

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA
DOCTORAT EN BIOMEDICINA I FARMÀCIA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL PACLITAXEL
EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS,
BIOMECÁNICAS Y FISIOLÓGICAS DEL
TEJIDO CUTÁNEO EN PACIENTES
ONCOLÓGICOS Y EN CULTIVOS DE PIEL 3D**

Presentada por:
MARTÍN PÉREZ LEAL

Dirigida por:
**DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO
DRA. DÑA. CELIA SANZ GARCÍA
DR. D. JOSÉ ALEJANDRO PÉREZ FIDALGO**

MAYO, 2020
VALÈNCIA



DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO
Catedrático Numerario de Universidad
Departament de Farmacologia
Universitat de València

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Don Martín Pérez Leal, con el título:

“ESTUDIO DEL EFECTO DEL PACLITAXEL EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS, BIOMECÁNICAS Y FISIOLÓGICAS DEL TEJIDO CUTÁNEO EN PACIENTES ONCOLÓGICOS Y EN CULTIVOS DE PIEL 3D”

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En València, mayo de 2020.

Dr. Julio Cortijo Gimeno



DRA. DÑA. CELIA SANZ GARCÍA

Investigadora en el Departament de Farmacologia
de la Universitat de València
Profesora Asociada en la Universitat Jaume I

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Don Martín Pérez Leal, con el título:

“ESTUDIO DEL EFECTO DEL PACLITAXEL EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS, BIOMECÁNICAS Y FISIOLÓGICAS DEL TEJIDO CUTÁNEO EN PACIENTES ONCOLÓGICOS Y EN CULTIVOS DE PIEL 3D”

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En València, mayo de 2020.

Dra. Celia Sanz García

DR. D. JOSÉ ALEJANDRO PÉREZ FIDALGO

Investigador en el Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA
Médico especialista en Oncología en el
Hospital Clínic Universitari de València

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Don Martín Pérez Leal, con el título:

“ESTUDIO DEL EFECTO DEL PACLITAXEL EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS, BIOMECÁNICAS Y FISIOLÓGICAS DEL TEJIDO CUTÁNEO EN PACIENTES ONCOLÓGICOS Y EN CULTIVOS DE PIEL 3D”

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En València, mayo de 2020.

Dr. José Alejandro Pérez Fidalgo

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no habría sido posible sin la colaboración y ayuda de una serie de personas a las que me gustaría dar las gracias de la forma más sincera.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Julio Cortijo la oportunidad que me dio hace ya algunos años de formar parte de su equipo de investigación donde he podido adquirir grandes conocimientos que me han ayudado mucho a nivel profesional y científico, por su paciencia conmigo, su confianza y su tiempo invertido.

A la Dra. Celia Sanz por empezar este trabajo junto a mí, por su ilusión en este proyecto y no dejarme tirar la toalla. Por los tantos momentos codo a codo en el laboratorio sin parar de aprender. Gracias por haber formado parte del camino.

Al Dr. Alejandro Pérez por su implicación en este trabajo, su tiempo dedicado y estar ahí siempre que se le ha necesitado, junto a su equipo del Hospital Clínico.

A todos mis compañeros y compañeras del equipo del Dr. Cortijo, que han estado siempre a mi lado. Este trabajo es también un poco suyo, por no dudar nunca en echarme una mano, por acompañarme en los buenos y en los no tan buenos momentos, en los dramas y en las comedias, por ser un pilar fundamental, pero sobre todo por dejar que pueda llamarles amigos en mayúsculas. Cristina, Inés, Pilar, Paula, Bea, Xavi, Amparo y Antonio, gracias por vuestras ganas, gracias por estar.

Al resto del departamento de Farmacología de la Universitat de València, desde los profesores, doctores, estudiantes... por su compañerismo y el buen ambiente que ayudan a crear.

A mis amigos y amigas de AMR, a mis compis de Mislata, al DaClab, a Raquel, a Miguel y a Germán, porque nunca habéis dejado de creer en mí, por seguir a mi lado, aunque a veces este trabajo nos haya robado un poco, o un mucho, de nuestro tiempo juntos. Gracias por acompañarme en esta aventura, pero, sobre todo, gracias por las que están por llegar.

A Fer por aportar desinteresadamente su visión gráfica y artística. Nunca dejes de crear.

A la tía Rosa por animarme a empezar y a no dejarlo, y al resto de mis tíos y primos por ser los mejores animadores.

Y por último y no menos importante, a mi padre, mi madre y mi hermana Iris, que han sufrido la evolución de este trabajo igual o más que yo. Papá y mamá, llegar donde he llegado ha sido gracias a vuestro esfuerzo, a vuestra educación y a vuestro apoyo incondicional. Mil gracias, os quiero mucho.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 LA PIEL	17
1.1.1 Estructura de la piel.....	17
1.1.1.1 Epidermis	19
1.1.1.2 Dermis.....	24
1.1.1.3 Hipodermis.....	27
1.1.2 Factores de hidratación de la piel.....	27
1.1.2.1 Papel de la AQP3.....	28
1.1.3 Envejecimiento de la piel.....	29
1.1.3.1 Colágeno	29
1.1.3.2 Elastina.....	30
1.1.3.3 Fibronectina	31
1.1.3.4 Especies reactivas de oxígeno.....	31
1.1.3.5 Alteraciones vasculares.....	34
1.1.3.6 Estudios <i>in vivo</i> sobre el envejecimiento de la piel.....	35
1.1.4 Producción de melanina	36
1.1.5 Citocinas inflamatorias en la piel.....	39
1.2 TAXANOS.....	40
1.2.1 Mecanismo de acción	41
1.2.2 Efectos biológicos de los taxanos en células normales	45
1.3 EFECTOS ADVERSOS DE LOS TAXANOS	47
1.3.1 Efectos adversos relacionados con la piel	48
1.3.1.1 Reacciones agudas relacionadas con la infusión.....	48
1.3.1.2 Reacciones de toxicidad cutánea.....	49
1.3.1.3 Reacciones de recuerdo.....	53
1.3.1.4 Eritrodistesia palmar-plantar	55
1.3.1.5 Cambios en la pigmentación.....	57
1.3.1.6 Edema periférico.....	58
1.3.1.7 Efectos relacionados con la esclerodermia.....	59
1.3.1.8 Onicotoxicidad	60
1.3.1.9 Alopecia inducida por quimioterapia.....	62
1.3.1.10 Otros efectos dermatológicos.....	64
2. OBJETIVOS.....	65
3. MATERIALES Y MÉTODOS	69
3.1 ESTUDIO <i>IN VIVO</i>	71
3.1.1 Poblaciones de estudio.....	71
3.1.1.1 Población sana	72
3.1.1.2 Población de pacientes oncológicas tratadas con paclitaxel	73
3.1.2 Aspectos éticos	77
3.1.2.1 Evaluación beneficio/riesgo	77
3.1.2.2 Consideraciones sobre el consentimiento informado.	77
3.1.2.3 Confidencialidad de los datos	78
3.1.2.4 Interferencia con los hábitos de prescripción.....	78
3.1.3 Valor de hidratación	78

3.1.4	Pérdida de Agua Transepidérmica (TEWL)	79
3.1.5	Valor de sebo	80
3.1.6	Valor de eritema y melanina	81
3.1.7	Grados ITA	82
3.1.8	Elasticidad y firmeza de la piel.....	84
3.1.9	Parámetros de superficie de la piel	87
3.1.10	Descamación de la piel.....	89
3.1.11	Grosor de las capas de la piel	90
3.1.12	Presentación de datos y análisis estadístico de los ensayos <i>in vivo</i>	92
3.2	ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	93
3.2.1	Reactivos utilizados	93
3.2.2	Cultivos celulares.....	94
3.2.3	Fármacos	95
3.2.4	Viabilidad celular mediante MTT.....	96
3.2.5	Cultivo de piel reconstituida. Modelo 3D.....	97
3.2.6	Inmunofluorescencia para la detección de Especies Reactivas de Oxígeno.....	102
3.2.7	Apoptosis celular mediante citometría de flujo	103
3.2.8	Angiogénesis.....	104
3.2.9	Liberación de interleucinas mediante técnica ELISA	105
3.2.10	Expresión génica mediante qPCR.....	106
3.2.10.1	Extracción de ARN total y cuantificación	106
3.2.10.2	Transcripción reversa.....	107
3.2.10.3	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	108
3.2.11	Expresión proteica mediante Western Blot	112
3.2.12	Capacidad fototóxica del paclitaxel.....	114
3.2.13	Presentación de datos y análisis estadístico de los ensayos <i>in vitro</i>	116
4.	RESULTADOS	117
4.1	ESTUDIO <i>IN VIVO</i>	119
4.1.1	Efectos adversos dermatológicos comunicados durante el tratamiento	119
4.1.2	Estudio de los parámetros físicos, biomecánicos y fisiológicos de la piel	119
4.1.2.1	Valor de hidratación.....	119
4.1.2.2	Pérdida de Agua Transepidérmica (TEWL).....	121
4.1.2.3	Valor de sebo	122
4.1.2.4	Valor de eritema	123
4.1.2.5	Pigmentación	124
4.1.2.6	Elasticidad y firmeza de la piel	125
4.1.2.7	Parámetros de superficie de la piel.....	127
4.1.2.8	Descamación de la piel	128
4.1.2.9	Grosor de las capas de la piel.....	130
4.2	ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	134
4.2.1	Ensayo de viabilidad celular previo	134
4.2.2	Efectos del paclitaxel sobre modelo 3D de piel.....	134
4.2.2.1	Producción de citoquinas inflamatorias.....	134
4.2.2.2	Efectos del paclitaxel sobre la expresión génica.....	136
4.2.2.3	Efectos del paclitaxel sobre la expresión proteica.....	140
4.2.2.4	Activación del factor de transcripción NF-κB	145

4.2.3	Efectos del paclitaxel sobre queratinocitos primarios humanos.....	146
4.2.3.1	Producción celular de ERO.....	146
4.2.3.2	Apoptosis celular y la senescencia.....	148
4.2.4	Efectos del paclitaxel sobre células microvasculares dérmicas humanas	150
4.2.4.1	Formación del tubo endotelial, angiogénesis.....	150
4.2.5	Efectos del paclitaxel sobre melanocitos primarios humanos	152
4.2.5.1	Expresión génica de marcadores de la melanogénesis.....	152
4.2.6	Capacidad fototóxica del paclitaxel.....	153
5.	DISCUSIÓN.....	155
5.1	EVIDENCIAS <i>IN VIVO</i>	157
5.2	RESPUESTA A NIVEL CELULAR.....	161
5.3	RESPUESTA A NIVEL MOLECULAR.....	163
5.4	EFFECTOS SOBRE LA MELANOGÉNESIS	166
5.5	EFFECTO SOBRE NF-κB COMO MECANISMO DE ACCIÓN.....	167
5.6	FOTOTOXICIDAD	169
5.7	COROLARIO.....	170
6.	CONCLUSIONES.....	171
7.	BIBLIOGRAFÍA	175
8.	ABREVIATURAS.....	197
9.	ANEXO	201

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y representa aproximadamente el 15% del peso corporal total de una persona adulta. Realiza muchas funciones vitales, incluida la protección contra agentes físicos, químicos y biológicos externos, así como la prevención del exceso de pérdida de agua del cuerpo además de jugar un papel fundamental en la termorregulación entre otros. Se trata de un órgano continuo, con las membranas mucosas que recubren la superficie del cuerpo (1,2).

1.1.1 Estructura de la piel

Se denomina sistema integumentario al conjunto formado por la piel y sus estructuras derivadas. Se trata de un sistema indispensable para nuestro cuerpo ya que representa la primera barrera de protección contra agentes externos y define la estructura de la piel (**Figura 1**). La piel está compuesta por tres capas: la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo o hipodermis (1). El grosor de estas capas varía considerablemente, dependiendo de la ubicación anatómica en el cuerpo. El párpado, por ejemplo, tiene la capa más delgada de la epidermis, que mide menos de 0,1 mm, mientras que las palmas y las plantas de los pies tienen la capa epidérmica más gruesa, que mide aproximadamente 1,5 mm. La dermis puede llegar a ser de 30 a 40 veces más gruesa que la epidermis (3,4).

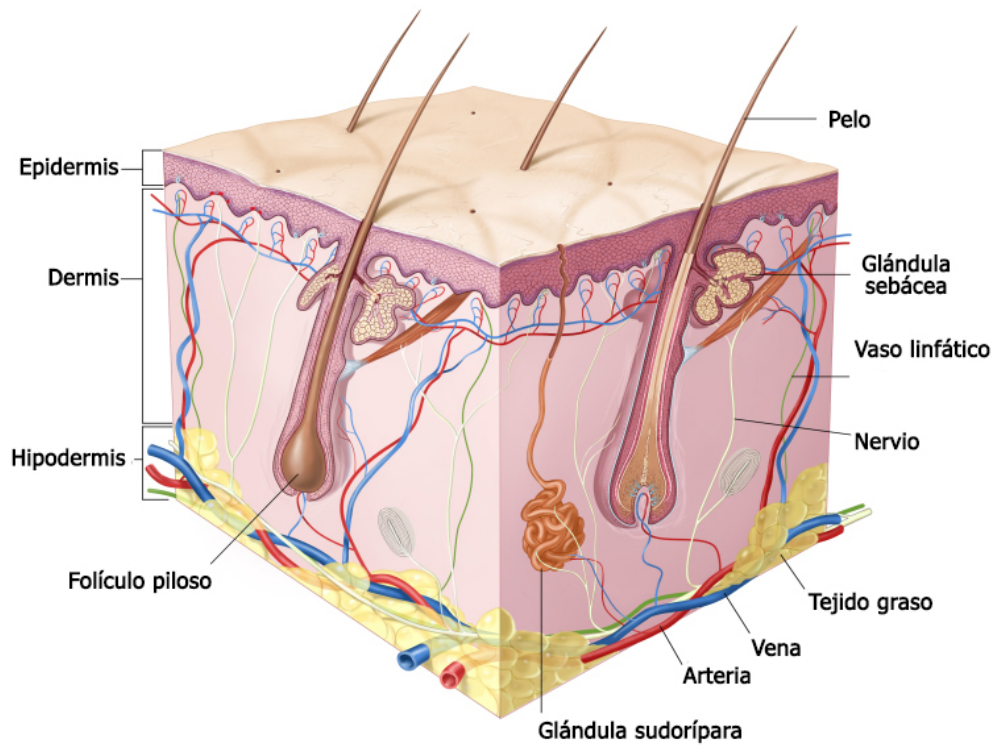


Figura 1. Estructura esquemática de la piel. Imagen adaptada de *National Cancer Institute (EE.UU.)*, 2002.

Aunque la dermis puede parecer un sustrato de soporte para la epidermis, ha quedado claro que es una estructura compleja que tiene una importante comunicación de señalización con la epidermis, que es vital para la homeostasis de la piel. El componente celular primario de la dermis son los fibroblastos, que son de origen mesenquimatoso. La dermis se está remodelando continuamente, lo cual es mantenido por las células madre mesenquimales. Estas células madre mesenquimales dan lugar no solo a fibroblastos, sino también a nervios y adipocitos. Los fibroblastos producen y organizan la matriz extracelular y se comunican entre sí y con la epidermis a través de varias vías de señalización (5).

Al menos el 80% de las células en la epidermis son los queratinocitos, los cuales en el proceso de diferenciación derivan del ectodermo. El proceso de diferenciación que ocurre cuando las células migran desde la capa basal hacia la superficie de la piel da

como resultado la queratinización, un proceso en el que el queratinocito pasa en primer lugar a través de una fase sintética y luego degradante (6). En la fase sintética, la célula acumula queratina en el citoplasma, un filamento intermedio fibroso dispuesto en un patrón de espiral helicoidal alfa que sirve como parte del citoesqueleto de la célula. Los paquetes de estos filamentos de queratina convergen y terminan en la membrana plasmática formando las placas de unión intercelular conocidas como desmosomas. Durante la fase degradante de la queratinización, los orgánulos celulares se pierden, incluido el núcleo, el contenido de la célula se consolida en una mezcla de filamentos y envolturas de células amorfas, y la célula finalmente se conoce como célula córnea o corneocito. El proceso de maduración que produce la muerte celular se conoce como diferenciación terminal (2,3).

1.1.1.1 Epidermis

En el nivel más externo se encuentra la epidermis, consiste en una capa específica de células conocidas como queratinocitos, que se encargan de sintetizar queratina, una proteína larga y filosa con un papel protector (2).

Está normalmente compuesta por cuatro capas diferentes (**Figura 2**) que desde el exterior hacia el interior serían la capa córnea, la capa granulosa, la capa de células espinosas y la capa basal. Así mismo, en aquellas zonas donde se presenta con un mayor grosor, la epidermis tiene cinco capas al contar con la capa lúcida, la cual está situada entre la capa córnea y la granular (7).

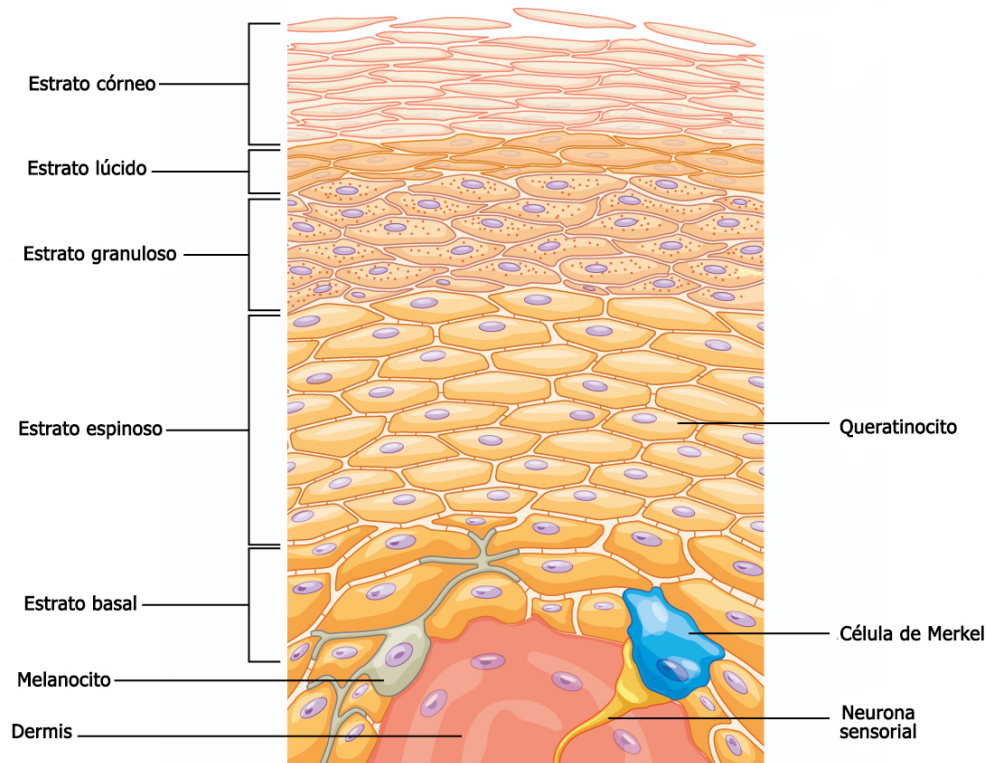


Figura 2. Estructura celular de las capas de la epidermis. Imagen adaptada de *Biga y col., 2019*.

La capa córnea, o estrato córneo, es la más externa de la epidermis, siendo la primera línea de defensa del cuerpo, cumpliendo una función esencial como barrera protectora de la piel contra el entorno externo. El estrato córneo ayuda a la hidratación y la retención de agua, lo que evita el agrietamiento de la piel, y está formado por corneocitos, queratinocitos sin núcleo que han alcanzado la etapa final de diferenciación de queratinocitos. Los corneocitos retienen los filamentos de queratina dentro de una matriz de filagrina, y la envoltura lipídica reemplaza la membrana plasmática de los queratinocitos. Estas células planas se organizan en una estructura de “ladrillo y mortero” dentro de una matriz lipídica extracelular. Los queratinocitos en la capa basal de la epidermis son proliferativos, y a medida que las células maduran la epidermis, pierden lentamente el potencial proliferativo y sufren una destrucción programada. El estrato córneo funciona como un sistema de dos compartimentos, con los corneocitos hidrófobos y ricos en proteínas secuestrados en una matriz enriquecida en lípidos (6,8–10). La fisiopatología del estrato córneo suele ser secundaria a defectos proteicos o lipídicos. Otros signos clínicamente significativos incluyen la paraqueratosis, que es la maduración incompleta de los queratinocitos y la retención morfológica de los núcleos

en el estrato córneo. La paraqueratosis anormal del estrato córneo puede aparecer en pacientes con psoriasis, eccema crónico y carcinoma de células escamosas. La descamación o descamación visible de la piel, además, es una manifestación destacada de enfermedades del estrato córneo (8,11–14).

El estrato córneo humano comprende aproximadamente 15 capas de corneocitos aplanados y se divide en dos capas: el estrato compacto y el estrato disyuntivo. El estrato compacto es la capa profunda, densa y cohesiva, mientras que el estrato disyuntivo es más suelto y se encuentra superficialmente al estrato compacto. A medida que el estrato disyuntivo continúa perdiendo adhesividad secundaria a la disminución de la adhesión entre corneocitos, las células se descaman (8).

Los dos componentes del estrato córneo, la matriz lipídica extracelular y los corneocitos, cumplen diferentes funciones. Los corneocitos, que son los queratinocitos diferenciados terminalmente, proporcionan refuerzo mecánico, protegen las células mitóticamente activas subyacentes del daño ultravioleta (UV), regulan el inicio de la inflamación mediada por citocinas y mantienen la hidratación. La matriz lipídica extracelular del estrato córneo regula la permeabilidad, inicia la descamación de los corneocitos, tiene actividad peptídica antimicrobiana, excluye las toxinas, y permite la absorción química selectiva (8,15–17).

Existe la posibilidad de sufrir pérdidas agudas de lípidos del estrato córneo, secundarias a la aplicación tópica de disolventes orgánicos o detergentes, que extraen lípidos y permiten la pérdida pasiva de calcio y potasio extracelular. La deficiencia de ácidos grasos esenciales también produce anomalías en los lípidos y se manifiesta como una mayor pérdida de agua transepidérmica (TEWL, del inglés, *Transepidermal water loss*), descamación y alopecia (8,18).

Además de las patologías secundarias a las anomalías lipídicas, las anomalías de la proteína del estrato córneo también pueden provocar defectos en la capa del estrato córneo de la epidermis. Los defectos en los desmosomas del estrato

córneo, provocan enfermedades como la descamación de la piel. Los defectos en las proteínas de profilagrina y filagrina causan daños significativos de esta capa, y los defectos de profilagrina se asocian tanto con ictiosis vulgar como con ictiosis arlequín. Los defectos en las envolturas de las células del estrato córneo también pueden provocar patologías como la queratosis folicular y la psoriasis. La xerosis, sequedad en la piel, es la manifestación clínica más común de la enfermedad del estrato córneo, y representa una queratinización y descamación inadecuada o defectuosa. Esas enfermedades caracterizadas por escamas y, por lo tanto, ruptura del estrato córneo, incluyen dermatitis (eccema), psoriasis y las ictiosis. Tanto el eccema como la psoriasis son el resultado de cambios epidérmicos subyacentes que causan patología a nivel del estrato córneo. Por otro lado, las ictiosis resultan de defectos subyacentes en la queratinización (8,18,19).

La capa granulosa, o estrato granuloso, contiene varias capas de células que contienen gránulos ricos en lípidos. En esta capa, las células comienzan a inmortalizarse y pierden sus núcleos, a medida que se alejan de los nutrientes ubicados en el tejido más profundo (10). Se trata de la capa más superficial de la epidermis que contiene células vivas, está compuesta por células aplanadas que contienen abundantes gránulos de queratohialina en su citoplasma. Estas células son responsables de una mayor síntesis y modificación de proteínas involucradas en la queratinización (6).

La queratina, la proteína constituyente básica de la piel y sus apéndices, se organiza en forma de haces de filamentos de queratina. La filagrina es una de las principales proteínas asociadas a filamentos intermedios que interactúan con los filamentos de queratina en la piel. Su forma precursora llamada profilagrina se acumula en los gránulos citoplasmáticos de la capa granular en forma de estructuras llamadas gránulos de queratohialina. Los gránulos de queratohialina existen principalmente dentro del estrato granuloso, con algunos presentes en el estrato espinoso. Estos gránulos son insolubles en agua y se encuentran dentro del citoplasma, donde promueven la deshidratación de la célula. Su función principal parece ser la reticulación de los filamentos de queratina, lo que crea la epidermis, proporcionando al cuerpo una

capa impermeable que protege contra la invasión de partículas extrañas. Este proceso en el que están involucrados los gránulos de queratohialina es conocido como queratinización (11).

La capa de células espinosas, o estrato espinoso, compromete la mayor parte de la epidermis y contiene varias capas de células (entre 3 y 5 capas) conectadas por desmosomas. Estos desmosomas permiten que las células permanezcan fuertemente unidas entre sí y adopten una forma similar a "espinas". Contienen algunos gránulos de queratohialina y gránulos lamelares. Los gránulos lamelares contienen los glicolípidos que se secretan en la superficie de las células y funcionan como un pegamento, manteniendo las células unidas (10,20,21). En este estrato es posible encontrar las llamadas células de Langerhans, células dendríticas, las cuales son la primera línea de defensa de la piel y juegan un papel importante en la presentación del antígeno. Estas células son de origen mesenquimatoso, contienen los gránulos Birbeck y son derivadas de la médula ósea, formando parte del sistema fagocítico mononuclear. Estas células expresan las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad I y II, absorben antígenos en la piel y los transportan a los ganglios linfáticos (21,22).

La capa de células basales, o estrato basal, es la capa más profunda de la epidermis y más cercana a la dermis. Se trata de un epitelio germinal que da origen a todas las células de la epidermis. Es mitóticamente activo y contiene melanocitos, una sola fila de queratinocitos y células madre. Los melanocitos son el tipo de célula responsable de producir melanina, una sustancia que le da a nuestra piel su color. En el citoplasma poseen orgánulos especiales unidos a la membrana que producen melanina, melanosomas. La proporción entre melanocitos:queratinocitos en el estrato basal fluctúa entre de 1:10 y 1:36. Los queratinocitos de esta capa evolucionan y maduran a medida que viajan hacia el exterior para crear las capas restantes. En esta capa se encuentran también las células de Merkel, que funcionan como un receptor y son responsables de estimular los nervios sensoriales que el cerebro percibe, como el sentido del tacto, estas células son especialmente abundantes en las superficies de las manos y los pies. (7,10,23–25).

En algunas zonas es posible encontrar un estrato adicional llamado estrato lúcido, o capa lúcida, la cual contiene de 2 a 3 capas de células. Es una capa de transición entre el estrato granuloso y el estrato córneo. Se encuentra presente en la piel más gruesa como la que se encuentra en las palmas de las manos y las plantas de los pies, es una capa delgada y transparente que consiste en eleidina, que es un producto de transformación de la queratohialina (21).

1.1.1.2 Dermis

La capa media, la dermis, se trata de una capa de tejido conectivo intercalada entre la epidermis y el tejido subcutáneo. Está formada fundamentalmente por la proteína estructural fibrilar conocida como colágeno, tejido elástico y otros componentes extracelulares que incluye vasculatura, terminaciones nerviosas, folículos pilosos y glándulas (**Figura 1**). Entre los componentes fibrosos se encuentra una "sustancia fundamental" extracelular que contiene glucosaminoglucanos, como el ácido hialurónico, proteoglicanos y las glucoproteínas (26). El papel de la dermis es sujetar y proteger la piel y las capas más profundas, ayudar en la termorregulación y ayudar a la percepción. Los fibroblastos son las células primarias dentro de la dermis, pero los histiocitos, los mastocitos, los adipocitos, las células de Schwann y las células madre, también juegan un papel importante en el normal mantenimiento de la estructura y función de la misma. Los mastocitos se encuentran típicamente alrededor de los capilares dérmicos (27,28).

La dermis se divide en dos capas, la dermis papilar (la capa superior) y la dermis reticular (la capa inferior) (**Figura 3**). La cara papilar, se organiza en papilas dérmicas que contienen terminaciones nerviosas y vasos microvasculares, necesarios para la nutrición y la inervación. La dermis papilar difiere de la reticular por una mayor densidad de células, un mayor contenido de proteoglicanos y una alineación más débil de las fibras de colágeno. La dermis papilar tiene una estructura polar desigual: su densidad celular disminuye en la dirección de la membrana basal a la dermis reticular (10,20,29).

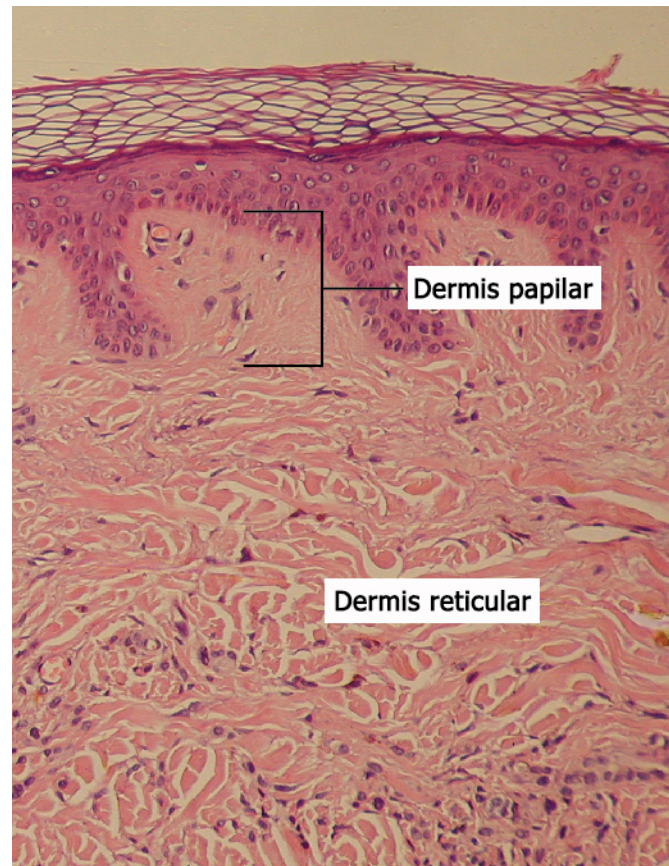


Figura 3. Capas de la dermis. Muestra de piel teñida vista al microscopio 10x, donde se muestran la capa papilar y la capa reticular. Las papilas dérmicas que se extienden hacia la epidermis pertenecen a la capa papilar, mientras que los densos haces de fibras de colágeno pertenecen a la capa reticular. Imagen adaptada de *Biga y col., 2019*.

El colágeno es el componente principal de la dermis, específicamente, se encuentran en mayor proporción el colágeno tipo I (75-85%) y tipo III (15%). El colágeno I forma una densa red ortogonal en la dermis reticular paralela a la superficie, mientras que en la dermis papilar son verticales. La fuerza tensora de la dermis se debe principalmente al colágeno tipo I. El colágeno forma fibras que son producidas por los fibroцитos y se agrupan en gruesas bandas onduladas, cada fibra está compuesta por microfibrillas. El tropocolágeno, el cual consta de tres cadenas de polipéptidos que forman una estructura de triple hélice, es el componente de estas microfibrillas elementales. Estas cadenas polipeptídicas contienen grandes cantidades de hidroxiprolina, hidroxilisina y glicina (3,27,30,31).

Las fibras elásticas también juegan un papel estructural importante dentro de la dermis. Están constituidas por elastina, que es una proteína fibrosa insoluble derivada de la tropoelastina, y unas microfibrillas periféricas, más heterogéneas, formadas por varias glucoproteínas insolubles, como las fibrilinas 1 y 2. A diferencia del colágeno, la configuración bioquímica de la elastina permite el deslizamiento, el estiramiento y el retroceso de las fibras (32). Estas fibras son más delgadas en la dermis papilar, donde se disponen orientadas perpendicularmente. En la dermis reticular se disponen de forma paralela a la superficie cutánea en la dermis profunda, siendo éstas más gruesas (3,27).

Existen numerosas enfermedades que afectan a la piel desde la dermis. La hiperactividad de los fibroblastos se ha implicado en muchas patologías. Los miofibroblastos, que expresan la actina del músculo liso alfa (α -SMA), se han implicado en cicatrices hipertróficas y queloides. Existen diferentes formas de esta fibrosis como son los queloides, cicatrices hipertróficas, dermatofibromas, dermatofibrosarcoma protuberans y esclerodermia, debidas a causas similares. En la fibrosis de la piel existe un exceso de deposición y acumulación de matriz extracelular, principalmente colágeno tipo I, en la dermis. Se piensa que los factores iniciadores de estos procesos en las primeras etapas ocurren a través de la lesión vascular y la disfunción inmune con una respuesta inflamatoria desregulada. (33–36).

El envejecimiento y la exposición crónica al sol pueden debilitar la dermis. Las fibras elásticas pueden verse comprometidas debido a una exposición solar crónica a la radiación UV, provocando una elastosis (37). La reducción del tejido conectivo en el envejecimiento, generalmente con daño UV concomitante, causa púrpura actínica también llamada púrpura senil, donde se ve afectada directamente la vasculatura. Como resultado, un trauma menor puede conducir a la extravasación de sangre (38).

La urticaria es una dermatosis inflamatoria caracterizada por hiperpermeabilidad vascular, que causa edema cutáneo superficial con una dilatación linfática (39). La infiltración linfocítica de la dermis causa enfermedades como la erupción de luz polimorfa, una dermatosis fotosensible común (40). Así mismo, se debe destacar la

dermatitis eccematosa como patología común de la piel. Las células de la piel son esenciales para mantener la barrera cutánea y por tanto hacerla más susceptible a la infección. Las sustancias nocivas pueden penetrar más fácilmente en la piel debido a la disfunción. Las personas con dermatitis atópica tienden a tener una respuesta inmune inflamatoria sesgada, y su piel se irrita fácilmente por fragancias y alérgenos (41).

1.1.1.3 Hipodermis

Tras la dermis se encuentra la hipodermis, llamada también tejido subcutáneo (**Figura 1**). Esta es la capa más profunda de la piel y contiene lóbulos adiposos formados en su mayoría por adipocitos, están separados por tabiques fibrosos compuestos de grandes vasos sanguíneos, neuronas sensoriales, folículos pilosos y colágeno. El panículo varía en grosor según el sitio de la piel. El componente principal esta capa es el triglicérido, compuesto de ácido oleico y ácido palmítico. El tejido subcutáneo sirve de almacén de energía, además de aislante térmico y de protector mecánico frente a golpes (3,28,42).

1.1.2 Factores de hidratación de la piel

El agua es absolutamente esencial para el funcionamiento normal de la piel y especialmente de su capa externa, el estrato córneo. La pérdida de agua de la piel debe regularse cuidadosamente, una función que depende de la naturaleza compleja del estrato córneo. La retención de agua en esta capa depende de dos componentes principales, por una parte, de la presencia de agentes higroscópicos naturales dentro de los corneocitos (denominados colectivamente “Factores de hidratación natural”), y por otra parte, de los lípidos intercelulares dispuestos de manera ordenada para formar una barrera frente a la TEWL. El contenido de agua del estrato córneo es necesario para la maduración adecuada de esta capa y controlar la descamación de la piel. El aumento de la TEWL deteriora las funciones enzimáticas requeridas para la descamación normal que resulta en la apariencia visible de la piel seca, áspera y descamada (43–46).

Existen estudios recientes sobre los complejos mecanismos de hidratación de la piel. En particular, se ha descubierto que el glicerol existe en el estrato córneo como un humectante endógeno natural, además de ser un intermediario importante del metabolismo energético y un sustrato para la biosíntesis de varios lípidos (47). El ácido hialurónico, que se ha considerado uno de los principales componentes dérmico, se encuentra en la epidermis y juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura normal del estrato córneo y la función de barrera epidérmica. Por otro lado, se ha descubierto la existencia de la proteína transportadora de agua, acuaporina 3 (AQP3), en la epidermis, que junto con la presencia de estructuras de unión ajustadas entre el estrato granuloso y el estrato córneo han aportado nuevos conocimientos sobre los mecanismos de distribución y barrera del agua de la piel. El transporte de glicerol mediado por AQP3 está involucrado en el metabolismo de los lípidos en la piel y su seboregulación, así como en la regulación de la proliferación y diferenciación de los queratinocitos (46,48–51).

1.1.2.1 Papel de la AQP3

La AQP3 es un transportador de membrana de agua y glicerol expresado en membranas plasmáticas en los queratinocitos de la capa basal de la epidermis en la piel normal. La expresión de AQP3 en la piel humana aumenta en respuesta al estrés de la piel en enfermedades como el eccema atópico, frente a diversos agentes como el ácido retinoico y en los carcinomas de piel. Los ratones *knockout* AQP3 han reducido el contenido de agua del estrato córneo y la elasticidad en comparación con los ratones control, así como la cicatrización de heridas y la biosíntesis epidérmica. El transporte reducido de glicerol AQP3-dependiente en esta epidermis deficiente parece ser el responsable de estas carencias, como lo demuestra el contenido reducido de glicerol en la epidermis y el estrato córneo en ratones *knockout* AQP3. Existen estudios que ponen de manifiesto el importante papel de la AQP3 en la proliferación epidérmica y la generación de tumores en la piel (52–55).

1.1.3 Envejecimiento de la piel

El envejecimiento cutáneo es inducido por factores intrínsecos y extrínsecos. Por una parte, el envejecimiento intrínseco es un proceso fisiológico inevitable que resulta en piel delgada y seca, arrugas finas y atrofia dérmica gradual. El envejecimiento intrínseco se caracteriza por 3 características: atrofia de la dermis debido a la pérdida de colágeno, degeneración en la red de fibras elásticas y pérdida de hidratación. Por otra parte, el envejecimiento extrínseco es generado por factores ambientales externos como la contaminación del aire, el tabaquismo, la mala nutrición, la exposición al sol o la acción de otras sustancias químicas, lo que resulta en arrugas más gruesas, una pérdida de elasticidad, laxitud y apariencia rugosa. En particular, la exposición a largo plazo a la radiación UV solar es el factor principal del envejecimiento extrínseco de la piel y se conoce como fotoenvejecimiento. La radiación UV induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el daño del ácido desoxirribonucleico (ADN), lo que lleva a una mayor producción de metaloproteinasas (MMP), una menor producción de colágeno en los queratinocitos y fibroblastos, además de afectar a la degradación de la elastina, acelerando así el envejecimiento de la piel al inducir la degradación de la matriz extracelular. Los últimos avances en la investigación de los mecanismos moleculares que conducen a estos cambios posibilitan la aparición de nuevas estrategias de tratamiento (56–59).

1.1.3.1 Colágeno

Los cambios cuantitativos y estructurales en las fibras de colágeno son las principales modificaciones que se encuentran en la piel envejecida. A diferencia de la piel joven, que tiene abundantes fibrillas de colágeno intactas, compactas y bien organizadas, las fibrillas de colágeno en la piel envejecida están fragmentadas y distribuidas en forma gruesa. Se ha demostrado que el aumento de la degradación del colágeno y la reducción de la biosíntesis del colágeno están involucrados en esta homeostasis aberrante, lo que resulta en una deficiencia neta de colágeno (60–62).

Existen estudios que ponen de manifiesto que el colágeno tipo I disminuye en la piel envejecida, debido al aumento de su degradación (63). Diversas MMP, serina proteasas y otros tipos de proteasas participan en esta actividad de degradación (56). Las MMP son una familia de endopeptidasas que pueden degradar las proteínas de la matriz extracelular. Las MMP se pueden clasificar en cinco subgrupos principales: colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13); gelatinasas (MMP-2 y MMP-9); estromelisininas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11); matrilisinas (MMP-7 y MMP-26); y MMP de membrana (MMP-14, MMP-15 y MMP-16). La MMP-1 es la principal proteasa que inicia la fragmentación de las fibras de colágeno (64,65). Después de la escisión por MMP-1, el colágeno puede degradarse aún más por MMP-3 y MMP-9. En la piel, la principal fuente de MMP son los queratinocitos epidérmicos y los fibroblastos dérmicos, aunque las MMP también pueden ser producidas por células endoteliales e inmunocitos (61,66).

1.1.3.2 Elastina

Las fibras elásticas son componentes críticos del tejido conectivo que proporcionan elasticidad y resistencia a la piel y otros tejidos. Estas fibras están compuestas de elastina y una serie de proteínas microfibrilares asociadas a la elastina que se ensamblan en una red de fibra compleja en un proceso de múltiples pasos. Para la biogénesis de las fibras elásticas funcionales se requieren múltiples procesos celulares, incluida la función mitocondrial, moléculas específicas en las vías secretoras y la producción ordenada temporal y espacialmente de componentes de la fibra elástica. Durante la fibrillogénesis de elastina, los polipéptidos de tropoelastina recién sintetizados se yuxtaponen, y su asociación se estabiliza mediante la formación de reticulaciones intermoleculares covalentes llamadas desmosinas. Las anomalías en estos procesos, así como la degradación de estas fibras, pueden conducir a la pérdida de fibras elásticas funcionales, lo que implica un envejecimiento de la piel, o incluso la aparición de patologías cutáneas (59,67). Las MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12, serina proteasas de neutrófilos, catépsina G y elastasa de leucocitos humanos juegan un papel fundamental en la descomposición de la elastina (57).

1.1.3.3 Fibronectina

Existen otras moléculas, aunque en diferente proporción que funcionan como componentes esenciales de la matriz extracelular. La fibronectina con su estructura multidominio desempeña un papel organizador clave en el ensamblaje de la matriz, ya que forma un puente entre los receptores de la superficie celular, por ejemplo, las integrinas y los compuestos tales como el colágeno, los proteoglicanos y otras moléculas de adhesión, así como la elastina con excelentes propiedades mecánicas, que dan soporte y ayudan a conferir a la piel sus propiedades elásticas (68–70).

1.1.3.4 Especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres se consideran los principales contribuyentes al proceso de envejecimiento de la piel a través de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (71). El estado de desequilibrio en las reacciones de oxidación-reducción se conoce como estrés oxidativo. El estrés oxidativo que ocurre en las células puede conducir a la oxidación de los fosfolípidos de la membrana celular, lo que resulta en la distorsión de la vía de señalización transmembrana (72). El estrés oxidativo también contribuye al aumento de la oxidación de macromoléculas, como los lípidos celulares, las proteínas y el ADN, causando disfunción celular con la edad. La acumulación relacionada con la formación de agregados de proteínas alteradas, dañadas y oxidadas puede conducir al envejecimiento. El daño proteico oxidativo es el signo molecular más común del envejecimiento y se observa en la piel fotodañada a través del daño celular mediado por ERO en las capas superiores de la piel. En una piel envejecida es posible observar la alteración del gradiente de calcio epidérmico debido a los cambios en la composición de la envoltura del estrato córneo, lo que resulta en una función barrera epidérmica reducida (61,72,73).

En general, el aumento de la producción de ERO activan la familia de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), compuesta por la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), p38 y la quinasa c-Jun N-terminal (JNK). Esta activación induce un

factor de transcripción, la proteína activadora 1 (AP-1), que desempeña un papel esencial en la regulación transcripcional de MMP-1, MMP-3, MMP-9 y MMP-12. El factor nuclear κ B (NF- κ B) es otro factor de transcripción activado mediante mecanismos de fosforilación por ERO, el cual juega también un papel importante en el envejecimiento de la piel (58,61,74,75).

El factor de transcripción NF- κ B es el regulador maestro de la respuesta inflamatoria y es esencial para la homeostasis del sistema inmune. NF- κ B regula la expresión de citocinas, factores de crecimiento y genes que regulan la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la senescencia celular y la inflamación. El papel fundamental que juega NF- κ B en procesos fisiológicos clave lo convierte en un factor importante para determinar estados patológicos. Dada su importancia celular, numerosos estudios han mostrado la contribución crucial de la fosforilación de NF- κ B ((p)-NF- κ B) para controlar la transactivación génica dirigida por NF- κ B. Es importante destacar que la fosforilación de NF- κ B controla la transcripción del gen de una manera específica, lo cual ofrece nuevas oportunidades terapéuticas para dirigirse selectivamente a NF- κ B (74–76).

Las células poseen distintos mecanismos para hacer frente a las ERO. En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio celular en cuanto a la generación de ERO, ya que las células eucariotas tienen varios mecanismos de defensa antioxidantes, que incluyen enzimas y otros antioxidantes. Hay cinco tipos principales de enzimas antioxidantes intracelulares primarias: Cu/Zn-Superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD: SOD1) en el citosol, Superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD: SOD2) en la matriz mitocondrial, catalasa, glutatión peroxidasa (GTX) y glutatión reductasa. Las SOD dispersan el superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, mientras que las otras enzimas convierten el peróxido de hidrógeno en H₂O y O₂. Además de las enzimas antioxidantes, los antioxidantes de bajo peso molecular y no enzimáticos también están involucrados en la protección de los componentes intracelulares contra las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, cuando la sobreproducción celular de ERO compromete la capacidad antioxidante intrínseca, lo cual produce estrés oxidativo y provocando daño a las biomoléculas de las células y tejidos (77). El factor nuclear derivado de eritroides 2 (Nrf2) es un factor de transcripción crucial que protege contra

los oxidantes. Nrf2 está regulado negativamente por la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1) presente en el citoplasma, proporcionando así una defensa antioxidante inducible. Las propiedades antioxidantes de Nrf2 se ejercen regulando la transcripción de proteínas antioxidantes (78).

La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (NOX) está reconocido como un jugador clave en la homeostasis intracelular de ERO y como uno de los principales productores de ERO dentro de la célula. Inicialmente fue descubierta como la enzima responsable del estrés oxidativo por el cual los leucocitos atacan a las bacterias (79), ahora se considera que las NADPH oxidasas (NOX) juegan un papel importante en casi todos los tipos de tejidos. Existen distintas isoformas de este tipo de enzimas. Los mecanismos de activación y la distribución tisular de los diferentes miembros de la familia son marcadamente diferentes. Las funciones fisiológicas de las enzimas de la familia NOX incluyen la defensa del huésped, el procesamiento postraduccional de proteínas, la señalización celular, la regulación de la expresión génica y la diferenciación celular. Las enzimas NOX también contribuyen a una amplia gama de procesos patológicos (80).

Existen estudios que sugieren la existencia de un circuito regulador de retroalimentación negativa entre la NADPH oxidasa 4 (NOX4) y Nrf2. En condiciones homeostáticas normales, NOX4 genera aniones superóxido, así como peróxido de hidrógeno, que a su vez activan Nrf2 oxidando los sensores de cisteína e inactivando Keap1. Con la activación de Nrf2 se inhibe la transcripción de NOX4 con el fin de disminuir la producción de ERO, es decir, existen roles esenciales y opuestos en la señalización de NOX4 y Nrf2. Todos los estudios coinciden en el papel regulatorio que tiene Nrf2 sobre NOX, por lo que una desestabilización de este equilibrio bioquímico podría resultar en una superproducción de ERO, lo que generaría una situación de estrés oxidativo en la célula (78,81–83).

1.1.3.5 Alteraciones vasculares

La angiogénesis, proceso de generar nuevos vasos sanguíneos, se ve afectada por diversas condiciones fisiológicas y patológicas en la piel. Con el envejecimiento natural de la piel, los vasos sanguíneos cutáneos sufren alteraciones pronunciadas. Se ha observado que con la edad existe una reducción de la microvasculatura cutánea. La piel humana está expuesta diariamente a la radiación solar ultravioleta (UV), rayos infrarrojos y calor, y se sabe que estos estímulos inducen la angiogénesis de la piel. Curiosamente, aunque la radiación UV aguda estimula la angiogénesis de la piel, los vasos sanguíneos cutáneos disminuyen en la piel con fotodaño crónico. Se sugiere que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el principal factor de angiogénesis en la piel. Durante la angiogénesis de la piel, varios estímulos, como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) y la hipoxia, inducen la expresión VEGF en los queratinocitos epidérmicos, lo que aumenta la vascularización de la dermis. Por lo tanto, la disminución relacionada con la edad en el número de vasos sanguíneos dérmicos se debe a un deterioro de la señalización de VEGF. Se puede suponer que la disminución en el suministro de sangre de la dermis que ocurre con la edad es una causa de una disminución en el número y el grupo proliferativo de células dérmicas (84–86).

La angiogénesis requiere la elaboración de óxido nítrico derivado del endotelio. Los factores angiogénicos inducen la liberación de óxido nítrico de las células endoteliales, lo que media en una multiplicidad de procesos involucrados en la angiogénesis. Estos procesos modulados por óxido nítrico incluyen la supervivencia, proliferación, migración e interacción con la matriz extracelular de las células endoteliales. Los trastornos de la vía de la óxido nítrico sintasa deterioran la angiogénesis. El óxido nítrico juega un papel crítico en la angiogénesis inducida por VEGF y la hiperpermeabilidad vascular. La óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) es una molécula esencial en la mediación de la angiogénesis inducida por VEGF-A y la función endotelial mediante la producción de óxido nítrico. Además, el nivel de proteína de eNOS se regula en respuesta al VEGF-A (87,88).

1.1.3.6 Estudios *in vivo* sobre el envejecimiento de la piel

Existen estudios realizados sobre humanos en los cuales mediante diferentes dispositivos es posible determinar numerosos parámetros relacionados con el estado de la piel, como son la hidratación, el nivel de sebo, la TEWL, el color, la elasticidad, la textura y el grosor. A medida que la piel envejece, se observan cambios en el grosor de la piel y la calidad de la epidermis y la dermis. Los avances tecnológicos han permitido una caracterización más objetiva y precisa del envejecimiento de la piel humana (89–94).

La piel va aumentando su grosor a lo largo de los primeros años de vida y se va adelgazando progresivamente a lo largo de la vida adulta a un ritmo que se acelera con la edad, aunque el número de capas celulares permanece estable (95–97). Existen estudios que avalan que tanto la dermis como la epidermis disminuye en grosor con la edad, sobre todo en zonas fotoexpuestas (98).

Los melanocitos enzimáticamente activos también van disminuyendo a lo largo de la vida, lo que resulta en una pigmentación desigual en la piel de los ancianos. De la misma forma existe una disminución paralela en el número de células de Langerhan, lo que conduce a un deterioro de la inmunidad cutánea. Los estudios ponen de manifiesto que la producción lipídica en la piel disminuye con el aumento de la edad, de la misma manera, se observa una reducción de los factores de hidratación natural existentes en las capas de la piel, a pesar de que no existen resultados concluyentes en los estudios *in vivo*, se observa una tendencia a su disminución con la edad. Se constatan diferencias entre hombres y mujeres, pero sobre todo diferencias dependiendo de la zona anatómica donde se realiza el estudio. La cantidad de sebo en la piel disminuye de manera notable en mujeres tras sufrir el fenómeno conocido como menopausia (92,98–106). El contenido de agua en la piel envejecida, particularmente en el estrato córneo, es más bajo que el de la piel más joven, esto pone de manifiesto que con el envejecimiento la piel tiende a secarse, lo que comporta una mayor tendencia a la xerosis. Los cambios en la composición de aminoácidos en la piel envejecida también

reducen la cantidad de factor de hidratación natural cutáneo, disminuyendo así su capacidad de retención de agua (98,105,107,108).

En relación a la función barrera de permeabilidad de la epidermis, no parece verse afectada de manera significativa, en condiciones normales, con el envejecimiento de la piel (109). Sin embargo, diferentes estudios concluyen que la TEWL sigue una tendencia a disminuir con la edad, una observación que se cree que puede ser debida a la reducción del contenido de agua de la piel envejecida, siempre existiendo discrepancias entre distintas zonas anatómicas (110–112). En términos generales, se podría decir que las personas ancianas pierden menos agua porque tienen menos agua que perder, así mismo, también se han observado cambios en la recuperación de la función de barrera en los sujetos de mayor edad (98).

En cuanto a la elasticidad de la piel, existen dispositivos capaces de determinar diferentes parámetros asociados a la recuperación de la piel tras aplicarle una fuerza de succión. Casi en su totalidad, los estudios realizados *in vivo* en humanos ponen de manifiesto que existe una pérdida notable tanto en la elasticidad como en la firmeza de la piel, así como en parámetros asociados a estos. Existen diferencias en cuanto a la elasticidad y la firmeza de la piel tanto entre sexos como entre zonas anatómicas de la misma persona, pero todos los estudios hablan de una tendencia a la disminución de estos parámetros con la edad. Esta pérdida se atribuye principalmente a la desorganización severa de la red de fibras elásticas y a la disminución de los haces de fibras de colágeno, que ocurren con el avance de la edad (92,98,102,113–118).

1.1.4 Producción de melanina

El proceso de producción de los pigmentos de melanina es conocido como melanogénesis, estos pigmentos son producidos con mayor frecuencia por las células llamadas melanocitos. Los melanocitos son células dendríticas del neuroectodermo. Los melanoblastos, las células precursoras de los melanocitos, son células no pigmentadas que se originan en las células de la cresta neural embrionaria. Los melanoblastos que se convierten en melanocitos se encuentran predominantemente en la capa basal de la

epidermis de la piel y los folículos pilosos (21,24,119–122). La función principal de los melanocitos es la producción del pigmento melanina. Los melanocitos en la piel están rodeados de queratinocitos, a los que transfieren su pigmento de melanina. La estructura molecular de la melanina es muy adecuada para absorber la luz UV y visible y, por lo tanto, sirve como protección contra la radiación UV de la luz solar. Los melanocitos también se encuentran en otros tejidos del cuerpo, como el sistema nervioso central y cardiovascular, la úvea del ojo, la cóclea e incluso el tejido adiposo (123–126).

La melanogénesis es un proceso complejo con diferentes etapas. Cuando se altera, puede producir diferentes tipos de defectos de pigmentación, que se clasifican como hipo o hiperpigmentación, en función de si existe una disminución (hipo) o un aumento (hiper) de la producción de la melanina, independientemente si éste se produce de formar irregular. Existen varias dermatosis asociadas con defectos de pigmentación que pueden ser congénitas o adquiridas, permanentes o temporales, sistémicas o con restricción cutánea. Estas dermatosis tienen un impacto importante en la calidad de vida del paciente, puesto que su tratamiento puede ser insatisfactorio, las industrias farmacéutica y cosmética han estado buscando continuamente nuevas soluciones. El estudio de los mecanismos de melanogénesis ayudan a explicar los defectos de pigmentación y permiten el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas. (123,127–132)

En los melanocitos se encuentran los melanosomas, orgánulos subcelulares de tipo lisosoma que sintetizan dos tipos de pigmentos de melanina: eumelanina (polímero insoluble marrón-negro/oscuero), que se encuentra en la piel oscura y el cabello negro, y feomelanina (polímero soluble rojo-amarillo), que está relacionado con el cabello rojo piel pecosa. La melanogénesis involucra una serie compleja de reacciones químicas catalizadas enzimáticamente. Existen tres enzimas importantes en la mediación de la melanogénesis: la tirosinasa (TYR), la proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TYRP-1) y la TRP-2 (también conocida como dopacromo tautomerasa, DCT), en particular, TYR es exclusivamente necesaria para la melanogénesis. Un aumento en la actividad de estas

enzimas está directamente relacionado con un aumento en la producción de melanina, de la misma manera, se conoce que la L-tirosina induce la síntesis de proteínas relacionadas con la TYR y por tanto con la melanogénesis. Existen numerosos estudios que utilizan estas enzimas como marcadores a la hora de estudiar el proceso de melanogénesis (126,133–138).

El inicio y la extensión de la pigmentación o la melanogénesis pueden estar influenciados por una variedad de factores extrínsecos e intrínsecos. Los factores extrínsecos incluyen radiación ultravioleta tipo B (UVB) y medicamentos, mientras que los factores intrínsecos incluyen moléculas secretadas por los queratinocitos o melanocitos circundantes, fibroblastos, células inflamatorias, neurales o endocrinas que se ven afectadas por afecciones como pueden ser el embarazo y la diabetes, entre otras (127,133,139,140).

El vínculo paracrino entre los melanocitos y los queratinocitos dentro de la epidermis es muy importante en la melanogénesis inducida por UVB (285–320 nm). En la ruta de la melanogénesis inducida por radiación UVB, se ha observado que en la epidermis existen tres pasos principales responsables del aumento de la melanogénesis. Estos procesos incluyen la proliferación de melanocitos, la síntesis de melanina y la transferencia de melanosomas a los queratinocitos. En los dos primeros procesos, son secretadas por los queratinocitos o melanocitos varias citocinas paracrinas y autocrinas importantes en la regulación de la melanogénesis. Tras la exposición a la radiación UVB, los queratinocitos inducen o secretan potentemente varias citocinas, pocas de las cuales son mitógenos conocidos para los melanocitos humanos. Existe una gran cantidad de factores solubles conocidos como estimuladores de la melanogénesis producidos a partir de queratinocitos o melanocitos como son la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH), endotelina-1 (EDN-1), prostaglandina E2, prostaglandina F2 α , óxido nítrico e histamina entre otros. Por otro lado, los efectos de las citocinas en la melanogénesis son más complejos, por ejemplo, las interleucinas (IL-) 1 α y 1 β , y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) también estimulan la melanogénesis (133,141).

1.1.5 Citocinas inflamatorias en la piel

La piel se considera como el límite entre el cuerpo y el mundo externo y funciona como una barrera entre los dos. En esta capacidad, ha evolucionado para ser una parte integral del sistema inmune innato y adaptativo. Existen estudios en los que además de describir mecanismos de inflamación de la piel y procesos que conducen a sus manifestaciones clínicas, se ha concretado en la actividad inmunológica que ocurre en ausencia de señales inflamatorias visuales. Se debe destacar la importancia de la inflamación subclínica en la piel humana y su relevancia para la vigilancia inmune innata en condiciones fisiológicas. Las ERO generadas por procesos metabólicos o inflamatorios, la radiación UV u otras radiaciones oxidantes pueden dañar las células, iniciando cascadas proinflamatorias. Además de servir como componentes estructurales de la piel, los queratinocitos tienen una actividad inmunológica significativa: secretan citocinas proinflamatorias y mediadores, incluyendo las IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), entre otros factores estimulantes celulares (142,143). Así mismo, las citocinas desempeñan un papel central en los signos clínicos visibles del envejecimiento. Por ejemplo, los niveles de IL-1 aumentan con la edad y promueven la inflamación de la piel, lo que acelera procesos celulares relacionados con el envejecimiento celular, y la IL-6, aumenta después de la menopausia y se asocia con la formación de arrugas en la piel (58,144–146).

La sobreexpresión de las principales citocinas proinflamatorias epidérmicas como son la IL-1 α y IL-1 β se correlaciona positivamente con la exacerbación de síntomas y la progresión de la enfermedad en psoriasis, dermatitis atópica, dermatosis neutrofilicas, fototoxicidad de la piel y cáncer de piel (147). Las IL-6 y IL-8 median una amplia gama de respuestas inflamatorias e inmunes. Su expresión es elevada en enfermedades inflamatorias o inmunodeficientes, como son la psoriasis o artritis reumatoide (148–150).

Los métodos no invasivos, como la espectroscopía de fluorescencia, las imágenes espectrales, los ultrasonidos y la espectroscopía de reflectancia difusa, así como la extracción mediante láminas adhesivas mínimamente invasiva, se pueden utilizar para evaluar marcadores inflamatorios subclínicos *in vivo*, incluidos eritema o pigmentación, tasa de proliferación de células epidérmicas y concentraciones de citocinas. Los productos para el cuidado de la piel, adecuadamente formulados, pueden ayudar a mantener la integridad de la barrera cutánea y mejorar sus capacidades. En el futuro, la evaluación de la inflamación subclínica puede ayudar a prevenir afecciones inflamatorias agudas o crónicas de la piel (151).

1.2 TAXANOS

Los taxanos, como el paclitaxel y el docetaxel, son fármacos quimioterapéuticos ampliamente empleados en clínica. Se han utilizado para tratar muchas formas de cáncer, incluidos los cánceres de mama, ovario y pulmón. Los taxanos pertenecen al grupo químico de los terpenos o isoprenoides. El paclitaxel se aisló del árbol tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) en 1971 y el docetaxel, un taxano de segunda generación, es un análogo de taxano semisintético del tejo europeo (*Taxus baccata*) identificado aproximadamente 20 años después. El principal mecanismo de estos fármacos es la inhibición de la función del microtúbulo. La estructura del paclitaxel puede verse en la **Figura 4**, y la del docetaxel en la **Figura 5** (152–157).

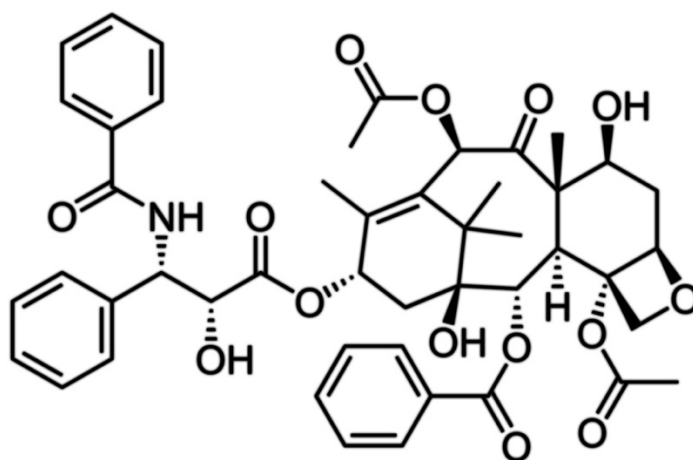


Figura 4. Estructura química del paclitaxel (157).

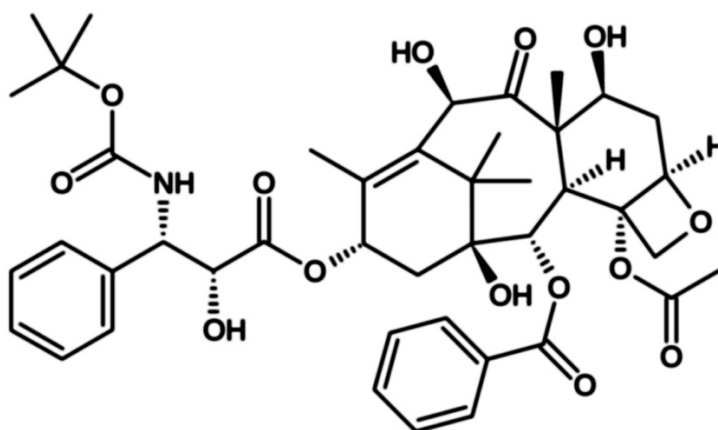


Figura 5. Estructura química del docetaxel (157).

1.2.1 Mecanismo de acción

El principal mecanismo de acción de estos fármacos como antineoplásicos está directamente relacionado con la inhibición de la función de los microtúbulos celulares, afectando directamente a la división celular y desencadenando procesos apoptóticos (155).

Los microtúbulos celulares muestran una forma de no equilibrio denominada inestabilidad dinámica que es esencial para la división celular. Esta inestabilidad dinámica está regulada por proteínas asociadas a microtúbulos. En un estado no fosforilado, las proteínas asociadas a microtúbulos se unen y estabilizan los microtúbulos, lo que conduce a la muerte celular (153,156).

Los microtúbulos están compuestos de α -tubulina y heterodímeros de β -tubulina. Los taxanos bloquean la división celular al unirse a la β -tubulina, estabilizar los microtúbulos y provocar la muerte celular. Además, los estudios *in vitro* han demostrado que los taxanos inducen la fosforilación y la apoptosis a través de Bcl2 (familia de proteínas derivadas del inglés *B-cell lymphoma 2*), necesitando para ello concentraciones mucho más bajas con docetaxel que con paclitaxel (152,158–160).

Como ya se ha comentado, los microtúbulos son polímeros intrínsecamente dinámicos. Estos son capaces de crecer y acortarse por la asociación no covalente reversible y la disociación de los heterodímeros α/β -tubulina en sus dos extremos. Las subunidades de α -tubulina y β -tubulina tienen cada una un sitio de unión a guanósín trifosfato (GTP), denominado sitio no intercambiable en α -tubulina y sitio intercambiable en β -tubulina. Durante la asociación del heterodímero de α/β -tubulina a los extremos de los microtúbulos, el GTP en β -tubulina se hidroliza a guanósín difosfato (GDP), y este GDP resultante en la β -tubulina no puede intercambiarse. Cuando los microtúbulos se despolimerizan, se liberan los heterodímeros α/β -tubulina y el GDP de la β -tubulina puede intercambiarse a GTP. En cambio, aunque la α -tubulina también se une a una molécula de GTP, la GTP está unida en el sitio no intercambiable y, por tanto, no puede hidrolizarse a GDP durante la adición de heterodímero de tubulina a los extremos de los microtúbulos. Esta propiedad exclusiva de unión e hidrólisis de GTP en α -tubulina y β -tubulina le da a los microtúbulos dos propiedades dinámicas inusuales, la inestabilidad dinámica y el intercambio rotatorio (152,157).

Esta estabilización de los microtúbulos en la que se basa el mecanismo de acción de los taxanos resulta en la detención del ciclo celular en la fase G2/M, inhibiendo así la mitosis. Si bien el paclitaxel y el docetaxel comparten muchas características estructurales comunes, su farmacología y farmacocinética difieren en algunos aspectos, lo que potencialmente explica su diferente actividad y sus perfiles de toxicidad. En consecuencia, en algunos pacientes, los tumores sólidos con resistencia al paclitaxel han demostrado ser sensibles al docetaxel. El docetaxel inhibe una mayor afinidad por la β -tubulina, apuntando a la organización del centrosoma y actuando sobre las células en tres fases del ciclo celular (S/G2/M), mientras que el paclitaxel causa daño celular al afectar el huso mitótico en las fases G2 y M del ciclo celular (153,155,161).

El papel eficaz del paclitaxel en este proceso de estabilización de los microtúbulos lo desempeña al activar el punto de control del ensamblaje del huso que evita la progresión del ciclo celular. En particular, el fármaco promueve la separación de los cromosomas debido a la presencia de cinetocoros que no muestran una unión sólida a los microtúbulos, alterando también la forma de la membrana y los fenómenos de

transporte celular, así como afectando a la regulación de factores de transcripción. Sin embargo, los destinos celulares tras el tratamiento con paclitaxel pueden ser diferentes. Un escenario supone la muerte celular en el curso de la mitosis, mientras que otro incluye una salida de la mitosis sin una segregación cromosómica adecuada (el llamado deslizamiento mitótico) que conduce a la formación de una célula G1 tetraploide. Como resultado del deslizamiento, las células pueden morir, permanecer detenidas por el crecimiento o sufrir más divisiones. Los mecanismos que determinan el resultado todavía no han sido explorados con exactitud (162,163).

Una de las formas mejor reconocidas de eliminación de células cancerosas en el tratamiento con paclitaxel es la apoptosis que se desarrolla en un mecanismo relacionado con las mitocondrias. Las células cancerosas sometidas al medicamento se caracterizan por una disminución del potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) que conduce a la apertura del canal de poros de transición de permeabilidad, además de conducir a la liberación de citocromo C (CytC) induciendo la apoptosis. Finalmente, la muerte apoptótica es ejecutada por las caspasas efectoras activadas. Todos estos procesos desencadenados por el paclitaxel y el docetaxel pueden visualizarse de manera esquemática en la **Figura 6** (163,164).

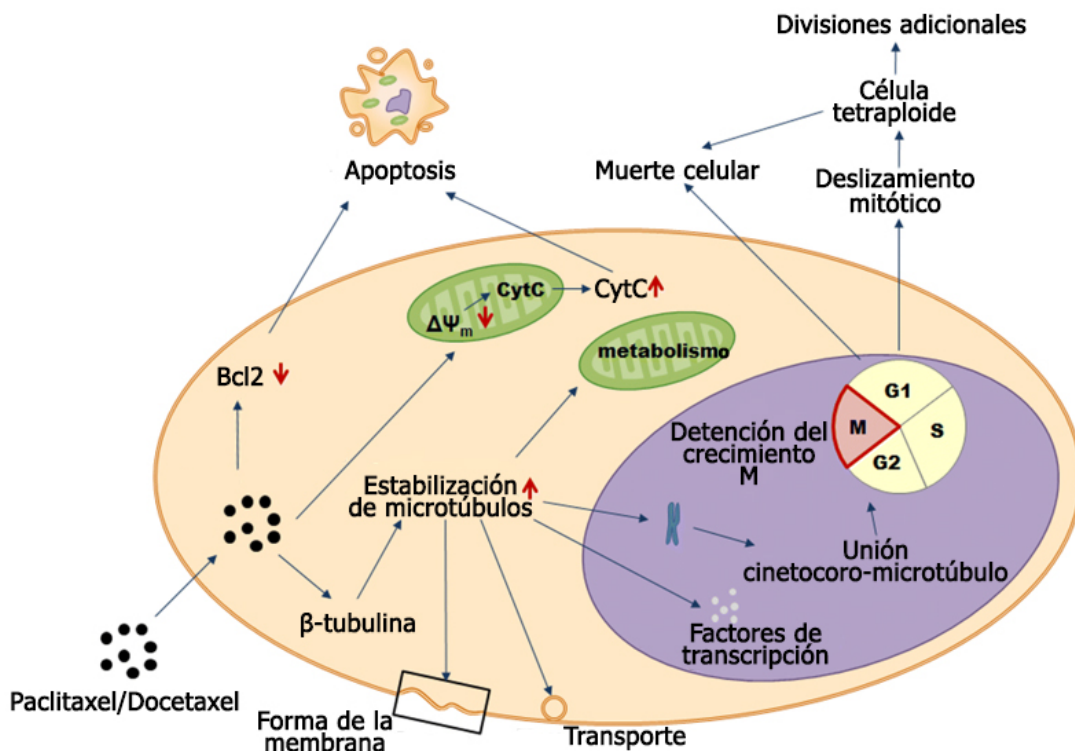


Figura 6. Diagrama esquemático del mecanismo de acción del paclitaxel y docetaxel. Imagen adaptada de Mikuta-Pietrasik y col., 2019.

La inducción de genes moduladores apoptóticos por paclitaxel parece ser independiente de la estabilización de los microtúbulos. Puede deberse a la regulación de la transcripción de diferentes genes, como las proteínas de respuesta al daño del ADN, las citocinas o las proteínas involucradas en el control de la proliferación celular, la apoptosis y la inflamación. Diversos estudios han propuesto distintos mecanismos diferentes que desembocan en la apoptosis. Por una parte, el paclitaxel induce la activación de Raf1 (protooncogén serina/treonina-proteína quinasa), que es responsable del control apoptótico celular a través de la supresión de Bcl2. Por otro lado, se ha visto que en ausencia de participación de la quinasa Raf1 existe inducción de la apoptosis bajo la influencia de las proteínas p53 y p21 (165,166). La proteína p53 es un supresor tumoral importante, regula la proliferación y la apoptosis, y su mutación ocurre en la mayoría de los cánceres humanos. En células normales, el daño en el ADN aumenta los niveles de p53, que luego activa una detención del ciclo celular G1 mediada por la proteína p21, para promover los mecanismos de reparación del daño del ADN o la apoptosis y limitar naturalmente la proliferación de clones celulares genéticamente transformados (166–169).

El paclitaxel también ejerce su mecanismo de acción mediante la activación de múltiples vías de transducción de señales, que pueden estar asociadas con la señalización proapoptótica. Las rutas asociadas con el paclitaxel son la ruta dependiente de TLR4 (Del inglés *Toll-like receptor 4*), la quinasa N-terminal cJun (JNK), las proteínas MAPK, el NF- κ B, el transductor de señal Janus quinasa (JAK) y los transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT). Una de las vías para la inducción de apoptosis es a través de la ruta de las proteínas MAPK, lo que produce la desfosforilación de las proteínas proapoptóticas Bad y Bax, la fosforilación de Bcl2, y la inducción de apoptosis. Bad y Bax (promueven la apoptosis) y Bcl2 (suprime la apoptosis) son proteínas reguladoras que son miembros de la familia Bcl2 y están involucradas en la muerte celular programada. La inducción de citocinas y proteínas proinflamatorias conducirá al efecto inmunomodulador del paclitaxel a dosis bajas y a la muerte celular a dosis más altas. Los cambios que ocurren en estas vías también son responsables del desarrollo de resistencia al paclitaxel (166,170–175).

El paclitaxel también exhibe una fuerte actividad inhibidora angiogénica en células cancerígenas. Existen estudios que demuestran la inhibición del proceso de angiogénesis al suprimir la expresión de VEGF. También se ha informado que el paclitaxel induce la generación de ERO y aumenta la producción de radicales libres al mejorar la actividad de las NOX, que contribuye al estrés oxidativo y puede desempeñar un papel importante sobre la actividad anticancerígena de paclitaxel, entre otros efectos. Sin embargo, la relación del estrés oxidativo con el mecanismo de citotoxicidad general del paclitaxel no está del todo establecida (176–181).

La farmacocinética de los taxanos es compleja y se complica por sus diferentes formulaciones. El paclitaxel y el docetaxel se metabolizan principalmente en el hígado, su ruta principal de eliminación del fármaco original y el metabolito hidroxilado es a través de la excreción biliar a través de las heces, y ambos taxanos tienen formulaciones diferentes (155,182).

1.2.2 Efectos biológicos de los taxanos en células normales

La primera línea de cambios que parece ocurrir en células normales expuestas a compuestos quimioterapéuticos son anomalías en su metabolismo general, en particular a lo que concierne a la energía celular. Los estudios que emplean fibroblastos estromales normales sometidos a fármacos quimioterapéuticos comunes, incluidos cisplatino, carboplatino y paclitaxel, mostraron que las células mantenidas bajo dicho régimen consumen mucha más glucosa y generan más lactato, que luego se libera a través del transportador 4 de monocarboxilato de protón unido por sobreexpresión (MCT4), que conduce a una acidificación aumentada del ambiente extracelular (183).

Se han observado numerosos efectos en células normales expuestas a taxanos, en concreto paclitaxel y docetaxel. Una de las características de los fibroblastos de la piel sometidos a paclitaxel y otros antineoplásicos es una inducción de su transformación hacia fibroblastos asociados al cáncer (FAC). Otros estudios demuestran que el tratamiento con paclitaxel mostró la producción de numerosos marcadores de

diferenciación hacia miofibroblastos, incluida la actina del músculo liso α (α SMA), la proteína de activación de fibroblastos (FAP), calponina, miosina, talina y vimentina (163,183,184).

En general, la adquisición de la condición FAC se aplica a los fibroblastos expuestos a paclitaxel y otros antineoplásicos, sin embargo, algunos efectos ejercidos por estos medicamentos difieren, lo que puede depender del tipo de células, tejidos y la concentración de los medicamentos utilizados. Por ejemplo, los fibroblastos intersticiales renales expuestos al paclitaxel mostraron el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y una expresión reducida de los indicadores α SMA, colágeno tipo I y otros indicadores de FAC. Los fibroblastos del estroma expuestos al paclitaxel exhiben una mayor producción de IL-6 y quimiocina ligando 5 (CCL5) (183–185).

Existen evidencias de que los FAC pueden contribuir a la formación de un ambiente favorable para la progresión tumoral en una ruta que involucra senescencia celular. Se sabe que los fibroblastos senescentes inician la tumorigénesis y alimentan la progresión de las células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo* (186,187). Se ha reconocido que paclitaxel induce senescencia también en las células endoteliales vasculares coincidiendo con la disminución de la actividad de la eNOS en estas células. Así mismo, está documentado un incremento de la apoptosis en células endoteliales debido a la acción de paclitaxel y docetaxel (163,188,189).

Los fibroblastos expuestos a paclitaxel también exhiben un aumento del estrés oxidativo. Se ha observado que el paclitaxel aumenta la generación de ERO y regula a la baja la actividad de varias enzimas antioxidantes en estas células, incluidas las SOD y la GTX (184,190). Las ERO generadas por células cancerosas tratadas con paclitaxel se acumulan principalmente fuera de las células, lo que conduce a daños letales también en células localizadas (180).

En definitiva, se han observado multitud de efectos biológicos desencadenados sobre células normales como son la estimulación de fenómenos inflamatorios, la inducción de senescencia y muerte celular, la síntesis de ERO, la modulación de la angiogénesis así como la inducción de metabolismo catabólico, entre otros (163).

En cuanto a los efectos del paclitaxel sobre queratinocitos humanos, los estudios realizados han sido escasos, algunos estudios hablan de la capacidad apoptótica del paclitaxel mediada por una vía que implica un aumento de la actividad de las caspasas 8 y 3. Otros estudios constatan que existe una reducción de la curación de arañazos sobre cultivo de queratinocitos humanos tratados con paclitaxel, así como sobre la piel del pez cebra, o ponen de manifiesto que el efecto del paclitaxel sobre la estabilización de los microtúbulos, en ratón, evitaría una correcta adhesión celular en la epidermis y por tanto se vería comprometida el efecto barrera de la piel. En cualquier caso, no se han realizado estudios sobre humano (191–193).

1.3 EFECTOS ADVERSOS DE LOS TAXANOS

Han sido descritos numerosos efectos adversos en clínica tras la aplicación de quimioterapias basadas en taxanos. La terapia con taxanos se asocia con efectos secundarios como fatiga, neuropatía periférica, mielosupresión, artralgias, mialgias y, sobre todo, reacciones cutáneas que pueden afectar negativamente la calidad de vida informada por el paciente. La neuropatía periférica en particular puede ser grave. Esta toxicidad es acumulativa a lo largo del transcurso de la terapia, puede ser una toxicidad limitante en cuanto a la dosis y puede conducir a la reducción o al cese de la terapia. Por lo tanto, actualmente se sabe que los tratamientos quimioterapéuticos mejoran los puntos finales clínicos como son la tasa de respuesta, el tiempo hasta el fracaso de la terapia y la supervivencia general, pero estos tratamientos también se asocian con preocupaciones que alteran la calidad de vida de los pacientes y que a veces son permanentes, como pueden ser el dolor y la discapacidad. Si se quiere tener una idea del beneficio general de la terapia, se debe valorar el equilibrio entre la eficacia del tratamiento y las toxicidades producidas por el mismo (194–196).

1.3.1 Efectos adversos relacionados con la piel

Una gran parte de los efectos adversos producidos por la quimioterapia basada en taxanos han sido registrados sobre la piel. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que los eventos adversos dermatológicos inducidos por taxanos ocurren en hasta en el 89% de los pacientes. El paclitaxel y el docetaxel se encuentran entre los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer más comunes implicados tanto en la alopecia inducida por quimioterapia, como en los efectos tóxicos en las uñas. No se deben pasar por alto las secuelas psicológicas y sobre la calidad de vida de los pacientes. De hecho, existen informes que plasman que un alto porcentaje de las mujeres con una neoplasia maligna ginecológica informaron que la alopecia inducida era el efecto adverso más traumático de la quimioterapia. Además, los taxanos pueden inducir cambios dermatológicos a través del efecto citotóxico directo. Existen pocos casos en los que las reacciones cutáneas producidas por la quimioterapia basada en taxanos hayan sido de gravedad y amenacen la vida del paciente, como han sido casos raros de eritema multiforme y necrólisis epidérmica tóxica entre otros (196–204).

A pesar de la prevalencia de efectos adversos dermatológicos y su asociación con el uso de taxanos, así como la presencia de posibles intervenciones preventivas, las revisiones formales o las pautas que detallan las estrategias a seguir son escasas (197).

1.3.1.1 Reacciones agudas relacionadas con la infusión

Una de las reacciones que pueden presentarse a la hora de la infusión parenteral del tratamiento quimioterapéutico son las reacciones inmediatas de hipersensibilidad. Aparecen durante o poco después de la infusión del tratamiento y se asocian con frecuencia a reacciones de hipersensibilidad. Las manifestaciones clínicas de este tipo incluyen diversos grados de urticaria, erupción morbiliforme, enrojecimiento, angioedema y prurito, que se presentan junto con signos sistémicos (por ejemplo, hipotensión, broncoespasmo, disnea, escalofríos y dolor de espalda) (205–208).

En estas reacciones de hipersensibilidad inmediatas el inicio suele darse muy rápido y se observa a los pocos minutos de comenzar la perfusión, tanto con paclitaxel como con docetaxel. La incidencia es de alrededor del 30% sin premedicación para ambos agentes, y parece estar en aumento en los últimos años. La reacción generalmente se observa durante el primer o segundo ciclo de tratamiento, y con frecuencia es de gravedad moderada (198,209–211).

Existen también reacciones de extravasación. La extravasación de fármacos quimioterapéuticos en tejidos blandos en las proximidades de un lugar de infusión puede ocurrir entre un 0,1% y un 6% de los pacientes. Esta extravasación puede provocar reacciones que suelen ser leves, pero también pueden ocurrir extravasaciones graves con este tipo de terapias. Estas reacciones generan una reacción inflamatoria local (edema, eritema y calor, entre otras) con flebitis en el punto de inyección o a lo largo de la vena, prurito, quemadura y tensión cutánea (212–215).

Los taxanos se consideran compuestos irritantes de manera general, pero también pueden producir una reacción vesicante, cuando un mayor volumen o concentración de fármaco se filtra en los tejidos blandos. Existe la posibilidad de que ocurran complicaciones graves, como necrosis o ulceración crónica. Se recomienda la infusión a través de un dispositivo de acceso venoso central, que reduce el riesgo de extravasación periférica (214,216–218).

1.3.1.2 Reacciones de toxicidad cutánea

Las erupciones maculopapulares son relativamente comunes en este tipo de tratamientos, especialmente con docetaxel. Las máculas y pápulas difusas pueden manifestarse como una erupción morbiliforme leve, y pueden asociarse con prurito y ardor que puede ir de moderado a severo. La erupción inducida por taxanos se encuentra predominantemente en lugares como los pliegues y zonas articulares, las áreas de contacto o debajo de apósitos y almohadillas (219–223). La presentación más característica es el desarrollo de parches intertriginosos inflamatorios bilaterales dolorosos en las regiones axilares e inguinales o pliegues del cuello, especialmente con

docetaxel como terapia adyuvante para el cáncer de mama. Con frecuencia se observa un síndrome concomitante de eritema periarticular tenar y onicólisis. También pueden aparecer este tipo de reacciones en el rostro. Suele desarrollarse varios días después del primer ciclo de tratamiento y se considera que es un efecto tóxico dependiente de la dosis. Las reacciones sobre las superficies extensoras de los brazos y las caras laterales de los muslos y las rodillas, de forma "inversa", también se ha descrito con paclitaxel como puede verse en la **Figura 7** (198,224).



Figura 7. Lesiones graves que afectan a la superficie extensora del codo durante un tratamiento con el fármaco paclitaxel (Sibaud y col. 2016).

El lupus eritematoso inducido por fármacos también es una afección común en estos casos, el cual puede ser inducido tanto por paclitaxel como por docetaxel, manifestándose con mayor frecuencia como lupus eritematoso cutáneo subagudo. Este último tipo de lupus es clínicamente indistinguible del idiopático, y está marcado por lesiones eritematosas papuloescamosas junto con otras de aspecto anular en áreas fotoexpuestas, como puede verse en la **Figura 8**. Aunque los pacientes pueden informar prurito, no se han observado síntomas sistémicos asociados. Esta reacción puede ocurrir

después de algunas semanas o meses de tratamiento, o desarrollarse en presencia de una condición de predisposición autoinmune conocida, en cuyo caso podrían ser extensas y severas (198,225–229).



Figura 8. Lesiones de apariencia anular en brazo superior relacionadas con lupus eritematoso cutáneo subagudo (Sibaud y col. 2016).

Al realizar un examen histológico de la zona afectada por lupus eritematoso, es evidente una dermatitis con vacuolización de células basales, atrofia epidérmica y presencia de necrosis de queratinocitos, a menudo con un infiltrado linfocítico perivascular superficial, junto con depósitos de mucina. Además, los fenómenos apoptóticos en los queratinocitos, iniciados por taxanos, pueden promover la liberación de nucleosomas, lo que lleva a una reacción autoinmune local secundaria. Además, los taxanos también pueden permitir la exposición de antígenos al sistema inmune, a través de la acción estabilizadora de los microtúbulos en el momento de la inhibición mitótica (226,229,230).

Es importante tener en cuenta la posibilidad de desarrollar lupus como resultado de la administración de otros fármacos quimioterapéuticos concomitantes, como la capecitabina, la doxorubicina y el fluorouracilo. También se ha informado con nab-paclitaxel, que retrata las mismas anormalidades clínicas, histológicas o de laboratorio (227,231).

Además de las dermatosis fotoinducidas específicas, como la reacción de lupus eritematoso cutáneo subagudo y la reaparición de lesiones a causa de radiación UV, tanto el paclitaxel como el docetaxel pueden conducir al desarrollo de una erupción inflamatoria predominantemente en áreas fotoexpuestas, también conocidas como reacciones de fototoxicidad. Existen estudios que ponen de manifiesto que esta fotosensibilidad está relacionada con aberraciones inducidas en la biosíntesis de porfirina y se desencadena a causa de la radiación UVB. Sin embargo, la incidencia de este tipo de reacciones parece ser inferior al 1% en pacientes con cáncer de mama tratados con paclitaxel o docetaxel. También se han informado de la aparición de eritema multiforme foto-distribuido (198,232–234).

Las erupciones pustulares también están presentes en numerosos cuadros clínicos que registran efectos adversos a los tratamientos. Existen distintos tipos de reacciones pustulares en la piel entre los que se encuentran las pustulosis exantematosas o la inflamación de los folículos pilosos, también conocida como foliculitis.

Por una parte, se puede decir que en tratamientos con docetaxel se ha informado del desarrollo típico de pustulosis exantematosas aguda generalizada, que se caracteriza por una erupción cutánea aguda con pústulas subcorneales no foliculares en un eritema edematoso y acompañado de fiebre. Una forma completamente similar de pustulosis generalizada también se ha informado con paclitaxel. Por otro lado, existe una variante localizada de estas pustulosis que se limita estrictamente a la cara, pero se trata de un suceso raro (235–237). Por otra parte, también es posible observar una foliculitis inflamatoria a raíz del tratamiento con taxanos, pero generalmente no es guarda relación con la dosis. Se conocen casos en los que ocurre predominantemente en la parte superior del cuerpo, particularmente el cuero cabelludo y los hombros (198,238).

1.3.1.3 Reacciones de recuerdo

Existen reacciones que vuelven a mostrar síntomas anteriores denominadas reacciones de recuerdo, haciendo que reaparezcan, por ejemplo, dermatitis asociadas a la radioterapia. Este fenómeno bien reconocido hace referencia al desarrollo de una reacción inflamatoria aguda, estrictamente localizada, en un área de la piel que fue irradiada previamente. El tratamiento de radiación inicial puede haber ocurrido varios años antes de la quimioterapia. La reacción de reaparición puede observarse a lo largo del tratamiento de quimioterapia. Las manifestaciones clínicas pueden incluir eritema, edema, endurecimiento cutáneo, descamación y, a veces, desprendimiento ampoloso o necrosis de la piel, típicamente confinada a un área previamente irradiada. Estos son de intensidad variable y pueden estar acompañados de prurito, ardor o dolor (239–241).

En general, la reacción no exige la interrupción de la quimioterapia, y con los ciclos de tratamiento posteriores, su desarrollo puede estar atenuado o ausente por completo. También puede ser necesaria la premedicación con corticosteroides o la reducción de la dosis (239,240,242–244).

También existen reacciones de recuerdo de lesiones asociadas a radiación UV anterior. Se trata de un fenómeno comúnmente descrito en oncología. Tanto el paclitaxel como el docetaxel pueden inducir un recuerdo fotográfico o UV, que supondría la reactivación del eritema producido por una quemadura solar. Por norma general, el episodio de eritema solar se da unos días o semanas antes de la quimioterapia. Después de la infusión del tratamiento, las lesiones cutáneas vuelven a aparecer en las áreas previamente afectadas por el eritema solar, con la misma presentación clínica incluso sin necesidad de exposición a la luz solar (**Figura 9**). La reacción secundaria tras la infusión del tratamiento puede tener consecuencias mucho más graves que el episodio inicial de eritema solar previo a la quimioterapia. Ante estas reacciones puede ser necesario el tratamiento de los síntomas con agentes antiinflamatorios tópicos, y se deben recomendar medidas fotoprotectoras antes de los ciclos. La reacción se atenúa gradualmente en el transcurso de estos ciclos y, en principio, no requiere interrupciones de la quimioterapia (198,245–247).



Figura 9. Lesiones inflamatorias de la piel en la zona donde se hubo una quemadura solar previa (Reaparición de lesiones asociadas a radiación UV) (Sibaud y col. 2016).

Por otra parte, también se reconocen las reacciones de recuerdo de fenómenos anteriores de extravasación. Existen reacciones inflamatorias debido a que el aumento de la permeabilidad de la microvasculatura y el microtraumatismo en el sitio del tejido dañado por extravasación previa, permiten la fuga y la acumulación del agente quimioterapéutico en la reinfusión. Esto se ha descrito en raras ocasiones después de la reinfusión de paclitaxel o docetaxel, y se caracteriza por eritema recurrente en sitios de inflamación previa. La biopsia revela dismaturación epidérmica con queratinocitos disqueratóticos, degeneración vacuolar en la capa basal y siringometaplasia escamosa ecrina (214,248–250).

1.3.1.4 Eritrodistesia palmar-plantar

Se han documentado casos de desarrollo de un síndrome dorsal mano-pie en tratamientos con taxanos. Este síndrome es relativamente más común con docetaxel, en comparación con paclitaxel. La aparición es menos frecuente que con otros agentes quimioterapéuticos, ocurre entre el 5-10% de los pacientes tratados con taxanos. Sin embargo, el uso generalizado de taxanos hace que existan numerosos casos de pacientes con estas reacciones (198,224,251–255).

La forma más característica del síndrome dorsal mano-pie se presenta sobre la parte dorsal de la mano, siendo específica de los taxanos y bastante común. Las lesiones eritematosas escamosas se observan predominantemente en parte dorsales de las manos (que cubren las articulaciones) y las eminencias tenares, como puede observarse en la **Figura 10**, y más raramente en el dorso de los pies o las regiones perimaleolar y tendón de Aquiles. La erupción dorsal de la mano generalmente no cruza la línea de Wallace, una zona de transición que se extiende a lo largo de los bordes medial y lateral de las manos. Ocasionalmente, se puede observar afectación palmoplantar. Las lesiones pueden comenzar desde el primer ciclo de tratamiento o desarrollarse progresivamente durante los ciclos posteriores, y a veces pueden ser anunciadas por síntomas como hormigueo, ardor o entumecimiento. El síndrome dorsal mano-pie es bilateral, pero no necesariamente simétrico, y el prurito, el dolor o una sensación de ardor son generalmente los síntomas más prominentes. También se han informado localizaciones ectópicas como por ejemplo en la región sacra (198,224,251–253,255–257).



Figura 10. Vista dorsal y plantar de ambas manos que muestra eritema e hinchazón bilateral, en paciente sometida a tratamiento con docetaxel (*Kewan y col. 2019*).

Los mecanismos desencadenantes del síndrome mano-pie no han sido establecidos concretamente, aunque se ha propuesto un efecto citotóxico directo de la quimioterapia sobre los queratinocitos basales. La predilección por las regiones palmoplantarias puede explicarse debido a que tienen una gran cantidad de capilares, a la rápida renovación de los queratinocitos, a la secreción preferencial de varios agentes quimioterapéuticos por las glándulas eccrinas y a traumatismos repetidos en estas áreas. Sin embargo, ninguna de estas hipótesis demuestra el porqué de la localización dorsal observada con el tratamiento con taxanos, aunque puede observarse una predilección por las zonas expuestas al sol (251–253,255,258).

Aunque el deterioro funcional es variable según cada paciente con síndrome dorsal mano-pie, la calidad de vida puede verse afectada de manera fehaciente, lo cual implica limitaciones de la dosis suministrada en el tratamiento. Esto pone en el centro del tablero las estrategias preventivas activas. La aplicación de frío localizado utilizado para la prevención de la onicólisis también protege contra el desarrollo del síndrome dorsal mano-pie. En el caso del desarrollo de eritema se recomienda el uso de corticosteroides sistémicos o esteroides tópicos de alta potencia. Los parches de lidocaína son de utilidad a la hora de tratar el dolor. Se debe considerar la evaluación global del dolor y su efecto sobre la vida diaria del paciente. A pesar de tener en cuenta toda esta serie de estrategias preventivas, entre otras, a veces resulta necesaria la reducción de la dosis o la interrupción temporal del tratamiento. En los casos en los que este síndrome haya sido inducido bajo tratamiento con docetaxel, una de las alternativas existentes, siempre y cuando sea posible, es el cambio a paclitaxel, ya que se constatan menores casos con este fármaco (198,251,259).

Otro tipo de eritrodesia existente es la denominada eritrodístesia permanente, la cual parece ser específica del docetaxel y a menudo se manifiesta como una placa solitaria, bien delimitada, eritematosa y sensible que se desarrolla unos días después de un ciclo de quimioterapia. Se localiza preferentemente en el antebrazo, a veces cerca del sitio de infusión (se debe diferenciar de la extravasación). Posteriormente, puede desarrollar descamación con hiperpigmentación secundaria, y es poco probable que se repita con el tratamiento continuo (198,216,230,260–262).

1.3.1.5 Cambios en la pigmentación

La hiperpigmentación supravenosa serpentina es una de los cambios pigmentarios que se han informado en tratamientos quimioterapéuticos con diversos fármacos entre los que se incluyen los taxanos, concretamente docetaxel. Esta complicación específica ocurre casi exclusivamente después de la infusión periférica del tratamiento. Se trata de un fenómeno que presenta un cuadro clínico característico, en

el cual se observan las redes venosas superficiales pigmentadas, con sitios de infusión que representan el punto de partida. Estas redes pueden presentar inicialmente inflamación y eritema, y estar acompañadas de ardor y/o prurito. La afección no requiere tratamiento específico o interrupción/reducción de la dosis del fármaco, aunque afecta directamente a la calidad de vida del paciente. No es un efecto típico provocado por paclitaxel (198,247,259,263,264).

Existen otro tipo de pigmentación inducida por quimioterapia, la hiperpigmentación flageladas y reticulada. Este tipo de hiperpigmentación es una reacción rara que puede ocurrir durante el tratamiento con varios agentes antineoplásicos. Esta afección se caracteriza por rayas eritematosas lineales con oscurecimiento de esa zona de la piel. Se atribuye tradicionalmente a los tratamientos quimioterapéuticos con bleomicina, pero puede ocurrir con docetaxel, además de existir casos documentados con paclitaxel. La hiperpigmentación se desvanece en la mayoría de los individuos una vez que se suspende el tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento del cáncer asociado a estos medicamentos puede continuarse en pacientes que experimentan esta afección cutánea (256,265,266).

1.3.1.6 Edema periférico

Generalmente los tratamientos con taxanos pueden conducir a un edema periférico reversible, aunque se ha informado principalmente con docetaxel. Clínicamente, se manifiesta con edema periférico con fóvea blanda en las extremidades inferiores que a veces puede progresar a linfedema, y afecta entre el 20% y más del 60% de los pacientes tratados por cáncer avanzado. La medicación preventiva con corticosteroides utilizada para la prevención de reacciones de hipersensibilidad puede restringir su desarrollo. La persistencia después de la interrupción del tratamiento es poco frecuente, pero a veces se pueden desarrollar cambios secundarios similares a la esclerodermia (198,219,220,267–269).

1.3.1.7 Efectos relacionados con la esclerodermia

Los casos de esclerosis cutánea infiltrativa se han informado tanto con paclitaxel como con docetaxel, y puede estar marcada por inflamación de la piel. Puede desarrollarse progresivamente durante varios meses y puede no manifestarse hasta muy tarde, a veces apareciendo incluso después del final de la quimioterapia. Las extremidades se ven afectadas con mayor frecuencia, especialmente las extremidades inferiores como puede verse en la **Figura 11**, lo que puede conducir a graves limitaciones de movilidad de las articulaciones involucradas, además del desarrollo de úlceras tróficas, que afectan de manera directa a la calidad de vida del paciente. Existen observaciones en otras zonas anatómicas, pero no hay hallazgos sistémicos o marcadores que sugieran esclerosis sistémica progresiva. Según las características de los casos publicados, el edema tiende a preceder a las lesiones similares a la esclerodermia, y también se puede observar hiperpigmentación en las mismas áreas (198,260,267,269–272).



Figura 11. Cambios relacionados con la esclerodermia con desarrollo progresivo de esclerosis cutánea (imagen de extremidades inferiores) (Sibaud y col. 2016).

Las biopsias de piel realizadas sobre estas lesiones revelan la aparición de fibrosis con proliferación de haces de colágeno en la dermis, junto con un ocasional infiltrado perivascular inflamatorio de células. Los mecanismos subyacentes a estos cambios proliferativos fibroblásticos no se conocen, aunque los taxanos parecen capaces de estimular el proceso, además de la expresión de diversas citocinas como la IL-6. Estos cambios inductores de esclerosis han sido informados en otros fármacos antineoplásicos como son la bleomicina o la gemcitabina. La interrupción de la quimioterapia en ocasiones puede conducir a una regresión clínica de las lesiones, aunque existen posibles tratamientos como el uso de corticosteroides o diuréticos, o la fisioterapia, que pueden hacer mejorar las afectaciones o evitar su progresión (198,216,247,268–271).

1.3.1.8 Onicotoxicidad

La toxicidad ungueal producida por el tratamiento con taxanos es muy común, se han llegado a reportar altas tasas de afección llegando al 89% después de tres ciclos de tratamiento. Los fármacos docetaxel y paclitaxel son los agentes quimioterapéuticos más frecuentes que inducen cambios en las uñas, como resultado de un efecto tóxico directo. Los cambios pueden afectar tanto la matriz de las uñas, el lecho (como la onicolísis como puede verse en la **Figura 12**) o el tejido o el tejido periungueal. Las lesiones en las uñas son evidentes después de varias semanas de tratamiento debido a la lenta tasa de crecimiento, y tienden a aumentar con el número de ciclos de tratamiento. Son comunes en pacientes que reciben los regímenes una vez a la semana, pero también se pueden observar con el régimen de quimioterapia cada tres semanas. Estos cambios no suelen reaparecer después de la interrupción del tratamiento, sin embargo, pueden darse secuelas persistentes que afectan a la placa de la uña y a su crecimiento (198,200–202,213,216,254,273–277).



Figura 12. Imagen de las uñas de la mano en la que se muestra desprendimiento parcial de la placa ungueal del lecho subyacente (onicólisis) (Sibaud y col. 2016).

La onicólisis representa la lesión más característica y ocurre debido al desprendimiento de la placa de la uña del lecho subyacente, como puede verse en la **Figura 12**. Esto puede terminar ocasionando la pérdida de la uña. Las uñas de las manos se ven afectadas con mayor frecuencia que las uñas de los pies. El impacto sobre la calidad de vida y las actividades de la vida diaria puede ser significativo y provocar la interrupción del tratamiento, esta afección puede ir acompañada de dolor (198,200,201,213,275,278).

También es posible el desarrollo de un hematoma subungueal, hemorragias o abscesos con secreción purulenta implicando a múltiples uñas. El área separada puede adquirir un color negro, blanco o marrón rojizo, según el tipo de lesión. La paroniquia también suele presentarse. Además, la onicólisis crónica puede provocar queratinización del lecho ungueal e hiperqueratosis subungueal. En consecuencia, es crucial promover la reinserción lo antes posible, de lo contrario la onicólisis puede volverse irreversible (198,274,275,278,279).

El manejo de los cambios en las uñas depende del tipo de afección y el impacto en las actividades de la vida diaria. Las medidas profilácticas incluyen el uso de emolientes, esmalte protector en la placa de la uña y guantes de algodón. Las uñas deben cortarse regularmente hasta que la placa de la uña se vuelva a unir. Es importante el uso de guantes congelados durante la quimioterapia. Una vez que se desarrolla este efecto adverso se debe poner el foco en el control de los síntomas. Puede ser necesario retirar la placa ungueal en casos de onicólisis severa y/o dolorosa, o cuando se asocia con un hematoma o absceso subungueal. Cualquier infección debe tratarse de inmediato con un antibiótico apropiado (198,201).

1.3.1.9 Alopecia inducida por quimioterapia

El paclitaxel y el docetaxel se encuentran entre los principales fármacos inductores de alopecia inducida por quimioterapia, principalmente por un mecanismo que induce el efluvio anágeno distrófico. El inicio es típicamente después del primer ciclo de tratamiento, ya sea en un entorno de tratamiento adyuvante o no. Esta alopecia representa uno de los eventos adversos más angustiantes de los taxanos, en la que también pueden verse involucradas otras áreas con pelos como pestañas, cejas, axilas, pubis, etc. Por lo general, el cabello perdido vuelve a crecer gradualmente a partir de tres a seis meses después del último ciclo, y regresa progresivamente a la línea de base, se trata de una alopecia reversible. Sin embargo, más de un tercio de los pacientes observan un cambio tanto en la textura como en el color del cabello que vuelve a crecer (198,203,204,280–282).

En los últimos años, también han surgido casos de alopecia permanente o irreversible después del tratamiento con taxanos. La pérdida de cabello se manifiesta como un crecimiento anómalo y/o ausencia de crecimiento del cuero cabelludo y del vello corporal, más de seis meses después de la interrupción de la quimioterapia. Sin embargo, no se han realizado estudios a largo plazo. Esta pérdida de cabello persistente no es total sino relativamente difusa, y tiende a acentuarse en áreas propensas a la

alopecia androgenética. El cabello pierde grosor y longitud, pero el cuero cabelludo parece sano, sin distintivos de alopecia cicatricial o fibrosis. El cabello en otros sitios (pestañas, cejas, axilas, pubis y cuerpo) también puede verse afectado. En las pruebas histológicas, el número de unidades foliculares parece no haber cambiado, pero se muestra un aumento en pelos miniaturizados y pelos telógenos, en detrimento de aquellos en fase anágena. No hay evidencias de fibrosis ni inflamación. Por lo que respecta al mecanismo que sigue este tipo de alopecia persistente, no existe una determinación clara, aunque se ha postulado una separación de las células de la matriz de la papila dérmica, así como una acción citotóxica directa de los taxanos sobre los queratinocitos de la matriz del cabello o las células madre del bulbo piloso (198,281,283–286).

En los casos de alopecia reversible, antes del inicio de la quimioterapia, se puede recomendar a los pacientes que se corten el cabello antes de que se caiga, o incluso que se afeiten la cabeza, para compensar la irritación del cuero cabelludo y cualquier estrés psicosocial inminente. Las aplicaciones tópicas de minoxidil (2%) iniciadas al inicio de la quimioterapia, aunque no son útiles para prevenir la caída, pueden acelerar la tasa de crecimiento del cabello, lo cual es significativo para muchos pacientes. El enfriamiento del cuero cabelludo tiende a conferir un efecto protector, lo que lleva a una reducción del 50% en la pérdida de cabello en alrededor del 50-75% de los casos, llegando a la totalidad de los pacientes dependiendo de la dosis. Los mecanismos subyacentes a los beneficios de enfriamiento del cuero cabelludo parecen ser la vasoconstricción y, lo que es más importante, una reducción del metabolismo del folículo piloso durante la infusión de quimioterapia, lo que los hace menos vulnerables a los efectos tóxicos de la quimioterapia (198,280,282,287–293).

Por lo que respecta a la alopecia persistente, se exige que los pacientes estén advertidos de la posibilidad de sufrir este efecto adverso con taxanos. En estudios limitados realizados hasta ahora, el minoxidil, la espironolactona y la fototerapia no han mostrado beneficio terapéutico, cuando se usan profilácticamente, o después del desarrollo de este tipo de alopecia. Además, no está claro si mitigar o prevenir la

alopecia reversible en las etapas agudas reduciría el riesgo de desarrollar eventualmente alopecia persistente. En cualquier caso, el impacto de la alopecia persistente sobre la autoestima y la calidad de vida de los pacientes debe evaluarse y abordarse de manera contundente (198,283,294,295).

1.3.1.10 Otros efectos dermatológicos

Además de los efectos adversos ya descritos se han documentado otros menores como son las lesiones sobre la mucosa oral; sofocos con enrojecimiento transitorio que generalmente afecta la cara, el cuello y la parte superior del pecho; focos de daño actínico en áreas fotoexpuestas que pueden inflamarse agudamente como queratosis actínicas; xerosis que se relacionan con el daño de la función de barrera cutánea induciendo una mayor pérdida de agua transepidérmica disminuyendo el contenido de agua de la piel en el estrato córneo, entre otros efectos (198,296).

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son:

1. Evaluar el efecto del paclitaxel en las propiedades físicas, biomecánicas y fisiológicas del tejido cutáneo en pacientes oncológicas.
2. Construir un modelo en 3D de piel estratificada en el que poder evaluar la respuesta de la piel ante fármacos o compuestos.
3. Evaluar la respuesta celular y molecular producida por paclitaxel en diferentes modelos cutáneos *in vitro*, con el fin de evidenciar el efecto del fármaco *in vivo*.
4. Evaluar el mecanismo de acción farmacológico del paclitaxel en diferentes modelos *in vitro*.
5. Determinar el potencial fototóxico del paclitaxel *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ESTUDIO *IN VIVO*

3.1.1 Poblaciones de estudio

Se trata de un estudio observacional prospectivo no aleatorizado sobre el análisis de parámetros cutáneos en pacientes oncológicas que van a recibir tratamiento con taxanos como parte de la práctica clínica habitual. En la realización del presente estudio se reclutaron dos grupos de mujeres, uno de ellos compuesto por 20 voluntarias sanas, y otro compuesto por 20 pacientes oncológicas procedentes del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, las cuales se someterán a un tratamiento quimioterapéutico basado en taxanos, concretamente en paclitaxel, por recomendación clínica según estrategia terapéutica habitual.

A ambos grupos se les tomaron diversas medidas de parámetros de la piel, los cuales se recogen junto con la zona donde se realiza la determinación en la **Tabla 1**.

Determinación	Zonas
Valor de hidratación	Mejilla, Antebrazo
Valor de TEWL	Mejilla, Antebrazo
Valor de sebo	Frente
Valor de eritema	Antebrazo
Valor de melanina	Antebrazo
Grados ITA	Antebrazo
Valores de elasticidad	Mejilla
Porcentaje de descamación	Frente
Valores de suavidad y rugosidad	Mejilla
Valores de profundidad / Grosor	Antebrazo

Tabla 1. Determinaciones realizadas sobre la piel y zonas sobre las que se toman las medidas.

3.1.1.1 Población sana

En primer lugar, se reclutó un grupo de voluntarias sanas atendiendo a una serie de criterios de inclusión/exclusión para poder ser aceptadas en el estudio, los cuales son:

- Criterios de inclusión:
 - Sujetos mujeres
 - Sujetos de origen caucásico
 - Sujetos con edades comprendidas entre 40 y 70 años
 - Adecuado nivel cultural y comprensión del estudio
 - Estar de acuerdo en participar voluntariamente en el estudio y que firmen su consentimiento informado por escrito (ANEXO).

- Criterios de exclusión:
 - Sujetos con enfermedad aguda durante el estudio y en la semana anterior del mismo.
 - Estar embarazada o en proceso de lactancia.
 - Presentar patologías cutáneas en la semana anterior al inicio del estudio.

La información general referente a la población de voluntarias sanas se refleja a continuación en la **Tabla 2**. Estas voluntarias ejercen de grupo control, con el cual se pretende determinar si existen cambios frente a los valores basales de las pacientes oncológicas sobre los diferentes parámetros de la piel determinados (**Tabla 1**). Se acotó el rango de edad de las voluntarias sanas en función de las edades de las pacientes oncológicas.

Nº de voluntarias	Media de edad \pm SD
20	55,95 \pm 6,30

Tabla 2. Media de edad de las voluntarias sanas incluidas en el estudio en años \pm Desviación Estándar (SD del inglés *Standard Deviation*).

3.1.1.2 Población de pacientes oncológicas tratadas con paclitaxel

La inclusión en el estudio de la población de pacientes con cáncer tratadas con paclitaxel se realizó entre el mes de mayo de 2019 y el mes de noviembre de 2019. Las pacientes fueron reclutadas en la Consulta de Oncología del Hospital Clínico Universitario de València. Para la inclusión de estas pacientes se estableció un estudio clínico de seguimiento prospectivo (EPA-SP) que recibió la denominación de estudio INC-PAC-2018-01.

El criterio principal de las pacientes oncológicas participantes en el estudio fue la prescripción por parte de su oncólogo/a de un tratamiento basado en taxanos, concretamente en paclitaxel. A estas pacientes se les tomaron diferentes medidas de parámetros de la piel, antes, durante y al finalizar el tratamiento en un total de 3 visitas seriadas en el tiempo. Las pacientes serán instruidas para que no utilicen cremas hidratantes al menos 24 horas antes de hacerse las evaluaciones cutáneas. Estas visitas se realizan en los diferentes ciclos de quimioterapia, previamente a que las pacientes reciban su tratamiento como puede verse en la **Figura 13**.

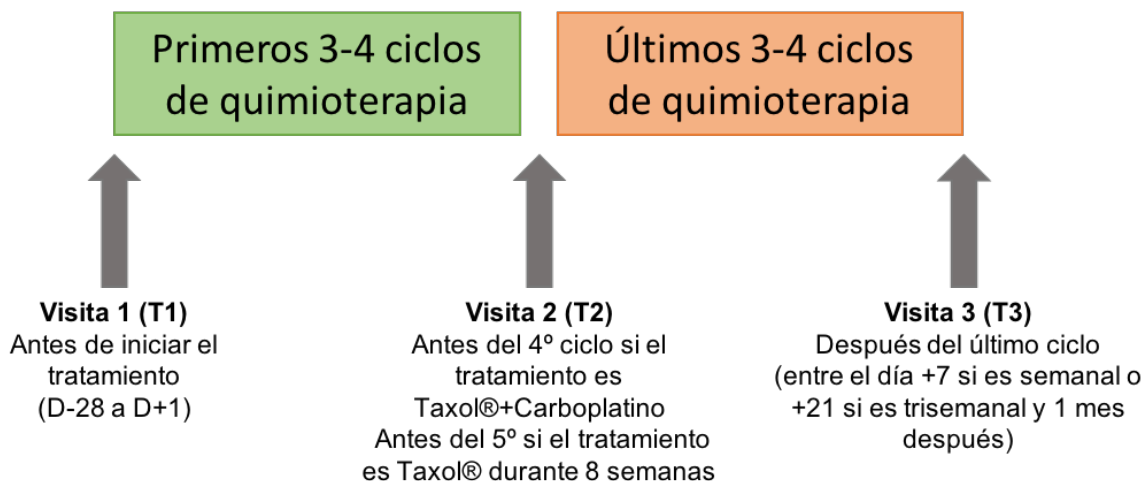


Figura 13. Esquema de las visitas que realizan las pacientes para realizar las determinaciones cutáneas coincidiendo con su tratamiento de quimioterapia.

El reclutamiento se realizó atendiendo a una serie de criterios de inclusión/exclusión para poder ser admitidas en el estudio, los cuales son:

- Criterios de inclusión:

- Mayor de 18 años.
- Estar de acuerdo en participar voluntariamente en el estudio y que firmen su consentimiento informado por escrito (ANEXO).
- Pacientes con diagnóstico clínico de cáncer ginecológico (cáncer de ovario, cérvix o endometrio, en cualquier estadio (clasificación FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) de I a IV).
- Indicación clínica para recibir tratamiento con esquemas basados en taxanos en neoadyuvancia, adyuvancia o en enfermedad avanzada.
- Pacientes tratadas tanto en primera línea como en recaída.
- Adecuada función renal, hepática y hematológica para inicio de tratamiento con quimioterapia (neutrófilos >1500, plaquetas >100000 en el hemograma previo inicio de tratamiento).
- Pacientes con prescripción de paclitaxel en esquema trisemanal en combinación o paclitaxel en esquema semanal ya sea en monoterapia o en combinación, por recomendación clínica según estrategia terapéutica habitual. Los esquemas subsidiarios de ser incluidos en este estudio observacional serían:
 - Paclitaxel 80 mg/m² semanal en monoterapia (esquema habitual en cáncer de mama neoadyuvante / adyuvante / avanzado y cáncer de ovario / cérvix / endometrio en recaída resistente).
 - Paclitaxel 80 mg/m² semanal + trastuzumab 6 mg/kg/21 días (esquema estándar en cáncer de mama HER2+)
 - Paclitaxel 80 mg/m² semanal + bevacizumab 15 mg/kg/21 días (esquema estándar en cáncer de mama avanzado y carcinoma de ovario en recaída resistente).

- Paclitaxel 175 mg/m² intravenoso (IV) + carboplatino AUC 5 (Área bajo la curva, equivalente a exposición al fármaco: mg/mL/min) cada 21 días (esquema habitual en cáncer de mama triple negativo adyuvante / neoadyuvante / avanzada, y carcinoma de cérvix / endometrio / ovario).
 - Paclitaxel 175 mg/m² IV + carboplatino AUC 5 + bevacizumab 15 mg/kg cada 21 días (esquema habitual en carcinoma de cérvix y ovario).
- Criterios de exclusión:
- Enfermedad cutánea crónica o reumatológica conocida (psoriasis, lupus eritematoso sistémico).
 - Tratamiento con corticoides en las últimas 2 semanas previas a la entrada en el estudio clínico.
 - Sujetos con enfermedad aguda durante el estudio y en la semana anterior al mismo.
 - Estar embarazada o en proceso de lactancia.
 - Cualquier situación clínica que contraindique la administración de quimioterapia.
 - En caso de presentar neurotoxicidad residual a tratamientos previos esta debería de ser inferior a grado 2.

La información referente a la población de pacientes se refleja a continuación en la **Tabla 3**. La media de edad de las pacientes es de 61,60 ± 12,69 (años ± SD). Los parámetros cutáneos tomados quedan recogidos en la **Tabla 1**, así mismo, se recogerán los efectos adversos relacionados con la piel observados en las pacientes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Nº	Edad	Localización	Subtipo de tumor	Grado	Estadio del tumor (FIGO)	Estrategia	Tratamiento	Taxano previo
1	63	OVARIO	CARCINOMA SEROSO	ALTO	III	Recaída Pt-sensible	TAXOL® + CARBOPLATINO + BEVACIZUMAB	SÍ
2	60	ENDOMETRIO	CARCINOSARCOMA	ALTO	IV	2ª línea	TAXOL® + CARBOPLATINO	SÍ
3	62	OVARIO	CARCINOMA SEROSO	ALTO	IV	Recaída Pt-resistente	TAXOL® SEMANAL + BEVACIZUMAB	SÍ
4	63	OVARIO	CARCINOMA SEROSO	ALTO	III	Recaída Pt-sensible	TAXOL® + CARBOPLATINO	SÍ
5	57	OVARIO	CARCINOMA SEROSO	ALTO	III	Recaída Pt-resistente	TAXOL® SEMANAL + BEVACIZUMAB	SÍ
6	55	ENDOMETRIO	ADENOCARCINOMA ENDOMETRIOIDE	G3	IV	2ª línea	TAXOL® SEMANAL	SÍ
7	47	OVARIO	CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS	ALTO	III	Recaída Pt-resistente	TAXOL® SEMANAL	SÍ
8	64	ENDOMETRIO	CARCINOMA SEROSO	ALTO	III	1ª línea	TAXOL® + CARBOPLATINO	SÍ
9	55	OVARIO	CARCINOMA SEROSO	ALTO	II	Recaída Pt-sensible	TAXOL® + CARBOPLATINO	SÍ
10	82	ENDOMETRIO	ADENOCARCINOMA ENDOMETRIOIDE	G3	III	Recaída Pt-sensible	TAXOL® + CARBOPLATINO	SÍ
11	57	OVARIO	CARCINOMA SEROSO	ALTO	III	Adyuvancia	TAXOL® + CARBOPLATINO	NO
12	32	OVARIO	ADENOCARCINOMA INDIFERENCIADO	ALTO	IV	Recaída Pt-resistente	TAXOL® SEMANAL	SÍ
13	52	OVARIO	ADENOCARCINOMA ENDOMETRIOIDE	G2	I	Adyuvancia	TAXOL® + CARBOPLATINO	NO
14	77	CÉRVIX	CARCINOMA EPIDERMIOIDE	NE	IV	2ª línea	TAXOL® SEMANAL	SÍ
15	45	ENDOMETRIO	CARCINOSARCOMA	ALTO	I	1ª línea	TAXOL® + CARBOPLATINO	NO
16	83	OVARIO	CARCINOMA SEROSO	ALTO	III	Neoadyuvancia	TAXOL® + CARBOPLATINO	NO
17	72	OVARIO	CARCINOMA SEROSO	ALTO	III	Recaída Pt-resistente	TAXOL® SEMANAL	SÍ
18	71	ENDOMETRIO	ADENOCARCINOMA ENDOMETRIOIDE	G3	I	Adyuvancia	TAXOL® + CARBOPLATINO	NO
19	74	OVARIO	CARCINOMA SEROSO	ALTO	III	Recaída Pt-resistente	TAXOL® SEMANAL	SÍ
20	61	OVARIO	CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS	ALTO	I	Adyuvancia	TAXOL® + CARBOPLATINO	NO

Tabla 3. Datos médicos de las pacientes oncológicas sobre las que se realizaron las medidas de los distintos parámetros de la piel. Taxol® es el nombre comercial del fármaco paclitaxel. Grado: Referente a la agresividad de las células, para los tumores de endometrio y de tipo endometriode de ovario los grados se dan de acuerdo al sistema clásico de grados 1 a 3 (grado 1 bien diferenciado o de bajo grado, grado 2 intermedio y grado 3 indiferenciado o de alto grado). Para los tumores de ovario se muestra el sistema de gradación actual de alto grado frente bajo. Estadio: Escala de clasificación FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) en su categorización de I a IV. Estrategia: Para los tumores de endometrio y cérvix se informa si fue para la enfermedad localizada (adyuvancia) o el número de línea de quimioterapia para enfermedad avanzada (1ª línea o 2ª línea). Para los tumores de ovario se informa de la estrategia a seguir si fue para la enfermedad localizada (adyuvancia o neoadyuvancia) o para la enfermedad avanzada según la sensibilidad al platino previa (platino-sensible frente platino-resistente). Las refractarias a platino fueron categorizadas como resistentes a platino. (NE: No especificado; Pt-sensible: Platino-sensible; Pt-resistente: Platino-resistente.) Tratamiento en base a los reflejados en los criterios de inclusión de las pacientes.

3.1.2 Aspectos éticos

Este estudio fue clasificado por la Agencia Española del Medicamento y el Producto Sanitario del Ministerio de Sanidad como “Estudio posautorización de seguimiento prospectivo” (abreviado como EPA-SP) con fecha del 13 de junio de 2018. Se realiza bajo INFORME FAVORABLE por parte del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de València con fecha de aprobación 29 de noviembre de 2018, así como con la autorización de la *Conselleria de Sanitat i Salut Pública* de la *Generalitat Valenciana* con fecha del 5 de febrero de 2019. Todos los documentos quedan disponibles en el ANEXO.

3.1.2.1 Evaluación beneficio/riesgo

Dado que el estudio solo incluye a pacientes que por práctica clínica habitual se vayan a tratar con quimioterapia basada en taxanos, en ningún caso se realiza una intervención sobre el tratamiento que va a recibir la paciente.

Las pruebas a realizar no van a implicar un incremento del riesgo para la paciente incluida. Los test cutáneos a los que se someterá no son invasivos, no se produce ni abrasión ni rozadura ni pinchazo sobre la piel. Se realiza mediante la colocación de varios equipos que funcionan por contacto directo con la piel (no con las mucosas) por lo que se considera que el riesgo secundario a estas técnicas es nulo.

3.1.2.2 Consideraciones sobre el consentimiento informado.

Dado que se trata de un estudio observacional en el que se somete a pruebas a las pacientes de forma prospectiva se solicitará consentimiento informado en todos los casos. No obstante, los pacientes serán informados de que los test cutáneos son inocuos sin riesgo alguno de efectos secundarios ya que se obtienen datos a partir de sondas colocadas sobre piel.

3.1.2.3 Confidencialidad de los datos

Los datos de los pacientes serán manejados única y exclusivamente por los investigadores. El tratamiento, comunicación y cesión de los datos de los sujetos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal y por su reglamento (Real Decreto 1720/2007).

3.1.2.4 Interferencia con los hábitos de prescripción

En ningún caso se alterará ni la prescripción, ni los esquemas de tratamiento, quedando el estudio totalmente asociado a las decisiones terapéuticas habituales, por lo que no existe interferencia alguna en los hábitos de prescripción médica.

3.1.3 Valor de hidratación

El principio de medición del Corneometer CM 825® (Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany) se basa en la determinación de la capacitancia de un medio dieléctrico. Cualquier cambio en la constante dieléctrica debido a variación de la hidratación de la epidermis altera la capacitancia de un condensador de precisión. Este método ha sido empleado por distintos autores a lo hora de realizar determinaciones de valores de hidratación. Este equipo proporciona medidas del valor de hidratación en Unidades Arbitrarias (U.A.) de Corneometer®, que oscilan entre 0-120 (297).



Figura 14. Toma de medidas de hidratación con el equipo Corneometer®.

Las medidas de hidratación se tomaron bajo condiciones de temperatura y humedad controladas. La temperatura se mantuvo a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa entre el 40-60%, manteniendo a la persona durante 30min en reposo bajo dichas condiciones. Se tomaron 3 medidas seguidas en zonas próximas, nunca en la misma zona, ya que la presión de la sonda sobre la piel puede hacer variar las determinaciones, y se calculó su media aritmética (**Figura 14**).

3.1.4 Pérdida de Agua Transepidérmica (TEWL)

El principio de medición del Tewameter TM 300® (Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany) se basa en la determinación de la evaporación del agua fundamentada en el principio de difusión en una cámara abierta. El gradiente de la densidad del aire se mide de forma indirecta mediante dos pares de sensores (temperatura y humedad relativa) situados en el interior del cilindro hueco. El dispositivo es capaz de detectar daños sobre la función barrera de la piel. Este equipo proporciona medidas del valor de Pérdida de Agua Transepidérmica (TEWL, de sus siglas en inglés) en g/hm^2 (297).

Las medidas de TEWL se tomaron bajo condiciones de temperatura y humedad controladas. La temperatura se mantuvo a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa entre el 40-60%, manteniendo a la persona durante 30min en reposo bajo dichas condiciones. Se tomaron 3 medidas seguidas en zonas próximas, nunca en la misma zona, ya que la presión de la sonda sobre la piel puede hacer variar las determinaciones, y se calculó su media aritmética (**Figura 15**). Se trata de una sonda sensible a las corrientes de aire, por lo que cada medida se obtiene tras la realización de 30 medidas seguidas sobre la misma zona, con el fin de que la sonda se estabilice y pueda obtener el valor más correcto.



Figura 15. Toma de medidas de pérdida de agua transepidermica con el equipo Tewameter®.

3.1.5 Valor de sebo

El principio de medición del Sebumeter SM 815® (Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany) se basa en la fotometría de puntos de grasa. Existe una cinta que en contacto con la epidermis y por lo tanto con el sebo presente en ella, pasa a ser transparente. Haciendo pasar un haz de luz es posible medir mediante una célula fotoeléctrica la transparencia ocasionada por la presencia de sebo. Esta transmisión de luz representa el contenido en sebo en la superficie de medición. El resultado del valor de sebo se expresa en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (297).

Las medidas de sebo se tomaron bajo condiciones de temperatura y humedad controladas. La temperatura se mantuvo a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa entre el 40-60%, manteniendo a la persona durante 30min en reposo bajo dichas condiciones. Se tomaron 3 medidas seguidas en zonas próximas, nunca en la misma zona, ya que la presión de la sonda sobre la piel puede hacer variar las determinaciones, y se calculó su media aritmética. Cada medida se obtiene tras realizar una presión de 30 segundos sobre la misma zona (**Figura 16**).



Figura 16. Toma de medidas del valor de sebo con la sonda Sebumeter®.

3.1.6 Valor de eritema y melanina

La sonda Mexameter MX 18® (Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany) ofrece distintas prestaciones como son la determinación del valor de eritema y la determinación del valor de melanina. El principio de medición de la sonda se basa en la absorción/reflexión. Para la medición de melanina se utilizan longitudes de onda específicas que corresponden a diferentes tasas de absorción de los pigmentos. Para la medición del eritema también se utilizan longitudes de onda específicas, correspondientes al máximo nivel de absorción espectral de la hemoglobina. Al definirse la cantidad de luz emitida, es posible calcular la cantidad de luz absorbida por la piel.

Este equipo proporciona medidas del valor de eritema y melanina en Unidades Arbitrarias, que oscilan entre 0-999 (297).

Las medidas de eritema y melanina se tomaron bajo condiciones de temperatura y humedad controladas. La temperatura se mantuvo a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa entre el 40-60%, manteniendo a la persona durante 30min en reposo bajo dichas condiciones. Se tomaron 3 medidas seguidas en zonas próximas, nunca en la misma zona, ya que la presión de la sonda sobre la piel puede hacer variar las determinaciones, y se calculó su media aritmética (**Figura 17**).



Figura 17. Toma de medidas de valores de eritema y melanina a través de la sonda Mexameter®.

3.1.7 Grados ITA

La sonda Skin-Colorimeter CL-400® (Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany) ofrece distintas prestaciones como es la determinación de los grados ITA (ITA°, del inglés *Individual Typology Angle*). Los ITA° son unidades relacionadas con el tono de la piel, inversamente proporcionales a su oscuridad, es decir, cuanto más bajo sea el valor de los ITA° más oscura será la piel, los cuales son posibles determinar a partir

de una serie de valores dados por el equipo (298). El fundamento de la medición de la sonda se basa en los principios de reflexión/dispersión. La medición consiste en la determinación de los parámetros $L^*a^*b^*$. Se fundamenta en un eje central de luminosidad L^* con valores de negro (0) a blanco (100) y dos ejes ortogonales que representan la cromaticidad: a^* describe los colores del rojo (+50) al verde (-50) y b^* los colores del azul (-50) al amarillo (+50) (297,299–301). El valor de los ITA° se obtiene mediante la fórmula:

$$ITA^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{L^* - 50}{b^*} \right) \cdot \frac{180}{\pi}$$

Las medidas de ITA° se tomaron bajo condiciones de temperatura y humedad controladas. La temperatura se mantuvo a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y la humedad relativa entre el 40-60%, manteniendo a la persona durante 30min en reposo bajo dichas condiciones. Se tomaron 3 medidas seguidas en zonas próximas, nunca en la misma zona, ya que la presión de la sonda sobre la piel puede hacer variar las determinaciones, y se calculó su media aritmética (**Figura 18**).



Figura 18. Toma de medidas de grados ITA con el equipo Colorimeter®.

3.1.8 Elasticidad y firmeza de la piel

La sonda Cutometer® MPA 580 (Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany) permite determinar parámetros como son la elasticidad y la firmeza de la piel, es un instrumento ampliamente utilizado para determinar las propiedades viscoelásticas de la piel. El funcionamiento del mismo consiste en una bomba de succión. El principio de medición se basa en el método de succión y relajación. La sonda crea una presión negativa y la piel es estirada hasta la apertura de la sonda. Se mide la profundidad de penetración mediante un sistema de medición óptica sin contacto. Los resultados evalúan la resistencia de la piel a la succión y su capacidad para volver a su posición original (297).

Se utilizó una sonda de medición de 2 mm de diámetro y se aplicó una succión constante de 400 mbar durante 1 segundos seguido de un tiempo de relajación de 1 segundos, 10 repeticiones. Las curvas de deformación de la piel obtenidas se analizaron utilizando el software del equipo. La sonda debe permanecer perpendicular al punto de la piel sobre el que se realiza la determinación durante las diferentes fases de la medición (**Figura 19**). La temperatura se mantuvo a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa entre el 40-60%, manteniendo a la persona durante 30min en reposo bajo dichas condiciones (299–301).



Figura 19. Toma de medidas de elasticidad y firmeza con el equipo Cutometer®.

La sonda Cutometer® proporciona diferentes valores en función de los datos obtenidos en el análisis de los resultados gráficos. En la **Figura 20**, se muestra un ejemplo de las curvas dibujadas por el software con la información recopilada por la sonda. Sobre las curvas se pueden determinar diferentes porciones en forma de distancia, a partir de las cuales pueden calcularse los parámetros R, entre otros, que son los utilizados a la hora de la determinación de las diferentes propiedades viscoelásticas de la piel.

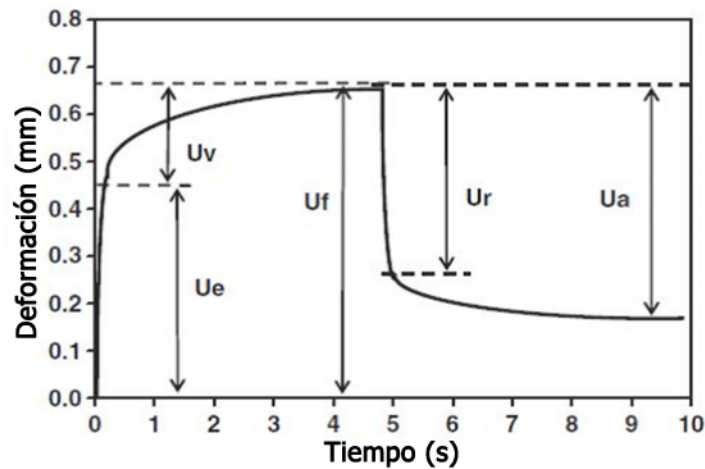


Figura 20. Ejemplo de curva obtenida mediante el software a través de los valores obtenidos por la sonda Cutometer®. Representada la deformación de la piel en distancia en mm frente al tiempo en segundos (302).

Los diferentes parámetros R, están calculados de la siguiente manera en función de las diferentes porciones y distancias establecidas sobre la curva, Uv, Ue, Uf, Ur y Ua (297):

- **R0:** Uf. Amplitud máxima de la piel, relacionada con la firmeza. Este parámetro representa el comportamiento pasivo de la piel ante una fuerza. El resultado viene dado en mm.
- **R1:** Uf – Ua. Amplitud mínima de la piel. Este parámetro representa la capacidad de recuperación del estado original de la piel. El resultado viene dado en mm.

- **R2:** U_a/U_f . Proporción entre la amplitud máxima de la piel y la capacidad de volver al estado original. Cuanto más cercano a 1 esté el valor, más elástica será la curva. Este parámetro está relacionado con la elasticidad bruta.
- **R3:** Amplitud máxima de la última curva de succión tras las succiones repetidas, comparada con la máxima amplitud de la primera curva. El resultado viene dado en mm.
- **R4:** Amplitud mínima de la última curva, comparada con la máxima amplitud de la primera. El resultado viene dado en mm.
- **R5:** U_r/U_e . Proporción entre la parte elástica de la fase de succión y la parte elástica de la fase de relajación. Cuanto más cercano a 1 esté el valor, más elástica será la curva. Este parámetro está relacionado con la elasticidad neta.
- **R6:** U_v/U_e . Proporción entre la visco-elasticidad y la parte elástica de la curva en la fase de succión. Cuanto más bajo sea este valor, más elástica será la curva.
- **R7:** U_r/U_f . Proporción de la recuperación elástica comparada con la curva completa. Cuanto más cercano a 1 esté el valor, más elástica será la curva. Este parámetro se define como la elasticidad comparada.
- **R8:** U_a de la primera curva. Equivale a la recuperación total de la piel.
- **R9:** Representa los efectos de la fatiga de la piel tras realizar sucesivas succiones. Cuanto menor sea R9, menor serán los efectos de fatiga. Este valor viene dado en mm.

En la mayoría de investigaciones realizadas por otros autores los parámetros R más utilizados han sido R0, R2, R5 y R7, y son los que el presente estudio utiliza en su mayoría para establecer conclusiones relacionadas con las propiedades biomecánicas de la piel (297,299–301,303,304). La sonda Cutometer® proporciona también otros parámetros como son los F y los Q, los cuales no han sido tenidos en cuenta en el presente estudio.

3.1.9 Parámetros de superficie de la piel

El equipo Visioscan® VC 98 (Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany) permite realizar un análisis de la superficie de la piel viva, a través de la toma de imágenes de la topografía de la piel mediante una iluminación UV específica mediante la cámara que posee el dispositivo. La distribución de los niveles de gris de la imagen obtenida, se utilizan para evaluar mediante el software correspondiente del equipo, los llamados parámetros SELS (Surface Evaluation of Living Skin: Evaluación de la superficie de la piel viva) que comprenden cuatro parámetros clínicos para describir cuantitativa y cualitativamente el estado de la epidermis: Suavidad de la piel (Sesm), Rugosidad de la superficie de la piel (Ser), Descamación (Sesc), Arrugas (Sew). La interpretación de los diferentes resultados obtenidos por el equipo Visioscan® teniendo en cuenta el manual del equipo ofrecido sería el siguiente (305):

- **Sesm:** Suavidad de la piel. A menor Sesm más suave es la imagen, y por la tanto la piel.
- **Ser:** Rugosidad de la piel, relacionado con la aspereza de la piel. A menor Ser, mayor aspereza de la piel.
- **Sesc:** Descamación de la piel. A menos Sesc, menor descamación del estrato córneo y por tanto menor descamación de la piel.
- **Sew:** Arruga de la piel. A mayor valor, mayor número de arrugas.

La sonda debe permanecer perpendicular al punto de la piel sobre el que se realiza la determinación durante las diferentes fases de la medición (**Figura 21**). La temperatura se mantuvo a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa entre el 40-60%, manteniendo a la persona durante 30min en reposo bajo dichas condiciones.

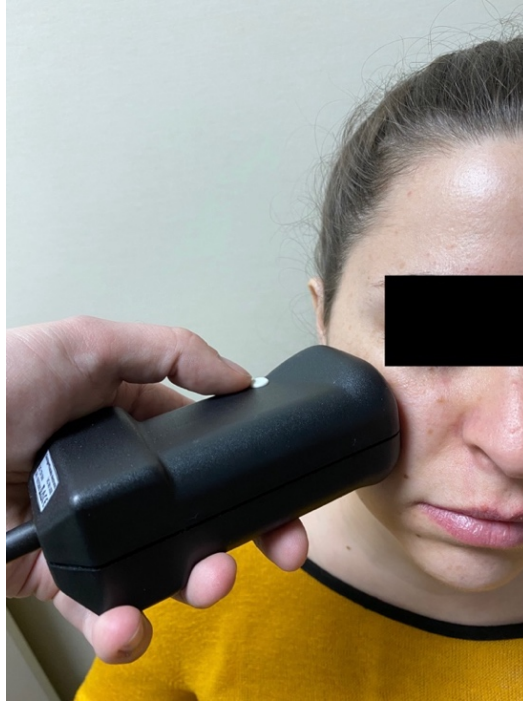


Figura 21. Toma de medidas sobre la superficie de la piel mediante el equipo Visioscan®.

En la **Figura 22**, puede verse un ejemplo de las imágenes tomadas por el equipo Visioscan®, sobre las cuales su software realiza el análisis y cuantifica los parámetros del estado de la superficie de la piel. En el presente estudio se tomarán los datos de los valores obtenidos para la suavidad (Sesm) y para la rugosidad (Ser).



Figura 22. Ejemplo de imagen obtenida mediante el equipo Visioscan® sobre el rostro.

3.1.10 Descamación de la piel

Para la determinación del porcentaje de descamación se utilizó el equipo Visioscan® VC 98 (Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany) combinado con la técnica de láminas Corneofix®. Las láminas Corneofix® tienen un lado adhesivo que se aplica sobre la piel. Al retirar la lámina, como puede verse en la **Figura 23**, los corneocitos se adhieren a la misma. El número, tamaño y grosor de los corneocitos indica el nivel de deshidratación del estrato córneo. Una piel hidratada adecuadamente muestra pequeñas escamas regulares, mientras que una piel deshidratada o incluso dañada muestra corneocitos gruesos y de diversos tamaños. Una vez retirada la lámina, esta se coloca sobre la abertura del equipo Visioscan®, y junto con la modalidad Coneofix® del software, el equipo analiza la muestra y mediante técnicas de análisis de imagen es capaz de reconocer hasta 5 capas distintas de los corneocitos adquiridos, en función del número, tamaño y grosor de las partículas, y a partir de las cinco categorías ofrece el cálculo de un índice de descamación en forma de porcentaje. Las cinco capas se representan de menor a mayor presencia de descamación con los siguientes colores: azul oscuro, azul claro, verde, amarillo y rojo, como se puede ver en la **Figura 24**. A mayor índice de descamación, mayor será la descamación de la zona de la piel donde se ha tomado la muestra (305).



Figura 23. Toma de muestra para el análisis de la descamación de la piel utilizando las láminas adhesivas Corneofix®.

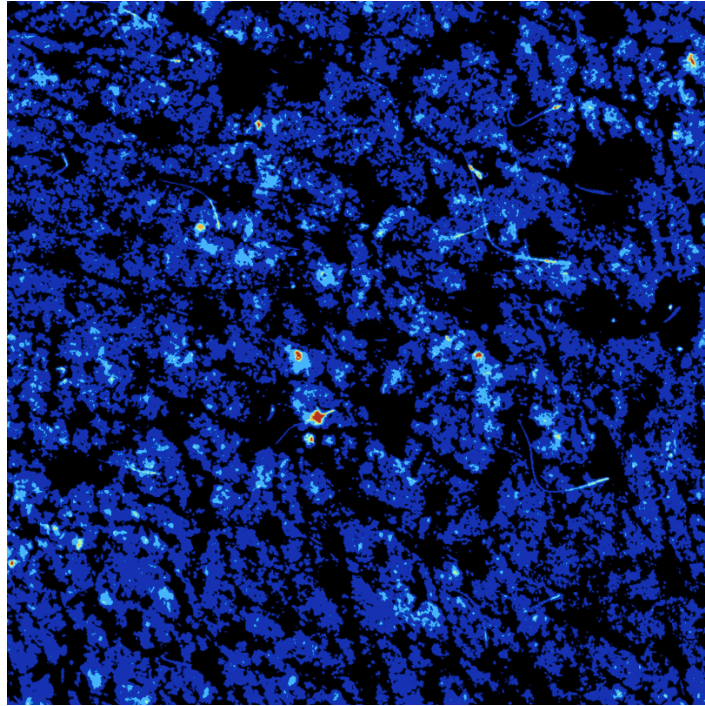


Figura 24. Ejemplo de imagen obtenida mediante las láminas Corneofix® a través del análisis de imagen del software Visioscan®. Los colores representativos, de menor a mayor descamación, son: azul oscuro, azul celeste, verde, amarillo y rojo.

3.1.11 Grosor de las capas de la piel

El equipo Ultrascan® UC22 (Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany) permite realizar un análisis de las diferentes capas de la piel viva, a través de la toma de imágenes basadas en ondas de ultrasonido que penetran en la piel y se reflejan de manera diferente en función de los tejidos. Las ondas reflejadas se transforman en impulsos eléctricos y el resultado es una imagen a color. La frecuencia de ultrasonido utilizada es de 22 MHz, permitiendo obtener imágenes de alta resolución de los primeros 6mm de la piel, como se puede observar en la **Figura 25** (306).

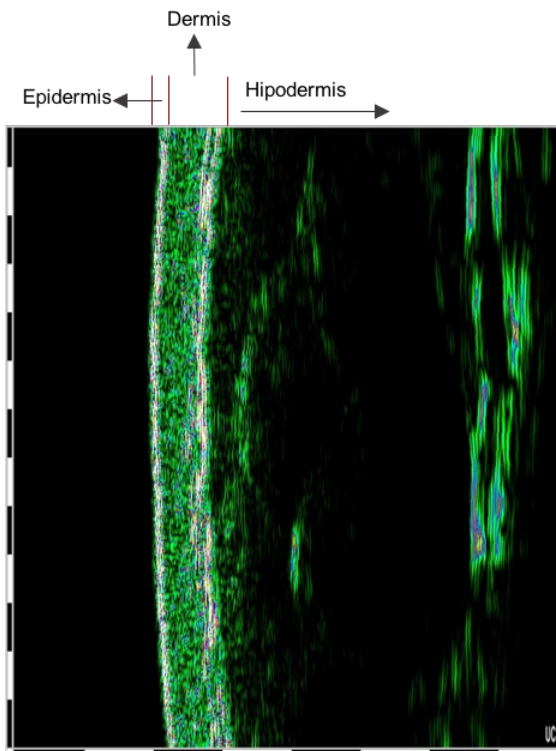


Figura 25. Imagen de las capas de la piel obtenida por el equipo Ultrascan® mediante ultrasonidos. Esquema de las diferentes capas: Epidermis, dermis e hipodermis.

La sonda debe permanecer perpendicular al punto de la piel sobre el que se realiza la determinación durante las diferentes fases de la medición, como se observa en la **Figura 26**. La temperatura se mantuvo a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa entre el 40-60%, manteniendo a la persona durante 30min en reposo bajo dichas condiciones.



Figura 26. Toma de imágenes de la piel por ultrasonido mediante el equipo Ultrascan®.

El software que posee el equipo es capaz de analizar el grosor y la densidad de las diferentes capas de la piel a través de técnicas de tratamiento de las imágenes obtenidas, diferenciando epidermis y dermis.

3.1.12 Presentación de datos y análisis estadístico de los ensayos *in vivo*

Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM) de cada una de las medidas. El análisis de la distribución normal para cada grupo de datos se realizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) pareado seguido de la prueba de Bonferroni, mediante la prueba t de Student entre grupos, o por pruebas no paramétricas apropiadas en su caso (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE.UU.). Los resultados se tomaron como significativos (*) cuando el valor $p < 0,05$.

3.2 ENSAYOS *IN VITRO*

3.2.1 Reactivos utilizados

Producto	Casa comercial	Referencia
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	M6250
Agua dietilpirocarbonato (DEPC)	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.	AM9906
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	318744
BSA (Albúmina de suero bovino)	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	A7638
Cloroformo	Panreac, Applichem; Darmstadt, Alemania	131252
cOmplete™ (Mezcla inhibidora de proteasas)	Roche Diagnostics; Indianapolis, EE.UU.	11836170001
DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.	D1306
DHE (Dihidroetidio)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.	36978
DMSO (Dimetilsulfóxido)	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	34869
DPX (Dibutylphthalate Polystyrene Xylene)	Panreac, Applichem; Darmstadt, Alemania	255254
EDTA (Ácido etilendiaminotetracético)	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	E9884
EGTA (ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético)	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	E3889
Eosina	Panreac, Applichem; Darmstadt, Alemania	251299
Etanol	Panreac, Applichem; Darmstadt, Alemania	362086
Suero fetal bovino (FBS)	Biowest LLC; Riverside, EE.UU.	S1400
Glicerol	Panreac, Applichem; Darmstadt, Alemania	131339
Glicógeno	Roche Diagnostics; Indianapolis, EE.UU.	10901393001
HCl	Panreac, Applichem; Darmstadt, Alemania	131020
Hematoxilina	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	GHS332
HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico)	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	H3375
Isopropanol	Panreac, Applichem; Darmstadt, Alemania	131090
Kit <i>BCA Protein Assay</i>	Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.	23225
Kit de detección de la apoptosis celular <i>Annexin V-FITC</i>	Abcam; Cambridge, Reino Unido	ab14085
Kit <i>ECL plus</i>	Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.	GERPN2232
Kit <i>Endothelial Tube Formation Assay</i>	Cell Biolabs, Inc; San Diego, EE.UU.	CBA-200
Kit <i>Human IL-1 alpha/IL-1F1 DuoSet ELISA</i>	R&D Systems; Minneapolis, EE.UU.	DY-200
Kit <i>Human IL-6 DuoSet ELISA</i>	R&D Systems; Minneapolis, EE.UU.	DY-206
Kit <i>Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA</i>	R&D Systems; Minneapolis, EE.UU.	DY-208
LSS (Laurilsulfato de sodio)	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	1614363-1G
Marcador de peso molecular <i>Rainbow™</i>	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	GERPN800E
Medio + suplementos <i>EGM™ Endothelial Cell Growth Medium BulletKit™</i>	Lonza; Basilea, Suiza	CC-3121
Medio <i>DMEM High Glucose</i>	Biowest LLC; Riverside, EE.UU.	L0102
Medio + suplementos <i>KGM-Gold™ Keratinocyte Growth Media BulletKit™</i>	Lonza; Basilea, Suiza	00192152 + 00192151
Medio <i>Melanocyte Growth Medium</i>	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	135-500
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	88417-1G
NaCl	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	S9888

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Nonidet™ - P40	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	74385
NRU (Rojo neutro)	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	N2889
Parafina	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	P3683
Paraformaldehído 4%	Panreac, Applichem; Darmstadt, Alemania	252931
PBS (Tampón fosfato salino)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.	10010023
PMSF (Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo)	Roche Diagnostics; Indianapolis, EE.UU.	10837091001
Tampón de electroforesis (Running buffer)	Bio-Rad Laboratories; Herts, Reino Unido	1610744
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.	4370048
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.	4366596
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina)	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	S5814
TriPure®	Roche Diagnostics; Indianapolis, EE.UU.	11667165001
Tritón X-100	Panreac, Applichem; Darmstadt, Alemania	142314
TrypLE™ Express Enzyme	Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.	12604054
Tween 20	Sigma-Aldrich Products; Saint Louis, EE.UU.	P1379
Xileno	Panreac, Applichem; Darmstadt, Alemania	131769

Tabla 4. Reactivos y kits utilizados en los diferentes ensayos.

3.2.2 Cultivos celulares

En la realización de los diferentes ensayos *in vitro* se emplearon diferentes tipos de cultivos celulares primarios a través de proveedor comercial (**Figura 27**):

- Queratinocitos primarios humanos (NHEK; N° cat. 00192627) de la casa comercial Lonza (Basilea, Suiza). Se cultivaron con medio *KGM-Gold™ Keratinocyte Growth Media BulletKit™* (medio de cultivo + suplementos) a 37°C con 5% CO₂ en aire humidificado. El medio fue reemplazado cada 48 horas.
- Fibroblastos primarios BALB/3T3 de ratón (N° cat. VCA-1005) de la casa comercial Lonza (Basilea, Suiza). Se cultivaron con medio *DMEM High Glucose* suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) a 37°C con 5% CO₂ en aire humidificado. El medio fue reemplazado cada 48 horas.
- Melanocitos epidérmicos primarios humanos (HEM; N° cat. 104-05A) de la casa comercial Sigma-Aldrich Products (Saint Louis, EE.UU.) con medio de cultivo *Melanocyte Growth Medium*, ya suplementado, a 37°C con 5% CO₂ en aire humidificado. El medio fue reemplazado cada 48 horas.

- Células endoteliales microvasculares dérmicas humanas primarias (HDMEC; N° cat. C-12212) de la casa comercial PromoCell (Heidelberg, Germany) con medio de cultivo *EBM™ Endothelial Cell Growth Basal Medium BulletKit™* (medio de cultivo + suplementos) a 37°C con 5% CO₂ en aire humidificado. El medio fue reemplazado cada 48 horas.

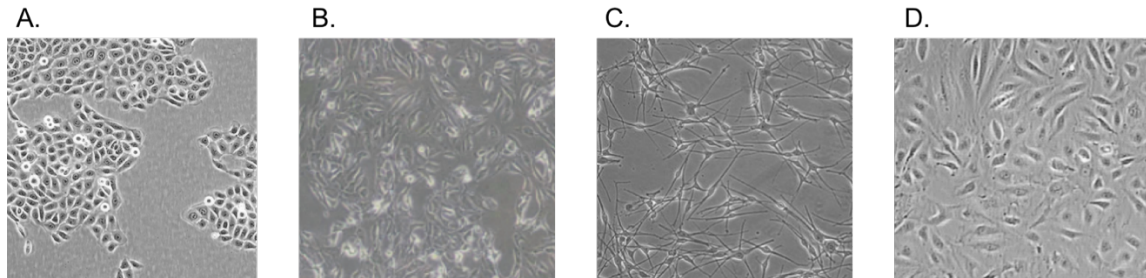


Figura 27. Imagen representativa de cada cultivo de células utilizado. A. Queratinocitos primarios humanos (NHEK); B. Fibroblastos primarios BALB/3T3 de ratón; C. Melanocitos epidérmicos primarios humanos (HEM); D. Células endoteliales microvasculares dérmicas humanas primarias (HDMEC).

3.2.3 Fármacos

El fármaco utilizado para este estudio fue paclitaxel (HY-B0015, MedChemExpress; EE.UU.), un antineoplásico utilizado en clínica en tratamientos oncológicos, coincidiendo con el tratamiento recibido por las pacientes, también llamado comercialmente Taxol®. Las concentraciones elegidas para tratar los cultivos celulares se recogen en la **Tabla 5**.

Fármaco	Concentración (µM)
Paclitaxel	0,3
Paclitaxel	3
Paclitaxel	30

Tabla 5. Concentraciones de paclitaxel utilizadas.

Las dosis utilizadas fueron determinadas a través de las concentraciones plasmáticas del fármaco en clínica (307). Con el fin de comprobar la viabilidad celular del fármaco sobre cultivo de queratinocitos en monocapa, se realizó un ensayo basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) clásico a distintas concentraciones.

3.2.4 Viabilidad celular mediante MTT

Con el fin de comprobar la viabilidad celular del fármaco sobre cultivo de queratinocitos en monocapa, se realizó un ensayo basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) clásico a distintas concentraciones.

Se mantienen en cultivo monocapa los queratinocitos primarios humanos (NHEK) a 37°C en placa de 96 pocillos (Corning Incorporated; Corning, EE.UU.) con medio de cultivo *KGM-Gold™ Keratinocyte Growth Media BulletKit* (medio de cultivo + suplementos) hasta alcanzar una confluencia del 60%. Tras ello, el cultivo es incubado a 37°C durante 48 h con el fármaco paclitaxel en las concentraciones de 30; 3; 0,3; 0,03; 0,003 μM con el fin de obtener una curva de viabilidad celular del fármaco de estudio, se utilizó como control positivo Laurilsulfato de sodio (LSS) a una concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta determinación de viabilidad celular está basada en la reducción metabólica del MTT a través de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, transformándolo en un compuesto de color azul (formazan) cuantificable, permitiendo determinar el funcionamiento mitocondrial de las células. En primer lugar, se retira el medio de cultivo de los pocillos y se incuba durante 3 h con MTT 1 mg/mL. Tras ello, se lavan las células con tampón fosfato salino (PBS), se incuban las células con dimetilsulfóxido (DMSO) durante 10 min y se procede a la lectura de la absorbancia del formazan mediante espectrofotometría a 570nm con el equipo *Infinite M200* (Tecan Group Ltd.; Männedorf, Switzerland) (**Figura 28**).

Se debe tener en cuenta que una determinada dosis de compuesto químico o fármaco produce mayor muerte celular en un cultivo monocapa que en un cultivo 3 dimensiones (3D), llegando a ser un 50% más resistente dependiendo del compuesto (308,309).

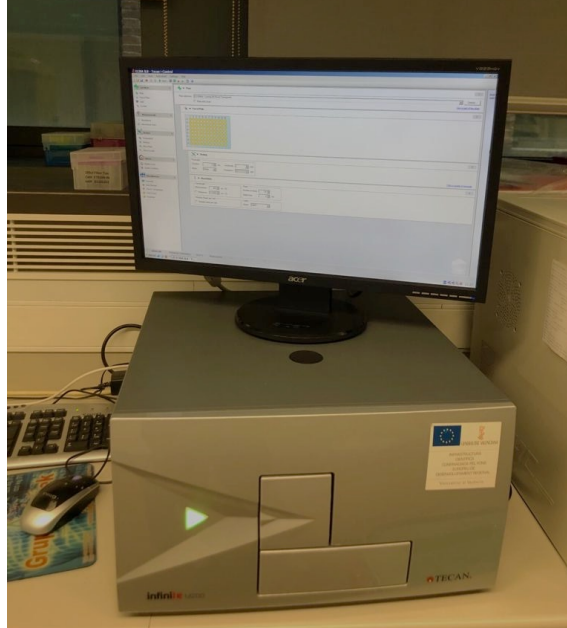


Figura 28. Espectrofotómetro de placa *Infinite M200* para la lectura de absorbancia.

3.2.5 Cultivo de piel reconstituida. Modelo 3D.

Se siguió un modelo de piel reconstituida en 3D, basado en el cultivo de queratinocitos en diferentes capas simulando la estructura de la piel. Los queratinocitos primarios humanos (NHEK) y los fibroblastos primarios BALB/3T3 de ratón se cultivaron formando un modelo 3D de piel. Para la realización de este modelo se requiere de una base de fibroblastos y una capa de queratinocitos que va a crecer utilizando los fibroblastos como soporte al que adherirse, de forma que consigue formar una estructura de queratinocitos similar a la epidermis.

En la obtención del modelo 3D se utilizaron placas de 6 pocillos (Corning Incorporated; Corning, EE.UU.) e *inserts* (Merck Millipore; Burlington, EE.UU.). Los *inserts* son unos cestos de poliestireno cuyo fondo es una membrana microporosa de tereftalato de polietileno. Estos cestos se encajan en los pocillos de las placas y de esta forma se delimitan dos compartimentos, el superior y el inferior, tal y como se representa en la **Figura 29**.

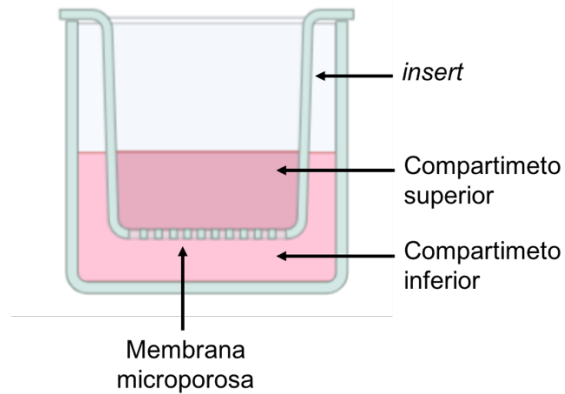


Figura 29. Esquema de un sistema de cultivo organotípico basado en la implementación de *inserts*. El sistema permite generar dos compartimentos, superior e inferior, haciendo posible que la parte apical del cultivo quede expuesta al aire y la parte basal quede en contacto con el medio de cultivo. Creado con BioRender.

En primer lugar, para formar el modelo 3D de piel, se sembraron los fibroblastos sobre la base del *insert* y se mantuvieron durante 2 días con medio de cultivo *DMEM High Glucose* con 10% FBS en la parte inferior del *insert* a 37°C. Una vez alcanzada una confluencia del 60-70% se irradiaron los fibroblastos con luz UV a 0,048 mW durante 1 h para detener su crecimiento, con el equipo *UVACUBE 400* (Honle UV Technology; Germany) (**Figura 30**), y se sembraron sobre ellos los queratinocitos.

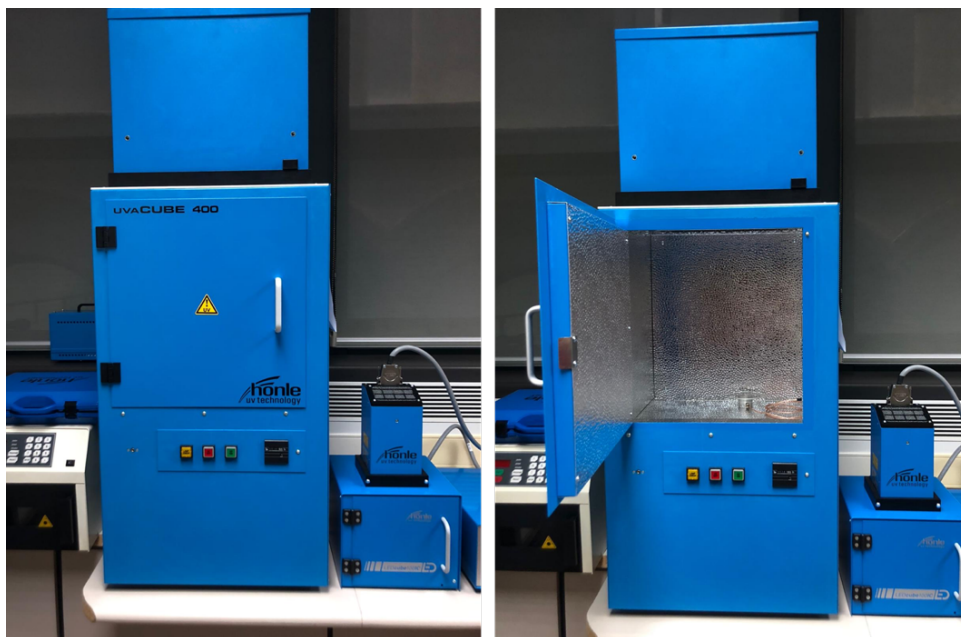


Figura 30. Cámara de irradiación para la simulación solar de radiación UV. Equipo UVACUBE 400.

Los queratinocitos se fueron adhiriendo en los huecos de los fibroblastos. En este momento, se utilizó medio de cultivo *KGM-Gold™ Keratinocyte Growth Media BulletKit™* (medio de cultivo + suplementos) que se añadió tanto por debajo como por encima del *insert*, y se mantuvo durante 4-5 días hasta que se formó una monocapa de queratinocitos formando una lámina continua de células. A partir de la formación de la monocapa celular, se quitó el medio de la parte apical del *insert*, dejando la capa apical del cultivo expuesta al aire, y quedando la parte basal en contacto con el medio de cultivo. El cultivo se mantuvo incubado a 37°C durante 21 días, cambiando el mediado cada dos días, obteniéndose así la formación de un epitelio cutáneo pseudoestratificado (310–312). Este proceso de formación del modelo se muestra de manera esquemática en el diagrama de la **Figura 31**.

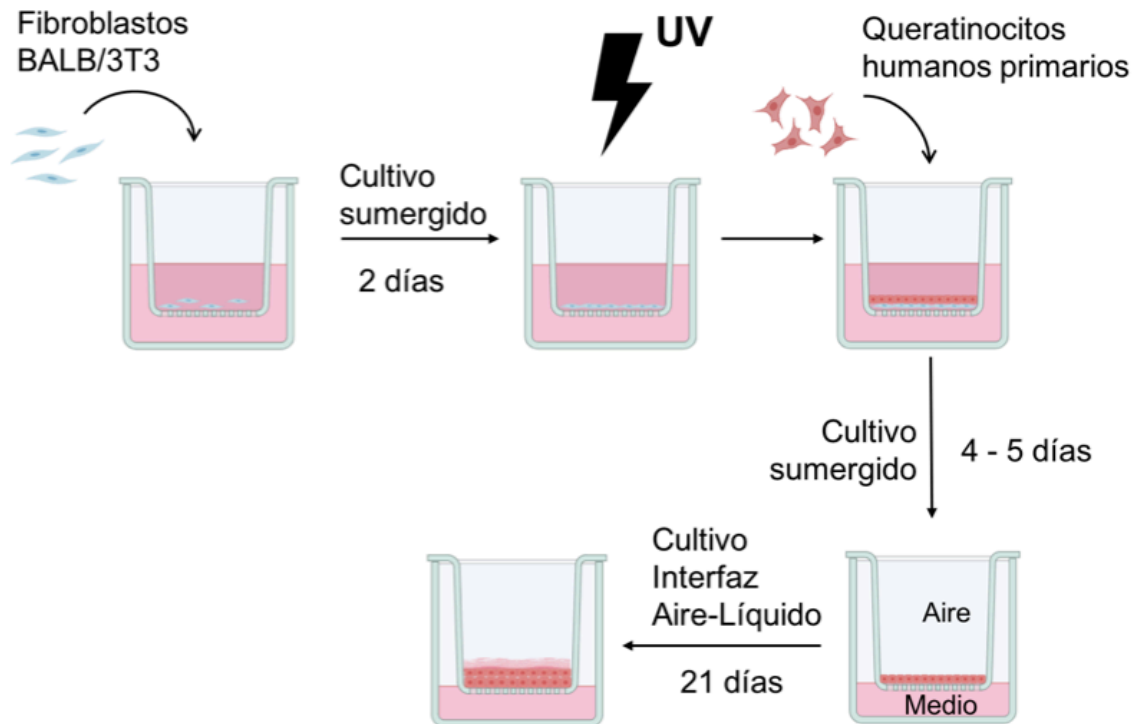


Figura 31. Esquema del proceso de obtención de un cultivo 3D de piel basado en fibroblastos primarios BALB/3T3 y queratinocitos primarios. Los queratinocitos crecen expuestos al aire y sobre una base de fibroblastos adherida a una superficie. Creado con BioRender.

El seguimiento de la obtención del modelo 3D de piel se realizó mediante microscopía en campo claro tomando distintas fotografías a 20x, teniendo en cuenta las particularidades de la morfología de los queratinocitos y fibroblastos. Para ello se utilizó el microscopio *Leica DM6000B* (Leica Biosystems; Wetzlar, Germany) con su correspondiente software. Una vez alcanzada la maduración del modelo 3D de piel, se realizaron cortes histológicos y una posterior tinción hematoxilina-eosina de los *inserts* incluidos en parafina, para así poder visualizar su formación.

Los *inserts* con el epitelio estratificado se fijaron con paraformaldehído 4% durante al menos 48 horas. Posteriormente se deshidrató mediante el siguiente procedimiento descrito en la **Tabla 6**.

Paso	Solución	Tiempo (minutos)
1.	Etanol 70%	30
2.	Etanol 96% I	30
3.	Etanol 96% II	30
4.	Etanol 100% I	30
5.	Etanol 100% II	30
6.	Xileno I	30
7.	Xileno II	30
8.	Parafina I	60

Tabla 6. Procedimiento de deshidratación de las muestras parafinadas.

A continuación, se procedió a la inclusión en bloques de parafina con un centro modular de inclusión de tejidos *Leica EG1150* (Leica Biosystems; Wetzlar, Germany). A partir de los bloques obtenidos, se cortaron secciones (4-6 μm de espesor) con un micrótopo *Thermo Scientific HM 340E Electronic Microtome* (Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.) y se adhirieron a un portaobjetos. Para realizar la tinción con hematoxilina-eosina, se desparafinaron los cortes con xileno, se hidrataron con concentraciones decrecientes de etanol y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Tras la tinción se deshidrataron las muestras mediante una sucesión de alcoholes crecientes y xileno y se montaron los portaobjetos con el medio de montaje DPX (Dibutylphthalate Polystyrene Xylene) y con cubreobjetos. Se tomaron fotografías de las preparaciones obtenidas con un microscopio de luz visible.

El seguimiento de la formación del cultivo 3D de piel, desde la deposición de los queratinocitos sobre los fibroblastos hasta el crecimiento final de los queratinocitos en capas, y obtención del modelo 3D de epidermis puede observarse en la (Figura 32).

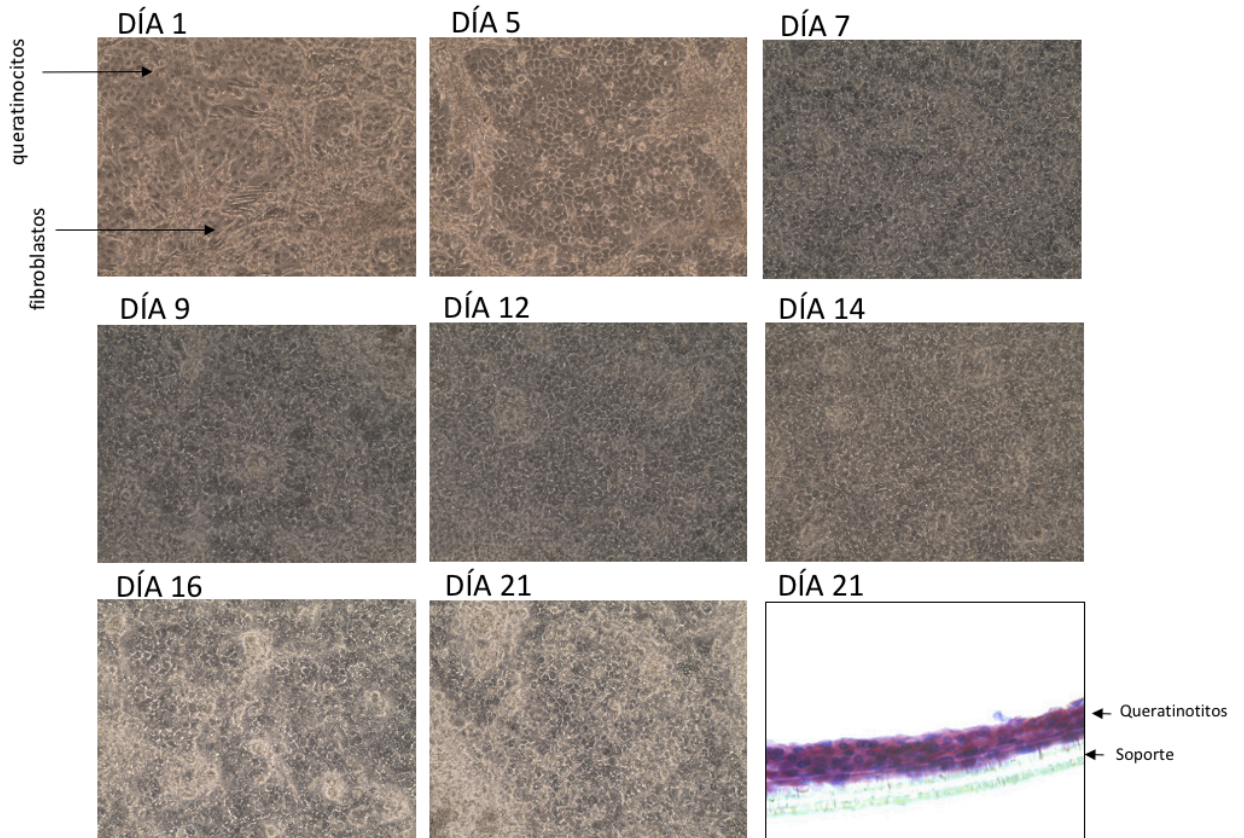


Figura 32. Seguimiento del desarrollo del cultivo 3D de piel, imágenes en campo claro x20, durante 21 días, e histología con tinción hematoxilina-eosina del modelo 3D formado a día 21. En los días 1, 5 y 7 pueden observarse las distintas morfologías celulares de queratinocitos (formas más redondeadas) y fibroblastos (formas alargadas), desapareciendo de la imagen estos últimos a medida que avanzan los días (días 9, 12, 14, 16). Por último, el día 21 solo se observan prácticamente queratinocitos en el cultivo. La última imagen (abajo a la derecha) muestra el corte transversal del soporte con el cultivo, tras una tinción clásica hematoxilina-eosina, en la que se pueden observar las distintas capas del epitelio formadas por los queratinocitos.

3.2.6 Inmunofluorescencia para la detección de Especies Reactivas de Oxígeno

El análisis de inmunofluorescencia se llevó a cabo para la medida de marcadores de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) mediante la utilización de la sonda DHE (Dihidroetidio). Se trata de una sonda fluorescente empleada para la detección de ERO, que cuando se oxida, principalmente por superóxido, es capaz de emitir fluorescencia de color rojo brillante (**Figura 33**).

Se mantienen en cultivo monocapa los queratinocitos primarios humanos (NHEK) (Lonza; Basilea, Suiza) durante 24 h en celdas sobre portaobjetos incubados con el fármaco a sus diferentes concentraciones. Tras finalizar el experimento, el medio fue retirado y las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 30 minutos. Para permeabilizar la membrana se incubó con Tritón X-100 al 0,1% en PBS a temperatura ambiente. A continuación, se añadió a las células el DHE y se incubó en condiciones de oscuridad durante 30 minutos, y posteriormente se incubó durante 5 minutos con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) para marcar los núcleos celulares. Se retiró el medio y se lavó con PBS. Para visualizar los resultados se utilizó un microscopio de fluorescencia *Spectral Leica TCS SP2 microscope* (Leica Biosystems; Wetzlar, Germany) usando las siguientes longitudes de onda de excitación/emisión: 340–380/425nm para DAPI y 520/610nm para DHE.

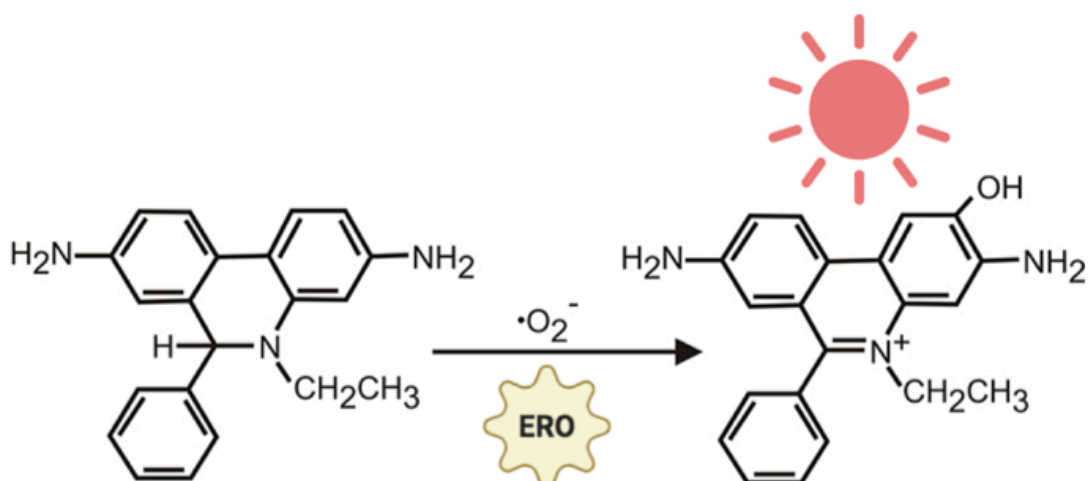


Figura 33. Reacción de oxidación del dihidroetidio a 2-hidroietidio por superóxido, para la detección de especies reactivas de oxígeno intracelulares.

Los resultados se reportaron como análisis colorimétrico mediante el software de análisis de imagen *Image J* (National Institutes of Health, EE.UU.) y como imágenes representativas.

3.2.7 Apoptosis celular mediante citometría de flujo

Para la determinación de los niveles de apoptosis celular se utilizó la técnica de citometría de flujo basada en la detección de anexina V, conocido marcador de apoptosis celular (313,314). Para ello, los queratinocitos primarios humanos (NHEK) (Lonza; Basilea, Suiza) se mantienen en cultivo monocapa durante 24 h a 37°C en placa de 96 pocillos incubados con el fármaco a sus diferentes concentraciones. El medio con los fármacos fue retirado, y conservado. Las células se lavaron con PBS y éste se guardó con el resto del medio. Se añadió tripsina para resuspender el cultivo, dejándose actuar durante 5 min. Una vez resuspendido, se mezcló el medio inicial, el PBS tras el lavado y la resuspensión celular en un mismo pocillo. A continuación, se utilizó el kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* para la detección de la apoptosis celular. Se añadió anexina V asociada al fluorocromo FITC (del inglés *Fluorescein IsoTioCyanate*) y yoduro de propidio (PI) incubándose durante 15min a temperatura ambiente bajo condiciones de oscuridad. El PI aparece cuando las células rompen sus membranas, una característica de necrosis y apoptosis tardía. Por último, se añadió el tampón de unión anexina V y se midieron utilizando el citómetro de flujo *BD LSRFortessa™ X-20* (BD Biosciences; San Jose, CA, EE.UU.) antes de pasada 1 hora (**Figura 34**). Se analizaron un mínimo de 10.000 células para cada una de las condiciones. Los datos fueron analizados por el software *FlowJo* (TreeStar, EE.UU.). Se tomaron al menos tres réplicas por prueba, se representaron los diagramas obtenidos del análisis de la anexina V asociada a FITC frente al PI. Los diagramas se pueden dividir en cuatro cuartiles (Q) que se definen de la siguiente manera: Q1 células necróticas (PI/FITC, +/-); Q2 células apoptóticas tardías (PI/FITC, +/+); Q3 células viables (PI/FITC, -/-) y Q4 células apoptóticas tempranas (PI/FITC, -/+). Los datos de los cuartiles tomados para la representación de la apoptosis celular fueron la suma del Q2 y el Q4, y los resultados se expresaron como media de cada uno de ellos.



Figura 34. Equipo de citometría de flujo BD LSRFortessa™ X-20.

3.2.8 Angiogénesis

Para la determinación de los cambios sobre el proceso de angiogénesis provocados por el fármaco paclitaxel, se utilizó el kit comercial *Endothelial Tube Formation Assay*, siguiendo las instrucciones propuestas por el fabricante.

Se siembran las células microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) con medio de cultivo *EBM™ Endothelial Cell Growth Basal Medium BulletKit™* (medio + suplementos) sobre placas opacas previamente revestidas con el gel proporcionado por en el kit, y se incuban con el fármaco a sus diferentes concentraciones durante 16h para permitir la formación del tubo endotelial según el fabricante. Tras finalizar el experimento, el medio fue retirado. A continuación, se lavaron las células con el tampón de tinción y fueron teñidas con una solución de tinción basada en calceína-acetoximetil (calceína-AM) durante 30min. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS y se tomaron imágenes mediante microscopía de fluorescencia, con el equipo *Spectral Leica TCS SP2 microscope* (Leica Biosystems; Wetzlar, Germany) usando las siguientes longitudes de onda de excitación/emisión: 495/515 nm.

Los resultados se reportaron como análisis mediante el software de análisis de imagen *Image J* (National Institutes of Health, EE.UU.) de la longitud del tubo (pixels), el número total de ramificaciones y el número total de lazos, así como en imágenes representativas.

3.2.9 Liberación de interleucinas mediante técnica ELISA

La IL-1 α , IL-6 y IL-8 liberadas por el modelo 3D de queratinocitos se determinó mediante técnica ELISA (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: “Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”) comercial (Human IL-1 α /IL-1F1, Human IL-6, Human CXCL8/IL8, R&D Systems; Minneapolis, EE.UU.) siguiendo las instrucciones propuestas por el fabricante. Los cultivos en 3D de queratinocitos incubaron con el fármaco durante 48 h. El sobrenadante celular se recogió y se midió la interleucina de interés mediante el kit de ELISA correspondiente. Los kits empleados utilizan la técnica de ELISA cuantitativa por inmuno-detección indirecta de proteínas o sistema “sándwich”. Las placas ELISA están previamente revestidas en su base con un anticuerpo primario contra la proteína de interés (**Figura 35 1.**). Se depositó la muestra en los pocillos y se dejó incubar durante 2 h para favorecer la unión ente la interleucina de interés y el anticuerpo inmovilizado (**Figura 35 2.**). Se realizaron lavados para eliminar uniones inespecíficas (**Figura 35 3.**). Tras ello, con sus correspondientes tiempos de espera, se añadió el anticuerpo específico conjugado a biotina (**Figura 35 4.**). Se aplicó el conjugado de estreptavidina-peroxidasa, que se unió a la biotina aprovechando la alta afinidad biológica entre la biotina y la estreptavidina (**Figura 35 5.**). Por último, se añadió 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) como sustrato para para producir la reacción al entrar en contacto con la peroxidasa, ofreciendo una absorbancia proporcional al número de uniones de la interleucina de estudio a los anticuerpos (**Figura 35 6.**). Se detuvo la reacción y se midió la absorbancia mediante espectrofotometría a 450nm con el equipo *Infinite M200* (Tecan Group Ltd.; Männedorf, Switzerland) (**Figura 28**). Los datos de concentración de la proteína se extrapolaron de una recta patrón estándar previa, realizada según las instrucciones del fabricante, y se relativizaron respecto al grupo control.

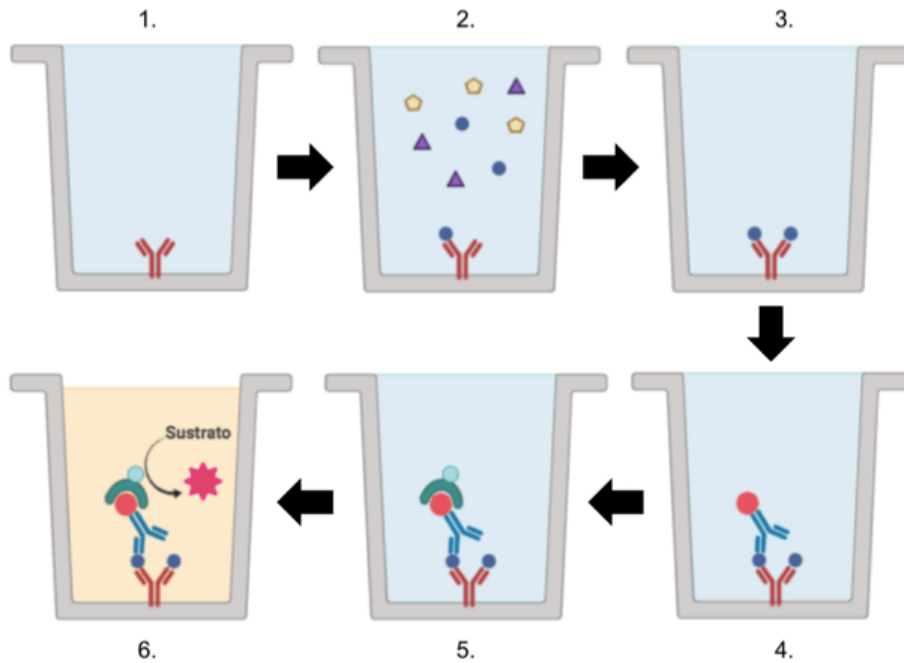


Figura 35. Esquema de la técnica ELISA de cuantificación de proteínas por inmuno-detección indirecta, en el que se describen las diferentes fases del proceso. Creado con BioRender.

3.2.10 Expresión génica mediante qPCR

3.2.10.1 Extracción de ARN total y cuantificación

El cultivo 3D de piel, así como el cultivo de melanocitos primarios cultivado en placas de 6 pocillos, son incubados con el fármaco durante 24h, y así poder obtener el ácido ribonucleico (ARN) producido por las células. Tras este periodo de incubación con el tratamiento, se recogió el experimento con el reactivo de aislamiento *TriPure*[®] y se realizó una extracción de ARN total mediante el procedimiento propuesto por el fabricante. El ARN extraído se cuantificó con el espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* (Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.) (**Figura 36**). Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total (ng/μL) mediante medidas de absorbancia a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}), a partir del espectro de absorción de las muestras. También se obtuvo el valor de la pureza de las muestras, determinado por el ratio A_{260}/A_{280} .



Figura 36. Equipo de cuantificación de ácidos nucleicos, espectrofotómetro *NanoDrop 2000C*.

3.2.10.2 Transcripción reversa

A continuación, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR). En la reacción de transcripción reversa, la enzima denominada transcriptasa reversa sintetiza ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir de un ARN mensajero molde (Figura 4.17). Este paso fue necesario para realizar la cuantificación de la expresión génica por PCR a tiempo real también llamada PCR cuantitativa (qPCR).

Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300 ng de ARN en ADNc utilizando el kit *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit* para la transcripción reversa. Se realizó este proceso en un termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.) (**Figura 37**) programando los siguientes pasos para la muestra: incubación durante 10 minutos a 25°C, ciclo de 30 minutos a 42°C e inactivación de la enzima durante 5 minutos a 95°C. El ADNc de doble hebra sintetizado se almacenó a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

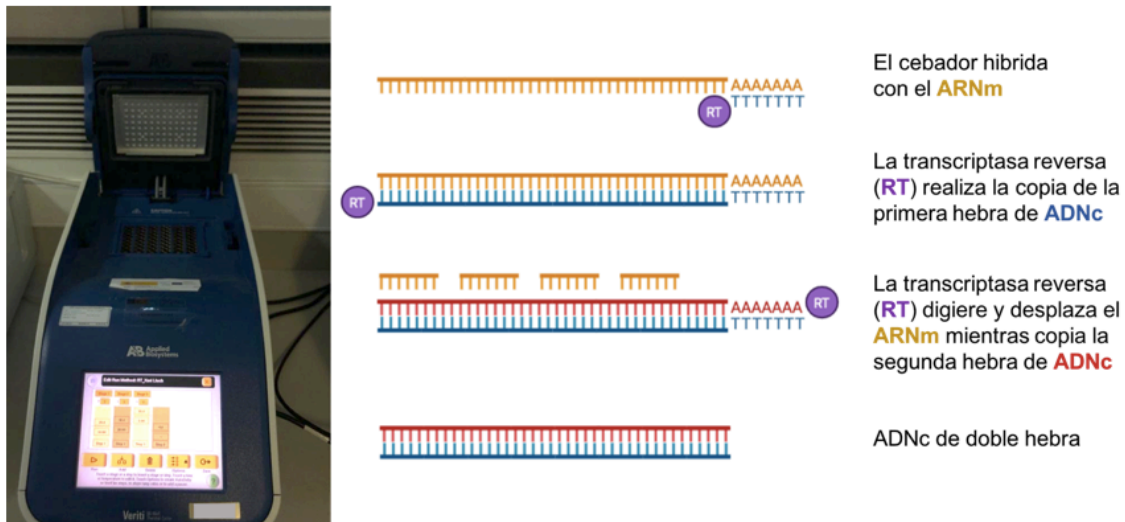


Figura 37. Transcripción reversa. La fotografía de la izquierda muestra el termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* empleado para la reacción de transcripción reversa. El diagrama de la parte derecha muestra las etapas en las que sucede la reacción de transcripción reversa. *Creado con BioRender.*

3.2.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN de interés utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Los cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción de amplificación consiste en la repetición de un ciclo integrado por tres etapas:

- Desnaturalización del ADN molde
- Hibridación de cebadores
- Elongación

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial en la cantidad de ADN de la región de interés.

La variante denominada PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) constituye una forma precisa de detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm). Los equipos de qPCR permiten la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción empleando lectores de fluorescencia que permiten medir la fluorescencia emitida durante la reacción. Para ello se utilizaron *Ensayos de*

Expresión Génica TaqMan[®], que son mezclas pre-formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos. Los reactivos *TaqMan*[®] utilizan una sonda capaz de generar fluorescencia y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la reacción. El proceso tiene lugar en una serie de etapas, tal y como se detalla en la **Figura 38**.

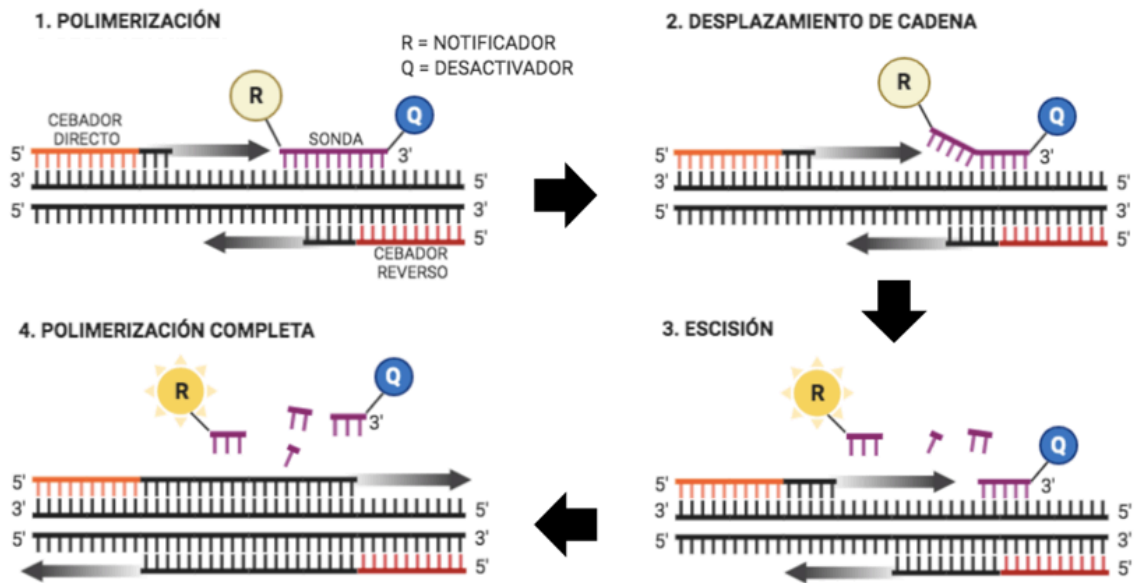


Figura 38. Sistema *TaqMan*[®] de cuantificación fluorimétrica de la expresión génica. 1. Etapa de polimerización donde la sonda específica del gen *Taqman*[®] con un notificador (R) y un desactivador (Q) unidos a los extremos 5' y 3' hibrida con el ADNc. 2. Desplazamiento de cadena donde empieza a copiarse el ADNc, cuando ambos marcadores están unidos a la sonda se inhibe la emisión del fluorocromo R por el desactivador Q. 3. En la etapa de escisión durante cada ciclo de polimerización la polimerasa degrada la sonda separando R de Q, comenzando la emisión de fluorescencia. 4. Se completa la polimerización, en la que el notificador y el desactivador están separados emitiendo por tanto la fluorescencia característica. Creado con BioRender.

La existencia de estas sondas capaces de emitir fluorescencia permite la cuantificación en tiempo real únicamente de los productos de amplificación específicos. En la **Tabla 7** se enumeran las sondas de expresión génica *TaqMan*[®] (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.) utilizadas para el estudio de la expresión de los genes de interés.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Gen	Referencia	Cultivo de procedencia del RNA
Bcl2	Hs04986394_s1	Cultivo 3D piel
Elastina (ELN)	Hs00355783_m1	Cultivo 3D piel
eNOS	Hs01574665_m1	Cultivo 3D piel
Fibronectina (FN1)	Hs01549976_m1	Cultivo 3D piel
NOX4	Hs01379108_m1	Cultivo 3D piel
SOD1	Hs00533490_m1	Cultivo 3D piel
Acuaporina 3 (AQP3)	Hs00185020_m1	Cultivo 3D piel
Colágeno tipo I (COL1A1)	Hs00164004_m1	Cultivo 3D piel
p21 (PAK3)	Hs01040810_m1	Cultivo 3D piel
p53 (TP53)	Hs01034249_m1	Cultivo 3D piel
VEGF	Hs00900055_m1	Cultivo 3D piel
Nrf2	Hs00975961_g1	Cultivo 3D piel
TYR	Hs00165976_m1	Melanocitos en monocapa
TYRP1	Hs00167051_m1	Melanocitos en monocapa
DCT	Hs01098278_m1	Melanocitos en monocapa
β-actina (ACTB)	Hs01060665_g1	Ambos

Tabla 7. Sondas de expresión génica *TaqMan*[®] utilizados en la qPCR (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.), incluyendo el tipo de cultivo celular del cual se extrae el material genético del experimento.

Cada reacción de PCR contenía los siguientes componentes:

- 1 µL de ADNc sintetizado en la transcripción inversa
- 5 µL de *TaqMan*[™] Gene Expression Master Mix
- 0,5 µL de la sonda y los cebadores correspondientes
- 3,5 µL de agua dietilpirocarbonato (DEPC)

La qPCR se desarrolló en un termociclador *QuantStudio*[™] 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.) con las siguientes condiciones: un paso inicial de 2 minutos a 0°C, un ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C (**Figura 39**).

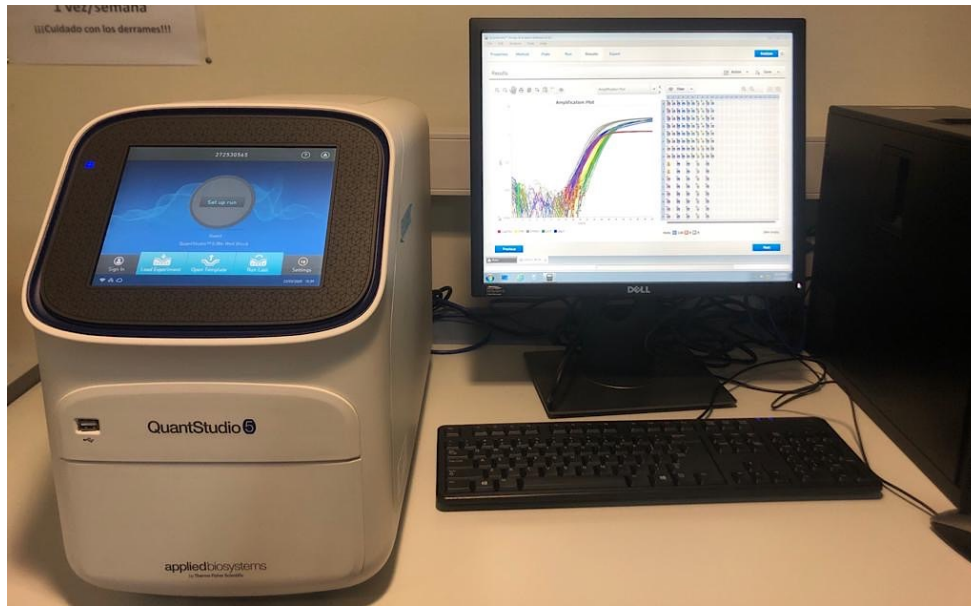


Figura 39. Equipo de qPCR QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR). La figura de la derecha corresponde a la gráfica obtenida tras el proceso de cuantificación, en la que el gen diana ha sido amplificado. Mediante el software del equipo es posible analizar las curvas obtenidas y cuantificar la expresión génica.

A partir de los datos de fluorescencia registrados se obtuvieron curvas de amplificación en las que se representaba el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos transcurridos. Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral o *threshold* en inglés. El *threshold* es el nivel determinado automáticamente o manualmente y fijado en la región exponencial de la gráfica de amplificación generada, por encima de esta línea el nivel de fluorescencia se considera significativamente superior a la fluorescencia basal.

La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó comparando sus Ct con el del control endógeno β -actina (ACTB). El nivel de expresión génica se calculó después como la diferencia (Δ Ct) entre el valor Ct del gen de interés y el valor Ct del control endógeno. Los cambios en la expresión de los niveles de ARNm del gen de interés se designaron como $2^{-\Delta$ Ct}.

3.2.11 Expresión proteica mediante Western Blot

La técnica de Western Blot permite detectar y cuantificar una proteína específica en una mezcla compleja de proteínas. El cultivo 3D de piel, es incubado con el fármaco durante 48 h para la obtención de proteínas. Tras este periodo de incubación con el tratamiento, se realizó una extracción de proteínas mediante la lisis de las células con un tampón de lisis compuesto por Buffer C (HEPES 1M, NaCl 4M, EDTA 0,5M, EGTA 0,1M, Glicerol y agua) suplementado con un cóctel inhibitorio de proteasas *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* y PMSF (Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo). A continuación, se realizaron sucesivos ciclos de choque térmico, se añadió el detergente *Nonidet™-P40* al 1% y tras centrifugar 20 min a 4°C se obtuvo el sobrenadante con el extracto proteico total. A continuación, se cuantificó el contenido en proteínas empleando el ensayo del ácido bicinonímico (BCA) utilizando el kit de ensayo *BCA Protein Assay Kit* y se midió la absorbancia a 562 nm con un lector espectrofotométrico de placas *Infinite M200* (Tecan Group Ltd.; Männedorf, Switzerland) (**Figura 28**). La cuantificación proteica se obtuvo por interpolación de las absorbancias obtenidas con una curva estándar de albumina de suero bovino (BSA) preparada en el mismo tampón que las muestras para minimizar la absorbancia residual.

Los extractos proteicos se prepararon con la misma cantidad de proteína (12 µg) de cada muestra y se realizó la electroforesis. Junto con las muestras se cargó el marcador de peso molecular *Rainbow™* en geles de poliacrilamida *Mini-PROTEAN® TGX™ Gels* (Bio-Rad Laboratories; Herts, Reino Unido), 10 µL por pocillo. La electroforesis se realizó en cubetas *MiniPROTEAN® 3 Cell Electrophoresis System* (Bio-Rad Laboratories; Herts, Reino Unido) usando tampón de electroforesis (*Running buffer*) y con un voltaje inicial de 90 V durante el paso de las proteínas por la primera parte del gel, aumentando tras ello el voltaje hasta 300 V. Una vez realizada la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa *Trans-Blot® Turbo™ Tranfer Pack* (Bio-Rad Laboratories; Herts, Reino Unido) utilizando el sistema *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Bio-Rad Laboratories; Herts, Reino Unido). Finalizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó con la solución de bloqueo BSA 5% en PBS con 0,1% Tween 20 (PBS-T) durante 2 h a

3. MATERIALES Y MÉTODOS

temperatura ambiente. A continuación, se añadió el anticuerpo primario diluido en BSA (1:1000) y se dejó en agitación y a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados se recogen la **Tabla 8**.

Símbolo del anticuerpo	Casa comercial	Especie de origen
Bcl2	NB100-92142 Novus Biologicals (Cambridge, Reino Unido)	Conejo
AQP3	ab125219 abcam (Cambridge, Reino Unido)	Conejo
COL1A	PA5-95137 Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.)	Conejo
FN1	PA5-29578 Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.)	Conejo
NOX4	NB100-58849 Novus Biologicals (Cambridge, Reino Unido)	Conejo
Nrf2	ab89443 abcam (Cambridge, Reino Unido)	Ratón
SOD1	ab16831 abcam (Cambridge, Reino Unido)	Conejo
VEGFA	ab46154 abcam (Cambridge, Reino Unido)	Conejo
NF-κB	ab16502 abcam (Cambridge, Reino Unido)	Conejo
(p)-NF-κB	ab86299 abcam (Cambridge, Reino Unido)	Conejo
ELN	ab23747 abcam (Cambridge, Reino Unido)	Conejo
p53	ab131442 abcam (Cambridge, Reino Unido)	Conejo
ACTB	A1978 Sigma-Aldrich Products (Saint Louis, EE.UU.)	Conejo

Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados en el ensayo Western Blot.

Se utilizó la β-actina (ACTB) como control endógeno de carga del extracto proteico total. Al día siguiente, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario preparado en BSA, disponibles en la **Tabla 9**.

Anticuerpo	Casa comercial
Anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP (origen: asno)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.) (SA1-100)
Anticuerpo anti-conejo conjugado a HRP (origen: asno)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.) (SA1-200)

Tabla 9. Anticuerpos secundarios utilizados en el ensayo Western Blot.

Finalmente, se detectó la expresión proteica por quimioluminiscencia mediante el kit *ECL plus*. Las proteínas marcadas se detectaron realizando autorradiografías en cámara oscura con película fotográfica (Amersham GE Healthcare; Buckinghamshire, Reino Unido) capaz de recoger la emisión de quimioluminiscencia inducida. Los resultados se reportaron como análisis densitométrico mediante el software de análisis de imagen *Image J* (National Institutes of Health, EE.UU.) y como western blot representativos. En la **Figura 40**, puede verse de forma esquemática el proceso de la técnica.

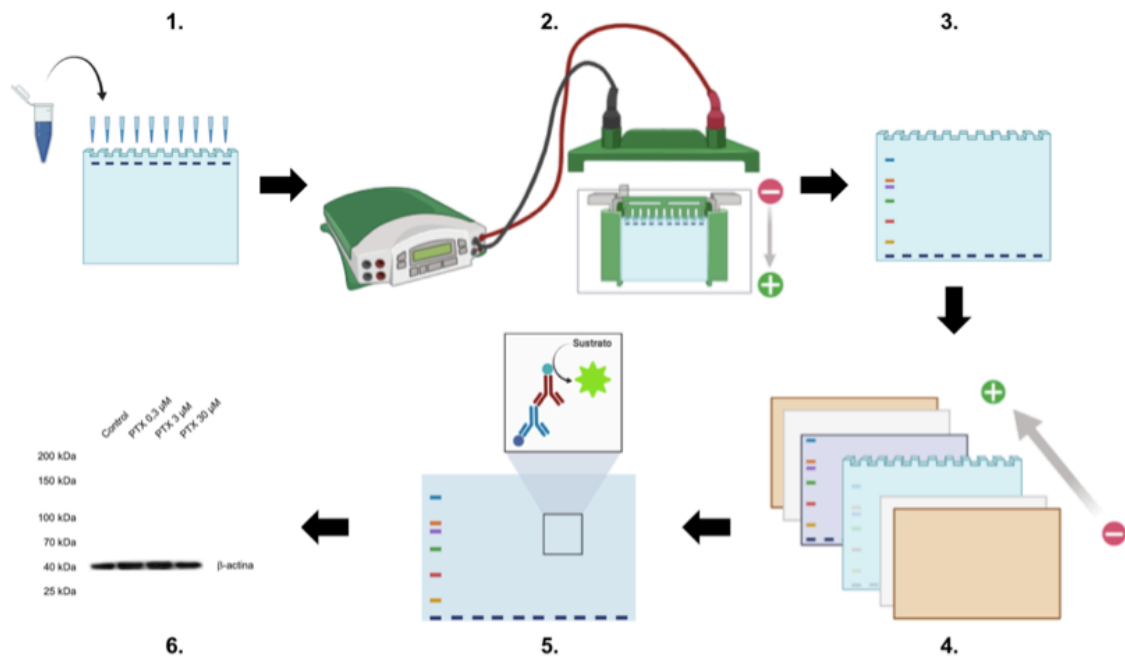


Figura 40. Esquema de la técnica Western Blot de detección y cuantificación de proteínas. 1. Carga de las muestras y el marcador de pesos moleculares. 2. Introducción en la cubeta de electroforesis. 3. Tras la electroforesis las muestras quedan separadas a lo largo del gel, incluido el marcador. 4. Transferencia de las proteínas separadas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa. 5. Incubación de la membrana con anticuerpo primario, anticuerpo secundario y reacción de quimioluminiscencia. 6. Revelado de la quimioluminiscencia para visualizar la banda donde se encuentra la proteína de interés. Creado con BioRender.

3.2.12 Capacidad fototóxica del paclitaxel

Para la determinación de la capacidad fototóxica del fármaco se realizó un estudio avalado por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD), llamado test de fototoxicidad *in vitro* *NRU* 3T3 (315,316).

Los fibroblastos primarios BALB/3T3 de ratón se mantienen en cultivo monocapa durante 24 h con medio *DMEM High Glucose* con 10% FBS. Se incuban previamente dos placas de 96 pocillos con la sustancia química de prueba, en este caso el fármaco paclitaxel en PBS, con una serie de concentraciones, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} M, y con control positivo y control negativo durante 1 h. El control positivo es Clorpromazina (CPZ, HY-B0407A, MedChemExpress; EE.UU.) y el control negativo LSS. Posteriormente, una de las dos placas se irradia con luz UV (+UV) durante 50 min a una potencia de $1,7 \text{ mW/cm}^2$ mientras que la otra placa se mantiene en la oscuridad (-UV), el equipo utilizado para la irradiación fue el *UVACUBE 400* (Honle UV Technology, Germany) (**Figura 30**). En ambas placas, el medio de tratamiento se reemplaza por medio de cultivo nuevo y, después de otras 24 h de incubación, se determina la viabilidad celular por absorción de rojo neutro (NRU). La absorbancia de NRU se determinó mediante espectrofotometría a 540nm con el equipo *Infinite M200* (Tecan Group Ltd.; Männedorf, Switzerland) (**Figura 28**).

La viabilidad celular se expresa como porcentaje y se calcula para cada concentración de prueba. Para predecir el potencial fototóxico, se comparan las respuestas de concentración obtenidas en presencia y en ausencia de irradiación, al nivel de la concentración efectiva 50 (CE_{50}), es decir, la concentración en la cual se reduce la viabilidad celular al 50% en comparación con los controles no tratados. Para evaluar los resultados, se calcula un factor de fotoirritación (PIF):

$$PIF = \frac{CE_{50} (-UV)}{CE_{50} (+UV)}$$

Se debe tener en cuenta que el PIF solo se puede calcular si las curvas de dosis-respuesta obtenidas en presencia y ausencia de luz UV caen por debajo del 50% de los controles, porque solo en estos casos se pueden determinar dos valores de CE_{50} (-UV y +UV). Por lo tanto, el modelo de predicción tiene en cuenta dos reglas de clasificación adicionales:

- Si una sustancia química es solo citotóxica en presencia de UV (+UV) y no citotóxica cuando se prueba sin irradiación (-UV), el PIF no se puede calcular, aunque este es un resultado que indica potencial fototóxico.
- Si ambos, EC_{50} (-UV) y EC_{50} (+UV), no se pueden calcular debido al hecho de que la sustancia no muestra ninguna citotoxicidad hasta la concentración más alta probada, quiere decir que no hay potencial fototóxico.

Según la OECD, la clasificación de la fototoxicidad en función del PIF obtenido se realiza siguiendo la escala que recoge la **Tabla 10**.

Predicción	PIF
No fototóxico	$PIF < 2$
Probablemente fototóxico	$2 < PIF < 5$
Fototóxico	$PIF > 5$

Tabla 10. Interpretación de los resultados de fototoxicidad según el factor de fotoirritación (PIF) obtenido (316).

3.2.13 Presentación de datos y análisis estadístico de los ensayos *in vitro*

Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes ($P=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). El análisis de la distribución normal para cada grupo de datos se realizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) pareado seguido de la prueba de Bonferroni, mediante la prueba t de Student entre grupos, o por pruebas no paramétricas apropiadas en su caso (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE.UU.). Los resultados se tomaron como significativos (*) cuando el valor $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO *IN VIVO*

4.1.1 Efectos adversos dermatológicos comunicados durante el tratamiento

Las 20 pacientes oncológicas en tratamiento con paclitaxel culminaron el estudio siguiendo con las pautas propuestas y realizando las visitas pertinentes. Las pacientes comunicaron una serie de enfermedades dermatológicas destacables que aparecieron durante el tratamiento con paclitaxel (**Tabla 11**), además de sufrir una alopecia asociada a quimioterapia generalizada, de mayor o menor grado dependiendo de la paciente.

Nº de paciente	Tratamiento	Enfermedades dermatológicas
4	TAXOL®+CARBOPLATINO	INTERTRIGO, DERMATITIS
5	TAXOL®+BEVACIZUMAB	DERMATITIS, ONICOLISIS
12	TAXOL®	SÍNDROME MANO-PIE
19	TAXOL®	LIVEDO RETICULARIS, QUERATOSIS HIPERTRÓFICA

Tabla 11. Relación de enfermedades dermatológicas destacadas diagnosticadas durante el tratamiento con paclitaxel en las pacientes oncológicas.

Estas son patologías que aparecen en la piel como consecuencia del tratamiento quimioterapéutico, por tanto, pueden considerarse como efectos adversos dermatológicos del fármaco.

4.1.2 Estudio de los parámetros físicos, biomecánicos y fisiológicos de la piel

4.1.2.1 Valor de hidratación

Se evaluó el efecto del paclitaxel sobre el valor de hidratación de la piel, obtenido mediante la sonda Corneometer®. Los resultados vienen dados en Unidades Arbitrarias (U.A.). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el valor de hidratación de la población de voluntarias sanas y el valor de las pacientes oncológicas previo tratamiento (T1), tanto para el rostro como para el antebrazo. El tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel produjo una disminución del valor de hidratación,

existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la visita inicial en la zona del antebrazo en la última visita (T3), y en la zona de la mejilla tanto en la segunda visita (T2) como en T3 (Figura 41).

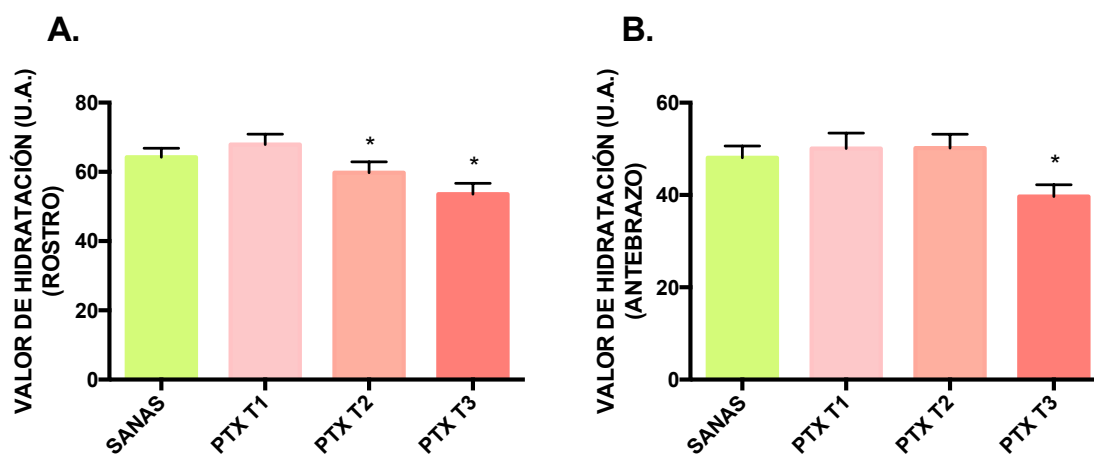


Figura 41. Determinación del valor de hidratación obtenido durante el tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas, en rostro (A.) y en antebrazo (B.). Se tomaron medidas del valor de hidratación (U.A.) antes (T1), durante (T2) y al finalizar (T3) el tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel. Se utilizó un grupo de 20 voluntarias sanas como control. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 3 determinaciones en cada tiempo, para todas las pacientes (n=20). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni, para el grupo de pacientes oncológicas en sus tres tiempos. La prueba t de Student se realizó entre el grupo de voluntarias sanas y el de pacientes oncológicas a T1. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

El porcentaje medio de variación del valor de hidratación ($\% \pm$ SEM) con respecto a T1, en la mejilla y en el antebrazo, después del tratamiento con paclitaxel a T2 y T3 se muestran en la **Tabla 12**.

Variación del valor de hidratación	T2 (% \pm SEM)	T3 (% \pm SEM)
Rostro	-10,38% \pm 4,94	-18,73% \pm 5,42
Antebrazo	4,74% \pm 8,07	-16,38% \pm 5,67

Tabla 12. Porcentaje medio de variación del valor de hidratación (% \pm SEM) a T2 y T3 con respecto a T1, en la zona del rostro y en la zona del antebrazo.

4.1.2.2 Pérdida de Agua Transepidérmica (TEWL)

Se evaluó el efecto del paclitaxel sobre la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) de la piel, obtenida mediante la sonda Tewameter®. Los resultados vienen dados en g/hm^2 . No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el valor de TEWL de la población de voluntarias sanas y el valor de las pacientes oncológicas previo tratamiento (T1), tanto para el rostro como para el antebrazo. El tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel produjo una disminución del valor de TEWL en la segunda (T2) y tercera visita (T3), existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la visita inicial en la zona del antebrazo en T3, y en la zona de la mejilla tanto en T2 como en T3 (Figura 42).

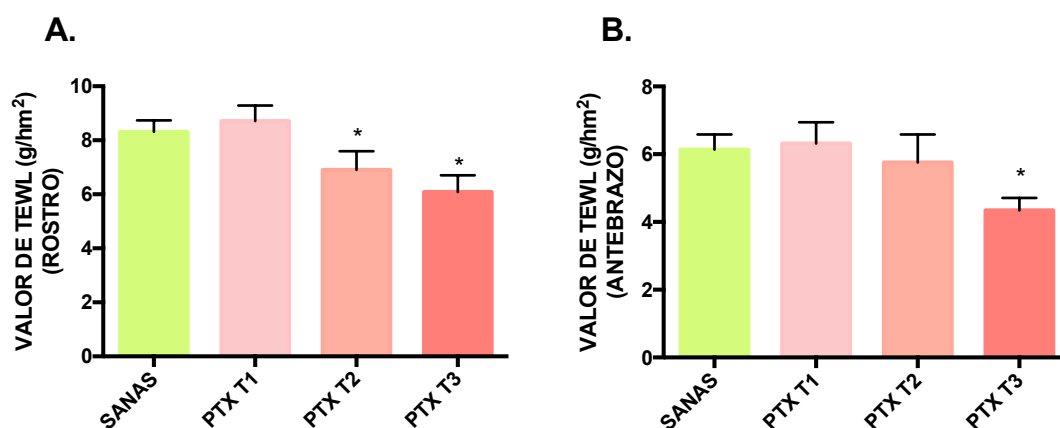


Figura 42. Determinación del valor de TEWL obtenido durante el tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas, en rostro (A.) y en antebrazo (B.). Se tomaron medidas del valor de TEWL (g/hm^2) antes (T1), durante (T2) y al finalizar (T3) el tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel. Se utilizó un grupo de 20 voluntarias sanas como control. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 3 determinaciones en cada tiempo, para todas las pacientes ($n=20$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni, para el grupo de pacientes oncológicas en sus tres tiempos. La prueba t de Student se realizó entre el grupo de voluntarias sanas y el de pacientes oncológicas a T1. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

El porcentaje medio de variación del valor de la TEWL ($\% \pm \text{SEM}$) con respecto a T1, en la mejilla y en el antebrazo, después del tratamiento con paclitaxel a T2 y T3 se muestran en la **Tabla 13**.

Variación de la TEWL	T2 (% \pm SEM)	T3 (% \pm SEM)
Rostro	-18,36% \pm 7,36	-26,67% \pm 8,63
Antebrazo	2,51% \pm 15,63	-18,56% \pm 9,49

Tabla 13. Porcentajes medios de variación del valor de TEWL ($\% \pm \text{SEM}$) a T2 y T3 con respecto a T1, en la zona del rostro y en la zona del antebrazo.

4.1.2.3 Valor de sebo

Se evaluó el efecto del paclitaxel sobre la producción de lípidos de la piel, a través del valor de sebo obtenido mediante la sonda Sebumeter®. Los resultados vienen dados en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el valor de sebo de la población de voluntarias sanas y el valor de las pacientes oncológicas previo tratamiento (T1). El tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel produjo una disminución del valor de sebo, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la visita inicial en T3 (**Figura 43**).

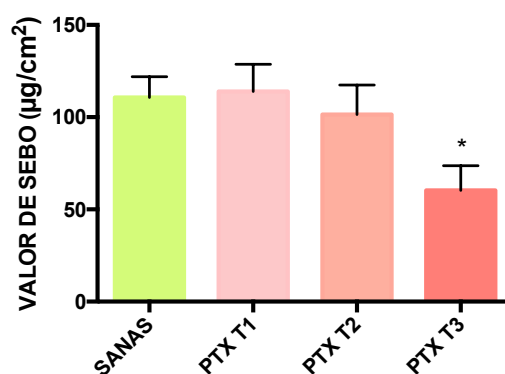


Figura 43. Determinación del valor de sebo obtenido durante el tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas. Se tomaron medidas del valor de sebo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) antes (T1), durante (T2) y al finalizar (T3) el tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel. Se utilizó un grupo de 20 voluntarias sanas como control. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 3 determinaciones en cada tiempo, para todas las pacientes ($n=20$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni, para el grupo de pacientes oncológicas en sus tres tiempos. La prueba t de Student se realizó entre el grupo de voluntarias sanas y el de pacientes oncológicas a T1. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$

El porcentaje medio de variación del valor de sebo ($\% \pm \text{SEM}$) con respecto a T1 después del tratamiento con paclitaxel a T2 y T3 se muestran en la **Tabla 14**.

Variación del valor de sebo	T2 (% \pm SEM)	T3 (% \pm SEM)
	1,14% \pm 16,00	-45,29% \pm 8,23

Tabla 14. Porcentajes medios de variación del valor de sebo (% \pm SEM) a T2 y T3 con respecto a T1.

4.1.2.4 Valor de eritema

Se evaluó el efecto del paclitaxel sobre el aumento del enrojecimiento de la piel, a través del valor de eritema obtenido mediante la sonda Mexameter®. Los resultados vienen dados en Unidades Arbitrarias (U.A.). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el valor de eritema de la población de voluntarias sanas y el valor de las pacientes oncológicas previo tratamiento (T1). El tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel produjo un aumento del valor de eritema, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la visita inicial en la última visita (T3), no se observaron diferencias significativas en la segunda visita (T2) (Figura 44).

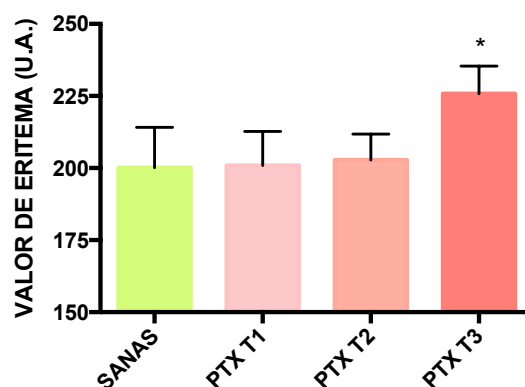


Figura 44. Determinación del valor de eritema obtenido durante el tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas. Se tomaron medidas del valor de eritema (U.A) antes (T1), durante (T2) y al finalizar (T3) el tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel. Se utilizó un grupo de 20 voluntarias sanas como control. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 3 determinaciones en cada tiempo, para todas las pacientes (n=20). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni, para el grupo de pacientes oncológicas en sus tres tiempos. La prueba t de Student se realizó entre el grupo de voluntarias sanas y el de pacientes oncológicas a T1. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

El porcentaje medio de variación del valor de eritema ($\% \pm$ SEM) con respecto al T1 después del tratamiento con paclitaxel a T2 y T3 se muestran en la **Tabla 15**.

Variación del valor de eritema	T2 (% \pm SEM)	T3 (% \pm SEM)
	2,74% \pm 4,93	13,96% \pm 4,11

Tabla 15. Porcentajes medios de variación del valor de eritema ($\% \pm$ SEM) a T2 y T3 con respecto a T1.

4.1.2.5 Pigmentación

Se evaluó el efecto del paclitaxel sobre los cambios en la pigmentación de la piel. Por una parte, se utilizó la sonda Mexameter®, que ofrece los resultados del valor de melanina en Unidades Arbitrarias (U.A.). Por otro lado, se utilizó la sonda Colorimeter®, que ofrece los resultados en grados ITA (ITA°), unidades relacionadas con el tono de la piel, inversamente proporcionales a su oscuridad, es decir, cuanto más bajo sea el valor de los ITA° más oscura será la piel. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el valor de melanina ni los ITA° de la población de voluntarias sanas y los valores de las pacientes oncológicas previo tratamiento (T1). El tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel produjo un aumento del valor de melanina, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la visita inicial en la última visita (T3), pero no en la segunda (T2) (**Figura 45 A.**). Este tratamiento también produjo una disminución de los ITA°, que representa un aumento de la pigmentación, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la visita inicial en T2 y en T3 (**Figura 45 B.**).

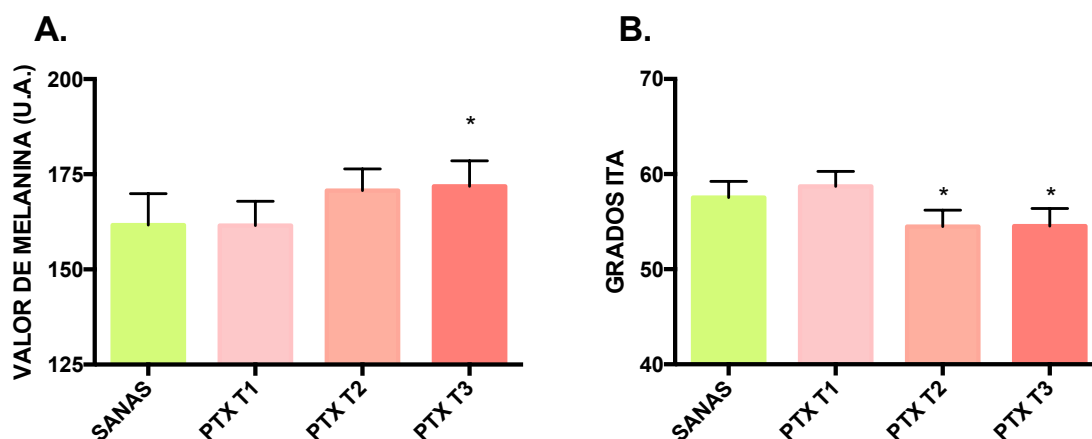


Figura 45. Determinaciones sobre la pigmentación de la piel, a través del valor de melanina (A.) y de ITA° (B.), obtenidas durante el tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas. Se tomaron medidas del valor de melanina (U.A) y ITA° antes (T1), durante (T2) y al finalizar (T3) el tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel. Se utilizó un grupo de 20 voluntarias sanas como control. Los resultados se presentan como la media ± error estándar de la media (SEM) de al menos 3 determinaciones en cada tiempo, para todas las pacientes (n=20). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni, para el grupo de pacientes oncológicas en sus tres tiempos. La prueba t de Student se realizó entre el grupo de voluntarias sanas y el de pacientes oncológicas a T1. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de p<0,05.

El porcentaje medio de variación del valor de melanina (% \pm SEM) con respecto a T1 después del tratamiento con paclitaxel a T2 y T3 se muestran en la **Tabla 16**.

Variación del valor de melanina	T2 (% \pm SEM)	T3 (% \pm SEM)
	6,86% \pm 2,95	6,68% \pm 1,86

Tabla 16. Porcentajes medios de variación del valor de melanina (% \pm SEM) a T2 y T3 con respecto a T1.

El porcentaje medio de variación del valor ITA^o (% \pm SEM) con respecto a T1 después del tratamiento con paclitaxel a T2 y T3 se muestran en la **Tabla 17**.

Variación de ITA ^o	T2 (% \pm SEM)	T3 (% \pm SEM)
	-7,00% \pm 2,24	-6,96% \pm 2,20

Tabla 17. Porcentajes medios de variación de ITA^o (% \pm SEM) a T2 y T3 con respecto a T1.

4.1.2.6 Elasticidad y firmeza de la piel

Se evaluó el efecto del paclitaxel sobre la elasticidad y firmeza de la piel, a través de algunos de los parámetros R proporcionados por la sonda Cutometer[®]. En el presente estudio se evaluaron las R más relevantes a nivel bibliográfico y que mayor información aportan sobre los parámetros de elasticidad y firmeza de la piel, como son la R0, R2, R5 y R7. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de R0, R2, R5 y R7 de la población de voluntarias sanas y los valores de las pacientes oncológicas previo tratamiento (T1). El tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel produjo una disminución de los valores de R0, R2, R5 y R7, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la visita inicial en la segunda (T2) y última visita (T3) (**Figura 46**).

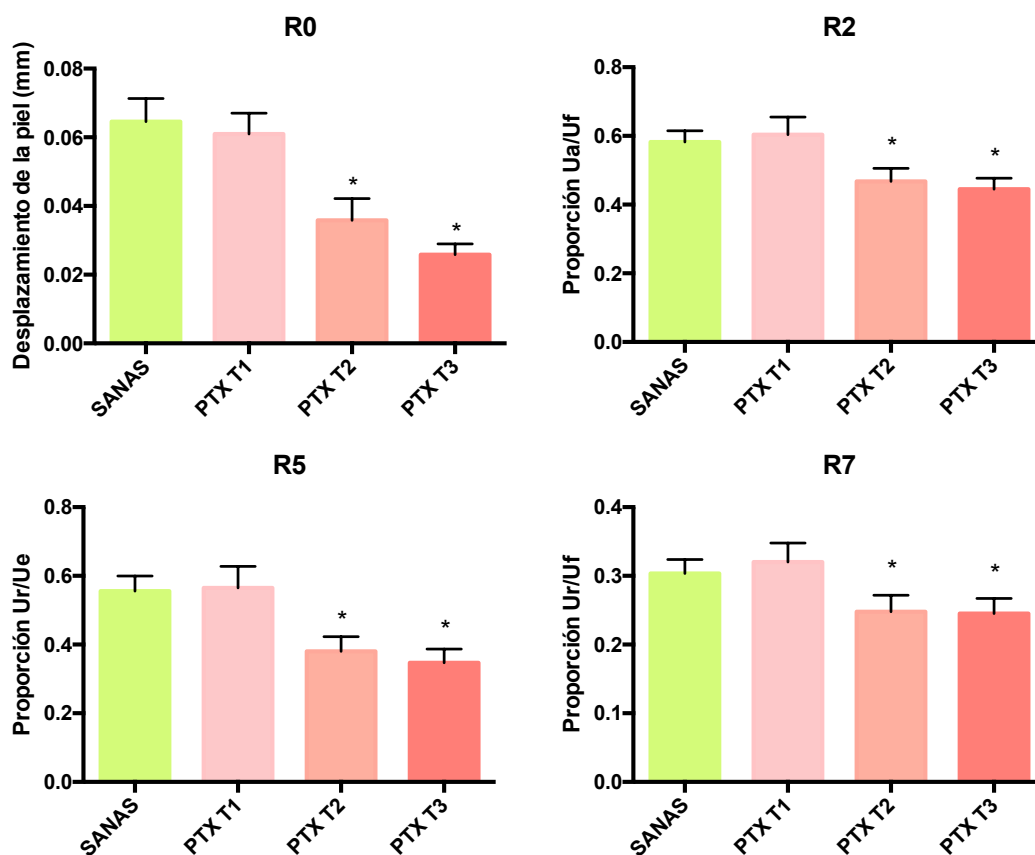


Figura 46. Determinación de los parámetros de elasticidad y firmeza de la piel R0, R2, R5 y R7 obtenidos durante el tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas. Se tomaron los valores de R0, R2, R5 y R7, antes (T1), durante (T2) y al finalizar (T3) el tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel. Se utilizó un grupo de 20 voluntarias sanas como control. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 3 determinaciones en cada tiempo, para todas las pacientes ($n=20$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni, para el grupo de pacientes oncológicas en sus tres tiempos. La prueba t de Student se realizó entre el grupo de voluntarias sanas y el de pacientes oncológicas a T1. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

El porcentaje medio de variación de los parámetros R0, R2, R5 y R7 ($\% \pm$ SEM) con respecto a T1 después del tratamiento con paclitaxel a T2 y T3 se muestran en la **Tabla 18**.

Variación de los parámetros R	T2 (% \pm SEM)	T3 (% \pm SEM)
R0	-22,89% \pm 16,03	-47,21% \pm 8,33
R2	-15,52% \pm 6,77	-19,69% \pm 6,10
R5	-28,78% \pm 5,76	-33,06% \pm 5,92
R7	-20,36% \pm 5,34	-19,40% \pm 7,09

Tabla 18. Porcentajes medios de variación de los parámetros R0, R2, R5 y R7 ($\% \pm$ SEM) a T2 y T3 con respecto a T1.

4.1.2.7 Parámetros de superficie de la piel

Se evaluó el efecto del paclitaxel sobre los parámetros de superficie de la piel, concretamente sobre la rugosidad (Ser) y la suavidad (Sesm), mediante el uso del equipo Visioscan®. El parámetro Ser se trata de un parámetro directamente proporcional, es decir, a mayor valor de Ser, mayor será la rugosidad de la piel proporcionada en la imagen. El parámetro Sesm se trata de un parámetro inversamente proporcional, es decir, a mayor valor de Sesm, menor será la suavidad de la piel proporcionada en la imagen. Los resultados de ambos parámetros vienen dados en Unidades Arbitrarias (U.A.). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el valor de Ser y Sesm de la población de voluntarias sanas y los valores de las pacientes oncológicas previo tratamiento (T1). El tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel produjo un aumento del valor de Ser y de Sesm, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la visita inicial en T3 en ambos parámetros (**Figura 47**), estas diferencias pueden apreciarse de manera visual en la **Figura 48**, mostrándose un deterioro de la superficie de la piel.

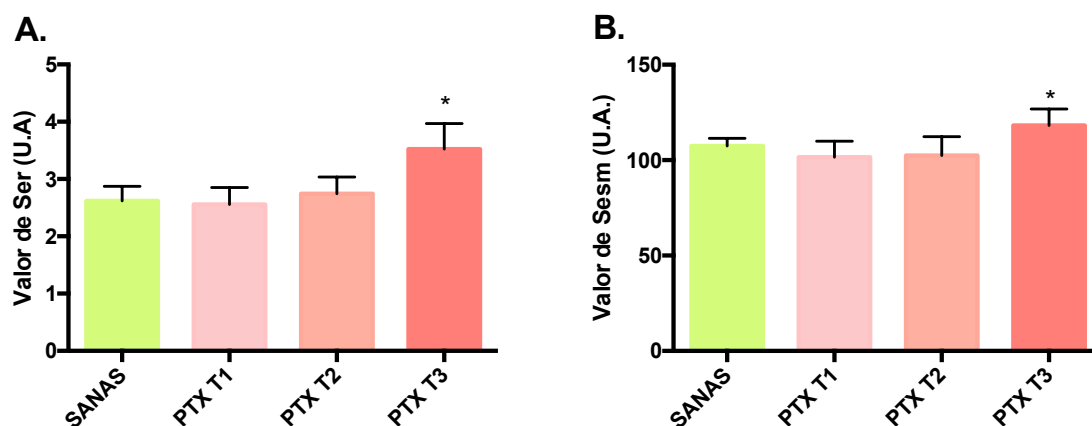


Figura 47. Determinación de los parámetros de superficie de la piel, Ser (A.) y Sesm (B.), obtenidos durante el tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas. Se tomaron los valores de Ser y Sesm antes (T1), durante (T2) y al finalizar (T3) el tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel. Se utilizó un grupo de 20 voluntarias sanas como control. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 3 determinaciones en cada tiempo, para todas las pacientes ($n=20$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni, para el grupo de pacientes oncológicas en sus tres tiempos. La prueba t de Student se realizó entre el grupo de voluntarias sanas y el de pacientes oncológicas a T1. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

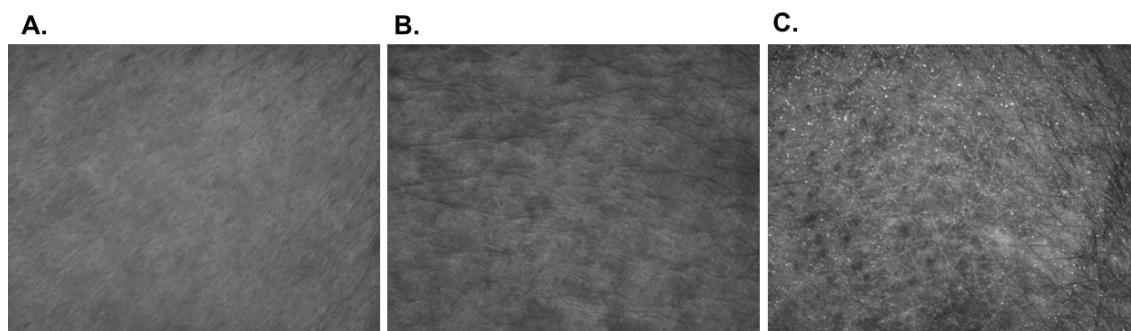


Figura 48. Imágenes representativas de la superficie de la piel obtenidas durante el transcurso del tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas. Cada una de las imágenes corresponde a cada una de las visitas que realizan las pacientes sometidas al tratamiento con paclitaxel: visita inicial T1 (A.), visita intermedia T2 (B.) y visita final T3 (C.). Las imágenes fueron obtenidas mediante el equipo Visioscan®.

El porcentaje medio de variación de los parámetros Ser y Sesm ($\% \pm \text{SEM}$) con respecto al T1 después del tratamiento con paclitaxel a T2 y T3 se muestra en la **Tabla 19**.

Variación de los parámetros de superficie	T2 ($\% \pm \text{SEM}$)	T3 ($\% \pm \text{SEM}$)
Ser	26,52% \pm 15,94	49,02% \pm 17,94
Sesm	3,53% \pm 7,71	20,54% \pm 5,80

Tabla 19. Porcentajes medios de variación de los parámetros de superficie de la piel Ser y Sesm ($\% \pm \text{SEM}$) a T2 y T3 con respecto a T1.

4.1.2.8 Descamación de la piel

Se evaluó el efecto del paclitaxel sobre la descamación de la piel, mediante la combinación de las láminas Corneofix® junto con el equipo Visioscan®. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de descamación de la población de voluntarias sanas y el porcentaje de las pacientes oncológicas previo tratamiento (T1). El tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel produjo un aumento de la descamación de la piel existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la visita inicial en la última visita (T3), pero no en la segunda visita (T2) (**Figura 49**). Las diferencias en la descamación pueden apreciarse de manera visual en la **Figura 50**, mostrándose el aumento de descamación recogido por las láminas.

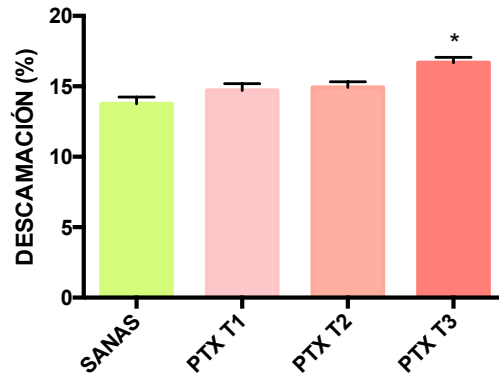


Figura 49. Determinación del porcentaje de descamación de la piel durante el tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas. Se tomaron los valores de descamación antes (T1), durante (T2) y al finalizar (T3) el tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel. Se utilizó un grupo de 20 voluntarias sanas como control. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 3 determinaciones en cada tiempo, para todas las pacientes ($n=20$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni, para el grupo de pacientes oncológicas en sus tres tiempos. La prueba t de Student se realizó entre el grupo de voluntarias sanas y el de pacientes oncológicas a T1. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

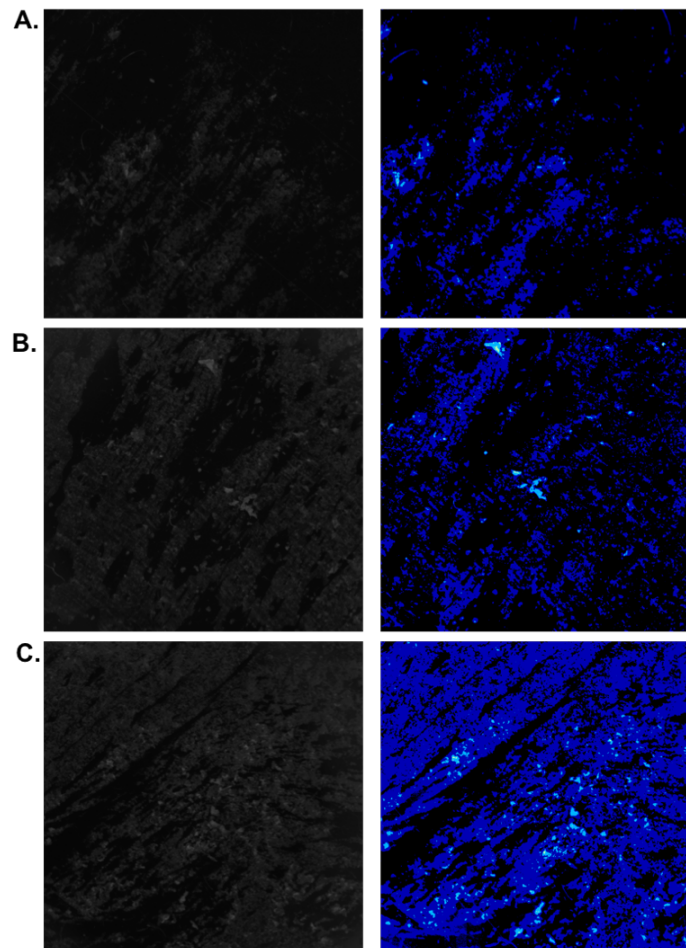


Figura 50. Imágenes representativas de la descamación de la piel obtenidas durante el transcurso del tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas. Cada una de las imágenes corresponde a cada una de las visitas que realizan las pacientes sometidas al tratamiento con paclitaxel: visita inicial T1 (A.), visita intermedia T2 (B.) y visita final T3 (C.). Las imágenes fueron obtenidas a través de las láminas adherentes Corneofix® y equipo Visioscan®, con su posterior análisis de imagen específico.

El porcentaje medio de variación de la descamación ($\% \pm \text{SEM}$) con respecto a T1 después del tratamiento con paclitaxel a T2 y T3 se muestran en la **Tabla 20**.

Variación de la descamación	T2 ($\% \pm \text{SEM}$)	T3 ($\% \pm \text{SEM}$)
		2,96% \pm 3,13

Tabla 20. Porcentajes medios de variación de la descamación de la piel ($\% \pm \text{SEM}$) a T2 y T3 con respecto a T1.

4.1.2.9 Grosor de las capas de la piel

Se evaluó el efecto del paclitaxel sobre el grosor de las capas de la piel, concretamente de la epidermis y la dermis, mediante el equipo Ultrascan®. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grosor de la epidermis, el de la dermis y la suma de ambos, de la población de voluntarias sanas y estos mismos valores de las pacientes oncológicas previo tratamiento (T1). El tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel produjo una disminución del grosor de la epidermis, de la dermis y por tanto de la suma de ambas, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la visita inicial en la segunda (T2) y última (T3) visita (**Figura 51**). Las diferencias en el grosor pueden apreciarse de manera visual en la **Figura 52**, mostrándose una disminución tanto en la epidermis como en la dermis, ambas zonas delimitadas y diferenciadas de forma aproximada en la parte superior de la imagen por líneas rojas.

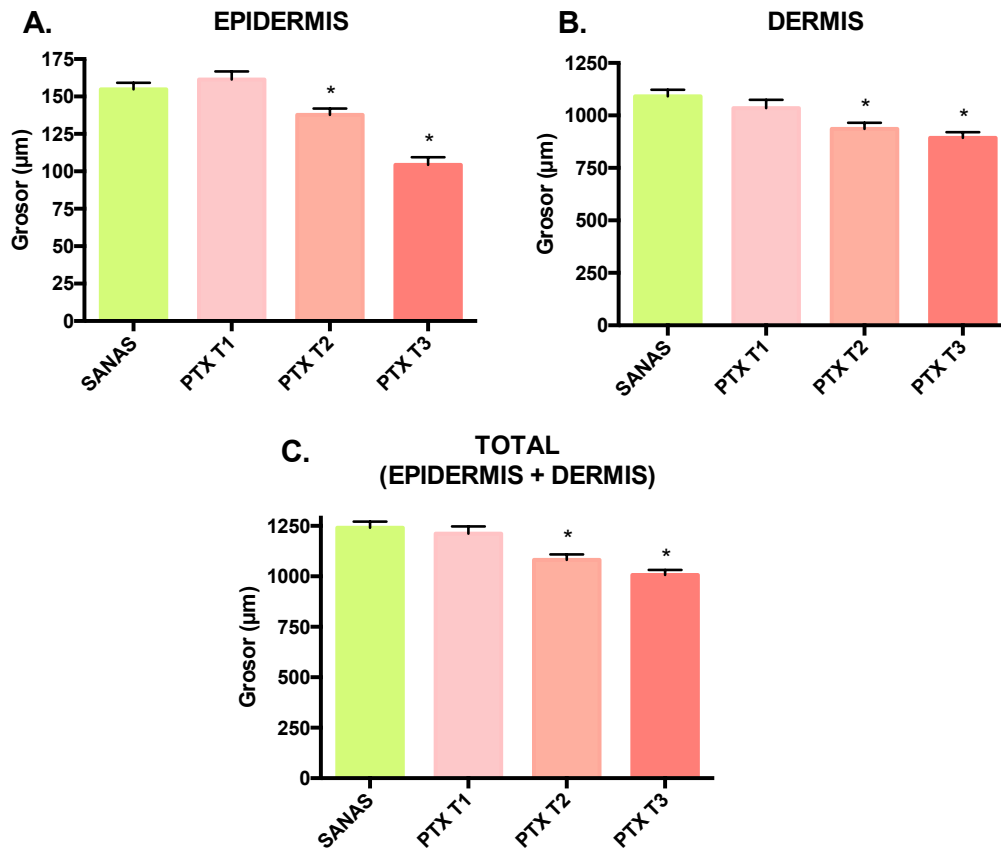


Figura 51. Determinación del grosor de la epidermis, dermis, y la suma de ambas, obtenidos durante el tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas. Se tomaron los valores de grosor de la epidermis, dermis y la suma de ambas antes (T1), durante (T2) y al finalizar (T3) el tratamiento quimioterapéutico con paclitaxel. Se utilizó un grupo de 20 voluntarias sanas como control. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 3 determinaciones en cada tiempo, para todas las pacientes ($n=20$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de la prueba de Bonferroni, para el grupo de pacientes oncológicas en sus tres tiempos. La prueba t de Student se realizó entre el grupo de voluntarias sanas y el de pacientes oncológicas a T1. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

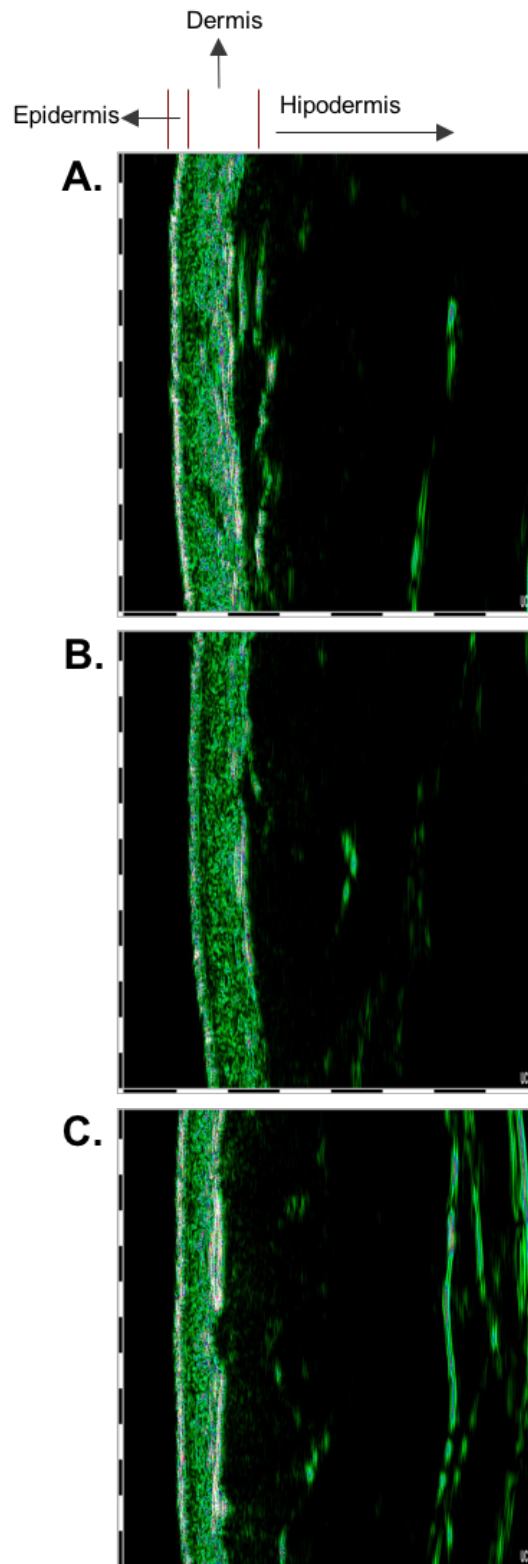


Figura 52. Imágenes representativas del grosor de la piel obtenidas durante el transcurso del tratamiento con paclitaxel (PTX) en 20 pacientes oncológicas. Cada una de las imágenes corresponde a cada una de las visitas que realizan las pacientes sometidas al tratamiento con paclitaxel: visita inicial T1 (A.), visita intermedia T2 (B.) y visita final T3 (C.). Las imágenes fueron obtenidas a través del equipo Ultrascan®. Representación gráfica de cómo se visualiza cada capa de la piel.

El porcentaje medio de variación del grosor de la epidermis, dermis y la suma de ambas (% \pm SEM) con respecto al T1 después del tratamiento con paclitaxel a T2 y T3 se muestra en la **Tabla 21**.

Variación del grosor	T2 (% \pm SEM)	T3 (% \pm SEM)
Epidermis	-13,79% \pm 2,21	-34,37% \pm 3,50
Dermis	-8,81% \pm 1,64	-12,75% \pm 2,05
Epidermis + Dermis	-10,28% \pm 1,41	-16,46% \pm 1,58

Tabla 21. Porcentajes medios de variación del grosor de la epidermis, dermis y la suma de ambas (% \pm SEM) a T2 y T3 con respecto a T1.

4.2 ENSAYOS *IN VITRO*

4.2.1 Ensayo de viabilidad celular previo

En este ensayo se pretendía evaluar la viabilidad celular del cultivo monocapa de queratinocitos incubados con el fármaco paclitaxel a distintas concentraciones utilizando la técnica del MTT, con el fin de verificar a que concentraciones este fármaco causa la muerte celular y así utilizar estos resultados como referencia (**Figura 53**).

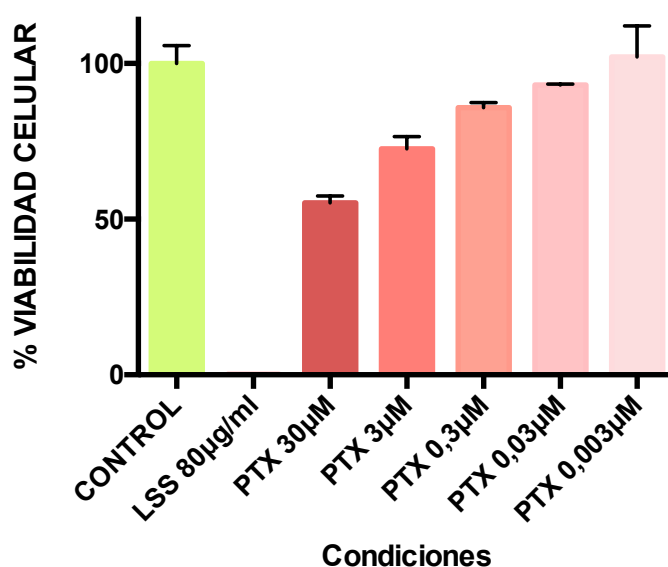


Figura 53. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT. Queratinocitos primarios en monocapa incubados 48h con paclitaxel (PTX) a 30; 3; 0,3; 0,03; 0,003 μ M, utilizando como control positivo Laurilsulfato de sodio (LSS) 80 μ g/mL. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3).

4.2.2 Efectos del paclitaxel sobre modelo 3D de piel

4.2.2.1 Producción de citoquinas inflamatorias

En cuanto a la producción de citoquinas inflamatorias de relevancia en la piel, se evaluó el efecto del paclitaxel sobre la expresión proteica de IL-1 α , IL-6 y IL-8 en el **modelo 3D de piel**. El tratamiento con paclitaxel durante 48 h produjo un aumento de la producción de las tres citoquinas inflamatorias de interés. Este aumento se dio en las

tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en todas las dosis del fármaco para la IL-1 α , y en las dosis de 3 μ M y 30 μ M para la IL-6 y IL-8 (Figura 54).

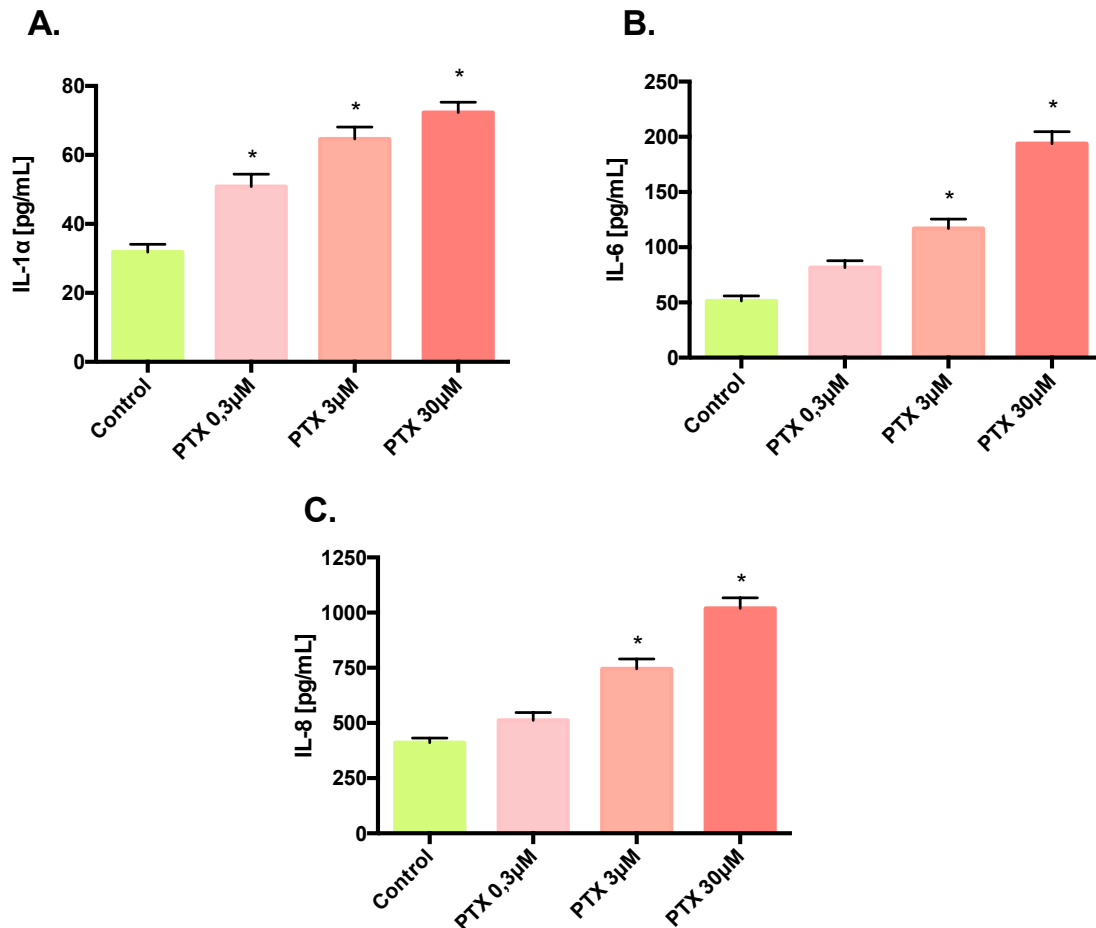


Figura 54. Producción de citoquinas inflamatorias IL-1 α (A.), IL-6 (B.) y IL-8 (C.) de cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 48 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μ M. Los resultados se expresan en pg/mL para cada una de las citoquinas, y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

4.2.2.2 Efectos del paclitaxel sobre la expresión génica

4.2.2.2.1 Expresión génica de AQP3

El **modelo 3D de piel**, bajo las condiciones de incubación propuestas con paclitaxel, presento una disminución de la expresión génica de la AQP3, la cual juega un papel importante en la hidratación de la piel y el control hídrico de los queratinocitos. La incubación del cultivo 3D de piel con el fármaco 24 h, produjo una disminución de la expresión génica en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μM y 30 μM (**Figura 55**).

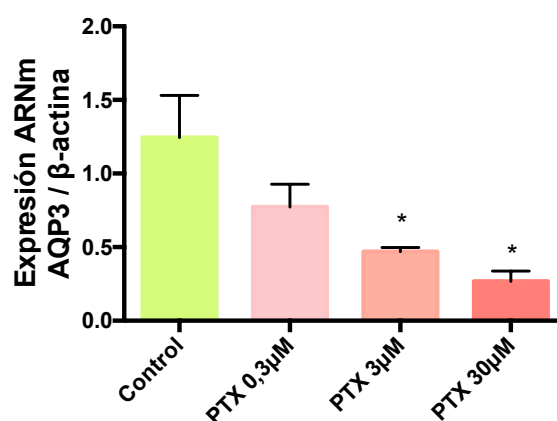


Figura 55. Expresión génica de la AQP3 en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM . Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno β -actina, y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes ($P=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

4.2.2.2.2 Expresión génica de marcadores de elasticidad y la firmeza

La incubación del **modelo 3D de piel** con paclitaxel 24 h produjo una disminución de la expresión génica de genes implicados en la elasticidad y firmeza de la piel, como son el colágeno I (COL1), la elastina (ELN) y la fibronectina (FN1), en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μM y 30 μM , tanto en COL1, como en ELN y FN1 (**Figura 56**).

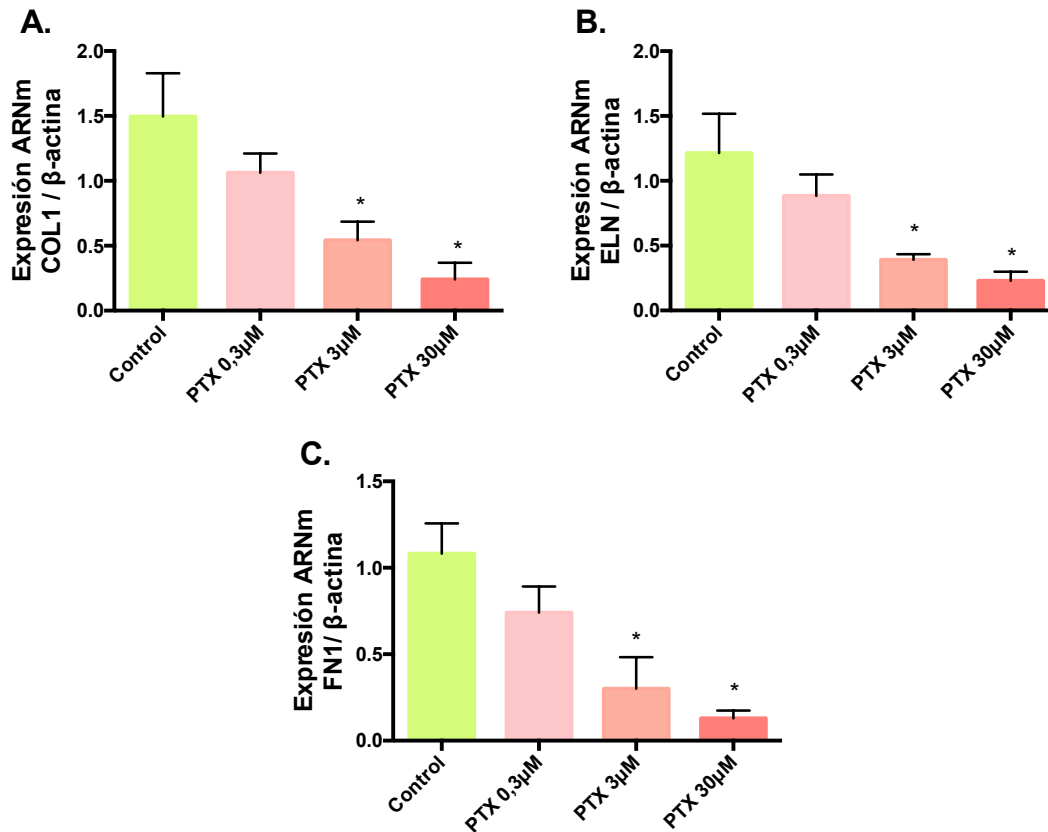


Figura 56. Expresión génica de colágeno I (COL1) (A), elastina (ELN) (B) y fibronectina (FN1) (C) en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μ M. Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno β -actina, y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes ($P=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

4.2.2.2.3 Expresión génica de marcadores de ERO

El **modelo 3D de piel** incubado con paclitaxel 24 h presentó una disminución de la expresión génica en los marcadores de ERO analizados, como son SOD1 y Nrf2, y un aumento de la expresión de NOX4. La disminución de la expresión génica tuvo lugar tanto en SOD1 como en Nrf2 en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μ M y 30 μ M (**Figura 57 A. y B.**). Esta misma incubación con el fármaco produjo un aumento de la expresión génica para NOX4 en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μ M y 30 μ M (**Figura 57 C.**).

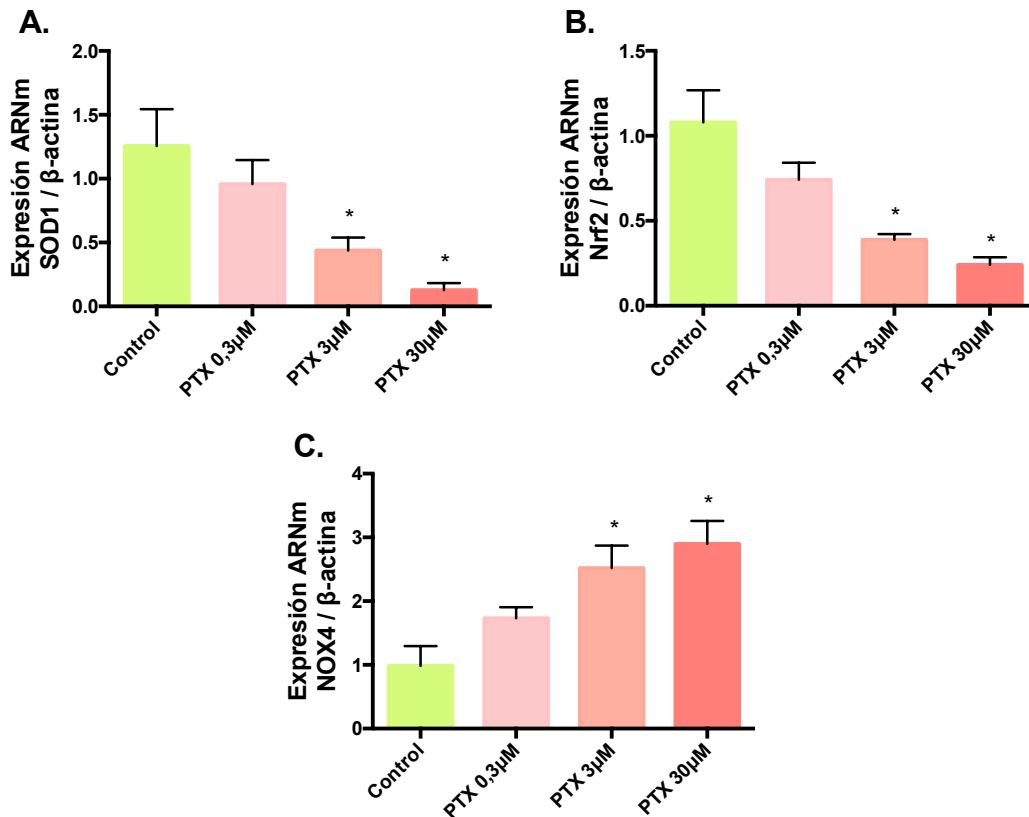


Figura 57. Expresión génica de SOD1 (A), Nrf2 (B) y NOX4 (C) en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM. Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno β-actina, y se presentan como la media ± error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

4.2.2.2.4 Expresión génica de marcadores de apoptosis y senescencia

El **modelo 3D de piel** incubado con paclitaxel 24 h presento cambios en la expresión génica de genes relacionados con la apoptosis celular y la senescencia, como son Bcl2, p53 y p21. La expresión del gen Bcl2 sufrió una disminución de la expresión génica mientras que en p53 y p21 se dio un aumento. La disminución de la expresión génica de Bcl2 tuvo lugar en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μM y 30 μM (**Figura 58 A.**). La expresión génica tanto en p53 como en p21 se vio aumentada con las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias

estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μ M y 30 μ M (Figura 58 B. y C.).

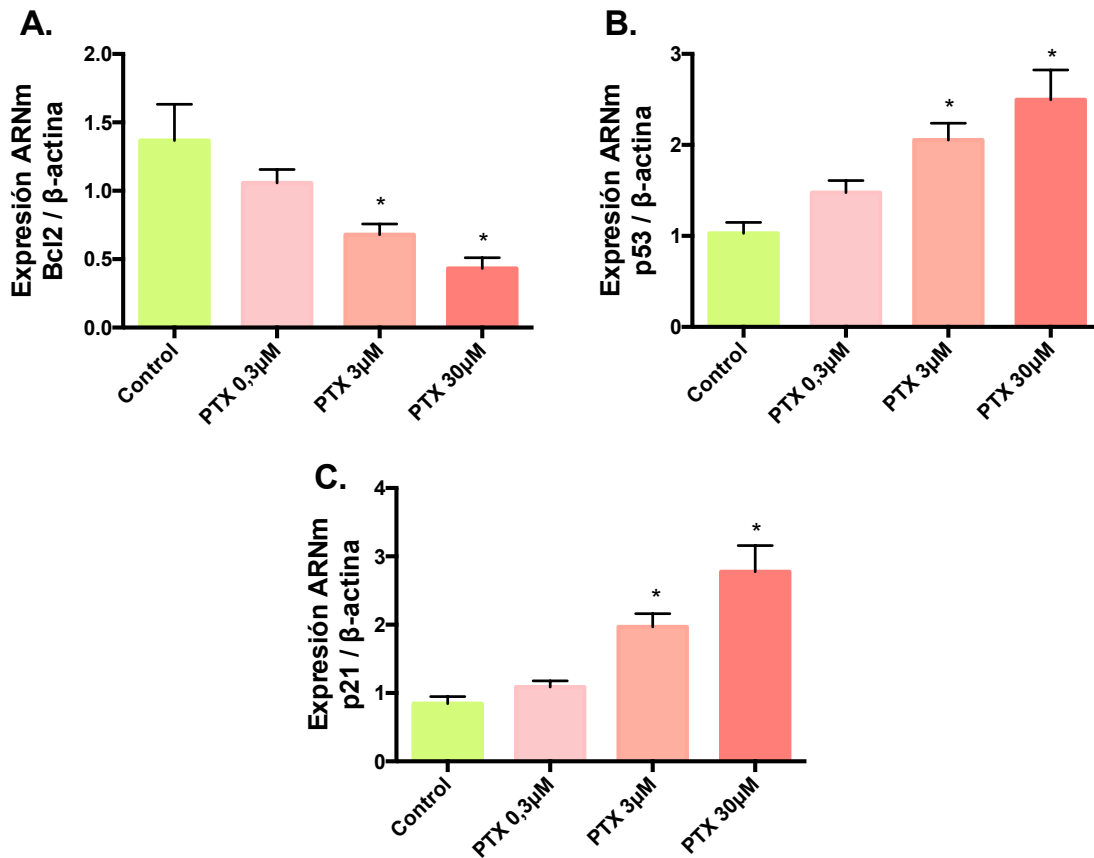


Figura 58. Expresión génica de Bcl2 (A.), p53 (B.) y p21 (C.) en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μ M. Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno β -actina, y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

4.2.2.2.5 Expresión génica de marcadores de angiogénesis

La incubación del **modelo 3D de piel** con paclitaxel 24 h produjo una disminución de la expresión génica de genes implicados en la formación de nuevos vasos sanguíneos, como son VEGF y eNOS, en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μ M y 30 μ M, tanto en VEGF, como en eNOS (Figura 59).

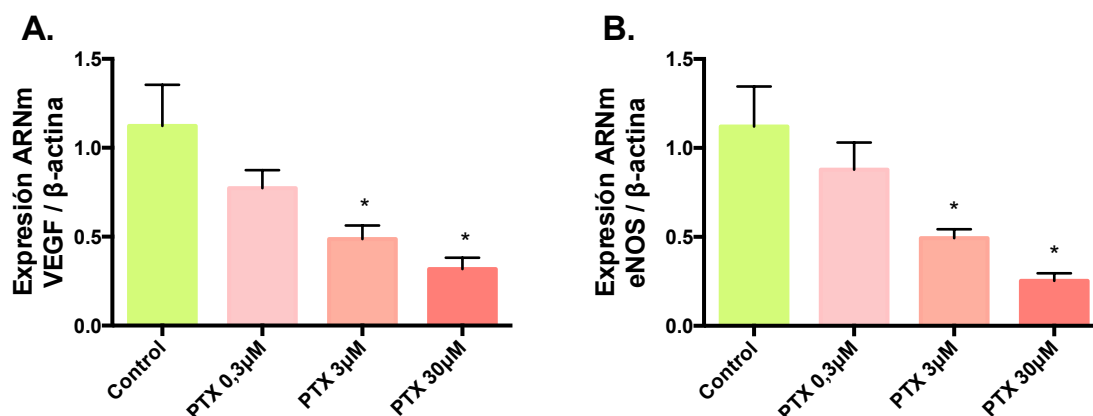


Figura 59. Expresión génica de VEGF (A.) y eNOS (B.) en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM. Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno β-actina, y se presentan como la media ± error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

4.2.2.3 Efectos del paclitaxel sobre la expresión proteica

4.2.2.3.1 Expresión proteica de AQP3

La incubación del **modelo 3D de piel** con paclitaxel 48 h produjo una disminución de la expresión proteica de la AQP3 en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control todas las concentraciones del fármaco utilizadas (**Figura 60**).

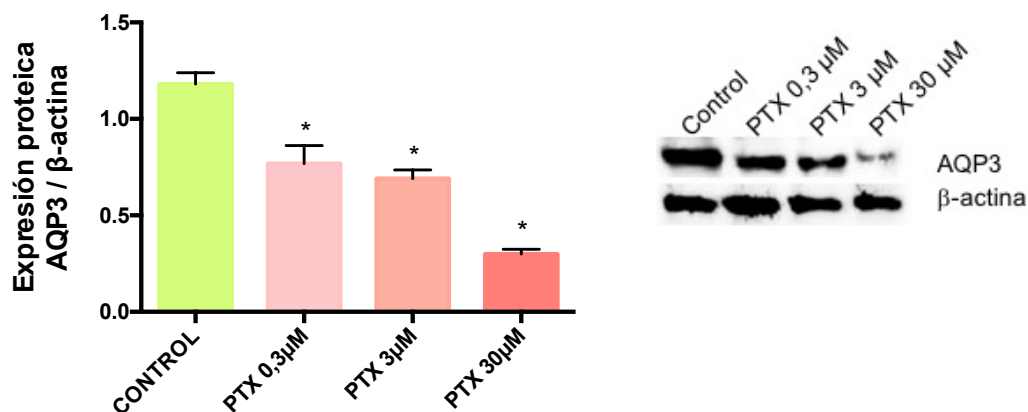


Figura 60. Expresión proteica de la AQP3 en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 48 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μ M. Los resultados se expresan como ratio entre la expresión de la proteína de estudio y la expresión proteica del control endógeno β -actina, y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$. A la derecha de la gráfica se muestra una imagen representativa de western blot para AQP3 con el control endógeno β -actina.

4.2.2.3.2 Expresión proteica de marcadores de elasticidad y la firmeza

La incubación del **modelo 3D de piel** con paclitaxel 48 h produjo una disminución de la expresión proteica de COL1, ELN y FN1 en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control todas las concentraciones del fármaco utilizadas para COL1 y ELN (**Figura 61 A. y B.**), y en las dosis de 3 μ M y 30 μ M para la FN1 (**Figura 61 C.**).

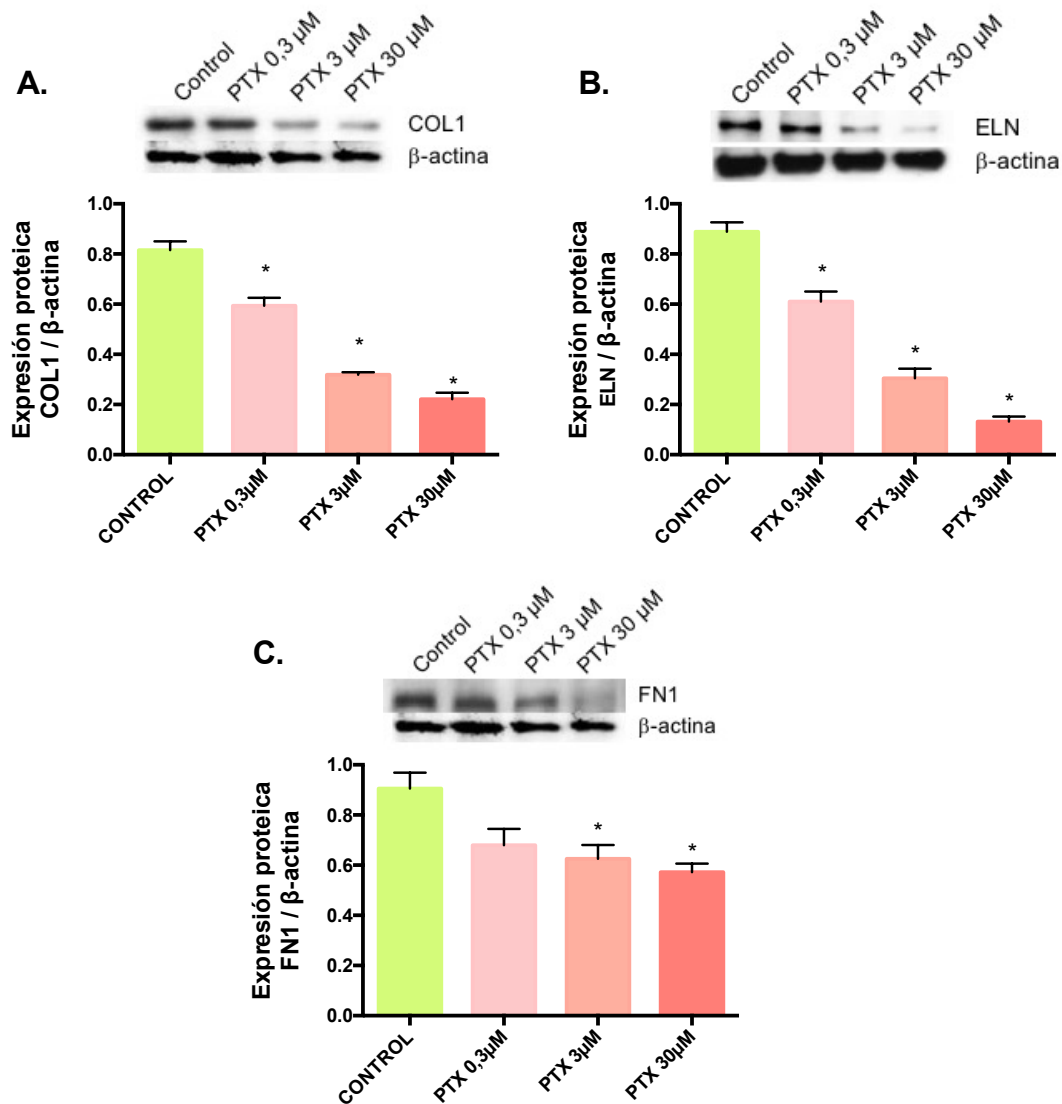


Figura 61. Expresión proteica de colágeno (COL1) (A), elastina (ELN) (B) y fibronectina (FN1) (C) en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 48 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μ M. Los resultados se expresan como ratio entre la expresión de la proteína de estudio y la expresión proteica del control endógeno β -actina, y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes ($P=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$. Sobre cada una de las gráficas se muestra una imagen representativa de western blot para la proteína en cuestión con el control endógeno β -actina.

4.2.2.3.3 Expresión proteica de marcadores de ERO

Se evaluó el efecto del paclitaxel sobre la expresión proteica de SOD1, Nrf2 y NOX4 en el **modelo de piel 3D**. Este modelo fue incubado 48 h con paclitaxel y presentó una disminución de la expresión proteica en las tres proteínas estudiadas. La disminución de la expresión proteica tuvo lugar tanto en SOD1 como en Nrf2 en las tres

dosificación del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μM y 30 μM para SOD1, y en las tres dosis utilizadas para Nrf2 (Figura 62 A. y B.). Esta misma incubación con el fármaco produjo un aumento de la expresión proteica para NOX4 en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μM y 30 μM (Figura 62 C.).

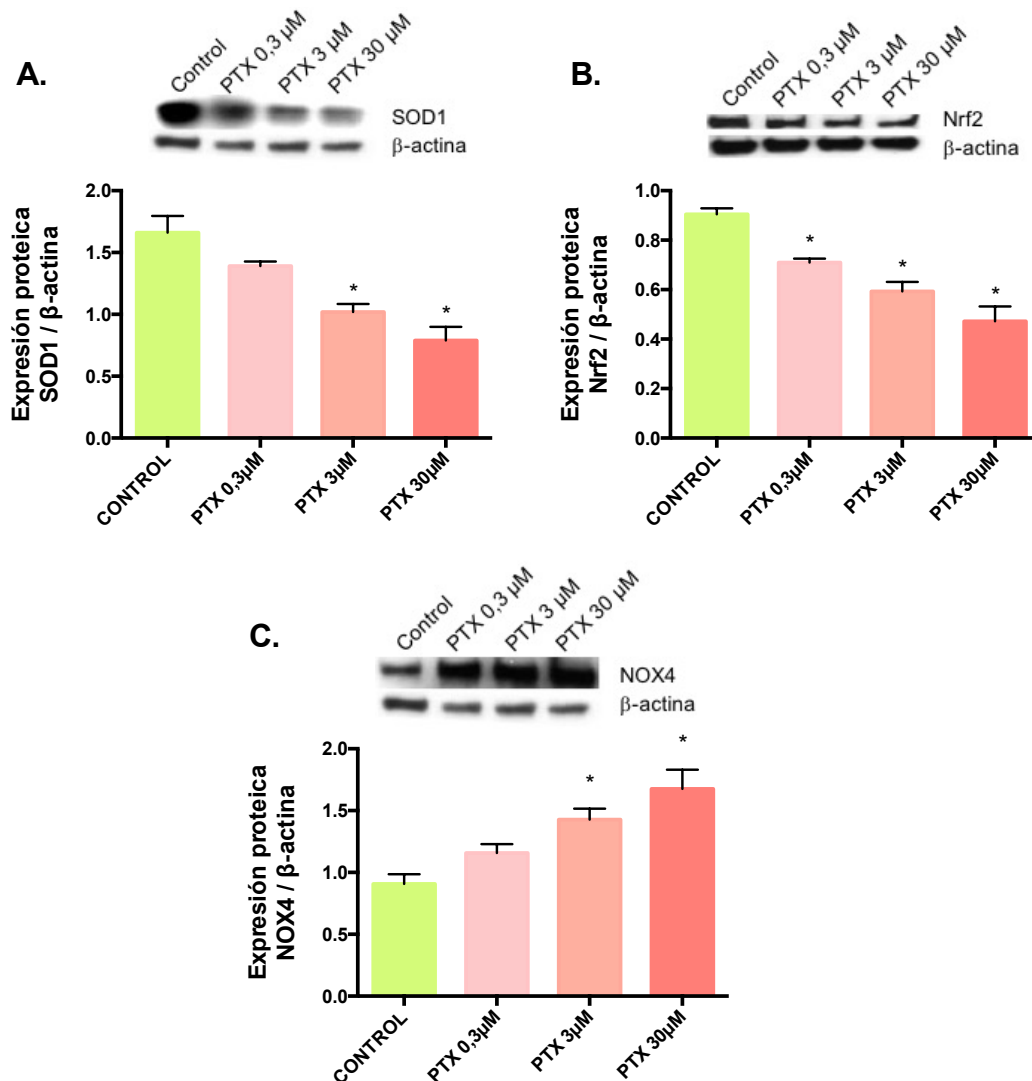


Figura 62. Expresión proteica de SOD1 (A), Nrf2 (B) y NOX4 (C) en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 48 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM . Los resultados se expresan como ratio entre la expresión de la proteína de estudio y la expresión proteica del control endógeno β -actina, y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$. Sobre cada una de las gráficas se muestra una imagen representativa de western blot para la proteína en cuestión con el control endógeno β -actina.

4.2.2.3.4 Expresión proteica de marcadores de apoptosis y senescencia

Se evaluó también el efecto del paclitaxel sobre la expresión proteica de Bcl2 y p53 en el **modelo de piel 3D**. Este modelo incubado 48 h con paclitaxel presentó una disminución de la expresión proteica de Bcl2 y un aumento de p53. La disminución de la expresión proteica de Bcl2 se dio con las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μM y 30 μM (**Figura 63 A.**). El aumento de la expresión proteica de p53 tuvo lugar con las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μM y 30 μM (**Figura 63 B.**).

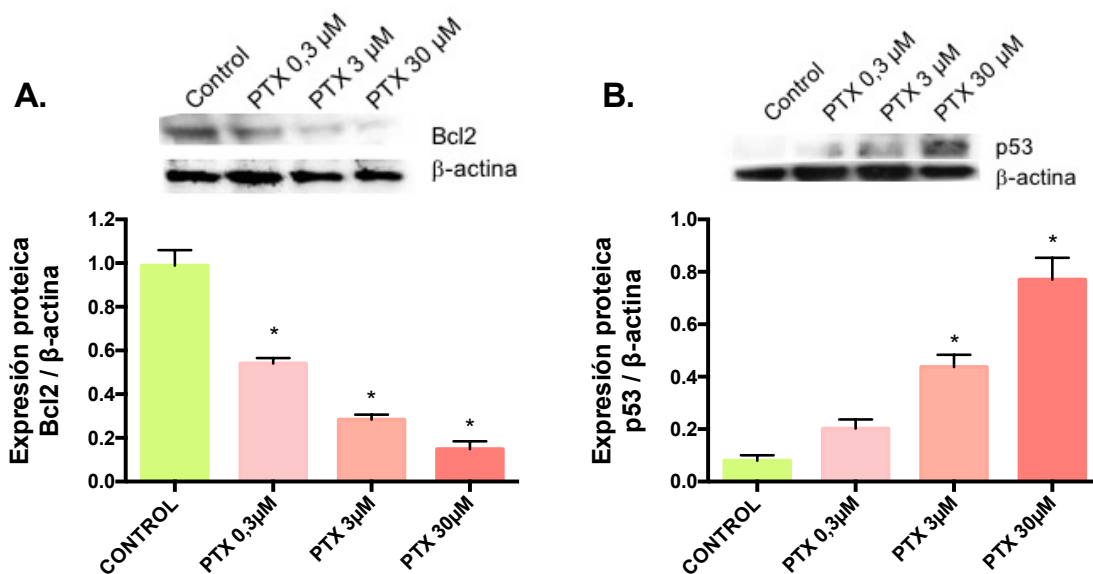


Figura 63. Expresión proteica de Bcl2 (A.) y p53 (B.) en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 48 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM . Los resultados se expresan como ratio entre la expresión de la proteína de estudio y la expresión proteica del control endógeno β -actina, y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes ($P=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$. Sobre cada una de las gráficas se muestra una imagen representativa de western blot para la proteína en cuestión con el control endógeno β -actina.

4.2.2.3.5 Expresión proteica de marcadores de angiogénesis

El modelo 3D de piel tratado con paclitaxel durante 48 h presentó una disminución de la expresión proteica de VEGF. Esta disminución se dio en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μ M y 30 μ M (**Figura 64**).

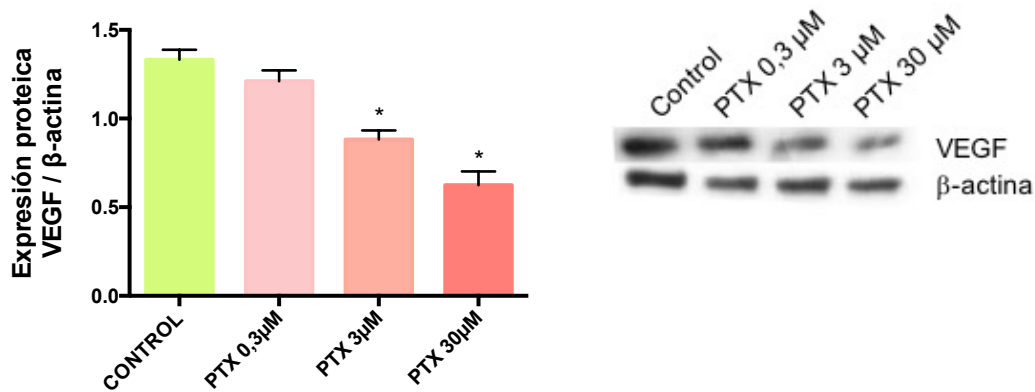


Figura 64. Expresión proteica de VEGF en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 48 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μ M. Los resultados se expresan como ratio entre la expresión de la proteína de estudio y la expresión proteica del control endógeno β -actina, y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$. A la derecha de la gráfica se muestra una imagen representativa de western blot para VEGF con el control endógeno β -actina.

4.2.2.4 Activación del factor de transcripción NF- κ B

Por lo que respecta al factor de transcripción NF- κ B, se evaluó en el **modelo de piel 3D** el efecto del paclitaxel sobre su activación, la cual tiene lugar mediante su fosforilación, a través de la detección proteica de NF- κ B y su forma fosforilada ((p)-NF- κ B). El modelo incubado durante 48 h con paclitaxel no mostró diferencias en su expresión proteica para NF- κ B, mientras que presentó un aumento para su forma fosforilada (p)-NF- κ B. El aumento de la fosforilación de NF- κ B se dio en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μ M y 30 μ M, sin embargo, la forma no fosforilada de NF- κ B no vio afectada su expresión (**Figura 65**).

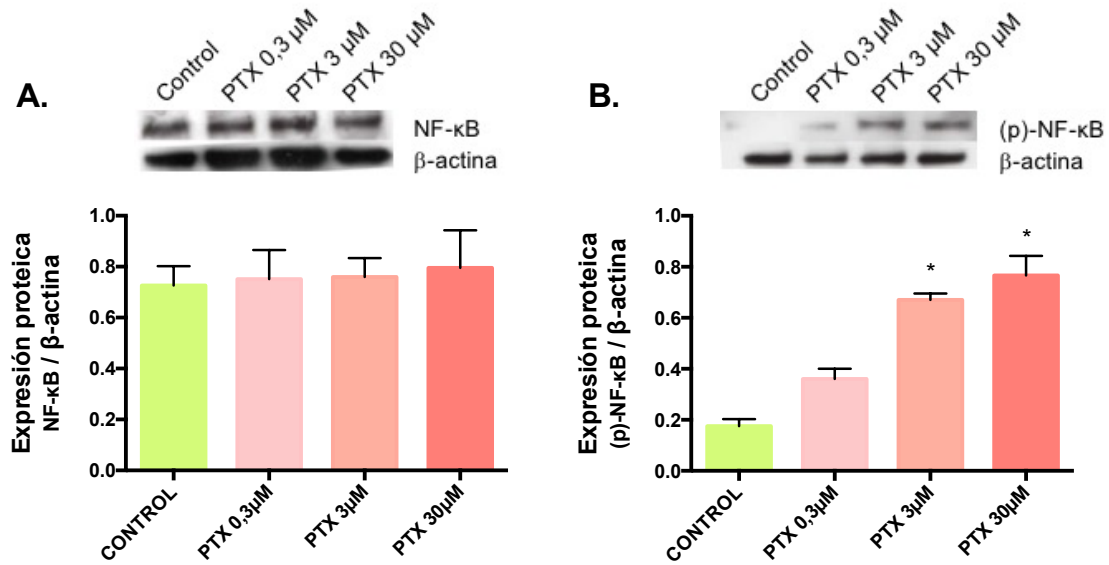


Figura 65. Expresión proteica de NF-κB (A.) y su forma fosforilada (p)-NF-κB (B.) en cultivo 3D de piel incubado con paclitaxel (PTX). El modelo fue incubado durante 48 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM. Los resultados se expresan como ratio entre la expresión de la proteína de estudio y la expresión proteica del control endógeno β-actina, y se presentan como la media ± error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$. En la parte superior de cada gráfica se muestra una imagen representativa de western blot con el control endógeno β-actina.

4.2.3 Efectos del paclitaxel sobre queratinocitos primarios humanos

4.2.3.1 Producción celular de ERO

Se evaluó mediante técnicas de inmunofluorescencia el efecto de paclitaxel sobre la producción de ERO mediante la utilización de la sonda dihidroetidio (DHE) sobre cultivo monocapa de **queratinocitos primarios humanos**. El cultivo fue incubado durante 24 h con el fármaco paclitaxel. Se utilizó el reactivo DAPI para teñir los núcleos celulares de color azul, y el DHE con el fin de marcar las ERO de color rojo. Los resultados se evaluaron a través de microscopía de fluorescencia y se cuantificaron colorimétricamente a través del nivel de rojo emitido por la sonda DHE, relativizándose la fluorescencia en porcentaje. Este estudio, bajo las condiciones de incubación propuestas con el fármaco, presentó un aumento de la producción de ERO, que puede apreciarse en las imágenes en color rojo a medida que se aumenta la concentración del

fármaco (**Figura 66**). La incubación de las células con paclitaxel 24 h, produjo un aumento de la producción de ERO en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las tres concentraciones del fármaco utilizadas (**Figura 67**). Así mismo, puede apreciarse como en las imágenes del cultivo tratado con el fármaco paclitaxel aparecen células en estado poliploide, viéndose diferentes núcleos en la misma célula.

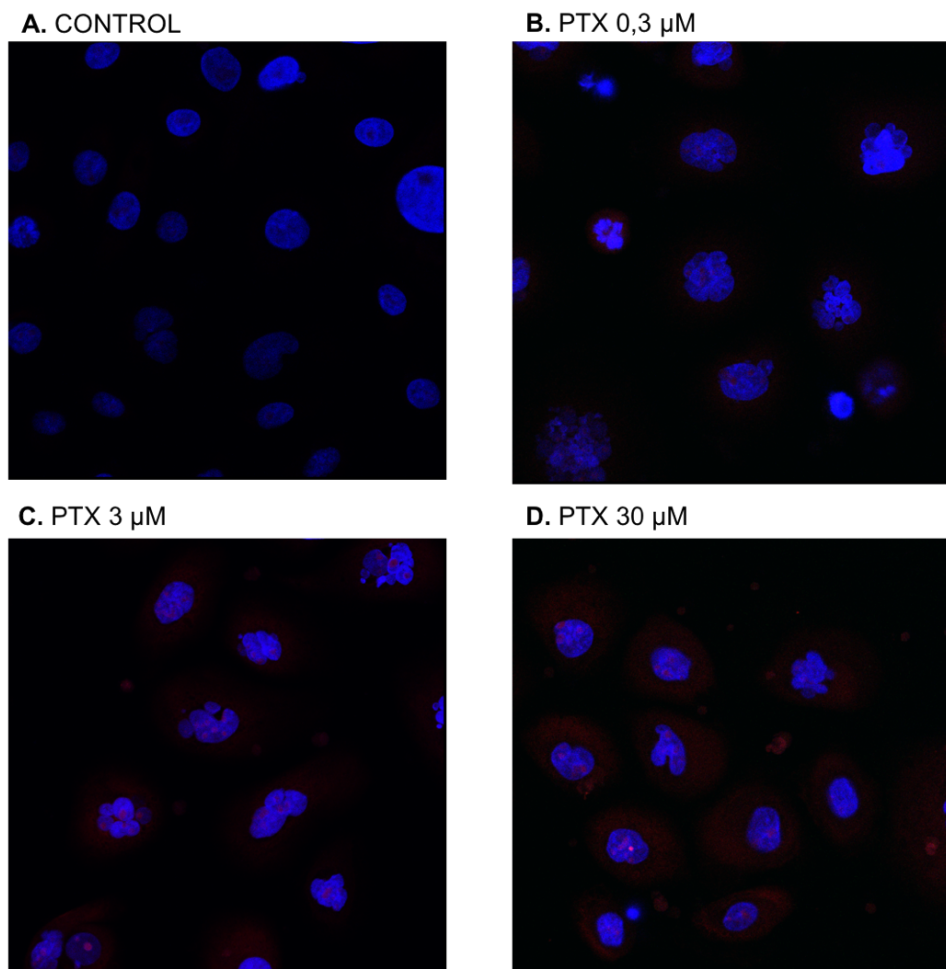


Figura 66. Imágenes representativas de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) sobre queratinocitos humanos primarios incubados con paclitaxel (PTX). Los queratinocitos fueron incubados durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM . Se trata de imágenes representativas de todas las condiciones de estudio: control (A.), paclitaxel 0,3 μM (B.), paclitaxel 3 μM (C.), paclitaxel 30 μM (D.). En color azul pueden apreciarse los núcleos celulares teñidos con la sonda DAPI, mientras que en color rojo puede verse el marcaje con la sonda dihidroetidio (DHE).

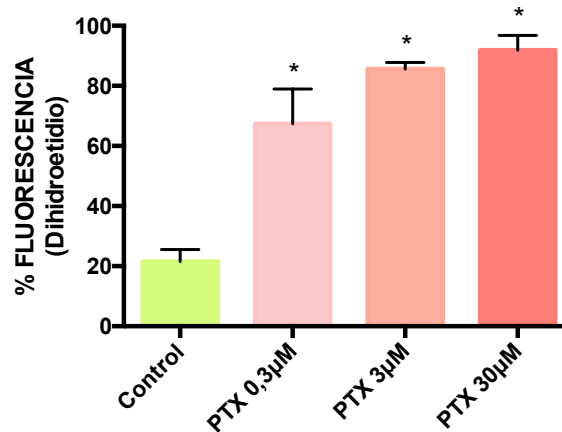


Figura 67. Producción de ERO en queratinocitos incubados con paclitaxel (PTX) expresada en porcentaje de fluorescencia de la sonda dihidroetidio (DHE). Los queratinocitos fueron incubados durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 µM. Los resultados se expresan en porcentaje de fluorescencia emitida por la sonda DHE, y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de imágenes de al menos 2 experimentos independientes ($P=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

4.2.3.2 Apoptosis celular y la senescencia

En cultivo monocapa de **queratinocitos primarios humanos** se evaluó mediante citometría de flujo el efecto de paclitaxel sobre la apoptosis celular mediante la detección de la anexina V, conocido marcador de apoptosis celular. Las células fueron incubadas durante 24 h con el fármaco paclitaxel. Se empleó anexina V asociada al fluorocromo FITC y yoduro de propidio (PI). Se analizó la fluorescencia emitida por las células para cada una de las condiciones. El cultivo incubado con el fármaco presentó un aumento de la apoptosis celular, que puede apreciarse en las representaciones que proporciona el software correspondiente de FITC frente a PI (**Figura 68**). La incubación de las células con paclitaxel 24 h, produjo un aumento de la apoptosis celular en las tres dosis del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las tres concentraciones del fármaco utilizadas (**Figura 69**).

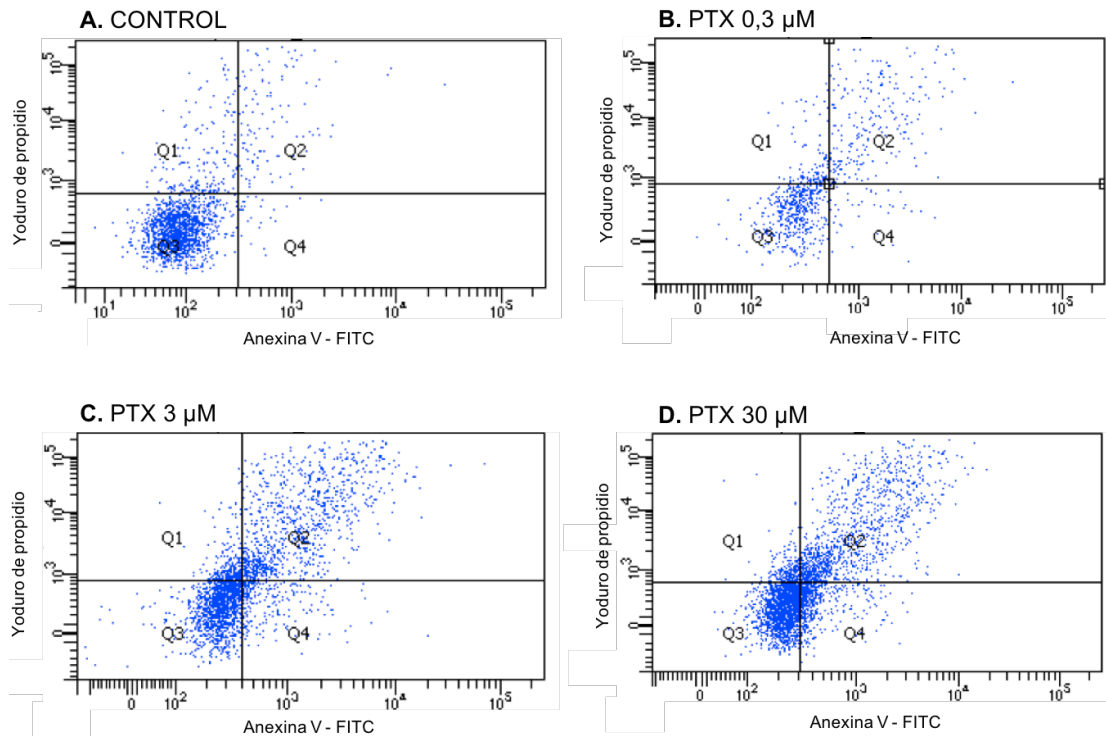


Figura 68. Diagramas de análisis de citometría de flujo para la determinación de la apoptosis celular producida por paclitaxel (PTX) tras su incubación sobre queratinocitos humanos primarios. Los queratinocitos fueron incubados durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM . Se trata de los diagramas obtenidos del análisis de la anexina V asociada a FITC frente al yoduro de propidio (PI). Se muestra un diagrama representativo de todas las condiciones de estudio: control (A.), paclitaxel 0,3 μM (B.), paclitaxel 3 μM (C.), paclitaxel 30 μM (D.). Un diagrama se puede dividir en cuatro cuartiles (Q) que se definen de la siguiente manera: Q1 células necróticas (PI/FITC, +/-); Q2 células apoptóticas tardías (PI/FITC, +/+); Q3 células viables (PI/FITC, -/-) y Q4 células apoptóticas tempranas (PI/FITC, -/+). Los datos de los cuartiles tomados para la representación de la apoptosis celular producida por paclitaxel fueron Q2 y Q4, y se presentan en la **Figura 69**.

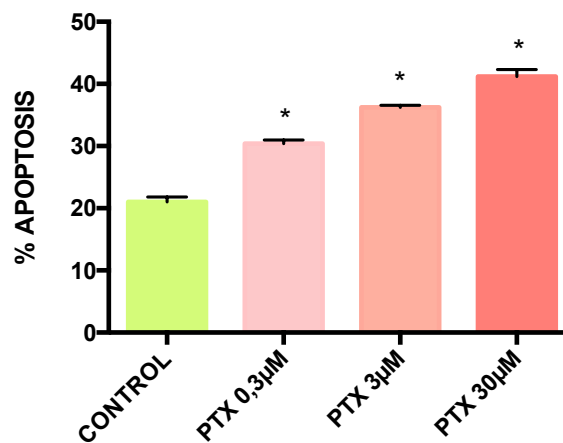


Figura 69. Apoptosis celular producida por paclitaxel (PTX) tras su incubación sobre queratinocitos humanos primarios determinada mediante citometría de flujo. Los queratinocitos fueron incubados durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM . Los resultados se expresan en porcentaje de células apoptóticas obtenidas tras el análisis de la anexina V asociada a FITC frente al yoduro de propidio (PI) (Q2 y Q4 en la **Figura 68**), y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de imágenes de al menos 2 experimentos independientes ($P=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

4.2.4 Efectos del paclitaxel sobre células microvasculares dérmicas humanas

4.2.4.1 Formación del tubo endotelial, angiogénesis.

Se evaluó el efecto de paclitaxel sobre la formación del tubo endotelial por parte de **células microvasculares dérmicas humanas**. El ensayo se realizó sobre el cultivo de este tipo de células endoteliales incubadas durante 24 h con el fármaco paclitaxel. Los resultados se reportaron como análisis de la longitud del tubo endotelial formado (pixels), el número total de ramificaciones y el número total de lazos. Se muestran imágenes representativas de cada una de las condiciones (**Figura 70**). La incubación de las células con paclitaxel, produjo una disminución concentración-dependiente del número de ramificaciones y el número de lazos existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones del fármaco de 3 μM y 30 μM . También se produjo una disminución de la longitud del tubo endotelial tras el tratamiento de las células con el fármaco en las tres dosis utilizadas, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las tres concentraciones del fármaco aplicadas (**Figura 71**).

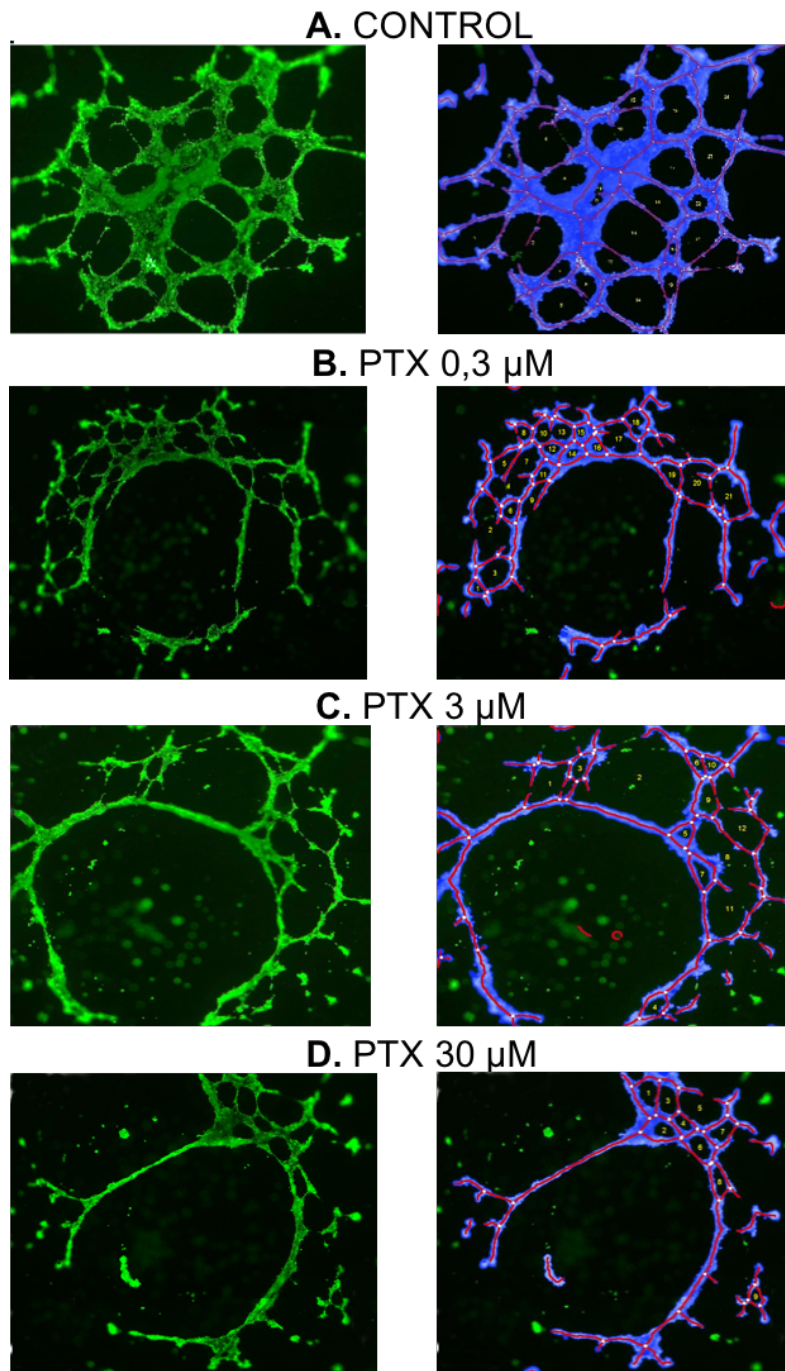


Figura 70. Efecto del paclitaxel (PTX) sobre la formación del tubo endotelial de células microvasculares dérmicas humanas. Las células endoteliales fueron incubadas durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μ M. Se trata de imágenes representativas de todas las condiciones de estudio: control (A.), paclitaxel 0,3 μ M (B.), paclitaxel 3 μ M (C.), paclitaxel 30 μ M (D.). En la parte izquierda pueden verse las imágenes teñidas al microscopio de fluorescencia, teniendo en la parte derecha su correspondiente imagen analizada mediante técnicas de análisis de imagen, viéndose en rojo el recorrido del tubo.

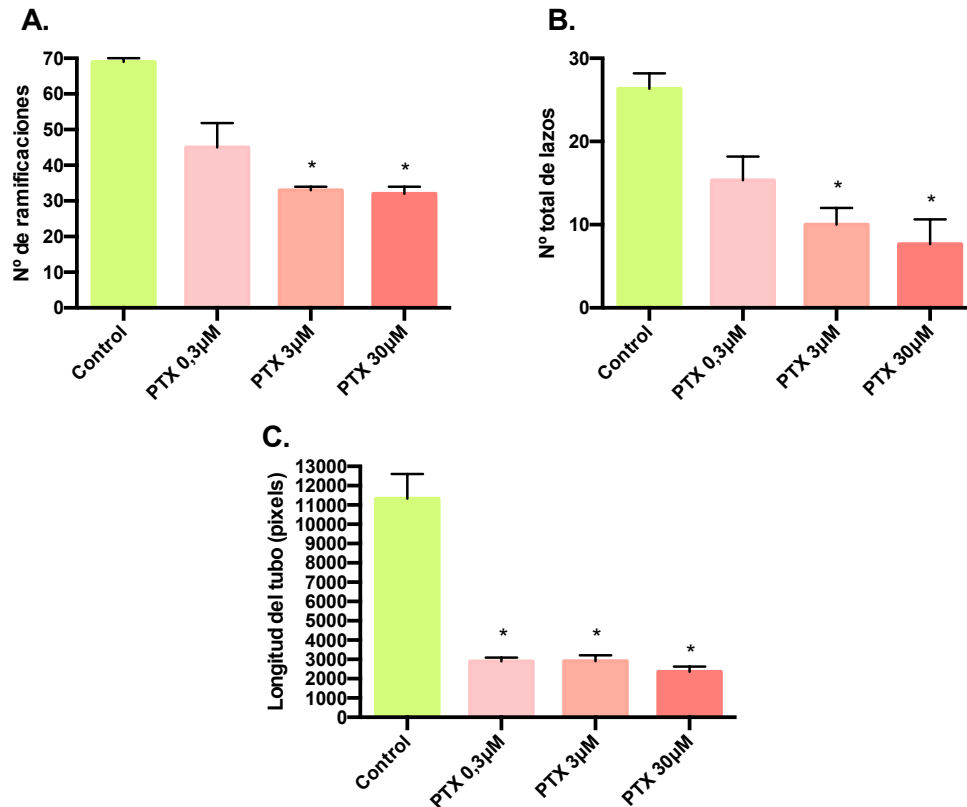


Figura 71. Efecto del paclitaxel (PTX) sobre el número de ramificaciones, el número de lazos y la longitud del tubo endotelial formado por células microvasculares dérmicas humanas. Las células endoteliales fueron incubadas durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM . Los resultados se expresan en número de ramificaciones (A.) y lazos formados por las células (B.), y en pixels la longitud del tubo (C.), y se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de imágenes de al menos 2 experimentos independientes ($P=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

4.2.5 Efectos del paclitaxel sobre melanocitos primarios humanos

4.2.5.1 Expresión génica de marcadores de la melanogénesis

En cuanto a la producción de melanina, el **cultivo monocapa de melanocitos humanos primarios** tratado 24 h con el fármaco paclitaxel presentó un aumento de la expresión génica de genes relacionados con la melanogénesis, como son TYR, TYRP1 y DCT. El aumento de la expresión génica de TYR, TYRP1 y DCT se dio en las tres concentraciones del fármaco utilizadas de forma concentración-dependiente, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en todas las dosis del fármaco utilizadas para TYRP1, y en las dosis del fármaco de 3 μM y 30 μM para TYR y DCT (**Figura 72**).

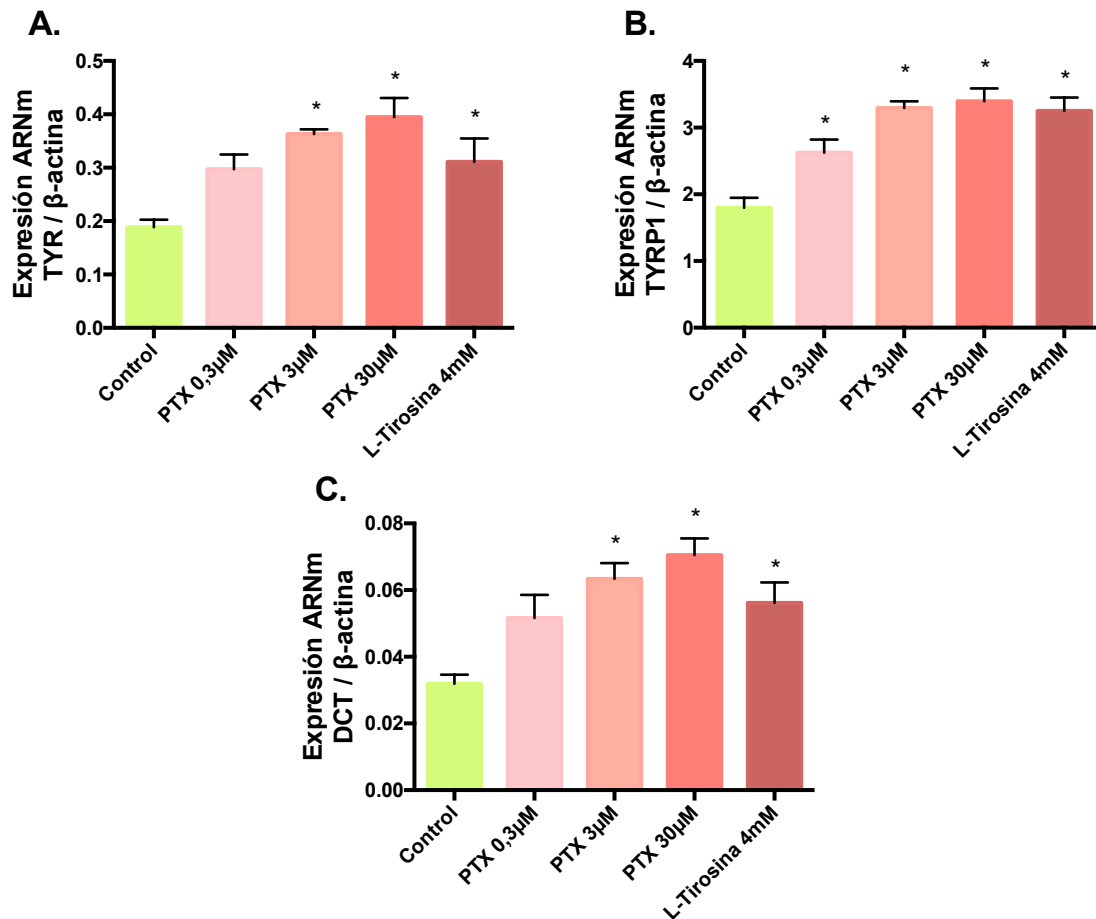


Figura 72. Expresión génica de TYR (A.) TYRP1 (B.) y DCT (C.) en cultivo de melanocitos primarios incubado con paclitaxel (PTX). Los melanocitos fueron incubados durante 24 h con el fármaco a las concentraciones de 0,3; 3; 30 μM. Se utilizó la L-Tirosina como control positivo. Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno β-actina, y se presentan como la media ± error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Los resultados se tomaron como diferencias significativas con respecto al control (*) cuando el valor de $p < 0,05$.

4.2.6 Capacidad fototóxica del paclitaxel

La determinación de la capacidad fototóxica del fármaco paclitaxel se realizó mediante un test de fototoxicidad *in vitro* avalado por la OECD. La viabilidad celular se expresa como porcentaje y se evalúa para cada condición y concentración de prueba (Figura 73). Para predecir el potencial fototóxico, se comparan las respuestas de concentración efectiva 50 (CE₅₀) obtenidas en presencia y en ausencia de radiación y se calcula un factor de fotoirritación (PIF), como relación del resultado de CE₅₀ en condiciones UV- entre la CE₅₀ UV+. Para la clasificación de la fototoxicidad en función del PIF obtenido se sigue la escala recogida en el protocolo.

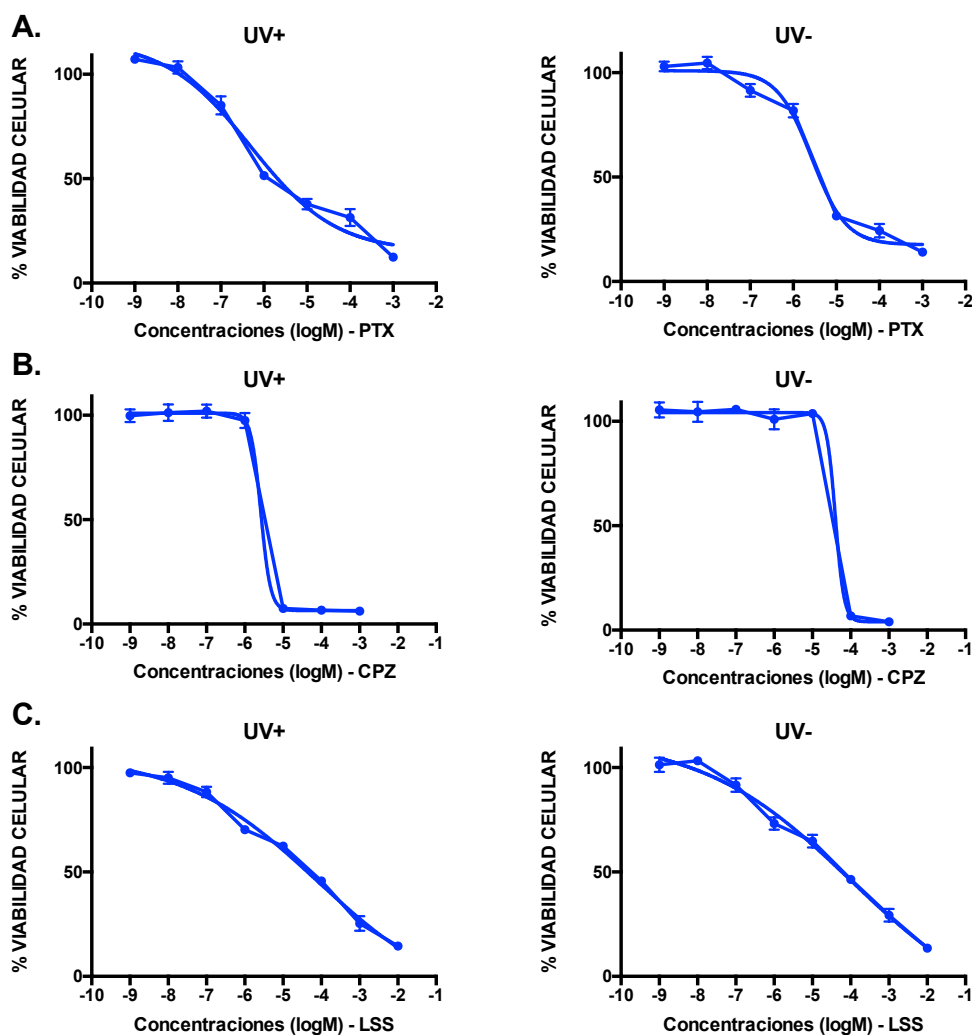


Figura 73. Datos de fototoxicidad para el fármaco paclitaxel (A.), el control positivo clorpromazina (CPZ) (B.) y el control negativo laurilsulfato de sodio (LSS) (C.). Las concentraciones utilizadas para cada uno de los compuestos fueron 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} M, y se expresan en las figuras como logaritmo de la misma. La línea azul indica la respuesta en el ensayo de absorción de rojo neutro (NRU), siendo UV- en ausencia de irradiación UV, y UV+ en presencia de irradiación UV. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (P=2), con cada condición por triplicado (n=3) para cada condición.

El resultado de PIF obtenido para cada uno de los compuestos se recogen en la **Tabla 22**. El fármaco paclitaxel obtuvo un PIF de 5,45, resultando según la clasificación como **fototóxico**.

Compuesto	PIF	Clasificación
Paclitaxel	5,45	Fototóxico
Clorpromazina (Control +)	15,24	Fototóxico
LSS (Control -)	1,24	No fototóxico

Tabla 22. Clasificación de los compuestos tras los resultados test de fototoxicidad *in vitro* OECD.

5. DISCUSIÓN

5.1 EVIDENCIAS *IN VIVO*

El paclitaxel es un fármaco antineoplásico utilizado en tratamientos oncológicos de quimioterapia, dada su larga trayectoria, se conocen multitud de efectos a causa de los tratamientos basados en este fármaco o en otros taxanos similares como docetaxel (155,198,219). Sin embargo, la descripción de la toxicidad en los ensayos clínicos con taxanos se limita a aquellas pacientes que presentan sintomatología. Existen escasos datos en la literatura sobre cuál es el impacto real de los taxanos en la piel en pacientes sin síntomas cutáneos. En el presente estudio, entre las alteraciones dermatológicas aparecidas en las pacientes oncológicas se encuentran algunas reacciones de toxicidad cutánea como son la dermatitis o los parches intertriginosos inflamatorios bilaterales. También se han dado casos de cambios en las uñas como la onicolisis, y cambios en la pigmentación cutánea como los producidos por el livedo reticularis. Se ha comunicado también síndrome mano-pie como una forma de eritrodesia palmar-plantar, así como la aparición de queratosis actínica (195–198). Sin embargo, la mayor parte de las pacientes no referían una clara sintomatología cutánea. No obstante, cabría destacar la aparición de alopecia asociada a quimioterapia, la cual fue generalizada en todas las pacientes, en mayor o menor medida, y supone uno de los efectos más traumáticos y que más secuelas psicológicas produce según algunos autores, afectado directamente sobre la calidad de vida de las pacientes, a pesar de no suponer un riesgo vital para ellas (197–199,203,204). En resumen, por lo que respecta a las reacciones cutáneas diagnosticadas en las pacientes del presente estudio, todas están dentro de las esperadas y catalogadas como posibles y más o menos frecuentes al seguir un tratamiento quimioterapéutico basado en taxanos, en concreto con paclitaxel.

Los resultados obtenidos en las medidas de parámetros cutáneos realizadas tanto a las voluntarias sanas como a las pacientes oncológicas previo tratamiento fueron similares y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, lo cual muestra que se partía de una población de pacientes con valores cutáneos dentro de la normalidad biológica de la mujer y representativos de la población general. Como muestra de ello, los datos obtenidos para las voluntarias sanas y las pacientes oncológicas en su primera visita se encontraban en torno a los valores de

referencia, así como por los obtenidos en otras investigaciones en las respectivas zonas anatómicas, en las que utilizan las mismas técnicas analíticas que en el presente estudio para determinar en mujeres sanas los valores de hidratación (99,104,317–319), los de TEWL (104,111,317,319), sebo (99,104,320,321), eritema (92,321,322), melanina (92,321,322), ITA^o (323,324), Ser (325,326), Sesm (325,326), descamación (327), grosor de la piel (322,328) y elasticidad y firmeza (99,301,304,321,322,328).

En relación a las diferentes **determinaciones *in vivo*** de la población de pacientes oncológicas en tratamiento, se puede concluir que la hidratación cutánea se ve afectada a causa del paclitaxel. Se produce una reducción de los valores de hidratación de la piel de las pacientes, tanto en el rostro como en el antebrazo, con respecto a la primera visita. Los resultados muestran como la disminución es más acusada a partir de la segunda visita en el rostro, mientras que la mayor disminución en el antebrazo se produce en la tercera visita. Esta diferencia puede explicarse debido a que el rostro además del tratamiento con paclitaxel, se trata de una zona fotoexpuesta, y existen evidencias del daño producido por la luz solar sobre las células de la piel, que potenciaría la disminución (56,329,330).

De la misma manera que en el valor de hidratación ocurre en lo que atañe a la TEWL, durante el tratamiento con paclitaxel muestra una disminución con respecto a la primera visita. Estos valores se ven reducidos de manera más acusada en la zona del rostro frente a la del antebrazo, lo cual tendría su explicación de la misma forma que en los valores de hidratación, la mayor frecuencia de exposición del rostro a radiación UV solar (56,329,330). A pesar de que una disminución de la pérdida de agua transepidérmica podría ser positiva para la piel, ya que se estaría evaporando una menor cantidad de agua de las células, en este caso, la disminución de la TEWL se explicaría debido a la disminución del valor de hidratación de la piel, las células contienen menos agua, por lo que la cantidad que puede evaporarse es también menor.

Por otra parte, en relación a la producción de lípidos de la piel, también se vio afectada por el tratamiento con paclitaxel, el valor de sebo fue disminuyendo

progresivamente con respecto a la primera visita de manera significativa. Los lípidos están considerados parte fundamental de los “factores de hidratación natural” de la piel, una de sus funciones es la de actuar como barrera frente a la pérdida de agua (43,44,50).

Por lo que respecta a los parámetros biomecánicos de la piel relacionados con la elasticidad y firmeza de la piel como son los parámetros R, se demostró una clara disminución de los mismos durante el tratamiento con paclitaxel. La administración del fármaco produjo una reducción de los parámetros R de la piel de las pacientes oncológicas, tanto en R0 como en R2, R5 y R7 con respecto a la primera visita. Estos valores muestran de una manera directa el estado de las propiedades biomecánicas de la piel (300,304,331).

En cuanto al grosor de la piel, los resultados obtenidos evidencian que el paclitaxel produce una disminución del mismo, reduciendo tanto el grosor de la dermis como de la epidermis de forma estadísticamente significativa. Las pacientes oncológicas tratadas con el fármaco vieron reducido el grosor de su piel tal y como se muestra en las ecografías del presente estudio. Esta pérdida de grosor sigue la línea de degradación generalizada de la piel a causa del tratamiento con el fármaco paclitaxel, relacionada con el resto de propiedades que dan soporte y sujeción a la piel (57,59,68,70,98,322,328).

En relación con el envejecimiento, el aumento de la sequedad, y la pérdida de función de la piel, se observa un aumento de la rugosidad, una disminución de la suavidad y un aumento de la descamación, tras el tratamiento con paclitaxel. El tratamiento con paclitaxel produjo un aumento del valor de Ser y Sesm, lo cual se relaciona con un aumento de la rugosidad de la piel y una disminución de la suavidad (325,326). Los efectos sobre estos dos parámetros muestran un claro envejecimiento de la piel, sumado a que, junto con el aumento del porcentaje de descamación, se evidencia una disminución en la capacidad de función barrera de la misma, viéndose afectada su integridad, a causa del tratamiento con paclitaxel en pacientes oncológicas (51). Todos

estos resultados, guardan una coherente relación con los obtenidos en los denominados como parámetros de elasticidad y firmeza y los factores fisiológicos de hidratación, obtenidos en este ensayo.

El tratamiento con paclitaxel en las pacientes oncológicas también supuso un aumento del eritema en la piel. El valor colorimétrico de eritema, se vio aumentado con respecto a la primera visita, lo que podría explicarse debido a un aumento de procesos inflamatorios en la piel, caracterizados por la aparición de enrojecimiento. Este incremento no fue acusado, pero se produjo de manera significativa en las pacientes.

La pigmentación de la piel también se vio afectada por el tratamiento con paclitaxel. En las pacientes oncológicas en tratamiento, los valores de melanina junto con los valores colorimétricos de ITA^o se vieron modificados significativamente con respecto a la primera visita, indicando un aumento de la pigmentación (322,332). Estos resultados podrían explicarse con la aparición frecuente de patologías pigmentarias características en clínica.

En definitiva, en este estudio se evidencia que aún incluso en una muestra de pacientes que mayoritariamente no presentaban patologías cutáneas, la administración de tratamientos basados en taxanos induce en la piel una disminución de la hidratación, del sebo, de la elasticidad y del grosor, un aumento de la descamación de la piel, del eritema y de la pigmentación, entre otras modificaciones. No obstante, este estudio *in vivo* tiene ciertos factores limitantes.

Por una parte, se trata de una serie de pacientes no homogénea ya que se han incluido no solo pacientes con enfermedad localizada sino también pacientes en distintas situaciones de enfermedad avanzada. Además, los esquemas de quimioterapia difieren entre las pacientes ya que a algunas se les proporcionó paclitaxel trisemanal mientras que otras recibieron un esquema semanal, y con diferentes agentes acompañantes. Sin embargo, la heterogeneidad de la muestra no debería suponer un importante impacto ya que ésta incluye solo tumores ginecológicos en los cuales los

tratamientos son muy similares. Además, considerando los esquemas utilizados, el fármaco con mayor impacto a nivel cutáneo siempre fue el paclitaxel por lo que a efectos de valoración de toxicidad de la piel no se considera que el resto de agente hayan supuesto un importante sesgo en nuestros datos.

Por otro lado, no todas las pacientes fueron expuestas a taxanos por primera vez en la inclusión en este estudio ya que la mayoría de ellas fueron tratadas previamente con paclitaxel. Para controlar este posible factor limitante, se incluyó una población sana como grupo control. Al comparar los datos basales del grupo de pacientes oncológicas frente a las voluntarias sanas no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, se podría considerar que el efecto del tratamiento previo con paclitaxel no ha sesgado de manera significativa las conclusiones del presente estudio, puesto que los resultados obtenidos se analizan en base a los valores iniciales de las pacientes antes de la administración del esquema actual.

5.2 RESPUESTA A NIVEL CELULAR

A **nivel celular**, mediante la citometría de flujo basada en la detección de anexina V en queratinocitos, se puede observar como el tratamiento con paclitaxel aumenta el proceso de apoptosis celular. Este proceso apoptótico es esperable ya que un mecanismo de acción conocido del paclitaxel es la unión a la β -tubulina lo que produce una estabilización de los microtúbulos, bloqueando la progresión de la mitosis y desencadenando la apoptosis celular, la cual también se analizó a través de marcadores moleculares (152,161,164).

En cuanto a la producción celular de ERO, los resultados del presente estudio demuestran que tras el tratamiento con paclitaxel existe un aumento de la producción de ERO (333,334). El tratamiento con paclitaxel en queratinocitos primarios humanos produce un aumento de estadísticamente significativo de las ERO celulares, cuyo marcaje es claramente visible en las imágenes de microscopía de fluorescencia. Así

mismo, mediante este ensayo, pudo observarse la morfología poliploide de las células sometidas al tratamiento con paclitaxel, poniendo de manifiesto la incapacidad para dividirse avocando a la célula a la apoptosis o a la detención del ciclo celular.

En relación a la capacidad celular de generar nuevos vasos sanguíneos, es decir, llevar a cabo procesos de angiogénesis, se demuestra una clara disminución durante el tratamiento con paclitaxel. La angiogénesis es un proceso estrechamente relacionado con el envejecimiento de la piel, ya que se pierde vascularización en el tejido lo que supone una merma del aporte energético y respiratorio a las células (85). El tratamiento con paclitaxel produjo una disminución de la formación del tubo endotelial en células microvasculares dérmicas humanas, afectando al número de ramificaciones, al número de lazos y a la longitud total del tubo, cuantificable gracias a técnicas de fluorescencia. Estos hallazgos sobre la formación del tubo endotelial en células de la piel, van en consonancia con el resto de resultados obtenidos, y soportaría las disminuciones en los parámetros de elasticidad y firmeza, y factores de hidratación, así como el aumento del resto de procesos relacionados con el envejecimiento y estados patológicos de la piel.

Por lo que respecta a la producción celular de citoquinas inflamatorias del modelo 3D de piel, el tratamiento con paclitaxel supuso un incremento de IL-1 α , IL-6 y IL-8, con respecto al control. Existen numerosos marcadores cutáneos para valorar la presencia de fenómenos inflamatorios, las citoquinas IL-1 α , IL-6 y IL-8 son algunos de estos marcadores, y su producción es utilizada como tal en la piel (142,143,335–338). De la misma forma, estos resultados irían acompañados y posiblemente ligados a la cantidad de efectos adversos frecuentes observados en clínica, como son los fenómenos de toxicidad cutánea como dermatitis y diversos tipos de erupciones eritematosas, así como otras patologías y respuestas inflamatorias de la piel, y en particular a los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* relacionados con el eritema y otras efectos degenerativos (198).

5.3 RESPUESTA A NIVEL MOLECULAR

A **nivel molecular**, la expresión génica y proteica de los diferentes factores analizados del modelo 3D de piel sufrieron modificaciones. En cuanto a la AQP3, se le otorga un importante papel en multitud de procesos relacionados con la hidratación de los queratinocitos y de la piel en general, ya que se encarga de transportar agua y glicerol en la epidermis. Numerosos estudios ponen de manifiesto que se trata de proteínas clave para mejorar la resistencia y la calidad de la superficie de la piel, así como para mejorar el envejecimiento y la sequedad, hidratando la epidermis, y formando y recuperando las barreras de la piel, además de tener un papel proliferativo en los queratinocitos (52,339). El tratamiento con paclitaxel del modelo 3D de piel, evidencia una disminución de la expresión génica y proteica, con respecto al control, de la AQP3, la cual guarda una relación directa con los resultados obtenidos en las pacientes oncológicas tratadas también con paclitaxel, que ven disminuidos sus parámetros fisiológicos relacionados con la hidratación. En conclusión, el tratamiento con paclitaxel tiene efectos negativos sobre diferentes factores fisiológicos implicados en la hidratación de la piel, como son el mantenimiento hídrico, el efecto barrera y la producción de lípidos.

Por otra parte, el COL1, la ELN, y la FN1, son proteínas que juegan un papel clave en el mantenimiento de la elasticidad, la firmeza y la función de soporte de la piel, propiedades que pueden verse afectadas por una merma en la producción proteica o un aumento en la degradación de las mismas. De la misma manera los cambios en la producción de estas proteínas estructurales puede afectar al grosor de la misma, causando cambios en el calibre de las capas cutáneas (57,59,68,70). El tratamiento con paclitaxel en el modelo 3D de piel, supuso una disminución de la expresión génica y proteica, con respecto al control, del COL1, ELN y FN1, proteínas clave en el mantenimiento de propiedades físicas y biomecánicas de la piel, que le ofrecen soporte y sujeción, favoreciendo la estructura y su función barrera protectora. Estos resultados guardan una relación directa con los obtenidos en el estudio *in vivo* sobre pacientes

oncológicas en tratamiento con paclitaxel, las cuales vieron disminuidos sus parámetros de elasticidad y firmeza, así como el grosor, además de cambios en la superficie de la piel.

Por otra parte, a nivel molecular, SOD1, Nrf2 y NOX4 son proteínas implicadas en la regulación de ERO, y utilizadas como marcadores en el estudio de la oxidación celular. La enzima SOD1 actúan dispersando los superóxidos de oxígeno y el peróxido de hidrógeno en la célula y el factor de transcripción Nrf2 juega un importante papel regulando la transcripción de proteínas antioxidantes, mientras que la enzima NOX4 es un factor clave en la homeostasis intracelular de las reacciones de oxidación y está reconocida como uno de los principales productores de ERO dentro de la célula (72,80,340,341). En primer lugar, el tratamiento con paclitaxel en el modelo 3D de piel, supuso una disminución de la expresión génica y proteica, con respecto al control, de SOD1 y Nrf2, privando a la célula de herramientas clave para luchar contra el estrés oxidativo. En segundo lugar, en el modelo 3D de piel tratado con paclitaxel se mostró un aumento de la expresión génica y proteica de NOX4, con respecto al control, lo que equivale a un potencial aumento de la producción de ERO dentro de la célula. Las ERO celulares causan multitud de efectos negativos en la piel como la aceleración del envejecimiento, la disminución de la función barrera o el aumento de la inflamación (72,342). Estas observaciones de la producción de ERO en la piel producida por el tratamiento con paclitaxel, muestran un desajuste en su regulación molecular, y van en consonancia con el resto de resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro* en lo que respecta a las alteraciones de los parámetros cutáneos como la hidratación, la firmeza y elasticidad o el desarrollo de procesos de inflamación.

Las proteínas Bcl2, p53 y p21, tienen roles importantes en los procesos de apoptosis celular y senescencia, los cuales son clave en el mecanismo de acción del paclitaxel como fármaco antineoplásico, y se utilizan molecularmente como marcadores de estos procesos (159,343–347). En primer lugar, tratamiento con paclitaxel en el modelo 3D de piel, supuso una alteración de la expresión génica, con respecto al control, de Bcl2, p53 y p21. La expresión de Bcl2 disminuyó, frente al aumento de la expresión de p21 y p53. De la misma manera sucedió en la expresión proteica de Bcl2 y p53. Estos

resultados a nivel de expresión génica y proteica, junto con los obtenidos a nivel celular, ponen de manifiesto que los efectos derivados de la acción antineoplásica del paclitaxel también se producen en las células de la piel, produciendo un deterioro en el normal funcionamiento de la misma y comprometiendo su integridad.

En relación a los diferentes factores moleculares implicados en el proceso de angiogénesis, se demuestra una clara disminución de los mismos durante el tratamiento con paclitaxel. El factor de crecimiento VEGF es el principal factor de angiogénesis en la piel, junto con la eNOS, debido su implicación endotelial en la síntesis de óxido nítrico, el cual está ligado al proceso de creación de vasos (84,87). El tratamiento con paclitaxel en el modelo 3D de piel, supuso una disminución de la expresión génica, con respecto al control, de VEGF y eNOS, los cuales tienen un rol importante en el proceso de angiogénesis. De la misma manera se vio disminuida la expresión proteica con respecto al control de VEGF. Estos resultados soportarían la inhibición de la formación del tubo endotelial a nivel celular, y estarían involucrados por tanto en las disminuciones de los parámetros físicos, biomecánicos y fisiológicos de la piel, así como en el aumento del resto de procesos relacionados con el envejecimiento y la inflamación.

El mecanismo de acción del paclitaxel ante VEGF no ha sido descrito con claridad, aunque podría explicarse ya que no se dan condiciones de proliferación celular para la generación de nuevos vasos, debido al desarrollo del proceso de apoptosis y/o detención del ciclo celular. Se ha hipotetizado que uno de los mecanismos de acción del paclitaxel, sobre todo en su esquema de administración semanal, podría deberse a un efecto antiangiogénico tumoral. En el caso de la eNOS, existen estudios que ponen de manifiesto la relación con VEGF en el desarrollo normal celular. El factor VEGF forma parte de la señalización del proceso de angiogénesis activando la eNOS, pero como se demuestra en el presente estudio, el fármaco paclitaxel induce una supresión de la expresión tanto génica como proteica de VEGF, lo cual hace que se vea afectada la eNOS y por tanto la angiogénesis (88,348).

Los hallazgos de nuestro estudio sobre la angiogénesis cutánea sí parecen sugerir que el paclitaxel tiene un efecto antiangiogénico sobre este órgano. La piel a efectos farmacodinámicos, es considerado un órgano subrogado del tumor, por lo que estos hallazgos sugieren que también podría ocurrir un efecto similar sobre el tumor.

5.4 EFECTOS SOBRE LA MELANOGÉNESIS

En cuanto a los mecanismos moleculares de la **producción de melanina**, e tratamiento con paclitaxel en melanocitos primarios humanos indujo el incremento de la expresión génica, con respecto al control, de las proteínas TYR, TYRP1 y DCT. Estas proteínas están involucradas en la ruta molecular de producción del pigmento melanina, y cuyo aumento indicaría un potencial aumento del proceso de melanogénesis en la piel (126,133–135,137).

La transcripción de los genes TYR, TYRP1 y DCT, está mediada por el factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF). Una de las rutas de activación del factor MITF es la vía dependiente de Ras/MAPK/ERK mediante su fosforilación, esta vía de señalización es una de las que se ha observado que se activa en algunos tipos celulares con el fármaco paclitaxel a través de su mecanismo de acción. Este estudio abre la puerta al desarrollo de las investigaciones sobre el papel del paclitaxel en la melanogénesis, y por consiguiente de las enfermedades relacionadas con la producción de melanina (126,173). Así mismo, estos resultados guardarían relación con los efectos adversos más frecuentes reconocidos en la clínica durante el tratamiento oncológico con paclitaxel, como son los cambios en la pigmentación de la piel. Entre estos efectos se encuentran algunos como la aparición de hiperpigmentación supravenosa serpentina, y la hiperpigmentación flagelada y reticulada (198). De la misma forma, apoyarían los cambios en la pigmentación recogidos en el estudio *in vivo*, a nivel del valor de melanina y de ITA°.

En resumen, tanto los resultados *in vivo*, como los obtenidos *in vitro*, así como los casos de efectos adversos frecuentes observados en clínica, pondrían de manifiesto que el tratamiento con paclitaxel incrementa el proceso de producción de melanina.

5.5 EFECTO SOBRE NF- κ B COMO MECANISMO DE ACCIÓN

El tratamiento con paclitaxel indujo una **activación del factor NF- κ B**. El factor NF- κ B tiene un rol importante en la regulación de la expresión de citocinas, factores de crecimiento y genes que regulan la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la senescencia celular y la inflamación, afectando directamente sobre el envejecimiento y el estado de la piel. La fosforilación de NF- κ B es fundamental para controlar su activación y translocación al núcleo para iniciar la transcripción génica específica (74–76).

El tratamiento con paclitaxel del cultivo 3D de piel produjo la fosforilación del factor NF- κ B, con respecto al control, a nivel de expresión proteica, no viéndose afectada su forma no fosforilada, lo que indicaría una potencial activación del factor y el desencadenamiento de procesos subyacentes. Por una parte, existen estudios que avalan la interacción del paclitaxel con el TLR4, y por tanto el desencadenamiento de toda su vía de señalización, la cual pasaría por la activación del factor NF- κ B y las consecuencias que eso conllevaría (**Figura 74**) (166,170,171,349,350). Además, el paclitaxel es capaz de pasar al citoplasma celular, y aparte de unirse a la β -tubulina e impedir la despolimerización de los microtúbulos, su presencia en la célula promueve la generación de ERO. Recientemente se han valorado los diferentes roles que tienen las ERO en la regulación de NF- κ B, así como en otras vías de señalización como las MAPK. En el caso del tratamiento con paclitaxel se estaría dando una activación, además de no ser la única causa de este fenómeno por lo que respecta a la piel (351–355).

La activación y translocación nuclear del factor NF- κ B, daría lugar a la transcripción de genes implicados en diversos procesos celulares. Uno de estos procesos sería la producción de citoquinas inflamatorias como son la IL-1 α , la IL-6 y la IL-8, que se

ha demostrado el incremento en su producción tras el tratamiento con paclitaxel (356). Otro de los procesos que tendrían lugar a través de la activación de NF- κ B, así como de la cascada de señalización de las MAPK según otros estudios, sería la activación del factor p53. El factor p53, junto con el propio NF- κ B, modularían la transcripción de genes relacionados con la apoptosis y la detención del ciclo celular como son en este caso la disminución del anti-apoptótico Bcl2 y el aumento de p21, además de otros genes pro-apoptóticos como los pertenecientes a la familia Bax (357–361).

Estos resultados sobre la activación de NF- κ B en el modelo 3D de piel producida por el tratamiento con paclitaxel, así como los mecanismos interrelacionados que se ven afectados, sigue la línea del resto de estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, en coherencia con la sobreproducción de citoquinas inflamatorias, el aumento de ERO, la apoptosis y la detención del ciclo celular, las alteraciones cutáneas que desembocan en un aumento del envejecimiento de la piel, y la posible aparición de patologías.

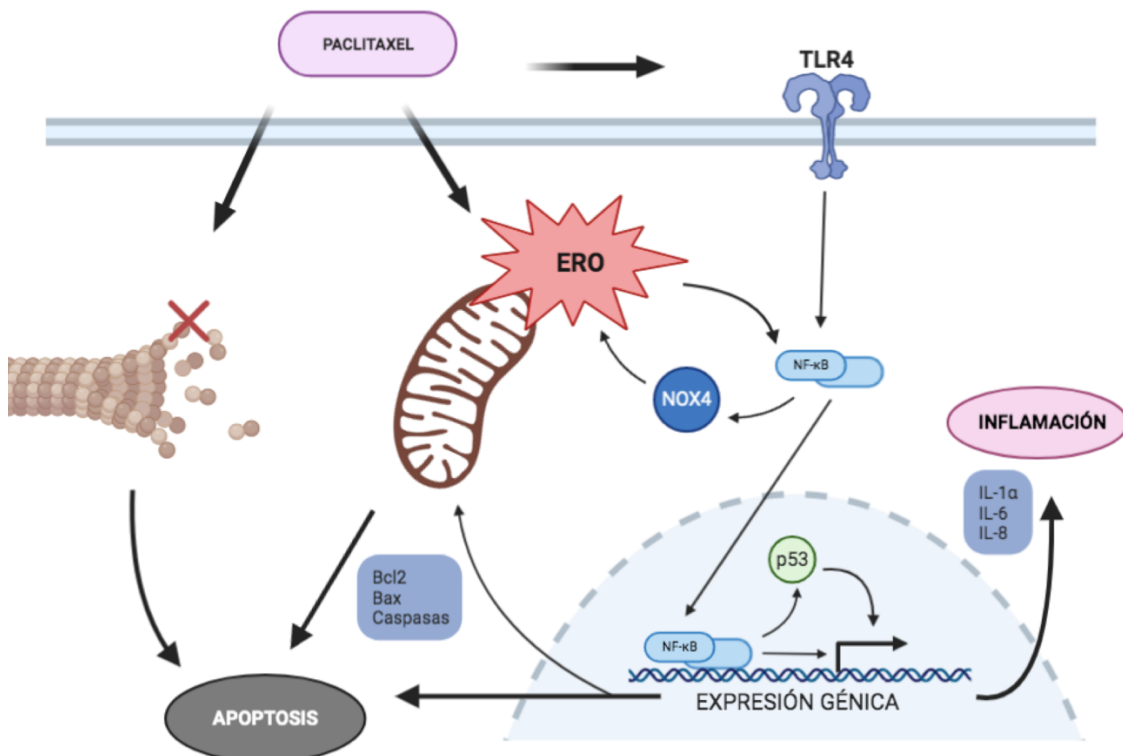


Figura 74. Vías de señalización activadas por paclitaxel (PTX). PTX se une a la β -tubulina evitando a despolimerización de los microtúbulos y desembocando en apoptosis y detención del ciclo celular. PTX interacciona con el TLR activando su vía de señalización mediada por el factor NF- κ B. De la misma manera NF- κ B activa las NOX que aumentan la aparición de ERO, lo cual activa también el factor nuclear. NF- κ B se transloca al núcleo, es capaz de activar p53, y ambos iniciar la transcripción de genes relacionados con la apoptosis celular y la senescencia, como son Bcl2, y p21, así como la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1 α , la IL-6 y la IL-8). Creado con BioRender.

Otra de las vías de señalización sobre las que el fármaco paclitaxel podría tener influencia es la ruta de PI3K/AKT, la cual está implicada en diferentes procesos de proliferación celular y supervivencia (362). Existen recientes estudios en los que se observa una inhibición de esta vía con paclitaxel en algunos tipos celulares (361). En el caso de la expresión de genes como el COL1, la ELN, la FN1 o la AQP3, existen estudios que sugieren la implicación de la vía PI3K/AKT en su regulación, por lo que la disminución de la expresión génica y proteica de estos genes podría estar relacionada dada la inhibición de esta cascada de señalización causada por el tratamiento por paclitaxel (363–367). Esta podría ser una hipótesis lógica que explicaría los resultados moleculares, así como los obtenidos en el estudio *in vivo* relacionados con los parámetros físicos, biomecánicos y fisiológicos de la piel con el tratamiento con paclitaxel, dejando la puerta abierta al estudio del efecto del fármaco sobre la vía de señalización de PI3K/AKT.

5.6 FOTOTOXICIDAD

Por lo que respecta al estudio de **fototoxicidad** del fármaco paclitaxel, los resultados obtenidos según el protocolo de la OECD, fueron que el fármaco está dentro de los límites para ser considerado como fototóxico. Esto apoyaría el gran número de reacciones registradas en clínica en zonas fotoexpuestas, así como podría explicar los aumentos en el deterioro de parámetros cutáneos en el rostro sobre el antebrazo, o las variaciones en los valores de pigmentación y eritema los cuales aumentaron significativamente, a pesar de haberse realizado en el antebrazo. La determinación *in vitro* de la capacidad fototóxica del paclitaxel, según la técnica avalada, no había sido descrita anteriormente.

5.7 COROLARIO

En definitiva, el presente estudio pone de manifiesto los efectos del paclitaxel sobre distintos parámetros cutáneos físicos, biomecánicos y fisiológicos a nivel tanto clínico como celular y molecular, demostrando un envejecimiento generalizado y una pérdida de función de la piel, acompañados de fenómenos inflamatorios, que podrían explicar el desarrollo de patologías producidas por el tratamiento. Es la primera vez que se utiliza un modelo 3D de piel para describir los efectos moleculares del paclitaxel, así como su correlación sobre los efectos clínicos en pacientes oncológicas, evidenciando el potencial toxicológico del fármaco, y poniendo de manifiesto que se trata de un modelo útil para este tipo de estudios. Esta evaluación de los efectos producidos en la piel pone el foco de forma temprana en la toxicidad cutánea sintomática y por tanto facilita la implementación de medidas profilácticas que la minimicen y eviten su empeoramiento. Al mismo tiempo, este trabajo abre la puerta al estudio de los efectos adversos cutáneos de fármacos antineoplásicos además de sensibilizar y destacar la importancia sobre la calidad de vida de la mujer afectada.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas fueron:

1. El tratamiento con paclitaxel produce un efecto citotóxico sobre la piel, afectando a los parámetros cutáneos clínicos relacionados con la hidratación, la TEWL, la producción de lípidos, la elasticidad y firmeza, los parámetros de superficie, la descamación, la pigmentación, el enrojecimiento, y el grosor de la piel.
2. En células cutáneas, el paclitaxel promueve un aumento de la apoptosis celular, la generación de ERO y la producción de citoquinas inflamatorias, así como una inhibición de la angiogénesis.
3. A nivel molecular, el tratamiento con paclitaxel sobre modelo 3D de piel altera la expresión de marcadores moleculares cutáneos implicados en la elasticidad y firmeza de la piel, la hidratación, la regulación de ERO, la angiogénesis, la senescencia y la apoptosis, así como una activación del factor NF- κ B.
4. Paclitaxel aumenta el proceso de producción de melanina, considerándose melanogénico.
5. El fármaco paclitaxel puede ser clasificado como fototóxico.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol EJD*. agosto de 2002;12(4):390-9; quiz 400-1.
2. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin (Chapter 1). En: Muelhbauer P, McGowan C, editores. *Site-Specific Cancer Series: Skin Cancer*. Oncology Nursing Society; 2009. p. 1-11.
3. James WD, Berger TG, Elston DM, Andrews GC. *Andrews' diseases of the skin: clinical dermatology* [Internet]. 2016 [citado 13 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20120068895>
4. PDQ Cancer Genetics Editorial Board. Genetics of Skin Cancer (PDQ®): Health Professional Version. En: *PDQ Cancer Information Summaries* [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 [citado 21 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65895/>
5. Wong DJ, Chang HY. Skin tissue engineering. En: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008 [citado 14 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27029/>
6. Chu DH. Chapter 7. Development and Structure of Skin. En: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K, editores. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* [Internet]. 8.^a ed. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2012 [citado 14 de enero de 2020]. Disponible en: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=56021404
7. Biga LM, Dawson S, Harwell A, Hopkins R, Kaufmann J, LeMaster M, et al. 5.1 Layers of the Skin. En: *Anatomy & Physiology* [Internet]. OpenStax/Oregon State University; 2019 [citado 21 de enero de 2020]. Disponible en: <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/5-1-layers-of-the-skin/>
8. Murphrey MB, Miao JH, Zito PM. Histology, Stratum Corneum. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 14 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513299/>
9. Kim J-H, Ahn B, Choi S-G, In S, Goh AR, Park S-G, et al. Amino acids disrupt calcium-dependent adhesion of stratum corneum. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215244.
10. Agarwal S, Krishnamurthy K. Histology, Skin. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 14 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537325/>
11. Freeman SC, Sonthalia S. Histology, Keratohyalin Granules. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 14 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537049/>
12. Uche LE, Gooris GS, Beddoes CM, Bouwstra JA. New insight into phase behavior and permeability of skin lipid models based on sphingosine and phytosphingosine ceramides. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 01 de 2019;1861(7):1317-28.
13. Seah BC-Q, Teo BM. Recent advances in ultrasound-based transdermal drug delivery. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:7749-63.
14. Ruchusatsawat K, Wongpiyabovorn J, Protjaroen P, Chaipipat M, Shuangshoti S, Thorner PS, et al. Parakeratosis in skin is associated with loss of inhibitor of differentiation 4 via promoter methylation. *Hum Pathol*. diciembre de 2011;42(12):1878-87.
15. Goleva E, Berdyshev E, Leung DY. Epithelial barrier repair and prevention of allergy. *J Clin Invest*. 1 de abril de 2019;129(4):1463-74.
16. Bosko CA. Skin Barrier Insights: From Bricks and Mortar to Molecules and Microbes. *J Drugs Dermatol JDD*. 01 de 2019;18(1s):s63-67.
17. Maarouf M, Maarouf CL, Yosipovitch G, Shi VY. The impact of stress on epidermal barrier function: an evidence-based review. *Br J Dermatol*. diciembre de 2019;181(6):1129-37.
18. Harding C. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther*. 1 de febrero de 2004;17 Suppl 1:6-15.

19. Parker J, Scharfbillig R, Jones S. Moisturisers for the treatment of foot xerosis: a systematic review. *J Foot Ankle Res.* 2017;10:9.
20. Lopez-Ojeda W, Pandey A, Alhaji M, Oakley AM. Anatomy, Skin (Integument). En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 14 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441980/>
21. Yousef H, Alhaji M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 14 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
22. Jaitley S, Saraswathi T. Pathophysiology of Langerhans cells. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP.* 2012;16(2):239-44.
23. Gilbert SF. The Epidermis and the Origin of Cutaneous Structures. *Dev Biol* 6th Ed [Internet]. 2000 [citado 14 de enero de 2020]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10037/>
24. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Adv Dermatol Allergol Dermatol Alergol.* febrero de 2013;30(1):30-41.
25. Hoath SB, Leahy DG. The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality. *J Invest Dermatol.* diciembre de 2003;121(6):1440-6.
26. Prost-Squarcioni C, Freitag S, Heller M, Boehm N. Functional histology of dermis. *Ann Dermatol Venereol.* enero de 2008;135(1 Pt 2):1S5-20.
27. Brown TM, Krishnamurthy K. Histology, Dermis. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 14 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/>
28. Shimizu H. Shimizu's textbook of dermatology. Japan: [Japan] : Hokkaido University, 2007.; 2007.
29. Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells.* 18 de 2019;8(6).
30. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929-58.
31. Terentjev EM, Weitz DA. The Oxford Handbook of Soft Condensed Matter. Edición: Reprint. OUP Oxford; 2015. 608 p.
32. Green EM, Mansfield JC, Bell JS, Winlove CP. The structure and micromechanics of elastic tissue. *Interface Focus.* 6 de abril de 2014;4(2):20130058.
33. Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol.* abril de 2011;57(4):376-9.
34. Smith GP, Chan ESL. Molecular pathogenesis of skin fibrosis: insight from animal models. *Curr Rheumatol Rep.* febrero de 2010;12(1):26-33.
35. Jumper N, Paus R, Bayat A. Functional histopathology of keloid disease. *Histol Histopathol.* septiembre de 2015;30(9):1033-57.
36. Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol.* enero de 2010;37(1):11-25.
37. Heng JK, Aw DCW, Tan KB. Solar elastosis in its papular form: uncommon, mistakable. *Case Rep Dermatol.* enero de 2014;6(1):124-8.
38. Ceilley RI. Treatment of Actinic Purpura. *J Clin Aesthetic Dermatol.* junio de 2017;10(6):44-50.
39. Deacock SJ. An approach to the patient with urticaria. *Clin Exp Immunol.* agosto de 2008;153(2):151-61.
40. Oakley AM, Ramsey ML. Polymorphic Light Eruption. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 22 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430886/>
41. Nemeth V, Evans J. Eczema. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 22 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538209/>

42. Hunter JAA, Savin J, Dahl M. The Function and Structure of the Skin, Chapter 2. En: *Clinical Dermatology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2014 [citado 13 de enero de 2020]. p. 7-29. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118938164.ch2>
43. Blank IH. Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* junio de 1952;18(6):433-40.
44. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol.* junio de 1983;80(1 Suppl):44s-9s.
45. Watkinson A, Harding C, Moore A, Coan P. Water modulation of stratum corneum chymotryptic enzyme activity and desquamation. *Arch Dermatol Res.* septiembre de 2001;293(9):470-6.
46. Verdier-Sévrain S, Bonté F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol.* junio de 2007;6(2):75-82.
47. Brisson D, Vohl MC, St-Pierre J, Hudson TJ, Gaudet D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* junio de 2001;23(6):534-42.
48. Hara M, Ma T, Verkman AS. Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *J Biol Chem.* 29 de noviembre de 2002;277(48):46616-21.
49. Boury-Jamot M, Daraspe J, Bonté F, Perrier E, Schnebert S, Dumas M, et al. Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(190):205-17.
50. Feingold KR. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res.* diciembre de 2007;48(12):2531-46.
51. Lee S, Jeong SK, Ahn S. An Update of the Defensive Barrier Function of Skin. *Yonsei Med J.* 1 de julio de 2006;47:293-306.
52. Qin H, Zheng X, Zhong X, Shetty AK, Elias PM, Bollag WB. Aquaporin-3 in Keratinocytes and Skin: Its Role and Interaction with Phospholipase D2. *Arch Biochem Biophys.* 15 de abril de 2011;508(2):138-43.
53. Hara-Chikuma M, Verkman AS. Roles of Aquaporin-3 in the Epidermis. *J Invest Dermatol.* 1 de septiembre de 2008;128(9):2145-51.
54. Zheng X, Bollinger Bollag W. Aquaporin 3 colocalizes with phospholipase d2 in caveolin-rich membrane microdomains and is downregulated upon keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol.* diciembre de 2003;121(6):1487-95.
55. Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J Mol Med.* 1 de febrero de 2008;86(2):221-31.
56. Zhang S, Duan E. Fighting against Skin Aging. *Cell Transplant.* mayo de 2018;27(5):729-38.
57. Mora Huertas AC, Schmelzer CEH, Hoehenwarter W, Heyroth F, Heinz A. Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie.* octubre de 2016;128-129:163-73.
58. Kim M, Park HJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Rejuvenation. *Mol Mech Aging Process Rejuvenation.* 31 de agosto de 2016;
59. Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J Drugs Dermatol JDD.* febrero de 2008;7(2 Suppl):s12-16.
60. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med.* 13 de noviembre de 1997;337(20):1419-28.
61. Shin J-W, Kwon S-H, Choi J-Y, Na J-I, Huh C-H, Choi H-R, et al. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *Int J Mol Sci.* 29 de abril de 2019;20(9).
62. Quan T, Fisher GJ. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology.* 2015;61(5):427-34.
63. Griffiths CE, Russman AN, Majmudar G, Singer RS, Hamilton TA, Voorhees JJ. Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid). *N Engl J Med.* 19 de agosto de 1993;329(8):530-5.

64. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* 15 de marzo de 2007;15(6):2223-68.
65. Pittayapruek P, Meehansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2 de junio de 2016;17(6).
66. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* enero de 2005;85(1):1-31.
67. Uitto J, Li Q, Urban Z. The complexity of elastic fiber biogenesis in the skin – a perspective to the clinical heterogeneity of cutis laxa. *Exp Dermatol.* febrero de 2013;22(2):88-92.
68. Clark RA. Fibronectin in the skin. *J Invest Dermatol.* diciembre de 1983;81(6):475-9.
69. Pezzoli D, Di Paolo J, Kumra H, Fois G, Candiani G, Reinhardt DP, et al. Fibronectin promotes elastin deposition, elasticity and mechanical strength in cellularised collagen-based scaffolds. *Biomaterials.* 2018;180:130-42.
70. Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol.* 2014;802:31-47.
71. Piotrowska-Nowak A, Bartnik E. The role of reactive oxygen species and mitochondria in aging. *Postepy Biochem.* 19 de agosto de 2014;60:240-7.
72. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules.* 21 de abril de 2015;5(2):545-89.
73. Serrano G, Almudéver P, Serrano J-M, Milara J, Torrens A, Expósito I, et al. Phosphatidylcholine liposomes as carriers to improve topical ascorbic acid treatment of skin disorders. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2015;8:591-9.
74. Choi YJ, Moon KM, Chung KW, Jeong JW, Park D, Kim DH, et al. The underlying mechanism of proinflammatory NF- κ B activation by the mTORC2/Akt/IKK α pathway during skin aging. *Oncotarget.* 16 de agosto de 2016;7(33):52685-94.
75. Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. *Cells.* 18 de marzo de 2016;5(1).
76. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF- κ B in Aging and Disease. *Aging Dis.* 2 de diciembre de 2011;2(6):449-65.
77. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* enero de 2002;82(1):47-95.
78. Kovac S, Angelova PR, Holmström KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim Biophys Acta.* abril de 2015;1850(4):794-801.
79. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223.
80. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* enero de 2007;87(1):245-313.
81. Brewer AC, Murray TVA, Arno M, Zhang M, Anilkumar NP, Mann GE, et al. Nox4 regulates Nrf2 and glutathione redox in cardiomyocytes in vivo. *Free Radic Biol Med.* 1 de julio de 2011;51(1):205-15.
82. Goettsch C, Goettsch W, Brux M, Haschke C, Brunssen C, Muller G, et al. Arterial flow reduces oxidative stress via an antioxidant response element and Oct-1 binding site within the NADPH oxidase 4 promoter in endothelial cells. *Basic Res Cardiol.* junio de 2011;106(4):551-61.
83. Bernard K, Logsdon NJ, Miguel V, Benavides GA, Zhang J, Carter AB, et al. NADPH Oxidase 4 (Nox4) Suppresses Mitochondrial Biogenesis and Bioenergetics in Lung Fibroblasts via a Nuclear Factor Erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)-dependent Pathway. *J Biol Chem.* 17 de febrero de 2017;292(7):3029-38.
84. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* diciembre de 2004;56(4):549-80.

85. Chung JH, Eun HC. Angiogenesis in skin aging and photoaging. *J Dermatol.* septiembre de 2007;34(9):593-600.
86. Gunin AG, Petrov VV, Golubtzova NN, Vasilieva OV, Kornilova NK. Age-related changes in angiogenesis in human dermis. *Exp Gerontol.* julio de 2014;55:143-51.
87. Cooke JP. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl.* diciembre de 2003;4(4):53-60.
88. Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun.* 27 de noviembre de 1998;252(3):743-6.
89. Waller J, Maibach H. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): Blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* 1 de diciembre de 2005;11:221-35.
90. Lee M, Jung Y, Kim E, Lee HK. Comparison of skin properties in individuals living in cities at two different altitudes: an investigation of the environmental effect on skin. *J Cosmet Dermatol.* marzo de 2017;16(1):26-34.
91. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Structural characteristics of the aging skin: a review. *Cutan Ocul Toxicol.* 2007;26(4):343-57.
92. Firooz A, Sadr B, Babakoochi S, Sarraf-Yazdy M, Fanian F, Kazerouni-Timsar A, et al. Variation of biophysical parameters of the skin with age, gender, and body region. *Sci World J.* 2012;2012:386936.
93. Dąbrowska M, Mielcarek A, Nowak I. Evaluation of sex-related changes in skin topography and structure using innovative skin testing equipment. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* noviembre de 2018;24(4):614-20.
94. Mercurio DG, Segura JH, Demets MBA, Maia Campos PMBG. Clinical scoring and instrumental analysis to evaluate skin types. *Clin Exp Dermatol.* abril de 2013;38(3):302-8; quiz 308-9.
95. Neerken S, Lucassen GW, Bisschop MA, Lenderink E, Nuijs TAM. Characterization of age-related effects in human skin: A comparative study that applies confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* abril de 2004;9(2):274-81.
96. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage.* septiembre de 2006;52(9):24-35; quiz 36-7.
97. Kakasheva-Mazhenkovska L, Milenkova L, Gjokik G, Janevska V. Variations of the histomorphological characteristics of human skin of different body regions in subjects of different age. *Prilozi.* 2011;32(2):119-28.
98. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Adv Wound Care.* febrero de 2013;2(1):5-10.
99. Wendling P-A, Dell'Acqua G. Skin biophysical properties of a population living in Valais, Switzerland. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* noviembre de 2003;9(4):331-8.
100. Ohta H, Makita K, Kawashima T, Kinoshita S, Takenouchi M, Nozawa S. Relationship between dermato-physiological changes and hormonal status in pre-, peri-, and postmenopausal women. *Maturitas.* 20 de septiembre de 1998;30(1):55-62.
101. Man MQ, Xin SJ, Song SP, Cho SY, Zhang XJ, Tu CX, et al. Variation of Skin Surface pH, Sebum Content and Stratum Corneum Hydration with Age and Gender in a Large Chinese Population. *Skin Pharmacol Physiol.* septiembre de 2009;22(4):190-9.
102. Colomb L, Flament F, Wagle A, Agrawal D. In vivo evaluation of some biophysical parameters of the facial skin of Indian women. Part I: variability with age and geographical locations. *Int J Cosmet Sci.* febrero de 2018;40(1):50-7.
103. Colomb L, Flament F, Wagle A, Idelcaid Y, Agrawal D. In vivo evaluation of some biophysical parameters of the facial skin of Indian subjects living in Mumbai. Part II: Variability with age and gender. *Int J Cosmet Sci.* abril de 2018;40(2):141-7.

104. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M. Skin physiology in men and women: in vivo evaluation of 300 people including TEWL, SC hydration, sebum content and skin surface pH. *Int J Cosmet Sci.* octubre de 2013;35(5):477-83.
105. Leyden JJ. Clinical features of ageing skin. *Br J Dermatol.* abril de 1990;122 Suppl 35:1-3.
106. Sugawara T, Nakagawa N, Shimizu N, Hirai N, Saijo Y, Sakai S. Gender- and age-related differences in facial sebaceous glands in Asian skin, as observed by non-invasive analysis using three-dimensional ultrasound microscopy. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* mayo de 2019;25(3):347-54.
107. McCallion R, Li Wan Po A. Dry and photo-aged skin: manifestations and management. *J Clin Pharm Ther.* febrero de 1993;18(1):15-32.
108. Choi JW, Kwon SH, Huh CH, Park KC, Youn SW. The influences of skin visco-elasticity, hydration level and aging on the formation of wrinkles: a comprehensive and objective approach. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* febrero de 2013;19(1):e349-355.
109. Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM. The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest.* mayo de 1995;95(5):2281-90.
110. Boireau-Adamezyk E, Baillet-Guffroy A, Stamatas GN. Age-dependent changes in stratum corneum barrier function. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* noviembre de 2014;20(4):409-15.
111. Kottner J, Lichterfeld A, Blume-Peytavi U. Transepidermal water loss in young and aged healthy humans: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dermatol Res.* mayo de 2013;305(4):315-23.
112. Akdeniz M, Gabriel S, Lichterfeld-Kottner A, Blume-Peytavi U, Kottner J. Transepidermal water loss in healthy adults: a systematic review and meta-analysis update. *Br J Dermatol.* 2018;179(5):1049-55.
113. Krueger N, Luebberding S, Oltmer M, Streker M, Kerscher M. Age-related changes in skin mechanical properties: a quantitative evaluation of 120 female subjects. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* mayo de 2011;17(2):141-8.
114. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M. Mechanical properties of human skin in vivo: a comparative evaluation in 300 men and women. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* mayo de 2014;20(2):127-35.
115. Takema Y, Yorimoto Y, Kawai M, Imokawa G. Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. *Br J Dermatol.* noviembre de 1994;131(5):641-8.
116. Kim SH, Lee SJ, Kim HJ, Lee JH, Jeong HS, Suh IS. Aging-related changes in the mid-face skin elasticity in East Asian women. *Arch Craniofacial Surg.* junio de 2019;20(3):158-63.
117. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol.* 1 de julio de 2012;4(3):308-19.
118. Cho C, Cho E, Kim N, Shin J, Woo S, Lee E, et al. Age-related biophysical changes of the epidermal and dermal skin in Korean women. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* julio de 2019;25(4):504-11.
119. Bonaventure J, Domingues MJ, Larue L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* mayo de 2013;26(3):316-25.
120. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob J-J, Halpern A, et al. Melanoma. *Nat Rev Dis Primer.* 23 de 2015;1:15003.
121. Tadokoro T, Yamaguchi Y, Batzer J, Coelho SG, Zmudzka BZ, Miller SA, et al. Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol.* junio de 2005;124(6):1326-32.

122. Sviderskaya EV, Hill SP, Balachandar D, Barsh GS, Bennett DC. Agouti signaling protein and other factors modulating differentiation and proliferation of immortal melanoblasts. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* agosto de 2001;221(4):373-9.
123. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 22 de febrero de 2007;445(7130):843-50.
124. Delevoye C. Melanin transfer: the keratinocytes are more than gluttons. *J Invest Dermatol.* abril de 2014;134(4):877-9.
125. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:239-71.
126. D’Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 15 de julio de 2016;17(7).
127. Videira IF dos S, Moura DFL, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol.* 2013;88(1):76-83.
128. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* mayo de 2009;66(9):1493-506.
129. Fistarol SK, Itin PH. Disorders of pigmentation. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG.* marzo de 2010;8(3):187-201; quiz 201-2.
130. Grimes PE. Management of hyperpigmentation in darker racial ethnic groups. *Semin Cutan Med Surg.* junio de 2009;28(2):77-85.
131. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci.* 15 de septiembre de 2009;10(9):4066-87.
132. Dessinioti C, Stratigos AJ, Rigopoulos D, Katsambas AD. A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. *Exp Dermatol.* septiembre de 2009;18(9):741-9.
133. Pillaiyar T, Manickam M, Jung S-H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cell Signal.* 2017;40:99-115.
134. Bourhim T, Villareal MO, Gadhi C, Hafidi A, Isoda H. Depigmenting effect of argan press-cake extract through the down-regulation of Mitf and melanogenic enzymes expression in B16 murine melanoma cells. *Cytotechnology.* octubre de 2018;70(5):1389-97.
135. Villareal M, Kume S, Bourhim T, Bakhtaoui F, Kashiwagi K, Han J, et al. Activation of MITF by Argan Oil Leads to the Inhibition of the Tyrosinase and Dopachrome Tautomerase Expressions in B16 Murine Melanoma Cells. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM.* 8 de julio de 2013;2013:340107.
136. Liu X, Du B, Zhang P, Zhang J, Zhu Z, Liu B, et al. miR-380-3p regulates melanogenesis by targeting SOX6 in melanocytes from alpacas (*Vicugna pacos*). *BMC Genomics.* 10 de diciembre de 2019;20(1):962.
137. Park S, Seok JK, Kwak JY, Choi Y-H, Hong SS, Suh H-J, et al. Anti-melanogenic effects of resveratryl triglycolate, a novel hybrid compound derived by esterification of resveratrol with glycolic acid. *Arch Dermatol Res.* julio de 2016;308(5):325-34.
138. Slominski A. L-tyrosine induces synthesis of melanogenesis related proteins. *Life Sci.* 1989;45(19):1799-803.
139. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *BioFactors Oxf Engl.* 2009;35(2):193-9.
140. Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A, Takema Y, Imokawa G. The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J Invest Dermatol.* abril de 2001;116(4):578-86.
141. Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 1 de diciembre de 2017;32:403-25.

142. Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol.* 6 de septiembre de 2002;88(1-2):1-12.
143. Jensen LE. Targeting the IL-1 family members in skin inflammation. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. noviembre de 2010;11(11):1211-20.
144. Borg M, Brincat S, Camilleri G, Schembri-Wismayer P, Brincat M, Calleja-Agius J. The role of cytokines in skin aging. *Climacteric J Int Menopause Soc.* octubre de 2013;16(5):514-21.
145. Hirao T, Aoki H, Yoshida T, Sato Y, Kamoda H. Elevation of interleukin 1 receptor antagonist in the stratum corneum of sun-exposed and ultraviolet B-irradiated human skin. *J Invest Dermatol.* mayo de 1996;106(5):1102-7.
146. Kim OY, Chae JS, Paik JK, Seo HS, Jang Y, Cavaillon J-M, et al. Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women. *Age.* abril de 2012;34(2):415-25.
147. Bou-Dargham MJ, Khamis ZI, Cognetta AB, Sang Q-XA. The Role of Interleukin-1 in Inflammatory and Malignant Human Skin Diseases and the Rationale for Targeting Interleukin-1 Alpha. *Med Res Rev.* 2017;37(1):180-216.
148. Paquet P, Piérard GE. Interleukin-6 and the skin. *Int Arch Allergy Immunol.* abril de 1996;109(4):308-17.
149. Georganas C, Liu H, Perlman H, Hoffmann A, Thimmapaya B, Pope RM. Regulation of IL-6 and IL-8 Expression in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts: the Dominant Role for NF- κ B But Not C/EBP β or c-Jun. *J Immunol.* 15 de diciembre de 2000;165(12):7199-206.
150. Park K, Lee J-H, Cho H-C, Cho S-Y, Cho J-W. Down-regulation of IL-6, IL-8, TNF- α and IL-1 β by glucosamine in HaCaT cells, but not in the presence of TNF- α . *Oncol Lett.* marzo de 2010;1(2):289-92.
151. Stamatas GN, Morello AP, Mays DA. Early inflammatory processes in the skin. *Curr Mol Med.* septiembre de 2013;13(8):1250-69.
152. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* abril de 2004;4(4):253-65.
153. Oshiro C, Marsh S, McLeod H, Carrillo M, Klein T, Altman R. Taxane Pathway. *Pharmacogenet Genomics.* diciembre de 2009;19(12):979-83.
154. Ishihara Y, Mendoza A, Baran PS. Total synthesis of taxane terpenes: cyclase phase. *Tetrahedron.* 8 de julio de 2013;69(27-28):5685-701.
155. Gligorov J, Lotz JP. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences. *The Oncologist.* 2004;9 Suppl 2:3-8.
156. McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* abril de 2008;1785(2):96-132.
157. Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents.* enero de 2005;5(1):65-71.
158. Huizing MT, Misser VH, Pieters RC, ten Bokkel Huinink WW, Veenhof CH, Vermorken JB, et al. Taxanes: a new class of antitumor agents. *Cancer Invest.* 1995;13(4):381-404.
159. Haldar S, Basu A, Croce CM. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res.* 15 de enero de 1997;57(2):229-33.
160. Haldar S, Jena N, Croce CM. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 de mayo de 1995;92(10):4507-11.
161. Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* marzo de 1999;17(3):1061-70.
162. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell.* 15 de septiembre de 2014;25(18):2677-81.

163. Mikula-Pietrasik J, Witucka A, Pakula M, Uruski P, Begier-Krasińska B, Niklas A, et al. Comprehensive review on how platinum- and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells. *Cell Mol Life Sci.* 1 de febrero de 2019;76(4):681-97.
164. Bhalla KN. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene.* diciembre de 2003;22(56):9075-86.
165. Sevko A, Kremer V, Falk C, Umansky L, Shurin MR, Shurin GV, et al. Application of paclitaxel in low non-cytotoxic doses supports vaccination with melanoma antigens in normal mice. *J Immunotoxicol.* septiembre de 2012;9(3):275-81.
166. Kampan DrN, Madondo M, McNally O, Quinn M, Plebanski M. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *BioMed Res Int.* 3 de julio de 2015;2015:1-21.
167. Giannakakou P, Sackett DL, Kang YK, Zhan Z, Buters JT, Fojo T, et al. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem.* 4 de julio de 1997;272(27):17118-25.
168. Rakovitch E, Mellado W, Hall E, Pandita T, Sawant S, Geard C. Paclitaxel sensitivity correlates with P53 status and DNA fragmentation, but not G2/M accumulation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 de agosto de 1999;44:1119-24.
169. Zhang CC, Yang J-M, White E, Murphy M, Levine A, Hait WN. The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells. *Oncogene.* marzo de 1998;16(12):1617-24.
170. Pfannenstiel L, Lam S, Emens L, Jaffee E, Armstrong T. Paclitaxel enhances early dendritic cell maturation and function through TLR4 signaling in mice. *Cell Immunol.* 1 de marzo de 2010;263:79-87.
171. Rajput S, Volk-Draper LD, Ran S. TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* agosto de 2013;12(8):1676-87.
172. Perera PY, Qureshi N, Vogel SN. Paclitaxel (Taxol)-induced NF-kappaB translocation in murine macrophages. *Infect Immun.* marzo de 1996;64(3):878-84.
173. Okano J, Rustgi AK. Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery. *J Biol Chem.* 1 de junio de 2001;276(22):19555-64.
174. Wang T-H, Chan Y-H, Chen C-W, Kung W-H, Lee Y-S, Wang S-T, et al. Paclitaxel (Taxol) upregulates expression of functional interleukin-6 in human ovarian cancer cells through multiple signaling pathways. *Oncogene.* 10 de agosto de 2006;25(35):4857-66.
175. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* marzo de 2006;5(3):219-34.
176. Klauber N, Parangi S, Flynn EA, Hamel E, D'Amato RJ. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res.* 1997;57(1):81-6.
177. Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, et al. The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1996;2(11):1843-9.
178. Ai B, Bie Z, Zhang S, Li A. Paclitaxel targets VEGF-mediated angiogenesis in ovarian cancer treatment. *Am J Cancer Res.* 1 de agosto de 2016;6(8):1624-35.
179. Cesca M, Bizzaro F, Zucchetti M, Giavazzi R. Tumor delivery of chemotherapy combined with inhibitors of angiogenesis and vascular targeting agents. *Front Oncol.* 1 de octubre de 2013;3:259.
180. Alexandre J, Hu Y, Lu W, Pelicano H, Huang P. Novel Action of Paclitaxel against Cancer Cells: Bystander Effect Mediated by Reactive Oxygen Species. *Cancer Res.* 1 de mayo de 2007;67:3512-7.
181. Hadzic T, Aykin-Burns N, Zhu Y, Coleman MC, Leick K, Jacobson GM, et al. Paclitaxel combined with inhibitors of glucose and hydroperoxide metabolism enhances breast cancer cell killing via H2O2-mediated oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 15 de abril de 2010;48(8):1024-33.

182. van Zuylen L, Verweij J, Sparreboom A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest New Drugs*. mayo de 2001;19(2):125-41.
183. Peiris-Pagès M, Sotgia F, Lisanti MP. Chemotherapy induces the cancer-associated fibroblast phenotype, activating paracrine Hedgehog-Gli signalling in breast cancer cells. *Oncotarget*. 10 de mayo de 2015;6(13):10728-45.
184. Peiris-Pagès M, Smith DL, Győrffy B, Sotgia F, Lisanti MP. Proteomic identification of prognostic tumour biomarkers, using chemotherapy-induced cancer-associated fibroblasts. *Aging*. octubre de 2015;7(10):816-38.
185. Zhang D, Zhang L, Yang R, Xu X, Chen J, Wang S, et al. Paclitaxel attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis by inhibiting STAT3 signaling. *Drug Des Devel Ther*. 1 de abril de 2015;9:2139.
186. Lewis DA, Travers JB, Machado C, Somani A-K, Spandau DF. Reversing the aging stromal phenotype prevents carcinoma initiation. *Aging*. abril de 2011;3(4):407-16.
187. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 de octubre de 2001;98(21):12072-7.
188. Hayashi S, Yamamoto A, You F, Yamashita K, Ikegame Y, Tawada M, et al. The stent-eluting drugs sirolimus and paclitaxel suppress healing of the endothelium by induction of autophagy. *Am J Pathol*. noviembre de 2009;175(5):2226-34.
189. Hung C-H, Chan S-H, Chu P-M, Tsai K-L. Docetaxel Facilitates Endothelial Dysfunction through Oxidative Stress via Modulation of Protein Kinase C Beta: The Protective Effects of Sotrastaurin. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. mayo de 2015;145(1):59-67.
190. Peiris-Pagès M, Sotgia F, Lisanti MP. Chemotherapy induces the cancer-associated fibroblast phenotype, activating paracrine Hedgehog-Gli signalling in breast cancer cells. *Oncotarget*. 10 de mayo de 2015;6(13):10728-45.
191. Hokeness K, Qiu LH, Vezeridis M, Yan BF, Mehta S, Wan YS. IFN-gamma enhances paclitaxel-induced apoptosis that is modulated by activation of caspases 8 and 3 with a concomitant down regulation of the AKT survival pathway in cultured human keratinocytes. *Oncol Rep*. mayo de 2005;13(5):965-9.
192. Lisse TS, Middleton LJ, Pellegrini AD, Martin PB, Spaulding EL, Lopes O, et al. Paclitaxel-induced epithelial damage and ectopic MMP-13 expression promotes neurotoxicity in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 de abril de 2016;113(15):E2189-2198.
193. Sumigray KD, Foote HP, Lechler T. Noncentrosomal microtubules and type II myosins potentiate epidermal cell adhesion and barrier formation. *J Cell Biol*. 29 de octubre de 2012;199(3):513-25.
194. Forsyth PA, Balmaceda C, Peterson K, Seidman AD, Brasher P, DeAngelis LM. Prospective study of paclitaxel-induced peripheral neuropathy with quantitative sensory testing. *J Neurooncol*. octubre de 1997;35(1):47-53.
195. Cella D, Peterman A, Hudgens S, Webster K, Socinski MA. Measuring the side effects of taxane therapy in oncology: the functional assesment of cancer therapy-taxane (FACT-taxane). *Cancer*. 15 de agosto de 2003;98(4):822-31.
196. Guastalla J, Diéras V. The taxanes: toxicity and quality of life considerations in advanced ovarian cancer. *Br J Cancer*. 1 de enero de 2004;89 Suppl 3:S16-22.
197. Marks D, Qureshi A, Friedman A. Evaluation of Prevention Interventions for Taxane-Induced Dermatologic Adverse Events: A Systematic Review. *JAMA Dermatol*. 31 de octubre de 2018;154.
198. Sibaud V, Lebœuf NR, Roche H, Belum VR, Gladieff L, Deslandres M, et al. Dermatological adverse events with taxane chemotherapy. *Eur J Dermatol EJD*. 1 de octubre de 2016;26(5):427-43.
199. Su M-H, Chen G-Y, Lin J-H, Lee H, Chung K-C, Wang P-H. Paclitaxel-related dermatological problems: Not only alopecia occurs. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 1 de noviembre de 2019;58:877-9.

200. Winther D, Saunte DM, Knap M, Haahr V, Jensen AB. Nail changes due to docetaxel--a neglected side effect and nuisance for the patient. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer*. octubre de 2007;15(10):1191-7.
201. Robert C, Sibaud V, Mateus C, Verschoore M, Charles C, Lanoy E, et al. Nail toxicities induced by systemic anticancer treatments. *Lancet Oncol*. abril de 2015;16(4):e181-189.
202. Capriotti K, Capriotti JA, Lessin S, Wu S, Goldfarb S, Belum VR, et al. The risk of nail changes with taxane chemotherapy: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Br J Dermatol*. septiembre de 2015;173(3):842-5.
203. Mcgarvey E, phd L, Pinkerton R, bs L. Psychological Sequelae and Alopecia Among Women with Cancer. *Cancer Pract*. 1 de noviembre de 2001;9:283-9.
204. Münstedt K, Manthey N, Sachsse S, Vahrson H. Changes in self-concept and body image during alopecia induced cancer chemotherapy. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer*. marzo de 1997;5(2):139-43.
205. Caiado J, Picard M. Diagnostic tools for hypersensitivity to platinum drugs and taxanes: skin testing, specific IgE, and mast cell/basophil mediators. *Curr Allergy Asthma Rep*. agosto de 2014;14(8):451.
206. Lee C, Gianos M, Klaustermeyer WB. Diagnosis and management of hypersensitivity reactions related to common cancer chemotherapy agents. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. marzo de 2009;102(3):179-87; quiz 187-9, 222.
207. Piovano E, Pivetta E, Modaffari P, Martra F, Baima Poma C, Perotto S, et al. A search for predictive factors for hypersensitivity reactions to paclitaxel and platinum salts in chemotherapy for gynecologic pelvic neoplasms. *Gynecol Obstet Invest*. 2012;74(1):21-7.
208. Boulanger J, Boursiquot JN, Cournoyer G, Lemieux J, Masse MS, Almanric K, et al. Management of hypersensitivity to platinum- and taxane-based chemotherapy: cepo review and clinical recommendations. *Curr Oncol Tor Ont*. agosto de 2014;21(4):e630-641.
209. Castells M, Sancho-Serra M del C, Simarro M. Hypersensitivity to antineoplastic agents: mechanisms and treatment with rapid desensitization. *Cancer Immunol Immunother ClI*. septiembre de 2012;61(9):1575-84.
210. Sánchez-Muñoz A, Jiménez B, García-Tapiador A, Romero-García G, Medina L, Navarro V, et al. Cross-sensitivity between taxanes in patients with breast cancer. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. diciembre de 2011;13(12):904-6.
211. Raisch DW, Campbell W, Garg V, Qureshi ZP, Bookstaver PB, Norris LB, et al. Description of anaphylactic reactions to paclitaxel and docetaxel reported to the FDA, with a focus on the role of premedication. *Expert Opin Drug Saf*. julio de 2011;10(4):521-8.
212. Barbee MS, Owonikoko TK, Harvey RD. Taxanes: vesicants, irritants, or just irritating? *Ther Adv Med Oncol*. enero de 2014;6(1):16-20.
213. Link CJ, Sarosy GA, Kohn EC, Christian MC, Davis P, Adamo DO, et al. Cutaneous manifestations of Taxol therapy. *Invest New Drugs*. 1995;13(3):261-3.
214. Stanford BL, Hardwicke F. A review of clinical experience with paclitaxel extravasations. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer*. mayo de 2003;11(5):270-7.
215. Gallo E, Llamas-Velasco M, Navarro R, Fraga J, García-Diez A. Eccrine squamous syringometaplasia secondary to cutaneous extravasation of docetaxel: report of three cases. *J Cutan Pathol*. marzo de 2013;40(3):326-9.
216. Heidary N, Naik H, Burgin S. Chemotherapeutic agents and the skin: An update. *J Am Acad Dermatol*. abril de 2008;58(4):545-70.
217. Pérez Fidalgo JA, García Fabregat L, Cervantes A, Margulies A, Vidall C, Roila F, et al. Management of chemotherapy extravasation: ESMO-EONS Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. octubre de 2012;23 Suppl 7:vii167-173.
218. Gonzalez T. Chemotherapy extravasations: prevention, identification, management, and documentation. *Clin J Oncol Nurs*. febrero de 2013;17(1):61-6.

219. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med*. 13 de abril de 1995;332(15):1004-14.
220. Cortes JE, Pazdur R. Docetaxel. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. octubre de 1995;13(10):2643-55.
221. Poikonen P, Sjöström J, Klaar S, Nittby LT, Sigurdsson H, Madsen EL, et al. Skin toxicity as a risk factor for major infections in breast cancer patients treated with docetaxel. *Acta Oncol Stockh Swed*. 2004;43(2):190-5.
222. Bologna JL, Cooper DL, Glusac EJ. Toxic erythema of chemotherapy: a useful clinical term. *J Am Acad Dermatol*. septiembre de 2008;59(3):524-9.
223. Spicknall KE, Mutasim DF. Localized toxic erythema of chemotherapy during treatment with paclitaxel. *Int J Dermatol*. enero de 2014;53(1):e3-5.
224. Childress J, Lokich J. Cutaneous hand and foot toxicity associated with cancer chemotherapy. *Am J Clin Oncol*. octubre de 2003;26(5):435-6.
225. Chang C, Gershwin ME. Drug-induced lupus erythematosus: incidence, management and prevention. *Drug Saf*. 1 de mayo de 2011;34(5):357-74.
226. Adachi A, Horikawa T. Paclitaxel-induced cutaneous lupus erythematosus in patients with serum anti-SSA/Ro antibody. *J Dermatol*. julio de 2007;34(7):473-6.
227. Lowe GC, Lowe G, Henderson CL, Grau RH, Hansen CB, Sontheimer RD. A systematic review of drug-induced subacute cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol*. marzo de 2011;164(3):465-72.
228. Wong NY, Parsons LM, Trotter MJ, Tsang RY. Drug-induced subacute cutaneous lupus erythematosus associated with docetaxel chemotherapy: a case report. *BMC Res Notes*. 5 de noviembre de 2014;7:785.
229. Marchetti MA, Noland MM, Dillon PM, Greer KE. Taxane associated subacute cutaneous lupus erythematosus. *Dermatol Online J*. 15 de agosto de 2013;19(8):19259.
230. Chen M, Crowson AN, Woofter M, Luca MB, Magro CM. Docetaxel (taxotere) induced subacute cutaneous lupus erythematosus: report of 4 cases. *J Rheumatol*. abril de 2004;31(4):818-20.
231. Lamond NWD, Younis T, Purdy K, Dorreen MS. Drug-induced subacute cutaneous lupus erythematosus associated with nab-paclitaxel therapy. *Curr Oncol Tor Ont*. octubre de 2013;20(5):e484-487.
232. Cohen AD, Mermershtain W, Geffen DB, Schoenfeld N, Mamet R, Cagnano E, et al. Cutaneous photosensitivity induced by paclitaxel and trastuzumab therapy associated with aberrations in the biosynthesis of porphyrins. *J Dermatol Treat*. febrero de 2005;16(1):19-21.
233. Cohen PR. Photodistributed erythema multiforme: paclitaxel-related, photosensitive conditions in patients with cancer. *J Drugs Dermatol JDD*. enero de 2009;8(1):61-4.
234. Tokunaga M, Iga N, Endo Y, Fujisawa A, Tanioka M, Kabashima K, et al. Elevated protoporphyrin in patients with skin cancer receiving taxane chemotherapy. *Eur J Dermatol EJD*. diciembre de 2013;23(6):826-9.
235. Weinberg JM, Egan CL, Tangoren IA, Li LJ, Laughinghouse KA, Guzzo CA. Generalized pustular dermatosis following paclitaxel therapy. *Int J Dermatol*. julio de 1997;36(7):559-60.
236. Kim SW, Lee UH, Jang SJ, Park HS, Kang YS. Acute localized exanthematous pustulosis induced by docetaxel. *J Am Acad Dermatol*. agosto de 2010;63(2):e44-46.
237. Ji Y-Z, Geng L, Qu H-M, Zhou H-B, Xiao T, Chen H-D, et al. Acute generalized exanthematous pustulosis induced by docetaxel. *Int J Dermatol*. junio de 2011;50(6):763-5.
238. Belda-Iniesta C, Casado E, Corral de la Calle M, Castelo B, Barón MG. Re: Folliculitis associated with weekly paclitaxel treatment. *J Natl Cancer Inst*. 5 de marzo de 2003;95(5):410.
239. Burris HA, Hurtig J. Radiation recall with anticancer agents. *The Oncologist*. 2010;15(11):1227-37.
240. Susser WS, Whitaker-Worth DL, Grant-Kels JM. Mucocutaneous reactions to chemotherapy. *J Am Acad Dermatol*. marzo de 1999;40(3):367-98; quiz 399-400.

241. Alley E, Green R, Schuchter L. Cutaneous toxicities of cancer therapy. *Curr Opin Oncol*. marzo de 2002;14(2):212-6.
242. Borgia F, Guarneri C, Guarneri F, Vaccaro M. Radiation recall dermatitis after docetaxel administration: absolute indication to replace the drug? *Br J Dermatol*. septiembre de 2005;153(3):674-5.
243. Morkas M, Fleming D, Hahl M. Challenges in oncology. Case 2. Radiation recall associated with docetaxel. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de febrero de 2002;20(3):867-9.
244. Wyatt AJ, Leonard GD, Sachs DL. Cutaneous reactions to chemotherapy and their management. *Am J Clin Dermatol*. 2006;7(1):45-63.
245. Ee H-L, Yosipovitch G. Photo recall phenomenon: an adverse reaction to taxanes. *Dermatol Basel Switz*. 2003;207(2):196-8.
246. Droitcourt C, Le Hô H, Adamski H, Le Gall F, Dupuy A. Docetaxel-induced photo-recall phenomenon. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. agosto de 2012;28(4):222-3.
247. Koppel RA, Boh EE. Cutaneous reactions to chemotherapeutic agents. *Am J Med Sci*. mayo de 2001;321(5):327-35.
248. Ley BD, Millán GG, Perez JS, Fraga J, Díez AG. Docetaxel recall phenomenon at the site of previous drug extravasation. *Arch Dermatol*. octubre de 2010;146(10):1190-1.
249. Kazandjieva J, Gergovska M, Darlenski R, Márina S, Broshtilova V, Balabanova M, et al. Recall dermatitis after systemic treatment with paclitaxel. *Int J Dermatol*. agosto de 2010;49(8):956-9.
250. Sanborn RE, Sauer DA. Cutaneous reactions to chemotherapy: commonly seen, less described, little understood. *Dermatol Clin*. enero de 2008;26(1):103-19, ix.
251. Corazza M, Minghetti S, Borghi A, Virgili A, Ballardini P. Hand-foot syndrome caused by docetaxel with no recurrence after switch to paclitaxel, a different taxane. *Int J Dermatol*. marzo de 2014;53(3):e180-182.
252. Stravodimou A, Voutsadakis IA. Hand and foot syndrome associated with docetaxel treatment. *Acta Oncol Stockh Swed*. abril de 2012;51(4):554-6.
253. de Argila D, Dominguez JD, Iglesias L. Taxol-induced acral erythema. *Dermatol Basel Switz*. 1996;192(4):377-8.
254. Miller KK, Gorcey L, McLellan BN. Chemotherapy-induced hand-foot syndrome and nail changes: a review of clinical presentation, etiology, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol*. octubre de 2014;71(4):787-94.
255. Nagore E, Insa A, Sanmartín O. Antineoplastic therapy-induced palmar plantar erythrodysesthesia ('hand-foot') syndrome. Incidence, recognition and management. *Am J Clin Dermatol*. agosto de 2000;1(4):225-34.
256. Poi MJ, Berger M, Lustberg M, Layman R, Shapiro CL, Ramaswamy B, et al. Docetaxel-induced skin toxicities in breast cancer patients subsequent to paclitaxel shortage: a case series and literature review. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer*. octubre de 2013;21(10):2679-86.
257. Kewan T, Alomari M, Khazaaleh S, Covut F, Olayan M. Hand-foot Syndrome Secondary to Low-dose Docetaxel in a Breast Cancer Patient. *Cureus*. 6 de abril de 2019;11(4):e4400.
258. Harris CS, Wang D, Carulli A. Docetaxel-associated palmar-plantar erythrodysesthesia: a case report and review of the literature. *J Oncol Pharm Pract Off Publ Int Soc Oncol Pharm Pract*. febrero de 2014;20(1):73-80.
259. Sibaud V, Dalenc F, Chevreau C, Roché H, Delord J-P, Mourey L, et al. HFS-14, a specific quality of life scale developed for patients suffering from hand-foot syndrome. *The Oncologist*. 2011;16(10):1469-78.
260. Payne AS, James WD, Weiss RB. Dermatologic toxicity of chemotherapeutic agents. *Semin Oncol*. febrero de 2006;33(1):86-97.
261. Chew L, Chuen VSL. Cutaneous reaction associated with weekly docetaxel administration. *J Oncol Pharm Pract Off Publ Int Soc Oncol Pharm Pract*. marzo de 2009;15(1):29-34.

262. Chu CY, Yang CH, Yang CY, Hsiao GH, Chiu HC. Fixed erythrodysesthesia plaque due to intravenous injection of docetaxel. *Br J Dermatol.* abril de 2000;142(4):808-11.
263. Aydogan I, Kavak A, Parlak AH, Alper M, Annakkaya AN, Erbas M. Persistent serpentine supragenous hyperpigmented eruption associated with docetaxel. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* mayo de 2005;19(3):345-7.
264. Schrijvers D, Van Den Brande J, Vermorken JB. Supragenous discoloration of the skin due to docetaxel treatment. *Br J Dermatol.* mayo de 2000;142(5):1069-70.
265. Masson Regnault M, Gadaud N, Boulinguez S, Tournier E, Lamant L, Gladieff L, et al. Chemotherapy-Related Reticulate Hyperpigmentation: A Case Series and Review of the Literature. *Dermatol Basel Switz.* 2015;231(4):312-8.
266. Cohen PR. Paclitaxel-associated reticulate hyperpigmentation: Report and review of chemotherapy-induced reticulate hyperpigmentation. *World J Clin Cases.* 16 de diciembre de 2016;4(12):390-400.
267. Farrant PBJ, Mortimer PS, Gore M. Scleroderma and the taxanes. Is there really a link? *Clin Exp Dermatol.* julio de 2004;29(4):360-2.
268. Verhulst L, Noë E, Morren M-A, Verslype C, Van Cutsem E, Van den Oord JJ, et al. Scleroderma-like cutaneous lesions during treatment with paclitaxel and gemcitabine in a patient with pancreatic adenocarcinoma. Review of literature. *Int J Dermatol.* septiembre de 2018;57(9):1075-9.
269. Itoh M, Yanaba K, Kobayashi T, Nakagawa H. Taxane-induced scleroderma. *Br J Dermatol.* febrero de 2007;156(2):363-7.
270. Kupfer I, Balguerie X, Courville P, Chinet P, Joly P. Scleroderma-like cutaneous lesions induced by paclitaxel: a case study. *J Am Acad Dermatol.* febrero de 2003;48(2):279-81.
271. Läuchli S, Trüeb RM, Fehr M, Hafner J. Scleroderma-like drug reaction to paclitaxel (Taxol). *Br J Dermatol.* septiembre de 2002;147(3):619-21.
272. Pedersen JV, Jensen S, Krarup-Hansen A, Riis L. Scleroderma induced by paclitaxel. *Acta Oncol Stockh Swed.* agosto de 2010;49(6):866-8.
273. Yang S-T, Cheng M, Lee N-R, Chang W-H, Lee Y-L, Wang P-H. Paclitaxel-related nail toxicity. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 1 de septiembre de 2019;58(5):709-11.
274. Minisini AM, Tosti A, Sobrero AF, Mansutti M, Piraccini BM, Sacco C, et al. Taxane-induced nail changes: incidence, clinical presentation and outcome. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* febrero de 2003;14(2):333-7.
275. Hussain S, Anderson DN, Salvatti ME, Adamson B, McManus M, Braverman AS. Onycholysis as a complication of systemic chemotherapy: report of five cases associated with prolonged weekly paclitaxel therapy and review of the literature. *Cancer.* 15 de mayo de 2000;88(10):2367-71.
276. Gilbar P, Hain A, Peereboom V-M. Nail toxicity induced by cancer chemotherapy. *J Oncol Pharm Pract Off Publ Int Soc Oncol Pharm Pract.* septiembre de 2009;15(3):143-55.
277. Mackay-Wiggan J, Nair KG, Halasz CLG. Onycholysis associated with paclitaxel. *Cutis.* marzo de 2003;71(3):229-32.
278. Ghetti E, Piraccini BM, Tosti A. Onycholysis and subungual haemorrhages secondary to systemic chemotherapy (paclitaxel). *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* julio de 2003;17(4):459-60.
279. Almagro M, Pozo JD, Garcia J, Vasquez A, Fonseca E. Nail alterations secondary to paclitaxel [corrected] therapy. *Eur J Dermatol EJD.* marzo de 2000;10(2):146-7.
280. Trüeb RM. Chemotherapy-induced hair loss. *Skin Ther Lett.* agosto de 2010;15(7):5-7.
281. Tallon B, Blanchard E, Goldberg LJ. Permanent chemotherapy-induced alopecia: case report and review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* agosto de 2010;63(2):333-6.
282. Paus R, Haslam IS, Sharov AA, Botchkarev VA. Pathobiology of chemotherapy-induced hair loss. *Lancet Oncol.* febrero de 2013;14(2):e50-59.
283. Palamaras I, Misciali C, Vincenzi C, Robles WS, Tosti A. Permanent chemotherapy-induced alopecia: a review. *J Am Acad Dermatol.* marzo de 2011;64(3):604-6.

284. Miteva M, Misciali C, Fanti PA, Vincenzi C, Romanelli P, Tosti A. Permanent alopecia after systemic chemotherapy: a clinicopathological study of 10 cases. *Am J Dermatopathol.* junio de 2011;33(4):345-50.
285. Prevezas C, Matard B, Pinquier L, Reygagne P. Irreversible and severe alopecia following docetaxel or paclitaxel cytotoxic therapy for breast cancer. *Br J Dermatol.* abril de 2009;160(4):883-5.
286. Tosti A, Palamaras I, Miteva M, Misciali C. Docetaxel and permanent alopecia. *J Am Acad Dermatol.* mayo de 2013;68(5):e151.
287. Martín M, de la Torre-Montero JC, López-Tarruella S, Pinilla K, Casado A, Fernandez S, et al. Persistent major alopecia following adjuvant docetaxel for breast cancer: incidence, characteristics, and prevention with scalp cooling. *Breast Cancer Res Treat.* octubre de 2018;171(3):627-34.
288. Crown J, Sills E, Ballot J, McDonnell D, Walshe J, Fennelly D, et al. Incidence of permanent alopecia following adjuvant chemotherapy in women with early stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 20 de mayo de 2017;35:e21576-e21576.
289. Mols F, van den Hurk CJ, Vingerhoets AJJM, Breed WPM. Scalp cooling to prevent chemotherapy-induced hair loss: practical and clinical considerations. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer.* febrero de 2009;17(2):181-9.
290. van den Hurk CJ, Peerbooms M, van de Poll-Franse LV, Nortier JW, Coebergh JWW, Breed WP. Scalp cooling for hair preservation and associated characteristics in 1411 chemotherapy patients - results of the Dutch Scalp Cooling Registry. *Acta Oncol Stockh Swed.* abril de 2012;51(4):497-504.
291. Betticher DC, Delmore G, Breitenstein U, Anchisi S, Zimmerli-Schwab B, Müller A, et al. Efficacy and tolerability of two scalp cooling systems for the prevention of alopecia associated with docetaxel treatment. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer.* septiembre de 2013;21(9):2565-73.
292. Komen MMC, Smorenburg CH, van den Hurk CJG, Nortier JWR. Factors influencing the effectiveness of scalp cooling in the prevention of chemotherapy-induced alopecia. *The Oncologist.* 2013;18(7):885-91.
293. Yeager CE, Olsen EA. Treatment of chemotherapy-induced alopecia. *Dermatol Ther.* agosto de 2011;24(4):432-42.
294. Kluger N, Jacot W, Frouin E, Rigau V, Poujol S, Dereure O, et al. Permanent scalp alopecia related to breast cancer chemotherapy by sequential fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide (FEC) and docetaxel: a prospective study of 20 patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* noviembre de 2012;23(11):2879-84.
295. Masidonski P, Mahon SM. Permanent alopecia in women being treated for breast cancer. *Clin J Oncol Nurs.* febrero de 2009;13(1):13-4.
296. Ali FR, Yiu ZZN, Fitzgerald D. Inflammation of actinic keratoses during paclitaxel chemotherapy. *BMJ Case Rep.* 8 de junio de 2015;2015.
297. Courage + Khazaka - CK Electronic. Información y manual de instrucciones. Sistema multisonda MPA. Cologne, Germany; 2010.
298. Wilkes M, Wright CY, du Plessis JL, Reeder A. Fitzpatrick Skin Type, Individual Typology Angle, and Melanin Index in an African Population. *JAMA Dermatol.* 151(8):902.
299. Dobrev H. Application of Cutometer area parameters for the study of human skin fatigue. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* mayo de 2005;11(2):120-2.
300. Ohshima H, Kinoshita S, Oyobikawa M, Futagawa M, Takiwaki H, Ishiko A, et al. Use of Cutometer area parameters in evaluating age-related changes in the skin elasticity of the cheek. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI.* febrero de 2013;19(1):e238-242.

301. Woo MS, Moon KJ, Jung HY, Park SR, Moon TK, Kim NS, et al. Comparison of skin elasticity test results from the Ballistometer(®) and Cutometer(®). *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. noviembre de 2014;20(4):422-8.
302. Dobrev H. Novel Ideas: The Increased Skin Viscoelasticity - A Possible New Fifth Sign for the Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis. *Curr Rheumatol Rev*. 1 de enero de 2013;9:261-7.
303. Visscher MO, Burkes SA, Adams DM, Hammill AM, Wickett RR. Infant skin maturation: Preliminary outcomes for color and biomechanical properties. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. noviembre de 2017;23(4):545-51.
304. Gerhardt L-C, Lenz A, Spencer ND, Münzer T, Derler S. Skin-textile friction and skin elasticity in young and aged persons. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. agosto de 2009;15(3):288-98.
305. Courage + Khazaka - CK Electronic. Información e instrucciones del manejo del Visioscan® VC 98 USB y su software. Cologne, Germany; 2013.
306. Courage + Khazaka - CK Electronic. Manual de usuario Ultrascan UC22 cosmetic. Cologne, Germany; 2013.
307. Agencia Española del Medicamento y del Producto Sanitario. Paclitaxel. Ficha Técnica del Medicamento. [Internet]. 2018 [citado 7 de noviembre de 2019]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/66997/66997_ft.pdf
308. Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J Biotechnol*. 10 de abril de 2006;122(3):372-81.
309. Lu B, Miao Y, Vigneron P, Chagnault V, Grand E, Wadouachi A, et al. Measurement of cytotoxicity and irritancy potential of sugar-based surfactants on skin-related 3D models. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. abril de 2017;40:305-12.
310. Mak VH, Cumpstone MB, Kennedy AH, Harmon CS, Guy RH, Potts RO. Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol*. marzo de 1991;96(3):323-7.
311. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. noviembre de 1979;76(11):5665-8.
312. Pruniéras M, Régnier M, Woodley D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol*. julio de 1983;81(1 Suppl):28s-33s.
313. Aubry JP, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, Jeannin P, Herbault N, Caron G, et al. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry*. 1 de noviembre de 1999;37(3):197-204.
314. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2009;559:19-32.
315. Kim K, Park H, Lim K-M. Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. *Toxicol Res*. junio de 2015;31(2):97-104.
316. OECD. Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test [Internet]. OECD; 2019 [citado 18 de noviembre de 2019]. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). Disponible en: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-432-in-vitro-3t3-nru-phototoxicity-test_9789264071162-en
317. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M. Age-related changes in skin barrier function - quantitative evaluation of 150 female subjects. *Int J Cosmet Sci*. abril de 2013;35(2):183-90.
318. Constantin M-M, Poenaru E, Poenaru C, Constantin T. Skin Hydration Assessment through Modern Non-Invasive Bioengineering Technologies. *Maedica*. marzo de 2014;9(1):33-8.
319. Milani M, Sparavigna A. The 24-hour skin hydration and barrier function effects of a hyaluronic 1%, glycerin 5%, and Centella asiatica stem cells extract moisturizing fluid: an intra-subject, randomized, assessor-blinded study. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017;10:311-5.

320. Youn SW, Na JI, Choi SY, Huh CH, Park KC. Regional and seasonal variations in facial sebum secretions: a proposal for the definition of combination skin type. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. agosto de 2005;11(3):189-95.
321. Firooz A, Aghazadeh N, Rajabi Estarabadi A, Hejazi P. The effects of water exposure on biophysical properties of normal skin. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. mayo de 2015;21(2):131-6.
322. Nedelec B, Forget NJ, Hurtubise T, Cimino S, de Muszka F, Legault A, et al. Skin characteristics: normative data for elasticity, erythema, melanin, and thickness at 16 different anatomical locations. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. agosto de 2016;22(3):263-75.
323. Wright CY, Wilkes M, du Plessis JL, Reeder AI, Albers PN. In multiple situational light settings, visual observation for skin colour assessment is comparable with colorimeter measurement. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. agosto de 2016;22(3):305-10.
324. Castanedo-Cazares JP, Hernández-Blanco D, García-Cortés JD, Medina-Aguilar L, Torres-Álvarez B. Analysis of cutaneous pigmentation in a sample. *Gac Med Mex*. 2018;154(1):68-73.
325. Mahmood T, Akhtar N. Combined topical application of lotus and green tea improves facial skin surface parameters. *Rejuvenation Res*. abril de 2013;16(2):91-7.
326. Rasul A, Akhtar N. Formulation and in vivo evaluation for anti-aging effects of an emulsion containing basil extract using non- invasive biophysical techniques. *Daru J Fac Pharm Tehran Univ Med Sci*. 2011;19(5):344-50.
327. Kim JH, Kim BY, Choi JW, Kim SO, Lee HS, Park KC, et al. The objective evaluation of the severity of psoriatic scales with desquamation collecting tapes and image analysis. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. mayo de 2012;18(2):143-50.
328. Coltman CE, Steele JR, McGhee DE. Effect of aging on breast skin thickness and elasticity: implications for breast support. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. agosto de 2017;23(3):303-11.
329. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. *ISRN Dermatol*. 12 de septiembre de 2013;2013:930164.
330. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 5 de enero de 2015;5(1):a015370.
331. Ryu HS, Joo YH, Kim SO, Park KC, Youn SW. Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. agosto de 2008;14(3):354-8.
332. Park ES, Na JI, Kim SO, Huh CH, Youn SW, Park KC. Application of a pigment measuring device-- Mexameter--for the differential diagnosis of vitiligo and nevus depigmentosus. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. noviembre de 2006;12(4):298-302.
333. Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*. 10 de enero de 2014;20(2):372-82.
334. Wang Q, Zou M-H. Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) and Mitochondrial ROS in AMPK Knockout Mice Blood Vessels. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1732:507-17.
335. Perkins MA, Osterhues MA, Farage MA, Robinson MK. A noninvasive method to assess skin irritation and compromised skin conditions using simple tape adsorption of molecular markers of inflammation. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. noviembre de 2001;7(4):227-37.
336. McGeough MD, Pena CA, Mueller JL, Pociask DA, Broderick L, Hoffman HM, et al. Cutting edge: IL-6 is a marker of inflammation with no direct role in inflammasome-mediated mouse models. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de septiembre de 2012;189(6):2707-11.

337. Quist SR, Wiswedel I, Quist J, Gollnick HP. Kinetic Profile of Inflammation Markers in Human Skin In vivo Following Exposure to Ultraviolet B Indicates Synchronic Release of Cytokines and Prostanoids. *Acta Derm Venereol.* 2 de noviembre de 2016;96(7):910-6.
338. Bruch-Gerharz D, Fehsel K, Suschek C, Michel G, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J Exp Med.* 1 de noviembre de 1996;184(5):2007-12.
339. Dumas JM, Sadick N, Noblesse E, Juan M, Lachmann-Weber N, Boury-Jamot M, et al. Hydrating skin by stimulating biosynthesis of aquaporins. *J Drugs Dermatol JDD.* 1 de julio de 2007;6:s20-4.
340. Watanabe K, Shibuya S, Ozawa Y, Nojiri H, Izuo N, Yokote K, et al. Superoxide dismutase 1 loss disturbs intracellular redox signaling, resulting in global age-related pathological changes. *BioMed Res Int.* 2014;2014:140165.
341. Gęgotek A, Skrzydlewska E. The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Arch Dermatol Res.* 24 de febrero de 2015;307.
342. Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol.* diciembre de 2006;126(12):2565-75.
343. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol.* octubre de 2007;19(5):488-96.
344. Gritsenko DA, Orlova OA, Linkova NS, Khavinson VKh. Transcription factor p53 and skin aging. *Adv Gerontol.* 1 de abril de 2017;7(2):114-9.
345. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med.* febrero de 2010;9(45):145-52.
346. Pontén F, Berne B, Ren ZP, Nistér M, Pontén J. Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. *J Invest Dermatol.* septiembre de 1995;105(3):402-6.
347. Chen A, Huang X, Xue Z, Cao D, Huang K, Chen J, et al. The Role of p21 in Apoptosis, Proliferation, Cell Cycle Arrest, and Antioxidant Activity in UVB-Irradiated Human HaCaT Keratinocytes. *Med Sci Monit Basic Res.* 30 de abril de 2015;21:86-95.
348. Cai J, Jiang WG, Ahmed A, Boulton M. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation is regulated by interaction between VEGFR-2, SH-PTP1 and eNOS. *Microvasc Res.* enero de 2006;71(1):20-31.
349. Vyas D, Laput G, Vyas AK. Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. *OncoTargets Ther.* 2014;7:1015-23.
350. Zhang D, Yang R, Wang S, Dong Z. Paclitaxel: new uses for an old drug. *Drug Des Devel Ther.* 2014;8:279-84.
351. Lingappan K. NF- κ B in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol.* febrero de 2018;7:81-6.
352. Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* enero de 2011;21(1):103-15.
353. Sriram S, Subramanian S, Sathiakumar D, Venkatesh R, Salerno MS, McFarlane CD, et al. Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- κ B. *Aging Cell.* diciembre de 2011;10(6):931-48.
354. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M. Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 11 de junio de 2010;396(4):901-7.
355. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:4350965.
356. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2.
357. Basile JR, Eichten A, Zacny V, Mürnger K. NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. *Mol Cancer Res MCR.* febrero de 2003;1(4):262-70.

358. Lowe JM, Menendez D, Bushel PR, Shatz M, Kirk EL, Troester MA, et al. p53 and NF- κ B coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Cancer Res.* 15 de abril de 2014;74(8):2182-92.
359. Kim S-J, Hwang S-G, Shin DY, Kang S-S, Chun J-S. p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NFkappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation. *J Biol Chem.* 6 de septiembre de 2002;277(36):33501-8.
360. Li H-L, Chen D-D, Li X-H, Zhang H-W, Lu Y-Q, Ye C-L, et al. Changes of NF- κ B, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol.* junio de 2002;8(3):431-5.
361. Ren X, Zhao B, Chang H, Xiao M, Wu Y, Liu Y. Paclitaxel suppresses proliferation and induces apoptosis through regulation of ROS and the AKT/MAPK signaling pathway in canine mammary gland tumor cells. *Mol Med Rep.* junio de 2018;17(6):8289-99.
362. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de septiembre de 2012;4(9):a011189.
363. Yokoyama K, Kimoto K, Itoh Y, Nakatsuka K, Matsuo N, Yoshioka H, et al. The PI3K/Akt pathway mediates the expression of type I collagen induced by TGF- β 2 in human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* enero de 2012;250(1):15-23.
364. Runyan CE, Schnaper HW, Poncelet A-C. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway enhances Smad3-stimulated mesangial cell collagen I expression in response to transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem.* 23 de enero de 2004;279(4):2632-9.
365. Kuang P-P, Zhang X-H, Rich CB, Foster JA, Subramanian M, Goldstein RH. Activation of elastin transcription by transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* abril de 2007;292(4):L944-952.
366. Liao Y-X, Zhang Z-P, Zhao J, Liu J-P. Effects of Fibronectin 1 on Cell Proliferation, Senescence and Apoptosis of Human Glioma Cells Through the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2018;48(3):1382-96.
367. Li A, Lu D, Zhang Y, Li J, Fang Y, Li F, et al. Critical role of aquaporin-3 in epidermal growth factor-induced migration of colorectal carcinoma cells and its clinical significance. *Oncol Rep.* febrero de 2013;29(2):535-40.

8. ABREVIATURAS

α -SMA	Actina del músculo liso alfa
3D	3 dimensiones
ACTB	β -actina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA	Análisis de la varianza
AQP3	Acuaporina 3
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AUC	Área bajo la curva
Bcl2	Familia de proteínas derivadas del inglés <i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Albumina de suero bovino
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
COL1	Colágeno tipo I
CPZ	Clorpromazina
CytC	Citocromo C
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DCT	Dopacromo tautomerasa = TYRP2
DHE	Dihidroetidio
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
ELN	Elastina
eNOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAC	Fibroblastos asociados al cáncer
FBS	Suero fetal bovino
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FITC	del inglés <i>Fluorescein IsoTioCyanate</i>
FN1	Fibronectina
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
IL-	Interleucina
ITA	del inglés <i>Individual Typology Angle</i>
IV	Intravenoso
LSS	Laurilsulfato de sodio
MAPK	Proteína quina activada por mitógeno
MITF	Factor de transcripción asociado con microftalmia
MMP	Metaloproteinasas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- κ B	Factor nuclear κ B

NOX	NADPH oxidasa
NRU	Absorción de rojo neutro
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	Tampón fosfato salino con Tween
PI	Yoduro de propidio
PIF	Factor de fotoirritación
PTX	Paclitaxel
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SD	Desviación Estándar
SEM	Error estándar de la media
Ser	Valor relacionado con la rugosidad de la piel
Sesm	Valor relacionado con la suavidad de la piel
SOD1	Cu/Zn-Superóxido dismutasa 1
TEWL	Pérdida de agua transepidérmica
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TYR	Tirosinasa
TYRP1	Proteína 1 relacionada con la tirosinasa
TYRP2	Proteína 2 relacionada con la tirosinasa = DCT
U.A.	Unidades Arbitrarias
UV	Ultravioleta (Tipo A (UVA) y tipo B (UVB))
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, tipo A)

9. ANEXO

CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO CLÍNICO POR LA AEMPS



DEPARTAMENTO
DE MEDICAMENTOS
DE USO HUMANO

ASUNTO: PROPUESTA DE RESOLUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE CLASIFICACIÓN DE ESTUDIO CLÍNICO O EPIDEMIOLÓGICO

DESTINATARIO: D. JOSÉ ALEJANDRO PÉREZ FIDALGO

Vista la solicitud formulada con fecha **16 de mayo de 2018**, por **D. JOSE ALEJANDRO PÉREZ FIDALGO**, para la clasificación del estudio titulado **“Estudio de las alteraciones de los parámetros cutáneos por taxanos y otros antineoplásicos en pacientes con cancer”**, con código **INC-PAC-2018-01**, y cuyo promotor es **Servicio de Oncología. Hospital Clínico. INCLIVA Departamento de Farmacología Universidad de Valencia**, se emite propuesta de resolución.

El Departamento de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), de conformidad con los preceptos aplicables⁽¹⁾, propone clasificar el estudio citado anteriormente como **“Estudio Posautorización de seguimiento prospectivo** (abreviado como EPA-SP)

El promotor del estudio deberá remitir solicitud de autorización del mismo ⁽²⁾ a todas aquellas Comunidades Autónomas en las que se pretenda llevar a cabo, incluyendo la siguiente documentación (una copia en papel y otra en formato electrónico).

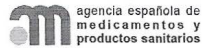
- Carta de presentación dirigida a los responsables de esta materia en la Comunidad Autónoma⁽³⁾ en la que se solicite la autorización del estudio e indique la dirección y contacto del solicitante y la relación de documentos que se incluyen⁽⁴⁾.
- Resolución de la AEMPS sobre la clasificación del estudio
- Protocolo completo, incluidos los anexos, y donde conste el número de pacientes que se pretenden incluir en España, desglosado por Comunidad Autónoma.
- Dictamen favorable del estudio por un CEIC acreditado en España.
- Listado de Centros Sanitarios donde se pretende realizar el estudio, desglosado por Comunidad Autónoma
- Listado de investigadores participantes en la Comunidad Autónoma.
- Si el estudio se pretende realizar en otros países, situación del mismo en éstos
- Documento acreditativo de haber satisfecho las tasas correspondientes, en aquellas CC.AA. donde se exijan.

El plazo máximo establecido para emitir resolución por parte de cada CC.AA. será de 90 días naturales. Si transcurrido el mismo la CC.AA. no se hubiese pronunciado, se entenderá autorizado el estudio en esa CC.AA.

CORREO ELECTRÓNICO

farmacoeipi@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8
28022 MADRID



DEPARTAMENTO
DE MEDICAMENTOS
DE USO HUMANO

A todos los efectos, se le notifica la propuesta de resolución del procedimiento de clasificación de estudio clínico o epidemiológico, y se le comunica que dispone de un plazo de quince días para presentar alegaciones y cuantos documentos estime necesarios o los que a su derecho convenga.

Madrid, a 13 de junio de 2018

La Jefe de División de Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia

María Dolores Montero Corominas

¹ Son de aplicación al presente procedimiento la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas; la Ley 14/2000, de 29 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y de orden social; Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios; Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos; el Real Decreto 1275/2011, de 16 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal "Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios" y se aprueba su estatuto; el Real Decreto 577/2013, de 26 de julio, por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano y la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las directrices sobre estudios posautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano.

² De acuerdo con la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre.

³ Directorio disponible en la página web de la AEMPS (<http://www.aemps.es/actividad/invClinica/estudiosPostautorizacion.htm>)

⁴ En el caso de que el promotor no sea quien presente la documentación, se deberá incluir en la misma un documento que indique las responsabilidades delegadas por el promotor a la persona o empresa que actúa en su nombre.

CORREO ELECTRÓNICO

farmacepei@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8
28022 MADRID

INFORME FAVORABLE DEL COMITÉ ÉTICO



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

D. Diego V. Cano Blanquer, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICA

Código de protocolo del promotor: INC-PAC-2018-01

Título: Estudio de las alteraciones de los parámetros cutáneos por taxanos y otros antineoplásicos en pacientes con cáncer.

Promotor: José Alejandro Pérez Fidalgo

Protocolo: Versión 1.1 de 7 de noviembre de 2018

Hoja de Información al Paciente: Versión 1.1 de 7 de noviembre de 2018

Que el Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia en su reunión de fecha 29 de noviembre de 2018, acta nº 342, tras la evaluación realizada de la propuesta del promotor relativa al estudio especificado, y teniendo en consideración las siguientes cuestiones:

1. Cuestiones relacionadas con la idoneidad del investigador y de sus colaboradores
2. Cuestiones relacionadas con la idoneidad de las instalaciones.
3. Cuestiones relacionadas con las cantidades y, en su caso, previsiones de remuneración o compensación para los investigadores y sujetos del estudio y los aspectos relevantes de cualquier acuerdo entre el promotor y el centro, que han de constar en el contrato firmado.
4. Consideraciones generales del estudio.

Emite un **INFORME FAVORABLE*** para la realización de dicho estudio este centro.

Este Comité acepta que dicho estudio sea realizado en el Servicio de Oncología, por el **Dr. D. JOSE ALEJANDRO PEREZ FIDALGO** como investigador principal.

Que este Comité ha realizado la evaluación de la solicitud de autorización del estudio, de acuerdo con lo previsto en la Orden SAS/3470/2009.

Que el CEIm del Hospital Clínico Universitario de Valencia, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Clínico Universitario de Valencia es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio.

* El presente dictamen estará condicionado a la aprobación del Estudio por parte de la Conselleria de Sanitat.

Lo que firmo en Valencia a 29 de noviembre de 2018.

Fdo.: D. Diego V. Cano Blanquer

Anexo I: COMPOSICION DEL CEIm

Presidente:	
Dra. D ^a . Marina Soro Domingo	Jefe de Sección. Servicio de Anestesia y Reanimación
Vicepresidente:	
Dra. D ^a . Cristina Gomis Gozalbo	Médico Adjunto. Servicio de Ginecología
Secretario:	
D. Diego V. Cano Blanquer	Farmacéutico Hospitalario
Secretario Suplente:	
D ^a M ^a José Tarin Blasco	Licenciado en derecho
Vocales:	
Dr. D. Manuel Alós Almiñana	Jefe de Servicio de Farmacia
Dr. D. José Luis Trillo Mata	Farmacéutico de Atención Primaria
Prof. D. Esteban Morcillo Sánchez	Farmacólogo Clínico
D ^a M ^a Ángeles Mora Pla	Diplomada en Enfermería
Doña Almudena Amaya Rubio	Diplomada en Enfermería
Dr. D. Luis González Luján	Médico de Atención Primaria
Dr. D. Julio Palmero Da Cruz	Jefe de Servicio de Radiodiagnóstico
Prof. D. Joaquín Ortega Serrano	Jefe Servicio de Cirugía General
Dr. D. Rafael Fernández-Delgado	Facultativo Especialista Pediatría
Dra. D ^a Patricia Rosello Millet	Médico Adjunto. Servicio de Pediatría
Dr. D. Ricardo Ruiz Granell	Jefe de Sección. Servicio de Cardiología
Prof. D. Miguel Mínguez Pérez	Jefe de Sección. Servicio de Medicina Digestiva
Dra. D ^a M ^a Jesús Puchades Montesa	Médico Adjunto. Servicio de Nefrología
Dra. D ^a M ^a José Fabiá Valls	Médico Adjunto. Servicio de Medicina Interna
Dr. José Alejandro Pérez Fidalgo	Médico Adjunto. Servicio de Oncología
Dra. Tania Fleitas Kanonnikoff	Médico Adjunto. Servicio de Oncología
Dra. M ^a Luisa Calabuig Muñoz	Médico Adjunto. Servicio de Hematología
Dr. D. Antonio Peláez Hernández	Facultativo Especialista Alergia
Dr. D. Francisco Dasí Fernández	Investigador del Sistema Nacional de Salud "Miguel Servet"
D. Luis Miguel Bayo Calaforra	Fundación AGM "Amics de la Gent Major"
Secretaria Técnica:	
Doña Dolores Iglesias Ferri	Licenciada en Farmacia

APROBACIÓN DE LA CONSELLERIA DE SANITAT I SALUT PÚBLICA

Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE ESTUDIO POSAUTORIZACIÓN OBSERVACIONAL PROSPECTIVO CON MEDICAMENTOS

DESTINATARIO: D. JOSE ALEJANDRO PÉREZ FIDALGO

Vista la solicitud formulada por D. José Alejandro Pérez Fidalgo, del Servicio de Oncología del Hospital Clínico de Valencia, con domicilio a efectos de notificación C/ Menéndez Pelayo 4. 46010 València.

ANTECEDENTES

PRIMERO- Con fecha de entrada en la Conselleria de Sanidad Universal y Salud Pública 27 de diciembre de 2018, D. José Alejandro Pérez Fidalgo, solicita la autorización para la realización del estudio posautorización observacional titulado Estudio de las alteraciones de los parámetros cutáneos por taxanos y otros antineoplásicos en pacientes con cáncer, con código INC-PAC-2018-01.

SEGUNDO- El Comité Autonómico de Estudios Postautorización Observacionales Prospectivos de Medicamentos de la Comunitat Valenciana (CAEPO) evalúa el citado estudio y emite informe favorable al Director General de Farmacia y Productos Sanitarios por no contravenir las directrices establecidas en el artículo 24 del RD. 577/2013, de 26 de julio, del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano y el artículo 8 de la Resolución de 16 de julio de 2009, de la Conselleria de Sanitat, de regulación de los procedimientos, documentación y plazos a observar en la presentación y modificaciones en procesos relacionados con los ensayos clínicos y estudios post-autorización observacionales de medicamentos y productos sanitarios en la Comunitat Valenciana.



Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris



Data 12 FEB. 2019

EIXIDA 5676

NºRef: DGFPS/SGFPS/SAFD/CAVIME/el

INCLIVA
HOSPITAL CLÍNICO DE VALENCIA
D. José Alejandro Pérez Fidalgo
C/ Menéndez Pelayo 4
46010 Valencia

Adjunto remito resolución de autorización de la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios para la realización del estudio *Estudio de las alteraciones de los parámetros cutáneos por taxanos y otros antineoplásicos en pacientes con cáncer*, con código: **INC-PAC-2018-01**.

València, 05 de febrero de 2019
LA SUBDIRECTORA GENERAL DE
OPTIMIZACIÓN E INTEGRACIÓN


Raquel Tena Barreda



Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris

FUNDAMENTOS DE DERECHO

PRIMERO.- La Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios es competente para autorizar la realización de los estudios postautorización de acuerdo a lo dispuesto en el Decreto 93/2018, de 13 de julio, del Consell, por el que se aprueba el Reglamento Orgánico y Funcional de la Conselleria de Sanitat Universal y Salut Pública.

SEGUNDO.- RD. 577/2013, de 26 de julio, del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano, establece en su artículo 24 que los estudios postautorización deberán tener como finalidad complementar la información obtenida durante el desarrollo clínico de los medicamentos previo a su autorización y queda prohibida la planificación realización o financiación de estudios postautorización con la finalidad de promover la prescripción de los medicamentos.

TERCERO.- La Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las directrices sobre estudios postautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano.

CUARTO.- Decreto 73/2009, de 5 de junio, del Consell, por el que se regula la gestión de ensayos clínicos y estudios postautorización observacionales con medicamentos y productos sanitarios.

QUINTO.- Resolución de 16 de julio de 2009, de la Conselleria de Sanitat, de regulación de los procedimientos, documentación y plazos a observar en la presentación y modificaciones en procesos relacionados con los ensayos clínicos y estudios post-autorización observacionales de medicamentos y productos sanitarios en la Comunitat Valenciana.



Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris

De conformidad con ello, la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios

RESUELVE

PRIMERO- AUTORIZAR la realización del estudio:

Título: Estudio de las alteraciones de los parámetros cutáneos por taxanos y otros antineoplásicos en pacientes con cáncer. Versión 1.1 de 7/11/2018. HIP/CI: versión 1.1 de 7/11/2018.

Código: INC-PAC-2018-01.

en los centros sanitarios propuestos en la solicitud:

CENTROS	INVESTIGADORES
Hospital Clínico Universitario de València	Dr. Alejandro Pérez Fidalgo

SÉGUNDO- La realización del estudio está condicionada a que el Gerente del Departamento dé el visto bueno para su realización y firme el correspondiente contrato con el promotor.

TERCERO- El promotor deberá comunicar a esta Dirección General la fecha efectiva de comienzo del estudio en cada centro. Asimismo, enviará el informe de seguimiento anual y deberá comunicar cualquier incidencia relevante de forma inmediata. Tras la finalización de la recopilación de los datos, presentará el informe final del estudio antes de doce meses.

Contra esta Resolución, que no pone fin a la vía administrativa, podrá interponerse Recurso de Alzada ante la Secretaría Autonómica de Salud Pública y del Sistema Sanitario Público en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente al de la recepción de la presente notificación.

València, 05 de febrero de 2019.
**EL DIRECTOR GENERAL DE FARMACIA
 Y PRODUCTOS SANITARIOS**

José Manuel Ventura Cerdá

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: Estudio de las alteraciones de los parámetros cutáneos por taxanos y otros antineoplásicos en pacientes con cáncer	
CÓDIGO DEL ESTUDIO	INC-PAC-2018-01
PROMOTOR	José Alejandro Pérez Fidalgo
INVESTIGADOR PRINCIPAL	José Alejandro Pérez Fidalgo
SERVICIO	Oncología Medica
CENTRO	Hospital Clínico Universitario. INCLIVA

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de su centro, de acuerdo a la legislación vigente, Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda decidir si acepta o no participar en este estudio. Lea esta hoja de información con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno. Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. J. Alejandro Pérez Fidalgo en el teléfono 961973931.

1. Participación voluntaria

Le invitamos a participar en el estudio porque ha sido diagnosticado de un tumor de mama, o de ovario, cérvix o endometrio que requiere recibir un tratamiento con quimioterapia con taxanos.

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir NO participar. Si decide participar, puede cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria.

Debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

2. Justificación y Objetivo del estudio

Existen una gran variedad de fármacos para el tratamiento de las enfermedades malignas que producen como efecto secundario diferentes trastornos en la piel. Sin embargo, la mayoría de las veces, estas alteraciones pasarán desapercibidas, es decir ocurrirán de forma subclínica. Sólo en los casos más severos se evidenciará la aparición de eczemas o molestias cutáneas secundarias a los fármacos antineoplásicos.

Entre los fármacos más comúnmente empleados se encuentran los taxanos, una familia de medicamentos que frecuentemente provocan alteraciones en la piel y toxicidad cutánea.

Por otro lado, algunos fármacos antineoplásicos inducen una respuesta inmunitaria. Esta respuesta es importante para incrementar el efecto antitumoral del tratamiento. La respuesta inmunitaria se puede estudiar mediante el análisis de la piel, pues esta reacción en muchas ocasiones va acompañada de eczema o descamación.

El presente estudio tiene dos objetivos. En muchas ocasiones la toxicidad cutánea aparece después de varios ciclos de quimioterapia. Este hecho hace suponer que si se pudiese estudiar las alteraciones subclínicas de la piel, es decir los pequeños cambios cutáneos que no llegan a ser sintomáticos se podría prever la aparición de una toxicidad cutánea severa posterior. El primer objetivo es por lo tanto estudiar esos pequeños cambios en la piel para evaluar si así es posible predecir la aparición de una toxicidad cutánea más tardía. En segundo lugar, mediante el estudio de los pequeños cambios subclínicos se pretende evaluar si además sería posible predecir una mayor actividad de determinados fármacos ya que a veces si estos son muy eficaces producen una reacción inmunitaria evidenciada en piel.

3. Descripción del estudio

En este estudio se pretende estudiar cualquier cambio cutáneo por imperceptible (subclínico) que sea, durante el periodo de tiempo en el que se le administre un tratamiento con taxanos. Para ello vamos a proceder a medir los siguientes parámetros en su piel:

- 1) grasa cutánea,
- 2) hidratación
- 3) viscoelasticidad
- 4) evaluación de las células de la superficie cutánea
- 5) textura cutánea
- 6) descamación
- 7) ecografía cutánea.

Además, a criterio del evaluador podrían además practicarle un test de pérdida de agua transcutánea y/o un análisis de la melanina y eritema. Estas pruebas se repetirán 3 veces (antes de empezar el tratamiento antineoplásico, al 3º ciclo o mes, y al finalizar el tratamiento).

Todas estas pruebas se realizan con sensores que se acercan a la piel analizándola o fotografiándola, pero no suponen ninguna técnica invasiva, siendo totalmente inocuas, sin ningún riesgo o daño para su piel. Las fotografías de la piel se tomarán a corta distancia sobre áreas que no permitan el reconocimiento del paciente, es decir no se fotografiará la cara y otras áreas que faciliten la identificación.

Asimismo, se accederá a los datos de la historia clínica para recabar información clínica y se obtendrán los resultados de los análisis de sangre que se le vayan a realizar como parte de la práctica clínica habitual.

En ningún momento se le realizará ninguna técnica invasiva como consecuencia de su inclusión en este estudio ni incluso se le practicará análisis alguno de sangre adicional.

Se prevén incluir un total de 50 pacientes en este estudio.

4. Actividades del estudio

El estudio durará lo mismo que su tratamiento de quimioterapia. Durante dicho tratamiento se le solicitará que acuda a realizarse las pruebas cutáneas al departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina que dista escasos 400 metros del edificio en el cual recibirá la quimioterapia (en el Servicio de Oncología del Hospital Clínico). No se le hará venir específicamente para la realización de las pruebas, sino que se aprovechará alguna de las visitas a las que tiene que acudir para recibir quimioterapia, para que mientras espera pueda acudir a la realización de dichas pruebas cutáneas.

Se le realizarán 3 visitas para valorar parámetros cutáneos:

- 1) Antes del primer ciclo
- 2) Antes del tercer ciclo o tercer mes
- 3) Al finalizar el tratamiento

Durante las visitas se le pasará un cuestionario y se le realizarán las pruebas cutáneas. La duración estimada de todos los procedimientos en cada visita es de unos 20 minutos.

5. Riesgos y molestias derivados de su participación en el estudio

Dado que no se prevé realizar pruebas invasivas ni que dañen o erosionen la piel, no se prevé ningún riesgo adicional para usted. Las pruebas cutáneas son totalmente inocuas y no le provocarán ningún daño ni molestia sobre la zona analizada.

Aunque se recogerán datos de sus análisis de sangre, el estudio no tiene previsto la realización de análisis de sangre adicionales a los que le indicará su oncólogo/a por práctica clínica habitual.

6. Posibles beneficios

Es muy posible que usted no obtenga ningún beneficio para su salud por participar en este estudio, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

7. Protección de datos personales

El investigador/promotor y el centro son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor, la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal, el Real Decreto que la desarrolla (RD 1720/2007) y el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD).

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será

revelada a persona alguna salvo excepciones en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a su información personal identificada quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades competentes, al Comité de Ética de la Investigación y personal autorizado por el promotor (monitores del estudio, auditores), cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

De acuerdo a lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos, pero sí se utilizarán los que ya se hayan recogido.

Además, puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio. Para ejercitar sus derechos, dirijase al investigador principal del estudio o al Delegado/a de Protección de Datos del centro/institución en dpd@gva.es. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Los datos codificados pueden ser transmitidos a terceros y a otros países, pero en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito o para su uso en publicaciones científicas, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

En el caso de que los datos se exporten a terceros países, se mantendrá el nivel de confidencialidad tal y como establece la LOPD 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos personales y el RGPD 2016/679.

El promotor/investigador adoptará las medidas pertinentes para garantizar la protección de su privacidad y no permitirá que sus datos se crucen con otras bases de datos que pudieran permitir su identificación.

Si el promotor/investigador no puede confirmar esta demanda, el paciente deberá ser informado del riesgo de re-identificación derivado de la reutilización de sus datos en futuros estudios no definidos en este momento.

8. Información relativa a muestras biológicas

En este estudio no está prevista la obtención, ni conservación ni análisis de ningún tipo de muestra biológicas.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: Estudio de las alteraciones de los parámetros cutáneos por taxanos y otros antineoplásicos en pacientes con cáncer	
CÓDIGO DEL ESTUDIO	INC-PAC-2018-01
PROMOTOR	José Alejandro Pérez Fidalgo
INVESTIGADOR PRINCIPAL	José Alejandro Pérez Fidalgo
SERVICIO	Oncología Médica
CENTRO	Hospital Clínico Universitario de Valencia

Yo, _____ <<nombre y apellidos del participante>>
(Nombre de puño y letra por el paciente)

He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ <<nombre del investigador>>
(Nombre de puño y letra por el paciente)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Consiento al uso y tratamiento de mis datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del participante

Fecha: ____/____/____

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

CONSENTIMIENTO INFORMADO ANTE TESTIGOS

TÍTULO DEL ESTUDIO: Estudio de las alteraciones de los parámetros cutáneos por taxanos y otros antineoplásicos en pacientes con cáncer	
CÓDIGO DEL ESTUDIO	INC-PAC-2018-01
PROMOTOR	José Alejandro Pérez Fidalgo
INVESTIGADOR PRINCIPAL	José Alejandro Pérez Fidalgo
SERVICIO	Oncología Médica
CENTRO	Hospital Clínico Universitario

Yo, _____ <<nombre y apellidos del testigo>>, (Nombre de puño y letra por el testigo) como testigo, afirmo que en mi presencia se ha informado a D/Dª _____ <<nombre y apellidos del participante>> (Nombre de puño y letra por el testigo) y se ha leído la hoja de información que se le ha entregado sobre el estudio, de modo que:

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha hablado con _____ <<nombre del investigador>> (Nombre de puño y letra por el testigo)

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presta libremente su conformidad para su participación en el estudio.

Consiente al uso y tratamiento de sus datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Recibirá una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del testigo

Fecha: ____/____/____

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____