

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Medicina



**TESIS DOCTORAL**

**Tratamiento con heparina tópica en pacientes con síndrome eritrosidestésico palmo plantar asociado a capecitabina y estudio de su mecanismo fisiopatológico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

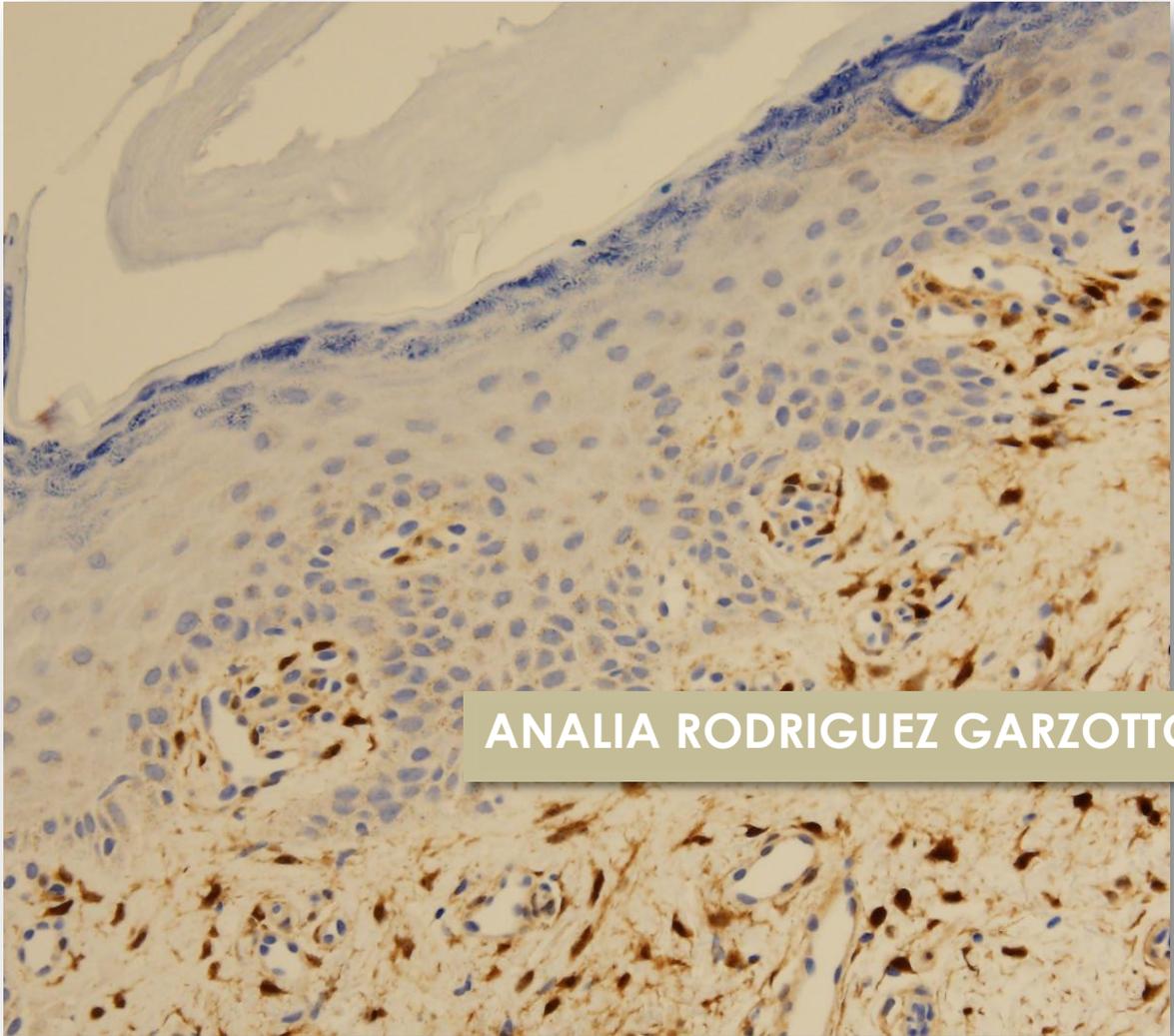
**Analia Adela Rodríguez Garzotto**

Directores

**María Teresa Agulló Ortuño**  
**Rafael Enríquez de Salamanca**  
**Hernán Cortés Funes**

**Madrid, 2017**

TRATAMIENTO CON HEPARINA TÓPICA EN PACIENTES  
CON SÍNDROME ERITROSIDESTÉSICO PALMO PLANTAR  
ASOCIADO A CAPECITABINA Y  
ESTUDIO DE SU MECANISMO FISIOPATOLÓGICO



ANALIA RODRIGUEZ GARZOTTO

**TESIS DOCTORAL**

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento Medicina







# Universidad Complutense de Madrid

FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TRATAMIENTO CON HEPARINA TÓPICA EN  
PACIENTES CON SÍNDROME ERITROSIDESTÉSICO  
PALMO PLANTAR ASOCIADO A CAPECITABINA Y  
ESTUDIO DE SU MECANISMO FISIOPATOLÓGICO

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR

**Analia Adela Rodríguez Garzotto**

Directores:

**Dra. M<sup>a</sup> Teresa Agulló Ortuño**  
**Dr. Rafael Enríquez de Salamanca**  
**Dr. Hernán Cortés Funes**





Prof. Dra. MARÍA TERESA AGULLÓ, Profesora Asociada de la Universidad de Castilla La Mancha e Investigadora del Laboratorio de Oncología Traslacional del Instituto de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid

Prof. Dr. D. RAFAEL ENRÍQUEZ DE SALAMANCA LORENTE, Catedrático de Medicina Interna del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

Prof. Dr. D. HERNÁN CORTÉS FUNES, Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid.

CERTIFICAN que,

Dña. Analia Adela Rodriguez Garzotto, licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección, en el Laboratorio de Oncología Traslacional del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre de Madrid, el trabajo titulado: "TRATAMIENTO CON HEPARINA TÓPICA EN PACIENTES CON SÍNDROME ERITROSIDESTÉSICO PALMO PLANTAR ASOCIADO A CAPECITABINA Y ESTUDIO DE SU MECANISMO FISIOPATOLÓGICO", considerando que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Madrid a 15 de Octubre de 2015

VºBº de los Co Directores de tesis

Prof. Dra. María Teresa Agulló

Prof. Dr. D. Rafael Enríquez De Salamanca Lorente

Prof. Dr. D. Hernán Cortés Funes



# Agradecimientos

---





A mi esposo, familia  
y amigos



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a mi esposo que me ha acompañado en cada uno de mis logros y que “existen” gracias a su incansable apoyo. A mis padres y suegros, eternos trabajadores y soñadores que ven sus logros en los nuestros.

A los pacientes que colaboran con ilusión para que podamos saber más sobre el cáncer y todo lo que le rodea en especial a la Sra. Graciela Inés Quiroga por quien empezó esta idea.

A Helena Revoredo que confió en nosotros y nos dio y da su apoyo y cariño.

A la Dra. Teresa Agulló Ortuño, Tere, mi Directora y amiga.

Al Dr. Cortés Funes porque creyó en un proyecto y dio su apoyo para que pudiera iniciarse.

A los que en algún momento participaron en dar forma a un sueño para que se convirtiera en un sólido proyecto y que se consolidara con alentadores resultados: Lara Iglesias Docampo, Carlos Gómez Martín, Cristina Grávalos y José Antonio López Martín.

A Carmen Montalbán por su docencia inicial en el mundo de los Ensayos Clínicos. A Raquel, mi Data Manager favorita por su gran colaboración.

A Eva Ciruelos, Luis Manso y César Mendiola por enviarme pacientes y confiar en este tratamiento. A las enfermeras y Javi “el celador” del Servicio de Oncología Médica del Hospital 12 de Octubre por ayudar en la logística del Ensayo Clínico.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre, al Dr. José Luis Rodríguez Peralto, por ayudarme con el análisis de todas las muestras y a María, Grassy y Rosa por su extraordinaria ayuda con la Inmunohistoquímica de las biopsias.

Al Dr. Ortiz del Servicio de dermatología del Hospital 12 de Octubre por su colaboración en la extracción de las biopsias.

A Isabel Ruppen y María Pilar Ximénez de Embún del Laboratorio de Proteómica del CNIO por colaborar en la determinación proteica.

A la Dra. Coral Barbas Arribas por realizar la metabolómica de nuestro proyecto, resultados que por lo extenso de la tesis no se han añadido.

Finalmente a Remey Artigas del Laboratorio Menarini, a Elena Sánchez Viñez y Paz Torres de Laboratorios Roche que confiaron en este proyecto y nos brindaron su apoyo económico.



# Índice

---



**ÍNDICE**

ABREVIATURAS .....	23
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.....	27
1 RESUMEN .....	31
OBJETIVO PRINCIPAL.....	34
OBJETIVOS SECUNDARIOS .....	34
OBJETIVOS EXPLORATORIOS.....	35
2 SUMMARY.....	39
3 INTRODUCCIÓN.....	45
EL SÍNDROME PALMO PLANTAR.....	45
REPARACIÓN DE HERIDAS EN LA PIEL NORMAL.....	48
FISIOLOGÍA DE LA PIEL .....	48
RECAMBIO CELULAR NORMAL DE LA PIEL.....	49
HEPARAN SULFATO Y HEPARINA .....	54
CAPECITABINA .....	56
METABOLISMO DE LA CAPECITABINA.....	56
VARIACIONES DE LOS GENES DYPD Y TYMP Y SU RELACIÓN CON EL SPP	57
TEORÍAS DEL MECANISMO FISIOPATOLÓGICO DEL SPP .....	58
MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS PROPUESTOS .....	60
EL SISTEMA INMUNE DE LA PIEL .....	61
LOS QUERATINOCITOS CUMPLEN FUNCIONES DE CENTINELAS INMUNES	62
.....	62
LOS QUERATINOCITOS PRODUCEN MEDIADORES DE LA INMUNIDAD	64
INNATA.....	64
LOS QUERATINOCITOS NO SON CÉLULAS PROFESIONALES	64
PRESENTADORAS DE ANTÍGENO.....	64
RESPUESTAS INMUNES DESREGULADAS DE LA PIEL.....	66
REACCIONES CUTÁNEAS A FÁRMACOS .....	67
MECANISMO POR EL CUAL LAS CÉLULAS T RECONOCEN A LOS FÁRMACOS	67
.....	67
EXANTEMA MACULOPAPULAR (MPE) .....	68

	JUSTIFICACIÓN DEL DISEÑO DE UN ENSAYO CLÍNICO .....	68
4	HIPÓTESIS .....	73
5	OBJETIVOS .....	77
	OBJETIVO PRINCIPAL.....	77
	OBJETIVOS SECUNDARIOS .....	77
	OBJETIVOS EXPLORATORIOS.....	77
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
	DISEÑO DEL ENSAYO CLÍNICO.....	81
	POBLACIÓN EN ESTUDIO .....	81
	DURACIÓN DEL ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE LOS PACIENTES .....	82
	TRATAMIENTO.....	83
	ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE BIOPSIAS DE PIEL .....	84
	TIPO DE MUESTRAS.....	84
	EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICAS DE LAS MUESTRAS DE LA PIEL AFECTA POR EL SPP: .....	85
	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA EN BIOPSIAS DE PIEL .....	85
	CAMBIOS GLOBALES EN LA EXPRESIÓN PROTEICA: ITRAQ.....	85
	CONFECCIÓN DE TISSUE MICROARRAYS.....	87
	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN MUESTRAS SANGUÍNEAS DE LOS PACIENTES.....	89
	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS .....	89
	OBTENCIÓN DE ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN A ADN COMPLEMENTARIO .....	90
	CUANTIFICACIÓN DE ARN MENSAJERO .....	90
	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	91
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
	DISEÑO DEL ENSAYO CLÍNICO .....	95
	DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES .....	95
	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES .....	95
	ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO .....	98
	TOXICIDAD DEL TRATAMIENTO.....	98
	REDUCCIÓN DE DOSIS .....	98

EVALUACION HISTOLÓGICA DE LAS BIOPSIAS.....	98
CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES PROTEICAS EN EL SPP .....	101
PROTEÍNAS SOBRE EXPRESADAS MÁS RELEVANTES.....	102
PROTEÍNAS CUYA EXPRESIÓN SE ENCUENTRA DISMINUIDA TRAS EL TRATAMIENTO CON HT.....	115
DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS DE EXPRESIÓN PROTEICA: ANÁLISIS FUNCIONAL.....	121
EXPRESIÓN GÉNICA DE TYMP Y DPYD EN SANGRE PERIFÉRICA. ....	124
8 CONCLUSIONES .....	131
9 COMUNICACIONES RELACIONADAS .....	135
10 REFERENCIAS.....	145
11 ANEXOS .....	158



# Abreviaturas

---



## ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario.  
aGVHD: Enfermedad aguda de injerto contra huésped.  
AMP: Péptidos antimicrobianos.  
APC: Células presentadoras de antígenos no profesionales.  
BCIE: Eritrodermia ictiosiforme congénita.  
COX: Ciclooxygenasa.  
DA: Dermatitis atópica.  
DAMP: Patrones moleculares asociados a daño.  
DC: Células dendríticas.  
5'-DFCR: 5'-desoxifluorocitidina.  
DPD: Dihidropirimidina deshidrogenasa.  
DTT: Ditioneitol.  
dTTP: Desoxitimidina 5'trifosfato.  
DYPD: Dihidropirimidina deshidrogenasa.  
EC: Estrato córneo.  
EDC: Complejo de la diferenciación epidérmica.  
EGF: Factor de crecimiento epidérmico.  
EMT: Transición epitelio-mesénquima.  
EVA: Escala Analógica Visual  
FASP: Filtro asistido para preparación de la muestra.  
FBAL:  $\alpha$  fluoro- $\beta$ alanina.  
FDR: Relación de falso descubrimiento.  
FGF: Factor estimulante de fibroblastos.  
FLG: Filagrina.  
FN: Fibronectina.  
FNIII1-7: Fibronectina tipo 3 Dominio proteína.  
5-FU: 5-fluorouracilo.  
FUH2: Dihidrofluorouracilo.  
GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.  
Hb: Hemoglobina.  
HCD: Disociación de alta energía de colisión.  
Hct: Hematocrito.  
HE: Hematoxilina y Eosina.  
HS: Heparán sulfato.  
HSPGs: Heparán sulfato proteoglicanos.  
IFN: Interferón tipo I.  
iTRAQ : Isobaric tags for relative and absolute quantitation.  
Kdap: Proteína asociada a la diferenciación de queratinocitos

K1: Keratina 1, tipo II.  
KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos.  
KIFs: Filamentos intermedios de queratina.  
LCE: Desarrollo córneo.  
LPS: Lipopolisacáridos.  
MHC-II: Moléculas de histocompatibilidad de clase II.  
MPE: Exantema maculopapular.  
NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.  
NKT: Células T asesinas naturales.  
NLR: Dominio de unión del Nucleótido  
NNMT: Nicotinamida N-metiltransferasa.  
OCT: Temperatura óptima de corte.  
PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos.  
PBMC: Fracción de células mononucleares de sangre periférica.  
PDECGF: Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas.  
PDMS: Polidimetil ciclosiloxano.  
PGs: Proteoglicanos.  
PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina.  
SALT: Tejido linfóide asociado a la piel.  
SOD-1: Dismutasa superóxido.  
SOD-2: Manganeso dismutasa.  
SPARC: Proteína ácida rica en cisteína secretada.  
SPRR: Pequeñas proteínas ricas en prolina.  
STMN1: Stathmin.  
TGs: Transglutaminasas  
TGF-β<sub>1</sub>: Factor de crecimiento transformante β<sub>1</sub>.  
TLRs: Receptores tipo Toll.  
TNF: Factor de necrosis tumoral.  
TYMP: Timidina fosforilasa.  
TYMS: Timidilato sintetasa.

# Listado de Tablas y Figuras

---



## LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.

TABLA 1: GRADOS DE SPP SEGÚN NCI .....	46
TABLA 2: SONDAS TAQMAN .....	91
TABLA 3: SÍNTOMAS DEL SPP .....	96
TABLA 4: VALORACIÓN DEL DOLOR POR EVA.....	97
TABLA 5: NÚMERO SEMANAS EN TRATAMIENTO.....	98
TABLA 6: RESULTADOS MICROSCOPIA. ....	99
TABLA 7: PROTEÍNAS SOBRE EXPRESADAS .....	101
TABLA 8: PROTEÍNAS CON EXPRESIÓN DISMINUIDA.....	102
TABLA 9: NIVELES DE EXPRESIÓN DE TYMP Y DPYD EN LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO. ....	125
TABLA 10: DIFERENCIA DE EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE LOS PACIENTES QUE RESPONDIERON Y LOS QUE NO .....	126
FIGURA 1: DOS EJEMPLOS DE DOS PACIENTES CON SPP. ....	47
FIGURA 2: LA PIEL Y SUS APÉNDICES. ....	48
FIGURA 3: VÍAS METABÓLICAS DE LA CAPECITABINA (MILANO ET AL., 2008).....	57
FIGURA 4: QUERATINOCITOS COMO SENSORES DE PELIGRO (NESTLE ET AL., 2009).....	63
FIGURA 5: CENTINELAS INMUNES RESIDENTES EN LA PIEL NORMAL(NESTLE ET AL., 2009). .	65
FIGURA 6: INMUNOPATOGENESIS DE LA PSORIASIS MODIFICADO DE (NESTLE ET AL., 2009). .	66
FIGURA 7: RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON HT DE UN PACIENTE.....	69
FIGURA 8: ESQUEMA DEL DISEÑO DEL ENSAYO CLINICO.....	83
FIGURA 9: DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES. ....	95
FIGURA 10: TIEMPO HASTA RESPUESTA CLÍNICA.....	96
FIGURA 11: IHQ NNMT FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT. ....	103
FIGURA 12: IHQ SPARC FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT. ....	105
FIGURA 13: IHQ HSP47 SERPIN H1 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.....	107
FIGURA 14: IHQ THY1-ACD90 FIGURA A: BASAL FIGURA B:TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.....	108
FIGURA 15: IHQ DERMICIDIN FIGURA A: BASAL FIGURA B:TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.....	109
FIGURA 16: IHQ S100 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT. ....	111
FIGURA 17: PERIOSTIN FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT. ....	112
FIGURA 18: IHQ STMN1 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT. ....	113
FIGURA 19: IHQ CALDESMON FIGURA A : BASAL. FIGURA B: TRAS TRES SEMANS DE TRATAMIENTO. ....	114

FIGURA 20: IHQ CD9 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT. ....	117
FIGURA 21: IHQ K1 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT. ....	119
FIGURA 22: IHQ K10 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT. ....	119
FIGURA 23: IHQ FILAGGRIN FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT. ....	120
FIGURA 24 A: FUNCIONES CELULARES Y MOLECULARES B: DESARROLLO Y FUNCIÓN DE SISTEMAS BIOLÓGICOS. ....	121
FIGURA 25: RED PRINCIPAL DE INTERCONEXIÓN ENTRE LA HEPARINA Y LAS PROTEÍNAS ESTUDIADAS. ....	122
FIGURA 26: PROTEÍNAS DE NUESTRO ESTUDIO RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DE LA PIEL Y SUS FUNCIONES. ....	122
FIGURA 27: PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA ORGANIZACIÓN Y EL ENSAMBLAJE CELULAR. ....	123
FIGURA 28: PROTEÍNAS RELACIONADAS CON ENFERMEDADES DERMATOLÓGICAS. ....	123
FIGURA 29: PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL MOVIMIENTO CELULAR. ....	124
FIGURA 30: NIVELES DE EXPRESIÓN DE TYMP Y DPYD DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO, EN FUNCIÓN DE LA RESPUESTA AL INICIO Y TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HEPARINA TÓPICA. ....	126

# Resumen

---



# 1 RESUMEN

## TÍTULO DE LA TESIS.

TRATAMIENTO CON HEPARINA TÓPICA EN PACIENTES CON SÍNDROME ERITROSIDESTÉSICO PALMO PLANTAR ASOCIADO A CAPECITABINA Y ESTUDIO DE SU MECANISMO FISIOPATOLÓGICO

## INTRODUCCIÓN.

El síndrome palmo-plantar (SPP) es un efecto adverso, asociado a distintas quimioterapias sistémicas, más frecuentemente secundario a fluoropirimidinas orales como Capecitabina (Xeloda®). Su incidencia se estima entre un 36 y un 68 % de los pacientes sometidos a este tratamiento. Generalmente no amenaza la vida del paciente y rara vez requiere hospitalización.(Childress and Lokich, 2003, Abushullaih et al., 2002)

El tratamiento es la suspensión del quimioterápico, modificación de dosis hasta mejoría sintomática y medidas de soporte.(Gressett et al., 2006) La discontinuación del agente causal determina la regeneración de la piel en 1 a 2 semanas, en función del grado y estadio.

La fisiopatología del SPP no está establecida. Los cambios clínicos e histológicos que se observan son compatibles con daños en la barrera fisiológica de la piel.(Degen et al., 2010) Entre los hallazgos anatomopatológicos descritos se encuentran cambios inflamatorios inespecíficos como infiltración linfocitaria, dilatación de vasos sanguíneos y edema, marcada hiperqueratosis con paraqueratosis y queratinocitos apoptóticos. (Gressett et al., 2006, Scotte et al., 2005, Scheithauer and Blum, 2004)

El compromiso selectivo de la dermis de palmas y plantas, acompañado de daño epitelial celular, sugieren un efecto tóxico directo sobre los queratinocitos de la capa basal como mecanismo fisiopatológico principal del

SPP, aunque existen diferentes teorías.(Gressett et al., 2006, Narasimhan et al., 2004) La primera teoría relaciona al SPP secundario a Capecitabina con un incremento de los niveles de la enzima Timidina Fosforilasa (TP) en células especializadas de la piel (queratinocitos) que determina la acumulación de metabolitos activos de Capecitabina en la epidermis, lo que conlleva a un aumento de la probabilidad de desarrollar este efecto adverso. (Chalermchai et al., 2010) Una segunda teoría postula que la Capecitabina puede ser eliminada por el sistema ecrino (secreción de sudor), lo que explicaría el SPP principalmente en palmas y plantas en relación con el mayor número de glándulas ecrinas en estas localizaciones. (Milano et al., 2008) Y la tercera teoría, sugiere que el SPP podría desarrollarse debido al aumento de la vascularización y al incremento de la presión y la temperatura en las manos y los pies. (Kara et al., 2006) Se postula una cuarta teoría en la que se vincula al SPP con una reacción de tipo inmune ya que existen algunas similitudes clínicas e histológicas entre SPP con la enfermedad aguda de injerto contra huésped (aGVHD). Se ha sugerido que los fármacos quimioterápicos determinan cambios en los receptores de la superficie celular pudiendo ser capaces de inducir reacción del huésped. (Childress and Lokich, 2003, Milano et al., 2008)

Aunque el SPP no es peligroso para la vida, la condición afecta negativamente a la calidad de la misma y puede limitar las actividades de la vida diaria. Además, el desarrollo de SPP conduce a interrupción del programa de tratamiento y a menudo a la reducción de la dosis, pudiendo influir significativamente en la eficacia del tratamiento.

Por otro lado, sabemos que el Heparán Sulfato (HS) en la superficie de las células, modula las acciones de un gran número de ligandos extracelulares. Los miembros de la familia de HS se unen a diferentes ligandos para favorecer la formación de complejos con receptores de señalización. Estos proteoglicanos también inmovilizan y regulan el volumen de recambio de ligandos que actúan en la superficie celular.(Bottaro et al., 1990)

El HS es un polisacárido lineal fuertemente aniónico que se distingue de la heparina de producto farmacéutico por su menor grado de sulfatación. (Jorpes and Gardell, 1948) Al igual que las cadenas de HS, la heparina posee una alta capacidad para enlazar un repertorio diverso de proteínas bajo condiciones fisiológicas. (Bernfield et al., 1999) El HS se une a la superficie celular así como a las proteínas de la matriz, citocinas y quimiocinas, estas interacciones modulan la maduración de las células inflamatorias y la activación, la difusión y la adherencia de los leucocitos al endotelio, así como la extravasación y la quimiotaxis. (Gotte, 2003)

La heparina es un glucosaminoglicano aniónico con efectos anticoagulantes, capaz de inhibir también la proliferación de diversos tipos celulares *in vitro*. El tratamiento *in vivo* inhibe la proliferación de células de músculo liso vascular, de fibroblastos, melanocitos, queratinocitos y estimula la síntesis de colágeno. La heparina mimetiza los efectos fisiológicos del HS pero sus acciones son dosis dependientes y actúan tanto en las membranas plasmáticas de las células de la dermis como en células de la epidermis. (Hurwitz et al., 2015, Ferrao and Mason, 1993, Parisel et al., 2003) La inhibición de la proliferación de los cultivos de queratinocitos se debe a distintos mecanismos, especialmente uno autocrino. Según este mecanismo, la heparina forma un complejo con el factor de crecimiento de queratinocitos uniéndose a este con alta afinidad, lo que impide su acción. Todo ello sugiere que la heparina podría ser un tratamiento selectivo dirigido a la inhibición de la hiperqueratosis. (Vanscott and Ekel, 1963)

### Hipótesis

Uno de los principales efectos secundarios del tratamiento con Capecitabina es el Síndrome Palmo Plantar (SPP). En este, el compromiso selectivo de la dermis de palmas y plantas, con presencia de hiperqueratosis acompañada de infiltrado inflamatorio, sugiere la pérdida de la homeostasis cutánea a favor de un estímulo proliferativo y una respuesta inmune loco regional.

### Hipótesis 1

- *El uso de Heparina Tópica mejora el SPP al unirse en forma de complejos estables con factores estimulantes de crecimiento y diferentes citoquinas inhibiendo de esta manera su acción, por lo que disminuye la respuesta inflamatoria local y beneficia la calidad de vida de los pacientes sin aumentar la toxicidad.*

Para optimizar el tratamiento quimioterápico con Capecitabina es necesario conocer el mecanismo fisiopatológico de uno de sus principales efectos adversos, el SPP.

### Hipótesis 2

- *El estudio histopatológico de biopsias de pacientes con SPP y el análisis exploratorio de las proteínas expresadas en ellas representan un modelo válido para generar hipótesis biológicas e identificar posibles mecanismos implicados en su fisiopatología.*

Se ha relacionado el SPP con los niveles de Timidina fosforilasa (TP) y Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) ya que los pacientes tratados con deficiencia de DPD tienen un mayor riesgo de presentar toxicidad grave.

### Hipótesis 3

- *La expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de la Capecitabina como TP y DPD se relaciona con la gravedad del SPP.*

## **OBJETIVOS**

### **1.1.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

- Evaluar la mejoría en las manifestaciones clínicas del Síndrome Eritrosidestésico Palmo Plantar (SPP), tras tres semanas de tratamiento con heparina tópica.

### **1.1.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Valorar la seguridad del tratamiento tópico con heparina en pacientes con SPP secundario a Capecitabina.

- Interpretar la mejoría sintomática, mediante Escala Analógica Visual (EVA) del dolor, en los pacientes con SPP tratados con heparina tópica.

### 1.1.3 OBJETIVOS EXPLORATORIOS

- Evaluar los cambios histopatológicos en las biopsias obtenidas de los pacientes con SPP durante el tratamiento con HT.
- Identificar y cuantificar la expresión diferencial de proteínas involucradas en el mecanismo fisiopatológico autoinmune del SPP.
- Analizar la expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de la Capecitabina y su relación con el SPP.

### RESULTADOS

En nuestro trabajo hemos observado una mejoría clínica evidente, entendiéndose como una disminución de al menos un grado del SPP, asociado a un descenso de la presencia de dolor, en los pacientes tratados con HT.

Por otro lado identificamos numerosas proteínas en las biopsias cutáneas, realizadas previa y tras tres semanas del tratamiento con HT, que creemos, tienen una estrecha relación con hechos que son fundamentales para el desarrollo y resolución del SPP. Se describe una expresión diferencial de proteínas implicadas en procesos de inflamación, de inmunidad cutánea, de diferenciación y de muerte celular, hasta el momento procesos no relacionados con el desarrollo de este efecto adverso.

Tras el tratamiento con HT se elevan también proteínas relacionadas con la adhesión, reparación y maduración celular como S100, Caldesmon, SPARC, Periostin y Thy 1, que se interpreta en el contexto de nuestros pacientes, como implicados en el restablecimiento de la homeostasis cutánea de palmas y plantas.

De igual modo, tras el tratamiento con HT se observa un descenso en aquellas proteínas inhibitoras de la apoptosis como Serpina B3, o un aumento de las

inhibidoras de la proliferación por lo que se favorece la diferenciación y maduración celular normal de la piel.

## CONCLUSIONES

En relación con las tres Hipótesis planteadas concluimos lo siguiente:

### Conclusión 1

El uso de Heparina Tópica es un tratamiento eficaz para el Síndrome Palmo Plantar secundario a Capecitabina al restituir la homeostasis cutánea. Revierte los estímulos de hiperqueratosis y el proceso inflamatorio mejora la respuesta inflamatoria loco regional al disminuir la expresión de factores estimulantes de crecimiento y citoquinas. Sin aumentar la toxicidad.

### Conclusión 2

El estudio histopatológico de las biopsias de pacientes con SPP antes de iniciar el tratamiento con heparina tópica y tras tres semanas de tratamiento, puso de manifiesto una expresión diferencial de proteínas involucradas en los mecanismos fisiopatológicos del SPP que hasta el momento no han sido descritos.

### Conclusión 3

No logramos relacionar los niveles de Timidina fosforilasa (TPYD) y Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD) en sangre periférica con la gravedad del SPP.

En resumen, nuestro estudio identifica una serie de proteínas hasta el momento no relacionadas con el SPP y que participan en distintos mecanismos moleculares que según nuestra teoría se encuentran asociados tanto con el desarrollo del SPP como en su reversión tras el uso de Heparina Tópica. Con estos datos proporcionamos el inicio de un camino hacia la búsqueda de biomarcadores de susceptibilidad a padecer este efecto adverso. Del mismo modo podríamos identificar aquellos pacientes que se beneficiarían de recibir un tratamiento preventivo asociado a su quimioterapia.

# Summary

---



## **2 SUMMARY**

### **TITLE OF THE THESIS.**

TREATMENT WITH TOPIC HEPARIN IN PATIENTS WITH CAPECITABINE ASSOCIATED PALMAR–PLANTAR ERYTHRODYSESTHESIA AND STUDY OF THEIR PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISM

### **INTRODUCTION**

The Hand Foot Syndrome or Palmar–Plantar Erythrodysesthesia Syndrome (PPS) is an adverse effect, associated with various systemic chemotherapy, as Capecitabine (Xeloda). Incidence is estimated between 36 and 68% of patients undergoing this treatment. Usually it is not life threatening for the patient and rarely requires hospitalization. (Childress and Lokich, 2003, Abushullaih et al., 2002)

Treatment is chemotherapy discontinuation, dose modification to symptomatic improvement and supportive measures. (Gressett et al., 2006) Discontinuing the causal agent determines skin regeneration in 1 to 2 weeks, depending on the grade and stage.

The pathophysiology of PPS is not established. Clinical and histological changes observed are consistent with damage to the physiological barrier of the skin. (Degen et al., 2010). Among the pathologic findings are described as nonspecific inflammatory changes, lymphocytic infiltration, dilation of blood vessels and edema, marked hyperkeratosis with parakeratosis and apoptotic keratinocytes. (Gressett et al., 2006, Scotte et al., 2005, Scheithauer and Blum, 2004)

The selective engagement of the dermis of palms and soles, with epithelial cell damage, suggesting a direct toxic effect on keratinocytes of the basal layer. Probably the main pathophysiological mechanism of PPS, although there are different theories. (Gressett et al., 2006, Narasimhan et al., 2004) The first theory relates PPS with increased levels of the enzyme Thymidine Phosphorylase (TP) in specialized skin cells (keratinocytes) that determines the accumulation of active metabolites of Capecitabine in the epidermis, leading to an increased chance of developing this side effect. (Chalermchai et al., 2010) A second theory postulates that Capecitabine may be secreted by the system eccrine (sweat secretion), which would explain the PPS mainly on

palms and soles in relation to the largest number of eccrine glands at these locations. (Milano et al., 2008) And the third theory suggests that the PPS could develop due to increased vascularity and increased the pressure and temperature in the hands and feet. (Kara et al., 2006) The fourth theory linked the PPS with immune reaction type as there are some clinical and histological similarities between SPP with acute graft versus host disease (aGVHD). It has been suggested that chemotherapeutic drugs determine changes in cell surface receptors may be capable of inducing host reaction. (Childress and Lokich, 2003, Milano et al., 2008)

Although PPS is not life threatening, the condition negatively affects the quality of life and may limit activities of daily living. Furthermore, PPS development leads to interruption of the treatment program and often reducing the dose, can significantly influence the treatment effectiveness.

Furthermore, we know that the heparan sulfate (HS) on the surface of cells, modulates the actions of many extracellular ligands. The family members of HS bind different ligands to favor formation of complexes with receptor signaling. These proteoglycans immobilized and also regulate the volume parts of ligands that act on the cell surface. (Bottaro et al., 1990)

The HS is a strongly anionic linear polysaccharide that is not different from heparin pharmaceutical product due to its lower degree of sulfation. (Jorpes and Gardell, 1948) Like HS chains, heparin has a high capacity to bind a diverse repertoire of proteins under physiological conditions. (Bernfield et al., 1999) The HS binds to the cell surface as well as matrix proteins, cytokines and chemokines, these interactions modulate inflammatory cell maturation and activation, diffusion and adhesion of leukocytes the endothelium and the extravasation and chemotaxis. (Gotte, 2003)

Heparin is a glycosaminoglycan with anticoagulant anion action, can also inhibit proliferation of various cell types in vitro effects. The in vivo treatment inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells, fibroblasts, melanocytes, keratinocytes and stimulates collagen synthesis. Heparin mimics the physiological effects of HS but their actions are dose dependent and act both in the plasma membranes of cells of the dermis and epidermis cells. (Hurwitz et al., 2015, Martin et al., 2015) (Ferrao and Mason, 1993 Parisel et al., 2003) Inhibition of the proliferation of keratinocyte cultures is due to different mechanisms, especially one autocrine. According to this mechanism, the heparin forms a complex with the keratinocyte growth factor binding with high affinity, which prevents its action. This suggests that heparin could be a selective treatment aimed at inhibition of hyperkeratosis. (Vanscott and Ekel, 1963)

## GOALS

### MAIN GOAL

- Evaluate the improvement in clinical manifestations of the Palmar–Plantar Erythrodysesthesia Syndrome (PPS), after three weeks of treatment with topical heparin.

### SECONDARY OBJECTIVES

- To assess the safety of topical treatment with heparin in patients with secondary PPS capecitabine.
- Interpret symptomatic improvement by Visual Analog Scale (VAS) of pain in PPS patients treated with topical heparin.

### EXPLORATION OBJECTIVES

- To evaluate the histopathological changes in biopsies obtained from patients with PPS during treatment with HT.
- Identify and quantify the differential expression of proteins involved in autoimmune pathophysiological mechanism of PPS.
- To analyze the gene expression of enzymes involved in the metabolism of Capecitabine and its relation to the PPS.

## RESULTS

In our work we have observed a clear clinical improvement, defined as a decrease of at least a degree of PPS, associated with a decrease in the presence of pain in patients treated with HT.

We identified a numerous proteins in skin biopsies performed before and after three weeks of treatment with HT, we believe that they have a close relation with inflammation processes, cutaneous immunity, differentiation and cell death is described, so far no processes associated with the development of this adverse effect.

After treatment with HT also accession-related proteins, repair and cell maturation as S100, Caldesmon, SPARC, Periostin and Thy 1, which is interpreted in the context of our patients, as involved in restoring skin homeostasis rise palms and soles.

Similarly, after treatment with a decrease in those HT inhibitory proteins as Serpina B3 apoptosis, or increased proliferation inhibiting differentiation so and normal skin is promoted cell maturation is observed.

## CONCLUSIONS

Topical use of heparin is an effective treatment for the Palmo Plantar Syndrome secondary to Capecitabine to restore skin homeostasis. Reverses stimuli hyperkeratosis and improves locoregional inflammatory response by decreasing the expression of growth stimulating factors and cytokines.

The histopathological study of biopsies from patients with PPS before started and after three weeks of treatment with topical heparin, shows a differential expression of proteins involved in the pathophysiological mechanisms of PPS to the undescribed at this time.

Our genetic analysis fails to correlate levels of Thymidine phosphorylase (*TYP*) and Dihydropyrimidine dehydrogenase (*DPYD*) serum with the severity of PPS in our patients.

In summary, our study identifies a number of proteins so far not related to the PPS and involved in different molecular mechanisms on our theory are associated with the development of PPS, as well as involved in the reversal of heparin after use Topical . These data provide the beginning of a path to search for biomarkers of susceptibility to this adverse effect. Similarly we could identify those patients who will benefit from receiving preventive treatment associated with chemotherapy.

# Introducción

---



## **3 INTRODUCCIÓN**

### **3.1 EL SÍNDROME PALMO PLANTAR**

El síndrome palmo-plantar (SPP) es un efecto adverso, asociado a distintas quimioterapias sistémicas, más frecuentemente secundario a fluoropirimidinas orales como Capecitabina (Xeloda®). Su incidencia se estima entre un 36 y un 68 % de los pacientes sometidos a este tratamiento.(Childress and Lokich, 2003, Abushullaih et al., 2002)

Generalmente no amenaza la vida del paciente y rara vez requiere hospitalización. Pero es una toxicidad importante, limitante de dosis. Tanto la Organización Mundial de la salud (OMS) como el Instituto Nacional del Cáncer (National Cancer Institute, NCI) han desarrollado una clasificación para los grados del SPP, siendo el Grado 3 de extrema importancia. El Grado 1 se caracteriza por disestesias o parestesias de las palmas y las plantas. En el Grado 2 los pacientes experimentan incomodidad al caminar o sostener objetos y enrojecimiento o hinchazón sin dolor. La progresión a Grado 3 implica eritema doloroso y tumefacción que limita la actividad normal. El Grado 4 del SPP se define por la descamación, ulceración y formación de ampollas en la piel, acompañado de dolor. (Gressett et al., 2006, Son et al., 2009)

El SPP es una reacción tóxica relativamente frecuente relacionada con algunos agentes quimioterapéuticos. La Doxorubicina, Citarabina, Docetaxel y Fluorouracilo son los agentes implicados con más frecuencia. (Nagore, Insa et al. 2000), y los Inhibidores de la Tirosina Kinasa como Sorafenib o Sunitinib y Regorafenib (Lai et al., 2007, McLellan et al., 2015)

El tiempo medio de aparición del SPP, secundario a Capecitabina, es de 36 a 360 días, relacionándose con la dosis acumulada y el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento.(Do and Kim, 2007) Comúnmente se evidencia este efecto adverso tras la exposición prolongada a la sustancia como ocurre con los tratamientos largos o con las infusiones continuas, así como con las preparaciones con larga vida media. También se observa un aumento en la frecuencia y en la gravedad del SPP si en un paciente se combinan dos sustancias con este posible efecto adverso.

Dentro de las características clínicas, es de destacar el eritema doloroso, a menudo precedido de parestesias, situado en palmas y plantas, especialmente en pulpejos de falanges distales en el contexto del tratamiento

de quimioterapia. Si la administración de Capecitabina continúa, el síndrome progresa a los pocos días, con edema, hormigueos y disestesias, pudiendo llegar a bullas en las áreas de presión, tanto en talones como metatarsos, con ulceraciones y posibles infecciones añadidas, lo que ocasiona la pérdida de la función, asociada a intenso dolor. Frecuentemente se observan más afectadas las manos que los pies.(Gressett et al., 2006) Con 5Fluorouracilo se evidenció en un meta análisis, un aumento de las toxicidades en pacientes mujeres ancianas (Levy et al., 1998) Con Capecitabina no se ha descrito hasta el momento, diferencias entre hombres o mujeres o entre diferentes etnias.(Saif and Elfiky, 2007, Narasimhan et al., 2004)

**TABLA 1:** GRADOS DE SPP SEGÚN NCI

GRADOS	DEFINICIÓN
1	Mínimos cambios de la piel o dermatitis pero interfiere con las actividades de la vida diaria
2	Cambios de la piel, con superficie celular intacta, acompañados de dolor que interfiere con las actividades de la vida diaria mínimamente
3	Dermatitis ulcerativa o cambios de la piel con intenso dolor que interfiere con las actividades de la vida diaria. Superficie celular alterada con ampollas, heridas edema o sangrados
4	N/A

Las características clínicas y factores de riesgo para el desarrollo del SPP fueron investigados por Heo y colaboradores (Heo et al., 2004) los cuales evaluaban en 179 pacientes de 4 ensayos clínicos prospectivos que habían recibido quimioterapia con Capecitabina asociada a docetaxel, vinorelbina o cisplatino, datos de toxicidad en pacientes con cáncer de estómago, vía biliar y cáncer de mama. El síndrome mano-pie fue descrito en el 64,8% (116/179) de los pacientes, de los cuales 8/179 (4,5%) presentaron grado 3. El efecto adverso se desarrolló por primera vez dentro de los 3 primeros ciclos de quimioterapia en 100/116 (86,2%) pacientes. El análisis de los factores de riesgo mostró que el uso combinado con docetaxel se relacionaba con mayor probabilidad de su desarrollo.

El tratamiento es la suspensión del quimioterápico, modificación de dosis hasta mejoría sintomática y medidas de soporte.(Gressett et al., 2006) La discontinuación del agente causal determina la regeneración de la piel en 1 a 2 semanas, en función del grado y estadio. La aplicación de emolientes tópicos, el uso de Piridoxina (Chalermchai et al., 2010) caramida (Shinohara et al., 2014) o inhibidores de ciclooxigenasa (COX), (Degen et al., 2010) parches

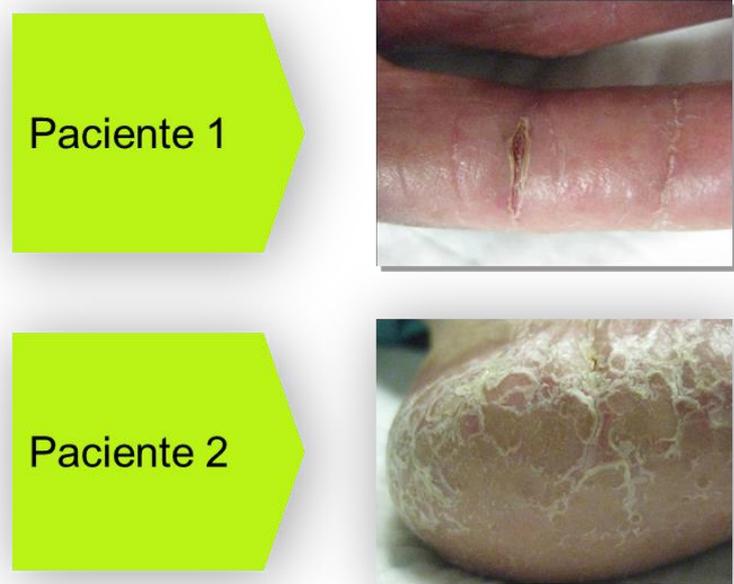
de nicotina, vitamina E (Kara et al., 2006), corticosteroides (Saif and Elfiky, 2007, Kanat et al., 2007) y el uso de guantes fríos, durante la infusión del quimioterápico, (Scotte et al., 2005) son algunas de las estrategias hasta el momento investigadas, tanto para su prevención como para su tratamiento, sin un claro beneficio. (Chalermchai et al., 2010, Degen et al., 2010) Los tratamientos de apoyo como el cuidado tópico de la herida, la elevación y compresas frías pueden ayudar a aliviar el dolor.

La fisiopatología del SPP no está establecida. Los cambios clínicos e histológicos que se observan en el SPP son compatibles con daños en la barrera fisiológica de la piel. (Degen et al., 2010).

Entre los hallazgos anatomopatológicos descritos se encuentran cambios inflamatorios inespecíficos como infiltración linfocitaria, dilatación de vasos sanguíneos y edema, marcada hiperqueratosis con paraqueratosis y queratinocitos apoptóticos. También fue descrito espongiosis leve, necrosis dispersa, queratinocitos disqueratósicos y degeneración vacuolar de la capa basal. (Scotte et al., 2005) Los cambios dérmicos en la mayoría de los casos incluyen dilatación de los vasos sanguíneos y edema papilar. (Gressett et al., 2006, Scotte et al., 2005, Scheithauer and Blum, 2004)

El compromiso selectivo de la dermis de palmas y plantas, acompañado de daño epitelial celular, sugieren un efecto tóxico directo sobre los queratinocitos de la capa basal como mecanismo fisiopatológico principal del SPP. (Gressett et al., 2006, Narasimhan et al., 2004)

**FIGURA 1:** DOS EJEMPLOS DE DOS PACIENTES CON SPP.



Aunque SPP no es peligroso para la vida, la condición afecta negativamente a la calidad de la misma y puede limitar las actividades de la vida diaria. Además, el desarrollo de SPP conduce a interrupción del programa de

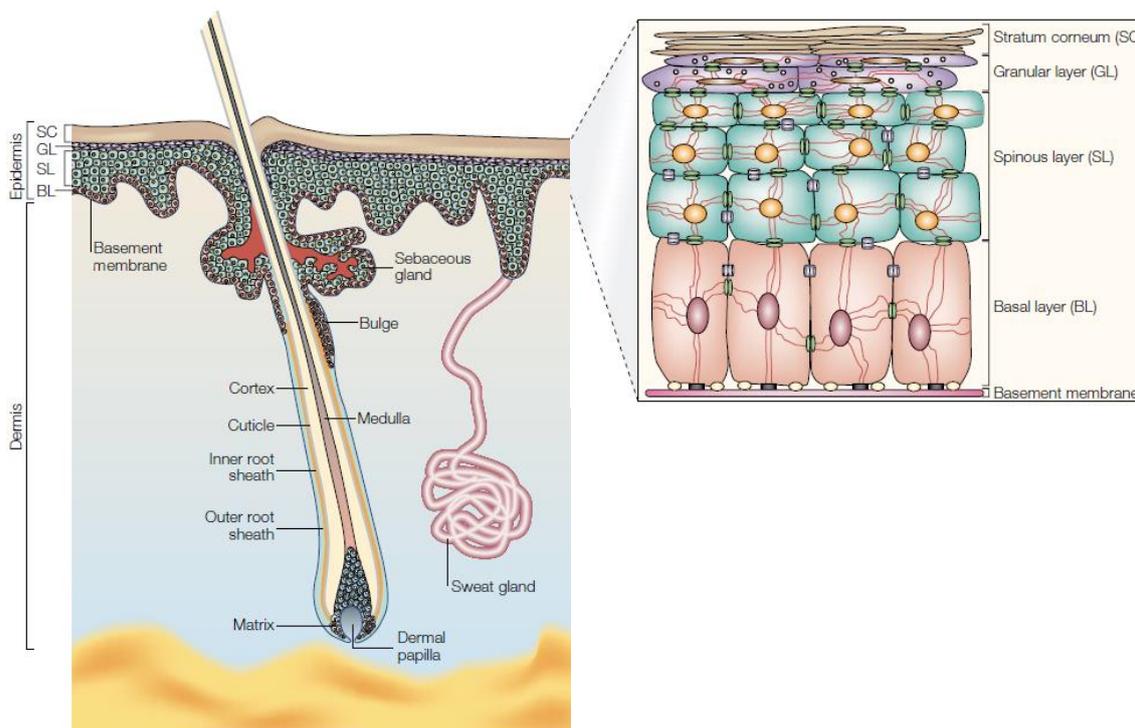
tratamiento y, a menudo conduce a la reducción de la dosis, pudiendo influir significativamente en la eficacia del tratamiento.

### 3.2 REPARACIÓN DE HERIDAS EN LA PIEL NORMAL

#### 3.2.1 FISIOLOGÍA DE LA PIEL

La epidermis es una capa delgada de epitelio escamoso estratificado que se apoya en la parte superior de una membrana basal separándola de la matriz extracelular, donde se encuentran los apéndices, entre ellos los folículos pilosos y las glándulas del sudor (Fig. 1). La epidermis es dura y resistente y es capaz de soportar traumatismos físicos y químicos diarios. Previene de infecciones y retiene los fluidos corporales evitando así la deshidratación. (Fuchs and Raghavan, 2002)

**FIGURA 2:** LA PIEL Y SUS APÉNDICES.



La piel y sus apéndices: La piel de los mamíferos está conformada por la epidermis y dermis, separados por una membrana basal. La epidermis es un epitelio escamoso estratificado compuesto por varias capas de células. Por debajo se encuentra la membrana o capa basal (BL), luego la dermis que se estratifica en diferentes capas para dar lugar a la diferenciación celular: capa espinosa (CE), la capa granular (CG) y el estrato córneo (EC). Se encuentran también folículos pilosos, que atraviesan transversalmente la dermis con una raíz externa o vaina contigua a la capa basal epidérmica. En la parte inferior del folículo se encuentra el bulbo del cabello. (Modificada de *Elaine Fuch, 2002*)

La epidermis es un tejido autorenovable y en el bulbo de los folículos pilosos residen las células madre. Estas células madre son toti-potenciales capaces de generar no solo la epidermis sino los folículos pilosos y las glándulas

sebáceas.(Fuchs and Raghavan, 2002) La tasa de proliferación y la velocidad de migración celular varían de acuerdo al tipo de injuria que sufre la piel y el grado de herida producida.

### 3.2.2 RECAMBIO CELULAR NORMAL DE LA PIEL

#### 3.2.2.1 La cornificación y sus proteínas

En la piel de los mamíferos hay dos tipos de muerte celular, la apoptosis que ocurre en la parte más inferior y la cornificación o queratinización que se evidencia en la parte más superficial. La epidermis, es un compartimiento formado por múltiples capas que determina una barrera impermeable esencial para sobrevivir. Esta barrera es continuamente regenerada por la diferenciación terminal de los queratinocitos. Este proceso llamado cornificación es altamente organizado en tiempo y espacio. Los queratinocitos se movilizan desde una célula con capacidad proliferativa en la capa basal de la epidermis, atraviesan la capa granular donde adopta una forma aplastada que determina la muerte celular en las capas más superficiales de la piel. (Candi et al., 2005) Este proceso celular comienza con la síntesis de un tipo inmaduro de material envolvente por debajo de la membrana plasmática que a continuación se somete a la unión covalente con moléculas preformadas dedicadas a producir una estructura rígida; su principal función fisiológica es proporcionar resistencia física y actuar como una barrera para evitar la deshidratación.(Fuchs and Raghavan, 2002) Por lo tanto la diferenciación epidérmica comienza con la migración de los queratinocitos desde la capa basal y termina con la formación de la capa córnea (Fig. 2). La proliferación, la diferenciación y la muerte celular ocurren secuencialmente, y cada proceso se caracteriza por la expresión de proteínas específicas. Las anomalías en estas proteínas pueden originar diferentes enfermedades. En condiciones normales, la tasa de proliferación de la capa basal de la epidermis es equilibrada por la descamación de la capa córnea en la superficie de la piel. Esta homeostasis epidérmica constantemente rejuvenece la epidermis. Las queratinas K5 y K14 son las principales proteínas estructurales producidas por los queratinocitos con actividad proliferativa de la capa basal. Estas se ensamblan en filamentos intermedios de queratina (KIFs), que se extienden desde los desmosomas hacia la lámina nuclear junto con los microtúbulos (tubulina) y los microfilamentos (actina), formando el citoesqueleto de la célula epitelial. Desencadenado por señales no suficientemente estudiadas hasta el momento, los queratinocitos migran desde la basal hacia la capa espinosa, donde pierden su actividad mitótica y comienzan a sintetizar un nuevo conjunto de proteínas estructurales y enzimas que son característicos de la cornificación. (Golstein and Kroemer, 2007, Lippens et al., 2005)

Las queratinas K1 y K10 se encuentran entre las primeras proteínas que se expresan durante la cornificación. Los filamentos de K1 y K10 reemplazan los de K5 preexistente y la red K14 de KIF. En lugares específicos se expresan cantidades significativas de otras queratinas como la K9 en palmas y plantas y K2E en sitios engrosados de la piel. En una etapa más avanzada, las células adquieren gránulos de queratohialina, que contienen una proteína interfilamentosa llamada Profilagrin - precursor del Filagrin. Filagrin se adhiere a los filamentos de queratina en una apretada red, lo que promueve el colapso de la célula hacia una forma aplanada, que es característica de los corneocitos de la capa córnea. Al mismo tiempo, son sintetizadas una serie de otras proteínas estructurales, como Involucrina, Loricrina, Tricohialina (THH) y la Clase de Pequeñas Proteínas ricas en Prolina (SPR) y posteriormente son reticuladas por varias transglutaminasas (TG) para reforzar la envoltura córnea justo debajo de la membrana plasmática. (Lippens et al., 2005, Candi et al., 2005)

Además de las proteínas de la capa córnea se sintetizan una compleja serie de lípidos, algunos de los cuales se unen de forma covalente a proteínas de la envoltura córnea como la Ceramidas, formando laminillas intercelulares que ayudan a producir una compleja barrera. Los corneocitos están firmemente unidos entre sí por corneodesmosomas -estructuras desmosómicas modificadas- que son proteolíticamente degradados en las capas superiores de la capa córnea para permitir la descamación. (Fuchs and Raghavan, 2002)

Se forman estructuras similares en muchos otros tipos de epitelio escamoso estratificado, como el cabello y las uñas o el tracto urinario. El proceso de refuerzo varía entre epitelios. La composición de aminoácidos o proteínas que se utilizan (como loricrina o SPR) confiere diferentes propiedades (como la elasticidad, resistencia mecánica e impermeabilidad) en epitelios con distintas características (por ejemplo, piel de la palma, piel dorsal, epitelio oral. (Serre et al., 1991)

### 3.2.2.2 Interacción entre células y matriz celular durante la reparación normal de heridas

Sabemos que la dermis de la piel humana adulta contiene una población fisiológicamente heterogénea de fibroblastos que interactúan entre sí y con otras moléculas para poder determinar una arquitectura única y así poder participar en funciones de reparación de procesos inflamatorios como las heridas. (Sorrell et al., 2007) El estudio de la cinética de crecimiento y cambios morfológicos de los fibroblastos en cultivos celulares de piel humana neonatal ha demostrado una gran diversidad genética y fenotípica. (Goldring et al., 1990) Esta heterogeneidad ha sido bien documentada en los fibroblastos

situados en la dermis papilar superficial y la dermis profunda reticular. También se ha descrito la capacidad de los fibroblastos para producir matriz extracelular con el fin de organizar eficazmente el desarrollo de los tejidos y para la reparación de las heridas. (Eckes et al., 2000) Una molécula de la matriz extracelular esencial en los sitios de reparación de heridas es la Fibronectina. (Ffrench-Constant et al., 1989) Por lo tanto, aquellos fibroblastos que producen Fibronectina (FN) podrán organizarse eficientemente y desempeñarán un papel esencial en la reparación de heridas. Sin embargo, se ha demostrado que existen diferentes clones de fibroblastos en tejidos no dérmicos, con distinta capacidad de producción y organización de moléculas de la matriz extracelular. En 1990 se llega a la conclusión de que diferentes líneas celulares de fibroblastos podían producir diversas cantidades de colágeno de tipo I. (Goldring et al., 1990)

La FN es secretada en forma de dímero (Schwarzbauer y Sechler 1999). Una parte de estos dímeros se unen a los receptores de FN en las superficies celulares que sirve como sitios de nucleación para la formación de fibrillas insolubles, un proceso que requiere la participación activa de las células. Se ha demostrado que la FN está relacionada con la proliferación celular (Ffrench-Constant et al., 1989, Sechler and Schwarzbauer, 1998), en general, cuanto más rápidamente proliferan las subpoblaciones de fibroblastos producen matrices más extensas y elaboradas.

Tanto los patrones de desarrollo y diferenciación, como el mantenimiento de la función de las células del parénquima, el tamaño, la forma y la invasividad de los tumores están orquestados por interacciones entre las células con la matriz extracelular. La estructura fibrilar de la FN podría codificar las señales y controlar la regulación esencial para la proliferación celular a través de cambios en la arquitectura de la matriz. Una matriz conformada principalmente por FN nativa estimularía el crecimiento celular. En contraste, una variedad mutante FN (FNDIII1-7) formaría una matriz estructuralmente distinta que inhibe la progresión G0/G1 a la fase S. Además, FNDIII1-7 suprimiría la capacidad estimuladora de la FN nativa. El principal efecto diferencial en el crecimiento celular que se evidenció (Sechler and Schwarzbauer, 1998) fue la inhibición mediante el bloqueo de la formación de fibrillas de la matriz.

Por lo tanto, la modificación de la arquitectura de la matriz proporciona un enfoque novedoso para controlar la proliferación celular. (Sechler and Schwarzbauer, 1998)

Los fibroblastos de la piel presentan actividad paracrina y autocrina determinando interacciones con otras células en la piel. (Smola et al., 1993) Estas interacciones son importantes para la reparación de la herida en donde

los fibroblastos interactúan con otras células de la piel, como células epidérmicas y las células endoteliales vasculares, para restaurar el tejido y la función de la piel.

Los fibroblastos dérmicos son una población dinámica y diversa de células cuyas funciones en la piel en muchos aspectos, siguen siendo desconocidas. La piel humana adulta normal contiene al menos tres subpoblaciones distintas de fibroblastos, que ocupan diferentes nichos en la dermis. Los fibroblastos de cada uno de estos nichos exhiben diferencias distintivas cuando se cultivan por separado. Los fibroblastos papilares, residen en la superficie de la dermis, y los fibroblastos reticulares residen en las profundidades de la dermis. Ambas subpoblaciones de fibroblastos difieren de los que están asociados a los folículos pilosos. Los fibroblastos juegan un papel importante en la bioingeniería de la piel. (Sorrell and Caplan, 2004)

La producción de fibroblastos y la liberación de factores tales como KGF-1 y GM-CSF regulan la regeneración de la epidermis de la piel en los modelos experimentales equivalentes, y en estudios *in vivo* también indican que estas moléculas son importantes para el proceso de reparación. (Maas-Szabowski et al., 2000)

Las células epidérmicas regulan la cantidad de factores producidos por los fibroblastos a través de la liberación de IL-1 $\alpha$  y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea. (Maas-Szabowski et al., 2000) Existen subpoblaciones de fibroblastos dentro de un tejido determinado pudiendo diferir entre ellas en la producción, liberación, y la respuesta a factores de crecimiento / citoquinas.

La IL-1 es una importante citoquina reguladora que se libera en los sitios de herida. Aquellos fibroblastos que participan en la reparación de heridas responden a este factor. (Werner and Grose, 2003)

La IL-6 es una citoquina inflamatoria producida por diferentes tipos de celulares de la piel, incluyendo los fibroblastos (Boxman et al., 1993). Este factor regula la diferenciación de los monocitos y desempeña un papel fundamental en la comunicación de los fibroblastos con las demás células de la epidermis; estos eventos pueden incluir la regulación de la proliferación y migración de las células epidérmicas, características importante para la reparación de heridas. (Sorrell et al., 2007)

Por otro lado, es bien sabido que los factores estimulantes de fibroblastos (FGF) favorecen la proliferación de diversos tipos celulares. La familia de FGF está formada por al menos 22 miembros y 4 de ellos relacionados con el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF). Los cuales estimulan mediante un mecanismo paracrino la proliferación de los queratinocitos y a diferencia de otros miembros de la familia FGF no actúan sobre la actividad mitogénica

de los fibroblastos o células endoteliales, (Bottaro et al., 1990) por lo tanto puede proteger a estas células de diversos insultos, tales como fármacos quimioterápicos. (Hsu et al., 2006) (Farrell et al., 2002) Es una familia de proteínas relativamente inestables y todos los miembros de la familia FGF se caracterizan por la unión ávida a la heparina (Bottaro et al., 1990) (Sorrell et al., 2007)

La sobreexpresión de factores estimulantes de queratinocitos como el KGF 1 origina un estímulo en la proliferación de la epidermis desde la capa basal que ocasiona una disminución y retraso en la diferenciación de los queratinocitos. (Sorrell and Caplan, 2004) Si se administra KGF exógeno o se induce una sobreexpresión a través de un retrovirus recombinante que codifique KGF, se inducen cambios drásticos en la organización en las tres dimensiones de la epidermis que incluyen pronunciado engrosamiento, hacinamiento y alargamiento de las células basales así como aplanamiento de las crestas epidérmicas. (Andreadis et al., 2001) La inmunotinción cuantitativa para el antígeno de proliferación Ki67, reveló que, además del aumento de la proliferación basal KGF también induce la expresión de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  y el retraso en la expresión de la queratina 10 y de la transglutaminasa. Estos resultados demuestran por primera vez que un único factor de crecimiento puede alterar la organización en las tres dimensiones estructurales de la epidermis así como de su función proliferativa *in vitro*. (Andreadis et al., 2001) Estos resultados posibilitaron además de generar nuevas estrategias para la ingeniería de tejidos, plantear diferentes hipótesis para dilucidar el mecanismo fisiopatológico de diferentes enfermedades de la piel como la psoriasis o el SPP tras la administración de Capecitabina en algunos pacientes mediante el análisis de los efectos del factor de crecimiento sobre los complejos vínculos entre la proliferación celular, el movimiento de la célula y diferenciación dentro de un tejido estratificado. (Andreadis et al., 2001)

Se ha demostrado que las queratinas 14 y 15 se expresan predominantemente en los queratinocitos de la capa basal y que la queratina 10 es expresada exclusivamente por las células de la capa suprabasal considerada como un marcador de diferenciación terminal. (Cheng and Cho, 2012)

Un rasgo característico de los FGF es la interacción con heparina o proteoglicanos como Heparán Sulfato en la superficie celular, los cuales estabilizan a los FGF frente a la desnaturalización térmica y la proteólisis. (Andreadis et al., 2001)

### 3.3 HEPARAN SULFATO Y HEPARINA

El Heparán Sulfato (HS) en la superficie de las células adherentes, modula las acciones de un gran número de ligandos extracelulares. Los miembros de la familia del HS como los Syndecans transmembrana y los Glypicans, se unen a diferentes ligandos para favorecer la formación de complejos con receptores de señalización. Estos proteoglicanos de HS también inmovilizan y regulan el volumen de recambio de ligandos que actúan en la superficie celular. Los dominios extracelulares de estos proteoglicanos pueden desprenderse de la superficie de la célula, lo que genera proteoglicanos de HS solubles que pueden inhibir las interacciones en un variado repertorio de superficies celulares. (Bottaro et al., 1990)

Los componentes de la matriz extracelular involucrados directamente con la proliferación, la diferenciación, la migración y cambios en la forma celular, ejercen sus efectos sobre las células mediante la unión a receptores de la superficie celular altamente específicos, que, cuando se ocupan, se internalizan para transducir señales intracelulares. Estos receptores transmiten señales en la célula y a menudo utilizan el Heparán Sulfato de la superficie celular para reconocer sus ligandos o para regular su activación. (Bottaro et al., 1990)

El HS es un polisacárido lineal fuertemente aniónico que se distingue de la heparina de producto farmacéutico por su menor grado de sulfatación. (Jorpes and Gardell, 1948) Al igual que la heparina, las cadenas de HS son estructuralmente heterogéneas y ávidas para enlazar un repertorio diverso de proteínas bajo condiciones fisiológicas.

En la superficie celular el HS proporciona a las células un mecanismo para atrapar una amplia variedad de efectores extracelulares sin requerir múltiples proteínas de unión. El HS se sintetiza en gran variedad de superficies celulares, pero se distinguen mayoritariamente dos familias principales de proteoglicanos unidos a la membrana, los Syndecans y los Glypicans. Un gran número de estos se encuentran implicadas en la morfogénesis y en la reparación de heridas, en la defensa del huésped y en el metabolismo energético. Los HS de membrana HSPG de la superficie celular pueden mejorar la formación de complejos de señalización del receptor-ligando, así como dirigir ligandos en la propia célula hacia la degradación o el reciclaje, y pueden también ser liberados desde la superficie de la célula como PGs solubles. Este desprendimiento es parte de la renovación de los HSPG y puede acelerarse también mediante efectores, lo que origina la generación de HSPG solubles que pueden unirse a ligandos y de este modo comportarse como potentes inhibidores. (Bernfield et al., 1999) El HS se une a la superficie celular así como a las proteínas de la matriz, citocinas y quimiocinas, estas

interacciones modulan la maduración de las células inflamatorias y la activación, la difusión y la adherencia de los leucocitos al endotelio, así como la extravasación y la quimiotaxis. (Gotte, 2003)

La inflamación es una reacción altamente compleja en el tejido conectivo vascularizado ya sea por estímulos exógenos o endógenos que potencialmente pueden causar daño celular. Las interacciones entre leucocitos y células endoteliales juegan un papel clave en la inflamación aguda y en última instancia conducen a la acumulación de líquido y leucocitos en el tejido extravascular, para tratar de neutralizar al agente perjudicial e intentar reparar del tejido lesionado. (Gotte, 2003)

La heparina es un glucosaminoglicano aniónico con efectos anticoagulantes, capaz de inhibir también la proliferación de diversos tipos celulares *in vitro*. El tratamiento *in vivo* inhibe la proliferación de células de músculo liso vascular, de fibroblastos, melanocitos, queratinocitos y estimula la síntesis de colágeno. La heparina mimetiza los efectos fisiológicos del HS pero sus acciones son dosis dependientes y actúa tanto en las membranas plasmáticas de las células de la dermis como en células de la epidermis. (Hurwitz et al., 2015, Martin et al., 2015) (Ferrao and Mason, 1993, Parisel et al., 2003) La inhibición de la proliferación de los cultivos de queratinocitos se debe a distintos mecanismos, especialmente uno autocrino. Según este mecanismo, la heparina forma un complejo con el factor de crecimiento de queratinocitos uniéndose a este con alta afinidad, lo que impide su acción. Todo ello sugiere que la heparina podría ser un tratamiento selectivo dirigido a la inhibición de la hiperqueratosis, común a distintas entidades como la psoriasis. (Vanscott and Ekel, 1963) Ello se basa en el hecho de que la heparina, administrada en forma tópica, alcanza más del 50% de su concentración en la dermis, siendo capaz de inhibir la proliferación de fibroblastos y la síntesis de ADN en los queratinocitos. (Pillai et al., 1994, Parisel et al., 2003, Oremus et al., 2007)

La reparación de las heridas requiere la síntesis *de novo* de colágeno y de sustancias como glucosaminoglicanos, (Saliba, 2001) por lo que el colágeno es un buen marcador para vigilar el proceso de cicatrización de las heridas. (Saliba, 2001)

#### 3.3.1.1 Absorción transdérmica de Heparina

La piel puede ser utilizada para la administración de fármacos en dos formas, transdérmica y por vía dérmica. La vía transdérmica implica la administración percutánea del fármaco a través de la piel hacia la circulación sistémica. En la administración dérmica, la propia piel es el órgano diana. El objetivo del suministro de fármacos a través de la piel para un tratamiento en dermatología no es trivial. Un ideal de perfil de administración para un agente

activo terapéutico aplicado tópicamente para el tratamiento de condiciones tales como eczema, psoriasis o cáncer de piel debe implicar la difusión desde la superficie de la piel a través del estrato córneo, la acumulación en el sitio de acción y el metabolismo posterior para inactivar el producto con poca o ninguna absorción sistémica de la droga. (Brown et al., 2001, Betz et al., 2001, Venakatachalapathy et al., 2007, Parisel et al., 2003, Ferrao and Mason, 1993)

### 3.4 CAPECITABINA

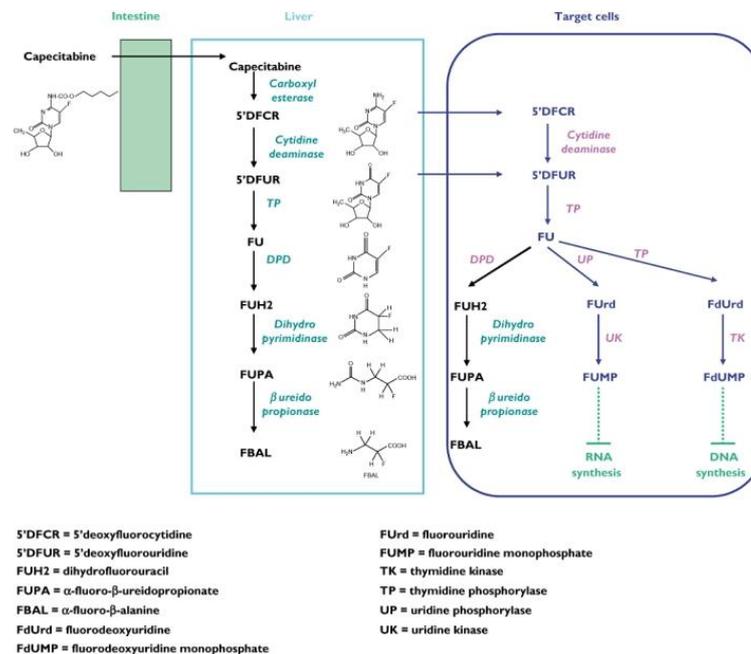
#### 3.4.1 METABOLISMO DE LA CAPECITABINA

La Capecitabina es un profármaco administrado por vía oral de 5-fluorouracilo (5-FU), que es un agente quimioterapéutico incorporado en el tratamiento de varios tumores malignos, como cáncer colorrectal, cáncer gástrico, pancreático, tumores de cabeza y cuello y en cáncer de mama. (Farr and Safwat, 2011, Malet-Martino and Martino, 2002, Walko and Lindley, 2005, Yin et al., 2015)

La Capecitabina es bien tolerada en general y tiene un perfil de tolerabilidad bueno en comparación con los bolos de administración de 5FU / LV (5-FU administrado junto a leucovorina). Sus efectos adversos más comunes que limitan la dosis son la diarrea, la hiperbilirrubinemia y el síndrome palmo plantar (SPP). Otros efectos adversos frecuentes incluyen fatiga, debilidad, dolor así como efectos gastrointestinales, náuseas, vómitos y estomatitis o mucositis. En comparación con los bolos de 5FU / LV, la Capecitabina se asocia con más SPP, pero menos con estomatitis, alopecia, diarrea, náuseas y neutropenia. (Gressett et al., 2006) Es importante remarcar que el SPP es un efecto secundario que se produce con la infusión continua de 5-FU, pero que es casi ausente con la infusión en bolo de 5FU. (Yen-Revollo et al., 2008) El fármaco, se absorbe a través del tracto gastrointestinal como una molécula intacta, posteriormente es activada a través de un proceso enzimático en tres etapas: en el hígado, la capecitabina es hidroxilada por la Carboxilesterasa para convertirse en 5'-desoxifluorocitidina (5'-DFCR). En un segundo paso, 5'DFCR es convertido en 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) por la Citidina desaminasa. En el tercer paso, 5'-DFUR es finalmente convertida a 5-FU por la Timidina fosforilasa (TP). (Walko and Lindley, 2005, Milano et al., 2008) Esta cascada da como resultado la formación de 5-FU. Se han detectado niveles más altos de TP en las células tumorales que en los tejidos sanos. (Miwa et al., 1998) Además, 5-FU es metabolizado por la TP a 5-fluorodesoxiuridina que inhibe a la Timidilato sintasa (TS), enzima que participa en la formación de desoxitimidina 5'trifosfato (dTTP), metabolito necesario para la correcta

síntesis y reparación del ADN. Finalmente el 5-FU es catabolizado a dihidrofluorouracilo (FUH2) por la Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD).

**FIGURA 3:** VÍAS METABÓLICAS DE LA CAPECITABINA (MILANO ET AL., 2008).



La DPD se expresa predominantemente en el hígado y desactiva más de 80% del 5-FU administrado. Hasta un 20% de 5-FU se excreta en la orina. La actividad de DPD reducida da como resultado una mayor vida media de 5-FU y una toxicidad mayor. La actividad de DPD está influida por varios factores, entre ellos, el ritmo circadiano, posiblemente el sexo, las interacciones entre medicamentos, etc. Hasta el momento, se han hecho diferentes estudios relacionando la expresión proteica de estas enzimas en tejidos tumorales, así como los polimorfismos en los genes que las codifican (*DYPD*, *TYMP* y *TYMS*), con el SPP. (Milano et al., 2008) (Mercier and Ciccolini, 2006)

### 3.4.2 VARIACIONES DE LOS GENES DYPD Y TYMP Y SU RELACIÓN CON EL SPP

La enzima TP está codificada por el gen *TYMS* que está formado por 10 exones situados en la región cromosómica 22q.13.33. Esta enzima citosólica cataliza la fosforilación de timidina o desoxiuridina en timina o uracilo, y es esencial para la síntesis de nucleótidos. Además es la principal enzima activadora en el catabolismo de la Capecitabina. El producto proteico de este gen (TP), fue inicialmente identificado como el factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PDEC GF), un factor angiogénico distinto de los previamente descritos como mitógenos de células endoteliales y pertenecientes a la familia de factores de crecimiento de fibroblastos. (Ishikawa et al., 1989)

El gen *DPYD* codifica la proteína DPD, principal enzima del catabolismo de las pirimidinas y la enzima limitante de la velocidad del catabolismo del 5-FU. En humanos, *DPYD* está localizado en la región 22 del cromosoma 1 y está formado por 25 exones. Las mutaciones en este gen tienen como resultado una deficiencia en la actividad de DPD y consecuentemente, un riesgo incrementado de toxicidad para aquellos pacientes que están recibiendo tratamiento con Capecitabina.

La expresión de TP y DPD ha sido estudiada en diversas muestras tumorales, obteniéndose resultados contradictorios con respecto a su valor pronóstico y predictivo y a su relación con el desencadenamiento de efectos secundarios al tratamiento con 5-FU. (Milano et al., 2008, Papanastasopoulos and Stebbing, 2014, Del Re et al., 2015) También se han identificado diversas mutaciones y polimorfismos genéticos que afectan a la función celular de éstas enzimas. (Guillem et al., 2013, Del Re et al., 2015) En pacientes tratados con 5-FU o Capecitabina con deficiencia de DPD, la toxicidad puede ser potencialmente letal, con una prolongada pancitopenia, a menudo asociado con sepsis, o toxicidad gastrointestinal como diarrea grave refractaria, vómitos y mucositis. (Papanastasopoulos and Stebbing, 2014)

Aproximadamente el 3-5% de la población general puede tener actividad de DPD parcial, aunque hay una gran variabilidad. La deficiencia en la actividad de DYPD representa al menos el 50% de la toxicidad grave relacionada con el tratamiento con 5-FU. La gran variación en las frecuencias descritas de polimorfismos del gen *DYPD* asociado con toxicidad grave de 5-FU en los estudios nombrados anteriormente, puede ser atribuida a varios factores. (Amstutz et al., 2011)

- i) la gran variabilidad en la frecuencia de potencialmente nocivos polimorfismos entre diferentes poblaciones;
- ii) el uso de regímenes combinados con otras quimioterapias, que ocasionen un efecto contributivo.

Por todo lo anteriormente descrito, la estratificación de los pacientes que van a recibir tratamiento con Capecitabina, en función de sus características genotípicas y transcriptómicas puede servir de gran ayuda para prevenir toxicidades no deseadas como el SPP.

### **3.5 TEORÍAS DEL MECANISMO FISIOPATOLÓGICO DEL SPP**

Entre los hallazgos anatomopatológicos descritos se encuentran cambios inflamatorios inespecíficos como infiltración linfocitaria, dilatación de vasos sanguíneos y edema, marcada hiperqueratosis con paraqueratosis y queratinocitos apoptóticos. (Childress and Lokich, 2003) El compromiso selectivo de la dermis de palmas y plantas, acompañado de daño epitelial

celular, sugiere un efecto tóxico directo sobre los queratinocitos de la capa basal como mecanismo fisiopatológico del SPP. (Nagore et al., 2000)



La fisiopatología molecular del SPP no está claramente dilucidada, aunque se han propuesto varias teorías sobre el mecanismo de toxicidad. El SPP ha sido atribuido a la presencia de metabolitos de 5-FU, como el dihidrofluoracilo (5-FUH2) y  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina (FBAL) sin un argumento farmacológico claro. (Fischel et al., 2004) Estudios previos demostraron la baja toxicidad de 5-FUH2 o FBAL en queratinocitos humanos, debido a que la actividad de la TP era particularmente elevada en estos y la actividad de DPD muy baja. En un ensayo posterior (Ferrero et al., 2006), en el que se correlaciona el SPP con los niveles de TP y DPD, los autores tomaron biopsias de 12 voluntarios sanos, utilizando el área de la palma de la mano como zona de estudio y de la espalda como zona control. Como resultado, muestran que la expresión de TP y Ki67 es marcadamente mayor en la capa basal de ambas zonas y que la expresión de DPD es mucho más intensa en la zona de la palma que en la zona control de la espalda, lo que sugiere que la Capecitabina podría ser activada localmente por la alta expresión de TP y que el bajo nivel de DPD en palmas podría explicar la preferencia del SPP por las palmas. (Milano et al., 2008)

Los niveles de expresión elevados en queratinocitos de la timidina fosforilasa y de la uridina fosforilasa, las enzimas responsables de la conversión de la Capecitabina en 5-FU activo, podría determinar la inflamación local secundaria a la acumulación del fármaco en células de la piel. La Capecitabina puede ser absorbida y secretada por las glándulas sudoríparas ecrinas, que están distribuidas en las palmas y plantas. En biopsias de piel de pacientes que experimentan SPP debido a la doxorubicina liposomal o Capecitabina se ha evidenciado hiperqueratosis, paraqueratosis, hipergranulosis, leve infiltración linfocítica perivascular, y degeneración vacuolar leve en la capa basal de la epidermis. (Milano et al., 2008)

Otra evidencia convincente proviene de los informes de los pacientes tratados con deficiencia de DPD. A pesar de que estos pacientes tienen un mayor riesgo de toxicidad grave a 5-FU y sus derivados, el SPP rara vez se presenta como un efecto secundario adverso. (Milano et al., 2008)

### 3.5.1 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS PROPUESTOS

La **primera teoría** relaciona al SPP secundario a Capecitabina con un incremento de los niveles de la enzima Timidina Fosforilasa (TP) en células especializadas de la piel (queratinocitos) que determina la acumulación de metabolitos activos de Capecitabina en la epidermis, lo que conlleva a un aumento de la probabilidad de desarrollar SPP. (Chalermchai et al., 2010)

Una **segunda teoría** postula que la Capecitabina puede ser eliminada por el sistema ecrico (secreción de sudor), lo que explicaría el SPP principalmente en palmas y plantas en relación con el mayor número de glándulas ecrinas en estas localizaciones. (Milano et al., 2008)

Y la **tercera teoría**, sugiere que el SPP podría desarrollarse debido al aumento de la vascularización y al incremento de la presión y la temperatura en las manos y los pies. (Kara et al., 2006)

Proponemos una **Cuarta Teoría** en la que se vincularía al SPP con una reacción de tipo inmune ya que existen algunas similitudes clínicas e histológicas entre SPP con la enfermedad aguda de injerto contra huésped (aGVHD). Se ha sugerido que los fármacos quimioterápicos determinan cambios en los receptores de la superficie celular pudiendo ser capaces de inducir reacción del huésped. El efecto tóxico directo del fármaco quimioterápico contra las células epidérmicas podría explicar los hallazgos histopatológicos descritos. (Childress and Lokich, 2003, Milano et al., 2008)

Sin embargo, no hay una explicación clara para su distribución particular típicamente localizado en palmas y plantas.

Las características específicas de las manos y los pies podrían desempeñar un papel en el desarrollo del efecto adverso. El estrato córneo grueso, el gradiente de temperatura, la anatomía vascular, la alta capacidad proliferativa de la epidermis, la ausencia de glándulas sebáceas o pelos con sus folículos y la alta concentración de glándulas ecrinas o de papilas dérmicas, pueden contribuir a la patogénesis.

No hay una relación directa entre el fármaco, la dosis y la gravedad en todos los pacientes, por lo que deben participar otros factores, como por ejemplo el tratamiento concomitante con otros quimioterápicos, corticosteroides, transfusiones de hemoderivados y el estado metabólico propio del paciente.

### 3.6 EL SISTEMA INMUNE DE LA PIEL

La piel, como la interfaz principal entre el cuerpo y el medio ambiente, proporciona una primera línea de defensa contra patógenos microbianos y daños físicos o químicos. La inmunovigilancia de un órgano tan grande y expuesto presenta desafíos únicos para los centinelas inmunes y las células efectoras.(Pichler et al., 2002) Si la respuesta inmune es inadecuada pueden sobrevenir infecciones o tumores, pero si por el contrario, la respuesta inmunitaria es excesiva se puede desencadenar inflamación crónica o el desarrollo de autoinmunidad. El control de la respuesta inmune es por lo tanto un reto importante para mantener la integridad de la piel, para lo que se activan mecanismos de defensa así como vías tolerogénicas para poder lograr la homeostasis inmune. (Zaba et al., 2009) El concepto inicial de SALT (skin-associated lymphoid tissues –SALT o tejido linfático asociado a a piel)(Streilein, 1983) introdujo la idea de células inmunes que migran en un circuito continuo de manera dirigida entre la piel, los ganglios linfáticos y la circulación, proporcionando de ese modo una inmunovigilancia óptima. (Nestle et al., 2009)

Si bien las células de Langerhans epidérmicas cumplen un papel fundamental en la inmunidad cutánea, otros tipos de células dendríticas (DCs) y células de la inmunidad innata también están presentes en la dermis con un papel relevante, dando lugar a la aparición del concepto de un Sistema Inmunológico Dérmico.(Nestle et al., 2009)

La piel humana tiene dos compartimentos principales, la epidermis y la dermis. La epidermis es el compartimento exterior y contiene cuatro estratos. El estrato basal es la capa inferior de la epidermis y es responsable de renovar constantemente las células de la epidermis. Esta capa contiene sólo una fila de células epidérmicas indiferenciadas, conocidos como queratinocitos basales. Los queratinocitos basales se diferencian y se trasladan a la capa siguiente, el estrato espinoso para comenzar un proceso de maduración, así como iniciar la división para reponer la capa basal. Las células que se mueven hacia el estrato espinoso cambian de forma, de columnar hacia una forma poligonal para empezar a sintetizar queratinas diferentes a las queratinas de la capa basal. Los queratinocitos en el estrato granuloso se caracterizan por tener mucho material citoplasmático y producir activamente diferentes queratinas, proteínas y lípidos. El estrato córneo, es el último producto de los queratinocitos en su proceso de maduración, es la capa más externa de los cuatro estratos de la epidermis y es en gran parte responsable de la función de barrera de la piel. Las células en esta capa, conocidas como corneocitos, son células muertas derivadas de queratinocitos que proporcionan una barrera que excluye a muchos agentes tóxicos e impide la

deshidratación.(Proksch et al., 2008) Dentro de las células especializadas de la epidermis se incluyen los melanocitos, que producen el pigmento melanina y las células de Langerhans, principales células inmunológicas residentes de la piel. Los linfocitos T, principalmente células T CD8 +, se pueden encontrar en el estrato basal y espinoso. La epidermis tiene una estructura histológica sencilla, pero la dermis subyacente es anatómicamente más compleja, con mayor diversidad celular. Contiene muchas células inmunes especializadas como células dendríticas (DCs), Linfocitos T helper CD4 + y las células T natural killer (NKT), además de macrófagos, mastocitos y fibroblastos.(Nestle et al., 2009)

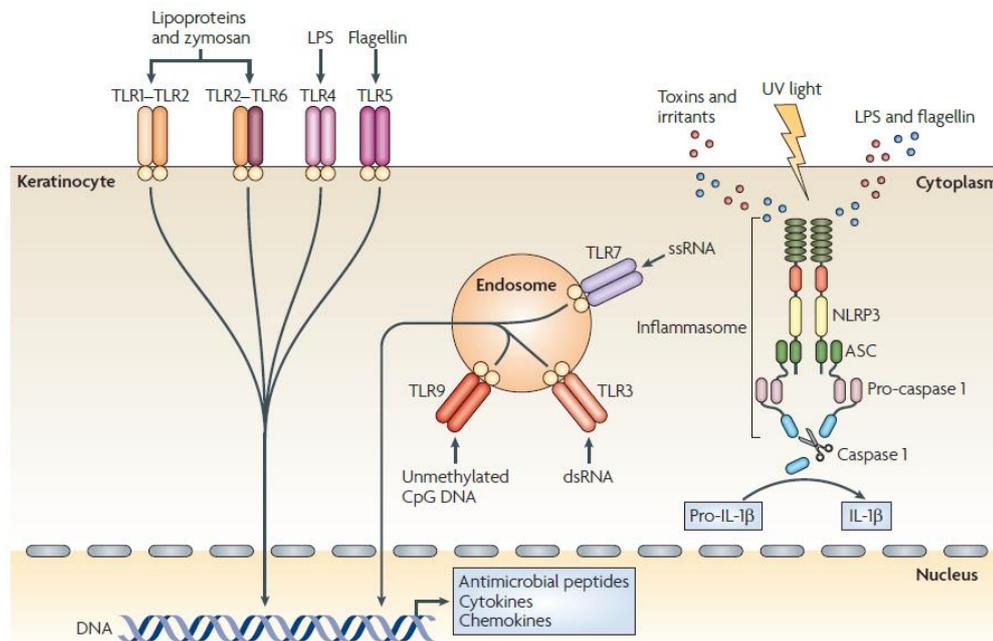
La dermis drena por vasos linfáticos y conductos vasculares, a través de los cuales migran las células.

### 3.6.1 LOS QUERATINOCITOS CUMPLEN FUNCIONES DE CENTINELAS INMUNES

Los queratinocitos pueden identificar patógenos y mediar una respuesta inmune para discriminar entre organismos comensales inofensivos y patógenos perjudiciales. Las células eucariotas detectan productos microbianos a través de receptores PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) que reconocen diversos componentes microbianos, como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, flagelina y ácidos nucleicos (Janeway, 1989). Los receptores tipo Toll (TLRs) son los mejores estudiados y la unión de TLRs por PAMPs conduce a la activación de las vías de señalización de la célula huésped y posterior respuesta inmune innata y adaptativa.(Lebre et al., 2007) Los queratinocitos epidérmicos expresan varios TLRs, situados en la superficie celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6) o en endosomas (TLR3 y TLR9). (Miller and Modlin, 2007)

La expresión de TLRs por los queratinocitos podría ser crucial para la activación de respuestas inmunes en la piel, con respuestas predominantes de tipo TH1 y la producción de interferón tipo I (IFN).(Miller and Modlin, 2007)

Una clase recientemente descubierta de proteínas NLR (nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing) son capaces de reconocer PAMP y DAMP (danger-associated molecular patterns) tales como irritantes y toxinas endógenas asociadas con peligro.(Martinon et al., 2009) La activación de estos receptores tiene como consecuencia la activación de vías de señalización pro-inflamatorias a través del inflamasoma - un gran complejo multiproteico formado por una NLR, el ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) y una pro-Caspasa 1(Martinon et al., 2009)

**FIGURA 4:** QUERATINOCITOS COMO SENSORES DE PELIGRO (NESTLE ET AL., 2009).

Los queratinocitos son centinelas de la piel y pueden reconocer agentes extraños o peligrosos como por ejemplo patógenos con PAMPs de origen microbiano o con DAMPs (Danger associated molecular pattern) como toxinas o sustancias irritantes relacionadas con peligro a través de los receptores tipo Toll (TLRs). Los TLRs son receptores transmembrana que están presentes en la superficie celular o en compartimentos del endosoma. El lipopolisacárido (LPS) estimula al TLR4; las lipoproteínas bacterianas y fúngicas estimulan a los TLR1-TLR2 y los heterodímeros TLR2-TLR6; La Flagelina bacteriana activa TLR5. El reconocimiento de los PAMP por los TLRs conduce a la activación de las vías de señalización de la célula huésped y a una respuesta inmune innata y adaptativa posteriores con la producción de quimiocinas, de citoquinas y péptidos antimicrobianos. Los queratinocitos también expresan la familia NLRP3, que pertenece a la clase recientemente identificada de proteínas codificadas por una familia de genes (nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing NLR). Estas proteínas pueden reconocer PAMP que se encuentran en el citoplasma (como LPS y Flagelina). Los DAMP y los rayos ultravioleta (UV), pueden activar el complejo inflamosoma. Este complejo multimérico es formado por un NLR, una proteína adaptadora denominada ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) y pro-caspasa 1.

El ensamblaje del inflamosoma conduce a la activación de Caspasa 1, que escinde a la pro-Interleuquina-1β (pro-IL-1β) y pro-IL-18 para generar citoquinas inflamatorias activas. Además, sensibilizadores de contacto, como los haptenos, aplicados a la piel son capaces de activar al inflamosoma interdependiente de IL-1β y IL-18 determinando por lo tanto una reacción alérgica o dermatitis de contacto.(Watanabe et al., 2007) Por lo tanto, después de la exposición de la piel a haptenos o a una alta dosis de irradiación UV, los sensores intracelulares contenidos en el complejo inflamosoma en los queratinocitos son activados, conduciendo a la activación de la caspasa 1, citoquina clave proinflamatoria. Esto a su vez da lugar a la activación de células inmunes residentes en el tejido que inducen y perpetúan la respuesta inflamatoria.(Nestle et al., 2009)

### 3.6.2 LOS QUERATINOCITOS PRODUCEN MEDIADORES DE LA INMUNIDAD INNATA

La producción de péptidos antimicrobianos (AMP) es un mecanismo de defensa evolutivamente conservado de las células eucariotas contra los patógenos. Se producen en las superficies del epitelio dañado, donde impiden la invasión microbiana del huésped mediante la muerte directa del patógeno, mediante el reclutamiento de células inmunes del huésped y la modulación de la producción de citoquinas. (Gilliet and Lande, 2008) En la piel, los queratinocitos son una importante fuente de AMPs catiónicos, es decir,  $\beta$ -defensinas y catelicidinas.

Durante las infecciones de la piel, la producción local de AMPs por los queratinocitos puede ser estimulada por citoquinas derivadas de las células T como las IL-17A o la IL-22, que son producidos por células TH17. Los AMPs se expresan también en altas concentraciones en la piel de pacientes con psoriasis y se cree que son responsables o pueden contribuir a la ruptura de la auto-tolerancia en pacientes con psoriasis asociada a la producción de la LL37 péptido antimicrobiano de catelicidina. (Lande et al., 2007) Además de AMPs, los queratinocitos constitutivamente pueden secretar numerosas citoquinas, como IL-1, IL-6, IL-10, IL-18 y el factor de necrosis tumoral (TNF). (Albanesi et al., 2005) La IL-1 es una citoquina pleiotrópica con una amplia gama de efectos biológicos, entre los que se incluyen la activación de las células DC y los TH así como la maduración de las células B y su expansión clonal. En la piel sana, los queratinocitos constitutivamente sintetizan pro-IL-1 $\alpha$  y pro-IL-1 $\beta$ . Tras la exposición a estímulos tales como la irradiación ultravioleta, los queratinocitos inician el proceso de liberación de IL-1 $\beta$  a través la activación del inflamasoma.

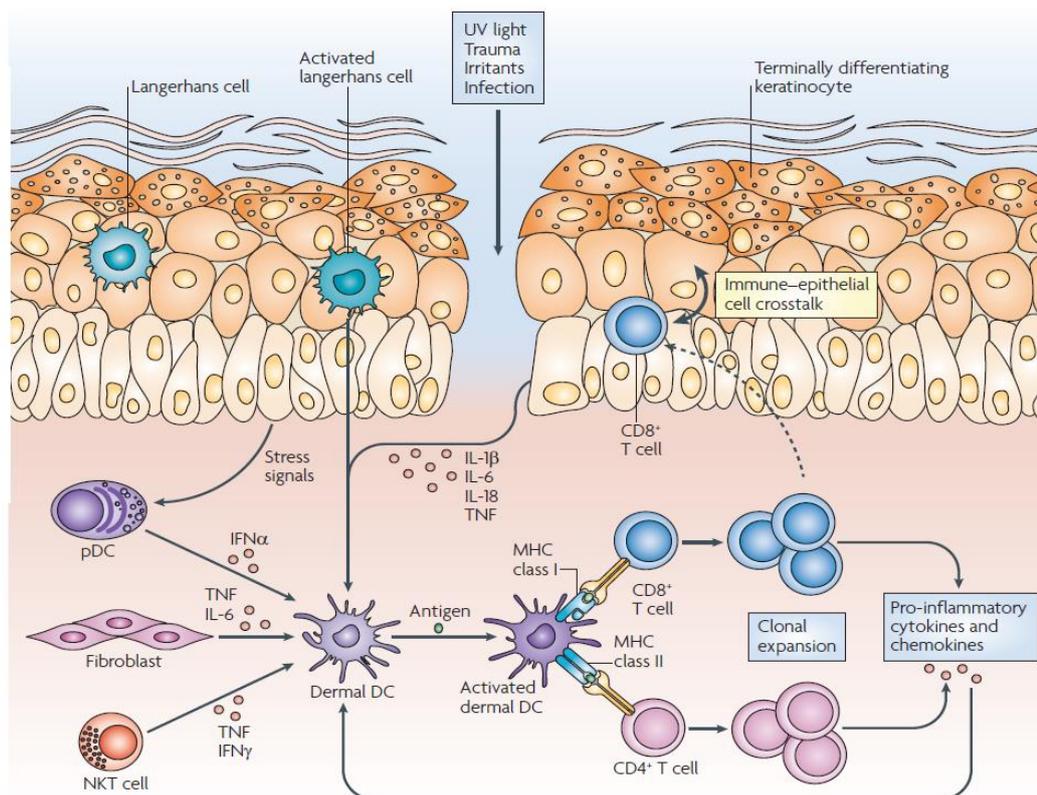
Los queratinocitos activados también pueden reclutar neutrófilos a la epidermis inflamada de pacientes con psoriasis mediante la producción de CXCL1 y CXCL8 (también conocido como IL-8). (Albanesi et al., 2005) Los queratinocitos son células efectoras proinflamatorias posicionadas estratégicamente en la más externa capa del cuerpo para que reaccionen de manera oportuna a las agresiones con la producción coordinada de AMPs, citocinas y quimiocinas proinflamatorias. (Martinon et al., 2009)

### 3.6.3 LOS QUERATINOCITOS NO SON CÉLULAS PROFESIONALES PRESENTADORAS DE ANTÍGENO

Los queratinocitos expresan moléculas de Histocompatibilidad de clase II (MHC-II) como se comprobó en estudios de enfermedad de injerto contra huésped. (Nickoloff and Turka, 1994) Datos posteriores sugieren que los queratinocitos se asocian a otros trastornos de la piel caracterizados por

infiltrados de células T. Estos estudios avalan la existencia de una actividad de células presentadoras de antígenos no profesionales (APC) en la piel. (Nickoloff and Turka, 1994)

**FIGURA 5:** CENTINELAS INMUNES RESIDENTES EN LA PIEL NORMAL (NESTLE ET AL., 2009).



Los rayos Ultravioletas (UV), los traumas, los agentes irritantes o las infecciones (esencialmente cualquier tipo de alteración de la barrera) desencadena una respuesta inmunitaria coordinada para mantener la homeostasis de la piel. Las células del sistema inmunológico son centinelas clave para la restauración de la homeostasis, pero también pueden ser células efectoras durante la patología tisular. Las células de Langerhans son centinelas inmunológicas clave. Los queratinocitos pueden reaccionar a los estímulos nocivos mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias (tales como la interleuquina-1β (IL-1β), IL-6, IL-18 y factor de necrosis tumoral (TNF), que a su vez podría activar a las células dendríticas de la piel (DCs) en presencia o ausencia del antígeno. Las células de la respuesta inmune innata, como las células dendríticas plasmocitoides (pDC), son activadas por señales de estrés derivados de queratinocitos, lo que contribuye también a la activación dérmica de DC mediante la liberación de interferón α (IFN). Los fibroblastos pueden producir TNF e IL-6 y las células T asesinas naturales (NKT) puede producir TNF e IFN lo que determina una mayor respuesta inflamatoria local. La activación de las DC dérmicas puede activar y expandir de forma clonal a las células T CD4 + o CD8 + de memoria de la piel asociada a la producción de citoquinas proinflamatorias derivadas de células T y quimiocinas. Estas, a su vez, pueden estimular más células epiteliales y mesenquimales, como los queratinocitos y fibroblastos, amplificando así la reacción inflamatoria. Por otra parte, las células T residentes de la piel pueden migrar a la epidermis.

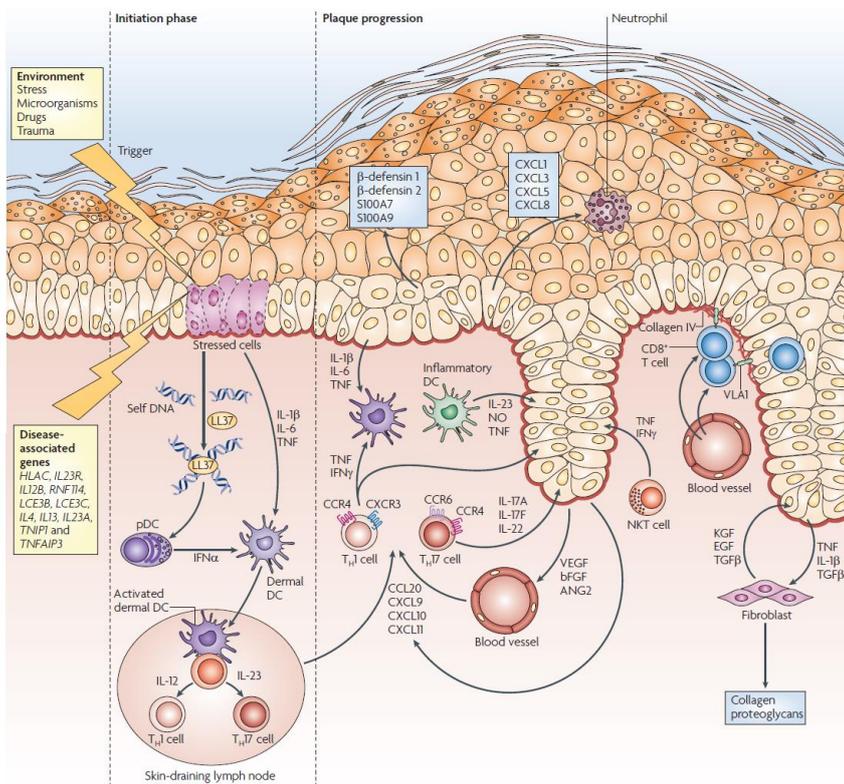
Los queratinocitos pueden proporcionar las señales necesarias para la proliferación de células T, induciendo respuestas específicas de epítopo tras procesar un péptido exógeno y presentarlo a los linfocitos T CD4+ y T CD8+, lo que origina la producción de citoquinas TH1 y TH2. (Nickoloff et al., 1993, Black et al., 2007) Todo esto indica que los queratinocitos presentan características de

APC con potencial tanto de tolerización como de activación antígeno específica.

3.6.4 RESPUESTAS INMUNES DESREGULADAS DE LA PIEL

Numerosos trastornos de la piel, tales como la psoriasis, la dermatitis atópica y la dermatitis de contacto están asociados con una desregulación de la respuesta inmune en la piel. (Nestle et al., 2009) Entre los llamados centinelas inmunes de la piel están incluidas las DCs, las células T específicas de antígeno con función efectora, los queratinocitos con función proinflamatoria y el sistema inmune innato. Si consideramos la psoriasis como un modelo de la patología inflamatoria de la piel y nos centramos en su inmunopatogénesis, la psoriasis es una enfermedad crónica inflamatoria de la piel, caracterizada por lesiones bien delimitadas, escamosas y placas eritematosas. Las células efectoras del sistema inmune innato, tales como queratinocitos, pDC, células NKT y los mediadores de la inflamación, tales como LL37 y los IFN tipo I, han demostrado tener un papel en la patogénesis de la psoriasis. (Lande et al., 2007) La visión actual de la patogénesis de la psoriasis propone que una combinación de factores genéticos y ambientales confiere una susceptibilidad mayor a la enfermedad y que un desequilibrio en la respuesta inmune conduce a una serie de cambios en la piel. (Lowes et al., 2007) La presencia de citoquinas como IFN, TNF, IL-17A e IL-22 en la dermis afecta a los queratinocitos. Estos aumentan la producción de mediadores proinflamatorios y su proliferación, cronificando la respuesta inflamatoria de la enfermedad.

**FIGURA 6:** INMUNOPATOGÉNESIS DE LA PSORIASIS MODIFICADO DE (NESTLE ET AL., 2009).



### 3.7 REACCIONES CUTÁNEAS A FÁRMACOS

Las reacciones cutáneas son algunas de las reacciones adversas observadas con mayor frecuencia a fármacos. (Hunziker et al., 1997) Aunque el mecanismo fisiopatológico de la mayoría de las reacciones adversas cutáneas secundarias a fármacos sigue siendo en gran parte desconocido, algunos autores postulan que podría ser de origen inmunológico.(Hunziker et al., 1997) En los últimos años, cada vez más trabajos indican un papel activo importante de las células T en diversas enfermedades inducidas por fármacos. Un análisis detallado de los pacientes con diversas alergias a medicamentos reveló la existencia de células T específicas frente a fármacos en la circulación general así como un infiltrado local en la piel con presencia de bullas, pústulas o erupciones maculopapulares secundarias a drogas.(Pichler et al., 2002)

#### 3.7.1 MECANISMO POR EL CUAL LAS CÉLULAS T RECONOCEN A LOS FÁRMACOS

El modelo hapteno para el reconocimiento de fármacos por el sistema inmune, que implica que una molécula pequeña requiere la unión covalente a una molécula más grande (proteína o péptido) para ser capaz de ser reconocidos por el sistema inmunológico, era el modelo más aceptado.(Pichler et al., 2002) Estas estructuras modificadas son reconocidas por inmunoglobulinas o, tras ser procesadas a pequeños péptidos, por las células T. También existe la posibilidad de que el hapteno modifique al péptido inmunogénico dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); en este caso no se requiere el procesamiento de la molécula (figura 5). La hipótesis supone que el hapteno (= Fármaco) tiene que ser químicamente reactivo para ser capaz de someterse a la unión covalente con una proteína o péptido más grande. Alternativamente, si el medicamento no es químicamente reactivo *per se*, puede llegar a ser reactivo tras el metabolismo (hipótesis del pro-hapteno).(Merk et al., 1998) Un hapteno típico es la penicilina, que tiende a unirse covalentemente a los grupos de lisina dentro de las proteínas de forma espontánea.(Schneider and De Weck, 1965) El sulfametoxazol ha sido propuesto como un ejemplo típico de un pro-hapteno ya que gana su inmunogenicidad tras su metabolismo intracelular. Todas las reacciones a los medicamentos relacionados con sulfametoxazol se dirigen contra metabolitos reactivos y no contra el compuesto original inerte en sí. El hallazgo de que los queratinocitos también pueden procesar al sulfametoxazol en sulfametoxazol-hidroxilamina (metabolito activo) apoya esta concepto, ya que explicaría la manifestación alérgica en la piel. (Reilly et al., 2000)

Recientemente, se propuso una hipótesis alternativa en la cual se generan clones de células T activos frente a sulfametoxazol, lidocaína, celecoxib, y

quinolonas, donde se encuentra el fármaco inerte sin metabolito asociado. (von Greyerz et al., 1999, Zanni et al., 1998)

### 3.7.2 EXANTEMA MACULOPAPULAR (MPE)

En el MPE, el análisis histopatológico muestra típicamente una infiltración de células T predominante junto con una dermatitis. Los estudios inmunohistoquímicos demuestran la presencia de agentes citotóxicos T CD4 + y en menor grado de las células T CD8 +, que contienen perforina y granzima B y generalmente se encuentran cerca de los queratinocitos que muestran signos de destrucción celular. (Pichler et al., 2002)

La expresión del ligando de FAS es apenas detectable, lo que sugiere que el efecto citotóxico se debería a la exocitosis de gránulos con el consiguiente daño celular de los queratinocitos. (Crowson and Magro, 1999)

Además de la presencia de células T citotóxicas, las células T específicas de drogas también favorecen una reacción inflamatoria en la piel a través de la liberación y la inducción de diversas citoquinas como la IL-5, IL-6, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  y el interferón- $\gamma$  así como diferentes quimiocinas. El aumento de la expresión de estos mediadores parece contribuir a la generación de eosinofilia en el tejido y en sangre periférica, sello distintivo de muchas reacciones alérgicas inducidas por fármacos. (Gerber et al., 1997)

El MPE inmunohistologicamente se caracteriza por un infiltrado celular mononuclear superficial, principalmente perivascular de leve a moderado, con escasa eosinofilia. (Crowson and Magro, 1999) Normalmente, está presente una dermatitis de grado variable. La dermatitis se caracteriza por una acumulación de linfocitos en la zona de unión dermo-epidérmica, junto con una alteración vacuolar (degeneración hidrópica) de los queratinocitos en la capa de células basales. (Crowson and Magro, 1999, Pichler et al., 2002)

## 3.8 JUSTIFICACIÓN DEL DISEÑO DE UN ENSAYO CLÍNICO

Dado que en el SPP el compromiso de la dermis de palmas y plantas es selectivo, diversos autores sugieren un efecto inmune directo sobre los queratinocitos de la capa basal como principal mecanismo fisiopatológico. Esto determina una pérdida de la homeostasis de la dermis con un incremento descontrolado de la proliferación celular asociado a daño epitelial celular (Gressett et al., 2006, Narasimhan et al., 2004). Diferentes factores pueden alterar la arquitectura de la matriz, la organización de la epidermis y su función proliferativa (Andreadis et al., 2001, Sechler and Schwarzbauer, 1998) por lo que es menester encontrar un enfoque novedoso para recuperar el control de la proliferación celular.

Por otro lado existen pruebas evidentes de que la heparina posee además de su capacidad anticoagulante, una alta afección para enlazar un repertorio diverso de moléculas ejerciendo un efecto inhibitorio al formar complejos estables con lo que les impide ejecutar su función. (Forsten et al., 2000, Hsu et al., 1999, Wang et al., 2007). Esta actividad de la heparina la transforma en un posible agente capaz de restablecer la homeostasis cutánea al limitar la actividad de moléculas liberadas en un entorno inflamatorio que perpetúan el proceso loco regional. Con el beneficio añadido de su función anticoagulante ya que no podemos descartar que el poder trombogénico, que sabemos posee la Capecitabina, no juegue un papel en la microcirculación de palmas y plantas aunque sea en parte dentro de la fisiopatología del SPP.

Por todo lo anteriormente expuesto, se decidió iniciar una prueba clínica terapéutica en aquellos pacientes que presentaban un SPP de grado 2 con heparina tópica, presumiendo que ejercería su función en la superficie celular modulando la respuesta loco regional, con lo que conseguiríamos mejorar la sintomatología.

**FIGURA 7:** RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON HT DE UN PACIENTE.



Tras dos pacientes que presentaron un beneficio evidente, sin demostrar efectos secundarios asociados a la HT, se decidió proponer el desarrollo de un Ensayo Clínico fase II para valorar con metodología científica nuestra hipótesis. Y así tratar de esclarecer no sólo el mecanismo fisiopatológico sino comprobar la eficacia y seguridad de un posible tratamiento.



Hipótesis

---



## 4 HIPÓTESIS

Uno de los principales efectos secundarios del tratamiento con Capecitabina es el Síndrome Palmo Plantar (SPP). En este, el compromiso selectivo de la dermis de palmas y plantas, con presencia de hiperqueratosis acompañada de infiltrado inflamatorio, sugiere la pérdida de la homeostasis cutánea a favor de un estímulo proliferativo y una respuesta inmune loco regional.

### Hipótesis 1

- *El uso de Heparina Tópica mejora el SPP al unirse en forma de complejos estables con factores estimulantes de crecimiento y diferentes citoquinas inhibiendo de esta manera su acción, por lo que disminuye la respuesta inflamatoria local y beneficia la calidad de vida de los pacientes sin aumentar la toxicidad.*

Para optimizar el tratamiento quimioterápico con Capecitabina es necesario conocer el mecanismo fisiopatológico de uno de sus principales efectos adversos, el SPP.

### Hipótesis 2

- *El estudio histopatológico de biopsias de pacientes con SPP y el análisis exploratorio de las proteínas expresadas en ellas representan un modelo válido para generar hipótesis biológicas e identificar posibles mecanismos implicados en su fisiopatología.*

Se ha relacionado el SPP con los niveles de Timidina fosforilasa (TP) y Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) ya que los pacientes tratados con deficiencia de DPD tienen un mayor riesgo de presentar toxicidad grave.

### Hipótesis 3

- *La expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de la Capecitabina como TP y DPD se relaciona con la gravedad del SPP.*



# Objetivos

---



## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

- Evaluar la mejoría en las manifestaciones clínicas del Síndrome Eritrosidestésico Palmo Plantar (SPP), tras tres semanas de tratamiento con heparina tópica.

### **5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Valorar la seguridad del tratamiento tópico con heparina en pacientes con SPP secundario a Capecitabina.
- Interpretar la mejoría sintomática, mediante Escala Analógica Visual (EVA) del dolor, en los pacientes con SPP tratados con heparina tópica.

### **5.3 OBJETIVOS EXPLORATORIOS**

- Evaluar los cambios histopatológicos en las biopsias obtenidas de los pacientes con SPP durante el tratamiento con HT.
- Identificar y cuantificar la expresión diferencial de proteínas involucradas en el mecanismo fisiopatológico autoinmune del SPP.
- Analizar la expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de la Capecitabina y su relación con el SPP.



# Materiales y Métodos

---



## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la eficacia y la seguridad de la administración de HT como tratamiento del SPP secundario a Capecitabina desarrollamos un Ensayo Clínico Fase II donde se reclutaron 21 pacientes que presentaban SPP grado I o II. Los cuales fueron incluidos en el estudio entre el 9 de septiembre de 2010 y el 1 de marzo del 2013.

### 6.1 DISEÑO DEL ENSAYO CLÍNICO

#### 6.1.1 POBLACIÓN EN ESTUDIO

Un total de 21 pacientes fueron incluidos en este Ensayo. Clínico Para la selección de los pacientes se establecieron los siguientes criterios de inclusión:

1. Firma del Consentimiento informado tras haberlo leído y entendido.
2. Edad  $\geq$  a 18 años.
3. Estado funcional según ECOG de 0 a 2.
4. Cáncer confirmado histológica o citológicamente.
5. Paciente en tratamiento con Capecitabina en cualquier esquema de administración, como agente único o en combinación.
6. Presencia de Eritrodisestesia Palmo-Plantar (SPP) en grado I ó II según los criterios NCI-CTCAE (vs. 4.0).

Se seleccionaron una serie de criterios de exclusión:

1. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
2. Los pacientes en edad fértil deberán aceptar el uso de un método anticonceptivo adecuado durante el tratamiento con heparina tópica, hasta 1 mes después de haber finalizado el tratamiento.
3. Pacientes que se encuentren recibiendo tratamiento activo dentro de un ensayo clínico.
4. Funciones orgánicas inadecuadas:  
Albúmina  $< 2,5$  g/dl  
Recuento de plaquetas  $< 75 \times 10^9/L$   
APTT o INR  $> 1,5 \times$  LSN
5. Neuropatía periférica de grado  $\geq 2$  según los CTC del NCI versión 4.0.
6. Púrpura de cualquier etiología.

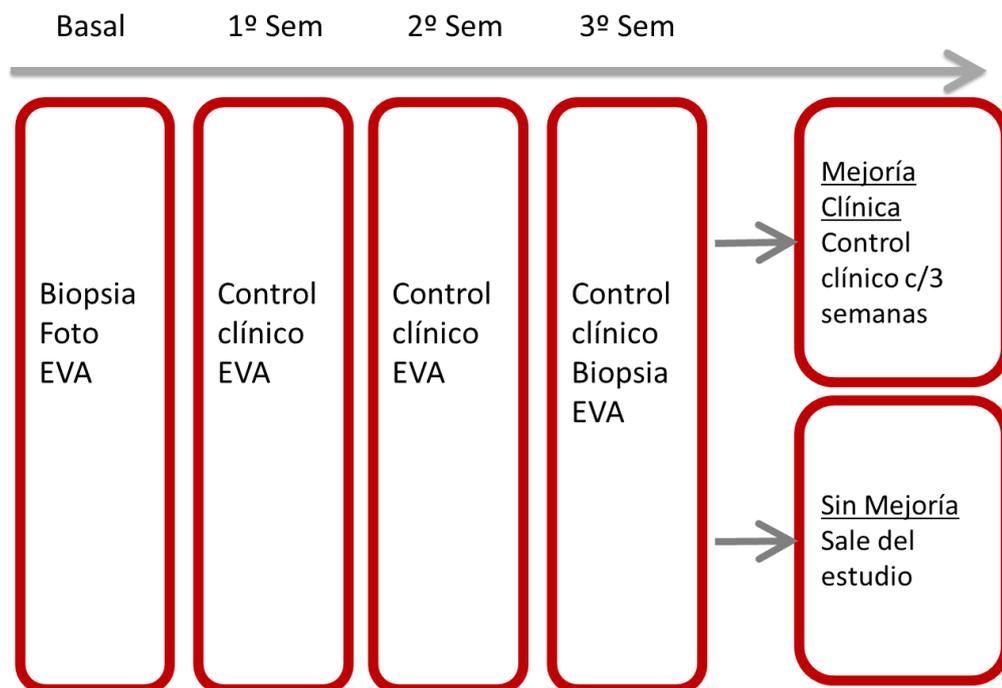
7. Lesiones sangrantes en palmas o plantas.
8. Pruebas de cualquier otra enfermedad, disfunción metabólica o psicológica, hallazgo en la exploración o de las pruebas del laboratorio clínico que lleven a la sospecha razonable de una enfermedad o proceso que contraindique el uso de un fármaco en investigación, que puedan afectar al cumplimiento por el paciente de las rutinas del estudio, o que pongan al paciente en grave riesgo de sufrir complicaciones relacionadas con el tratamiento.
9. Hipersensibilidad conocida a Heparina, o antecedentes de trombopenia asociada a heparina.
10. Deficiencia conocida de DPD.
11. Uso de cualquier otro fármaco en investigación, corticosteroides de manera crónica.
12. Eritrodisestesia Palmo-Plantar debido a cualquier otro fármaco distinto de Capecitabina.
13. Empleo de otros fármacos para el tratamiento del SPP (vitamina B6 o productos con urea o ácido láctico) u otros fármacos tópicos para manos y pies con cualquier otra indicación (ej. Sequedad de piel).
14. Incapacidad de cumplir el tratamiento y los procedimientos del protocolo.

### 6.1.2 DURACIÓN DEL ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE LOS PACIENTES

Durante 12 meses se seleccionaron los pacientes que se incluyeron en este estudio. El seguimiento mínimo que se hizo a estos pacientes fue de seis meses desde su inclusión.

Todos los pacientes leyeron la hoja de información del estudio y firmaron el Consentimiento Informado.

Los pacientes fueron sometidos a una exploración física basal, al momento del ingreso al estudio, junto con la toma de fotografías del grado de gravedad de las lesiones cutáneas de palmas y plantas y se hacía entrega de una Escala Analógica Visual para la auto-valoración del dolor (EVA). La valoración clínica y EVA se repetían de forma semanal durante las seis primeras semanas. En caso de respuesta, que se interpretó como mejoría clínica, se repetía la toma de fotografías y se continuaba con evaluaciones cada tres semanas. Si el paciente aceptaba, se le realizaba una biopsia cutánea previo inicio de tratamiento con HT de la zona de la palma localizada en la eminencia tenar y se repetía tras evidenciar beneficio clínico a las tres semanas.

**FIGURA 8:** ESQUEMA DEL DISEÑO DEL ENSAYO CLINICO.

### 6.1.3 TRATAMIENTO

El tratamiento consistió en la administración de Heparina tópica en fórmula de gel (Menaven Gel®, Menarini España) que se administró cuatro veces al día durante 21 días. Se le instruía al paciente y a sus familiares para que se aplicara sobre la zona afectada, tanto en palmas como en plantas, aproximadamente 2 cm<sup>3</sup> de gel seguido de un suave masaje; evitando la aplicación directamente sobre heridas sangrantes o abiertas.

Tras tres semanas de tratamiento se realizó una valoración de la eficacia clínica de la HT. En caso de beneficio clínico de SPP, se continuaba administrando HT mientras siguiera con Capecitabina como tratamiento oncológico, o bien hasta retirada del consentimiento del paciente o decisión del investigador.

#### 6.1.3.1 Valoración de respuesta al tratamiento

Para evaluar la respuesta al tratamiento con HT, se estudiaron las siguientes variables

La EFICACIA del tratamiento con HT se interpretó como: mejoría clínica a las tres semanas, mejoría percibida por el paciente mediante realización de EVA o el uso de medicaciones para dolor y otros tratamientos sintomáticos para el SPP.

Se evaluó la SEGURIDAD mediante la identificación de eventos adversos asociados al tratamiento con HT y se registraron y categorizaron según la escala del NCI CTCAE v 4.0. Todas las evaluaciones se realizaron según lo planificado en el calendario del estudio.

Se realizó, además la determinaciones bioquímicas de hemoglobina (Hb), hematocrito (Hct), recuento de plaquetas, recuento de leucocitos, fórmula leucocitaria (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos) y evaluación de albúmina cada tres semanas, coincidiendo con la analítica requerida previo al inicio del tratamiento oncológico (para evitar punciones venosas innecesarias a los pacientes). La determinación de tiempos de Coagulación como INR y/o aPTT solo se realizó en aquellos pacientes que recibían un tratamiento anticoagulante profiláctico y/ o terapéutico.

Las evaluaciones de la seguridad clínica incluyeron además los procesos médicos anteriores (basales) y concurrentes así como los tratamientos previos y concomitantes (incluidos los de libre dispensación y los productos de herbolario) en todas las visitas al hospital.

## 6.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE BIOPSIAS DE PIEL

### 6.2.1 TIPO DE MUESTRAS

Del total de pacientes incluidos en nuestro estudio, se realizaron biopsias punch de la zona afectada en la eminencia tenar de las palmas de las manos de 20 pacientes que dieron su consentimiento para ello. La toma de muestras fue realizada por un dermatólogo de nuestro hospital, tras la colocación de anestesia loco regional con lidocaína al 1% de forma subcutánea, realizando posteriormente un punto de sutura para facilitar la cicatrización. Todos los pacientes presentaban SPP en grados GI o GII.

Para su posterior comparación histológica, se tomaron dos muestras de piel a cada uno de los pacientes: una basal, previa al inicio del tratamiento con HT; y otra muestra tras finalizar el tratamiento a las tres semanas. El tejido cutáneo se dividió en dos partes iguales, una para su inclusión en un bloque de parafina y otra para su congelación en OCT (*Optimal Cutting Temperature*), para su adecuación para los posteriores estudios histológicos y proteómicos.

Las muestras pareadas se guardaron de manera anonimizada en el Biobanco del Hospital 12 de Octubre para posteriores estudios.

### 6.2.2 EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICAS DE LAS MUESTRAS DE LA PIEL AFECTA POR EL SPP:

Un patólogo especializado en análisis dermatológico del Hospital 12 de Octubre analizó cada una de las biopsias cutáneas obtenidas. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina eosina para su análisis microscópico.

Se llevó a cabo un análisis comparativo entre las muestras de piel pareadas. Se examinó el tipo de infiltración linfocitaria, evidencia de hiperqueratosis, degeneración vacuolar, dilatación vascular, presencia de células de Langerhans e indemnidad de la capa basal, así como cualquier otra característica histológica anómala y así poder correlacionar estos resultados con los hallazgos clínicos.

## 6.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA EN BIOPSIAS DE PIEL

### 6.3.1 CAMBIOS GLOBALES EN LA EXPRESIÓN PROTEICA: iTRAQ

Para la experimentación que se describe a continuación se utilizaron las biopsias de piel embebidas en OCT y que se encontraban almacenadas en el Biobanco del Hospital 12 de Octubre

Para estudiar cambios globales en la expresión proteica potencialmente mediados por el tratamiento con HT en pacientes con SPP asociado a Capecitabina, se realizó un análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre biopsias cutáneas de 20 pacientes obtenidas al inicio (día 0) y tras la respuesta clínica (día 21) del tratamiento. Para ello se utilizó la técnica iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation)(Han et al., 2008) basada en la espectrometría de masas y el marcaje isobárico diferencial. Las biopsias de piel embebidas en medio OCT (Optimum Cutting Temperature) se lavaron con PBS y todas las muestras de cada grupo se procesaron de forma conjunta en forma de *pools*. Los extractos proteicos se obtuvieron mediante homogeneización (Precellys, Montigny-le-Bretonneux, Francia) en presencia de microesferas de cerámica y buffer RIPA (Tris-HCl pH 7,5 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; NP-40 1 %) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche, Basilea, Suiza) y benzonasa al 0,1% para degradar los restos de DNA (Novagen, Darmstadt, Alemania). La fracción proteica se precipitó con metanol/cloroformo para posteriormente rehidratarla con urea 7M, tiourea 2M y ditiotreitól (DTT) 10 mM en bicarbonato de trietilamonio (TEAB) 0,1 M. Seguidamente se midió la concentración de las muestras y se procedió a su digestión mediante el método FASP (Filter aided sample preparation) (Wisniewski et al., 2009) Cada muestra (100 µg de proteína) fue sometida a dos digestiones consecutivas. La primera digestión se realizó con la

endoproteinasa Lys-C (Wako Chemicals, North Chesterfield, Virginia, EEUU) toda la noche a temperatura ambiente en un ratio enzima:proteína 1:50. La segunda digestión, de 6 horas de duración, se realizó con tripsina (Promega; Madison, WI, EEUU) a 37°C. A continuación se llevó cabo el marcaje isotópico de las aminos reactivas presentes en los péptidos procedentes de cada digestión trípica siguiendo las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Posteriormente, las muestras de iTRAQ se purificaron usando un cartucho Sep-Pak C-18 en fase reversa (Waters Corp., Milford, MA, EEUU).

Los péptidos eluidos y marcados se reconstituyeron en la solución OFFGEL (10% glicerol:agua (1:1), 1% anfólitos pH 3-10) para el posterior fraccionamiento de cada digestión trípica mediante isoelectroenfoque. Para ello se usó el sistema 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Las tiras IPG (gradiente inmovilizado de pH) de 24 cm (GE Healthcare, München, Germany) con un rango lineal de pH 3-10 se rehidrataron durante 15 min siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se cargaron 150 µL de muestra en cada uno de los 24 pocillos, y la separación de los péptidos en base a su punto isoeléctrico se realizó a 20°C y 50 µA hasta que se alcanzó el nivel 50 kVh. Cada fracción se evaporó y se sometió a un desalado empleando puntas "Stage" con discos C8 (3M, Minneapolis, MN) (Rappsilber et al., 2003) rellenas de resina R3 (Applied Biosystems). Finalmente, las fracciones peptídicas se evaporaron y resuspendieron en H<sub>2</sub>O con ácido fórmico (FA) al 0,1% (v/v).

Las muestras se separaron mediante nano-cromatografía de líquidos de fase reversa en un sistema nanoLC Eksigent (Eksigent Technologies, Framingham, MA, EEUU) y analizadas mediante espectrometría de masas en un LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Bremen, Alemania) equipado con una fuente nanoESI (nano-electrospray ionization).

Las muestras se inyectaron en el sistema empleando un autosampler AS-2 (Eksigent) y se preconcentraron y desalaron en línea empleando un cartucho de fase reversa ReproSil Pur C18-Aq 5 µm 0.3 x 10 mm (SGE Analytical, Australia) durante 5 min a 2,5 µL/min con 0.1% FA. Los péptidos eluyeron desde una columna cromatográfica de fase reversa ReproSil Pur C18-AQ 3 µm 200 x 0,075 mm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Alemania) mediante un gradiente binario empleando 2% acetonitrilo (ACN) en 0,1% FA (fase móvil A) y 100% ACN en 0,1%FA (fase móvil B), a un flujo de 300 nL/min y temperatura constante 30°C. Los péptidos se separaron utilizando el siguiente gradiente: 0-5 min 2% B, 5-150 min 45% B y 150-165 min 98% B.

El espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos se empleó en modo de ionización positivo. El escaneo MS se realizó en el analizador FT (Fourier

Transform) barriendo una ventana entre 250 and 1750 m/z. La resolución se fijó a 60 000 FWHM (Full width at half maximum) a m/z 400 y el control automático de ganancia (AGC) se fijó a 500 000 iones. Los valores de m/z que desencadenaban un evento MS/MS se incluyeron en una lista de exclusión durante 60 s. La mínima señal en MS para desencadenar un evento MS/MS se fijó a 1000 cuentas. En todos los casos, se registró un microscan. La opción "lock mass" se habilitó para los modos MS y MS/MS, de manera que los iones polidimetil ciclosiloxano (PDMS, protonado (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>; m/z 445.120025) se emplearon para la recalibración interna de los espectros de masas.(Olsen et al., 2005)

Para la fragmentación HCD (high energy collision dissociation), los 15 patrones isotópicos más abundantes con carga  $\geq 2$  del escaneado de barrido se seleccionaron con una ventana de aislamiento de 2 m/z y fragmentados en la celda de colisión C-trap aplicando una energía de colisión normalizada del 42%. Los fragmentos resultantes se detectaron en el sistema Orbitrap con una resolución de 7500 FWHM a m/z 400. Los máximos tiempos de inyección de iones para el escaneado de barrido y el MS/MS se fijaron a 500 ms y 250 ms respectivamente y los *ion target values* se fijaron a 1E6 y 4E5, respectivamente.

Los datos se procesaron usando el programa informático Proteome Discoverer 1.3.0.339 (Thermo Scientific). Los espectros de fragmentación se compararon con la base de datos SwissProt Human (versión Marzo 21, 2012) usando MASCOT como dispositivo de búsqueda (v 2.2). La identificación de péptidos y proteínas se filtró con un false discovery rate (FDR) al 1%. Tan solo se consideraron los péptidos de elevada confianza. Los resultados se exportaron en una hoja de Excel para la interpretación manual de los datos. Aunque el software Proteome Discoverer proporcionó una cuantificación relativa y algunos datos estadísticos, se seleccionaron puntos de corte adicionales para los ratios de expresión de iTRAQ con el objetivo de identificar proteínas sobreexpresadas y reprimidas. Se establecieron niveles de exigencia, uno más permisivo (ratio<0,8 represión; ratio>1,2 sobreexpresión). En el análisis tan solo se tuvieron en consideración las proteínas que se identificaron con 2 o más péptidos únicos y de las que, al menos, se contaron tres péptidos marcados con el reactivo iTRAQ.

El análisis funcional de los resultados se realizó con la herramienta informática Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EEUU; <http://www.ingenuity.com>).

### 6.3.2 CONFECCIÓN DE TISSUE MICROARRAYS

Como método para la validación de los resultados de iTRAQ se realizó Inmunohistoquímica de aquellas proteínas en las que habíamos identificado

una expresión diferencial entre las muestras pre y post-tratamiento mediante la construcción de un Tissue Microarrays.

Se construyó un *tissue micro-array* a partir de las biopsias realizadas en la zona afectada de la eminencia tenar de la palma de la mano de los pacientes, que se encontraban almacenadas en bloques de parafina. Se seleccionaron los 20 casos con SPP grados GI o GII pareadas. Se seleccionó de cada uno de los bloques de piel, por un grupo de dos investigadores clínicos, el área más representativa de la que se tomó un cilindro. Se colocaron en filas y columnas de manera aleatoria y al mismo tiempo se dibujó el topograma de situación en una plantilla de papel para el control de validación. Se colocaron de manera aleatoria cinco cilindros de otros tejidos epiteliales para controles internos, lo que sirvió además para orientación de lectura y análisis.

Se construyeron 7 bloques de tissue microarrays con aguja de 2mm. Una vez construido el array, se reintrodujo en estufa para su consolidación definitiva y se efectuaron varias secciones de 3-5 micras que se fijaron en portas, se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (HE) y se montaron y secaron.

Posteriormente se validó el array mediante la identificación del grado histológico de cada espécimen por otros dos investigadores, patólogo y oncólogo, que no habían intervenido ni en la selección de los casos ni en la construcción del array, colocando su diagnóstico en una plantilla idéntica a la del array, pero con las casillas en blanco. Se procedió finalmente a la comprobación de concordancias y discrepancias con la plantilla original así como al porcentaje estadístico de los mismos.

### 6.3.2.1 ANTICUERPOS UTILIZADOS

Los anticuerpos utilizados para la realización de los Tissue-array y las casas comerciales a las que se compraron, se relacionan a continuación:

Anticuerpos monoclonales de ratón, de la casa Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Tx):

- anti-Cytokeratin 1(E-12):sc-376224, (Popescu et al., 1989)
- anti-Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT (G-4):sc-376048, (Win et al., 2013)
- anti- Filaggrin (AE21):sc-80609, (McKinley-Grant et al., 1989)
- anti-SCCA1 (8H11):sc-21767, (Qi et al., 2005)
- anti-Op18 (A-4):sc-48362, (Sobel, 1991)
- anti-Cytokeratin 10 (DE-K10):sc-52318 (Pontiggia et al., 2009)
- anti-CD9 (C-4):sc-13118 (Ferrero et al., 1991).

Los anticuerpos policlonales de conejo, de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Tx):

- anti-Periostin (H-300):sc-67233 (Didangelos et al., 2010) y

- anti-Tenascin-X (H-90):sc-25717 (Jung et al., 1993).

El anticuerpo policlonal de conejo, de Sigma-Aldrich.:

- anti-SerpinH1(S5950)

Los anticuerpos policlonal y monoclonal respectivamente, de conejo, de Novus Biologicals (Littleton, USA):

- anti-Cytokeratin 2 (NBP2-16091) y
- anti-CD90 (NBP1-42068).

Los anticuerpos de ratón monoclonales, de Acris Antibodies (Germany):

- anti-Dermcidin (AM2628OLE-N) y
- anti-GAPDH (ACR001P).

## 6.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN MUESTRAS SANGUÍNEAS DE LOS PACIENTES

### 6.4.1 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS

Se han obtenido dos muestras de sangre de cada paciente: la primera de ellas en el momento de entrada al estudio (antes del inicio del tratamiento) y la segunda a los 21 días de tratamiento de dichos pacientes con heparina tópica. Se extrajeron en cada una de las tomas, 9 mL de sangre por punción venosa, depositándose en un tubo con EDTA como anticoagulante. Tras la obtención de las muestras, se procedió a su procesamiento inmediato para el aislamiento de ARN total.

- El aislamiento de la fracción de células mononucleares (PBMC) de la sangre total se realizó siguiendo el siguiente protocolo:
- Se deposita la sangre suavemente con pipeta Pasteur sobre 10 ml de ficoll (Histopaque 1077, Sigma) previamente atemperado, sin romper la interfase.
- Centrifugación a 400g, durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT), en centrífuga sin frenada.
- Se recoge cuidadosamente el anillo intermedio que contiene la PBMC, depositándose en un nuevo tubo.
- Esta fracción se resuspende en 10 mL de PBS 1X y se centrifuga de nuevo a 400g durante 10 minutos.
- Se elimina el sobrenadante y el sedimento celular (pellet) es resuspendido en 1 mL de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0,8% para eliminar cualquier resto de eritrocitos que pueda contener el sedimento, incubándose 5 minutos en baño a 37°C.
- La lisis se para con 10 mL de PBS. Se centrifuga de nuevo a 400g durante 5 minutos.
- El sedimento así obtenido, se resuspende en FBS con 10% de DMSO y se guarda a -80°C hasta su utilización.

### 6.4.2 OBTENCIÓN DE ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN A ADN COMPLEMENTARIO

Para la extracción de ARN total de las muestras de sangre se utilizó el reactivo TRI Solution (Ambion), seguido de una etapa de purificación en columna usando RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se incluyó una etapa de digestión, para eliminar los posibles fragmentos de DNA genómico que pudieran quedar en la muestra, con DNase I (Qiagen). El material de plástico y vidrio usado en la extracción de ARN fue siempre material libre de RNasa (RNasa-free) y se utilizaron puntas de pipetas estériles con filtro. El ARN aislado fue almacenado a -80°C hasta el momento de su utilización.

El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN con Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit (Roche Diagnostic). ARN y ADNc fueron cuantificados espectrofotométricamente con ND-1000 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) y la calidad de cada una de las muestras fue confirmada en geles de agarosa.

### 6.4.3 CUANTIFICACIÓN DE ARN MENSAJERO

#### 6.4.3.1 qRT-PCR

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-PCR) a tiempo real, se llevó a cabo con la utilización de un conjunto de sondas y cebadores específicos del ensayo “TaqMan gene-expression” (Life Technologies).

La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR y los valores de expresión génica relativos fueron calculados por el método  $\Delta\Delta C_t$ , usando el Sequence Detection System 2.0.5 software (Applied Biosystems). Todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado y son expresadas en relación a los niveles de expresión del gen de expresión endógena GAPDH (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa). Los controles negativos apropiados (todos los componentes para la amplificación, excepto el DNA) fueron añadidos en cada reacción.

La PCR a tiempo real se realizó siguiendo el protocolo indicado en el kit de sondas TaqMan. La reacción se hizo en placas de 96 pocillos, con un volumen final de 20 µL, incluyendo 2 µL de ADNc como molde. Se llevó a cabo un paso inicial de desnaturalización y activación de la polimerasa a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos formados por 15 segundos a 95°C para la desnaturalización, 60 segundos a 60°C para el anillamiento y la extensión. Tras de lo cual se sometieron las muestras a 5 minutos a 72°C para la

extensión final, finalizando con una disminución de la temperatura hasta 4°C para la finalización de la PCR.

Los niveles finales de mRNA se convirtieron a ratios de expresión disminuida ( $\leq 1$ ) o incrementada ( $> 1$ ), en relación a los respectivos niveles de RNA mensajeros en un pool de PBMC de voluntarios sanos.

#### 6.4.3.2 Sondas TaqMan

Las características de las sondas TaqMan utilizadas en la determinación de la expresión génica de Timidina fosforilasa (*TYMP*), Dihidropirimidina deshidrogenasa (*DPYD*) y Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) se exponen en la siguiente tabla:

**TABLA 2:** SONDAS TAQMAN

Símbolo	Nombre	Sonda	Exón	Longitud del amplicón
<b>TYMP</b>	Thymidine phosphorylase	Hs00157317_m1	4-5	95
<b>DPYD</b>	Dihydropyrimidine dehydrogenase	Hs00559279_m1	1-2	74
<b>GAPDH</b>	Glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1	3-3	122

## 6.5 ANALISIS ESTADÍSTICO

El cálculo del tamaño muestral se realizó mediante el método de Simon en 2 etapas para estudios fase II. Este método está basado en el objetivo principal del estudio, que fue la valoración de la tasa de respuestas clínicas obtenidas con el tratamiento del SPP tratado con HT.

Según nuestro diseño, aceptamos la eficacia del tratamiento si conseguimos una tasa de respuesta de al menos el 50% de los pacientes, rechazando la eficacia del tratamiento cuando la tasa de respuesta sea inferior al 20%. En este caso, consideramos un error alfa de 0,05 y una potencia del test del 90%, por lo que se incluyó un total de 21 pacientes dado que los resultados del estudio evidenciaron más de tres respuestas clínicas en los primeros doce pacientes reclutados.

Los resultados obtenidos en los ensayos de expresión génica se expresan en tablas y figuras como media  $\pm$  desviación estándar (SD). Los análisis de correlación y comparación en la expresión génica antes y después del tratamiento con HT se llevó a cabo con el test t-Student para muestras

apareadas. La relación entre variables categóricas se llevó a cabo a través de tablas de contingencias y el test exacto de Fisher.

Los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS 15.0 para Windows (Chicago, IL) y Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). Se consideró que existían diferencias significativas en los casos en que  $P < 0.05$ . Los límites de los intervalos de confianza se establecieron para el 95% de probabilidad.

# Resultados y Discusión

---



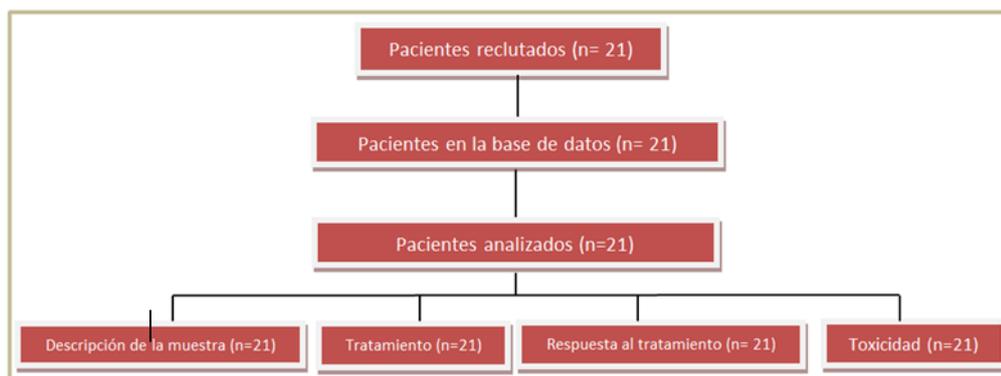
## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 DISEÑO DEL ENSAYO CLÍNICO

#### 7.1.1 DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES

Se incluyeron 21 pacientes mayores de 18 años tras la firma del consentimiento informado, con un estado funcional (ECOG) de 0 a 1 que tuvieran el diagnóstico de enfermedad oncológica confirmado por histología o citología y que se encontraran recibiendo tratamiento quimioterápico con Capecitabina en cualquier esquema de administración, como agente único o en combinación, que presentaran SPP Grado I o II según los criterios NCI-CTCAE (vs. 4.0) y que no cumplieran ningún criterio de exclusión.

**FIGURA 9:** DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES.



#### 7.1.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

La edad media de los pacientes fue de 62,2 años siendo nueve de ellos varones (42,9%) y doce mujeres (57%) con un ECOG de 1 el total de ellos. Cuatro pacientes (44%) con SPP Grado I y diecisiete (81%) de ellos con Grado II. Correspondiendo con lo que se encuentra descrito, no hay una variación en la manifestación del SPP entre sexos o edades. (Abushullaih et al., 2002, Childress and Lokich, 2003)

Las patologías neoplásicas en nuestra cohorte, más frecuentes fueron el cáncer de mama (47%) y el cáncer colorrectal (38%). Seis pacientes recibían Capecitabina como primera línea de tratamiento quimioterápico, 3 como segunda línea y 12 como tercera línea o sucesivas. No se evidenció correlación entre el grado del SPP con el número de líneas previas recibidas o con el

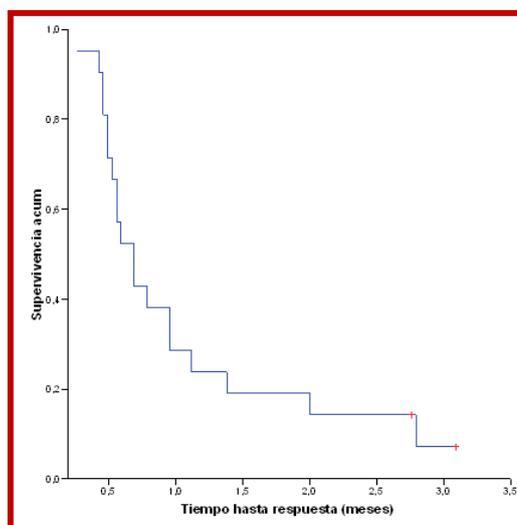
régimen, ya que siete pacientes recibieron Capecitabina en monoterapia y el resto en régimen de combinación. Sólo un paciente recibió un esquema concomitante con otra droga con la posibilidad de generar SPP como efecto adverso, Epirrubicina, siendo el SPP de grado1 al momento del ingreso al Ensayo Clínico.

**TABLA 3:** SÍNTOMAS DEL SPP

	Manos		Pies	
	N	%	N	%
Dolor	14	66.7	18	85.7
Eritema	21	100.0	21	100.0
Edema	21	100.0	19	90.5
Hiperqueratosis	12	57.1	19	90.5
Ampollas	-	-	2	9.5
Descamación	6	28.6	18	85.7

La sintomatología que acompañaba al SPP en nuestros pacientes se describe en la tabla 3. Como vemos, un mismo paciente presentaba dos o más síntomas, lo que coincide con lo descrito en la literatura. (Do and Kim, 2007, Gressett et al., 2006) Si bien la presencia de dolor no fue la sintomatología más frecuente (66% de los pacientes), sin embargo es la que más angustia y limita para realizar la vida diaria de los pacientes.(Heo et al., 2004, McLellan et al., 2015)

**FIGURA 10:** TIEMPO HASTA RESPUESTA CLÍNICA.



Al final del estudio, la respuesta clínica (mejoría del SPP por lo menos en un grado) se evidenció en 19 pacientes (90,5%). Con una media de respuesta al tratamiento de 1,1 meses y una mediana para el tiempo de respuesta de 0,7 meses (IC al 95%: 0,5-0,9)

A las tres semanas, el 76,2 % de los pacientes respondió con la disminución de uno más grados de SPP y el 90 % mejoró al final del tratamiento con HT.

Se realizó además un cuestionario con medición de escala analógica visual para caracterizar intensidad de dolor (EVA) al ingreso al ensayo clínico y durante cada semana de tratamiento.(de Goeij et al., 2015)

**TABLA 4:** VALORACIÓN DEL DOLOR POR EVA

EVA	Basal	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 6	Semana 12	Semana 18	Semana 24
<b>Media</b>	5.5	3.1	2.3	1.3	0.8	1.9	1.7	0.6
<b>Mediana</b>	5.0	3.0	2.0	0.5	0.0	0.0	1.5	0.0
<b>D.S.</b>	1.8	2.0	1.8	1.6	1.4	2.7	1.9	1.3
<b>Mínimo</b>	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>Máximo</b>	9.0	7.5	5.0	5.0	4.0	7.0	4.0	3.0
<b>Total</b>	21	21	21	21	19	7	6	5

D.S.: desviación estándar.

En la evaluación del dolor mediante la escala visual analógica se observó una mediana de intensidad de dolor en el momento basal de 5 (siendo la escala de 0- nada de dolor y 10 la máxima intensidad de dolor que el paciente padeció en su vida), disminuyendo hasta 0,5 a las 3 semanas en la mayoría de los pacientes (Tabla 4, P <0,001).

Se han propuesto diferentes tratamientos sintomáticos para el control del SPP como la aplicación de emolientes tópicos, el uso de Piridoxina (Chalermchai et al., 2010) ceramida (Shinohara et al., 2014) o inhibidores de ciclooxigenasa (COX), (Degen et al., 2010) parches de nicotina, vitamina E (Kara et al., 2006), corticosteroides (Saif and Elfiky, 2007, Kanat et al., 2007) y el uso de guantes fríos, durante la infusión del quimioterápico,(Scotte et al., 2005). No obstante no se ha demostrado un claro beneficio para estos tratamientos.(Chalermchai et al., 2010, Degen et al., 2010) Hasta este momento sólo la discontinuación del agente causal determina la regeneración de la piel en 1 a 2 semanas, con los riesgos que conlleva la suspensión de un fármaco activo para la enfermedad oncológica.(Gressett et al., 2006)

Este estudio aporta nuevos datos sobre la eficacia de la aplicación tópica de heparina como un tratamiento fácil y accesible que es capaz de mejorar la sintomatología y con ello, la calidad de vida de pacientes oncológicos con SPP, sin la necesidad de suspender el tratamiento quimioterápico activo, causante de este efecto adverso.

### 7.1.3 ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO

Todos los pacientes realizaron el tratamiento tópico con heparina, llegando algunos a administrársela hasta un total de 41,6 semanas dado que el beneficio clínico presentado había sido muy significativo.

**TABLA 5:** NÚMERO SEMANAS EN TRATAMIENTO

	N	Media	Mediana	D.S.	Mínimo	Máximo
Semanas en tratamiento	21	14,1	7,6	12,4	3,6	41,6

D.S.: desviación estándar.

### 7.1.4 TOXICIDAD DEL TRATAMIENTO

Hasta la fecha de último seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio, ninguno de ellos presentó acontecimientos adversos relacionados con la HT según se describe en su ficha técnica.

### 7.1.5 REDUCCIÓN DE DOSIS

Un total de 5 pacientes redujeron la dosis de Capecitabina por presentar toxicidad hematológica y digestiva asociada principalmente con diarrea y mucositis. Un paciente retrasó dos semanas el reinicio del tratamiento quimioterápico por toxicidad digestiva. Estos datos coinciden con la toxicidad descrita para la Capecitabina con el tratamiento prolongado.(Beard et al., 1993, Fischel et al., 2004, Farr and Safwat, 2011)

## 7.2 **EVALUACION HISTOLÓGICA DE LAS BIOPSIAS**

Se realizó la evaluación histológica de 20 biopsias cutánea para el estudio del mecanismo fisiopatológico.

Al igual que describen otros autores, en las biopsias de nuestros pacientes, prevalece la hiperqueratosis, el infiltrado linfocitario y la dilatación vascular asociada a la pérdida de células de Langerhans.(Fitzpatrick, 1993, Heo et al., 2004)

Cuando se evidencia hiperqueratosis dentro de la patogenia de una enfermedad se debe pensar que alguno de los procesos de proliferación y diferenciación epidérmica terminal se encuentra alterado.

**TABLA 6:** RESULTADOS DE MICROSCOPÍA.

	Visita basal				Semana 3			
	No		Si		No		Si	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Degeneración Vacuolar</b>	20	100,0	-	-	18	94,7	1	5,3
<b>Hiperqueratosis</b>	1	5,0	19	95,0	2	10,5	17	89,5
<b>Infiltrado linfocitario</b>	2	10	18	90	13	68,4	6	31,6
<b>Pérdida de células de Langerhans</b>	2	10,0	14	70,0	1	5,3	15	78,9
<b>Dilatación vascular</b>	2	10,0	18	90,0	-	-	19	95
<b>Borramiento capa basal</b>	20	100,0	-	-	18	94,7	1	5,3

La diferenciación de los queratinocitos comienza a partir de células basales localizadas en la capa basal inferior de la epidermis, éstas se unen a la membrana basal a través de un dispositivo de anclaje llamado hemidesmosoma, mientras que los queratinocitos se unen entre sí principalmente por desmosomas. (Raja et al., 2007) Las células basales, a continuación, desplazan a su progenie, hacia la segunda capa donde se convierten en células espinosas. La capa espinosa se compone de aproximadamente 10 capas donde los queratinocitos continúan ascendiendo, volviéndose más planos para finalmente convertirse en células granulares en la capa granular. Las células granulares muestran características diferentes con respecto a sus predecesoras, son más planas y han cornificado su envoltura celular lo que les proporciona una barrera física vital. (Akiyama and Shimizu, 2008) Esta envoltura celular es una capa de 10 nm de grosor compuesta de un reticulado de proteínas insolubles (queratina, loricrina, filagrina, involucrina y transglutaminasa 1) y lípidos, principalmente las ceramidas. (Ishida-Yamamoto et al., 2011) Por último las células granulares se vuelven corneocitos en la capa córnea, que son células muertas. (Lippens et al., 2005) Las superficies de la piel queratinizadas están protegidas de los estímulos externos. Como se mencionó anteriormente, la cornificación es un proceso normal para formar la barrera epidérmica en los tejidos epiteliales que se

compone, en resumen, de diferenciación terminal y muerte celular programada de los queratinocitos. (Lippens et al., 2005) Esta homeostasis implica un equilibrio entre el crecimiento celular y la muerte celular. La homeostasis es controlada por varios mecanismos, por lo que se deduce que ante procesos de hiperqueratinización alguno de estos mecanismos falla. Pudiendo localizarse el error a diferentes niveles de este proceso, tanto a nivel genético (las mutaciones en genes que codifican las proteínas involucradas causan anormalidades en la queratinización). (Hamada et al., 2013) como a nivel de los factores de crecimiento, ya que estos podrían determinar una hiperestimulación celular lo que demoraría la diferenciación o maduración celular de los queratinocitos que conlleva a un aumento del grosor dérmico. (Jacobi et al., 2006)

Los factores de crecimiento de fibroblastos tienen afinidad por las células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales. El KGF ha demostrado un potencial de estimulación más selectivo sobre la proliferación y diferenciación de los queratinocitos. Jacobi estudió la influencia del KGF sobre el epitelio durante la reparación de heridas evidenciando que el KGF acelera la reepitelialización e incrementa el grosor del epitelio al administrar KGF exógeno. (Jacobi et al., 2006) Los resultados de diversos estudios concuerdan en que KGF es único en su capacidad de acelerar la reepitelización. (Pierce, Yanagihara et al 1994). (Jacobi et al., 2006)

La presencia de un infiltrado linfocitario se relaciona con un proceso inflamatorio local. Aunque en el pasado, los queratinocitos fueron considerados como células pasivas en el ataque inmunológico durante la infiltración de linfocitos T, actualmente diferentes estudios han demostrado que los queratinocitos participan activamente en las respuestas inmunes cutáneas. (Black et al., 2007, Boyman et al., 2007) Tras la activación, los queratinocitos expresan una gran cantidad de citocinas, quimiocinas y moléculas accesorias, que pueden transmitir señales tanto positivas como negativas para las células de la inmunidad innata y adaptativa. (Boxman et al., 1993)

Tanto la expresión anormal de mediadores de inflamación como la desregulación de los receptores de los queratinocitos contribuyen a la patogénesis de enfermedades inflamatorias de la piel crónicas tales como psoriasis, dermatitis atópica y dermatitis de contacto alérgica. (Nestle et al., 2009)

### 7.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES PROTEICAS EN EL SPP

En este trabajo se ha realizado el análisis comparativo entre las biopsias de piel de los pacientes antes del inicio y las realizadas tras tres semanas de tratamiento con heparina tópica. Se identificaron 1876 proteínas (Anexo 1) con un alto intervalo de confianza (99%) mostrando altos índices de correlación entre repeticiones (70%).

**TABLA 7:** PROTEÍNAS CON EXPRESIÓN AUMENTADA

Accession	Nombre	Nombre Gene	
<b>P07919</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial Complex III subunit6	<b>UQCRH</b>	<b>1,78</b>
<b>Q15063</b>	Periostin	<b>POSTN</b>	<b>1,67</b>
<b>P06702</b>	Protein S100-A9	<b>S100A9</b>	<b>1,66</b>
<b>P05109</b>	Protein S100-A8	<b>S100A8</b>	<b>1,57</b>
<b>P29034</b>	Protein S100-A2	<b>S100A2</b>	<b>1,61</b>
<b>P02452</b>	Collagen alpha-1(I) chain	<b>COL1A1</b>	<b>1,58</b>
<b>P02461</b>	Collagen alpha-1(III) chain	<b>COL3A1</b>	<b>1,53</b>
<b>Q05707</b>	Collagen alpha-1(XIV) chain	<b>COL14A1</b>	<b>1,39</b>
<b>P08123</b>	Collagen alpha-2(I) chain	<b>COL1A2</b>	<b>1,66</b>
<b>P00441</b>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<b>SOD1</b>	<b>1,54</b>
<b>P50454</b>	Serpin H1	<b>SERPINH1</b>	<b>1,49</b>
<b>P09486</b>	SPARC	<b>SPARC</b>	<b>1,44</b>
<b>P40261</b>	Nicotinamide N-methyltransferase	<b>NNMT</b>	<b>1,43</b>
<b>Q4ZHG4</b>	Fibronectin type III domain-containing protein 1	<b>FNDC1</b>	<b>1,36</b>
<b>Q13509</b>	Tubulin beta-3 chain	<b>TUBB3</b>	<b>1,36</b>
<b>P04216</b>	Thy-1 membrane glycoprotein	<b>THY1</b>	<b>1,43</b>
<b>P14555</b>	Phospholipase A2, membrane associated	<b>PLA2G2A</b>	<b>1,36</b>
<b>Q12884</b>	Seprase	<b>FAP</b>	<b>1,32</b>
<b>P02763</b>	Alpha-1-acid glycoprotein 1	<b>ORM1</b>	<b>1,35</b>
<b>P19652</b>	Alpha-1-acid glycoprotein 2	<b>ORM2</b>	<b>1,31</b>
<b>P16949</b>	Stathmin	<b>STMN1</b>	<b>1,30</b>
<b>Q05682</b>	Caldesmon	<b>CALD1</b>	<b>1,30</b>
<b>P81605</b>	Dermcidin	<b>DCD</b>	<b>1,53</b>

En las Tablas 7 y 8 se describen las proteínas que muestran una expresión diferencial y que podrían tener relevancia clínica en el SPP. Como una primera aproximación de cuáles podrían ser las proteínas de interés, se consideraron aquellas con una variación superior a 1,3 (cut off empleado en iTRAQ).

Posteriormente se realizó una revisión exhaustiva de la literatura en relación a

dichas proteínas para comprender su comportamiento en los diferentes mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo del SPP

**TABLA 8:** PROTEÍNAS CON EXPRESIÓN DISMINUIDA

Accession	Nombre	Nombre Gene	
P60985	Keratinocyte differentiation-associated protein	KDAP	0,56
P21926	CD9 antigen	CD9	0,58
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	0,62
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	0,70
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	0,73
P29508	Serpin B3	SERPINB3	0,72
Q96P63	Serpin B12	SERPINB12	0,75
P05120	Plasminogen activator inhibitor 2	SERPINB2	0,77
Q9NZH8	Interleukin-36 gamma	IL36G	0,72
P20930	Filaggrin	FLG	0,76
P22105	Tenascin-X	TNXB	0,76

### 7.3.1 PROTEÍNAS SOBRE EXPRESADAS MÁS RELEVANTES

#### ***Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)***

La NNMT cataliza la N-metilación de la nicotinamida y otras piridinas para formar iones piridina. Esta actividad es importante para la biotransformación de muchos fármacos, como es la metabolización de Capecitabina a 5 FU.

La nicotinamida es un nutriente esencial para revertir los síntomas de la pelagra y es un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Recientemente se han descrito otras actividades biológicas de la nicotinamida, incluyendo sus efectos citoprotectores sobre tejidos neurales y tejidos vasculares (Chong et al., 2002), así como su actividad anti-inflamatoria. (Ungerstedt et al., 2003)

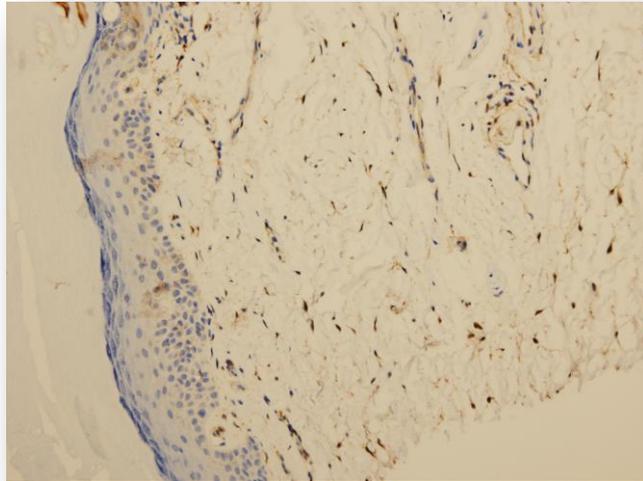
En un estudio piloto aplican NNMT tópicamente y demuestran su eficacia en disminuir la respuesta inflamatoria de diversas enfermedades cutáneas (Gebicki et al., 2003), proporcionando la primera evidencia de la actividad biológica de NNMT in vivo, aunque el mecanismo no quedó esclarecido. Chlopicki demostró que NNMT es un agente anti-trombótico único, ya que limita la trombosis dependiente de plaquetas por un mecanismo relacionado con la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) derivado de la COX-2. (Chlopicki et al., 2007)

En nuestro estudio corroboramos la sobre expresión hallada por iTRAQ en las biopsias tras tres semanas de tratamiento mediante IHQ obteniendo iguales

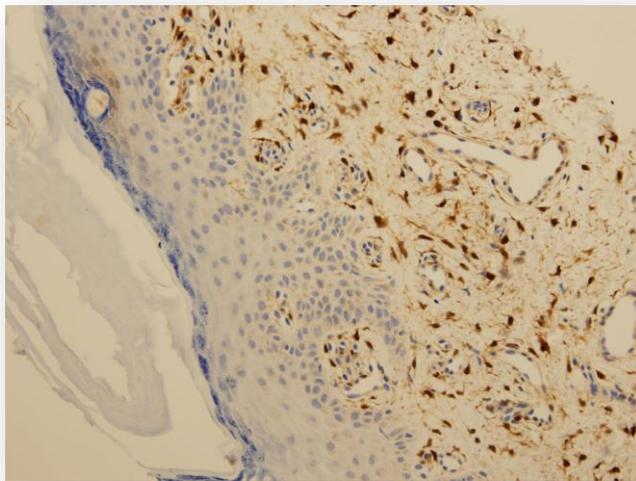
resultados, lo que sugiere un importante papel en el descenso del proceso inflamatorio locoregional. Figura 9. (Ungerstedt et al., 2003)

**FIGURA 11:** IHQ NNMT DE BIOPSIA DE PIEL FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A



B



Si bien su actividad antiinflamatoria parece ser la más importante que avala nuestra hipótesis de mecanismo fisiopatológico involucrado en el SPP, no podemos descartar que la recientemente descrita actividad anti-trombótica del NNMT no ejerza un papel adicional al de la heparina (conocido anticoagulante). En nuestros pacientes la mayoría de las biopsias presentaban dilatación vascular, que podría tratarse de una manifestación indirecta de microtrombosis vasculares dérmicas no evaluadas, dado que se han descrito

eventos trombóticos vasculares sistémicos asociados a Capecitabina. (Martí et al., 2008, Ensley et al., 1989)

### ***Fibronectin type III domain containing protein FNDIII1-7***

Normalmente está ausente en la piel sana y es apenas detectable en nevos melanocíticos benignos. Se expresa en el estroma cerca de los tumores de la piel, o en las células tumorales en sí mismas y se encuentra sobre-expresada en la epidermis de la piel con psoriasis. (French-Constant et al., 1989, Anderegg et al., 2005)

La fibronectina (FN) de la matriz codifica las señales y los controles esenciales para la proliferación celular y la señalización a través de cambios en la arquitectura de la matriz. Una matriz rica en FN nativa determina un estímulo del crecimiento celular. En contraste, la variedad de la FN (FNDIII1-7) es estructuralmente distinta y forma una matriz que inhibe la progresión de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular. (Sechler and Schwarzbauer, 1998)

La literatura actual concuerda en que existe un aumento de FNDIII1-7 en los tejidos que requieran reparar heridas y que este, se debe a un incremento de la producción *in situ* como respuesta a un estímulo inflamatorio donde coexisten inductores como el TGF  $\beta$ , IL 1 o TNF  $\alpha$ . (Anderegg et al., 2005)

La FNDIII1-7 se encuentra sobre-expresada en procesos inflamatorios como hemos corroborado en nuestros pacientes. Una matriz extracelular constituida fundamentalmente con esta variedad de FN puede modificar su arquitectura, proporcionando un enfoque novedoso para controlar la proliferación celular. (Anderegg et al., 2005).

No se ha podido validar este resultado por IHQ debido a la imposibilidad de conseguir un anticuerpo comercial adecuado.

### ***Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)***

SPARC regula el crecimiento celular a través de interacciones con la matriz extracelular y citoquinas. Se une al calcio y al cobre, a varios tipos de colágeno, a la albúmina, a la trombospondina, al PDGF y a las membranas celulares. Se expresa en altas concentraciones en los tejidos sometidos a la morfogénesis, remodelación y reparación de las heridas. (Bradshaw et al., 2003)

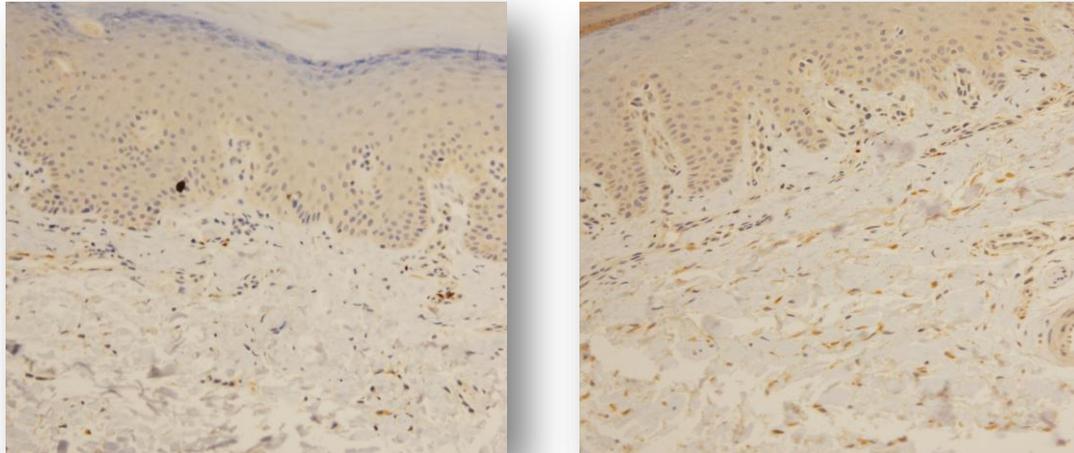
SPARC contribuye a la formación de fibrillas de colágeno en la dermis. Bradshaw describe que la piel de ratones adultos modificados genéticamente para que no expresen SPARC, tenía aproximadamente la mitad de la resistencia a la tracción comparado con la de ratones normales. Así, la ausencia de SPARC compromete las propiedades mecánicas de la dermis, que

atribuyeron al menos en parte, a los cambios en la estructura y la composición de la matriz extracelular. (Bradshaw et al., 2003)

**FIGURA 12:** IHQ SPARC FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A

B



En las biopsias de nuestros pacientes tras mejorar la respuesta inflamatoria aumenta la concentración de SPARC favoreciendo la producción de colágeno después de tres semanas de tratamiento tópico con heparina. Esta sobreexpresión de SPARC la hemos validado por IHQ. (Figura 12)

En muchos casos, la producción de SPARC se acompaña de inducción de colágeno. (Brekken et al., 2003) La producción de colágeno I parece ser requisito para la asociación de SPARC con la reparación de heridas. (Bradshaw et al., 2002) Esta afirmación concuerda con la sobreexpresión obtenida en nuestro trabajo, de diferentes tipos de colágeno y procolágeno.

### ***Collagen alpha***

La familia del colágeno está compuesta por más de 27 miembros distintos con una gran diversidad funcional. Algunos colágenos cumplen funciones conocidas como proteínas estructurales y otros participan en el control funcional de órganos o tejidos. (Myllyharju and Kivirikko, 2004) Al igual que otras macromoléculas de la matriz, los colágenos son funcionales sólo después de la agregación en superestructuras o compuestos complejos que contienen no sólo varios tipos de colágeno, sino también otros tipos de moléculas. Controlan por lo tanto las interacciones célula-matriz regulando actividades celulares como el crecimiento, la supervivencia, la diferenciación,

la expresión génica, y el metabolismo.(Myllyharju and Kivirikko, 2004, Franzke et al., 2003)

Existe un subgrupo cada vez mayor, las proteínas transmembrana de colágeno, que tienen funciones duales como receptores de superficie celular o como componentes de la matriz. Son proteínas transmembrana que se expresan ampliamente y están involucradas en la adherencia celular, en interacciones epitelio-mesénquima durante la morfogénesis, en la señalización neuromuscular, y en la defensa del huésped contra agentes microbianos. Se pueden asociar con enfermedades genéticas o adquiridas, por ejemplo, epidermolisis bullosa, displasias ectodérmicas, penfigoide ampollar, o la enfermedad de Alzheimer.(Byers, 1989)

En nuestros pacientes aumentan diversos miembros de la familia del colágeno (colágeno Alpha I- III- XIV) tras el tratamiento con HT, lo que se observa de forma paralela con un aumento de la expresión de SPARC descrito en la literatura como parte de la reparación de heridas. El pro colágeno con un discreto aumento de expresión (1,29) no superó el punto de corte establecido en nuestro trabajo (1,3) para considerarse sobreexpresado.

### ***Hsp47 Serpin H1***

La Hsp47 se une específicamente al colágeno y participa como chaperona en la biosíntesis de este. Una característica distintiva de todos los tipos de colágeno es una estructura de triple hélice única formada por repeticiones en tándem de una secuencia de prolina y de hidroxiprolina. Se ha descrito una reducción de los niveles de actividad de Hsp47 en formas recesivas graves de osteogénesis imperfecta.(Widmer et al., 2012)

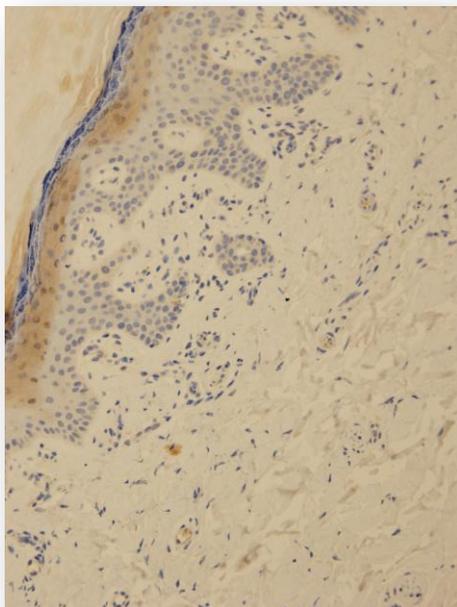
Las serpinas son un grupo numeroso de proteínas con estructuras similares, identificados inicialmente como capaces de inhibir otras enzimas del grupo de las proteasas. El nombre serpina deriva de la combinación de serina proteasa inhibitora—en virtud de sus propiedades funcionales.(Hunt and Dayhoff, 1980) La mayoría de las serpinas controlan por inhibición cascadas proteolíticas catalizadas por enzimas proteasas de la familia de las quimotripsinas, mientras que otras realizan funciones variadas, tales como almacenamiento, proteínas de transporte hormonal y desarrollo de linfocitos B, entre muchas otras. (Korin, 2006) Se emplea el término serpina para estas enzimas no inhibitorias, a pesar de su contradictoria función(Silverman et al., 2001)

En el estudio de Sajjadi (Sajjadi et al., 2013) con el fin de desarrollar terapias eficaces y medir la extensión del daño inducido por laser, cuantifican las proteínas de choque térmico (HSP47 y HSP70), para comprender el papel de las mismas en el daño tisular y en la curación de heridas después de la

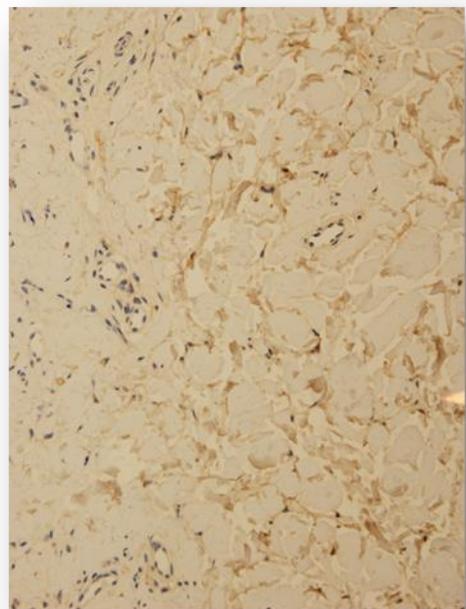
irradiación. Los autores identificaron por inmunohistoquímica y microscopía confocal la extensión del daño y el proceso de cicatrización en el tejido, y describen un aumento de HSP47 que ilustra el proceso de recuperación de los daños inducidos térmicamente. Estos datos concuerdan con nuestros resultados que abalan una recuperación tras el tratamiento tópico de HT del proceso inflamatorio locoregional así como un aumento de la cicatrización de heridas promoviendo la regeneración de colágeno localmente.

**FIGURA 13:** IHQ HSP47 SERPIN H1 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A



B



### ***Thy-1 membrane glycoprotein (CD90)***

El Thy 1 es un receptor de células T, que participa en el proceso de angiogénesis, en el de adhesión célula-célula, en la organización del citoesqueleto y en la regulación negativa de la migración celular.(Schubert et al., 2011)

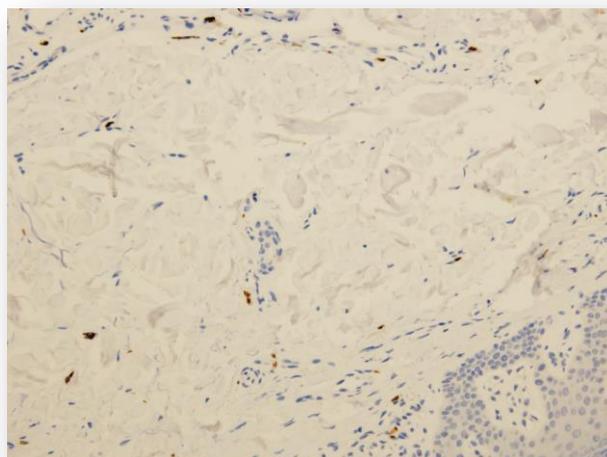
En un estudio reciente (Schmidt et al., 2015) abordan la relevancia de Thy-1 para las funciones de fibroblastos *in vitro* e *in vivo*, demostrando que Thy-1 tiene un papel crucial en el control del crecimiento celular mediante la supresión de la proliferación, la promoción de la apoptosis y la diferenciación de fibroblastos dérmicos.(Schmidt et al., 2015) Los fibroblastos son las células más importantes para la producción, degradación y re-organización de la matriz extracelular y en proporcionar el microambiente del tejido. Por lo tanto, el mantenimiento del equilibrio entre la proliferación celular, la

apoptosis y la diferenciación de los fibroblastos es crucial para la homeostasis tisular, cicatrización de heridas fisiológica, formación de la cicatriz y la prevención de la fibrosis del tejido. Thy-1 es una molécula de adhesión célula-célula inducida por la activación de células endoteliales microvasculares que median la unión y la trans migración de las células mieloides, así como de células tumorales y por lo tanto tiene un papel importante en el control de la inflamación (Schubert et al., 2011). Thy-1 se expresa de forma amplia y constitutivamente en la superficie celular de los fibroblastos.

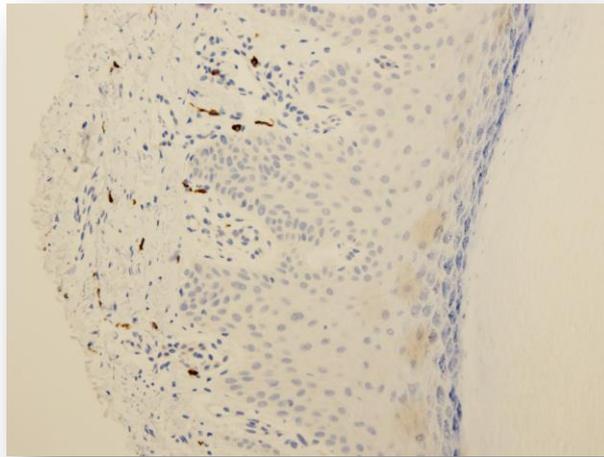
Se han descrito en la literatura numerosos factores, incluyendo factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, citoquinas, y componentes de la matriz involucrados en el estímulo de proliferación celular (Yoneda et al., 1988, Strutz et al., 2001), mientras que la lista de factores conocidos para limitar la proliferación es mucho más corta. Sorprendentemente, se demuestra que Thy-1 tiene un papel crucial en la regulación del crecimiento celular mediante la supresión de la proliferación y la promoción de la apoptosis y la diferenciación de fibroblastos dérmicos y es por lo tanto fundamental para mantener el equilibrio entre la proliferación de fibroblastos y la diferenciación. (Rege and Hagoood, 2006) Concordando con nuestra hipótesis, demostramos que tras el tratamiento con HT no solo se mejora la respuesta inflamatoria locoregional sino que aumentan todos los posibles implicados en restablecer el proceso de maduración y diferenciación favoreciendo la restitución de la apoptosis y homeostasis cutánea.

**FIGURA 14:** IHQ THY1-ACD90 FIGURA A: BASAL FIGURA B:TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A



B



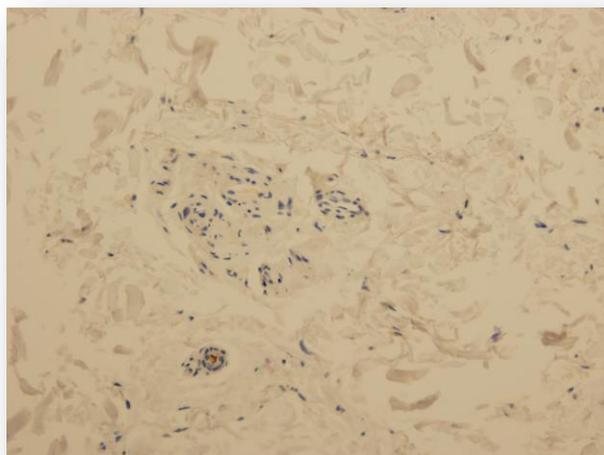
### ***Dermcidin***

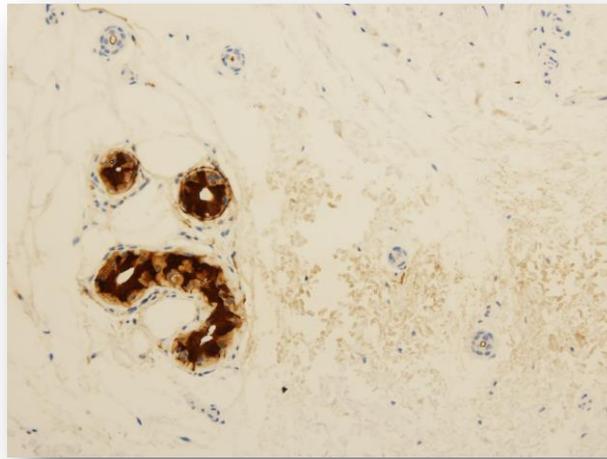
Hace años el grupo de Schitteck descubrió la proteína dermcidin, codificada por un gen expresado en las glándulas sudoríparas ecrinas de los humanos. La proteína se secreta en el sudor, donde es proteolíticamente procesada para dar lugar a péptidos antimicrobianos (PAMPs) con un amplio espectro de actividad. (Schitteck et al., 2008, Wiesner and Vilcinskis, 2010) Debido a su persistencia y abundancia, los péptidos derivados de dermcidin constituye la primera línea de defensa de la piel mediante la construcción de una barrera constante que se superpone al epitelio, especialmente en los sitios del cuerpo que con más probabilidad puedan entrar en contacto con microorganismos patógenos, tales como la cara y las manos. La piel contribuye activamente a la defensa del huésped mediante la activación de una respuesta inmune innata que incluye la producción de PAMPs.(Braff et al., 2005)

El aumento en la expresión de dermcidin en las biopsias tras tratamiento con HT demuestra la participación de la respuesta inmune loco regional como parte del mecanismo fisopatológico del SPP.

**FIGURA 15:** IHQ DERMICIDIN FIGURA A: BASAL FIGURA B:TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A





### **Protein S100**

Es una proteína de unión al calcio y al zinc que desempeña un papel importante en la regulación de los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune. (Lesniak and Graczyk-Jarzynka, 2015) Son pequeñas proteínas codificadas por genes situados en el complejo de la diferenciación epidérmica (EDC). A diferencia de otras proteínas codificadas por estos genes EDC, (*small proline rich (SPRR)*, *late cornified envelope (LCE)*) que son indispensables para la diferenciación epidérmica normal, el papel de las proteínas S100 en la epidermis permanece en gran medida desconocido. El hecho de que su gen se encuentre junto a una organización de genes cuyas proteínas son los productos por excelencia para la diferenciación epidérmica, sugiere que esta proteína puede tener un impacto en la biología de la epidermis también. Este tema es abordado por dos revisiones recientes. (Halawi et al., 2014, Eckert et al., 2004)

Las proteínas S100 difieren en su distribución en las capas epidérmicas. Teniendo en cuenta que cada componente epidérmico consta de células especializadas con funciones bien definidas, esta distribución diferencial puede ser indicativa de funciones diferentes para cada una de las proteínas S100.

Ciertas proteínas S100 están involucradas con la constante renovación y diferenciación epidérmica, mientras que otras en el proceso de curación de heridas. Las funciones extracelulares implican actividad pro inflamatoria, antimicrobiana y actividades inductoras de apoptosis. (Lesniak and Graczyk-Jarzynka, 2015)

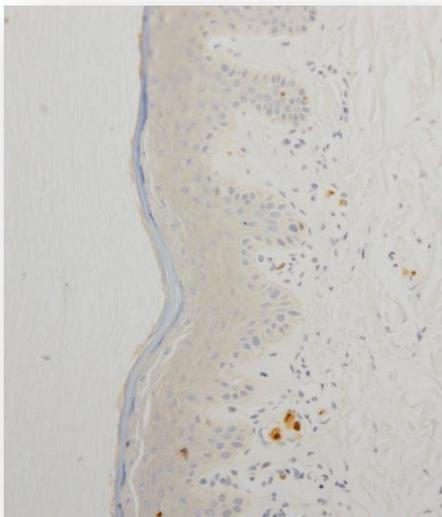
La proteína S100A9 se expresa mínimamente en la epidermis normal. En la psoriasis aumenta junto a la S100A8 y se encuentran localizadas principalmente en la capa basal, espinosa y granular. El efecto quimiotáctico directo de S100A8, S100A9 y el complejo S100A8/A9 sobre diversas células

inmunes determina la inducción de citoquinas pro-inflamatorias por queratinocitos y estimula la producción de mediadores pro-angiogénicos. (Lee et al., 2012)

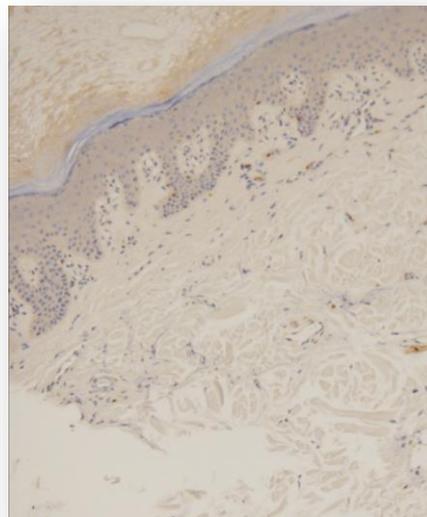
Si bien el mecanismo fisiopatológico del SPP no está totalmente dilucidado, las lesiones cutáneas son semejantes a las encontradas en ciertos tipos de psoriasis (aunque difieren principalmente en la localización anatómica), por lo que podríamos inferir que ciertos mecanismos celulares se encuentren alterados en ambas patologías de forma similar, hecho justificado por la similitud en la expresión de diferentes proteínas como el complejo S100 A8 A9.

**FIGURA 16:** IHQ S100 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A



B



### ***Periostin***

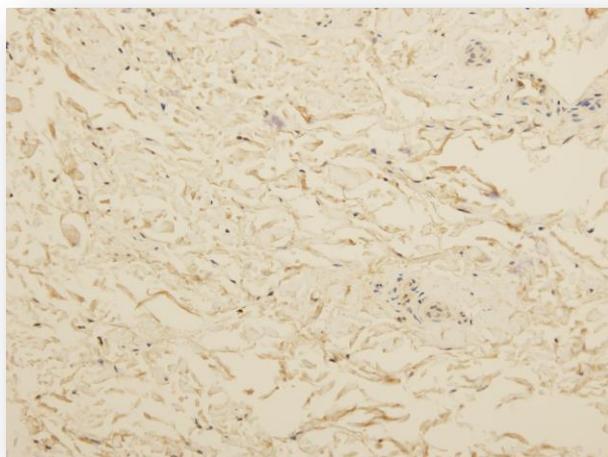
La periostin estimula la cicatrización de heridas. Elliott evidenció el aumento de expresión de periostin al tercer día del proceso de reparación de heridas en la piel murina, donde regula aspectos de la fase proliferativa de la reparación, incluyendo la infiltración de células mesenquimales y la diferenciación de miofibroblastos.(Elliott et al., 2015) En ese estudio se analizó el fenotipo y la expresión de periostin en las heridas crónicas de pacientes diabéticos. Además estudiaron la regulación de esta proteína por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y el factor de crecimiento transformante

$\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) en los fibroblastos de la herida. Las heridas crónicas de la piel tenían un fenotipo pro-inflamatorio caracterizado por la infiltración de macrófagos y neutrófilos e inmunoreactividad por TNF $\alpha$ . Por lo que concluyen que las variaciones en la expresión de periostin, están relacionadas con un microambiente inflamatorio y la presencia de TNF en las heridas crónicas en humanos. La correcta cicatrización se acompañó de un aumento de la expresión de periostin asociada a un incremento de TGF- $\beta 1$  con un descenso de TNF $\alpha$ .

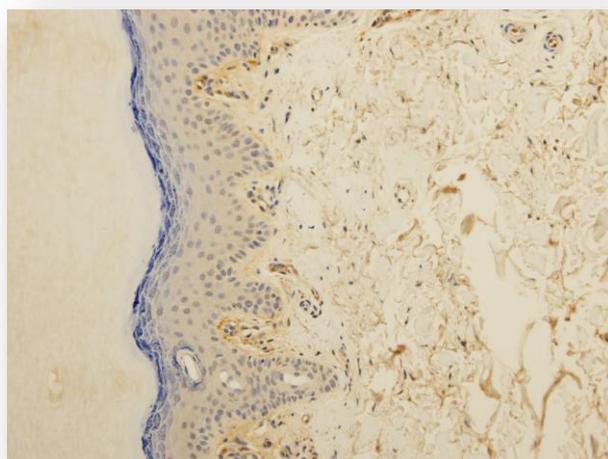
Coincidiendo con los resultados que encontramos en nuestras biopsias el aumento de periostin lo podemos relacionar con la mejoría del proceso inflamatorio loco regional y la reparación de la homeostasis cutánea.

**FIGURA 17:** PERIOSTIN FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A



B



**Stathmin (STMN1)**

La STMN1 es una proteína que desempeña un papel crítico en la regulación de los microtúbulos del citoesqueleto. La sobreexpresión de STMN1 se asoció con la proliferación, la migración, la invasión y la apoptosis de diferentes tipos celulares. (Li et al., 2015). Esta proteína regula la dinámica de los microtúbulos al promover la despolimerización o evitar la polimerización de los heterodímeros de tubulina. En mitosis, los microtúbulos son los encargados de la formación del huso mitótico y por lo tanto, son esenciales para la correcta segregación cromosómica y la división celular.

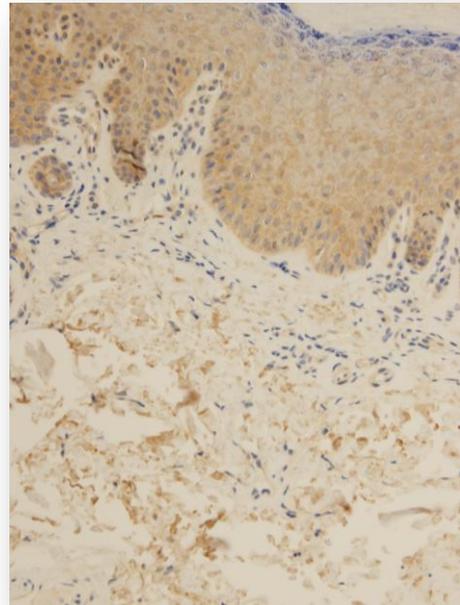
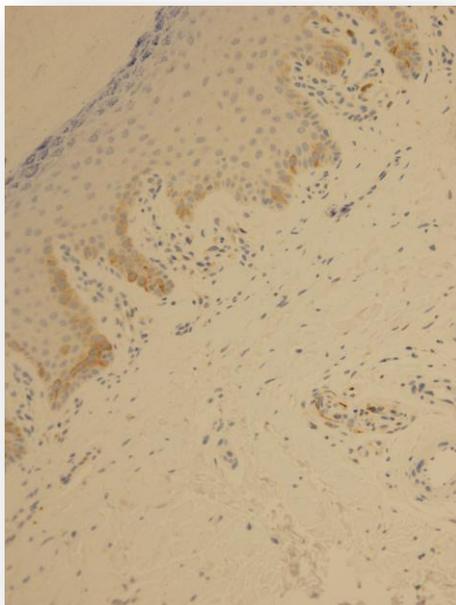
Como resultados de la sobre-expresión de la STMN1 se enlentece el ciclo celular en la fase G2 / M por lo que disminuye la proliferación celular. (Rubin and Atweh, 2004) Tras tres semanas de tratamiento con HT, en las biopsias se aprecia un aumento de expresión de la STMN1, que podría estar relacionado con la respuesta clínica observada de disminución de la hiperqueratosis en nuestros pacientes.

La figura 18 es un ejemplo representativo por IHQ, de la expresión diferencial de STMN1 cuantificada por iTRAQ, en los pacientes antes y después del tratamiento con HT.

**FIGURA 18:** IHQ STMN1 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A

B



### *Caldesmon*

Caldesmon es una proteína de unión a la miosina implicada en la regulación de las interacciones actomiosina en el músculo liso y en células no musculares (podría actuar como un puente entre la miosina y los filamentos de actina). También juega un papel esencial durante la mitosis celular. El caldesmón es una proteína asociada al citoesqueleto que se encuentra en células musculares y se encarga de inhibir las contracciones calcio-dependientes del músculo liso. En las células no musculares, la fosforilación por CDK1 durante la mitosis determina que el caldesmón se disocie de los microfilamentos.

Se ha descrito un aumento de Caldesmon asociado a Actina y a HSP70 en situaciones de lesión tisular sin esclarecer su causa. (Bartegi et al., 1989)

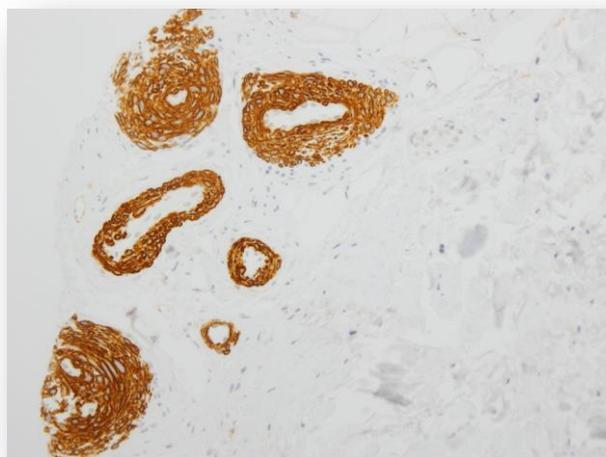
En nuestros pacientes se ha evidenciado un aumento importante en la concentración de Caldesmon que podría corresponderse con un efecto vasodilatador beneficioso de la irrigación loco regional, como se puede observar en las imágenes de IHQ que se encuentran a continuación (figura19).

**FIGURA 19:** IHQ CALDESMON FIGURA A : BASAL. FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO.

A



B



***Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial (Complex III subunit6)***

Este es un componente del complejo c reductasa citocromo-ubiquinol (complejo III o citocromo b-c1), que es parte de la cadena respiratoria mitocondrial. (Liu and Bradner, 1993) Interviene en diferentes procesos biológicos como respuesta al stress y regeneración celular. Su aumento en las biopsias se correlaciona con restablecimiento de la homeostasis cutánea.

***Superoxido dismutase***

Es una enzima proteolítica que destruye los radicales libres con actividad tóxica dentro de la célula. (Miquel et al., 1980) Existe la teoría de que el envejecimiento celular es causado por la acumulación de radicales libres derivados del oxígeno. (Miquel, 1991) Como consecuencia del metabolismo oxidativo normal, las mitocondrias consumen oxígeno, produciendo aniones superóxido. En las células hay un complejo enzimático de defensa con función antioxidante que neutraliza y protege contra el daño de los radicales libres. Estas enzimas incluyen entre otras la dismutasa superóxido (SOD-1) y la manganeso dismutasa (SOD-2). Diferentes investigadores han comprobado el aumento de expresión de la SOD-1 y SOD-2 durante el envejecimiento celular. (Ciriolo et al., 1991, Ku et al., 1993)

Concordando con nuestros hallazgos se deduce que la presencia de una expresión elevada de SOD1 está relacionada con la senescencia celular, aumentando por lo tanto en escenarios de maduración y diferenciación como el de nuestros pacientes después del tratamiento con HT (Al-Sheikh and Ghneim, 2011)

**7.3.2 *PROTEÍNAS CUYA EXPRESIÓN SE ENCUENTRA DISMINUIDA TRAS EL TRATAMIENTO CON HT******SERPINB3 (SCCA1) Serpina B2 o Plasminogen activator inhibitor 2***

Las serpinas son enzimas con capacidad de inhibir a otras enzimas.

Durante el proceso de muerte celular se produce una activación proteolítica mediante dos posibles vías, la vía intrínseca en respuesta al estrés o al daño del DNA, que es mediada por caspasas y la vía extrínseca que es activada por miembros de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF).

El apoptosoma está formado por un complejo de proteínas citoplasmáticas, al que se ensambla el Citocromo c liberado desde la mitocondria en respuesta al daño celular.

Las Serpinas tienen un papel fundamental en la muerte celular y en la tumorigénesis. Algunas de ellas poseen un efecto protector en la célula ya que promueve mecanismos de resistencia frente al TNF $\alpha$  como el SCCA1 y la Serpina B2 relacionada también con la diferenciación de los queratinocitos, por lo tanto modulan la apoptosis celular.(Sheshadri et al., 2014) Hecho relevante en nuestros pacientes ya que las dos enzimas se encuentran disminuidas en las biopsias, lo que podría explicar que la HT tenga una función al inhibir a los inhibidores. De este modo la apoptosis se vería favorecida, y disminuiría la hiperqueratosis tal como lo hemos visto en nuestros pacientes.(Sheshadri et al., 2014) Nuestras observaciones están de acuerdo con lo publicado por Higgins en el 2009 que describe a la Heparina como un cofactor de la función inhibitoria de las Serpinas. (Higgins et al., 2010)

### ***KDAP Keratinocyte differentiation-associated protein***

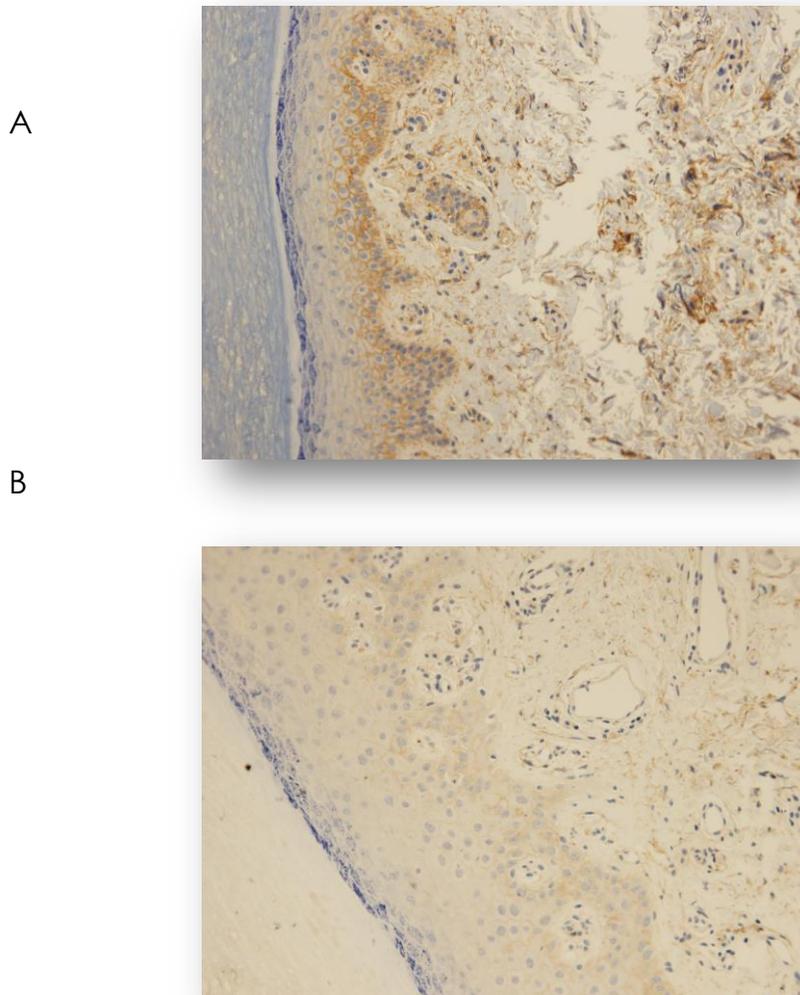
La KDAP fue identificada por primera vez por Oomizu. (Oomizu et al., 2000). Es secretada por los queratinocitos y actúa como un regulador soluble de la diferenciación de los mismos. Desempeña un papel importante en la morfogénesis de la piel embrionaria. La expresión de KDAP se restringe a la capa basal de la epidermis, en cambio su expresión en la piel psoriásica es más difusa, con la participación de capas suprabasales. (Tsuchida et al., 2004) Su expresión está regulada por la diferenciación de los queratinocitos. La KDAP es una proteína soluble hecho importante cuando se pone de manifiesto una importante disminución en su concentración, ya que se podría asociar a los datos clínicos de mejoría relacionada con maduración y o diferenciación de los queratinocitos. Nosotros desconocemos en que capa epidérmica se expresa KDAP en nuestros pacientes, no obstante estos datos parecen indicar una tendencia a la recuperación de la homeostasis epidérmica.

### ***CD9 antigen Tetraspanin***

Tetraspanin CD9 ha sido implicada en diversos procesos celulares y fisiológicos, incluyendo la migración celular. Tiene un importante papel en la diferenciación durante la reparación de heridas, regula la migración aunque su función exacta sigue siendo poco clara.(Penas et al., 2000) Jiang demostró que la expresión de CD9 disminuye durante la migración de los queratinocitos en el proceso de reparación de heridas tanto *in vivo* como *in vitro*. La disminución de la concentración de CD9 promueve la migración de

queratinocitos in vitro, mientras que la sobreexpresión inhibe la migración celular. (Jiang et al., 2013, Zhang et al., 2012) Estos datos coinciden con los hallados en nuestros pacientes.

**FIGURA 20:** IHQ CD9 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.



### ***Keratin***

Las queratinas son proteínas del epitelio, que presentan una gran diversidad molecular. Forman filamentos mediante la unión de queratinas de tipo I y de tipo II. En los seres humanos existen alrededor de 54 genes que codifican queratinas. Se expresan diferencialmente con patrones relacionados con el tipo de epitelio y con las etapas de diferenciación celular. Forman parte del citoesqueleto epitelial, siendo importantes para la estabilidad mecánica y la integridad de las células y los tejidos. Algunas queratinas también tienen funciones reguladoras y participan en vías de señalización intracelular

involucradas por ejemplo, en la protección contra el estrés, la cicatrización de heridas y en la apoptosis. Por otro lado exhiben patrones característicos de expresión en tumores por lo que tienen relevancia en el diagnóstico de carcinomas por Inmunohistoquímica.(Moll et al., 2008)

### ***Keratin, type II cytoskeletal 1 (k1)***

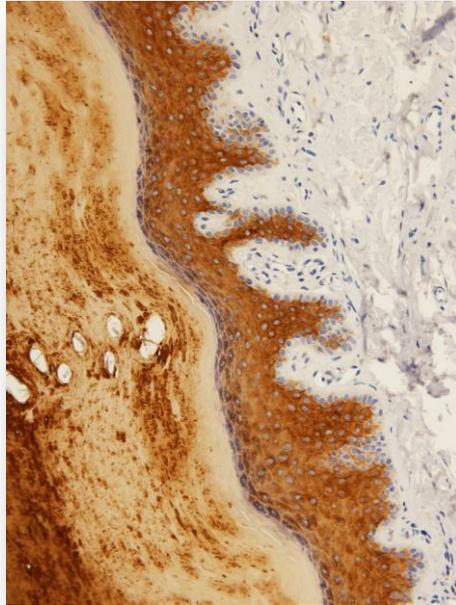
La K1 es una de las principales queratinas de diferenciación de los queratinocitos. En la epidermis, la transición de los queratinocitos de la capa basal (proliferativa) a la capa de células espinosas (suprabasal o post-mitótica) se caracteriza por un cambio profundo en la expresión de queratinas. Las queratinas predominantes expresadas en las células de la capa basal son las K5, K14, K15 y posteriormente la queratina K1 de tipo II y la queratina K10 de tipo I. (Fuchs and Green, 1980, Moll et al., 1982) La K1 es importante en la integridad de la epidermis, subrayado por el hecho de que mutaciones puntuales en K1 y K10 se asocian con trastornos ampollares como las hiperqueratosis epidermolítica bullosa y la eritrodermia ictiosiforme congénita (BCIE). En estas patologías inicialmente se evidencian ampollas en la piel, pero más tardíamente se engrosa y se convierte en una piel ictiótica (Lane and McLean, 2004, Omary et al., 2004) con células suprabasales que se fragmentan fácilmente y además, una epidermis que se convierte en hiperproliferativa e hiperqueratósica.

Las mutaciones en el gen que codifica para K1 (*KRT1*) son notablemente heterogéneas y dan lugar a diversos fenotipos superpuestos, a menudo relativamente compatibles con la vida. (Lane and McLean, 2004).

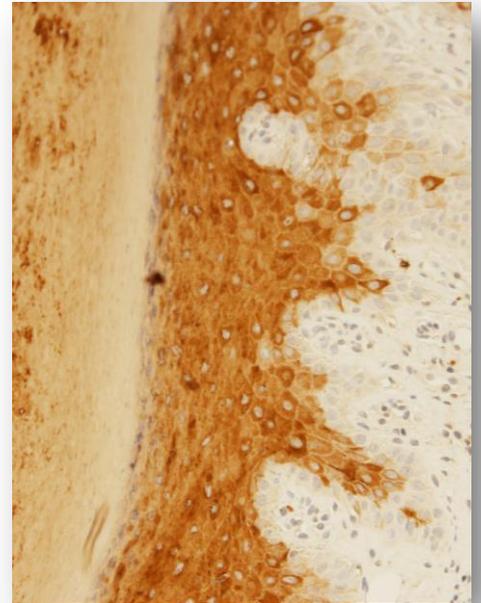
Si bien las K1 y K10 pueden considerarse como "Marcadores" de queratinización de queratinocitos, en nuestros pacientes a diferencia de lo que esperábamos encontrar, se evidencia una importante disminución de sus concentraciones tras el tratamiento. El hecho de que existe una mejoría clínica hace pensar que se restablece la normal diferenciación del epitelio, mecanismo en el que se encuentran implicadas las queratinas, pero que probablemente no se evidencia con exactitud en nuestras biopsias debido a la formación de complejos estables de la queratina con la heparina.

**FIGURA 21:** IHQ K1 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A

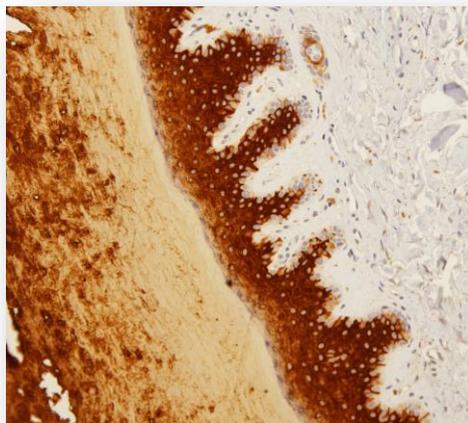


B

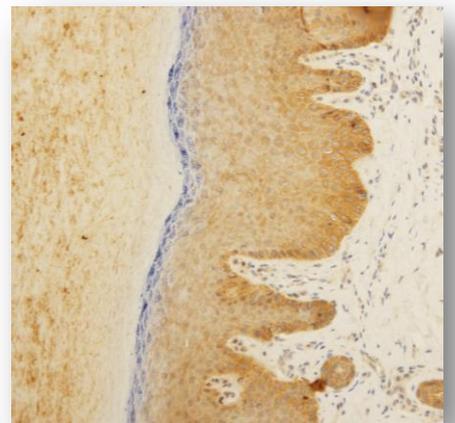


**FIGURA 22:** IHQ K10 FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A



B



### *Filaggrin (FLG)*

La filagrina no sólo proporciona un citoesqueleto para la envoltura córnea a través de la agregación de filamentos de queratina, sino que también contribuye a la hidratación y mantenimiento de la acidez en el estrato córneo. (Sakai et al.)

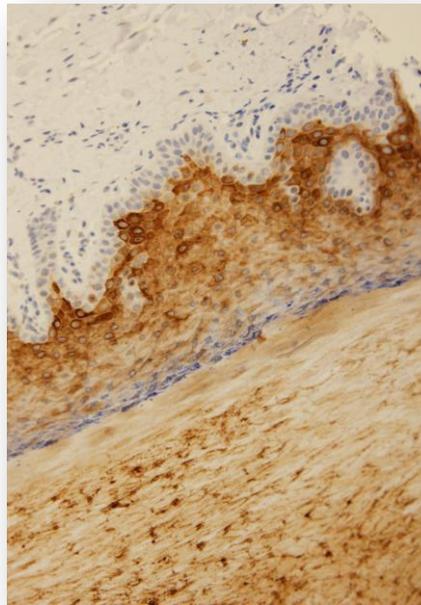
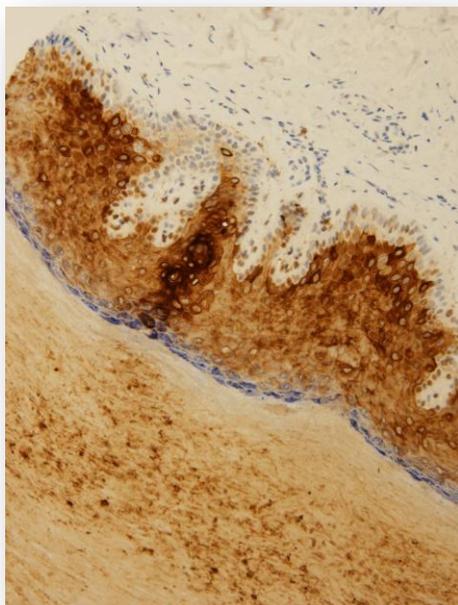
La Filagrina tiene una importante función en la cornificación epidérmica. Esta proteína tiene la propiedad de organizar los filamentos intermedios de queratina en haces en el interior celular, causando el colapso del citoesqueleto y provocando a su vez, cambios en la forma celular hacia estructuras más planas y elípticas. La vida media de la Filagrina es muy corta, aproximadamente de seis horas, lo que indica que estos eventos se producen de forma rápida. La Filagrina es degradada a aminoácidos libres, esenciales para la retención de agua, lo que contribuye a mantener la osmolaridad y flexibilidad de la capa córnea. (Candi et al., 2005, Presland and Dale, 2000)

La disminución de la Filagrina observada en nuestros pacientes tras el tratamiento con HT, podría explicarse por la degradación de la misma a aminoácidos libres, cumpliendo con su cometido en esta epidermis con tendencia a la normalización.

**FIGURA 23:** IHQ FILAGGRIN FIGURA A: BASAL FIGURA B: TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HT.

A

B



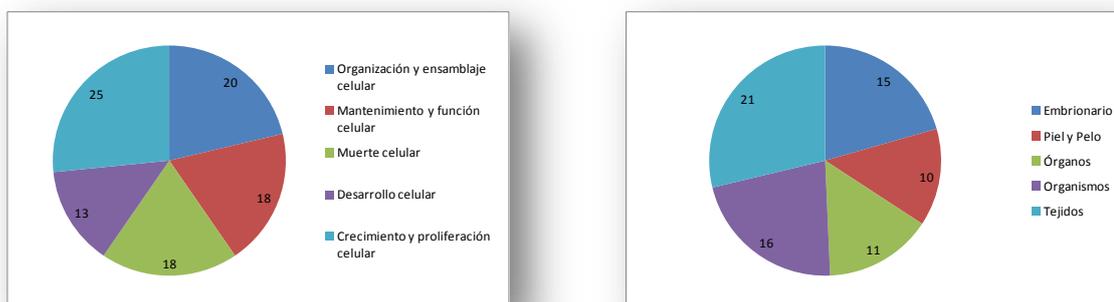
### 7.3.3 DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS DE EXPRESIÓN PROTEICA: ANÁLISIS FUNCIONAL.

En este estudio se han identificado un total de 1876 proteínas (Anexo I) con expresión diferencial en biopsias de piel de pacientes con SPP obtenidas antes y después de recibir tratamiento con HT. En apartados anteriores se ha discutido sobre la relación de estas proteínas con los posibles mecanismos fisiopatogénicos del SPP.

El análisis funcional de los resultados de expresión proteica se llevó a cabo con la herramienta informática Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA). A través de la cual se han generado redes de conexión entre las distintas proteínas identificadas con expresión diferencial en las biopsias pareadas.

En la siguiente figura se puede ver el número de proteínas y las funciones biológicas más relevantes en las cuales están implicadas.

**FIGURA 24** A: FUNCIONES CELULARES Y MOLECULARES B: DESARROLLO Y FUNCIÓN DE SISTEMAS BIOLÓGICOS.

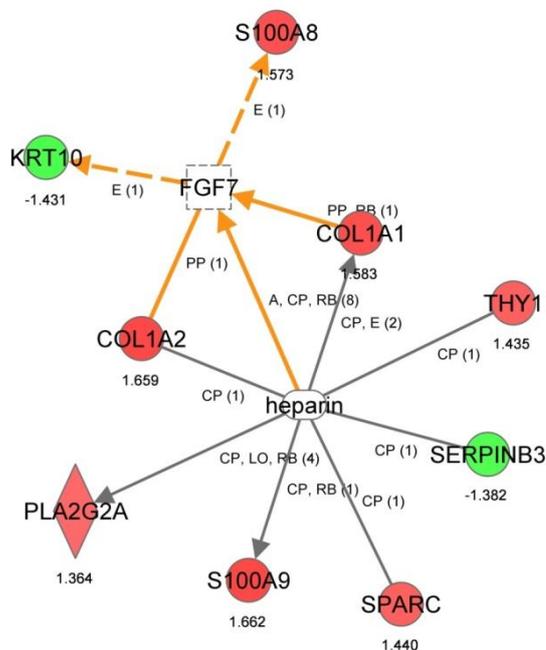


Posteriormente, se utilizaron los valores de expresión diferencial de las proteínas identificadas para generar nuevas redes proteicas de interacción biológica (IPA). En estas redes, las proteínas son representadas como nodos y la relación biológica entre dos nodos se representa como una línea conectora. Todas estas conexiones están corroboradas por al menos una publicación científica de las almacenadas en la base de datos de IPA. La intensidad de color del nodo indica el grado de regulación (rojo: proteínas sobre-expresadas, verde: proteínas con expresión disminuida).

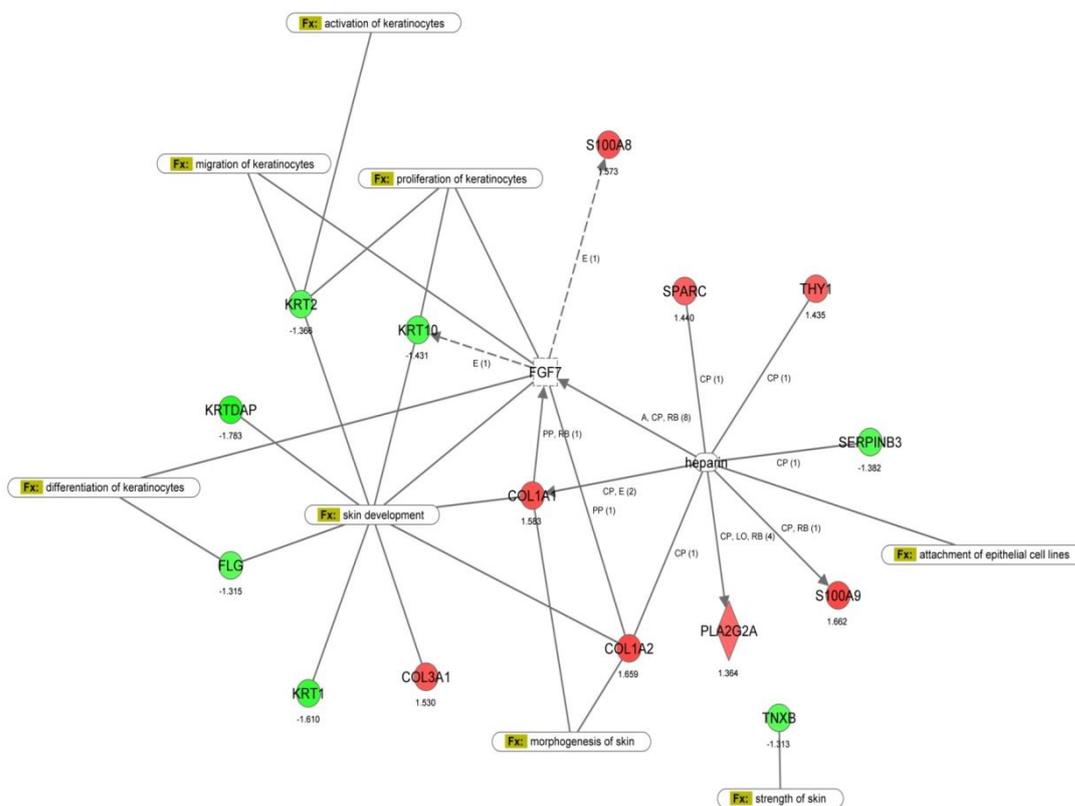
La siguiente imagen muestra la red principal que relaciona el tratamiento de Heparina Tópica con las proteínas expresadas diferencialmente en nuestro

estudio. A partir de esta red principal se ha intentado establecer las relaciones biológicas con el resto de proteínas (Figuras posteriores).

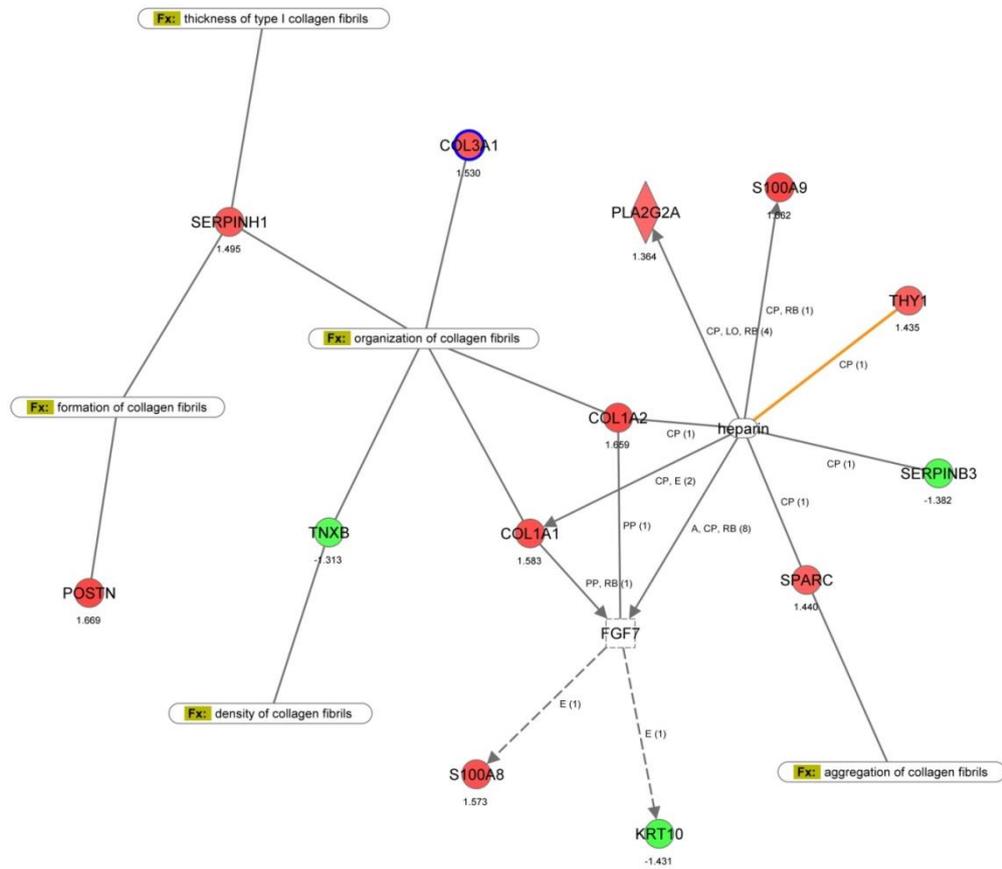
**FIGURA 25:** RED PRINCIPAL DE INTERCONEXIÓN ENTRE LA HEPARINA Y LAS PROTEÍNAS ESTUDIADAS.



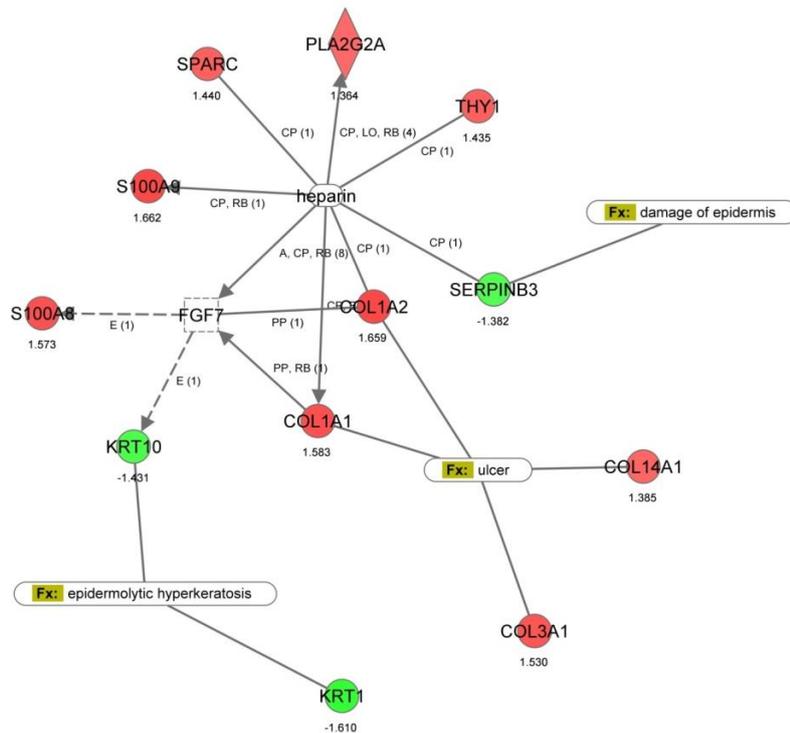
**FIGURA 26:** PROTEÍNAS DE NUESTRO ESTUDIO RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DE LA PIEL Y SUS FUNCIONES.



**FIGURA 27:** PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA ORGANIZACIÓN Y EL ENSAMBLAJE CELULAR.



**FIGURA 28:** PROTEÍNAS RELACIONADAS CON ENFERMEDADES DERMATOLÓGICAS.





En este trabajo, se decidió cuantificar los niveles de expresión de los genes *TYMP* y *DPYD* en sangre periférica de los pacientes incluidos en nuestra cohorte, con el fin de averiguar si existían deficiencias de expresión iniciales que pudieran predisponer al desencadenamiento del SPP, independientemente de la expresión proteica en los tejidos afectados. Por lo cual, se cuantificó la expresión de estas enzimas en la fracción PBMC al inicio y a los 21 días de tratamiento con Heparina Tópica.

En la siguiente tabla se exponen los estadísticos de los niveles de expresión de *TYMP* y *DPYD* en los 21 pacientes incluidos en este estudio.

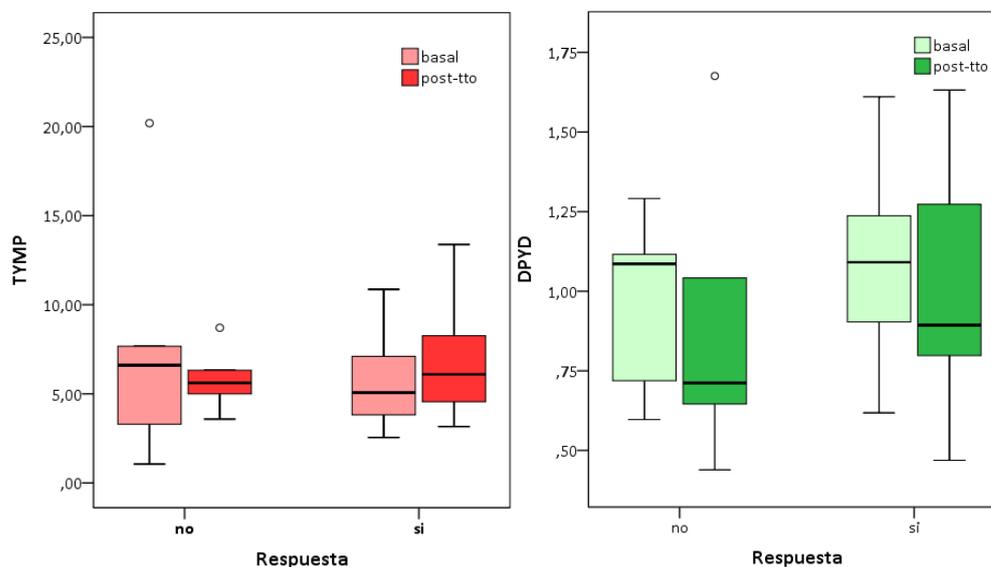
**TABLA 9:** NIVELES DE EXPRESIÓN DE *TYMP* Y *DPYD* EN LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

		<i>TYMP</i> basal	<i>TYMP</i> 3 semanas	<i>DPYD</i> basal	<i>DPYD</i> 3 semanas
Media		6,141	6,656	1,058	0,977
Mediana		5,279	5,811	1,089	0,887
Desviación estándar		4,147	3,067	0,263	0,340
Rango		19,130	10,221	1,014	1,237
Mínimo		1,058	3,165	0,597	0,439
Máximo		20,188	13,386	1,611	1,676
Percentiles	25	3,258	4,553	0,880	0,729
	50	5,279	5,811	1,089	0,887
	75	7,742	7,986	1,241	1,273

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de *TYMP* ni de *DPYD*, antes del tratamiento y tras 21 días de tratamiento con HP ( $P= 0,514$  y  $P= 0,421$  respectivamente, t-Student apareada).

Posteriormente, decidimos dividir la población de estudio en función de su respuesta al tratamiento con HP, estudiando los niveles de expresión de ambos genes y comparándolos entre aquellos pacientes que habían respondido al tratamiento a las 3 semanas y los que no habían obtenido mejora del SPP. La siguiente figura refleja los resultados obtenidos.

**FIGURA 30:** NIVELES DE EXPRESIÓN DE *TYMP* Y *DPYD* DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO, EN FUNCIÓN DE LA RESPUESTA AL INICIO Y TRAS TRES SEMANAS DE TRATAMIENTO CON HEPARINA TÓPICA



Como podemos observar en la Tabla de resultados, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión génica estudiados entre los pacientes que respondieron y los que no respondieron al tratamiento con HT.

**TABLA 10:** DIFERENCIA DE EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE LOS PACIENTES QUE RESPONDIERON Y LOS QUE NO

		Media ± SD	P
<b>TYMP basal</b>	Sin mejoría	7,764 ± 7,427	0,555
	Mejoría	5,600 ± 2,516	
<b>TYMP 3 semanas</b>	Sin mejoría	5,846 ± 1,892	0,512
	Mejoría	6,910 ± 3,361	
<b>DPYD basal</b>	Sin mejoría	0,962 ± 0,291	0,356
	Mejoría	1,091 ± 0,255	
<b>DPYD 3 semanas</b>	Sin mejoría	0,903 ± 0,483	0,589
	Mejoría	1,000 ± 0,299	

SD: desviación estándar

Una posible explicación a estos resultados puede ser el pequeño número de pacientes incluidos en nuestro estudio. Por este motivo, decidimos realizar el estudio de manera cualitativa, agrupando los pacientes en función del

aumento o disminución de la expresión génica tras el tratamiento con HT y relacionándolo con la respuesta al mismo. No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, pero es de destacar que entre los pacientes que obtuvieron un beneficio clínico con el tratamiento de HT, el 75% (11/16) presentaron un aumento de expresión del gen *TYMP*, y el 62,5% (10/16) un descenso en la expresión de *DPYD*.

La enzima TP, que es la principal enzima activadora de Capecitabina, se conoce también con el nombre de factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), y participa en otros procesos biológicos como angiogénesis, invasividad tumoral y apoptosis.(Toi et al., 2005) Niveles de expresión altos de esta proteína se han asociado con un peor pronóstico de la enfermedad, mayor nivel de angiogénesis tumoral y peores efectos secundarios a tratamientos basados en 5-FU.(Milano et al., 2008, Grimminger et al., 2010)

Nuestros resultados con respecto a la expresión génica de *TYMP* no son esclarecedores. Los pacientes que mejoraron de SPP con el tratamiento tenían una menor expresión génica a nivel basal, aunque más aumentada a las 3 semanas de tratamiento que los pacientes que no obtuvieron beneficios del tratamiento con HT. No obstante, dado que TP es también un marcador angiogénico, la toxicidad observada puede estar relacionada no sólo con los productos metabólicos de la Capecitabina, sino también con otros factores como el mayor flujo sanguíneo en las palmas y los pies o el remodelado de la matriz extracelular.(Peters et al., 2000, Bronckaers et al., 2009)

DPD es la principal enzima y limitante de la velocidad del metabolismo de 5-FU y otras fluoropirimidinas. Diversos autores han identificado severas toxicidades en pacientes tratados con 5-FU o Capecitabina que han sido atribuidas a un déficit en la actividad de DPD. Esta actividad disminuida tiene como consecuencia la acumulación de metabolitos intermedios del catabolismo de la Capecitabina, y un prolongado y más alto nivel de 5-FU circulante, que podrían ser los causantes de los efectos adversos observados. Por otro lado, se han identificado diversas mutaciones en el gen *DPYD* que contribuyen a este fenotipo defectuoso en la metabolización de 5-FU, lo que apoya la teoría de que una correcta estratificación de los pacientes en función de sus características genotípicas sería ventajoso para ayudar a prevenir toxicidades no deseadas.(Yen and McLeod, 2007, van Kuilenburg et al., 2003)

En nuestra población de estudio no hemos realizado la secuenciación del gen *DPYD*, no obstante y aunque no hemos encontrado diferencias significativas estadísticamente, sí observamos que la expresión génica de *DPYD* es menor en aquellos pacientes que no han respondido al tratamiento con HT, tanto en la medición basal como en la realizada post-tratamiento ( $0,962 \pm 0,291$  y

0,903  $\pm$  0,483 respectivamente), con respecto a los valores de expresión de *DPYD* obtenidos en los pacientes que sí respondieron al tratamiento con HT (basal= 1,091  $\pm$  0,255; post= 1,000  $\pm$  0,299). Estos datos concuerdan con los anteriormente publicados, en los que una deficiencia en el catabolismo de 5-FU, debido a una menor actividad de DPD, puede originar un SPP más grave y con efectos más prolongados.

# Conclusiones

---



## 8 CONCLUSIONES

En relación con las tres Hipótesis planteadas concluimos lo siguiente:

### Conclusión 1

El uso de Heparina Tópica es un tratamiento eficaz para el Síndrome Palmo Plantar secundario a Capecitabina al restituir la homeostasis cutánea. Revierte los estímulos de hiperqueratosis y el proceso inflamatorio mejora la respuesta inflamatoria loco regional al disminuir la expresión de factores estimulantes de crecimiento y citoquinas. Sin aumentar la toxicidad.

### Conclusión 2

El estudio histopatológico de las biopsias de pacientes con SPP antes de iniciar el tratamiento con heparina tópica y tras tres semanas de tratamiento, mostró una expresión diferencial de proteínas hasta el momento no relacionados con el mecanismo fisiopatológicos del SPP.

### Conclusión 3

No logramos relacionar la expresión génica de Timidina fosforilasa (TP) y Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) en sangre periférica, con la gravedad de SPP.



# Comunicaciones Relacionadas

---



## 9 COMUNICACIONES RELACIONADAS

### **Phase II trial of topical heparin as treatment for patients (pts) with hand-foot syndrome (HFS) induced by Capecitabine (CAP).**

**Meeting:**

2011 ASCO Annual Meeting

**Category:**

Patient and Survivor Care

**Subcategory:**

Supportive Care

**Session Type and Session Title:**

This abstract will not be presented at the 2011 ASCO Annual Meeting but has been published in conjunction with the meeting.

**Abstract Number:**

e19671

**Citation:**

J Clin Oncol 29: 2011 (suppl; abstr e19671)

**Author(s):**

A. A. Rodriguez Garzotto A, L. C. Iglesias Docampo, C. Gravalos Castro, J. A. Lopez-Martin, T. Agullo Ortuno, V. Diaz Garcia, B. Homet, E. M. Ciruelos Gil, L. Manso, C. Mendiola, C. Gomez-Martin, R. Hitt, A. Gomez Camara, H. Cortes-Funes; Medical Oncology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain; Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; Medical Oncology Service, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

**Background:** Molecular physiopathology of HFS induced by CAP is unclear. Interruption or dose reduction of CAP is the only effective strategy. Aims: to evaluate efficacy and safety of a topical heparin Menaven gel® and to analyse expression levels of four biomarkers. **Methods:** This is a Simon 2-stage phase 2 trial: if >3 responses were achieved in the first 12 pts, the study proceeded to its second stage. Key entry criteria: Age >18 years, diagnosis of cancer in treatment with CAP, as single-agent or in combination, and presence of HFS grade (G) 1 or 2 (NCI-CTCAE version 3.0). Topical heparin was administered in palms and soles four times/day for three weeks (w). No other concurrent treatment for HFS was allowed. Physical examination and Visual Analogic Pain Scale (VAS) were assessed at baseline, and weekly. Changes were photographically documented by investigator. Skin biopsies of palms and blood samples were obtained at baseline and after 3w. Expression of thymidine phosphorylase (TP), dihydropyrimidine-dehydrogenase (DPD), Fibroblast Growth Factor (FGF) and Keratinocyte Growth Factor (KGFR) were analyzed by immunohistochemistry (IHC) and immunoperoxidase revelation in skin. TP and DPD mRNA expression was determined by quantitative real-time PCR in

blood samples. **Results:** Between Oct/2010 and Jan/2011, 21 pts were included. So far, 16 pts are evaluable: 6 males, median age 61 y. Breast cancer (n=8), colorectal cancer (n=5) and others (n=3). Baseline HFS was G1 18% and G2 82%. CAP was administered as single-agent (n=4) and combination (n=12). Improvement of HFS was observed in 68% and 75% pts in w3 and 6, respectively. Median VAS decreased from 5,6 at baseline to 1,1 in w3,  $p < 0,001$ . No changes were observed in the skin biopsies. However, high expression of TP was found in conjunction of decreased DPD in blood samples in 12pts with clear response. Definitive results from 21 subjects will be presented at the meeting. **Conclusions:** Our preliminary results suggest that topical heparin may be effective to relief CAP-induced HFS. A study evaluating topic heparin as a preventive therapy of HFS is planned.

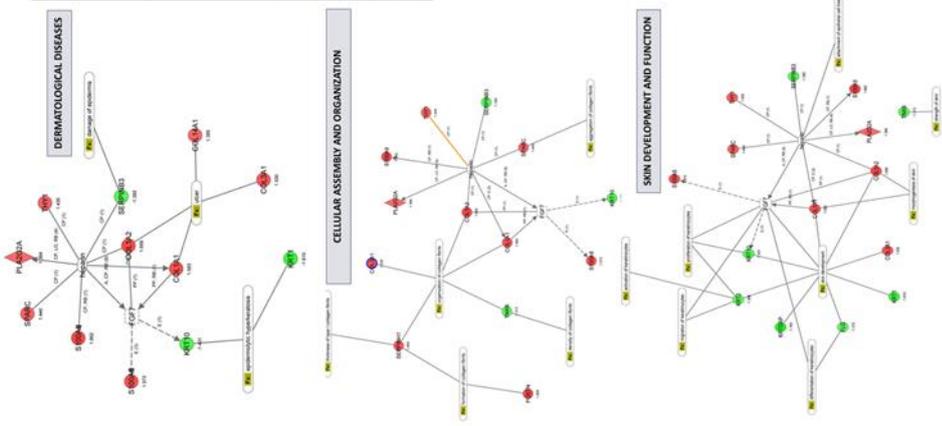
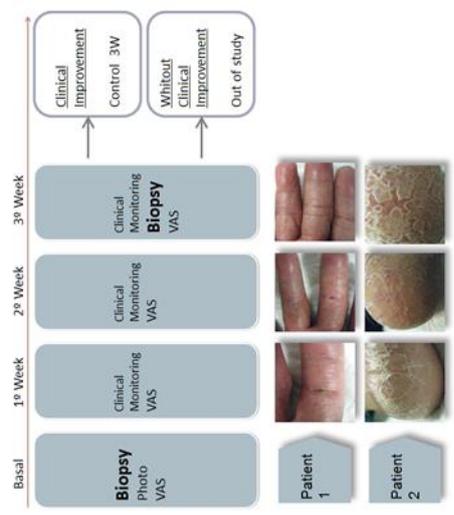
---

**Source URL:** <http://meetinglibrary.asco.org/content/83591-102>

# Differential protein expression profile in skin biopsies from patients with hand-foot syndrome who have benefited from topical heparin treatment.

Rodríguez-Garzo A.<sup>1</sup>, Ruppen I.<sup>2</sup>, Ximénez de Embún MP.<sup>2</sup>, Iglesias L.<sup>1</sup>, Grávalos C.<sup>1</sup>, Agudo-López A.<sup>3</sup>, Pérez C.<sup>3</sup>, Díaz-García CV.<sup>3</sup>, López-Martín JA.<sup>1</sup>, Ciruelos E.<sup>1</sup>, Manso L.<sup>1</sup>, Mendiola C.<sup>1</sup>, Aguiló-Ortuño MT.<sup>3</sup> and Cortés-Funes H.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Department of Medical Oncology, <sup>2</sup> Research Center Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, <sup>3</sup>Tumor Markers Group, Spanish National Cancer Research Center. Corresponding authors: analisa.rodriguez@salud.madrid.org

**Background**  
 Hand-foot syndrome (HFS) is a dose-limiting toxicity of capecitabine (CAP), leading to significant morbidity in patients receiving this agent. Interruption or dose reduction of CAP is the only effective strategy.  
 Molecular pathophysiology of HFS induced by CAP is unclear. The purpose of our study is to define the pathophysiology and risk factors predictors of CAP-induced HFS. Previously, we had conducted a clinical trial in patients who developed HFS secondary to CAP. Topical heparin was administered in palms and soles of patients four times/day for three weeks (W), evidencing clinical improvement in 99% of patients. As a result, patients did not have to stop chemotherapy.  
 Physical examination and Visual Analogic Pain Scale (VAS) were assessed at baseline, and weekly. Changes were photographically documented by investigator.



Gene Name	Protein name	Day 21 vs. Day 0 Ratio	Biological Process
WDR91	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	1.67	Biological Process
POSTN	Protonin	1.67	cell organization and biogenesis; metabolic process; transport
COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	1.58	cell differentiation; cell organization and biogenesis; regulation of biological process
S100A8	Protein S100-A8	1.57	cell communication; cell organization and biogenesis; cellular component movement
DCD	Derecisin	1.53	defense response; metabolic process; response to stimulus
SERPINE1	Serpin H1	1.49	Chaperone in the biosynthetic pathway of collagen
SPARC	SPARC	1.44	Cell growth through interaction extracellular matrix and cytokines
TNNT1	Thy-1 membrane glycoprotein	1.43	cell-cell adhesion; cytoskeleton organization
MBMT	Nicotinamide 8-methyltransferase	1.43	Catalyze the 8-methylation of nicotinamide and other pyridines
STX11	Stathmin	1.38	Involved in the regulation of the microtubule (MT) filament systems by destabilizing microtubules
CALD1	Caldesmon	1.38	It play an essential role during cellular mitosis

Gene Name	Protein name	Day 21 vs. Day 0 Ratio	Biological Process
KIT2DP	Keratinocyte differentiation-associated protein	0.36	Biological Process
MBL1	Keratin, type I cytoskeletal 1	0.36	Biochemical marker of terminal differentiation in keratinocytes
AMPD17	Argonase-related protein 7	0.36	regulation of biological process; response to stimulus, Innate immunity
KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	0.36	Related to hyperkeratosis
SFRP1B1	Serpin B1	0.27	Inhibitor of bone immune response. Related to cellular differentiation
SEI1B1	Interleukin-36 gamma	0.27	It is present in epital barrier. Local inflammatory response
SEI1B2	Serpin B2	0.25	Regulatory protein of protein catabolic process
IL6	Interleukin 6	0.25	Pro-inflammatory cytokine
TGFB	Transformin X	0.26	It is a key interaction between cells and the extracellular matrix
SERPINE2	Matrogen activator inhibitor 2	0.27	Negative regulation of apoptotic process

**Conclusions**  
 Several proteins identified in this study have a close relationship with keratinocyte terminal differentiation and keratinocyte intercellular strength. Also, we describe differential expression among proteins involved in inflammatory processes, skin immunity and cell death. In summary, our study not only served to uncover molecular mechanisms associated with HFS reversion, but also to reveal the biomarker role of several proteins in this syndrome.

**References**  
 -Nagore E, Insa A, Samartin O. Antineoplastic therapy-induced palmar plantar erythrodysesthesia ("hand-foot") syndrome. Incidence, recognition and management. *Am J Clin Dermatol*. 2000 Jul-Aug;1(4):225-34.  
 -Heo YS, Chang HM, Kim TW, Ryu MR, Ahn JH, Kim SS, et al. Hand-foot syndrome in colorectal cancer patients treated with capecitabine: a single-center study. *J Clin Pharmacol*. 2004 Oct;44(10):1166-72.  
 -Liu Y, Wang X, Sood ED, Alizadeh M, et al. Incidence and severity of hand-foot syndrome in white and non-white patients. *J Support Oncol*. 2007 Jul-Aug;5(7):337-43.  
 -Sait MW, Elfray AA. Identifying and treating fluoropyrimidine-associated hand-and-foot syndrome in white and non-white patients. *J Support Oncol*. 2007 Jul-Aug;5(7):337-43.  
 -Gressett SM, Starford BL, Herdewick F. Management of hand-foot syndrome induced by capecitabine. *J Oncol Pharm Pract*. 2006 Sept;13(3):131-41.  
 -Schneibauer W, Blum J. Coming to grips with hand-foot syndrome. Insights from clinical trials evaluating capecitabine. *Oncology (Williston Park)*. 2004 Aug;18(9):1161-8, 73; discussion 73-6, 81-4.



## “Phase IIa Trial Of Topical Heparin As Treatment For Patients (Pts) With Hand-foot Syndrome (Hfs) Induced By Capecitabine (Cap)”

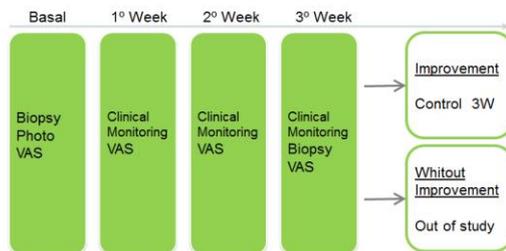
Rodriguez Garzotto A, Iglesias L, Gravalos C, Díaz V, Agulló-Ortuño MT, Ciruelos E, Manso L, Mendiola C, Lopez-Martin J, Cortes-Funes H.

On behalf of the Oncosur Cooperative Cancer Group

Medical Oncology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

### Background

Molecular physiopathology of HFS induced by CAP is unclear. Interruption or dose reduction of CAP is the only effective strategy. Aims: to evaluate efficacy and safety of a topical heparin Menaven gel® and to analyse expression levels of four biomarkers



### Methods

This is a Simon 2-stage phase2 trial: if  $\geq 3$  responses were achieved in the first 12pts, the study proceeded to its second stage. Key entry criteria: Age  $\geq 18$  years, diagnosis of cancer in treatment with CAP, as single-agent or in combination, and presence of HFS grade (G) 1 or 2 (NCI-CTCAE version 3.0). Topical heparin was administered in palms and soles four times/day for three weeks (w). No other concurrent treatment for HFS was allowed.

Physical examination and Visual Analogic Pain Scale (VAS) were assessed at baseline, and weekly. Changes were photographically documented by investigator.

Skin biopsies of palms and blood samples were obtained at baseline and after 3w. Expression of thymidine phosphorylase (TP), dihydropyrimidine-dehydrogenase (DPD), Fibroblast Growth Factor (FGF) and Keratinocyte Growth Factor (KGFR) were analyzed by immunohistochemistry (IHC) and immunoperoxidase revelation in skin. TP and DPD mRNA expression was determined by quantitative real-time PCR in blood samples.

### Conclusions

Our preliminary results suggest that topical heparin may be effective to relief CAP-induced HFS. A study evaluating topic heparin as a preventive therapy of HFS is planned.

### Results

Between Oct/2010 and Jan/2011, 21 pts were included. So far, 16 pts are evaluable: 6 males, median age 61 y. Breast cancer (n=8), colorectal cancer (n=5) and others (n=3). Baseline HFS was G1 18 % and G2 82%. CAP was administered as single-agent (n=4) and combination (n=12). Improvement of HFS was observed in 68% and 75% pts in w3 and 6, respectively. Median VAS decreased from 5,6 at baseline to 1,1 in w3,  $p < 0,001$ . No changes were observed in the skin biopsies. However, high expression of TP was found in conjunction of decreased DPD in blood samples in 12pts with clear response.

HFS

Grades of HFS

VAS

Types Of Cancer

Lines of treatment

VAS

Patient 1

Patient 2

	Manos		Pies	
	N	%	N	%
Dolor	10	58,8	14	82,3
Eritema	17	100,0	17	100,0
Edema	17	100,0	15	88,2
Hiperqueratosis	12	70,6	17	100,0
Ampollas	-	-	2	11,7
Descamación	6	32,3	15	88,2

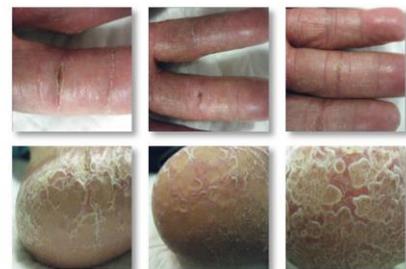
	N	%
Grado 1	3	17,6
Grado 2	14	82,4
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100,0</b>

	N	Media	Mediana	Desv. Tip.	Mínimo	Máximo
EVA	17	5,6	6,0	1,9	2,0	9,0

	N	%
Tipo de cáncer		
Cáncer de mama	8	47,0
Cáncer colorectal	6	35,3
Cáncer gástrico	1	5,9
Adenocarcinoma supraglótico	1	5,9
Páncreas	1	5,9
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100,0</b>

	N	%
1	4	23,5
2	3	17,6
3	4	23,5
Más de 4	6	35,3
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100,0</b>

	EVA	Basal	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 6
Media	5,6	2,8	2,0	1,1	0,9	
Mediana	6,0	2,7	1,7	0,5	0,0	
Desv. Tip.	1,9	2,1	1,9	1,5	1,5	
Mínimo	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Máximo	9,0	7,5	5,0	5,0	4,0	
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>16</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	









# Referencias

---



## 10 REFERENCIAS

- ABUSHULLAIH, S., SAAD, E. D., MUNSELL, 2002. Incidence and severity of hand-foot syndrome in colorectal cancer patients treated with capecitabine: a single-institution experience. *Cancer Invest*, 20, 3-10.
- AKIYAMA, M. & SHIMIZU, H. 2008. An update on molecular aspects of the non-syndromic ichthyoses. *Exp Dermatol*, 17, 373-82.
- AL-SHEIKH, Y. A. & GHNEIM, H. K. 2011. 'The effect of micronutrients on superoxide dismutase in senescent fibroblasts'. *Cell Biochem Funct*, 29, 384-93.
- ALBANESI, C., SCARPONI, C., GIUSTIZIERI, B. 2005. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4, 329-34.
- AMSTUTZ, U., FROELICH, T. K. & LARGIADER, C. R. 2011. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics*, 12, 1321-36.
- ANDEREGG, U., BREITSCHWERDT, K., KOHLER. 2005. MEL4B3, a novel mRNA is induced in skin tumors and regulated by TGF-beta and pro-inflammatory cytokines. *Exp Dermatol*, 14, 709-18.
- ANDREADIS, S. T., HAMOEN, K. E., YARMUSH. 2001. Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system. *FASEB J*, 15, 898-906.
- ARTINON, F., MAYOR, A. & TSCHOPP, J. 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, 27, 229-65.
- BARTEGI, A., FATTOUM, A., DAGOR. 1989. Isolation, characterization and immunocytochemical localization of caldesmon-like protein from molluscan striated muscle. *Eur J Biochem*, 185, 589-95.
- BEARD, J. S., SMITH, K. J. & SKELTON, H. G. 1993. Combination chemotherapy with 5-fluorouracil, folinic acid, and alpha-interferon producing histologic features of graft-versus-host disease. *J Am Acad Dermatol*, 29, 325-30.
- BERNFIELD, M., GOTTE, M., PARK.M. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 68, 729-77.
- BETZ, G., NOWBAKHT, P., IMBODEN. 2001. Heparin penetration into and permeation through human skin from aqueous and liposomal formulations in vitro. *Int J Pharm*, 228, 147-59.
- BLACK, A. P., ARDERN-JONES, M. R., KASPROWICZ. 2007. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol*, 37, 1485-93.
- BOTTARO, D. P., RUBIN, J. S., RON, D. 1990. Characterization of the receptor for keratinocyte growth factor. Evidence for multiple fibroblast growth factor receptors. *J Biol Chem*, 265, 12767-70.
- BOXMAN, I., LOWIK, C., AARDEN. 1993. Modulation of IL-6 production and IL-1 activity by keratinocyte-fibroblast interaction. *J Invest Dermatol*, 101, 316-24.
- BOYMAN, O., CONRAD, C., TONEL, G. 2007. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends Immunol*, 28, 51-7.
- BRADSHAW, A. D., PUOLAKKAINEN, P., DASGUPTA, J. 2003. SPARC-Null Mice Display Abnormalities in the Dermis Characterized by Decreased Collagen Fibril Diameter and Reduced Tensile Strength. *J Invest Dermatol*, 120, 949-955.
- BRADSHAW, A. D., REED, M. J. & SAGE. 2002. SPARC-null mice exhibit accelerated cutaneous wound closure. *J Histochem Cytochem*, 50, 1-10.
- BRAFF, M. H., BARDAN, A., NIZET, V. 2005. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol*, 125, 9-13.

- BREKKEN, R. A., PUOLAKKAINEN, P., GRAVES, D. C. 2003. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest*, 111, 487-95.
- BRONCKAERS, A., GAGO, F., BALZARINI. 2009. The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy. *Med Res Rev*, 29, 903-53.
- BROWN, M. B., HANPANITCHAROEN, M. & MARTIN. 2001. An in vitro investigation into the effect of glycosaminoglycans on the skin partitioning and deposition of NSAIDs. *Int J Pharm*, 225, 113-21.
- BYERS, P. H. 1989. Inherited disorders of collagen gene structure and expression. *Am J Med Genet*, 34, 72-80.
- CANDI, E., SCHMIDT, R. & MELINO, G. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 328-40.
- CIRIOLO, M. R., FISKIN, K., DE MARTINO, A. 1991. Age-related changes in Cu,Zn superoxide dismutase, Se-dependent and -independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mech Ageing Dev*, 61, 287-97.
- CROWSON, A. N. & MAGRO, C. M. 1999. Recent advances in the pathology of cutaneous drug eruptions. *Dermatol Clin*, 17, 537-60, viii.
- CHALERMCHAI, T., TANTIPHLACHIVA, K., SUWANRUSME, H. 2010. Randomized trial of two different doses of pyridoxine in the prevention of capecitabine-associated palmar-plantar erythrodysesthesia. *Asia Pac J Clin Oncol*, 6, 155-60.
- CHENG, J. B. & CHO, R. J. 2012. Genetics and epigenetics of the skin meet deep sequence. *J Invest Dermatol*, 132, 923-32.
- CHILDRESS, J. & LOKICH, J. 2003. Cutaneous hand and foot toxicity associated with cancer chemotherapy. *Am J Clin Oncol*, 26, 435-6.
- CHONG, Z. Z., LIN, S. H. & MAIESE, K. 2002. Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *J Vasc Res*, 39, 131-47.
- DE GOEIJ, M., STEEGERS, M. A., VELDHOVEN, C. M. 2015. [Measuring pain is useful and every doctor can do it: 7 tips]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 159, A8276.
- DEGEN, A., ALTER, M., SCHENCK, F. 2010. The hand-foot-syndrome associated with medical tumor therapy - classification and management. *J Dtsch Dermatol Ges*, 8, 652-61.
- DEL RE, M., MICHELUCCI, A., DI LEO, A. 2015. Discovery of novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene associated with toxicity of fluoropyrimidines and viewpoint on preemptive pharmacogenetic screening in patients. *EPMA J*, 6, 17.
- DIDANGELOS, A., YIN, X., MANDAL, K. 2010. Proteomics characterization of extracellular space components in the human aorta. *Mol Cell Proteomics*, 9, 2048-62.
- ECKERT, R. L., BROOME, A. M., RUSE, M. 2004. S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol*, 123, 23-33.
- ECKES, B., ZIGRINO, P., KESSLER, D. 2000. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol*, 19, 325-32.
- ELLIOTT, C. G., FORBES, T. L., LEASK, A. 2015. Inflammatory microenvironment and tumor necrosis factor alpha as modulators of periostin and CCN2 expression in human non-healing skin wounds and dermal fibroblasts. *Matrix Biol*, 43, 71-84.
- ENSLEY, J. F., PATEL, B., KLONER, R. 1989. The clinical syndrome of 5-fluorouracil cardiotoxicity. *Invest New Drugs*, 7, 101-9.
- FARR, K. P. & SAFWAT, A. 2011. Palmar-plantar erythrodysesthesia associated with chemotherapy and its treatment. *Case Rep Oncol*, 4, 229-35.
- FARRELL, C. L., REX, K. L., CHEN, J. N. 2002. The effects of keratinocyte growth factor in preclinical models of mucositis. *Cell Proliferation*, 35, 78-85.
- FERRAO, A. V. & MASON, R. M. 1993. The effect of heparin on cell proliferation and type-I collagen synthesis by adult human dermal fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1180, 225-30.
- FERRERO, D., CARLESSO, N., GALLO, E. 1991. CD9 antigen on acute non-lymphoid leukemia cells: preferential expression by promyelocytic (M3) subtype. *Leuk Res*, 15, 457-61.

- FERRERO, J., LASSALLE, S., MARI, M. Hand-foot syndrome (HFS) in patients receiving capecitabine: a pharmacological explanation. ASCO Annual Meeting Proceedings, 2006. 2019.
- FFRENCH-CONSTANT, C., VAN DE WATER, L., DVORAK, H. 1989. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol*, 109, 903-14.
- FISCHER, J. L., FORMENTO, P., CICCOLINI, J. 2004. Lack of contribution of dihydrofluorouracil and alpha-fluoro-beta-alanine to the cytotoxicity of 5'-deoxy-5-fluorouridine on human keratinocytes. *Anticancer Drugs*, 15, 969-74.
- FITZPATRICK, J. E. 1993. The cutaneous histopathology of chemotherapeutic reactions. *J Cutan Pathol*, 20, 1-14.
- FORSTEN, K. E., FANNON, M. & NUGENT, M. A. 2000. Potential mechanisms for the regulation of growth factor binding by heparin. *J Theor Biol*, 205, 215-30.
- FRANZKE, C. W., TASANEN, K., SCHUMANN, J. 2003. Collagenous transmembrane proteins: collagen XVII as a prototype. *Matrix Biol*, 22, 299-309.
- FUCHS, E. & GREEN, H. 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19, 1033-42.
- FUCHS, E. & RAGHAVAN, S. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet*, 3, 199-209.
- GERBER, B. O., ZANNI, M. P., UGUCCIONI, M. 1997. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr Biol*, 7, 836-43.
- GILLIET, M. & LANDE, R. 2008. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol*, 20, 401-7.
- GOLDRING, S. R., STEPHENSON, M. L., DOWNIE, E. 1990. Heterogeneity in hormone responses and patterns of collagen synthesis in cloned dermal fibroblasts. *J Clin Invest*, 85, 798-803.
- GOLSTEIN, P. & KROEMER, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32, 37-43.
- GOTTE, M. 2003. Syndecans in inflammation. *FASEB J*, 17, 575-91.
- GRESSETT, S. M., STANFORD, B. L. & HARDWICKE, F. 2006. Management of hand-foot syndrome induced by capecitabine. *J Oncol Pharm Pract*, 12, 131-41.
- GRIMMINGER, P. P., SCHNEIDER, P. M., METZGER, R. 2010. Low thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression correlate with prolonged survival in resected non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 11, 328-34.
- GUILLEM, V., HERNANDEZ-BOLUDA, J. C., GALLARDO, D. 2013. A polymorphism in the TYMP gene is associated with the outcome of HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol*, 88, 883-9.
- HALAWI, A., ABBAS, O. & MAHALINGAM, M. 2014. S100 proteins and the skin: a review. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 28, 405-14.
- HAMADA, T., TSURUTA, D., FUKUDA, S. 2013. How do keratinizing disorders and blistering disorders overlap? *Exp Dermatol*, 22, 83-7.
- HAN, H., PAPPIN, D. J., ROSS, P. L. 2008. Electron transfer dissociation of iTRAQ labeled peptide ions. *J Proteome Res*, 7, 3643-8.
- HEO, Y. S., CHANG, H. M., KIM, T. W. 2004. Hand-foot syndrome in patients treated with capecitabine-containing combination chemotherapy. *J Clin Pharmacol*, 44, 1166-72.
- HIGGINS, W. J., FOX, D. M., KOWALSKI, P. S. 2010. Heparin enhances serpin inhibition of the cysteine protease cathepsin L. *J Biol Chem*, 285, 3722-9.
- HSU, E., OSSLUND, T., NYBO, R., CHEN, B. L., KENNEY, W. C., MORRIS, C. F., ARAKAWA, T. & NARHI, L. O. 2006. Enhanced stability of recombinant keratinocyte growth factor by mutagenesis. *Protein Eng Des Sel*, 19, 147-53.
- HSU, Y. R., NYBO, R., SULLIVAN, J. K. 1999. Heparin is essential for a single keratinocyte growth factor molecule to bind and form a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor. *Biochemistry*, 38, 2523-34.

- HUNT, L. T. & DAYHOFF, M. O. 1980. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 95, 864-71.
- HUNZIKER, T., KUNZI, U. P., BRAUNSCHWEIG, S. 1997. Comprehensive hospital drug monitoring (CHDM): adverse skin reactions, a 20-year survey. *Allergy*, 52, 388-93.
- HURWITZ, H. I., UPPAL, N., WAGNER, S. A. 2015. Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Ruxolitinib or Placebo in Combination With Capecitabine in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer for Whom Therapy With Gemcitabine Has Failed. *J Clin Oncol*.
- ISHIDA-YAMAMOTO, A., IGAWA, S. & KISHIBE, M. 2011. Order and disorder in corneocyte adhesion. *J Dermatol*, 38, 645-54.
- ISHIKAWA, F., MIYAZONO, K., HELLMAN, U. 1989. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature*, 338, 557-562.
- JACOBI, U., TASSOPOULOS, T., SURBER, C. 2006. Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch Dermatol Res*, 297, 303-10.
- JANEWAY, C. A., JR. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1, 1-13.
- JIANG, X. P., ZHANG, D. X., TENG, M. 2013. Downregulation of CD9 in keratinocyte contributes to cell migration via upregulation of matrix metalloproteinase-9. *PLoS One*, 8, e77806.
- JORPES, J. E. & GARDELL, S. 1948. On heparin monosulfuric acid. *J Biol Chem*, 176, 267-76.
- JUNG, M., PESHEVA, P., SCHACHNER, M. 1993. Astrocytes and neurons regulate the expression of the neural recognition molecule janusin by cultured oligodendrocytes. *Glia*, 9, 163-75.
- KANAT, O., BASKAN, B. E., KURT, E. 2007. Successful treatment of palmar-plantar erythrodysesthesia possibly due to temozolomide with dexamethasone. *J Postgrad Med*, 53, 146.
- KARA, I. O., SAHIN, B. & ERKISI, M. 2006. Palmar-plantar erythrodysesthesia due to docetaxel-capecitabine therapy is treated with vitamin E without dose reduction. *Breast*, 15, 414-24.
- KORIN, J. 2006. Antitrombina: 25 años después: Un tributo a una permanente fuente de conocimiento en Hemostasia. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 40, 299-305.
- KU, H. H., BRUNK, U. T. & SOHAL, R. S. 1993. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med*, 15, 621-7.
- LAI, S. E., KUZEL, T. & LACOUTURE, M. E. 2007. Hand-foot and stump syndrome to sorafenib. *J Clin Oncol*, 25, 341-3.
- LANDE, R., GREGORIO, J., FACCHINETTI, V. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 449, 564-9.
- LANE, E. B. & MCLEAN, W. H. 2004. Keratins and skin disorders. *J Pathol*, 204, 355-66.
- LEBRE, M. C., VAN DER AAR, A. M., VAN BAARSEN, L. 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*, 127, 331-41.
- LEE, Y., JANG, S., MIN, J. K., LEE, K. 2012. S100A8 and S100A9 are messengers in the crosstalk between epidermis and dermis modulating a psoriatic milieu in human skin. *Biochem Biophys Res Commun*, 423, 647-53.
- LESNIAK, W. & GRACZYK-JARZYŃKA, A. 2015. The S100 proteins in epidermis: Topology and function. *Biochim Biophys Acta*.
- LEVY, E., PIEDBOIS, P., BUYSE, M. 1998. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *J Clin Oncol*, 16, 3537-41.
- LI, X., WANG, L., LI, T. 2015. STMN1 overexpression correlates with biological behavior in human cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*.

- LIPPENS, S., DENECKER, G., OVAERE, P. 2005. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1497-508.
- LIU, A. Y. & BRADNER, R. C. 1993. Elevated expression of the human mitochondrial hinge protein gene in cancer. *Cancer Res*, 53, 2460-5.
- LOWES, M. A., BOWCOCK, A. M. & KRUEGER, J. G. 2007. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445, 866-73.
- MAAS-SZABOWSKI, N., STARK, H. J. & FUSENIG, N. E. 2000. Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 114, 1075-84.
- MALET-MARTINO, M. & MARTINO, R. 2002. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review. *Oncologist*, 7, 288-323.
- MARTÍ, V., MONELL, J., SEIXO, F. 2008. Síndrome coronario agudo durante la monoterapia oral con capecitabina. *Revista Española de Cardiología*, 61, 548-549.
- MARTIN, M., RUIZ SIMON, A., RUIZ BORREGO, M. 2015. Epirubicin Plus Cyclophosphamide Followed by Docetaxel Versus Epirubicin Plus Docetaxel Followed by Capecitabine As Adjuvant Therapy for Node-Positive Early Breast Cancer: Results From the GEICAM/2003-10 Study. *J Clin Oncol*.
- MARTINON, F., MAYOR, A. & TSCHOPP, J. 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, 27, 229-65.
- MCKINLEY-GRANT, L. J., IDLER, W. W., BERNSTEIN, I. A. 1989. Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 4848-52.
- MCLELLAN, B., CIARDIELLO, F., LACOUTURE, M. E. 2015. Regorafenib-associated hand-foot skin reaction: practical advice on diagnosis, prevention, and management. *Ann Oncol*.
- MERCIER, C. & CICCOLINI, J. 2006. Profiling dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in patients with cancer undergoing 5-fluorouracil/capecitabine therapy. *Clin Colorectal Cancer*, 6, 288-96.
- MERK, H. F., BARON, J., KAWAKUBO, Y. 1998. Metabolites and allergic drug reactions. *Clin Exp Allergy*, 28 Suppl 4, 21-4.
- MILANO, G., ETIENNE-GRIMALDI, M. C., MARI, M., LASSALLE, S. 2008. Candidate mechanisms for capecitabine-related hand-foot syndrome. *Br J Clin Pharmacol*, 66, 88-95.
- MILLER, L. S. & MODLIN, R. L. 2007. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *J Invest Dermatol*, 127, 262-3.
- MIQUEL, J. 1991. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr*, 12, 99-117.
- MIQUEL, J., ECONOMOS, A. C., FLEMING, J. 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*, 15, 575-91.
- MIWA, M., URA, M., NISHIDA, M. 1998. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer*, 34, 1274-81.
- MOLL, R., DIVO, M. & LANGBEIN, L. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129, 705-33.
- MOLL, R., MOLL, I. & WIEST, W. 1982. Changes in the pattern of cytokeratin polypeptides in epidermis and hair follicles during skin development in human fetuses. *Differentiation*, 23, 170-8.
- MYLLYHARJU, J. & KIVIRIKKO, K. I. 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet*, 20, 33-43.
- NAGORE, E., INSA, A. & SANMARTIN, O. 2000. Antineoplastic therapy-induced palmar plantar erythrodysesthesia ('hand-foot') syndrome. Incidence, recognition and management. *Am J Clin Dermatol*, 1, 225-34.
- NARASIMHAN, P., NARASIMHAN, S., HITTI, I. 2004. Serious hand-and-foot syndrome in black patients treated with capecitabine: report of 3 cases and review of the literature. *Cutis*, 73, 101-6.

- NESTLE, F. O., DI MEGLIO, P., QIN, J. Z. 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9, 679-91.
- NICKOLOFF, B. J. & TURKA, L. A. 1994. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today*, 15, 464-9.
- OLSEN, J. V., DE GODOY, L. M., LI, G. 2005. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics*, 4, 2010-21.
- OMARY, M. B., COULOMBE, P. A. & MCLEAN, W. H. 2004. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med*, 351, 2087-100.
- OOMIZU, S., SAHUC, F., ASAHINA, K. 2000. Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium. *Gene*, 256, 19-27.
- OREMUS, M., HANSON, M. D., WHITLOCK, R. 2007. A systematic review of heparin to treat burn injury. *J Burn Care Res*, 28, 794-804.
- PAPANASTASOPOULOS, P. & STEBBING, J. 2014. Molecular basis of 5-fluorouracil-related toxicity: lessons from clinical practice. *Anticancer Res*, 34, 1531-5.
- PARISEL, C., SAFFAR, L., GATTEGNO, L. 2003. Interactions of heparin with human skin cells: binding, location, and transdermal penetration. *J Biomed Mater Res A*, 67, 517-23.
- PENAS, P. F., GARCIA-DIEZ, A., SANCHEZ-MADRID. 2000. Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration. *J Invest Dermatol*, 114, 1126-35.
- PETERS, G. J., DE BRUIN, M., FUKUSHIMA, M. 2000. Thymidine phosphorylase in angiogenesis and drug resistance. Homology with platelet-derived endothelial cell growth factor. *Adv Exp Med Biol*, 486, 291-4.
- PICHLER, W. J., YAWALKAR, N., BRITSCHGI, M. 2002. Cellular and molecular pathophysiology of cutaneous drug reactions. *Am J Clin Dermatol*, 3, 229-38.
- PILLAI, S., GILLIAM, L., CONRAD, H. E. 1994. Heparin and Its Non-Anticoagulant Analogues Inhibit Human Keratinocyte Growth Without Inducing Differentiation. *J Investig Dermatol*, 103, 647-650.
- PONTIGGIA, L., BIEDERMANN, T., MEULI, M. 2009. Markers to evaluate the quality and self-renewing potential of engineered human skin substitutes in vitro and after transplantation. *J Invest Dermatol*, 129, 480-90.
- POPESCU, N. C., BOWDEN, P. E. & DIPAOLO, J. A. 1989. Two type II keratin genes are localized on human chromosome 12. *Hum Genet*, 82, 109-12.
- PRESLAND, R. B. & DALE, B. A. 2000. Epithelial Structural Proteins of the Skin and Oral Cavity: Function in Health and Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11, 383-408.
- PROKSCH, E., BRANDNER, J. M. & JENSEN, J. M. 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 17, 1063-72.
- QI, Y., CHIU, J. F., WANG, L. 2005. Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Proteomics*, 5, 2960-71.
- RAJA, SIVAMANI, K., GARCIA, M. S. & ISSEROFF, R. R. 2007. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci*, 12, 2849-68.
- RAPPILBER, J., ISHIHAMA, Y. & MANN, M. 2003. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem*, 75, 663-70.
- REGE, T. A. & HAGOOD, J. S. 2006. Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 991-9.
- REILLY, T. P., LASH, L. H., DOLL, M. A. 2000. A role for bioactivation and covalent binding within epidermal keratinocytes in sulfonamide-induced cutaneous drug reactions. *J Invest Dermatol*, 114, 1164-73.
- RUBIN, C. I. & ATWEH, G. F. 2004. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem*, 93, 242-50.

- SAIF, M. W. & ELFIKY, A. A. 2007. Identifying and treating fluoropyrimidine-associated hand-and-foot syndrome in white and non-white patients. *J Support Oncol*, 5, 337-43.
- SAJJADI, A. Y., MITRA, K. & GRACE, M. 2013. Expression of heat shock proteins 70 and 47 in tissues following short-pulse laser irradiation: assessment of thermal damage and healing. *Med Eng Phys*, 35, 1406-14.
- SAKAI, T., HATANO, Y., ZHANG, W. 2007. Knockdown of either filaggrin or loricrin increases the productions of interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-8, IL-18 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in stratified human keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*.
- SALIBA, M. J., JR. 2001. Heparin in the treatment of burns: a review. *Burns*, 27, 349-58.
- SCOTTE, F., TOURANI, J. M., BANU, E. 2005. Multicenter study of a frozen glove to prevent docetaxel-induced onycholysis and cutaneous toxicity of the hand. *J Clin Oncol*, 23, 4424-9.
- SCHEITHAUER, W. & BLUM, J. 2004. Coming to grips with hand-foot syndrome. Insights from clinical trials evaluating capecitabine. *Oncology (Williston Park)*, 18, 1161-8, 1173; discussion 1173-6, 1181-4.
- SCHITTEK, B., PAULMANN, M., SENYUREK, I. 2008. The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets*, 8, 135-43.
- SCHMIDT, M., GUTKNECHT, D., SIMON, J. C. 2015. Controlling the Balance of Fibroblast Proliferation and Differentiation: Impact of Thy-1. *J Invest Dermatol*, 135, 1893-902.
- SCHNEIDER, C. H. & DE WECK, A. L. 1965. A new chemical spect of penicillin allergy: the direct reaction of penicillin with epsilon-amino-groups. *Nature*, 208, 57-9.
- SCHUBERT, K., POLTE, T., BONISCH, U. 2011. Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation. *Eur J Immunol*, 41, 645-56.
- SECHLER, J. L. & SCHWARZBAUER, J. E. 1998. Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. *J Biol Chem*, 273, 25533-6.
- SERRE, G., MILS, V., HAFTEK, M., VINCENT, C. 1991. Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J Invest Dermatol*, 97, 1061-72.
- SHESHADRI, N., CATANZARO, J. M., BOTT, A. J., SUN, Y., ULLMAN, E., CHEN, E. I., PAN, J. A., WU, S., CRAWFORD, H. C., ZHANG, J. & ZONG, W. X. 2014. SCCA1/SERPINB3 promotes oncogenesis and epithelial-mesenchymal transition via the unfolded protein response and IL6 signaling. *Cancer Res*, 74, 6318-29.
- SHINOHARA, N., NONOMURA, N., ETO, M. 2014. A randomized multicenter phase II trial on the efficacy of a hydrocolloid dressing containing ceramide with a low-friction external surface for hand-foot skin reaction caused by sorafenib in patients with renal cell carcinoma. *Ann Oncol*, 25, 472-6.
- SILVERMAN, G. A., BIRD, P. I., CARRELL, R. W. 2001. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem*, 276, 33293-6.
- SMOLA, H., THIEKOTTER, G. & FUSENIG, N. E. 1993. Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J Cell Biol*, 122, 417-29.
- SOBEL, A. 1991. Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends Biochem Sci*, 16, 301-5.
- SON, H. S., LEE, W. Y., LEE, W. S. 2009. Compliance and effective management of the hand-foot syndrome in colon cancer patients receiving capecitabine as adjuvant chemotherapy. *Yonsei Med J*, 50, 796-802.
- SORRELL, J. M., BABER, M. A. & CAPLAN, A. I. 2007. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. *Cell Tissue Res*, 327, 499-510.
- SORRELL, J. M. & CAPLAN, A. I. 2004. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci*, 117, 667-75.

- STREILEIN, J. W. 1983. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J Invest Dermatol*, 80 Suppl, 12s-16s.
- STRUTZ, F., ZEISBERG, M., RENZIEHAUSEN, A. 2001. TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int*, 59, 579-92.
- TOI, M., ATIQR RAHMAN, M., BANDO, H. 2005. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol*, 6, 158-66.
- TSUCHIDA, S., BONKOBARA, M., MCMILLAN, J. R. 2004. Characterization of Kdap, a protein secreted by keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 122, 1225-34.
- UNGERSTEDT, J. S., HEIMERSOON, K., SÖDERSTRÖM. 2003. Nicotinamide inhibits endotoxin-induced monocyte tissue factor expression. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1, 2554-2560.
- VAN KUILENBURG, A. B., DE ABREU, R. A. & VAN GENNIP, A. H. 2003. Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Ann Clin Biochem*, 40, 41-5.
- VANSOOTT, E. J. & EKEL, T. M. 1963. KINETICS OF HYPERPLASIA IN PSORIASIS. *Arch Dermatol*, 88, 373-81.
- VENAKATACHALAPATHY, T. S., MOHAN KUMAR, S. & SALIBA, M. J. 2007. A comparative study of burns treated with topical heparin and without heparin. *Ann Burns Fire Disasters*, 20, 189-98.
- VON GREYERZ, S., BURKHART, C. & PICHLER, W. J. 1999. Molecular basis of drug recognition by specific T-cell receptors. *Int Arch Allergy Immunol*, 119, 173-80.
- WALKO, C. M. & LINDLEY, C. 2005. Capecitabine: a review. *Clin Ther*, 27, 23-44.
- WANG, F., LIU, R., LEE, S. W. 2007. Heparin-binding EGF-like growth factor is an early response gene to chemotherapy and contributes to chemotherapy resistance. *Oncogene*, 26, 2006-16.
- WERNER, S. & GROSE, R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 83, 835-70.
- WIDMER, C., GEBAUER, J. M., BRUNSTEIN, E. 2012. Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13243-7.
- WIESNER, J. & VILCINSKAS, A. 2010. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1, 440-64.
- WIN, K. T., LEE, S. W., HUANG, H. Y. 2013. Nicotinamide N-methyltransferase overexpression is associated with Akt phosphorylation and indicates worse prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol*, 34, 3923-31.
- WISNIEWSKI, J. R., ZOUGMAN, A., NAGARAJ, N. 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 6, 359-62.
- YEN-REVOLLO, J. L., GOLDBERG, R. M. & MCLEOD, H. L. 2008. Can inhibiting dihydropyrimidine dehydrogenase limit hand-foot syndrome caused by fluoropyrimidines? *Clin Cancer Res*, 14, 8-13.
- YEN, J. L. & MCLEOD, H. L. 2007. Should DPD analysis be required prior to prescribing fluoropyrimidines? *Eur J Cancer*, 43, 1011-6.
- YIN, W., PEI, G., LIU, G., HUANG, L., GAO, S. & FENG, X. 2015. Efficacy and safety of capecitabine-based first-line chemotherapy in advanced or metastatic breast cancer: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Oncotarget*.
- YONEDA, M., YAMAGATA, M., SUZUKI, S. 1988. Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture. *J Cell Sci*, 90 ( Pt 2), 265-73.
- ZABA, L. C., KRUEGER, J. G. & LOWES, M. A. 2009. Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol*, 129, 302-8.
- ZANNI, M. P., VON GREYERZ, S., SCHNYDER, B. 1998. HLA-restricted, processing- and metabolism-independent pathway of drug recognition by human alpha beta T lymphocytes. *J Clin Invest*, 102, 1591-8.
- ZHANG, J., DONG, J., GU, H., YU, S. 2012. CD9 is critical for cutaneous wound healing through JNK signaling. *J Invest Dermatol*, 132, 226-36.







# Anexos

---



## **11 ANEXOS**

