak J Biol Sci.* 12:929-933. 2009
137. Kim, K. H., Park, E. J., Seo, Y. J., Cho, H. S., Kim, C. W., Kim, K. J., and Park, H. R. Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 and p53 expression in skin tumors. *J Dermatol.* 33:319-325. 2006
138. Jensen, V., Prasad, A. R., Smith, A., Raju, M., Wendel, C. S., Schmelz, M., Leyva, W., Warneke, J., and Krouse, R. S. Prognostic Criteria for Squamous Cell Cancer of the Skin. *J Surg Res.* 2009
139. Pariser, D. M., Lowe, N. J., Stewart, D. M., Jarratt, M. T., Lucky, A. W., Pariser, R. J., and Yamauchi, P. S. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol.* 48:227-232. 2003
140. Park, M. Y., Sohn, S., Lee, E. S., and Kim, Y. C. Photorejuvenation induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in patients with actinic keratosis: a histologic analysis. *J Am Acad Dermatol.* 62:85-95. 2010
141. Issa, M. C., Pineiro-Maceira, J., Vieira, M. T., Olej, B., Mandarim-de-Lacerda, C. A., Luiz, R. R., and Manela-Azulay, M. Photorejuvenation with topical methyl aminolevulinate and red light: a randomized, prospective, clinical, histopathologic, and morphometric study. *Dermatol Surg.* 36:39-48. 2010

142. Leong, J., Hughes-Fulford, M., Rakhlin, N., Habib, A., Maclouf, J., and Goldyne, M. E. Cyclooxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation. *Exp Cell Res.* 224:79-87. 1996
143. Isoherranen, K., Punnonen, K., Jansen, C., and Uotila, P. Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br J Dermatol.* 140:1017-1022. 1999
144. Ferrario, A., Von, Tiehl K., Wong, S., Luna, M., and Gomer, C. J. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer Res.* 62:3956-3961. 2002
145. Volanti, C., Hendrickx, N., Van, Lint J., Matroule, J. Y., Agostinis, P., and Piette, J. Distinct transduction mechanisms of cyclooxygenase 2 gene activation in tumour cells after photodynamic therapy. *Oncogene.* 24:2981-2991. 2005
146. Luna, M., Wong, S., Ferrario, A., and Gomer, C. J. Cyclooxygenase-2 expression induced by photofrin photodynamic therapy involves the p38 MAPK pathway. *Photochem Photobiol.* 84:509-514. 2008
147. Makowski, M., Grzela, T., Niderla, J., LAzarczyk, M., Mroz, P., Kopee, M., Legat, M., Strusinska, K., Koziak, K., Nowis, D., Mrowka, P., Wasik, M., Jakobisiak, M., and Golab, J. Inhibition of cyclooxygenase-2 indirectly potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice. *Clin Cancer Res.* 9:5417-5422. 2003
148. Akita, Y., Kozaki, K., Nakagawa, A., Saito, T., Ito, S., Tamada, Y., Fujiwara, S., Nishikawa, N., Uchida, K., Yoshikawa, K., Noguchi, T., Miyaishi, O., Shimosato, K., Saga, S., and Matsumoto, Y. Cyclooxygenase-2 is a possible target of treatment approach in conjunction with photodynamic therapy for various disorders in skin and oral cavity. *Br J Dermatol.* 151:472-480. 2004
149. Van, Haren R., Feldman, D., and Sinha, A. A. Systematic comparison of nonmelanoma skin cancer microarray datasets reveals lack of consensus genes. *Br J Dermatol.* 161:1278-1287. 2009
150. Padilla, R. S., Sebastian, S., Jiang, Z., Nindl, I., and Larson, R. Gene expression patterns of normal human skin, actinic keratosis, and squamous cell carcinoma: a spectrum of disease progression. *Arch Dermatol.* 146:288-293. 2010

**H. ANEXOS**

## H.1. Anexo 1

---

### HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

#### INTRODUCCIÓN

La terapia fotodinámica (TFD) utilizada en el tratamiento de tumores consiste en la destrucción selectiva de las células tumorales mediante un fotosensibilizador (en este caso, en forma de crema) que se activa por la luz en presencia de oxígeno. La TFD es un tratamiento contra el cáncer que está en investigación en muchas formas de tumores y que se utiliza principalmente para tratar las lesiones tumorales que son accesibles ópticamente.

El aminolevulinato de metilo en crema (Metvix®) se encuentra comercializado en varios países para tratar lesiones como las que usted presenta.

El dermatólogo a cargo del tratamiento recogerá sus datos personales y demográficos, además de todos sus antecedentes relacionados con la salud, en especial aquellas circunstancias médicas o tratamientos que esté recibiendo y que hayan aconsejado el tratamiento con la terapia fotodinámica. Se le citará para una segunda visita en la que recibirá el tratamiento con terapia fotodinámica y que consistirá en lo siguiente:

Primero se prepararán las zonas donde se encuentran las lesiones: para ello se procederá a retirar todas las costras y escamas y se raspará ligeramente la superficie de las lesiones.

Posteriormente se aplicará con una espátula una capa de crema de alrededor de 1 mm de espesor: esta aplicación se hará sobre las lesiones y un margen de 5 a 10 mm de piel sana alrededor de la lesión.

Se procederá a cubrir la zona con un vendaje durante 3h.

Pasado este tiempo, se retirará el vendaje y se limpiará la zona con suero salino, y a continuación se expondrá la lesión a una luz roja emitida por una lámpara especialmente diseñada, y aprobada por las autoridades sanitarias, que hace que la crema que se le ha aplicado anteriormente, se active y actúe sobre las células tumorales de su lesión, respetando el tejido sano. Si usted presenta varias lesiones, se tratarán todas al mismo tiempo.

El médico y su equipo calcularán el tiempo que debe permanecer bajo la luz. Se le facilitarán unas gafas especiales que siempre debe llevar mientras el foco de luz esté activado.

A los 3 meses de haber recibido la 2ª sesión, deberá acudir a una 4ª visita en la que el médico valorará el grado de eficacia del tratamiento que se le ha administrado y dependiendo del grado de respuesta de sus lesiones, se le podrán aplicar o no otras 2 sesiones de fototerapia. En caso de que lo considere necesario, ya que la respuesta puede no ser la esperada, se le aplicará una 3ª sesión ese

mismo día, y volverá a repetirse al cabo de una semana (7 días  $\pm$  2 días) y se le volverá a citar pasados 3 meses para volver a evaluar las lesiones.

### **EFFECTOS INDESEABLES - RIESGOS PREVISIBLES**

Entre el 60 y el 80% de los participantes en otros ensayos clínicos comunicaron haber presentado síntomas de fototoxicidad local, consistentes principalmente en la aparición de dolor, sensación de quemazón local, calor, escozor, dolor, comezón y hormigueo en la piel, costras y enrojecimiento en las zonas tratadas. Estas reacciones fueron en su mayoría de intensidad leve o moderada, y transitorias. El uso repetido no incrementó la frecuencia ni la intensidad de las reacciones fototóxicas locales.

### **TRATAMIENTO**

Puesto que la terapia fotodinámica debe administrarse en un medio hospitalario, no se le entregará medicación alguna. Cada vez que acuda a una visita para recibir la sesión de tratamiento que le corresponda, su dermatólogo o el personal a su cargo, se encargarán de aplicarle el tratamiento (aminolevulinato de metilo) en las zonas a tratar.

No deberá aplicarse ningún otro tratamiento local. Cualquier duda que tenga sobre la utilización o consumo de otros fármacos deberá consultarla con el médico que le está tratando.

### **TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS**

Si decide no recibir este tratamiento, su dermatólogo le prescribirá el tratamiento que considere más adecuado para su enfermedad. Así mismo, si usted o su dermatólogo decidieran suspender el tratamiento prematuramente, recibirá usted el tratamiento más apropiado.

### **PARTICIPACIÓN**

Puede decidir libremente aceptar su participación en este tratamiento o negarse a participar. En este último caso, su médico le aconsejará sobre el tratamiento a seguir. Asimismo, podrá retirarse del tratamiento en cualquier momento y por cualquier motivo sin perjuicio alguno, y esta decisión no afectará a su asistencia médica.

El medicamento (aminolevulinato de metilo) le será administrado gratuitamente.

### **CONFIDENCIALIDAD**

Toda la información recogida durante este tratamiento será confidencial. Todos los datos, forman parte de su historia clínica, que es de su propiedad y a la cual solo tiene acceso el dermatólogo que le está tratando o cualquier otro facultativo de este Hospital, al que por causa relacionada con este tratamiento haya sido derivado para otro acto médico. Usted tiene acceso a su Historia clínica y podrá disponer de ella en cualquier momento y con el objeto que usted decida. Su

nombre no aparecerá en ninguna publicación ni presentación de datos. Los datos que se obtengan de este tratamiento estarán protegidos por la Ley Orgánica 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal. Al firmar el consentimiento adjunto autoriza usted el acceso directo de estas personas a sus registros médicos.

### **PERSONAS DE CONTACTO**

El dermatólogo que le administre el tratamiento le mantendrá al corriente de cualquier nuevo dato relacionado con la medicación que se le está aplicando y que pueda influir en su deseo de continuar con el tratamiento. Si tiene alguna duda sobre este tratamiento o sobre lo que debe hacer si enfermara durante el mismo, puede ponerse en contacto con su médico:

Doctor: \_\_\_\_\_.



## FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

Yo,

\_\_\_\_\_  
(nombre y apellidos)

declaro                      bajo                      mi                      responsabilidad                      que:

\_\_\_\_\_  
(nombre del participante)

Ha recibido la hoja de información sobre el tratamiento.

Ha podido hacer preguntas sobre el tratamiento.

Ha recibido suficiente información sobre el tratamiento

Ha                                      sido                                      informado                                      por:

\_\_\_\_\_  
(nombre del dermatólogo)

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del tratamiento:

Cuando quiera.

Sin tener que dar explicaciones

Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos

Y ha prestado libremente su conformidad para participar en el tratamiento.

Firma                      del                      testigo\_\_\_\_\_

Fecha\_\_\_\_\_

(escrita a mano por el testigo)

## H.2. Anexo 2



### **DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

#### **Nº DE HISTORIA**

D./D<sup>a</sup>.....de años de edad  
 (Nombre y dos apellidos)

Con domicilio en..... y D.N.I. nº

D./D<sup>a</sup>.....de años de edad  
 (Nombre y dos apellidos)

Con domicilio en..... y D.N.I. nº

En ..... calidad de.....de.....  
 (Representante legal, familiar o allegado) (Nombre y dos apellidos del paciente)

#### **DECLARO**

Que el DOCTOR/A .....  
 (Nombre y dos apellidos del facultativo que facilita la información)

Me ofrece participar de forma voluntaria en el proyecto de investigación sobre Terapia Fotodinámica en el que interviene el Dr. Jaén del Servicio de Dermatología de este Hospital.

Por lo tanto, y a partir de las biopsias que se me realizarán para los estudios histopatológicos, doy mi consentimiento para que también puedan ser utilizadas en los estudios celulares y moleculares relacionados con el proyecto

Sólo aquellos datos de la historia clínica que estén relacionados con el estudio piloto serán objeto de comprobación. Esta comprobación se hará en la medida de lo posible en presencia del Investigador Principal/Investigadores Colaboradores, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias clínicas pertenecientes a los sujetos participantes en el tratamiento. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo el investigador principal/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica.

El tratamiento de los datos se hará con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal y si además se transmiten datos a terceros se hará según lo establecido en la mencionada Normativa y el R.D. 994/99.

Así mismo usted debe saber que tiene derecho de acceso, rectificación y cancelación de sus datos en cualquier momento.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado relacionadas al proyecto que se está llevando a cabo y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado. Si en el transcurso del estudio me surgen más dudas, puedo contactar con el Dr..... en el teléfono:

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación puedo revocar el consentimiento que ahora presto, sin que ello altere la relación médico-enfermo ni se produzca perjuicio en mi tratamiento.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que en tales condiciones

**CONSIENTO**

Que las muestras de tejido obtenidas mediante biopsia, puedan también ser utilizadas para los estudios moleculares indicados.

En.....(Lugar y Fecha)

Fdo.:El/la Investigador  
El representante legal,

Fdo.: El Paciente  
Familiar o allegado

Fdo.:

**REVOCACIÓN**

D./D<sup>a</sup>.....de años de edad  
(Nombre y dos apellidos)  
Con domicilio en..... y D.N.I. nº

D./D<sup>a</sup>.....de años de edad  
(Nombre y dos apellidos)  
Con domicilio en..... y D.N.I. nº

En ..... calidad de.....de.....  
(Representante legal, familiar o allegado) (Nombre y dos apellidos del paciente)

**REVOCO** el consentimiento presentado en fecha..... y no deseo proseguir el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado

En.....(Lugar y Fecha)

Fdo.:El/la Investigador  
El representante legal,

Fdo.: El Paciente  
Familiar o allegado

Fdo.:

### **H.3. Anexo 3**

---

Debido a su extensión, el presente anexo se adjunta en formato electrónico (*Arrays Humanos.xls*).