



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE APOPTOSIS Y DE LA VÍA
APOPTÓTICA IMPLICADA EN PIEL Y MUCOSA DE PACIENTES
CON PRURIGO ACTÍNICO Y SUJETOS SIN PRURIGO ACTÍNICO, ASI
COMO FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL PADECIMIENTO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. JUAN CARLOS CUEVAS GONZÁLEZ

TUTORA

DRA. MARÍA ELISA VEGA MEMÍJE

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

DRA. S. AIDA BORGES YAÑEZ

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DRA. PATRICIA ALONSO VIVEROS

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.**

MÉXICO, D.F, DICIEMBRE DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1. Resumen	1
2. Abstrac	2
3. Introducción	3
4. Antecedentes	4
4.1 Epidemiología	4
4.2 Etiología y Fisiopatogenia	5
4.3 Cuadro clínico	9
4.4 Histopatología	12
4.5 Diagnóstico	14
4.6 Diagnóstico diferencial	14
4.7 Tratamiento	15
4.8 Apoptosis	17
4.9 Técnica de TUNEL	21
4.10 Técnica de Inmunohistoquímica	22
4.11 Fas-Fas L	23
4.12 Bcl-2	24
4.13 Bax	24
4.14 Caspasa 3	25
4.15 p53	26
4.16 Factores de riesgo asociados a PA	26
5. Planteamiento del problema	27
6. Justificación	27
7. Hipótesis de trabajo	27
8. Objetivo General	28

8.1 Objetivos específicos	28
9. Diseño del estudio	29
9.1 Universo de estudio	29
9.2. Tamaño de muestra	30
9.3 Criterios de inclusión, primera fase	31
9.4 Criterios de inclusión, segunda fase	31
10. Variables	32
10.1 Variables dependientes	32
10.2 Variables independientes	32
11. Material y método	37
11.1 Técnica de TUNEL	38
11.2 Técnica de Inmunohistoquímica	38
11.3 Pacientes de reciente diagnóstico	40
11.4 Citología de base líquida	40
11.5 Cuestionario de factores de riesgo	41
12. Resultados	41
12.1 Técnica de TUNEL	41
12.2 Técnica de Inmunohistoquímica	45
12.3 Segunda Fase	54
13. Discusión	69
14. Conclusiones	79

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Variables incluidas en el estudio	34
Tabla 2	Anticuerpos utilizados	39
Tabla 3	Expresión de la técnica de TUNEL en casos y controles (Queilitis del PA).	42
Tabla 4	Expresión de la técnica de TUNEL en casos y controles (PA en piel).	42
Tabla 5	Inmunopositividad de los anticuerpos en casos de PA y tejido sin PA	45
Tabla 6	Expresión de los anticuerpos apoptóticos en queilitis del PA y en PA en piel	45
Tabla 7	Reacción de bcl-2 en queilitis del PA	46
Tabla 8	Reacción de bcl-2 en PA localizado en piel	47
Tabla 9	Positividad de p53 en queilitis del PA	48
Tabla 10	Positividad de p53 en PA localizado en piel	48
Tabla 11	Inmunomarcaje de Caspasa 3 en queilitis del PA	49
Tabla 12	Inmunomarcaje de Caspasa 3 en PA localizado en piel	50
Tabla 13	Densidad óptica de los distintos anticuerpos apoptóticos	53
Tabla 14	Distribución de la edad (Segunda fase del estudio)	55
Tabla 15	Datos relacionados a la escolaridad	56
Tabla 16	Distribución de la exposición solar en casos y controles	57
Tabla 17	Convivencia con animales domésticos y/o de granja	60
Tabla 18	Distribución del uso de leña en casos y controles	63
Tabla 19	Distribución del hábito tabáquico en casos y controles	64
Tabla 20	Pruebas no paramétricas	65

Tabla 21	Pruebas paramétricas	67
Tabla 22	Regresión logística múltiple	68

INDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1	Distribución de casos y controles según el lugar de origen	54
------------------	--	----

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1	Fisiopatología de la respuesta de hipersensibilidad tipo IV	7
Imagen 2	Lesiones de PA en zonas foto expuestas	9
Imagen 3	Liquenificación e hiperpigmentación residual en lesiones de PA	10
Imagen 4	Queilitis del PA	11
Imagen 5	Conjuntivitis del PA	11
Imagen 6	Características histopatológicas de lesiones de PA en piel	12
Imagen 7	Características histopatológicas de lesiones de PA en labio	13
Imagen 8	Mecanismo de apoptosis	18
Imagen 9	Vías de la apoptosis	19
Imagen 10	Vías celulares del proceso apoptótico	20
Imagen 11	Interacción Fas-Fas-L	23
Imagen 12	Participación de la Caspasa 3 en el proceso apoptótico	25
Imagen 13	Positividad a la técnica de TUNEL	43
Imagen 14	Positividad a la técnica de TUNEL	44
Imagen 15	Positividad a la técnica de TUNEL	44
Imagen 16	Positividad al anticuerpo bcl-2	47
Imagen 17	Positividad al anticuerpo p53	49
Imagen 18	Positividad al anticuerpo Caspasa 3	51
Imagen 19	Positividad al anticuerpo Bax	52
Imagen 20	Anticuerpo Fas	52

DEDICATORIA

A **Dios** por permitirme llegar hasta aquí en compañía de mi familia.

A mi hija **Nicole** y a mi Esposa **Alma** porque son fuente de inspiración para lograr objetivos cada vez mayores y son parte de mi realización familiar y profesional.

A mi madre **Silvia** y a mi hermana **Verónica** quienes en todo momento me han apoyado.

A la Dra. **María Elisa Vega Memije**, quien sin ella este trabajo no hubiera sido posible, gracias por todo lo que aprendí de usted y por el gran ejemplo que me brindó

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. **S. Aida Borges Yañez** y a la Dra. **Patricia Alonso Viveros** quienes todo el tiempo me apoyaron y guiaron durante este largo camino.

A la Dra. **Elba Rosa Leyva Huerta** quien estuvo al pendiente siempre de mí y de mis compañeros del PMDCMOS, gracias por todo.

A mis grandes amigos que conocí en el laboratorio de patología molecular del Instituto Nacional de Pediatría con quien tuve el honor de trabajar Dr. **Francisco Javier García Vázquez**, H.T **Marco Antonio Aguilar Urbano** y H.T **José Eduardo Farfán Morales**, si los menciono a todos necesitaría varias hojas, pero en verdad gracias a todos.

A la Dra. **Erika Rodríguez Lobato** por el gran equipo de trabajo que formamos.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por haberme brindado la oportunidad de formarme en esta gran casa de estudios.

1. Resumen

Introducción: El prurigo actínico (PA) es un padecimiento que afecta la mucosa labial, conjuntival y las zonas cutáneas expuestas al sol, se inicia en edades tempranas. Las características histopatológicas están bien definidas, la patogénesis se ha asociado con una reacción de hipersensibilidad de tipo IV, estando implicada la apoptosis en este padecimiento.

Objetivo. Determinar la presencia de apoptosis y la vía apoptótica implicada en piel y mucosa de pacientes con PA y sujetos sin PA, así como estudiar la posible asociación del padecimiento con factores de riesgo.

Metodología: Estudio de casos y controles realizado en el departamento de dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González que fue dividido en dos partes; en la primera se incluyeron 64 bloques con tejido incluido en parafina con diagnóstico de PA y 64 bloques de tejido de piel sin alteración histopatológica, fueron procesados por técnicas de TUNEL e IHQ. En la segunda fase se incluyeron 30 pacientes de reciente diagnóstico y 60 controles, se elaboró cuestionario de factores de riesgo y toma de citología exfoliativa.

Resultados: Con la técnica de TUNEL se observó positividad en el estrato basal en 24(80%) casos de queilitis y en 16 (80%) en piel, la expresión en el estrato granular fue positiva en el labio en 23 casos (76%) y en 19 (95%) de piel, en el infiltrado perivascular tanto de labio como de piel fue de 26 (86%) y 14 (70%) respectivamente. Con respecto a la inmunohistoquímica (N=64) se observaron diferencias significativas en el tejido con PA vs tejido control con los anticuerpos bcl2 $X^2=22.94$ $p=.001$, p 53 $X^2=8.05$ $p=.005$ y caspasa 3 $X^2=69.39$ $P=.001$ Los anticuerpos Bax y Fas fueron negativos en ambos tejidos. En la segunda fase se encontró que el padecimiento afecta con mayor frecuencia a las mujeres con respecto a los hombres, si bien las primeras manifestaciones ocurren durante la infancia la enfermedad es diagnosticada de manera tardía. En el análisis bivariado se encontraron diferencias significativas con las variables convivencia con animales domésticos, convivencia con animales de granja, exposición solar y exposición al humo de leña. En la regresión logística se encontraron diferencias significativas con la variable convivencia con animales de granja (RM 15.31 $p=.001$).

Conclusiones: En este trabajo se demostró la presencia de apoptosis en el prurigo actínico, sugerimos que en la fisiopatología del padecimiento se encuentra implicada una respuesta de hipersensibilidad tipo IV subtipo a-b, además de la radiación UV B y A el humo de leña y/o la convivencia con animales domésticos y/o de granja son factores externos que favorecen su presencia.

2. Abstract

Introduction: Actinic prurigo (AP) is a condition affecting the labial mucosa, conjunctival and cutaneous sun-exposed areas, starting at early ages. The histopathologic features are well defined, the pathogenesis has been associated with a hypersensitivity reaction type IV, finding active apoptosis in AP.

Aim. To determine the presence of apoptosis and the apoptotic pathway involved in skin and mucosa of patients with PA and subjects without PA, and to study the possible association of the disease with risk factors.

Methodology: A case-control study conducted in the department of dermatology at Hospital General Dr. Manuel Gea González which was divided into two parts; in the first 64 blocks of paraffin-embedded tissue diagnosed with PA and 64 blocks of skin tissue without histopathological alterations were included, were processed by TUNEL and IHC techniques. In the second phase 30 newly diagnosed patients and 60 controls were included, risk factor questionnaire was developed and making exfoliative cytology

Results: With TUNEL technical we observed positivity in the basal layer in 24 (80%) cases of cheilitis and in 16 (80%) of the skin, the expression in the granular layer was positive in 23 cases lip (76%) and 19 (95%) of skin, in the perivascular infiltrate in tissue of lip and the skin was 26 (86%) and 14 (70%) respectively. With respect to immunohistochemical (N = 64) significant differences were observed in tissue with PA vs control tissue; bcl2 $X^2 = 22.94$ $P = 0.001$, p 53 $X^2 = 8.05$ $P = 0.005$ and $X^2 = 69.39$ caspase 3 $P = .001$. The Bax and Fas antibodies were negative in both tissues. In the second phase it was found that the condition occurs more often in women compared to men, although the first manifestations occur during childhood disease is diagnosed so late. In bivariate analysis significant differences was observed with the variables living with pets, living with farm animals, sun exposure and exposure to wood smoke. In the logistic regression significant differences with the variable coexistence with farm animals ($p = .001$, RM 15.31) were found.

Conclusions. In this work the presence of apoptosis in actinic prurigo demonstrated, we suggest that the pathophysiology of the disease is involved a hypersensitive response type IV subtype ab plus UV B and A wood smoke and / or coexistence with domestic and / or farm animals are external factors that favor their presence.

3. Introducción

El prurigo actínico (PA) es una fotodermatosis inflamatoria, crónica e idiopática que afecta áreas fotoexpuestas, además de la mucosa labial y conjuntival; sin embargo, también puede afectar áreas no fotoexpuestas. Respecto a la susceptibilidad genética, se ha reportado un fuerte vínculo con el antígeno leucocitario humano (HLA), particularmente con el alelo HLA-DR (En México del 90 al 92.8% de los pacientes con prurigo actínico tienen este alelo, y el HLA-DRB1*0407 es el subtipo más frecuente (60-80%).

Dentro de los factores raciales el mestizaje juega un papel fundamental, ya que afecta a población amerindia, esta fotodermatosis se describe en países como México, Guatemala, Colombia, Honduras, Ecuador, Perú y Bolivia.

Si bien las primeras manifestaciones se presentan desde la infancia entre los 6 y los 8 años de edad, los casos son diagnosticados tardíamente una vez que las lesiones se exacerban, es más frecuente en mujeres, a razón de 2:1 con respecto a los hombres; se ha descrito que los pacientes tienen el antecedente de exposición solar, exposición al humo de leña y convivencia con animales domésticos y/o de granja.

El Hospital General Dr. Manuel Gea González es el principal centro de referencia en nuestro país; al ser una enfermedad que afecta a población latina la investigación que se ha realizado hasta el momento proviene de grupos de investigación en América Latina.

La fisiopatología del padecimiento no es del todo clara, por lo que se pretende demostrar la presencia de apoptosis e incluir esta enfermedad dentro de una respuesta de hipersensibilidad tipo IV sub tipo a-b, así como establecer factores de riesgo asociados a la enfermedad.

4. Antecedentes

El prurigo actínico (PA) es una fotodermatosis inflamatoria, crónica e idiopática que afecta áreas fotoexpuestas, además de la mucosa labial y conjuntival; sin embargo, también puede afectar áreas no fotoexpuestas. Se observa predominantemente en poblaciones de piel oscura con un fuerte componente amerindio en su mestizaje. Fue descrita por primera vez en 1952 por López González en Argentina ¹ bajo el nombre de prurigo solar, ² luego lo describió Escalona y colaboradores en México (1954), reportándose casos aislados en Canadá, Centroamérica y Sudamérica.¹ A través de los años se ha denominado dermatitis solar, síndrome cutáneo de Guatemala, prurigo solar, prurigo actínico familiar, erupción polimorfa lumínica tipo prurigo, erupción lumínica polimorfa de los indios americanos, erupción sensible a la luz en indios americanos, ³ prurigo solar de la altiplanicie, prurigo solar de Hutchinson, entre otros.^{1-3,5} El Dr. Fabio Londoño de Colombia lo denominó prurigo actínico y es el término más utilizado.
1,4,6.

4.1 Epidemiología

A pesar de que las primeras manifestaciones se presentan desde la infancia, entre los 6 y los 8 años de edad, ^{2,7} los pacientes son diagnosticados tardíamente (segunda a cuarta década de la vida) una vez que las lesiones se exacerban. Es más frecuente en mujeres, a razón de 2:1 con respecto a los hombres,^{2,7,8} y afecta principalmente a personas con fototipos oscuros (IV y V de la clasificación de Fitzpatrick) ^{2,7,9} que viven en clima seco, soleado y con altitudes por encima de los 1000 m sobre el nivel del mar, sin embargo hay casos descritos a altitudes menores.^{2,7.}

Dentro de los factores raciales el mestizaje juega un papel importante,⁴ esta fotodermatosis se presenta en países como México (con una prevalencia de 3.9%),⁶ Guatemala, Colombia, Honduras, Ecuador, Perú y Bolivia; se han

reportado casos aislados en Costa Rica, Venezuela, Argentina, Uruguay, Chile, el norte de los Estados Unidos, en la población Inuit de Canadá ^{1,2,8} (prevalencia de 0.1%),⁶ Australia, Gran Bretaña y Tailandia y muy recientemente en Brasil. ¹

4.2 Etiología y Fisiopatogenia

Poco se conoce acerca de la causa de esta enfermedad. Hasta el 68% ⁶ de los casos tienen un familiar con prurigo actínico, otros autores reportan tan solo 4.3% ⁵ de historia familiar de prurigo actínico en población Mexicana. Los posibles factores implicados son el nivel socioeconómico bajo, la residencia en áreas rurales y la exposición a distintos alérgenos.¹⁰

Respecto a la susceptibilidad genética, se ha reportado un fuerte vínculo con el antígeno leucocitario humano (HLA), particularmente con el alelo HLA-DR4,¹¹ alelo que varía de población en población. En México, del 90 al 92.8% de los pacientes con prurigo actínico tienen este alelo,^{4, 12,13} y el HLA-DRB1*0407^{1,6,8} el subtipo más frecuente (60-80%).^{5,13} El HLA-DR4 también se ha reportado en casos de PA aislados en Europa en población inmigrante.^{1,6} Otros alelos relacionados son el HLA-A28, el B39,^{1,8} el HLA-A24, HLA-Cw4, DRB1*14^{6,8} y el HLA-Cw4. ^{1,6,8} Estos estudios son concordantes con los realizados en Latinoamérica y en Europa occidental con respecto al papel de los alelos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC II) en la fisiopatología del PA, además se sugiere que están implicados otros genes situados dentro de la clase I y clase II del MHC, tales como el factor de necrosis tumoral y proteínas de choque de calor. Los alelos mencionados e involucrados tanto en la susceptibilidad como en la protección se encuentran en la población Mexicana así como en parte de la población latina lo que sugiere el fuerte componente genético autóctono en el mestizo.¹⁰

En 1984 Moncada y colaboradores ¹⁵ reportaron que la piel de los pacientes con PA tenía una respuesta inmunológica anormal con aumento de linfocitos T en sangre periférica, en especial linfocitos T cooperadores (CD4+), y aumento de

células Ia+ en el infiltrado inflamatorio dérmico.^{2,16} Posteriormente se observó que dicha respuesta anormal era inducida por radiación solar, particularmente la radiación ultravioleta A (UVA) y B (UVB), aunque la luz visible también juega un papel importante.^{1,2,17}

La radiación UVB estimula la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en los queratinocitos, principalmente en la capa suprabasal;^{1,7} éste es capaz de estimular la inmunorreactividad y la expresión de moléculas de adhesión en los queratinocitos, lo que favorece la migración de células inflamatorias que producen daño tisular y necrosis epidérmica.^{7,18} El TNF- α también inicia la activación del factor de transcripción NF- $\kappa\beta$ y la muerte celular programada (apoptosis), por lo que su presencia nos sugiere que este fenómeno ocurre en la fisiopatología del prurigo actínico,¹⁹ pero no ha sido documentada todavía.

Los estudios de inmunohistoquímica han demostrado predominio de linfocitos T CD45RO+ (células T de memoria) e interleucina 2 (IL-2) en el infiltrado inflamatorio, desencadenándose una respuesta Th1 en donde participa el Interferón γ y los macrófagos, de igual manera se han identificado componentes de la respuesta Th2 interviniendo la IL5, eosinófilos, IL 4, IgE así como los mastocitos.^{1,20,21} Los folículos linfoides patognomónicos de la queilitis del PA y observados en los estudios histopatológicos se encuentran conformados en la periferia por linfocitos T (CD45+, IL-2) y en el centro por linfocitos B (CD20+), además de abundantes eosinófilos y depósitos extracelulares de IgM, IgG y C3 en la dermis papilar.^{7,8}

Las células B activadas, en lugar de diferenciarse hacia células plasmáticas, inician la formación de centros germinales gracias a la interacción de CD40 con su ligando CD154 (CD40L), el cual es estimulado por la célula T a través de su receptor (TCR, del inglés *T cell receptor*). Esta unión también hace que las células B, habitualmente con baja afinidad por IgM, sean capaces de unir cualquier otro anticuerpo y expresar CD80 (B7) en su superficie, un marcador presente en todas

las células presentadoras de antígenos (CPA). Este CD80 de las células B interactúa con el CD28 de las células T, el cual emite una señal que activa al gen de IL-2 con proliferación de células Th2. Estas células inducen la liberación de IL-5 (que activa a los eosinófilos) e IL-4 (que estimula la producción de IgE²⁰ y la activación de mastocitos), proceso que promueve la formación de los centros germinales ectópicos característicos del PA (folículos linfoides).

Por otro lado, los linfocitos T CD4+ inducen y amplifican la respuesta inmunológica y la síntesis de IL-2 que, además de inducir una respuesta Th2, activa a las células asesinas naturales (células NK, del inglés *Natural Killers*) e induce la producción de anticuerpos¹ tipo IgE, la cual ya ha sido demostrada que se encuentra aumentada en suero en pacientes con lesiones de moderadas a severas,^{22,23} estos procesos inmunológicos están representados en la **Imagen 1**.²³ donde se señalan los autores que han contribuido con estudios en PA.

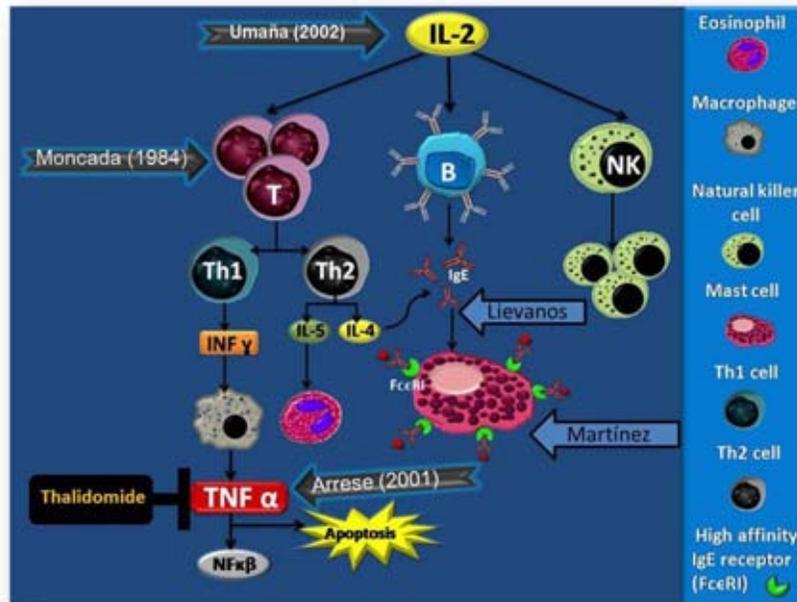


Imagen 1. Participación de la IL 2, linfocitos B, T y NK así como respuesta Th1 y Th2 en la reacción de hipersensibilidad tardía tipo IV.

Los mastocitos tienen un papel importante tanto en reacciones inflamatorias como alérgicas. Poseen un receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) capaz de unir al complejo IgE-antígeno que inicia la transducción de señales que culminan en la secreción de mediadores pro-inflamatorios y citocinas en los linfocitos T. ^{24,25.}

En un estudio realizado en México se encontró que el promedio de mastocitos en lesiones de PA localizadas en piel fue de 28.48 mastocitos/campo, con un rango de 0 a 66. En los controles el promedio de mastocitos fue de 9.75, con un rango de 5 a 16 mastocitos, y en mucosa sana fue de 7 mastocitos/campo lo que indica una mayor densidad de mastocitos en muestras de mucosas de pacientes con PA con respecto a la mucosa sana y a otras patologías, incluyendo a las de origen inflamatorio.²⁶

En este mismo trabajo se cuantificó la presencia de eosinófilos en esta patología encontrando un promedio de 9 eosinófilos en cada caso. ²⁶

La presencia de IgE, eosinófilos y mastocitos sugiere una reacción de hipersensibilidad en la fisiopatología del PA.²⁷ En términos generales, las reacciones de hipersensibilidad se producen tras la exposición a un antígeno con activación de células efectoras. Hasta ahora se conocen cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad que van de la I a la IV, (clasificación de Gell y Coombs) ²⁸⁻²⁹ esta última con cuatro subtipos (IVa-IVd),³⁰ ya que las células T pueden desencadenar diversas formas de inflamación con distintos patrones de citocinas y activación preferencial de diferentes inmunocitos ³¹⁻³⁴ o bien la interrelación que puede haber entre los componentes de la respuesta (Imagen 1) como la IL 2 que puede activar a linfocitos T, B ó NK y desencadenar respuesta con diferentes componentes.

Con base en esto, el prurigo actínico podría catalogarse como una reacción de hipersensibilidad retardada ^{15,35-36} tipo IVa ya que tras la exposición solar, los queratinocitos son capaces de producir TNF-α, ^{1,7} o bien una reacción tipo IVb por

la presencia de IgE, eosinófilos y mastocitos.^{32,33,34} Otra posibilidad remota, es que se trate de una reacción de hipersensibilidad tipo I con predominio de respuesta Th2^{15,38} por la presencia de IgE, eosinófilos y mastocitos, sin embargo este tipo de respuesta es inmediata, puede llegar a la anafilaxia tras la exposición al antígeno y aparece eccema y angioedema como manifestaciones cutáneas,^{29,32,33,38} que no sucede en el PA.

4.3 Cuadro Clínico

El prurigo actínico es una fotodermatosis polimorfa, bilateral y simétrica, que afecta predominantemente áreas fotoexpuestas de cara, cuello, tronco y extremidades. Como se muestra en **imagen 2**, las lesiones predominan en zonas prominentes de la cara donde los rayos solares inciden con mayor intensidad (dorso nasal, los arcos cigomáticos y superciliares, labio inferior y conjuntiva).^{2,5} Con menor frecuencia se observan lesiones en áreas no fotoexpuestas.^{4,13}

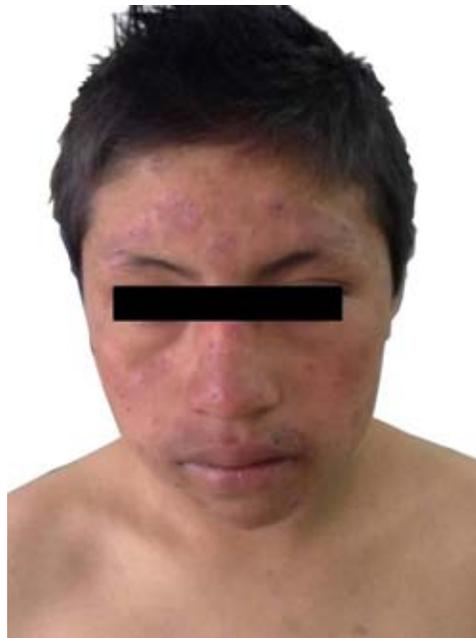


Imagen 2. Prurigo actínico, paciente con lesiones múltiples, bilaterales y simétricas en áreas fotoexpuestas.

Esta dermatosis se caracteriza por la presencia de máculas y pápulas eritematosas que confluyen formando placas. Debido a que es sumamente pruriginosa, se observan excoriaciones, costras serohemáticas, áreas de liquenificación, engrosamiento por el rascado crónico, cicatrices, hipo o hiperpigmentación residual. **Imagen 3** ^{2,4,5,7,8.}



Imagen 3. Liquenificación e hiperpigmentación residual en lesiones crónicas de PA, nótese los rasgos étnicos de la paciente.

En el borde bermellón del labio inferior generalmente existe edema, grietas, fisuras y exulceraciones cubiertas por costras serohemáticas, lo que en conjunto se denomina queilitis del prurigo actínico. En ocasiones se puede encontrar hipertrofia gingival anterior, posiblemente asociada a respiración bucal por la sintomatología presentada en el labio.⁵ **Imagen 4**

La queilitis del prurigo actínico es una manifestación clínica frecuente, habitualmente se afecta el labio inferior. El 65% de los pacientes con PA la presenta,^[1] y hasta en un 27.6% es la única manifestación de la enfermedad.⁵



Imagen 4. Queilitis del prurigo actínico, se observa edema, ulceración y costras.

A nivel conjuntival aproximadamente el 45% de los pacientes presenta conjuntivitis del prurigo actínico, que inicialmente se presenta con hiperemia, fotofobia, lagrimeo y posteriormente hipertrofia de papila, pseudopterigión y en los casos más graves, disminución del campo visual por vascularización de la córnea. No se ha estudiado a detalle, pero el daño conjuntival no suele presentarse de manera aislada, por lo que posiblemente sea una manifestación tardía de la enfermedad.

^{2,4,5} **Imagen 5**



Imagen 5. Conjuntivitis del prurigo actínico con hiperemia conjuntival. Se acompaña de lagrimeo y fotofobia.

El curso clínico es crónico con exacerbaciones tras la exposición solar. En los países donde las estaciones del año son marcadas, las exacerbaciones ocurren en primavera y remiten parcialmente en el otoño.^{4,6} En cambio, en zonas con clima tropical y sin tantas variaciones estacionales como en México, las exacerbaciones se presentan todo el año, relacionadas con el tiempo de exposición al sol.²

4.4 Histopatología

A nivel cutáneo hay hiperqueratosis (89%), paraqueratosis (49%), acantosis (92%), engrosamiento de la lámina basal (73%) e infiltrado inflamatorio perivascular superficial por linfocitos. En ocasiones la imagen histológica solo muestra datos de cronicidad, pero la presencia de un intenso infiltrado inflamatorio linfocitario nodular, acompañado por eosinófilos y mastocitos, sugiere el diagnóstico.³⁹ A diferencia de otras fotodermatosis como el lupus eritematoso, no es común la afección de anexos ni la presencia de elastosis solar.⁵ **Imagen 6**

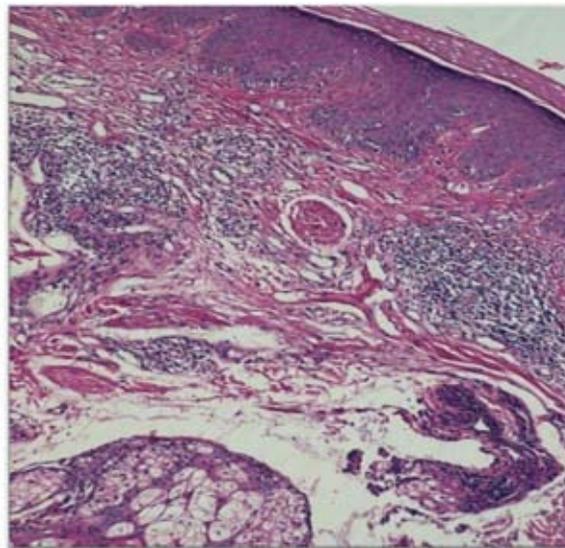


Imagen 6. En el estudio histopatológico de lesiones de PA en piel, es frecuente encontrar hiperqueratosis, acantosis y un infiltrado linfocitario de tipo nodular.

En las lesiones del borde bermellón del labio se observa hiperqueratosis (87%), costras serohemáticas (63.8%) que cubren áreas exulceradas (40.5%), acantosis

regular (96.5%), espongiosis (79.3%) y vacuolización de la capa basal (83.6%); eosinófilos (74.1%), melanóforos (69.8%) y en la lámina propia, vasodilatación (60%), edema (80.1%) con un infiltrado linfocitario difuso (75.8%), en banda o nodular que forma folículos linfoides bien definidos, que se denomina queilitis folicular, característica de la queilitis del prurigo actínico que se presenta con una frecuencia del 80%.⁵ **Imagen 7**

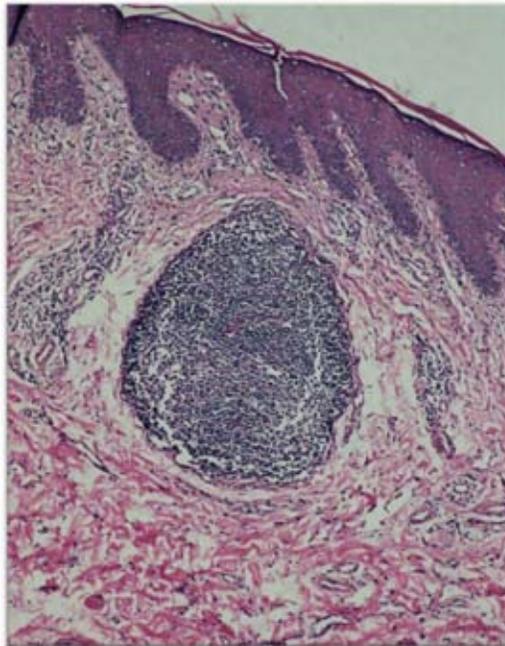


Imagen 7. En el estudio histopatológico de la queilitis del PA la formación de folículos linfoides es una característica de la enfermedad.

En conjuntiva se aprecia hiperplasia epitelial que alterna con áreas de atrofia, vacuolización de la capa basal (60%), dilatación capilar y un infiltrado inflamatorio con eosinófilos, linfocitos y melanóforos en la lámina propia. Aquí también los linfocitos pueden tener una disposición folicular como se observa en labio.^{2, 8.}

Los folículos linfoides se observan hasta en el 80% de las muestras de mucosa labial.^{1,2,5} Con técnica de inmunohistoquímica se demuestra que los linfocitos pequeños e hipercromáticos de la periferia corresponden a linfocitos T y los de

mayor tamaño del centro a linfocitos B, ^{2,8} como se observa en los folículos linfoides de ganglios y amígdalas. ⁴⁰

4.5 Diagnóstico

El diagnóstico de prurigo actínico es clínico y debe confirmarse con estudio histopatológico, ⁴¹ preferentemente de mucosas, donde es posible observar los folículos linfoides. ³⁹

4.6 Diagnóstico diferencial

Los principales diagnósticos diferenciales clínicos del prurigo actínico con predominio de afección cutánea son:

- Dermatitis atópica con fotosensibilidad; se presenta clínicamente desde edades tempranas, con pápulas, erosiones, placas, costras, áreas de liquenificación en zonas de la cara expuestas al sol como mejillas, labios y párpados con respeto del dorso nasal así como en zonas flexoras, si bien la mayoría remite en la pubertad algunos otros continúan hasta la edad adulta con el padecimiento.
- Dermatitis por fotocontacto crónico; la distribución de las lesiones son en áreas de exposición solar como cara, V del escote y dorso de manos, inclusive antebrazos, puede manifestarse desde pápulas eritematosas hasta verdaderas placas liquenificadas, donde el prurito es el síntoma principal. Aunque clínicamente sugiere cualquiera de las fotodermatosis idiopáticas, esta se identifica mediante pruebas de fotoparche el agente causal, que usualmente, como se ha demostrado en otros estudios, se relaciona a pesticidas, plantas, detergentes y blanqueadores)⁴
- Dermatitis actínica crónica, se caracteriza por erupciones persistentes, eccematosas asociadas a pápulas y placas infiltradas, en sitios de exposición solar, aunque suelen observarse también en áreas cubiertas⁴

- Erupción polimorfa lumínica, se caracteriza por desarrollar lesiones papulares, vesículas, costras y placas en áreas de piel expuestas a la radiación solar entre media y 24 horas posterior a la exposición y que desaparecen horas e incluso algunos días después de evitar la exposición. Se presenta en piel blanca y es la fotodermatosis más frecuente en los países anglosajones.^{4,8}

El principal reto diagnóstico es la dermatitis atópica con fotosensibilidad, ya que también inicia en la infancia y con frecuencia los pacientes desconocen su estado atópico que consiste en xerosis de la piel acompañado de síntomas respiratorios alérgicos.⁴³

La conjuntivitis del PA debe diferenciarse de la conjuntivitis primaveral, la cual es bilateral, recurrente, altamente pruriginosa y predomina en adolescentes con historia de atopia.⁴⁴

El diagnóstico diferencial clínico más importante de la queilitis del PA es la queilitis traumática secundaria al mordisqueo del labio, en donde se observa eritema, atrofia, erosión y zonas de hiperpigmentación melánica con sensación ardorosa y tendencia a la cronicidad.⁴⁵ Es importante no confundir los términos de queilitis del prurigo actínico y la queilitis actínica, ya que son entidades completamente distintas.⁴⁶ La queilitis del PA no sufre transformación maligna y clínicamente el labio aumenta de volumen, contraria a la queilitis actínica que es consecuencia del daño solar acumulado y clínicamente es evidente la pérdida de la dimensión vertical del labio, hay atipia en el epitelio y puede llegar a evolucionar a un carcinoma epidermoide, así como la presencia de elastosis actínica en el corion.

4.7 Tratamiento

En el tratamiento es fundamental evitar la exposición solar y el uso de protectores solares. El uso de fármacos depende de la extensión y la gravedad de la

enfermedad, ^{5,8,47} dentro de las opciones terapéuticas se encuentran los corticosteroides tópicos o sistémicos, vitamina E, β -carotenos, tetraciclina, antipalúdicos, antihistamínicos, ciclosporina A, tacrolimus y dosis bajas de fototerapia UVA o UVB, todos con remisiones parciales.^{2,5,48} Pero el medicamento que ha demostrado mayor utilidad es la talidomida.

La talidomida (alfa N-ftalilimido-glutaramida) es un derivado del ácido glutámico.⁴⁹ Fue utilizado en 1973 por Londoño,⁵⁰ quien demostró excelentes resultados al tratar pacientes con PA. Estos hallazgos fueron confirmados en 1975 por Saúl⁵²⁻⁵³ y en 1993 por Vega Memije y colaboradores.¹² Por tratarse actualmente del tratamiento farmacológico más eficaz para tratar este padecimiento^{8,43} merece que profundicemos en su mecanismo de acción.

La talidomida posee efecto inmunomodulador, antiinflamatorio, antiangiogénico y teratogénico. Se han demostrado propiedades en la inmunidad celular al inhibir la transformación linfoblástica inducida por fitohemaglutinina en linfocitos humanos, también se ha evidenciado un efecto inhibitorio de la quimiotaxis de los neutrófilos y reducción en la fagocitosis.

Otra características a mencionar son la reducción de la regeneración de radicales intermediarios de oxígeno. Con relación a las citocinas se sabe que la talidomida inhibe de manera selectiva la producción de IL 1 β , IL 6, IFN gamma, IL12 y el TNF- α interfiriendo en la respuesta inmune celular.⁵⁴

Como ya se mencionó se logró comprobar la inhibición del TNF- α por los monocitos al reducir la vida media del RNA mensajero de esta citocina, cuyo papel es de suma importancia en la respuesta del huésped, en procesos infecciosos de etiología viral, parasitaria, micótica o bacteriana así como en enfermedades autoinmunes. También altera la densidad de las moléculas de adhesión en leucocitos inducidos por el TNF alfa, al presentar propiedades coestimuladoras

con las células T con aumento de producción de IL 2 la cual tiene un rol importante en el efecto antiangiogénico de este fármaco. ⁵⁵

La dosis efectiva reportada en niños de 9 a 16 años es de 0.5 a 2.5 mg/kg/día por vía oral ⁵⁶ y en adultos la dosis inicial es de 100 a 200 mg al día, dosis que se puede mantener hasta observar mejoría clínica ^{5,8,57} (lo cual ocurre usualmente entre las dos y las cuatro semanas de tratamiento)^[4] y disminuirse hasta alcanzar la dosis mínima efectiva que generalmente es de 25 mg por semana. ^{5,8}

El principal problema de la talidomida es su teratogenicidad, por lo que es obligatorio utilizar un método anticonceptivo efectivo en todas las mujeres en edad reproductiva.^{5,8} Otros efectos adversos son somnolencia, aumento del apetito,⁸ cefalea, náuseas, estreñimiento, hipersensibilidad cutánea¹ y neuropatía sensitiva,⁸ esta última hasta en el 90.9% de los casos se encuentra asintomática, el paciente es sometido a estudios de conducción nerviosa.⁵⁸

La talidomida también ha sido utilizada para mejorar las condiciones de pacientes terminales de VIH y cáncer. En el primero de los casos el fármaco al inhibir la biosíntesis del TNF α inhibe la citocina que posiblemente activa la replicación del virus, existen investigaciones clínicas que estudian el uso de la talidomida para potenciar la respuesta inmune de los pacientes VIH positivos con sarcoma de Kaposi, pérdida involuntaria de peso mayor al 10%, aftas orales y esofágicas. Entre las neoplasias malignas en las que se encuentra aceptado su uso incluso por la FDA es para tratar mieloma múltiple en combinación con la dexametasona en pacientes sin tratamiento previo, mayores de 65 años o en aquellos no considerados aptos para recibir quimioterapia a altas dosis.⁵⁹

4.8 Apoptosis

La apoptosis se define como la muerte celular programada, cuando una célula comienza con este proceso se activan una serie de reacciones enzimáticas, lo cual conduce a la desorganización proteica con daño subsecuente al ADN, cabe

mencionar que en la apoptosis en su fase inicial mantiene la integridad de la membrana previniendo que los componentes intracelulares sean liberados y evitando así el daño a los tejidos de manera directa.⁶⁰

Las células que son inducidas a sufrir apoptosis presentan las siguientes características: **Imagen 8**

- Reducen su tamaño
- Sus mitocondrias se abren y dejan salir el citocromo C
- En la superficie celular surgen vesículas
- La cromatina sufre degradación
- Se rompen en fragmentos rodeados de membrana
- La fosfaditil serina se une a receptores de células específicas
- Las células fagocíticas segregan citocinas que inhiben la inflamación.⁶¹

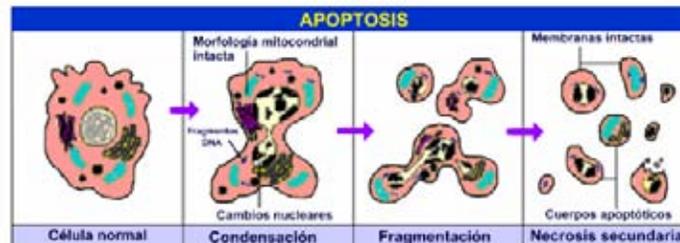


Imagen 8. Mecanismo de apoptosis.

Tomado de Cascales y cols. 2003 (Anal. Real Acad. Nal. Farm)

Como se muestra en la **Imagen 9** la apoptosis se lleva a cabo mediante dos vías; la vía extrínseca (constantemente activa) en la cual participan los receptores de muerte (TNF tipo 1) así como la proteína Fas (CD95) y sus ligandos TNF y Fas ligando (FasL) respectivamente, estos receptores tienen un dominio de muerte

intracelular que reúne a proteínas adaptadoras como el TNF (TRADD) y el dominio asociado a Fas (FADD) así como cisteína- proteasas como las caspasas, la caspasa 8 es una caspasa iniciadora de la apoptosis.

Por otra parte la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis se inicia al interior de la célula ante estímulos internos, tales como daño genético irreparable, hipoxia, stress oxidativo, toxinas, bacterias, radicales libres y radiación UV. Dicha vía está regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia bcl-2, específicamente las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1). Estas proteínas apoptóticas frenan la apoptosis bloqueando la liberación mitocondrial de citocromo-c, las proteínas pro-apoptóticas actúan promoviendo la liberación del citocromo desde la mitocondria hacia el citoplasma.⁶²

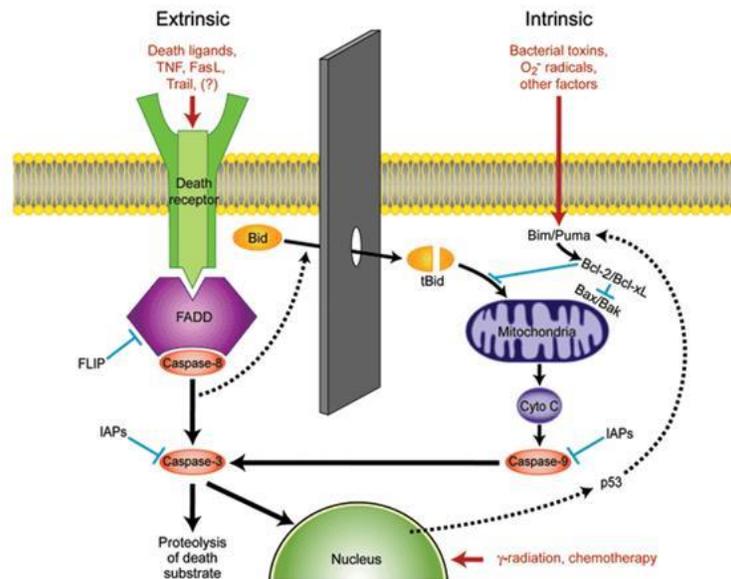


Imagen 9. Vías de la apoptosis

Tomado de Coto y cols. 2007 (QV).

Durante los procesos de muerte celular se pueden distinguir 3 etapas:

1. Fase de activación: dichos procesos pueden ser activados por una inducción negativa, es decir la pérdida de una actividad supresora o bien mediante inducción positiva al llevarse a cabo la unión de un ligando a un receptor.
2. Fase de propagación: como parte de los mensajeros que participan en los procesos de muerte celular se encuentran el calcio y las especies reactivas de oxígeno, aunque recientemente se han añadido otros segundos mensajeros como la ceramida así como otro grupo de proteínas tales como factores de transcripción (p53) y oncogenes (c-myc, familia de bcl).
3. Fase de ejecución: una vez que la maquinaria apoptótica se ha activado se producen una serie de procesos bioquímicos que conducen a la degradación de proteínas y de la cromatina. Dicha proteólisis es irreversible y específica. **Imagen 10**⁶³

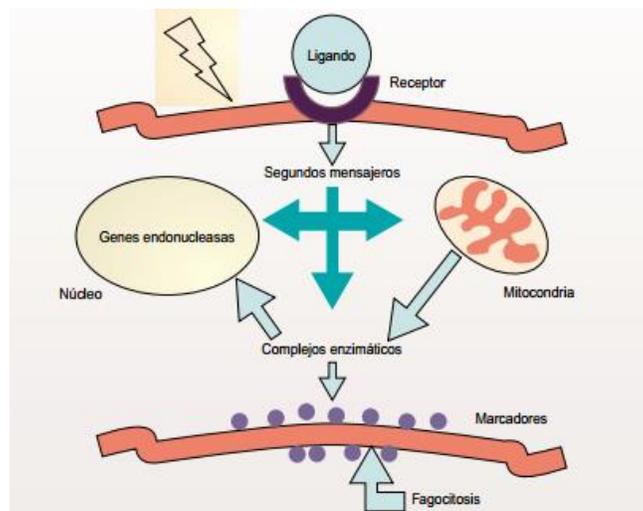


Imagen 10. Vías celulares del proceso apoptótico

Tomado de Jordan y cols. 2003 (OFFARM).

4.9 Técnica de TUNEL

La degradación del ADN es una de las características más importante de la apoptosis, por lo que se han desarrollado diferentes métodos que permiten analizar las células de manera individual en busca de dicha degradación.

Unos de los métodos más utilizados es el marcaje de ADN de hebra sencilla por medio de una transferasa terminal que adiciona nucleótidos marcados al ADN en el extremo 3 prima los cuales pueden ser utilizados por fluorescencia o bien por métodos de inmunohistoquímica.^{64,65}

La técnica de TUNEL (Transferase-mediated dUTP Nick endlabeling) es un método directo útil para la identificación de la apoptosis, debido a que durante este fenómeno las endonucleasas nucleares digieren el ADN genómico en fragmentos oligonucleosomales (180-200 pares de bases) lo que favorece la realización de dicha técnica al marcar los fragmentos de ADN mediante la incorporación catalítica de 16 dUTP marcando los extremos libres por medio de la enzima transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT).⁶⁶

Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico los resultados obtenidos pueden ser variables dependiendo del momento exacto en el que se encuentre la célula, esto permite disponer de diferentes marcadores apoptóticos para cada momento, cabe mencionar que no todos están presentes en todas las células ni todos los marcadores de apoptosis son exclusivos de este proceso. Otro aspecto a considerar es que a pesar de que la célula haya iniciado con el proceso de apoptosis y que incluso se encuentren en la misma fase del ciclo celular el proceso de muerte no es sincrónico por lo que los resultados obtenidos son representativos de un momento específico.

La técnica de TUNEL es un método para la detección de apoptosis en células individuales tanto en fase temprana como tardía a diferencia de otros métodos como la detección de la exposición de fosfatidil serina que detecta una fase

apoptótica temprana o bien como la técnica de electroforesis de ADN que nos marca el mecanismo apoptótico en su fase tardía. ^{65,67}

4.10 Técnica de inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica tiene como fundamento el uso de reactivos basados en anticuerpos para localizar epítopes específicos en secciones de tejido, los cuales al estar presentes o ausentes son indicadores de cambios genéticos, bioquímicos o funcionales.

A nivel general los marcadores utilizados en inmunohistoquímica (IHQ) pueden ser agrupados de la siguiente manera.

- a) Marcadores de diferenciación
- b) Marcadores oncofetales
- c) Isoenzimas
- d) Hormonas
- e) Proteínas tejido específicas
- f) Oncogenes
- g) Anti oncogenes
- h) Marcadores de proliferación
- i) Glicoproteínas
- j) Marcadores pronósticos
- k) Marcadores apoptóticos

Estos marcadores utilizados como antígenos pueden ser visualizados por medio de anticuerpos específicos, los cuales son generados de diferentes

especies de animales en forma monoclonal o policlonal, unidos a su vez a un receptor específico e identificados por medios colorímetros y/o enzimáticos; la reacción química generada puede ser citoplasmática, nuclear o membranal o bien una combinación de estas. ⁶⁸

4.11 Fas-Fas L

Fas también llamado receptor APO-1 o CD95, pertenece a la super familia de receptores TNF, este gen está ubicado en el brazo largo del cromosoma 10, en la región 24.1. El receptor es una glicoproteína transmembranal tipo I que se activa con la unión de su ligando extracelular y genera apoptosis.

Por otra parte Fas L (CD95L) (**Imagen 11**) está ubicado en el brazo largo del cromosoma 1 codifica para una proteína de membrana tipo II en donde el extremo N terminal se encuentra en el espacio citoplasmático y el C terminal en el extracelular.

El gen Fas L se encuentra principalmente en los linfocitos T activados y en los NK, cuando la proteína transmembranal Fas se une con Fas L esta se trimeriza y se une a una proteína con un dominio de muerte (FADD) asociado a Fas. ⁶⁹

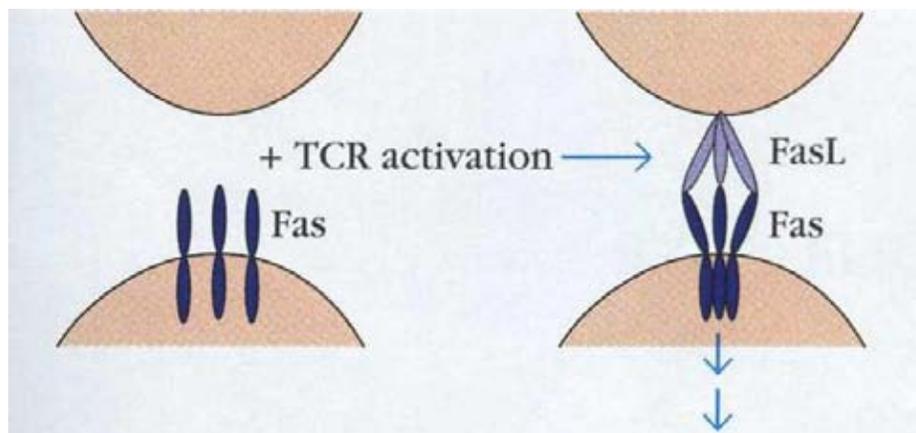


Imagen 11. Interacción Fas-Fas L

Tomado de Krammer PH. 2000 (Nature).

4.12 Bcl-2

Bcl-2 es una familia compuesta de 19 genes que pueden promover o inhibir la apoptosis, dentro de los miembros de esta familia se encuentra BAX que favorece la apoptosis y bcl-2 que la inhibe.

Se encuentra localizado en el cromosoma 18. Las proteínas de este gen ejercen un efecto inhibitor sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial que libera el citocromo C hacia el citoplasma de la célula el cual a su vez inicia la vía intrínseca de la apoptosis a través de la activación de las caspasas. Bcl-2 es un proto-oncogen que prolonga la sobrevivencia de las células, al bloquear la apoptosis.

70

4.13 Proteína Bax

Bax es una proteína cuyo gen codificador se encuentra en el cromosoma 19, a pesar de que posee una alta homología con la proteína bcl-2 carece del dominio BH4 y participa en la vía apoptótica mitocondrial induciendo la liberación de citocromo C. Se ha observado que Bax se asocia con el complejo del poro de la mitocondria (PT) que participa en la regulación de Ca^{2+} .⁷¹

Bax es una proteína de 21 kDa que guarda como ya se mencionó una estrecha relación con bcl-2 ya que se agrupa en regiones conservadas BH1 y BH2. Bax se heterodimeriza con bcl-2 y se homodimeriza consigo mismo. Cuando Bax se sobre expresa en las células, la apoptosis se acelera como respuesta a la señal de muerte, por el contrario cuando bcl2 se sobre expresa la muerte celular es reprimida por lo que analizar la expresión de ambos anticuerpos resulta fundamental para determinar la susceptibilidad a la apoptosis.⁷¹

4.14 Caspasa 3

Las caspasas pertenecen a una familia de cistein-proteasas que dividen sustratos específicamente después de ácido aspártico. Se han identificado 14 caspasas implicadas en la apoptosis y que son sintetizadas por proenzimas que requieren un proceso de proteólisis para ser activadas. **(Imagen 12)**

De todas las caspasas, la 3 ha sido caracterizada como la directamente vinculada a la apoptosis y se ha sugerido que su expresión aumenta la vulnerabilidad a la apoptosis o activa incluso por sí misma la cascada apoptótica.⁷²

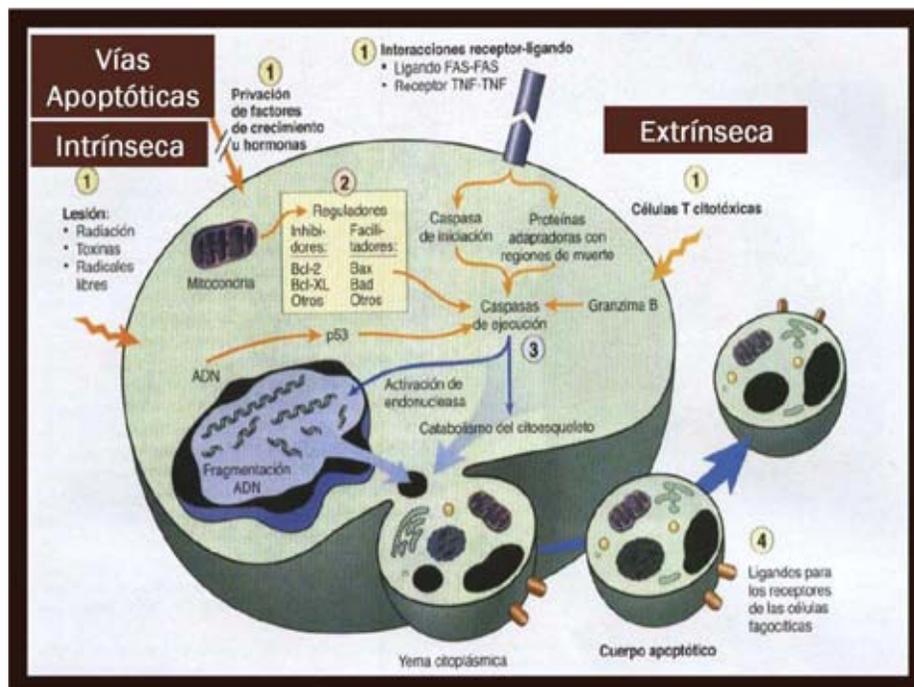


Imagen 12. Participación de la caspasa 3 en el proceso apoptótico en el punto donde ambas vías confluyen.

Tomado de Kumar y Cols. 2000

4.15 Gen p53

Es una proteína reguladora de la transcripción, inhibe la proliferación celular, tiene actividad anti-transformante e induce muerte celular por apoptosis ante un daño en el ADN que no puede ser reparado.⁷³ El gen *p53* (TP53) está localizado en el locus 17p13 en el genoma humano, está compuesto por 11 exones y se expresa en todas las células, aunque la vida media de la proteína es corta, consta de 393 aminoácidos y como su nombre indica tiene un peso de 53 kDa. Cuenta con varios dominios, principalmente un dominio de transactivación, un dominio de unión a ADN, un dominio de translocación nuclear y un dominio de oligomerización. Sin embargo, el gen codifica hasta nueve isoformas de la proteína que son expresadas de forma tejido-específica.⁷⁴

Se ubica dentro del ciclo celular en los sitios de restricción al final de la fase G1 inhibiendo el crecimiento celular y tratando de corregir el ADN dañado, nuevamente al inicio de la fase G2 vuelve a participar en un punto de control celular en donde *p53* verifica que el ADN celular haya sido corregido y en caso contrario induce apoptosis.⁷⁴

4.16 Factores de riesgo asociados a PA

A pesar de que se considera a la luz ultravioleta B y A los iniciadores de la fisiopatología del PA, en un patrón genéticamente determinado, no se ha podido explicar porque algún tipo de población lo presenta y otros no, por lo que se considera que deben existir factores de riesgo asociados al PA. Existe un estudio piloto llevado a cabo en el hospital Gea González, entre los factores evaluados se encuentran deficiencias nutricionales, específicamente con la ingesta de sodio, magnesio, selenio, vitamina B1 y B6.¹⁰

También han sido estudiadas otras variables como la exposición al humo de leña, la convivencia con animales domésticos y de granja así como un estado

socioeconómico bajo.¹⁰ Se requieren otros estudios para corroborar estas posibles asociaciones y comprender más acerca de la enfermedad.

5. Planteamiento del problema

La fisiopatología del PA no ha sido del todo esclarecida, se propone que sea una reacción de hipersensibilidad tipo IV sub tipo “a” y “b” en donde la apoptosis es el último paso de la respuesta th1, por lo que suponemos que este evento debe presentarse en el PA y de ser así es necesario identificar la vía apoptótica implicada, otro punto que aún no queda claro es si además de la radiación solar otros factores externos como son la exposición al humo de leña y la convivencia con animales domésticos y/o de granja se encuentran asociados. Por lo que nos hemos planteado como pregunta de investigación si en el prurigo actínico se encuentra activa la apoptosis y de ser así, cuál es la vía apoptótica implicada, así como la presencia de factores de riesgo asociados con la enfermedad.

6. Justificación

Ningún estudio ha sido diseñado hasta el momento con el objetivo de determinar la activación de la apoptosis, lo cual es fundamental para complementar el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad que produce un prurito intenso y afectación de la piel y mucosas, dando una morbilidad importante y afectando la calidad de vida del paciente, al que hay que proporcionarle medidas preventivas, evitar que dentro de lo posible las lesiones se desencadenen en sujetos enfermos, buscar opciones de tratamiento además de las que se cuentan hasta el momento y prevenir el desarrollo del padecimiento en personas sanas expuestas a factores de riesgo.

7. Hipótesis de trabajo

- Dentro de la fisiopatología del prurigo actínico se encuentra implicada la apoptosis

- La vía apoptótica implicada en el prurigo actínico es la vía intrínseca, identificada por los anticuerpos Bcl-2, Bax y p53.
- La exposición solar, la convivencia con animales domésticos y/o de granja y la exposición al humo de leña son factores de riesgo asociados al padecimiento

8. Objetivo General

Determinar la presencia de apoptosis y la vía apoptótica implicada en piel y mucosa de pacientes con PA y sujetos sin PA así como estudiar la posible asociación del padecimiento con factores de riesgo.

8.1. Objetivos específicos

- Determinar la presencia de apoptosis en el prurigo actínico por medio de la técnica de TUNEL y técnica de inmunohistoquímica en tejido incluido en parafina
- Determinar la presencia de apoptosis en el prurigo actínico por medio de inmunohistoquímica en muestras obtenidas por citología exfoliativa.
- Describir las características socio demográficas de los casos de PA y de los controles.
- Estudiar la posible asociación al humo de leña en casos con PA y en sujetos sin PA.
- Describir el tiempo de exposición al sol en casos con PA y en sujetos sin PA.
- Registrar la convivencia con animales domésticos y de granja en pacientes con PA y en sujetos sin PA.
- Identificar si la exposición al humo de leña, la exposición solar y la convivencia con animales domésticos y/o de granja están asociadas con la presencia de PA

9. Diseño del estudio. Se trata de un estudio de casos y controles el cual se dividió en dos fases. En la primera la muestra estuvo conformada por bloques de tejido incluido en parafina con diagnóstico de PA así como tejido sin alteración histopatológica utilizado como control, todo perteneciente al departamento de Dermatopatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

En la segunda fase se incluyeron pacientes con prurigo actínico de reciente diagnóstico con sus respectivos controles, a los cuales se les aplicó cuestionario de factores de riesgo.

9.1 Universo de estudio.

Primera fase.

Se incluyeron 64 bloques con tejido embebido en parafina con diagnóstico corroborado de prurigo actínico, así como 64 bloques de tejido sin alteración histopatológica perteneciente al laboratorio de dermatopatología del año 1994 al 2013.

Segunda fase.

Fueron incluidos al estudio 30 pacientes que acudieron al departamento de dermatología de enero del 2012 a enero del 2014 (Previo consentimiento informado, **(Anexo 1)** con características clínicas de PA y cuyo diagnóstico fue corroborado por estudio histopatológico y 50 controles del departamento de estomatología del hospital que acudían por tratamientos odontológicos y que aparentemente no padecían enfermedades crónicas de base, otras fotodermatosis, ni padecimientos alérgicos. Se tomó la muestra de este departamento porque la población que acude allí a consulta es similar a la que acude a dermatología.

9.2 Tamaño de la muestra.

Primera fase.

Para determinar la presencia de apoptosis y debido al número de muestras que se pudieron procesar con el kit adquirido de técnica de TUNEL (TACS Roche) la muestra incluida fue de 50 casos y 20 controles de tejido sin alteración histopatológica. Para determinar la vía apoptótica por medio de la técnica de inmunohistoquímica la muestra incluida fue de 64 casos y 64 controles. Esta primera fase correspondió a tejido incluido en parafina que se encontraba en el archivo de Dermatopatología del año 1994 al 2013.

Segunda fase.

Como en ese momento se realizaba el diagnóstico y tuvimos la oportunidad de atender a los pacientes, se aplicó el cuestionario de factores de riesgo elaborado para este trabajo, por eso en la primera fase se trabajó la parte experimental y en esta segunda la relacionada a los factores de riesgo.

El tamaño de la muestra se calculó utilizando el programa *Power Analysis and Sample Size* (PASS). La fórmula que se utilizó para el tamaño de muestra fue:

$$n_1 = (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 / C(r)^2 + 3$$

Nivel de confianza: 95%

Poder 80%

9.3 Criterios de inclusión

Primera Fase

Criterios de Inclusión (Casos)

- Bloques con tejido incluido en parafina con diagnóstico corroborado histopatológicamente de PA, registrados en el archivo del departamento de dermatopatología del H. Gral. Dr. Manuel Gea González del año de 1994 al 2013.

Criterios de Exclusión.

- Bloques con tejido insuficiente para ser procesado con técnica de inmunohistoquímica y técnica túnel.

Criterios de Inclusión (Controles)

- Bloques con tejido de piel sin alteraciones histológicas incluido en parafina, registrados en el archivo del departamento de dermatopatología del H. Gral. Dr. Manuel Gea González del año 1994 al 2013.

9.4 Segunda Fase

Criterios de Inclusión (Casos)

- Pacientes con características clínicas de PA y con diagnóstico confirmado histopatológicamente (Infiltrado perivascular linfocitario, presencia de folículos linfoides, hiperqueratosis y espongirosis) que acudieron al departamento de dermatología del H. Gral. Dr. Manuel Gea González de Enero de 2012 a Enero de 2014.
- Pacientes que contestaron el cuestionario de factores de riesgo.
- Que aceptaron participar en el estudio previa firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión de los casos

- Pacientes con algún otro tipo de fotodermatosis
- Que contaran con familiares en primer y segundo grado con PA.

Criterios de Inclusión (Controles)

- Sujetos que acudieron al departamento de estomatología del H. Gral. Dr. Manuel Gea González
- Que permitieran la toma de muestra para citología, con la cual se realizó la técnica de inmunohistoquímica para buscar apoptosis
- Que estuvieron de acuerdo en contestar el cuestionario de factores de riesgo
- Sujetos clínicamente sanos

Criterios de exclusión de los controles

- Pacientes con algún otro tipo de fotodermatosis

10. Variables

10.1 Dependiente

- Prurigo actínico

10.2 Independientes

- Edad
- Sexo
- Exposición solar

- Convivencia con animales domésticos
- Convivencia con animales de granja
- Exposición al humo de leña
- Contaminación ambiental
- Hábito de fumar
- Fas
- p53
- bcl-2
- Bax
- Caspasa 3

Tabla 1. Variables incluidas en el estudio

DEFINICIÓN DE VARIABLES			
Variable	Definición Conceptual	Indicadores	Definición Operacional
Edad	Es el tiempo que ha vivido el ser humano	El dato se tomó del expediente clínico en la primera fase y del cuestionario de factores de riesgo para la segunda fase.	Edad cumplida en años _____
Sexo	Condición orgánica que distingue masculino y femenino	El dato se tomó del expediente clínico en la primera fase y del cuestionario de factores de riesgo para la segunda fase.	Masculino _____ Femenino _____
Exposición Solar	Es la exposición de los sujetos a la radiación UV	Esta información es para los casos y controles (segunda fase) y se tomó por interrogatorio en el cuestionario de factores de riesgo ¿Usted en sus actividades diarias se expone al sol? ¿Cuántos días a la semana se expone al sol? Número de horas que se expone al sol diariamente en sus actividades En sus actividades anteriores usted se exponía al sol ¿Cuántos días a la semana se exponía al sol? Número de horas que se exponía al sol diariamente en sus actividades anteriores ¿De qué hora a qué hora se exponía al sol? Considerando el tiempo de trabajo y las otras actividades que realiza al aire libre, ¿Cuántas horas se exponía al sol a la semana?	0=No, 1= Si Cuantitativa continua _____
Zoonosis	Convivencia con animales domésticos y/o de granja	Esta información es para los casos y controles (segunda fase) y se tomó por interrogatorio en el cuestionario de factores de riesgo ¿Tiene animales domésticos? ¿Desde hace cuánto tiempo convive con los animales domésticos? ¿Qué tipo de animal tiene? En donde se encuentra la mascota durante el día ¿Dónde duerme la mascota? ¿Cuántos días está en contacto con la mascota durante la semana? ¿Cuántas horas pasa usted en contacto físico con la mascota diariamente? ¿Anteriormente tenía animales domésticos?	0= No, 1 = Si Cuantitativa continua _____ 1= Perro, 2= Gato, 3= Pájaros, 4= Hámster, 5= Tortugas, 6= Otro _____ 0= Al exterior del hogar 1= Al interior del hogar 1= Puerco, 2= Vaca, 3= Borrego, 4= Chivo, 5= Caballo, 6=Gallinas 7= Patos, 8=Pollos, 9= Otros _____

		<p>¿Cuánto tiempo convivió con los animales domésticos? ¿Qué tipo de animal tuvo? En donde se encontraba la mascota durante el día ¿Donde dormía la mascota? ¿Tiene animales de granja? ¿Desde hace cuánto tiempo convive con animales de granja? ¿Qué tipo de animal tiene? ¿Dónde duermen los animales de granja? ¿Cuántos días a la semana pasa en contacto con los animales? ¿Cuántos días a la semana pasa en contacto con los animales? ¿Cuántas horas por día está en contacto con los animales? ¿Anteriormente tenía animales de granja? ¿Desde hace cuánto tiempo convivía con animales de granja? ¿Qué tipo de animal tuvo? ¿Donde dormían los animales de granja? ¿Cuántos días a la semana pasaba en contacto con los animales? ¿Usted cuantas horas por día estaba en contacto físico con los animales?</p>	
Exposición al humo de leña	Familias que cocinan con leña y/o usan chimeneas.	<p>Esta información es para los casos y controles (segunda fase) y se tomó por interrogatorio en el cuestionario de factores de riesgo</p> <p>En su casa cocinan con? ¿Cuántos días a la semana está expuesto al humo de leña o carbón? ¿Cuántas horas por día está expuesto? ¿La exposición al humo de leña es fuera o dentro del hogar? ¿Desde hace cuánto tiempo está expuesto al humo? ¿Usan leña o carbón con otro fin? Desde hace cuánto tiempo usa leña ó carbón con otro fin ¿Cuál actividad? Anteriormente usaba leña ó carbón con otro fin? ¿Cuál actividad?</p>	<p>0= gas, 1= leña, 2=carbón, 3= gas y leña 4=gas y carbón</p> <p>Cuantitativa continua_____</p> <p>0= Fuera, 1= Dentro 2= ambos</p> <p>0= No, 1= Sí</p> <p>Nominal_____</p>
Prurigo actínico	Es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, mucosa	En la primera fase el diagnóstico fue corroborado con HyE por dos patólogos histológicamente de los casos que se	Hiperqueratosis Espongiósis Infiltrado perivascular

	labial y conjuntival. Representa una respuesta anormal a la luz solar y se caracteriza por pápulas y placas infiltradas pruriginosas a menudo excoriadas en áreas expuestas al sol.	incluyeron del departamento de dermatopatología En la segunda fase los pacientes acudían al departamento de dermatología con características clínicas de PA y después el diagnóstico era confirmado por la toma de la biopsia.	Folículos linfoides Linfocitos dispersos Queratinocitos apoptóticos Melanocitos Eosinófilos Macrófagos Vega ME. Características histopatológicas del prurigo actínico. Dermatol Rev Mex 1993; 37: 295-97.
Fas	Fas es una proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado. El ligando Fas (FasL o Apo-1) es una proteína de membrana tipo II de 40 kDa miembro de la familia del factor de necrosis tumoral.	Para la primera y segunda Fase Se tomó la densidad óptica con el software Image Lab. 2.0 Cualitativa: Los dos observadores registraban el sitio de positividad.	Cuantitativa continua _____ Negativo Leve= Densidad óptica menor a 40 Moderado= 40-80 Severo=81 y mas
P53	Es un iniciador de apoptosis	Para la primera y segunda Fase Se tomó la densidad óptica con el software Image Lab. 2.0 Cualitativa: Los dos observadores registraban el sitio de positividad.	Cuantitativa continua _____ Negativo Leve= Densidad óptica menor a 40 Moderado= 40-80 Severo=81 y mas
Bax	Es una proteína pro-Apoptóticas de tipo multidominio.	Para la primera y segunda Fase Se tomó la densidad óptica con el software Image Lab. 2.0 Cualitativa: Los dos observadores registraban el sitio de positividad.	Cuantitativa continua _____ Negativo Leve= Densidad óptica menor a 40 Moderado= 40-80 Severo=81 y mas
Caspasa 3	Es una proteína efectora de apoptosis tardía.	Para la primera y segunda Fase Se tomó la densidad óptica con el software Image Lab. 2.0	Cuantitativa continua _____ Negativo Leve= Densidad óptica menor

		Cualitativa: Los dos observadores registraban el sitio de positividad.	a 40 Moderado= 40-80 Severo=81 y mas
bcl-2	Es una proteína que regula la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria	Para la primera y segunda Fase Se tomó la densidad óptica con el software Image Lab. 2.0 Cualitativa: Los dos observadores registraban el sitio de positividad.	Cuantitativa continua _____ Negativo Leve= Densidad óptica menor a 40 Moderado= 40-80 Severo=81 y mas
ApoTag	Es una proteína utilizada en la detección de fragmentos terminales de ADN	Para la primera fase Cualitativa: Los dos observadores registraban el sitio de positividad.	Dicotómica Positivo Negativo

11. Material y método

Primera Fase

Se revisaron los diagnósticos histopatológicos del archivo del departamento de dermatopatología del año 1994 al 2013, basados en el diagnóstico emitido por el patólogo adscrito se incluyeron 64 muestras (lesiones de labio y/o piel), tuvimos un control por cada caso (tejido sin alteración histopatológica). Se realizaron cortes histológicos de los bloques a 2 micrómetros, un total de 7 laminillas por bloque. (Una laminilla para HyE, una para Fas, bax, bcl-2, p53, Caspasa 3 y TUNEL respectivamente).

Efectuados los cortes, la primera tinción realizada fue la de HyE cuyo objetivo era corroborar el diagnóstico de acuerdo a los criterios diagnósticos seleccionados en este estudio. Las clasificaciones utilizadas para establecer el diagnóstico y realizar el análisis fueron las establecidas en 1993 por Vega y cols.³⁷ Previo al análisis histopatológico para determinar el diagnóstico de prurigo actínico se realizó una prueba de concordancia inter e intra observador entre el tutor y el alumno. La

estandarización se efectuó en un microscopio de dos cabezas donde ambos identificamos cada una de las características histopatológicas; se realizaron varias observaciones obteniendo un valor de Kappa interobservador de 0.80 e intra observador de 0.81 y 0.90 respectivamente. Se llevo a cabo el entrenamiento en el laboratorio para realizar la técnica de TUNEL y de inmunohistoquímica así como la estandarización para cada uno de los anticuerpos.

11.1 Técnica de TUNEL. (Transferase-mediated dUTP Nick endlabeling) para esta técnica se seleccionaron 30 muestras de tejido de queilitis del prúrigo actínico y 20 lesiones localizadas en piel así como 20 tejidos sin alteración histopatológica.

Se desparafinaron y rehidrataron los tejidos, se hizo el desenmascaramiento del antígeno con Citrato de Sodio al 0.1M pH 6.2, posteriormente se colocaron 100 µl de proteinasa K concentración por laminilla libre de DNAsas (30 minutos), para después añadir 50 ul del mix de reacción TACS nucleasa Roche (streptavidin-HRP solution), y su diluyente (Streptavidina) 500 µl, se montó por medio de capilaridad y se incubó (30 min.), se prepararon 450 µl de solución enzimática y 50 µl de solución marcada con fluoresceína, se utilizaron 50 µl para cada uno de los 50 casos procesados y se dejaron incubar (60 min.) a 37 ° en cámara húmeda y en la oscuridad. Cumplido el tiempo se realizó la contratinción con azul de Evans y se colocó el cubreobjetos con un medio de montaje para fluorescencia (Dako fluorescent Mounting Medium Cat. S3023, Dakocytomation), entre cada paso se lavó el tejido con TBS

Para la valoración se utilizó un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 y la reacción fue categorizada de manera dicotómica registrando el sitio histológico del marcaje, la prueba estadística para evaluar esta técnica fue X^2 por tratarse de variables cualitativas.

11.2 Técnica de Inmunohistoquímica

Los 64 casos con sus respectivos controles fueron procesados por IHQ, se desparafinaron y rehidrataron los tejidos, se hizo la recuperación antigénica con

citrato de sodio al 0.1% pH 6.2, se inactivó la peroxidasa endógena (peróxido de hidrógeno al 0.9 %) y se realizaron los lavados con agua destilada para finalmente dejarse en reposo durante 5 minutos en buffer salino de fosfatos (PBS).

Los tejidos se incubaron durante 45 minutos con los anticuerpos; bcl-2, p53, caspasa 3, Bax y Fas como se especifica en la **tabla 2**. Posteriormente se usó el anticuerpo secundario antimouse/antirabbit así como el complejo estreptavidina/peroxidasa por 30 minutos en cada uno de ellos. La reacción se visualizó con Diaminobencidina (Dako) para posteriormente contrateñirse con hematoxilina de Hills.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en el estudio

Anticuerpo	Marca	Clona	Dilución
Bcl2	Dako	DO-7	1:100
Caspasa 3	Santa cruz	policlonal	1:200
p53	Dako	policlonal	1:300
Bax	Dako	policlonal	1:100
Fas	Santa Cruz	DLI	1:100

La evaluación de la técnica de inmunohistoquímica (inmunorreactividad) constó de dos fases, la primera se realizó por parte de 2 evaluadores con el objetivo de determinar los sitios histológicos positivos a los distintos anticuerpos, para determinar la intensidad de manera semi-cuantitativa se utilizó el software Image Lab 2.0, se tomaron 4 fotografías (40x) por cada caso positivo en los cuales se midió la densidad óptica por imagen calculando la media obtenida por caso. Si la densidad óptica nos arrojaba un valor de 40 o menor el marcaje fue considerado leve, mayor a 40 y hasta 80 moderado y con un valor de 81 o más severo. Se realizó la base de datos con el software SPSS Versión 20, la prueba estadística para evaluar la técnica de IHQ fue X^2 y comparación de medias.

Segunda Fase

11.3 Pacientes de reciente diagnóstico

Fueron incluidos en el estudio 30 pacientes de reciente diagnóstico que acudieron al departamento de dermatología de enero del 2012 a enero del 2014 con características clínica de PA y cuyo diagnóstico fue corroborado por estudio histopatológico así como 2 controles por cada caso.

Cabe mencionar que a todos los pacientes y controles que reunían los criterios de inclusión se les invitó a participar en el estudio con firma de consentimiento y/o asentimiento informado

A los casos y a los controles se le tomó citología en base líquida con el objetivo de realizar la IHQ utilizando los anticuerpos apoptóticos ya mencionados y se les aplicó un cuestionario de factores de riesgo. Se realizó estadística descriptiva, X^2 para variables cualitativas, se probó la normalidad de las variables, se hicieron pruebas paramétricas y no paramétricas así como regresión logística.

11.4 Citología de base líquida

Se pasó un cepillo citológico electrocargado sobre la lesión (casos) o sobre la mucosa de labio inferior (controles) en un par de ocasiones, después el cepillo se depositó en viales que contenían líquido de preservación.

Para la forma manual cada vial se mezcló vigorosamente en el vortex para suspender las células, se colocó la sustancia encapsuladora y se obtuvo un gradiente de densidad por centrifugación en el cual el sedimento correspondía a células exentas de detritus.

Con la micropipeta se tomaron 20 microlitros y se pusieron dos botones por laminilla, después se colocaron en la estufa por 20 minutos, concluido el tiempo, se dejaron 10 minutos en acetona a 4 grados centígrados para después secarse a

temperatura ambiente. A partir de aquí el proceso de IHQ se realizó de manera habitual (como lo descrito anteriormente).

Para la forma automática se utilizó el aparato thin prep. El aparato dispersa las células, las junta y las transfiere a la laminilla formando una monocapa y logrando una mayor celularidad.

Para corroborar los resultados y darle confiabilidad a los marcadores apoptóticos de IHQ se tomaron 20 citologías de cérvix y 20 de cavidad bucal, la mitad fueron procesados de manera manual y la otra mitad con el Thin Prep, para poder comparar la viabilidad celular a todos ellos se les realizó la citoqueratina AE1-AE3 y se contrastaron los resultados de ambos grupos. **(Anexo 2)**

11.5 Cuestionario de factores de riesgo

Se elaboró un cuestionario de factores de riesgo **(Anexo 3)** formado por 82 items, el cual en una primera instancia se aplicó a 30 pacientes que acudieron a dermatología sin importar el motivo de la consulta, nuestro interés fue validar las preguntas, para que fueran lo suficientemente claras. En base a estos resultados el cuestionario fue modificado y se aplicó a otros 30 pacientes.

La versión final del cuestionario fue aplicada a todos los casos y controles que fueron captados en el estudio.

12 Resultados

Primera Fase

12.1 Técnica de TUNEL

Se seleccionaron 50 bloques con diagnóstico de PA y/o Queilitis del Prurigo actínico diagnosticados entre 1994 al 2013 que contaban con material biológico suficiente para ser incluidos en el estudio y 20 controles correspondientes a tejido sin alteración histopatológica. Del total de los casos incluidos 22 (44%) correspondieron al sexo femenino y 28 (56%) al masculino, con respecto a la edad

la media fue de 29.58 (± 12.30), la muestra del paciente más joven correspondía a sujeto de 9 años y la del de mayor edad 55. De las 50 muestras procesadas 30 correspondieron a queilitis del PA y 20 a PA en piel.

Al realizar la valoración histopatológica con HyE se encontró que en los 30 casos de queilitis del PA y en 18/20 (90%) de PA en piel estaba presente un infiltrado inflamatorio perivascular, los folículos linfoides se observaron en 20/30 (66.7%) de las queilitis ($X^2=22.22$ $p=.001$) y las formaciones linfocitarias de tipo nodular en 5/20 (25%) de PA localizado en piel. Al realizar la técnica de TUNEL en ambos grupos obtuvimos los siguientes resultados: **Tabla 3 y 4.**

Tabla 3. Expresión de la técnica TUNEL en casos y controles.

Positividad a la técnica de TUNEL en queilitis del prurigo actínico				
Localización	Casos (con prurigo) n=30	Controles (sin prurigo) n=20	X²	P
Infiltrado perivascular	30/30	1/20	45.96	.001
Folículos linfoides	20/30	0/20	22.22	.001
Estrato basal	24/30	2/20	23.55	.001
Estrato granular	23/30	5/20	13.00	.001

Fuente Directa

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los sitios histológicos característicos de la queilitis de PA.

Tabla 4. Expresión de la técnica TUNEL en casos y controles.

Positividad a la técnica de TUNEL en piel del prurigo actínico				
Localización	Casos (con prurigo) n=20	Controles (sin prurigo) n=20	X²	P
Infiltrado perivascular	18/20	1/20	28.97	.001
Infiltrado linfocitario de tipo nodular	5/20	0/20	5.71	.017
Estrato basal	16/20	2/20	19.97	.001
Estrato granular	19/30	5/20	20.41	.001

Fuente Directa

Hubo positividad estadísticamente significativa a la técnica de TUNEL en el estrato basal así como en el infiltrado linfocitario de tipo nodular y perivascular lo que indica la presencia de apoptosis en elementos celulares del tejido conjuntivo y de la epidermis.

Al analizar la expresión de los casos en los distintos sitios histológicos encontramos positividad en estrato basal en 24/30 (80%) de las queilitis y en 16/20 (80%) de las lesiones en piel, en los 10 casos restantes de ambos grupos no hubo expresión en el estrato basal. El marcaje en el estrato granular (Zona de Costra) fue positiva en el labio en 23 casos (76%) y en 19 (95%) de piel **Imagen 13 a, b, c, d.**; en el infiltrado perivascular tanto de labio como de piel fue de 26 (86%) y 14 (70%) respectivamente **Imagen 14 a y b.**

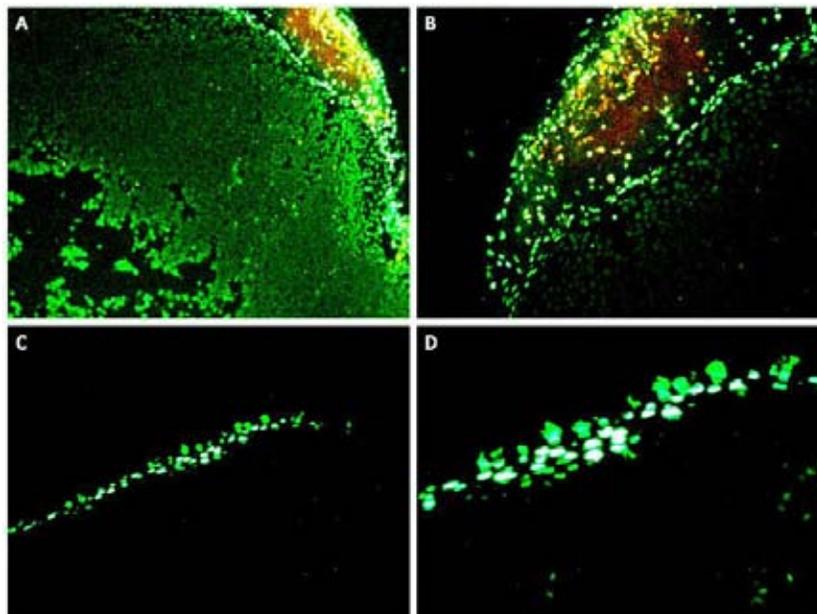


Imagen 13; Técnica de TUNEL, A y B 10x Positividad en estrato granular y corneo (zona de costra), C 10x y D 40x Captación en estrato basal tanto en queilitis del PA como PA en piel.

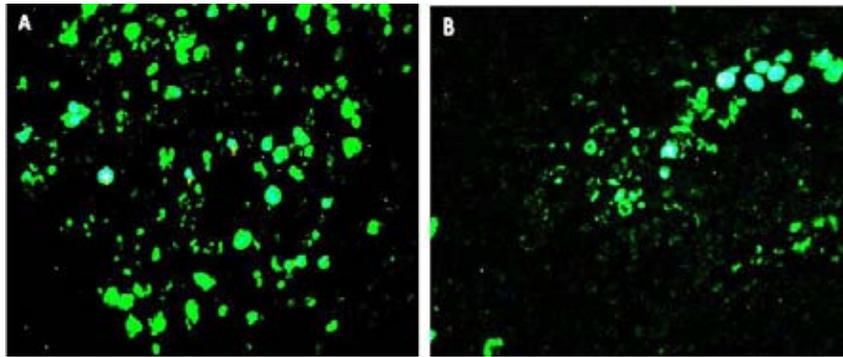


Imagen 14; Técnica de TUNEL A y B 40x, Infiltrado perivascular difuso en apoptosis.

Los folículos linfoides patognomónicos de la queilitis del PA fueron marcados en 13/20 (43.3%) $X^2=11.712$ $p=.001$ y las formaciones linfocitarias de tipo nodular característica histopatológica del PA en piel tuvieron expresión nuclear en 5/20 (25%) $X^2=8.333$, $p=.004$. **Imagen 15 a, b, c, d.**

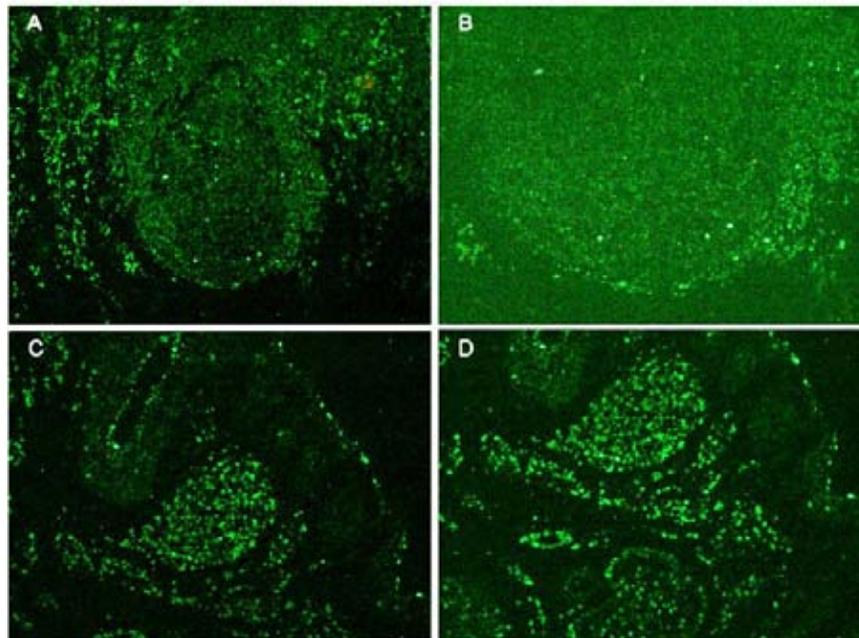


Imagen 15; Técnica de TUNEL A 10x, B 20x + en Folículos linfoides en queilitis del PA y en infiltrado inflamatorio adyacente, en los folículos la positividad fue hasta del 10% de los linfocitos que formaban el folículo contrario a las formaciones nodulares de PA de piel C y D 10x en donde los linfocitos del nódulo fueron positivos en el 90%.

12.2 Técnica de inmunohistoquímica.

Para esta fase se contaron con 64 casos que reunieron los criterios de inclusión establecidos en el estudio. En la **tabla 5** mostramos la positividad con cada uno de los anticuerpos en casos y controles y en la **tabla 6** la expresión de los marcadores en lesiones de labio y de piel.

Tabla 5. Inmunopositividad de los anticuerpos en casos de PA y tejido sin PA

Positividad de los anticuerpos en casos y controles				
Anticuerpo	Casos (con prurigo) N=64	Controles (sin prurigo) N=64	X²	P
Bcl-2	36/64	10/64	22.94	.001
p53	48/64	2/64	69.44	.001
Caspasa 3	45/64	0/64	69.39	.001
Bax	1/64	10/64	8.05	.005
Fas	0/64		0/64	

Fuente Directa

Encontramos diferencias significativas con los anticuerpos bcl-2, p53 y Caspasa 3 lo cual nos indica que la vía apoptótica implicada es la intrínseca que es desencadenada por factores externos.

Tabla 6. Expresión de los distintos anticuerpos apoptóticos en la queilitis del PA y en PA de piel.

Anticuerpo	Queilitis del PA		PA en piel	
	Casos positivos	%	Casos positivos	%
Bcl2	27/40	67.5	13/24	54.16
P53	30/40	75.0	18/24	75.00
Caspasa 3	27/40	67.5	18/24	75.00
Bax	1/40	2.50	0/24	0
Fas	0/40	0	0/24	0

Fuente Directa

No encontramos diferencias en el marcaje de los anticuerpos en queilitis del PA y/o lesiones localizadas en piel en ambos casos la vía apoptótica implicada fue la intrínseca.

Expresión de Bcl2

En las **tablas 7 y 8** así como en la **imagen 16** presentamos los resultados a la reacción de Bcl-2 en los distintos sitios histológicos en la queilitis y en lesiones de piel respectivamente.

Tabla 7. Reacción de Bcl-2 en queilitis del PA

Bcl-2				
Localización	Positivo	Negativo	X²	P
Infiltrado perivascular	16/18	7/15	13.195	.001
Periferia del folículo linfoide	16/18	7/15	13.195	.001
Linfocitos dispersos	9/10	14/16	5.763	.016
Queratinocitos apoptóticos	7/7	16/17	6.271	.012
Melanocitos	7/7	16/17	6.271	0.12
Eosinófilos	6/6	17/17	5.217	.022
Macrófagos	4/4	17/19	3.285	.070
Parte central del folículo linfoide	1/1	16/22	.048	.826

Fuente Directa

En las queilitis del PA el anticuerpo bcl-2 se expresó de manera estadísticamente significativa en la membrana de los linfocitos periféricos de los folículos linfoides (patognomónicos del padecimiento) y en los linfocitos dispersos lo cual indica un intento de inhibir la apoptosis en estos elementos celulares. La positividad en los queratinocitos apoptóticos y en los melanocitos es considerada como control interno.

Tabla 8. Reacción de Bcl-2 en PA localizado en piel

Bcl-2				
Localización	Positivo	Negativo	X ²	P
Linfocitos dispersos	9/9	4/11	12.185	.001
Melanocitos	8/8	5/11	10.154	.001
Queratinocitos apoptóticos	6/6	7/11	6.769	.009
Infiltrado perivascular	6/6	7/11	6.769	.009
Eosinófilos	4/4	9/11	4.02	.044
Macrófagos	3/3	10/11	2.901	.098

Fuente Directa

El anticuerpo bcl-2 se expresó de manera significativa en linfocitos perivasculariales y dispersos así como en eosinófilos. La expresión en melanocitos es considerada como control interno.

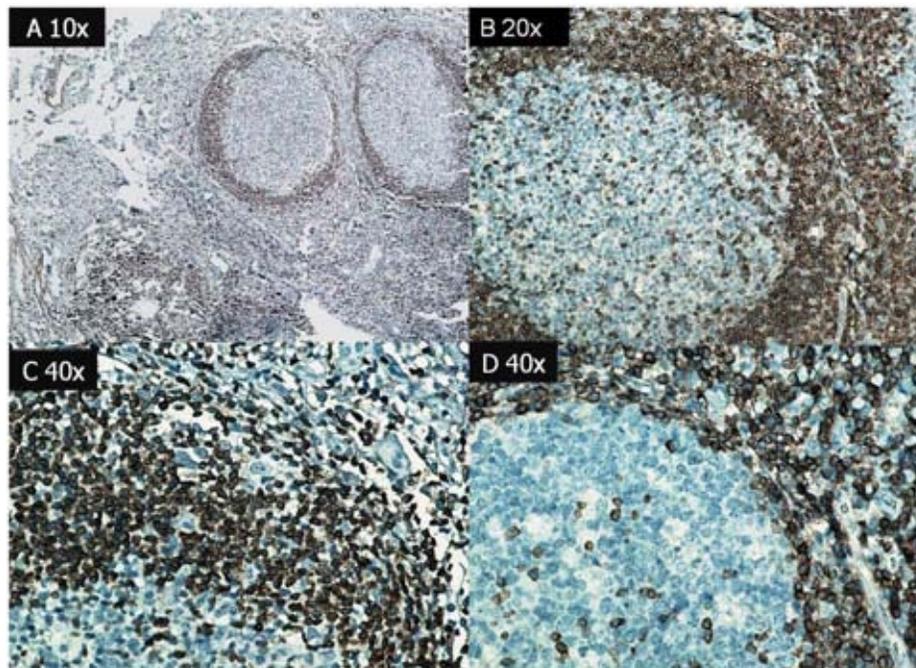


Imagen 16; A, B, C y D. Reacción membranal de Bcl-2 en linfocitos periféricos del folículo linfoide en queilitis del PA.

Expresión de p53

Positividad al anticuerpo en los distintos sitios histopatológicos en queilitis de PA como en PA en piel. (Tabla 9 y 10, Imagen 17)

Tabla 9. Positividad de p53 en queilitis del PA

P53				
Localización	Positivo	Negativo	X²	P
Estrato basal	28/28	2/10	31.111	.001
Linfocitos perivasculares	28/28	2/10	31.111	.001
Queratinocitos apoptóticos	1/1	10/29	.342	.559
Melanocitos	1/1	10/29	.342	.559

Fuente Directa

El marcador p53 se expresó de manera significativa en el estrato basal y en los linfocitos perivasculares lo cual indica actividad apoptótica en componentes celulares del epitelio y del tejido conjuntivo.

Tabla 10. Positividad de p53 en PA localizado en piel

P53				
Localización	Positivo	Negativo	X²	P
Estrato basal	18/18	0/6	24.00	.001
Linfocitos perivasculares	1/1	6/17	.348	.555

Fuente Directa

En lesiones localizadas en piel, el anticuerpo p53 fue positivo de manera significativa en el estrato basal, indicador de apoptosis en el epitelio

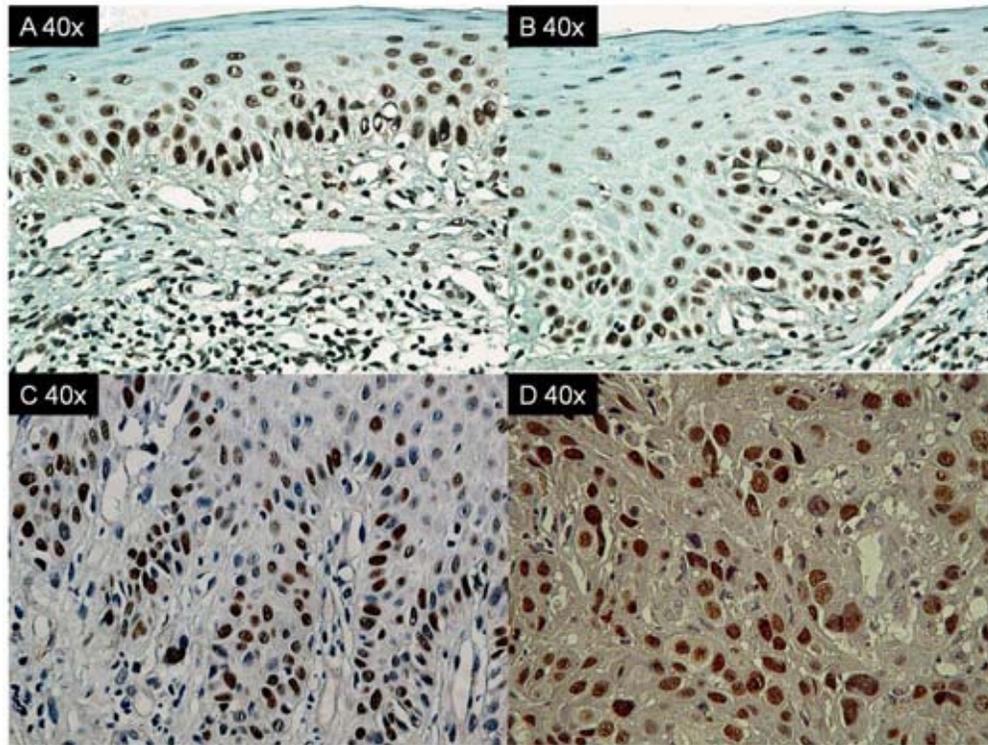


Imagen 17; **A y B** Positividad nuclear en estrato basal del anticuerpo p53 en queilitis del PA, **C** Positividad nuclear en estrato basal de PA en piel, **D** carcinoma de células escamosas utilizado como testigo positivo.

Expresión de Caspasa 3. Inmunomarcaje del anticuerpo Caspasa 3 en queilitis de PA y en lesiones de PA en piel (**Tabla 11 y 12, Imagen 18**)

Tabla 11. Inmunomarcaje de Caspasa 3 en queilitis del PA

Caspasa 3				
Localización	Positivo	Negativo	X ²	P
Estrato basal	14/14	6/13	10.370	.001
Eosinófilos	14/14	6/13	10.370	.001
Parte central del folículo linfoide	12/12	13/15	8.254	.004
Estrato espinoso	11/11	13/16	7.305	.007
Estrato granular	10/10	13/17	6.420	.011
Infiltrado perivascular	9/9	13/18	5.591	.018
Macrófagos	9/9	13/18	5.591	.018

Linfocitos dispersos	9/9	13/18	5.591	.018
Queratinocitos apoptóticos	6/6	13/21	3.339	.065
Melanocitos	6/6	13/21	3.339	.065

Fuente Directa

En las queilitis la Caspasa 3 fue estadísticamente significativa en los estratos epiteliales así como en la parte central del folículo linfoide lo cual sugiere que la apoptosis comienza en el centro del folículo

Tabla 12. Inmunomarcaje de Caspasa 3 en PA localizado en piel

Caspasa 3				
Localización	Positivo	Negativo	X²	P
Estrato basal	13/13	5/6	9.455	.002
Estrato espinoso	13/13	5/6	9.455	.002
Estrato granular	11/11	6/7	6.769	.009
Infiltrado perivascular	9/9	6/9	4.800	.028
Macrófagos	7/7	6/11	3.294	.070
Eosinófilos	6/6	6/12	2.667	.102
Estrato corneo	4/4	6/14	1.600	.206
Macrófagos	4/4	16/14	1.600	.206
Infiltrado linfocitario nodular	2/2	6/16	.727	.394

Fuente Directa

En lesiones localizadas en piel el anticuerpo Caspasa 3 se expresó de manera significativa en los estratos epiteliales y en el infiltrado linfocitario disperso lo cual indica que el infiltrado inflamatorio participa activamente en el proceso de apoptosis.

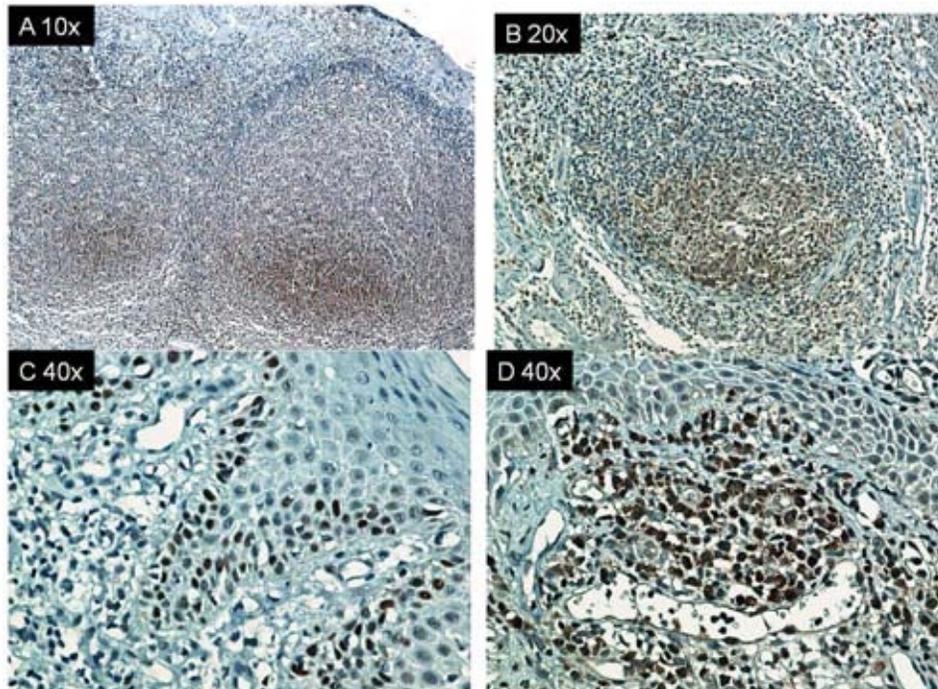


Imagen 18; **A** y **B** Inmunomarcaje citoplasmático en linfocitos centrales del folículo linfoide en queilitis del PA, **C** Marcaje nuclear en estrato basal de lesiones en piel, **D** infiltrado linfocitario perivascular, cabe mencionar que cuando la positividad fue en el epitelio la expresión fue nuclear y cuando se observó en el tejido conjuntivo fue captación citoplasmática.

Expresión de Bax y Fas

En el caso de Bax tuvimos captación al anticuerpo en un solo caso de queilitis de PA y con Fas todos los casos fueron negativos tanto de queilitis como de piel. **(Imagen 19 y 20)**

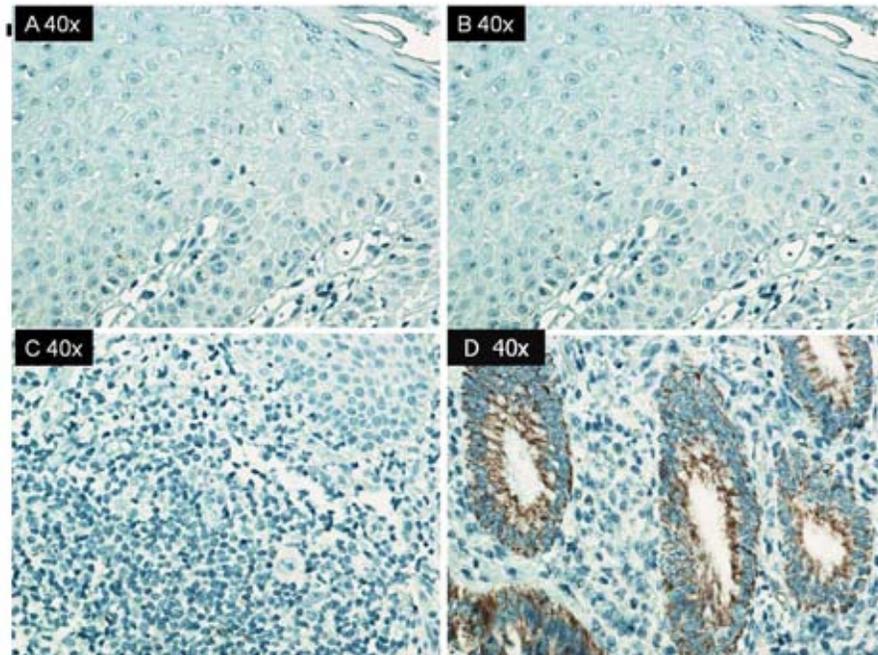


Imagen 19; A, B y C Casos de queilitis y lesiones en piel negativos al anticuerpo Bax, **D** Colon positivo al anticuerpo utilizado como control.

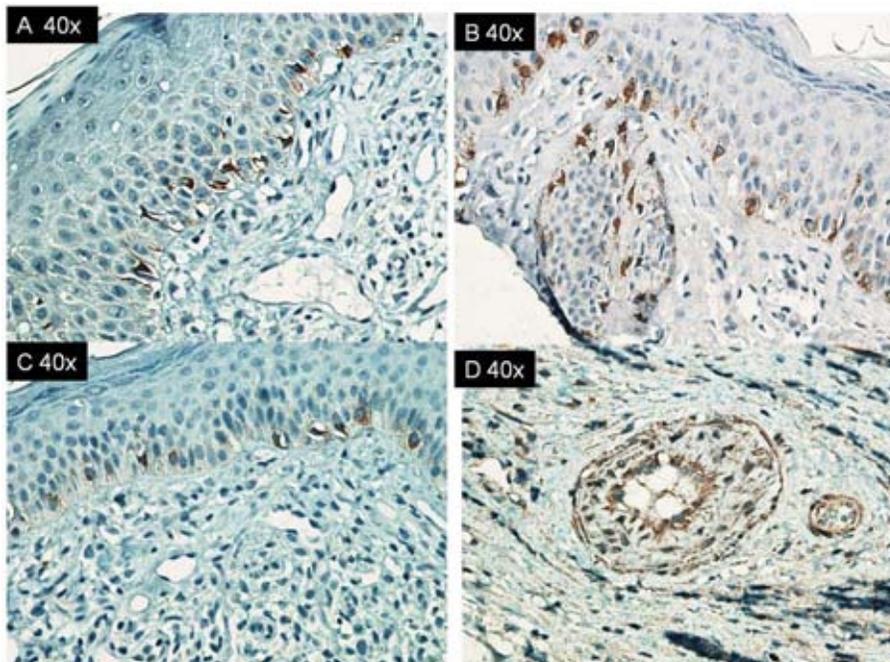


Imagen 20; A, B y C controles internos que corresponden a melanocitos y queratinocitos apoptóticos en lesiones de labio y piel, **D** control + de colon

Tabla 13. Densidad óptica de los distintos anticuerpos apoptóticos en queilitis del PA y en lesiones localizadas en piel.

Caso	Queilitis de PA			PA en piel		
	Caspasa 3	BCL-2	P53	Caspasa 3	BCL-2	P53
1	32.83	132.58	43.59	20.14	48.45	23.68
2	43.39	147.12	47.47	106.79	122.06	26.54
3	53.00	56.47	21.83	44.35	47.25	53.91
4	75.47	53.02	10.96	22.75	109.12	6.84
5	138.17	236.92	12.82	44.81	50.39	11.31
6	165.64	154.57	24.33	47.68	207.31	107.41
7	45.54	238.23	47.96	129.73	25.25	72.46
8	51.47	195.21	22.41	15.27	47.98	17.50
9	50.71	50.53	85.23	25.89	154.53	9.12
10	16.40	143.82	50.39	23.97	158.28	20.83
11	130.43	186.58	53.23	49.77	50.69	50.69
12	45.62	215.84	21.40	22.79	67.13	22.16
13	15.40	23.21	78.85	16.06	145.39	17.66
14	187.52	168.28	21.21	118.81	0	22.58
15	22.03	78.77	54.86	22.49	0	73.40
16	10.30	78.22	11.26	206.56	0	18.68
17	155.29	155.41	11.78	75.39	0	22.78
18	129.35	74.87	20.44	74.98	0	11.24
19	48.08	157.63	37.67	0	0	0
20	121.04	134.82	22.80	0	0	0
21	15.03	226.67	24.32	0	0	0
22	216.10	174.69	96.58	0	0	0
23	26.35	95.63	24.47	0	0	0
24	18.25	94.23	33.78	0	0	0
25	78.67	90.29	25.42	0	0	0
26	47.66	85.65	20.32	0	0	0
27	58.69	52.23	88.52	0	0	0
28	0	0	97.43	0	0	0
29	0	0	39.52	0	0	0
30	0	0	10.64	0	0	0

La media de expresión de las queilitis para Caspasa 3, bcl-2 y p 53 fue 66.61, 116.71 y 38.71 respectivamente y para lesiones en piel 59.34, 68.54 y 32.71, no se encontraron diferencias significativas en la comparación de medias.

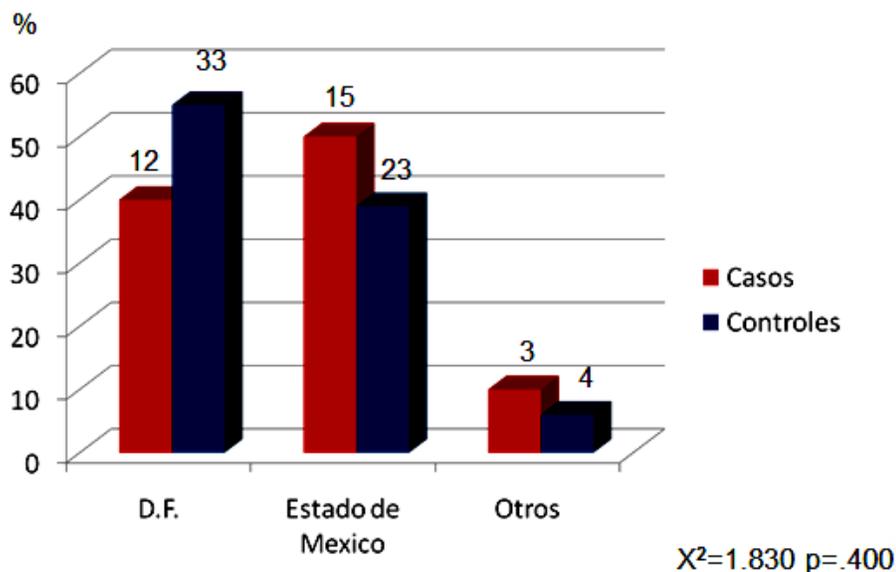
12.3 Segunda Fase.

Características de los casos y los controles

En este estudio incluimos 30 pacientes de reciente diagnóstico; de los cuales el 66.7%, 20 correspondieron al sexo femenino y 33.3%, 10 al masculino. El paciente más joven tenía 7 años y el de mayor edad 71, con una media de 30.87 años.

Incluimos a dos controles por cada caso, 70%, 42 correspondieron a mujeres y 30%, 18 a hombres. El sujeto control más joven tenía 9 años y el de mayor edad 65. La media de edad para este grupo fué de 38.22 años. En la **Grafica 1** se observa el lugar de origen del total de la muestra correspondiente a la segunda fase.

Grafica 1. Distribución de casos y controles según lugar de origen



Fuente Directa

La población que acude al hospital es en su mayoría del D.F. y en zonas conurbadas en el Estado de México en donde las condiciones de vida son similares.

En la **tabla 14** se presenta información que nos ayuda a conocer la población incluida en este estudio

Tabla 14. Distribución de la edad, años vividos en ese lugar y desde hace cuantos años se dedica a su actividad actual (variables estratificadas)

Grupos de edad				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
7-25 años	13	43.3	9	15
26-46	12	40	32	53.3
47 y más	5	16.7	19	31.7
	30	100	60	100

X^2 8.98 p=.011

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al estratificar la edad, el 43.3% de los pacientes con el padecimiento tenían entre 7-25 años, en el 53.3% de los controles, la edad fue 26-46 años.

Años vividos en ese lugar				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
3-16 años	11	36.7	11	18.3
17-36	12	40	33	55
37 y más	7	23.3	16	26.7
	30	100	60	100

X^2 3.73 p=.154

No se encontraron diferencias significativas al estratificar los años vividos en ese lugar, la respuesta de los casos podía ir desde 3 años de radicar en su domicilio actual hasta 36 años

Desde hace cuantos años se dedica a su actividad actual				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
1-5 años	18	60	16	26.7
6-19	10	33.3	22	36.7
20 y más	2	6.7	22	36.7
	30	100	60	100

X^2 12.69 p=.002

El 60% de los casos tenía de 1 a 5 años de dedicarse a la misma actividad, contrario a los controles en donde el 26.7% tenían de 1-5 años, el 36.7% de 6-19 años y 20 años y más. Las diferencias encontradas son significativas, resulta importante mencionar que en el cuestionario de factores de riesgo se preguntó acerca de las ocupaciones anteriores

Fuente Directa

En la **tabla 15** se presenta la escolaridad de los casos y controles estratificada

Tabla 15. Distribución de datos relacionados a la escolaridad

Último grado escolar cursado				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
Primaria	12	40	18	30
Carrera técnica/preparatoria	17	56.7	35	58.3
Carrera/posgrado	1	3.3	7	11.7
	30	100	60	100

X^2 2.172 p=.338

No se encontraron diferencias significativas con respecto a la escolaridad, el último grado escolar fue similar en ambos grupos.

¿Usted sabe leer un recado?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	0	0	6	10
Si	30	100	55	91.7
Total	30	100	60	100

X^2 3.214 p=.073

Solo el 8.3% de los controles no sabía escribir un recado, el 100% de los casos podía escribir, no hubo diferencias significativas en ambos grupos

¿Usted sabe escribir un recado?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	0	0	5	8.3
Si	30	100	54	90
Total	30	100	60	100

X^2 .264 p=.104

Los pacientes con prurigo que podían leer un recado también podían escribirlo, 55 controles podían leer un recado pero uno de ellos no era capaz de escribirlo, no hubo diferencias significativas

Fuente Directa

En la **tabla 16** se presenta la exposición a la radiación UV en ambos grupos en estudio

Tabla 16. Distribución de la exposición solar en casos y controles

¿Usted realiza sus actividades laborales al aire libre ?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	10	33.3	43	71.7
Si	20	66.7	17	28.3
Total	30	100	60	100

X^2 .238 p=.626

El 66.7% de los pacientes con la fotodermatosis realizaban sus actividades laborales al aire libre vs el 28.3% de los controles, las diferencias encontradas no son significativas.

¿Antes de su ocupación actual desarrollaba sus actividades al aire libre ?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	10	33.3	47	78.3
Si	20	66.7	13	21.7
Total	30	100	60	100

X^2 1.431 $p=.232$

El 66.7% de los casos tuvieron una ocupación anterior similar a la actual (al aire libre) vs el 21.7% de los controles, al realizar el análisis bivariado los resultados no son significativos.

Años que realizó sus actividades laborales al aire libre				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
0-3 años	26	86.7	53	88.3
Más de 4 años	4	13.3	7	11.7
	30	100	60	100

X^2 .052 $p=.820$

El número de años que los casos realizaron sus actividades laborales al aire libre fueron de 0 a 3 hasta en el 86.7% de los casos, los datos reportados por el grupo control son similares.

¿En sus actividades diarias se expone al sol?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	3	10	23	38.3
Si	27	90	37	61.7
Total	30	100	60	100

X^2 7.816 $p=.005$ RM 5.59 IC 1.52-20.55

El 90% de los casos en sus actividades diarias se expone al sol vs el 61.7% de los controles, los valores son significativos, el sujeto que en sus actividades diarias se expone al sol tiene 4.59 veces mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que el que no se expone.

Días a la semana de exposición solar				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
1 día	5	16.7	24	40
2-6 días	7	23.3	15	25
7 días	18	60	21	35
	30	100	60	100

X^2 6.28 p=.043

Debido a que las ocupaciones laborales son similares en casos y controles no tuvimos diferencias significativas con respecto a los días de exposición solar.

Exposición solar horas por día				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
0-2 horas	15	50	32	53.3
3-5	5	16.7	14	23.3
6 horas y mas	10	33.3	14	23.3
	30	100	60	100

X^2 1.214 p=.545

Pudiéramos pensar que los pacientes con PA se exponen más al sol que los controles, sin embargo no encontramos diferencias, una vez que se les explica la influencia o intervención de la luz UV en el padecimiento buscan protegerse de la radiación solar en la medida de sus posibilidades.

Horas totales de exposición solar por semana				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
0-3 horas	13	43.3	37	61.7
4-20	12	40	15	25
21 y más	5	16.7	8	13.3
	30	100	60	100

X^2 1.214 p=.545

El 43.3% de los pacientes con PA se exponía hasta 3 horas vs el 61.7% de los controles y los que más se exponían al sol en los casos (21 horas y mas) fue el 16.7% vs el 13.3% de los controles, las diferencias encontradas no son significativas.

¿En sus actividades anteriores se exponía al sol?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	17	56.7	39	65
Si	13	43.3	21	35
Total	30	100	60	100

$X^2 .591$ $p=.442$

Las actividades anteriores son similares tanto en los casos como en los controles por lo que no se encontraron diferencias significativas.

Horas por semana que se exponía al sol				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
0-3 horas	10	33.3	36	60
4-20	9	30	15	25
21 y mas	11	36.7	9	15
	30	100	60	100

$X^2 7.195$ $p=.027$

Fuente Directa

En la **tabla 17** se presenta la convivencia con animales domésticos y/o de granja, información obtenida del cuestionario de factores de riesgo.

Tabla 17. Distribución de la exposición con animales domésticos y/o de granja en casos y controles

¿Tiene animales domésticos?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	10	33.3	37	61.7
Si	20	66.7	23	38.3
Total	30	100	60	100

$X^2 6.435$ $p=.011$ $RM 3.21$ $IC 1.28-8.07$

Con respecto a la convivencia con animales domésticos encontramos diferencias significativas en el análisis bivariado, el 66.7% de los pacientes tiene animales domésticos vs el 38.8% de los controles. El sujeto que tiene animales domésticos tiene 2.21 veces mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.

¿En dónde se encuentra la mascota en el día?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
Al exterior del hogar	13	65	12	52.2
Al interior del hogar	7	35	11	47.8
Total	20	100	23	100

$X^2 .723$ $p=.395$

La mascota se encontraba al exterior del hogar en el 65% de los casos y en el 52.2% de los controles sin encontrar diferencias significativas con respecto al sitio en donde permanecía la mascota.

¿En dónde duerme la mascota?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
Al exterior del hogar	13	65	16	69.6
Al interior del hogar	7	35	7	30.4
Total	20	100	23	100

$X^2 .102$ $p=.750$

En el 65% de los casos la mascota dormía al exterior del hogar vs el 69.6% de los controles, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

¿Anteriormente tenía animales domésticos?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	19	63.3	33	55
Si	11	36.7	27	45
Total	30	100	60	100

$X^2 .569$ $p=.451$

El 63.3% de los casos y en el 55% de los controles no habían tenido anteriormente una mascota, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos

¿Lugar de permanencia de la mascota durante el día?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
Al exterior del hogar	7	63.6	21	77.8
Al interior del hogar	4	36.4	6	22.2
Total	11	100	27	100

$X^2 .806$ $p=.369$

Los casos y controles que respondieron que anteriormente habían tenido una mascota afirmaron que el sitio en el que el animal permanecía durante el día era al exterior del hogar 63.6% vs 77.8% respectivamente sin encontrar diferencias significativas.

¿Lugar de permanencia de la mascota durante la noche?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
Al exterior del hogar	7	63.6	20	74.1
Al interior del hogar	4	36.4	7	25.9
Total	11	100	27	100

$X^2 .414$ $p=.520$

Los casos y controles que respondieron que anteriormente habían tenido una mascota informaron que el sitio en el que el animal permanecía durante la noche era al exterior del hogar 63.6% vs 74.1% respectivamente sin encontrar diferencias significativas.

Convivencia con animales de granja				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	18	60	57	95
Si	12	40	3	3
Total	30	100	60	100

$X^2 17.640$ $p=.000$ $RM 12.66$ $IC 3.21-49.93$

El 40% de los casos convivía con animales de granja vs el 3% de los controles, las diferencias encontradas son estadísticamente significativas, el sujeto que convive con animales de granja tiene 11.66 veces mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que el que no presenta este factor de riesgo.

¿Anteriormente tenía animales de granja?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	20	66.7	49	81.7
Si	10	33.33	11	18.3
Total	30	100	60	100

X^2 2.516 p=.113

El 33.33% de los casos y el 18.3% de los controles anteriormente tenían animales de granja, sin embargo estos datos no son estadísticamente significativos.

En la **tabla 18** mostramos la información obtenida relacionada a la exposición al humo de leña

Tabla 18. Distribución del uso de leña en casos y controles

En su casa ¿con que cocinan?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
Gas	17	56.7	50	83.3
Leña	13	43.3	10	16.7
Total	30	100	60	100

X^2 7.47 p=.006 RM 3.82 IC 1.41-10.30

El 43.3% de los casos y el 16.7% de los controles utilizaban la leña para cocinar en su casa, los resultados son estadísticamente significativos, un sujeto que cocina con leña tiene 2.82 veces mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que alguien no expuesto.

Lugar de exposición al humo				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
Al exterior del hogar	12	92.3	8	80
Al interior del hogar	1	7.7	2	2
Total	13	100	10	100

X^2 .755 p=.385

El 92.3% de los casos y el 80% de los controles que se exponían al humo de leña lo hacían al exterior del hogar, sin encontrar diferencias significativas.

¿Usa leña o carbón con otro fin?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	22	73.5	48	80
Si	8	26.5	12	20
Total	30	100	60	100

$X^2 .514$ $p=.473$

El 26.5% de los casos y el 20% de los controles utilizaban la leña y/o carbón con otro fin (para calentarse, por motivos de trabajo y en convivencias familiares), los datos no son estadísticamente significativos

Fuente Directa

En la **tabla 19** se presenta la información que corresponde al humo de tabaco

Tabla 19. Distribución del hábito tabáquico en casos y controles

¿Fuma?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	26	86.7	51	85
Si	4	13.3	9	15
Total	30	100	60	100

$X^2 .045$ $p=.832$

El 13.3% de los casos y el 15% de los controles fumaban, al ser los datos similares no existen diferencias significativas en ambos grupos.

¿Anteriormente fumaba?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	23	76.5	50	83.5
Si	7	23.5	10	16.5
Total	30	100	60	100

$X^2 .580$ $p=.446$

El 23.5 % de los casos y el 16.5% de los controles son exfumadores, si bien existen diferencias estas no son estadísticamente significativas

¿Está usted en contacto con personas que fuman?				
	Casos n=30	%	Control n=60	%
No	19	63.3	40	66.7
Si	11	36.7	20	33.3
Total	30	100	60	100

$X^2 .098$ $p=.754$

Los datos de fumadores pasivos son similares en casos y en controles (36.7% vs 33.3%), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas

Fuente Directa

Se probó la normalidad de las variables

En la **tabla 20** se muestran los resultados de las pruebas no paramétricas

Tabla 20. Resultado de la comparación entre casos y controles

Variables	Caso/Control	Rango promedio	Media	Mediana	Sig. asintót
¿Desde hace cuantos años se dedica a esta actividad?	Control 60	51.28	17.17	15.00	.003
	Caso 30	33.93	8.37	4.00	
	Total 90				
Días a la semana que se expone al sol	Control 60	40.46	3.45	3.50	.006
	Caso 30	55.58	5.20	7.00	
	Total 90				
Número de horas que se expone al sol al día en sus actividades	Control 60	44.68	3.40	2.00	.657
	Caso 30	47.15	4.60	3.00	
	Total 90				
Días a la semana que se exponía al sol	Control 60	43.98	1.95	.00	.367
	Caso 30	48.55	2.43	.00	
	Total 90				
Número de horas que se exponía al sol al día en sus act. anteriores	Control 60	43.95	1.52	.00	.361
	Caso 30	48.60	2.03	.00	
	Total 90				
Horas por semana que se exponía al sol	Control 60	44.04	8.10	.00	.390
	Caso 30	48.42	10.60	.00	
	Total 90				
Número de horas diarias en las que desarrolla otras actividades al aire libre	Control 60	46.23	.75	.00	.357
	Caso 30	42.63	.40	.00	
	Total 90				
Tiempo total de horas a la semana de exposición	Control 60	43.09	9.38	2.00	.177
	Caso 30	50.32	11.57	4.50	

solar	Total	90				
¿Desde hace cuántos años tiene animales domésticos?	Control	60	42.23	2.93	.00	.069
	Caso	30	52.05	3.50	1.00	
	Total	90				
¿Cuántos días está en contacto con la mascota durante la semana?	Control	60	40.69	2.18	.00	.006
	Caso	30	55.12	4.20	7.00	
	Total	90				
¿Cuántas horas pasa usted en contacto físico con la mascota diariamente?	Control	60	41.28	.60	.00	.045
	Caso	30	52.55	1.20	1.00	
	Total	90				
Días a la semana de contacto con los animales de granja	Control	3	5.33	3.00	1.00	.187
	Caso	12	8.67	5.17	7.00	
	Total	15				
¿Cuántas horas por día está en contacto con los animales?	Control	3	8.17	1.67	1.00	.926
	Caso	12	7.96	2.00	1.00	
	Total	15				
Días a la semana de contacto con los animales de granja	Control	11	11.64	5.27	7.00	.583
	Caso	10	10.30	4.60	6.00	
	Total	21				
¿Cuántos días a la semana está expuesto al humo de leña o carbón?	Control	10	9.15	3.30	1.50	.058
	Caso	13	14.19	5.31	7.00	
	Total	23				
¿Cuántas horas por día?	Control	10	9.15	2.80	3.00	.000
	Caso	13	14.19	1.08	1.00	
	Total	23				
¿Cuántas horas por día está expuesto al humo del tabaco con personas que fuman?	Control	10	9.15	2.20	2.50	.565
	Caso	13	14.19	3.00	1.00	
	Total	23				
¿Cuántas horas por semana está expuesto al humo del tabaco con personas que fuman?	Control	20	17.80	8.55	6.50	.133
	Caso	11	12.73	8.55	2.00	
	Total	31				

*Prueba de Kruskal-Wallis.

Fuente Directa

En las pruebas no paramétricas encontramos diferencias estadísticamente significativas con las variables: ¿Desde hace cuantos años se dedica a esta actividad? $p=.003$, días a la semana de exposición al sol $p=.006$, días en contacto con la mascota en la semana $p=.006$, horas de contacto físico con la mascota x día $p=.045$ y horas por día de exposición al humo de leña y/o carbón $p=.000$.

En la **tabla 21** se presenta el análisis para variables con distribución normal.

Tabla 21. Comparación entre casos de reciente diagnóstico y controles.

Variables	Caso/Control	Media	Mediana	Sig. Asintót
Edad	Control 60	38.22	38.00	.312
	Caso 30			
	Total 90			
Cuántos años ha vivido en ese lugar	Control 60	29.72	30.00	.387
	Caso 30			
	Total 90			
Años que realizó sus actividades laborales al aire libre	Control 13	7.23	9.00	.792
	Caso 10			
	Total 24			
¿Tiempo que convivió con los animales domésticos?	Control 27	13.22	10.00	.188
	Caso 11			
	Total 38			
¿Desde hace cuánto tiempo convivía con animales de granja?	Control 10	8.73	5.00	.133
	Caso 11			
	Total 21			
Desde hace cuánto tiempo usa leña ó carbón con otro fin	Control 12	20.42	23.00	.018
	Caso 8			
	Total 20			
¿Cuántos cigarrillos fuma por día?	Control 9	1.44	1.00	.981
	Caso 4			
	Total 13			
¿Cuántos cigarrillos fuma a la semana?	Control 9	6.22	4.00	.036
	Caso 4			
	Total 13			
¿Cuántos años fumó?	Control 10	7.5	6.00	.981
	Caso 7			
	Total 17			
¿Cuántos cigarrillos fumaba por día?	Control 10	5.40	2.50	.265
	Caso 7			
	Total 17			
¿Cuántos cigarrillos fumaba a la semana?	Control 60	2.78	00	.032
	Caso 30			
	Total 90			
¿Desde hace cuánto tiempo convive con animales de granja?	Control 3	3.67	1.0	.009
	Caso 12			
	Total 15			

Pruebas paramétricas (T)

Fuente Directa

En las pruebas paramétricas encontramos diferencias estadísticamente significativas con las variables: Desde hace cuánto tiempo usa leña o carbón con otro fin $p=.018$, número de cigarrillos que fuma a la semana $p= .036$, cigarrillos que fumaba a la semana $p=.032$, desde hace cuánto tiempo convive con animales de granja $p=.009$.

En la **tabla 22** se presenta el modelo final de la regresión logística.

Tabla 22. Regresión logística múltiple

Variable	RM	Exp (B)		Sig.
		Inferior	Superior	
Edad	.956	.918	.996	.031
Convivencia con animales de granja	15.31	3.00	78.06	.001
Días a la semana de exposición solar	3.81	.990	14.65	.053

VARIABLES EN EL MODELO; edad, convivencia con animales de granja, con que cocinan en su casa, días a la semana de exposición solar y cigarrillos fumados por semana.

Interpretación: Obtuvimos valores significativos con las variables; edad, convivencia con animales de granja y días a la semana de exposición solar, con cada año que aumenta la edad disminuye la probabilidad de enfermarse de PA, con la variable convivencia con animales de granja el riesgo es 14.31 veces más grande y con la variable días a la semana de exposición solar el riesgo es 2.81 veces más grande en sujetos con la exposición vs los no expuestos.

Fuente Directa

Las razones para incluir las variables en el modelo fueron: aquellas que resultaron estadísticamente significativas en las comparaciones bivariadas realizadas previamente. ($p<0.25$), las que se consideraron importantes o influyentes a pesar de no haber resultado estadísticamente significativas pero que podrían modificar o intervenir en nuestros resultados, también aquellas que tuvimos conocimiento de su influencia a través de estudios previos. Se cumplieron los supuestos del modelo de regresión logística.

13. Discusión

Primera Fase

Con la técnica de TUNEL cumplimos uno de los objetivos planteados en el estudio “Determinar la presencia de apoptosis en el PA” lo cual confirma que dentro de la fisiopatología del padecimiento se encuentra implicada una respuesta de hipersensibilidad tipo IV, ya que la apoptosis es el último paso de la respuesta Th1.

La apoptosis es la muerte fisiológica que tiene como finalidad regular el número de células en el organismo y puede iniciar mediante dos vías; una permanentemente activa y otra que se inicia cuando la célula sufre un daño irreparable. Es un fenómeno que comienza en la membrana nuclear con la señalización del daño y se caracteriza por la pérdida de la integridad de esta membrana.^{64,75} La degradación del ADN generalmente está asociada con apoptosis, debido a la actividad de endonucleasas que fragmentan el ADN a nivel internucleosomal, liberando nucleosomas con alrededor de 200 pares de bases.

Se han desarrollado diferentes técnicas que permiten analizar individualmente cada célula, uno de los métodos más utilizados es la detección del ADN de hebra sencilla por medio de una transferasa terminal^{64,65} que adiciona nucleótidos marcados al ADN en los extremos 3´ expresados con la técnica que se denomina TUNEL.⁶⁴ Con esta técnica nosotros encontramos marcaje positivo con inmunofluorescencia en estrato basal, granular, infiltrado perivascular, folículos linfoides y formaciones linfocitarias de tipo nodular lo que nos indica la activación de la apoptosis en el PA en los diferentes niveles de la epidermis y dermis.

Cabe mencionar que en los folículos linfoides la positividad que se presentó fue de manera leve (+) a diferencia del infiltrado linfocitario de tipo nodular (PA en piel) en donde la expresión observada fue elevada (+++) lo que nos indica una mayor actividad apoptótica en lesiones localizadas en piel. En donde si encontramos

positividad severa tanto en lesiones de labio como de piel fue en el estrato basal, en el infiltrado perivascular así como en la zona de la costra, lo que nos habla de la presencia de apoptosis tanto en epitelio (desde el estrato basal hasta granular) así como en tejido conjuntivo principalmente en el infiltrado difuso y perivascular.

Prochazkova y col realizaron un estudio comparativo en tres técnicas utilizadas para detectar apoptosis (TUNEL, Apostain y Laminina B) reportando ventajas en la primera de ellas entre las que se encuentran su versatilidad que permite la comparación de material fijado in vivo, ya sea por citometría de flujo o bien en tejidos,⁷⁶ en nuestro caso realizamos la técnica en tejidos fijados en formol para de esa manera utilizar mayor número de muestras. Otras características que se desean de las técnicas para valorar apoptosis son la estabilidad, tolerancia a las condiciones cambiantes (pre- tratamiento) y la capacidad de evitar falsos positivos o falsos negativos. Para evitarlos estandarizamos la técnica de manera previa utilizando controles positivos y negativos.

La degradación de la proteína de andamiaje del ADN se produce en la primera parte del proceso de apoptosis, mientras que la fragmentación del ADN y la desintegración de la membrana nuclear son acontecimientos posteriores influenciados por caspasas.⁷⁶ Cualquier técnica para detectar apoptosis se requiere complementar con otra que también sea sensible, razón por la cual además de la técnica de TUNEL recurrimos a la IHQ.

La señalización a través de Fas conduce a apoptosis. La puesta en marcha del proceso requiere la unión de Fas a anticuerpos anti-Fas, a células que expresan FasL o a FasL soluble. A Fas se le unen MORT1 (o FADD -*Fas-associating protein with death domain*) y RIP (*receptor-interacting protein*). Posteriormente al complejo Fas/FADD se le une MACH, produciéndose su activación. MACH es una enzima proteolítica de la familia de las caspasas (caspasa-8) capaz de desencadenar la apoptosis.⁷⁷

Por medio de Fas se inicia la vía extrínseca de la apoptosis, con este anticuerpo nosotros tuvimos positividad en queratinocitos y en melanocitos tanto en lesiones de queilitis como en lesiones de piel, aunque esta expresión es considerada normal (control interno) al ser inducida por el infiltrado inflamatorio. No tuvimos casos positivos a este marcador en los sitios histológicos característicos del PA, por lo que inferimos que esta vía apoptótica no es la que se encuentra activada en la fisiopatología del PA. En los controles (tejido sin alteración histopatológica) no tuvimos casos positivos a él.

Bax es un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, que juega un papel fundamental en la regulación de la señalización intrínseca de la apoptosis.⁷⁸ Se encuentra en el citoplasma de las células en forma inactiva y se activa en estadios tempranos de la apoptosis, se asocia a la mitocondria mediante mecanismos no bien conocidos e induce cambios conformacionales desencadenando la muerte celular programada.⁷⁹ En este trabajo encontramos positividad en un solo caso de queilitis, en el cual se revisó de nuevo la morfología en búsqueda de variantes aunque no se encontró nada que lo diferenciara con el resto de la muestra. Los controles fueron negativos con este anticuerpo.

La proteína Bcl-2 suprime la apoptosis de dos maneras: por acción directa sobre las mitocondrias para impedir el aumento en la permeabilidad y por medio de interacciones con otras proteínas. En algunos otros casos Bcl-2 también puede suprimir la apoptosis fijando proteínas del citosol y secuestrándolas en la membrana mitocondrial.⁸⁰ En la muestra procesada observamos inmunomarcaje de manera significativa con el anticuerpo BCL-2 en las queilitis del PA (periferia del folículo linfoide) lo que significa un intento de suprimir la apoptosis en este sitio, lo cual concuerda con los resultados obtenidos con la técnica de TUNEL, como se describe la positividad en el folículo fue escasa (menor al 10%). Bcl-2 también se expresó de manera importante en las formaciones linfocitarias de tipo nodular de lesiones en piel, cabe recordar que con la técnica de TUNEL la

positividad en ese sitio si fue intensa por lo que podemos sugerir la presencia de apoptosis temprana y tardía.

Otros sitios de captación del anticuerpo en ambas lesiones fueron: infiltrado perivascular, linfocitos dispersos, queratinocitos, melanocitos y macrófagos. Tanto Bax como Bcl-2 deben interpretarse de manera conjunta, cuando Bax se sobre expresa en las células la apoptosis se acelera como respuesta a la señal de muerte, por el contrario cuando bcl2 se sobre expresa la muerte celular es reprimida. En el tejido sin alteración histopatológica se presentó captación al anticuerpo en el estrato basal, sin embargo es considerado control interno ya que una característica de esta zona es la mitosis normal que allí se presenta.

La activación de la Caspasa 3 es de los signos distintivos de la apoptosis y puede ser utilizada para cuantificar la activación y la inhibición de la cascada de muerte celular. Las células son más susceptibles a la estaurosporina (inhibidor de las proteín-cinasas) en una fase específica del ciclo celular lo que conducirá a la muerte celular.⁸¹

Existen dos grandes grupos de caspasas, las iniciadoras y las de ejecución. Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/ activadores. Por otra parte las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. Estas proteasas son las encargadas de los sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis. Entre éstos se encuentran proteínas de señal, de reparación de ADN, estructurales, factores de transcripción, etc.⁸² La Caspasa 3 es una Caspasa de ejecución.

En nuestros tejidos la expresión a la Caspasa 3 fue nuclear en el epitelio y citoplasmática en células encontradas en el conjuntivo, lo que nos indica diferentes etapas de la apoptosis. En los folículos linfoides la expresión se presentó de manera significativa en linfocitos centrales lo que nos indica el inicio

de la cascada de muerte celular. Si analizamos la expresión con cada marcador vemos como en el folículo el TUNEL fue positivo de manera leve en los linfocitos centrales y BCL-2 lo fue en los linfocitos periféricos, por lo que podemos aventurar que la apoptosis se inicia en los linfocitos B, y en los linfocitos T existe inhibición de la muerte celular. En el tejido normal no hubo expresión del anticuerpo lo que confirma que la Caspasa 3 es activada una vez que inicia la maquinaria apoptótica.

La Caspasa 3 fue positiva en linfocitos dispersos y perivasculares y en el epitelio en el estrato basal (sitio en donde es común la mitosis), así como en el estrato espinoso lo cual sugiere la activación de la apoptosis en diferentes sitios histopatológicos.

La proteína p53 es la que ordena la ejecución de la apoptosis en respuesta a los agentes que dañan el ADN. La proteína MDM 2 se liga a un amino terminal de p53 en una relación proteína-proteína que bloquea la actividad de p53. Normalmente esta proteína actúa como factor de transcripción determinando la expresión de un grupo de genes que detienen el ciclo celular o inician el proceso apoptótico.⁸³

En este trabajo se presentó reacción con dicho anticuerpo en el estrato basal de queilitis del PA como en PA en piel. En el tejido normal no encontramos reacción lo cual concuerda con lo reportado en la literatura en donde se menciona que p53 no se identifica en tejido sano. Nosotros comprobamos la presencia de apoptosis en el estrato basal con los anticuerpos Caspasa 3 y p53 lo cual refuerza nuestros resultados de que la apoptosis se encuentra activa.

Por medio de la técnica de inmunohistoquímica corroboramos lo obtenido con la técnica de TUNEL: “La apoptosis se encuentra implicada en el PA” y además pudimos identificar que la vía apoptótica implicada es la intrínseca la cual se activa por factores externos (bacterias, toxinas, radicales libres, antígenos, radiación solar, entre otros). Esto abrió la posibilidad de que además de la radiación solar ya

descrita existen otros factores desencadenantes del padecimiento y que favorecen las manifestaciones clínicas.

Se requieren otros estudios para explorar a mayor profundidad la muerte celular y descartar con mayor solidez la vía extrínseca de la apoptosis por medio de otros marcadores como Caspasa 8, Fas L y TNF alfa.

Segunda Fase

Coincidimos con lo reportado en la literatura acerca de que las mujeres son más afectadas por la enfermedad, en nuestra muestra 20 pacientes (66.7%) correspondieron al sexo femenino y 10 (33.3%) al masculino, la media de edad fue de 30.87 años lo cual coincide con reportes previos⁸⁴ que indican que las primeras manifestaciones del padecimiento se presentan en la infancia, sin embargo los pacientes acuden a la consulta médica varios años después cuando las lesiones son exacerbadas, esta información se obtuvo de la historia clínica y del cuestionario de factores de riesgo al interrogar al paciente acerca de cuando fue la primera vez que desarrolló lesiones.

Es crucial conocer a fondo esta enfermedad debido a que afecta principalmente a la población mestiza (HLA) y el conocimiento generado hasta el momento proviene de grupos de investigación latinoamericanos. El Hospital General Dr. Manuel Gea González en la ciudad de México es el principal centro de referencia en el país. Algunos autores habían propuesto que los pacientes con PA compartían la característica de vivir en zonas con altura mayor a los 1000 metros sobre el nivel del mar,² sin que hasta el momento exista consenso en la literatura, ya que existen reportes de poblaciones con pacientes diagnosticados con PA que habitan en zonas con altura menor e incluso al nivel del mar. La población que atiende el hospital es en su mayoría residente del D.F. y de la periferia del Estado de México en donde las condiciones de vida son muy similares, como por ejemplo el nivel socioeconómico.

Un punto a dilucidar es que el paciente con PA se asolea menos cuando ya tiene la enfermedad y hay otras personas que se asolean más, tienen el genotipo y no presentan la enfermedad, nosotros encontramos diferencias significativas en el análisis bivariado con las variables “exposición al sol en actividades diarias” y “días a la semana de exposición solar,” lo cual se puede explicar si consideramos que la radiación UV específicamente de tipo A inhibe la síntesis de ADN, así como el TNF alfa y las interleucinas 1,6 y 8.

Al hacer la asociación con la parte experimental observamos que nuestra muestra fue negativa al TNF alfa y se determinó que la vía apoptótica implicada es la intrínseca desencadenada precisamente por factores externos como la radiación solar. En la regresión logística encontramos diferencias significativas con la variable “días a la semana de exposición solar,” una limitante de nuestro estudio son los intervalos de confianza tan amplios, esto relacionado al tamaño de la muestra insuficiente.

Vera y cols. en la búsqueda de factores de riesgo asociados al PA realizaron un estudio piloto en el hospital Dr. Manuel Gea González entre los años 1990 y 2006 se observó que los pacientes que eran recientemente diagnosticados y que contaban con el antecedente de exposición al humo de leña tenían 9.5 veces mayor riesgo de presentar la enfermedad, los que convivían con animales domésticos 3.6 veces mayor riesgo y con animales de granja 6.9 veces,¹⁰ por lo que consideramos necesario confirmar esos datos.

Los resultados de este trabajo coinciden con Vera y cols al encontrar diferencias significativas en el análisis bivariado y encontrar que los pacientes expuestos al humo de leña tienen 3.8 veces mayor riesgo de presentar la enfermedad ($p=.006$ IC 1.41-10.30), los que conviven con animales domésticos 3.2 veces mayor riesgo ($p=.011$, IC 95% 1.28-8.07) y con animales de granja 12.66 veces más ($p=.000$, IC 95% 3.21-49.93). En la regresión logística la variable convivencia con animales domésticos se mantuvo significativa ($p=.001$ RM 15.31 IC 95% 3.00-78.05).

Una posible explicación al riesgo de la exposición al humo de leña en los casos con respecto a los controles son los hidrocarburos aromáticos policíclicos que son compuestos orgánicos derivados de la combustión del material orgánico y que son llamados contaminantes prioritarios debido a su amplia distribución en el ambiente y por sus propiedades mutagénicas, carcinogénicas, teratogénicas y causantes de apoptosis.⁸⁵

Martínez y colaboradores en el 2011 mencionaron la capacidad lipofílica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos lo cual facilita su paso a través de las membranas celulares, dicho metabolismo se lleva a cabo en los tejidos del cuerpo en donde se involucran diferentes vías de transformación química principalmente a nivel pulmonar. En este mismo trabajo los autores resaltan la importancia que tiene la contaminación del aire en interiores lo cual se convierte en un riesgo potencial para la salud, ya que en comunidades rurales las personas pasan más del 60% del tiempo al interior del hogar, donde la emisión de hidrocarburos aromáticos policíclicos es constante. La mitad de la población mundial y aproximadamente el 90% de la población rural de los países en desarrollo utilizan biomasa como fuente de energía, el consumo global en América Latina es del 12% y en México aproximadamente el 18% de la población (3 millones 694 mil viviendas) utilizan un estimado diario de 2.1 kg de leña por persona,^{52,86} con estos datos es mandatorio investigar cual es el efecto de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el PA.

Al reportar la convivencia con animales domésticos y/o de granja de manera significativa surgen dos hipótesis; la primera la higiene que pudiese ser deficiente y la segunda la exposición a parásitos. Se requieren estudios en donde se realice trabajo de campo y en los que se pueda valorar con detalle lo anterior para poder tener resultados concluyentes.

El permitirnos haber corroborado la presencia de estos factores de riesgo tendrá aplicación preventiva la cual comenzará desde la concientización de padres con hijos con esos factores de riesgo hasta el apego al tratamiento de casos ya diagnosticados evitando potenciales desencadenantes de la enfermedad.

Otro de los objetivos que nos planteamos en este trabajo fue el utilizar la citología exfoliativa para evaluar los marcadores apoptóticos (Bax, p53, Caspasa 3, Bcl-2 y Fas) como método de diagnóstico indirecto de la enfermedad así como para tener valores comparativos en los controles. Para la estandarización de la técnica tanto de manera manual como para el Thin Prep utilizamos el anticuerpo AE1-AE3.

Las citoqueratinas son filamentos intermedios que forman parte del citoesqueleto de las células epiteliales y éstas comprenden una gran familia de proteínas multigénicas que se encuentran relacionadas. La citoqueratina AE1-AE3 es una mezcla de dos anticuerpos monoclonales y es ampliamente utilizada debido a que identifica la mayoría de las citoqueratinas.⁸⁷

Nosotros utilizamos esta citoqueratina para medir la viabilidad celular en muestras de mucosa bucal. Si bien la viabilidad celular en células del cérvix (utilizadas como control) es altamente positiva mayor al 80%, resulta importante el hallazgo de que la viabilidad celular en muestras de mucosa bucal es menor al 10 %.

Una posible explicación es que debido a las características del epitelio bucal, la mucosa expresa en tejidos citoqueratinas 5 y 14 en células del estrato basal, en encía CK 1 y 10 y en mucosa de revestimiento CK 1.⁸⁸ Sin embargo cabe mencionar que nosotros trabajamos con citología líquida en donde con dicha técnica la muestra obtenida corresponde a células superficiales. Sería importante contrastar los resultados de las citoqueratinas en tejidos y los obtenidos de citología en los distintos sitios de la cavidad bucal.

Coincidimos con Hayama y cols quienes reportaron ventajas de la citología líquida vs la citología convencional⁸⁹ en el inicio del estudio utilizamos la citología

convencional pero ya que la conservación de las células no era la mejor y debido a la gran celularidad que ofrece la técnica líquida todos los casos fueron realizados de esta manera.

Dentro de las limitaciones de este estudio se encuentra el que no obtuvimos resultados positivos con los marcadores apoptóticos en muestras de mucosa bucal obtenidas por citología, así como el tamaño de la muestra insuficiente en la asociación de los factores de riesgo, sin embargo los resultados de los anticuerpos apoptóticos son concluyentes en tejido de PA incluido en parafina y este es el primer estudio que se realiza para identificar la apoptosis en la enfermedad, lo cual aporta conocimiento para entender el PA como una respuesta de hipersensibilidad tipo IV sub tipo a y/o b.

Conclusiones

- Se demostró la presencia de apoptosis en el prurigo actínico.
- Como la apoptosis es la última etapa de la respuesta de hipersensibilidad tipo IV y se han identificado los otros componentes de este tipo de respuesta, sugerimos que el PA tiene una respuesta de hipersensibilidad tipo IV subtipo a-b.
- Confirmamos que además de la radiación UV B y A existen otros factores externos como son la exposición al humo de leña, y la convivencia con animales domésticos y/o de granja que favorecen la presencia de PA.

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el Artículo 21:

I. Los investigadores me han invitado a participar en un proyecto de investigación llamado **“Análisis de la apoptosis y la vía apoptótica en prurigo actínico y su asociación con factores de riesgo”** y se me ha explicado que si me encuentro dentro del grupo de los casos, padezco prurigo actínico (alérgico al sol) y se me invita a participar en este proyecto para el estudio de la enfermedad. En caso de pertenecer al grupo de los controles, únicamente se me propone participar voluntariamente en el proyecto de investigación. El proyecto de investigación es importante ya que hasta el momento son pocos los estudios reportados en la literatura que esclarezcan la etiología de la enfermedad.

II. Se me ha informado que dependiendo al grupo al que pertenezca (**casos**) se tomará una muestra mediante un raspado con un cepillo sobre la lesión sin ningún riesgo y se me aplicará el cuestionario de factores de riesgo. Además de no contar con diagnóstico corroborado por estudio histopatológico se tomará biopsia del sitio de la lesión. Si pertenezco a los (**controles**) se tomará la muestra realizando un raspado con un cepillo sobre el labio inferior sin que esto tenga alguna molestia ni riesgo y se me aplicará un cuestionario de factores de riesgo. Se me ha comentado que puede ser necesaria la toma de otra muestra en caso de que el estudio así lo requiera.

III. Se me explicó que no tendré que pagar nada por el estudio y en caso de no aceptar participar mi atención en el servicio del hospital no se verá afectada.

IV. Se me ha comentado que los resultados de este estudio ayudarán a ampliar el conocimiento de la fisiopatología y por lo tanto el comportamiento biológico de ésta enfermedad.

V. Se me ha asegurado que se me responderá a cualquier pregunta y aclarará cualquier duda acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con el estudio y mi participación.

VI. Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad.

Con fecha ____ de _____ del 201__ habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, acepto participar en el estudio titulado:

Análisis de la apoptosis y la vía apoptótica en prurigo actínico y su asociación con factores de riesgo.

Nombre y firma del paciente o Tutor

Dirección:

Teléfono:

Nombre, y firma del testigo 1

Dirección:

Teléfono:

Nombre, y firma del testigo 2

Dirección:

Teléfono:

Investigador Responsable:

Dra. Elisa Vega Memije.

Firma _____
dra_elisa_vega@yahoo.com.mx

Investigador Principal:

Juan Carlos Cuevas González.

Firma _____
cuevas_gonzalez@hotmail.com

Investigadoras Asociadas

Dra. Alma Angélica Rodríguez Carreón.

Firma _____
alanroca80@hotmail.com

Erika Rodríguez Lobato.

Firma _____

lobatoe_24@hotmail.com

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación y el otro en poder del investigador.

Para preguntas o comentarios comunicarse con el Dr. Octavio Sierra Martínez, presidente de las Comisiones de Ética y de Investigación al (01 55) 4000-3050.

ANEXO 2

Estandarización de la técnica de citología en base líquida y realización de la IHQ.

En las **tablas 23 y 24** se muestran los resultados de la estandarización de la citología en base líquida realizada de manera manual así como con el aparato Thin Prep en muestras de cérvix y de mucosa bucal

Viabilidad celular en muestras de cérvix.

Expresión de AE1-AE3 en citología de base líquida de cérvix realizada por ambas técnicas				
	Positivas	Negativas	Expresión en cantidad	Expresión en intensidad
Técnica manual (n=30)	30	0	++	+++
Thin Prep n= (5)	5	0	++	+++

Fuente Directa

No se encontraron diferencias (en la expresión de la citoqueratina en cantidad y en intensidad) en la técnica de citología líquida cuando se realizó de manera manual y con el aparato Thin Prep.

Viabilidad celular en muestras de mucosa bucal

Expresión de AE1-AE3 en citología de base líquida en muestras de mucosa bucal procesadas de forma manual y automatizada				
	Positivas	Negativas	Expresión en cantidad	Expresión en intensidad
Técnica manual (n=30)	2	28	+	+
Thin Prep n= (5)	1	4	+	+

Fuente Directa

En citología de base líquida en mucosa bucal los resultados fueron similares de manera automatizada y de manera manual, lo cual corrobora que la técnica de inmunohistoquímica está correctamente realizada y la negatividad de los marcadores apoptóticos es real.

No obtuvimos marcaje al realizar la inmunohistoquímica con los marcadores apoptóticos (Fas, Bax, bcl-2, p53 y Caspasa 3) en las citologías de base líquida tomadas del sitio de la lesión (casos) y de mucosa labial sana (controles)

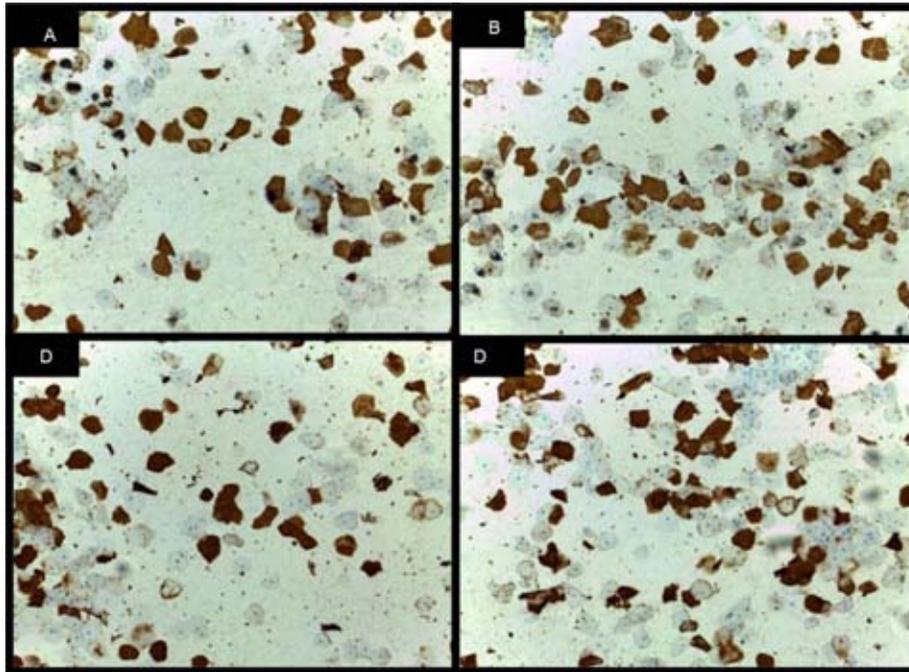


Imagen 20; A, B, C y D 10X Positividad al anticuerpo AE1-AE3 en citología de base líquida de cérvix procesada de manera manual.

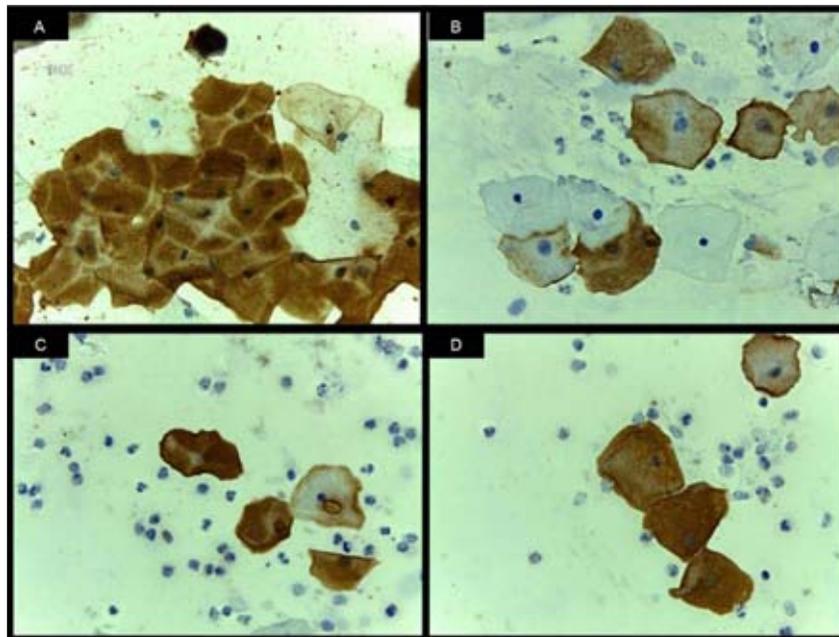


Imagen 21; A, B, C y D 40X Captación del anticuerpo AE1-AE3 en citología de base líquida con muestra de cérvix realizada de forma automatizada con el aparato Thin Prep.

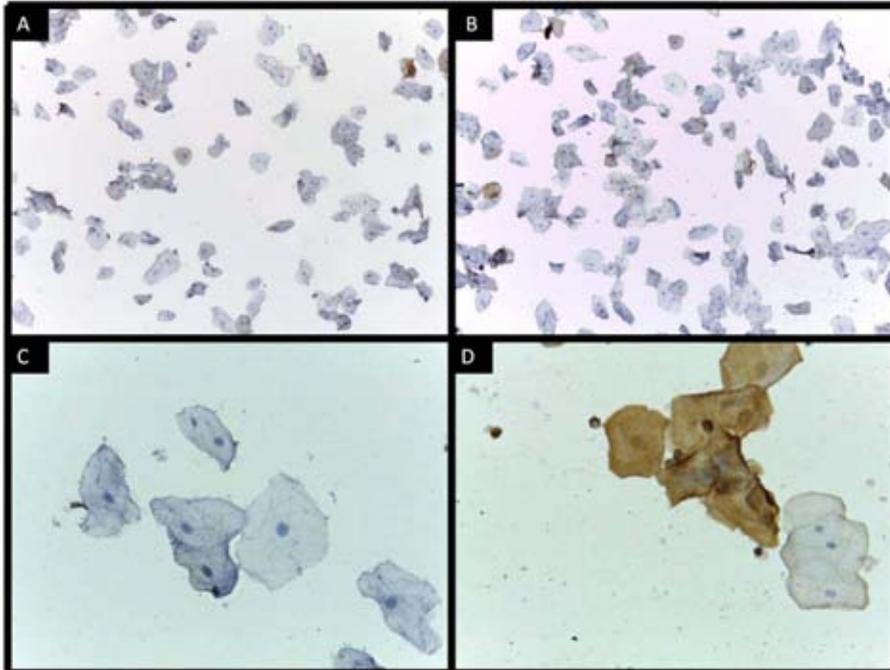


Imagen 22; AE1-AE3 A y B 10x Escasa reacción al anticuerpo en células de mucosa bucal realizadas por citología en base líquida con el Thin Prep, **C y D 40x**, positividad citoplasmática en células de mucosa bucal tomadas por citología de base líquida y de manera manual.

ANEXO 3



Buenos (días /tardes) la siguiente encuesta nos permitirá conocer e investigar sobre los factores de riesgo específicos del prurigo actínico. Lo que se verá reflejado en una mejor atención para el paciente.

Cuestionario	
1	Número de identificación / /
2	Número de expediente / / /
3	Fecha: / / / / / / / / / / / / día mes año
4	_____ Nombre apellido paterno apellido materno
5	Sexo 0=Masculino 1=femenino / /
6	Edad / / / años
7	Domicilio: _____ Calle número, Colonia, Delegación o Municipio CP _____ Estado
8	Lugar de origen _____
9	Cuantos años ha vivido en ese lugar / / / años
10	Telefono / / / / / / / / / / / /
11	¿Usted padece prurigo actínico? / / 0=No, 1= Sí (Si contesta NO pasar a la pregunta 13)
12	¿Hace cuantos años/meses se le diagnosticó PA? / / / / / / Años meses
13	¿Tiene familiares con PA? / / 0=No, 1= Sí, 2=No sabe

14	En caso de responder Sí 0= Indirectos, 1 =Padres, 2= Hermanos 3= Abuelos	/ _ /
15	¿Cuál es el último año que pasó (aprobó) en la escuela? 0=No estudió (pasar pregunta 16 y 17) 1=No terminó la primaria (pasar pregunta 16 y 17) 2=Terminó la primaria 3=Terminó la secundaria 4=No terminó la secundaria 5=Terminó la preparatoria vocacional o bachillerato 6=Terminó carrera técnica 7=No terminó carrera técnica 8=Terminó la carrera Superior o Profesional 9=No terminó la carrera superior o profesional 10=Posgrado 88=No sabe, 99=No responde	/ _ /
16	¿Usted sabe escribir un recado? 0=No 1= Si	/ _ /
17	¿Usted sabe leer un recado? 0=No 1= Si	/ _ /
18	Actualmente a que se dedica 1= Estudia 2=Trabaja ¿en qué? _____ 3=Estudia y trabaja _____ 4=Se dedica al hogar 5= Otro ¿Cual? _____	/ _ /
19	¿Desde hace cuantos años se dedica a esta actividad?	/ _ /
20	¿Desarrolla sus actividades laborares al aire libre? 0= No 1= Si	/ _ /
21	¿Antes de su ocupación actual, tenía otra actividad que realizara al aire libre? (Si contesta NO pasar a la pregunta 24) 0= No 1= Si	/ _ /
22	¿Qué actividad realizaba? _____	
23	¿Cuantos años/meses se dedico a eso?	/ _ / / _ / Años /Meses
24	¿Usted en sus actividades diarias se expone al sol? 0=No, 1= Si (Si contesta NO pasar a la pregunta 28)	/ _ /
25	¿Cuantos días a la semana se expone al sol?	/ _ / días
26	Número de horas que se expone al sol diariamente en sus actividades	/ _ / / horas
27	¿De qué hora a qué hora se expone al sol?	De las / _ / a las / _ /

28	En sus actividades anteriores usted se exponía al sol 0= No 1= Si (Si contesta NO pasar a la pregunta 33)	/_/_
29	¿Cuántos días a la semana se exponía al sol?	/_/_ días
30	Número de horas que se exponía al sol diariamente en sus actividades anteriores	/_/_/_ Horas
31	¿De qué hora a qué hora se exponía al sol?	De las /_/_/ a las /_/_/
32	Considerando el tiempo de trabajo y las otras actividades que realiza al aire libre, ¿Cuántas horas se exponía al sol a la semana?	/_/_/_ Horas
33	¿Desarrolla alguna otra actividad como actividades deportivas, convivencias u otras al aire libre? 0= No, 1= Si (Si responde NO, pasar a la pregunta 37)	/_/_
34	¿Cuántos días a la semana?	/_/_ días
35	Número de horas al día en las que desarrolla estas otras actividades al aire libre	/_/_/_ Horas
36	Considerando el tiempo de trabajo y las otras actividades que realiza al aire libre, ¿Cuántas horas se expone al sol a la semana?	/_/_/_ Horas
37	¿Tiene animales domésticos? 0= No, 1 = Si (Si responde NO pasar a la pregunta 44)	/_/_
38	¿Desde hace cuanto tiempo convive con los animales domésticos?	/_/_/_ /_/_/_ Años /Meses
39	¿Qué tipo de animal tiene? 1= Perro, 2= Gato, 3= Pájaros, 4= Hámster, 5= Tortugas, 6= Otro Cual_____	/_/_ /_/_
40	En donde se encuentra la mascota durante el día 0= Al exterior del hogar 1= Al interior del hogar	/_/_
41	¿Donde duerme la mascota? 0= Al exterior del hogar 1= Al interior del hogar	/_/_
42	¿Cuántos días está en contacto con la mascota durante la semana?	/_/_ Días
43	¿Cuántas horas pasa usted en contacto físico con la mascota diariamente?	/_/_/_ Horas
44	¿Anteriormente tenía animales domésticos? 0= No, 1 = Si (Si responde NO pasar a la pregunta 49)	/_/_
45	¿Cuanto tiempo convivió con los animales domésticos?	/_/_/_ /_/_/_ Años /Meses

46	¿Qué tipo de animal tuvo? 1= Perro, 2= Gato, 3= Pájaros, 4= Hámster, 5= Tortugas, 6= Otro Cual_____	/ / / /
47	En donde se encontraba la mascota durante el día 0= Al exterior del hogar 1= Al interior del hogar	/ /
48	¿Donde dormía la mascota? 0= Al exterior del hogar 1= Al interior del hogar	/ /
49	¿Tiene animales de granja? 0= No, 1= Si (Si contesta NO pasar a la pregunta 55)	/ /
50	¿Desde hace cuanto tiempo convive con animales de granja?	/ / / / / / / / Años /Meses
51	¿Qué tipo de animal tiene? 1= Puerco, 2= Vaca, 3= Borrego, 4= Chivo, 5= Caballo, 6=Gallinas 7= Patos, 8=Pollos, 9= Otros_____	/ / / /
52	¿Donde duermen los animales de granja? 0= Al exterior del hogar 1= Al interior del hogar	/ /
53	¿Cuantos días a la semana pasa en contacto con los animales?	/ / / / / / / / Días
54	¿Cuantas horas por día está en contacto con los animales?	/ / / / / / / / horas
55	¿Anteriormente tenía animales de granja? 0= No, 1= Si (Si contesta NO pasar a la pregunta 61)	/ /
56	¿Desde hace cuanto tiempo convivía con animales de granja?	/ / / / / / / / Años /Meses
57	¿Qué tipo de animal tuvo? 1= Puerco, 2= Vaca, 3= Borrego, 4= Chivo, 5= Caballo, 6=Gallinas 7= Patos, 8=Pollos, 9= Otros_____	/ / / /
58	¿Donde dormían los animales de granja? 0= Al exterior del hogar 1= Al interior del hogar	/ /
59	¿Cuantos días a la semana pasaba en contacto con los animales?	/ / / / / / / / Días
60	¿Usted cuantas horas por día estaba en contacto físico con los animales?	/ / / / / / / / horas
61	En su casa cocinan con: 0= gas, 1= leña, 2=carbón, 3= gas y leña 4=gas y carbón (Si contesta GAS pasar a la pregunta 66) 3= Otro_____	/ /
62	¿Cuantos días a la semana está expuesto al humo de leña o carbón?	/ / / / / / / / Días
63	¿Cuántas horas por día está expuesto?	/ / / /

		Horas
64	¿La exposición al humo de leña es fuera o dentro del hogar? 0= Fuera, 1= Dentro 2= ambos	/ /
65	¿Desde hace cuanto tiempo está expuesto al humo?	/ / / / Años /Meses
66	¿Usan leña o carbón con otro fin? 0= No, 1= Sí (Si contesta NO pasar a la pregunta 69)	/ /
67	Desde hace cuanto tiempo usa leña ó carbón con otro fin	/ / / / Años /Meses
68	¿Cuál actividad? _____	
69	Y anteriormente usaba leña ó carbón con otro fin 0=No 1= Si (Si contesta NO pasar a la pregunta 71)	/ /
70	¿Cuál era la actividad? _____	
71	¿Usted Fuma? 0= No, 1= Si (Si responde NO, pase a la pregunta 75) (Si responde SI, contesta y pasa a la preg. 80)	/ /
72	¿A qué edad comenzó a fumar?	/ / / / Años
73	¿Cuántos cigarrillos fuma por día?	/ / / /
74	¿Cuántos cigarrillos fuma a la semana?	/ / / /
75	¿Anteriormente fumaba? 0=No, 1= Si (Si responde NO pasar a la pregunta 80)	/ /
76	¿Cuántos años fumó?	/ / / / Años
77	Hace cuantos años dejo de fumar	/ / / / Años
78	¿Cuántos cigarrillos fumaba por día?	/ / / /
79	¿Cuántos cigarrillos fumaba a la semana?	/ / / /
80	¿Está en contacto usted con personas que fuman? 0=No, 1=Si (Si contesta NO, termina la encuesta y se le agradece al participante)	/ /
81	¿Cuántas horas por día está expuesto al humo del tabaco con las personas que fuman?	/ / / / horas

82 ¿Cuántas horas por semana está expuesto al humo del tabaco con las personas que fuman?

/_/_/_/
horas

Le agradecemos su cooperación y tiempo brindado, cualquier duda estamos a sus órdenes.

Referencias

1. Salazar-Mesa AM. Prurigo actínico en la niñez. *Dermatol Pediatr Lat.* 2005; 3(3): 193-200.
2. Hojyo MT, Vega ME, Cortes R, Flores O, Cortés R, Teixeira F et al. Actinic Prurigo: an update. *Int J Dermatol.* 1995; 34 (6): 380-4.
3. Tincopa OW, Tincopa L, Valverde J, Carvajal A, Zapata C, Rojas P et al. Prurigo solar en Trujillo. Estudio clínico, histológico y epidemiológico. *Dermatol Peru.* 2002; 12(2):114-21.
4. Saeb M, Cortés R, Vega ME, Hojyo MT, Guevara ME, Dominguez L. Principales fotodermatosis en Latinoamérica. Revisión y actualización. *Derm Venez.* 1999, 37 (1): 15-21.
5. Vega ME, Mosqueda A, Irigoyen ME, Hojyo MT, Dominguez L. Actinic prurigo cheilitis: clinicopathologic analysis and therapeutic results in 116 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(1):83-91.
6. Wiseman MC, Orr PH, Macdonald SM, Schroeder ML, Toole JW. Actinic prurigo: clinical features and HLA associations in a Canadian Inuit population. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 44(6):952-6.
7. Arrese JE, Dominguez L, Hojyo MT, Vega E, Cortés R, Guevara E. Effectors of inflammation in actinic prurigo. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 44(6):957-61.
8. Hojyo MT, Vega ME, Cortes R, Dominguez L. Diagnosis and treatment of actinic prurigo. *Dermatol Ther.* 2003; 16(1): 40-4.
9. Sachdeva S. Fitzpatrick skin typing: applications in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2009;75 (1):93-6.
10. Vera DS, Zuloaga S, González PC, Sánchez K, Chávez N, Hojyo MT, et al. Actinic prurigo: a case-control study of risk factors. *Int J Dermatol.* 2014; 53(9):1080-5.
11. Granados J, Domínguez L. Inmunogenética del Prurigo Actínico en mexicanos. *Dermatol Rev Mex.* 1993; 37 (1): 314-15.
12. Hojyo T, Granados J, Vargas G, Yamamoto JK, Vega E, Cortés R, et al. Further evidence of the role of HLA-DR4 in the genetic susceptibility to actinic prurigo. *J Am Acad Dermatol.* 1997; 36 (6):935-7.
13. Grabczynska SA, McGregor JM, Kondeatis E, Vaughan RW, Hawk JL. Actinic prurigo and polymorphic light eruption: common pathogenesis and the importance of HLA-DR4/DRB1*0407. *Br J Dermatol.* 1999; 140(2):232-6.

14. Zuloaga S, Castillo M, Vega E, Arellano O, Rodríguez JM, Pérez N. Class I and class II major histocompatibility complex genes in Mexican patients with actinic prurigo. *Br J Dermatol*. 2007; 156(5):1074-5.
15. Moncada B, González R, Baranda ML, Loredó C, Urbina R. Immunopathology of polymorphous light eruption. T lymphocytes in blood and skin. *J Am Acad Dermatol*. 1984; 10(6):970-3.
16. González G, Ocádiz R. Poblaciones clonales de células T y B en prurigo actínico, una fotodermatosis. *Gac Méd Méx*. 2001; 137 (1):15-20.
17. Hojyo MT. Pruebas fotobiológicas en prurigo actínico. *Dermatol Rev Mex*. 1993; 37(1):328.
18. Christopher H. Photoimmunology. In: Gaspari AA, Tying SK editors. *Clinical and basic immunodermatology*. London: Springer. 2008; I: 147-55.
19. Van DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science*. 1996; 1 (274): 787-9.
20. Nairn R, Helbert M. *Immunology for medical students*. 2nd rev ed. Philadelphia (PA): Mosby Elsevier. 2007:122-23.
21. Umaña A, Gómez A, Durán MM, Porrás L. Lymphocyte subtypes and adhesion molecules in actinic prurigo: observations with cyclosporin A. *Int J Dermatol*. 2002; 41(3):139-45.
22. Cuevas JC, Lievanos Z, Vega ME, Hojyo MT, Dominguez L. Correlación de los niveles séricos de IgE en manifestaciones clínicas en pacientes con PA. *An Bras Dermatol*. Artículo enviado a consideración.
23. Pizzi N. Aspectos menos conocidos del Prurigo actínico. *Dermatología Rev Mex* 1993; 37 (1): 298.
24. Miyazaki D, Nakamura T, Toda M, Cheung-Chau KW, Richardson RM, Ono SJ. Macrophage inflammatory protein-1alpha as a costimulatory signal for mast cell-mediated immediate hypersensitivity reactions. *J Clin Invest*. 2005; 115(2):434-42.
25. Fischer M, Harvima IT, Carvalho RF, Möller C, Naukkarinen A, Enblad G. Mast cell CD30 ligand is upregulated in cutaneous inflammation and mediates degranulation-independent chemokine secretion. *J Clin Invest*. 2006;116(10):2748-56.
26. Martínez E, Bologna R, Mosqueda A, Cuevas JC, Rodríguez E, Martínez MA et al. Immunohistochemical detection of mastocytes in tissue from patients with actinic prurigo. *JCED*. Paper in press.
27. Chvatchko Y, Kosco MH, Herren S, Lefort J, Bonnefoy JY. Germinal center formation and local immunoglobulin E (IgE) production in the lung after an airway antigenic challenge. *J Exp Med*. 1996;184(6):2353-60.
28. Coombs Pr, Gell PG. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: *Clinical Aspects of Immunology*, ed. Gell RR. Oxford: Oxford University Press, 1968; 575-96.

29. Warrington R, Silviu-Dan F. Drug allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2011; 7(1):1492-7
30. Schlessinger L. Alergia a fármacos I: epidemiología y fisiopatología. *Medwave* 2009; 9(5):1-4
31. Torres MJ, Mayorga C, Blanca M. Nonimmediate allergic reactions induced by drugs: pathogenesis and diagnostic tests. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; 19(2):80-90.
32. Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med*. 2003; 139(8):683-93.
33. Adam J, Pichler WJ, Yerly D. Delayed drug hypersensitivity: models of T-cell stimulation. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;71(5):701-7.
34. Lerch M, Keller M, Britschgi M, Kanny G, Tache V, Schmid DA et al. Cross-reactivity patterns of T cells specific for iodinated contrast media. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(6):1529-36.
35. Scheen Sr, Connolly SM, Dicken CH. Actinic Prurigo. *J Am Acad Dermatol J Am Acad Dermatol*. 1981;5(2):183-90.
36. Herrera R, Vega ME, Hojyo MT. En búsqueda de autoanticuerpos en pacientes con prurigo actínico. III Comunicación preliminar. *Dermatología Rev Mex*. 1993;37: 312-13.
37. Hari Y, Urwyler A, Hurni M, Yawalkar N, Dahinden C, Wendland T et al. Distinct serum cytokine levels in drug- and measles-induced exanthema. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;120(3):225-9.
38. Ávalos E, Ramírez R, Presno M. Subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con Prurigo actínico. *Dermatol Rev Mex*. 1993; 37(1):305-307.
39. Vega ME. Características histopatológicas del prurigo actínico. *Dermatol Rev Mex*. 1993; 37 (1): 295-97.
40. Vega GB. Órganos linfoides. *Rev Fac Med. UNAM* 2009; 52 (5): 234-36.
41. Lestarini D, Khoo LSW, Goh CL. The clinical features and management of actinic prurigo: a retrospective study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1999; 15(5):183-7.
42. Erupción polimorfa lumínica
<http://www.menarini.es/images/dermatopatologia/Derma048.pdf>
43. Hojyo MT. Prurigo actínico: diagnóstico diferencial. *Dermatol Rev Mex*. 1993; 37(1):303-5
44. Magaña M, Mendez Y, Rodriguez A, Mascott M. The conjunctivitis of solar (actinic) prurigo. *Pediatr Dermatol*. 2000;17(6):432-5.
45. Comité de evaluación clínica terapéutica. Boletín de información Clínica Terapéutica. Academia Nacional de Medicina de México. 2008; 17(4):3-5.

46. Vega ME, Ortega S, Hojyo MT. Queilitis: Correlación clínico-patológica. *Dermatol Rev Mex*. 1991; 35(4) 212-17.
47. Fusaro R, Jonson J. Prevención y tratamiento del Prurigo actínico. *Dermatol Rev Mex* 1993;37 (1):339-40.
48. Crouch R, Foley P, Baker C. Actinic prurigo: a retrospective analysis of 21 cases referred to an Australian photobiology clinic. *Australas J Dermatol*. 2002;43(2):128-32.
49. Cejudo C. Desórdenes inmunológicos y el resurgimiento de la talidomida. Nuevas aplicaciones clínicas. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*. 1999; 8(2): 49-56.
50. Londoño F. Thalidomide in the treatment of actinic prurigo. *Int J Dermatol* 1973; 12(5):326-28.
51. Lestarini D, Khoo LSW, Goh CL. The clinical features and management of actinic prurigo: a retrospective study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1999;15(5):183-7.
52. Flores O. Prurigo solar de altiplanicie. Resultados preliminares del tratamiento con talidomida en 25 casos. *Dermatol Rev Mex* 1975; 19:26-39.
53. Saul A, Flores O, Novales J. Polymorphous light eruption: treatment with thalidomide. *Australas J Dermatol* 1976; 17 (1):17-21.
54. Pendino P, Agüero C, Kriunis I. Talidomida y análogos de talidomida. *Archivos de alergia e inmunología clínica*. 2005; 36 (2):41-51
55. Sigala C, Nelle H, Halabe J. El resurgimiento de la talidomida. *Rev Fac Med UNAM*, 2001; 44(5):212-15.
56. Cazarín J, Román D, Messina M, Magaña M. Talidomida en niños con prurigo solar refractario. *Actas Dermatol* 2002; 2 (1):11-15.
57. Estrada G, Garibay A, Núñez A, Hojyo T, Vega E, Cortés R, et al. Evidence that thalidomide modifies the immune response of patients suffering from actinic prurigo. *Int J Dermatol*. 2004;43(12):893-7.
58. Vázquez J. Neuropatía periférica por uso prolongado de Talidomida en pacientes con Prurigo Actínico. TESIS UNAM 2010.
59. Romaguera C. Estudio sobre la utilización de la talidomida desde los trágicos años sesenta hasta la actualidad. Análisis desde la perspectiva legal y ética. <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/32366>
60. Navarrete C, Ibáñez C. Rol de la Apoptosis en la Fisiopatología del Lupus Eritematoso Sistémico. *Rev Chil Reumatol*. 2008; 24(1):30-8.
61. Cascales, M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal.Real Acad. Nal. Farm*. 2003; 69: (1):36-63.
62. Sosa RD, Brandan N, Jeréz J. Apoptosis. Catedra de bioquímica-apoptosis. UNNE, 2012.

63. Jordan J. Apoptosis: muerte celular programada. OFFARM. 2003; 22 (6):12-23.
64. Alfaro ME, García CC, Dueñas GA. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Rev Inst Nal Cancerol Méx 2000;46: 275-80.
65. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992; 119: 493-501.
66. Panizo A, Vega F. Estudio de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL. Rev Esp Patol.1997; 30 (3): 243-245.
67. Pacheco MG, Avalos E, Vega E, Bollain JJ, López E, Hojyo MT, et al. The final destiny of acantholytic cells in pemphigus is Fas mediated. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009;23(6):697-701.
68. Garcia V. Manual de Inmunohistoquímica. INP
69. Garcia R, Ayala P, Acosta N. Alteración en la regulación de la apoptosis vía Fas/FasL en cáncer gástrico. Rev. Cienc. Salud.2009; 7(1): 83-94.
70. López E, Rioscovian AP, Sepúlveda AC, Siordia G, Figueroa L, De La Cruz H. Sobreexpresión Bcl-2 como factor pronóstico en niños con astrocitomas. GAMO. 2011; 10(1):1
71. Lloret M, Lara PC, Bordón E, Fontes F, Rey A, Pinar B, et al. Major vault protein may affect nonhomologous end-joining repair and apoptosis through Ku70/80 and bax downregulation in cervical carcinoma tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009;73 (4):976-9.
72. Garcia V, Gonzalez MA, Bascones A. Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral. Resultados preliminares. Av Odontoestomatol. 2006; 22 (5):263-69.
73. Hu Z, Zeng Q, Zhang B, Liu H, Wang W. Promotion of p53 expression and reactive oxidative stress production is involved in zerumbone-induced cisplatin sensitization of non-small cell lung cancer cells. Biochimie. 2014; doi: 10.1016/j.biochi.2014.09.001.
74. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. Nature. 1997; 389(6648):300-5.
75. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. Science 1998; 281 (5381): 1317-22.
76. Prochazkova J, Kylarova D, Vranka P, Lichnovsky V. Comparative study of apoptosis-detecting techniques: TUNEL, apostain, and lamin B. Biotechniques. 2003; 35 (3): 528-34.
77. Peñas PF, Ríos L, Buezo GF, García A. Apoptosis. Revisión de mecanismos moleculares e implicaciones en Dermatología. Actas Dermosifiliogr., 1998;89:3-13

78. Zarnescu O, Brehar FM, Chivu M, Ciurea AV. Immunohistochemical localization of caspase-3, caspase-9 and Bax in U87 glioblastoma xenografts. *J Mol Histol.* 2008;39(6):561-9.
79. Lalier L, Cartron PF, Olivier C, Logé C, Bougras G, Robert JM et al. Prostaglandins antagonistically control Bax activation during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011;18(3):528-37
80. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patología estructural y funcional. Sexta edición. Mc Graw Hill interamericana. 2000. 23-27
81. Hernández MT, Sabanero ML, Barbosa G, Gallegos M. Estaurosporina y dexametasona, inductores apoptóticos en células coriónicas y transformadas. 2° Congreso Nacional de Química Médica <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>
82. Elinos CM, Maldonado V, Meléndez J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd Méx.* 2003; 139 (5): 1-3.
83. Calderon R. La apoptosis en biología y patología. *Rev. Peru. Cardiol.* 2005; 30 (2):119-128.
84. Rodríguez AA, Rodríguez E, Rodríguez G, Cuevas JC, Mancheno A, Solís MP, et al. Actinic Prurigo: An update. *SKINmed.* Paper in press.
85. Ortiz R, Cram S, Sommer I. Polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) in soils of the low alluvial plain in the state of Tabasco, Mexico. 28(2):131-144,2012 www.universidadyciencia.ujat.mx
86. Martínez RI. Estimación de riesgo en salud por exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos y DDT residual en población infantil del Estado de Chiapas. Tesis doctoral. Facultades de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
87. Monoclonal Mouse. Anti-Human. Cytokeratin. Clones AE1/AE3. <http://www.dako.com/download.pdf?objectid=105470005>
88. Mills' S. Histology for Pathologist. Fourth Edition. Wolters Kluwer. 2012.
89. Hayama F, Motta A, Silva A, Migliari D. Preparaciones de base líquida vs citología convencional: Adecuación de las muestras y coincidencias de diagnóstico en lesiones orales. *Med Oral, Patol Oral, Cir bucal.* 2005;10 (1):115-22.