

TESIS DOCTORAL
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES

**DIAGNÓSTICO DE FLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICO EN
LA ENFERMEDAD DE BOWEN TRATADA CON TERAPIA FOTODINÁMICA.**

Autora:

M^a Teresa Truchuelo Díez (maytetd@yahoo.es)

Dirigida por:

Dr. Pedro Jaén Olasolo (pedro@pjaen.com)

Dr. Antonio Harto Castaño (antonioharto@gmail.com)

Servicio de Dermatología
Hospital Ramón y Cajal, carretera de Colmenar km 9,1, 28034 Madrid
Universidad de Alcalá de Henares
Madrid, España



Departamento de Medicina

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Jaén, director de esta tesis, y al Dr. Harto, codirector, su apoyo, confianza y dedicación, no sólo en este proyecto, sino a lo largo de toda mi formación dermatológica, donde han supuesto para mí unos modelos a seguir como excelentes especialistas. Agradecerles su motivación y ejemplo a lo largo de todo este tiempo.

A la Dra. Fernández-Guarino por su entusiasmo, docencia, apoyo y ánimos desde los orígenes del proyecto.

Al Dr. Harto, Dra. Fernández-Guarino y Dra. Pérez, por haberme iniciado en el mundo de la Terapia Fotodinámica y del diagnóstico por fluorescencia.

A la Dra. Carmen Moreno (servicio de anatomía patológica del hospital) por su ayuda clave para la realización de parte de esta tesis. Gracias por estar siempre dispuesta a colaborar, por el tiempo dedicado desinteresadamente a este proyecto y por todas sus enseñanzas en dermatopatología. Gracias también a los técnicos de dicho servicio de anatomía patológica.

Al Dr. Boixeda, mi tutor durante la residencia, por ser un ejemplo a seguir como mente inquieta y dermatólogo con un constante e inagotable afán de superación.

A todo el personal del Servicio de Dermatología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, y en especial a mis compañeros de residencia, con los que he compartido momentos inolvidables a lo largo de estos años.

A mis amigas del Montpellier (en especial a Anita, que ha sido para mí todo un ejemplo del médico por excelencia, con su entrega, lucha y consuelo durante la enfermedad de Marisa), a mis amigos del Maravillas y a mis amigas “gregorianas”, por estar siempre ahí, compartiendo los buenos y malos momentos.

Y finalmente, y sin embargo clave para la culminación de esta tesis, dar las gracias a mi familia, por su apoyo incondicional, sabios consejos y cariño recibido en todo momento.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALA: Ácido 5-aminolevulínico

CB: Carcinoma de Bowen

CBC: Carcinoma basocelular

CCNM: Cáncer cutáneo no melanoma

CE: Carcinoma espinocelular

DF: Diagnóstico de Fluorescencia

E: Especificidad

EB: Enfermedad de Bowen

FS: Fotosensibilizante

FI: Fluorescencia intensa

FM: Fluorescencia media

FN: Fluorescencia nula

FNeg: Falsos negativos

FP: Falsos positivos

HE: Hematoxilina eosina

IHQ: Inmunohistoquímica

KIN: Neoplasia queratinocítica intraepidérmica

MAL: Metil aminolevulinato

MM: Melanoma maligno

PpIX: Protoporfirina IX

QA: Queratosis actínica

RC: respuesta completa

RN: respuesta nula

RP: respuesta parcial

S: Sensibilidad

TDF: Terapia Fotodinámica

TI: Tinción inmunohistoquímica intensa

TL: Tinción inmunohistoquímica leve

TN: Tinción inmunohistoquímica nula

VPN: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

INDICE:

<u>1.INTRODUCCIÓN</u>	8
a. Enfermedad de Bowen.	9
a.1. Definición	9
a.2. Diagnóstico	14
a.3. Tratamiento	22
b. Terapia Fotodinámica.	25
b.1. Antecedente histórico	25
b.2. Mecanismo de acción	26
b.3. Fotosensibilizantes	28
b.4. Fuentes de luz	33
b.5. Diagnóstico de fluorescencia	35
b.6. Mecanismo de destrucción tisular	39
b.7. Indicaciones: aprobadas y en desarrollo	41
b.8. Terapia fotodinámica y la enfermedad de Bowen	44
<u>2. JUSTIFICACIÓN. HIPÓTESIS Y OBJETIVO</u>	45
<u>3. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	48
a. Selección de pacientes	49
b. Descripción de la técnica	51
c. Comparación entre diagnóstico clínico y de fluorescencia y el gold estándar: la histología	56
d. Análisis estadístico	58
<u>4. RESULTADOS</u>	61
a . Eficacia de la TFD en la EB. Respuesta clínica, de fluorescencia e histológica	62
b. Estudio inmunohistoquímico y modificación con TFD	74
c. Asociación entre diferentes variables y respuesta a TFD	80
d. Validez del Diagnóstico de fluorescencia (DF)	87
<u>5. DISCUSIÓN</u>	89
a. Elección de TFD para tratamiento de EB	90
b. Elección de pacientes	96
c. Técnica de Fluorescencia	98

d. Comparación de resultados e interpretación	99
d.1. Eficacia de la TFD en la EB	99
d.2. Estudio inmunohistoquímico y modificación con TFD	99
d.3. Asociación entre diferentes variables y respuesta a TFD	105
d.4. Validez del Diagnóstico de fluorescencia (DF)	107
d.4.1. Resumen	107
d.4.1.1. Sensibilidad	107
d.4.1.2. Especificidad	113
d.4.1.3. Fluorescencia pre-TFD	114
d.4.1.4. Mejoría de fluorescencia	116
d.4.1.5. Evolución de respuestas parciales a completas	116
d.4.1.6. Papel del DF en pre y post-TFD	117
d.4.1.7. Limitaciones del diagnóstico de fluorescencia	117
d.4.1. Ejemplos y reflexiones	120
<u>6. CONCLUSIONES</u>	125
<u>7. RESUMEN</u>	127
<u>8. ABSTRACT</u>	131
<u>9. BIBLIOGRAFIA</u>	135
<u>10. ANEXOS</u>	152

1. INTRODUCCIÓN

a. ENFERMEDAD DE BOWEN

a.1 Definición:

La enfermedad de Bowen (EB), también denominado carcinoma de Bowen (CB), o carcinoma escamoso in situ (CEIS), es un tipo de cáncer cutáneo no melanoma (CCNM). Fue descrito por primera vez por el dermatólogo Americano John T. Bowen en 1912. Se trata de un carcinoma escamoso in situ con potencial de progresión a carcinoma escamoso invasivo.¹⁻⁴ La frecuencia se estima en 15 casos por 100.000 habitantes aproximadamente,⁵ predominando en pacientes con fototipos claros sometidos a exposición solar crónica. Ambos sexos se afectan por igual; sin embargo en hombres es más frecuente en cabeza y cuello mientras que en mujeres lo es en extremidades inferiores y mejillas. Raramente afecta a fototipos oscuros o zonas cubiertas. La incidencia es mayor a partir de los 60 años.^{6,7} En 2/3 de los casos la EB aparece como lesión única.^{4,5}

La EB es una entidad con pronóstico favorable a pesar de tratarse de proliferación neoplásica de queratinocitos. Los estudios de mayor tamaño describen un riesgo de 3-5% de progresión a carcinoma invasivo, de ellos 1/3 se estima que producirían metástasis. (En la enfermedad de Bowen de localización genital o eritroplasia de Queyrat, el riesgo de progresión a carcinoma invasivo asciende al 10%).⁶

Se había postulado una posible asociación con neoplasias internas pero en 1989 un metaanálisis de 12 estudios demostró ausencia de asociación y estos datos se corroboraron en un estudio de cohortes poblacionales de 1147 CB en Dinamarca. Por todo ello no se considera actualmente enfermedad paraneoplásica.⁸

La clínica de la EB consiste generalmente en la presencia de manchas o placas eritematosas, descamativas con hiperqueratosis ocasional, bien delimitadas de borde irregular, asintomáticas y de lento crecimiento. Ocasionalmente se ulceran. La pigmentación de las lesiones es infrecuente y sucede sobre todo cuando afectan a las uñas, en forma de erosión, alrededor de las cutículas o causando onicolisis. En estos casos es importante el diagnóstico diferencial con el melanoma maligno.⁹

Figura 1: A. Enfermedad de Bowen de localización subungueal con coloración pigmentada. **B.** Eritroplasia de Queyrat en el glande de aspecto aterciopelado.



Figura 1A

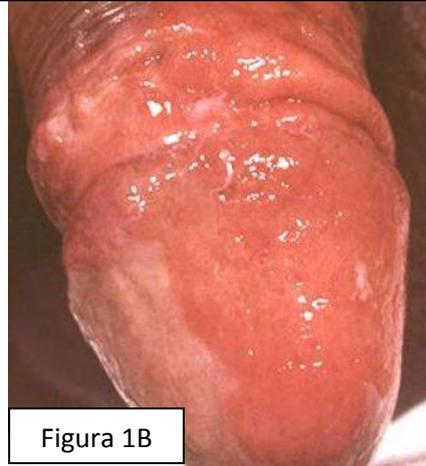


Figura 1B

Otra variante especial sería la localización intertriginosa en donde se objetiva una placa eritematosa con exudación y maceración en grado variable.

La EB, aunque mucho más frecuente en áreas fotoexpuestas, puede también aparecer en cualquier parte de la superficie cutánea o en mucosas (a diferencia de las queratosis actínicas).⁶ Cuando la EB afecta a mucosas, se presenta como una pápula o placa verrugosa o eritematosa de aspecto aterciopelado. Dentro de la afectación mucosa, destacamos la localización en genitales, denominada eritroplasia de Queyrat. Se desarrolla principalmente sobre genitales masculinos a nivel del glande (donde fue descrita inicialmente), pero también puede afectar al prepucio y a la mucosa de la vulva en mujeres. Matizar que cuando la EB se origina sobre piel queratinizada genital se denominará EB del área genital. La edad de aparición de la eritroplasia de Queyrat suele ser entre la 5ª y 6ª década. La lesión consiste en una placa de aspecto aterciopelado y húmedo y curso indolente que puede progresar en 10-26%.^{6,10} Hay autores que diferencian las lesiones con atipia de muy bajo grado, de aspecto parcheado a las que denominan papulosis bowenoide, aunque sin embargo otros autores niegan el carácter maligno de esta última entidad.¹⁰ Tanto en la eritroplasia de Queyrat (EB de mucosa genital), como en la EB de localización periungueal, toma especial importancia el papel del VPH (aunque no parece imprescindible para el desarrollo de EB en estas localizaciones).⁹ En la mucosa genital femenina la EB correspondería al grado III de Neoplasia intraepitelial vulvar (VIN III).

Es interesante recordar también el concepto de eritroplasia de la mucosa oral. A diferencia de la leucoplasia que se presenta como una lesión blanquecina, más frecuente en hombres y la lesión preneoplásica más frecuente en la cavidad oral, la eritroplasia consiste en una placa bien delimitada, aterciopelada, de superficie plana o elevada que afecta por igual a hombres y mujeres y que constituye una entidad muy poco frecuente. Se ha relacionado con ingesta de alcohol, tabaco y liquen escleroatrófico erosivo. Es asintomática e indistinguible clínicamente de una patología inflamatoria. En un alto porcentaje de eritroplasias, tras la biopsia se confirmará el diagnóstico de EB o CE invasivo.¹¹ Se ha sugerido que el porcentaje de recidivas tras diferentes tratamientos es mayor en la EB de mucosa.¹⁰

La EB se presenta en 2/3 de los casos como lesión única. Puede aparecer en áreas cubiertas pero como se ha comentado anteriormente es mucho más frecuente en zonas expuestas. La cabeza, cuello y extremidades son las principales regiones anatómicas afectas.^{5,6}

Es relativamente frecuente un retraso en el diagnóstico de EB así como su confusión con otras entidades como tiña corporis, eczema numular, queratosis seborreica, enfermedad de Paget, carcinoma basal superficial, queratosis actínica o psoriasis. Por ello cualquier lesión diagnosticada (erróneamente) como inflamatoria que cumpla las características de EB y que sea resistente a tratamiento esteroideo debe ser biopsiada. Igualmente, será importante realizar un buen diagnóstico diferencial clínico, que habrá de hacerse con las siguientes entidades:

- Queratosis actínicas (lesiones precursoras de CE. Hasta el momento no se conoce un modo de pronosticar cuál evolucionará a CE)
- Carcinoma escamoso invasivo.
- Carcinoma basocelular (especialmente el subtipo superficial).
- Tiña corporis.
- Liquen simple crónico.
- Enfermedad de Paget de la mama / extramamaria.
- Placa de psoriasis.
- Queratosis liquenoide benigna.
- Eczema.

- Queratosis seborreica irritada.
- Acanthoma de células claras.

La EB puede aparecer de novo o a partir de una queratosis actínica preexistente. La piel, al ser el órgano más extenso y externo del cuerpo constituye la principal barrera de protección frente a agentes externos físicos, químicos y biológicos. Sufre una continua agresión por agentes ambientales pero fundamentalmente por la exposición repetida al sol. La EB se incluye dentro del concepto de cáncer cutáneo no melanoma (CCNM), grupo en el que también se incluye el carcinoma epidermoide invasivo o el carcinoma basocelular (todos con diferenciación epitelial queratinocítica). El CCNM representa el 20% de todos los diagnosticados, tiene en comparación con otros cánceres de origen epitelial una baja tasa de metástasis y por tanto de mortalidad.^{12,13}

La **etiología** de la EB es multifactorial.¹⁴⁻¹⁶ Como entidad cancerígena que es, surgiría por la acumulación secuencial de alteraciones dinámicas en el genoma.¹⁷ Esta afirmación se basa en el descubrimiento de múltiples mutaciones en protooncogenes, que da lugar a oncogenes, que ganan en su función mientras que se produce una pérdida de función en los genes supresores de tumores. Debido a ello las células se hacen resistentes a las señales de terminación del crecimiento y de diferenciación. Así se inicia el proceso de tumoración. Estas mutaciones serían pues las responsables de la transformación de células humanas normales a estados premalignos y finalmente a células con alta malignidad (cancerígenas).¹⁸ Para todo este proceso es necesario que exista tanto la producción de lesiones en ADN como un fallo en los mecanismos de eliminación de estas células con ADN dañado. El recambio que experimenta la epidermis continuamente es de crucial importancia para evitar el acúmulo de daño y la pérdida de funciones fisiológicas de sus células. Es interesante también mencionar el concepto de campo de cancerización. Este término fue acuñado en 1953 por Slaughter.¹⁹ Hace referencia a que el inicio de un cáncer no se debe al cambio a nivel de un única célula sino a un proceso anaplásico que afecta a varias células simultáneamente, en este caso de epitelios circundantes, por exposición al carcinógeno.

Entre las múltiples causas implicadas se encuentran:

- Radiación ultravioleta crónica (UV): Se considera el riesgo más frecuente para CCNM, y por tanto también para EB. La relación entre exposición solar y cáncer de piel fue observada por primera vez por Hyde y Dubreuilh hace aproximadamente un siglo. Las costumbres sociales han aumentado la exposición solar de los habitantes de países occidentales y esto está en relación directa con el aumento de incidencia del CCNM en los últimos 30 años.¹³ Dicha radiación ultravioleta, localizada en la región central del espectro electromagnético, puede ser de tres tipos:

La UVC (100-280nm), de alta energía y capacidad mutagénica, no llega a la superficie terrestre al ser absorbida por la atmósfera.

La UVB (280-320 nm): la mayoría es absorbida en la atmósfera pero un pequeño porcentaje alcanza la superficie terrestre. Puede penetrar hasta la membrana basal de la epidermis. Ejerce un daño directo en el ADN suprimiendo además la inmunidad celular. El daño en el ADN consiste en la formación de dímeros pirimidin-ciclobutano y 6-4 pirimidina-pirimidonas en puntos con 2 pirimidinas adyacentes en la misma hebra de ADN. Consecuentemente esto conduce a una alteración altamente mutagénica: la transición de citosina (C) a timina (T).²⁰ Estas mutaciones específicas inducidas por UVB se han hallado en oncogenes RAS y en genes supresores de tumores p53 y PTCH.²⁰ Existen fuentes artificiales de radiación UVB, usada por ejemplo en el tratamiento de dermatosis como la psoriasis. Hasta el momento no se ha demostrado que aumente el riesgo de CCNM.²¹

La UVA (320-400nm): supone más del 95% de la radiación UV que alcanza la superficie terrestre y es la que más penetra, por lo que es la más implicada en el fotoenvejecimiento y el daño crónico dérmico. Este daño lo ejerce mediante la formación de radicales libres de oxígeno.²² La radiación UVA es capaz de atravesar el cristal de las ventanas.²³

- Radiaciones ionizantes: Los rayos X y otras radiaciones ionizantes pueden ser causa de EB, aunque con menos frecuencia que la UV. Podría explicar el

desarrollo de este tipo de lesión sobre áreas previamente tratadas con radioterapia.¹³

- Carcinógenos químicos: Por ejemplo: la exposición a arsénico (que puede tener un periodo de latencia de hasta 10 años) o la exposición profesional a hidrocarburos aromáticos.²³
- Virus papiloma humano: Se considera un factor de riesgo intrínseco, a diferencia de los anteriores. Es bien conocido que la infección por virus de papiloma humano (VPH) es factor de riesgo para el carcinoma epidermoide, especialmente en inmunodeprimidos y en localización periungueal y genital.^{9,10} El subtipo 16 es el implicado principalmente, aunque otros también se han detectado: 2, 18, 31, 33, 51, 54, 56, 61, 62, y 73.¹⁰
- Inmunosupresión: Los pacientes inmunodeprimidos, ya sea por enfermedad sistémica o por tratamiento inmunosupresor, presentan con mayor frecuencia CCNM, también EB. En estos casos las lesiones aparecen a edad más precoz, son más numerosas y agresivas. Parecen afectar más frecuentemente el tronco que en pacientes inmunocompetentes. Las recidivas son más frecuentes pese a realizar un adecuado tratamiento.²⁴ Es bien conocido que el sistema inmune está implicado en la limitación del desarrollo de tumores en humanos,²⁵ su defecto aumenta la tolerancia a la transformación celular. También juega un papel la inmunosupresión producida por la radiación UV.²⁶
- Otras causas posiblemente implicadas: Predisposición genética como en el caso de ciertas genodermatosis (xeroderma pigmentoso, albinismo oculocutáneo), traumatismos o antecedentes de quemaduras o irritación crónica en la zona.

a.2. Diagnóstico:

Como hemos comentado el diagnóstico se basa en la exploración clínica dermatológica y su confirmación se obtiene mediante la biopsia cutánea. Existen además otros métodos de imagen complementarios no invasivos que luego comentaremos.

Los datos histológicos característicos de la EB son:²⁷ la presencia de anaplasia afectando toda la epidermis con pérdida de la maduración normal de sus componentes, presentando unos queratinocitos atípicos y desordenados. Estos queratinocitos, con elementos de diferenciación hacia la queratinización individual característico de las células disqueratóticas, pueden presentarse como células con núcleos hipercromáticos rodeados por citoplasma eosinófilo o como células con núcleos grandes y abigarrados (poiquilocarinosis). La membrana basal aparenta normalidad pero la atipia de queratinocitos está presente también en epitelio folicular (estos dos rasgos ayudan a diferenciarlos de la queratosis actínica). En la epidermis, además de esta disqueratosis, se objetivan signos más inespecíficos como: hiperqueratosis con paraqueratosis y acantosis. También destaca la presencia de vacuolización, mitosis (pueden ser tripolares o explosivas), células multinucleares así como ocasionales queratinocitos pálidos y grandes denominados pagetoides y distribuidos desordenadamente por toda la epidermis. En dermis papilar se objetiva infiltrado linfocitario moderado.

Además, la EB se puede subclasificar en varios subtipos histológicos:²⁷ Psoriasiforme (cuando hay marcada paraqueratosis y escasa hiperqueratosis); Atrófico (cuando hay escasa acantosis, lo cual es infrecuente); Verrucoso (cuando existe hiperqueratosis con ortoqueratosis y papilomatosis); Irregular (el más pleomórfico, caracterizado por acantosis irregular) y el subtipo menos frecuente (5%) denominado EB pagetoide: Se caracteriza histopatológicamente por la proliferación de células claras en la epidermis debido a la presencia de queratinocitos de citoplasma amplio y pálido que se distribuyen en nidos de forma salpicada por la epidermis. Sin embargo, las lesiones de la enfermedad de Bowen pagetoide suelen mostrar disqueratosis, una hilera basal respetada constituida por pequeñas células basaloides comprimidas, y no se observan células en anillo de sello ni estructuras ductales intraepidérmicas. En los casos en que los rasgos morfológicos de diferenciación glandular estén ausentes, las tinciones inmunohistoquímicas (EMA, CEA, CAM 5.2) ayudarán a establecer el diagnóstico. El diagnóstico diferencial histológico se debe plantear con lesiones que poseen una proliferación en la epidermis de células claras. El patrón distintivo histológico de infiltración epidérmica por parte de las células de Paget ha llevado a la utilización del término «infiltración

pagetoide» para indicar cualquier entidad en que las células se distribuyen aisladas o formando pequeños cúmulos a lo largo de la epidermis. En la mayoría de los casos el diagnóstico correcto se puede alcanzar mediante una evaluación morfológica cuidadosa y mediante la ayuda de una batería de marcadores inmunohistoquímicos.²⁸ Algunos autores refieren que las células claras se deberían a depósitos de glucógeno; otros, basándose en estudios con microscopía electrónica, concluyen que estas células serían el resultado de cambios degenerativos del citoplasma («degeneración hidrópica», confluencia de vacuolas, o bien degeneración de los lisosomas). Son muchos los tumores cutáneos que pueden presentar células claras, tanto benignos (Acantoma de células claras, Tricolemoma, Hidradenoma de células claras, Siringoma de células claras, Dermatofibroma de células claras, etc.) como malignos (Carcinoma basocelular de células claras, Carcinoma sebáceo, Hidroadenocarcinoma de células claras, Carcinoma tricolemal, Porocarcinoma ecino de células claras, Fibroxantoma atípico de células claras, Carcinoma mioepitelial de células claras, Melanoma de células balonzantes, metástasis del carcinoma renal, etc.). Existen estudios que demuestran que de los CE invasivos aquellos que tienen un porcentaje mayor de células claras, con frecuencia se desarrollan sobre EB previa o sobre otras lesiones precursoras, con un patrón como «aparente diferenciación anexial».²⁹

También es interesante diferenciar histológicamente la EB de las QA. Clínicamente las lesiones de QA pueden en ocasiones ser muy similares a la EB y estar localizadas igualmente en áreas fotoexpuestas. En estos casos la histología es de gran ayuda. Se caracterizan por presentar queratinocitos desorganizados y atípicos de predominio en los estratos basales (displasia queratinocítica basal). Además se observa pleomorfismo y núcleos grandes, hipercromáticos, disqueratósicos y apoptóticos. En los casos con ausencia de capa granulosa se objetiva paraqueratosis en la superficie de la lesión. Sin embargo, y a diferencia de la EB, se verá ortoqueratosis coincidiendo con la salida del acrosiringio. La dermis superficial suele mostrar un infiltrado linfoide, más o menos denso, acompañado de elastosis solar.³⁰

Se clasifican en 5 tipos histológicos: QA hipertrófica (hiperqueratosis marcada con áreas de paraqueratosis y engrosamiento epidérmico con papilomatosis); QA atrófica (ausencia de hipertrofia epidérmica); QA acantolítica (separación intraepidérmica de los queratinocitos que puede simular un patrón glandular); QA pigmentada (aumento de melanina) y QA bowenoide. Este último subtipo es el que más nos interesa. Se caracteriza por atipia celular en todos los niveles de la epidermis (displasia queratinocítica total) pero presenta ortoqueratosis en las salidas del acrosiringio. En ocasiones es indistinguible de la EB.³¹

Actualmente la histología sigue siendo el “gold estándar” en el diagnóstico, por lo que cualquier técnica se comparará con ella.²⁷

Además, como complemento de la histología convencional se puede ampliar el estudio patológico con tinciones de inmunohistoquímica (IHQ). Dichas tinciones no se realizan en la rutina diaria pero hay estudios que demuestran la positividad de ciertos marcadores IHQ en la EB. Sin embargo a día de hoy no se conoce su valor pronóstico, dicha cuestión será abordada en nuestro estudio. Dos marcadores interesantes serían el oncogén p53 y el marcador de proliferación Ki67.

El p53 es un gen supresor de tumores y su mutación es frecuente en las neoplasias epidérmicas (in situ e invasivas).³² Además recientemente se ha visto que posee también una función antioxidante, con lo que su inactivación por la radiación UVB contribuiría a aumentar el estrés oxidativo causado por UVA³³.

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 ADN, 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. Entre ellas se encuentra la quinasa dependiente de ciclina (cyclin dependent kinase, CDK) que, en condiciones normales, se une a la ciclina para juntas permitir el paso de la fase de G1 a S.³⁴

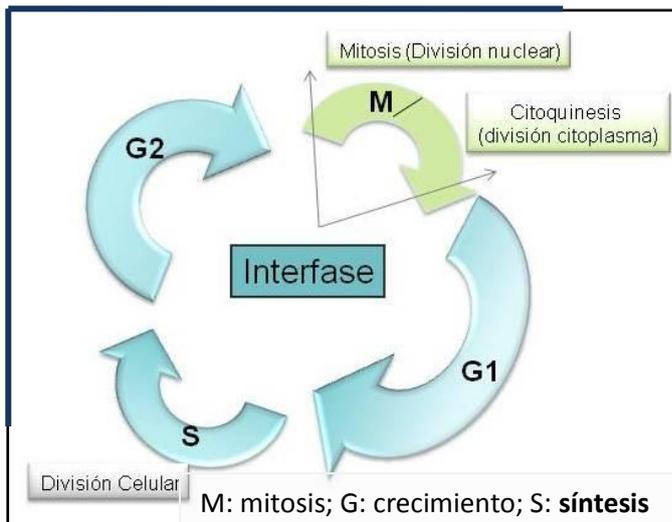


Figura 2. Fases del ciclo celular

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”.³⁵ Es una de las primeras aberraciones claves en el proceso de carcinogénesis cutáneo.³⁶ Se activa cuando la célula recibe agresiones externas (estrés), entre las cuales se encuentra la radiación UV, induciendo fundamentalmente senescencia mediante la parada del ciclo celular, para permitir a la célula reparar su ADN.³⁵ Si la función de reparación no se completa, éste induce muerte celular por apoptosis, con lo que se evita la perpetuación de una célula con ADN mutado.

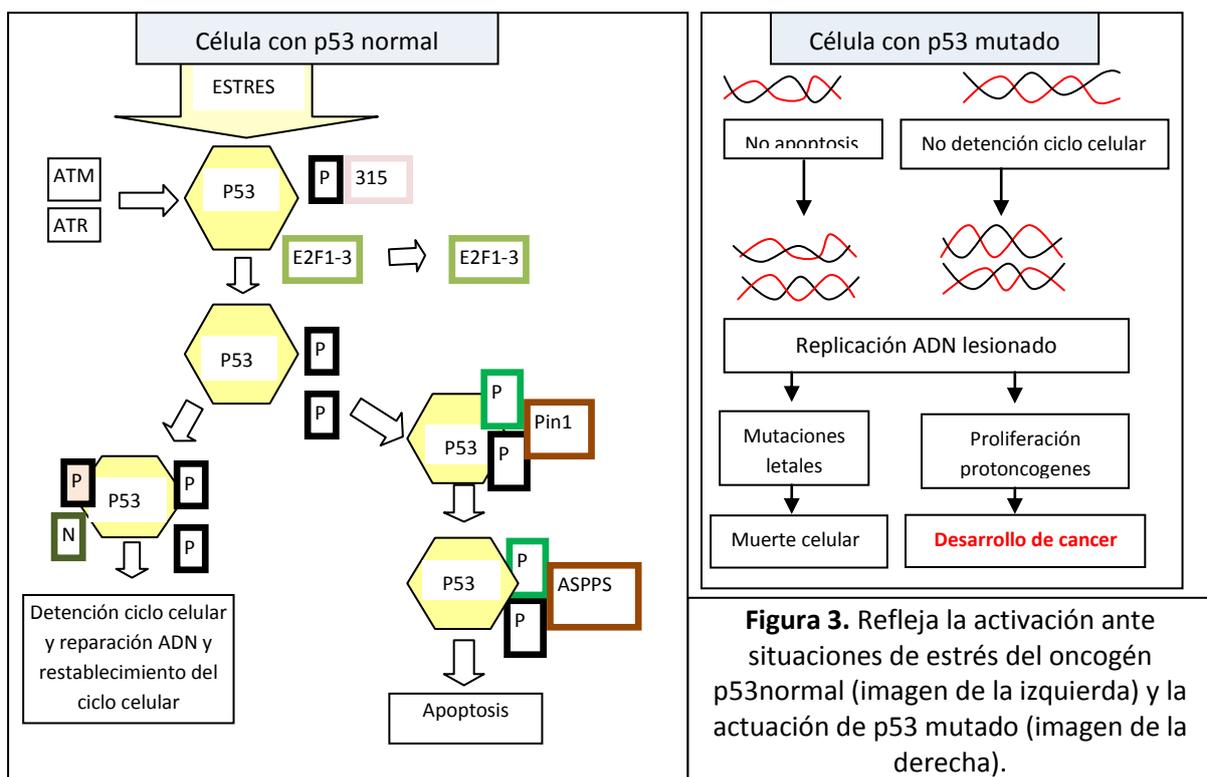


Figura 3. Refleja la activación ante situaciones de estrés del oncogén p53 normal (imagen de la izquierda) y la actuación de p53 mutado (imagen de la derecha).

Se ha visto que p53 está mutado en piel sana fotoexpuesta,³⁷ con porcentajes variables de hasta un 50% de QA, 50% de CB y hasta un 90% de espinocelulares.³⁸ Se han descrito más de 150.000 mutaciones de diferentes orígenes. En el caso de CCNM, el codón 248 es el afectado con más frecuencia, y el 278 es el más específico de CE.³⁹

La mutación en p53 se produce mucho antes de la aparición clínica e histológica de la lesión, ya sea una QA o un CE.⁴⁰ La expresión de p53 es patente en piel fotoexpuesta, pretumoral y tumoral.⁴¹ Ésta se da en forma de agregados, que representarían los clones de células portadoras de p53 mutado presentes en el campo de cancerización.

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.⁴² Para el desarrollo de la EB (como de una QA o un CE invasivo) es necesaria la expansión clonal de los agregados portadores de cierta mutación en p53 (responsable de la multifocalidad), 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 una expansión clonal selectiva de las células portadoras de p53 mutado: la resistencia que adquieren estas células a la apoptosis inducida por UV y la mayor capacidad proliferativa en comparación con el resto de queratinocitos normales.⁴³

El p53 no se expresa en piel sana no fotoexpuesta. Talghini⁴⁴ encontró porcentajes de hasta 41,8% en EB frente al 26,6% en las QA o el 54,6% de los CE. Rudost describió porcentajes de >90% para CE y de hasta 80% para QA.⁴² Hay estudios que describen cómo la expresión del p53 en EB es mayor que en queratosis actínica pero menor que en carcinoma epidermoide invasivo.⁴⁴ Sin embargo, en el estudio publicado por Skazi³², tras comparar el marcaje de p53 en diferentes cánceres cutáneos (Carcinoma basocelular, Carcinoma epidermoide invasivo, Queratoacantoma, EB, Queratosis actínica, Melanoma maligno in situ y Enfermedad de Paget) concluyen que el tumor que presenta la mayor tinción de p53 es precisamente la EB, seguido de Queratoacantoma y CE invasivo.

Respecto al **Ki67**, es un marcador de proliferación celular. Puede expresarse en piel sana pero en baja cantidad. Su intensidad de marcaje aumenta en lesiones precancerosas o malignas.⁴⁵ En el estudio de Talghini comentado previamente describen como se expresaría en el 0,8% de la piel sana, en el 23,7% de las QA, en el 12,3% de la EB y en el 19,3% del CE, sin existir diferencias significativas entre ellos con este último marcador. Se objetiva un Ki67 mayor en CE que en carcinoma de Merkel, por el mayor índice proliferativo en el primero.⁴⁵

Otros marcadores que en la literatura se han descrito como útiles en lesiones precancerosas de cáncer cutáneo no melanoma serían la **ciclina A** (marcador de proliferación celular que actúa tanto en la fase S de replicación de ADN como en el inicio de la mitosis); la **ciclina D1** (pertenece al grupo de proteínas reguladoras de ciclo. Su función se desarrolla en la fase temprana G1, donde permite el paso a fase S. Su aumento de expresión acorta la fase G1 del ciclo celular, y participa en la transformación maligna en el carcinoma de vesícula biliar.⁴⁶ 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.⁴⁷ La sobreexpresión de ciclina D1 se da desde etapas iniciales del desarrollo de cáncer cutáneo).⁴⁸

También se ha estudiado el papel de la **beta-catenina** (molécula implicada en adhesión intercelular y transducción de señales que podría ser clave para activar la invasión y capacidad proliferativa de los tumores malignos). Un estudio publicado por Mihailovici⁴⁹ y colaboradores, objetivó que la EB presentaba un marcaje con distribución difusa de la ciclina A, que era mayor que en queratosis actínicas o que en los carcinomas epidermoides invasivos del estudio. Sin embargo el marcaje de la ciclina D1 era igual en EB y en carcinoma epidermoide, pero mayor que en queratosis actínica. La ausencia o disminución de beta-catenina en membrana fue más frecuente en carcinoma epidermoide que en queratosis actínicas o EB. La expresión aberrante de beta-catenina en localizaciones atípicas no se correlacionaba con el subtipo histológico pero sí con aquellas lesiones donde el índice de marcado de la ciclina A era mayor.

En el estudio publicado por Li y colaboradores,⁵⁰ encuentran también una expresión reducida en EB y en carcinoma epidermoide invasivo de beta-catenina a diferencia de piel sana así como una distribución anormal de la misma en el citoplasma o en el núcleo celular en vez de en la membrana. En este estudio además también encuentran reducción de la expresión de cadherina-E en ambos tipos de tumores. Finalmente otro marcador publicado en relación con la EB es el p16INK4a.⁵¹ Se trata de una proteína supresora tumoral, reguladora del ciclo celular, que inhibe las ciclinas-D en la fase G1 del ciclo celular. Está íntimamente relacionada con el gen del retinoblastoma. Se demostró hace algunos años que en neoplasias escamosas de cuello existe una expresión aumentada del p16INK4a detectada en el momento en que las lesiones evolucionan de displasia de bajo grado a carcinoma escamoso in situ. Posteriormente, en el 2003 se demostró tras un estudio realizado en 203 lesiones (lesiones escamosas benignas, queratosis actínicas y EB) cómo este marcador tenía sensibilidad y especificidad suficientes como para distinguir entre EB (donde el 84% de las muestras analizadas presentaban positividad para p16INK4a) y queratosis actínicas (sólo el 6% de mostraban positividad) u otras lesiones escamosas benignas (ninguna muestra fue positiva para este marcador).⁵¹

Además del gold-estándar, la histología, actualmente existen otras herramientas diagnósticas complementarias que se diferencian de la biopsia por ser *no invasivas* como: la dermatoscopia, la microscopía confocal y el diagnóstico de fluorescencia. La primera de ellas sí es utilizada por muchos dermatólogos de forma habitual, pero las otras dos no están integradas en la rutina diaria actualmente:

- **Dermatoscopia:** Se conoce también como microscopía de epiluminiscencia y mediante un sistema óptico permite detectar estructuras no visibles al ojo humano, como por ejemplo, la presencia de vasos glomerulares que se ha descrito como un signo muy sensible para el diagnóstico de EB. Sin embargo dicha sensibilidad es altamente observador dependiente. Recientemente un estudio ha propuesto la utilidad de esta técnica en el seguimiento de la EB.⁵²
- **Microscopía confocal:** El microscopio confocal es una técnica no invasiva que permite ver in vivo las estructuras de la piel. Suministra una imagen en planos horizontales, similar a las imágenes obtenidas en la dermatoscopia.⁵³ Estas

imágenes son superponibles a cortes histológicos, llegando a una muy buena correlación, lo que nos permite diferenciar el tipo de tumor, estudiar márgenes afectos o recidivas locales en tumores cutáneos. Su principal limitación es la escasa profundidad a la que puede llegar ya que sólo permite estudiar la epidermis y dermis superficial. Esto significa que podría indicarnos que se trata de un tumor epidermoide pero no sería útil para delimitar el borde profundo de un tumor que infiltre o que afecte estructuras dérmicas medias o profundas. Por tanto podría tener algunos porcentajes de falsos diagnósticos de EB que realmente fueran carcinomas epidermoides invasivos. La ventaja que ofrece el confocal respecto el estudio histológico es que es una técnica más rápida, no necesitando todo el proceso de congelación, tinción y procesamiento de la pieza para su análisis.⁵³⁻⁵⁶

- Fluorescencia: ver apartado 1.b.

a.3. Tratamiento:

Actualmente existen diversas opciones terapéuticas para el manejo de la EB. Se pueden clasificar según el tipo de intervención y mecanismo de actuación en médicas, quirúrgicas o mixtas. Cada una tiene una serie de ventajas y desventajas que se detallan a continuación. Habrá que tener en cuenta diversos factores (tamaño, número, localización, repercusión funcional, costes) antes de decantarse por una en concreto.

Ejemplo de tratamientos **médicos tópicos** son:

- 5- Fluorouracilo: agente antineoplásico que interfiere con la síntesis de ADN inhibiendo la timidilato sintetasa y consecuentemente la proliferación celular. Se usa en presentación en crema al 5%, una o 2 veces al día durante 1-3 meses. Puede usarse en oclusión. Puede producir una intensa irritación con la consecuente suspensión de tratamiento. La principal desventaja de este fármaco es que no penetra lo suficiente como para tratar la afectación folicular. Se ha demostrado menos eficaz que TFD.^{4, 57,58} En España hasta hace unos años

estaba comercializada al 5%, actualmente hay que formularla. En Estados Unidos y algunos países de Europa existen preparados comerciales de 5FU en combinación con ácido salicílico.

- Imiquimod 5% crema: es un modificador de respuesta inmune, agonista del toll-like receptor 7 (TLR7) que estimula la respuesta inmune induciendo, sintetizando y liberando citoquinas involucradas en la inmunidad celular. Se han usado diferentes pautas de tratamiento en la EB, desde su uso diario durante 12 a 16 semanas⁵⁹, pasando por el uso semanal durante 16 semanas⁶⁰, o aplicación 3 veces en semana las primeras 4 semanas y 2 veces en semana las siguientes 4 semanas.⁶¹ Produce inflamación de la zona tratada. Sería una opción muy útil en el tratamiento de lesiones de gran tamaño, en piernas o genitales.^{4,62} Además dado que en ocasiones son pacientes con daño actínico crónico, por ser este un agente cuya diana terapéutica es todo un campo de cancerización, puede obtener ventajas adicionales. Un estudio publicado recientemente en 2011 revisando las series de EB tratadas con Imiquimod tópico describe curaciones clínicas completas de hasta 73-88% con periodos de seguimiento de hasta 19 meses, y defiende esta opción como a elegir antes de la cirugía.⁶² Este mismo grupo de trabajo ha publicado recientemente una mejor respuesta y tolerancia en aquellos EB tratados con TFD e imiquimod en combinación que dichos tratamientos en monoterapia.⁶³ Sin embargo la EB no constituye una indicación aprobada para tratamiento con imiquimod.
- La radioterapia puede considerarse cuando haya lesiones múltiples ó en pacientes donde esté contraindicada la cirugía. Debe evitarse en piernas dada la mala cicatrización.⁴
- La TFD de la que a continuación hablaremos ha sido usada con excelentes resultados cosméticos.

Dentro de las opciones **quirúrgicas** se encuadran:

- Escisión simple con márgenes: es uno de los tratamientos más frecuentemente realizado en lesiones pequeñas y áreas accesibles. Consiste en extirpar la lesión mediante escisión quirúrgica con bisturí frío, generalmente en forma de huso, incluyendo unos márgenes de 0,5-1cm más allá de la lesión clínicamente visible. En región perianal los márgenes deben ser mayores. Las recurrencias descritas con este tratamiento son del 5,5% en 5 años.^{4,6, 64}
- Cirugía micrográfica de Mohs: es un método excelente para las lesiones mayores, mal delimitadas o recurrentes de cabeza y cuello así como aquellas donde la preservación de tejido es importante.^{4, 65} Consiste en la extirpación sistemática del tumor con márgenes pequeños seguido de estudio histológico intraoperatorio del 100% de los márgenes. El tumor es extirpado en sucesivos estadíos, y guiado por el análisis histológico tridimensional de los bordes, el cirujano puede ir dibujando toda el área tumoral y localizar nidos tumorales que se escaparían usando un método convencional. Permite así preservar una mayor cantidad de tejido sano perilesional. Sin embargo, pese al análisis exhaustivo de la muestra, se han descritos recidivas de hasta el 6% de los casos en 5 años.⁶
- El curetaje, electrocoagulación, electrodesecación, crioterapia y ablación láser (laser de argón, dióxido de carbono o Neodinio-Yag): Todas ellas tienen la desventaja de no permitir el estudio histológico. Además no penetran lo suficiente como para alcanzar anejos. Las ventajas son su seguridad y comodidad así como eficiencia.

En concreto, con la crioterapia se describen porcentajes de curación de EB del 90-95% aplicando diversos protocolos terapéuticos. Se recomiendan 3 ciclos de congelación de 20 segundos que se repetirán durante varias semanas, conlleva asociado riesgo de cicatrización residual así como dolor intenso. Los melanocitos son más sensibles al frío que los queratinocitos, por lo que este tratamiento puede dejar hipopigmentación residual. Otras opciones serían ciclos únicos de 30 segundos o 2 ciclos de 20 segundos. Se han descrito recurrencias del 13% a los 5 años.⁶ Comparado con TFD se ha mostrado menos eficaz.^{4, 66}

La combinación de las terapias descritas anteriormente (ej: curetaje más crioterapia) permite efectos sinérgicos, generalmente sin potenciar los efectos adversos. Sin embargo no existen hasta el momento ensayos clínicos publicados con evidencia suficiente sobre la eficacia y seguridad exacta de cada combinación de tratamiento.

Por ello, todos los pacientes diagnosticados y tratados de EB deberán realizar visitas de seguimiento cada 6-12 meses (más frecuente si son pacientes de alto riesgo) con evaluación de toda la superficie corporal.

Además tras el diagnóstico se deberá hacer hincapié en la importancia de la fotoprotección de forma rutinaria, frente a radiación UVB y UVA, ya que como se ha comentado ambas están implicadas en la carcinogénesis de esta enfermedad.

b.TERAPIA FOTODINÁMICA (TFD)

b.1. Antecedentes históricos

El uso de sustancias fotosensibilizantes y exposición solar posterior para el tratamiento de enfermedades dermatológicas data del antiguo Egipto y la antigua Grecia. Estas civilizaciones utilizaban psoralenos contenidos en plantas para el tratamiento de dermatosis como psoriasis o vitíligo.¹ Este concepto, generalmente conocido como fotoquimioterapia es aplicable a la fototerapia PUVA, a la fotoquimioterapia extracorpórea (fotoféresis) y a la terapia fotodinámica (TFD).

El término “fotodinámico” implica reacciones biológicas mediadas por un fotosensibilizante en las que se producía un consumo de oxígeno.⁶⁶

La TFD es una modalidad que comprende la administración de un fotosensibilizante que se acumula en las células diana seguido de la irradiación de la lesión con una fuente de luz adecuada en presencia de oxígeno. La combinación de tres elementos inicialmente no tóxicos, oxígeno, luz y fotosensibilizante, es la responsable de la destrucción tisular.

El uso creciente de la TFD se basa en los trabajos pioneros de Dougherty y colaboradores⁶⁷, quienes presentan en 1978 estudios de la aplicación de esta novedosa técnica para el tratamiento de cáncer cutáneo y otras neoplasias. Desde entonces, la TFD ha ganado un creciente interés en la medicina habiendo sido aprobada por la FDA para el tratamiento de determinados tumores en países como Canadá, Japón, Francia, Noruega, Alemania y Estados Unidos. Recientes investigaciones han demostrado además su aplicación con éxito en otras indicaciones no oncológicas como Arterioesclerosis⁶⁸, enfermedades infecciosas⁶⁹ y artritis reumatoide.⁷⁰ La TFD ha ganado un creciente interés habiendo sido aprobada por la FDA para el tratamiento de determinados tumores y entidades no oncológicas en distintos países.⁶⁸⁻⁷⁰

En concreto, dada la accesibilidad de la piel a la exposición a una fuente de luz, el uso de la TFD en dermatología es cada vez más común. Múltiples dermatosis cancerosas y precancerosas, sobre todo queratosis actínicas y epitelomas basocelulares han mostrado buena respuesta al tratamiento con TFD. Estudios actuales tratan de evaluar su eficacia en otras dermatosis tumorales, inflamatorias e infecciosas.⁷² También es importante valorar el tiempo de mantenimiento de las respuestas así como determinar los parámetros óptimos en cada caso y encontrar la manera de disminuir los efectos adversos.

b.2 Mecanismo de acción:

La TFD consiste en la administración de un FS que se acumula selectivamente en determinadas células o tejidos, de forma que al ser iluminados en presencia de oxígeno y con una luz de adecuada longitud de onda y en dosis suficiente, se produce como resultado la fotooxidación de materiales biológicos y la consecuente muerte celular.^{58,71}

El FS se acumula preferentemente en las células tumorales y al estimularse por la fuente de luz desencadena la reacción fotoquímica que a su vez originará tanto la alteración vascular, inflamación y respuesta inmunitaria del huésped como la muerte celular y destrucción selectiva del tumor. La penetración profunda del FS tópico no es necesaria porque la EB es intraepidérmica, pero debe abordarse con precaución, ya que puede haber focos invasores menos susceptibles a TFD.^{58,71}

Contraindicaciones

Según la FDA (Food and drugs administration) la TFD no debería aplicarse en las siguientes circunstancias:^{58,71}

- Sensibilidad cutánea a la luz, porfirias y alergia a porfirinas.
- La crema de MAL (Metvix®) contiene aceite de nueces y almendras, por lo que deben evitarse si hay hipersensibilidad.
- La TFD se considera clase C en las embarazadas.
- No está autorizado su uso en pediatría.
- No está autorizado en mujeres lactantes.
- Uso de corticoides tópicos dos semanas antes de la sesión de TFD en el área a tratar.
- Uso de retinoides tópicos y sistémicos, hidroxiácidos tópicos, quimioterapia e inmunoterapia cuatro semanas antes.

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. El eritema y edema producidos pueden durar hasta 2 semanas. También pueden darse prurito, descamación, hiperpigmentación postinflamatoria y, menos frecuentemente, ulceración, costras, pústulas, erosiones, vesículas/ampollas e incluso cicatrices. De forma extraordinaria se han descrito urticarias, infecciones cutáneas o dermatitis de contacto.⁷³

El dolor, que es sin duda el efecto adverso más frecuente, suele ser proporcional a la extensión de la superficie tratada y es más intenso en fototipos claros. Se han descrito diferentes estrategias para intentar minimizarlo:⁷³

- Avisar previamente al paciente y realizar “talkestesia” (anestesia mediante la conversación) durante la aplicación del tratamiento.
- Paracetamol 1 gramo previo a la sesión.
- Infiltración subcutánea de anestesia sin adrenalina (una vasoconstricción disminuiría el oxígeno de la zona, imprescindible para el proceso fotodinámico).
- Bloqueo nervioso regional.
- Agua vaporizada durante la iluminación.
- Reducción de la energía de la luz.
- Pausas durante la iluminación.

b.3. Fotosensibilizantes

Las características que debería reunir un FS para la efectividad del tratamiento fotodinámico serían: ^{74,75}

1. Selectividad por el tejido o células a tratar.
2. Distribución homogénea en el tejido diana.
3. Lipofilia para difundir a través de las membranas biológicas.
4. Tiempo breve entre su administración y la acumulación en los tejidos a tratar.
5. Vida media corta y eliminación más rápida de los tejidos normales.
6. Activación a longitudes de onda con penetración óptima en el tejido a tratar.
7. Alto rendimiento en la producción de radicales de oxígeno.
8. Escasa toxicidad en la oscuridad.

Los FS y precursores más usados en TFD clínica y experimental se resumen en la figura 4.⁷⁴ Se clasifican en sistémicos (de *primera generación*: hematoporfirina, porfímero sódico; de *segunda generación*: derivados del anillo tetrapirrólico, con picos máximos de absorción en 660 y 850 nm, como clorinas, cianinas, ftalocianinas, porfíricos u otras porfirinas)⁷⁴ y precursores de FS tópicos (ALA y MAL).

1. PORFIRINAS^{1,76,77}

a. Derivados de porfirinas:

- Derivado de la hematoporfirina.
- Dihematoporfirin éster/éter.
- Porfímero sódico.
- Tetrafenilporfirinas.

b. Precursores de porfirinas:

- Ácido delta-aminolevulínico (ALA).
- Ácido metilaminolevulínico (MAL).

2. PORFINAS⁷⁸

3. PTALOCIANINAS⁷⁹⁻⁸⁰

4. PORFICENOS

5. CLORINAS⁸¹⁻⁸⁵

- Derivado benzoporfirínico anillo A monoácido
- N-aspartil-clorina e
- ATX-S10
- Tin etiopurpurin
- Meso-tetra(hidroxifenil)-clorina

6. FEOFORBIDES⁸⁵

7. LUTETIUM TEXAPIRINA⁸⁶

8. **OTROS:** Fluoresceína, Antracenos, Tetraciclinas, Furocumarinas, Purpurinas, Fenotiazinas, Rosa de Bengala, Azul, verde o violeta de metileno, Verding, Hipocrelina, Hipericina.⁸⁵

Fig4: Fotosensibilizantes usados en TFD

El espectro de absorción de las porfirinas tiene un pico máximo en la banda de Soret (360-400 nm) y otros picos menores en la banda Q (500 y 630 nm). En concreto el de la protoporfirina IX (PpIX) *in vivo* tiene bandas a 408 nm, 510 nm, 543 nm, 583 nm y 633 nm.⁸⁷ El primero proporciona la mayor inactivación celular, mientras que para una mayor penetración tisular, debemos utilizar el último, aunque sea menos potente. A mayor longitud de onda se obtiene mayor penetración y aunque nos alejemos del pico máximo de la PpIX, conseguimos penetraciones significativas a partir de 600nm (aproximadamente 5 mm).

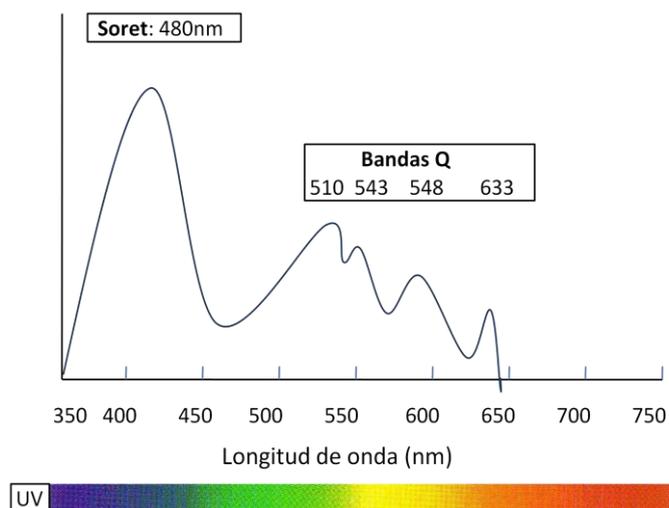


Fig 5. Espectro de absorción visible de Porfirina IX.

Las moléculas de porfirinas están en su estado basal y cuando son irradiadas con una luz de adecuada longitud de onda pasan a un nivel energético superior e inestable: estado singlete. Estas moléculas de fotosensibilizante excitadas tienden a perder esa energía y vuelven a su estado energético basal de diversas maneras, una de ellas es emitiendo fluorescencia, lo que en la clínica nos permite realizar la técnica diagnóstica de fluorescencia. Esto es posible ya que las moléculas de PpIX son fluorescentes y por tanto tienen la capacidad que acabamos de describir: tras ser estimuladas por una luz adecuada tienden a recuperar su estado basal desprendiendo una radiación de mayor longitud de onda y menor energía que la que las estimuló (fluorescencia roja). La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la intensidad de la radiación y a la concentración de la sustancia fluorescente en el tejido, es decir, del agente fotosensibilizante.

Los primeros en aportar la idea de la "fotosensibilización endógena" del tejido tumoral fueron Kennedy y col.⁸⁸ Los FS tópicos son los más utilizados en dermatología. Ofrecen la ventaja de disminuir el riesgo de fototoxicidad al minimizar el área expuesta y mayor sencillez de administración. En este caso, en lugar de administrar el fotosensibilizante se aplica un precursor del mismo, el ácido aminolevulínico (ALA) y su precursor: el ácido metil-aminolevulínico (MAL), que se convierten en el fotosensibilizante activo, la protoporfirina IX (PpIX), y como todo buen fotosensibilizante es acumulado en determinadas células o tejidos.⁸⁹

A diferencia de los fotosensibilizantes administrados por vía intravenosa, el ALA tiene las ventajas de que es efectivo tanto por vía oral como por vía tópica. Además, otra de las cualidades que posee es que a las 24-48 horas de su administración el fotosensibilizante ya ha sido totalmente eliminado de los tejidos, no provocando una fotosensibilidad prolongada en el tiempo.⁸⁷ El MAL es el único aprobado por la Agencia Europea del Medicamento para su uso en TFD en dermatología.⁸⁰ Existen FS denominados de tercera generación que incorporan moléculas como anticuerpos monoclonales, formulación en liposomas o en nanosomas y adenovirus fotosensibilizantes pero aún no disponibles en práctica habitual.⁷⁶

Siguiendo la vía de la síntesis del grupo hemo entenderemos el papel que juegan estos FS en el tratamiento fotodinámico. El ALA es el primer compuesto intermedio de la síntesis de las porfirinas, se forma en el interior de la mitocondria a partir de glicina y succinil-CoA mediante la enzima ALA-sintetasa. Ésta enzima se sitúa en la membrana mitocondrial interna y es el principal regulador de la vía.

Una vez formado el ALA éste difunde de la mitocondria al citoplasma, donde tras varios pasos enzimáticos, se transforma en coproporfirinógeno III, el cual entra de nuevo en la mitocondria. Allí, tras sucesivas reacciones enzimáticas, se transforma en PpIX, que con la incorporación de un ión ferroso por la enzima ferroquelatasa, se transforma en el grupo hemo.⁹⁰

Esta vía de la síntesis del hemo está regulada por la disponibilidad de sustrato y por un sistema de retroalimentación negativo, que inhibe a la enzima ALA-sintetasa directamente. Si se administra ALA (o MAL que sufre desmetilación inmediatamente tras entrar en la célula) de forma exógena este control es rebasado, y entonces se produce una superproducción de porfirinas, particularmente de PpIX, ya que sólo la ferroquelatasa está limitada.⁹⁰ Esta limitación exclusiva de la ferroquelatasa justifica el aumento selectivo del FS PpIX tras administrar ALA ó MAL.^{87,90} (Fig 6).

De esta forma las células desarrollarán fluorescencia debida al acúmulo de esta molécula fluorescente, la PpIX, convirtiéndose así en células fotosensibilizadas.

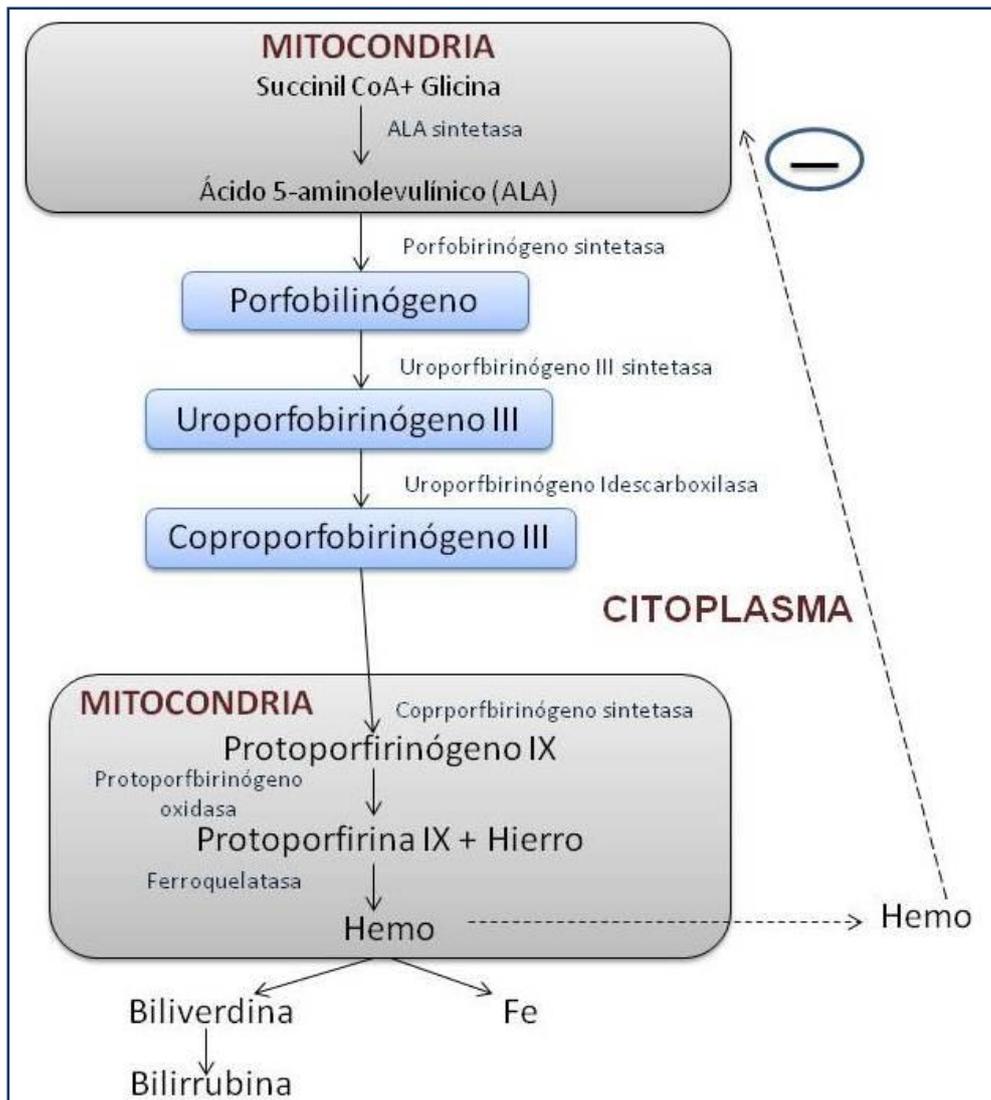


Fig 6. Incorporación del precursor del FS a la vía de síntesis del grupo hemo.

El ALA se capta por transporte activo a través de las membranas celulares. Es una molécula hidrofílica y atraviesa pobremente las membranas celulares. Para alcanzar niveles relevantes de PpIX intracelular se requiere su administración a altas concentraciones (20%) y mantener largo tiempo de aplicación antes de iluminar (de 4 a 8 horas).⁸⁷

El MAL es mucho más lipofílico y con mayor penetración tisular en menos tiempo (3 horas).^{58,91} Esto le permite una localización tumoral más selectiva, homogénea y un mayor rendimiento fotodinámico.^{2,66} De hecho en la EB se alcanzan curaciones de hasta el 95% frente al 82% obtenido con ALA-TFD.⁵⁷ En cuanto al mecanismo de acción parece que parte se hidroliza a ALA, pero también existe evidencia de

incorporación directa de MAL a la ruta sintética de las porfirinas, e incluso de efectos estimulantes del MAL en la ruta porfirínica.⁹² Como ventaja adicional, los pacientes refieren menor dolor durante la iluminación.⁹²

La penetración del FS tópico es influenciada por diferentes factores. Así se verá retardada por el grosor del estrato córneo, mientras que el curetaje, los peelings químicos, o el pretratamiento con acetona puede ayudar a los precursores a alcanzar la profundidad adecuada dentro de la piel, lo que aumenta la efectividad de la TFD. La existencia de un daño actínico extenso, abrasiones de la piel o de inflamación aumentan también la absorción percutánea.

El tiempo de aplicación del FS hasta su iluminación por la luz varía según los protocolos entre 1 y hasta 14 horas, aunque tiempos tan prolongados no parecen necesarios.⁹³

b.4. Fuentes de luz

La fuente de luz utilizada en TFD viene determinada por el espectro de excitación del FS, la capacidad de penetración de la luz emitida en los tejidos y la fluencia (densidad de energía) de la misma. Una fuente de luz con espectro de emisión en la absorción del FS y con una buena penetración en los tejidos determina una efectividad máxima de la TFD.

La luz ideal en el tratamiento de TFD en su uso en dermatología debería cumplir los siguientes requisitos:⁹³⁻⁹⁶

1. Emitir en una longitud de onda que sea absorbida por el FS y capaz de penetrar en la piel para alcanzar su diana.
2. Tener adecuada fluencia y duración para que tenga lugar la reacción fotodinámica.
3. Causar mínima molestia y eritema. No producir costras ni púrpura y permitir una recuperación rápida del daño tisular causado.
4. Poder administrarse en poco tiempo.

Penetración de la luz en los tejidos:

La penetración de la luz a través de los tejidos depende de las características del mismo y de la longitud de onda de la luz utilizada. El tejido diana puede modificar la absorción mediante: absorción óptica de cromóforos tisulares endógenos (hemoglobina); dispersión óptica (en la piel hace que la penetración real de la luz roja de 630nm sea de 1-3mm)⁹⁷ ó por la presencia del FS.

Longitudes menores de 600nm son absorbidas por hemoglobina y mayores de 1300nm por el agua. Fotones de longitudes mayores a 850nm escasamente generan oxígeno singlete. En general, la penetración de una fuente de luz es de 1-2 mm para 400-500 nm, de 5 mm para 630 y de 10 mm para 700-850 nm. La mayoría de las investigaciones se han centrado en el rango azul (400nm) que se sitúa en el pico máximo de absorción de las porfirinas y en la luz roja (630 nm), que aunque tiene un pico menor, es capaz de penetrar más profundamente.^{93,97}

Dosimetría:

La dosis de TFD es el producto de la concentración local de PpIX y la fluencia de la fuente luminosa (J/cm^2). Dosis demasiado bajas producen un daño subletal insuficiente mientras que dosis excesivamente altas producirían una deprivación de oxígeno y disminución de eficacia del proceso fotodinámico.

En la EB se han utilizado diferentes fluencias que varían desde los 10 a los 240 J/cm^2 . También los esquemas varían desde una sesión a varias (fraccionando), con tiempo entre sesiones también variable entre 1-4 semanas. Lo más usado es el esquema de 2 sesiones separadas por una semana.⁵⁸

Tipos de fuentes de luz:

Para realizar TFD en dermatología se utilizan distintos dispositivos:⁵⁸

- Luces incoherentes/fluorescentes: abarca todo el espectro de luz.
- LEDs (Light emitting diodes): semiconductores de pequeño tamaño que emiten longitudes de onda estrecha (20-50nm), sin emisión infrarroja ni ultravioleta.
- Láser: emiten una longitud de onda concreta, coherente y colimada. Permite seleccionar la longitud de onda deseada para cada FS.⁹⁴
- Luz pulsada intensa: faltan estudios que determinen su eficacia en la EB
- Luz natural: algún estudio demuestra que es tan efectiva como los LEDs⁹⁸

Las luces no coherentes permiten tratar áreas más amplias y son más baratas que los láseres. Las más utilizadas son la luz azul, roja y la luz intensa pulsada. Los LEDs son los más utilizados actualmente. Los láseres permiten seleccionar con exactitud la longitud de onda del FS, maximizando la penetración en los tejidos, ya que tiene menor dispersión que las luces no coherentes. Se ha utilizado el laser de colorante pulsado de longitud de onda corta (585 nm), el laser de colorante pulsado de longitud larga (595 nm) o el laser de diodo (638 nm) entre otros. Los escasos estudios comparativos existentes hasta el momento entre distintas fuentes de luz, no muestran ventajas en la utilización de láseres frente a luces no coherentes como fuentes de luz en TFD en general ni en TFD para EB en particular,⁵⁸ tampoco de localización mucosa.⁹⁹ Un artículo publicado recientemente¹⁰⁰ afirma que se obtenían un 10% más de curaciones histológicas de EB con luz LED que con láser, pero no obtuvieron significación estadística.

b.5. Diagnóstico de fluorescencia:

El diagnóstico por fluorescencia (DF), mal llamado diagnóstico fotodinámico, es un procedimiento de diagnóstico por la imagen que nos permite delimitar los tejidos neoplásicos y diferenciarlos de los tejidos sanos peritumorales. Esto puede hacerse porque los tejidos patológicos producen y acumulan mayores cantidades de porfirinas a partir del MAL que los tejidos sanos.^{101,102}

Esta técnica se basa en la capacidad que tienen ciertas sustancias de emitir fluorescencia, la cual puede ser captada fácilmente mediante sistemas adaptados de fotografía digital. Dicha fluorescencia será la guía para detectar o delimitar tumores y en concreto lesiones de EB en nuestro estudio.¹⁰²

Dicho diagnóstico por fluorescencia consiste en la detección de la fluorescencia roja emitida por la PpIX tras ser iluminada una lesión cutánea con luz de longitud de onda entre 370-400 nm (como luz de Wood), a la que previamente se ha aplicado durante unas horas un FS como el ALA o el MAL.¹⁰³ Se puede fotografiar con unos sistemas de flashes ultravioletas acoplados a una cámara digital.¹⁰⁴ Una mayor fluorescencia se correlaciona histológicamente con mayor cantidad de PpIX.¹⁰⁵ El

potencial del DF aún se desconoce, no sólo en la delimitación de las lesiones, sino también para valoración de respuesta terapéutica.

Tiempo de incubación del FS para el diagnóstico de fluorescencia

Si bien el tiempo de aplicación del fotosensibilizante usando MAL para la TFD es de 3 horas, el diagnóstico puede realizarse o bien transcurridas esas 3 horas estándar o bien se puede incrementar el tiempo de incubación hasta 5 o 6 horas, cuando se estima que la intensidad de la fluorescencia es mayor.

Incluso algunos autores que practican el diagnóstico de fluorescencia de forma rutinaria antes de las intervenciones quirúrgicas prefieren un periodo de oclusión de 24 horas, observándose igualmente una buena delimitación de la fluorescencia de la lesión tumoral, y con un grado de fluorescencia más débil perilesional.¹⁰⁶

Fotografía con flash de luz ultravioleta para el DF

Para poder obtener fluorescencia mediante de luz ultravioleta, necesitamos una fuente de luz que contenga un filtro transmisor o de excitación de radiaciones ultravioleta, para que solo permita el paso de longitudes de onda en ese espectro, bloqueando el resto de longitudes de onda mayores del espectro visible. Un ejemplo clásico y comúnmente empleado en dermatología es la lámpara o luz de Wood.

Existen múltiples fuentes de luz ultravioleta en el mercado y si bien para la simple observación del paciente no se precisan lámparas costosas de gran potencia, no sucede lo mismo si queremos realizar fotografía de fluorescencia ya que dichas lámparas tienen poca emisión de radiación, por lo que para tomar la fotografía necesitaríamos largos tiempos de exposición, que el individuo no se mueva y que la cámara esté sujeta mediante un trípode.

Algunos autores recomiendan lámparas de Wood muy potentes para la realización de este tipo de fotografía, pero no evitan la necesidad de realizar la fotografía a oscuras y la dificultad del enfoque si realizamos la fotografía con cámaras digitales sin capacidad de foco manual.

Para evitar todos estos problemas se aconseja la realización de flashes adaptados que emiten luz ultravioleta.^{102,107}

La primera referencia para poder realizar fotografía de fluorescencia en una habitación iluminada se la debemos a Myers.¹⁰⁷ Este autor acopló al flash un filtro de la serie Wratten 47B (filtro excitador o emisor de luz ultravioleta) y un filtro amarillo delante del objetivo, como se hacía habitualmente para este tipo de fotografías, pero utilizó una máquina fotográfica con velocidad de sincronización del flash elevada, superior a 1/125, siendo lo habitual 1/60, lo que le permitía que la luz visible ambiental no quedara reflejada en la película.

Afortunadamente la mayoría de las máquinas que utilizamos actualmente nos permiten utilizar velocidades de sincronización con el flash elevadas y si adaptamos el flash podremos realizar fotografía de fluorescencia sin necesidad de estar en un cuarto oscuro.

Si quisiéramos modificar nuestro equipo fotográfico para la realización de la fotografía de fluorescencia, primero tendríamos que utilizar varios flashes de gran potencia, para tener mayor intensidad de luz, segundo acoplar delante de los flashes, filtros excitadores de luz ultravioleta, como los clásicos de Wratten 18^a o como el Schott UG1 y para evitar la luz ultravioleta reflejada un filtro barrera como el Wratten 2A o 2. Este último generalmente no es necesario en muchas cámaras digitales al estar incorporados dentro de la cámara.

No obstante existen en el mercado dos sistemas ya comercializados, uno denominado Clear-Stone® que utiliza dos flashes sincronizados que emiten luz ultravioleta y que están acoplados tanto a cámaras digitales semiprofesionales como reflex de Olympus® que dan excelentes resultados. Las imágenes pueden ser capturadas directamente en el ordenador mediante un software específico del sistema para su visualización y almacenaje.

El otro sistema comercializado es DyaDerm®, que está compuesto por una cámara de vídeo Sony de 12 bit, con un flash de luz xenon adaptado con un filtro ultravioleta entre 370-440nm. La cámara de vídeo está ajustada mediante un brazo a un ordenador Pentium IV equipado con un software capturador de imágenes. El flash

emite siete pulsos lumínicos por segundo a la piel los cuales son capturados por la videocámara, que está equipada con un filtro Schott de 455nm que elimina la luz externa excitadora. Este sistema está siendo adaptado en algunos centros para la realización de estudios de investigación.¹⁰⁸

Concepto de Fluorescencia

La luz ultravioleta tiene una longitud de onda menor que la luz visible. Si la aplicamos sobre una sustancia, esta cambia y emite longitudes de onda más largas, dentro del espectro visible (400-700nm, pudiendo ser amarillo, verde o rosa).^{71,90} Cuando esta respuesta se produce únicamente en presencia del estímulo energético (luz ultravioleta) recibe el nombre de fluorescencia; pero cuando la respuesta se produce tras haber retirado el estímulo se denomina fosforescencia.

Tanto la fluorescencia como la fosforescencia poseen luminiscencia, término general utilizado para la emisión de radiación.

En la naturaleza existen muchas sustancias que poseen la capacidad per se de producir fluorescencia, como algunas rocas, minerales, plantas, hongos, bacterias y muchas secreciones y tejidos corporales. A este tipo de fluorescencia la denominamos fluorescencia primaria o autofluorescencia. También existe la fosforescencia en la naturaleza, como por ejemplo en el caso de algunos insectos.

Por otro lado existen otros productos, los fluorocromos, que al ser introducidos o aplicados en un sujeto provocan fluorescencia secundaria. Este tipo de marcadores son utilizados frecuentemente en el campo de la investigación, en laboratorios, en la medicina forense, o también en múltiples productos de la vida cotidiana, como son los detergentes y polvos de lavado, o en pinturas y sustancias plásticas para aumentar su visibilidad.¹⁰⁹

b.6. Mecanismo de destrucción tisular

La eficacia de la TFD se basa en la conjunción de la muerte celular directa, el daño vascular, la inflamación y la respuesta inmunitaria del huésped. Todo ello se consigue a través de diferentes mecanismos:¹¹⁰

Fotoquímica de la TFD

Tras la absorción de la luz el FS es transformado desde su estado basal a un estado electrónicamente excitado, pero inestable y de vida media muy corta (10^{-6} a 10^{-9} segundos). El FS excitado tiende a ceder el exceso de energía, bien volviendo a su estado basal y liberándola en forma de fluorescencia (radiación de menor energía y mayor longitud de onda que la que absorbió) o bien pasando a estado triplete. El estado triplete interacciona con las moléculas circundantes dando lugar a dos tipos de reacción fotooxidativa:

1. Tipo I: por transferencia de electrones, originando radicales libres de oxígeno (peróxidos, anión superóxido y radicales hidroxilo).
2. Tipo II: por transferencia de energía al oxígeno, dando lugar a la formación de oxígeno singlete y al retorno del FS a su estado basal.

Ambas reacciones ocurren de forma simultánea y en competición, aunque parece que el oxígeno singlete es el mayor responsable del daño producido por la TFD.

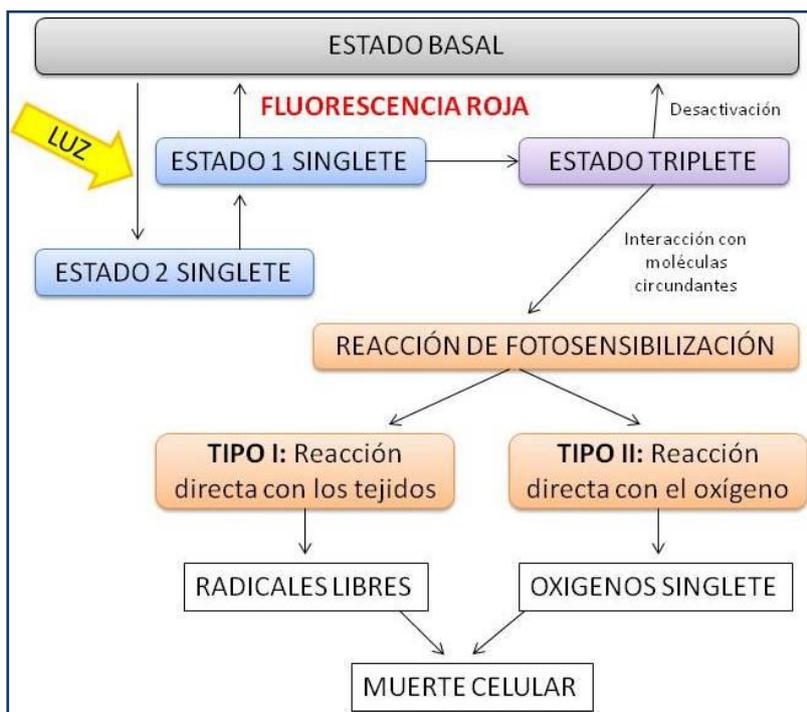


Fig.7: Diagrama de acción de un FS.

Ambas reacciones ocurren simultáneamente y en competición, aunque parece que el oxígeno singlete es el mayor responsable del daño producido por la TFD.

Efectos directos

La reacción fotodinámica produce daño celular directo, que en el caso del MAL lleva a apoptosis celular.¹¹¹

Las principales dianas son los lípidos y proteínas celulares. Posee sin embargo un bajo potencial de producir daño de ADN, lo que le confiere seguridad.

Existen ciertas características de las células tumorales e inflamatorias que facilitan la especificidad y preservación de estructuras normales, es decir, hacen más sensibles al daño fotodinámico a dichas células tumorales¹¹². Se cree que éstas poseen una síntesis aumentada de porfirinas secundaria a una actividad enzimática en algún punto de síntesis del grupo hemo.¹¹³⁻¹¹⁷ Pero es principalmente la alteración en la superficie cutánea (disrupción de estrato córneo) el factor que más influye en el acúmulo de PpIX en las células tumorales.¹¹⁴

Efectos indirectos

- Regulación de la angiogénesis: La vasculatura parece ser la diana más crítica del fotodaño indirecto, resultando deprivación de oxígeno y nutrientes en la lesión. Tras la TFD se demuestra con ecografía doppler una crítica disminución de flujo sanguíneo, que persiste 24 horas.¹¹⁸
- Regulación de la matriz extracelular:¹¹⁹ Aumenta la expresión y activación de metaloproteinasas (MPP) y disminuye la de sus inhibidores. Esto puede contribuir por un lado a frenar la proliferación tumoral y por otro al excelente resultado cosmético de la TFD.
- Efecto inmunológico:¹²⁰ La TFD libera potentes mediadores de la inflamación, como reactantes de fase aguda, sustancias vasoactivas, peroxidasas, proteinasas, componentes del complemento, factores de crecimiento y otros inmunoreguladores: interleucinas (IL) 6, 1 β y 2, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y factor estimulante de colonias granulocíticas (GCSF). Estas señales inflamatorias inician un reclutamiento de neutrófilos, los cuales al liberar radicales libres de oxígeno y enzimas lisosomales inducen daño en las células y en los

vasos. Posteriormente se produce la llegada de mastocitos, que junto con los neutrófilos forman la respuesta inmune no-específica. Más tarde aparecerán los macrófagos y monocitos, que procesan antígenos específicos del tumor a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II). Esto permite el reconocimiento de epítomos específicos tumorales por los linfocitos CD4, lo que genera la producción de linfocitos T citotóxicos específicos frente al tumor, generando una respuesta inmune específica frente al tumor, con memoria inmunológica, lo que representa una ventaja frente a otras terapias tumorales como la radioterapia, quimioterapia o cirugía.

b.7. Indicaciones: aprobadas y en desarrollo^{2,4,121}

Indicaciones aprobadas¹²¹

- Queratosis actínicas (QA): son una de las patologías más comunes en la práctica clínica y son las lesiones precancerosas más frecuentes en dermatología. La prevalencia se estima en torno a un 10% en la tercera década y asciende a un 80% en la séptima década. Son más frecuentes en fototipos claros con antecedentes de exposición solar intensa. Los pacientes que han recibido el trasplante de un órgano sólido o inmunodeprimidos tienen mayor riesgo de presentar QA. Su diagnóstico en la práctica habitual es clínico. Se manifiestan como máculo-pápulas eritematosas con escamas o costras en su superficie. Su larga evolución y su localización en zonas fotoexpuestas (áreas de cancerización) facilitan el diagnóstico. Su estudio histológico revela displasia de los queratinocitos basales. El tratamiento habitual es la crioterapia, sin embargo cuando son múltiples es más cómodo el uso de imiquimod tópico o TFD. La principal desventaja de la TFD en QA frente a otras modalidades de tratamiento es el mayor coste (tiempo y dinero) y el dolor durante las sesiones, que en ocasiones persiste hasta 24 horas después. Como ventajas destacar que trata múltiples lesiones a la vez, el excelente resultado cosmético y que obtiene tasas de curación similares, sino superiores, a los tratamientos ya establecidos.

- Carcinoma basocelular superficial (CBC): Es el cáncer cutáneo más frecuente. Presenta diversas manifestaciones y puede llegar a ser localmente agresivo, metastatizando en muy escasas ocasiones. Las indicaciones aprobadas, con MAL, según la Guía Clínica de TFD de la Asociación Británica de Dermatología de 2008¹²¹ y las guías de uso de MAL-TFD en CCNM de European Academy of Dermatology and Venereology publicadas en 2010² son el CBC superficial y el CBC nodular de pequeño tamaño (menor de 2mm de grosor). No estaría indicado en CBC morfeiformes o pigmentados ni en carcinomas epidermoides.
- EB (ver apartado siguiente b.8.)
- Prevención de CCNM en transplantados: según las Guías previamente mencionadas puede tener papel en prevención de QA (evidencia B1) pero está aún por determinar en CBC y CCE.

Indicaciones aprobadas:

- Carcinoma basocelular superficial (CBC) y el CBC nodular < 2mm de grosor.
- Queratosis actínicas (QA).
- Enfermedad de Bowen (EB).
- Prevención de CCNM en transplantados: según las Guías previamente mencionadas puede tener un papel en prevención de QA (evidencia B1), pero está aún por determinar en CBC y Carcinoma espinocelular (CE).

Fig 8. Resumen de Indicaciones aprobadas.

Indicaciones en desarrollo:¹²¹

- Oncológicas:
 - Carcinoma espinocelular (CCE) invasivo.
 - Queilitis actínica (precancerosa).
 - Eritroplasia de Queyrat.
 - Sarcoma de Kaposi.
 - Poroqueratosis actínica superficial.
 - Linfoma cutáneo de células T (LCCT): En lesiones localizadas, en forma de placa o tumor, lo ideal es aplicar tratamiento tópico y realizar seguimiento, ya que el curso del LCCT es lento y poco agresivo. Hay múltiples opciones de tratamiento en esta situación: corticoides tópicos, mostaza nitrogenada tópica, PUVA, radioterapia, escisión, láser CO₂ y en algunos casos, se puede añadir la TFD.
 - Tratamiento paliativo de metástasis cutáneas.
 - Enfermedad de Paget (EP): mamaria y extramamaria: En ocasiones la extensión hace imposible el abordaje quirúrgico, surgiendo como alternativas el imiquimod tópico, la radioterapia y la TFD.

- No oncológicas:
 - Acné
 - Psoriasis
 - Verrugas vulgares
 - Condilomas acuminados
 - Hiperplasias sebáceas
 - Liquen escleroso y atrófico
 - Morfea
 - Alopecia areata
 - Liquen plano oral
 - Hirsutismo
 - Infecciones por dermatofitos
 - Leishmaniasis cutánea
 - Queloides
 - Granuloma anular
 - Poroqueratosis actínica
 - Linfadenosis benigna cutis
 - Hailey-Hailey
 - Nevus sebáceo
 - Rosácea
 - Hidrosadenitis

b.8. La Terapia fotodinámica y la enfermedad de Bowen:

El nivel de evidencia científica de la TFD es comparable a cualquiera de las opciones terapéuticas disponibles y supera al 5-fluoruracilo, a la crioterapia y al láser.

Se considera, por incluirse dentro de los CCNM, nivel de Evidencia A1. Esto significa que es extremadamente recomendable (buena evidencia de que la medida es eficaz y los beneficios superan ampliamente a los perjuicios). Al menos existe un ensayo clínico controlado y aleatorizado diseñado de forma apropiada.

En las últimas guías de la Asociación Británica de Dermatólogos se considera una opción entre buena y muy buena, a tener en cuenta especialmente en lesiones múltiples, grandes o situadas en zonas de mala cicatrización, puesto que la principal ventaja que ofrece es un resultado cosmético excelente.⁴ No recomiendan su uso en el área perianal por la falta de estudios en esta localización y existir casos descritos de progresión.^{99,121}

2. JUSTIFICACIÓN. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer cutáneo no melanoma (CCNM) es una afección muy frecuente en el hombre. Dentro de ellas encontramos la EB, con rasgos clínicos e histológicos bien definidos. Sin embargo no se conoce bien los factores pronósticos que puedan determinar qué lesiones son de alto riesgo y por tanto con mayor probabilidad de evolucionar a carcinoma epidermoide (CE) invasivo.

Aunque existen diferentes herramientas para abordar el CCNM, la TFD se ha erigido como clave, especialmente en el carcinoma basocelular (CBC) y la queratosis actínica (QA). En la EB no se ha estudiado tanto como en las 2 entidades previamente nombradas, pero dado que comparte ciertas características con la QA, es de esperar (y así se ha demostrado en los artículos publicados)² que también pase a constituir un pilar clave de tratamiento en EB. Así mismo, el estudio de la modificación en la expresión de marcadores inmunohistoquímicos (IHQ) puede ayudar a entender más acerca del mecanismo de acción por el cual la TFD actúa sobre la lesión de EB y si tiene actuación también sobre una base patogénica o no.

La TFD tiene la ventaja de alcanzar respuestas con buenos efectos cosméticos. Además trata toda un área de cancerización, lo cual es útil entre otras cosas, en pacientes con EB en los que hemos dicho que es muy frecuente el daño actínico. Una de las posibles desventajas es que este tratamiento no permite el estudio histológico de la lesión tratada, con lo que no se tiene certeza de la eliminación total de los restos tumorales. Sería por ello útil el disponer de una herramienta que supliera esa falta de información histológica. Aquí es donde el diagnóstico de fluorescencia puede jugar un papel clave como técnica de diagnóstico no invasiva. Se sabe que la EB, al igual que otras neoplasias cutáneas, adquiere una coloración roja intensa tras la aplicación de un FS y la posterior iluminación con luz ultravioleta, lo que nos permite diferenciar entre tejido sano y tejido tumoral. Aprovechando esta característica si se confirmara su fiabilidad podría incluirse como herramienta útil en nuestra consulta dermatológica diaria.

De acuerdo con lo anterior, los objetivos del proyecto se resumen en:

- Estudiar la validez de la fluorescencia como método diagnóstico en pacientes con enfermedad de Bowen que reciben tratamiento mediante terapia fotodinámica determinando su correlación con la clínica y la histología tanto antes como después del tratamiento. Estudiar los posibles factores clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos, que puedan influir en la respuesta de la enfermedad de Bowen al tratamiento con terapia fotodinámica.

Para alcanzar dichos objetivos se plantearon diferentes actuaciones:

- Se recogieron datos descriptivos de los pacientes y de las biopsias y se correlacionó, mediante estudio estadístico, con las diferentes respuestas obtenidas (clínica, fluorescencia e histológica).
- Se analizaron histológicamente las biopsias tomadas de pacientes afectados de EB, antes y después de 2 sesiones de tratamiento con TFD, con el fin de describir la presencia o ausencia de restos tumorales y correlacionarlo con la exploración clínica y de fluorescencia detectada en ambos momentos. Además dichas biopsias sirvieron de sustrato para estudiar el cambio en la expresión en los marcadores IHQ tras la TFD y correlacionar los mismos también con datos clínicos, fluorescencia e histología.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

a. SELECCIÓN DE PACIENTES

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo y descriptivo en el que se incluyeron un total de 67 pacientes diagnosticados de EB. El estudio incluyó pacientes cuyo diagnóstico de EB había sido realizado entre noviembre de 2004 y marzo de 2011. Se buscaron todos los pacientes que fueron diagnosticados de EB (confirmada con biopsia) en ese periodo de tiempo. Para ello se usó el sistema SNOMED, que es un programa informático, disponible en nuestro hospital, de búsqueda sistematizada según el diagnóstico histológico: se adjudica un código a la EB y permite buscar todas las piezas histológicas que han sido diagnosticadas con ese código de EB en un periodo de tiempo. El total de lesiones de EB en ese tiempo fue de 296. Estudiando más detalladamente se vio que, de ellos, 206 fueron diagnosticados a partir de enero de 2008. De este grupo de 296 pacientes se escogieron tan sólo aquellos que habían recibido tratamiento con TFD, que en total eran 98 pacientes. Suponían principalmente los pacientes diagnosticados en los últimos 3 años (desde 2008), ya que antes tan sólo se utilizaba la TFD excepcionalmente en el tratamiento de EB. De hecho, de los pacientes incluidos finalmente en el estudio, se recogió 1 paciente en el año 2004, 3 pacientes en el año 2005, 3 pacientes en el año 2006 y 13 pacientes en el año 2007. El resto (47 pacientes) fueron tratados entre 2008 y marzo 2011. En la gran mayoría de los pacientes que en nuestro servicio reciben tratamiento con TFD se toma iconografía pre y post-tratamiento, se descartaron para el estudio aquellos que por alguna razón esto no se hubiera realizado. Así, de este grupo de 98 pacientes tratados con TFD, quedaron finalmente incluidos en el estudio 67 pacientes, tras haber excluido también aquellos que sufrieron pérdida de seguimiento por abandono de tratamiento antes de recibir la 2ª sesión o antes de ser valorado al mes de esta 2ª sesión, o los que no reunían los datos necesarios de inclusión en el estudio.

Como **criterios de selección** para ser incluido en el estudio se requería:

- Que el diagnóstico hubiera sido confirmado histológicamente.
- Que las lesiones no hubieran sido sometidas a tratamientos previos.

- Que existiera un registro en la historia clínica de la localización y tamaño de la EB así como de edad y sexo del paciente.
- Que hubieran sido registrados los antecedentes de enfermedades que cursan con fotosensibilidad, especialmente las porfirias así como alergias a frutos secos como cacahuete (presente en la crema de ácido metil aminolevulínico (Metvix®)).
- Que hubieran recibido 2 sesiones de tratamiento con TFD y estuviera registrada la visita realizada al mes de la 2ª sesión.
- Que en la historia estuviera recogidas las dosis exactas administradas y efectos adversos referidos.
- Que existiera un registro fotográfico antes y después del tratamiento (un mes después de la 2ª sesión). Dicha fotografía debía de ser tanto convencional como de fluorescencia.
- Que existiera un consentimiento informado según las normas del Comité de Ética y Ensayos Clínicos del Hospital Ramón y Cajal (HRyC).

Siguiendo los criterios mencionados anteriormente, los pacientes incluidos fueron un total de 67 con lesiones de EB.

Se recogieron de todos ellos los siguientes datos: sexo, edad, tamaño de la lesión, subtipo histológico, localización, nº de lesiones de EB, nº de cáncer cutáneo no melanoma y enfermedades concomitantes.

Además, dentro de esta muestra de 67 pacientes se realizó, previo consentimiento informado, biopsia post-tratamiento en 29/67 pacientes. Era el propio paciente quien, dado que se trataba de una técnica novedosa, elegía si quería o no biopsia post-tratamiento para confirmar curación o persistencia tumoral, independientemente de la clínica o fluorescencia. Fue en 24 de estos 29 pacientes, que tenían tanto biopsia pre-TFD como biopsia post-TFD, donde además se realizó el estudio IHQ sobre las biopsias previas al tratamiento y las correspondientes biopsias del mes de fin de tratamiento.

El tiempo de seguimiento posterior fue variable dependiendo de cada paciente, y algunos continuaban en seguimiento a fecha de enero 2012. De forma global, aquellos con respuesta clínica y de fluorescencia completa que al año del tratamiento mantuvieron la remisión eran dados de alta. En los que persistió la lesión se aplicaron más sesiones de TFD o se planteó extirpación según el caso. Para este estudio se tomaron los datos registrados en la historia clínica.

b. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

El protocolo de tratamiento estándar fue aplicado a todos los pacientes por igual, siguiendo las actuales recomendaciones:¹²²

Se tomó fotografía clínica previa a la 1ª sesión de tratamiento. Posteriormente se administró el FS siguiendo la técnica habitual de la TFD: tras limpiar con suero salino el área de la lesión de EB, se aplicó una capa de 1mm de espesor de ácido metilaminolevulínico tópico (MAL, Metvix®) y se mantuvo en oclusión con film adhesivo (Tegaderm®) durante 3 horas. Toda la zona se mantuvo cubierta con un apósito opaco para evitar la inactivación del MAL con luz visible. Pasadas las 3 horas, se retiraron los apósitos, y tras limpiar los restos de crema con suero salino se realizó una fotografía con flashes de luz ultravioleta (fotografía de fluorescencia) con la cámara Olympus® C5060 conectada a flashes ultravioletas de 400nm (ClearStone® VD-DA digital system). Inmediatamente después se iluminó con luz roja (Aktilite®) con los siguientes parámetros: longitud de onda: 630 nm, fluencia: 38 J/cm², y duración: 7.5 minutos. El número de sesiones aplicadas de forma estándar fueron 2 sesiones separadas por una semana y siempre se programaron los mismos parámetros.

No se administró ningún tipo de tratamiento analgésico preventivamente. Se recomendó evitar exposición solar así como luces intensas durante un periodo de tiempo de 48 horas siguientes al tratamiento, posteriormente se pautó fotoprotección de la zona tratada durante un mínimo de un mes.

Durante la sesión e inmediatamente después así como en sucesivas consultas de revisión se preguntó y recogieron los posibles efectos adversos desarrollados.

La evaluación post-tratamiento se realizó al mes de la 2ª sesión de terapia fotodinámica momento en que se valoró la respuesta clínica, y además se tomaron iconografías clínica y de fluorescencia (tras 3 horas con la crema Metvix® en oclusión sobre la zona previamente tratada).

El tiempo transcurrido desde la biopsia diagnóstica inicial hasta esta valoración post-tratamiento, por la organización actual del servicio, fue de aproximadamente 68 días, ya que la media aproximada hasta el primer tratamiento fueron 30 días y los tratamientos estaban separados una semana.

En 29/67 pacientes en ese momento de valoración post-tratamiento (al mes de la 2ª sesión de TFD) se realizó además una biopsia post-tratamiento, con punch de 4mm de diámetro. La zona que se biopsió en estos pacientes fue aquella donde se detectó mayor fluorescencia y persistencia tumoral o, en su defecto la región adyacente a la biopsia del diagnóstico.

La técnica de obtención de la biopsia tanto pre como post-tratamiento se realizó con la misma sistemática, inyectando anestesia local (mepivacaína 2%), extrayendo la muestra con punch de 4mm y suturando el defecto con seda de 4 ceros. Las muestras se conservaron en formol para procesamiento histopatológico convencional. Las heridas se curaron con povidona yodada cada 12 horas durante una semana y tras ese tiempo se retiraron los puntos.

Todas las piezas se procesaron e incluyeron en parafina, tras lo cual se realizaron los cortes y tinción con hematoxilina eosina (HE) según la técnica habitual. En el grupo de 29/67 pacientes en los que se realizó la biopsia post-tratamiento, se procedió a la tinción HE convencional y además, en 24 de estas 29 muestras, se realizó un estudio IHQ en cortes del bloque de parafina. También se procedió a la realización de dicho estudio IHQ en los bloques de parafina correspondientes a las biopsias pre-TFD de esas 24 lesiones de EB.

Las biopsias se procesaron fijándose con formalina y posteriormente fueron incluidas en parafina. A continuación se realizaron varios cortes de cada bloque para la tinción con hematoxilina-eosina y para la tinción IHQ.

El procesamiento inmunohistoquímico se realizó mediante la técnica de estreptavidina-biotina, siguiendo los pasos descritos en la tabla 1.

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron el anticuerpo de origen murino anti-proteína p53 (Dako, Copenhague, Dinamarca, IR 616, Flex Monoclonal. Mo anti-human p53, clon 318-6-11. Dilución 1/50, recuperación citrato pH 6) y el anticuerpo monoclonal IgG1 de origen murino anti-Ki 67 (Dako, Copenhague, Dinamarca. IR 626, Flex Monoclonal Mo anti-human Ki-67, clon MIB-1. Dilución 1/50, recuperación citrato pH 6).

- 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 CaCl₂ 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 1. *Procesamiento inmunohistoquímico (IHQ).*

Valoración de la respuesta macroscópica. Se realizó de la siguiente manera:

La respuesta clínica fue valorada, ayudándonos, para una mayor exactitud, de las fotografías convencionales tomadas en momento previo a la 1ª sesión y en la visita al mes de la última sesión. Se clasificó según la superficie estudiada en respuesta nula (0 = RN) cuando existía persistencia de la totalidad del tumor o la disminución había sido de menos de un cuarto del área respecto a la lesión previa; parcial (1 = RP) si persistían áreas focales de tumor pero la disminución era mayor de un cuarto del área respecto a la lesión previa sin llegar a la desaparición total; ó respuesta completa (2 = RC) cuando no había restos de tumor a la exploración física.

El mismo procedimiento se realizó para la respuesta de fluorescencia que se clasificó como intensa (2= FI) cuando era roja muy brillante y abarcaba >75% del área tumoral, intermedia (1= FM) cuando era roja poco brillante y se detectaban parches de fluorescencia de <75% del área tumoral sin llegar a ser nula (>1%); o fluorescencia nula (0 = FN) cuando existía ausencia (0%) de fluorescencia roja.

Se calculó también la mejoría de fluorescencia (▲ F), que se clasificó como alta (▲A) si disminuían 2 puntos en la clasificación, media (▲M) si disminuía un punto o nula (▲N) si se mantenía igual o empeoraba.

Fueron valoradas por 2 dermatólogos del servicio, uno de ellos también realizaba la fotografía de fluorescencia y la biopsia al mes de la última sesión de TFD, (MTD). Se realizó un test de concordancia entre ambos.

Valoración histológica:

En el momento del diagnóstico la realizó indistintamente una de las 3 patólogas del servicio de anatomía patológica del HRyC. La valoración histológica post-tratamiento la realizaba siempre la misma patóloga (CMG) y un segundo observador (MTD) y se clasificó como positiva (+) cuando había restos tumorales o negativa (-) cuando no se evidenciaba restos tumorales.

Esa presencia o ausencia de tumor se determinaba en base al estudio de una serie de datos como son: verticalización de las células, alteración en la relación núcleo citoplasma, presencia de queratinocitos atípicos, desorganización en la arquitectura del estrato espinoso, nº de mitosis, hiperqueratosis, paraqueratosis y acantosis.

Valoración inmunohistoquímica:

Fue valorada por 2 observadores independientes, sin conocer si se trataba de biopsia pre o post-tratamiento. Uno de ellos una patóloga del servicio de anatomía patológica del hospital, la misma que valoraba la hematoxilina-eosina post-tratamiento (CMG), y el otro observador (MTD) quien puntuó también los otros apartados. La valoración fue en términos cualitativos.

Así el **Ki67** se consideró:

-	“Negativo” cuando se expresó en su forma normal, esto es tiñendo las células basales epidérmicas que son las que tienen actividad mitótica para la reparación y regeneración epidérmica.
+	Moderado
++	Intenso

El **p53** se consideró:

-	Negativo cuando no se expresaba en absoluto
+	Leve
++	Moderado
+++	Intenso

Además se especificaba la distribución del marcaje: focal versus difusa. Se realizó un test de control negativo con piel sana no fotoexpuesta. Se realizó un test de concordancia entre observadores para todas las valoraciones microscópicas.

Seguimiento:

Se registraron todos los efectos adversos descritos por los pacientes mediante la aplicación de la técnica (quemazón, dolor, prurito, cicatriz). Para el análisis estadístico se etiquetaron como ausentes o presentes.

Durante el seguimiento se registraron las recidivas (reaparición de EB tras haberse constatado respuesta histológica previa) y progresiones.

c. COMPARACIÓN ENTRE DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y DE FLUORESCENCIA Y EL GOLD ESTANDAR: LA HISTOLOGÍA

Además de determinar la eficacia exacta de la TFD para el tratamiento de la EB en nuestro servicio, el objetivo del presente trabajo era comparar el diagnóstico clínico y de fluorescencia con la histología y buscar algunos factores (clínicos, histológicos o IHQ) que pudieran determinar una mayor resistencia al tratamiento (peor respuesta clínica, de fluorescencia o histológica) o un peor pronóstico (mayor número de recidivas o mayor frecuencia de progresión a CE invasor), así como estudiar la relación entre IHQ y fluorescencia o histología.

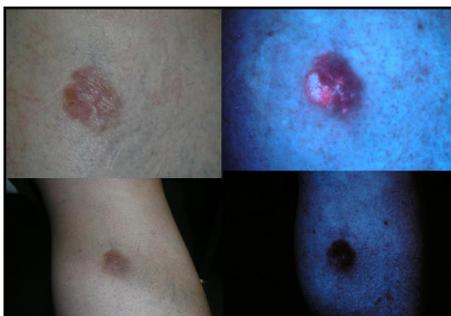
También quisimos determinar la validez del diagnóstico de fluorescencia. Para ello se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo así como cociente de probabilidad positivo del diagnóstico de fluorescencia, comparado con el gold-estándar que es la histología. Además se estudió también la validez de la valoración clínica y de fluorescencia combinadas.

Dado que 29/ 67 pacientes tuvieron (además de una imagen pre y post-TFD clínica y de fluorescencia) una biopsia al mes de finalizado el tratamiento, se pudo comparar la coincidencia y desacuerdo entre la valoración clínica con la histología; la valoración del área de fluorescencia con la histología y la combinación de ambas (clínica y fluorescencia) con la histología.

Se pueden considerar válidas como pruebas diagnósticas la exploración clínica y/o el diagnóstico de fluorescencia si ambas coinciden con el estudio histológico (“gold estándar”).

Si la exploración clínica considera persistencia tumoral pero en la biopsia no se detectan restos tumorales, se considerará un falso positivo. Si por el contrario se biopsia un área que fue clasificada como RC en la valoración clínica y se encuentran restos tumorales, se considerará un falso negativo.

Esquema de la comparación de técnicas:



Ej : Paciente nº 19. FP clínico post-TFD

Evaluación clínica	Presencia tumoral AP	Ausencia tumoral AP
Respuesta completa	Falso -	Verdadero -
Respuesta parcial	Verdadero +	Falso +
Respuesta nula	Verdadero +	Falso +

Si la fluorescencia fuera intensa o intermedia cuando en la biopsia ya no existiera tumor se considerará el resultado como un falso positivo de la técnica diagnóstica. Si por el contrario la valoración de fluorescencia fuera “nula” y sin embargo al hacer la biopsia encontrásemos restos tumorales, consideraremos el resultado como un falso negativo de la técnica diagnóstica.

En la combinación de fluorescencia y clínica se clasificó como positivo cuando existía clínica o fluorescencia positivo (por ejemplo si existe RC pero FI o FM, o cuando FN pero RP o RN) y negativo cuando tanto clínica y fluorescencia eran negativas: RC y FN. Si un resultado clasificado como positivo presenta ausencia tumoral en la biopsia se considerará un falso positivo y a la inversa, si un resultado negativo presenta restos tumorales se considerará un falso negativo.



Ej: Paciente nº 29 FP fluorescencia post-TFD.

Evaluación Fluorescencia	Presencia tumoral AP	Ausencia tumoral AP
Negativa	Falso -	Verdadero -
Media	Verdadero +	Falso +
Intensa	Verdadero +	Falso+

d. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- La metodología informática utilizada consistió en el registro de los datos en Excel para su codificación. Posteriormente, se transportó al paquete de programas estadísticos SPSS v.15.0, en entorno Windows, con el que se realizaron todos los procedimientos de cálculo.
- Para estudiar la eficacia de la TFD en la EB se cuantificaron el número de respuestas (completas y parciales) y el número de no respondedores. Además se realizó un seguimiento para ver si los resultados se mantenían en el tiempo y se compararon con los porcentajes de respuesta en carcinomas basocelulares superficiales tratados con TFD, referencia de CCNM tratado con TFD.¹²³
- Se realizó **estudio de concordancia y reproducibilidad** de las mediciones realizadas mediante el cálculo del índice Kappa. Se calculó restando a la concordancia observada la concordancia esperada por azar, obteniendo el porcentaje final de concordancia. El grado de acuerdo según el índice Kappa obtenido se clasificó: < 0,00 = sin acuerdo; 0,00 - 0,20 = insignificante; 0,21 - 0,40 = mediano; 0,41 - 0,60 = moderado; 0,61 - 0,80 = sustancial y 0,81 - 1,00 = casi perfecto.
- Se realizó un **estudio descriptivo** calculando, de las *variables cuantitativas* (tamaño, edad) la media, mediana aritmética, desviación estándar (D.E.), valor máximo y mínimo. De las *variables cualitativas* (sexo, localización, subtipo histológico, fluorescencia pre, fluorescencia post, mejora de fluorescencia, respuesta clínica, nº de lesiones de EB única o múltiple, otras lesiones de cáncer cutáneo no melanoma ausentes o presentes, efectos secundarios sí o no y en un subgrupo también: respuesta histológica, IHQ-p53 pre y post, IHQ-Ki67 pre y post) se calculó la frecuencia absoluta y relativa de pacientes obtenidos en cada una de las categorías, expresada en tanto por ciento, tanto en la muestra global como en cada subgrupo analizado.
- Previamente a la elaboración de procedimientos analíticos se determinó la distribución normal o Gauss de las variables cuantitativas mediante la prueba de

Kolmogorov-Smirnov, con el fin de establecer los criterios adecuados para la elección de aplicación de pruebas paramétricas o no paramétricas.

- Se realizó posteriormente un **estudio analítico**:
 - Para establecer las posibles asociaciones de forma univariante entre las variables cualitativas se aplicó el *test de comparación de proporciones de Pearson (chi-cuadrado)*, usando el *test exacto de Fisher* cuando el tamaño muestral así lo indicó. El intervalo de confianza aplicado fue del 95% en todos los casos. Se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples cuando fue oportuno.
 - Para estudiar las posibles asociaciones de forma univariante entre variables cuantitativas (edad y tamaño) y variables cualitativas (el resto) se utilizó la *prueba T de Student* para muestras independientes, una vez identificado que se trataban de variables con distribución normal en la muestra tras el análisis con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples cuando fue oportuno.
 - Para establecer la comparación entre los diferentes parámetros ordinales de valoración de la tinción inmunohistoquímica de la muestra pretratamiento y la postratamiento se hizo utilizando el *test de Wilcoxon*. Se trata de un test no paramétrico para muestras apareadas, aplicable para variables ordinales. 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.
- Para estudiar la validez del diagnóstico de fluorescencia como técnica diagnóstica en la EB y compararla con el gold estándar y con la exploración clínica, hemos calculado los índices de validez diagnóstica: la *sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, cociente de probabilidad positivo y cociente de probabilidad negativo, con su intervalo de confianza calculado al 95%, a partir de nuestra muestra de 29 pacientes de la prueba que evaluamos con la histología posterior, que fue nuestra prueba de referencia.*

- Para estudiar si ambas son validas (clínica y fluorescencia), y ver si se obtiene beneficio cuando se combinan se calculó *sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, cociente de probabilidad positivo y cociente de probabilidad negativo, con su intervalo de confianza al 95%*, del diagnóstico clínico y de fluorescencia (se consideró resultado positivo de la combinación de clínica y fluorescencia post-TFD, cuando al menos una de las 2 era *no nula*. Se consideró negativo cuando ambas eran nulas) y se compararon con los del DF.

La sensibilidad y especificidad son los parámetros más empleados como índices de validez de las pruebas diagnósticas; corresponden al punto de vista "natural" del investigador que evalúa la prueba, pero requieren de ciertos cálculos para interpretar el resultado de una prueba en la práctica clínica.

Los valores predictivos representan las proporciones de interés en la práctica, pero su valor es muy limitado porque dependen de la proporción de enfermos en el grupo en que la prueba se ha evaluado.

Los cocientes de probabilidad son índices útiles porque permiten transformar la probabilidad preprueba en probabilidad postprueba mediante una sencilla relación y no dependen de la proporción de enfermos en el grupo en el que se ha evaluado la prueba. Consideramos válidas tanto la exploración clínica como la fluorescencia como técnicas diagnósticas en el momento previo al tratamiento y por lo tanto útil para ser empleadas por los dermatólogos de forma sistemática a la hora de delimitar el área exacta a tratar y también las consideramos validas como técnicas diagnosticas en el seguimiento de la EB tras tratamiento con TFD cuando los valores de los índices estudiados sean próximos a un 80%. Si fuera válida la fluorescencia tendríamos que ver si usada en conjunto con la clínica tienen efecto sinérgico. Si es así recomendaremos el uso de fluorescencia como técnica de diagnóstico no invasivo. Si no supone ventaja sobre la exploración clínica no la recomendaremos. Además hay que tener en cuenta que el diagnóstico de puede suponer ventaja en el momento previo al tratamiento (como delimitación del área a tratar) pero no tener beneficio en el seguimiento, o viceversa.

4. RESULTADOS

a. EFICACIA DE LA TFD EN LA EB . RESPUESTA CLÍNICA, DE FLUORESCENCIA E HISTOLÓGICA

Muestra seleccionada:

En el ANEXO I se describen las características clínicas **descriptivas** de los pacientes y de la EB de cada uno de ellos. Se recogió el sexo, edad, tamaño de la lesión, subtipo histológico, localización, nº de lesiones de EB, nº de cáncer cutáneo no melanoma y enfermedades concomitantes. No se objetivaron diferencias significativas en la distribución de ninguna de estas variables entre el grupo global de 67 pacientes y el subgrupo con control histológico de 29 pacientes. Se resumen a continuación:

En nuestro grupo se incluyeron 35 hombres y 32 mujeres, con edades comprendidas entre 47 y 97 años (edad media 74,58 años). De las 67 lesiones 61/67 (91%) eran EB convencionales y 6/67 (9%) eran de células claras (subtipo pagetoide). El tamaño medio fue de 2,76 cm, con un rango de 0 a 5,5 cm y una desviación estándar de 1,169. Encontramos EB mayor de 2 cm en 37/67 pacientes (55%). En el *subgrupo con control histológico* (29 pacientes) estos datos se mantuvieron, incluyéndose 13 mujeres (44%) y 16 varones (55,2%); 26 lesiones fueron EB clásicos (89,7%) y 3 lesiones (10,3%) fueron EB de células claras. El tamaño medio fue de 2,55 cm, con una desviación estándar de 1,08 y un mínimo de 1 cm y un máximo de 5 cm. Para el estudio de asociación con otros factores el tamaño se subdividió en menor o igual a 2 cm y mayor de 2 cm, basándonos en el punto de corte pronóstico aceptado para los CE.

Por localizaciones, 23/67 (34,3%) en extremidades inferiores; 22/67 (32,8%) pacientes presentaban el tumor en cabeza y cuello (9 en sien; 5 en frente, 1 preauricular, 5 en cuero cabelludo; 2 en cara y 0 en cuello); 15/67 (22,4%) en extremidades superiores (7 en mano y 8 en brazo); 4/67 (5,98%) en tronco y 3/67 (4,48%) en región genital. Por tanto, la localización más frecuente de EB fueron las extremidades inferiores, seguido de área de cabeza y cuello. En el *subgrupo con control histológico* la localización más frecuente fue cabeza y cuello 12/29 (41,4%), seguido de extremidades inferiores 8/29 (27,6%), extremidades superiores 5/29 (17,2%), tronco 2/29 (6,9%) y genitales 2/29 (6,9%)

El número de lesiones de EB por paciente fue en la mayoría de casos, 58/67 (86,6%) pacientes, de una única lesión, mientras que se encontró en la historia antecedente de otras lesiones de EB en 9/67 pacientes (13,4%): 2 lesiones de EB en diferentes localizaciones en 7/67 pacientes y 3 lesiones de EB en 2/67 pacientes. No fueron diagnosticados de forma sincrónica por lo que se sólo se incluye una lesión de estos 9 pacientes en nuestro estudio: aquella tratada con TFD y en el periodo del estudio. En ninguno de ellos se detectaron más de 3 EB ni al diagnóstico ni durante el seguimiento posterior. En el *subgrupo con control histológico* también la mayoría, 24/29 (82,8%), tenían tan sólo una lesión de EB.

Se determinó la existencia de otro cáncer de piel no melanoma (CCNM) ya fuera previo o posterior al diagnóstico de EB y se vio que en 35/67 (52,2%) no tenían otra lesión CCNM asociada, 1/67 asoció un melanoma in situ y 31/67 (46,27%) pacientes fue positiva la asociación con CCNM, principalmente carcinomas basocelulares (CBC), seguidos por carcinomas epidermoides (CE). De los 31/67 pacientes con otro CCNM, 15 de ellos presentaban tan sólo CBC; 11 de ellos presentaron CE pero no CBC y 4 de estos 31 presentaban tanto CBC como CE y 1 presentaba un CE y un fibroxantoma atípico. *En el subgrupo con control histológico* 17/29 (58,6%) no tuvieron otro CCNM asociado.

Hombres y mujeres		Subtipo EB		Tamaño medio	
35 Hombres y 32 Mujeres		91% clásico y 9% pagetoide		2,76 cm	
Extremidades inferiores	Cabeza y cuello	Extremidades superiores	Tronco	Área genital	
23/67 (34%)	22/67 (33%)	15/67 (22%)	4/67 (6%)	3/67 (4%)	

Tabla 2. Resumen de parte de los datos descriptivos (I)

En cuanto a factores de riesgo por enfermedad oncológica o inmunosupresión previa según los datos recogidos en la historia, se encontraron en 8/67 (11,94%) pacientes: 4 neoplasias hematológicas, 1 carcinoma de mama, 2 transplantados renales y 1 transplantado hepático. En el *subgrupo con control histológico*, 24/29 (82,8%) no tenían enfermedad sistémica asociada mientras que en 5 sí que se detectó

enfermedad concomitante: 1 leucemia linfática crónica, 2 linfomas no Hodgkin, 1 trasplantado hepático y 1 trasplantado renal.

Nº lesiones EB	Otro CCNM en algún momento	Factores de riesgo inmunológico basales
58/67 (86%) aislado 9/67 (13%) antecedente de otro EB distinto	35/67 (52%) ausencia de antecedente de cáncer de piel 1/67 Melanoma in situ 31/67 (46%) otro CCNM: 15 CBC, 11 CE y 4 CBC y CE	8/67 (12%)

Tabla 3. Resumen de parte de los datos descriptivos (II)

Resultados: Para visualizar un resumen de los resultados tras la TFD ver ANEXO II.

De los 67 pacientes estudiados se obtuvo una **respuesta clínica** en el 89,6% de los casos. Dicha respuesta fue completa en 28/67 pacientes, lo que supone un 41,8%. La respuesta parcial fue alcanzada en 32/67 pacientes, representando un 47,8%. En tan sólo en 7/67 pacientes (10,4%) no se objetivó ninguna respuesta.

La **fluorescencia** fue clasificada como intensa en 56/67 (83,6%) pacientes pre-tratamiento y 10/67 (14,9%) post-tratamiento; fluorescencia intermedia en 11/67 (16,4%) pre-tratamiento y 22/67 (32,8%) post-tratamiento y negativa en 0/67 pre-tratamiento y 35/67 (52,2%) post-tratamiento.

En las **biopsias post-tratamiento** se confirmó la curación histológica en la mayoría de los casos, en concreto en 21/29 (72,42%) y en tan sólo 8/29 (27,59%) se objetivó persistencia tumoral.

FLUORESCENCIA	Intensa (2)	Intermedia (1)	Nula (0)
PRE	56 (83,6%)	11 (16,4%)	0
POST	10 (14,9%)	22 (32,8%)	35 (52,2%)
Respuesta CLÍNICA	Nula (2)	Parcial (1)	Completa (0)
	7 (10,4%)	32 (47,8%)	28 (41,8%)
Respuesta histológica	Persistencia tumoral histológica	Respuesta histológica completa (curación histológica)	
	8/29 (28%)	21/29 (72%)	

Tabla 4. Resumen de la valoración clínica y de fluorescencia (pre y post-TFD) en 67 pacientes así como valoración de la respuesta histológica en 29/67 pacientes con biopsia post-TFD.

Se observó concordancia en todas las valoraciones salvo:

Nº paciente	27		36		37		40		67	
	O1	O2	O1	O2	O1	O2	O1	O2	O1	O2
RP	X			X		X		X	X	
RC		X	X		X		X			X
F post intermedia	X		Tabla 5. Tabla donde se reflejan los pacientes donde hubo discrepancia en la valoración.							
F post intensa		X								

O: Observador; RP: respuesta parcial; RC: respuesta completa; F: fluorescencia.

Se realizó un test de concordancia entre los 2 observadores, obteniéndose un índice Kappa **casi perfecto** en todas las observaciones. (Tablas 4-8)

		CLINICA. Obs.2			Total
		RC	RP	RN	
CLINICA obs.1	RC	25	3	0	28
	RP	2	30	0	32
	RN	0	0	7	7
Total		27	33	7	67

Tabla 6. Tabla de contingencia interobservador para respuesta clínica.

Observación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Error estándar	Nivel significación
Clínica	92,54%	42,46%	0,873	0,056	0,000

Tabla 7. Test de concordancia en respuesta clínica.

		FUORESCENCIA PRE Obs.2		Total
		Intermedia	Intensa	
FLUORESCENCIA PRE Obs.1	Intermedia	11	0	11
	Intensa	0	56	56
Total		11	56	67

Tabla 8. Tabla de contingencia interobservador para fluorescencia pre-tratamiento.

Observación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Error estándar	Nivel significación
F PRE tratamiento	100%	72,55%	1	0,000	0,000

Tabla 9. Test de concordancia en fluorescencia pre-tratamiento.

		FLUORESCENCIA POST OBS.2			Total
		Nula	Intermedia	Intensa	
FLUORESCENCIA POST Obs.1	Nula	35	0	0	35
	Intermedia	1	21	0	22
	Intensa	0	0	10	10
Total		36	21	10	67

Tabla 10. Tabla de contingencia interobservador para fluorescencia post-tratamiento.

Observación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Error estándar	Nivel significación
F POST tratamiento	98,5%	40,60%	0,975	0,025	0,000

Tabla 11. Test de concordancia en fluorescencia post-tratamiento.

A continuación se resumen, agrupando por respuestas, los resultados obtenidos:

FLUORESCENCIA POST INTENSA					
10 pacientes					
AP POST +	AP POST -	NDD AP	RN	RP	RC
5	0	5	6	4	0
RC 0 RP 4 RN 1	F Intensa post-TFD en 10 pacientes (Nº:2,5,13,18,26,31,32,54,61,62)				

FLUORESCENCIA POST INTERMEDIA					
22 pacientes					
AP POST +	AP POST -	NDD AP	RN	RP	RC
3	3	16	1	16	5
RC 0 RP 2 RN 1	RC 1 RP 2 RN 0				

FLUORESCENCIA POST NULA					
35 pacientes					
AP POST +	AP POST -	NDD AP	R NULA	R PARCIAL	R COMPLETA
0	18	17	0	12	23
	RC 11 RP 7 RN 0				

AP Post: resultado de biopsia post-tratamiento; NDD: No datos disponibles; R: respuesta clínica post-tratamiento; RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; RN: respuesta nula.

Tabla 12. Diferentes grados de fluorescencia post-TFD (intensa, intermedia y nula) y sus correspondientes resultados clínicos e histológicos.

En el subgrupo de los 29 pacientes **con histología** post tratamiento se confirmó ausencia tumoral en el 72,4% de los casos y persistencia en el resto (8/29 = 27,6%). A continuación detallamos la valoración clínica y de fluorescencia pre y post-TFD en este subgrupo con control histológico:

Respecto a los resultados de la respuesta clínica en este subgrupo de 29 pacientes, se objetivó algún tipo de respuesta en el 93,1% de los casos, de ellas el 41,4% fueron clasificadas como RC, alcanzando asociación significativa ($p=0,004$) entre respuesta clínica e histológica. De los 21 en los que se demostró ausencia tumoral histológica, 12 habían sido clasificados clínicamente con acierto como respuesta clínica completa pero 9 se les clasificó como respuesta parcial. De los 8 donde se objetivó persistencia tumoral todos habían sido clasificados o como respuesta parcial (6) o como respuesta nula (2) y no hubo ningún falso negativo que se hubiera clasificado como respuesta completa. Estos resultados no alcanzaron significación estadística. Los falsos positivos no presentaban diferencias en localización, subtipo histológico, tamaño tumoral, sexo o edad.

El diagnóstico de fluorescencia (DF) en estos 29 pacientes con control histológico no detectó ningún caso de fluorescencia pre-TFD (Fpre-TFD) nula, sino que 27 (93,1%) de las Fpre-TFD fueron intensas. Esta fluorescencia pre-TFD no se asoció estadísticamente ni con la respuesta clínica ($p=0,91$), ni con la respuesta histológica ($p=1$), ni con una mayor mejoría de fluorescencia ($p=0,06$).

En cuanto a la fluorescencia post-TFD (Fpost-TFD), la mayoría fueron nulas 18/29 (62,1%) pero se detectaron Fpost-TFD intensas hasta en 5/29 (17,2%) de los casos. De las 21 lesiones sin tumor en la histología post-tratamiento, se acertó en 18 de ellos con diagnóstico de fluorescencia negativo, mientras que en 3 de ellos se clasificó como fluorescencia positiva tumores histológicamente curados. Por otra parte de los 8 tumores donde se objetivó persistencia tumoral, todos ellos habían sido clasificados con fluorescencia positiva (ya fuera intensa o intermedia) sin existir falsos negativos. Algo más de la mitad de los pacientes 16/29 (55,2%) alcanzaron una mejoría de fluorescencia alta, siendo nula esta mejoría en 5/29 (17,2%). Se obtuvo asociación estadística entre la Fpost-TFD y respuesta clínica ($p= 0,003$). También se obtuvo significación estadística en la asociación entre Fpost-TFD y

mejoría de fluorescencia post-TFD con respuesta histológica ($p < 0,001$ en ambos casos), pero no entre Fpre-TFD y respuesta histológica ($p=0,91$).

	FLUORESCENCIA POST TFD					
	F INTENSA		F INTERMEDIA		F NULA	
	5		6		18	
AP POST TFD	AP+	AP-	AP+	AP-	AP+	AP-
		5	0	3	3	0
RESPUESTA CLÍNICA	RC 0		RC 0	RC 1		RC 11
	RP 4		RP 2	RP 2		RP 7
	RN 1		RN 1	RN 0		RN 0

Tabla 13. Resumen DF, clínico y AP post-TFD, con limitación al subgrupo de los 29 pacientes con biopsia post.

		AP post tratamiento. n (%)		Significación estadística con IC al 95%
		Ausencia tumoral	Persistencia tumoral	
Fluorescencia post-TFD	Nula	18(85,7)	0	$p < 0,001$
	Intermedia	3(14,3)	3(37,5)	
	Intensa	0	5(62,5)	
	Total	21	8	
Fluorescencia Pre-TFD	Nula	0	0	$p = 1$
	Intermedia	2(9,5)	0	
	Intensa	19(90,5)	8(100)	
	Total	21	8	
Respuesta Clínica	RC	12(57,1)	0	$p < 0,001$
	RP	9(42,9)	2(25)	
	RN	0	6(75)	
	Total	21	8	
Mejoría de fluorescencia	Alta	16(76,2)	0	$p < 0,001$
	Media	5(23,8)	3(37,5)	
	Nula	0	5(62,5)	
	Total	21	8	
Clínica y fluorescencia	Negativo	11(52,4)	0	$p = 0,0120$
	Positivo	10(47,6)	8(100)	

Tabla 14. Tablas de contingencia de Fluorescencia post-TFD, fluorescencia pre-TFD, respuesta clínica, mejora de fluorescencia y combinación de fluorescencia con valoración de respuesta clínica frente al estudio histológico en los 29 pacientes en los que se disponía de este último. Se aplicó la corrección de Bon-ferroni para comparaciones múltiples y se mantuvo la significación estadística. La asociación estadística es significativa, salvo para la F pre-TFD.

Estudiando en nuestra muestra global de 67 pacientes el **diagnóstico de fluorescencia** obtuvimos:

1. **Fluorescencia pre-TFD y respuesta clínica:** Analizando las **fluorescencias pre-TFD** con las respuestas clínicas, vemos que, de las 11 lesiones con fluorescencia *intermedia* pre-TFD, 7 (63,6%) presentan RC, 3 (27,3%) RP y 1 RN (9,1%). De las 56 fluorescencias *intensas*, 21(37,5%) tienen RC, 29 (51,8%) RP y 6 (10,7%) RN. El 75% de RC, el 90,6% de las RP y el 85,7% de las RN presentan FI pre-PDT. No obtenemos significación estadística suficiente ($p= 0,26$) para afirmar correlación entre Fluorescencia pre-PDT y respuesta clínica.

Además la ausencia de respuesta (RN) no obtuvo tendencia a la asociación con fluorescencia leve ni con fluorescencia intensa, siendo similar en ambos grupos (9,1-10,7%).

Limitando estos datos a los 29 pacientes con biopsia post-tratamiento, los resultados se mantienen sin obtener asociación estadística entre F pre-PDT y respuesta clínica en este subgrupo ($p=0,91$).

De los 27 con fluorescencia intensa pre-TFD que tenían **estudio AP**, 19 curaron histológicamente mientras que en 8/27 persistió el tumor en la biopsia post-TFD. Los 2 que tenían fluorescencia pre-TFD leve y estudio histológico realizado, presentaron curación en la biopsia tras TFD.

2. **Fluorescencia post-TFD y respuesta clínica:** el 23/28 (82,1%) de las RC tienen Fluorescencia post-TFD negativa, mientras que de las 7 con RN, 6 tienen Fluorescencia intensa y 1 intermedia. Entre las RP, la mayoría tiene fluorescencia intermedia (16/32 = 50%), 12/32 (37,5%) tiene fluorescencia nula y 4/32 (12,5%) fluorescencia intensa. Se obtuvo asociación estadística ($p < 0,001$) entre intensidad de fluorescencia post-TFD y grado de respuesta clínica, dado que en 6/10 (60%) de los pacientes con FI se obtiene RN; en 16/22 (73%) de pacientes con FM se obtiene RP y en 23/35 (66%) de pacientes con FN se obtiene RC.

Limitando los datos a los 29 pacientes con biopsia post-tratamiento, se mantiene la asociación estadística entre intensidad de Fpost-TFD y grado de respuesta clínica, presentando FN en 11/12 (92%) lesiones con RC. ($p<0,048$).

3. Fluorescencia post-TFD e histología: De los 32 pacientes con diagnóstico de fluorescencia post-TFD positiva (FI y FM), sólo 11 tenían estudio histológico post-tratamiento. De ellos solamente en 8 persistió el tumor en histología (enfermedad presente ó +) mientras que 3/11 presentaron curación histológica (enfermedad ausente ó -).

La fluorescencia fue negativa en 35 pacientes, de los cuales 18 tenían estudio histológico post-tratamiento demostrando en todos ausencia tumoral.

De los 10/67 (14,92%) con fluorescencia **intensa** post-TFD, 5 tenían estudio histológico post-tratamiento con **persistencia** tumoral histológica en **todos** ellos y clasificadas como RC sólo 1/5 mientras que el resto 4/5 como RP. De los 22 con FM post-TFD, sólo 6 tenían histología post-TFD, y de ellas la *mitad* presentaban persistencia tumoral (ninguna clasificada como RC) y la otra mitad ausencia, de ellas 2/3 fueron clasificadas como RP y 1/3 como RC, ninguna RN. Todas las que tenían fluorescencia nula fueron negativas en el estudio histológico y 11/18 clasificadas como RC y 7/18 como RP.

Pese a que en 38/67 (56,7%) pacientes con fluorescencia post-TFD no tuvieron control histológico, los resultados en los 29 donde se pudo estudiar la asociación entre F post-TFD e histología post-TFD fueron significativos ($p < 0,001$).

4. Grado de mejoría de Fluorescencia (▲ Fluorescencia) y respuesta clínica:

Comparando la **fluorescencia pre y post-TFD** vimos que, mientras que pre-TFD se obtienen 11 FM y 56 FI; tras la TFD sólo se puntuaron 10 FI y 22 FM mientras que ascendió hasta 35 el número de lesiones de EB que presentaron FN. Correlacionando el grado de mejoría de fluorescencia con el tipo de respuesta clínica se detectó asociación alta y significativa ($p=0,001$) entre la disminución de la fluorescencia tras el tratamiento con TFD y una mejor respuesta al tratamiento.

La mayoría (60,7%) de los pacientes con mejorías de fluorescencia altas presentaron RC y la mayoría (46,9%) de pacientes con mejorías medias presentaron RP. Esta asociación se mantiene como vimos cuando se analiza en el subgrupo de 29 pacientes con control histológico posterior. En todos los pacientes con mejoría de

fluorescencia alta y control histológico post-TFD se constató ausencia tumoral (16/29) y en todos los pacientes con mejoría de fluorescencia nula y control histológico post-TFD se constató persistencia tumoral en la histología (5/29). En los 8 pacientes con mejoría de fluorescencia intermedia que tenían histológico post-TFD, se constató curación histológica en 5 y persistencia tumoral histológica en 3. Alcanzó significación estadística también la asociación entre mejora de fluorescencia e histología ($p < 0,001$).

		Respuesta Clínica n (%)				AP post tratamiento n (%)		
		RC	RP	RN	Significación estadística con IC al 95%	Ausencia tumoral	Persistencia tumoral	Significación estadística con IC al 95%
Fluorescencia pre-TFD	Nula	0	0	0	p= 0,261	0	0	p = 1
	Intermedia	7(25)	3(9,4)	1(14,3)		2(9,5)	0	
	Intensa	21(75)	29(90,6)	6(85,7)		19(90,5)	8(100)	
	Total	28	32	7		21	8	
Fluorescencia Post-TFD	Nula	23(82,1)	12(37,5)	0	p<0,001	18(85,7)	0	p<0,001
	Intermedia	5(17,9)	16(50)	1(14,3)		3(14,3)	3(37,5)	
	Intensa	0	4(12,5)	6(85,7)		0	5(62,5)	
	Total	28	32	7		21	8	
Mejoría de Fluorescencia	Alta	17(60,7)	11(34,4)	0	p= 0,001	16(76,2)	0	p<0,001
	Media	9(32,1)	15(46,9)	2(28,6)		5(23,8)	3(37,5)	
	Nula	2(7,1)	6(18,8)	5(71,4)		0	5(62,5)	
	Total	28	32	7		21	8	

Tabla 15. Tablas de contingencia de Fluorescencia post-TFD, fluorescencia pre-TFD, y mejora de fluorescencia frente a la respuesta clínica, y de nuevo frente a la histología (29/67). Se aplica la corrección de Bon-ferroni para comparaciones múltiples y se mantiene la significación estadística. La asociación estadística es significativa con la fluorescencia post-TFD y con la mejora de fluorescencia pero no con la fluorescencia pre-TFD.

5. Falsos positivos y falsos negativos de la fluorescencia post-TDF: De los 3 *falsos positivos por fluorescencia*, constatados histológicamente (pacientes nº 1, 27 y 29 clasificados como FM) 2 de ellos se habían calificado como respuesta parcial (27 y 29) y tan sólo uno como respuesta completa (nº1). Todos fueron clasificados como fluorescencia intermedia (FM). No se pudieron sacar datos significativos asociados a estos falsos positivos.

Si estudiamos los pacientes con FM post-TFD y respuesta completa (RC) sin tener en cuenta la biopsia post-TFD encontramos un total de 5 pacientes (y sólo 1/5, el nº 1, localizado en frente) tenía control histológico posterior, confirmando ausencia tumoral). Los otros 4 (nº 40, 43, 44, 50) se localizaban en sien, brazo y piernas, respectivamente. Por otra parte, 12 pacientes sin emisión de fluorescencia post-TFD (FN) se clasificaron como respuesta parcial (RP), y de ellos 7 tenían realizada histología post-TFD, todos ellos sin restos tumorales y por tanto eran *falsos positivos (FP) de la evaluación clínica y verdaderos negativos (VN) del diagnóstico de fluorescencia (DF)*. En cuanto a los *falsos negativos por fluorescencia* no se objetivó ninguno, ya fuera intermedia o intensa.

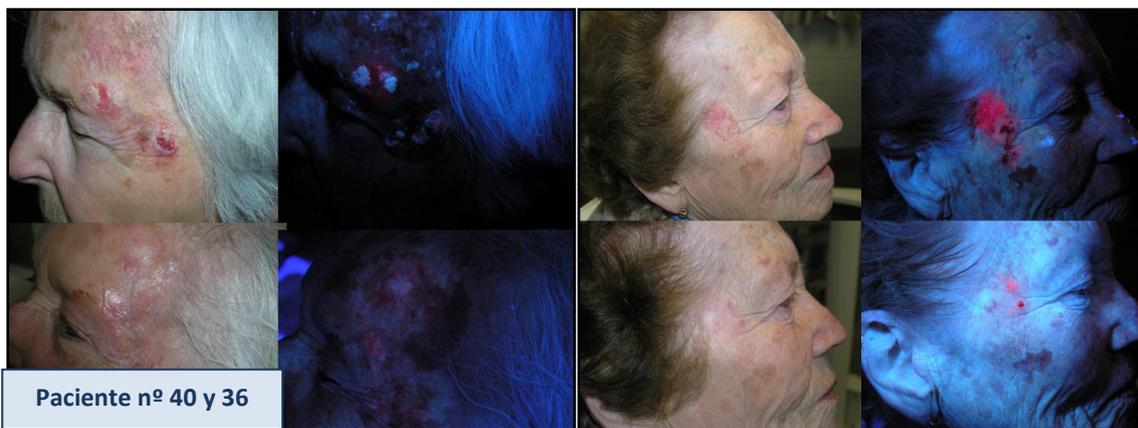
La respuesta **clínica** fue clasificada como completa (RC) en 28 pacientes, de ellos 12 tenían **histología** post-tratamiento siendo en todos ellos negativa. No hay por ello falsos negativos (FNeg) ya que en ningún caso donde se clasificara RC se encontró tumor en la histología.

De los 15 pacientes con RP y estudio histológico post-TFD, en 9 no había tumor residual en histología (enfermedad ausente) y por tanto fueron falsos positivos (FP), mientras que 6/15 sí tenían persistencia histológica. De esos 9 que en la clínica se había considerado que presentaba restos de lesión (RP), en el diagnóstico de **fluorescencia post-TFD** 7 de ellos habían sido clasificados acertadamente como negativos y 2 de ellos como fluorescencia intermedia. De los 6 en que sí se objetivó persistencia tumoral histológico que se clasificaron como RP, la fluorescencia post-TFD había positiva en todos (4/6 intensa y 2/6 intermedia).

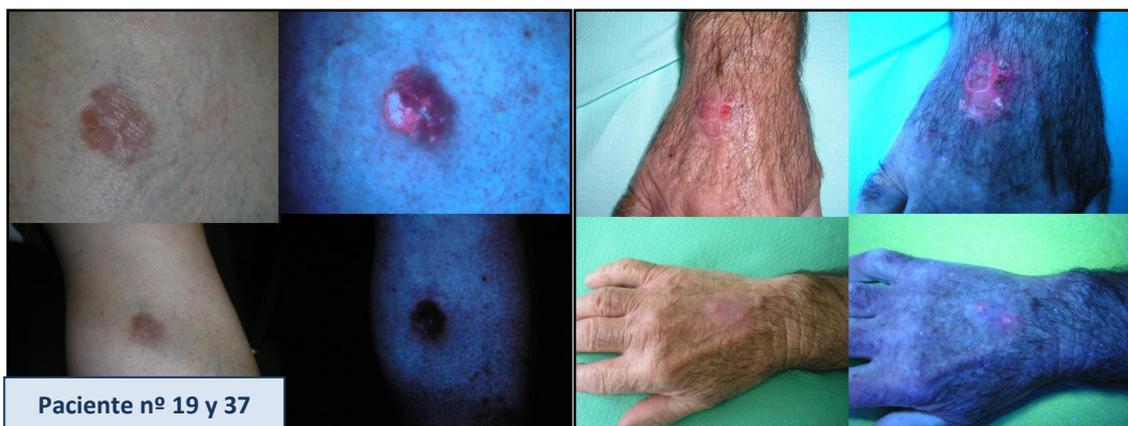
Como se puede ver en las tablas anteriores (Tablas 14 y 15), se obtuvo asociación estadísticamente significativa entre la respuesta clínica y la respuesta histológica y entre la respuesta clínica y la fluorescencia post-TFD y la mejoría de fluorescencia pero no con la fluorescencia pre-TFD.

Comentar que, como dijimos las **biopsias post-TFD** se realizaban según acordaba el paciente, lo cual supone que no estaban determinadas por la imagen clínica o de fluorescencia. De las 32 RP, 15 tenían AP (4 con FI, 4 con FM y 7 FN) y 17 no tenían AP (0 FI, 12 FM, 5 FN). De las 28 RC, 12 tenían AP (0 FI, 1 FM, 11 FN) y 16 no tenían AP (0FI, 4FM, 12 FN). De los 7 RN, 2 tenían estudio AP (1 FI y otro FM) y 5 no tenían estudio AP (los 5 FI).

A continuación mostramos una serie de ejemplos donde podemos comparar, mediante imágenes clínicas y de fluorescencia, las lesiones de EB pre-TFD (parte superior de la composición) y post-TFD (parte inferior de la composición). Se presentan diferentes localizaciones:

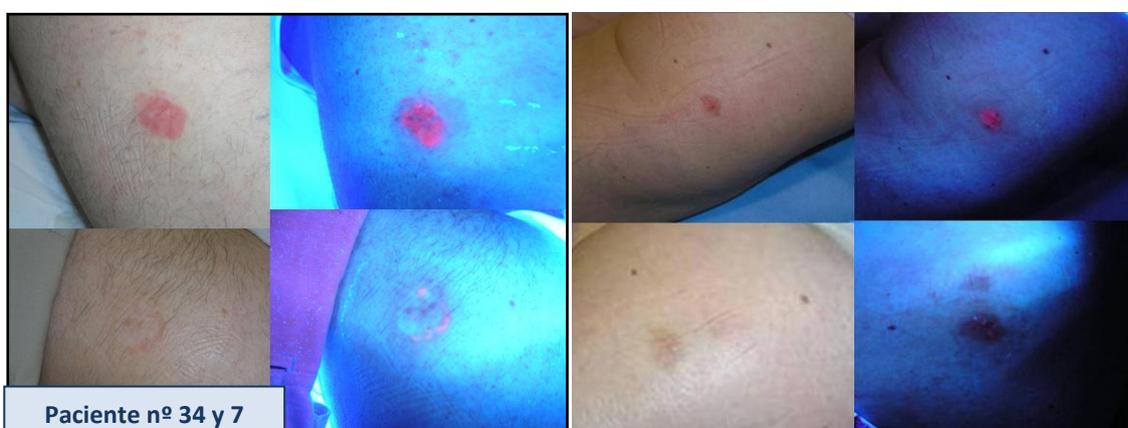


Figuras 9 y 10: Pacientes con EB en extremidades superiores tratados con TFD.



Paciente nº 19 y 37

Figuras 11 y 12: Pacientes con EB en extremidades superiores tratados con TFD.



Paciente nº 34 y 7

Figuras 13 y 14: EB en extremidades inferiores tratados con TFD.

b. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y MODIFICACIÓN CON TFD

La valoración de las tinciones IHQ (p53 y Ki67) pre y post-TFD se realizó en 25/29 pacientes que tenían biopsia post-tratamiento y obtuvo una concordancia del 100% entre los dos observadores (CMG y MTD).

Los resultados del estudio **inmuno**histoquímico que encontramos aparecen recogidos en los anexos III y IX y se exponen a continuación:

Proteína tumoral p53

Existió una pérdida por artefacto de las biopsias del paciente número 6, por lo que los análisis se calcularon sobre 24 muestras.

Pre-TFD	N	%	Post-TFD	N	%
I difuso	13	54	I difuso	5	21
I focal	3	12	I focal	1	4
L difuso	4	17	L difuso	6	25
M difuso	2	8	L focal	5	21
M focal	2	8	M difuso	5	21
Total	24		M focal	2	8
			Total	24	

Tabla 16. Evaluación de la Tinción p53 pre(izquierda) y post-TFD (derecha).

p53 Pre-TFD:

La intensidad de marcaje con la tinción con la proteína tumoral p53 antes del tratamiento (pre-TFD) fue clasificada como intensa en la mayoría de los casos (16/24 = 67%), mientras que se objetivó tinción moderada en 4/24 (17%) y tinción leve en otras 4 de ellas (17%).

La distribución más frecuente fue la difusa. Del total de muestras estudiadas tenían distribución difusa e intensa el 54 % (13/24), difusa y moderada el 8% (2/24) de las biopsias y difusa y leve el 17% (4/24). Todos los leves fueron difusos. El 21% (5/24) restante presentaron distribución focal.

p53 Post-TFD:

Sin embargo tras las dos sesiones de tratamiento, la intensidad de marcaje en la mayoría de los casos pasó a ser leve en 11/24 (46%), mientras que se obtuvo un marcaje moderado en 7/24 (29%) de las muestras e intenso en 6/24 (25%) muestras.

Respecto a las distribución del marcaje con p53 post-TFD, se objetivó que de las 24 biopsias post-TFD, la mayoría, 16/24 (67%), presentaban distribución difusa y 8/24 presentaban distribución focal (33%).

La intensidad de marcaje con p53 clasificado como intenso disminuyó de un 67% pre-TFD a tan sólo el 25% post-TFD. Esta disminución en el marcaje de p53 pre-TFD y post-TFD fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Sin embargo, destacar que en ningún caso la tinción post-TFD llegó a ser nula, sino que la clasificación de menor intensidad fue la de leve.

Ki67

Se perdió por artefacto la muestra del paciente nº 6 (pre y post-TFD) y la muestra pre-TFD del paciente nº 14.

Pre-TFD	N	%	Post-TFD	N	%
I	19	83	I	3	12
M	4	13	M	4	17
Total	23		N	17	71
			Total	24	

Tabla 17. Evaluación de la Tinción Ki67 pre- TFD (izquierda) y post-TFD (derecha). Excluido la tinción del paciente nº 6 en ambas y del nº 14 en pre-TFD por artefacto.

Ki67 Pre-TFD:

Con la tinción con el marcador de proliferación celular Ki67, la mayoría de las 23 biopsias pre-TFD (19/23 = 83%) presentaban marcaje intenso o moderado. Todos de forma difusa.

Ki67 Post-TFD:

Tras el tratamiento sin embargo, el 71% (17/24) de las muestras post-TFD teñidas con Ki67 presentaban una tinción de normalidad (clasificada como “nula” pero que consistía en tinción de la membrana basal como ocurre en la piel sana) y tan sólo 7/24 (29%) de las tinciones con Ki67 post-TFD presentaban una tinción positiva. Dicha disminución de marcaje fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Nº de paciente	Nº IHQ	p53 pre (I-M-L-N)	p53post (I-M-N)	Ki67pre (I-M-N)	Ki67post (I-M-N)
1	1	I	M	I	N
2	2	I	I	I	I
3	3	I	M	I	N
4	4	I	I	I	N
5	5	I	M focal	I	I
7	6	I	L	I	N
8	7	I	L	I	N
9	8	I	M focal	I	N
10	9	L	I focal	M	N
11	10	I	L	I	N
12	11	M focal	M	I	M
13	12	I	I	I	I
14	13	M	L focal	ND	N
16	14	M focal	L	M	N
17	15	I	L focal	I	N
18	16	L	L	I	N
19	17	I focal	L	I	N
20	18	I	I	I	M
21	19	I	L focal	I	N
22	20	I focal	M	I	N
25	21	L	L focal	M	N
26	22	I focal	I	M	M
27	23	L	L focal	I	N
29	24	M	M	I	M

Tabla 18. Evaluación de las tinciones inmunohistoquímicas p53 y Ki67 pre- TFD y post-TF. En la tinción de Ki67 no se especifica distribución porque todas fueron difusas. I: Intenso, L: Leve, M: moderado. ND: No disponible. Excluido la tinción del paciente nº 6 en ambas y del nº 14 en pre-TFD por artefacto.

En general, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la tinción IHQ con otros factores (respuesta clínica, fluorescencia, respuesta histológica, subtipo celular de EB o localización). Tan solo se encontró asociación estadística para las siguientes asociaciones:

- Ki67 post-TFD y *respuesta clínica* ($p = 0,025$): el 91,7% de las RC tienen Ki67 post normal y el 100% de las RN tienen Ki67 intenso.

- p53 post-TFD y *Biopsia post-TFD*: el 83,4% de las biopsias post-TFD positivas tienen marcaje p53 intenso o moderado, ($p = 0,024$).

- Ki67 post-TFD y *F post-TFD*: el 80% de las F intensas tienen Ki67 intenso o moderado mientras que el 93,3% de las F Negativas tienen Ki67 normal, ($p = 0,001$).

- Ki67 post-TFD y *biopsia post-TFD*: el 83,3% de las biopsias post-TFD tienen Ki67 post-TFD intenso o moderado y el 88,9% de las biopsias negativas tienen el Ki67 normal, ($p = 0,001$).

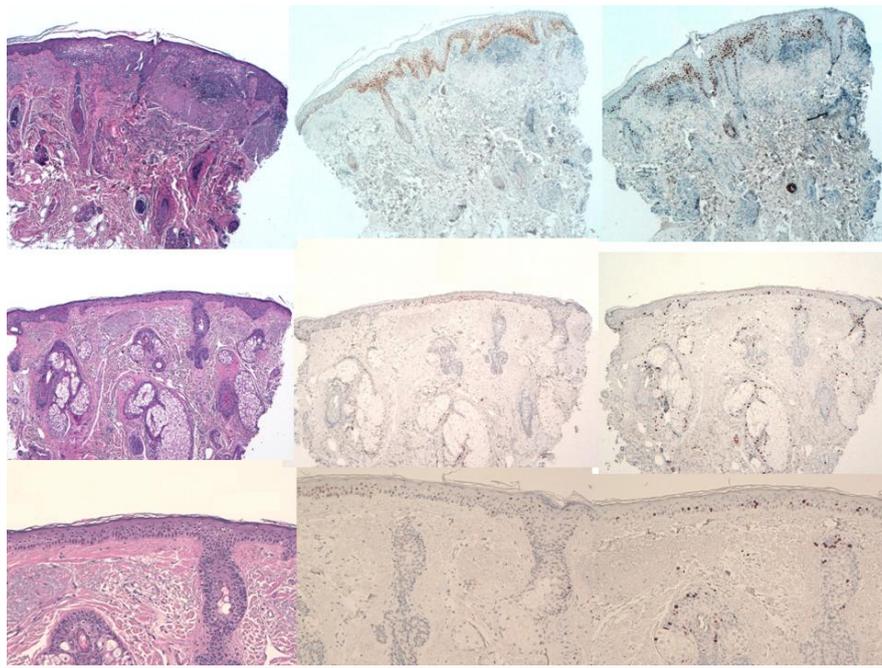


Figura 15. De izquierda a derecha: tinción con Hematoxilina-eosina, p53 y Ki67. En la fila superior imágenes pre-TFD (2,5X), en la fila de intermedia imágenes post-TFD (2,5X) y en la fila inferior imágenes macro (4X) de las lesiones post-TFD. Se objetiva curación tumoral en todas las imágenes post-TFD. (Paciente nº 1).

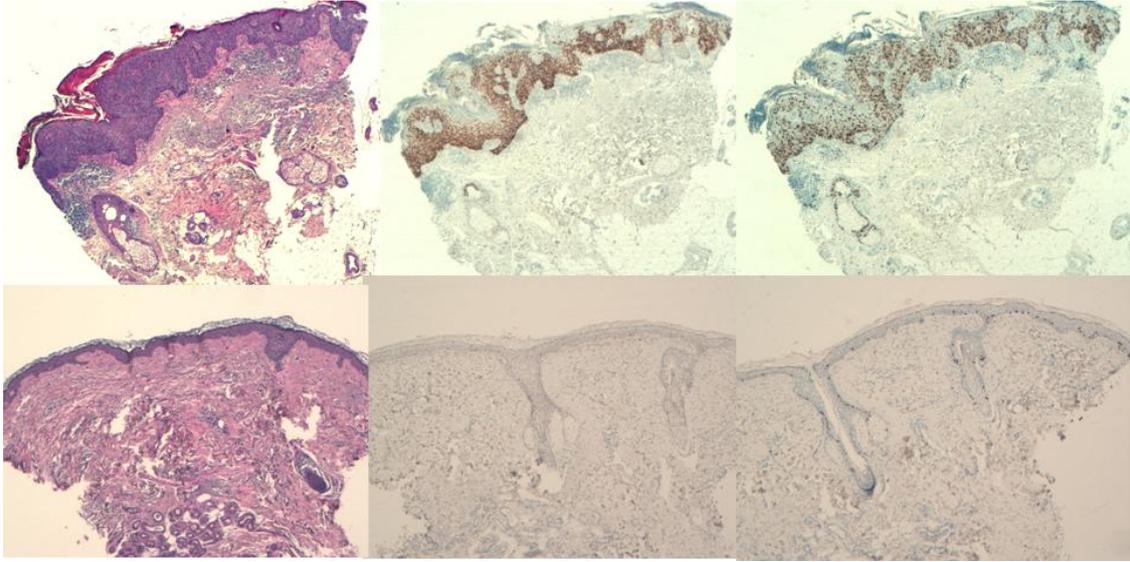


Figura 16. De izquierda a derecha: tinción con Hematoxilina-eosina, p53 y Ki67. En la fila superior imágenes pre-TFD (2,5X), en la fila de intermedia imágenes post-TFD (2,5X). Se objetiva curación tumoral en todas las imágenes post-TFD. (Paciente nº 8).

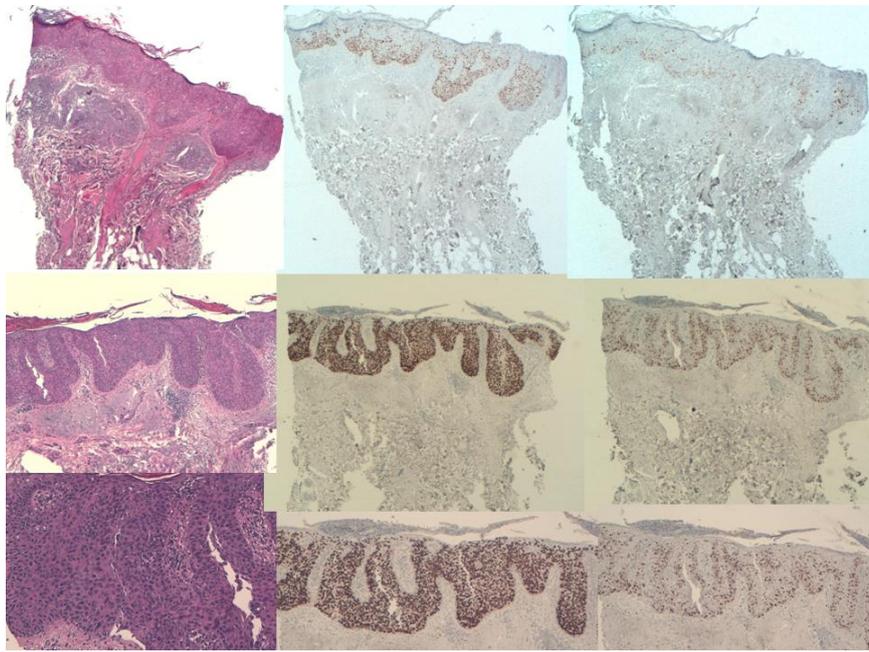


Figura 17. De izquierda a derecha: tinción con Hematoxilina-eosina, p53 y Ki67. En la fila superior imágenes pre-TFD (2,5X), en la fila de intermedia imágenes post-TFD (2,5X) y en la fila inferior imágenes macro (4X) de las lesiones post-TFD). Se objetiva persistencia tumoral en todas las imágenes post-TFD, correspondiente al paciente nº 26.

c. ASOCIACION ENTRE DIFERENTES VARIABLES Y RESPUESTA A TFD

Respecto a la asociación entre diferentes variables independientes y las diferentes respuestas, ya fuera clínica, histológica o emisión de fluorescencia así como la relación entre dichas variables entre sí, detallamos los resultados obtenidos a continuación (Ver tabla 19 al final de este apartado):

1. La **localización** más frecuente fueron las piernas y la menos frecuente el tronco. Los porcentajes mayores de ausencia total de respuesta clínica (RN) se detectaron en la región de cabeza y cuello (18,2% del total de las lesiones de EB localizadas aquí), seguido de las piernas donde la ausencia de respuesta clínica se detectó en el 13% de las lesiones de EB situadas en dicha localización. Tanto en extremidades superiores como en tronco y genitales no se encontró ningún caso de ausencia de respuesta clínica. Las RC se obtuvieron con mayor frecuencia en las extremidades superiores (66,7% de las EB localizadas aquí), seguidas del tronco (50%). Los menores porcentajes de RC se obtuvieron en cabeza y cuello (31,8%), seguidos de cerca por genitales (33,3%) y piernas (34,8%). No obtuvimos resultados estadísticamente significativos.

Tampoco se obtuvo asociación estadísticamente significativa entre localización y respuesta clínica cuando se limitaba al *subgrupo con control histológico* ($p = 0,704$). En este subgrupo todas las RN (2/29) se localizaron en región de cabeza y cuello y a diferencia del análisis general, de todas las RC el 33,3% fue en cabeza y cuello, otro 33,3% en extremidades inferiores, el 25% en brazos y el 8,3% en tronco.

En las extremidades superiores el 33,3% del total de 15 pacientes con EB en brazo presentaron curación histológica, representando un 100% de curaciones histológicas de los 5/15 pacientes que tenían AP post-tratamiento. Se obtuvieron similares porcentajes de curación en la pierna, donde en el 30% de los casos se constató curación histológica, representando un 7/8 (87,5%) de casos con AP post-tratamiento en esa localización. De estos 7 pacientes, 4 se clasificaron como RC y 3 como RP. Por otra parte en la cabeza y cuello el porcentaje de ausencia tumoral total es tan sólo del 27,3%, pero al subanalizar los 12 pacientes con AP post-tratamiento se ve que representa el 50% de este grupo, el menor junto con el tronco (25% de ausencias tumorales del total, que supone un 50% de las 4 EB localizadas

en el tronco). Parece que las extremidades tienen un mayor porcentaje (87,5-100%) de curaciones histológicas, sin embargo nuestros datos no son significativos estadísticamente. Tampoco se obtuvo asociación estadística cuando se limitó el análisis al *subgrupo con control histológico* ($p=0,131$).

En cuanto a la fluorescencia post-tratamiento es la región de cabeza y cuello la que mayor porcentaje (59,1%) de fluorescencia positiva presenta (ya sea media o intensa) y la que menos la extremidad superior. En el subgrupo con control histológico también es la cabeza y cuello la que más porcentaje de fluorescencia presenta 58,3%, siendo la que menos la extremidad inferior (12,5%), seguido de extremidad superior (20%). No se obtuvo asociación estadísticamente significativa ($p=0,353$).

En la fluorescencia pre-tratamiento la región de genital es la que presenta un mayor porcentaje de fluorescencia intensa (100%), seguido de cabeza y cuello (95,5%) y posteriormente miembros inferiores (82,6%). En ninguna localización la fluorescencia leve pre tratamiento es más frecuente que la intensa y tan sólo en el tronco se distribuyen equitativamente en un 50%. No se obtuvo en ningún caso asociación estadísticamente significativa. De los 9 falsos positivos de la clínica, 3 estaban localizados en las piernas, 2 en cabeza y cuello, 2 en brazos y 2 en genitales. Analizando el subgrupo con control histológico, tan sólo en 2/29 (6,9%) se obtuvo fluorescencia pre-TFD intermedia, y estaban ambos casos localizados en extremidades inferiores. El resto de lesiones fueron clasificadas todas como fluorescencia intensa pre-TFD y por orden de frecuencia, de mayor a menor, la localización donde más se hallaron fue en cabeza y cuello, seguido de extremidades inferiores y extremidades superiores. No hubo asociación estadística ($p= 0,22$).

2. El **subtipo histológico** no presentó asociación estadísticamente significativa con el tipo de respuesta clínica. Así, se detectaron 6 RN en el subtipo clásico y 1 RN en el subtipo pagetoide. De este último además se obtuvo 1 RC y 4 RP. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta a TFD en función del subtipo histológico clásico o célula clara.

Tampoco había diferencias en la fluorescencia post o pre-tratamiento. Por ejemplo en el subtipo clásico se objetivó un porcentaje de fluorescencia media pre-TFD del 16,4%, similar al 16,7% del subtipo pagetoide. Así mismo se detectó un 83,6% y 83,3% respectivamente de fluorescencia intensa post-TFD.

Tampoco se detectó asociación estadística entre subtipo histológico y respuesta clínica, fluorescencia pre o post- TDF ni mejoría de fluorescencia *en el subgrupo con control histológico* ($p=0,21$; $p=0,2$; $p=0,54$; $p=0,66$, respectivamente). El subtipo clásico presentó curaciones histológicas en 19/26 (73%) de las lesiones con biopsia post tratamiento, similar al de células claras que curó histológicamente en 2/3 (67%) de las lesiones con biopsia post-TFD.

3. El **sexo** no presenta asociación estadística con la respuesta clínica, fluorescencia ni respuesta histológica post – TFD ($p<0,05$). Tampoco en el subgrupo con control histológico ($p=0,42$; $p=0,48$ y $p=1$, respectivamente).

4. La **edad** no presenta asociación estadística con la respuesta clínica, fluorescencia post-TFD, mejoría de fluorescencia ni respuesta histológica post-TFD ($p= 0,241$, $p=0,603$, $p=0,228$ y $p=0,675$ respectivamente). Tampoco con la presencia o ausencia de recidivas ($p=0,67$) ni efectos adversos ($p=0,613$).

5. El **tamaño** no presentó asociación estadística con la respuesta clínica, ni histológica post-TFD ($p= 0,063$ y $0,837$ respectivamente). Tampoco con la fluorescencia post-TFD o con la mejoría de fluorescencia ($p= 0,071$ y $0,316$ respectivamente), ni con la presencia o ausencia de recidivas ($p=0,121$), ni con la presencia o ausencia de efectos adversos ($p= 0,375$). En *el subgrupo con control histológico* no se detectó asociación estadística significativa ni con sexo ($p=0,46$), ni con localización ($p=0,65$), ni con subtipo histológico ($p=0,59$), ni tampoco con la fluorescencia pre-TFD ($p=0,48$), ni con la respuesta clínica ($p=0,83$), ni con la fluorescencia post –TFD ($p=0,08$) ni con la mejoría de fluorescencia ($p=0,43$) y

tampoco se asoció a la curación o persistencia histológica ($p=0,42$). Finalmente, tampoco se asoció a una mayor frecuencia de efectos secundarios ($p=0,57$).

6. El **número de lesiones** de EB no presentó asociación estadística con la respuesta clínica ni con la fluorescencia post-TFD ni con la respuesta histológica ($p=0,23$; $p=0,09$ y $0,7$ respectivamente).

Ninguna de estas variables presentó asociación significativa con el pronóstico (recidiva vs no recidiva) o con la existencia o no de efectos adversos.

	Respuesta Clínica	F pre	F post	▲ F	AP post	Recidiva	Ef. adversos
Sexo	$p=0,49$	$p=0,86$	$p=0,055$	$p=0,387$	$p=0,73$	$p=0,76$	$p=1$
Edad	$p=0,241$	$p> 0,05$	$p=0,603$	$p=0,228$	$p=0,675$	$p=0,67$	$p=0,613$
Tamaño	$p=0,063$	$p> 0,05$	$p=0,071$	$p=0,316$	$p=0,837$	$p=0,121$	$p=0,375$
Localización	$p=0,45$	$p=0,12$	$p=0,412$	$p=0,302$	$p=0,13$	$p=0,84$	$p=0,715$
Nº EB	$p=0,172$	$p=0,36$	$p=0,08$	$p=0,13$	$p=0,133$	$p> 0,05$	$p=0,715$
Subtipo AP	$p=0,421$	$p=0,986$	$p=0,378$	$p=0,063$	$p=0,814$	$p=0,746$	$p=0,655$
Ef. Adversos	$p=0,314$	$p=0,796$	$p=0,73$	$p=0,231$	$p=0,791$	$p=0,979$	X
F pre	$p=0,261$	X	$p=0,68$	$p=0,07$	$p=1$	$p=0,25$	$p=0,796$
Respuesta clínica	X	$p=0,26$	$p=0,001$	$p=0,001$	$p=0,004$	$p=0,52$	$p=0,314$
F post	$p=0,001$	$p=0,68$	X	$p=0,001$	$p=0,001$	$p=0,001$	$p=0,73$

Tabla 19. Tabla resumen con los resultados estadísticamente significativos resaltados en azul ($p < 0,05$). Calculado sobre el global de 67 pacientes. Se mantiene la significación estadística una vez aplicada la corrección de Bonferroni en comparaciones

El **periodo de seguimiento** medio vimos que fue de 14,10 meses (desviación típica de 7,801) , con un mínimo de 2 meses y un máximo de 39 meses de seguimiento desde la evaluación al mes de la última sesión de TFD. Algunos pacientes seguían en seguimiento a fecha de enero de 2012.

Generalmente a los pacientes con respuesta completa y/o fluorescencia nula post-TFD mantenidas durante 12 meses de seguimiento se les dió de alta. Los pacientes con otros CCNM eran los que tenían periodos de seguimiento mayores. Hubo 3 pérdidas (definidas como seguimientos menores de 5 meses, los nº 33, 41 y 52). En el *subgrupo con control histológico* el tiempo medio de seguimiento fueron 15,14 meses (DE= 7,43 meses).

- En este periodo se constató histológicamente desarrollo de recidivas en 1/67 pacientes (paciente número 4, que había demostrado ausencia tumoral en la histología post-TFD). Hubo 2 pacientes (40 y 44) que pese a presentar RC tras TFD en el seguimiento posterior se detectó reaparición de la lesión tumoral, pero dado que no poseían biopsia post-TFD que constatare tal curación se les incluyó como progresión en superficie.
- En 2/67 pacientes (los nº 13 y 31) se determinó progresión a carcinoma epidermoide invasivo. En el nº 13 la respuesta clínica se había clasificado como parcial pero tanto la fluorescencia intensa post tratamiento como la histología confirmaron la persistencia tumoral. En el 31 se clasificó como ausencia de respuesta clínica y persistencia de fluorescencia intensa pre y pos-tratamiento.
- En 6/67 pacientes (nº 40 y 44 y nº 20, 38 y 48) se detectó progresión en superficie (es decir, aumento de tamaño, no evolución a carcinoma invasivo). Los 2 primeros como habíamos comentado presentaron RC y los 3 últimos habían presentado RP.

Durante ese periodo de seguimiento:

- De los 28 que presentan respuesta completa, en 2 de ellos (número 36 y 43) recibieron con posterioridad más sesiones, manteniendo RC en el seguimiento. Esto es porque el nº 36 tenía discordancia entre observadores (O1 clasificó como RC pero O2 clasificó como respuesta parcial) y prefirió recibir nuevas sesiones. El número 43 tenía fluorescencia leve pese a curación clínica y él prefirió recibir nuevas sesiones, permaneciendo en remisión clínica en el seguimiento. Hubo 1 recidiva en este grupo (nº 4) en el mismo sitio donde se había constatado RC y 2 progresiones en superficie (40 y 44). El nº 44 reapareció la lesión en zona adyacente a la EB previa. El nº 40 también había presentado discrepancia entre observadores, siendo clasificado como RC por O1 y RP por O2, por lo que había recibido 2 sesiones extras de TFD, pese a lo cual reapareció la lesión. Se perdió en el seguimiento el nº 41. Los otros 22/28 mantuvieron su respuesta durante el seguimiento.
- De los 32 que tuvieron respuesta parcial 1 se extirpó ante falta de mejoría (nº2), otro progresó a carcinoma invasor (nº 13), 3 progresaron en superficie (20,38 y 48), 12 recibieron más sesiones de TFD y acabaron en curación clínica completa, que se mantuvo durante todo el seguimiento y 2 presentaron persistencia pese a nuevas sesiones de TFD (nº 64 y 66); 2 se perdieron en el seguimiento tras ser revalorado al mes de la última sesión de TFD (nº 33 y 52); y 11 alcanzaron remisión sin más sesiones (nº 17,19,23,24,25,27,28,29,51,56,67). Destacar que, de estos 11 pacientes 8 tenían estudio histológico, siendo en 8/8 negativo. De ellos, 6 tenían fluorescencia negativa post-TFD y sólo 2 fluorescencia intermedia.
- De los 7 que no obtuvieron ninguna respuesta, 3 acabaron en cirugía extirpación (nº 5,15,62); el nº32 curó clínicamente tras recibir más sesiones de TFD, 1 se mantuvo estable pese nuevas sesiones de TFD (nº 61), uno progresó (nº31) y el nº 54 rechazó cualquier tipo de tratamiento.

El 67,16% (45/67) de los pacientes presentaron buena tolerancia a la aplicación de la TFD. El **efecto adverso** más frecuente fue el de sensación de quemazón (17/67 = 25,4%) seguido de dolor (4/67) y de cicatriz residual (1/67). No se objetivó ningún otro tipo de efecto adverso. Todas las lesiones tratadas mostraron unos excelentes resultados cosméticos.

La mayoría de los pacientes con efectos adversos (20/22) presentaban fluorescencia pre-TFD intensa, sin embargo no se pudo demostrar diferencias estadísticas respecto a los que no presentaron efectos adversos.

Tampoco se objetivó diferencias significativas en los efectos adversos según la localización o tamaño.

	Total	Cirugía	Más sesiones TFD hasta curación	Más sesiones pero persiste	Más sesiones TFD pero progresa a invasor	Progresión superficial	Persiste pero rechaza tratamiento	Remisión sin más sesiones	Recidiva	Pérdida
Respuesta completa	28	0	2	0	0	2	0	22	1	1
Respuesta parcial	32	1	12	2	1	3	0	11	0	2
Respuesta nula	7	3	1	1	1	0	1	0	0	0

Tabla 20. Resumen del seguimiento de los 67 pacientes del estudio.

d. VALIDEZ DEL DIAGNÓSTICO POR FLUORESCENCIA

Uno de los objetivos del estudio era determinar la **validez del diagnóstico de fluorescencia (DF)**, para lo cual se realiza el siguiente análisis de validez de la prueba de Fluorescencia diagnóstica, mediante el análisis por método de Miettinen y Taylor con el que se estudia la S, E, VPP, VPN, CPP, CPN:

VALIDEZ DIAGNÓSTICO DE FLUORESCENCIA	
Sensibilidad	100 %
Especificidad	85,71% (IC: 70,75% al 100%)
VPP	72,73% (IC: 46,41% a 99,05%)
VPN	100%
Cociente de probabilidad positivo (CPP)	7 (IC: 2,4 a 19,96)
Cociente de probabilidad negativo	No aplicable

Tabla 21. Estudio de validez del DF respecto al gold-estándar (A.P.).

Se puede comparar con lo obtenido con la combinación del **diagnóstico clínico + diagnóstico de fluorescencia**. Para ello consideramos prueba positiva a la calificación como RN o RP o FI o FM y prueba negativa a la coincidencia de RC con FN. Lo hacemos así en vez de incluir las RP en prueba negativa, dado que, aunque implique que esa lesión ha respondido a la TFD y pertenezca al grupo de “respondedores”, desde el punto de vista de diagnóstico de la enfermedad se debe considerar positivo:

VALIDEZ DIAGNÓSTICO CLINICO + FLUORESCENCIA	
Sensibilidad	100%
Especificidad	52,38% (IC: 31% a 73,74%)
VPP	44,44% (IC: 21,49% a 67,40%)
VPN	100%
Cociente de probabilidad positivo (CPP)	2,10 (IC:1,34 a 3,29)

Tabla 22. Estudio de validez de la combinación clínica + DF. IC: 95%.

Analizando las evaluaciones de las respuestas clínicas aisladamente, sin la fluorescencia, y comparándolas con la histología dijimos que no existían falsos negativos y sí falsos positivos (9 confirmados histológicamente), que, supondrían una especificidad baja (57,14%, con IC al 95% de 35,98-78,31%), sin embargo no es la valoración clínica la que queremos evaluar sino el diagnóstico de fluorescencia.

Volviendo al DF y a la combinación de diagnóstico clínico + DF vemos como la sensibilidad es máxima en ambos. La especificidad es mayor con el DF aislado: 85,71% frente a un 52,38% obtenido con la combinación de clínica + DF, lo cual hace que la fluorescencia tenga también un mayor VPP (72,73%) frente al 44,44% de la combinación con la clínica.

5. DISCUSIÓN

a. ELECCIÓN DE TFD PARA TRATAMIENTO DE EB

Se han empleado distintas opciones terapéuticas para el tratamiento de EB, la mayoría con repercusiones estéticas para el paciente. La TFD ha sido recientemente aceptada en el tratamiento de este tipo de cáncer cutáneo no melanoma (CCNM), con un grado de recomendación A y nivel de evidencia I, a raíz de algunos estudios que sugirieron su eficacia.^{2,3,4} En la tabla 19 se resumen los distintos estudios realizados sobre uso de TFD en EB publicados hasta el 2006, año en que se publicó el de mayor número de pacientes registrados hasta el momento actual. Posteriormente se han realizado algunos estudios más, con resultados similares.¹²³ El nuestro sería el segundo a nivel mundial en número de pacientes, después del publicado por Morton y colaboradores³ y el más grande publicado en España hasta el momento. Es además el primer estudio retrospectivo y basado en la práctica habitual así como el primero en estudiar la posible utilidad del diagnóstico de fluorescencia en el manejo de la EB y el primero en objetivar modificación en la expresión de ciertos marcadores IHQ tras la TFD. Nuestros resultados son acordes con los previamente publicados en literatura inglesa.

Autor/Año	Luz	FS	Nº	Fluencia (J/cm ²)	Respuesta	Observaciones
Svanberg 94	Láser 630 nm	5-ALA	10	60	9/10 RC	No recurre en 6-14 meses
Cairnduff 94	Láser 630 nm	5-ALA	36	125-150	35/36 RC	3 recaídas en 18 meses. Éxito global 89%
Morton 96	630 nm	5-ALA	20	125	20/20 RC a los 12 meses. 75% curan con una sesión y 25% con 2 sesiones	Probabilidad de curación con una sesión con TFD es mayor que con crioterapia. 2/20 con crioterapia ulceración (no con TFD)
Stables 97	Luz visible	ALA	3	100	RC en todos (2 sesiones)	Trata lesiones de gran tamaño que no responden a tratamiento habitual
Stables 98	Proyector diapositivas	ALA	77	100	73/77 RC a los 12 meses. 71/77 RC a los 24 meses	
Varma 98	Luz roja	ALA	38	30	95% RC en 2 sesiones	12 meses sin recurrencia
Morton 00	Roja 630 nm Verde 540 nm	ALA	32 y 29	125 y 62,5	30/32 RC (94%) y 21/29 RC (72%)	2 recurrencias a los 12 meses (curación global 88%) y 7 recurrencias a los 12 meses (curación global 48%)
Morton 01	630 nm	5-ALA	40	-	Lesiones > 2cm diámetro. 35/40 (88%) RC en 1-3 sesiones	PDT primera elección EB de gran tamaño. Tasa curación 88% igual a CBC superficial de igual tamaño.
Varma 01	640 nm	5 ALA	88	105	88% RC	A los 12 meses 69% RC
Wong 01	630 nm	ALA	4	250	¼ RC (seguimiento 16 meses)	Todas formas digitales (evitando cirugía)

Dijstra 01	400 nm	ALA	1	10-20	90-100%	EB que afecta >50% del cuero cabelludo
Salim 03	Luz visible	ALA	40	100	88% RC y a los 12 meses 82% RC. 2 sesiones separadas 6 semanas	Compara con 5-Fluorouracilo 4 semanas, 2 tratamientos separados 6 semanas: 67% RC y a los 12 meses 48% RC
Dragrieva 04	Luz visible	ALA	4	75	2/4 RC a las 48 semanas. ¼ recurrencia a las 48 semanas y ¼ recurrencia a las 12 semanas	Pacientes transplantados
Britton 05	LCP 585 nm	ALA	17	7mm, 3ms, 10 J/cm ²	14/17 (82%) RC al año	LCP fuente luz eficaz para tratamiento EB
Bapista 06	630 nm	ALA	13	100	RC: 84,6% RP: 15%	Nº medio sesiones para RC: 3,2. Media de seguimiento 38 meses.
Morton 06	Luz roja	MAL	96	75	RC 80% a los 12 meses	Compara con crioterapia (n=82, RC:67% a los 12 meses) y 5 Fluorouracilo (n=32, RC:69% a los 12 meses). Resultado cosmético bueno o excelente en 94% de los tratados con TFD (66% con crioterapia y 76% con 5 fluorouracilo)

Tabla 23. Resumen de los estudios más importantes en base a los cuales se procedió a la aceptación de la TFD como opción válida de tratamiento para la EB ^{66,96,124-135}.

En las guías británicas para manejo de EB publicadas en 2006⁴ se repasan los diferentes tratamientos disponibles que aparecen resumidos en la tabla 24.

Características	5-FU tópico	Imiquimod	Crioterapia	Excision	Curetaje	TFD	Radioterapia	Láser
Pequeña, escasas, buena cicatrización (bc)	4	3	2	1	3	3	5	4
Grande, única y bc.	3	3	3	5	5	2	4	7
Múltiple, bc	3	4	2	3	5	3	4	4
Pequeña, escasas, mala cicatrización (mc)	2	3	3	2	2	1-2	5	7
Grande, única, mc	3	2-3	5	4	5	1	6	7
Cara	4	7	2	2	4	3	4	7
Dedo	3	7	3	5	2	3	3	3
Perianal	6	6	6	6	1	7	2-3	6
Pene	3	3	3	5	4	3	2-3	3

Tabla 24 ⁴ Leyenda: 1: tratamiento de elección, 2: buena elección, 3: generalmente aceptable, 4: razonable pero no requerida frecuentemente, 5: generalmente pobre elección, 6: probablemente no debería ser usada, 7: no evidencia.

Con todos estos diferentes tratamientos se estima de forma global que el riesgo de recurrencia es de un 5-10%,⁴ mayor a la encontrada en nuestro estudio aunque nosotros la definimos en base a la histopatología lo cual pudiera influir en dicha diferencia. El seguimiento recomendado es controvertido pero la media publicada es de un año, sin existir diferencias reseñables según el tipo de intervención aplicada. De ellos la TFD se considera como una opción entre buena y muy buena, con una evidencia científica IA, a tener en cuenta especialmente en lesiones múltiples, grandes o situadas en zonas de mala cicatrización, puesto que la principal ventaja que ofrece es un resultado cosmético excelente. En localizaciones más raras como en la matriz ungueal existen series de casos que avalan su beneficio así como en lesiones desarrolladas en pacientes inmunodeprimidos.¹³⁶ En región perianal determinan que no existe evidencia como para recomendarla (Tabla 20).^{4,99} De forma global los porcentajes de respuesta de la EB con 1 o 2 sesiones de ALA-TFD son de entre 69-100%⁶². Un estudio que comparaba expresamente ambos FS describió respuestas con ALA-TFD de hasta el 82% y con MAL-TFD de hasta el 95% y dichas respuestas se mantuvieron hasta 12 meses después del tratamiento.⁵⁸ Todo ello coloca a esta opción de tratamiento en primera línea de manejo de la EB.^{58,124,137}

Como hemos visto, no existe un tratamiento “gold estandar” en la EB y puesto que todas las opciones tienen sus ventajas e inconvenientes, antes de decantarse por una en particular se debe tener en cuenta el número de lesiones, tamaño de las mismas y potencial de cicatrización de la zona así como factores dependientes del paciente (posibilidad de desplazamiento, exigencias estéticas), infraestructura de cada centro de asistencia médica y factores económicos.^{101,138} Respecto a este último aspecto existe controversia en cuanto al coste comparativo de la TFD frente a otros: un estudio de minimización de costes demostró que actualmente el curetaje y escisión serían las opciones más baratas y TFD la más cara (en dicho estudio se incluyeron también crioterapia, 5-FU y laser)¹⁰¹ sin embargo otro estudio obtuvo resultados contrarios sugiriendo un ahorro económico por lesión.¹³⁸

Centrándonos en la TFD, esta técnica ha demostrado su eficacia en el tratamiento de EB así como su beneficio como tratamiento no invasivo, con buena tolerancia y excelentes resultados cosméticos.

En cuanto a las distintas **fuentes de luz**, en nuestro estudio utilizamos la más aceptada para el tratamiento estándar del cáncer cutáneo no melanoma (CCNM) con MAL-TFD: la luz roja (no coherente) emitida por diodo a 630 +/-3 nm. Esta luz roja se ha demostrado significativamente más eficaz para el tratamiento de la EB que la luz verde de 540nm, alcanzándose en un estudio comparativo entre ambas, una RC de 94% con la primera y del 72% con la segunda.⁹⁷ Sin embargo no se ha encontrado diferencias significativas entre el láser y la luz no coherente, considerándose ambos igual de efectivos hasta el momento, aunque son escasos los estudios bien realizados que comparan ambas fuentes de luz.^{100,121,139} También se ha estudiado un posible beneficio el fraccionamiento de la iluminación pues en 50 EB tratados con ALA-PDT se vio que aquellos con fraccionamiento alcanzaban mayor porcentaje de respuestas completas aunque no estadísticamente significativas.¹⁴⁰ Se ha estudiado también el papel de la iluminación con luz pulsada intensa en QA, EB y CBCs tratados con ALA-PDT obteniéndose resultados similares a los obtenidos con luz roja con dispositivos nuevos de luz pulsada que emiten energía mayor y fija.¹⁴¹ Un estudio reciente de TFD con MAL y laser de diodo como fuente de luz obtiene recurrencias del 43,5% a los 5 años de seguimiento (con mantenimiento de respuesta en el 57,7%).¹⁴²

Respecto a la **superioridad entre diferentes fotosensibilizantes (FS)**, aunque no existen estudios comparativos directos entre ALA y MAL, parece que los resultados son similares y los datos de los estudios respectivos serían extrapolables.^{58,121,124,136} Los diferentes estudios publicados en la literatura (Tabla 20) demuestran, tanto con ALA como con MAL, remisiones completas de hasta 90% así como superioridad respecto a crioterapia y 5-FU.^{3,4,57,58,65,123,141} A continuación se analiza más detalladamente los datos existentes en la literatura:

En el año 2004 por Lui et al¹⁴³ plantearon la eficacia del uso de FS sistémicos (verteporfin) en TFD con iluminación con luz de diodo para el manejo de diferentes tipos de CCNM. Obtuvieron unas respuestas histológicas del 69% cuando usaban energías de 60J/cm² y del 93% cuando usaban energías de 180 J/cm².

De entre los estudios publicados con ALA-TFD destacamos el publicado en 2001 por Varma et al¹²⁶ donde se trataban 50 EB, 62 carcinomas basocelulares y 127 queratosis actínicas. En él se detectaron remisiones completas tras el segundo tratamiento del 88%, 95% y 99% respectivamente. Sin embargo la recurrencia de EB era del 31% de los casos al año, algo mayor que en los carcinomas basocelulares (18%) y en las queratosis actínicas (28%) y mayor que el 8,9% de nuestro estudio.

En ese mismo año Morton et al¹²⁷ publicaron un estudio abierto donde estudiaban la respuesta al tratamiento de 45 EB múltiples y de 40 EB gran tamaño (>2mm) demostrando que el 98% de las lesiones múltiples y un 88% de las grandes desaparecían tras 1, 2 o 3 tratamientos, aunque en ambos grupos hubo 4 recurrencias al año de seguimiento.

Además ALA-TFD se ha **comparado con** crioterapia y con 5-FU en 2 ensayos clínicos randomizados de 40 pacientes cada uno. TFD demostró superioridad en eficacia y efectos adversos en ambos trabajos. (RC de TFD vs 5-FU a los 12 meses 82% vs 48% y RC TFD vs crioterapia 75% vs 50%).^{3, 57,66}

De entre los artículos publicados con MAL-TFD destacaremos el estudio comparativo frente a 5-FU y frente a crioterapia. Fue publicado en 2006 por Morton et al³ y consistía en un ensayo clínico con 225 pacientes con diagnóstico histológico de EB, de las cuales 96 fueron tratadas con TFD, 82 con crioterapia, 30 con 5-FU y 17 con placebo. A los tres meses la proporción de respuestas completa fue similar con TFD (93%), con crioterapia (86%) y con 5-FU (83%) frente al 21% de los placebos, siendo la TFD superior por tanto en eficacia pero también cosméticamente. A los 12 meses el mantenimiento de respuesta completa con TFD fue mayor que con crioterapia y que con 5-FU, con unas tasas de recurrencia del 15% frente al 21% y 17% respectivamente.

Otros estudios publicados comparando TFD frente a otros tratamientos concuerdan con el anterior como por ejemplo el de Salim et al⁵⁷ donde se compararon ALA-TFD frente 5-FU en 8 pacientes transplantados y se obtuvo un porcentaje de curación del 89% con TFD frente al 11% con el segundo.

Así mismo el artículo publicado ya en 1996 por Morton et al⁶⁶ concluyó que de 40 pacientes randomizados donde la mitad recibieron MAL-TFD y la mitad crioterapia, el porcentaje de respuesta fue del 75% en los primeros frente al 50% de los segundos y con mejor tolerancia en el grupo de la TFD.

Otro estudio publicado más recientemente en 2008 por Calzavara et al¹²⁴ trata con MAL-TFD a 41 EB así como 71 carcinomas epidermoides con una respuesta media de 73,2%. La respuesta completa en EB a los 3 meses era de 87,8% y al año se mantenía en 70,7%. Estos porcentajes eran menores en los carcinomas epidermoides, lo cual se explicaba por la menor penetración de MAL en dermis profunda (la luz roja sí penetra a dichas profundidades). Además encuentran que la atipia celular es un factor pronóstico de peor respuesta a MAL. No encontraron asociación estadística negativa de respuesta en relación a tamaño de lesión.

Es interesante también el artículo publicado por Lehmann et al¹⁴⁴ en 2007 donde hace una revisión de ensayos clínicos publicados de cáncer cutáneo no melanoma tratados con MAL-TFD, entre los cuales se encuentra la EB. Concluye que la RC es del 68% a los dos años.

En cuanto a la posible desventaja de la TFD respecto a otros tratamientos que permiten evaluación histológica post-tratamiento como por ejemplo la escisión, está por determinar el papel del diagnóstico por fluorescencia. Dada la aparente buena correlación con la clínica (parece existir negativización de fluorescencia cuando hay remisión clínica), podría ser una herramienta de ayuda en la valoración de la respuesta a tratamiento aunque es cierto que hay controversia al respecto y se deben realizar más estudios en este sentido.^{145,146}

- De forma global se puede concluir con los datos existentes en la literatura y que son compartidos por nuestro estudio, que en el tratamiento de EB con TFD se obtienen tasas de curación de hasta el 95% con dos sesiones, con unas tasas de recurrencia a los 12 meses entre el 0 y el 11%.³ Además los porcentajes de respuestas (89,6%) de nuestro estudio son similares al alcanzado en carcinomas basocelulares superficiales tratados con TFD (89,4%), que fue la primera indicación aceptada junto con queratosis actínicas.¹²¹
- El gran porcentaje de curaciones de EB tratado con TFD puede ser explicada por su carácter intraepidérmico permitiendo una buena penetración de la luz. Los efectos adversos más frecuentemente recogidos son el dolor y quemazón durante el tratamiento, edema, eritema, formación de costras e hipo/hiperpigmentación. Todos ellos curan por sí mismos y en todos los casos la satisfacción del paciente y los buenos resultados estéticos son la norma. Se ha demostrado que el fototipo I y II es un factor independiente pronóstico para presentar dolor en el tratamiento con TFD.¹⁴⁷

b. ELECCIÓN DE PACIENTES

La muestra de pacientes es representativa de los pacientes con EB de nuestra área poblacional que llegan a nuestra consulta. Para evitar sesgos de selección se procedió a la recogida de los pacientes como describimos en el apartado de material y métodos, intentando recoger todos los casos de EB que llegaron al servicio, y seleccionando sólo aquellos que cumplían todos los requisitos de recogida de datos, pero que a priori no tendrían ninguna característica clínica ni histológica peculiar y diferente de los excluidos por falta de datos en la historia o de iconografía. Esto es importante dado que uno de los objetivos del estudio es evaluar la utilidad de la fluorescencia como técnica diagnóstica para facilitar el seguimiento post-tratamiento. Los pacientes pueden tener diferencias histológicas y clínicas, como en nuestra muestra. También a la hora de realización de la biopsia seguimos un protocolo para

que todas se hagan de la forma más equivalente y representativa posible. De hecho se obtuvo un grupo heterogéneo pues de los 29 pacientes con biopsia post-tratamiento, en 8 se obtuvo persistencia tumoral y en 21 de ellos ausencia tumoral en la histología. En el primer grupo (persistencia tumoral) todas las lesiones habían sido clasificadas como RP o RN y como FI o FM. En el último grupo de ausencia tumoral, 9 lesiones habían sido clasificadas como RP y el resto (12) como RC y 3 lesiones fueron clasificadas como FM y el resto (8) como FN, traduciendo que las biopsias se hacían tanto en pacientes donde se objetivó respuesta o persistencia clínica y/o de fluorescencia.

Por lo que a edad y sexo se refiere, la media de edad ha sido de 74,58 años y por sexos hay 34 varones y 33 mujeres. Estas características no difieren de otros estudios realizados en EB.¹⁴⁸

Por localización nuestros datos difieren parcialmente respecto a otros publicados, como por ejemplo el estudio de Hansen y Tyrell^{6,149} donde la localización más frecuente (53,8%) fue cabeza y cuello, seguido de brazos (27%), tronco (11,5%) y piernas (7,4%). Sin embargo nosotros encontramos las piernas como la localización más frecuente (34,3%). El resto de distribuciones sí siguen el orden propuesto por Hansen: cabeza y cuello > brazos > tronco > genitales. Pudiera ser que el aumento en la frecuencia de la afectación en piernas fuera mayor en nuestro estudio por causas debidas al azar o porque en otros servicios las lesiones en piernas se traten con más frecuencia empíricamente sin tener confirmación mediante biopsia, para evitar los efectos adversos posibles de dicha intervención cuando se realiza en extremidades inferiores.

El porcentaje de pacientes con afectación por otro CCNM de nuestro estudio (46,27%) concuerda, aunque levemente superior, con los datos publicados.¹

El tiempo de seguimiento medio transcurrido desde la valoración post-tratamiento (realizada al mes de la 2ª sesión de TFD) fue de 14, 10 meses. En este seguimiento hubo 3/67 pacientes que se perdieron con 4 meses o menos de seguimiento, dos con respuesta clínica parcial y otro de respuesta completa en su última revisión registrada.

c. TÉCNICA DE FLUORESCENCIA

En nuestro estudio hemos realizado la detección de la fluorescencia según la técnica estándar de la Terapia Fotodinámica, utilizando el mismo periodo o tiempo de incubación, que es de tres horas, por ser este el protocolo estándar establecido en nuestro Servicio.

El diagnóstico por fluorescencia puede realizarse también a las 5 o 6 horas después de haber aplicado el fotosensibilizante, que es cuando se estima que la intensidad de la fluorescencia es mayor.^{150,151} En la técnica se pueden emplear dos FS, el ALA o el MAL. Ya hemos comentado que el MAL es una molécula más lipofílica, lo que le confiere una mayor capacidad a la hora de penetrar a través del estrato córneo y de las membranas biológicas. Además, posee una mayor especificidad para las células neoplásicas.¹⁵¹⁻¹⁵⁴ Por estas razones y porque en Europa el MAL es el que está avalado por las guías para el tratamiento de la EB, es el FS que hemos utilizado.

La fluorescencia macroscópica en la piel se correlaciona con el contenido de Pp IX en las células epidérmicas. Se ha propuesto que el acúmulo selectivo o específico del FS en la célula tumoral podría deberse, entre otras cosas a que la Pp IX se acumula en estas células por una reducción de la actividad de la ferroquelatasa y por un aumento de la actividad de la porfobilinógeno deaminasa.^{112-117,155,156} En 2007, el grupo de Smits¹⁵⁷ propuso por primera vez, tras estudiar la correlación entre DF e histología en 67 neoplasias queratinocíticas intraepidérmicas (KIN), que el factor que determinaba un mayor acúmulo en los tejidos tumorales es por una parte el grosor del estrato córneo (correlación inversa) y principalmente la integridad del estrato córneo así como el número de células epidérmicas (independientemente del grado de atipia), pues no objetivó diferencia en el acúmulo de Pp IX en los diferentes grados de KIN. Esto mismo fue defendido también por Kleinpenning¹⁵⁸ en 2010, objetivando también ausencia de diferencias en los diferentes KIN de la intensidad de fluorescencia tumoral (acúmulo Pp IX), pero detectando diferencias en los ratios de fluorescencia: el ratio fluorescencia tumoral / fluorescencia perilesional era igual en la EB que en CE microinvasivo, pero en ambos mayor que en los CE moderadamente diferenciados y en los CE bien diferenciados. Hipotetiza que el

factor limitante de estos últimos será la falta de penetración del FS y la luz. En este caso, a diferencia de Smits¹⁵⁷, proponen el grado de diferenciación tumoral como posible factor influyente en la fluorescencia macroscópica.

Existen dos estudios del DF en EB, pero tan sólo de la lesión activa y puntualmente en el tiempo.¹⁵⁷ Este es el primer estudio donde se analiza el cambio dinámico del DF antes y después un tratamiento (TFD) y su posible validez como prueba diagnóstica.

d. COMPARACIÓN DE RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

Aunque hay algunos estudios publicados sobre la eficacia de la TFD en la EB, el nuestro sería el estudio más grande publicado hasta la fecha en nuestro país. Respecto a los datos que obtuvimos comentar:

d.1. Eficacia de la TFD en la EB: Nuestros porcentajes de respuesta fueron comparables a los publicados (89,6% frente al 75-95%).⁵⁸

d.2. Estudio inmunohistoquímico y modificación con TFD: Hemos estudiado la expresión de marcadores IHQ (p53 y Ki67) en 2 momentos temporales: previo al tratamiento y al mes de la 2ª sesión de tratamiento. Elegimos esta separación temporal por considerarla suficiente para evaluar cambios según lo descrito por Fantini, como describimos más adelante.¹⁵⁹ Recientemente se ha publicado un estudio sobre la modificación de ambos marcadores a las 6 semanas de una única sesión tratamiento de TFD. Aunque este estudio se llevaba a cabo en queratosis actínicas podemos compararlo con los datos de nuestro estudio.¹² En dicho trabajo se objetivó una disminución del grado de displasia y elastosis, así como reducción de la expresión de ki-67 y p53. Este estudio determinó también la expresión de ciclina D1 (que permaneció estable) y de COX-2 (presentó tendencia a la elevación). El estudio concluía que la TFD tiene capacidad de reducir los signos específicos de fotoenvejecimiento cutáneo a nivel histológico. Además la reducción tanto de Ki-67 (indicador de actividad proliferativa) como del p53 (marcador de oncogénesis precoz en la piel), indican que induce reversión del proceso de carcinogénesis. Otro estudio

publicado por Szeimies et al¹⁶⁰ realizado también sobre 26 queratosis actínicas tratadas con 3 sesiones de TFD objetivó una disminución significativa del grado de atipia de las lesiones así como aumento significativo de la cantidad de colágeno y una disminución, no significativa, de la expresión del oncogén p53.

El **Ki67**, marcador nuclear expresado en todas las fases del ciclo celular salvo en G₀,¹⁶¹ también presenta una expresión aumentada en la EB, indicando una mayor actividad proliferativa que en piel sana. Esto da lugar, entre otras cosas, a un crecimiento desordenado de los queratinocitos en toda la epidermis, que es lo típico de la EB. La actividad proliferativa en la EB es mayor en la base del tumor con reducción gradual de la misma hacia el centro y margen del tumor y desde las células basales a la epidermis, confirmando la heterogeneidad intratumoral de actividad proliferativa celular en la EB.¹⁶² Nosotros no estudiamos la distribución de Ki67 en toda la pieza tumoral sino en la biopsia. Lo que encontramos fue una mayor intensidad de marcaje de Ki67 en las capas inferiores, siendo la distribución de marcaje de Ki67 difusa en todas las muestras estudiadas, sin encontrar en ninguna muestra una distribución parcheada (que pudiera representar grupos celulares clonales).

Tras la TFD detectamos en nuestro estudio una reducción significativa de las células positivas para Ki67 y por tanto se puede atribuir a dicho tratamiento la disminución de la proliferación queratinocítica. Esta disminución en la proliferación celular podría ser debido a dos mecanismos: un daño no selectivo del área lesional por la mayor penetración del FS por defecto del estrato córneo que llevaría a una destrucción homogénea de la lesión de EB, quedando el tejido sano sin hiperactividad proliferativa.

En segundo lugar, una posible mayor actividad de la vía del grupo hemo en las células con alta tasa proliferativa¹¹⁶ que harían de estas células hiperproliferativas una diana más sensible al proceso fotodinámico. Smits precisó en un trabajo publicado en 2009¹⁶³ que las diferencias en el acúmulo de Pp IX en diferentes tejidos no se explican por su diferente capacidad intrínseca de síntesis de Pp IX sino por la penetración del FS y por la proliferación celular epidérmica.

El **p53**, que no se expresa de forma normal en piel sana no fotoexpuesta, sin embargo en las lesiones de EB presenta una expresión aumentada. Es difícil saber en la IHQ si esa sobreexpresión es de p53 mutado o nativo.³⁸ Pero como la proteína mutada es mucho más estable que la funcional, es de esperar que la detectada con sobreexpresión sea la mutada. Se sabe que en torno al 50% (12-64%) de los CE invasivos sobreexpresan p53,⁴¹ llegando en ciertos trabajos como el publicado en 2009 por Rodoust y colaboradores a porcentajes de expresión de >90% de los SCC estudiados⁴². En nuestro estudio la expresión del p53 alcanza el 100% de las biopsias de EB estudiadas, estando en concordancia con los que afirman que la EB es la que mayor expresión de p53 posee (comparado con CE, CBC, QA, Queratoacantoma, Melanoma in situ, Enfermedad de Paget).³² También se expresa en piel normal fotoexpuesta aunque en proporciones pequeñas (variable del 0 al 10%).^{34,41} 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 una señal específica del efecto de la radiación UVB. También puede dañarse indirectamente por oxidación inducida por UVA. Fisiológicamente está implicado en la detención del ciclo celular para reparar el ADN. Si este paso falla, induce apoptosis para evitar la perpetuación de esa célula portadora de ADN dañado. Si ocurre una mutación en el gen de p53, puede alterarse su función y no llevar a cabo su control del ADN.

Como apoya nuestro estudio, la TFD es capaz de disminuir de forma significativa la expresión de p53 mutado aunque no de eliminarlo totalmente, revirtiendo parcialmente el proceso de carcinogénesis. El por qué de dicha disminución de expresión de p53 se podría explicar porque tras la TFD se produce una disminución en la carga de células epidérmicas atípicas, que eran las más sensibles a TFD y las que poseían el p53 mutado en mayor proporción. Sin embargo, pudieran persistir algunas células que tuvieran la mutación de p53 pero aún no hubieran desarrollado los cambios consecuentes del DNA y por ello no presentarían ni atipia ni incremento de proliferación siendo por tanto más resistentes a TFD por acumular menor cantidad de Pp IX (fluorescencia negativa). Serían estas últimas células las responsables de la expresión leve de p53 post-TFD. Esto concuerda con el predominio de fluorescencia negativa post-TFD pese a la no negativización del p53

en las muestras estudiadas. Dado que 18/24 muestras con estudio IHQ y control histológico no presentaron atipia histológica post-TFD pero sí persistencia de expresión de p53 mutado (aunque en menor intensidad que pre-TFD), se puede deducir que la recuperación histológica precede a la normalización molecular, del mismo modo que la alteración molecular precede a la alteración histológica.⁴²

Curiosamente, las recidivas al año de seguimiento en nuestro estudio son <10%. Teniendo en cuenta que la EB se cree que recidiva principalmente en los 6 primeros meses,¹²⁶ aparentemente la persistencia de p53 mutado (de intensidad leve) no se asociaría a un mayor riesgo de recidiva a corto plazo. Sin embargo destacar que en nuestro estudio el paciente nº4, que presentó una recidiva posterior, tenía marcaje p53 positivo intenso difuso tras el tratamiento pese a presentar aparente curación clínica, de fluorescencia y en la evaluación histológica de la hematoxilina eosina y Ki67 negativo. Este es el único paciente con recidiva que tenía estudio IHQ por lo que no se pueden sacar conclusiones pero sí plantear hipótesis como por ejemplo que quizás no sea la presencia o ausencia de p53 lo que marcara un posible pronóstico, sino la intensidad y distribución de la expresión del mismo, permitiendo la detección de pacientes candidatos a presentar recidivas posteriores. Si eso fuera así se podrían diseñar métodos diagnósticos no invasivos de detección cutánea del oncogén p53. De los otros 4 pacientes con p53 posterior positivo intenso difuso, al nº 2 se le extirpó su EB (y por tanto no valorable la recidiva), el nº 26 que tenía RP recibió 2 sesiones más de TFD hasta alcanzar la RC y los nº 13 y 20 progresaron. En estos 3 últimos pacientes la tinción p53 no aportó ventajas frente a la clínica, fluorescencia o HE.

Para confirmar la posible relación entre la expresión de p53 (tanto su simple presencia como la intensidad y distribución) y la probabilidad de recidiva habrán de realizarse estudios con mayor volumen de pacientes y tiempo de seguimiento más largo. Una explicación posible para la presencia de p53 en el 100% de las muestras estudiadas post-TFD y la baja tasa de recidiva podría ser que la negativización del p53 mutado tardara más de 1 mes que es el tiempo tras el cual en nuestro estudio realizamos la biopsia post-TFD, como por ejemplo ocurre tras exposición a RUV crónica donde 2 meses después del cese de exposición se ha visto en modelos

murinos que la expresión de p53 seguía presente.⁴³ O bien quizás se necesiten mayor número de sesiones para conseguir la negativización de la expresión de p53 mutado y así erradicar totalmente el proceso de carcinogénesis al eliminar una mutación que dijimos era clave en el inicio de dicho proceso oncológico.

La reducción significativa de este marcador tumoral tras la TFD sugiere que este tratamiento tiene efecto anticancerígeno a nivel molecular, pero falta por determinar si dicha remisión puede llegar ser total en la EB así como las consecuencias exactas de una remisión parcial como la encontrada en nuestro estudio.

A la vista de estos resultados se puede deducir lo siguiente:

Nuestro estudio mostró una disminución significativa tras la TFD de la expresión de ambos marcadores IHQ, Ki67 y p53, pese a que este último no llegó a negativizar.

No evidenciamos asociación significativa entre la expresión pre-TFD de marcadores IHQ (ni con Ki67 ni con p53) con la respuesta post-TFD clínica, de fluorescencia o histológica. Según estos resultados se deduciría que la tinción IHQ con estos marcadores no serviría como predictor de respuesta a la TFD en la EB.

En nuestro estudio aquellas biopsias donde más disminuía el p53 y el Ki67 (de intenso a leve o nulo) la respuesta histológica más frecuente era la respuesta completa (ausencia de tumor en HE), demostrando un paralelismo entre tinción IHQ y alteración histológica en HE. De hecho hubo asociación significativa entre la expresión IHQ y la histología post-TFD para ambos marcadores.

En cuanto a la relación entre p53 y fluorescencia objetivamos que de las 4 biopsias que presentaron p53 pre-TFD positiva pero leve (pacientes nº 10, 18, 25 y 27), el nº 25 presentaba datos de EB de células claras en la histología con hematoxilina eosina. Estos resultados están en concordancia con lo publicado en la literatura, que recoge algunos casos donde la mutación causante del desarrollo de la lesión de EB no esté mediado por alteración en la proteína tumoral p53.⁴⁴ Si existe relación entre características histológicas y mutación o no en p53 habrá que estudiarlo con más

casos en futuros estudios, aunque aparentemente parece que distintas mutaciones resultan en alteraciones histológicas similares.⁴²

No se encontró asociación estadística entre la fluorescencia post-TFD y la expresión de p53, atribuible a nuestra hipótesis de que las células que tras TFD persisten expresando p53 (responsables de la tinción leve con dicho marcador IHQ), serían aquellas que no habrían desarrollado aún los cambios de DNA responsables de la hiperproliferación y por ello no serían capaces de acumular en exceso Pp IX y no emitirían fluorescencia detectable macroscópicamente.

Respecto al Ki67 y la fluorescencia, el grupo de Smits y col. en 2007 no encontró asociación estadística entre el ratio de fluorescencia piel tumoral / piel no lesional y la expresión de Ki67 en lesiones tumorales de neoplasias queratinocíticas intraepiteliales.¹⁵⁷ Dos años después este mismo grupo publicó un estudio donde, tras hacer una correlación entre fluorescencia y nº de células existentes (en piel sana, psoriasis y queratosis actínica) concluyeron que no existían diferencias intrínsecas en la producción de fluorescencia entre estas diferentes entidades histológicas, sino que dependería de la densidad celular, entre otras cosas. También encontraron una mayor fluorescencia en zonas de epidermis con mayor diferenciación queratinocítica, que en la piel sana coincide con las capas altas de la epidermis.¹⁶³ La detección de una asociación significativa entre negatividad de fluorescencia post-TFD con la tinción post-TFD con IHQ (Ki67) apoya dicha relación entre la proliferación celular y el acúmulo de Pp IX (emisión de fluorescencia).

Podría discutirse si la realización de la biopsia post-tratamiento debiera posponerse en el tiempo, sin embargo basándonos en el artículo de Fantini y colaboradores¹⁵⁹ donde estudiaron las modificaciones histológicas en EB tras TFD concluyendo que las modificaciones en la HE y tinción Bcl-2 se detectan intensamente en las primeras 48 horas pero a los 7 días ya no se encuentran restos de tejido apoptótico ni necrótico, pensamos que un mes es suficiente para hacer esta valoración.

Nuestros resultados apoyan que, el tratamiento con TFD no sólo modifica significativamente la displasia que define la presencia de EB, sino también la

expresión de ciertos marcadores IHQ que se han demostrado sobreexpresados en dicha enfermedad^{44,45,165,165} y también en su lesión previa, como son las QA.^{12,160}

La modificación de estos marcadores apoya que este tratamiento actúa modificando las alteraciones genéticas inicialmente detectadas en la EB y por tanto estaríamos actuando sobre dianas específicas de la oncogénesis. Sin embargo mientras que la proliferación celular se normaliza como refleja la tinción de Ki67, el p53 en ningún caso llega a ser nulo (se repitió la tinción con un control en la cual sí que se obtenía resultado nulo), por lo cual podemos plantear que la TFD podría controlar la actividad hiperproliferativa de la EB y controlar parcialmente la expresión de p53 volviendo a estadios iniciales del tumor pero no podría revertir totalmente las alteraciones del p53, es decir no podría actuar restableciendo íntegramente uno de los puntos de inicio del proceso de carcinogénesis y devolver las características genéticas de una piel sana no fotoexpuesta y por tanto podría persistir la posibilidad de futuras recidivas tras TFD. Nos queda la duda si al ser una expresión leve de p53 la encontrada en la mayoría de los casos post-TFD, pudiera acabar siendo reversible espontáneamente pasados varios meses tras la TFD.

Se necesitan más estudios para definir exactamente el impacto de la TFD en el campo de cancerización para saber si es capaz de eliminar totalmente o sólo revertir parcialmente el proceso de cancerización cutánea.

d.3. Asociación entre diferentes variables y respuesta a TFD: Respecto a posibles factores clínicos que pudieran influir en la respuesta (clínica, de fluorescencia o histológica) y en el pronóstico de la EB comentar que estos datos no los pudimos comparar con otros estudios ya que no hay nada publicado hasta el momento al respecto. Es preciso subrayar la importancia del uso de métodos estadísticos para el estudio de la interpretación entre variables de posible importancia pronóstica en las distintas respuestas.

Encontramos una tendencia no significativa a obtener una menor respuesta en la localización de cabeza y cuello seguido de extremidades inferiores, mientras que la mejor respuesta la encontramos en las extremidades superiores. Al compararlo con

el estudio de Tyrell et al, vemos que ellos detectaron la mayor resistencia a TFD en regiones acrales con un 68% de RC frente 85% de RC en localización no acral, sin embargo esa asociación entre localización y respuesta clínica sólo fue significativa para las queratosis actínicas y no significativa (69% vs 81%) para la EB y para los carcinomas basocelulares superficiales (82% vs 87%).¹⁴⁹

En nuestro estudio las EB localizadas en cabeza y cuello son las que presentaron un mayor porcentaje de F pre-TFD intensa pero los que peor respuesta clínica e histológica obtuvieron mientras que las EB de las extremidades superiores tuvieron también elevados porcentajes de F pre-TFD intensa pero el mayor porcentaje de respuesta clínica e histológica. Además, mientras que en cabeza y cuello la mejoría en la fluorescencia fue nula en 31,8% de los casos, en las EB localizadas en extremidades superiores tan sólo se detectaron mejorías nulas en el 6,7%, existiendo asociación significativa entre mejoría de fluorescencia y respuesta clínica e histológica ($p=0,001$ y $p <0,001$). Tyrell¹⁴⁹ detectó un mayor acúmulo significativo de Pp IX (aumento de fluorescencia tras 3 horas de incubación) en la EB acral, sin embargo el fotoblanqueamiento durante la irradiación era menor en dicha localización, aunque sin alcanzar diferencia significativa respecto a EB no acral. Dicho fotoblanqueamiento lo describe correlacionado con la respuesta clínica. Nosotros hipotetizamos que una peor respuesta en cabeza y cuello podría ser explicado, entre otras causas, por una mayor daño actínico (y en consecuencia mayor número de mutaciones) en dicha zona, así como un grosor de piel mayor que disminuiría la concentración del MAL en dicha zona, a diferencia de la piel fina de los brazos de personas de edad avanzada (la mayoría en nuestro estudio), la cual permitiría una gran absorción del MAL.

Morton¹²⁷ describió en un estudio que el 88% (35/40) de las EB mayores de 2 cm obtuvieron respuestas completas tras 1-3 sesiones de ALA-TFD, encontrando asociación entre tamaño y número de sesiones para obtener curación; a diferencia de los carcinomas basocelulares donde el factor más importante era el grosor y no el tamaño en superficie. Estos datos concuerdan por los publicados por este mismo autor posteriormente⁶⁶, donde el diámetro máximo basal de la EB tenía una asociación estadística con el porcentaje de respuestas completas tras MAL-TFD, crioterapia o 5-fluorouracilo. En nuestro estudio no encontramos asociación

significativa estadísticamente entre tamaño (37/64 pacientes tenían EB mayor de 2 cm) y las diferentes variables estudiadas.

Respecto a la variable subtipo histológico y su relación con la respuesta y el pronóstico comentar que no detectamos asociación estadística entre subtipo histológico con ninguna respuesta (clínica, de fluorescencia ni histológica). En 2008 Calzavara¹²⁴ estudió cómo el grosor clínico, la atipia y la profundidad de la lesión se perfilaban como factores pronóstico de respuesta clínica en un análisis univariante, pero al realizar la regresión logística multivariante, sólo la atipia celular se mantenía como factor pronóstico independiente de respuesta clínica. En este caso la atipia celular tanto de EB como CE microinvasivo se clasificó según la escala de Broder's de I-IV grados y concluyó que la TFD era poco efectiva para los grados de atipia III y IV. En nuestro estudio tampoco objetivamos asociación significativa entre el subtipo de células claras y el pronóstico. Se ha estudiado que los CE invasivos que tienen un porcentaje mayor de células claras se desarrollan con mayor frecuencia sobre EB previa que de novo o sobre otras lesiones precursoras, con un patrón como "aparente diferenciación anexial".²⁹ La existencia de menos células claras en los CE incipientes y de más cantidad en los CE avanzados nos sugiere que el desarrollo de células claras en los CE (bien sea por acumulación de glucógeno, por efectos citopáticos del VPH o por otras causas) sería un proceso progresivo que precisa tiempo y solo aparecería en los CE más desarrollados.²⁹ Serían necesarios más estudios para ver si el EB de células claras evoluciona desde EB clásica y si desarrolla con más frecuencia CE invasivo, que en nuestro estudio parece apuntar que no es así. También sería interesante estudiar si la EB de células claras posee mutaciones diferentes a la EB clásica a nivel genético.

d.4. Validez del Diagnóstico de fluorescencia (DF): La fluorescencia es la capacidad que poseen ciertas sustancias de emitir, tras ser estimuladas con energías con una longitud de onda específica para dicha sustancia que en el caso de Pp IX sería longitud de onda menor que la luz visible (ultravioleta), longitudes de onda mayores (de menor energía) dentro del espectro visible (400 – 700 nm) mientras están recibiendo el estímulo energético. Se denomina fosforescencia si dicha emisión

persiste una vez retirada la energía estimulante. Existen muchas sustancias que emiten fluorescencia de forma natural (rocas, minerales, hongos, bacterias, secreciones, etc), lo que se denomina autofluorescencia. Por otra parte existen productos capaces de inducir una fluorescencia secundaria cuando son aplicados en un cuerpo.¹⁰²⁻¹⁰⁴

El término correcto es DF y no diagnóstico fotodinámico como aparece en algunos artículos, ya que no están implicadas especies reactivas de oxígeno, que sí son necesarias como dijimos para la reacción fotodinámica. En el DF la fluorescencia es la luz roja emitida por átomos o moléculas de los tejidos que producen y acumulan grandes cantidades de porfirinas y que previamente se han estimulado por la absorción de energía lumínica (iluminación con luz ultravioleta).

El primero en hablar de DF fue Lipson en el año 1961. La radiación ultravioleta tiene longitudes de onda entre 100 y 400 nm, pero de ellas la mejor longitud de onda para iluminar en DF es aquella radiación ultravioleta de longitudes de onda mayores, en el rango de la UVA que coincide con la denominada banda Soret (360-400nm). Por ello se puede utilizar la luz de Wood. Para la observación de la fluorescencia se utilizan generalmente para la estimulación fuentes de luz con filtro transmisor o de excitación de radiaciones ultravioleta de forma que sólo permiten el paso de longitudes de onda en ese espectro, bloqueando longitudes mayores como el visible. Un ejemplo de ellas serían la lámpara de Wood (370-405 nm) ó las luces de xenón. Para la fotografía con estas fuentes de luz se necesitaría un tiempo de exposición largo, oscuridad ambiental en la habitación donde se realiza la fotografía así como inmovilidad del objeto a fotografiar y de la cámara fotográfica. Para evitar estos problemas se desarrolló una técnica de **fotografía de fluorescencia mediante flash de luz ultravioleta**. El primero en hablar de ello fue Myers. Inicialmente se utilizaron equipos fotográficos a los que se acoplaban varios flashes de gran potencia a los que a su vez se añadían filtros excitadores de luz ultravioleta y un filtro barrera para evitar la luz ultravioleta reflejada por la piel. Posteriormente se comercializaron dos sistemas, uno de ellos es el usado en nuestro estudio, el denominado ClearStone®, que utiliza 2 flashes sincronizados que emiten luz ultravioleta de 400 nm acoplados a la cámara digital. El otro equipo comercializado es DyaDerm®, compuesto por una cámara de vídeo y un flash de luz de xenón adaptado con un filtro ultravioleta entre 370 y 440 nm. Dado que actualmente las

máquinas fotográficas poseen velocidades de sincronización elevadas con el flash, si se adapta el flash se puede realizar fotografía de fluorescencia sin necesidad de estar en un cuarto oscuro.

Además dichas cámaras suelen incorporar el filtro barrera que evita la luz reflejada.¹⁶⁶

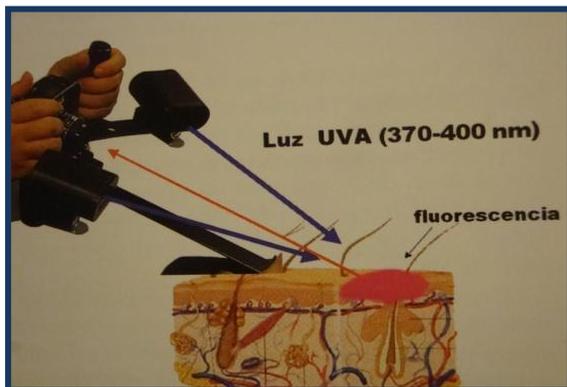


Figura 18. Cámara emisora radiación ultravioleta A para la fotografía de fluorescencia.

Más allá de su aplicación en dermatología estaría la aplicación del DF en gastroenterología (detección de displasias durante la realización de endoscopia), urología (detección de carcinomas in situ, multifocales, etc de vejiga), neumología (detección de tejido tumoral durante la realización de broncoscopia), etc.¹⁶⁶

Las lesiones benignas y piel sana no emiten fluorescencia generalmente y, si lo hacen por presentar fluoróforos endógenos no es una fluorescencia tan roja como la emitida por tumores como EB, CBC o CE, sino más tenue y azulada.^{166,167} Existen diferentes patrones de fluorescencia pues mientras el CBC, CE, QA, EB y enfermedad de Paget presentan fluorescencia intensa roja con RUV (especialmente en los superficiales); otros tumores como el Sarcoma de Kaposi o el Linfoma de células T emiten fluorescencia media y otras lesiones dermatológicas como verrugas, lentigos o melanoma no emiten fluorescencia.¹⁵⁴ Además la demarcación de fluorescencia (ratio fluorescencia lesional / perilesional) es más complicada en la cara, sobre todo en nariz y párpados, lo cual se ha atribuido a la existencia de PpIX en piel con fotoenvejecimiento crónico que habitualmente se ve en estas áreas.

En nuestro trabajo también estudiamos la validez de la técnica diagnóstica de fluorescencia comparándola con el “gold estándar”, que es la histología, y con la combinación de la evaluación clínica y el DF. La comparación de estas técnicas se ha hecho basada en la valoración hecha por 2 dermatólogos del servicio y siguiendo unos análisis estadísticos específicos. En la práctica habitual aunque se realiza DF previo al tratamiento y en el seguimiento de forma estándar, sin embargo el diagnóstico se basa en la valoración clínica aislada (que en nuestro estudio tuvo 9 falsos positivos confirmados histológicamente). Se están introduciendo diferentes métodos de diagnóstico tumoral no invasivos y creemos que, el DF puede ser muy interesante ya que posee como hemos visto en el presente trabajo una alta exactitud y reproducibilidad y además se trata de una opción cómoda ya que se incluye dentro del propio tratamiento con TFD y por tanto no supondría coste adicional (ni tiempo ni dinero) y su carácter no invasivo ayudaría a mantener los resultados cosméticos de la TFD.

Existen diferentes y novedosas alternativas como pruebas diagnósticas no invasivas, sin embargo todas ellas han sido utilizadas tan sólo para el diagnóstico de la lesión activa y no se ha evaluado su modificación tras el tratamiento de la lesión tumoral. Entre estas novedosas técnicas destacamos: los *ultrasonidos de alta frecuencia* que registran el eco emitido por la lesión creando una imagen bidimensional; la dermatoscopia que es bastante prometedora, aunque no ha sido determinada aún su eficacia exacta, en la EB dado el alto porcentaje de presencia de vasos glomerulares y superficie escamosa; la *tomografía de coherencia óptica* que ofrece imágenes tomográficas por secciones cruzadas en tiempo real y que se ha estudiado en el CBC y las queratosis actínicas pero no en la EB. Debido a su baja penetrancia no parece tener utilidad en la delimitación del margen tumoral.¹⁶⁷

También existe el *microscopio confocal* que posee la mayor resolución de todas las técnicas ópticas utilizadas para el diagnóstico de cáncer cutáneo no melanoma. Recientemente se han presentado 10 casos de EB estudiados con microscopio confocal donde se describen rasgos de la atipia queratinocítica que diferenciaría la EB de otras presentes en CCNM, sin embargo se trata de una técnica cara y de difícil interpretación y con escasa penetrancia.¹⁶⁸

De los 29 pacientes con estudio histológico, en 26 la fluorescencia coincide plenamente con los datos histológicos, representando un porcentaje muy alto (89,65%). Sólo en los pacientes nº 1, 27 y 29 presentaron FM post-TFD con curación histológica. No podemos comparar estos resultados con otros datos de DF tras TFD en EB dado que no hay estudios publicados al respecto. El estudio más parecido sería el de Liutkeviciute et al.¹⁶⁶ donde estudian diferentes longitudes de onda de estimulación de fluorescencia en diferentes lesiones malignas (entre ellos 16 CE) y benignas así como en piel normal, realizando biopsia de la zona con fluorescencia más intensa. Encuentran ausencia de fluorescencia en todas las muestras de piel normal y de lesiones benignas y permitió el diagnóstico de 9% de lesiones clasificadas como piel normal clínicamente y que eran carcinomas superficiales.

La mayoría de los estudios publicados se centran en valorar la correlación entre DF y delimitación del margen de carcinoma basocelular, con resultados dispares. (Tabla 23). Aunque nosotros no realizamos estudio del margen o mapeo y por tanto no es una comparación exacta, si analizamos la concordancia entre fluorescencia e histología en nuestro estudio respecto a la obtenida en estos otros estudios, vemos que es similar (algo superior) a la publicada en el estudio realizado por Redondo et al.¹⁶⁹ (donde la coincidencia entre el diagnóstico fotodinámico y el histológico fue de un 70%). Sin embargo nuestros datos difieren de los publicados por Wennberg et al.¹⁷⁰ donde no encontraron una buena concordancia entre la fluorescencia y el mapeo histológico. En su grupo de 22 pacientes, solamente en la mitad (11 pacientes) tuvieron buena correlación. En la otra mitad el diagnóstico por fluorescencia falló (5 con concordancia parcial, pero en 6 no se encontró relación alguna). Otro estudio por Wetzig et al.¹⁷¹ analizó 26 pacientes con carcinomas basocelulares (22 subtipo nodular) localizados en la zona H de la cara. Al comparar el área clínica, de fluorescencia e histológica, observaron que el área de fluorescencia era menor que el área clínica, con valores estadísticamente significativos. Obtuvieron una sensibilidad muy baja, del 38,5% y una especificidad del 88,4%, concluyendo que el DF en la zona centrofacial (zona H de la cara) no aporta datos adicionales a la simple exploración física.

Autor	Año	Nº lesiones y tipo	AP	Favorable	Desfavorable
Smits et al.	2007	➤ 86 lesiones KIN premalignas y malignas: 17 EB (KIN 3)	No	➤ FT > FS ➤ En EB FT / FS > KIN 1 o 2.(NS)	➤ No diferencia significativa FT/FS en KIN 1, 2 o 3.
Wetzig et al	2010	➤ 22 CBC nodulares y 4 superficiales en zona AR ➤ FT: rojo, Autofluorescencia: verde, procesamiento combinado. ➤ Dx clínico. Cirugía Mohs	Sí	➤ 10/26 FT permite completar el Dx clínico del margen	➤ FT pre quirúrgica NO beneficio adicional frente Dx clínico
Neus et al	2009	➤ 29 CBC ➤ ALA y Cirugía según FT	Sí	➤ S=79%, E:100% ➤ Mejor en los más grandes ➤ Sólo 6 no correlación FT y margen AP ➤ Sólo 4 FT FN	➤ No ventaja frente Dx clínico que 20% FN ➤ FT no útil CBC pequeños o nidos micronodulares
Wenberg et al	1999	➤ 30 CBC ➤ Dx clínico y FT, previo Mohs	Sí	➤ Correlación FT y AP: 50% Buena, 23% parcial. Sí útil para delimitar margen CBC	➤ 27% no correlación
Stenquist et al	2006	➤ 12 CBC agresivos ➤ F biespectral (FT 365 nm y autofluorescencia 450 nm) ➤ Margen post-Mohs	Sí	➤ Buena correlación FT y mapeo AP en 42%	➤ No buena correlación en 58%
Sandberg et al	2011	➤ 35 CBC	No	➤ FT/FS > en 2ª sesión por daño córneo ➤ FT/FS con MAL > ALA	➤ No correlación FT con resistencia a tratamiento o dolor, ➤ Margen FT > Dx clínico en CBC < 1cm ² , no en resto.
Redondo et al	2008	➤ 20 CBC ➤ FT ➤ Margen Mohs según Dx clínico	Sí	➤ 14/20 correlación FT y AP=70% (7 Dx clínico y FT =. FT > Dx clínico en otros 7). ➤ 3 FP con FT ➤ 3 FN con FT	➤ 6/20 no correlación
Kleipenning et al	2010	➤ 7 CE, 17 QA, 3 CBC, 9 no tumor (36 total)	Sí	➤ FT/FS > EB KIN 1 o 2 ➤ Util FT Dx Diferencial QA y malignidad ➤ FT > si > queratosis, nº células y superficial	➤ FT/FS > en EB que CE avanzado pero = CE micronodular (dermis papilar) ➤ Tras corregir por nº células no diferencia FT y FS
Liutkeviciute et al	2009	➤ 70 CBC ALA ➤ 16 CE MAL ➤ Diferentes fuentes iluminación	No	➤ 401nm máxima excitación ➤ FT permite delimitar tumores mal definidos o subclínicos	
Wong et al	2007	➤ 10 CBC, 20 sospechosos y 20 controles ➤ Margen cirugía según FT	Sí	➤ S= 94,1% ➤ E=82,6% ➤ FT útil para Dx CBC clínico y subclínico en cara ➤ Margen basado FT > ➤ FT delimita claramente borde lateral controlado con AP	

Tabla 25^{154,157,166,169,171-173} *KIN: Siglas en inglés para el término Keratinocytic intraepithelial neoplasia (displasia intraepithelial queratinocítica). EB: Enfermedad Bowen, FT: Fluorescencia tumoral FS: fluorescencia piel sana, NS: no significativo, CBC: carcinoma basocelular; AP: anatomía patológica; AR: alto riesgo; Dx: diagnóstico, FN: falso negativo, FP: falso positivo; CE: carcinoma epidermoide; QA: queratosis actínica, AP: control AP posterior.*

Destacar que esta comparación con los estudios de fluorescencia en CBC no es exacta ya no sólo porque nosotros no realizamos mapeo, sino porque en diferentes trabajos donde se ha estudiado la demarcación de fluorescencia (ratio fluorescencia tumoral / piel perilesional) es la EB la que alcanza el mayor ratio de forma significativa,¹⁴⁹ no siendo extrapolables los datos de fluorescencia en CBC a la fluorescencia en EB.

Dado que la luz ultravioleta penetra hasta una profundidad de 90µm, permite estudiar la epidermis (aproximadamente 65µm) y la parte más proximal de la dermis,¹⁷² por lo que se explica la gran exactitud a la hora de determinar el margen de la lesión de EB, a diferencia de lo que pasa en otros tumores como el carcinoma basocelular en el que, en el mejor de los casos, la fluorescencia podría delimitarnos el borde lateral de un tumor, pero no permitiría identificar las prolongaciones que infiltran en profundidad. (Tabla 25).

En nuestro estudio concluimos que la fluorescencia es una prueba válida para el diagnóstico de EB. Así lo demuestra su alta sensibilidad (100%), mayor que la alcanzada con el simple diagnóstico clínico en concordancia con los resultados encontrados por Liutkeviciute et al.¹⁶⁶ y su alta especificidad (85,71%), acertando en el diagnóstico de la persistencia tumoral y sin existir asociación estadística con variables como localización o subtipo histológico.

d.4.1. Resumen de los principales conceptos del DF:

d.4.1.1. **Sensibilidad:** Por nuestros resultados se puede afirmar que el DF en la EB es una prueba extremadamente sensible, que puede ser de utilidad tanto en el seguimiento de los pacientes con EB post-TFD (para evitar que pasen desapercibidos persistencias tumorales o confirmar curaciones) como previo al tratamiento, para resaltar visualmente la presencia tumoral y poder así comparar en sucesivas visitas si responde o no al tratamiento. La falta de una especificidad absoluta no conllevaría mayor problema dado que en caso de obtener falsos positivos tan sólo supondría nuevas sesiones de TFD que, aunque supone gasto innecesario, al paciente no le conllevaría ningún efecto negativo y sí podría beneficiarse de la mejora cosmética asociada a la TFD^{121,139}, así como de posibles propiedades antineoplásicas preventivas, actualmente no confirmadas científicamente, pero sugeridas por las modificaciones moleculares encontradas tras la TFD y que podrían suponer un incremento en el tiempo de respuesta libre de enfermedad, aunque esto deberá ser confirmado por la evidencia científica. Por otra parte el que la fluorescencia sea una técnica diagnóstica tan sensible evitará indeseadas biopsias invasivas en aquellos pacientes donde haya dudas de persistencia tumoral. Además una parte muy importante de las lesiones de EB se

localizan en las extremidades inferiores, donde una biopsia puede ser desencadenante de ulceración crónica o afectan a pacientes ancianos donde se debe evitar todo procedimiento invasivo. La alta sensibilidad del diagnóstico de fluorescencia permitirá indicaciones de tratamiento sin biopsia invasiva. Dicha alta sensibilidad evita falsos negativos que podrían llevar a un seguimiento de lesiones que como se ha comentado pueden evolucionar a carcinoma invasivo. Por ello creemos importante que la técnica posea una alta sensibilidad aunque la especificidad no sea del 100%.

d.4.1.2. La **especificidad** del 85,71% alcanzada por el DF es mayor que la obtenida con la simple exploración visual convencional (57,14%) o con la combinación de DF con clínica (52,38%) y por tanto la fluorescencia aumentará la especificidad, con superioridad frente a la clínica sobre todo en aquellos casos con FN o FI. A razón de lo observado en nuestro estudio parece haber situaciones donde la fluorescencia aumente la seguridad del diagnóstico clínico, menos específico, tal y como demuestran los casos donde se obtuvo RP pero con FI post-TFD y persistencia histológica del tumor post-TFD; o en el paciente nº 13 el cual también se clasificó como RP con fluorescencia intensa y que presentó progresión posterior, o los casos donde se objetivó FN y se confirmó ausencia tumoral a pesar de haberse clasificado como RP. Por tanto, cuando la fluorescencia es intensa o nula, parece aumentar la certeza diagnóstica en esos casos de RP, donde pudiera haber duda de la persistencia o no del tumor. En los casos de fluorescencia intermedia, dado que sólo 6/22 pacientes tuvieron estudio histológico, no podemos sacar conclusiones importantes, aunque se puede intuir que, en esos casos de FM post-TFD si la clínica es tajante (RN o RC), sería la que más se aproximaría al diagnóstico histológico.

La alta correlación existente entre fluorescencia y tanto con la clínica como con la histología, demostrada por la asociación estadísticamente significativa entre F post y ambas variables, hace que el DF pueda ser de utilidad en el seguimiento de la EB:

- Ante **Fluorescencia post-TFD intensa** esperaremos encontrar persistencia tumoral en la histología. En caso de presentar una respuesta clínica clasificada como RP, según lo encontrado en nuestro estudio, lo esperable será que sí tenga persistencia histológica y se deberá biopsiar/tratar de nuevo.

-Ante **Fluorescencia post-TFD intermedia** lo esperable según nuestro estudio es que se pueda encontrar tanto persistencia como ausencia tumoral en la histología (50% de probabilidades). Un diagnóstico clínico claro de RC o RN puede ayudar en este caso de FM, ya que en caso de presentar RC se esperará encontrar ausencia tumoral y en caso de RN se esperará encontrar persistencia tumoral, pero no así ante RP que pueden presentarse tanto si hay ausencia como persistencia de tumor en histología.

- Ante **Fluorescencia post-TFD nula**, esperaremos obtener RC con curación histológica, incluso aunque clínicamente se vea RP.

- El **grado de fluorescencia** parece correlacionarse con el grado de afectación *clínica*, afianzando el diagnóstico; y mayor aún es su correlación con la *histología*. Vemos como todas las F negativas presentaron una mayoría de RC y 100% de AP negativa, mientras que en el otro extremo se encontrarían las F Intensas con una mayoría de RP y todas las histologías positivas.

Según lo descrito se puede intuir que, ante casos con duda sobre la clasificación de la respuesta clínica, la fluorescencia puede ser de ayuda dado que, de las lesiones en las que clínicamente parecía existir algo de tumor post-TFD (RP) que tenían además control histológico se detectó: de las curadas histológicamente la mayoría presentaron F negativa (7/9); mientras que de las que histológicamente presentaban persistencia tumoral la mayoría expresaron F intensa (4/6). Por tanto ante una RP parece, según nuestros resultados, que si la lesión emite F intensa lo esperable será que exista persistencia tumoral y si no emite fluorescencia (F negativa) lo esperable será que exista ausencia tumoral. No será de tanta ayuda el hallar F moderada.

d.4.1.3. La **fluorescencia pre-TFD** no presentó asociación significativa con la respuesta clínica o histológica y por tanto no serviría como factor pronóstico de buena o mala respuesta al tratamiento, a diferencia de los que se observó en el estudio publicado por Dra. Fernández-Guarino en queratosis actínicas tratadas con TFD.¹⁴⁵

d.4.1.4. Se vio la existencia de una correlación alta y significativa entre la **mejoría de fluorescencia** y una mejor respuesta, ya que la mayoría de los pacientes que presentaron mejorías altas de fluorescencia obtuvieron RC y mayores porcentajes de curaciones histológicas. Por el contrario, aquellos que no mejoraron la fluorescencia post-TFD respecto la fluorescencia pre-TFD, no presentaron en ningún caso curación histológica sino que los 5 con biopsia post-TFD tenían persistencia tumoral.

Además proponemos el grado de mejoría de fluorescencia como una herramienta clave a la hora de pronosticar una curación real, ya que podemos afirmar tras nuestro estudio que la ausencia de mejoría de fluorescencia sí traduce una peor respuesta histológica, independientemente de la clínica objetivada y viceversa, una mayor mejoría de fluorescencia se asocia significativamente a una mayor curación histológica. De hecho de los 21 pacientes con ausencia tumoral confirmada histológicamente, 16 (76,2%) presentaron mejoría alta de fluorescencia, 5 de ellos (23,8%) presentaron mejoría media y ningún paciente presentó ausencia de mejoría de fluorescencia, mientras que de los 8 pacientes donde se confirmó persistencia tumoral, ninguno de ellos presentó mejoría alta y la mayoría (5 de ellos 62,5%) presentaron ausencia de mejoría ($p < 0,001$).

d.4.1.5. La **evolución de las respuestas parciales a completas** fue de 11 RP que durante el seguimiento evolucionaron a RC. De ellas 8 tenían estudio AP, siendo en todos los casos negativo. La fluorescencia en 6/8 había sido negativa mientras la clínica fue de RP. De aquí se puede intuir que la fluorescencia sea más específica. También se podría postular que la expresión clínica de la lesión de EB pueda tardar más tiempo en alcanzar esa especificidad y ser valorada acertadamente como negativa cuando la inflamación post-TFD haya desaparecido. Podría ser que la valoración clínica precoz fuera la causa del diagnóstico de falsos positivos clínicamente, o bien que aún transcurridos meses o años post-TFD persistieran dichos falsos positivos con el diagnóstico clínico y con ello la menor especificidad clínica no fuera dependiente del tiempo transcurrido tras la finalización del tratamiento fotodinámico.

d.4.1.6. Según los resultados de nuestro estudio, creemos que el **papel del DF** en el momento **previo al tratamiento con TFD** tan sólo sería el de facilitar la visualización de la lesión, pero es en el momento del **seguimiento (post-TFD)** donde el DF sería de mayor utilidad.

d.4.1.7. **Las limitaciones del diagnóstico de fluorescencia:** pueden existir una serie de factores limitantes. Hay que tener en cuenta que tanto el modo de realización de la técnica como la lesión a analizar (ya sea por el tumor en sí mismo o por la piel en la que asiente) pueden inducirnos a errores de interpretación de la fluorescencia. No hay un método único establecido para la detección de la fluorescencia. Puede variar desde el FS, el período de incubación, o la elección del sitio de biopsia para el análisis histopatológico:

d.4.1.7.1. Procedimiento inadecuado.

Si se realiza de forma incorrecta cualquiera de los pasos necesarios para la obtención de la fluorescencia, el resultado no será el adecuado. Por ejemplo:

- Mala preparación previa de la piel o la lesión a estudio: Exceso de capa córnea en lesiones hiperqueratósicas (detritus celulares carentes de metabolismo, y por tanto sin fluorescencia) ó presencia de áreas cruentas o hemorrágicas (tras curetear lesiones hiperqueratósicas o por la misma necrosis tumoral) que pueden impedir una buena captación selectiva.
- Mala aplicación del fotosensibilizante: poca cantidad (en grosor de la capa o en extensión perilesional), por defecto o mala oclusión tras la aplicación del FS, o por aplicarlo un tiempo inadecuado.

d.4.1.7.2. Lesiones pigmentadas.

Existen EB pigmentadas que no muestran fluorescencia tras la aplicación del fotosensibilizante, no se incluyó ninguna EB pigmentada en el estudio.

d.4.1.7.3. Profundidad tumoral.

Dadas las propiedades físicas de la técnica y de la piel, y al igual que ocurre en el proceso terapéutico de la TFD, el diagnóstico es ineficaz cuando la lesión tenga una

profundidad superior a 2mm.⁴ Por tanto será importante eliminar la hiperqueratosis de la EB si la tuviera, previo a la aplicación del FS.¹³⁷

La emisión de fluorescencia por EB se relaciona negativamente con el grosor del estrato córneo.^{157,163} También ha visto que las lesiones de carcinoma epidermoide microinvasivo (estadío precoz, invade dermis papilar) emite más fluorescencia que aquellos CE invasivos más evolucionados y que puede ayudar al diagnóstico precoz cuando clínicamente la lesión es aún poco aparente.¹⁵⁷

d.4.1.7.4. Tipo de celularidad.

Para que el fotosensibilizante acabe produciendo fluorescencia visible, necesitamos que éste entre en la vía metabólica celular y acumule en ella Protoporfirina IX. Este proceso se cumple solamente en células que posean la vía de la síntesis del grupo Hemo, por lo que necesitamos una lesión con abundante celularidad.

Mencionar que se ha planteado que las células tumorales pueden no acumular mayor cantidad de Pp IX que las células de piel sana, sino que sea el mayor número de células existente en la lesión tumoral lo que proporcione mayor fluorescencia.^{104,162,163} En estos trabajos se postula la importancia de la penetración del FS a través del estrato córneo como principal factor determinante de la emisión de fluorescencia, más que por la diferencia de captación de FS entre diferentes tejidos apoyado por los datos del trabajo de tras realizar un estudio ex vivo donde no hayan diferencias significativas en la emisión de fluorescencia entre diferentes tejidos.¹⁶³ Además encuentran una mayor emisión de fluorescencia en los queratinocitos más superficiales que en los basales (menos diferenciados)¹⁶², que concuerda con la peor respuesta a la TFD observada por Calzavara en aquellos EB y CE con mayor atipia celular (III y IV de Broder's).¹²⁴

d.4.1.7.5. Fluorescencia basal en el área anatómica a estudio.

Habitualmente existe un fondo basal de fluorescencia, que depende del tiempo de incubación de la crema (MAL) y también de las características específicas de la piel de cada paciente, de la localización anatómica donde asienta la lesión a estudiar, y de la colonización bacteriana.

Esta fluorescencia basal es muy variable entre diferentes individuos, lo que dificulta la interpretación y la comparación de resultados.

Un claro ejemplo de esta fluorescencia basal es la cara, fundamentalmente la región centrofacial y sobretodo la pirámide nasal, pabellones auriculares y conducto auditivo externo. No se conocen bien las causas de esta mayor fluorescencia basal, pero se cree que podría deberse a la presencia de un mayor número de glándulas sebáceas. Sí se sabe que la proporción fluorescencia en piel tumoral entre fluorescencia en piel sana es mayor cuando se utiliza MAL que en caso de utilizar ALA, dado la mayor penetrancia del primero.¹⁵⁸

De nuestros 3 FP confirmados con AP. Uno de nuestros FP (nº1) se localizaba en frente. Otro (nº 29) en genital y el tercero (nº 27) en dorso de mano.

d.4.1.7.6. Cicatrices.

El resultado de la fluorescencia sobre una cicatriz hay que interpretarlo en función del tiempo de evolución de ésta. Una cicatriz reciente, presenta un fondo basal de fluorescencia debido a la inflamación de la piel para la correcta cicatrización.

Sin embargo, cicatrices ya completamente remodeladas, presentan menor fluorescencia por el tejido fibroso cicatricial, pobre en celularidad. Esto supone una dificultad a la hora de evaluar posibles recidivas sobre tumores previamente extirpados quirúrgicamente. Sin embargo al mes del tratamiento con TFD la inflamación ya es mínima, dado que no se produjo una verdadera cicatriz y por tanto no supondría un problema.

d.4.1.7.7. Inflamación cutánea.

Cualquier tipo de inflamación cutánea, sea cual sea su origen -infeccioso, irritativo, alérgico- mostrará fluorescencia tras la aplicación e incubación del fotosensibilizante, lo cual nos puede dar falsos positivos en nuestro diagnóstico si el tumor a estudio asienta sobre cualquier zona inflamada. Como demostró Fantini¹⁵⁹ al mes de la TFD la inflamación producida por ésta ya se ha resuelto.

Hipotetizamos que, en el falso positivo del nº 27, al estar localizado en dorso de la mano, y en los posibles falsos positivos nº 43, 44 y 50 (brazo y piernas, respectivamente) posibles traumatismos que en esas zonas son más frecuentes, podrían haber contribuido a una inflamación subclínica capaz de emitir fluorescencia.

d.4.1.7.8. Fluorescencia peritumoral.

Al realizar la fluorescencia se suele observar alrededor de la lesión tumoral una área de fluorescencia, normalmente de menor intensidad que la fluorescencia tumoral, pero que en personas no entrenadas o familiarizadas con la técnica pueden llevar a errores y diagnósticos de falsos positivos.

La emisión de fluorescencia por EB activa ha demostrado ser claramente mayor que la piel perilesional y también ser mayor que la emitida por queratosis actínicas, aunque en este último caso las diferencias parecen no ser significativas y por tanto el DF no valdría para diferenciación histopatológica entre grados de neoplasia intraepidérmicas queratinocíticas.¹⁵⁷

d.4.1.7.9. Limitaciones técnicas:

Destacamos entre ellas la posible variabilidad en la iluminación externa, la variabilidad en la carga del flash o la toma de la imagen por diferentes dermatólogos. Además de las limitaciones propias del DF, en nuestro estudio contamos con la dificultad de la elección de la zona a biopsiar post-tratamiento. Dado que tan sólo se toma un punch de 4mm, podría no ser siempre representativo del total de la lesión. Para intentar minimizar este error se escoge siempre el área donde persista clínica y/o fluorescencia o, en su defecto, el área adyacente a la biopsia previa del diagnóstico, donde previamente existía tumor.

d.4.2. Una vez vistas las limitaciones de la técnica de fluorescencia, vamos a proceder a la realización de ciertas **reflexiones sobre ejemplos** de los pacientes de nuestra muestra donde hemos encontrado un "error" de la técnica de DF, ya sea por un resultado que resultó ser falso positivo o bien al contrario, falso negativo:

El **paciente nº 1** es una mujer de 70 años con EB clásica en frente. El tumor marcaba fluorescencia al mes de tratamiento. El resultado histológico fue de ausencia tumoral y por ello se consideró falso positivo. Podríamos atribuirlo a un fallo de interpretación de la fluorescencia basal de la paciente en dicha zona.



Figura 19. Paciente nº1. Imagen clínica y de fluorescencia pre TFD (izquierda) y post-TFD (derecha)

El 2º caso, paciente **nº 27**, de 80 años, presentaba una lesión de EB en dorso de mano. Fue clasificada como FM y RP pero en histología se descartó existencia tumoral y por tanto era otro FP. Como hemos postulado, los microtraumatismos en esta zona podrían ser la causa de la detección de una fluorescencia no tumoral.

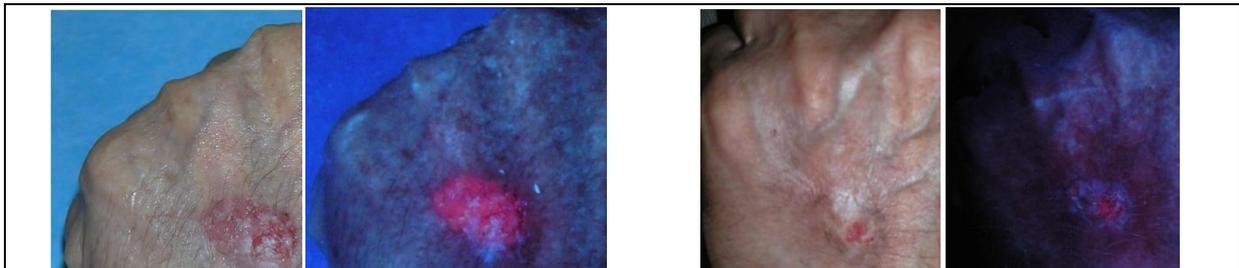


Figura 20. Paciente nº 27. Imagen clínica y fluorescencia pre-TFD (izquierda) y post-TFD (derecha).

El tercer paciente, **nº29**, un varón de 49 años con EB en pene (Queyrat). Se obtuvo fluorescencia positiva, con clínica de RP pero histología negativa, con lo cual es un falso positivo. Hipotetizamos que, la flora bacteriana de la zona pudiera haber contribuido a dicha emisión de fluorescencia.



Figura 21. Paciente nº 29. Imagen clínica y fluorescencia pre-TFD (izquierda) y post-TFD (derecha)

Teniendo en cuenta las ventajas y limitaciones mencionadas anteriormente podríamos pensar que el subtipo de células claras, al tener mayor densidad celular, podría ser más favorable al diagnóstico por fluorescencia, o que ciertas localizaciones anatómicas como el área centro facial, por tener una fluorescencia basal más elevada, no sería el lugar idóneo para realizar esta técnica diagnóstica. Sin embargo, vemos que estas premisas no se cumplen ya que encontramos falsos positivos en diferentes localizaciones y por otra parte los subtipos clásicos presentaron resultados de fluorescencia similares al de células claras.

Además, existe la ventaja de que muchos tumores no están en área centrofacial y por tanto no serían candidatos de falsos positivos debido a esta localización. Sin embargo, los pacientes suelen tener una edad avanzada (media de edad 74 años) y es fácil que, además del tumor, presenten daño actínico perilesional que puede confundirnos a la hora de delimitar la presencia o ausencia de EB.

Hemos observado (aunque no está explícitamente recogido en el estudio) que el patrón de fluorescencia en la lesión de EB es homogéneo e intenso, en teoría explicado por su delimitación al estrato epidérmico, sin sobrepasar membrana basal y por tanto sin llegar a dermis. Así mismo en nuestra experiencia clínica (no recogido en el estudio) el ratio de fluorescencia en EB / fluorescencia peritumoral es muy elevado, como varios estudios publicados en la literatura.¹⁵⁸ Estas características de la fluorescencia de la EB hacen que sea de utilidad a la hora de diferenciar la fluorescencia de la EB de la fluorescencia emitida por cicatrices o inflamación, con un patrón menos claro y regular de fluorescencia. Se podrá así mejorar el porcentaje de verdaderos positivos y verdaderos negativos.

Todo esto hace que en el momento actual, la fluorescencia pueda ser utilizada sistemáticamente como técnica de diagnóstico previo a la TFD, pero principalmente en el seguimiento de estos tumores de EB, por tener una sensibilidad y especificidad muy buenas. Así se mejorará el diagnóstico de seguimiento en estos pacientes, la mayoría de edad avanzada, donde la realización de una simple biopsia puede suponer un gran impacto negativo. La buena correlación entre fluorescencia e histología, mejor que entre clínica e histología, hacen de esta técnica de diagnóstico

no invasiva una herramienta ideal en el seguimiento de estos pacientes tratados de EB con TFD.

Quizás, en un futuro, la técnica avance para intentar mejorar aún más su rendimiento. Necesitamos algún sistema que permita discriminar mejor la fluorescencia verdadera del tumor de la fluorescencia perilesional o del daño actínico circundante, o captar mejor fluorescencias menos intensas de tumores con baja celularidad. Para optimizar la interpretación del DF, se pueden procesar las imágenes en programas informáticos tipo Photoshop® que nos permitan realizar cambios colorimétricos; de este modo, podríamos discriminar mejor las diferentes tonalidades del rosa de la fluorescencia y poder así relacionar las diferentes intensidades de fluorescencia con su clínica o histología correspondiente.

No obstante, no hay estudios publicados sobre este tema en la EB, simplemente hay casos anecdóticos con el carcinoma basocelular, donde usando los cambios colorimétricos sobre la imagen de fluorescencia se obtienen mejores resultados de la técnica diagnóstica, y una aproximación más real a la extensión tumoral.¹⁷⁰

También se está trabajando en la fabricación de nuevos FS. Quizás en un futuro el desarrollo de la nanotecnología permitirá que dichos FS, entre otras mejoras, posean afinidad selectiva por las células tumorales, bien sea por detección de duplicación celular elevada (elevación Ki67) o detección de mutaciones en oncogenes (inactivación p53) u otros mecanismos, que haga incrementar aún más la especificidad del DF.

Respecto a las limitaciones de nuestro estudio, aunque se han ido comentando a lo largo del desarrollo de este trabajo las resumiremos a continuación:

- Número de casos (29) con biopsia post-tratamiento para control histológico y 24 muestras para estudio IHQ. Un número mayor aumentaría la potencia del estudio. Sería necesarios más estudios y de mayor tamaño sobre la relación entre IHQ y recidivas y si por ejemplo aumentar el número de sesiones de TFD llevaría a la negativización de este gen mutado en la mayoría de EB.
- Posiblemente por el escaso número de pacientes con biopsia post-TFD no han sido significativos los resultados obtenidos del estudio de posibles factores

pronósticos de buena o mala respuesta que evaluamos (localización, sexo, tamaño, nº de lesiones o efectos adversos), pudiendo hablar en nuestro estudio tan sólo de tendencias. Por ello no se procedió a realizar el análisis multivariante.

- El estudio in vivo en humanos y siguiendo los requisitos éticos y los protocolos de tratamiento de nuestro servicio suponen ciertas limitaciones metodológicas como es el número de biopsias post-tratamiento obtenidas (podría estudiarse todo el área tratada, mapeándola, e incluso realizando grandes extirpaciones), también podría realizarse biopsias seriadas para ir viendo la evolución en el tiempo o también podría incrementarse el tamaño de las mismas.
- Limitaciones de la técnica. Por ejemplo la técnica de la biopsia que en el momento del diagnóstico se cogía de la zona más llamativa clínicamente y en el momento post-tratamiento en la más llamativa clínicamente y que tuviera mayor fluorescencia o en su defecto adyacente a la biopsia del diagnóstico. Esto permite que podamos afirmar con casi total seguridad (pero no absoluta) que los cambios histológicos e IHQ post-tratamiento puedan compararse con los pre-tratamiento y entre ellos. Ya hemos hablado de las limitaciones propias de la técnica del DF.

6. CONCLUSIONES

- 1) La fluorescencia detectada mediante fotografía con flash emisor de luz ultravioleta de forma previa al tratamiento con terapia fotodinámica de los pacientes con enfermedad de Bowen no es útil para predecir la respuesta a esta terapia, sin embargo, sí lo es para determinar la persistencia o no de la enfermedad tras el tratamiento.

- 2) La terapia fotodinámica elimina total o parcialmente el grado de displasia y la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos p53 y Ki67, implicados en la patogenia tumoral de la enfermedad de Bowen, lo que sugiere un efecto sobre la oncogénesis del tumor.

7. RESUMEN

Introducción:

La enfermedad de Bowen (EB), también conocida como carcinoma de Bowen o carcinoma escamoso in situ, es un tipo de cáncer cutáneo no melanoma (CCNM) que afecta tanto a piel como mucosas y presenta potencial de progresión a carcinoma escamoso invasivo. Por tanto un diagnóstico y tratamiento precoz de esta entidad supone un gran beneficio para el paciente. Varios estudios han demostrado la eficacia y buena respuesta cosmética de la terapia fotodinámica (TFD) en el tratamiento de este tipo de CCNM, consecuentemente la TFD ha sido recientemente aceptada desde el año 2008 como una muy buena opción para el tratamiento de la EB.^{1,2,3} El diagnóstico de fluorescencia (DF) consiste en registrar la fluorescencia emitida por el tejido tras la aplicación de un fotosensibilizante, traduciendo la presencia de células tumorales en dicho tejido. Se ha descrito la utilidad del DF en queratosis actínicas. Existen resultados diversos sobre el DF para carcinoma basocelular y muy escasos estudios sobre el DF en la EB. Este es el primer estudio que correlaciona la fluorescencia tras TFD con la respuesta histológica. Existen muy pocos estudios sobre el marcaje inmunohistoquímico de la EB y ninguno de ellos sobre su modificación tras TFD.

Objetivos:

Determinar la eficacia de la TFD en el tratamiento de la EB así como estudiar la validez del diagnóstico de fluorescencia (DF) respecto al gold-estándar (histología). Como objetivo secundario se planteó la descripción de la modificación en la expresión inmunohistoquímica (IHQ) Ki67 y p53 inducida por TFD así como el estudio de posibles factores pronósticos de respuesta.

Material y método:

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo y descriptivo. Se incluyeron un total de 67 pacientes con EB. Se confirmó el diagnóstico de EB con biopsia cutánea en todas las lesiones antes del inicio de tratamiento con TFD. El protocolo estándar de tratamiento se aplicó a todos los pacientes: se administró ácido metilaminolevulínico tópico (MAL, Metvix®) en oclusión durante 3 horas y a continuación se administró luz roja (630 nm, 38J/cm², 7.5 minutos, Aktilite®). Antes de cada

sesión se tomó iconografía clínica y de fluorescencia (Cámara Olympus® C5060 conectada a flashes ultravioletas (ClearStone® VD-DA digital system). Todos los pacientes del estudio recibieron 2 sesiones separadas por una semana. La respuesta clínica se clasificó en parcial (RP), completa (RC) o nula (RN) y la imagen de fluorescencia como nula (FN), intermedia (FM) o intensa (FI). Se realizó biopsia post-tratamiento en 29 de los pacientes. Se realizó IHQ Ki67 y p53 EN 24 de las 29 biopsias post-TFD y se comparó con la tinción de las respectivas biopsias pre-TFD. Se llevó a cabo un periodo de seguimiento (14,28 meses de media) y se registraron los efectos adversos presentados.

Resultados:

Un total de 35 hombres y 32 mujeres con una edad media de 74,58 años recibieron tratamiento con TFD para su EB. Las lesiones se localizaban principalmente en extremidades inferiores (34,3%). Globalmente el 89,6% de los pacientes alcanzaban respuesta terapéutica (41,8% RC y 47,8% RP, con un seguimiento medio de 14,28 meses).

Post-TFD todas las lesiones con fluorescencia negativa tenían histología negativa mientras que todas las lesiones con fluorescencia intensa presentaban persistencia tumoral en la histología. La fluorescencia tiende a disminuir o desaparecer cuando se evidenciaba respuesta clínica, encontrando RP en la mayoría de las lesiones con fluorescencia intermedia y RC en la mayoría de las lesiones con fluorescencia negativa, evidenciando una correlación entre ambas. Se obtuvo mayor especificidad con la fluorescencia que con la evaluación clínica aislada. El diagnóstico de fluorescencia tras compararse con el gold-estándar (histología) alcanzó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 85,7% (IC: 70,8-100).

La disminución de marcaje con tinción inmunohistoquímica (p53 y Ki67) tras TFD fue estadísticamente significativa.

Discusión:

Se han empleado distintas opciones terapéuticas para el tratamiento de EB, la mayoría de ellas con repercusiones estéticas para el paciente. La TFD ha sido recientemente aceptada para el tratamiento de este tipo de CCNM a raíz de algunos estudios que sugirieron su eficacia.^{1,2,3} En España éste es el primer y mayor estudio de estas características (retrospectivo y llevado a cabo en la práctica médica diaria) y nuestros resultados de eficacia y seguridad son acordes con los previamente publicados en literatura inglesa.

La alta sensibilidad y especificidad del diagnóstico de fluorescencia permitieron clasificarla como prueba diagnóstica válida en la EB, que puede ser útil en el seguimiento de estos pacientes.

Las modificaciones histológicas e IHQ apoyan la modulación inducida por la TFD a nivel de la patogenia molecular carcinogénica de la EB.

Conclusión:

La EB es una entidad muy frecuente en la práctica clínica habitual del dermatólogo. Es imprescindible diferenciarlo de un carcinoma escamoso invasivo. La TFD es una herramienta efectiva para el tratamiento de EB. Su beneficio se manifiesta tanto por la curación como por los buenos resultados cosméticos obtenidos, con buena tolerancia y mínimos efectos adversos. La modulación IHQ apoya el efecto antitumoral per se de la TFD. Por otra parte el diagnóstico de fluorescencia en la EB se perfila como una buena ayuda diagnóstica durante los controles de seguimiento de estos pacientes.

Son necesarios más ensayos clínicos aleatorizados frente a otros tratamientos estándar así como estudios de eficiencia y estudios prospectivos de mayor tamaño para determinar factores pronósticos de buena o mala respuesta.

8. ABSTRACT

Introduction:

Bowen's disease (BD), also known as in situ squamous cell carcinoma, is a non-melanoma skin cancer, which may appear on the skin or mucous areas and has the potential of evolve to invasive squamous cell carcinoma. An early diagnosis and treatment may be of great benefit for the patient. Several studies have shown the efficacy and good cosmetic outcome of photodynamic therapy (PDT) for the treatment of BD and has been approved since 2008 as a good option for the treatment of BD.^{1,2,3} Fluorescence diagnosis (FD) consists on registration of the fluorescence emitted by tissue after application of a photosensitizer, indicating presence of tumoral cells. It has been described as a useful tool for actinic keratosis. Different results have been published about fluorescence diagnosis for basal cell carcinomas. Very few reports about the role of fluorescence diagnosis for BD exist and this is the first one which correlates the fluorescence image after PDT with the histopathological response. There are sparse reports describing immunohistochemical markers of BD, and none of them regard the changes of these markers after PDT.

Objective:

To assess the efficacy of PDT for BD treatment. To assess the validity of FD comparing it with the gold-standar, which is the histopathological study.

A secondary objective was to describe the changes induced by PTD on the expression of immunohistochemical markers such as Ki 67 and p53, as well as determine possible response predictive factors.

Patients and methods:

We carried out an observational, retrospective and descriptive study. A total of 67 patients with biopsy proven BD lesions were enrolled.

All the lesions had been treated with the standard protocol (Topical methyl-aminolaevulinic acid under occlusion for 3 hours and followed by illumination with red-light (630 nm, 38J/cm², 7.5 minutes. Two sessions one week appart). Clinical and fluorescence photographs were taken before treatment and one month after the 2nd one with an Olympus Camera® C5060 connected to ultraviolet flashes

(ClearStone® VD-DA digital system). Clinical response was classified as partial, complete or no response. Fluorescence response was classified as negative, intermediate or intense. The follow-up period and the adverse events observed including pain were also collected. In 29 BD lesions a post-treatment biopsy was performed one month after the 2nd treatment and compared with the pre-PDT biopsy. In 24 out of those 29 lesions an immunohistochemical study was performed pre-PDT and after-PDT with Ki67 and p53 markers. Intensity of immunohistochemical expression was classified in a qualitative way.

A mean follow-up period of 14.28 months and adverse events were registered.

Results:

A total of 36 men and 32 women with a mean age of 74.58 years received PDT treatment for BD. Lesions were mainly located on the inferior extremities (34.3%). Some kind of response was achieved by 89.6% of the patients, 41.8% of them were complete responses and 47.8% partial responses.

Post-PDT all lesions with negative fluorescence had histology without any tumoral rests whereas all lesions with intense fluorescence had tumoral persistence on the histology. Fluorescence tends to decrease or disappear when more clinical response was achieved: partial response was found in most of the lesions with intermediate fluorescence and complete response was found in most of the lesions with negative fluorescence. We found statistical association between fluorescence and the clinical and histopathological evaluations performed after treatment. Fluorescence diagnosis obtained a 100% sensitivity (higher than clinical evaluation alone) and a specificity of 85.7% (CI: 70.8-100). The decrease on the expression of immunohistochemical markers (Ki67 and p53) post-PDT was statistically significant.

Discussion:

Different therapeutic options exist for BD treatment, most of them with an important cosmetic impact for the patient. PDT has been recently approved for the treatment of BD tumor based on previous studies which suggested the efficacy of this

treatment.^{1,2,3} Our study is the first one performed in our country with a retrospective design and performed during the diary practice. Our results regarding efficacy and security are similar to those previously published in the English literature.

The high sensitivity and specificity of FD allow us to classify it as a valid diagnostic tool for BD diagnosis, and it may be useful during the follow-up of this disease.

Histological and immunohistochemical modifications induced by PDT suggest that this therapy may have a role in the modulation of the oncogenic molecular mechanisms implied in the BD formation, helping in reverse the carcinogenic process.

Conclusion:

BD is a frequent entity and it must be differentiated from invasive squamous cell carcinoma. PDT is an effective treatment for BD as it has high rates of response and an excellent cosmetic outcome with good tolerance and minimal adverse events.

Fluorescence diagnostic for BD seems a very helpful diagnostic tool during the follow-up of these patients.

Modulation of the immunohistochemical markers supports the anticarcinogenic role directly due to PDT.

More randomized clinical studies are to be performed comparing PDT with other standar treatments and assessing the efficiency of this treatment as well as larger and prospective studies to asses predictive factors or response.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Lui H, Anderson RR. Photodynamic therapy in dermatology: recent developments. *Dermatol Clin*. 1993;11:1-13.
2. Christensen E, Warloe T, Kroon S, Funk J, Helsing P, Soler AM, Stang HJ, Vatne O, Mørk C. Guidelines for practical use of MAL-PDT in non-melanoma skin cancer. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24:505-12.
3. Morton CA, Horn M, Leman J, Tack B, Bedane C, Tjioe M, Ibbotson S, Khemis A, Wolf P. Comparison of topical methylaminolevulinate photodynamic therapy with cryotherapy or fluorouracil for treatment of squamous cell carcinoma in situ: results of a multicenter randomized trial. *Arch Dermatol*. 2006;142:729–735.
4. Cox NH, Eedy DJ, Morton CA. Guidelines for management of Bowen's disease: 2006 update. *Br J Dermatol*. 2007;156:11-21.
5. Reizner GT, Chuang TY, Elpern DJ, Stone JL, Farmer ER. Bowen's disease (squamous cell carcinoma in situ) in Kauai, Hawaii. A population-based incidence report. *J Am Acad Dermatol*. 1994;31:596-600.
6. Hansen J, Drake A, Walling H. Bowen's Disease: A Four-Year Retrospective Review of Epidemiology and Treatment. *Dermatol Surg*. 2008;34:878–883.
7. Kovács A, Yonemoto K, Katsuoka K, Nishiyama S, Harhai I. Bowen's disease: statistical study of a 10 year period. *J Dermatol*. 1996;23:267-74.
8. Jaeger AB, Gramkow A, Hjalgrim H, Melbye M, Frisch M. Bowen disease and risk of subsequent malignant neoplasms: a population-based cohort study of 1147 patients. *Arch Dermatol*. 1999;135:790-3.
9. Daisuke Inokuma, Satoru Aoyagi, Nao Saito. Bowen's Disease of the Nail Matrix Presenting as Melanonychia: Detection of Human Papillomavirus Type 56. *Acta Derm Venereol*. 2009;89:638-9 .
10. Porter WM, Hawkins D, Dinneen M, Bunker CB. Penile intraepithelial neoplasia: clinical spectrum and treatment of 35 cases. *Br J Dermatol*. 2002;147:1159–65.
11. Neville BW. A red lesion on the palate. *J Am Dent Assoc*. 2006;11:1537-38.
12. Bagazgoitia L, Cuevas Santos J, Juarranz A, Jaén P. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. *Br J Dermatol*. 2011;165:144-51.

13. MacKie RM, Quinn AG. (2004) Non-melanoma skin cancer and other epidermal skin tumours. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. (Eds.) *Rook's textbook of dermatology*. 7th edn. Oxford: Blackwell Publishing. 36.1-36.50.
14. Kossard S, Rosen R. Cutaneous Bowen's disease. An analysis of 1001 cases according to age, sex, and site. *J Am Acad Dermatol*. 1992;27:406-10.
15. Derancourt C, Mougin C, Chopard Lallier M, Coumes-Marquet S, Drobacheff C, Laurent R. Oncogenic human papillomaviruses in extra-genital Bowen disease revealed by in situ hybridization. *Ann Dermatol Venereol*. 2001;128:715-8.
16. Brenn T, McKee P. (2005) Tumors of the surface epithelium. In: Granter S, Calonje E, McKee P. (Eds.) *Pathology of the Skin*. 2. 3th edn. London: Elsevier Mosby. 1193-1197.
17. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Manzur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160:1-40.
18. Hanahan D, Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
19. Slaughter DP, Southwick HW, Mejkall W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6:963-968.
20. Sarasin A, Giglia-Mari G. p53 gene mutations in human skin cancers. *Exp Dermatol*. 2002;11 Suppl 1:44-47.
21. Hearn RM, Kerr AC, Rahim KF, Ferguson J, Dawe RS. Incidence of skin cancers in 3867 patients treated with narrow-band ultraviolet B phototherapy. *Br J Dermatol*. 2008;159:931-35.
22. Sarasin A. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat Res*. 1999;428:5-10.
23. Arora A, Attwood J. Common skin cancers and their precursors. *Surg Clin North Am*. 2009;89:703-712.
24. Drake AL, Walling HW. Variations in presentation of squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease) in immunocompromised patients. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59:68-71.
25. Ulrich C, Jurgensen JS, Degen A, Hackethal M, Ulrich M, Patel MJ, Eberle J, Terhorst D, Sterry W, 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*. 2009;161 Suppl 3:78-84.
26. Dandie GW, Clydesdale GJ, Jacobs I, Muller HK. Effects of UV on the migration and function of epidermal antigen presenting cells. *Mutat Res*. 1998;422:147-154.
27. Strayer DS, Santa Cruz DJ. Carcinoma in situ of the skin: a review of histopathology. *J Cutan Pathol*. 1980;7: 244-59 .

28. Maldonado C, Raya C. Lesión violácea perianal. *Piel*. 2004;19:332-4.
29. Corbalán-Vélez R, Ruiz-Macia JA, Brufau C, López-Lozano JM, Martínez-Barba E, Carapeto FJ. Las células claras en el carcinoma espinocelular cutáneo. *Actas Dermosifiliogr*. 2009;100:307-16.
30. Elder DE. (2007) Localized Superficial Epidermal or Melanocytic Proliferations. In: Elder DE, Elenitsas R, Bennett JB, Iofreda M, Miller J, Miller F. (Eds.) *Atlas and synopsis of Lever's histopathology of the skin*. 2.2nd edn. London: Lippincott. 17-71.
31. Venadero F, Franco G, Vásquez M. Queratosis actínica bowenoide en un cuerno cutáneo. *Rev Cent Dermatol Pascua*. 2008;17:89-91.
32. Skazi D, Turkmenoglu TT, Kabukcuoglu F. The expression of p63 and p53 in keratoacanthoma and intraepidermal and invasive neoplasms of the skin. *Pathol Res Pract*. 2009;205:589-94.
33. Gruijl, FR. p53 mutations as a marker of skincancer risk: comparison of UVA and UVB effects. *Exp Dermatol*. 2002;11 Suppl 1:37-9.
34. Benjamin CL, Ananthaswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;224:241-8.
35. Berking C. Photocarcinogenesis. Molecular mechanisms and preventive strategies. *Hautarzt*. 2007;58:398-405.
36. Burnworth B, Arendt S, Muffler S, Steinkraus V, Brocker EB, Birek C, Hartschuh W, Jauch A, 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*. 2007;86:763-780.
37. Van der Pols JC, Xu C, Boyle GM, Parsons PG, Whiteman DC, Green AC. 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*. 2006;163:982-8.
38. Stratigos AJ, Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou A, Pagouni A, Christofidou E, Petridis A, Papadopoulos O, Kokka E, Antoniou C, Georgala S, Katsambas AD. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19:180-6.

39. Boukamp, P. UV-induced skin cancer: similarities--variations. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2005;3:493-503.
40. Ananthaswamy HN, Loughlin SM, Cox P, Evans RL, Ullrich SE., Kripke ML. Sunlight and skin cancer: inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. *Nat Med.* 1997;3:510-14.
41. Carpenter PM, Linden KG, McLaren CE, Li KT, Arain S, Barr RJ, Hite P, Sun JD, Meyskens FL Jr. Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:1996-2002.
42. Rodust PM, Stockfleth E, Ulrich C, Leverkus M, Eberle J. UV-induced squamous cell carcinoma--a role for antiapoptotic signalling pathways. *Br J Dermatol.* 2009;161 Suppl 3:107-115.
43. Melnikova VO, Pacifico A, Chimenti S, Peris K, Ananthaswamy HN. Fate of UVB-induced p53 mutations in SKH-hr1 mouse skin after discontinuation of irradiation: relationship to skin cancer development. *Oncogene.* 2005;24:7055-63.
44. Talghini S, Halimi M, Baybordi H. Expression of p27, Ki67 and p53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and bowen disease. *Pak J Biol Sci* 2009;12:929-33.
45. Fernández-Figueras MT, L Puig, E Musulen, M Gilaberte, C Ferrandiz, E Lerma, A Ariza. Prognostic significance of p27Kip1, p45Skp2 and Ki67 expression profiles in Merkel cell carcinoma, extracutaneous small cell carcinoma, and cutaneous squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2005; 46:614–621.
46. Hui AM, Li X, Shi YZ, Takayama T, Torzilli G, 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.* 2000;6:4272-77.
47. Mastoraki A, Ioannidis E, Apostolaki A, Patsouris E, Aroni K. PGP 9.5 and Cyclin D1 Co-Expression in Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Int J Surg Pathol.* 2009;17:413-20.
48. Bito, T, Ueda M, Ahmed NU, Nagano T, 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.* 1995;22:427-434.
49. Mihailovici MS, Teleman S, Ungureanu C. The prognostic molecular factors in precancerous lesions and nonmelanotic skin carcinoma. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2003;107:494-501.

50. Li ZX, Peng ZH, Ji FP, Yuan JY, Pan M, Liu Y, Wan Q. Expression of E-cadherin and beta-catenin in Bowen's disease and squamous cell carcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2006;26:1245-7. (Abstract).
51. Salama ME, Mahmood MN, Qureshi HS, Ma C, Zarbo RJ, Qmsby AH. P16INK4a expression in actinic keratosis and Bowen's disease. *Br J Dermatol*. 2003;149:1006-12.
52. Mun JH, Park JM, Song M, Jwa SW, Kim HS, Ko HC, Kim BS, Kim MB. The use of dermatoscopy to monitor therapeutic response of Bowen's disease: A dermatoscopic pathological study. *Br J Dermatol*. 2012;167:1382-5.
53. Ahlgrim-Siess V, Hofmann-Wellenhof R, Cao T, Oliviero M, Scope A, Rabinovitz HS. Reflectance confocal microscopy in the daily practice. *Semin Cutan Med Surg*. 2009;28:180-9.
54. Gareau DS, Karen JK, Dusza SW, Tudisco M, Nehal KS, Rajadhyaksha M. Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *J Biomed Opt*. 2009;14:034012.
55. Karen JK, Gareau DS, Dusza SW, Tudisco M, Rajadhyaksha M, Nehal KS. Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy. *Br J Dermatol*. 2009;160:1242-50.
56. Patel YG, Nehal KS, Aranda I, Li Y, Halpern AC, Rajadhyaksha M. Confocal reflectance mosaicing of basal cell carcinomas in Mohs surgical skin excisions. *J Biomed Opt*. 2007;12:034027.
57. Salim A, Leman JA, Mc Coll JH, Chapman R, Morton CA. Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease. *Br J Dermatol*. 2003; 148:539–43.
58. Calin MA, Diaconeasa A, Savastru D, Tautan M. Photosensitizers and light sources for photodynamic therapy of the Bowen's disease. *Arch Dermatol Res*. 2011;303:145–151.
59. Arlette J. Treatment of Bowen's disease and erythroplasia of Queyrat. *Br J Dermatol*. 2003;149:43-9.
60. Micali G, Nasca MR, de Pasquale R. Erythroplasia of Queyrat treated with imiquimod 5% cream. *J Am Acad Dermatol* 2006;55:901-3.

61. Patel GK, Goodwin R, Chawla M, Laidler P, Price PE, Finlay AY, Motley RJ. Imiquimod 5% cream monotherapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54:1025-32.
62. Serra-Guillén C, Nagore E, Guillén C. Photodynamic therapy vs imiquimod. *Actas dermatosifiliogr.* 2012;103:488-501.
63. Serra-Guillén C, Nagore E, Hueso L, Traves V, Messeguer F, Sanmartín O, Llombart B, Requena C, Botella-Estrada R, Guillén C. A randomized pilot comparative study of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy versus imiquimod 5% versus sequential application of both therapies in immunocompetent patients with actinic keratosis: clinical and histologic outcomes. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66:e131-7.
64. Cleary RK, Schaldenbrand JD, Fowler JJ, Schuler JM, Lampman RM. Treatment options for perianal Bowen's disease: survey of American Society of Colon and Rectal Surgeons Members. *Am Surg.* 2000; 66:686–8.
65. Leibovitch I, Huilgol S, Selva D, Richards S, Paver R. Cutaneous squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease): treatment with Mohs' micrographic surgery. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52:997-1002.
66. Morton CA, Whitehurst C, Moseley H, McColl JH, Moore JV, Mackie RM. Comparison of photodynamic therapy with cryotherapy in the treatment of Bowen's disease. *Br J Dermatol.* 1996; 135:766–71.
67. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 80: 427-487.
68. Saito T, Hayashi J, Sato H, Kawabe H, Aizawa K. Scanning electron microscopic analysis of acute photodynamic therapy for arterioesclerotic plaques of rabbit aorta using a pheophorbide derivative. *J Clin Laser Med Surg.* 1996; 14:1-6.
69. Ben-Hur E, Oetjen J, Horowitz B. Silicon phthalocyanine Pc4 and red light causes apoptosis in HIV infected cells. *Photochem Photobiol.* 1997;65: 456-460.
70. Hendrich C, Siebert WE. Photodynamic therapy for rheumatoid arthritis?. *Lasers Surg Med.* 1997; 21: 359-64.

71. Redondo, P, Sánchez-Viera A. (2007) Principios básicos de la Terapia Fotodinámica. En: Gilaberte Y, González S. (Eds.) *Terapia Fotodinámica*. 1.1a edn. Madrid: EdiComplet. 11-9.
72. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med*. 2011;43:755-67.
73. Christiansen K, Bjerring P, Troilius, A. 5-ALA for photodynamic photorejuvenation--optimization of treatment regime based on normal-skin fluorescence measurements. *Lasers Surg Med* 2007;39:302-310.
74. Stapleton M, Rhodes LE. Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous diseases. *J Dermatol Treat*. 2003;14:107-112.
75. Pandey R, Zheng G. (2000) Porphyrins as photosensitizers in Photodynamic therapy. In: Kadish K, Smith K, Guillard R. (Eds.) *The Porphyrin Handbook*. 6. 1st edn. New York: Academic Press. 55-124.
76. Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc*. 2013;46:7-23.
77. Jiraskova M, Jirasek L, Stork J, Vosmik F, Jirsa M. Photodynamic diagnosis and therapy in dermatology. Experience with use of TPPS4 in skin diseases. *Cas Lek Cesk*. 2003;142:493-9.
78. Karrer S, Abels C, Szeimes RM, Bäumlner W, Dellian M, Hohenleutner U, Goetz A, Landthaler M. Topical application of a first porphycene dye for photodynamic therapy - penetration studies in human perilesional skin and basal cell carcinoma. *Arch Dermatol Res*. 1997;289:132-7.
79. Lo PC, Huang JD, Cheng DY, Chan EY, Fong WP, Ko WH, Ng DK. New amphiphilic silicon(IV) phthalocyanines as efficient photosensitizers for photodynamic therapy: synthesis, photophysical properties, and in vitro photodynamic activities. *Chemistry*. 2004;10:4831-8.
80. Fabris C, Soncin M, Mazzon E. A novel tetracationic phthalocyanine as a potential skin therapeutic agent. *Exp Dermatol*. 2005;14:675-83.
81. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2009;85:1053-74.
82. Chan AL, Juárez M, Allen R, Volz W, Albertson T. Pharmacokinetics and clinical effects of mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) photodynamic therapy in adult patients with primary or secondary cancer of the skin and mucosal surfaces. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005;21:72-8.

83. Takahashi H, Komatsu S, Ibe M, Ishida-Yamamoto A, Nakajima S, Sakata I, Iizuka H. ATX-S10(Na)-PDT shows more potent effect on collagen metabolism of human normal and scleroderma dermal fibroblasts than ALA-PDT. *Arch Dermatol Res.* 2006;298:257-63.
84. Rifkin R, Reed B, Hetzel F, Chen K. Photodynamic therapy using SnET2 for basal cell nevus syndrome: a case report. *Clin Ther.* 1997;19:639-41.
85. Campbell SM, Gould DJ, Salter L, Clifford T, Curnow A. Photodynamic therapy using meta-tetrahydroxyphenylchlorin (Foscan®) for treatment of vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Dermatol.* 2004;151:1076-80.
86. Renschler MF, Yuen A, Panella TJ, Wieman TJ, Julius C, Panjehpour M, Taber SW, Fingar V, Lowe E, Engel J, Lum B, Woodburn K, Cheong WF, Miller RA. Photodynamic therapy trials with lutetium texaphyrin PCI-0123 (Lu-TeX). *Photochem Photobiol.* 1997;65 Suppl:47S.
87. Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Konshaug M, Giercksky KE, Nesland JM. 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer.* 1997; 79:2282-2308.
88. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B.* 1990;73:973-44.
89. Orenstein A, Kostenich G, Roitman L, Shechtman Y, Kopolovic Y, Ehrenberg B, Malik Z. A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model. *Br J Cancer.* 1996;73:937-44.
90. Juzenas P, Juzeniene A, Kaalhus O. Noninvasive fluorescence excitation spectroscopy during application of 5-aminolevulinic acid in vivo. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1:745-8.
91. Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol.* 1998;134:207-14.
92. Ortiz-Policarpio B, Lui H. Methyl aminolevulinate-PDT for actinic keratoses and superficial nonmelanoma skin cancers. *Skin Therapy Lett.* 2009;14:1-3.
93. Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem Photobiol.* 1997;65:235-51.
94. Karrer S, Baumler W, Abels C. Long-pulsed dye laser for photodynamic therapy: investigations in vitro and in vivo. *Lasers Surg Med.* 1999; 25: 51-59.

95. Alexiades-Armenakas M. Aminolaevulinic acid photodynamic therapy for actinic keratosis, actinic cheilitis, acne: vascular lasers. *Dermatol Clin.* 2007; 25: 25-33.
96. Soler AM, Warloe T, Berner A, Giercksky KE. A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5 aminolevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br J Dermatol.* 2001;145:467-71.
97. Morton CA, Whitehurst C, Moore JV, MacKie RM. Comparison of red and green light in the treatment of Bowen's disease by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2000; 143: 767-772.
98. Wiegell SR, Haedersdal M, Philipsen PA, Eriksen P, Enk CD, Wulf HC. 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.* 2008;158:740-746.
99. Varma S. Erythroplasia of Queyrat treated with topical aminolaevulinic acid photodynamic therapy: a cautionary tale. *Br J Dermatol.* 2000; 142:825-6.
100. Kim BS, Kim JY, Song CH, Kim HY, Lee WJ, Lee SJ. Light-Emitting Diode Laser Versus Pulsed Dye Laser-Assisted Photodynamic Therapy in the Treatment of Actinic Keratosis and Bowen's Disease. *Dermatol Surg.* 2012;38:151–153.
101. Ramrakha- VS, Herd RM. Treating Bowen's disease: a costminimization study. *Br J Dermatol.* 2003; 148:1167–72.
102. Harto A, García C, Marquet A. (2007) La fotografía en terapia fotodinámica. Diagnóstico por fluorescencia. En: Gilaberte Y, González S. (Eds.) *Terapia Fotodinámica*. 1.1a edn. Madrid: EdiComplet. 23-36.
103. Harto A, Fernández-Guarino M. Diagnóstico por fluorescencia fotodinámico. Fotografía con luz ultravioleta. *Rev Chilena Dermatol.* 2007;14:30-5.
104. Tyrrell J, Campbell S, Curnow A. Validation of a non-invasive fluorescence imaging system to monitor dermatological PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010;7:86-97.

105. Smits T, Robles CA, van Erp PE. Correlation between macroscopic fluorescence and protoporphyrin IX content in psoriasis and actinic keratosis following application of aminolevulinic acid. *J Invest Dermatol* 2005;125:833-9.
106. Angel-Pettersen E, Sorensen R, Warloe T. Porphyrin formation in actinic keratoses and basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Invest Dermatol*. 2006;126:265-271.
107. Myers B. How to photograph fluorescein in a normally illuminated room. *Plast Reconstr Surg*. 1981;6:809-10.
108. Kleipenning MM, Smits T, Ewalds E. Heterogeneity of fluorescence in psoriasis after application of 5-aminolaevulinic acid: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol*. 2006;155:539-45.
109. Willians R. The invisible imagen. A tutorial on photography with invisible radiation. *Fluorescence photography*. *J Biol Photog*. 1994;62:3-19.
110. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B*. 1997;39:1-18.
111. Kriska T, Korytowski W, Girotti AW. Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolaevulinic acid treated tumor cells. *Arch Biochem Biophys*. 2005;25:435-446.
112. Gomer CK, Rucker N, Murphree AL. Transformation and mutagenic potencial of porphyrin photodynamic therapy in mammalian cells. *Int J Radiat Biol*. 1988;53:651-659.
113. Fritsch C, Abels C, Goetz E, Stahl W, Bolsen K, Ruzicka T, Goerz G, Sies H. Porphyrins preferentially accumulate in a melanoma following intravenous injection of 5-aminolevulinic acid. *Biol Chem*. 1997;378:51-57.
114. Gallegos ER, DeLeon-Rodriguez I, Martinez-Guzman, LA, Perez-Zapata AJ. 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*. 1999;30:163-170.
115. Krieg RC, Fickweiler S, Wolfbeis OS, Knuechel R. Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. *Photochem Photobiol*. 2000;72:226-233.
116. Navone NM, Polo CF, Frisardi AL, Andrade NE, Battle AM. Heme biosynthesis in human breast cancer--mimetic "in vitro" studies and some heme enzymic activity levels. *Int J Biochem*. 1990;22:1407-1411.

117. Riesenbergr R, Fuchs C, Kriegmair, M. Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin on human bladder carcinoma cells in vitro. *Eur J Cancer*. 1996;32:328-334.
118. Palsson S, Gustafsson L, Bendsoe N, Soto Thompson M, Andersson- Engels S, Svanberg K. Kinetics of the superficial perfusion and temperature in connection with photodynamic therapy of basal cell carcinomas using esterified and non-esterified 5-aminolaevulinic acid. *Br J Dermatol*. 2003; 148:1179-1188.
119. Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Landthaler M, Szeimies RM. Influence of 5-aminolaevulinic acid and red light on collagen metabolism of human dermal fibroblasts. *Int J Dermatol*. 2003;120: 325-331.
120. Almeida R, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signalling mechanism in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1704:59-86.
121. Morton CA, McKenna KE, Rhodes LE. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol*. 2008;159:1245-66.
122. Bissonette R, Bergeron A, Liu Y. Large surface photodynamic therapy with aminolevulinic acid: treatment of actinic keratoses and beyond. *J Drugs Dermatol*. 2004;3(1 Suppl):S26-31.
123. Surrenti T, De Angelis L, Di Cesare A, Fagnoli MC, Peris K. Efficacy of photodynamic therapy with methyl aminolevulinate in the treatment of superficial and nodular basal cell carcinoma: an open-label trial. *Eur J Dermatol*. 2007;17:412-5.
124. Calzavara PG, Venturini M, Sala R, Capezzeria R, Parrinello G, Specchia C, Zane C. Methylaminolaevulinate-based photodynamic therapy of Bowen's disease and squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2008;159:133-44.
125. Stables GI, Stringer MR, Robinson DJ, Ash DV. Large patches of Bowen's disease treated by topical aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 1997;136:957-60.
126. Varma S, Wilson H, Kurwa HA et al. Bowen's disease, solar keratoses and superficial basal cell carcinomas treated by photodynamic therapy using a large-field incoherent light source. *Br J Dermatol*. 2001;144:567-74.
127. Morton CA, Whitehurst C, McColl JH, Moore JV, MacKie RM. Photodynamic therapy for large or multiple patches of Bowen disease and basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 2001; 137:319-24.

128. Svanberg K, Andersson T, Killander D, Wang I, Stenram U, Andersson-Engels S, Berg R, Johansson J, Svanberg S. Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumour using topical delta-amino levulinic acid sensitization and laser. *Br J Dermatol*. 1994;130:743-751.
129. Cairnduff F, Stringer MR, Hudson EJ, Ash DV, Brown SB. Superficial photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. *Br J Cancer*. 1994;69:605-8.
130. Stables GI, Stringer MR, Robinson DJ, Ash DV. The treatment of Bowen's disease by topical aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 1998; 139 Suppl 51:74.
131. Varma S, Anstey A, Wilson H et al. Photodynamic therapy for the treatment of Bowen's disease, solar keratoses and superficial basal cell carcinoma: 12 months experience with a novel light source. *Br J Dermatol*. 1998;139 Supl 51:19.
132. Wong TW, Sheu HM, Lee JY, Fletcher RJ. Photodynamic therapy for Bowen's disease (squamous cell carcinoma in situ) of the digit. *Dermatol Surg*. 2001;27:452-456.
133. Dijkstra AT, Majoie IM, van Dongen JW, van Weelden H, van Vloten WA. Photodynamic therapy with violet light and topical 6-aminolaevulinic acid in the treatment of actinic keratosis, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol*. 2001;15:550-4.
134. Dragieva G, Hafner J, Dummer R, Schmid-Grendelmeier P, Roos M, Prinz BM, Burg G, Binswanger U, Kempf W. Topical photodynamic therapy in the treatment of actinic keratoses and Bowen's disease in transplant recipients. *Transplantation*. 2004;77:115-121.
135. Britton JE, Goulden V, Stables G, Stringer M, Sheehan-Dare R. Investigation of the use of the pulsed dye laser in the treatment of Bowen's disease using 5-aminolaevulinic acid phototherapy. *Br J Dermatol*. 2005;153:780-4.
136. Baptista J, Martinez C, Leite L, Cochito M. Our PDT experience in the treatment of non-melanoma skin cancer over the last 7 years. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20:693-7.
137. Morton CA. Methyl Aminolevulinic Acid: Actinic Keratoses and Bowen's disease. *Dermatol Clin*. 2007;25:81-7.
138. Aguilar M, Troya M, Martin L, Benítez N, González M. A cost analysis of photodynamic therapy with MAL and imiquimod compared with conventional surgery for the treatment of superficial basal cell carcinoma and Bowen's disease of the lower extremities. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24:1431-6.

139. Soler AM, Angell-Petterssen E, Warloe T, Tausjø J, Steen HB, Moan J, Giercksky KE. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid with dimethylsulphoxide and ethylenediaminetetracetic acid: a comparison of two light sources. *Photochem Photobiol.* 2000;71:724-9.
140. De Haas E, Sterenbor H, Neumann H, Robinso D. Response of Bowen Disease to ALA-PDT Using a Single and a 2-Fold Illumination Scheme. *Arch Dermatol.* 2007;14:264-5.
141. Downs A, Bower C, Oliver D, Stone CA. Methyl aminolaevulinate–photodynamic therapy for actinic keratoses, squamous cell carcinoma in situ and superficial basal cell carcinoma employing a square wave intense pulsed light device for photoactivation. *Br J Dermatol.* 2009;161:187–218.
142. Lehmann P. Methyl aminolaevulinate–photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2007;156: 793–801.
143. Souza CS, Felicio LB, Ferreira J, Kurachi C, Bentley MV, Tedesco AC, Bagnato VS. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009;6:207-13.
144. Lui H, Hobbs L, Tope W, Lee K, Elmets C, Provost N, Chan A, Neyndorff H; Su X, Jain H, Hamzavi I, McLean D, Bissonnette R. Photodynamic Therapy of Multiple Nonmelanoma Skin Cancers With Verteporfin and Red Light–Emitting Diodes Two-Year Results Evaluating Tumor Response and Cosmetic Outcomes. *Arch Dermatol.* 2004;140:26-32.
145. Szeimies RM, Landthaler M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis of skin cancers. *Recent Results Cancer Res.* 2002;160:240-5.
146. Fernandez-Guarino M, Harto A, Sánchez-Ronco M et al. Retrospective, descriptive, observational study of treatment of multiple actinic keratoses with topical methyl aminolevulinic acid and red light: results in clinical practice and correlation with fluorescence imaging. *Actas Dermosifiliogr.* 2008;99:779-87.
147. Artis AHMM, van de Weer MM, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NWJ. Pain during topical photodynamic therapy: uncomfortable and unpredictable. *J Eur Acad Dermatol.* 2010;24:1452–7.
148. ClaytonTh, Tait J, Whitehurst C, Yates VM. Photodynamic therapy for superficial basal cell carcinoma and Bowen's disease. *Eur J Dermatol.* 2006;16:39-41.

149. Tyrell JS, Morton CA, Campbell SM, Curnow A. Comparison of PpIX accumulation and destruction during methyl-aminolevulinate photodynamic therapy (MAL-PDT) of skin tumours located at acral and non-acral sites. *Br J Dermatol*. 2011;164:1362-8.
150. Fritsch C, Ruzicka T. (2003) Fluorescence detection of ALA-induced porphyrins (FDAP). In: Fritsch C, Ruzicka T. (Eds.) *Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy of skin diseases*. 1a edn. New York: Springer-Verlag Wien. 23-31.
151. Angel-Pettersen E, Sorensen R, Warloe T. Porphyrin formation in actinic keratoses and basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Invest Dermatol*. 2006;126:265-71.
152. Moan J, Ma LW, Iani V. On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters. *Int J Cancer*. 2001;92:139-43.
153. Peng Q, Moan J, Warloe T, Iani V, Steen HB, Bjorseth A. Build up of esterified aminolevulinic acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J Photochem Photobiol B*. 1996;34:95-6.
154. Sandberg C, Paoli J, Gillstedt M, Halldin CB, Larkö O, Wennberg AM, Ericson MB. Fluorescence diagnostics of basal cell carcinomas comparing methyl-aminolaevulinate and aminolaevulinic acid and correlation with visual clinical tumour size. *Acta Derm Venereol*. 2011;91:398-403.
155. Kriz M, Hegyi J, Ruzicka T, Berking C. Fluorescence diagnostics as a guide for demarcation and biopsy of suspected anal cancer. *Int J Dermatol*. 2012;51:31-4.
156. Svaasand LO, Wyss P, Wyss MT, Tadir Y, Tromberg BJ, Berns P, Peng Q, Moan J, Warloe T. Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing breast carcinoma. *Int J Cancer*. 1992;52:433.
157. Smits T, Kleinpenning M, Blokx W, MD, PhD, van de Kerkhof P, van Erp P, Gerritsen M. Fluorescence diagnosis in Keratinocytic intraepidermal neoplasias. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57:824-31.
158. Kleinpenning MM, Wolberink EW, Smits T, Blokx WA, van De Kerkhof PC, van Erp PE, Gerritsen RM. Fluorescence diagnosis in actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2010;26:297-302.
159. Fantini F, Greco A, Cesinaro A, Surrenti T, Peris K, Vaschieri C, Marconi A, Giannetti A, Pincelli C. Pathologic Changes After Photodynamic Therapy for Basal Cell Carcinoma and Bowen Disease A Histologic and Immunohistochemical Investigation. *Arch Dermatol*. 2008;144:186-194

160. Szeimies RM, Torezan L, Niwa A, Valente N, Unger P, Kohl E, Schreml S, Babilas P, Karrer S, Festa-Neto C. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 2012;167:150-9.
161. Kantakis J, Narvaez D, Euvrard S, Faure M, Claudy A. Proliferation markers Ki67 and PCNA in cutaneous squamous cell carcinomas: lack of prognostic value. *Br J Dermatol*. 1997;136:633-4.
162. Murakami M, Hashimoto Y, Tsukinoki K, Matsunaga K, Mizoguchi Y, Horibe Y, Tashiro K, Watanabe Y, Kasahara M. Histopathological assessment of localized proliferation in cases of Bowen's disease using immunostaining and a laser cytometer. *Arch Dermatol Res*. 1998;290:435-440.
163. Smits T, van Laarhoven AI, Stassen A, van der Kerkhof P, van Erp and Gerritsen M. Introduction of protoporphyrin IX by aminolaevulinic acid in actinic keratosis, psoriasis and normal skin: preferential porphyrin enrichment in differentiated cells. *Br J Dermatol*. 2009;160:849-57.
164. Caulin C, Nguyen T, Lang G, Goepfert T, Brinkley B, Cai W, Lozano G, Roop D. An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss of function p53 mutations. *J Clin Invest*. 2007;117:1893-1901.
165. Owens D. p53, chemokines and squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2007;117:1752-55.
166. Liutkeviciutena J, Mordas A, Rutkovskiene L, Bloznelyte L. Skin and mucosal fluorescence diagnosis with different light sources. *Eur J Dermatol*. 2009;19:135-40.
167. Mogensen M, Jemec G. Diagnostic of nonmelanoma skin cancer/keratinocyte carcinoma: a review of diagnostic accuracy of nonmelanoma skin cancer diagnostic tests and technologies *Dermatol Surg*. 2007;33:1158-1174.
168. Ulrich M, Kanitakis J, González S, Lange-Asschenfeldt S, Stockfleth E, Roewert-Huber J. Evaluation of Bowen disease by in vivo reflectance confocal microscopy. *Br J Dermatol*. 2012;166:451-3.
169. Redondo P, Marquina M, Pretel M, Aguado L, Iglesias ME. Methyl-ALA-Induced fluorescence in photodynamic diagnosis of basal cell carcinoma prior to Mohs micrographic surgery. *Arch Dermatol*. 2008;144:115-7.
170. Wenberg AM, Gudmundson F, Stenquist B. In vivo detection of basal cell carcinoma using imaging spectroscopy. *Acta Derm Venereol*. 1999;79:54-61.

171. Wetzig T, Kandler M, Maschke J, Peasch U, Simon JC. No clinical benefit of preoperative fluorescence diagnosis of basal cell carcinoma localized in the H-zone of the face. *Br J Dermatol.* 2010;162:1370-6.

172. Neuß S, Gambichler T, Bechara FG et al. Preoperative assessment of basal cell carcinoma using conventional fluorescence diagnosis. *Arch Dermatol Res.* 2009; 301:289–94.

173. Stenquist B, Ericson MB, Strandeberg C et al. Bispectral fluorescence imaging of aggressive basal cell carcinoma combined with histopathological mapping: a preliminary study indicating a possible adjunct to Mohs micrographic surgery. *Br J Dermatol.* 2006;154:305–9.

9. ANEXOS

ANEXO I: DATOS DESCRIPTIVOS

Pacientes (número, sexo)	Edad (años)	Tamaño (cm)	Localización	Nº de lesiones de EB	Nº CCNM	FR conocidos	Subtipo AP
1. M	70	3	Frente	1	0	0	Clásico
2. M	77	0,5	Sien	1	0	0	Clásico
3. V	67	2	Brazo	2	0	0	Clásico
4. V	76	2	Tronco	1	1 Cbc	0	Clásico
5. V	83	2,5	C. cabelludo	1	1 CE	0	Clásico
6. M	54	4	Tronco	1	0	Linfoma folicular	Clásico
7. M	59	1,5	Pierna	1	0	0	Clásico
8. M	57	2,5	Frente	1	0	Tx renal	Clásico
9. V	69	1,5	Brazo	1	0	0	Clásico
10. V	75	4	Sien	1	2 Cbc	0	Clásico
11. M	75	2	Pierna	1	2 Cbc	0	Clásico
12. M	62	1	Frente	1	2 Cbc	0	Clásico
13. V	77	4	Sien	2	1CE	0	Pagetoide
14. V	76	4	Mano	1	0	0	Clásico
15. M	75	2	Sien	2	1 Cbc	0	Clásico
16. M	63	2,5	Pierna	1	1 Cbc	0	Clásico
17. V	70	2	Pierna	1	0	0	Clásico
18. V	49	2,5	Pierna	2	0	0	Clásico
19. V	62	2	Brazo	1	2 Cbc	Tx hepatico	Clásico
20. V	78	3	C. cabelludo	2	CE	Leucemia LC	Clásico
21. V	72	3,5	Pierna	1	0	0	Pagetoide
22. M	67	1,5	Pierna	1	Melanoma is	0	Clásico
23. V	68	1,5	C. cabelludo	1	0	0	Clásico

V: varón; M: mujer; Tx: trasplante; LC: linfocítica; C. cabelludo: cuero cabelludo; Cbc: carcinoma basocelular; FR: factor de riesgo; CCNM: cáncer no melanoma; CE: carcinoma epidermoide.

Pacientes (número, sexo)	Edad (años)	Tamaño (cm)	Localización	Nº de lesiones de EB	Nº CCNM	FR conocidos	Subtipo AP
24. V	85	1	C. cabelludo	1	0	0	Clásico
25. M	96	1	Pierna	1	0	0	Pagetoide
26. M	85	1	Frente	1	0	0	Clásico
27. M	80	3	Mano	1	3 Cbc	Linfoma NH	Clásico
28. V	74	5	Genital	1	0	0	Clásico
29. V	47	2,5	Genita	1	0	0	Clásico
30. M	97	4	Cara (otros)	3	1 CE	0	Clásico
31. V	79	4	Sien	1	1 CE	0	Clásico
32. V	87	3,5	Frente	1	4 CE	Linfoma NH	Clásico
33. M	84	3,5	Pierna	3	1 CE	0	Clásico
34. V	86	2	Pierna	1	0	0	Clásico
35. M	80	4	Pierna	1	0	0	Clásico
36. M	84	3	Sien	1	0	0	Clásico
37. V	86	1,5	Mano	1	5 Cbc y 1 CE	0	Clásico
38. V	56	2,5	C. cabelludo	1	0	Tx renal	Clásico
39. V	55	2	Pierna	1	1 Cbc y 1 CE	0	Clásico
40. M	87	4	Sien	1	1 CE	0	Clásico
41. V	79	2,5	Mano	1	3 Cbc y 4 CE	0	Clásico
42. V	75	3,3	Periauricular	1	1 CE	0	Clásico
43. V	89	2	Brazo	1	1 CE	0	Clásico
44. V	54	2	Pierna	1	1 CE	0	Pagetoide
45. V	83	2,5	Genital	1	1 Cbc	0	Clásico
46. V	71	2	Brazo	1	0	0	Clásico

V: varón; M: mujer; Tx: trasplante; LC: linfocítica; C. cabelludo: cuero cabelludo; Cbc: carcinoma basocelular; FR: factor de riesgo; CCNM: cáncer no melanoma

Pacientes (número, sexo)	Edad (años)	Tamaño (cm)	Localización	Nº de lesiones de EB	Nº CCNM	FR conocidos	Subtipo AP
47.V	71	2	Brazo	1	0	0	Clásico
48. V	74	4,5	Brazo	1	2 Cbc	0	Clásico
49. M	60	1,5	Sien	1	3 Cbc	0	Clásico
50. M	76	3	Pierna	1	0	0	Clásico
51. M	86	4	Pierna	1	1 Cbc y 1 CE	0	Clásico
52. M	74	1,5	Mano	1	0	0	Clásico
53. V	79	3	Cara (otros)	1	0	0	Clásico
54. V	88	2,5	Pierna	2	6 Cbc, 1Fxa	0	Pagetoide
55. V	87	0,4	Mano	1	0	0	Clásico
56. M	74	2	Pierna	1	1 Cbc	Ca mama	Clásico
57. M	63	2,5	Tronco	1	0	0	Clásico
58. M	80	0,5	Pierna	1	2 CE	0	Clásico
59. M	88	4	Brazo	1	1 Cbc	0	Clásico
60. M	62	1	Pierna	2	3 Cbc	0	Clásico
61. M	77	1,5	Pierna	1	0	0	Clásico
62. V	65	4	Pierna	1	0	0	Clásico
63. M	79	1,5	Mano	1	0	0	Clásico
64. M	80	3	Tronco	1	0	0	Clásico
65. M	89	5,5	Pierna	1	0	0	Clásico
66. M	79	3	Pierna	1	0	0	Pagetoide
67. V	86	5	Sien	1	0	0	Clásico

V: varón; M: mujer; Tx: trasplante; LC: linfocítica; C. cabelludo: cuero cabelludo; Cbc: carcinoma basocelular; FR: factor de riesgo; CCNM: cáncer no melanoma; is: in situ; CE: carcinoma epidermoide.

ANEXO II: DATOS DE RESULTADOS

Pte	Clínica Post	F pre	F post	Mejora F	A.P. post	T seguimiento (meses)	Evolución	Nº sesiones	Ef. secundarios
1.	0	2	1	Media	-	13	-	2	No
2.	1	2	2	Nula	+	7	Cx por persistencia	2+ 3	No
3.	0	2	0	Alta	-	12	-	2	Quemazón
4.	0	2	0	Alta	-	14	Recidiva	2	cicatriz
5.	2	2	2	Nula	+	15	Cx por persistencia	2+ 2	No
6.	1	2	1	Media	+	22	-	2+ 6	No
7.	0	1	0	Media	-	39	-	2	Quemazón
8.	0	2	0	Alta	-	25	-	2	Quemazón
9.	0	2	0	Alta	-	27	-	2	No
10.	0	2	0	Alta	-	13	-	2	No
11.	0	2	0	Alta	-	16	-	2	No
12.	0	2	0	Alta	-	8	-	2	No
13.	1	2	2	Nula	+	8	Cx (Progresión CE pobremente diferenciado). Metástasis cervicales.	2+5	Quemazón
14.	0	2	0	Alta	-	12	-	2	No
15.	2	2	1	Media	+	14	Cx por persistencia	2	No
16.	0	2	0	Alta	-	27	-	2	Quemazón
17.	1	2	0	Alta	-	24	-	2	No
18.	1	2	2	Nula	+	12	-	2+ 3	No
19.	1	2	0	Alta	-	16	-	2	Quemazón
20.	1	2	1	Media	+	5	Progresión en superficie	2	Quemazón
21.	1	2	0	Alta	-	12	-	2+ 4	No
22.	0	2	0	Alta	-	8	-	2	Dolor
23.	1	2	0	Alta	-	12	-	2	No

Pte: paciente; Bx: Biopsia; TFD: Terapia Fotodinámica; AP: Anatomía Patológica; Rpta: Respuesta; Respuesta clínica 0 (completa), 1 (parcial) y 2 (nula); NDD: No Datos Disponibles; Cx: cirugía. Ce: Carcinoma epidermoide; T: tiempo.

Pte	Clínica Post	F pre	F post	Mejora F	A.P. post	T seguimiento (meses)	Evolución	Nº sesiones	Ef. secundarios
24.	1	2	0	Alta	-	8	-	2	No
25.	1	1	0	Media	-	8	-	2	No
26.	1	2	2	Nula	+	16	-	2+ 2	Dolor
27.	1	2	1	Media	-	24	-	2	Quemazón
28.	1	2	0	Alta	-	10	-	2	Quemazón
29.	1	2	1	Media	-	12	-	2	No
30.	1	2	1	Media	NDD	24	-	2+ 1	Quemazón
31.	2	2	2	Nula	NDD	12	Progresión	2+ 4	No
32.	2	2	2	Nula	NDD	12	-	2+ 4	No
33.	1	2	1	Media	NDD	3	Pérdida	2+ 4	No
34.	0	1	0	Media	NDD	12 meses	-	2	Quemazón
35.	1	2	1	Media	NDD	12	-	2+ 2	No
36.	0	2	0	Alta	NDD	12	-	2+ 2	No
37.	0	2	0	Alta	NDD	24	-	2	No
38.	1	2	1	Media	NDD	4	Progresión en superficie	2	Quemazón
39.	0	2	0	Alta	NDD	36	-	2	No
40.	0	1	1	Nula	NDD	6	Progresión en superficie	2 + 2	No
41.	0	1	0	Media	NDD	2	Pérdida	2	No
42.	1	2	0	Alta	NDD	12	-	2+ 3	No
43.	0	2	1	Media	NDD	26	-	2+ 1	No
44.	0	2	1	Media	NDD	6	Progresión en superficie	2	No
45.	0	2	0	Alta	NDD	15	-	2	Dolor, quemazón
46.	0	1	0	Media	NDD	10	-	2	No

Pte: paciente; Bx: Biopsia; TFD: Terapia Fotodinámica; AP: Anatomía Patológica; Rpta: Respuesta; Respuesta clínica 0 (completa), 1 (parcial) y 2 (nula); NDD: No Datos Disponibles; Cx: cirugía. Ce: Carcinoma epidermoide; T: tiempo.

Pte	Clínica Post	F pre	F post	Mejora F	A.P. post	T seguimiento (meses)	Evolución	Nº sesiones	Ef. secundarios
47.	0	2	0	Alta	NDD	22	-	2	No
48.	1	1	1	Nula	NDD	9	Progresión en superficie	2+ 2	No
49.	0	2	0	Alta	NDD	14	-	2	No
50.	0	2	1	Media	NDD	20	-	2	No
51.	1	2	0	Alta	NDD	10	-	2	No
52.	1	2	1	Media	NDD	4	Pérdida	2+ 4	No
53.	1	2	1	Media	NDD	14	-	2+ 2	Quemazón
54.	2	2	2	Nula	NDD	12	Persiste	2	No
55.	0	1	0	Media	NDD	24	-	2	No
56.	1	2	0	Alta	NDD	18	-	2	Quemazón
57.	0	1	0	Nula	NDD	30	-	2	No
58.	1	2	1	Media	NDD	9	-	2+ 2	Quemazón
59.	0	2	0	Alta	NDD	19	-	2	Dolor
60.	1	2	1	Media	NDD	12	-	2+ 2	No
61.	2	2	2	Nula	NDD	5	Persiste	2+ 4	No
62.	2	1	2	Media	NDD	5	Extirpación	2+ 3	No
63.	1	2	0	Alta	NDD	12	-	2+ 2	No
64.	1	1	1	Nula	NDD	6	Persiste	2+ 2	No
65.	1	2	1	Media	NDD	13	-	2+ 2	Quemazón
66.	1	2	1	Media	NDD	8	Persiste	2+ 3	No
67.	1	2	0	Alta	NDD	12	-	2	Quemazón

Pte: paciente; Bx: Biopsia; TFD: Terapia Fotodinámica; AP: Anatomía Patológica; Rpta: Respuesta; Respuesta clínica 0 (completa), 1 (parcial) y 2 (nula); NDD: No Datos Disponibles; Cx: cirugía. Ce: Carcinoma epidermoide; T: tiempo.

ANEXO III: RESULTADOS IHQ y RESPUESTA CLÍNICA, FLUORESCENCIA E HISTOLÓGICA

Nº paciente	Nº IHQ	p53 pre (I-M-L-N)	p53post (I-M-N)	Ki67pre (I-M-N)	Ki67post (I-M-N)	Clínica Post	F pre	F post	Mejora F	A.P. post
1	1	I	M	I	N	RC	2	1	Media	-
2	2	I	I	I	I	RP	2	2	Nula	+
3	3	I	M	I	N	RC	2	0	Alta	-
4	4	I	I	I	N	RC	2	0	Alta	-
5	5	I	M focal	I	I	RN	2	2	Nula	+
7	6	I	L	I	N	RC	1	0	Media	-
8	7	I	L	I	N	RC	2	0	Alta	-
9	8	I	M focal	I	N	RC	2	0	Alta	-
10	9	L	I focal	M	N	RC	2	0	Alta	-
11	10	I	L	I	N	RC	2	0	Alta	-
12	11	M focal	M	I	M	RC	2	0	Alta	-
13	12	I	I	I	I	RP	2	2	Nula	+
14	13	M	L focal	NDD	N	RC	2	0	Alta	-
16	14	M focal	L	M	N	RC	2	0	Alta	-
17	15	I	L focal	I	N	RP	2	0	Alta	-
18	16	L	L	I	N	RP	2	2	Nula	+
19	17	I focal	L	I	N	RP	2	0	Alta	-
20	18	I	I	I	M	RP	2	1	Media	+
21	19	I	L focal	I	N	RP	2	0	Alta	-
22	20	I focal	M	I	N	RC	2	0	Alta	-
25	21	L	L focal	M	N	RP	1	0	Media	-
26	22	I focal	I	M	M	RP	2	2	Nula	+
27	23	L	L focal	I	N	RP	2	1	Media	-
29	24	M	M	I	M	RP	2	1	Media	-

Pte: paciente; IHQ: inmunohistoquímica, F: fluorescencia, I: intensa; M:moderada; L:leve; N: nula; A.P.: anatomía patológica; +: sí, -:no; RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; RN: respuesta nula; Fluorescencia: 0: nula; 1: leve; 2: intensa; pre: pre-TFD y post: post-TFD.

