

Universidad de Huelva

Departamento de Enfermería



Cuantificación del *demodex folliculorum* mediante reacción en cadena de la polimerasa y su asociación con el carcinoma basocelular en el área periorcular

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Juan Carlos Sánchez España

Fecha de lectura: 12 de marzo de 2018

Bajo la dirección de los doctores:

Carlos Ruiz Frutos

Alberto Tenorio Abreu

Huelva, 2018





Universidad
de Huelva

UNIVERSIDAD DE HUELVA

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

**CUANTIFICACIÓN DEL DEMODEX FOLLICULORUM MEDIANTE REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA Y SU ASOCIACIÓN CON EL CARCINOMA
BASOCELULAR EN EL ÁREA PERIOcular**

JUAN CARLOS SÁNCHEZ ESPAÑA

DIRECTORES

CARLOS RUIZ FRUTOS. MD, PHD.

ALBERTO TENORIO ABREU. PHD.

2017

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Delgado, ejemplo de trabajo y liderazgo.

A la Dra. María Sacramento Valero, quien me anima siempre a sacar adelante mis proyectos.

Al Dr. Alberto Tenorio, por siempre confiar en este trabajo, sin el no se hubiera desarrollado ni la primera línea.

A la Dra. Ligia Naranjo y al Dr. Alejandro Pascagaza, compatriotas, compañeros y amigos durante este camino de formación fuera de nuestra casa. Colombia.

A la Dra. Sonia Pérez y a la Dra. Sara Maldonado, orgullosas andaluzas, las mejores compañeras que pude tener durante la residencia que se convirtieron en amigas.

Al Dr. José Ernesto Gallo y a la Dra. Luisa Román, amigos que puso el destino en mi camino, están presentes en mis mejores recuerdos de la especialización.

A la Dra. María del Carmen González, compañera de este proyecto con quien trabajamos hombro a hombro todos estos meses.

Al Dr. Carlos Hidalgo y al laboratorio HGC Biomedical Research Diagnostic S.L, por su compromiso incondicional con el desarrollo del presente estudio.

Al Dr. Carlos Ruiz, mi asesor permanente y gran profesional.

A los Dres. Manuel Cobos y Alejandro Álvarez, por inculcarme el gusto por la Oculoplástica.

A mis hermanos Diego y Carlos Andrés, siempre presentes.

A los primos Rocío y Hernán por estar siempre pendientes de mi.

A mi Papá por su constante apoyo durante mi formación.

A las Tías Gloria y Cecilia, mis madres en la tierra.

A Afranio Luis pilar fundamental en mis proyectos de vida.

ÍNDICE

GLOSARIO	9
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	17
1.1 MARCO TEÓRICO	18
1.1.1 Región periocular	18
1.1.1.1 Anatomía	18
1.1.1.2 El globo ocular	18
1.1.1.3 Párpados	21
1.1.1.4 Histología de los párpados	25
1.1.2 Carcinoma Basocelular (CBC)	29
1.1.2.1 Generalidades	29
1.1.2.2 Historia	29
1.1.2.3 Epidemiología	30
1.1.2.4 Anatomía Patológica	31
1.1.2.5 Patogénesis.....	34
1.1.2.6 Factores de riesgo asociados.....	36
1.1.2.7 Características clínicas.....	37
1.1.2.8 Variedades clínicas de presentación	38
1.1.2.9 Diagnóstico.....	42
1.1.2.10 Diagnóstico diferencial	44
1.1.2.11 Tratamiento	46
1.1.2.12 Pronóstico.....	49
1.1.3 <i>Demodex folliculorum</i> (DF)	49
1.1.3.1 Taxonomía.....	49
1.1.3.2 Generalidades	50
1.1.3.3 Ciclo biológico	51
1.1.3.4 Especies de <i>Demodex</i>	53

1.1.3.5 Hábitat	55
1.1.3.6 Patogenia	56
1.1.3.7 Manifestaciones clínicas de la infestación por <i>Demodex</i>	59
1.1.3.8 Diagnóstico morfológico del agente infestante	60
1.1.4 Biología molecular y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)....	61
1.2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	69
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	85
2.1 Hipótesis y Objetivos.....	86
2.2.1 Hipótesis	86
2.2.2 Objetivos	87
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODO	89
3.1 Diseño metodológico	90
3.2 Aspectos éticos	92
3.3 Obtención de la muestra a estudio	93
3.4 Variables	94
3.4.1. Independientes	94
3.4.2. Dependientes	95
3.5. Instrumentos	95
3.6. Recogida y análisis de datos	96
3.7. Procedimientos	97
3.7.1. Anatomía Patológica	97
3.7.2. Oftalmología	97
3.7.3. Microbiología	97
3.8. Desarrollo de la PCR	99
3.9. Limitaciones del estudio	105
3.10. Análisis estadístico	106

CAPÍTULO IV: RESULTADOS	108
4.1. Prueba piloto	109
4.2. Sensibilidad y especificidad de la PCR	110
4.3. Matriz de datos	110
4.4. Características demográficas y anatomopatológicas	111
4.5. Presencia del <i>DF</i>	115
4.6. Densidad de infestación del <i>DF</i>	117
4.7. Correlación entre la edad y la densidad de infestación	118
4.8. Análisis por localización anatómica	119
4.8.1. Prevalencia y densidad general del <i>DF</i> por localización	119
4.8.2. Regresión logística binaria	121
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	123
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	143
CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
CAPÍTULO VIII: ANEXOS	167
8.1. Consentimiento informado	169
8.2. Aceptación del Comité de Ética Médica	176
8.3. Formato de recogida de datos Anatomía Patológica	179
8.4. Matriz de datos	180
CAPÍTULO IX: INDICIOS DE CALIDAD	184
9.1. Notas de prensa	185
9.2. Publicaciones en revistas	187
9.3. Participación en congresos	194
9.4. Premios	199

ÍNDICE DE FIGURAS.

1.1 Fotografía de ojo derecho normal	20
1.2 CBC nodular.	32
1.3 CBC superficial	33
1.4 CBC trabecular	33
1.5 CBC morfeiforme	34
1.6 CBC esclero-dermiforme de canto interno	38
1.7 CBC nodular del canto interno	39
1.8 CBC esclerosante de párpado inferior	39
1.9 CBC superficial	41
1.10 Sistema de clasificación TNM del CBC	42
1.11 Ejemplar adulto de <i>DF</i>	54
1.12 Presencia de <i>Demodex</i> en pestañas	54
1.13 Variedades de la infestación	59
1.14 Amplificación exponencial del ADN en la PCR	61
1.15 Método convencional de la PCR	62
1.16 Amplificación en ciclos con PCR a tiempo real	63
1.17 Kit de extracción manual (Genomic DNA Spin Column-Bioline®).	64
1.18 Ciclo de amplificación	68
3.1 Ejemplar adulto de <i>DF</i>	99
3.2 Tubos de Eppendorf con las piezas de Anatomía Patológica	103
3.3 Temperatura de disociación de la secuencia diana	105
4.1 Diagrama de barras apiladas según sexo	112
4.2 Diagrama de sectores de la distribución de las variedades histológicas de los CBC	113

4.3 Diagrama de sectores para la frecuencia de lesiones benignas	114
4.4 Diagrama de barras para la prevalencia de la infestación en casos y controles	115
4.5 Diagrama de barras para la distribución de infestación en casos de tipo nodular y controles	117
4.6 Pirámide para distribución de frecuencias de la densidad de DF en casos y controles	118

GLOSARIO

APONEUROSIS: Membrana fibrosa y blanquecina que envuelve los músculos (aponeurosis de envoltura) o los une con las partes que se articulan (aponeurosis de inserción). También se denomina fascia.

APOPTOSIS: Es una vía de destrucción o muerte celular programada o provocada por el mismo organismo, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento, puede ser de naturaleza fisiológica y está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

ATROFIA: Disminución del volumen o tamaño de un órgano o de un tejido orgánico debido a causas fisiológicas o patológicas.

BENIGNO: Afección, tumor o neoplasia que no es maligna o cancerosa.

CARCINOMA: Es una neo-formación cancerosa maligna con origen en células de tipo epitelial o glandular por ejemplo.

CAVIDADES ORBITARIAS: Son las dos cavidades situadas a ambos lados de la línea media de la cara destinadas a alojar los globos oculares y sus anexos.

CHALAZIÓN: Lesión pequeña de aspecto tumoral que aparece en el borde libre de los párpados causada por obstrucción e inflamación de una glándula de Meibomio.

CONTRACCIÓN: Acción de contraer o contraerse, especialmente un músculo o un órgano.

CORNEA: Es la estructura hemisférica, transparente y delgada localizada en la parte anterior del ojo con poder refractivo.

DERMIS: Capa de la piel, de tejido conjuntivo situada debajo de la epidermis.

DIPLOPÍA: Visión doble.

ECZEMA: También llamada dermatitis eccematosa la cual es un conjunto de afecciones dermatológicas, caracterizadas por presentar lesiones inflamatorias diversas.

EPIDERMIS: Capa de la piel, de células epiteliales que recubren la parte más superficial del cuerpo sobre la dermis.

FOLÍCULO: Estructura que tiene las porciones: glandular, secretora y excretora. Formada de un pequeño saco. Está situada en la piel o en las mucosas.

GEN: Partícula de material genético que se halla dispuesta en un orden fijo a lo largo de un cromosoma, y que determina la aparición de los caracteres hereditarios en los seres vivos.

HIPERCROMÁTICAS: Es un término descriptivo referido a un estado del núcleo, donde hay una abundancia de ADN que tiñe de oscuro en preparaciones histológicas.

HUÉSPED: Es aquel organismo que alberga a otro en su interior o que lo porta sobre sí, ya sea en una simbiosis de comensal o un mutualista.

IMPRONTAR: Reproducción de imágenes en hueco o de relieve en una zona para la visualización de estas.

INSERCIÓN: Es sinónimo de inclusión, introducción, empotramiento o penetración. También se define como la unión de uno o más tejidos o músculos en una zona determinada.

MADAROSIS: Pérdida de pestañas ocasionada por blefaritis, medicación tópica crónica, cirugía o alteraciones sistémicas.

MEIBOMITIS: Inflamación de las glándulas de Meibomio del párpado. Suele ser un proceso crónico y normalmente asociado a un exceso de secreción grasa o seboreica por parte de la glándula.

METAPLASIA: Es un cambio reversible en el que una célula diferenciada (epitelial o mesenquimal) se sustituye por otro tipo de célula.

METÁSTASIS: (Del griego metástasis – mudarse de lugar o transferencia). Es el proceso de propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel donde es originario el tumor.

NECROSIS: Muerte de las células y los tejidos de una zona determinada de un organismo vivo.

NEVUS: Llamado también nevo (del latín naevus, lunar). Es una proliferación de distintos tipos de células en la piel.

ÓRBITA: Es una estructura ósea que delimita y aloja al globo ocular.

PALPEBRAL: Es la referencia de la zona de los párpados.

PÁPULA: Es un tipo de lesión en piel, menor de un centímetro de diámetro, circunscrita, elevada, de bordes bien definidos y de contenido sólido.

PERIOCULAR: Es la región que se encuentra situada alrededor del ojo.

PITIRIASIS: Dermatitis caracterizada por una descamación en finas costras de la piel.

PLURIPOTENTES: Son células originadas de células madres que se encuentran en todos los organismos multicelulares y que tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas y de auto-renovarse para producir más células madre.

POLIMORFISMO: Hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen. Es decir, un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población.

PROTUBERANCIA: Es un término que procede del vocablo latino protuberantia. Se trata de un saliente, un relieve, una turgencia o una hinchazón.

PSORIASIS: Es una enfermedad de la piel caracterizada por la aparición crónica de placas escamosas de color plata, fundamentalmente en los codos, rodillas y el cuero cabelludo, aunque puede aparecer en cualquier parte del organismo.

RESECCIÓN: Operación quirúrgica que consiste en separar total o parcialmente uno o varios órganos o tejidos del cuerpo.

RETINA: Es la capa de tejido sensorial que se encuentra en la parte posterior globo ocular.

RETROOCULAR: Es la pared posterior de la cavidad orbitaria.

SINDROME DE GORLIN: Es un trastorno hereditario autosómico dominante que predispone principalmente a la proliferación de tumores como los carcinomas basocelulares y queratoquistes maxilares.

TELANGIECTASIAS: Se conocen como “arañas vasculares”, la cuales son dilataciones de pequeños vasos sanguíneos en la superficie de la piel, que pueden aparecer en zonas como la cara o las piernas.

TRABÉCULAS: Son cada una de las pequeñas prolongaciones óseas entrecruzadas que forman una malla ósea y que limitan compartimentando las cavidades medulares del tejido esponjoso.

TRIQUEIASIS: Es una enfermedad ocular que consiste en una alteración de las pestañas, las cuales crecen de forma anómala en dirección al ojo.

RESUMEN

Se ha planteado la infestación por *Demodex folliculorum* (DF) en diferentes enfermedades de la región periocular y el objetivo fue estimar si era un factor de riesgo en el carcinoma basocelular (CBC). **Método.** Se realizó un estudio epidemiológico de casos y controles y además se diseñó un método estandarizado para detectar ADN de DF mediante Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) en tiempo real en tejido sólido de CBC. Se emplearon métodos de la estadística descriptiva e inferencial, t-student, Shapiro-Wilk, correlación de Pearson y regresión logística binaria, calculándose la odds ratio, la sensibilidad y especificidad, todas al 95 % de confianza, **Resultados.** En la prueba piloto el DF se encontró en el 50 % de las muestras, 57 % entre los hombres y 40 % en las mujeres. En los controles la densidad media fue de 308.65 amplicones/1.125 mg de tejido sólido, La PCR en tiempo real tuvo especificidad del 100 %, y el límite de detección se situó entre 1–10 copias/μl. Al estudiar 115 biopsias, casos (n=64) con CBC y controles (n=51) con lesiones benignas, no hubo diferencias de sexo, ni de edad ($p>0,05$). La variedad histológica más frecuente de CBC fue la nodular (70.3 %) y entre los controles la queratosis seborreica (alrededor del 25 %). En los casos el DF se detectó en el 42.2 %; en los controles en 19.6 % (OR 2.99; IC95%1.27-7) y en el subgrupo de CBC nodular de 51.1 % ($p<0,05$). La densidad de DF fue de 15.29 copias en controles, mientras en los CBC fue de 90.10 copias y en el subgrupo nodular fue de 112.4 copias ($p<0,01$). No se detectó correlación entre el incremento de la edad y la densidad de la infestación. Por localización anatómica fue superior la prevalencia del DF en el canto interno y el párpado inferior con relación a los controles; sin embargo, no hubo diferencias en cuanto a la densidad de la infestación. Según la regresión logística binaria solo la presencia o no del DF tiene significación estadística como factor de riesgo y no la densidad. **Conclusiones:** La PCR en tiempo real es efectiva para el diagnóstico, la determinación de la prevalencia y la densidad del DF. En los CBC hay mayor presencia de DF y mayor densidad, sobre todo en canto interno y párpado inferior. Se constata una asociación entre DF y el CBC, lo que lo posiciona como un potencial factor de riesgo para el mismo.

Palabras clave: *Demodex folliculorum*, Carcinoma basocelular, Reacción en cadena de la Polimerasa.

ABSTRACT

Infestation by *Demodex folliculorum* (*DF*) in different diseases of the periocular region was considered and the objective was to estimate if it was a risk factor in basal cell carcinoma (BCC). **Method.** An epidemiological study of cases and controls was carried out and a standardized method for detecting *Demodex folliculorum* DNA was prepared by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) in solid CBC tissue. Descriptive and inferential statistics, t-student, Shapiro-Wilk, Pearson's correlation and binary logistic regression were used, and the odds ratio, sensitivity and specificity were calculated, all at 95% confidence intervals. **Results.** In the pilot test *DF* was found in 50% of the samples, 57% among men and 40% in women. At the controls the mean density was 308.65 amplicons / 1,125 mg of solid tissue. Real-time PCR had specificity of 100%, and the detection limit was between 1-10 copies / μ l. When we studied 115 biopsies, cases (n = 64) with BCC and controls (n = 51) with benign lesions, there were no differences in sex or age ($p > 0.05$). The most frequent histological variety of BCC was nodular (70.3%) and seborrheic keratosis among the controls (about 25%). In the cases *DF* was detected in 42.2%; in the controls in 19.6% (OR 2.99; 95% CI 1.27-7) and in the subgroup of nodular BCC of 51.1% ($p < 0.05$). The *DF* density was 15.29 copies in controls, while in the CBC it was 90.10 copies and in the nodular subgroup it was 112.4 copies ($p < 0.01$). No correlation was detected between the increase in age and the density of the infestation. By anatomical localization, the prevalence of *DF* was higher in the inner canine and lower eyelid compared to controls; however, there were no differences in the density of the infestation. According to binary logistic regression, only the presence or absence of *DF* has statistical significance and not density. **Conclusions:** Real-time PCR is effective for the diagnosis, determination of *DF* prevalence and density. In CBC there is a greater presence of *DF* and higher density, especially in the inner canthus and lower eyelid. An association between *DF* and CBC is verified, which positions it as a potential risk factor for it.

Key words: *Demodex folliculorum*, Basal cell carcinoma, Polymerase chain reaction.

Capítulo I

Introducción

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 Región periorcular

1.1.1.1 Anatomía

El órgano encargado de la visión, que es el ojo, se ubica en la cavidad orbitaria junto con sus anexos desarrollando una compleja relación anatómica. Es uno de los cinco sentidos, junto con el gusto, olfato, tacto y oído. A través de la visión nos relacionamos con el mundo que nos rodea. Los estímulos de luz que percibimos del exterior, pasan por los diversos medios refringentes de nuestro ojo y se quedan grabados en la retina, dando paso a una transformación en estímulos eléctricos para trasladarse a la vía óptica y acabar ubicado dentro del cerebro en la corteza visual, dando como resultado la interpretación de la imagen observada^{1,2}.

1.1.1.2 El globo ocular

El globo ocular presenta una dimensión de 23 milímetros de diámetro, con forma de esfera ovoide, ocupando, dentro de la órbita, su mitad inferior. Su peso es de 7 gramos aproximadamente, con una consistencia firme, pareciendo un cuerpo sólido y duro. La presión de los líquidos que se encuentran en el ojo da origen a dicha consistencia^{1,3}. (Fig. 1.1)

Atendiendo a la base de la órbita, observamos cómo el vértice de la córnea se encuentra situado cerca de la línea recta que une los salientes de los rebordes de las órbitas inferior y superior. Este vértice de la córnea se encuentra anterior a una línea recta que uniese los bordes externo e interno de la órbita. Por tanto, el reborde superior domina y excede al propio globo ocular, cuya función es protegerlo. Las relaciones de la base orbital con el globo ocular varían dependiendo de la persona y depende también del estado de plenitud de la propia cavidad de las órbitas. Este asunto se trata del desarrollo considerable, en mayor o menor medida de la masa adiposa retro-ocular y de la masa muscular intraorbitaria^{1,3}.

El globo no se relaciona con los huesos de manera directa. Está recubierto anteriormente por los párpados, los cuales lo cubren, protegen y ayudan a lubricar. Se encuentra cubierto por una cúpula fibrosa que forma la aponeurosis de Tenon o aponeurosis orbito-ocular^{1,3}.

Entrando a relacionar las paredes orbitales, el globo no se encuentra situado en la misma distancia de cada una de ellas, está más alejada de la pared interna que de la externa por lo cual se puede llegar a la errónea impresión de que el ojo se desplaza al moverse dentro de la órbita pero lo que ocurre es una rotación sobre sí mismo^{1,3}.

El complejo muscular, vasculonervioso y adiposo se encuentra posterior al globo y separados por la cápsula de Tenon dentro de la propia órbita. La grasa intra-orbitaria presenta una viscosidad y elasticidad baja. El globo está constituido desde el exterior al interior por unas tres túnicas o capa: La primera de ellas es fibrosa denominada esclerótica, la segunda es la úvea la cual es vascular y por último la retina que se trata de la capa sensorial^{1, 3}.



Fig. 1.1 Fotografía de ojo derecho normal. **Tomada de:** Álvarez J. Anatomía del globo ocular y de la órbita. Capítulo 1. 2012².

La región orbitaria es el área de la cara superpuesta a la órbita y al globo ocular e incluye los huesos orbitarios, el contenido orbitario (grasa, músculos, nervios y vasos), párpados superior e inferior y el aparato lagrimal desde la glándula lagrimal hasta el saco lagrimal y desembocadura en la nariz. Para efectos de este estudio, se extenderá específicamente sobre los párpados.

1.1.1.3 Párpados

Se trata de estructuras con un origen musculo-membranoso que se hallan delante de los globos oculares. Entre sus funciones están tamizar la luz evitando los estímulos visuales por completo como lo que nos ocurre al dormir, también para protegernos de elementos extraños que se encuentren en el aire, facilitar que las lágrimas se distribuyan por toda la superficie corneal y conjuntival mediante el parpadeo y bombeando la lágrima a su drenaje hasta la nariz^{2, 4}.

La estructura del párpado superior es muy similar a la del inferior. Su porción anterior está formada por el músculo orbicular y la piel (muchos denominan a este conjunto como lámina anterior del párpado). Su porción posterior está compuesta por el platillo tarsal, que contiene a las glándulas de Meibomio y por la conjuntiva (también denominados como lámina posterior del párpado). Su parte superior que se encuentra cerca de las cejas se denomina fragmento preseptal del párpado y en su parte inferior se encuentra la línea de pestañas. En su interior se encuentran los músculos retractores y la grasa preaponeurótica^{2, 4}.

El músculo retractor del párpado superior está compuesto en su porción anterior por la aponeurosis del músculo elevador y en su porción posterior por una musculatura estriado. También tiene un componente muscular liso simpático denominado el músculo de Müller o tarsal superior. En cambio los retractores del

párpado inferior vienen formados por el denominado tendón depresor llamada fascia capsulo-palpebralis, formada por fibras estriadas y con un origen en la vaina del músculo recto inferior. La porción simpática de músculo liso del párpado inferior se denomina el músculo tarsal inferior. Los músculos orbiculares de los párpados que rodean los ojos, se componen de musculatura estriada y sirven para ocluir los párpados^{2, 4}.

Cerca del borde libre palpebral se halla una porción pretarsal y una porción preseptal la cual está en relación a las cejas que están inervadas por el VII par craneal. La parte pretarsal, favorece la formación de los llamados cantos palpebrales (canto interno o medial y canto externo o lateral) que son elementos que sostienen los párpados en la posición adecuada El canto interno juega un papel relevante para el bombeo de las lágrimas enviándola hacia la nariz a través de la vía lagrimal^{2, 4}.

El canto interno se encuentra ubicado en la región naso-etmoideo-orbitaria, relacionándose de manera íntima con la región nasal y con la pared interna de la órbita formado por las celdillas etmoidales. Por la porción superior se encuentra la fosa craneal anterior. Resulta primordial la concepción en tres dimensiones de dicha zona en un adecuado manejo de las vías de diseminación y de la patología tumoral^{2, 4,5}.

La región cantal interna presenta gran diversidad de estructuras incluyendo la piel de los dos párpados en su porción medial, la que se encuentra en la

vertiente nasal, el aparato lagrimal (saco, canaliculi y punctum), algunas porciones pretarsales del músculo orbitario, el tendón cantal medial o interno y la conjuntiva⁴.

El tendón cantal interno es sin duda alguna la estructura más relevante de la región mencionada debido a que da soporte al globo ocular junto con el tendón cantal externo y los dos tarsos, todo este conjunto de estructuras mantienen a los párpados en su posición de un modo tangencial al globo. El buen estado de este soporte ayuda a un adecuado drenaje de la lagrimal. En la porción medial de los platinos tarsales inferior y superior se encuentra el origen del tendón cantal medial, donde las fibras pretarsales y preseptales del músculo orbicular se fraccionan en una porción superficial y otra profunda. Es precisamente aquí, entre ambas fibras, donde se encuentran los puntos lagrimales siendo más cortas las profundas que las superficiales y las que se adosan a los canaliculos^{1, 4}.

El tendón hacia la zona medial se condensa en un sistema de tres partes donde la inserción en la órbita medial se efectúa de la manera que vamos a tratar. El componente horizontal y anterior que se trata de la porción más fuerte de dicho sistema se introduce a nivel de la cresta lagrimal anterior y posteriormente en una parte de los huesos propios. Las fibras profundas del orbicular pretarsal y preseptal forman el componente posterior y han sido denominadas en las investigaciones clásicas como músculo de Duverney, de Horner la pars lacrimalis o tensor tarsi. Además dichas fibras se interrelacionan introduciéndose en el

hueso lagrimal por detrás y por encima de la cresta lagrimal posterior agrupándose con la fascia lagrimal^{2, 4}.

McCarthy y Zide, evidenciaron que existía un tercer componente vertical que se incrusta por encima del saco lagrimal vinculándose con el periostio y la periorbita de la región. El vector final de dichas inclusiones viene a decir que la resuspensión de la mayoría del complejo debería ser superior y posterior a la cresta lagrimal. En dicha zona el periostio es frágil por lo que una fijación se realizará en el hueso⁴.

Si miramos de frente al ojo, el borde palpebral superior se encuentra a 1- 2 milímetros bajo el limbo corneal superior y en donde el borde del párpado inferior se encuentra a nivel del limbo inferior. El promedio en adultos de la fisura interpalpebral es de unos 30 milímetros de ancho y 9 -10 milímetros de alto⁴.

La piel de la parte palpebral que contiene glándulas sebáceas y sudoríparas es delgada. En el bordes libre se encuentra la entrada al aparato lagrimal en unas prominencias a nivel medial que se denominan cómo tubérculos lagrimales³, en ese punto encontramos los dos puntos lagrimales, uno inferior y uno superior por donde entra la lágrima hacia los canalículos, los cuales miden 2 mm en su porción vertical y de 8 a 13 milímetros en su porción horizontal, posteriormente drenan hacia el saco lagrimal y llegan a la nariz a través del conducto denominado lacrimonasal para terminar en la nasofaringe.^{3, 4}.

La relación íntima que conforman los canalículos con las fibras del músculo orbicular se expresa en el componente de bombeo que se crea en el momento de la relajación y contracción de las mismas lo que permiten un drenaje adecuado de la secreción lagrimal. Así pues, la fusión en las estructuras manifiesta de que la mayoría de tumores que se infiltran en la región posean una diseminación medial hacia la órbita, hacia la vía lagrimal y hacia las regiones cercanas lo que motiva extensas resecciones que incluyen un componente óseo en muchas ocasiones^{2, 4}.

Entre la transición de la piel y la conjuntiva se hallan las pestañas, en el borde libre del párpado^{1, 3}.

1.1.1.4 Histología de los párpados

La piel, compuesta por los anejos cutáneos, dermis y epidermis, contiene una variada gama de tipos celulares que tienen la capacidad de proliferar y dar lugar a una transformación neoplásica. De hecho existe una notable variedad de tumores cutáneos pudiendo darse desde lesiones benignas, pre-malignas, malignas que se originan en cualquier estructura (dermis, epidermis, anejos, etc.). Los tumores malignos y benignos se clasifican en función tanto de su localización y en función de su célula de origen⁴.

- **Epidermis**

La epidermis está compuesta por células productoras de queratina que se denominan queratinocitos, células de Langerhans, de Merkel y melanocitos

entre otras. Consta de cuatro capas, desde la profundidad a la superficie son:

1. La capa de células basales, compuesta por una fila única de células columnares que generan las células más superficiales. Este tipo de células, las basales, tienen melanina que se deriva de los melanocitos adyacentes.
2. La capa de estrato espinoso, ésta tiene un espesor de entorno cinco células, que tienen abundante citoplasma eosinofílico y una forma poligonal. El término de células espinosas se debe al hecho de que sus bordes se hallan unidos mediante puentes intercelulares o desmosomas.
3. La capa de células granulares, consiste en dos capas de células en forma de diamante o pavimentosas con gránulos querato-hialinos.
4. Capa de queratina (córnea), cuya característica principal es ser muy delgada y estar formada por células planas anucleadas⁴.

- Dermis

Ubicada justamente debajo de la epidermis. Una de las principales características de la dermis es que tiene un grosor mucho mayor. Formada por tejido conjuntivo, contiene vasos linfáticos y sanguíneos, fibras nerviosas, Las

principales células que la componen son los macrófagos, los fibroblastos y los mastocitos. Las proyecciones epidérmicas descendentes, conocidas como crestas inter-papilares, forman inter-digitaciones con las papilas o proyecciones dérmicas ascendentes. En el párpado, es el músculo orbicular el que ofrece soporte a la dermis. Los anejos cutáneos se encuentran bien dentro de los tarsos palpebrales o en la dermis:

- Glándulas Meibomio: se trata de unas glándulas sebáceas que se encuentran en las láminas tarsales y han sufrido de una modificación. Éstas se vacían por una fila única de alrededor de 30 aberturas en cada uno de los párpados. Cada glándula tiene un conducto central con varios acinos, las células de los cuales consiguen sintetizar lípidos que pasando al conducto consiguen formar la capa externa de la película lagrimal denominada pre-corneal.
- Glándulas sebáceas: son glándulas que se pueden encontrar tanto en los pelos de las cejas como en la carúncula. Las más pequeñas se coligan con el vello (pelos finos) que cubren la piel periocular.
- Glándulas de Zeiss: se trata de glándulas sebáceas que han sufrido de una modificación y se hallan en conexión con los folículos que se encuentran en las pestañas.

- Glándulas de Moll: se trata de unas glándulas sudoríparas apocrinas que habiendo sufrido una modificación pueden abrirse a un folículo de las pestañas o de forma directa abrirse en el borde palpebral anterior de éstas. Existen en mayor número en el párpado inferior.
- Glándulas sudoríparas ecrinas: éstas se encuentran distribuidas por toda la piel palpebral por lo que a diferencia de lo que ocurre con las glándulas de Moll, no se limitan al borde palpebral.
- Unidades pilosebáceas: estas son las que junto con las glándulas sebáceas forman los folículos pilosos^{2, 4}.

1.1.2 Carcinoma basocelular

1.1.2.1 Generalidades.

El carcinoma basocelular (CBC) es el tumor maligno más común de la piel, con más de 400.000 pacientes tratados cada año en los Estados Unidos de América. Entre los factores de riesgo con más importantes se encuentran: la piel que no se broncea, la piel pálida y la exposición a la luz solar de forma crónica. Ocurre principalmente en la cabeza y cuello correspondiendo a más del 90% de los tumores malignos palpebrales. Usualmente ocurre en pacientes de raza blanca entre los 50 – 80 años de edad. En niños sucede si presentan patologías de base predisponentes^{6, 7}.

1.1.2.2 Historia natural

Por lo general, se trata de una lesión de crecimiento lento de la piel con un inicio entre los 3 a los 24 meses previos al diagnóstico, aunque las historias más largas no son infrecuentes. A menudo, el paciente reporta un pequeño bulto o rasguño que no se ha curado asociado a costras recurrentes en la superficie de la lesión y puede sangrar intermitentemente. Rara vez hay dolor significativo pero puede haber irritación leve o picazón. Si la lesión está en el margen del párpado, se puede notar madarosis (pérdida de pestañas). Si es más avanzado, se puede reportar visión doble asociado al efecto mecánico y distorsión de la forma de los

párpados debido al crecimiento de la lesión incluyendo estrechamiento o ampliación de la abertura palpebral⁷⁻¹⁰.

1.1.2.3 Epidemiología

En cuando a la relación hombres y mujeres, no es una patología con preferencia de sexos^{11, 12}.

El CBC es el tumor maligno más común de la piel. Los datos publicados sobre la incidencia de tumores malignos en el período 1999 - 2003 se registraron 19.091 cánceres de piel no melanoma (ambos sexos combinados), de los cuales los CBCs sumaron 14.484 casos (75.9%) y carcinomas de células escamosas o escamo-celular (CEC) 2.062 casos (10,8%)^{13, 14} en los EEUU.

Al referirnos a la lateralidad, la proporción de todos los tipos histológicos de los cánceres de piel no melanoma localizados en el ojo ocurren el 46,2% de casos en el ojo izquierdo y 48,7% en el ojo derecho, el resto son bilaterales¹⁴.

Los rangos de edad de los pacientes con CBCs varían entre los 24 años y los 94 años con una mediana 68 años¹⁴.

Es importante señalar, como plantean Rubin AI, Chen EH y Ratner, que la incidencia real de los carcinomas de piel no es exactamente conocida por sub-

registros, ya que los cánceres cutáneos no melanomas generalmente no se reportan en los registros de cáncer lo cual dificulta obtener estadísticas globalizadas¹⁵.

1.1.2.4 Anatomía patológica.

Las células del CBC, suelen ser hipercromáticas, ligeramente ovals con núcleos y citoplasmas grandes. Las células aparecerán uniformes y si están presentes, las figuras mitóticas suelen ser bajas. Los agregados tumorales nodulares pueden tener diferentes tamaños pero las células tumorales tienden a alinearse en la periferia de estos nidos. Las lesiones tempranas generalmente tienen una conexión con la epidermis pero también estas pueden ser difíciles de apreciar en lesiones avanzadas. El aumento de mucina está frecuentemente presente en el estroma dérmico circundante^{10, 11}.

La forma agresiva presenta la infiltración como patrones de crecimiento. Esta infiltración de las células en vez de ser nidos, surge como finas hebras de células tumorales (a menudo sólo una celda de grosor), que están incrustados en densos árboles fibrosos, característica común del CBC morfeiforme^{11, 15, 16}. El CBC tiene diversas variaciones histopatológicas características que influyen en el pronóstico y tratamiento a seguir:

- Nodular: presenta una lesión típica con lóbulos, nidos y cordones de células basales bien definidas separadas de tejido conectivo con agregados nodulares

células basaloideas. Las células tumorales muestran un alineamiento paralelo en la periferia de cada lóbulo denominado empalizada periférica, la cual es característica. El estroma usualmente muestra contracción induciendo las fisuras claras características. (Fig. 1.2)

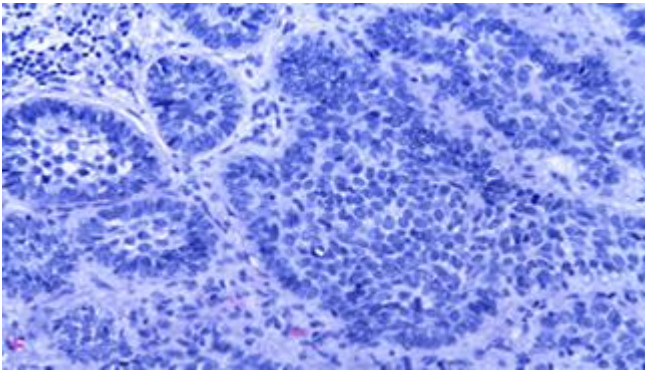


Fig. 1.2 CBC Nodular con nidos de células basaloideas (con disposición en empalizada en la periferia), rodeados por espacios claros de retracción. H-E 200x.

Foto tomada por: la Dra. María del Carmen González Gallego. Hospital Juan Ramón Jiménez. Huelva.

- Superficial: este tipo de tumor se caracteriza por múltiples nidos tumorales de células basaloideas que se conectan con la epidermis y se extienden hasta la dermis papilar superficial, con un grosor que no supera 1 milímetro^{16, 17}. (Fig. 1.3)

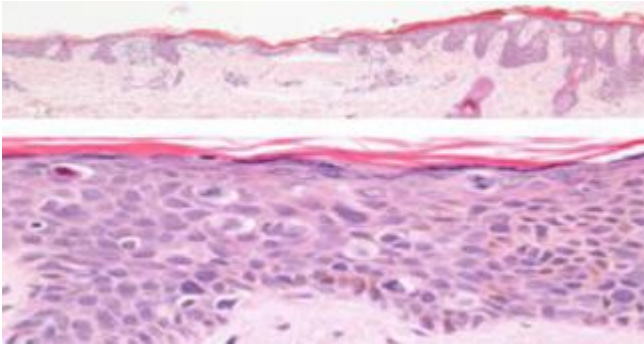


Fig. 1.3 CBC superficial. **Foto tomada por:** Carra RA, Taibjeeb SM, Sanders DSA. Basaloid skin tumours: basal cell carcinoma. Curr Diagn Pathol 2007; 13:252–272¹⁸.

- Trabecular o infiltrativo: es un tumor difuso compuesto por espículas o trabéculas elongadas e invasivas con bordes irregulares y un frente de avance infiltrativo. (Fig. 1.4)

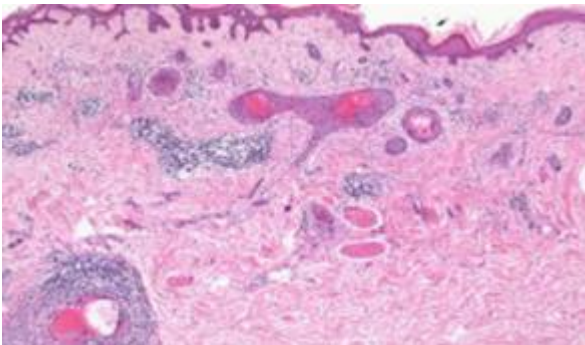


Fig. 1.4. CBC trabecular. **Foto tomada por:** Carra RA, Taibjeeb SM, Sanders DSA. Basaloid skin tumours: basal cell carcinoma. Curr Diagn Pathol 2007; 13:252–272¹⁸.

- Morfeiforme: muestra un tumor mal definido de células característicamente falta de empalizada. Presenta yemas o hebras de tumor que se extiende a distancias variables en la dermis con intensa proliferación de estroma fibroso. Se evidencia en algunos casos en una forma menos agresiva de cáncer y la participación sub-clínica es extensa^{15, 18}. (Fig. 1.5)

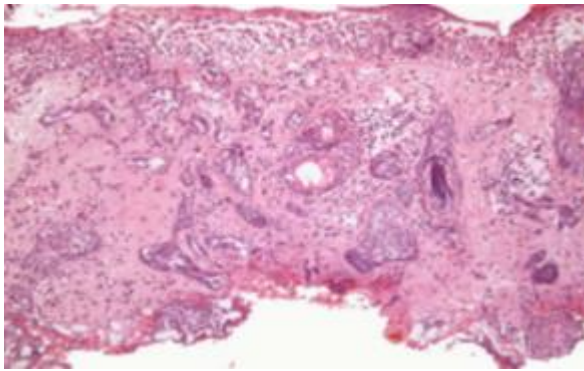


Fig. 1.5. CBC morfeiforme. **Tomado de:** Carra RA, Taibjeeb SM, Sanders DSA. Basaloid skin tumours: basal cell carcinoma. *Curr Diagn Pathol* 2007; 13:252–272¹⁸.

1.1.2.5 Patogénesis.

Muchos creen que los CBC surgen de células pluripotentes basales de la epidermis o estructuras foliculares. Los tumores generalmente surgen de la piel y ocasionalmente surgen de la vaina externa de la raíz del folículo piloso, a saber, el tallo del folículo piloso son células que residen justo debajo del conducto de la glándula sebácea en la región llamada protuberancia¹⁹.

Esta trayectoria afecta la diferenciación de una variedad de tejidos durante el desarrollo fetal. Después de la embriogénesis, continúa la función en la regulación del crecimiento y diferenciación celular. La pérdida de la inhibición de esta vía está relacionada con tumores malignos humanos, incluyendo CBC. El gen hedgehog codifica una proteína extracelular que se une a un complejo receptor de la membrana celular. De los tres conocidos homólogos humanos, Sonic hedgehog (Shh) es la proteína más pertinente para el CBC, al producirse su unión con otros genes para el desarrollo de tumores, aunque no se conoce completamente esta unión¹³.

La radiación ultravioleta se ha implicado como factor principal en la génesis del CBC, por el efecto deletéreo que ejerce sobre el ADN (Ácido desoxirribonucleico) de los queratinocitos de la piel, pero se requiere además una respuesta defectuosa del huésped a dicha radiación para que se generen los eventos que determinarán la aparición del tumor^{11, 13, 19 – 23}.

La exposición a la radiación ultravioleta de tipo B (radiación UVB) en el espectro de 290 – 320nm, induce la formación de enlaces covalentes entre las bases pirimidínicas generando fotoproductos como dímeros de ciclodipirimidina y lesiones que de no ser reparadas se vuelven mutagénicas. Existen además polimorfismos de diversos genes fuertemente asociados a un incremento en la susceptibilidad a la radiación ultravioleta (UV) y a determinado fenotipo en el individuo, tal es el caso del gen del receptor de melanocortina 1 (MC1R) asociado

a un aumento del riesgo de CBC hasta 3,6 veces y a la presencia de más de un tumor, el riesgo conferido por este gen tiende a ser mayor en los fototipos oscuros^{21, 22}.

Mutaciones en los genes supresores tumorales p53 y PTCH, también como consecuencia de la radiación UV, dan como resultado proteínas truncadas que carecen de la capacidad reparadora de la proteína normal y elevan el riesgo de carcinogénesis. Se ha postulado que este factor puede contribuir al desarrollo de CBC en individuos jóvenes. Otro factor etiológico es la presencia de polimorfismo de genes implicados en la reparación de la escisión de nucleótidos causada por la radiación UV, otros autores sugieren el rol del complejo de reparación de la rotura de doble cadena y de alteraciones de genes tales como E185Q en la proteína p95²¹⁻²³.

1.1.2.6 Factores de riesgo asociados:

Entre los factores de riesgo que se han asociado al CBC están: la edad avanzada, la exposición a la luz solar, la exposición al arsénico, las cicatrices previas post traumáticas y post-quirúrgicas y la radioterapia (RT); mientras que la inmunosupresión es considerada un factor predisponente²⁴⁻³².

La herencia juega un rol importante con patologías como el Síndrome de Gorlin y el Xeroderma pigmentoso. Estos pacientes desarrollan carcinomas de células basales a partir de la tercera década de la vida^{26, 27, 33}.

Hace más de una década que se ha venido estudiando la asociación de la infestación por *Demodex folliculorum* con el folículo piloso el cual habitan y sus consecuencias, lo cual ha dado origen a nuevas hipótesis, siendo necesarios más estudios para reforzar estos hallazgos^{34, 35}.

1.1.2.7 Características clínicas.

La localización de presentación del CBC en el área periocular según la frecuencia es: párpado inferior 65%, canto medio 15%, párpado superior 15% y canto externo 5%¹⁵. El tumor presenta un crecimiento lento, siendo invasivo de forma local pero sin mostrar metástasis la gran mayoría de las veces. Aquellos tumores que se hallan cerca del canto medial tienen mayor tendencia a la invasión tanto de la órbita como de los senos siendo por lo tanto más complicados de tratar y presentando un riesgo mayor de recidiva que aquellos que tienen lugar en otras localizaciones de la región palpebral. Además aquellos tumores que consiguen reaparecer tras un tratamiento incompleto, lo hacen de forma más agresiva dificultando su tratamiento, de allí la importancia del tratamiento primario³⁶.

El subtipo más prevalente es el nodular con el 80% de los casos. Hay que tener especial cuidado con ciertos tipos como el morfeiforme ya que a pesar de representar tan solo el 2% de los basaliomas, presenta un peor pronóstico³⁷. (Fig. 1.6)

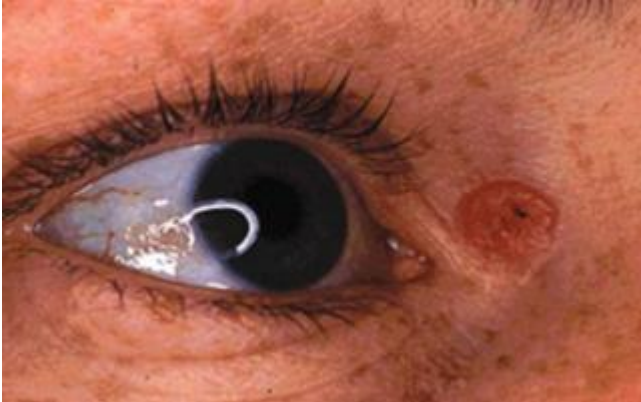


Fig. 1.6. CBC esclerodermiforme en canto interno. **Tomado de:** Payne JW, Duke JR, Butner R et al. Basal cell carcinoma of the eyelids. A long-term follow-up study. Arch Ophthalmol 1969; 81: 553-558³⁷.

1.1.2.8 Variedades clínicas de presentación:

- Nodular: se inicia como lesión traslúcida con telangiectasias y centro deprimido con tendencia a la ulceración y al sangrado³⁷. (Fig. 1.7)

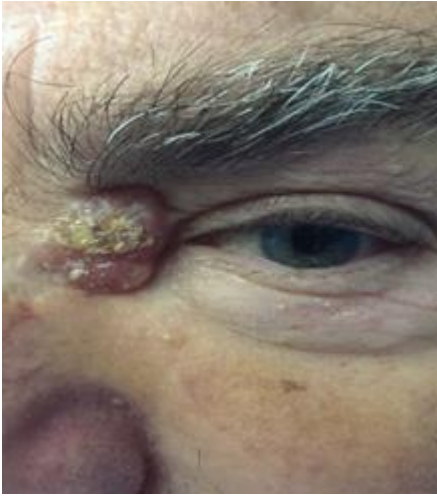


Fig. 1.7. CBC nodular del canto interno. Paciente del Dr. Manuel Cobos, Hospital Juan Ramón Jiménez. Huelva.

- Morfeiforme / Esclerosante: Es una lesión pálida de bordes mal definidos, usualmente mal diagnosticada inicialmente como blefaritis que no mejora a los múltiples tratamientos. Este subtipo clínico tiene tendencia a invasión local (órbita, vía lagrimal, cavidad craneana), especialmente si no se trata oportunamente, produciendo desplazamiento del globo y diplopía. (Fig. 1.8)

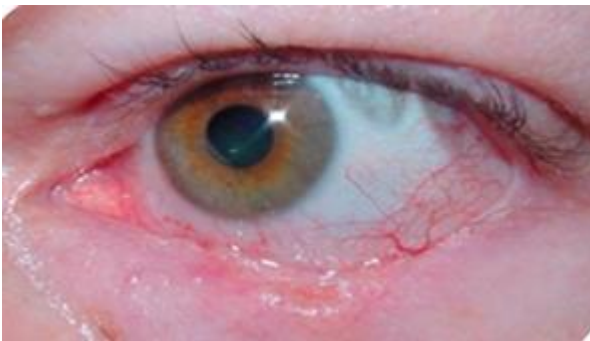


Fig. 1.8. CBC esclerosante de párpado inferior. **Tomado de:** Pfeiffer MJ, Pfeiffer N, Valor C.. *Descriptive study on basal cell eyelid carcinoma*. Arch Soc Esp Oft 2015; 90 (9): 426-431³⁸.

- Quística: Constituye entre el 4 a 8% de los tumores; clínicamente se presenta como placas redondeadas o pápulas que suelen estar bien definidas y tener una coloración gris azulado con áreas perladas. En cuanto a su superficie, tiende a ser lisa con ciertas telangiectasias. Puede ser confundido con quistes de párpados por lo tanto cualquier quiste de párpados aparentemente benigno con rasgos atípicos se deben enviar para la histopatología análisis^{37, 38}.

- Pigmentado: es un sub-tipo de CBC nodular, sin embargo, cualquier modalidad de CB puede pigmentarse hasta en el 8% de los casos, fundamentalmente las formas superficiales y perladas. Constituyen el 6% del total de los CBC. Este tumor presenta una pigmentación con diferentes gamas de colores de marrón a negro, generalmente moteada, debido al cúmulo de melanina. Son más frecuentes en personas de piel oscura con fototipo IV -V. La fagocitosis de los melanosomas por parte de las células tumorales y la presencia de los melanóforos en el estroma y en el parénquima de los tumores es la causa de la pigmentación de este subtipo de CBC, clínicamente suele confundirse con melanoma^{37, 38}.

- Superficial: Representan el 9 al 11% de los CBC. Es una placa eritemato-escamosa, circunscrita, de tipo psoriasiforme, con crecimiento lento que tiende con la cronicidad a ulcerarse, a menudo se observa una zona central más clara simulando curación por medio de una cicatriz blanquecina. Su localización más frecuente es el tronco y extremidades^{32, 33} (Fig. 1.9).

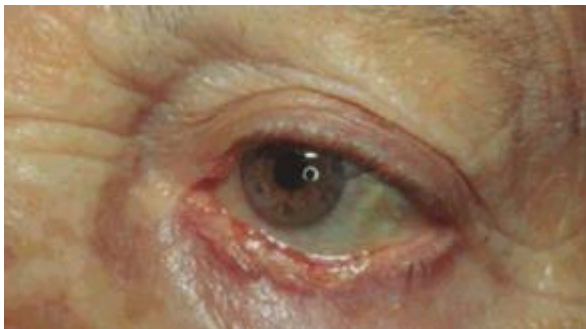


Fig. 1.9 CBC superficial. **Tomado de:** Silverman MK et al. *Recurrent rates of treated basal cell carcinomas*. Part 1: overview. *J Dermatol Surg Oncol* 1991; 17: 713³⁹.

- Infiltrativo: Es un tumor que crece expansivamente. Conocido también como *Ulcus Rodens* o úlcera de Jacobi, se localiza en el surco naso-labial, en el ángulo del ojo y alrededor de las orejas. Se caracteriza por ser una úlcera serpiginosa y penetrante, de aspecto hemorrágico, de crecimiento rápido que alcanza gran tamaño e infiltra cartílago o hueso ocasionando mutilaciones, el borde es usualmente mal definido y a menudo se extiende más allá de los márgenes clínicos. Generalmente resulta de un CBC no tratado. A menudo puede presentarse también como una úlcera no dolorosa con un borde similar a un collar

de perlas y se le denomina *Ulcus terebrans*. Éstas pueden afectar al cartílago, al hueso, además de la piel, pero las metástasis son raras³⁸.

1.1.2.9 Diagnóstico

Los criterios de diagnóstico de los CBC tienen por base:

- Las características dermatoscópicas, un criterio positivo de CBC y criterios negativos de lesión melanocítica.
- Las características clínicas del tumor, así como la evolución presentada por la lesión.
- La histopatología, siendo ésta una regla fundamental de CBC⁴⁰.

A continuación, se puede encontrar el desglose de la clasificación tumoral en base al tumor primario, su extensión o no extensión a los ganglios regionales, y la existencia o no de metástasis a distancia: (Fig. 1.10)

Tumor primario	
TX	Tumor primario no puede ser evaluado.
T0	No hay evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor de 2 cm o menos en su diámetro mayor.
T2	Tumor mayor de 2 cm y menor de 5 cm en su diámetro mayor.
T3	Tumor mayor de 5 cm su diámetro mayor.
T4	Tumor que invade estructuras profundas extradérmicas (cartílago, músculo esquelético o hueso).

Ganglios regionales	
NX	Ganglios regionales no pueden ser evaluados.
N0	No hay ganglios regionales metastáticos.
N1	Ganglios regionales metastáticos.
Metástasis a distancia	
MX	Metástasis a distancia no puede ser evaluada.
MO	No hay metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia demostrada.

Fig. 1.10. Sistema de clasificación TNM del CBC. **Tomado de:** Weber R, Callender D. Clinical Assessment and Staging. En: *Basal and Squamous Cell Skin Cancers of the Head and Neck*. London: Williams&Wilkins; 1996. Cap 7. pp 65-77⁴¹.

- La biopsia incisional puede ser necesaria antes del tratamiento para confirmar el diagnóstico. Esto no siempre es necesario si el diagnóstico es obvio clínicamente y si la lesión es pequeña (menor de 2 cm) donde es posible realizar una biopsia excisional (retirando en su totalidad la lesión). Incluso si el diagnóstico es evidente puede realizarse una biopsia previa si la consecuencia de la cirugía definitiva es dramática: por ejemplo, si las cirugías implican malformación o pérdida del ojo⁴⁰.

- La tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) se utilizan para investigar lesiones más grandes donde se sospecha una invasión intraorbitaria⁴⁰.

1.1.2.10 Diagnóstico diferencial

Las formas superficiales pueden simular un eczema numular, la enfermedad de Bowen y la Psoriasis. Las formas perladas se tienen que diferenciarse de las queratosis seborreicas, los nevus melanocíticos maduros, los carcinomas espinocelulares, los melanomas, los tricoepiteliomas, y los tumores anexiales.

En lo referente al diagnóstico diferencial a nivel histopatológico, existen muchas neoplasias cutáneas que pueden simular un CBC. Por regla general, el diagnóstico se establece en base a la conexión epidérmica, presencia de mucina y retracción del estroma, las figuras de mitosis y las imágenes de apoptosis.

De forma excepcional, la diagnóstico diferencial se genera en base al subtipo microscópico de CBC:

- Patrón micronodular o nodular: debe diferenciarse del hidradenoma nodular, el espiadenoma ecrino y el tricoepitelioma/tricoblastoma.

- En el patrón superficial: debe diferenciarse de la queratosis seborreica y de la queratosis actínica.
- En el patrón queratósico e infundíbulo-quístico: debe diferenciarse del hamartoma folicular basaloide, del tricoepitelioma/tricoblastoma, de la queratosis seborreica reticulada y del carcinoma cloacogénico.
- En el patrón infiltrativo o esclerótico (morfeiforme): debe diferenciarse del tricoepitelioma desmoplásico y del carcinoma anexial microquístico.
- En el patrón adenoide y fibropitelioma (de Pinkus): debe diferenciarse del tumor mixto maligno de la piel (siringoma condroide maligno), del carcinoma adenoide quístico cutáneo primario y del adenocarcinoma papilar digital agresivo.
- En el patrón de células claras: debe diferenciarse del tricolemoma, del adenoma sebáceo, del acantoma de células claras, del hidradenoma de células claras, del nevus o del melanoma de células balonizantes, así como de las metástasis (p.e., carcinoma de células renales convencional).
- En el patrón metatípico: debe diferenciarse del CEC^{40, 42}.

1.1.2.11 Tratamiento.

El objetivo del tratamiento es la resección completa del tumor incluso si compromete la apariencia estética del paciente con la posterior reconstrucción consiguiendo de esta manera una curación en más del 90% de los casos^{15, 43-46}.

Es importante recordar que el CBC tiene bajo potencial metastásico y el tratamiento se focaliza en el control local¹⁵.

Las claves para determinar qué conducta quirúrgica tomar son:

- El techo orbitario en función de la invasión de la fosa cerebral.
- La invasión de los músculos extrínsecos o la esclera en relación a la conservación del globo ocular.
- La relación existente con respecto al seno maxilar y el piso orbitario.
- La invasión de la lámina perpendicular del etmoides y las celdillas etmoidales a nivel de la pared medial.

La resección quirúrgica es el tratamiento de elección del CBC. Para lesiones grandes primero se requiere biopsia incisional con posterior resección mediante cirugía micrográfica de Mohs (actual Gold Standard), que tienen la ventaja de la evaluación histológica intraquirúrgica¹⁵. Otras terapias se mencionan a continuación:

- Terapia de radiación: La radioterapia (RT) es eficaz como tratamiento primario de varios CBCs. Para la mayoría de estos, las tasas de curación se acercan al 90%. Esta es especialmente útil para pacientes que no pueden tolerar fácilmente una intervención quirúrgica como sujetos ancianos u otras patologías asociadas como discrasias sanguíneas. La irradiación puede ser útil en pacientes que tienen tumores agresivos y que ya obtuvieron tratamiento por cirugía previamente o si la operación no puede limpiar el borde dejándolo libre del tumor. La radiación es también una excelente opción para los pacientes que rechazan la cirugía debido al tamaño de la lesión o estructuras que pueda ser deformante. Es recomendado no usar la RT en individuos menores de 60 años dado su potencial para la carcinogénesis y resultados cosméticos inferiores⁴⁷.

Los primeros resultados cosméticos tienden a ser buenos y esta terapia puede ser menos distorsionante que la extirpación quirúrgica, sin embargo a largo plazo los resultados después de algunos años pueden ser peores debido a los efectos adversos de la RT⁴⁷. Otra desventaja de este método es que el margen de la lesión no puede ser examinado dejando los tejidos alterados a nivel microscópico. Los tumores recurrentes en sitios previamente irradiados tienden a ser agresivos y es difícil de tratar y reconstruir posteriormente. La RT permanece como una opción viable en ciertos pacientes con CBC⁸.

- Crioterapia: La crioterapia es también un tratamiento eficaz para las personas con lesiones más agresivas CBC alcanzando tasas de curación cercanas al 90%. Sin embargo es una terapia que depende en gran medida de la experiencia del especialista en el área. La cura óptima se alcanza cuando la profundidad, duración y temperatura de la manipulación es exacta para tratar la lesión^{45, 46}.

- Criosondas: Es una terapia de tratamiento alternativa de los CBC. Los pacientes deben estar dispuestos a portar inmediatamente después del tratamiento hinchazón y necrosis que resulta en áreas tratadas con posterior cicatrización^{45, 46}.

- Terapia tópica con Imiquimod^{46, 49-52}: Este medicamento es un modificador de la respuesta inmune y fue aprobado por la FDA en julio de 2004 para el tratamiento de lesiones que cumplieran las siguientes características: deben ser demostradas por biopsia, de tamaño menor a 2 cm de diámetro, primarias, superficiales de la piel del tronco o del cuello, adultos con sistemas inmunes normales. El esquema de aplicación de cinco días a la semana por seis semanas ha reportado aclaramiento histológico del 82% a las 12 semanas^{15, 52}. Sin embargo, se ha detectado que el uso de esta droga produce malestar debido a

efectos colaterales que desaparecen después de la culminación del tratamiento. La tasa de recurrencia del tumor en el párpado a los 3 años fue de 0 %⁵³.

1.1.2.12 Pronóstico.

Casi nunca existen metástasis a distancia a pesar de invadir los vasos linfáticos³. La resección incompleta se relaciona con recurrencias agresivas e invasión orbitaria especialmente los del canto interno. La mortalidad es menor del 1%¹⁵.

1.1.3 *Demodex folliculorum*

1.1.3.1 Taxonomía

- Phylum: Artropoda
- Subphylum: Chelicerata
- Clase: Arachnida
- Subclase: Acarina
- Orden: Acariforme
- Suborden: Prostigmata
- Familia: Demodicidae
- Género: *Demodex*
- Especie: *folliculorum*, *brevis*, *canis* y *cati* ⁵⁴.

Solo las especies *D. folliculorum* y *D. brevis* viven en los humanos, pero se han identificado alrededor de 100 especies en diversos animales⁵⁵.

1.1.3.2 Generalidades.

La palabra *Demodex* proviene de dos términos griegos, DEMO = grasa y DEX = gusano de la madera⁵⁴.

Se ubica principalmente en los folículos pilosos, en las glándulas sebáceas y en las glándulas meibomianas de mamíferos. En el humano solamente dos especies se han encontrado: *D. folliculorum* (DF) y *D. brevis* (DB)^{54, 55}.

El primero en detectar el DF fueron Henle y Berguer en 1841 y descrito en detalle por Simón en 1842; sin embargo, el primero en describirlo en la región ocular fue Becker en 1875 en el ducto excretor de una glándula de Meibomio y en 1978 Majocchi lo recogió de un chalazión en un paciente con blefaritis crónica^{55, 57}.

Spickett y cols., realizaron las primeras descripciones detalladas del ciclo de vida del *Demodex*. Tiene un ciclo de vida de aproximadamente 14.5 días, son; son ácaros móviles con una velocidad de 16 mm por hora y son fototáxicos negativos. En su estado larvario realiza dos mudas antes de convertirse en su forma adulta. El *Demodex* se nutre de material sebáceo, linfa, plasma y células epiteliales de la piel lo cual explicaría su preferencia como hábitat las áreas seboreicas faciales⁵⁴. Se encuentra tanto en personas normales como en

pacientes con entidades dermatológicas fuertemente relacionadas con su presencia³⁴.

La demodicosis o demodicidiosis es una enfermedad que se presenta a nivel mundial, causada por el *Demodex*, un ácaro comensal el cual es uno de los ectoparásitos más comunes en el ser humano habitándolo sin causar enfermedad en la gran mayoría de pacientes.

Es considerado agente patógeno especialmente en pacientes inmunocomprometidos como en la leucemia, VIH o insuficiencia renal^{58, 59} y en pacientes inmunocompetentes se relacionan con la blefaritis crónica^{60, 61} y la rosácea⁶², entre otras, con una prevalencia variable que aumenta con la edad⁶³.

1.1.3.3 Ciclo biológico

El ciclo biológico del género *Demodex* es complejo, desarrollándose completamente en el hospedador, ya que es un parásito obligado. Las especies parásitas del hombre son *DF* y *DB*.

La duración del ciclo en el hombre es de 3 a 4 semanas según la especie, aunque “*in vitro*” es de dos semanas aproximadamente, siendo el intervalo entre copulación y ovoposición de 12 horas. Del huevo de aspecto fusiforme, emerge una larva I con tres pares de patas inmóviles. Luego ésta se transforma en larva II

quien también tiene tres pares de patas aunque ésta ya se desplaza lentamente. En 6 a 7 días aparece una protoninfa con cuatro pares de patas, la que originará la ninfa II, con piezas bucales ya desarrolladas para finalmente dar origen al estadio adulto con diferenciación sexual y patas completas⁶⁴.

Las hembras salen de la unidad pilosebácea en la noche y migran a través de la superficie de la piel para encontrar con quien reproducirse. La cópula tiene lugar cerca de la entrada del folículo piloso. Posteriormente las hembras grávidas se mueven en el interior de la glándula sebácea donde depositan los huevos de los cuales emergen las larvas 60 horas más tarde⁶⁴.

El estadio adulto es transparente, alargado y mide entre 100 y 400 μm de largo y 40 a 50 μm de diámetro con un cuerpo segmentado y con cuatro pares de patas atrofiadas y formado por una parte anterior: el prosoma o cefalotórax y de una parte posterior: el opistosoma o abdomen. El prosoma está compuesto por el gnatosoma que contiene las piezas bucales (boca, estiletes y pedipalpos) y el podosoma que contiene los cuatro pares de palpos motores o patas. El opistosoma constituye los 2/3 del largo total del parásito. No posee ano ni aparato excretor⁶⁴.

Los huevos miden de 30 a 40 μm de largo y presentan aspecto ovoide, con un extremo aguzado. Su hábitat es la piel (preferentemente cutis graso), las glándulas sebáceas y los folículos pilosos. Si bien se localiza preferentemente en

nariz y párpados, se lo puede encontrar en cualquier región del cuerpo, inclusive la zona pubiana y tórax⁶⁴.

DB se aloja preferentemente en las glándulas sebáceas y es más solitario (máximo de tres ejemplares por sector) y rara vez es hallado en el pelo del folículo. *DF* es hallado con más frecuencia sobre la superficie de la piel, especialmente si ésta es muy grasa y en el canal de la unidad pilo-sebácea⁶⁴.

1.1.3.4 Especies de *Demodex*. (Fig. 1.11 y 1.12)

La especie más importante para el ser humano son dos: el *DF*, que mide 250-300µm y se alimenta de células epiteliales del folículo piloso, causando daño directo, distensión folicular, madarosis y triquiasis. Este tipo de *Demodex* genera hiperqueratinización reactiva entorno a la base de las pestañas e hiperplasia epitelial, formando la caspa cilíndrica clásica de la blefaritis por *DF*, depositando huevos, excretando desechos, y muriendo en el interior de los folículos. Tienen un ciclo de vida de aproximadamente unos diez días de duración, pasando por cinco fases: huevo, larva, protoninfa, ninfa y adulto^{54, 64}.

El *DB* habita en las glándulas sebáceas y mide 150-200 µm causando un bloqueo de los orificios de las glándulas de Meibomio, dando lugar a su disfunción,

reacción granulomatosa a cuerpo extraño y provocando patología como chalazión recurrente^{57,64, 65}.

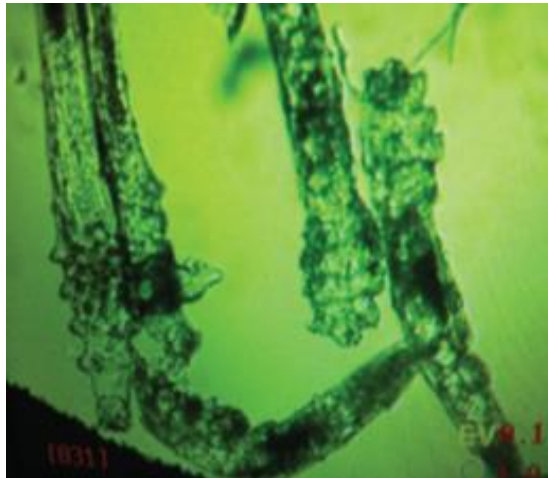


Fig. 1.11. Ejemplar adulto de *DF* sobre pestaña de paciente con blefaritis. **Tomada por:** Coston TO. *Demodex folliculorum* blepharitis. Trans Am Ophthalmol Soc. 1967; 65:361–392⁶⁶.



Fig. 1.12. Presencia de *Demodex* en pestañas. **Tomado por:** Zhao YE, Wu LP, Hu L, Xu JR. *Association of blepharitis with Demodex: a meta-analysis*. Ophthalmic Epidemiol 2012; 19:95-102⁶⁷.

1.1.3.5 Hábitat

DF y *DB* se hallan en diferentes sitios de los complejos pilo-sebáceos de la piel. Así mientras el *DB* se localiza en las glándulas sebáceas y de meibomio de los cabellos; *DF* se encuentra en los ductos pilo-sebáceos a nivel de las glándulas sebáceas. Por lo general, para el *DF* se encuentran hasta tres o más ácaros en un solo folículo, mientras que el *DB* por lo general se encuentra en los acinos glandulares de forma solitaria, siendo normalmente una hembra^{56, 64, 65}.

Por lo general en un mismo paciente se encuentra tan sólo una especie de las dos, no obstante, sí que se han registrado casos donde ambas especies se encontraban conviviendo. En cuanto a la distribución topográfica, el *Demodex* aparece de forma más frecuente en la nariz, siendo las pestañas y el meato auditivo externos los otros sitios en los que aparecen más frecuentemente, aunque de forma esporádica también se ha podido encontrar sobre la mejilla relacionándolo con la rosácea. Su incidencia es más frecuente en los párpados inferiores, lo que se puede explicar teniendo en cuenta que se trata del párpado más cercano a la nariz⁷⁶.

Se considera *DF* como un patógeno de bajo grado, pues a pesar de nutrirse de células del epitelio folicular, la metaplasia epitelial y distensión folicular sólo aparecen cuando un mismo folículo alberga más individuos de lo habitual asociado a un sistema inmune débil⁷⁶.

Se estima que el *Demodex* hace uso de las glándulas sebáceas, sin embargo no se han podido encontrar evidencias de metaplasia glandular. Ha sido implicado como el agente constante de la piel de pacientes con rosácea granulomatosa o papulo-pustular incluyendo presencia en aisladas pápulas inflamatorias, en la rosácea eritemato-escamosa con semejanza a la pitiriasis, en la alopecia en el cuero cabelludo y en los casos aislados en la seborrea, la blefaritis, la atrofia dérmica, los carcinomas de pulmón, la meibomitis, la pigmentación de piel palpebral y chalazión.⁷¹ También se ha asociado a en casos de inmunodepresión, como puede ser el caso de infección por HIV, leucemia y quimioterapia por cáncer^{35, 72-75}.

1.1.3.6 Patogenia

El verdadero rol del *DF* en patología dermatológica es hoy en día tema de debate. Mientras algunos le otorgan rol de comensal, otros en cambio lo señalan como el principal implicado en dermatitis humanas, sin descartar al *DB*, quien también estaría involucrado en la producción de dermatopatías, especialmente rosácea^{73, 76}.

El *DF* y el *DB* son ectoparásitos que pueden causar una variedad de desórdenes en humanos. *Demodex* suele ser considerado comensal en la piel humana⁷⁰.

En hospedadores inmunocomprometidos se lo ha hallado asociado con leucemia linfoblástica aguda (LLA) en niños donde producía dermatitis peri-oral y erupción demodécica con lesión primaria de 1 a 2 mm de diámetro, áspera, papulo-eritematosa con finas escamas agrupadas en racimos con configuración en anillo o serpenteante. La escasa cantidad de casos reportados en población pediátrica quizás se deba a la reducida actividad de las glándulas sebáceas en niños⁶⁵.

La vía de infestación se desconoce, aunque se supone que se trataría de contacto directo de persona a persona. La mayoría de los autores correlacionan la concentración parasitaria (número de parásitos hallados por unidad de superficie estudiada), con enfermedad en el humano, no obstante, estas relaciones cuantitativas aún suelen ser motivo de controversia⁶⁵.

En el hombre se lo ha implicado en la producción de diversas entidades como son la rosácea eritemo-escamosa tipo pitiriasis, en la variante papulo-pustulosa o estadio III y en la variante granulomatosa, así como en las blefaritis crónicas, también denominada en ocasiones rosácea ocular, dermatitis perioral y nódulos inflamatorios^{72, 73, 77}.

En la Demodicidosis, los estudios hísticos demuestran que la presencia de *DF* en los folículos se correlaciona con infiltrado linfocítico alrededor de los mismos. Cuando el ácaro cruza la barrera folicular y penetra en la dermis, puede

precipitar una reacción granulomatosa donde las células gigantes lo fagocitas (reacción tipo rosácea granulomatosa)⁷⁸. La demodicidosis se ha observado en pacientes con alteraciones en las células T con incrementos en linfocitos CD4+ y CD5+ y disminución de los CD8+ en el infiltrado inflamatorio de la pared folicular y la epidermis. Esto juega un rol importante en la susceptibilidad a la infección oportunista en estos pacientes. En pacientes tratados con inmunosupresores, las erupciones demodécicas ocurren durante estos períodos. También se lo ha encontrado asociado con lesiones papulares en cara en pacientes con SIDA. El predominio de células T en infiltrados dérmicos de pacientes con rosácea en asociación muy frecuente con *Demodex*, refuerza la hipótesis de que la respuesta inmune mediada por células juega un importante rol en la patogénesis de esta patología, asociada con este ácaro⁷⁹.

En pacientes con rosácea, con antígenos preparados, se demostró la presencia de respuesta humoral en suero y en estudios in-muno-histo-patológicos se puso en evidencia IgG género-específica y un predominio de células T en el infiltrado inflamatorio de las lesiones al igual que en casos de rosácea ocular⁷⁹.

Al existir una asociación estadísticamente significativa entre las dermatopatías mencionadas y *DF* y que se produce una remisión de los cuadros después de tratamiento específico para el ácaro, además de que al estar asociado con situaciones de estrés o virosis podemos considerar al *DF* un parásito oportunista, que en determinadas situaciones es capaz de agravar o producir

dermatopatías por sí mismo comportándose en estas situaciones como un verdadero patógeno. La localización intradérmica del parásito favorecería esta situación. Además el comportamiento inquieto del mismo, moviéndose desde la superficie de la piel hacia los folículos pilosos facilitaría el ingreso por arrastre o contaminación de patógenos bacterianos que pudieran estar sobre la piel de las personas, produciendo infecciones bacterianas secundarias^{78, 79}.

1.1.3.7 Manifestaciones clínicas de la infestación por *Demodex*:

Destacan caspa cilíndrica típica en la raíz de las pestañas, pestañas mal dirigidas, disfunción de las glándulas de Meibomio, inflamación del margen palpebral, inflamación de la conjuntiva bulbar, infiltración corneal y pannus. (Fig. 1.13)

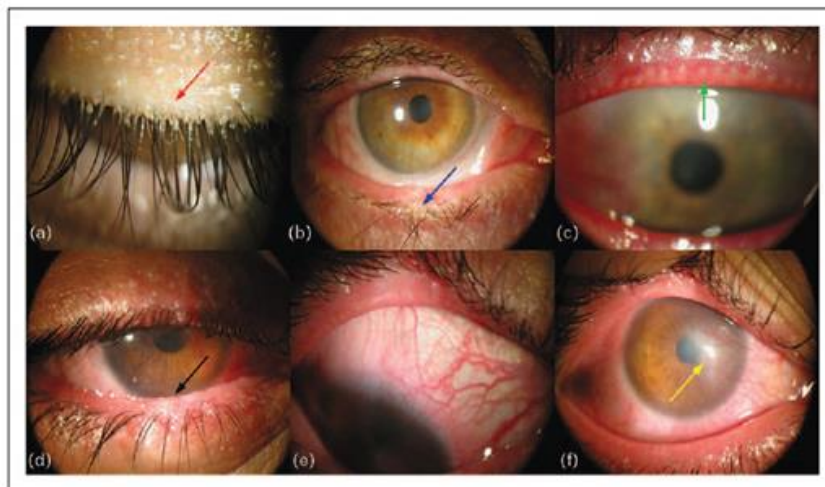


Fig. 1.13. Variedades de la infestación a. Caspa cilíndrica típica en la raíz de las pestañas (rojo). b. Pestañas mal dirigidas pestañas (azul). c. Disfunción de la glándula de Meibomio (verde). d. Inflamación margen palpebral (negro). e. Inflamación conjuntiva bulbar. f. Infiltración corneal y pannus (amarilla). **Tomado de:** Pathogenic role of *Demodex* mites in blepharitis; Jingbo LB, Hosam S, and Tsenga SCG. 2010⁷⁶.

1.1.3.8 Diagnóstico morfológico del agente infestante.

Se basa en la visualización directa del *Demodex* al microscopio óptico, con la desventaja de los diferentes métodos dan resultados muy variables⁷⁸.

Erbagci, Z. y colaboradores, quienes previamente han encontrado asociación entre las lesiones del borde palpebral tipo CB con el *DF*, han usado el método de conteo directo del ácaro de las piezas bajo microscopio de luz, método poco rentable ya que es difícil distinguir el ácaro de los detritos celulares una vez extraída y procesada la muestra, siendo más reproducible y con mayor validez científica el uso de las técnicas nuevas de biología molecular realizadas en el laboratorio de biología molecular como es la PCR cuantitativa^{80, 81}.

1.1.4 Biología molecular y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se han desarrollado técnicas moleculares de Reacción en Cadena de la Polimerasa “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR) para la detección y cuantificación del *DF*, con el fin de estandarizar con mayor precisión el diagnóstico y el índice parasitario en lesiones cutáneas.

La PCR se basa en formar copias de fragmentos de ADN a partir de un molde, con la siguiente expansión 2^N en donde N es el número de ciclos. Así en N=35 ciclos se obtendrían 34.359.738.368 copias. Esta técnica tiene como finalidad facilitar la detección del fragmento de ADN diana. Se utiliza para el diagnóstico de virus, bacterias y otros organismos así como en la identificación de cadáveres, entre otros⁸². (Fig. 1.14)

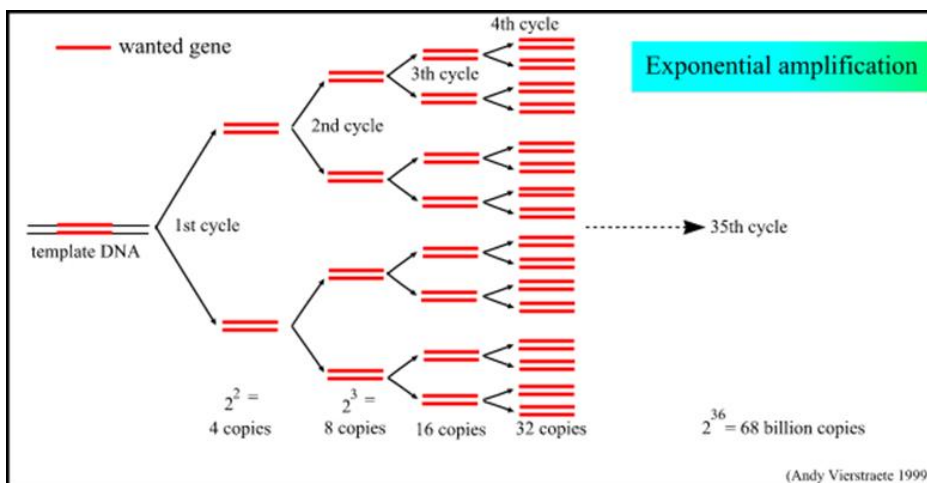


Fig. 1.14. Amplificación exponencial del ADN en la PCR. Vierstraete Andy. 1999⁸².

La PCR puede ser de diversos tipos: anidada, de extensión solapada (mutagénesis), *in situ*, múltiple, con transcriptasa inversa (RT – PCR), en tiempo real o cuantitativa (qPCR)^{81, 83, 84}. También la podemos dividir en método convencional y en PCR a tiempo real. (Fig. 1.15 y 1.16)

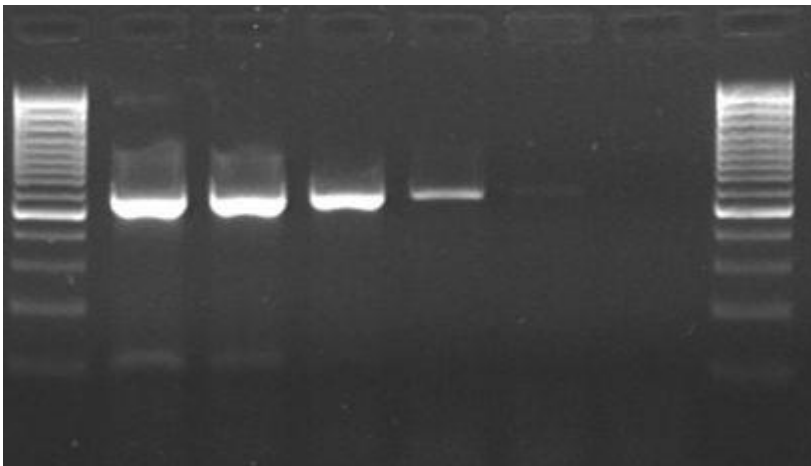


Fig. 1.15 Método convencional de la PCR. Separación de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa en PCR a tiempo final. Tomado de <http://www.ainia.es/insights/conoce-las-normas-y-requisitos-para-el-analisis-microbiologico-de-alimentos-mediante-pcr/>

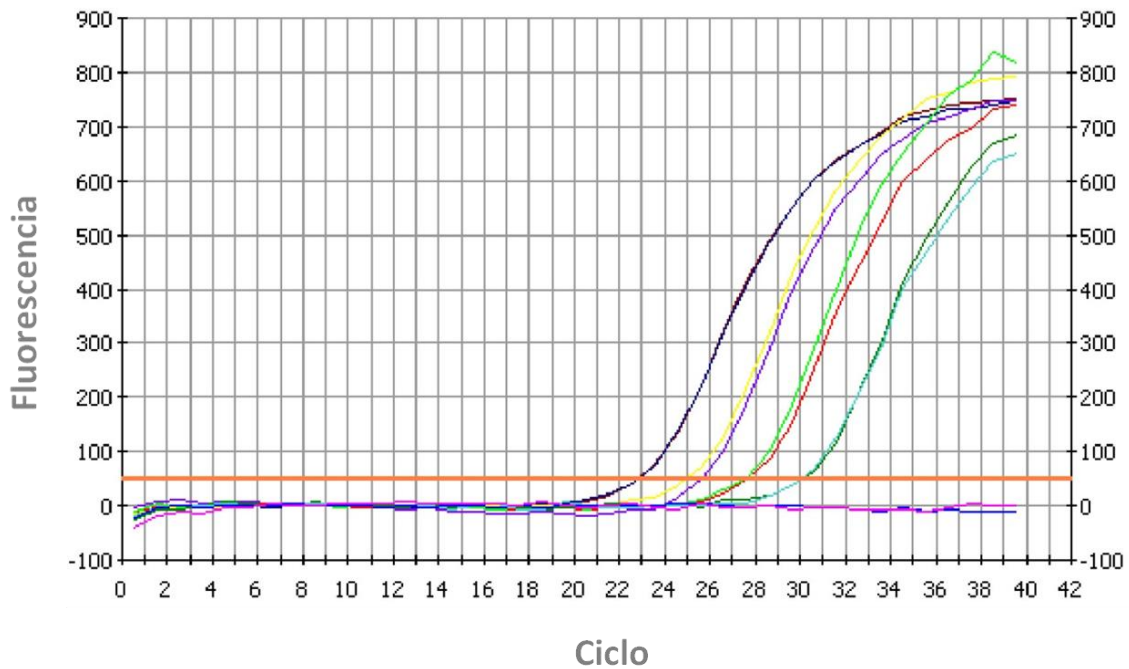


Fig. 1.16 Gráfica de amplificación en ciclos mediante PCR a tiempo real. Tomado de <https://analyticalbiotech.files.wordpress.com/2012/07/real-time-pcr1.png>

La PCR requiere unos pasos o fases. A partir de una muestra biológica se realiza la extracción de ácidos nucleicos. La PCR propiamente dicha requiere desnaturalización, alineamiento y amplificación, finalmente se realiza la lectura a punto final o en tiempo real.

La extracción de ácidos nucleicos es la liberación de moléculas de ADN o ARN del interior celular hacia el exterior, previa ruptura de las células y purificación posterior de dichas moléculas, eliminando el resto de residuos o restos celulares. (Fig. 1.17)



Fig. 1.17. Kit de extracción manual (Genomic DNA Spin Column-Bioline®).

Según el fundamento se clasifica en: cromatografía de absorción, extracción orgánica o bolas magnéticas y según el grado de automatización se clasifica en: extracción manual (Genomic DNA Spin Column-Bioline®) o extracción automática (EasyMag. Biomerieux®, Maxwell. Promega®)⁸³. (Fig 1.17)

Para la extracción se realizan diferentes pasos:

- Lisis: buffer de lisis. Incubación a 56°C 10 minutos en termo-bloque.
- Purificación: eliminación de residuos mediante una serie de lavados por centrifugación-decantación.
- Elución: recuperación de los ácidos nucleicos purificados y concentrados.

Componentes usados en la extracción.

- Tampón Tris-EDTA (TE): es un buen tampón e inhibidor de nucleasas, que sirve para la conservación del ADN. El EDTA inhibe la PCR a concentraciones superiores a un mililitro.
- Cloroformo: es un componente que permite la separación en dos fases, donde las proteínas y otros contaminantes se quedan en la fase orgánica y el ADN permanece en la fase acuosa.
- Fenol: se trata de una solución que desnaturaliza, de la muestra, las proteínas contaminantes. Se utiliza para eliminar proteínas (nucleasas y proteasas), el rendimiento del PCR disminuye a concentraciones en torno al 0.2%, y cuando llega al 0.5% la inhibe por completo.
- Etanol e isopropanol: son los causantes de que los ácidos nucleicos se precipiten. En concentraciones que sean superiores al 1% posee efectos inhibitorios.
- El SDS se trata de un detergente iónico que modifica a las proteínas e inhibe, a concentraciones mínimas, la PCR.
- Isotiocianato de guanidinio: favorece la disolución acuosa de compuestos insolubles, al ser un agente caotrópico, que además conserva el ARN e inhibe las RNasas.

El proceso de lisis se puede llevar a cabo mediante métodos químicos o físicos:

- Uso de hidróxido con calor.
- Uso de detergentes sin calor o con calor.
- Ebullición en tampón de PCR o en agua destilada.
- Ciclos de congelación y descongelación.
- SDS-proteínasa K, isotiocianato de guanidinio.
- Sonicación.
- Nitrógeno líquido.
- Uso de enzimas tales como la lisozima.

Protocolo simplificado de extracción manual:

- Lisis: muestra + buffer de lisis. Incubación a 56°C, 10 minutos.
- Precipitación: se añade alcohol 70°, se agita y centrifuga. Nos quedamos con el pellet.
- Lavados: Se hacen varios lavados con alcohol.
- Secado: Se deja secar los restos de alcohol que pueda contener.

Elución: Se eluye el ADN en tampón TE.

Reactivos utilizados en la PCR:

- Dos iniciadores o cebadores (*primers*, en inglés), oligonucleótidos, que son, ambos, suplementarios a cada una de las hebras del ADN diana.

- 4 desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTP), que sirven para polimerizar el ADN nuevo.
- Iones divalentes. Se suele usar magnesio (Mg^{2+}). Resultan como cofactores de polimerasa.
- Algunos iones monovalentes, como por ejemplo el potasio.
- ADN polimerasa o la mezcla de diversas polimerasas con una temperatura ideal de funcionamiento cercana a $70^{\circ}C$ (la polimerasa Taq, es la más frecuente).
- Un buffer o una solución tampón mantiene el pH apropiado para que funcione el ADN polimerasa.
- Termociclador, se trata de un aparato que conserva la temperatura requerida para cada una de las etapas de un ciclo.
- ADN molde, contiene la parte del ADN para amplificar.

Ciclo de amplificación (etapas de la PCR)⁸³:

- Inicio. $95^{\circ}C$ unos minutos para activar a la enzima polimerasa.
- Desnaturalización. Separación de las hebras por calentamiento a $95^{\circ}C$.
- Alineamiento o unión del cebador. Hibridación del cebador con la hebra molde. Es necesario bajar la temperatura (T^a) entre $40-68^{\circ}C$ dependiendo de la secuencia del cebador.
- Extensión o elongación de la cadena. A $72^{\circ}C$ que es la T^a óptima de actividad de la Taq polimerasa.

La elongación final, es una única etapa que se realiza a una temperatura entre 70-74°C, durante unos 5 y 15 minutos aproximadamente, tras ciclo final de PCR. Se asegura, con ella, que cualquier ADN de cadena simple que quede, sea ampliado totalmente. (Fig. 1.18)

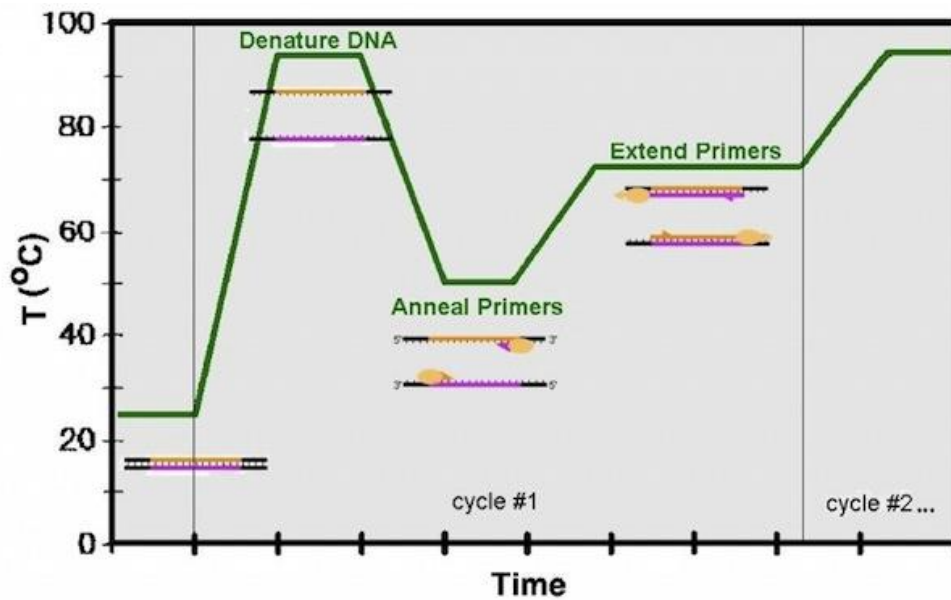


Fig. 1.18. Ciclo de amplificación. Desnaturalización, anillaje, extensión. Tomado de <http://blogdelaboratorio.com/amplificacion-del-adn-la-pcr/>

La utilización de esta técnica ha de estandarizarse para detectar el *Demodex* en tejidos sólidos. La cuantificación del *DF* mediante PCR para humanos solo está descrita en la literatura para el estudio de la rosácea⁷² y que conozcamos, no se ha realizado anteriormente para el estudio del CBC.

1.2 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer constituye una enorme carga para la sociedad tanto en países desarrollados como en los menos desarrollados. Su frecuencia está en aumento por el crecimiento y envejecimiento de la población, así como por la incrementada prevalencia de factores de riesgo tales como el tabaquismo, la obesidad, la inactividad física, cambios en los patrones reproductivos asociados con la urbanización y el desarrollo económico⁸⁵.

Del total de 14 millones de nuevos casos de cáncer, 2,2 millones, un 15 % se atribuye a infecciones, sobre todo virales⁸⁶, y aunque el cáncer de piel es el más frecuente y prevalente, la mortalidad producida por el mismo es muy baja, por lo que en los reportes suelen excluirse de las estadísticas⁸⁵.

En la piel humana es posible encontrar una amplia variedad de seres indetectables a simple a vista, la mayoría de los cuales nunca o solo en condiciones peculiares podría ser responsable de algún daño. Esta colección de moradores oportunistas comprende desde microorganismos hasta artrópodos muy diminutos, cuyas molestias al huésped no exceden las de una circunscrita reacción de rechazo, muchas veces fugaz. Otras podrían provocar una serie de lesiones y comprometer órganos importantes como el de la visión⁸⁶.

Existen cada vez más evidencias de que hay infecciones e infestaciones que son consideradas como fuertes factores de riesgo para cánceres específicos y ya se han considerado 10 infecciones como carcinogénicas para los seres humanos por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer⁸⁶. Sin embargo, no se cita al *Demodex* como posible factor de riesgo o como agente causal de ningún tipo de cáncer hasta el momento actual.

Se ha logrado determinar que esto puede estar dado por la respuesta inmunológica frente a su epítopes. Tienen el simple propósito de colonizar al huésped y nutrirse de las secreciones y descamación de su piel. Entre ellos puede distinguirse a un ácaro minúsculo llamado *Demodex*, de la cual existe la especie *DF* que tiene forma alargada y durante su ciclo de vida van parasitando folículos de la cara, sobre todo de la zona de la nariz y párpados; y el *DB*, pero para efecto de este estudio nos referiremos al primero mencionado⁸⁷.

El CBC es el tumor maligno más frecuente en la piel. En 1996, alrededor de 400.000 pacientes eran tratados por esta enfermedad en los EE.UU. de Norteamérica⁸⁸. Constituye más del 75 % de los cánceres no-melanomas de la piel. Aparece fundamentalmente en la cara, particularmente en la nariz, párpados, cantos mediales y áreas periorbitales^{8, 9, 88, 89}.

La demodicosis es una enfermedad que se presenta a escala mundial, causada por el *Demodex*, un ácaro comensal que es uno de los ectoparásitos más

comunes en el ser humano, habitándolo sin causar enfermedad en la gran mayoría de los casos⁹⁰. Sin embargo es considerado como agente patógeno especialmente en inmunodeprimidos como ocurre en la leucemia, la infección por VIH y la insuficiencia renal. También es bien sabido que la prevalencia de la infestación incrementa con la edad⁵⁹⁻⁶¹.

Los problemas dermatológicos son frecuentes y se estiman que son el 10 % del total de los problemas de atención primaria. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el incremento de cáncer de piel está repuntando en las últimas dos décadas. En el mundo se conoce cada año 2 a 3 millones de casos de cáncer de piel no melanoma donde el principal representante es el CBC. Revelando que uno de cada tres pacientes con diagnóstico de cáncer tiene cáncer cutáneo⁸⁹.

La OMS describe que se agudiza la pérdida de la capacidad de la capa de ozono para la protección contra las radiaciones UV del sol; se calcula que por cada 10% que ésta disminuya ocurrirán 300,000 casos de cáncer no melanoma (CBC) y 4,500 casos de melanoma. Por lo tanto, el mayor factor de riesgo de cáncer cutáneo es la exposición a la luz del sol y los antecedentes de quemaduras solares. Así mismo la OMS reporta que la altitud es un factor que interviene en el incremento de radiación ultravioleta, concluyendo que la intensidad de la radiación ultravioleta aumenta 20% por cada 1000 metros de altitud⁸⁹.

Afirmación puesta a discusión ya que un estudio suizo no ha encontrado asociación entre las dosis de RUV y la ubicación de los Basaliomas, encontrando similar la exposición en párpado superior e inferior²³. En la última década se ha detectado un incremento de su incidencia y una tendencia a aparecer en edades más tempranas, posiblemente asociados al empleo de fototerapia y a la exposición solar, afectando a ambos sexos por igual⁹¹.

El CBC es el tumor maligno más común de la piel constituyendo más del 90% de las neoplasias malignas palpebrales^{3, 4}. Las localizaciones más comunes están en el párpado inferior (43 %), seguidas por el canto medial (26 %), el párpado superior (12%) y el canto lateral (8%)⁹². Son más difíciles de manejar cuando se localizan en el canto medio ya que en su crecimiento pueden invadir a la órbita y/o senos perinasales, de hecho, este tumor es localmente invasivo y de crecimiento lento.

Existen 3 formas clínicas principales: CB nodular, CB nódulo ulcerativo y el CB esclerosante que puede confundirse con condiciones benignas de los párpados y su exéresis puede resultar incompleta a causa de que sus márgenes son clínicamente inaparentes. Hay otras formas de presentación con el CBC pigmentado que tiende a confundirse con un nevus o un melanoma y el CBC quístico que semeja un quiste epitelial⁹³.

Sus primeras manifestaciones son tumores pequeños de crecimiento lento. La destrucción local que provoca puede ser significativa en estructuras tan delicadas e importantes como los párpados causando deformidades o pérdida de la función del órgano afectado. Elegir el tratamiento más apropiado dependerá en cada caso del tamaño de la lesión, localización, tipo de CBC, estado general, edad y necesidades estéticas del paciente^{94, 95}.

El CBC crece de las células basales de la epidermis que no maduran y se queratinizan de forma normal. El tumor crece en el interior de la dermis formando una masa nodular invasiva. Causan una extensiva destrucción local, pero característicamente no metastizan, y presentan una tasa de recurrencia muy alta tras procedimientos terapéuticos poco adecuados. Silverman realizó un estudio retrospectivo de 5.755 CBC tratados de diversas maneras y halló una tasa de recurrencia de 10,6% en tumores primarios y 15,4% en tumores previamente tratados^{43, 44}.

La tasa de recurrencia en los CBC de localización palpebral es aún mayor, siendo los del canto interno los más peligrosos en este aspecto, ya que pueden acceder más rápidamente a la órbita. En general, la edad media de aparición tiene un pico de frecuencia máxima a los sesenta años y resulta más agresivo cuando aparece en menores de 35 años⁹².

La aparición del CBC está relacionada con factores genéticos, virales y ambientales. Sin embargo aunque la etiología exacta de CBC es desconocida existe una relación bien establecida entre el CBC y la unidad pilosebácea. Actualmente se piensa que se originan a partir de células pluripotenciales en la capa basal de la epidermis o el folículo²⁸. Los hallazgos inmunohistoquímicos sugieren una respuesta de la inmunidad innata y una reacción de hipersensibilidad retardada causada por las proteínas propias del ácaro, evidenciándose un infiltrado de linfocitos T CD4 Helper, macrófagos y células Langerhans en el folículo infestado⁷⁷.

El examen clínico ha sido la principal fuente diagnóstica, sin embargo, a simple vista resulta imposible visualizar y distinguir lesiones oculares en fase inicial o con característica clínica no clásica, ocasionando enfermedades subdiagnosticadas, diagnósticos tardíos o tumores recurrentes, generando grandes costos para el paciente y para el estado Español, en consecuencia, provocando una preocupación actual y futura de Salud Pública en España.

En los CBC, se ha determinado que la etiopatogenia es multifactorial, donde tanto factores constitucionales como ambientales pueden jugar un papel fundamental en su desarrollo. A continuación se describen características de estos factores y la forma como favorecen la aparición de CBC⁹⁶.

La ubicación del CBC es casi exclusiva de la piel provista de folículos pilosos, por lo que se ha sugerido su origen en la unidad pilosebácea. Algunos trabajos reportan que la expresión de citoqueratinas de las células neoplásicas de los CBC, son semejantes a las del epitelio de la vaina radicular externa del folículo piloso, lo que apoya la hipótesis de un origen folicular. Sin embargo, lo que se ha propuesto es que el CBC se desarrolla a partir de las células pluripotenciales tanto de la zona basal de la epidermis como de la vaina radicular externa del pelo, a nivel del istmo y la protuberancia⁸.

Dentro de los factores involucrados, así como lo ha establecido la OMS, el más importante es la exposición a las radiaciones ultravioletas (UV) con un incremento importante de estos tumores en las últimas décadas, por disminución de la capa de ozono. Las radiaciones UV producen inmunosupresión y daños en el ADN que alteran su proceso de reparación⁹⁷.

La radiación UV favorece el proceso de apoptosis, generando mutaciones de la proteína supresora de tumores p53 (en el 40-50% de los casos de CBC), que induce la formación de fotodímeros (como el ciclobutanopirimidina) y aumentando las mutaciones de los proto-oncogenes de la familia ras; además, producen mutaciones del gen supresor tumoral PTCH (human homologue *Drosophila* patched gene). Después de la exposición solar, se elevan la interleucina 4 y la interleucina 10 disminuyendo la vigilancia antitumoral, factor que favorece el desarrollo de los tumores⁹⁷.

La capa natural de ozono, que recubre la tierra absorbiendo las radiaciones UV dañinas, presenta disminución desde 1985 debido a la contaminación ambiental. Compuestos químicos como los clorofluorocarbonos (CFCs, del inglés chlorofluorocarbons) que se utilizan en refrigerantes, solventes, aires acondicionados, entre otros son los causantes de que disminuya la capa de ozono, hecho que es más evidente en la Antártica. Se ha calculado que por cada 1% que disminuya la capa de ozono, ocurre un incremento del 1,7 al 3% anual de CBC y CEC, respectivamente⁹⁶.

El grupo de Bastiaens M y col. encontró, que el papel de las radiaciones UV sobre los CBC, puede ser diferente para los distintos subtipos, reportando que los CBC con patrón nodular, están relacionados con la exposición crónica al sol; en cambio los de patrón superficial se relacionan más con exposición solar intermitente¹⁷.

A menor fototipo de piel según Fitzpatrick existe mayor riesgo de padecer de CBC. En la actualidad, se estima que 3 de cada 10 personas de raza blanca tienen la posibilidad de desarrollar un CBC; siendo mayor aún el riesgo en aquellas personas que tienen poca o ninguna capacidad de broncearse y con antecedentes de quemaduras solares antes de los 20 años. En los pacientes albinos los CBC son de tipos histológicos más agresivos⁹⁶.

El tratamiento con PUVA (psoralenos más radiaciones UVA), actualmente un tema controversial, es la relación entre el desarrollo de cánceres de piel no melanoma y la fotoquimioterapia y la fototerapia. En pacientes tratados con PUVA para diversas enfermedades cutáneas como psoriasis, liquen plano, linfoma cutáneo de células T, entre otras, se ha visto una mayor incidencia. Esto es debido al alto efecto mutagénico y carcinogénico acumulativo de las radiaciones UVA; sin embargo, en los CBC la conexión con el tratamiento de PUVA no está clara⁹⁸.

Las Camas bronceadoras, por considerar el bronceado como sinónimo de salud y bienestar, en países no tropicales, son muy utilizadas; por ejemplo, en USA se calcula que alrededor de un millón de personas utilizan estos servicios diariamente por considerarlo poco perjudicial. Existe una relación dosis dependiente, entre la exposición en las camas solares, el fotodaño y la aparición de cáncer de piel. Aunque no hay certeza de su relación con el CBC, se estima que el uso de radiaciones UVA (320-340nm), tres veces por semana por 30 minutos, en un período de 20 años duplicará el riesgo de cáncer de piel⁹⁶.

Las Radiaciones ionizantes, la exposición ocupacional y la administración de tratamientos de radioterapia prolongados, se han asociado con carcinomas cutáneos no melanomatosos. El incremento del riesgo para CBC, se limita al área expuesta a la radiación. Se estima que 20 a 40 años después de la exposición a radiaciones puede desarrollarse un CBC⁹⁹.

En los pacientes inmuno-suprimidos por trasplantes de órganos, medicamentos o por causas virales, el CBC es el segundo tumor maligno cutáneo más frecuente. En los pacientes trasplantados renales se reporta un riesgo de CBC, 10 veces mayor que la población general y en los trasplantados cardíacos 2 a 3 veces más frecuente. En pacientes trasplantados en la infancia, se reporta la aparición de carcinomas cutáneos tipo CEC y CBC, 13 años posterior al trasplante; cuando presentan un promedio de edad de 27 años aproximadamente⁹⁶.

Algunas drogas inmunosupresoras, utilizadas en el tratamiento post-trasplante han sido vinculadas a determinados cánceres cutáneos. Entre estos medicamentos tenemos: la Ciclosporina y la prednisolona. En los pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la frecuencia de CBC es 11 veces mayor que la población normal; siendo su ubicación más común el tronco y su presentación clínica e histológica, el CBC tipo superficial. Tanto en pacientes trasplantados como en los que padecen enfermedades inmunosupresoras, entre ellas el SIDA, se suele apreciar un comportamiento más agresivo⁹⁶.

Los Hábitos tabáquicos como el cigarrillo aumenta el riesgo de padecer de CBC aunque esta última relación es aún controversial. Trabajos como los de Karagas³⁰ no encuentran relación entre el hábito tabáquico y la incidencia de CBC; sin embargo, existen otros estudios como el realizado por Narbutt¹⁹, que observó en mujeres jóvenes con historia anterior o hábito tabáquico activo, un incremento

en la prevalencia de CBC en los párpados. También el grupo de Smith y Randle¹⁴⁸, relacionan el tabaquismo a CBC, pero especialmente con aquellos tumores cuyo diámetro es superior a 1 cm^{16, 100}.

En su reporte la relación se incrementa proporcionalmente al tamaño del tumor, llegando inclusive a 50% de los pacientes con tumores de 5 cm o más, que eran fumadores. Se atribuye el efecto del cigarrillo, a una disminución en los niveles de Vitamina A en los fumadores, que disminuye la protección de los radicales libres. Otra explicación es la disminución de la respuesta inflamatoria a las radiaciones UVB, a causa de la nicotina⁹⁶.

Los factores ocupacionales, como la exposición a elementos como el asfalto, alquitrán, parafina cruda, aceites minerales, solventes orgánicos e inorgánicos, arsénico inorgánico, entre otros, parecen aumentar el riesgo a padecer de cáncer cutáneo no melanomatoso. El arsénico tiene un conocido efecto carcinogénico en la piel, sobre todo en aquellas regiones con aguas contaminadas. Su relación es dosis dependiente a la cantidad de agua contaminada que se ingiera¹⁰⁰.

Las tasas de incidencia del CBC periocular varían según la localización geográfica; en países como Alemania, entre los años 1998-2000, la incidencia era de 100,2 hombres por cada 100.000 habitantes por año y 72,6 mujeres por cada

100.000 habitantes por año. En la ciudad de New Hampshire, Estados Unidos de Norteamérica, para los años 2003-2004, la tasa de incidencia era de 309 hombres y de 100,5 mujeres por cada 100.000 habitantes por año, mayor que el reporte realizado 14 años antes en ese mismo lugar. En Australia la incidencia generalmente es mayor que en las regiones cercanas al Ecuador, teniendo para 2010 en la ciudad de Townsville, al norte de Queensland, una incidencia de 2.058 hombres y 1.194 mujeres por cada 100.000 habitantes⁹⁶.

La incidencia de los CBC en Europa, Canadá, USA y Australia, se incrementa de 3 a 6% cada año, constituyendo por esta razón, un reto diagnóstico y terapéutico¹⁷. A pesar que algunos estudios han demostrado que puede tratarse de un tumor de baja malignidad, tiene una alta incidencia, que, desde el punto de vista de morbilidad, lo hace un problema importante de salud, generando grandes costos en tratamiento; estimándose en países como USA, un costo de 500 millones de dólares anuales^{96, 97}.

A nivel mundial la incidencia del CBC cada vez es más frecuente, con un incremento del 20% en las últimas dos décadas. Dicho incremento podría ser el resultado de diferentes factores intervinientes tales como el incremento de la exposición solar recreacional y el uso excesivo de cámaras solares, asociada a la cultura de bronceado como un distintivo de belleza, llegando a un estimado de 3 millones de diagnósticos de CBC anuales en EEUU⁹⁹.

Leffell, en una serie estudiada sobre CBC periocular, encontró que el 38% de las mujeres y el 25% de los hombres menores de 35 años, con diagnóstico de CBC periocular, tenían un tipo histológico de comportamiento agresivo, en oposición a los mayores de 60 años con tipos histológicos más circunscritos; concluyendo entonces, que los individuos más jóvenes, son propensos a desarrollar CBC con patrones de crecimiento más agresivos¹⁰¹.

Recientemente se ha estudiado la relación del *Demodex folliculorum* (DF) con neoplasias benignas como el Adenoma sebáceo⁶³, como malignas de tipo CBC¹⁰³ o Melanoma⁷³, las cuales pueden surgir a partir de una inflamación crónica, trauma, cicatriz o quemadura preexistente²⁵. Un estudio retrospectivo realizado en Turquía encontró mayor presencia (65% de los casos contra 23% de los controles sanos) y densidad (cantidad de ácaro por unidad pilo-sebácea o pestaña) de Demodicosis en el Carcinoma basocelular del borde palpebral situándolo como un posible factor de carcinogénesis⁸⁰. La presencia de más de 5 ácaros *Demodex* por centímetro cuadrado de piel es significativa para su actividad patogénica.

Su distribución es mundial, afectando en hasta el 90% de casos en algunos estudios. La variedad *folliculorum* es más frecuente en mujeres, cuyas lesiones son observadas principalmente en cara media. Sin embargo, existen reportes en los que se observa un leve predominio del sexo masculino 2:1⁹⁶. El uso de productos químicos para eliminar el maquillaje, en vez del jabón, promueven su

proliferación. Su pico mayor es en la tercera edad, observándose poco frecuente en niños. Se ha publicado cierta asociación con algunos fómites siendo toallas, peine, sábanas, esponjas y ropa para dormir, principalmente^{96, 97}.

El *DF* habita la piel del área periocular y se encuentra mayoritariamente ubicado en la piel de la nariz y del canto interno seguido por el párpado inferior, mientras que en el párpado superior es baja. Es bien sabido que los sitios donde es más común el Carcinoma de células basales son el canto interno y el párpado inferior precisamente⁷².

La implicación de *DF* en algunas enfermedades de piel como la rosácea o blefaritis crónica está suficientemente demostrada por numerosos estudios¹⁰⁴. Sin embargo, a pesar de ciertos indicios y sospechas de su relación con el desarrollo de enfermedades malignas como en CBC actualmente no está claramente demostrado.

El parásito vive de forma saprofita en número controlado en los folículos pilosos de un importante porcentaje de individuos sanos y cuya infestación y densidad está relacionada de forma directamente proporcional con la edad. Posiblemente su hiperparasitación descontrolada es lo que por un lado se relaciona con algunas enfermedades⁷⁷ y por otro se sospecha su implicación en el desarrollo de ciertos tipos de lesiones como es el CB observar que ambas

entidades, el CBC y la demodicidosis, están presentes en el mismo individuo en varias oportunidades^{80, 103, 105}.

La clave esencial para poder establecer una relación directa de la presencia y densidad del parásito con ciertas enfermedades, sería disponiendo de una herramienta diagnóstica precisa y exacta que permitiera reproducir resultados y obtener datos estadísticos que de forma objetiva pueda relacionar el parásito con enfermedad de forma significativa e inequívoca. En este sentido, la herramienta más idónea podría ser la cuantificación de *DF* mediante la PCR.

La cuantificación del *DF* mediante PCR para humanos solo esta descrita en la literatura para el estudio de la Rosácea⁶⁰ y que se conozca no se ha realizado anteriormente para el CBC. Erbagci, Z. y colaboradores^{80, 105}, quienes previamente han encontrado asociación entre las lesiones del borde palpebral tipo CBC con el *DF*, han usado el método de conteo directo del ácaro de las piezas bajo microscopio de luz, método poco rentable ya que es difícil distinguir el ácaro de los detritos celulares una vez extraída y procesada la muestra, siendo más reproducible y con mayor validez científica el uso de las técnicas de amplificación molecular cuantitativas.

Una vez establecida la asociación entre el *DF* y el CBC encontraríamos un factor de riesgo detectable y fácilmente tratable en la práctica clínica, de esta manera conseguiríamos evitar la aparición de una patología con una tasa de incidencia tan elevada, siendo en Europa mucho mayor que el conjunto de la

población mundial, 195,5 x 100.000 habitantes/año y 128 x 100.000 habitantes/año respectivamente¹⁰⁶. El costo de la atención de las neoplasias de la piel no melanoma (CBC y CEC) ocupan el quinto lugar después de los carcinomas de próstata, pulmón, colon y de mama¹⁰⁷.

Esta asociación constituye un hallazgo reciente, siendo necesario realizar estudios con mayor nivel de evidencia en cuanto a diseño, técnica de recolección y análisis de las variables, así como mayor número de casos para clarificar la importancia de la infestación crónica por el ácaro en la patogénesis de la enfermedad, y así de esta manera generar nuevas hipótesis que sirvan de base a futuras investigaciones.

Existe la necesidad de disponer de herramientas diagnósticas coadyuvantes a la clínica del CBC, que sean de fácil acceso, seguras y que agilicen el diagnóstico temprano de esta patología. El propósito del presente estudio es evaluar la presencia y cuantificar la densidad del ácaro *DF* en los CBCs del área periocular mediante PCR cuantitativa con el objeto de ver si dicha presencia puede tenerse en cuenta como indicador del CBC.

Capítulo II

Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis y objetivos

2.1.1 Hipótesis

- La infestación por *Demodex folliculorum* (*DF*) y el Carcinoma Basocelular (CBC) del área periocular están relacionados tanto por la presencia como por la mayor densidad de la infestación.
- Existe mayor presencia del ácaro *DF* en las lesiones de tipo CBC comparado con las lesiones benignas en el área periocular.
- Existe mayor densidad del ácaro *DF* en las lesiones de tipo CBC comparado con las lesiones benignas en el área periocular.
- Existe mayor cantidad de *DF* en la región periocular donde es más prevalente el CBC (párpado inferior y canto interno).

2.1.2 Objetivos

General.

- Evaluar la presencia y cuantificar la densidad del ácaro *Demodex folliculorum* (*DF*) en los Carcinomas Basocelulares (CBCs) del área periocular, mediante Reacción en cadena de polimerasa (PCR), comparándolas con lesiones benignas, con el objeto de ver si dicha presencia puede tenerse en cuenta como indicador del CBC.

Específicos.

- Identificar al ectoparásito *DF* mediante PCR.
- Establecer la presencia y densidad de infestación por *DF* en el CBC del área periocular.
- Establecer la presencia y densidad de infestación por *DF* en lesiones benignas del área periocular.
- Establecer la presencia y densidad de infestación por *DF* en lesiones benignas del área periocular y CBC por subgrupos histológicos.

- Establecer la densidad de infestación por *DF* según la localización topográfica de las lesiones en el área periocular.
- Determinar si existe una correlación entre la edad y la densidad de infestación del *DF*
- Determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre la presencia del *DF* en CBCs comparado con la presencia de *DF* en lesiones benignas.
- Establecer un modelo predictivo, con los niveles de sensibilidad y especificidad.

Capítulo III

Material y Método

3.1 Diseño metodológico.

3.1.1 Tipo de estudio. Investigación aplicada cuantitativa, de tipo observacional de casos y controles.

3.1.2 Población. Total de piezas anatómo-patológicas de lesiones del área periocular de pacientes sometidos a extirpación quirúrgica en el Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva (España), con diagnóstico de Carcinoma basocelular (CBC), tomados como los casos; y de pacientes con similares características de edad, sexo y región demográfica sometidos a extirpación quirúrgica con diagnóstico de lesiones benignas tomados como controles. Ambos en el período comprendido entre el 1 de enero de 2009 y el 1 de enero de 2015 (6 años).

3.1.2.2 Criterios de inclusión y exclusión.

Casos: La población de casos estuvo conformada por biopsias tomadas en los 6 años del estudio, con diagnóstico de CBC remitidos desde en servicio de Oftalmología del área periocular.

- Criterios de inclusión:
 - CBC en cualquiera de sus subtipos histológicos (nodular, infiltrativo, micronodular, superficial, morfeiforme).
 - Edad superior a 18 años.

- Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado previamente a la intervención quirúrgica, donde autoriza el estudio de las piezas de anatomía patológica.
- Criterios de exclusión:
 - CBC que tenían diagnóstico mixto (CBC + otro tipo de lesión) en la misma pieza de estudio.
 - Diferentes piezas anatomo-patológicas en el mismo paciente.

Controles: La población de controles estuvo conformada por biopsias tomadas en los 6 años del estudio, con diagnóstico de lesión benigna remitidos desde en servicio de Oftalmología del área periocular.

- Criterios de inclusión:
 - Lesión benigna de tipo: hidrocistoma, quiste de inclusión epidérmica, queratosis seborreica, papiloma fibroepitelial, nevus y hemangioma capilar,
 - Edad superior a 18 años.
 - Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado previamente a la intervención quirúrgica, donde autoriza el estudio de las piezas de anatomía patológica.

- Criterios de exclusión:
 - Lesiones con relación conocida con el *Demodex folliculorum* (DF), a saber: chalazión, rosácea e inflamación crónica.
 - Lesiones benignas que tenían diagnóstico mixto (2 o más tipos de lesión benigna) en la misma pieza de estudio.
 - Diferentes piezas anatómo-patológicas en el mismo paciente.

3.2 Aspectos éticos.

En el presente estudio se han aplicado los principios éticos de la investigación en seres humanos, que se recogen en la declaración de Helsinki, actualizada en la asamblea general de Seúl (Octubre 2008). Además, se respetó la confidencialidad y secreto de la información de carácter personal siguiendo la ley de protección de datos, según la Ley Orgánica 15/1999 (BOE 1999, n 298)⁹³.

El estudio fue aprobado por el comité ético de investigación clínica y la comisión de investigación del centro. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado por escrito. (Anexo 1).

Se tuvo en cuenta la Ley 41/2002 básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y la Ley 14/2007 de investigación biomédica.

3.3 Obtención de la muestra a estudio.

Población. Se analizaron todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión del estudio, tanto para el grupo de casos como para el grupo control, sometidos a intervención quirúrgica en el periodo de tiempo de 6 años establecido en el Hospital Juan Ramón Jiménez de la ciudad de Huelva (España).

Dado el coste de la técnica, la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), se propuso estimar el tamaño de la muestra mediante el software Epidat 4.0¹⁰⁹, tomando como referencia el artículo de Erbagci, Z. y colaboradores, donde se observa una prevalencia del *DF* en sujetos sanos del 26.7%, y en sujetos con CBC del 65.6%⁸⁰, para obtener una potencia del 90%, tomando un control por cada caso de estudio, obteniendo un tamaño muestral de 76 casos (38 sujetos con CBC y 38 sujetos con lesiones benignas).

De la población de casos total encontrados durante este periodo de tiempo fue de (N1=340) y el total de controles fue de (N2=1170). Se tomaron aquellos casos en los cuales la información estaba más completa, tanto en la base de datos de Anatomía Patológica como en las historias clínicas del servicio de Oftalmología, tales como edad, sexo, localización, y subtipo histológico.

Para que fueran comparables por edad se hicieron rangos de los casos, de 10 años cada uno, buscando obtener similares poblaciones etarias en los controles y que fueran comparables. La región demográfica fue la misma para todos (Pacientes intervenidos en la provincia de Huelva). La localización y el sexo no fueron escogidos intencionalmente al no encontrar diferencias entre los grupos.

Al haberse encontrado más casos de los requeridos, se realizó un muestreo aleatorio simple de los mismos. Al final se consiguieron analizar 115 muestras (64 casos y 51 controles).

3.4 Variables

3.4.1 Independientes:

- Piezas positivas para *DF*: Demostración de la existencia del ADN del ácaro en la muestra estudiada mediante PCR.
- Piezas negativas para *DF*: Demostración de la no existencia del ADN del ácaro en la muestra estudiada mediante PCR.
- Densidad de infestación: Cantidad de copias de ADN del ácaro en la muestra estudiada por la cantidad de tejido cuantificado mediante PCR en tiempo real.
- Edad: en años cumplidos
- Sexo: El biológico: H: Hombre, M: Mujer.

3.4.2 Dependientes:

- Tipo histológico de lesión: Informada por el servicio de Anatomía patológica.
 - Casos: nodular, micronodular, infiltrativo, morfeaforme, superficial.
 - Controles: hidrocistoma, quiste de inclusión epidérmica, queratosis seborreica, papiloma fibroepitelial, nevus y hemangioma capilar.

- Localización de la lesión: Tomada de la descripción de la exploración prequirúrgica en la historia clínica de Oftalmología (párpado superior, párpado inferior, canto interno, canto externo).

3.5 Instrumentos

Los casos se seleccionaron mediante el software NovoPath 5.20.00. Los datos se recogieron por parte de Anatomía Patológica en un protocolo elaborado para tal fin. (Anexo 2)

Para la detección del *DF*, se llevó a cabo una prueba de PCR para lo que se utilizó el sistema de extracción QIAgen y el termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems).

Para el análisis estadístico de los datos, se usó el software IBM SPSS v. 22¹¹⁰.

3.6 Recogida y análisis de datos.

El especialista de Anatomía patológica realizó la búsqueda en los archivos del software “NovopPath” de las piezas quirúrgicas con diagnóstico de CBC y lesiones benignas que cumplieron con los criterios de inclusión dentro de los 6 años del estudio, verificando en la historia clínica que tuviese el consentimiento informado firmado que autorizara el estudio de dichas piezas, hasta encontrar como mínimo los 38 casos y 38 controles requeridos en el tamaño muestral calculado; clasificándolos por edad, sexo, localización y subtipo histológico.

Luego el especialista de Microbiología se encargó de realizar la PCR en el laboratorio de biología molecular: HGC Biomedical Research Diagnostic S.L, laboratorio concertado con el Hospital Juan Ramón Jiménez.

A las muestras positivas para ADN de *DF* se les realizó la cuantificación para obtener así la densidad de ácaro por tejido estudiado.

Finalmente se realizó el análisis estadístico de los resultados. Todos los datos de ambos grupos de estudio se fueron registrando semanalmente por los investigadores principales en una tabla de registro SPSS v.22¹¹⁰.

3.7 Procedimientos

3.7.1 Anatomía Patológica.

Búsqueda de las piezas en el software NovoPath 5.20.00.

Criterios de búsqueda: Búsqueda general, Fechas: desde: 01-01-09 hasta: 01-01-15, Muestras recibidas desde el servicio de Oftalmología, con diagnóstico de CBC, quiste, papiloma, queratosis seborreica, pilomatrixoma, xantelasma, hemangioma, granuloma, nevus, triquilemoma.

- Clasificación del subtipo histológico de los CBCs que no estuvieron previamente informados.
- Llenado del instrumento de recogida de datos.

3.7.2 Oftalmología

- Búsqueda de las historias clínicas del servicio de Oftalmología para buscar la variable “localización”.
- Búsqueda de los controles adecuados para normalizar los grupos.
- Llenado del instrumento de recogida de datos

3.7.3 Microbiología

Protocolo de extracción de ADN en biopsias (con el kit de extracción manual en columna “ISOLATE Genomic DNA Spin Column”).

1. Desparafinar la muestra. - A una lámina de biopsia en parafina, añadir 1 ml de xileno y voltear vigorosamente. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente, volteando de vez en cuando.
2. Centrifugar a 11.000 g durante 3 minutos, desechar el sobrenadante.
3. Añadir 1 ml de etanol (96-100%) y mezclar invirtiendo varias veces.
4. Centrifugar a 11.000 g durante 3 minutos. Desechar el sobrenadante.
5. Repetir el lavado con etanol.
6. Incubar con el tubo abierto a 37°C hasta que se evapore el etanol (15 minutos aprox.).
7. Pre-lisis.- Añadir 180 µl Lysis Buffer GL y 25 µl de solución de proteinasa
8. Voltear. Incubar a 56°C durante 1-3 horas (hasta lisado completo), volteando de vez en cuando.
9. Lisado. - Voltear la muestra suavemente y añadir 200 µl de Lysis Buffer G3. Voltear vigorosamente e incubar a 70°C durante 10 minutos.
10. Ajuste de las condiciones de unión al DNA. - Voltear suavemente y añadir 210 µl de etanol (96-100%) a la muestra. Voltear vigorosamente.
11. Unión al DNA. - Colocar una columna (ISOLATE Genomic DNA Spin Column) (de color verde) en un tubo de colección de 2 ml. Cargar la muestra en la columna y centrifugar 1 minuto a 11.000 g. Descartar el tubo de colección y volver a poner otro tubo limpio de 2 ml de colección.
12. Lavado de la membrana de sílica. - Añadir 500 µl de Wash Buffer GW1. Centrifugar 1 minuto a 11.000 g. Descartar el tubo de colección y poner

otro nuevo. Añadir 600 µl de Wash Buffer GW2. Centrifugar 1 minuto a 11.000. Descartar el tubo de colección y colocar otro nuevo.

13. Secado de la membrana de sílica. - Centrifugar 1 minuto a 11.000 g para eliminar los restos de etanol. Colocar la columna en un tubo de 1,5 ml.
14. Elución del DNA. - Añadir Elution Buffer G precalentado (70°C) en el centro de la membrana de sílica (100 µl). Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar 1 minuto a 11.000 g.

3.8 Desarrollo de la PCR.

Se llevó a cabo el desarrollo de una PCR a tiempo real que permitiese detectar el parásito *DF*. Para que la técnica se llevara a cabo de forma óptima, se hizo uso de 3 controles positivos del parásito, que se obtuvieron e identificaron mediante la observación, a través de un microscopio óptico, de muestras de pestañas obtenidas de pacientes que sufrían de blefaritis crónica. Cada uno de los controles positivos constó de tres ejemplares completos y adultos. (Fig. 3.1).

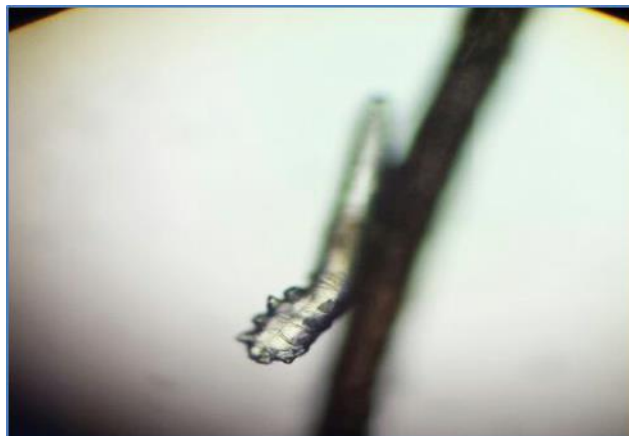


Fig. 3.1 Ejemplar adulto de *DF* sobre pestaña de paciente con blefaritis crónica tomado como control positivo (40 x). **Foto ganadora** del Primer premio de Fotografía Científica en el 91 Congreso Sociedad Española de Oftalmología. MD. Juan Carlos Sánchez España, Sevilla, 2015, publicado en el 2016¹¹¹.

También se hizo uso de tres controles negativos obtenidos de biopsias realizadas a tejidos sólidos profundos. Los controles positivos y negativos fueron preservados a una temperatura de -20°C hasta que se hizo uso de ellos. Para la extracción del ADN se utilizó el kit comercial *ISOLATE Genomic DNA Spin Column- Biotline*, un sistema manual de extracción de ácidos nucleicos en columnas de sílica que puede ser utilizado para conseguir extracciones de tejidos sólidos, cuyo protocolo de extracción ha sido descrito anteriormente.

El desarrollo de la técnica se llevó a cabo con cebadores que se habían diseñado para la detección de la secuencia diana específica: 18S ARNr (KF745889.1). En cuanto al sistema de detección, se hizo uso de una sonda TaqMan que disponía de un fluoróforo FAM incorporado al extremo 5´ y un extintor de señal (Quencher) al extremo 3´. El diseño de la herramienta se llevó a cabo con el programa informático Primer Express 3.0 (Applied Biosystem). La especificidad del amplicón fue validada con BLAST confrontándolo con la base de datos de nucleótidos NCBI.

La validez de los oligos (cebadores y sonda) fue confirmada mediante el software *on line* Oligo Calculator versión 3.26. Como control de extracción y amplificación, se utilizaron cebadores y sonda TaqMan para la detección del gen humano de la RNasa P. Las secuencias de oligonucleótidos y sonda para la detección de *Demodex folliculorum* fueron:

sense: CGAGGATCTATTGGAGGGCAAGT;

antisense: GAACTGAGATACAACTACGAGCT;

sonda: [6FAM]AGCCGCGGTAATTCCA[BQH1a].

Las secuencias de oligonucleótidos para detectar el gen de la RNasa P fueron:

sense: AGATTTGGACCTGCGAGCG;

antisense: GAGCGGCTGTCTCCACAAGT;

sonda: [6FAM]TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG[BQH1a].

Para el análisis por PCR se utilizó el termociclador a tiempo real 7500 Fast (*Applied Biosystems*), configurando el programa de temperaturas de la siguiente manera: 10 minutos a una temperatura de 95°, y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 25 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C.

En los tres controles positivos se obtuvo el ADN a través del anteriormente mencionado sistema en columna, obteniendo un volumen de 100 µl de eluido. El volumen de cada reacción fue de 25 µl, en donde se encontraron 5µl de eluido de

extracción, 5 μ l de agua libre de Rnasa, 0,5 μ l de sonda TaqMan específica (Sigma-Aldrich), 1 μ l de solución ROX, 1 μ l de mezcla de cebadores a concentración 10 mM, y 12,5 μ l de Master Mix 2X (Promega). El amplicón que se obtuvo de los controles a través de la PCR se secuenció con el 3500 Series Genetic Analyzers (Applied Biosystems), un secuenciador automático, y se comparó con la base de datos existente en el GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI en sus siglas en inglés), tratando de confirmar, de este modo, la especificidad de la reacción.

El amplicón de los controles positivos fue cuantificado mediante espectroscopia (Qubit 3.0 fluorometer, life technologies), realizando una curva patrón en la que se establecieron cinco puntos de concentraciones: 100.000 copias/ μ l., 10.000 copias/ μ l, 1.000 copias/ μ l, 100 copias/ μ l, y 10 copias/ μ l.

La sensibilidad se configuró de acuerdo al número mínimo de copias que la PCR es capaz de detectar, haciendo uso de diluciones seriadas de concentraciones conocidas analizadas por triplicado. En cuanto a las concentraciones utilizadas para determinar la sensibilidad, correspondieron a 1000, 100, 10, y 5 copias/ μ l.

A modo de prueba de la técnica, se llevó a cabo una serie piloto consistente en 46 muestras procedentes de biopsias cutáneas parafinadas obtenidas de

anatomía patológica procedentes de pacientes con lesiones de carcinoma basocelular de áreas periorcarias de presentación clínica nodular.

Dichas muestras consistían en 15 cortes con un grosor de 15 μm y una superficie de 1 – 1,5 cm^2 equivalente a 22,5 mg de tejido aproximadamente. Éstas fueron desparafinadas en una disolución de xilol durante una extensión temporal de 30 minutos, siendo centrifugadas durante 1 minuto a 11.000 g, desechando el sobrenadante. Una vez desparafinado el producto, se puso 24 horas en incubación a 56°C dentro de un tubo que contenía 200 μl de solución de lisis, con el objetivo de conseguir un óptimo rendimiento en la extracción de biopsias de tejidos sólidos.

La densidad de parásitos se registró en número de amplicones por cada 1,125 mg de muestra sólida (22,5 mg/20= 1,125 mg), teniendo en cuenta que en cada reacción se utilizaban 5 μl de eluido de los 100 μl obtenidos en la extracción. (Fig. 3.3).



Fig. 3.2 Tubos de Eppendorf con las piezas de anatomía patológica. De cada biopsia se tomaron 15 cortes de 15 μm de grosor.

Mediante la variante *Cycle Threshold* (Ciclo Umbral), en comparación con la curva patrón, se obtuvieron los resultados cuantitativos. Éstos se calcularon con la plataforma 7500 Fast. Cada una de las muestras se analizó dos veces en la misma reacción, una para determinar la existencia de *Demodex folliculorum* y la otra para detectar la ARNasa P, que permite el control de extracción y amplificación en la reacción. Aquellas muestras que aparecían como positivas fueron secuenciadas y contrastadas con la, anteriormente mencionada, base de datos del NCBI.

Para determinar la sensibilidad se utilizaron las concentraciones de 10, 100 y 1.000 copias/ μl , llegándose a ser detectadas, por triplicado, en los tres análisis. Por la PCR, se llegaron a detectar las concentraciones de 1 y 5 copias/ μl , en uno de los análisis que se llevaron a cabo de manera triplicada, pero en dos de las tres reproducciones no se detectaron. Así pues, el límite de detección se situó en torno a 1 y 10 copias/ μl (Fig. 3.3). Además para determinar la especificidad de la técnica se utilizaron 10 muestras de polvo de ácaro del género *Dermatophagoides* obtenidos por aspiración de tapizados de mobiliario doméstico.

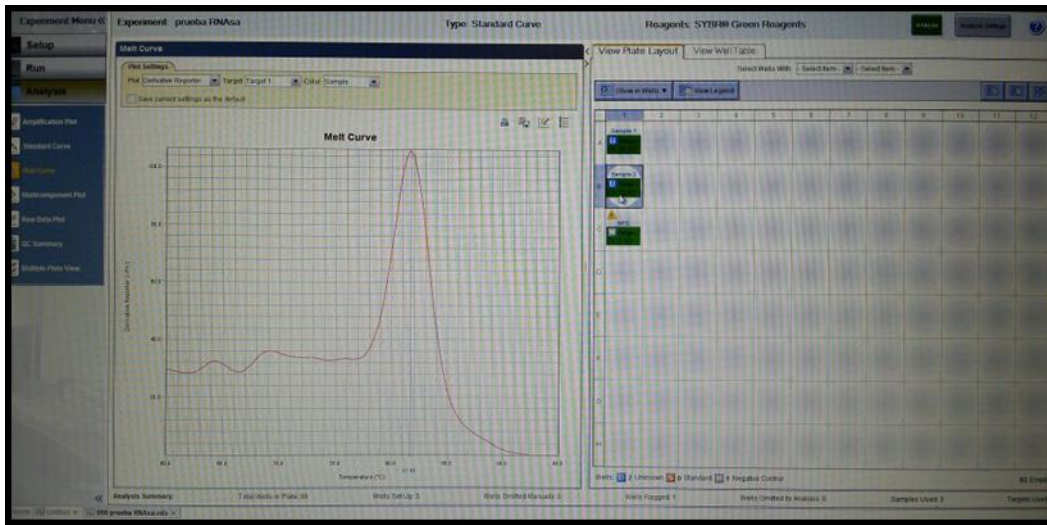


Fig. 3.3. Temperatura de disociación de la secuencia diana en la detección del ácido.

3.9 Limitaciones del estudio.

- La cuantificación del tejido es aproximada ya que es difícil que todas las biopsias tengan exactamente el mismo tamaño.
- La variable secundaria "color de piel" es un dato que en muchas historias clínicas no aparece, siendo un factor de riesgo conocido para el desarrollo del CBC, por lo que es importante tenerlo en cuenta.
- La variable secundaria "exposición a la Luz UV" es un parámetro difícil de cuantificar, siendo un factor de riesgo conocido para el desarrollo del CBC, por lo que es importante tenerlo en cuenta.
- La prueba diagnóstica es de alto coste, por lo que no se pueden estudiar gran número de biopsias, sino una muestra representativa.

3.10. Análisis estadístico.

Dado el coste de la técnica de PCR, se propuso estimar el tamaño de la muestra mediante el software Epidat 4.0¹⁰⁹, tomando como referencia las prevalencias del *DF* encontradas por Erbagci, Z. y colaboradores⁸⁰, para obtener una potencia del 90%. Los estadísticos descriptivos para variables cuantitativas se informaron como la media \pm la desviación estándar si seguían distribución normal, y la mediana, además del rango observado.

Para la comparación de frecuencias absolutas de las variables cualitativas nominales y la prevalencia de *DF* se utilizó la dócima de X^2 , y la para comparar las medias, se utilizó la prueba de la T de Student para muestras independientes, previa comparación de varianzas con el test de Levene.

Para comparar la densidad de infestación del *DF* se utilizó la prueba U de Mann - Whitney al no cumplir con la normalidad (Test Shapiro - Wilk).

También se usó la correlación de Pearson para establecer la posible relación entre las variables densidad de infestación y la edad.

Una $p < .05$ fue considerada estadísticamente significativa.

Se usó el análisis de regresión logística para construir un modelo de valoración e identificar aquellas variables que jugaban un papel relevante, empleando diferentes medidas de bondad de ajuste para verificar lo apropiado del modelo: como el test de Hosmer-Lemeshow, determinándose la sensibilidad y especificidad. La inclusión de la interacción se realizó con pruebas de significación estadística, es decir, al introducirla en el modelo el coeficiente de la misma es estadísticamente significativo.

Los datos se volcaron sobre el programa informático Microsoft Office Excel 2016 y el para el análisis estadístico se usó el IBM SPSS Statistics versión 22 (SPSS, Inc, Chicago, Illinois, USA)¹¹⁰.

Capítulo IV

Resultados

4.1 Prueba piloto.

Inicialmente se analizaron únicamente los casos de Carcinoma Basocelular (CBC) de subtipo histológico nodular:

Se analizaron 46 muestras de biopsias, de las cuales 26 (56,52%) correspondieron a varones. La edad media de ellos fue de 66,38 años (DE= \pm 13.1), con un rango entre 35,8 y 89,7 años y una mediana de 67,4 años.

La presencia del parásito *Demodex folliculorum* (DF) se apreció en la mitad de las muestras (23 de 46). En el caso de los hombres, el 57% fueron positivas (15 de 26), y en las mujeres un 40% fueron positivas (8 de 20).

La densidad media en los tres controles positivos fue de 1.213 amplicones. La densidad media de las muestras positivas fue de 308,65 amplicones por cada 1,125 miligramos de tejido (DE=560,71) con un rango entre 10,82 y 2560,74 amplicones por cada 1,125 miligramos de tejido sólido de la lesión y una mediana de 87,35. Se confirmaron las 23 muestras positivas por medio de secuenciación. Así pues, la especificidad de la técnica en el tamaño muestral utilizada fue del 100%. Las 46 muestras amplificaron para el gen de la RNasa P en los pocillos, correspondientes a control de extracción y amplificación, por lo que la reacción de amplificación funcionó en la totalidad de las muestras.

4.2 Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR.

Los tres controles positivos identificados mediante microscopía óptica, donde por medio de la a PCR desarrollada, también fueron identificados y amplificados. La secuenciación de los amplicones mostraron una homología del 100% alineándose con la secuencia KF745889.1 de la BB.DD. del GenBank correspondiente a *DF*. Los tres controles negativos, también lo fueron mediante PCR. La utilización de la curva-patrón para cuantificarlos, reveló valores de CT (*Cycle Threshol*=ciclo umbral) de 30,61, 27,58, 25,05, 21,51 y 17,13 para las concentraciones de 10, 100, 1.000, 10.000 y 100.000 copias/μl, respectivamente.

En los tres análisis y por triplicado, se detectaron concentraciones de 10, de 100 y de 1000 copias/μl cuando se determinó la sensibilidad de las mismas. Las concentraciones de 1 y de 5 copias/μl fueron detectadas por la PCR, en la realización por triplicado de uno de los análisis, sin detectarse en 2 de las 3 reproducciones. Así pues, se consideró el límite de detección entre 1 y 10 copias/μl. Todas las muestras positivas y los controles positivos fueron confirmadas mediante secuenciación, y las 10 muestras de polvo con ácaro del género *Dermatophagoides* las cuales fueron negativas.

4.3 Matriz de datos.

Se muestra en el anexo 3, donde se reúne la información de cada individuo tanto entre los casos como en el control.

4.4 Características demográficas y anatomopatológicas de los casos y controles.

Se estudiaron 115 piezas de anatomía patológica. El grupo de casos con diagnóstico anatomopatológico de CBC estuvo compuesto de 64 sujetos vs 51 sujetos del grupo control con diagnóstico de lesiones benignas.

En cuanto al sexo se compararon 31 hombres y 33 mujeres en los casos vs 20 hombres y 31 mujeres en los controles; $p = 0.32$.

Con respecto a las edades, en el grupo de CBC se obtuvo un promedio de edad de 67.7 ± 13.5 años [rango, 35.8 a 89.7 años] vs 65 ± 13.1 años [rango, 36.6 a 87 años] en los controles; $p = .29$. (Tabla I, Fig. 4.1).

Tabla I. Frecuencia de individuos según sexo en casos y controles.

Sexo	Casos $n_1= 64$		Controles $n_2=51$		Total	
	F.A.	%	F.A.	%	F.A.	%
Masculino	33	51,6	31	60,8	64	55,7
Femenino	31	48,4	20	39,2	51	44,3
Total	64	100,0	51	100,0	115	100,0

Nota: $X^2 = 0.965$, $gl=1$; $p=0.3259$. Fuente: Base de datos de Oftalmología y Anatomía Patológica.

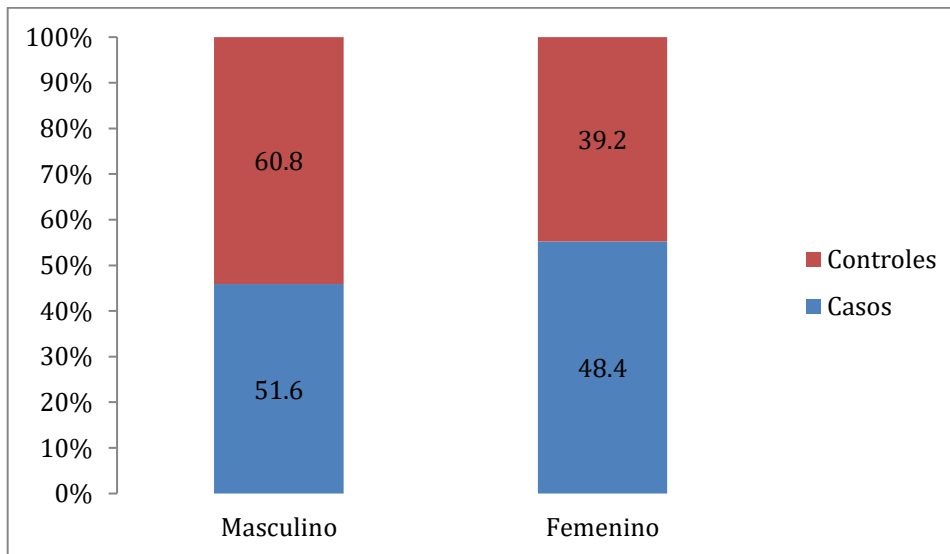


Fig. 4.1 Diagrama de barras apiladas del sexo en casos y controles Fuente: Tabla I

El grupo de casos con CBC, con un total de 64 biopsias, estuvo compuesto de 5 subtipos histológicos, siendo el nodular el más prevalente con el 70.3% de los casos, seguido por el infiltrativo con el 18.7%, el resto de los tipos de encontró por debajo del 10 %. (Tabla II, fig. 4.2)

Tabla II. Distribución de las variedades anatomopatológicas de los CBCs.

Variedades	F.A.	%
Nodular	45	70,3
Infiltrativo	12	18,8
Micronodular	4	6,3

Superficial	2	3,1
Morfeiforme	1	1,6
Total	64	100

F.A: Frecuencia Acumulada. Fuente: Base de datos de Anatomía Patológica

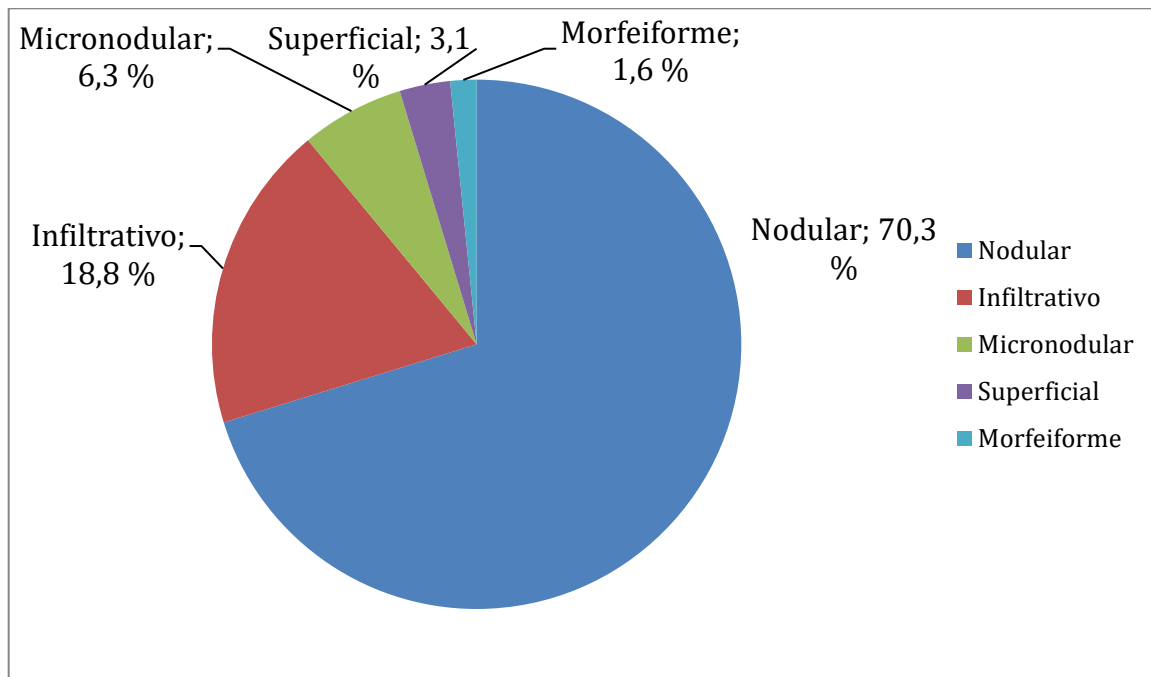


Fig. 4.2. Diagrama de sectores con distribución de las variedades histológicas de los carcinomas basocelulares detectados. Fuente: Tabla II

Entre los controles, con 51 biopsias, hubo 5 subtipos histológicos, y fue la queratosis seborreica la más frecuente (25,4 %), seguida por el quiste de inclusión epidérmico (25,1 %), y, en orden descendente, el hidrocistoma (17,6 %), el nevus (15,6 %), los papilomas (11,7 %) y el hemangioma capilar (7,8%). (Tabla III, Fig. 4.3)

Tabla III. Distribución de las variedades anatomopatológicas de lesiones benignas perioculares.

Variedades	F.A.	%
Queratosis seborreica	13	25,4
Quiste de inclusión	11	25,1
Hidrocistoma	9	17,6
Nevus	8	15,6
Papiloma	6	11,7
Hemangioma	4	7,8
Total	51	100

F.A: Frecuencia Acumulada. Fuente: Base de datos de Anatomía Patológica

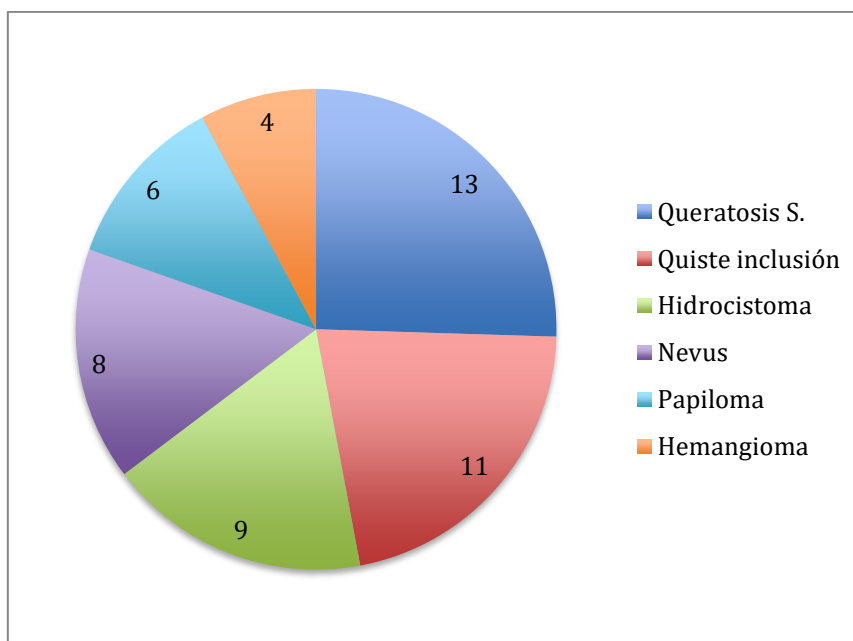


Fig. 4.3. Diagrama de sectores para la frecuencia absoluta de las lesiones hísticas benignas de la zona periocular. Fuente: Tabla III.

4.5 Presencia de DF.

En CBC.

La prevalencia de *DF* fue del 42.2 % en pacientes con CBC, mientras que entre los controles el parásito se encontró en el 19.6 %, diferencia que resultaba significativa (Odds ratio, 2.99: IC 95 %: 1.27 – 7), ($X^2 = 6.63$; gl=1; p=0.01) (Tabla III, Fig. 4.4)

Tabla IV. Presencia o no de *DF* en casos y controles.

Presencia	Casos n ₁ = 64		Controles n ₂ =51		Total	
	F.A.	%	F.A.	%	F.A.	%
Si	27	42,2	10	19,6	37	32,2
No	37	57,8	41	80,4	78	67,8
Total	64	100,0	51	100	115	100

F.A: Frecuencia Acumulada. Fuente: Base de Laboratorio de Biología Molecular.

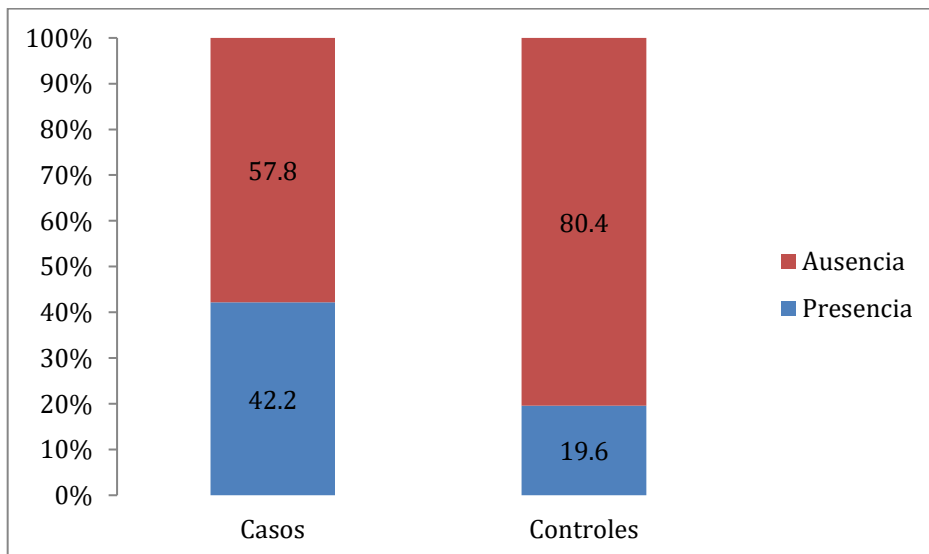


Fig. 4.4 Diagrama de barras apiladas para el por ciento de positividad (prevalencia) de la infestación con *DF* en casos y controles. Fuente: Tabla IV

En el grupo de casos, subgrupo de CBC nodular, que fue la mayoría de los mismos (70.3 %), se encontró una prevalencia de *DF* del 51.1 %, mientras entre los controles era del 19.6 % (Odds Ratio: 4.28; IC 95 %: 1.73-10.59) ($X^2 = 10.52$; $gl=1$; $p=0.00118$), diferencia altamente significativa.

Tabla V. Presencia o no de *DF* en el subgrupo de CBC nodular y en controles.

Presencia de	Casos $n_1= 45$		Controles $n_2=51$		Total	
	F.A.	%	F.A.	%	F.A.	%
Si	23	51,1	10	19,6	33	34,4
No	22	48,9	41	80,4	63	65,6
Total	45	100,0	51	100	96	100

Fuente: Base de datos de Anatomía Patológica y de Biología Molecular.

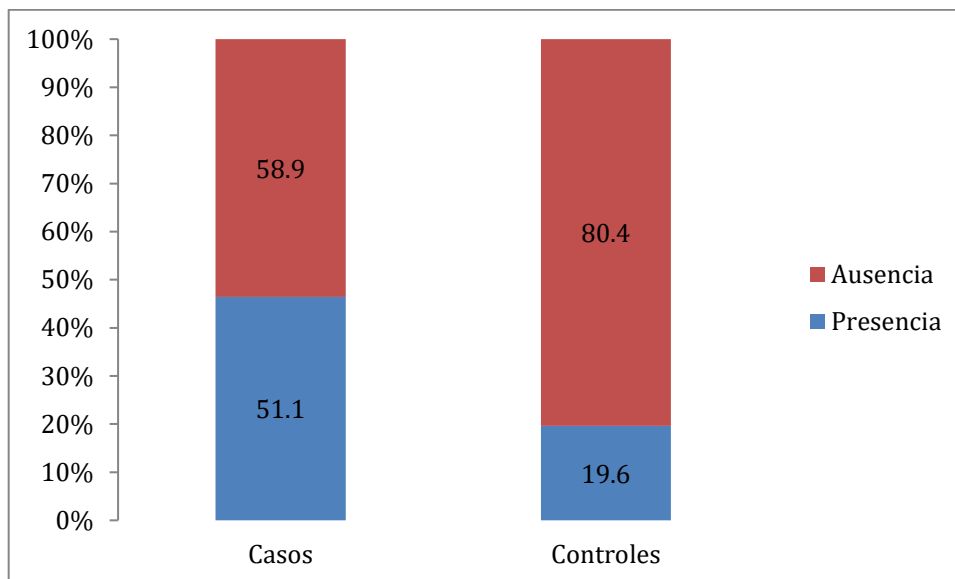


Fig. 4.5 Diagrama de barras apiladas para la distribución de infestación por *DF* en casos de CBC nodular y controles. *Fuente: Tabla V*

4.6 Densidad de infestación por *DF* en casos de CBC, en el subgrupo nodular y en controles.

La densidad expresada como el número de copias del ADN del *DF* / 1.125 mg de tejido varió en los diferentes grupos estudiados. Mientras que entre los controles era de 15.29 ± 44.7 , en el CBC en general era de 90.10 ± 224.1 , y en el subgrupo nodular era aún mayor, alcanzando el valor de 112.4 ± 260.2 .

Al comparar las densidades mediante la prueba de rangos de la U de Mann Whitney, al no estar distribuidas normalmente de ambos subgrupos de casos positivos, es decir, el CBC vs controles, y CBC nodular vs controles, las

diferencias resultaban muy significativas para ambas comparaciones ($p = 0.008$, $p = 0.001$, respectivamente).

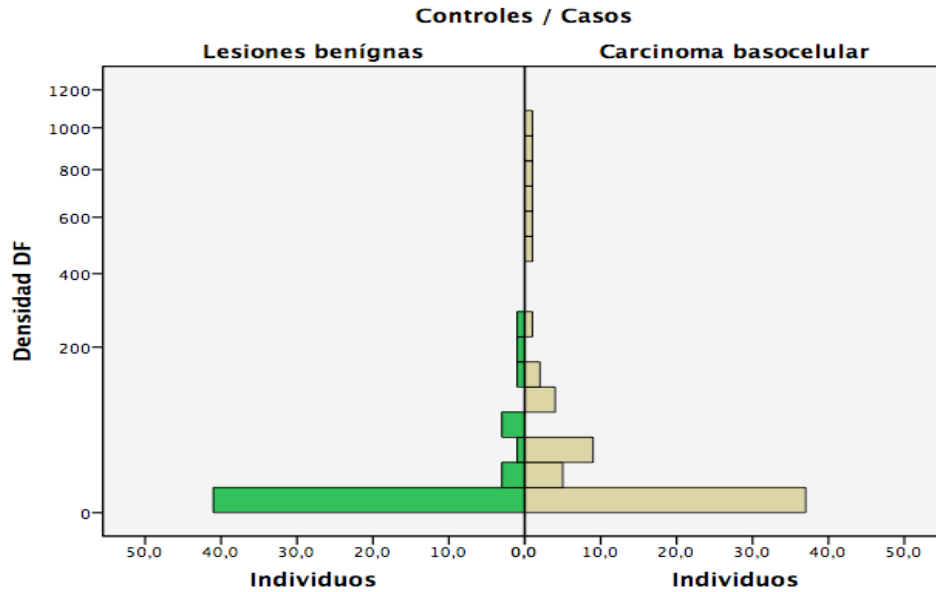


Fig. 4.6 Distribución de frecuencias de la densidad de *DF* en casos y controles expresada en número de copias de ADN por 1,125 mg de tejido. Fuente: base de datos.

4.7 Correlación entre la edad y la densidad de infestación.

Se verificó mediante dos pruebas.

- Análisis de varianza para las medias de las densidades detectadas de *DF* en el CBC y los grupos de edades que detectó la ausencia de diferencias significativas ($F= 2.216$; $gdl = 2$; 112 ; $p = 0.114$).
- Análisis de Correlación de Pearson, que brindó una $r= 0.14$; $p > 0.05$.

4.8 Análisis por localización anatómica

4.8.1 Prevalencia y densidad general del DF por localizaciones.

Aunque en cifras absolutas la mayor prevalencia se observó en los cantos y mayor densidad en el canto interno, las diferencias no resultaron significativas.

Tabla VI. Prevalencia y densidad del DF por localizaciones.

Localización	Prevalencia %	Densidad media \pm DE
Canto interno (n=25)	56	123.18 \pm 263.7
Párpado inferior (n=52)	23	38.96 \pm 141
Canto externo (n=9)	55	16.13 \pm 23.1
Párpado superior (n=29)	20	44.69 \pm 145.2
P	0.006	0.011

Nota: La densidad se expresa como número de copias de ADN del D. folliculorum por 1.125 mg de tejido. Fuente: Base de datos

Al comparar los resultados de prevalencia y densidad entre casos y controles por localización se encontró mayor prevalencia y densidad en el CBC localizado en el canto interno y en el párpado inferior comparado con los controles. (Tabla VII)

Tabla VII. Prevalencia y densidad del *DF* en casos de CBC y controles por localización.

Localización	Grupo	Prevalencia %	p	Densidad media ± DE	P
Canto interno	Casos (n=19)	68.4	0.023*	159.5 ± 249.6	0.07
	Controles (n= 6)	16.7		8.19 ± 20	
P. inferior	Casos (n=36)	30.6	0.036*	54.6 ± 167.5	0.06
	Controles (n=15)	6.3		3.75 ± 15.0	
Canto externo	Casos (n=4)	50	0.64*	7.38 ± 5.8	0.55
	Controles (n=5)	60		23.12 ± 29.5	
P. superior	Casos (n=5)	20	0.73*	148.2 ± 331.3	0.93
	Controles (n=24)	20.8		23.13 ± 61.5	

*Nota: La densidad se expresa como número de copias de ADN del D. folliculorum por 1.125 mg de tejido. * Se usó la razón de verosimilitudes del Chi Cuadrado por haber frecuencias menores que 5 en alguna de las celdas de la tabla de contingencia de 2 x 2. Fuente: Base de datos.*

4.8.2 Regresión logística binaria.

En esta parte del estudio vamos a construir un modelo estadístico que nos permita predecir la aparición de los CBC basados en las variables estudiadas. Estas variables son: variable dependiente “Tipo de Lesión [Benigno, Maligno]”, variables independientes la “Presencia de DF (PRES) [Si, No]” y “Localización [PS, CE, PI, CI]”. Partimos de que la probabilidad de tener CBC es del 0,5 que es el valor que por defecto utiliza la regresión logística.

Tabla VIII. Resumen del modelo

Paso	Logaritmo de la verosimilitud -2	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	125,294 ^a	,247	,331

Tabla IX. Clasificación. Valores de sensibilidad y especificidad del modelo. El valor de corte es 0,500.

Observado	Pronosticado		
	Controles	Casos	Porcentaje correcto
Controles	26	25	51,0
Casos	7	57	89,1
Porcentaje global			72,2

Los resultados de la prueba Omnibus del modelo nos muestra que las variables introducidas (Presencia DF + Localización) mejora el ajuste de forma significativa

($p = .000$) con respecto al modelo con únicamente la constante, lo cual se corrobora con la prueba de Hosmer y Lemeshow ($p = .661$). Las pruebas R^2 de Cox y Snell (0,247) y R^2 de Nagelkerke (0,331) nos indican que entre un cuarto y un tercio de la variación de la variable dependiente (Tipo de CB) es explicada por las variables incluidas en el modelo (Presencia DF + localización). Así mismo, el modelo tiene una especificidad del 51% y una sensibilidad del 89.1%, por lo que clasifica bastante bien a los individuos con CB Maligno.

Con las VI “Presencia de DF [Si, No]” y “Localización [PS, CE, PI, CI]”, y con la VD “Tipo de CB [Benigno, Maligno]”, se modeliza la siguiente ecuación de regresión logística Binaria. Señalar que el coeficiente de la localización CI no resulta significativo, pero se incluye dentro de la ecuación dado que el resto de localizaciones si resultan significativas.

Tabla X. Variables y coeficientes del modelo propuesto en la ecuación.

		Variables en la ecuación						95% C.I. para EXP(B)	
		B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	Inferior	Superior
Paso 1 ^a	PRES01(1)	1,173	,520	5,087	1	,024	3,232	1,166	8,956
	Localizacion			20,337	3	,000			
	Localizacion(1)	,989	,872	1,287	1	,257	2,688	,487	14,839
	Localizacion(2)	2,470	,698	12,510	1	,000	11,826	3,008	46,491
	Localizacion(3)	2,479	,597	17,214	1	,000	11,927	3,698	38,466
	Constante	-1,887	,532	12,564	1	,000	,152		

a. Variables especificadas en el paso 1: PRES01, Localizacion.

La única variable clínicamente relevante en el modelo es la presencia o no del *DF* como factor de riesgo.

Capítulo V

Discusión

Como resultado de la presente tesis doctoral hemos obtenido los siguientes aportes científicos-técnicos: se ha logrado estandarizar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación de *Demodex folliculorum* (DF) en tejidos de párpados humanos. La metodología empleada permite detectar con alta sensibilidad y especificidad la presencia del parásito en las lesiones producidas en el Carcinoma Basocelular (CBC) de los tejidos perioculares, y específicamente en la variante clínico histológica nodular. Como aporte práctico se ha logrado cuantificar y establecer la densidad de infestación por área de tejido.

El presente estudio sitúa al ácaro DF, tanto su presencia como su densidad de infestación, como factor de riesgo de desarrollar carcinoma cutáneo de tipo Basocelular específicamente en la región de alrededor de los ojos (peri-ocular), ampliando de esta manera la patogenia de esta patología y abriendo nuevas puertas a futuras investigaciones sobre esta asociación.

Estos hallazgos se realizaron con una técnica de Biología Molecular, la PCR en tiempo real, lo cual aumenta el valor de este hallazgo al presentar la capacidad de detección de este parásito con una alta sensibilidad y reproducibilidad, fortaleciendo los hallazgos de autores previos quienes habían utilizado técnicas menos reproducibles.

Dado el elevado coste de la técnica, no se usa de rutina en la práctica clínica, por lo que desarrollarla específicamente en el laboratorio para la investigación¹¹², la cual no había sido creada con anterioridad para la detección del ácaro *Demodex*. Y que en un futuro podría utilizarse para detectar el germen en la práctica clínica o en investigaciones futuras.

Si bien el CBC es el más frecuente de los tumores malignos de las personas blancas¹¹³, y su incidencia mundial varía¹¹⁴, con según localizaciones geográficas y puede llegar hasta 726 por 100 000 habitantes, como ocurrió en Australia (1993)¹¹⁵, pero como plantean Rubin, Chen y Ratner en el año 2005, la incidencia absoluta es difícil de determinar, ya que los cánceres no melanomas se excluyen de las estadísticas de los registros de cáncer¹⁵.

En el área Mediterránea de España en el año 2006 la incidencia fue 253 por 100 000 personas-año; y la tasa estandarizada fue de 128 por 100 000 personas-año, según la población mundial y de 195 por 100 000 personas-año, según la población europea. Después de los 65 años, las tasas de incidencia ajustadas para la edad muestran un incremento significativo mayor en hombres que en mujeres¹⁰⁷.

Estas diferencias entre países no solamente se deben a que son diferentes poblaciones de estudio con diferente exposición al sol y diferentes estilos de vida,

sino también por los diferentes métodos usados para obtener los datos. Los métodos prospectivos dan incidencias superiores que los retrospectivos¹⁰⁷.

Por otra parte muchas lesiones son tratadas sin confirmación microscópica y muchos pacientes desarrollan múltiples CBCs. Cuando aparece en pacientes añosos sin síntomas, raramente los pacientes buscan atención médica. Por otra parte, en los certificados de defunción no aparece el CBC como causa básica de muerte. Todo ello parece estar incidiendo en el subregistro que se ha planteado para este tipo de cáncer¹⁰⁷.

Peor aún la fisiopatología del mismo no es del todo conocida, por lo que la idea de encontrar una asociación entre el tumor y algún factor a nivel local ha sido la diana de varios investigadores en los últimos años para poder ampliar los conocimientos sobre la fisiopatología de esta enfermedad, la cual es muy prevalente principalmente en regiones anatómicas tales como la cara y el cuello, sobre todo en personas de piel clara, pelo rubio, ojos azules o verdes y con pecas, que se mencionan como factores de riesgo que actúan predominantemente a través de una protección reducida a la radiación ultravioleta (RUV)^{116, 117}. Factor no tomado en cuenta en nuestro estudio al ser difícil su revisión de manera retrospectiva.

En el caso del área periocular, la piel es susceptible de numerosas neoplasias benignas y malignas, y estas últimas se comportan más agresivamente

que las mismas variedades en otras partes del cuerpo humano. El CBC en esta región topográfica es el más frecuente^{116, 117}. Por lo cual es un área de gran importancia para el Oftalmólogo al afectar indirectamente la visión al causar, en etapas tempranas problemas mecánicos que pueden, en fases tardías, llegar a la pérdida del globo ocular.

Este tumor no produce alta mortalidad, pero la morbilidad es alta y constituye un problema de salud. Aunque el principal factor involucrado es la RUV, puede haber otros factores de riesgo implicados. Es por ello que se decidió estudiar al mismo y posible asociación con infestación cutánea basados en la literatura actual.

Las dos especies del ácaro *Demodex*, el *DF* y el *brevis* (*DB*) están presentes en individuos sanos¹¹⁸ y el papel de los mismos en la patogenia de las enfermedades cutáneas en pacientes adultos ha sido ampliamente discutido. En nuestro estudio lo encontramos en el grupo control en un 19.6% de los casos, en teoría, este grupo es de pacientes sanos, al menos libres de CBC.

Se plantea que solo con una densidad mayor de 5 ácaros / cm² de área cutánea se logra producir actividad patogénica¹¹⁹. Según nuestros resultados, una mayor densidad de infestación (expresada como el número de copias del ADN del *DF* / 1.125 mg de tejido) varió en los diferentes grupos estudiados. Mientras que entre los controles era de 15.29 ± 44.7, en el CBC en general era de 90.10 ±

224.1, y en el subgrupo nodular era aún mayor, alcanzando el valor de 112.4 ± 260.2 . Con estos datos podemos pensar que el hecho no es solo tener presente el *DF*, sino el que las grandes infestaciones pueden relacionarse con patología cutánea como se comprueba.

El DF se ha relacionado con rosácea papular y papulopustulosa, dermatitis perioral, dermatitis seborreica, erupción pustular, blefaritis, alopecia seborreica y otras lesiones cutáneas, aunque persiste mucha controversia¹²⁰. Se ha planteado también como uno de los factores que gatillan la carcinogénesis de los CBC⁸⁰ que es nuestra hipótesis de estudio, pero también se ha encontrado en lesiones benignas como es el adenoma sebáceo⁶³, lo cual puede ser la base de estudio para futuras investigaciones de las diversas entidades dermatológicas posiblemente relacionadas y más aun teniendo el método tan fiable diseñado como es la PCR en tiempo real para el *DF*¹¹².

Si bien la infestación ocurre de persona a persona, por contacto directo, o a través de la ropa de cama, los ácaros no son visibles a simple vista. Se requiere de la microscopia mediante lámpara de hendidura o microscopio de luz¹¹⁸. Técnicas poco reproducibles en el campo de investigación. La presencia del ácaro *Demodex* en el área periocular se ha buscado en diversos trabajos debido a su asociación con enfermedades inflamatorias crónicas locales. Encontrando una prevalencia del *Demodex* en individuos sanos y enfermos con prevalencias que van desde 0 al 100 % de las muestras estudiadas. Posiblemente debido a las

diferentes maneras de cuantificación que existen, y aunque las dos especies que viven en el hombre tienen nichos diferentes, predomina la infestación por *DF*¹¹⁸⁻¹²⁰.

La prevalencia del *DF* es diversa según la población estudiada. En pacientes con ausencia de patología maligna dermatológica, se ha encontrado el ácaro en un 18% en los pacientes en España⁶¹, en el 29,2% de los individuos en Colombia¹²¹, del 26,7% en Turquía⁷⁴ y en Bélgica del 25%³⁴. En México del 27,3 % en individuos entre 11 y 50 años con similar distribución por sexo, e incremento con la edad de los individuos¹¹⁹. En estudiantes chinos del 30,8%¹²². Nuestro estudio lo encontró en el 19.6% de los controles de 65 ± 13,1 años [rango, 36.6 a 87 años], por lo que coincide con el estudio español anteriormente mencionado.

La prevalencia encontrada del *DF* en pacientes con dermatitis peri-oral, rosácea, y dermatitis seborreica fue del 27 %⁷⁷. En otros trabajos se ha detectado prevalencia del 58 % y del 38,6 % en acné rosácea^{123, 124}. Por lo que se evidencia la cantidad de literatura sobre el tema, sin la posibilidad de estandarización al ser métodos de cuantificación variables.

Según una serie de estudios, la intensidad de la infestación por *DF* fue significativamente mayor en pacientes diabéticos¹²⁵, en pacientes con insuficiencia renal¹²⁶, y más recientemente en obesos¹²⁷. Seguramente debido a la relación conocida del ácaro con la inmuno-supresión del huésped. Este punto no fue tenido en cuenta en nuestro trabajo, por lo que se presenta como una limitación del estudio. Podría ser un factor a incluir en futuras investigaciones. Se plantea que en

los individuos obesos hay mayores niveles de adipoquinas y citoquinas pro-inflamatorias, tales como la leptina y la IL-6, que estimulan la liberación de ACTH y la producción de corticosteroides, mediadores que tienen efectos deletéreos en la inmunidad, lo que resulta en una inmunosupresión que se correlaciona con el incremento de la densidad del *DF*¹²⁷. Sin embargo, no hay que olvidar que muchas infestaciones por este ácaro son asintomáticas, por lo que su rol no queda aclarado.

Al revisar la biología del ácaro se descubre que se alimenta principalmente de sebo, de un medio líquido rico en proteínas y grasas de los folículos inflamados, lo que es una fuente excelente para su nutrición y es en la cara, nariz, y región periocular donde se acumula mayormente el sebo. Es por ello sitio de asiento frecuente de estos agentes infestantes¹²⁸. A nivel oftalmológico es interesante la región periocular pero a nivel dermatológico y a nivel oncológico de deben abrir puertas de estudios a todas estas regiones donde se asienta el agente.

Como se ha venido mencionado, la demodicosis causa una reacción inflamatoria en la zona que habita, a nivel palpebral ocasiona blefaritis crónicas resistentes a los tratamientos habituales⁶¹, por lo cual para nuestro estudio, este punto fue uno de los criterios de exclusión: lesiones con vinculación ya conocida con el *DF* como es la inflamación crónica, que al parecer sucede cuando estos ácaros se multiplican provocando una reacción irritante¹²⁸.

Con relación a la edad se ha planteado que el ácaro *DF* es más prevalente en ancianos, un estudio realizado en el 2005 sobre blefaritis crónica en España encontró una densidad de infestación aumentada en relación con la edad avanzada⁶¹. Por lo general se describe la demodicidosis como una infestación de pacientes adultos con una baja frecuencia en niños y adolescentes que tienen pocas glándulas sebáceas donde el ácaro puede habitar¹²⁹. En nuestro estudio, un criterio de exclusión, eran los pacientes menores de 18 años, al ser menores de edad y al no aportarnos capacidad de ser comparables con los casos con CBC que usualmente son grupos etarios mayores. Incluimos edades en el grupo de CBC de un promedio de 67.7 ± 13.5 años [rango, 35.8 a 89.7 años] vs 65 ± 13.1 años [rango, 36.6 a 87 años] en el grupo control. Realizamos el análisis de Correlación de Pearson entre la densidad de infestación y la edad, la cual no nos brindó una correlación ($r= 0,14$; $p > 0.05$).

En el 42,2 % de las biopsias del área periocular en los CBC se encontró la presencia de *DF*, aumentando este porcentaje al 51,1% de los sujetos con la variante Nodular de los CBCs. Son datos similares a los encontrados por los trabajos hechos en Turquía donde se evidenció esta presencia en el 65,6% de las biopsias de CBCs palpebrales estudiado⁸⁰, o en China donde se encontró *DF* en el 56%¹⁰³ de los Basaliomas. Estos dos últimos estudios realizados con técnicas de conteo directo bajo el microscopio de luz. Lo que supone que en la mitad de las biopsias estudiadas por nosotros y por la literatura previa, se evidenció dicha

infestación. Nuestros datos y los de estudios previos nos llevan a aceptar la hipótesis de nuestro estudio de que existe una mayor presencia del ácaro en las lesiones malignas en el área periocular de tipo CBC comparado con las lesiones benignas.

La mayor densidad del *DF* en relación con las lesiones de tipo CBC se ha encontrado en los trabajos realizados por Sun J¹⁰³ y Erbagci et al.^{80, 105} quienes también encuentran significativamente mayor cantidad del ácaro por pestaña en las piezas de anatomía patológica del borde palpebral al examinarlas al microscopio de luz. Con estos hallazgos y con los nuestros contrastan los resultados de Talghini S⁷³ quien no encuentra una relación en el basalioma pero sí en el melanoma, otro tipo de cáncer de piel aún más agresivo.

Sin embargo, estos resultados hay que mirarlos con cierta reserva, ya que las técnicas empleadas para su detección fueron visuales, subjetivas, y ello produce limitaciones y sesgos importantes. Todos ellos usan un índice de infestación que depende de la cantidad de ácaros encontrados por unidad pilosebácea, un método con los inconvenientes inherentes a la técnica por la dificultad para distinguir el ácaro de los detritos celulares y heces del mismo, una vez extraída y procesada la muestra. En nuestro caso se emplearon técnicas más objetivas, válidas y fiables, como la PCR, por lo que los resultados pueden diferir de los reportados por esos otros investigadores.

Las técnicas de amplificación molecular, debido a su alta efectividad, son más precisas y fiables. Aunque la técnica de PCR aplicada a las biopsias elimina estas limitaciones, presenta dificultad en cuanto a la estandarización de la cantidad de tejido estudiado para establecer la densidad relativa del peso, ya que se debe elegir bien la zona de corte que contenga al menos 1 cm² de superficie. Además, durante el corte con el micrótopo, puede adquirir impurezas que modifican en pequeña proporción el peso en teoría, por lo cual se considera que los resultados serán siempre datos aproximados.

El CBC es una entidad de adultos en general, aunque se puede desarrollar en jóvenes, como plantea Belshi¹², sobre todo en aquellos con lesiones predisponentes como el síndrome nevoide³³, el nevus sebáceo de Jadassohn o la xeroderma pigmentosa²². En el presente trabajo no existió ningún caso con alguna enfermedad que predisponga a la aparición de CBC.

La infestación del *DF* en la región facial y área periocular se centra principalmente en la nariz y canto interno^{55, 65}, lo cual se confirma en nuestro estudio donde se encontró mayor presencia y densidad de infestación del ácaro en el canto interno con una presencia del ácaro en el 56 % de las biopsias provenientes de dicha localización, con una densidad de infestación mayor a las demás (123.18 número de copias de ADN del *DF* por 1.125 mg de tejido estudiado). Dicha zona es la segunda localización de la región periocular en

frecuencia de aparición del CBC después del párpado inferior^{37, 38}, lo cual confirma una de nuestras hipótesis de estudio.

El CBC no tiene afinidad por alguno de los sexos¹⁶, sin embargo se plantea que puede ser más frecuente y recurrente en la región periorcular de las mujeres que en otras regiones del cuerpo y que en esa región aparecen subtipos histológicos más raros¹⁷. Sin embargo, en nuestro trabajo no se encontraron diferencias en cuanto al sexo.

La fisiopatología del CBC aún no se ha esclarecido, pero se conoce que existe una relación entre el basalioma y la unidad pilosebácea, ya que se piensa que se origina a partir de células pluripotenciales en la capa basal de la epidermis o el folículo⁸, sitio de asentamiento del ácaro donde causa inflamación crónica local y daño directo^{35, 130}.

Se piensa que el CBC puede surgir a partir de una inflamación crónica, trauma, cicatriz o quemadura preexistente²⁵, pero el principal factor tradicionalmente relacionado con el CBC es la cantidad de exposición a LUV. Afirmación puesta a discusión ya que un estudio suizo no ha encontrado asociación entre la cantidad de radiación UV y la ubicación de los basaliomas, encontrando similar la exposición en párpado superior e inferior²³. Al no existir claridad en este tema, se deben buscar causas del CBC a nivel local que nos hagan entender aún más la fisio-patología de esta entidad. Esta relación fue aún

más pronunciada entre los sujetos sensibles al sol con tendencia a las quemaduras. Otros estudios han corroborado que la exposición intermitente, pero intensa, al sol parece incrementar el riesgo, mientras que la acción acumulada a largo plazo de la exposición a los rayos ultravioletas no parece guardar relación^{15, 16}.

Se han planteado diversos mecanismos para establecer la acción de las radiaciones ionizantes y la aparición del cáncer cutáneo. Alteraciones genéticas y epigenéticas pueden estar implicadas¹³¹. Este factor de riesgo es difícil analizarlo de forma individual por lo cual es un factor de riesgo difícilmente colectable para incluirlo en nuestro análisis²³. Para conocer la afectación de la radiación UV tanto la A como la B, son necesarios estudios donde se evidencien las alteraciones epigenéticas y mutaciones ocurridas en la piel con lesiones tumorales y que no suceden en la piel sana (protegida o no protegida vs la luz del sol) causando daño en el ADN en los puntos mutables del gen supresor de los tumores p53, lo que conduce al desarrollo del cáncer cutáneo.^{132, 133} En realidad, la susceptibilidad parece ser determinada por una interacción compleja entre la duración y la intensidad de la exposición a la RUV y genes polimórficos y no hace parte de nuestra investigación actual¹¹⁵. A pesar de no profundizar en este tema, hay que tener claro que es una limitación de nuestro trabajo a tener en cuenta.

Entre otros factores de riesgo que se mencionan para la aparición de los CBC, son los medicamentos fotosensibilizadores, especialmente los

antimicrobianos, que aumentan el riesgo de CBC, en particular en los de comienzo temprano (por debajo de los 50 años), sobre todo con el uso de las tetraciclinas para el tratamiento del acné en la adolescencia^{22, 29}. El consumo de agua contaminada con arsénico y de medicamentos que lo contienen parece aumentar el riesgo de CBC^{30, 31}. Todos estos factores de riesgo tienen poca evidencia científica y no están claramente definidos. Ninguna de estas variables ha sido tomada en cuenta en nuestro estudio.

La inmunosupresión en receptores de órganos incrementa el riesgo de CBC en proporción a la duración de la terapia inmunosupresora y el riesgo de este tumor aumenta 10 veces comparado con la población general³², como pudiera ocurrir en otras enfermedades que comprometen al sistema inmunitario, tales como la infección por HIV¹³⁴. En nuestro estudio no hubo ni casos trasplantados ni pacientes HIV+, por lo que se pueden descartar estos factores de riesgo.

También se piensa que la infestación por *Demodex* por sí misma, condiciona una inmunosupresión en el huésped¹³⁵. Entre las acciones del *DF* están la de regurgitar el material comido y depositarlo en las pestañas. Este material contiene proteasas y lipasas que digieren aún más material fuera del cuerpo del ácaro para el consumo posterior, posiblemente preparando alimento para la próxima generación¹³⁶. Como se planteó anteriormente se alimenta de sebo, sin embargo, para obtener la proteína necesaria para su exoesqueleto, el consumo de queratina de las células epidérmicas es posible. En ocasiones porta

bacterias que actúan como limpiadoras de pestañas, y por tanto se ha considerado por algunos como microflora que incluye también *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp y *Bacillus oleronius* que pueden actuar como co-patógenos en la enfermedad humana^{137, 138}. Este *Bacillus oleronius* que es portado dentro de *Demodex* ss, puede producir proliferación monocítica en pacientes con acné rosácea⁷⁵.

La sospecha de la reacción local a las células del estrato basal de la piel no radica en una simple suposición. Está claro que los agentes microbianos a nivel local producen inflamación e irritación, que de manera crónica pueden alterar el funcionamiento celular. La muerte del ácaro puede liberar una gran carga de antígenos de este bacilo que inician una respuesta inflamatoria en la zona. La respuesta del hospedero es principalmente por incremento de linfocitos T CD4 auxiliares o inductores¹³⁹, macrófagos y células de Langerhans, lo que indica una respuesta inmune innata¹⁴⁰. Por otra parte, parece que el *Demodex* incrementa las metaloproteinasas de la matriz extracelular, involucradas en la inflamación, con lisis de colágeno y angiogénesis¹⁴¹, lo que pudiera explicar la producción de laxitud y ectropión en estos pacientes.

En el 2017, Tatu, Ionesu y Cristea describen al *Bacillus pumilus* en cultivos de lesiones de rosácea infestadas con *DF*¹⁴². Este bacilo es comúnmente aislado de una variedad de fuentes, particularmente de las heces de los animales. Tiene propiedades citotóxicas, actividad hemolítica, puede producir lecitinasa y tiene

acción ficolítica sobre la caseína. Es posible que estas propiedades puedan estar relacionadas también con el proceso inflamatorio observado en casos de rosácea.

Cuando el individuo infestado es asintomático existe una relación simbiótica con tolerancia inmune ya sea porque está ocurriendo en un sitio privilegiado sin trastornos inmunes dentro del folículo, o debido a la disminución de la respuesta inmune del hospedero por parte del mismo ácaro. Si se pierde la resistencia y homeostasis del hospedero entonces se desencadenaría el proceso de la enfermedad¹³⁶. Es por esta razón que se encuentran también habitando pacientes sanos sin producir enfermedad.

Una vez establecida la asociación entre el *DF* y el CBC, estaríamos ante un posible o potencial factor de riesgo más para el desarrollo del mismo, el cual es detectable y fácilmente tratable en la práctica clínica, de esta manera se conseguiría prevenir la aparición de una enfermedad con una tasa de incidencia tan elevada.

El presente trabajo confirma los resultados obtenidos anteriormente en cuanto a que encuentra una asociación entre la presencia del ácaro *DF* y el CBC del área periorcular¹⁰⁵, con la diferencia de que en nuestro estudio hemos usado técnicas de biología molecular para la realización del conteo, como es la PCR.

En la actualidad, el estudio del *Demodex* en humanos mediante PCR solo se encuentra descrito para el estudio de la rosácea⁷².

El uso de PCR aumenta la sensibilidad al 100%, como explica el Dr. Tenorio en su artículo publicado en la Revista Española de Quimioterapia, Indicadores de calidad 10.2¹²², ya que detecta directamente el ADN del ácaro en las biopsias de anatomía patológica y no depende del entrenamiento del investigador si se realiza la visualización directa del ácaro, evaluada bajo el microscopio de luz, en la cual pueden haber confusiones dependientes tanto del evaluador como de la misma muestra, la cual durante el proceso de corte puede deteriorarse y causar errores.

No hay que olvidar que el cáncer es una enfermedad esencialmente genética, caracterizado por inestabilidad genómica y acumulación de múltiples defectos genéticos y epigenéticos. Las alteraciones genéticas que inducen al cáncer pueden ser heredadas, como mutaciones en las líneas germinales en genes supresores de tumores y en oncogenes, produciendo síndromes cancerosos familiares, y por otra parte factores ambientales pueden también contribuir a la carcinogénesis¹⁴³. Por lo cual el presente hallazgo puede ser uno de los factores ambientales a tratar para poder reducir la incidencia de estos tumores.

Múltiples factores contribuyen a la patogenia del CBC, pero el mecanismo subyacente es la alteración genética. Por lo que el descubrimiento del rol de la vía

de señalización de “Sonic hedgehog” (SHH) ha mejorado dramáticamente nuestra comprensión de esta enfermedad. El SHH juega un papel crítico en el temprano desarrollo embriológico, y contribuye a la formación del tubo neural y la piel (ectodérmicos) y los sistemas musculoesqueléticos y hematopoyéticos^{144, 145, 146}. Postnatalmente SHH deja de funcionar, aunque continúa involucrado en el mantenimiento de las poblaciones de células madres de varios tejidos, incluyendo la piel. Por tanto, la falta de regulación de la señalización del SHH puede producir graves malformaciones congénitas, tales como holoprosencefalia y ciclopia, mientras su activación postnatal puede dar lugar a varios tumores, incluyendo al CBC de la piel, al meduloblastoma y al rhabdomyosarcoma¹⁴⁶.

La radiación ultravioleta induce mutaciones en la vía de la regulación de la proteína SHH en el 80 % de los pacientes con CBCs esporádicos, algunas de las cuales inactivan a la proteína de membrana PTCH1, y otras activan a otra proteína de transmembrana, la SMO que puede funcionar como un oncogén en la señalización del SHH¹⁴⁵.

También se han encontrado mutaciones en el gen TP53 en el 44-100 % de los casos de CBC¹⁴⁷. Este gen codifica la proteína p53, conocida como el “guardia del genoma” por su rol al inducir apoptosis en células defectuosas y potencialmente malignas⁴⁰. La mutación en este gen también es producida por radiaciones UV, lo que puede relacionarse con la agresividad del tumor¹⁴⁷.

El tabaquismo puede influir también por los componentes carcinogénicos del humo, como por la inmunodepresión que produce¹⁴⁸.

La feomelanina, encontrada en los individuos de piel blanca, con vellos escasos, puede contribuir al daño inducido por los rayos UV, ya que puede actuar potenciando la generación de radical oxígeno en respuesta a los rayos UV²³.

En resumen, la piel humana, además de funcionar como una barrera física para detener la entrada de patógenos, alberga numerosos organismos comensales¹²¹. Por tanto, la piel y el sistema inmunitario interactúan con microbios, para mantener la homeostasis cutánea, a pesar de los continuos retos proporcionados por diversos factores ambientales. En algunos casos, la radiación UV puede inducir inmunosupresión, que altera al microbioma cutáneo y sus componentes, además de los daños en el ADN y la membrana²³. Si se adiciona a estos hechos, la presencia de un ectoparásito, con sus interacciones con la piel, la no producción de agentes superóxido reactivos que lo pudieran atacar, se podría alterar aún más la homeostasis y contribuir a la formación de tumores tales como el CBC.

El presente estudio sitúa al *DF* como un posible factor de riesgo de carcinogénesis en el CBC del área periocular, sirviendo para generar nuevas hipótesis sobre la patogenia de este y sobre el rol patológico del ácaro en las diversas enfermedades cutáneas, para lo cual sería necesario desarrollar nuevos

trabajos prospectivos con mayor nivel de evidencia. Sería muy recomendable cuantificarlo, por ejemplo, en las diversas zonas corporales cutáneas, donde también se desarrollan este tipo de enfermedades dermatológicas malignas.

Se puede entonces hablar de tratamiento específico no invasivo para las lesiones de carcinoma basocelular de los párpados y de la piel, no solamente con imiquimod^{49, 50} para el mismo, sino también con medicaciones que combatan la infestación con *DF* y las infecciones bacterianas secundarias a la infestación.

La prevención de la demodicidosis estaría dada principalmente por la higiene personal, sobre todo para individuos desde la 5ta década de vida en adelante donde aumenta la incidencia de la infestación y la probabilidad de enfermedad del área periocular.

Capítulo VI

Conclusiones

- La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es efectiva para el diagnóstico, la determinación de la prevalencia y la densidad del ácaro *Demodex folliculorum* (DF).
- Existe mayor presencia de DF en el Carcinomas Basocelular (CBC) comparado con lo hallado en las lesiones benignas.
- Existe mayor densidad de DF en el CBC comparado con lo hallado en las lesiones benignas.
- Hay mayor presencia de DF en el canto interno y el párpado inferior comparado con lo detectado en las lesiones benignas de igual localización.
- No se detectó correlación entre la edad y la densidad de infestación por el DF.
- El presente trabajo constata una asociación entre el DF y el CBC el cual sirve como base para crear nuevas hipótesis sobre la patogenia del CBC y el papel patológico del DF en lesiones de la piel.

Capítulo VII

Referencias Bibliográficas

1. Anatomía e histología ocular. Curso 0. Óptica y Optometría. In: Glosario Terminológico. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza; 2012/2013. p. 1–30. Disponible en <https://es.scribd.com/document/342924210/ojo-pdf>.
2. Pastor Pons I. Terapia manual en el sistema oculomotor. Vol. 1. Zaragoza: Editorial Elsevier Masson; 2012. 256 p.
3. Harry J, Misson G. Clinical Ophthalmic Patholog. Oxford: Editorial Butterworth-Heinemann; 2001: p 10-22.
4. Ferry A. The eyelids. En Sorsby A, ed. Modern ophthalmology, Vol. 4. Philadelphia: Editorial JB Lippincott; 1972. p. 833-53.
5. Turell ME. Eyelid, conjunctival, and orbital tumors: an atlas and textbook and Intraocular tumors: an atlas and textbook, Br J Ophthalmol; 2010; 94 (7): 958.
6. Spencer J. Basal Cell Carcinoma. En: Treatment of skin disease. Comprehensive therapeutic strategies. Edición 1. China: Editorial Mosby RDC Group; 2002. Cap 22.
7. Weedon D. Tumores de la epidermis. En: Piel Patología. Edición 1. Madrid: Editorial Marban Libros, S.L; 2002. p. 635-72.

8. Kirhkam N. Tumors and Cyst of the Epidermis. En: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Jhonson B, editors. *Lever's Histopathology of the Skin*. Edición 8. Philadelphia: Editorial Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 685-746.
9. Herrera Ceballos E, Herrera Acosta E. Basal cell carcinoma: concept and history. *Monographs of Dermatology*. 2003;16(2): 65-6.
10. Sehgal VN, Chatterjee K, Pandhi D, Khurana A. Basal cell carcinoma: pathophysiology. *Skinmed*. 2014;12(3): 176-81.
11. Marzuka AG, Book SE. Basal Cell Carcinoma: Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Features, Diagnosis, Histopathology, and Management. *Yale J Biol Med* 2015;88(2): 167-79.
12. Belshi A. Current approach to eyelid basal cell carcinoma. The 1st International Conference on Research and Education-Challenges Toward the Future (ICRAE 2013). 2013: 1-6.
13. Tran H, Chen K, Shumack S. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2003;149(66): 50-52.
14. Yin VT, Merritt HA, Sniegowski M, Esmaeli B. Eyelid and ocular surface carcinoma: diagnosis and treatment. *Clinics in Dermatol* 2015; 33 (2): 159-169.

15. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2005; 353: 2262-9.

16. Lear JT, Smith AG. Basal Cell Carcinoma. *Postgrad Med J.* 1997;73: 538-542.

17. Bastiaens M, Hoefnagel J, Bruijn J, Westendorp R, Vermeer B, Bouwes J. Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinoma indicated different types of tumors. *J Invest Dermatol.* 1998;110: 880-4.

18. Carra RA, Taibjeeb SM, Sanders DSA. Basaloid skin tumours: basal cell carcinoma. *Curr Diagn Pathol.* 2007;13: 252–72.

19. Narbutt J, Lesiak A, Erkiert A, Sysa-Jedrzejowska A. Non-Melanoma Skin Cancer Development and Environmental Factors. *Polish Journal of Environmental Studies.* 2005;14(5): 545-50.

20. Fitzpatrick T. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *Arch Dermatol.* 1988;124: 869-71.

21. Seidl H, Kreimer-Erlacher H, Back B, et al. Ultraviolet exposure as the main initiator of p53 mutations in basal cell carcinomas from psoralen and ultraviolet A-treated patients with psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2001;117: 1688.

22. Hogan D, To T, Gran L, Wong D, Lane P. Risk Factors for Basal Cell Carcinoma. *Int J Dermatol.* 1989; 28(9): 591-3.
23. Lindgren G, Diffey BL, Larko O. Basal cell carcinoma of the eyelids and solar ultraviolet radiation exposure. *Br J Ophthalmol.* 1998;82: 1412–5.
24. Wojno TH. The association between cigarette smoking and basal cell carcinoma of the eyelids in women. *Ophthalmol Plast Reconstr Surg.* 1999;15: 390-2.
25. Noodleman FR, Pollack SV. Trauma as a possible etiologic factor in basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol.* 1986;12: 841–6.
26. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Fincham S, Coldman AJ, McLean DI. et al. Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 1995;131(2): 157–63.
27. Karagas MR, McDonald JA, Greenberg ER, Stukel TA, Weiss JE, Baron JA. et al. Risk of basal cell and squamous cell skin cancers after ionizing radiation therapy. For The Skin Cancer Prevention Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(24): 1848–53.
28. Ferrucci LM, Cartmel B, Molinaro AM, Leffell DJ, Bale AE, Mayne ST. Indoor tanning and risk of early-onset basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67(4): 552–62.

29. Robinson SN, Zens MS, Perry AE, Spencer SK, Duell EJ, Karagas MR. Photosensitizing agents and the risk of non-melanoma skin cancer: a population-based case-control study. *J Invest Dermatol.* 2013;133(8): 1950–5.
30. Karagas MR, Tosteson TD, Blum J, Morris JS, Baron JA, Klaue B. Design of an epidemiologic study of drinking water arsenic exposure and skin and bladder cancer risk in a U.S. population. *Environ Health Perspect.* 1998;106(4): 1047–50.
31. Boonchai W, Green A, Ng J, Dicker A, Chenevix-Trench G. Basal cell carcinoma in chronic arsenicism occurring in Queensland, Australia, after ingestion of an asthma medication. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43(4): 664–9.
32. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med.* 2003;348(17): 1681–91.
33. Evans DG, Fardon PA. Nevroid basal cell carcinoma Syndrome. *Gene Rev.* 2015;21: 18-9.
34. Uyttebroeck, W., Nijs, I., Maudgal, PC., Missotten, L. Incidence of *Demodex folliculorum* on the eyelash follicle in normal people and in blepharitis patients. *Société belge d'ophtalmologie.* 1982;201: 83-7.
35. Gao YY, Di Pascuale MA, Li W, Liu DTS, Baradaran-Rafii A, Elizondo A, et al. High prevalence of *Demodex* in eyelashes with cylindrical dandruff. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46: 3089–94.

36. Bartos V, Pokorny D, Zacharova H, Haluska P, Daboszova M, Kullova, M. et al. Recurrent basal cell carcinoma: A clinicopathological study and evaluation of histomorphological findings in primary and recurrent lesions. *Acta Dermatoven.* 2011;20: 20-2.
37. Payne JW, Duke JR, Butner R, et al. Basal cell carcinoma of the eyelids: a long-term follow-up study. *Arch Ophthalmol.* 1969;81: 53-8.
38. Pfeiffer MJ, Pfeiffer N, Valor C. Descriptive study on basal eyelid carcinoma. *Arch Soc Esp Oftal.* 2015;90(9): 426-31.
39. Silverman MK et al. Recurrent rates of treated basal cell carcinomas. Part 1: overview. *J Dermatol Surg Oncol.* 1991; 17: 713.
40. Raasch BA, Buettner PG, Garbe C. Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. *Br J Dermatol.* 2006;155: 401-7.
41. Weber R, Callender D. Clinical Assessment and Staging. En: *Basal and Squamous Cell Skin Cancers of the Head and Neck.* London: Williams&Wilkins; 1996. Cap 7. p. 65-77.
42. Chenga, B.; Stanley R.; Stoeckerb, W; Stricklin S., Hinton K. (2013). Analysis of clinical and dermoscopic features for basal cell carcinoma neural network classification. *Skin Res Technol.* 2013; 1-10.

43. Silverman MK, Kopf AW, Bart RS, Grin CM, Levenstein MS. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 3: surgical excision. *J Dermatol Surg Oncol.* 1992;18: 471-6.

44. Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, Bart RS, Levenstein MJ. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 2: curettage-electrodessication. *J Dermatol Surg Oncol.* 1991;17: 720-6.

45. Kuflik EG, Gage A. The five-year cure rate achieved by cryosurgery for skin cancer. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24: 1002-4.

46. Telfer NR, Colver GB, Bowers PW. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 1999;141: 415-23.

47. Veness M, Richards S. Role of modern radiotherapy in treating skin cancer. *Austral J Dermatol.* 2003;44: 159-166.

48. Silverman MK, Kopf AW, Gladstein AH, Bart RS, Grin CM, Levenstein MJ. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 4: x-ray therapy. *J Dermatol Surg Oncol.* 1992;18: 549-54.

49. Marks R, Gebauer K, Shumack S, Amies M, Bryden J, Fox TL, et al. Imiquimod 5% cream in the treatment of superficial basal cell carcinoma: results of a multicentre 6-week dose-response trial. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44: 807-13.

50. Stanley MA. Imiquimod and the imidazoquinolones mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol.* 2002;27: 571-7.
51. Ceilley RI, del Roso JQ. Current modalities and new advances in the treatment of basal cell carcinoma. *Inter J Dermatol.* 2006;45(5): 489-98.
52. Geisse J, Caro O, Lindholm J, Colitz L Stampone P, Owens M. Imiquimodo 5 % cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma. Results from two phase III randomized, m vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol.* 2004;50: 722-33.
53. Choontanom R, Thanos Sm Busse H., Stupp T. Treatment of basal cell carcinoma of the eyelids qith 5 % topical imiquimod: a 3-year follow-up study. *Graefe´s Arch Clin & Expern Ophthalmol.* 2007; 245, (8); 1217-20.
54. Rufli T, Mumcuoglu Y. The hair follicle mites *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis*: Biology and Medical Importance. A review. *Dermatologica.* 1981;162: 1-11.
55. Robledo Prada MA, Orduz Robledo M, Robledo Villegas M. Demodicidosis: revisión histórica. *Medicina Cutánea Iber Latin Am.* 2015;43(1): 75-82.
56. Zhao Y, Guo N, Xun M, Xu JR, Wang M, Wang DL. Sociodemographic characteristics and risk factor analysis of *Demodex* infestation (*Acari Demodicidae*). *J Zhejiang Univ Sci B.* 2011;12: 998-1007.

57. Liang L, Ding X, Tseng SC. High prevalence of *Demodex brevis* infestation in chalazia. *Am J Ophthalmol*. 2014;157: 342–8.
58. Annam V, Yelikar B., Inamadar A., Arathi P, Palit A. Histopathological study of Itchy folliculitis in HIV with their immunological features and treatment. XVII International AIDS Conference. 3-8 August 2008, Mexico City, Mexico. 2008.
59. Zhao YE, Wu LP, Hu L, Xu JR. Association of blepharitis with *Demodex*: a meta-analysis. *Ophthalmic Epidemiol*. 2012;19: 95–102.
60. Yücel A, Yilmaz M. Investigation of the prevalence of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* in rosacea patients. *Turkiye Parazitoloj Derg*, 2013;37(3): 195-8.
61. Rodríguez AE, Ferrer C, Alió JL. Chronic blepharitis and *Demodex*. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2005;80: 635–42.
62. Pelletier JS, Capriotti K, Stewart KS, Capriotti JA. *Demodex* Blepharitis Treated with a Novel Dilute Povidone-Iodine and DMSO System: A case report. *Ophthalmol Ther*. 2017: 16-8.
63. Dhingra KK, Saroha V, Gupta P, Khurana N. *Demodex*-associated dermatologic conditions - A coincidence or an etiological correlate. Review with a report of a rare case of sebaceous adenoma. *Pathol Res Pract*. 2009;205: 423–6.

64. Parásitos de la piel Demodex. Piel Hoy. Argentina: Jun 2013. Disponible en: <http://www.pielhoy.com.ar/articulos/parasitos-de-la-piel-demodex/>
65. Norn MS. Incidence of Demodex folliculorum on skin of lids and nose. Acta Ophthalmol. 1982;60: 575–83.
66. Coston TO. Demodex folliculorum blepharitis Trans Am. Ophthalmol Soc. 1967;65: 361-92.
67. Zhao YE, Wu LP, Hu L, Xu JR. Association of blepharitis with Demodex: a meta-analysis. Ophthalmic Epidemiol. 2012;19: 95-10.
70. Zeytun E, Tilki E, Dogan S, Mumcuoglu KY. The effect of skin moisture, pH, and temperature on the density of Demodex folliculorum and Demodex brevis (Acari: Demodicidae) in students and staff of the Erzincan Universtiy. Turkey-Intern J Dermatol. 2017;56(7): 762-6.
71. Patra VK, Byrne SN, Wolf P. The Skin Microbiome: is it affected by UV-induced immune suppression?. Front Microbiol. 2016;7: 1235.
72. Casas C, Paul C, Lahfa M, Livideanu B, Lejeune O, Alvarez-Georges S, et al. Quantification of Demodex folliculorum by PCR in rosacea and its relationship to skin innate immune activation. Exp Dermatol. 2012;21: 906–10.

73. Talghini S, Fouladi DF, Babaeinejad S, Shenasi R, Samani SM. Demodex mite, rosacea and skin melanoma; coincidence or association? *Turkiye Parazitol Derg.* 2015;39: 41–6.
74. Kemal, M., Sümer, Z., Toker, M. I., Erdoğan, H., Topalkara, A., & Akbulut, M. The Prevalence of Demodex folliculorum in blepharitis patients and the normal population. *Ophthalmic Epidemiology.* 2005;12: 287–90.
75. Liu J, Sheha H, Tseng SCG. Pathogenic role of Demodex mites in blepharitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010;10: 505–10.
76. Jingbo LB, Hosam S, Tsenga SCG. Pathogenic role of Demodex mites in blepharitis. 2010.
77. Georgala S, Katoulis AC, Kylafis GD, Koumantaki-Mathioudaki E, Georgala C, Aroni K. Increased density of Demodex folliculorum and evidence of delayed hypersensitivity reaction in subjects with papulopustular rosacea. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2001;15: 441–4.
78. Jasso Olivares JC, Dominguez Cherit J, Hojyo Tomoka MT, Díaz González JM. Demodicidosis: una revision clínica y terapéutica. *Dermatología CMG.* 2014;12(2): 122-7.
79. Akilov OE., Mumcuoglu KY. Immune response in demodicosis. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2004; 18: 440–4.

80. Erbagci Z, Erbagci I, Erkiliç S. High incidence of demodicidosis in eyelid basal cell carcinomas. *International Journal of Dermatology*. 2003: 567–71.
81. Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. Humana Press. 2006; 47-56.
82. Vierstraete A. *Principle of the PCR*. Εκδόσεις University of Ghent. 1999. Disponibile en: <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>
83. Innis MA., Gelfand DH. Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. 1990: 3–12.
84. Atlas RM, Bej AK. Polymerase Chain Reaction. In: Gerhardt, P., Murray, RGE, Wood WA, Krieg NR. *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology. 1994: 418-35.
85. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: Cancer J Clinicians*. 2015;65(2): 87-108.
86. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*. 2016;4(9): e609-e16.

87. Porta C. The etiological importance of the cutaneous density of *Demodex folliculorum*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. 2003.
88. Haas AF, Kielty DW. Basal cell carcinoma. *Eye and Skin Disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996: 395-404.
89. Alfaro A, Castrejón L, Rodríguez M. Skin cancer. 10-year epidemiological study on ISSSTE beneficiaries in Nuevo León. *Dermatology*. 2010: 321-2.
90. Ying Ying G. et al. Prevalence of *Demodex* In eyelashes with cylindrical dandruff. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005;46(9): 3089-94.
91. García Martín E, Fernández Tirado FJ. Tendencias en el tratamiento de los CBC perioculares. *Arc Soc Esp*. 2010;85(8): 261-2.
92. Shields CL. Basal cell carcinoma of the eyelids. *Int Ophthalmol Clin*. 1993;33: 1-4.
93. Rodríguez Caravaca G, García-Cruces Méndez J, Hobson S, Rodríguez Caravaca F, Villar del Campo M, González Mosquera M. Validez del diagnóstico clínico del carcinoma basocelular en atención primaria. *Aten Primaria*. 2001;28(6): 391-5.

94. Colectivo de autores. Tumores palpebrales. Manual de diagnóstico y tratamiento en oftalmología. Educ Méd Sup. 2009;23(3): 131-37.
95. Ainbinder DJ, Esmaeli B, Groo SC, Finger PT, Brooks JP. Introduction of the 7th edition eyelid carcinoma classification system from the American Joint Committee on Cancer-International Union Against Cancer staging manual. Arch Pathol Lab Med. 2009;133(8): 1256-61.
96. Negrin-Díaz, M.L. Carcinoma Basocelular. Rev. Dermatología Venezolana. 2008;46(1).
97. Ramachandran S, Fryer AA, Lovatt T, Lear JT, Smith AG, Strange RC. Susceptibility and modifier genes in cutaneous basal cell carcinomas and their associations with clinical phenotype. J Photochem Photobiol. 2001;63: 1-7.
98. Buendia A, Muñoz, J, y Serrano S. Epidemiología del cáncer cutáneo no melanoma. Piel. 2002;17(1): 3-6.
- 99 Sallyann KC, Chen S. Analyzing the Cost of Preventing Nonmelanoma Skin Cancer. J Invest Derm. 2017;129(12): 2745-6.
- 100 Zak-Prelich M, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A. Environmental Risk Factors Predisposing to the Development of Basal Cell Carcinoma. Dermatol Surg 2004; 30: 248-52.

101. Lefell DJ, Headington JT, Wong DS, et al. Aggressive-growth basal cell carcinoma in young adults. *Arch Dermatol*. 1991;127(1): 1663-7.

103. Sun J, Gui X, He J, Liu H, Yu H, Xia C, et al. The relationship between infestation of *Demodex folliculorum* and epidermal neoplasm on face. *Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*. 2005;23: 428–31.

104 Czepita D, Kuzna-Grygiel W, Kosik-Bogacka D. Investigations on the occurrence as well as the role of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* in the pathogenesis of blepharitis. *Klin Oczna*. 2005;107(1-3): 80-2.

105 Erbagci Z, Erkilic S. Basal cell carcinoma and demodicidosis: is there an etiologic of coincidental relationship? *Turkey J Cancer*. 2000;30(3): 111-8.

106. Bielsa I, Soria X, Esteve M, Ferrándiz C. Population-based incidence of basal cell carcinoma in a Spanish Mediterranean area. *Br J Dermatol*. 2009;161:1341–6.

107. Cakir BÖ, Adamson P, Cingi C. Epidemiology and Economic Burden of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 2012. 419–22.

108. Manzini, Jorge Luis. (2000). Declaración de Helsinki : Principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos, Scientific Electronic Library Online - Chile. Recuperada en Noviembre 15, 2012, del sitio Web tema : Portal de Recursos Educativos Abiertos (REA) en <http://www.temoa.info/es/node/558289>

109. Epidat: programa para análisis epidemiológico de datos. Versión 4.0, octubre 2014. Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España; Organización

Panamericana da saúde (OPS-OMS); Universidade CES, Colombia. Disponible en: <http://dxsp.sergas.es>

110. IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.

111. Sánchez España JC. Demodex folliculorum, siguiendo la pista a una blefaritis crónica. Archivos de la Sociedad Español de Oftalmología. 2016;91(4): e41.

112. Abreu A, Sánchez-España JC, Naranjo-González LE, González-Gallego MC, Hidalgo-Grass C, Ruíz-Frutos C. Development of a PCR for the detection and quantification of parasitism by Demodex folliculorum infestation in biopsies of skin neoplasms periorcular area. Rev Esp Quimioter. 2016;29(4): 220-3.

113. Miller SJ. Aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. Clin Dermatol. 1995;13: 527-36.

114. Wong CSM, Strange RC, Lear JT. Basal cell carcinoma. BMJ 2003;327 (7418): 794-8.

115. Marks R, Staples M, Giles G. Trends in non-melanocytic skin cancer treated in Australia: the second national survey. Int J Cancer. 1993;32: 585-90.

116. Han J, Colditz GA, Hunter DJ. Risk factors for skin cancers: a nested case-control study within the Nurses' Health Study: Int J Epidemiol. 2006;35: 1514-21

117. Slutsky JB, Jones EC. Periocular cutaneous malignancies. A review of the literature. *Dermatologic Surgery*, 2012;38(4): 552-69.

118. Sener S, Karaman U, Hakverdi G. The incidence of demodex in the Faculty of Science Students and measurement of these students' knowledge level about demodex. *Med Sci*; 2017;6(1): 30-4.

119. González Hana AL, Medina de la Garza CE, Velázquez Arenas L, García Guerrero CJ, González Gonzalez SE. Prevalencia de los ácaros Demodex folliculorum y Demodex brevis en una población mexicana. *Medicina Univ* 2004;6 (23): 96-100.

120. Wang G, Zhang Y. [Investigation of Demodex infection among medical students]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2006;24(2): 156-7.

121. Galvis-Ramírez V, Tello-Hernández A, Álvarez-Osorio L, Rey-Serrano JJ. The prevalence of Demodex folliculorum infection in patients attending a general ophthalmological consultation. *Rev Salud Pública*. 2011;13: 990–7.

122. Zhao E, Guo N, Xun M, Xu JR, Wang M, Wang DI. Sociodemographic characteristics and risk factor analysis of Demodex infestation (Acari Demodicidae) *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011;12(12): 998-1007.

123. Czepita D, Kuzna-Grygiel W, Kosik-Bogacka D. Investigations on the occurrence as well as the role of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* in the pathogenesis of blepharitis. *Klin Oczna*. 2005;107(1-3): 80-2.
124. Moravvej H, Dehghan-Mangabadi M, Abbasian MR, Meshkat-Razavi G. Association of rosacea with demodicosis. *Arch Iran Med*. 2007;10(2): 199-203.
125. Akdeniz S, Bahceci M, Tuzcu AK, Harman M, Alp S, Bahceci S. Is demodex folliculorum larger in diabetic patients? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2002;16(5): 539-41.
126. Ozçelik S, Sümer Z, Değerli S, Ozyazici G, Hayta SB, Akyol M, Candan F. The incidence of *Demodex folliculorum* in patients with chronic kidney deficiency. *Türkiye Parazitoloj Derg*. 2007;31(1): 66-8.
127. Dokuyucu R, Aycan Kaya O, Yula E, Ustun I, Bayram F, Cumali G. The presence of *Demodex folliculorum* in various obese groups according to BMI levels. *Arch Iran Med*. 2016;19(3): 210-4.
128. Emine U, Ulviye Guvendi A, Yaloin B. Increased density of *Demodex folliculorum* may be related to additional risk factors. Letter to Editor. *Arch of Iran Med*. 2016;19(7): 525-6.

129. Aycan OM, Otlu GH, Karaman Ü, Daldal N, Atambay M. Frequency of the appearance of *Demodex* sp. in various patient and age groups. *Türkiye Parazitol Derg.* 2007;31(2): 115-8.
130. Liu J, Sheha H, Tseng SCG. Pathogenic role of *Demodex* mites in blepharitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010;10: 505–10.
131. Rodriguez Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Med.* 2011;17: 330-9.
132. Ramachandran S, Fryer AA, Lovatt T, Lear JT, Smith AG, Strange RC. Susceptibility and modifier genes in cutaneous basal cell carcinomas and their associations with clinical phenotype. *J Photochem Photobiol.* 2001;63: 1-7.
133. Gailani MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, et al. The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Gen.* 1996;14: 79-81.
134. Silverberg MJ, Leyden W, Warton EM, Quesenberry CP Jr., Engels EA, Asgari MM. HIV infection status, immunodeficiency, and the incidence of non-melanoma skin cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(5): 350–60.
135. Barriga OO, Al-Khalidi NW, Martin S, Wyman M. Evidence of immunosuppression by *Demodex canis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992;32: 37–46.

136. Nicholls SG, Oakely CL, Tan A, Vote BJ. Demodex species in human ocular diseases: new clinicopathological aspects. *Intern Ophthalmol*. 2017;37(1): 303-12.
137. Lacey N, Kavanagh K, Tseng SCG. Under the lash: demodex mites in human diseases. *Biochemist*. 2009;31(4): 2-6.
138. Szkaradkiewicz A, Chudzicka-Strugała I, Karpiński TM, et al. *Bacillus oleronius* and Demodex mite infestation in patients with chronic blepharitis. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(10): 1020–5.
139. Li J, O'Reilly N, Sheha H et al. Correlation between ocular Demodex infestation and serum immunoreactivity to bacillus proteins in patients with facial rosacea. *Ophthalmology*, 2010;117(5): 870–7.
140. Del Rosso JQ. Update on rosacea pathogenesis and correlation with medical therapeutic agents. *Cutis*; 2006; 78:9.
141. Bonamigo RR, Bakos L, Edelweiss M et al. Could matrix metalloproteinase-9 be a link between Demodex folliculorum and rosacea?. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19: 646–7.
142. Tatu AL, Ionescu MA, Cristea VC. Demodex folliculorum associated *Bacillus pumilus* in lesional areas in rosacea. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2017;83: 610-1.

143. Meyer T. Molecular events in skin cancer. *Cancer Treat Res.* 2009;146: 189-92.

144. Milman T, McCormick SA. The molecular genetics of eyelid tumors: recent advances and future directions. *Graefe's Arch for Clin and Exper Ophtahl.* 2013;251(2): 419-33.

145. Iwasaki JK, Srivastava D, Moy RL, Lin HJ, Kouba DJ. The molecular genetics underlying basal cell carcinoma pathogenesis and links to targeted therapeutics. *J Am Acad Dermatol.* 2010;66: e167–e78.

146. Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature.* 2001;411: 349-54.

147. Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90: 4216-20.

148. Smith J, Randle H. Giant Basal Cell Carcinoma and Cigarette Smoking. *Cutis.* 2001;(67): 73-6.

Capítulo VIII

Anexos

8.1 Consentimiento informado. (tomado de Junta de Andalucía)

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE SALUD

FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

Orden de 8 de julio de 2009 (BOJA no 152 de fecha 6 de agosto) por la que se dictan instrucciones a los Centros del Sistema Sanitario Público de Andalucía, en relación al procedimiento de Consentimiento Informado.

1. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA (*) CIRUGÍA DE LESIONES DE CONJUNTIVA Y PÁRPADOS. (Chalazión, lesiones induradas de párpado lesiones quísticas de párpado, lesiones pigmentadas o no de conjuntiva.)

Este documento sirve para que usted, o quien lo represente, dé su consentimiento para esta intervención. Eso significa que nos autoriza a realizarla. Puede usted retirar este consentimiento cuando lo desee. Firmarlo no le obliga a usted a hacerse la intervención. De su rechazo no se derivará ninguna consecuencia adversa respecto a la calidad del resto de la atención recibida. Antes de firmar, es importante que lea despacio la información siguiente.

Díganos si tiene alguna duda o necesita más información. Le atenderemos con mucho gusto. (*) Indicar el nombre del procedimiento/intervención a realizar; si es

posible, además del nombre técnico que siempre debe figurar, puede tratar de expresarlo con un nombre más sencillo.

1.1 LO QUE USTED DEBE SABER:

EN QUÉ CONSISTE. PARA QUÉ SIRVE:

Cada intervención se diseña para cada paciente dependiendo del tipo y localización de la lesión. La extirpación de una lesión requiere la reconstrucción anatómica posterior y su estudio anatomopatológico (en el microscopio) o biopsia siempre que se considere necesario, para descartar malignidad.

CÓMO SE REALIZA:

En la mayoría de los casos se emplea una anestesia local (por lo que se requiere una importante colaboración del paciente) y se realiza de forma ambulatoria (el paciente se va a casa después de la intervención).

QUÉ EFECTOS LE PRODUCIRÁ:

Tras la cirugía se requieren una serie de cuidados, tratamientos y consultas.

EN QUÉ LE BENEFICIARÁ:

Se eliminará la lesión y se procederá a su estudio patológico siempre que sea necesario.

OTRAS ALTERNATIVAS DISPONIBLES EN SU CASO:

En su caso:

QUÉ RIESGOS TIENE:

Cualquier actuación médica tiene riesgos. La mayor parte de las veces los riesgos no se materializan, y la intervención no produce daños o efectos secundarios indeseables. Pero a veces no es así. Por eso es importante que usted conozca los riesgos que pueden aparecer en este proceso o intervención.

- LOS MÁS FRECUENTES: Hemorragia, sin riesgo vital, lesión de los tejidos adyacentes y rotura de la sutura.
- LOS MÁS GRAVES: Cicatrización anormal y antiestética, reaparición de la patología, infección.
- LOS DERIVADOS DE SUS PROBLEMAS DE SALUD:

SITUACIONES ESPECIALES QUE DEBEN SER TENIDAS EN CUENTA:

A veces, tras la eliminación de la lesión inicial y su estudio patológico, se aprecia que la lesión no ha sido eliminada del todo, por lo que se deberá realizar otro procedimiento más agresivo posterior. Las patologías como diabetes, hipertensión, cardiopatías, inmunodepresión y otras, aumentan el riesgo quirúrgico y la posibilidad de complicaciones durante y después de la operación.

OTRAS INFORMACIONES DE INTERÉS (a considerar por el/la profesional):

Si es usted una persona con alto grado de ansiedad, debe comunicarlo durante la consulta previa a la cirugía (así se podrán tomar las medidas adecuadas).

OTRAS CUESTIONES PARA LAS QUE LE PEDIMOS SU CONSENTIMIENTO:

- A veces, durante la intervención, se producen hallazgos imprevistos. Pueden obligar a tener que modificar la forma de hacer la intervención y utilizar variantes de la misma no contempladas inicialmente.

- **A veces es necesario tomar muestras biológicas para estudiar mejor su caso. Pueden ser conservadas y utilizadas posteriormente para realizar investigaciones relacionadas con la enfermedad que usted padece.** No se usarán directamente para fines comerciales. Si fueran a ser utilizadas para otros fines distintos se le pediría posteriormente el consentimiento expreso para ello. Si no da su consentimiento para ser utilizadas en investigación, las muestras se destruirán una vez dejen de ser útiles para documentar su caso, según las normas del centro. En cualquier caso, se protegerá adecuadamente la confidencialidad en todo momento.

- También puede hacer falta tomar imágenes, como fotos o videos. Sirven para documentar mejor el caso. También pueden usarse para fines docentes de difusión del conocimiento científico. En cualquier caso serán usadas si usted da su autorización. Su identidad siempre será preservada de forma confidencial.

1.2 IMÁGENES EXPLICATIVAS: (En este espacio podrán insertarse con carácter

opcional imágenes explicativas, esquemas anatómicos, pictogramas etc. que faciliten y permitan explicar de manera más sencilla la información al paciente.)

2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

(En el caso de INCAPACIDAD DEL/DE LA PACIENTE será necesario el consentimiento del/de la representante legal)

(En el caso del MENOR DE EDAD, cuando se considere que carece de madurez suficiente, el consentimiento lo darán sus representantes legales, aunque el menor siempre será informado de acuerdo a su grado de entendimiento y, si tiene más de 12 años, se escuchará su opinión. Si el paciente está emancipado o tiene 16 años cumplidos será él quien otorgue el consentimiento. Sin embargo, en caso de actuación de grave riesgo, según el criterio del facultativo, los representantes legales también serán informados y su opinión será tomada en cuenta para la decisión.)

2.1 DATOS DEL/DE LA PACIENTE Y DE SU REPRESENTANTE LEGAL (si es necesario)

APELLIDOS Y NOMBRE, DEL/DE LA REPRESENTANTE LEGAL DNI / NIE

2.2 PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO

APELLIDOS Y NOMBRE _____ FECHA FIRMA

2.3 CONSENTIMIENTO

Yo, D/Dña conforme con la intervención que se me ha propuesto. He leído y comprendido la información anterior. He podido preguntar y aclarar todas mis dudas. Por eso he tomado consciente y libremente la decisión de autorizarla. También sé que puedo retirar mi consentimiento cuando lo estime oportuno.

SI NO Autorizo a que se realicen las actuaciones oportunas, incluyendo modificaciones en la forma de realizar la intervención, para evitar los peligros o daños potenciales para la vida o la salud, que pudieran surgir en el curso de la intervención.

SI NO Autorizo la conservación y utilización posterior de mis muestras biológicas para investigación relacionada directamente con la enfermedad que padezco.

SI NO Autorizo que, en caso de que mis muestras biológicas vayan a ser utilizadas en otras investigaciones diferentes, los investigadores se pongan en contacto conmigo para solicitarme consentimiento.

SI NO Autorizo la utilización de imágenes con fines docentes o de difusión del conocimiento científico.

FECHA FIRMA

EL/LA PACIENTE

/Visto Bueno de EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

Fdo.: _____

2.4 RECHAZO DE LA INTERVENCIÓN

Yo, D/Dña. no autorizo a la realización de esta intervención. Asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida.

EL/LA PACIENTE Consentimiento/Visto Bueno de EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

Fdo.: _____

2.5 REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D/Dña, de forma libre y consciente he decidido retirar el consentimiento para esta intervención. Asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida.

EL/LA PACIENTE Consentimiento/Visto Bueno de EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

Fdo.: _____

8.2. Aceptación del comité de ética



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

D^a M^a VICTORIA ALONSO MARTÍNEZ, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de la provincia de Huelva,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado, a propuestas del/de la investigador/a D./D^a. *Aberto Tenorio Abreu*, para que se realice el *Proyecto de Investigación* titulado:


Relación del Carcinoma basocelular del área periocular con la densidad del ectoparásito Demodex folliculorum cuantificado mediante PCR.
Código: PI 012/15

La capacidad de los investigadores y los medios disponibles en el/la *H. Juan Ramón Jiménez*, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Y que este Comité considera que dicho estudio cumple los requisitos éticos y legales para ser realizado en dicho centro por D./D^a. *Aberto Tenorio Abreu*.

Lo que firmo, en Huelva a 25 de Febrero de 2015

Firmado:


D^a. M^a Victoria Alonso Martínez

23/2/15

Área Hospitalaria Juan Ramón Jiménez
Ronda Norte, s/n. 21005 Huelva
Teléf. 959 01 60 00





D^a M^a VICTORIA ALONSO MARTÍNEZ, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de la provincia de Huelva,

CERTIFICA

Que este Comité ha ponderado y evaluado en la sesión celebrada el *24 de Febrero de 2015*, a propuestas del/de la investigador/a D./D^a. *Aberto Tenorio Abreu*, para que se realice el *Proyecto de Investigación* titulado:

Relación del Carcinoma basocelular del área periocular con la densidad del ectoparásito Demodex folliculorum cuantificado mediante PCR.
Código: PI 012/15

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité.

Vicepresidenta/a:

D^a. Valle Coronado Vázquez

Secretario/a:

D^a. Victoria Alonso Martínez

Vocales:

D/D^a. Manuel García de la Vega Sosa

D/D^a. F. Begoña García Navarro

D/D^a. Juan Gómez Salgado

D/D^a. Montserrat Hidalgo Hidalgo

D/D^a. M^a. Inmaculada Mesa Gallardo

D/D^a. Carlos Pérez Hernández

Que en dicha reunión, tras evaluar favorablemente, se acordó proceder a emitir informe Favorable.

Que dicho comité, está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Lo que firmo, en Huelva a **25 de Febrero de 2015**

Firmado:



D^a M^a Victoria Alonso Martínez



CONFORMIDAD DE LA DIRECCIÓN DEL CENTRO

D. RAFAEL GARCÍA VARGAS-MACHUCA, Director Gerente del Complejo Hospitalario de Huelva, vista la autorización del Comité de Ética de la Investigación de la provincia de Huelva,

CERTIFICA

Que conoce la propuesta realizada por el/la investigador/a D./D^a. *Aberto Tenorio Abreu*, para que se realice el *Proyecto de Investigación* titulado:

Relación del Carcinoma basocelular del área periocular con la densidad del ectoparásito Demodex folliculorum cuantificado mediante PCR.
Código: PI 012/15

Que será realizado por D./D^a. *Aberto Tenorio Abreu* como investigador/a principal.

Que acepta la realización de dicho proyecto en el/los centro(s) *H. Juan Ramón Jiménez*.

Lo que firmo, en Huelva a 25 de febrero de 2015

Firmado:


D. Rafael García Vargas-Machuca


8.3. Formato de recogida de datos Anatomía Patológica.

TABLA ANATOMIA PATOLOGICA			
HC:	<input type="text"/>	Sexo:	<input type="text" value="Hombre"/> <input type="text" value="Mujer"/>
Edad:	<input type="text"/>		
Localización	Diagnóstico Histopatológico		
Párpado Superior	CB (casos)	Superficial	Lesión Benigna (controles)
Párpado Inferior	Nodular		Hidrocistoma Papiloma fibroepitelial
Canto Interno	Infiltrativo		quiste de inclusión epidérmica Nevus
Canto Externo	Morfeiforme		Queratosis seborreica Hemangioma capilar
	Micronodular		

TABLA ANATOMIA PATOLOGICA			
HC:	<input type="text"/>	Sexo:	<input type="text" value="Hombre"/> <input type="text" value="Mujer"/>
Edad:	<input type="text"/>		
Localización	Diagnóstico Histopatológico		
Párpado Superior	CB (casos)	Superficial	Lesión Benigna (controles)
Párpado Inferior	Nodular		Hidrocistoma Papiloma fibroepitelial
Canto Interno	Infiltrativo		quiste de inclusión epidérmica Nevus
Canto Externo	Morfeiforme		Queratosis seborreica Hemangioma capilar
	Micronodular		

8.4. Matriz de datos.

Controles

CONTROL		AP	HC	ESTUDIO	SEXO	EDAD	LOCALIZ	PRESENCIA	DENSIDAD
1	1	E	3583**	B09-10215	M	60,0	PS	NEG	
2	2	E	4333**	B11-07217	H	59,8	CI	NEG	
3	3	E	3322**	B12-01061	H	55,3	PI	NEG	
4	4	E	4109**	B12-08086	M	50,1	PI	NEG	
5	5	E	4300**	B12-08090	H	70,5	PS	NEG	
6	6	E	3756**	B09-02785	M	73,4	PS	NEG	
7	7	E	3454**	B09-03855	M	64,4	CI	NEG	
8	8	E	3939**	B09-08261	M	70,4	PS	NEG	
9	9	E	3641**	B09-08816	M	65,2	PS	NEG	
10	10	E	3345**	B11-05696	M	63,9	PS	NEG	
11	11	E	4247**	B12-05396	M	81,1	CE	NEG	
12	12	E	4040**	B13-03823	H	80,2	CE	POS	30,78
13	13	E	1411**	B13-02956	M	81,6	PI	NEG	
14	1	Q	6868**	B13-02430	M	61,6	PS	NEG	
15	2	Q	5406**	B09-00685	M	52,2	PS	NEG	
16	3	Q	4140**	B13-07622	H	64,9	PS	POS	10,25
17	4	Q	5227**	B10-04414	H	43,5	PS	POS	14,82
18	5	Q	4573**	B09-02742	H	52,6	PS	NEG	
19	6	Q	10277**	B14-00209	H	46,1	PS	NEG	
20	7	Q	3727**	B12-07452	M	53,1	CI	NEG	
21	8	Q	4460**	B12-01921	H	53,9	PI	NEG	
22	9	Q	4354**	B13-07115	H	58,5	PS	NEG	
23	10	Q	3602**	B09-00217	M	67,1	PI	NEG	
24	11	Q	-3955**	B09-04578	H	87,0	PI	NEG	
25	1	A	5545**	B12-08231	M	83,4	CE	POS	14,05
26	2	A	3280**	B09-08045	M	66,8	PS	NEG	
27	3	A	9085**	B09-00226	M	75,8	PI	POS	60,21
28	4	A	3952**	B11-08047	H	78,2	CE	POS	70,81
29	5	A	4987**	B09-03675	H	78,9	CI	NEG	
30	6	A	7965**	B12-08774	H	78,1	CI	POS	49,14
31	7	A	5010**	B12-05599	M	80,4	PI	NEG	
32	8	A	1790**	B13-02100	M	84,2	PI	NEG	
33	9	A	9155**	B11-03927	M	80,2	PI	NEG	

34	1	V	5673**	B12-01199	M	77,4	PS	NEG	
35	2	V	3356**	B10-03061	M	69,0	PI	NEG	
36	3	V	5402**	B09-01587	M	36,6	PS	POS	230,65
37	4	V	4415**	B12-07727	M	49,0	PI	NEG	
38	5	V	3898**	B09-10217	M	68,0	PS	NEG	
39	6	V	6014**	B09-02485	M	45,3	CE	NEG	
40	7	V	800**	B13-01702	H	42,7	PS	POS	121,77
41	8	V	3877**	B12-07322	M	66,8	PI	NEG	
42	1	P	6377**	B09-04070	H	75,6	PS	NEG	
43	2	P	3623**	B09-08169	H	80,0	PI	NEG	
44	3	P	4352**	B11-08661	M	75,4	PS	NEG	
45	4	P	4248**	B12-01062	M	58,2	PS	NEG	
46	5	P	5381**	B11-00368	H	58,3	PI	NEG	
47	6	P	3245**	B12-03641	H	76,8	PI	NEG	
48	1	H	3994**	B12-02515	M	59,3	PS	NEG	
49	2	H	6744**	B09-01585	H	52,7	PS	POS	177,78
50	3	H	9994**	B11-04644	M	40,8	CI	NEG	
51	4	H	4571**	B13-00711	M	63,2	PS	NEG	

Casos

CASOS		AP	HC	ESTUDIO	SEXO	EDAD	LOCALIZ	PRESENCIA	DENSIDAD
1	1	N	50487**	B09-04401	M	41,9	PI	NEG	
2	2	N	3729**	B12-06007	H	80,0	PI	POS	153,63
3	3	N	6229**	B13-03296	H	64,6	PI	NEG	
4	4	N	6717**	B13-00223	M	72,9	CI	POS	93,98
5	5	N	5961**	B13-09152	H	58,9	CI	NEG	
6	6	N	6990**	B14-07883	H	71,8	CI	POS	584,37
7	7	N	4056**	B15-01498	M	59,5	PS	NEG	
8	8	N	2191**	B15-02781	H	54,4	CI	NEG	
9	9	N	4571**	B09-08618	M	70,8	PI	NEG	
10	10	N	3472**	B10-00449	M	52,3	PI	POS	11,58
11	11	N	3358**	B10-00451	H	87,9	CE	POS	17,73
12	12	N	4547**	B10-03060	M	76,6	CE	NEG	
13	13	N	6277**	B09-07545	H	69,7	PI	POS	95,14

14	14	N	5165**	B10-08734	H	60,7	CI	POS	27,03
15	15	N	5844**	B10-03540	H	67,4	PI	NEG	
16	16	N	5119**	B10-07064	H	47,6	CI	POS	37,85
17	17	N	4627**	B12-00343	H	71,0	CI	POS	87,35
18	18	N	-364**	B11-01878	M	50,0	PI	NEG	
19	19	N	3498**	B12-00786	H	70,6	CI	POS	694,01
20	20	N	9006**	B11-07573	H	60,4	PI	NEG	
21	21	N	5007**	B12-00327	H	67,1	PI	POS	471,13
22	22	N	7745**	B12-07688	M	48,6	CI	POS	29,31
23	23	N	3639**	B13-00659	M	56,3	PI	NEG	
24	24	N	5029**	B14-00099	H	73,2	CI	POS	46,4
25	25	N	4427**	B14-00782	H	83,2	PI	POS	897,82
26	26	N	4589**	B14-00547	M	89,7	PI	POS	41,99
27	27	N	-240**	B13-07008	M	82,7	CI	POS	2560,74
28	28	N	4265**	B09-01985	H	77,8	PI	NEG	
29	29	N	6447**	B09-01980	M	65,6	PI	NEG	
30	30	N	3337**	B10-01152	M	56,5	CI	POS	10,82
31	31	N	7387**	B10-00450	M	85,9	PI	NEG	
32	32	N	4225**	B10-01154	M	83,0	CI	POS	45,39
33	33	N	4187**	B10-06188	H	49,0	PI	POS	28,08
34	34	N	3849**	B11-02065	H	60,4	PI	NEG	
35	35	N	9175**	B12-07200	M	83,3	PI	NEG	
36	36	N	5378**	B12-08362	H	64,8	CI	POS	269,29
37	37	N	9153**	B12-06873	H	76,7	PS	POS	741,01
38	38	N	5197**	B12-07920	H	73,1	PI	NEG	
39	39	N	7918**	B13-00100	H	57,2	PS	NEG	
40	40	N	5026**	B13-03867	H	35,8	PI	POS	133,64
41	41	N	4372**	B13-04125	M	50,9	PI	POS	20,65
42	42	N	3179**	B12-01742	M	71,9	PI	NEG	
43	43	N	3282**	B11-04089	H	75,1	PI	NEG	
44	44	N	6205**	B11-01056	M	48,1	PI	NEG	
45	45	N	3197**	B11-01048	M	75,2	PI	NEG	
46	1	I	3506**	B12-04727	M	57,7	PI	NEG	
47	2	I	3977**	B12-04726	M	81,8	PI	NEG	
48	3	I	3896**	B12-05822	M	88,2	PI	NEG	
49	4	I	5033**	B12-05375	M	81,2	PI	NEG	
50	5	I	3544**	B09-04541	H	86,8	CI	POS	44,05
51	6	I	6770**	B11-00202	M	86,6	CE	NEG	
52	7	I	3497**	B12-08773	H	68,1	CI	NEG	
53	8	I	2466**	B13-02785	H	68,7	PI	POS	25,91

54	9	I	4388**	B13-07007	M	83,7	PI	NEG	
55	10	I	5966**	B09-05351	H	69,2	PI	POS	86,22
56	11	I	5487**	B10-02785	M	78,8	PI	NEG	
57	12	I	3882**	B09-00224	M	60,1	PI	NEG	
58	1	M	3277**	B09-09267	M	60,5	CI	NEG	
59	2	M	3739**	B13-00241	M	56,3	CI	NEG	
60	3	M	3876**	B09-07429	H	55,2	PS	NEG	
61	4	M	3380**	B13-03487	M	38,1	PS	NEG	
62	1	S	5489**	B10-03063	M	85,9	PI	NEG	
63	2	S	7617**	B14-07294	H	77,0	CE	POS	11,82
64	1	O	3177**	B15-02429	M	68,2	CI	NEG	

N: NODULAR

I: INFILTRATIVO

M: MICRONODULAR

S: SUPERFICIAL

O: MORFEIFORME

E: QUERATOSIS SEBORRÉICA

Q: QUISTE DE INCLUSIÓN EPIDÉRMICA

A: HIDROCISTOMA (ANTERIOR, QUISTE DE MOLL, APOCRINA // ECRINO)

V: NEVUS

P: PAILOMA FIBROEPITELIAL (CELULAS ESCAMOSAS)

H: HEMANGIOMA CAPILAR

SEXO:

H: HOMBRES

M: MUJERES

LOCALIZACIÓN:

PÁRPADO SUPERIOR: PS

PÁRPADO INFERIOR: PI

CANTO INTERNO: CI

CANTO EXTERNO: CE

PRESENCIA DF:

POSITIVO: POS

NEGATIVO: NEG

** Los dos últimos números de la historia clínica se ocultaron por Ley de protección de datos LOPD

Capítulo IX

Indicios de Calidad

9.1 Notas de prensa.

Fecha: 22/10/2015. Fuente: <http://huelvabuenasnoticias.com/2015/10/21/el-servicio-de-oftalmologia-del-complejo-hospitalario-de-huelva-galardonado-por-la-sociedad-espanola-de-la-especialidad/>

22/10/2015 El Servicio de Oftalmología del Complejo Hospitalario de Huelva, galardonado por la Sociedad Española de la especialidad | Huelva Buenas Noticias. Periódico

CONTACTO SUSCRIBETE GALERÍA FOTOGRAFICA FIRMAS VIDEOS ARCHIVO QUIÉNES SOMOS LIBROS DE HUELVA

Opinión Gastronomía Salud Moda y tendencias Motor Apuntes de historia Música Onubenses por el mundo

Compártelo:

Me gusta A 1519 personas les gusta esto.

El Servicio de Oftalmología del Complejo Hospitalario de Huelva, galardonado por la Sociedad Española de la especialidad

» *El primer premio de fotografía científica recae sobre la imagen de un ácaro minúsculo que habita en las pestañas del que se estudia su posible relación con el cáncer.*

21 octubre 2015

Redacción. El servicio de Oftalmología del Complejo Hospitalario Universitario de Huelva ha sido galardonado con el **primer premio de fotografía científica en el Congreso de la Sociedad Española de esta especialidad celebrado recientemente en Sevilla.** El trabajo premiado es una instantánea del ácaro demodex folliculorum sobre la pestaña de una paciente, una imagen que entraña gran dificultad para su obtención y que ha sido tomada desde el visor de un microscopio de luz del laboratorio, siendo su tamaño real 100 veces menor que la imagen visualizada.

El autor de la fotografía galardonada es **Juan Carlos Sánchez España, médico residente de cuarto año de Oftalmología del Complejo Hospitalario Universitario de Huelva.** Esta imagen se enmarca en un estudio de investigación que el facultativo está desarrollando en la actualidad, sobre el que versa su tesis doctoral, en el que también participan el facultativo especialista en Microbiología Alberto Tenorio Abreu y el médico residente de Anatomía Patológica María del Carmen González Gallego, ambos del Complejo Hospitalario onubense.

Juan Carlos Sánchez España.

El trabajo de investigación trata de **determinar con técnicas de biología molecular si existe o no relación entre la cantidad de este ácaro en las pestañas de los pacientes y el desarrollo posterior de un tumor en el párpado,** concretamente un carcinoma basocelular en la piel. Este tipo de tumor supone el 90 por ciento de los tumores malignos de la piel y suele localizarse fundamentalmente en la región facial o en otras zonas expuestas al sol.

Si bien algunos estudios previos muestran **una aparente relación entre la existencia del tumor en el párpado y una mayor densidad del parásito,** éstos emplean técnicas tradicionales de visualización microscópica y conteo directo del número de ácaros.

Sin embargo, **la investigación en curso emplea novedosas técnicas de biología molecular,** mucho más específicas y fiables, que permiten detectar de forma directa el ADN del parásito en las muestras de las pestañas que se están estudiando. Para ello, cuenta con la colaboración del laboratorio HGC Biomedical Research Diagnostic, una spin-off del Servicio Andaluz de Salud ubicada en Huelva, cuyos científicos han identificado por primera vez en España al parásito demodex folliculorum mediante técnicas de amplificación del material genético (PCR) del parásito.

Ahora tratarán de buscar **esa posible relación causa-efecto estudiando la densidad del ADN del ácaro** en las muestras de los pacientes con carcinomas detectados en el servicio de Oftalmología del Complejo Hospitalario Universitario de Huelva en los últimos seis años, que suponen cerca de setenta casos.

El demodex folliculorum es un ácaro inapreciable a la vista que habita a menudo en las pestañas de las personas alimentándose de la queratina de las células muertas de la piel, sin causar habitualmente patología ni sintomatología alguna. Sin embargo, en una de cada cuatro personas termina causando alguna enfermedad, estando demostrada su relación con la aparición de la rosácea (una enfermedad crónica de la piel con síntomas de engrosamiento, granos y enrojecimiento, que afecta principalmente a la cara), la blefaritis crónica (inflamación de los párpados) y la chalazión (una inflamación de la glándula sebácea del borde del párpado).

La importancia de determinar si existe relación entre la cantidad de demodex en las pestañas y la aparición del tumor radica en que, si se demostrase, **los pacientes podrían beneficiarse de la prevención de un futuro desarrollo del carcinoma,** ya que existe un tratamiento fácil y efectivo para la eliminación de este ácaro, el mismo que se emplea para las enfermedades mencionadas anteriormente.

Es decir, **nos encontraríamos ante uno de los factores de riesgo modificables en los pacientes con presencia de demodex** para evitar la aparición del carcinoma. Otros factores de riesgo demostrados en el carcinoma basocelular en la piel son la exposición al sol, la raza blanca, la avanzada edad o la deficiencia inmunitaria.

<http://huelvabuenasnoticias.com/2015/10/21/el-servicio-de-oftalmologia-del-complejo-hospitalario-de-huelva-galardonado-por-la-sociedad-espanola-de-la-especialidad/> 1

Fecha: 28/05/2015. Fuente: <http://huelvabuenasnoticias.com/2015/05/26/un-laboratorio-onubense-identifica-molecularmente-un-acaro-que-podria-intervenir-en-el-cancer-de-piel/>

28/5/2015 Un laboratorio onubense identifica un ácaro que podría intervenir en el cáncer de piel | Huelva Buenas Noticias, Periódico digital de Huelva y provincia centrad.

CONTACTO SUSCRIBETE GALERÍA FOTOGRÁFICA FIRMAS VIDEOS ARCHIVO QUIÉNES SOMOS LIBROS DE HUELVA

Compártelo:

Me gusta A 1823 personas les gusta esto.

Un laboratorio onubense identifica un ácaro que podría intervenir en el cáncer de piel

» *El hallazgo abre nuevas vías a un diagnóstico más rápido y eficaz de esta enfermedad.*

26 mayo 2015

Fermín Cabanillas, Científicos del laboratorio HGC Biomedical Research Diagnostic S.L. de Huelva han identificado por primera vez en España usando métodos moleculares al parásito *Demodex folliculorum*, un ácaro del que se investiga su influencia en el desarrollo del cáncer de piel.

Este hallazgo supone la primera identificación mediante técnicas de amplificación del material genético (PCR) del citado parásito, al que han llegado en este centro, una *Spin-Off* del SAS situada en el Parque Científico y Tecnológico de Huelva (PCTH) en Aljaraque.

Este logro ha sido obtenido por un grupo de investigadores liderado por el doctor Carlos J. Hidalgo Grass, en colaboración con su colega Alberto Tenorio-Abreu del Hospital Juan Ramón Jiménez, de Huelva.

Forma parte de un trabajo de investigación donde el residente de Oftalmología Juan Carlos Sánchez España está realizando su tesis doctoral bajo la tutoría del doctor Carlos Ruiz Frutos de la Universidad de Huelva.



El parásito *Demodex folliculorum*.



Carlos J. Hifalgo Grass (sin bata) lidera la investigación.

El conocido como Dermodex es un parásito de la familia de los ácaros que infesta los folículos pilosos palpebrales causando lesiones y la investigación se plantea encontrar una relación entre el parásito y la predisposición a la aparición de una lesión maligna conocida como carcinoma basocelular.

La investigación supone que se podrá alcanzar un diagnóstico molecular muy rápido y fidedigno de este cáncer de piel, una vez que se demuestre su participación en la aparición y desarrollo de esta enfermedad.

El proyecto se presentó en la convocatoria 2014 de la Junta de Andalucía y está siendo evaluado para la financiación de proyectos en Sanidad.

Actualmente se está realizando con fondos propios de los investigadores y otros aportados por HGC Biomedical Research Diagnostic S.L. como parte del interés de este laboratorio en fomentar la colaboración entre instituciones de alto nivel y el desarrollo de investigaciones avanzadas en el campo biomédico.

En paralelo a este trabajo, la posibilidad de identificar este ácaro directamente de muestras clínicas, como se ha realizado en HGC Biomedical, abre el camino para el desarrollo de una prueba molecular rápida para el diagnóstico de este parásito.

El laboratorio

HGC Biomedical Research Diagnostic S.L. es un Laboratorio de diagnóstico e investigación, centra su actividad en el análisis de moléculas de ADN o ARN, ha sido diseñado para dar respuesta a los más complejos diagnósticos y está a la vez intensamente comprometido con la investigación.

HGC Biomedical Research Diagnostic S.L. nace como una Spin Off en el seno de la Fundación Andaluza Beturia para la Investigación en Salud (FABIS) con el apoyo y bajo los lineamientos de la Oficina de Transferencia Tecnológica del SAS y tiene entre sus principales objetivos la más estrecha colaboración con centros de Educación Superior de la región para la consecución conjunta de proyectos de investigación donde estos centros puedan valerse de sus instalaciones, del sofisticado equipamiento, de la experiencia de sus investigadores y de la valiosa guía de FABIS; además tiene la intención de adherirse a los programas de Cooperación Transfronteriza, considerando los intereses comunes y complementarios con el Algarve portugués.



Actualmente el Laboratorio autofinancia este proyecto.

Compártelo:

<http://huelvabuenasnoticias.com/2015/05/26/un-laboratorio-onubense-identifica-molecularmente-un-acaro-que-podria-intervenir-en-el-cancer-de-piel/>

9.2 Publicaciones en revistas

Los artículos que forman parte del apartado “Publicaciones en revistas” han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a derechos de autor. En sustitución del artículo ofrecemos la siguiente información: referencia bibliográfica, enlace a la revista, y resumen, si lo tuviera.

- Tenorio Abreu, A., Sánchez España, J.C., Naranjo González L.E., González Gallego, M.C., Hidalgo Grass, C., Ruíz Frutos, C.: “Desarrollo de una PCR para la detección y cuantificación de la parasitación por *Demodex folliculorum* en biopsias de neoplasias cutáneas del área periocular”. Revista Española de Quimioterapia. Vol. 29, n. 4, págs. 220-223, (2016). ISSN: 0214-3429.

Enlace al texto completo del artículo:

<http://seq.es/seq/0214-3429/29/4/tenorio15jun2016.pdf>

RESUMEN:

Objetivo. Estandarizar la cuantificación relativa por masa de tejido de la parasitación por *Demodex folliculorum* procedente de biopsias neoplásicas cutáneas de la zona periocular mediante técnicas de amplificación molecular con el objetivo de poder estudiar la posible relación de la aparición de carcinoma basocelular palpebral con la presencia y densidad del ácaro en trabajos posteriores. Material y métodos. Se desarrolló una PCR cuantitativa a tiempo real con sondas TaqMan. La PCR se probó en una serie piloto de 46 muestras reales de biopsias de carcinoma basocelular de tipo nodular. Resultados. La sensibilidad se situó con un límite de detección de entre 1 y 10 copias/ μ l. El 50% (23/46) de las biopsias fueron positivas a *D. folliculorum*. La especificidad fue del 100% confirmado mediante secuenciación. Conclusión. La técnica muestra buenos resultados de sensibilidad y especificidad que la pueden hacer útil como herramienta para estudios causa-efecto de *D. folliculorum* y basalioma.

- Sánchez España, J.C., Tenorio Abreu, A., Álvarez López, A., Naranjo González L.E., González Gallego, M.C., Hidalgo Grass, C., Ruíz Frutos, C.: "PCR Quantification of *D. folliculorum* in Periocular Basal Cell Carcinoma". *Ophthalmology*. Vol. 123, n. 12, págs. 2632-2633, (2016). DOI: 10.1016/j.opthta.2016.08.005

Enlace al texto completo del artículo:

<https://doi.org/10.1016/j.opthta.2016.08.005>

RESUMEN:

The pathogenesis of basal cell carcinoma (BCC) traditionally has been linked to exposure to ultraviolet light, yet its true cause remains unclear. Several authors recently have examined a possible role played by *Demodex folliculorum* in both benign skin tumors, such as sebaceous adenoma and malignant tumors, such as BCC1 and melanoma.

9.2 Publicaciones en revistas.

Sánchez España JC. Demodex folliculorum: Following the trail to chronic blepharitis. Arch Soc Esp Oftalmol. 2016 Apr; 91(4):e41. doi: 10.1016/j.oftal.2015.11.017. Epub 2016 Jan 13. PMID: 26775083. DOI: 10.1016/j.oftal.2015.11.017. ISSN: 0365-6691.

ARCH SOC ESP OFTALMOL. 2016;91(4):e41



ARCHIVOS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OFTALMOLOGÍA

www.elsevier.es/oftalmologia



Oftalmología en imágenes

Demodex folliculorum, siguiendo la pista a una blefaritis crónica[☆] 

Demodex folliculorum: Following the trail to chronic blepharitis

J.C. Sánchez España
Servicio de Oftalmología, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, España

Paciente de 35 años con blefaritis crónica de 10 años de evolución resistente a múltiples tratamientos tópicos y sistémicos. En la exploración se observa el borde palpebral con áreas de madarosis, eritema con telangiectasias y descamación en forma de cilindros en la base de las pestañas. Se extraen 4 pestañas de cada párpado en la lámpara de hendidura y se observan bajo el microscopio de luz a 10X múltiples colonias del ácaro *Demodex folliculorum*. Una vez sospechada la Demodicosis como agente causal se da el tratamiento dirigido con franca mejoría de la sintomatología y crecimiento de nuevas pestañas^{1,2}.

Figura 1.



Figura 1

BIBLIOGRAFÍA

1. Zhao YE, Wu LP, Hu L, Xu JR. Association of blepharitis with Demodex: A meta-analysis. Ophthalmic Epidemiol. 2012;19:95-102.
2. Rodríguez AE, Ferrer C, Alió JL. Demodex y blefaritis crónica. Arch Soc Esp Oftalmol. 2005;80:635-42.

[☆] 1º Premio de Fotografía Científica (91 Congreso Sociedad Española de Oftalmología, Sevilla, 2015).
Correo electrónico: juansaes@hotmail.com
<http://dx.doi.org/10.1016/j.oftal.2015.11.017>
0365-6691/© 2015 Sociedad Española de Oftalmología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

9.3 Participación en Congresos

Comunicaciones en panel (posters).

Poster: Fecha: Octubre 2015. Título: "Development of a PCR for the detection of *Demodex folliculorum* infestation in the periocular area. Congreso: VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroWorld 2015. Autoría: A. Tenorio Abreu, J.A. Gómez Fernández, **J.C. Sánchez España**. Ciudad: Barcelona_ España.

VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015
Barcelona (Spain), 28-30 October 2015

Development of a PCR for the detection of *Demodex folliculorum* infestation in the periocular area

Alberto Tenorio-Abreu, José Antonio Gómez-Fernández, Juan Carlos Sánchez-España, Luis Arroyo Pedrero, Bárbara Gómez Alonso, Esmeralda Rodríguez-Molins, Carlos Hidalgo Grass.

Introduction
Demodex folliculorum is an ectoparasite of family mites living in the hair follicles. It is so saprophyte in a significant percentage of healthy patients. Superparasitism can cause the appearance of some lesions such as rosacea or chronic blepharitis. Currently it is studied for a possible role in the development of basal cell cancer (BCC) lid.

Objective
Design and development of a real time-PCR to detect parasite *D. folliculorum* in BCC biopsies.

Material and methods
Primers were designed using the Primer Express 3.0 software from 18S ribosomal gene database GenBank (KF745889.1), whose sequences were: SENSE- CTCGTAGTTGTATCTCAGTTCAT and ANTISENSE- ACCCGGTAAGAGCATCAGA. To determine the sensitivity of the technique amplicon dilutions of known concentration measurements were made previously by spectroscopy (Qubit fluorometer 3.0, Life Technologies). Specificity is determined by the temperature of dissociation specific amplicon (79,6°C) and subsequent sequencing. The technique was developed from three samples obtained from the parasite tabs extracting a patient with chronic blepharitis, which was used as a positive control. A system of manual DNA extraction columns (ISOLATE Genomic DNA Spin Column- Biorline) was used. PCR was performed in 7500 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems), with 35 cycles of temperature (95°-56°-72°) and a final dissociation curve. As fluorophore in measuring amplification SYBR Green was used. The assay was performed in triplicate.

Results
The sensitivity limit of detection measured in copy number was between 0 and 10 copies. Specificity was consistent with the dissociation temperature of 79,6°C. The amplicon sequence determined by capillary sequencing was 100% concordant with the GenBank database (KF745889.1).

Conclusions
With the data obtained sensitivity and specificity of the PCR developed, the parasite can be detected by this technique. Being able to start the study of BCC correlation with parasite infestation.

Poster. Fecha: Enero 2016. Título: "Detección de *Demodex folliculorum* en biopsias palpebrales de lesiones cancerosas mediante PCR". Congreso: *XX Congreso de la Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica (EIMC)*. Autoría: A. Tenorio Abreu, **J.C. Sánchez España**, M.C González Gallego. Ciudad: Barcelona_ España.



CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

El Presidente del Comité Organizador del **XX Congreso SEIMC 2016**, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

CERTIFICA QUE:

A. Tenorio-Abreu, J.C. Sánchez España, M.D.C. González Gallego, A. Márquez Sanabria, A. Domínguez Castaño, J.M. Saavedra Martín, M. De La Iglesia Salgado, C. Hidalgo-Grass

han realizado la presentación POSTER de la comunicación con título:

"Detección de *Demodex folliculorum* en biopsias palpebrales de lesiones cancerosas mediante PCR "

en el XX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, celebrado en Barcelona, del 26 al 28 de mayo de 2016.

Y para que conste se expide el presente certificado en Barcelona a 28 de mayo de 2016.

Dr. José María Miró Meda
Presidente del Comité Organizador

Comunicaciones orales.

Comunicación oral (comunicación de investigación). Fecha: Septiembre -2016. Título: "Elevada prevalencia y densidad de *Demodex folliculorum* en Carcinoma basocelular en el área periocular cuantificado mediante PCR". Congreso: 92 Congreso de la SEO (Sociedad Española de Oftalmología). Autoría: J.C. Sánchez España, A. Álvarez López, A. Tenorio Abreu. Ciudad: Málaga, España.



92 CONGRESO

DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OFTALMOLOGÍA

Málaga 17-24 DE SEPTIEMBRE DE 2016



PRESIDENTES
Prof. Dr. José M. García Campos
Dr. Ildefonso Fernández-Baca Casares

SECRETARIA
Dra. Mercedes Moreno Villena

VOCALES
Dr. Juan A. Abascal Pareja
Dr. Miguel A. Almendo del Pino
Dra. Isabel M.ª Baquero Aranda
Dr. Fco. Javier Beltrán Ureña
Dr. Ángel Gilveti Puche
Dra. Ana S. Delgado Fernández
Dra. M.ª del Carmen Díez Garretas
Dr. Cayetano Domínguez Ruiz
Dra. Manuela España Contreras
Dr. Emilio Espejo de los Riscos
Dr. Miguel A. Fernández Ramos
Dr. Miguel A. Fortes Fernández
Dr. Manuel García Marcos
Dr. Juan L. Gómez Martínez
Dr. José L. González de Gor Crooke
Dr. Carlos Hernando Ayala
Dr. Joaquín Irigoyen Díaz
Dra. M.ª Ángeles López-Egea Bueno
Dr. Guillermo Luque Aranda
Dr. Rafael Luque Aranda
Dra. M.ª Cristina Martínez de Velasco Santos
Dr. José Mora Castilla
Dr. Antonio Fco. Moreno Guerrero
Dra. M.ª Josefa Morillo Sánchez
Dr. Arturo Oliva Molina
Dr. Fernando Orellana Ramos
Dra. M.ª Isabel Pérez Cabeza
Dr. Fco. José Pérez Galindo
Dra. M.ª José del Río y Pardo
Dra. Paloma Rivera de Zea
Dra. Marina Rodríguez Calvo de Mora
Dra. M.ª del Valle Rueda Castillo
Dr. Fco. Javier Somavilla Lupiáñez
Dra. Ana I. Vázquez Salvi
Dr. Jacinto Villalvilla Castillo

D. José Manuel García Campos y D. Ildefonso Fernández-Baca Casares, como Presidentes del Comité Organizador, certifican que:

El Dr. D. Juan Carlos SANCHEZ ESPAÑA

ha presentado en el **92 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología**, celebrado en Málaga, del 21 al 24 de septiembre de 2016, la Comunicación de Investigación:

Elevada prevalencia y densidad de *Demodex folliculorum* en el Carcinoma basocelular del área periocular cuantificado mediante PCR

Y para que conste donde proceda firman el presente certificado en Málaga a veinticuatro de septiembre de dos mil dieciséis.



Prof. José M. García Campos



Dr. Ildefonso Fernández-Baca Casares

Presidentes del Comité Organizador

Secretaría General: C/ Arcepreste de Hita, 14, 1.ª Dcha. • 28015 Madrid • Tfnos: 91 544 80 35 – 544 58 79 • e-mail: congresoSEO@oftalm.com • www.oftalmoseo.com

Comunicación oral (rapid fire). Fecha: Septiembre - 2016. Título: “High prevalence and density of Demodex folliculorum infestation in periocular basal cell carcinoma quantified by PCR”. Congreso: 35th ESOPRS (European Society of Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery) anual meeting. Autoría: **J.C. Sánchez España**, A. Álvarez López, A. Tenorio Abreu. Ciudad: Atenas, Grecia.



35th esoprs
annual meeting
15-17 september 2016 | athens greece

www.esoprs2016.gr

European Society of Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery (ESOPRS)

SPEAKERS' CERTIFICATE

This is to certify that

Dr. Juan Carlos Sánchez España

presented the following Rapid Fire presentation entitled

HIGH PREVALENCE AND DENSITY OF DEMODEX FOLLICULORUM INFESTATION IN PERIOCCULAR BASAL CELL CARCINOMA QUANTIFIED BY PCR

J.C. Sánchez España¹, A. Álvarez López^{1,3}, A. Tenorio Abreu², L.E. Naranjo González^{1,4}, M.C. González Gallego⁵, C. Hidalgo Grass⁶, C. Ruíz Frutos⁷ M.D., Ph.D.

¹Department of Ophthalmology, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain, ²Department of Microbiology, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain, ³Department of Ophthalmology, Clínica Piñero, Sevilla, Spain, ⁴Department of Ophthalmology, Hospital Costa de la Luz, Huelva, Spain, ⁵Department of Pathology, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain, ⁶Department of Molecular biology, HGC Biomedical Research Diagnostic S.L, Huelva, Spain, ⁷Department of Environmental Biology and Public Health University of Huelva, Huelva, Spain

during the

35th ESOPRS Annual Meeting
organized by the European Society of Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery held on **September 15-17, 2016, in Athens, Greece.**


Y. Ntountas


G. Charonis

Organizers of the 35th ESOPRS 2016

Comunicación oral. Fecha: Junio -2016. Título: "Elevada prevalencia y densidad de Demodex folliculorum en Carcinoma basocelular en el área periocular cuantificado mediante PCR". Congreso: XXVI Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Plástica Ocular y Orbitaria (SECPOO. Autoría: **J.C. Sánchez España**, A. Álvarez López, A. Tenorio Abreu. Ciudad: Bilbao, España.



XXVI CONGRESO DE LA S.E.C.P.O.O.
Bilbao, 9 y 10 de junio de 2016

D. Joan Prat Bartomeu como Presidente de la Sociedad Española de Cirugía Plástica Ocular y Orbitaria (S.E.C.P.O.O.) y, D. Roberto Fernández Hermida y Dña. Bárbara Berasategui Fernández como Presidentes del Comité Organizador, certifican que:

El Dr. D. Juan Carlos SANCHEZ ESPAÑA

ha presentado en el **XXVI Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Plástica Ocular y Orbitaria**, celebrado en Bilbao, los días 9 y 10 de junio de 2016, la Comunicación Libre:

"Elevada prevalencia y densidad de Demodex folliculorum en Carcinoma basocelular en el área periocular cuantificado mediante PCR"

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Bilbao a diez de junio de dos mil dieciséis.

Dr. Joan Prat Bartomeu
Presidente S.E.C.P.O.O.

Dr. Roberto Fernández Hermida

Dra. Bárbara Berasategui Fernández
Presidentes Comité Organizador

9.4 Premios.

1er premio: Fotografía Científica. Fecha - Septiembre 2015. Título: “*Demodex Folliculorum, siguiéndole la pista a una blefaritis crónica*”. Congreso: 91º Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología (SEO). Autoría: **J.C. Sánchez España**. Sevilla.



INFORMACIÓN OFTALMOLÓGICA

PREMIOS ENTREGADOS EN EL CONGRESO

Premio Arruga 2015



Dr. Miguel González Andrade.

Premio Castroviejo 2015



Prof. Dr. José Manuel Benítez del Castillo Sánchez.

Premio Dres. Galo y Gustavo Leoz a la Comunicación de Investigación



Comunicación: «Sistemas genéticos para un nuevo abordaje del riesgo de progresión de la retinopatía diabética». Autores: Dres. M.ª Dolores Pinazo y Durán, Antonio V. Leoz Pérez, María José Roig Flewett y Vicente Zanón Moreno. Entrega el premio el Prof. Luis Fernández-Vega.

Premios Comunicación en Panel

1.º Premio: «Trasplante de membrana de Bowman para reducir y estabilizar al queratocono avanzado y progresivo». Autores: Dra. María Siatuá Pascián y Dra. Korine Van Dijk.

2.º Premio: «Parálisis de la mirada horizontal y oscilosis progresiva en pacientes con endotropía congénita y limitación de la abducción». Autores: Dr. Andrés Fernández-Vega Cueto-Figueroa y Dra. Idoia Rodríguez Masregui.

3.º Premio: «Dimeticona: Una nueva arma en el tratamiento del edema corneal». Autores: Dr. Miguel Contreras Díaz y Dr. Manuel Caro Magdaleno.



El Dr. Encinas hace entrega del 3.º premio de Panel al Dr. Manuel Caro.

Premio Comunicación en Vídeo

«Ambliopía profunda en anteoconía postquirúrgica en Síndrome de Sturge-Weber». Autores: Dr. Edgar Infantes Molina y Dr. Fernando González del Valle.



El Prof. Zato hace entrega del Premio al Dr. Infantes Molina.

Premio Fotografía Artística



1.º Premio: Título: «El implante contrataca». Lema: «Darli Vieder contra el edema macular diabético». Autores: Dra. María Cerdá Ibáñez y Dra. Francisca García Ibor.

El Prof. Zato haciendo entrega de la placa a la Dra. Cerdá.



2.º Premio: Título: «Guardia de Honor». Lema: «Como lo Vientos». Autor: Prof. José Guilherme Monteiro.

El Prof. García Feijoo haciendo entrega de la placa al Prof. Monteiro.

Premio Fotografía Científica



1.º Premio: Título: «Demodex Folliculorum». Lema: «Siguiendo la pista a una blefaritis crónica». Autor: Dr. Juan Carlos Sánchez España.

El Prof. García Feijoo haciendo entrega de la placa al Dr. Sánchez España.



2.º Premio: Título: «La isla mínima». Lema: «Oftalmología de película». Autores: Dra. Angélica de Freitas y Dr. Jorge Vila Arteaga.

El Prof. Fernández-Vega haciendo entrega de la placa al Dr. Vila.

24

Premio al mejor artículo científico original publicado en 2016 - 2017 Junio -2017. XXVII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Plástica Ocular y Orbitaria (SECPOO). **Sánchez España JC**, Tenorio Abreu A, Álvarez López A, Naranjo González LE, González Gallego MC, Hidalgo Grass C, Ruíz Frutos C. Madrid.



D. Ferrán Mascaró Zamora, como Secretario General de la Sociedad Española de Cirugía Plástica Ocular y Orbitaria,

CERTIFICO:

Que en la Sesión de premios del día 2 de Junio de 2017, durante el **XXVII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Plástica Ocular y Orbitaria**, le fue concedido el PREMIO AL MEJOR ARTÍCULO CIENTÍFICO ORIGINAL al trabajo titulado:

“PCR Quantification of D. folliculorum in Periocular Basal Cell Carcinoma”

del Dr.:

Juan C. Sánchez España

Y para que conste donde proceda firmo el presente certificado en Madrid a dos de junio de dos mil diecisiete.

Dr. Ferrán Mascaró Zamora
Secretario General

PREMIO: una inscripción gratuita para el XXVIII Congreso SECPOO, que se celebrará en Zaragoza en junio de 2018 y placa Dr. Gonzalo Blanco Mateos

