

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

KENNYA TAMARA LEON LINCANGO

**Expresión de moléculas inmunoregulatorias en el cáncer basocelular
agresivo y no agresivo y en pieles irradiadas por ultravioleta**

Ribeirão Preto

2023

KENNYA TAMARA LEON LINCANGO

**Expresión de moléculas inmunoregulatorias en el cáncer basocelular
agresivo y no agresivo y en pieles irradiadas por ultravioleta.**

Versión Original

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de Ribeirao Preto da Universidad de Sao Paulo y Universidad Central del Ecuador para la obtención del Título de Doctorado.

Area de Concentración: Clínica Médica
Orientador: Prof. Dr. Eduardo A Donadi
Co Tutora : Prof. Dra. Cacilda Da Souza

Ribeirao Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Leon Lincango, Kennya Tamara

Expresión de moléculas inmunoregulatorias en el cáncer basocelular agresivo y no agresivo y en pieles irradiadas por ultravioleta

...103 p.: il.; 30 cm.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São e Universidad Central del Ecuador para obtenção do Título de Doutor

Versão Original

1. Câncer basocelular agressivo. Câncer basocelular não agressivo. HLA-G. HLA-E. hOSEC. Radiação solar. Radiação ultravioleta. Equador.

Nome: LEON LINCANGO, Kennya Tamara

Expresión de moléculas inmunoregulatorias en el cáncer basocelular agresivo y no agresivo y en pieles irradiadas por ultravioleta.

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de Ribeirao Preto da Universidad de Sao Paulo y Universidad Central del Ecuador para la obtención del Título de Doctorado.

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Banca examinadora:

Prof. Dr. : _____

Instituição : _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição : _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição : _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição : _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição : _____

Julgamento: _____

AGRADECIMIENTO

Al Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi, coordinador del Convenio USP-UCE por su apoyo total en forma humana, y científica en todo el proceso de formación del Doctorado y su legado histórico como parte del Convenio USP-UCE.

Al Prof. Dr. Fernando Sempértegui Ontaneda, Rector de la Universidad Central del Ecuador, por su visión y soporte para que los Docentes de la UCE podamos acceder a este tipo de formación, en bien de toda la Comunidad Universitaria.

A la Prof. Cacilda Da Silva, por su ayuda en la ejecución de este Trabajo.

A la Prof. Dra Leandra Ramalho por su ayuda científica y su calidez como parte de este estudio.

Al Prof. Dr Marco Andrey Cipriani Frade por su aporte científico en este estudio

A la Licenciada Deysi Longo por su aporte y ayuda en lo concerniente a Laboratorio de Patología.

Al Dr Luis Castillo por los análisis estadísticos

A todos y cada una de las personas que hicieron posible este sueño.

A CAPES (Finance Code 001).

RESUMEN

LEON LINCANGO, Kennya Tamara. Expresión de moléculas inmunoregulatorias en el cáncer basocelular agresivo y no agresivo y en pieles irradiadas por ultravioleta. Tesis de Doctorado: Facultad de Medicina de Ribeirão Preto de la Universidad de São Paulo y la Universidad Central del Ecuador. Ribeirao Preto 2023.

Introducción: La radiación solar (RS) y particularmente la radiación ultravioleta (RUV) están involucradas en la producción de inflamación crónica e inmunosupresión en la piel. Puesto que las moléculas inmunoreguladoras HLA-E y HLA-G están involucradas en diversos procesos de control de las respuestas inmunes innata y adquirida, en este estudio se evaluó la interrelación de moléculas inmunoreguladoras, exposición a la RUV/RS y cánceres de piel. Así, estudiamos: i) la expresión de HLA-G y HLA-E en cánceres basocelulares agresivos y no agresivos, ii) el efecto de la RUV sobre la expresión *ex vivo* de moléculas HLA-E y HLA-G en muestras de pieles normales, y iii) las características epidemiológicas de los cánceres de piel en Ecuador y su asociación con la RS. **Pacientes y Métodos:** Las muestras de piel fueron obtenidas de los archivos del Departamento de Patología del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto de la Universidad de São Paulo, evaluándose 33 muestras de carcinomas basocelular agresivos y 23 no agresivos. La expresión de HLA-E y HLA-G bajo la RUV (105 Joules por 5 minutos) fue evaluada en explantes (hOSEC: *human organotypic skin explant in culture*) de piel normal obtenidas por abdominoplastia y cultivadas durante 13 días (con o sin RUV en los días D0, D2, D4, D6, D10 y D12) y evaluadas en los días D1, D7 y D13. Las expresiones de HLA-E y HLA-G fueron evaluadas por inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos específicos. Los datos sobre los carcinomas de piel en Ecuador fueron obtenidos de la base de datos del Instituto Nacional De Estadística Y Censo Ecuador, tomados desde 2015 hasta 2021 y los datos de la RS fueron obtenidos en el sitio <https://www.aros-solar.com/es/la-radiacion-solar>. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizándose el *software* libre R v4.3.1. **Resultados:** Las moléculas HLA-E y HLA-G fueron expresas en las áreas tumorales de carcinomas basocelulares agresivos y no agresivos. Los basocelulares no agresivos fueron primordialmente HLA-E positivas y HLA-G negativas, mientras que las muestras agresivas fueron primordialmente HLA-G positivas y HLA-E negativas. La RUV indujo la expresión de HLA-E (queratinocitos y células mononucleares) y HLA-G (células dendríticas) en explantes de piel. En Ecuador, en orden de frecuencia, los cánceres no melanoma fueron los más comunes, seguidos de melanoma maligno, carcinoma *in situ* y melanoma *in situ*. En números relativos, los cánceres de piel fueron más frecuentes en: i) hombres, ii) Quito cuándo comparado con Guayaquil, iii) pacientes con más de 66 años, iv) mestizos, y v) en regiones con mayores alturas. **Conclusión:** Este estudio relata por la primera vez la expresión simultánea de HLA-E y HLA-G en carcinomas basocelulares agresivos y no agresivos. La RUV indujo la expresión de HLA-E y HLA-G, ampliando el rol de moléculas inmunoreguladoras bajo la exposición a la RUV. La incidencia perpendicular de la RS en Ecuador produjo características particulares de cánceres de piel melanoma y non melanoma, según el sexo, la edad, la ciudad de referencia de ingresos y egresos hospitalarios, la altura de las ciudades ecuatorianas, la edad y la etnia auto referida.

Palabras clave: Cáncer basocelular agresivo, Cáncer basocelular no agresivo, HLA-G, HLA-E, hOSEC, Radiación solar, Radiación ultravioleta, Ecuador.

RESUMO

LEÓN LINCANGO, Kennya Tamara. Expressão de moléculas imunorreguladoras em câncer basocelular agressivo e não agressivo e em pele irradiada com ultravioleta. Tese de Doutorado: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e Universidade Central do Equador. Ribeirão Preto 2023.

Introdução: A radiação solar (RS) e particularmente a radiação ultravioleta (RUV) estão envolvidas na produção de inflamação crônica e imunossupressão na pele. Uma vez que as moléculas imunorreguladoras HLA-E e HLA-G estão envolvidas em vários processos de controle de respostas imunes inatas e adquiridas, neste estudo objetivamos avaliar a inter-relação de moléculas imunorreguladoras, exposição a RUV/RS e cânceres de pele. Assim, estudamos: i) a expressão de HLA-G e HLA-E em cânceres basocelulares agressivos e não agressivos, ii) o efeito da RUV na expressão *ex vivo* de moléculas HLA-E e HLA-G em amostras de pele normal e iii) as características epidemiológicas dos cânceres de pele no Equador e sua associação com RS. **Pacientes e Métodos:** As amostras de pele foram obtidas dos arquivos do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, avaliando 33 amostras de carcinomas basocelulares agressivos e 23 não agressivos. A expressão de HLA-E e HLA-G sob RUV (105 Joules por 5 minutos) foi avaliada em explantes (hOSEC: *human organotypic skin explant in culture*) de pele normal obtida por abdominoplastia e cultivada por 13 dias (com ou sem UVR), nos dias (D) (D0, D2, D4, D6, D10 e D12) e avaliados nos dias D1, D7 e D13. As expressões de HLA-E e HLA-G foram avaliadas por imunistoquímica, utilizando anticorpos específicos. Dados sobre carcinomas de pele foram obtidos do banco de dados do Instituto Nacional de Estatística e Censo do Equador, obtidos de 2015 a 2021 e os dados de RS foram obtidos do site <https://www.aros-solar.com/es/la-radiacion-solar>. As análises estatísticas foram realizadas usando o software livre R v4.3.1. **Resultados:** As moléculas HLA-E e HLA-G foram expressas em áreas tumorais de carcinomas basocelulares agressivos e não agressivos. As amostras de basocelulares não agressivos eram principalmente HLA-E positivas e HLA-G negativas, enquanto as amostras agressivas eram principalmente HLA-G positivas e HLA-E negativas. A UVR induziu a expressão de HLA-E (queratinócitos e células mononucleares) e HLA-G (células dendríticas) em explantes de pele. No Equador, em ordem de frequência, os cânceres não melanoma foram os mais comuns, seguidos por melanoma maligno, carcinoma *in situ* e melanoma *in situ*. Em números relativos, os cânceres de pele foram mais frequentes em: i) homens, ii) Quito quando comparado com Guayaquil, iii) pacientes com mais de 66 anos, iv) mestiços, e v) em regiões de maior altitude. Conclusão: Este estudo relata pela primeira vez a expressão simultânea de HLA-E e HLA-G em carcinomas basocelulares agressivos e não agressivos. A expressão de HLA-E e HLA-G induzida pela RUV expande o papel das moléculas imunorreguladoras sob exposição à RUV. A incidência perpendicular de RS no Equador produziu características particulares dos cânceres de pele melanoma e não melanoma, segundo sexo, idade, cidade de referência para internações e altas de pacientes, altura das cidades equatorianas, idade e etnia autodeclarada.

Palavras-chave: Carcinoma basocelular agressivo, Carcinoma basocelular não agressivo, HLA-G, HLA-E, hOSEC, Radiação solar, Radiação ultravioleta, Equador.

SUMMARY

LEON LINCANGO, Kennya Tamara. Expression of immunoregulatory molecules in aggressive and non-aggressive basal cell cancer and in ultraviolet irradiated skin. Doctoral Thesis: Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo and Central University of Ecuador. Ribeirão Preto 2023.

Introduction: Solar radiation (SR) and particularly ultraviolet radiation (UVR) are involved in the production of chronic inflammation and immunosuppression in the skin. Since the immunomodulatory HLA-E and HLA-G molecules are involved in several control processes of the innate and acquired immune responses, in this study we aimed to evaluate the relationship between immunoregulatory molecules, exposure to UVR/RS and skin cancers. To reach these goals, we studied: i) the expression of HLA-G and HLA-E in aggressive and non-aggressive basal cell cancers, ii) the effect of UVR on the *ex vivo* expression of HLA-E and HLA-G molecules in normal skin explants, and iii) the epidemiological characteristics of skin cancers in Ecuador and their association with RS. **Patients and Methods:** Skin samples were obtained from the archives of the Department of Pathology, University Hospital, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, evaluating 33 samples of aggressive and 23 non-aggressive basal cell carcinomas. HLA-E and HLA-G expression under UVR (105 Joules for 5 minutes) was evaluated in explants (hOSEC: human organotypic skin explants in culture) of normal skin obtained by abdominoplasty and cultured for 13 days (with or without UVR), on days (D) (D0, D2, D4, D6, D10 and D12) and evaluated on days D1, D7 and D13. HLA-E and HLA-G expressions were evaluated by immunohistochemistry, using specific antibodies. Data on skin carcinomas were obtained from the National Institute of Statistics and Census database of Ecuador, obtained from 2015 to 2021, and RS data were obtained from the website <https://www.aros-solar.com/es/la-radiacion-solar>. Statistical analyzes were performed using the free software R v4.3.1. **Results:** HLA-E and HLA-G molecules were expressed in tumor areas of aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. The non-aggressive basal cell samples were primarily HLA-E positive and HLA-G negative, whereas the aggressive samples were primarily HLA-G positive and HLA-E negative. UVR induced the expression of HLA-E (keratinocytes and mononuclear cells) and HLA-G (dendritic cells) in skin explants. In Ecuador, in order of frequency, non-melanoma cancers were the most common, followed by malignant melanoma, carcinoma *in situ* and melanoma *in situ*. In relative numbers, skin cancers were more frequent in: i) men, ii) Quito when compared to Guayaquil, iii) patients over 66 years of age, iv) mestizos, and v) in higher altitude regions. **Conclusion:** This study reports for the first time the simultaneous expression of HLA-E and HLA-G in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. UVR induced HLA-E and HLA-G expression, expanding the role of immunoregulatory molecules under UVR exposure. The perpendicular incidence of RS in Ecuador produced particular features of melanoma and non-melanoma skin cancers, according to gender, age, reference city for patient admissions and discharges, height of Ecuadorian cities, age and self-reported ethnicity.

Key words: Aggressive basal cell cancer, Non-aggressive basal cell cancer, HLA-G, HLA-E, hOSEC, Solar radiation, Ultraviolet radiation, Ecuador.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Radiación solar 19
- Figura 2 - Principales locales de penetración de la radiación ultravioleta (RUV) en la piel. La radiación ultravioleta A (UVA) alcanza la epidermis, la UVB la dermis y la UVC es absorbida primordialmente en la atmósfera..... 21
- Figura 3 - Ilustración de los componentes de la piel con énfasis en los sitios de origen de los principales y más frecuentes tipos de cánceres cutáneos. En el cáncer basocelular se observa crecimiento maligno de las células basales que invaden toda la epidermis, en el carcinoma espinocelular se observa una tumoración maligna que afecta a la epidermis y parte de la dermis, en el melanoma se observa una tumoración de melanocitos que invade la epidermis y se disemina a toda la dermis presentando mayor agresividad. 23
- Figura 4 - Principales características de la molécula inmunorreguladora HLA-E, que puede expresarse constitutivamente en varios tejidos o ser inducida por varios factores de transcripción, particularmente citoquinas. La interacción de la molécula HLA-E con linfocitos citotóxicos (T CD8⁺ o NK: *natural killer*) a través de receptores heterodiméricos NKG2A/CD94 induce la transducción de una señal intracelular inhibitoria, mediada por motivos ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*). Por otro lado, la interacción de HLA-E con el heterodímero NKG2C/CD94 induce la transducción de una señal estimuladora, mediada por motivos ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)..... 29
- Figura 5 - Principales características de la molécula inmunorreguladora HLA-G, que tiene expresión constitutiva restringida a ciertos tejidos (placenta, cristalino, células beta-pancreáticas, entre otros), pero puede ser inducida por varios factores de transcripción, particularmente citoquinas. La molécula HLA-G puede interactuar con receptores leucocitarios inhibitorios en las superficies de diversas células de la inmunidad innata y adaptativa, incluyendo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos (CD4⁺, TCD8⁺ y *Natural Killer*). La interacción de HLA-G con los receptores leucocitarios LILRB1 y LILRB2 induce la transducción de una señal intracelular inhibitoria, mediada por motivos ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*)..... 31
- Figura 6 - Flujograma del procedimiento de cultura *ex vivo* de explantes de piel obtenidas de mujeres normales (fototipos II y III) por ocasión de realización de abdominoplastia. Los explantes de tres donantes fueron sometidos o no (controles) a la radiación ultravioleta (RUV), utilizando el simulador solar Q-Sun XE-1S, potencia de 0,35 W/m²/nm (equivalente a 105 Joules), durante 5 minutos a una temperatura de 38°C, durante 14 días. Los explantes (triplicada por cada donante) fueron sometidos a la RUV en los días cero (D0), D2, D4, D6, D10 y D12 y las evaluaciones se realizaron en los días D1, D7 y D13 de cada experimento. 37
- Figura 7 - Tinción inmunohistoquímica para antígeno leucocitario humano (HLA)-G (a derecha) y HLA-E (a la izquierda). Control positivo de placenta humana del primer trimestre que expresa tanto HLA-G como HLA-E (tinción marrón). Ampliación original x200. 42
- Figura 8 - Ejemplos de tumores basocelulares presentando o no expresión de las moléculas HLA-E y HLA-G en las áreas tumorales. El panel superior ilustra muestras de basocelulares no agresivos y el panel inferior ilustra las muestras agresivas. Ampliación original 200X. . 44

- Figura 9 - Expresión de las moléculas inmunoregulatorias HLA-E y HLA-G en muestras de carcinoma basocelular agresivos (n=33) y no agresivos (n=23)..... 45
- Figura 10 - Expresión inmunohistoquímica de HLA-G (n=39) y HLA-E (n = 37) en carcinomas basocelulares agresivos y no agresivos. Aún que la expresión de HLA-E sea más intensa que HLA-G ($p<0.001$), no hay diferencias entre las expresiones de esas moléculas entre carcinomas agresivos y no agresivos. 46
- Figura 11 - Evaluación de la concordancia entre las expresiones de HLA-E y HLA-G, utilizando el indicador de concordancia Kappa de Cohen, que incluye en valor nulo; lo cual refleja la ínfima concordancia entre resultados de expresión conjunta. 47
- Figura 12 - Mapa de correspondencia, evaluando las expresiones de HLA-G e HLA-E en carcinomas agresivos y no agresivos. 47
- Figura 13 - Mapas de correspondencias evaluando simultáneamente las expresiones de HLA-E y HLA-G en carcinomas agresivos y no agresivos. El cuadro a la izquierda muestra la expresión de esas moléculas en muestras de carcinoma no agresivo (diagrama azul), mientras que las muestras agresivas están incluidas en el diagrama rojo. Como se observa, no hay una separación nítida entre los dos diagramas, observándose una intersección entre ellos (muestras con características de agresividad y no agresividad). El cuadro de la derecha muestra los mismos hallazgos del cuadro a la izquierda, pero individualizando el rol de las moléculas HLA-E y HLA-G. Así, las muestras de carcinoma basocelular no agresivos son primordialmente HLA-E positivas y HLA-G negativas, mientras que las muestras agresivas son primordialmente HLA-G positivas y HLA-E negativas..... 48
- Figura 14 - Imagen ilustrativa de un explante de piel, cultivado durante 24 horas, sin exposición a la radiación ultravioleta, mostrando los diversos estratos de las capas epidérmica y dérmica. 49
- Figura 15 - Expresión de HLA-E en explantes de piel sometidos o no (control: CN) a la radiación ultravioleta (RUV, 105 Joules por 5 minutos), realizadas en los días D0, D2, D4, D6, D10 y D12 y evaluadas 24 horas después de la primera (D1), 24 horas después de la cuarta (D7) y 24 horas después de la sexta (D13) RUV. Ampliación original $\times 200$ 50
- Figura 16 - Tinción inmunohistoquímica para el antígeno leucocitario humano HLA-E en explantes de piel sometida no (control) a la radiación ultravioleta en el día D1 (24 horas de cultivo), mostrando las capas de la piel (epidermis y dermis) y los estratos de las dos capas. En la piel control (superior) observase discreta expresión de la molécula HLA-E (marrón rojizo) en el estrato granuloso y muy discreta expresión en la dermis superficial. En la epidermis de la piel irradiada observase: i) aumento del estrato córneo, ii) mayor definición del estrato granuloso, iii) estrato espinoso con mayor diferenciación de queratinocitos y estrato basal intacto. La dermis superficial está más gruesa/densa. Comparada al control, la expresión de HLA-E está aumentada y se observa expresión en los estratos granuloso y basal. Sin embargo, la capa espinosa disminuyó la expresión de HLA-E, ya que tiene queratinocitos más diferenciados (núcleos redondeados o balonzados). En la dermis superficial hay un aumento de células inflamatorias (círculos negros) con expresión de HLA-E. En la dermis profunda destacan las células del endotelio capilar con expresión de HLA-E (círculos negros). Ampliación original $\times 200$ 52
- Figura 17 - Tinción inmunohistoquímica para el antígeno leucocitario humano HLA-E en explantes de piel sometida o no (control) a la radiación ultravioleta en el día D7. En el explante control

(superior), hay un aumento del estrato córneo, pero la piel permanece intacta, lo que permite observar todos los estratos de las capas epidérmica y dérmica. La expresión de HLA-E está más evidente en el estrato basal. En la piel sometida a la RUV (inferior), el estrato córneo es más compacto, manteniendo los estratos granular, espinoso y basal. Observase expresión de HLA-E en los estratos granuloso, espinoso y basal. En la dermis superficial y profunda se observan células inflamatorias (círculos negros) con expresión de HLA-E. Ampliación original $\times 200$ 53

- Figura 18 - Tinción inmunohistoquímica para el antígeno leucocitario humano HLA-E en explantes de piel sometida o no (controle) a la radiación ultravioleta en el día D13. En el explante control (superior), hay un grande aumento del estrato córneo y el estrato granuloso está prácticamente ausente. En el estrato espinoso observase queratinocitos hinchados (apoptóticos) con núcleos más redondeados y el estrato basal aún se conserva, manteniendo la unión dermis/epidermis. La expresión de HLA-E es observada donde hay células viables en el estrato basal. En la dermis superficial y en la dermis profunda observase expresión de HLA-E en las células inflamatorias (círculo azul). En explantes sometidos a la RUV (inferior), el estrato córneo es bastante grueso. El estrato granuloso está ausente, las células del estrato espinoso están disminuidas, desorganizadas y los queratinocitos están más diferenciados, con núcleos redondeados. El estrato basal está desorganizado con pérdida de la unión dermis/epidermis. En las capas de la dermis superficial y profunda se encuentran algunas células inflamatorias. No se observa ninguna expresión de HLA-E. Ampliación original $\times 200$ 54
- Figura 19 - Tinción inmunohistoquímica para el antígeno leucocitario humano HLA-G en explantes de piel sometida o no (controle) a la radiación ultravioleta en los días D1, D7 y D13. En los explantes controles e irradiados observase aumento del estrato corneo en todos los tiempos examinados. El estrato granuloso está prácticamente ausente en el los explantes irradiados y continúan ausentes en los dos grupos hasta el día D13. En el estrato espinoso observase queratinocitos hinchados (apoptóticos) con núcleos más redondeados y el estrato basal aún se conserva, manteniendo la unión dermis/epidermis. Ampliación original $\times 200$ 55
- Figura 20 - Número total de casos de cáncer de piel melanoma y no melanoma, registrados como egresos hospitalarios por el INEC en todo el territorio nacional de Ecuador (superior) y estratificados según el sexo (inferior) de 2015 hasta 2022. 57
- Figura 21 - Correlaciones entre el número total de casos cánceres de piel melanoma y no melanoma en egresos hospitalarios, registrados en el INEC de 2015 hasta 2022, con el promedio de la RS (<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/camas-y-egresos-hospitalarios/> acceso 6 de junio 2023) registrada en todo el país 58
- Figura 22 - Radiación solar (RS) mensual para Quito y Guayaquil (gráfico superior). Correlación entre RS en Quito y Guayaquil en el periodo común de evaluación ($r = 0.647$, $p = 0.000$) (gráfico mediano) y relación RS promedio-mensual Quito *versus* Guayaquil (gráfico inferior)... 59
- Figura 23 - Porcentaje de atenciones, estratificado según en año, sexo, ciudad de la atención, edad y etnia auto declarada. 61
- Figura 24 - Porcentaje de casos de cáncer de piel con relación al número total de atenciones médicas, estratificado según el año, sexo, ciudad de atención, edad y etnia auto declarada. 62
- Figura 25 - Porcentaje de casos de cáncer de piel con relación al número total de atenciones médicas, estratificado según el año, sexo, ciudad de atención, edad y etnia auto declarada. 63

Figura 26 - Porcentaje de atenciones, estratificado según el año, sexo, ciudad de atención, edad y etnia auto declarada.	64
Figura 27 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones.	66
Figura 28 - El gráfico superior muestra la tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la ciudad (Quito y Guayaquil). El gráfico inferior muestra la relación Tasa Quito / Tasa Guayaquil.	67
Figura 29 - El gráfico superior muestra la tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según el sexo. El gráfico inferior muestra la relación Tasa hombres / Tasa mujeres.....	68
Figura 30 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la edad.....	69
Figura 31 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la etnia.	70
Figura 32 - Tasa general (casos totales / atenciones totales) que muestra que otros tumores son los que predominan, oscilando en el tiempo entre 6 y 8 casos por cada 10 000 atenciones	70
Figura 33 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según el sexo. La gráfica superior muestra las tasas para hombres (casos hombres / hombres atendidos) y la gráfica inferior las tasas para mujeres (casos mujeres / mujeres atendidas).	72
Figura 34 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la ciudad de residencia. La gráfica superior muestra las tasas las tasas para Quito (casos residentes en Quito / atendidos residentes en Quito) y Guayaquil (casos residentes en Guayaquil / atendidos residentes en Guayaquil).....	73
Figura 35 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según el grupo etario de 0-5 años (gráfica superior) y el grupo entre 6-18 años (gráfica inferior).....	74
Figura 36 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según el grupo etario de 19-65 años (gráfico superior) y el grupo de más de 66 años (gráfico inferior).....	75
Figura 37 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la etnia, incluyendo mestizos e indígenas y montubios (gráfico inferior).	76
Figura 38 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la etnia, incluyendo afros (gráfico superior) y otras etnias (gráfico inferior).	77
Figura 39 - Correlación de Pearson entre la tasa de casos residentes / residentes atendidos en Quito y en Guayaquil con la radiación solar.....	78
Figura 40 - Distribución de los casos de cáncer de piel a lo largo de los años 2015-2022, estratificados según la altura de las provincias ecuatorianas.	79

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 - Clasificación de los tumores basocelulares agresivos, estratificados según la expresión individual de HLA-E y HLA-G en las áreas tumorales.	43
Tabla 2 - Clasificación de los tumores basocelulares no agresivos, estratificados según la expresión individual de HLA-E y HLA-G en las áreas tumorales.	43
Tabla 3 - El número total de atenciones médicas, estratificadas según en año, sexo, ciudad de la atención, edad y etnia auto declarada.....	60
Tabla 4 - El número total de cánceres de piel (melanoma y no melanoma), estratificado según el año, sexo, ciudad de atención), edad y etnia auto declarada.....	61
Tabla 5 - El número total de cánceres de piel (melanoma y no melanoma), estratificado según en año, sexo, ciudad de atención, edad y etnia auto declarada.	63
Tabla 6 - El número total de atenciones médicas, considerando el sitio de residencia del paciente, estratificado según el año, sexo, ciudad de la residencia, edad y etnia auto declarada.	63
Tabla 7 - Muestra los números totales de atenciones (a la izquierda) y los números total de casos de cánceres de piel melanoma y no melanoma (a la derecha) en pacientes residentes en las diversas provincias de Ecuador, estratificados según el año de evaluación.	65
Tabla 8 - Muestra la proporción de casos (casos en provincia/atenciones en provincia) y la severidad de los casos (Proporción de casos / \sum Proporción de casos). En rojo están destacadas las provincias con las tasas más altas de cánceres de piel y en amarillo las tasas más bajas.	65

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AUA	Ácido urocánico
LILRB1/2	<i>Leukocyte immunoglobulin-like receptor type 1 and 2</i>
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
D0 hasta D13	Días de cultura de explantes de piel
HLA	Antígeno leucocitario humano
HLA-A	Antígeno leucocitario humano tipo A
HLA-B	Antígeno leucocitario humano tipo B
HLA-E	Antígeno leucocitario humano tipo E
HLA-G	Antígeno leucocitario humano tipo G
hOSEC	<i>human organotypic skin explant in culture</i>
NKG2A	<i>Natural killer receptor type A</i>
IL	Interleuquinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INEC	Instituto Nacional De Estadística Y Censo Ecuador
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs</i>
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NK	<i>Natural killer</i> (células NK)
RS	Radiación solar
RUV	Radiación ultravioleta
RUVA	Radiación ultravioleta tipo A
RUVB	Radiación ultravioleta tipo B
TNF	Factor de Necrose Tumoral
IFN	Interferón

RESUMEN

I.	Introducción	17
I.1.	Los cánceres de piel	17
I.1.1.	Características generales de los cánceres de piel	17
I.1.2.	Epidemiología de los cánceres de piel	18
I.1.3.	Etiopatogenia de los cánceres de piel	18
I.1.4.	Clasificación clínica de los carcinomas basocelular, espinocelular y melanoma.	24
I.1.5.	Clasificación histopatológica de los cánceres de piel	25
I.1.6.	Tratamiento de los cánceres de piel	27
I.2.	Las Moléculas de histocompatibilidad que modulan la respuesta inmune	28
1.2.1.	HLA-E	28
1.2.2.	HLA-G	29
I.2.3.	Las moléculas HLA-E y HLA-G en los principales carcinomas de piel	31
II.	JUSTIFICACIÓN	33
III.	Objetivos generales:	34
III.1.	Objetivos específicos:	34
IV.	Material y Métodos	35
IV.1.	Obtención de muestras de piel de carcinoma basocelular	35
IV.2.	Obtención de muestras de piel normal para estudios <i>ex vivo</i>	35
IV.3.	El modelo hOSEC (human organotypic skin explant in culture)	36
IV.3. 1.	Obtención de fragmentos de piel de abdominoplastia y cultivo <i>ex vivo</i>	36
IV.3.2.	Estandarización del modelo hOSEC para estudio de la RUV	37
IV.3.4.	Preparación de muestras de explantes para experimentos de inmunohistoquímica	38
IV.4.	Expresión de las moléculas HLA-E y HLA-G	38
IV.5.	Características generales de los cánceres de piel y sus asociaciones con la radiación solar en Ecuador	39
IV. 5.	Análisis estadístico	41
V.	RESULTADOS	42
V.1.	Expresión de las moléculas HLA-G y HLA-E	42
V.1.1.	Expresión de moléculas HLA-E y HLA-G en tejidos controles	42
V.1.2.	Expresión de moléculas HLA-E y HLA-G en carcinoma basocelular	42
V.2.	Efecto de la RUV sobre los explantes de piel	48
V. 2. 1.	Expresión inmunohistoquímica de HLA-E en explantes de piel	51
V. 2. 2.	Expresión inmunohistoquímica de HLA-G en explantes de piel	55

V. 3. Características demográficas, geográficas e histopatológicas de los cánceres de piel melanoma y no-melanoma y sus correlaciones con la radiación solar (RS) en Ecuador.....	56
V.3.1. Números absolutos de casos de cánceres de piel.....	56
V.3.2. Números relativos de cánceres de piel y características demográficas	60
V. 3.3 Asociación entre casos de cáncer de piel con la altura de las regiones ecuatorianas	78
VI. DISCUSIÓN	80
VI.1. La radiación ultravioleta asociada a inflamación e inmunosupresión.....	80
VI.2. Las moléculas inmunoreguladoras HLA-E y HLA-G en el carcinoma basocelular	82
VI.3. Las moléculas HLA-E y HLA-G en explantes de piel bajo la influencia de la RUV	84
VI.4. Asociación entre la exposición a la radiación solar (RS) y los cánceres de piel en Ecuador...	87
VII. Conclusiones.....	91
REFERENCIAS	92
ANEXO 1.....	99
ANEXO. 2.....	103

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Los cánceres de piel

I.1.1. Características generales de los cánceres de piel

El cáncer de piel es uno de los tumores con mayor incidencia en el ser humano, por lo que se le debe de dar la importancia que se merece, en la mayoría de los casos es prevenible y curable. Existen dos tipos de cáncer de piel: el no melanoma, que se compone por el carcinoma basocelular y el espinocelular, y el melanoma (Castaneda Gameros; Eljure Tellez, 2016).

El riesgo de desarrollo de cáncer de piel depende de varios factores como los constitucionales o ambientales, entre ellos están la herencia, color de cabello claro o rojo, nevos multiplex melanocíticos, sensibilidad a la luz solar, particularmente la radiación ultravioleta (RUV). El cáncer de piel se puede desarrollar de diferentes estirpes celulares y tienen diferente agresividad y pronóstico. Tenemos entonces: Carcinoma Basocelular, Carcinoma espinocelular o epidermoide, Melanoma maligno, Adenocarcinomas, Sarcomas y Linfomas, pero hay que tomar en cuenta que los tres primeros son los más frecuentes (Castaneda Gameros; Eljure Tellez, 2016).

El cáncer basocelular es una enfermedad maligna que puede presentarse en diferentes formas clínicas, generalmente localizado en la cara, no en mucosas, de crecimiento lento, poco invasivo y con bajo potencial metastásico. Posee una capacidad de destrucción local, extendiéndose hacia cartílago y hueso en casos severos (Darias Dominguez; Garrido Celis, 2018). El espinocelular tiene apariencia de placas descamativas o tumoraciones que no curan sin tratamiento. Su localización más frecuente es labios y pabellones auriculares. El melanoma presentase como lesiones irregulares que afectan la simetría, los bordes, el tamaño y la policromasía. Se desarrolla principalmente en individuos de pieles claras, cabellos pelirrojos, con dificultad para broncearse y con frecuencia tienen antecedentes familiares de melanoma (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2019).

Existe una frecuencia diferencial de los cánceres de piel a depender de la exposición a factores geográficos, ambientales, genéticos, así como al tipo de la respuesta inmunológica contra los antígenos tumorales (Chinem; Miot, 2011).

I.1.2. Epidemiología de los cánceres de piel

En los Estados Unidos, los cánceres de piel más frecuentes son, en orden de frecuencia, los basocelulares y espinocelulares. Cada año, se diagnostican 5,4 millones de cánceres de piel basocelulares, luego seguidos de cánceres espinocelulares. Así, de cada diez casos de cánceres de piel, ocho son de tipo basal. Se piensa que este porcentaje se deba a una mayor exposición solar de las personas y al mayor tiempo de vida de estas (Sociedad Americana Contra el Cáncer, 2021).

Otro país con alto índice de basocelular es Australia, constituyendo la incidencia más alta en el mundo, son 726 por cada 100.000 habitantes, siguiéndose los Estados Unidos, con cifras de 226 y 363 por cada 100.000 habitantes por año y luego en Europa (Richmond-Sinclair *et al.*, 2009). En otros países como México, el carcinoma basocelular constituye el 75 y 80 % de los tumores malignos de piel. En Brasil, constituye el 70% de los tumores malignos de piel (Vázquez Blanco *et al.*; 2021). El cáncer de piel no melanoma es el más frecuente y representa el 30% de todos los tumores malignos (INCA, 2022). El Instituto Nacional de Cáncer (INCA), desde el año 2020 al 2022, indica que fueron diagnosticados 176.930 nuevos casos de cáncer basocelular y espinocelular, en mayor cantidad en mujeres cuándo comparados con hombres (Oncoguía, 2020). En el Ecuador, en el año 2020, se encontró que, entre los egresos hospitalarios, los tumores malignos de la piel correspondían al 63%, con predominancia de los cánceres basocelular y espinocelular. En cambio, en el año 2021, siguiendo estos mismos parámetros, se encuentra que esos tumores malignos de piel correspondían al 69% (Ceron Chimarro; Ayon Genkuong, 2020).

I.1.3. Etiopatogenia de los cánceres de piel

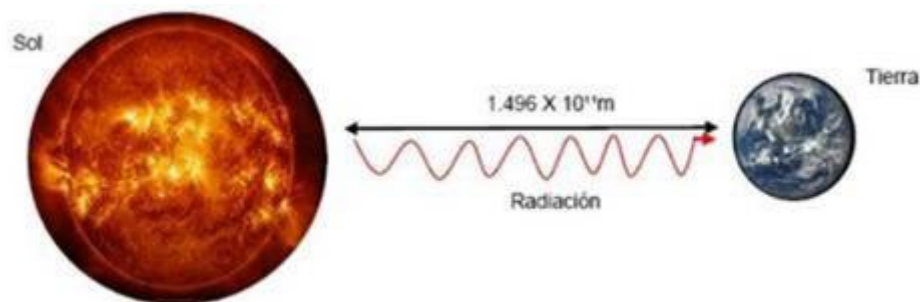
El sol es la fuente primaria de energía radiante, que se desplaza en el espacio hasta llegar a la Tierra en forma de ondas en flujo de paquetes de energía llamados cuanto o fotón. Se mide en longitudes de onda (λ), y el conjunto diverso de su radiación se conoce como espectro electromagnético. El intervalo de longitud de onda que emana es de 100- 5000 nanómetros (nm), de los cuales son visibles para el ser humano 380-760 nm. Hablando de estas radiaciones, la zona más energética es de 390-430 nm al color violeta y la menos energética es la del color rojo 650-700 nm. Sin embargo, la distribución de la radiación solar (RS) depende de otros factores como la masa del aire que atraviesa el amanecer o a nivel del mar, posición cenital del sol, o aumento de altitud, la elevación del sol según la estación del año y hora del

día, y también nubosidad, ángulo de incidencia y ángulo de reflectancia de las superficies (Montero Torres, 2022)

La radiación solar global incluye a la radiación directa, la difusa y la reflejada y a la Tierra llega en $1000\text{W}/\text{m}^2$. La radiación directa llega directamente del sol, la difusa se genera cuando esta alcanza la atmósfera de la Tierra y se dispersa de su dirección original gracias a las moléculas de la atmósfera, y un 25% de esta radiación se pierde y quedan dos tercios que llegan finalmente a la Tierra, pero aún se refleja por la superficie de la Tierra, dando lugar a Albedo que es el coeficiente de reflexión de la superficie (<https://www.aros-solar.com/es/la-radiacion-solar>)

La radiación solar es en definitiva energía electromagnética, se irradia del sol en todas direcciones, pero puede variar la cantidad promedio de energía solar es de 1 kilovatio por metro cuadrado (**Figura 1**).

Figura 1 - Radiación solar



Fuente: La autora

La radiación y su longitud de onda depende de la temperatura, así la luz visible es un 42%, el infrarrojo 49%, ultravioleta 8% y otros 1%. La radiación absorbida por la superficie terrestre es en promedio 51% y en un día sin nubes 85% y el albedo determina el porcentaje de la radiación reflejada, el sol produce radiación luminosa (Montero Torres, 2022).

La exposición solar es el principal agente etiológico asociado con el desarrollo de los cánceres más frecuentes de piel. Hay tres formas de exposición solar que se relacionan con el cáncer de piel: i) exposición intermitente, es la más frecuente en personas que se irradian en los fines de semana, vacaciones o por poco tiempo en el día, pero con mucha radiación, ii) exposición crónica, en personas que pasan a diario en el sol, en el calor en forma sostenida y silenciosa y iii) exposición acumulada, en la cual se mezclan las dos anteriores y ejerce un

efecto acumulativo en número de horas que las recibe una persona a lo largo de su vida (Cruz; Isaza, 2004).

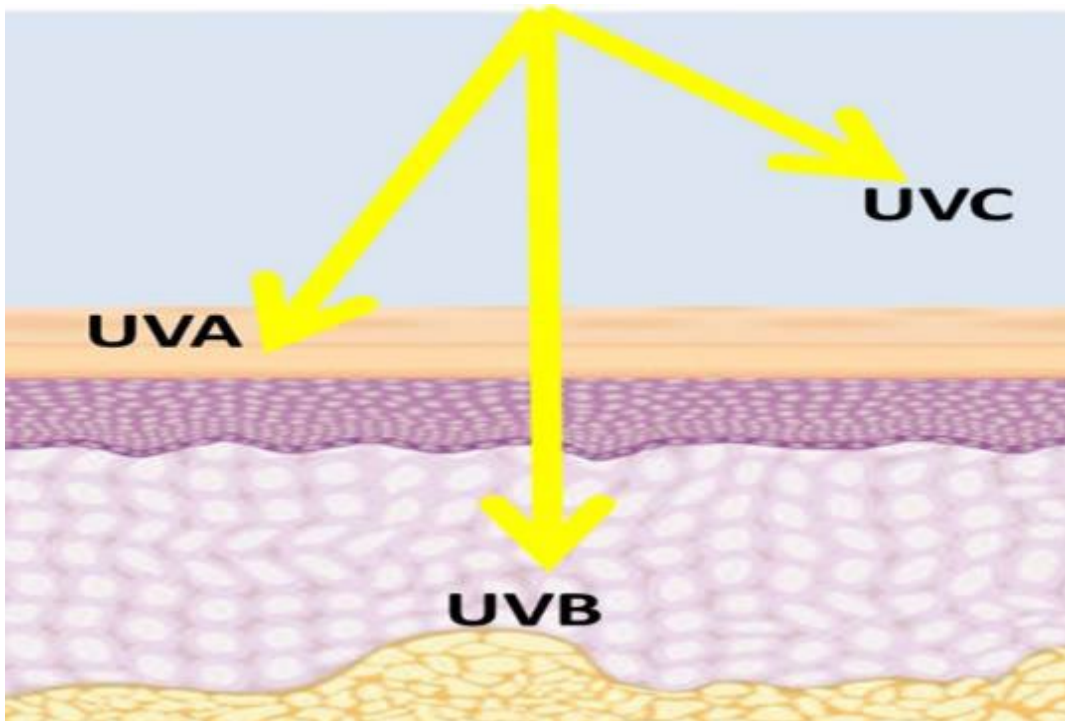
La RUV tiene diferentes longitudes de onda, la RUVA llega al planeta en un porcentaje del 98% y la RUVB en un porcentaje hasta el 5% (Cruz; Isaza, 2004). El mecanismo de producción de cáncer en la piel básicamente es por inducción de mutaciones y por inmunosupresión (Cruz; Isaza, 2004). La fuerza de la RUV puede variar según la localización geográfica e incluso según la altura del lugar donde se la recibe. Así, la RUV en la línea ecuatorial (perpendicular) es más grave que aquella que se aleja de la línea ecuatorial (oblicua). Además, la RUV aumenta mientras más altura existe sobre el nivel del mar. Vivir en el área rural, trabajos a la intemperie, falta de acceso a información en campañas de fotoeducación constituyen factores adicionales para el desarrollo de los cánceres de piel (Cajina Vazquez, 2012).

Como esquematizado en la **Figura 2**, la RUVA penetra hasta la epidermis, la RUVB llega a la dermis y la RUVB es absorbida a nivel de la atmósfera (Cabrera Morales; Lopez Nevot, 2006). La RUV (UVA y UVB) puede modificar las características de la piel por varios mecanismos, incluyendo:

- i) absorción por cromógenos endógenos (melanina, vitaminas, psoralenos, porfirinas, riboflavinas, entre otros) que pueden actuar a nivel del núcleo celular, produciendo foto productos como la 8-oxo-guanina (fotosensibilización) (Hart; Norval, 2018),
- ii) generación de daño directo a las bases nitrogenadas del ADN, produciendo daño oxidativo directo que puede o no ser reparado (Hart; Norval, 2018),
- iii) daño indirecto a los ácidos nucleicos por la formación de dímeros de ciclobutil pirimidina que también son foto productos, generando danos en el genoma (Hart; Norval, 2018),
- iv) alteraciones en los genes supresores que detienen el ciclo celular, necesitando la reparación de los ácidos nucleicos (Cruz; Isaza, 2004),
- v) disminución de las respuestas de la piel frente a la exposición continuada de muchas dosis bajas de RUV, necesitando mayor reparación del ADN, induciendo hiperplasia e hiperqueratosis del epitelio (Hart; Norval, 2018)
- vi) induciendo inmunosupresión por intermedio de la formación de metabolitos del ácido urocánico (AUA, formado en el estrato córneo de la piel a partir de la histidina) como el trans-AUA, que por su vez puede ser transformado en cis-UCA por la RUVB (Hart; Norval, 2018),

vii) inducción de inmunosupresión por disminución de la motilidad y del número de células de Langerhans, menor capacidad de queratinocitos de estimular linfocitos T, aumento de linfocitos CD8⁺ supresores, disminución de linfocitos T CD4⁺ auxiliares, de células *Natural Killer* (NK) y de células presentadoras de antígenos. Además, produciendo alteraciones de la producción de interleuquinas (IL), incluyendo disminución de producción del factor de necrosis tumoral (TNF) y aumento de IL-6 (Cruz; Isaza, 2004).

Figura 2 - Principales locales de penetración de la radiación ultravioleta (RUV) en la piel. La radiación ultravioleta A (UVA) alcanza la epidermis, la UVB la dermis y la UVC es absorbida primordialmente en la atmósfera.



Fuente: La autora

1.1.3. 1. Características etiopatogénicas del carcinoma basocelular

En el carcinoma basocelular, las quemaduras solares van acumulándose al igual que en el melanoma y son responsables por las mutaciones somáticas, sobre todo las quemaduras intensas y de corta duración. Se reporta que cinco quemaduras solares intensas antes de los 18 años aumentan la probabilidad de este cáncer en un 50% (Darias Dominguez; Garrido Celis, 2018).

Adicionalmente a los factores geográficos, la zona anatómica de la exposición solar puede contribuir con la morbilidad del cáncer basocelular, enfatizando la cara y específicamente la nariz, que recibe la RUV con más intensidad (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2019). También, la sensibilidad personal a la RUV depende de los fototipos cutáneos. Así, los fototipos I, II o III son de mayor riesgo para este tipo de carcinoma, al igual que en personas que consumen gran cantidad de inmunosupresores, o en aquellas con enfermedades subyacentes, como los síndromes del carcinoma nevoide de células basales, lo síndrome de Bazer y lo síndrome de Rombo (Cajina Vazquez, 2012).

A nivel microscópico, en el basocelular se encuentran células tumorales con núcleos alargados, homogéneos, hay polarización de los núcleos en el eje de orientación, se encuentran también células inflamatorias infiltradas con aumento de la vascularización en la dermis y pleomorfismo en la epidermis.

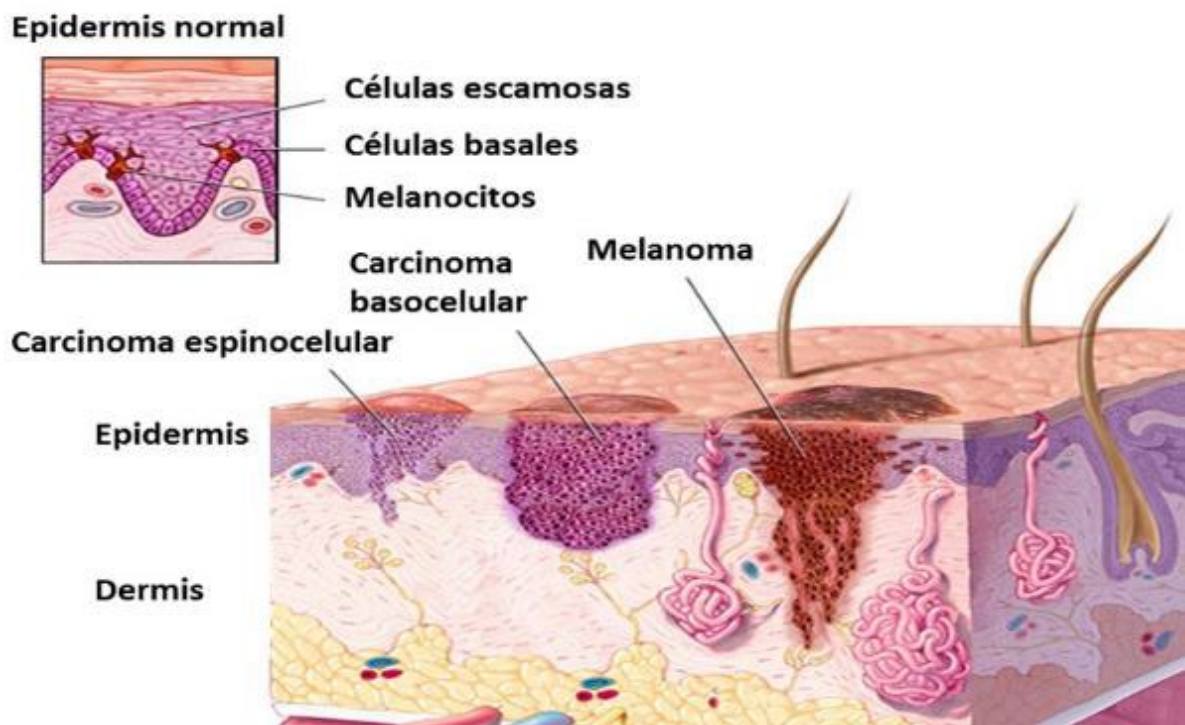
1.1.3. 2. Características etiopatogénicas del carcinoma espinocelular

La patogenia del cáncer espinocelular, en cambio, se relaciona con la exposición crónica a la RUV (efecto acumulativo), a diferencia de los cánceres basocelular y melanoma que se relacionan más con exposición solar en la infancia y quemaduras solares (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2019). Se observó que en el cáncer espinocelular las personas que habían recibido más de 70.000 horas de exposición tenían más posibilidad de desarrollar este tumor (Cruz; Isaza, 2004). La RUVB es capaz de causar daño sobre la ADN, formando dímeros de pirimidina en el gen tumoral supresor p53. Además, otros tipos de radiaciones (radiación ionizante, rayos X, radiación térmica) y derivados arsenicales e hidrocarburos aromáticos policíclicos también están involucrados en el desarrollo de esto tipo de cáncer (Acosta de Hart *et al.*, 2008). Aún cabe enfatizar que infecciones en áreas mucosas como aquellas causadas por el Papiloma virus humano pueden inducir carcinogénesis. La inmunosupresión es otro factor desencadenante, pero a diferencia del cáncer basocelular, el cáncer espinocelular tiene lesiones precursoras, con posibilidad de invasión a otros tejidos (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2019). Los factores internos que también pueden influir incluyen pieles claras, ojos claros, personas con genodermatosis como albinismo y xeroderma pigmentoso, en pieles enfermas crónicamente, osteomielitis, úlceras, quemaduras, enfermedades inflamatorias crónicas como liquen escleroso atrófico, lupus, entre otras causas (Acosta de Hart *et al.*, 2008).

1.1.3. 3. Características etiopatogénicas del melanoma

En el melanoma, pueden afectar factores exógenos como la exposición intensa a la luz solar, exposición crónica a la luz solar, residencia en lugares ecuatoriales, inmunodepresión iatrogénica o adquirida, cámaras de bronceado (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2019). Las quemaduras solares están implicadas en la carcinogénesis sobre todo con RUVB, importante en el desarrollo de melanomas (Cruz; Isaza, 2004). Se ha visto que el melanoma puede estar asociado a enfermedades como endometriosis, síndrome de Parkinson, nevos típicos y nevos congénitos. Un porcentaje de melanomas se relaciona con antecedentes familiares que se basan en mutaciones de genes como *CDKN2A* y otros. El melanoma puede tener lesiones precursoras como nevos atípicos con mutaciones en genes como *CDKN2A*, *PTEN* y *BRAF* (Restrepo; Velásquez, 2012). La **Figura 3** ilustra los sitios de origen de los principales y más frecuentes tipos de cánceres cutáneos, incluyendo el basocelular, el espinocelular y el melanoma.

Figura 3 - Ilustración de los componentes de la piel con énfasis en los sitios de origen de los principales y más frecuentes tipos de cánceres cutáneos. En el cáncer basocelular se observa crecimiento maligno de las células basales que invaden toda la epidermis, en el carcinoma espinocelular se observa una tumoración maligna que afecta a la epidermis y parte de la dermis, en el melanoma se observa una tumoración de melanocitos que invade la epidermis y se disemina a toda la dermis presentando mayor agresividad.



Fuente: Tomado de Mayo Clinic Health Library © 2023.

I.1.4. Clasificación clínica de los carcinomas basocelular, espinocelular y melanoma.

Los carcinomas basocelulares se caracterizan por ser destructivos locales y la apariencia clínica puede ser de cinco formas. A pesar de que existen otras clasificaciones propuestas por algunos autores, la clasificación descrita es la más frecuente y se adhiere a las formas clínicas más frecuentes:

- i) tipo nodular-ulcerativo, es la más común, con lesión única que se localiza sobre todo en cabeza y cuello, su forma clínica es una pápula, nódulo de aspecto perlado, con telangiectasias, cursa con ulceración,
- ii) tipo pigmentado, es parecido al tipo nodular ulcerativo, pero con pigmento en mayor o menor grado, debe diferenciarse clínicamente de lesiones pigmentadas,
- iii) tipo superficial, su apariencia es como placas descamativas en el tronco o en hombros, de crecimiento lento, pueden ser múltiples, deben diferenciarse de enfermedad de Paget, enfermedad de Bowen y psoriasis,
- iv) tipo esclerodermiforme, se presenta como una placa escleroatrófica, a veces ulcerado, de mal pronóstico ya que es infiltrativo y recidivante,
- v) tipo fibroepitelioma de Pinkus, es una forma rara, poco frecuente, puede ser una placa eritematosa o lesión pedunculada que se localiza en el pubis, área genitocrural (Cajina Vazquez, 2012; Chinem; Miot, 2011).

En cuanto al cáncer escamocelular de piel, éste se puede originar de lesiones premalignas como la queratosis actínica o sino sobre piel sana que va evolucionando, típicamente puede tener algunos tipos clínicos como:

- i) forma superficial o intradérmica, permanece afectando la epidermis, su apariencia es placa eritematosa y puede estar asociados con enfermedad de Bowen, eritroplasia de Queyrat,
- ii) forma nodular queratósica, su apariencia es un nódulo queratósico que afecta la epidermis, como ejemplo tenemos a los cuernos cutáneos,
- iii) forma ulcerada, se caracteriza por ser una ulceración indurada y con diseminación, generalmente con metástasis hacia la dermis, es la más frecuente, tiene crecimiento rápido y destructivo,
- iv) forma vegetante, puede llegar a crecer 10 centímetros, forma irregular de rápido crecimiento (Castaneda Gameros; Eljure Tellez, 2016).

Para el diagnóstico de melanoma se toma en cuenta las reglas ABCDE, A de asimetría, B bordes irregulares, C de varios colores, D diámetro mayor a 1 cm, E extensión a sectores vecinos y de antecedentes familiares. El melanoma es clasificado clásicamente como de cuatro tipos clínicos (Infante Carbonell *et al.*, 2019), incluyendo:

- i) extensión superficial, es el más frecuente, de crecimiento vertical, varios colores de tonalidades oscuras, irregular, afecta a tronco y extremidades,
- ii) nodular, es el segundo en frecuencia, se caracteriza por un nódulo que puede sangrar fácilmente, de color azulado al negro y de crecimiento radial,
- iii) lentiginoso acral, afecta las manos, pies, mucosas, colores oscuros, puede afectar las uñas, es más frecuente en pieles claras,
- iv) lentigo maligno, afectación de miembros o facial, crecimiento radial y se ve como una mancha de varias tonalidades de color e irregularidades.

I.1.5. Clasificación histopatológica de los cánceres de piel

La clasificación histopatológica del carcinoma basocelular puede variar en los autores, presentando subtipos. La siguiente clasificación incluye los tipos clínicos descritos anteriormente. De modo general, los cánceres basocelulares son neoplasias epiteliales malignas con células basaloides que poseen núcleos grandes, mitosis abundantes y las células se disponen en empalizada. Alrededor de las células tumorales existe un infiltrado inflamatorio crónico inespecífico en la dermis superior, a veces puede tener aspectos multifocales a nivel del epitelio (Chinem; Miot, 2011).

Los principales tipos histopatológicos incluyen:

- i) la forma macronodular es la forma más frecuente, existen grupos nodulares de células basaloides que se separan del tejido vecino por un típico artefacto. Puede tener diferenciación anexial, adenoide o quística,
- ii) la forma pigmentada es parecida a la forma macronodular, pero con producción de melanina, a veces con necrosis central o alteraciones quísticas,
- iii) en la forma micronodular, las células basaloides se organizan con menos de 15 células, son más uniformes que los tumores macronodulares,
- iv) en el tipo superficial existe proliferación celular de las células basaloides, formando una empalizada en la superficie inferior de la epidermis, que en la mayor parte de casos está atrofiada,

- v) la forma fibroepitelioma de Pinkus tiene filamentos largos y finos de las células algunas que se conectan con la epidermis y estromas fibrosos,
- vi) la forma esclerodermiforme se compone de filas tumorales que invaden a la dermis reticular y dan como resultado una intensa reacción fibromatosa, las células basaloides son pequeñas, irregulares invadiendo la dermis,
- vii) el tipo basoescamoso se caracteriza por tener apariencia de carcinoma basocelular y espinocelular. Cuando se parece más al carcinoma basocelular es más agresivo y generalmente da metástasis (Chinem; Miot, 2011).

Sin embargo, se pueden encontrar criterios histopatológicos que son predictivos de agresividad en el cáncer basocelular, de estos los que incluyen agresividad son la forma morfeiforme, infiltrativa, micronodular, metatípica, basoescamosa y sarcomatoide debido a que estas formas infiltran localmente y son recurrentes y raramente metastásicas. Otros criterios de agresividad son las formas que producen infiltración perineural de más de 0,1 mm de diámetro o subdérmicos y el otro criterio es la extensión subgaleal (Requena; Serra Guillen; Sanmartin, 2022).

Las principales características asociadas con el potencial de agresividad del carcinoma espinocelular o peor pronóstico incluyen: i) el tamaño, refiriéndose al diámetro mayor horizontal cuando es mayor a 2 cm, indica un carcinoma espinocelular de alto riesgo, ii) la localización del tumor en labios y orejas tiene un riesgo mayor de diseminación metastásica, iii) la presencia de condiciones de inmunosupresión subyacentes como la infección por VIH, trasplantes y otros, iv) la recurrencia del tumor, y v) cuando el tumor nace de úlceras, procesos crónicos o en sitios de inflamación crónica (Vasquez *et al.*, 2017).

A nivel histológico, hay cuatro parámetros para valorar el pronóstico y si se trata o no de carcinomas espinocelulares de alto grado; i) considerar el índice de Breslow (grosor) y los niveles de Clarck (invasión y profundidad). Así, un grosor mayor a 2 mm y un nivel de Clarck IV (invasión de la dermis reticular) constituyen un riesgo mayor. El Breslow es el factor predictor más importante, incluso la presencia de metástasis, ii) el grado de diferenciación tumoral es importante ya que mientras las células son más indiferenciadas tiene peor pronóstico, iii) el tipo histológico, entre ellos la presencia de acantolisis, infiltración y desmoplasia y iv) la invasión perineural también se asocia a metástasis y recurrencia (Vasquez *et al.*, 2017)

A nivel microscópico, el melanoma se manifiesta como una tumoración de melanocitos en nidos intraepidérmicos los que varían en forma y tamaño, además de presentar asimetría, es mal circunscripto a nivel tumoral. Se puede añadir la presencia de melanocitos atípicos en la unión dermoepidérmica o en la capa córnea en forma aislada en la epidermis que

pueden ser en mayor cantidad que los nidos, estas características son propias cuando se trata de un melanoma *in situ* (Ayala Reina *et al.*, 2018). El pronóstico del tumor depende: i) índice de Breslow, espesor en milímetros del tumor, ii) ulceración, iii) nivel de Clark, iv) tipo histológico del tumor, v) índice mitótico, vi) respuesta inflamatoria del huésped-tumor, vii) regresión tumoral, viii) tipo de célula neoplásica predominante, ix) edad y sexo y x) localización del tumor (Ayala Reina, *et al.*, 2018).

I.1.6. Tratamiento de los cánceres de piel

El tratamiento del cáncer basocelular puede ser variado. Aunque el más eficaz es la cirugía convencional, existe la posibilidad de realizar, raspado, electrodesecación, criocirugía, cirugía micrográfica de Mohs, radioterapia. Pero también están otros procedimientos que pueden adicionarse como el empleo de interferón alfa 2b intralesional, terapia fotodinámica, imiquimod, retinoides (Cajina Vazquez, 2012). Así, cada caso se debe analizar individualmente y el tratamiento debe ser exclusivo (Chinem; Miot, 2011).

Dependiendo del tamaño y localización de los cánceres espinocelulares, pueden ser tratados con cirugía en primer lugar, con escisión simple con un rango de seguridad de piel sana, curetaje, electrodisecación, cirugía de Mohs. Así mismo dependiendo de su localización, puede realizarse radioterapia sobre todo luego de cirugías como complemento. Además, existe crioterapia para aquellos pacientes que no puedan realizarse cirugía. Por último, para aquellos casos complicados con diseminación se aconseja además inmunoterapia, resección ganglionar y quimioterapia sistémica (American Cancer Society, 2022b; Marquez Rodas *et al.*, 2022).

Al tratarse de una enfermedad grave, con metástasis a distancia y afectación de órganos y muerte, el tratamiento del melanoma depende de la fase de diagnóstico, el tipo de melanoma, las condiciones del paciente, posibilidad de acceso de salud entre otros. Es de indicar que el tratamiento ha variado mucho y ha evolucionado con el advenimiento de terapias biológicas. Según la Sociedad Española de Oncología Médica, el melanoma puede ser clasificado como enfermedad localizada o enfermedad avanzada y dependiendo de este diagnóstico se pueden realizar los diferentes tratamientos. Así, el tratamiento de melanoma como enfermedad localizada puede incluir cirugía, terapia del ganglio centinela y mucha atención tiene sido dirigida a la inmunoterapia que se encarga de usar medicinas para que el sistema inmunológico reconozca adecuadamente y destruya las células malignas. En este punto pueden activarse o no ciertas moléculas que pueden aumentar o disminuir la respuesta inmune. Estos tipos de

tratamiento tienen un rol cada vez más importante en el escenario terapéutico del melanoma (American Cancer Society, 2022a; Marquez Rodas *et al.*, 2022).

La inmunoterapia es particularmente utilizada para ayudar al sistema inmune de los pacientes con melanoma a potenciar la destrucción de las células cancerosas, incluyendo el uso de inhibidores de las moléculas de control de la respuesta inmune (*immune checkpoint inhibitors*) como PD-1 (Pembrolizumab y Nivolumab), PD-L1 (Atezolizumab), CTLA-4 (Ipilimumab) (Carlino; Larkin; Long, 2021) y más recién el posible uso de un inhibidor del receptor de HLA-E (anti-NKG2A: Monalizumab) (Van Hall *et al.*, 2019).

I.2 Las Moléculas de histocompatibilidad que modulan la respuesta inmune

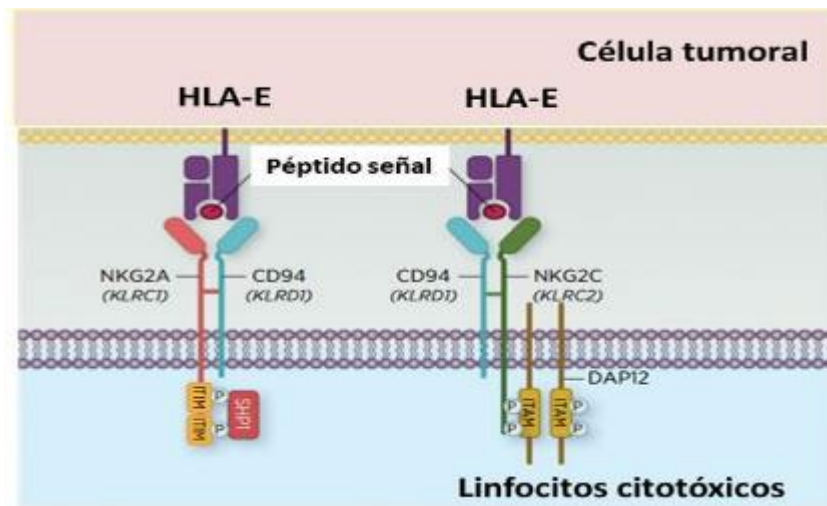
El complejo génico que codifica los antígenos leucocitarios humanos (*human leukocyte antigens* - HLA) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6, dentro del grupo de genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH también conocido por la sigla en inglés *Major Histocompatibility Complex* o MHC). Los genes del CPH pueden ser clasificados en genes de clase I clásicos (*HLA-A, B y C*) y no clásicos (*HLA-E, F y G*). Los genes de clase I clásicos codifican proteínas (aquí también llamadas de antígenos o moléculas) que se expresan constitutivamente en las superficies de todas las células nucleadas y cuya principal función es la presentación de antígenos intracitoplasmáticos a los linfocitos T CD8⁺. En cambio, los genes no clásicos de clase I codifican moléculas que pueden presentar antígenos, pero sus principales funciones están relacionadas con la modulación de la respuesta inmune. Por otro lado, los genes de clase de clase II (*HLA-DRA, HLA-DRB1, 3, 4 y 5, HLA-DQB1, DQAI, HLA-DPA1 y DPB1*) codifican moléculas que se expresan en células presentadoras de antígenos y tienen como principal función la presentación de péptidos a los linfocitos T CD4⁺ (Donadi *et al.*, 2011).

1.2.1 HLA-E

Entre las moléculas no clásicas de histocompatibilidad, las moléculas HLA-E y HLA-G ocupan un espacio relevante, pues que las dos son consideradas moléculas de chequeo inmunológico (*immune checkpoint inhibitors*). Aún que las dos moléculas puedan presentar péptidos a los linfocitos T, sus funciones más bien estudiadas se asocian a la modulación de la función de células de la inmunidad innata y adquirida, ligándose a receptores celulares inhibitorios (Morandi; Pistoia, 2014).

El gen *HLA-E* presenta 346 alelos que codifican 140 proteínas completas y diez truncadas (Robinson *et al.*, 2020). La molécula HLA-E puede ligarse a algunos receptores, sin embargo, el acoplamiento con el receptor heterodimérico NKG2A/CD94 presenta gran importancia pues que anticuerpos bloqueadores contra NKG2A es un tratamiento promisor para cánceres ginecológicos y de cabeza y cuello (Tinker *et al.*, 2019). El acoplamiento de HLA-E con el receptor NKG2A induce la activación de motivos intracitoplasmáticos de inhibición basados en tirosina (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*- ITIMs), inhibiendo las actividades citotóxicas de células NK y también de linfocitos T CD8⁺ intratumorales (Borst; Van Der Burg; Van Hall, 2020) (**Figura 4**). En condiciones fisiológicas, HLA-E está inducida en la placenta, testículo y epidídimo, mientras que en situaciones patológicas la molécula y su receptor NKG2A están también altamente expresos (King *et al.*, 2000)

Figura 4 - Principales características de la molécula inmunorreguladora HLA-E, que puede expresarse constitutivamente en varios tejidos o ser inducida por varios factores de transcripción, particularmente citoquinas. La interacción de la molécula HLA-E con linfocitos citotóxicos (T CD8⁺ o NK: *natural killer*) a través de receptores heterodiméricos NKG2A/CD94 induce la transducción de una señal intracelular inhibitoria, mediada por motivos ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*). Por otro lado, la interacción de HLA-E con el heterodímero NKG2C/CD94 induce la transducción de una señal estimulatoria, mediada por motivos ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*).



Fuente: Borst; Van Der Burg; Van Hall, 2020, con modificaciones

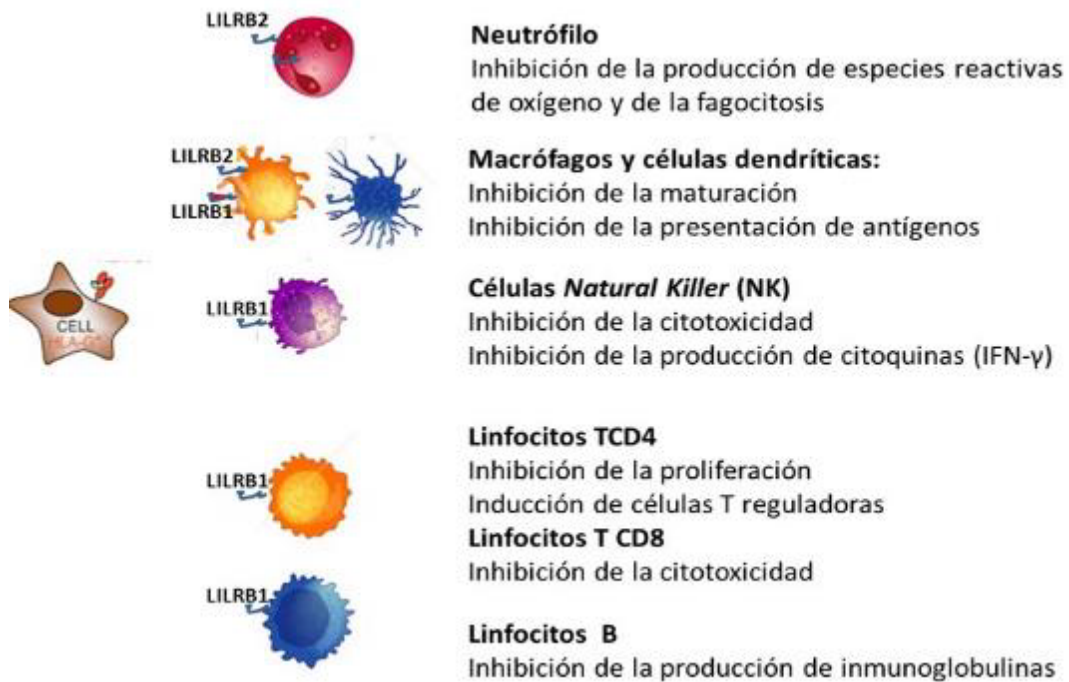
1.2.2 HLA-G

El gen *HLA-G* presenta variabilidad nucleotídica en la región codificadora y en las regiones reguladoras (promotora y 3' no traducida). Actualmente, son descritos 117 alelos en la región codificadora que codifican 38 proteínas completas y seis truncadas (Robinson *et al.* 2020). Aún que varias proteínas tengan sido descritas, pocas presentan frecuencias

polimórficas, es decir más de 1% en las poblaciones mundiales, incluyendo las moléculas HLA-G*01:01, G*01:03, G*01:04, G*01:05 y G*01:06 (Castelli *et al.*, 2021). Al menos siete isoformas distintas han sido descritas, incluyendo las de membrana (HLA-G1, G2, G3 y G4) y las solubles (moléculas HLA-G5, G6 y G7). El acoplamiento de HLA-G con sus receptores leucocitarios, particularmente con los LILRB1 y LILRB2 (*leukocyte immunoglobulin-like receptor type 1 and 2*), KIR2DL4 (*killer cel immunoglobulin-like receptor*) y CD8, induce señales inhibitorias intracelulares mediados por receptores ITIM. Así, la interacción de HLA-G con sus receptores inhibe la acción de diversos tipos celulares de la respuesta inmune innata y adquirida, incluyendo la actividad citotóxica de linfocitos T CD8⁺ y NK, proliferación de linfocitos T CD4⁺, presentación de péptidos por células presentadores de antígenos, producción y diferenciación de linfocitos B con disminución de la producción de inmunoglobulinas (Donadi *et al.*, 2015). La **Figura 5** ilustra las principales funciones inmunoregulatorias de la molécula HLA-G

La molécula HLA-G fue inicialmente detectada en el trofoblasto materno fetal, modulando el sistema inmunitario materno durante el embarazo, puesto que el feto pueda ser considerado un injerto semialogénico. Sin embargo, también es detectada en tejidos normales como la córnea, timo, precursores eritroides y endoteliales. Además, se detectó su presencia en varios tipos de cáncer, incluyendo mama, renal, hepático, cerebral, entre otros (Carosella *et al.*, 2008). Considerando que HLA-G module negativamente las células del sistema inmune, la expresión de esas moléculas en situaciones en las cuales se necesita una actividad citotóxica importante, como en las infecciones crónicas y en los cánceres, es maléfica pues que impide la acción protectora de células citotóxicas. En contraste, en enfermedades autoinmunes y en trasplantes de órganos sólidos, situaciones en las cuáles la inmunidad ya está exacerbada, la expresión de HLA-G é benéfica por ayudar a controlar la hiperactividad del sistema inmune (Dias *et al.*, 2015).

Figura 5 - Principales características de la molécula inmunorreguladora HLA-G, que tiene expresión constitutiva restringida a ciertos tejidos (placenta, cristalino, células beta-pancreáticas, entre otros), pero puede ser inducida por varios factores de transcripción, particularmente citoquinas. La molécula HLA-G puede interaccionar con receptores leucocitarios inhibitorios en las superficies de diversas células de la inmunidad innata y adaptativa, incluyendo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos ($CD4^+$, $TCD8^+$ y *Natural Killer*). La interacción de HLA-G con los receptores leucocitarios LILRB1 y LILRB2 induce la transducción de una señal intracelular inhibitoria, mediada por motivos ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*).



Fuente: Modificado de Carosella *et al.*, 2015

I.2.3. Las moléculas HLA-E y HLA-G en los principales carcinomas de piel

El gene que codifica la molécula HLA-E está clasificado entre los 20 más expresos en melanoma, sin embargo, la expresión *in vitro* de la molécula en células de melanoma expresa poco HLA-E en sus superficies celulares. Sin embargo, las células de melanoma expresan niveles elevados de HLA-E en su citoplasma y también secretan la producen la molécula en la forma soluble. Por otro lado, los melanocitos expresan en la superficie celular y secretan la molécula HLA-E (Derré *et al.*, 2006). Aún que la expresión de la molécula HLA-G haya sido mucho estudiada en tumores espinocelulares de otras localizaciones, como cabeza y cuello (Lee *et al.*, 2023) y en tumores ginecológicos (Boujelbene *et al.*, 2019), no hay estudios sobre HLA-E en los espinocelulares cutáneos. De la misma forma, no hay estudios sobre la molécula HLA-E en carcinomas basocelulares.

La expresión de la molécula HLA-G ha sido ampliamente estudiada en los melanomas y un meta-análisis, evaluando 16 estudios, reportó los siguientes resultados: i) la molécula ha

sido observada en 55% de los relatos, particularmente, in melanomas invasivos, ii) la expresión era variable según los tipos histológicos, aumentando progresivamente en casos de lentigo maligna (40%), melanoma lentigo maligna (51%), melanomas de expansión superficial (67%), melanomas nodulares (81%) y melanomas con metástasis confirmadas (82%), iii) por otro lado, la molécula HLA-G no ha sido observada en lesiones melanocíticas benignas, y iv) en algunos estudios, la elevada expresión de HLA-G estaba correlacionada con características clínicas e histológicas de agresividad del tumor, pero no se observó una asociación entre la expresión de HLA-G con la supervivencia del paciente (Marletta *et al.*, 2021).

En contraste con el melanoma, los estudios sobre HLA-G en los otros carcinomas de piel son más escasos. Considerando que pacientes trasplantados renales, sometidos a terapias inmunosupresoras, presentan una frecuencia aumentada de tumores, incluyendo los cutáneos, un estudio evaluó la expresión de HLA-G en lesiones malignas y benignas en estos pacientes. HLA-G estaba expreso en 14% de los carcinomas basocelulares, 35% en los carcinomas espinocelulares y en 47% de los carcinomas *in situ*. Sin embargo, HLA-G no estaba expresada en las lesiones benignas (Aractingi *et al.*, 2003). Un otro estudio evaluó la expresión de HLA-G en carcinomas basocelulares, evidenciando que la proteína estaba más frecuentemente expresada en los casos más agresivos, como los esclerosantes y los nodulares (Urosevic *et al.*, 2005). En estudio previo de nuestro grupo de investigación relatamos que la molécula HLA-G estaba predominantemente expresada en el citoplasma de las células del carcinoma basocelular y también en los linfocitos y macrófagos al derredor de las células tumorales (Westin *et al.*, 2022).

II. JUSTIFICACIÓN

La RUV es el más importante desencadenante del carcinoma de piel, que puede presentarse con diversas formas clínicas de agresividades, dependiendo de su tipo histológico y del tipo de respuesta inmune. Diversas moléculas modulan la respuesta inmunológica, inhibiendo la respuesta empeorando enfermedades como el cáncer, o aumentando, dando como resultado curación. Entre las moléculas moduladoras del sistema inmune se destacan HLA-E y HLA-G que presentan un importante rol impidiendo la acción de las células citotóxicas contra las células tumorales.

Considerando que la RUV presenta propiedades inmunosupresoras, el estudio del comportamiento de las moléculas regulatorias del sistema inmune y de sus actuaciones en el cáncer basocelular puede propiciar una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos asociados con este cáncer y proponer tratamientos acordes con este conocimiento.

Además, la RUV afecta cada día a los seres humanos en mayor o menor cantidad dependiendo de su diaria actividad, factores atmosféricos, su fototipo cutáneo entre otros factores. Puesto que los mecanismos dañosos asociados con inmunosupresión inducida por la RUV no son bien conocidos, el estudio de las moléculas HLA-E y HLA-G sometidas a RUV se justifica porque no hay estudios previos evaluando esas moléculas bajo la influencia de RUV y también para entender los mecanismos patogénicos de desarrollo de los cánceres de piel

Además, se debe considerar que:

- i) Ecuador recibe la RUV perpendicularmente,
- ii) Hay pocos informes epidemiológicos sobre los cánceres de piel en Ecuador,
- iii) Muchos factores etiopatogénicos de los cánceres basocelulares aún necesitan clarificación, el estudio epidemiológico junto con la expresión de moléculas inmunomoduladoras y la evaluación *ex vivo* del efecto de la RUV, pueden contribuir para mejorar el entendimiento sobre la evolución y morbilidad de los cánceres de piel, particularmente del basocelular.

III. OBJETIVOS GENERALES:

Considerando que:

- i) la RUV es el principal agente etiológico asociado con el desarrollo de los cánceres de piel, particularmente el basocelular,
- ii) la zona ecuatorial recibe la RUV perpendicularmente
- iii) entre otros efectos, la RUV induce inmunosupresión en la piel,
- iv) las moléculas inmunoregulatorias HLA-E y HLA-G están involucradas en la gravedad y diseminación de varios tipos de cánceres,
- v) hay pocos estudios sobre la expresión de HLA-G y ningún sobre la expresión de HLA-E en muestras de carcinoma basocelular,
- vi) hay pocos estudios sobre las características epidemiológicas de los cánceres de piel en áreas que reciben RUV perpendicularmente,

Los objetivos generales de este estudio están relacionados con: i) evaluación de la expresión de moléculas inmunomoduladoras HLA-G y HLA-E en los cánceres basocelulares, ii) observación del efecto de la RUV sobre las moléculas HLA-E y HLA-G en estudios *ex vivo* en pieles normales, y iii) estudio de características epidemiológicas de los cánceres de piel en Ecuador y su asociación con la radiación solar (RS).

III.1. Objetivos específicos:

- i) Evaluar la expresión de moléculas inmunomoduladoras HLA-E y HLA-G en muestras de piel de pacientes con cáncer basocelular agresivos y no agresivos de la región de Ribeirão Preto, Brasil;
- ii) Estudiar el rol de la exposición crónica a la RUV artificial sobre la expresión de moléculas inmunomoduladoras HLA-E y HLA-G en piel normal obtenida de pacientes sometidos a abdominoplastia.
- iii) Conocer las diferentes variables asociadas con los cánceres de piel en áreas geográficas en las cuales la RS incide perpendicularmente, como en Ecuador.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1 Obtención de muestras de piel de carcinoma basocelular

Las muestras de piel fueron obtenidas de los archivos del Departamento de Patología del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto de la Universidad de São Paulo (FMRP-USP). Estudiamos 33 muestras de piel de pacientes presentando carcinomas basocelular agresivos y 23 muestras de piel de carcinomas non-agresivos. Para cada caso, se revisaron todas las secciones disponibles teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) para confirmar el diagnóstico previo y seleccionar los bloques representativos para la inmunotinción. El diagnóstico de carcinoma basocelular se realizó sobre la base de criterios histológicos e inmunohistoquímicos previamente establecidos (Cajina Vazquez, 2012; Chinem; Miot, 2011; Requena; Serra Guillen; Sanmartin, 2022).

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital de Clínicas de la FMRP-USP (proceso **CAAE: 68552223.3.0000.5440 #, ANEXO A**).

IV.2 Obtención de muestras de piel normal para estudios *ex vivo*

Las muestras de piel fueron recolectadas por la alumna Márcia Aparecida Ramos Lopes, durante su disertación titulada “*Avaliação da viabilidade e aplicação do modelo de pele humana ex vivo (hOSEC) para estudos de fotoenvelhecimento*”, supervisada por el profesor Marco Andrey Cipriani Frade en el programa de Clínica Médica de la FMRP-USP, cuyos resultados aún no han sido publicados.

Fueran utilizadas pieles sanas, no expuestas a la radiación solar, desechadas de abdominoplastias realizadas en mujeres (18-45 años, presentando fototipos II y III) en el Hospital das Clínicas de la FMRP-USP. Las mujeres seleccionadas no presentaban antecedentes de cáncer de piel, ni de lesiones dermatológicas previas. El proyecto fue presentado para y aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital de Clínicas de la FMRP-USP (**proceso # 11290/2018 – ANEXO B**).

IV.3. El modelo hOSEC (human organotypic skin explant in culture)

La estandarización del modelo hOSEC fue previamente realizado en el “*Laboratório de Cicatrização e Hanseníase*” de la FMRP-USP, conforme previamente reportado (Frade *et al.*, 2015, Leite *et al.*, 2021). La estandarización del modelo hOSEC para evaluar el efecto de la RUV sobre la piel fue también realizado por la alumna Márcia Aparecida Ramos Lopes. A continuación, se describirá brevemente el procedimiento, incluyendo los pasos para la obtención de la piel, cultivo *ex vivo*, definición de las concentraciones RUV más adecuadas, tiempo exposición a la RUV, duración de los cultivos de piel y preparo de muestras para el análisis inmunohistoquímico. Las descripciones metodológicas relatadas en continuación se refieren a las mejores condiciones realización de los experimentos.

IV.3. 1. Obtención de fragmentos de piel de abdominoplastia y cultivo *ex vivo*

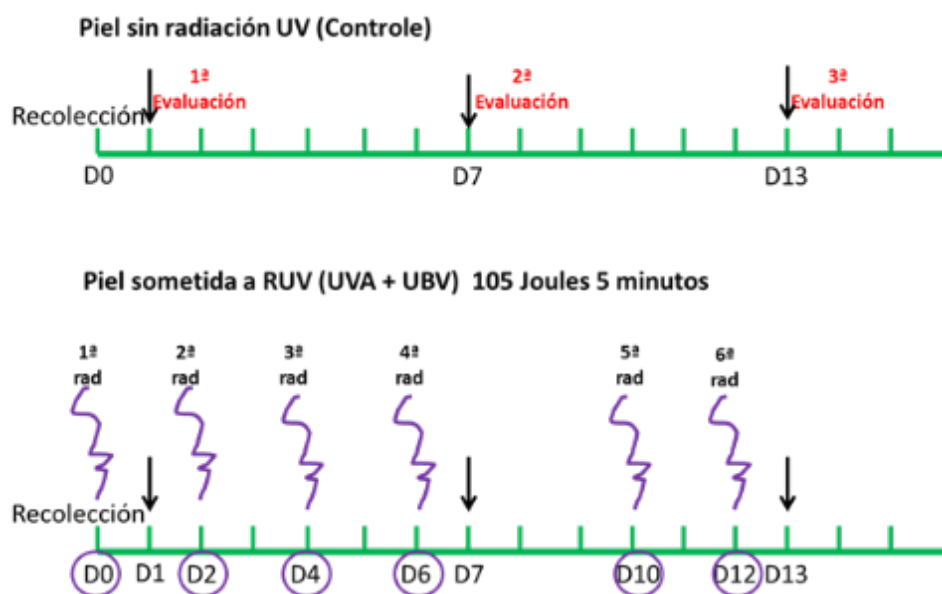
Las muestras de piel fueron colocadas en frascos estériles y mantenidas en cajas térmicas hasta el uso. Luego, las muestras fueron transferidas a otro frasco estéril, conteniendo solución salina tampón de fosfato (PBS) adicionada de penicilina al 1,5% 10.000 U, estreptomicina 10.000 μg y anfotericina B 25 μg (solución de antibióticos y antimicótica) (GIBCO - Invitrogen Corporation, Nueva York, EUA), y entonces mantenidas a 4°C durante la noche. Después de retirar el tejido adiposo subcutáneo, se colocaron explantes de 10 mm en placas de cultivo de 12 pocillos, sobre papel filtro (80 g/m^2 , permeabilidad al aire 26 $\text{l}/\text{s m}^2$, porosidad 25 μm), de manera que la dermis se quedase sumergida en el cultivo. Los explantes se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO - Invitrogen), suplementado con suero bovino fetal al 10% (SBF, GIBCO - Invitrogen Corporation), conteniendo L-glutamina al 1% (GIBCO - Invitrogen) y solución de antibióticos y antimicótica. Luego, las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO_2 durante 14 días, cambiando el DMEM a cada dos días.

IV.3.2. Estandarización del modelo hOSEC para estudio de la RUV

Considerando que no existe una estandarización en cuanto a la magnitud de la radiación, se realizaron varios experimentos variando las potencias y tiempos de radiación, utilizando el simulador solar Q-Sun XE-1S (Q-Lab, Westlake, EUA) el cual emite radiación UV, luz visible e infrarroja, con potencias variando desde 0,25 Watts/m²/nm hasta 0,68 W/m²/nm, con control de radiación a 340 nm y temperatura ajustada entre 35°C a 103°C.

Los explantes de piel fueron transferidos a otra placa de cultivo de 12 pocillos, adicionando 2 mL de solución salina con solución de antibióticos y antimicótico. Después de sometidas a la radiación, las muestras fueran cultivadas en DMEM a 37 °C con 5 % de CO₂. Así, las mejores condiciones de radiación fueron definidas utilizando: i) placa de cuarzo 85 x 125 x 2,1 mm (Actquartzo Industrial, Campinas, Brasil) con 99,99% de pureza SiO₂, ii) irradiancia a 340 nm, iii) potencia de 0,35 W/m²/nm, equivalente a 105 Joules, durante 5 minutos a una temperatura de 38°C, tres veces por semana, durante 13 días. Las evaluaciones se realizaron por triplicado por cada donante, en los días 1 (D1), D7 y D13 de cada experimento, utilizando tres donantes diferentes. La **Figura 6** ilustra el procedimiento.

Figura 6 - Flujograma del procedimiento de cultura *ex vivo* de explantes de piel obtenidas de mujeres normales (fototipos II y III) por ocasión de realización de abdominoplastia. Los explantes de tres donantes fueron sometidos o no (controles) a la radiación ultravioleta (RUV), utilizando el simulador solar Q-Sun XE-1S, potencia de 0,35 W/m²/nm (equivalente a 105 Joules), durante 5 minutos a una temperatura de 38°C, durante 14 días. Los explantes (triplicada por cada donante) fueron sometidos a la RUV en los días cero (D0), D2, D4, D6, D10 y D12 y las evaluaciones se realizaron en los días D1, D7 y D13 de cada experimento.



Fuente: La autora.

IV.3.4 - Preparación de muestras de explantes para experimentos de inmunohistoquímica

Las muestras, obtenidas en triplicado, fueron fijadas en formalina tamponada al 10 % (tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4) durante 24 horas. Luego, las muestras fueran deshidratadas y sometidas, secuencialmente, en baños de alcohol al 70%, 80%, 90%, 95% y alcohol absoluto (3 veces), una hora cada baño y seguido de xileno-alcohol (1:1) durante la noche. En el día siguiente, las muestras fueran sometidas a tres baños de xilol por 1 hora cada y, finalmente, en parafina a 60°C durante 2 horas. Luego, las muestras fueron cortadas en un micrótopo rotatorio (Leica, Wetzlar, Alemania) para los estudios inmunohistoquímicos.

IV.4 - Expresión de las moléculas HLA-E y HLA-G

Las muestras de piel obtenidas de explantes o de piel sometidas o no a la UVR y las muestras de piel presentando carcinoma basocelular agresivo y no-agresivo fueron preparadas para evaluar la expresión de moléculas HLA-E y HLA-G, conforme descrito previamente (Bertol, *et al.*, 2019), con pequeñas modificaciones. Resumidamente, secciones de tres μm de espesor fueron desparafinizadas con poli-l-lisina, rehidratadas y lavadas en tampón de citrato 10 mmol/l (pH 6,0) y después sometidas al calor por 45 minutos para la recuperación antigénica. Luego, las muestras fueron lavadas con PBS y después en solución de peróxido de hidrógeno al 3 % durante 20 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. El bloqueo de marcaje no específica fue realizado con suero normal (Vectastain Elite ABC Kit, Universal, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), durante 30 minutos. Luego, las secciones fueron incubadas durante dos horas a temperatura ambiente (25°C) en cámara húmeda con anticuerpos monoclonales para HLA-G (MEM-G/02, mouse IgG1, dilución 1:100, EXBIO, Vestec, República Checa) o HLA-E (MEM-E/02, mouse IgG1, dilución 1:100, EXBIO). Después de los lavados en PBS, se aplicó un anticuerpo secundario universal pan-específico biotinilado (Leica Biosystem, NewCastle upon Tyne, Reino Unido), durante 30 minutos. Las muestras fueron incubadas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Leica Biosystem) durante 30 minutos seguidos de otra incubación con *fast red* (Vector, Burlingame, CA, EUA) durante cinco minutos. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina de Harris, deshidratadas y montadas con Permount (Biomeda, Foster City, CA, EUA). El citotrofoblasto de placenta humana del primer trimestre y hígado de rata fueron utilizadas como controles positivo y negativo, respectivamente.

La inmunotinción se consideró positiva cuando estaba presente de manera homogénea en las membranas o una tinción citoplasmática marrón rojizo. Los porcentajes de células positivas se obtuvieron a ciegas en un campo representativo de alta potencia (200x). Las muestras se calificaron como negativas (sin células teñidas) o positivas (> 10% de células teñidas).

IV.5 Características generales de los cánceres de piel y sus asociaciones con la radiación solar en Ecuador

Se utilizaron los datos del INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censo 2020 disponible en <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/camas-y-egresos-hospitalarios/> acceso en el 6 de junio 2023) que registra las estadísticas de los egresos hospitalarios, con confirmación histopatológica de los tumores de piel, de acuerdo con el CIE.10. Así, se estudiarán los siguientes diagnósticos: **i)** C43 melanoma maligno de la piel (los tipos morfológicos clasificables en M872–M879 con código de comportamiento /3, C43.0 melanoma maligno del labio, C43.1 melanoma maligno del párpado, incluida la comisura palpebral, C43.2 Melanoma maligno de la oreja y del conducto auditivo externo, C43.3 melanoma maligno de las otras partes y las no especificadas de la cara, C43.4 Melanoma maligno del cuero cabelludo y del cuello, C43.5 melanoma maligno del tronco, margen de la mama y perianal, C43.6 melanoma maligno del miembro superior, incluido el hombro, C43.7 melanoma maligno del miembro inferior, incluida la cadera, C43.8 melanoma maligno de sitios contiguos de la piel, C43.9 melanoma maligno de piel, sitio no especificado, excluyéndose el melanoma del ano SAI (C21.0), órganos genitales (C51–C52, C60.–, C63.–) y del borde libre (rojo) del labio (C00.0–C00.2); **ii)** melanoma *in situ* (D03), incluyendo los tipos morfológicos clasificables en M872–M879 con código de comportamiento /2, D03.0 melanoma *in situ* del labio, D03.1 melanoma *in situ* del párpado y de la comisura palpebral, D03.2 melanoma *in situ* de la oreja y del conducto auditivo externo, D03.3 melanoma *in situ* de otras partes y de las no especificadas de la cara, D03.4 melanoma *in situ* del cuero cabelludo y del cuello, D03.5 melanoma *in situ* del tronco mama (piel y tejidos blandos), margen del ano y piel perianal, D03.6 melanoma *in situ* del miembro superior, incluido el hombro, D03.7 melanoma *in situ* del miembro inferior, incluida la cadera, D03.8 melanoma *in situ* de otros sitios, D03.9 melanoma *in situ* no especificado; **iii)** otros tumores malignos de la piel: C44, incluyendo tumor maligno de glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas, excluyendo melanoma maligno de la piel (C43.–), piel de los órganos genitales (C51–C52, C60.–, C63.–) y sarcoma de Kaposi (C46.–), C44.0 tumor maligno de la

piel del labio carcinoma de células basales del labio, excluyendo el tumor maligno del labio (C00.-), C44.1 tumor maligno de la piel del párpado, incluida la comisura palpebral, excluyendo el tejido conjuntivo del párpado (C49.0), C44.2 tumor maligno de la piel de la oreja y del conducto auditivo externo, excluyendo el tejido conjuntivo de la oreja (C49.0), C44.3 tumor maligno de la piel de otras partes y de las no especificadas de la cara, C44.4 tumor maligno de la piel del cuero cabelludo y del cuello, C44.5 tumor maligno de la piel del tronco, incluyendo la margen piel-piel de la mama y piel perianal, excluyendo el ano SAI (C21.0) y melanoma maligno del tronco, (C43.5) tumores del ano (191), C44.6 tumor maligno de la piel del miembro superior, incluido el hombro, C44.7 tumor maligno de la piel del miembro inferior, incluida la cadera, C44.8 lesión de sitios contiguos de la piel, C44.9 y iv) carcinoma *in situ* de la piel, D04 Carcinoma *in situ* de la piel, excluyendo la eritroplasia de Queyrat (pene) SAI (D07.4) y melanoma *in situ* (D03.-), D04.0 carcinoma *in situ* de la piel del labio, excluyendo el borde rojo del labio (D00.0), D04.1 carcinoma *in situ* de la piel del párpado y de la comisura palpebral, D04.2 carcinoma *in situ* de la piel de la oreja y del conducto auditivo externo, D04.3 carcinoma *in situ* de la piel de otras partes y de las no especificadas de la cara, D04.4 carcinoma *in situ* de la piel del cuero cabelludo y cuello, D04.5 carcinoma *in situ* de la piel del tronco, margen del ano, piel-piel de la mama y piel perianal, excluyendo ano SAI (D01.3) y piel de órganos genitales (D07), D04.6 carcinoma *in situ* de la piel del miembro superior, incluido el hombro, D04.7 carcinoma *in situ* de la piel del miembro inferior, incluida la cadera, D04.8 carcinoma *in situ* de la piel de otros sitios especificados y D04.9 carcinoma *in situ* de la piel, sitio no especificado (Organización Panamericana de la Salud, 2008).

Los datos fueron tomados desde 2015 hasta 2021, considerándose las siguientes variables: i) el sexo, ii) el color de piel según la autoidentificación étnica (indígena, afro-ecuatoriano, mestizo, blanco y sin información), iii) la distribución según la altura de las provincias de Ecuador, iv) la asociación entre los niveles medidos de la radiación solar (RS) en las provincias de Pichincha (Quito) y del Guayas (Guayaquil) que son centros de referencia a nivel nacional para los cánceres de piel.

Considerando que la radiación solar (RS) global engloba la directa (energía solar que llega directamente a la superficie de la tierra) o reflejada (energía solar que llega a la tierra y se refleja en el mar o la tierra), utilizamos la RS directa disponible <https://www.arosolar.com/es/la-radiacion-solar>, medida en W/m^2 , en valores promedio y máximo mensual, interpolados por polinomios Splin por mes. Cabe notar que Quito se encuentra a 2850 metros sobre el nivel del mar (msnm), mientras Guayaquil a 4 msnm.

IV. 5. Análisis estadístico

Para el análisis de datos sobre la expresión de las moléculas inmunoregulatorias se trabajan técnicas de intervalos de confianza para la proporción de positivos, pruebas de asociación tipo chi-cuadrado complementado con el Análisis Factorial de Correspondencias; a más de evaluar el Kappa de Cohen para medir los niveles de concordancia entre resultados de expresión de las moléculas inmunomoduladoras. Se consideró un nivel de significación del 5% ($\alpha=0,05$) para el rechazo de la hipótesis nula.

La comparación de expresión de HLA-G y HLA-E entre explantes sometidos o no a la RUV fue realizada cualitativamente una vez que analizamos solamente tres muestras en triplicada.

Los datos sobre la incidencia de cánceres de piel no melanoma y melanoma en Ecuador (clasificada según la autoidentificación étnica, sexo, edad, provincia, ciudad, altura geográfica de las regiones) fueron obtenidos de las informaciones oficiales de libre disponibilidad en el INEC, disponible en el sitio <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/camas-y-egresos-hospitalarios/> acceso 6 de junio 2023) sobre los registros de ingresos y egresos hospitalarios. Para asociar los datos sobre la incidencia de los cánceres de piel con la RS global (directa o reflejada), se utilizó la RS directa.

Se cuenta con información, para Quito y Guayaquil, de la RS en W/m^2 ; en valores promedio de cada hora. Para fines del tratamiento de datos, se presenta en valores promedio y máximo mensual, interpolados por polinomios Splin. Cabe notar que Quito se encuentra a 2850 msnm mientras que Guayaquil a 4 msnm.

Los datos sobre la RS son de libre acceso bajo solicitud en el ministerio de medio ambiente, al cual se solicitó la información (<https://www.inamhi.gob.ec/>) La información para los cánceres de piel están disponible mes a mes desde 2015 y para el caso de Quito y desde 2018 para Guayaquil. Al tratarse de datos en el tiempo, se evalúan las tendencias en el tiempo (con el mes como unidad temporal); para una mejor visualización de la tendencia; se suaviza mediante un polinomio Splin. Hay que notar que, para mejor tratamiento de datos de cáncer, se define la tasa como casos detectados por cada 10.000 atenciones; esto permite un mejor tratamiento y análisis de las tendencias en el tiempo.

Para el tratamiento de datos se usa el software libre R v4.3.1.

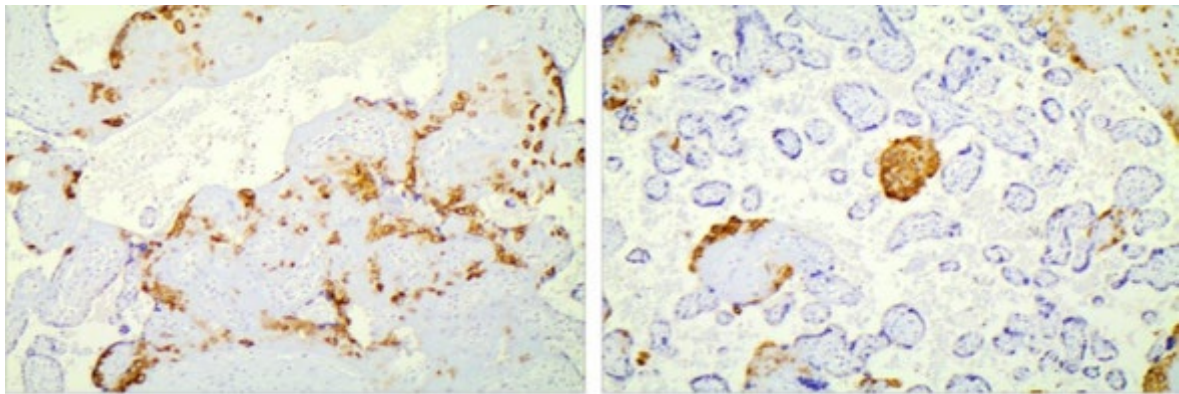
V. RESULTADOS

V.1. Expresión de las moléculas HLA-G y HLA-E

V.1.1. Expresión de moléculas HLA-E y HLA-G en tejidos controles

Como controles de los experimentos de inmunohistoquímica en muestras de carcinoma basocelulares fue utilizado como control positivo citotrofoblasto de placenta humana del primer trimestre que expresa tanto HLA-G como HLA-E (**Figura 7**).

Figura 7 - Tinción inmunohistoquímica para antígeno leucocitario humano (HLA)-G (a derecha) y HLA-E (a la izquierda). Control positivo de placenta humana del primer trimestre que expresa tanto HLA-G como HLA-E (tinción marrón). Ampliación original x200.



Fuente: La autora.

V.1.2. Expresión de moléculas HLA-E y HLA-G en carcinoma basocelular

Inicialmente se muestran resultados de cada variable observada, desagregado por nivel de agresividad; y, luego se contrasta con la presencia de moléculas HLA-E y HLA-G. Se utiliza el software libre R para el procesamiento de datos; que, básicamente trabaja con proporciones y sus intervalos de verosimilitud. Se evalúan 56 casos, de los cuales 33 (58.9%) se catalogan como agresivos y 23 (41.1%) no agresivos; sin embargo, considerando aquellos con resultado en HLA-G los casos se reducen a 39 y en aquellos que se cuenta con resultado en HLA-E los casos se reducen a 37 casos con resultado en las dos evaluaciones se reducen a 37:22 y 15 no agresivos. Las **Tablas 1 y 2** ilustran la expresión cualitativa de HLA-E o HLA-G en las muestras da carcinomas basocelulares agresivos y no agresivos.

Tabla 1 - Clasificación de los tumores basocelulares agresivos, estratificados según la expresión individual de HLA-E y HLA-G en las áreas tumorales.

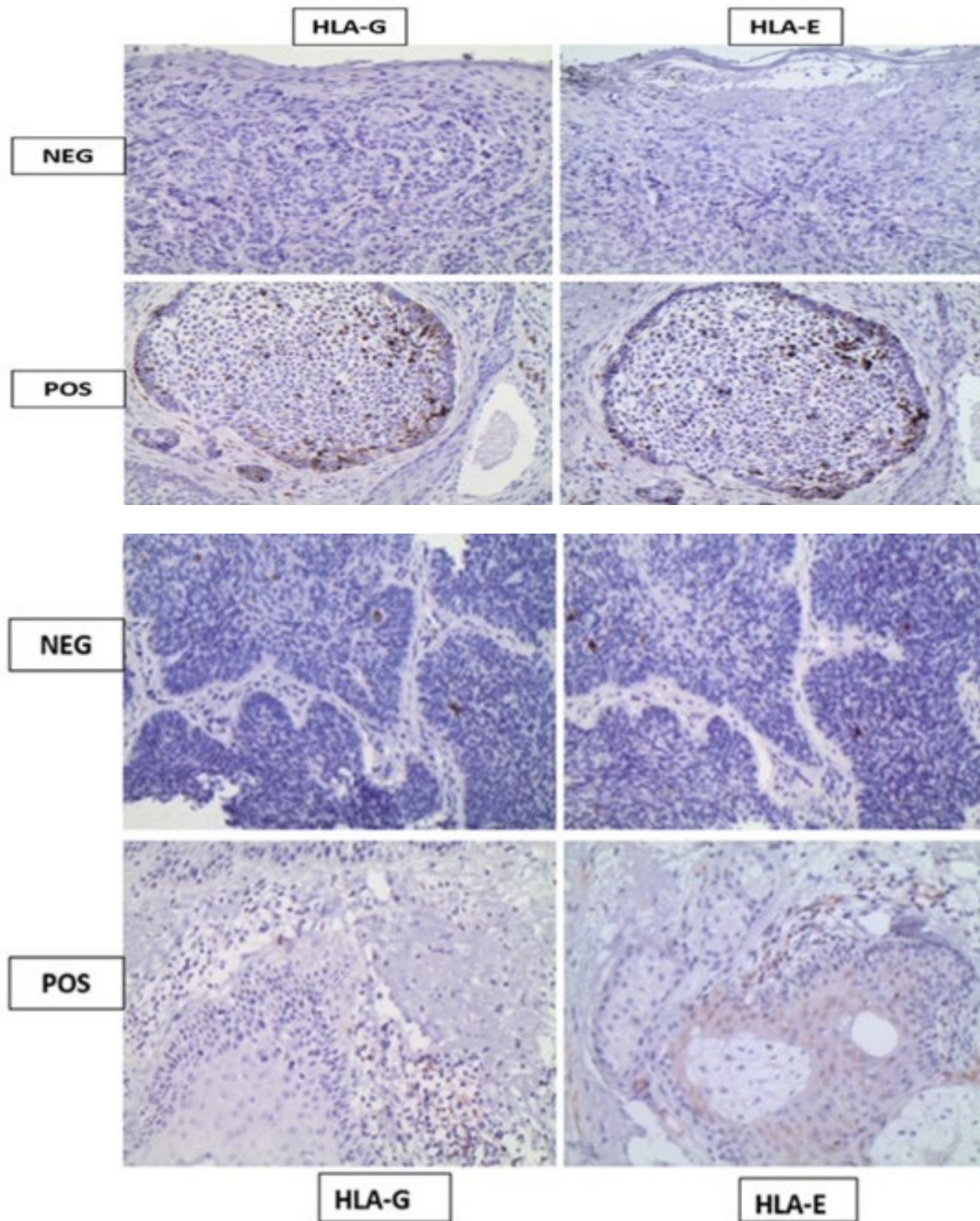
	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLOGICO	PRESENCIA DE HLA-G	PRESENCIA DE HLA-E
1	Carcinoma Basocelular Nodular - Esclerodermiforme	Positivo	Positivo
2	Carcinoma Basocelular Nodular e Esclerosante , ulcerado	Negativo	Negativo
3	Carcinoma Basocelular Nodular e Esclerodermiforme ulcerado	Negativo	Positivo
4	Carcinoma Basocelular Nodular Esclerocante e superficial	Negativo	Negativo
5	Carcinoma Basocelular Micronodular	Negativo	Positivo
6	Carcinoma Basocelular superficial esclerodermiforme	Negativo	Positivo
7	Carcinoma Basocelular Micronodular focal	Negativo	Positivo
8	Carcinoma Basocelular esclerodermiforme	Negativo	Positivo
9	Carcinoma Basocelular nodular esclerosante e queratosico ulcerado	Negativo	Positivo
10	Carcinoma Basocelular nodular micronodular e pigmentado	Positivo	Negativo
11	Carcinoma Basocelular adenoide e micronodular	Negativo	Negativo
13	Carcinoma Basocelular micronodular	Negativo	Positivo
14	Carcinoma Basocelular nodular esclerosante e ulcerado	Negativo	Positivo
15	Carcinoma Basocelular nodular e esclerodermiforme	Negativo	Positivo
16	Carcinoma Basocelular infiltrativo e ceratotico ulcerado	Negativo	Negativo
17	Carcinoma Basocelular e infiltrativo ulcerado	Negativo	Positivo
18	Carcinoma Basocelular superficial e nodular e infiltrativo	Positivo	Negativo
19	Carcinoma Basocelular esclerodermiforme	Negativo	Positivo
20	Carcinoma Basocelular superficial nodular , esclerodermiforme focal	Positivo	Positivo
21	Carcinoma Basocelular nodular e esclerosante	Negativo	Positivo
22	Carcinoma Basocelular esclerosante	Negativo	Negativo
23	Carcinoma Basocelular superficial nodular , esclerodermiforme focal	Positivo	Positivo

Tabla 2 - Clasificación de los tumores basocelulares no agresivos, estratificados según la expresión individual de HLA-E y HLA-G en las áreas tumorales.

	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLOGICO	PRESENCIA DE HLA-G	PRESENCIA DE HLA-E
1	Carcinoma Basocelular nodular	Negativo	Positivo
2	Carcinoma Basocelular nodular focalmente erodido	Negativo	Positivo
3	Carcinoma Basocelular superficial e nodular	Negativo	Positivo
4	Carcinoma Basocelular nodular	Negativo	Positivo
5	Carcinoma Basocelular nodular	Positivo	Positivo
6	Carcinoma Basocelular superficial	Negativo	Positivo
7	Carcinoma Basocelular nodular e infiltrativo focalmente ulcerado	Negativo	
8	Carcinoma Basocelular superficial e nodular	Negativo	Positivo
9	Carcinoma Basocelular nodular	Negativo	Negativo
10	Carcinoma Basocelular nodular e pigmentado	Positivo	Positivo
11	Carcinoma Basocelular nodular ceratotico	Negativo	Positivo
12	Carcinoma Basocelular nodular	Negativo	Negativo
13	Carcinoma Basocelular nodular	Negativo	Negativo
14	Carcinoma Basocelular superficial	Negativo	
15	Carcinoma Basocelular nodular	Negativo	Positivo
16	Carcinoma Basocelular superficial	Negativo	Positivo
17	Carcinoma Basocelular nodular variante adenoide	Negativo	Negativo

La **Figura 8** ilustra ejemplos de tumores basocelulares agresivos y no agresivos, presentando o no expresión de las moléculas HLA-E y HLA-G.

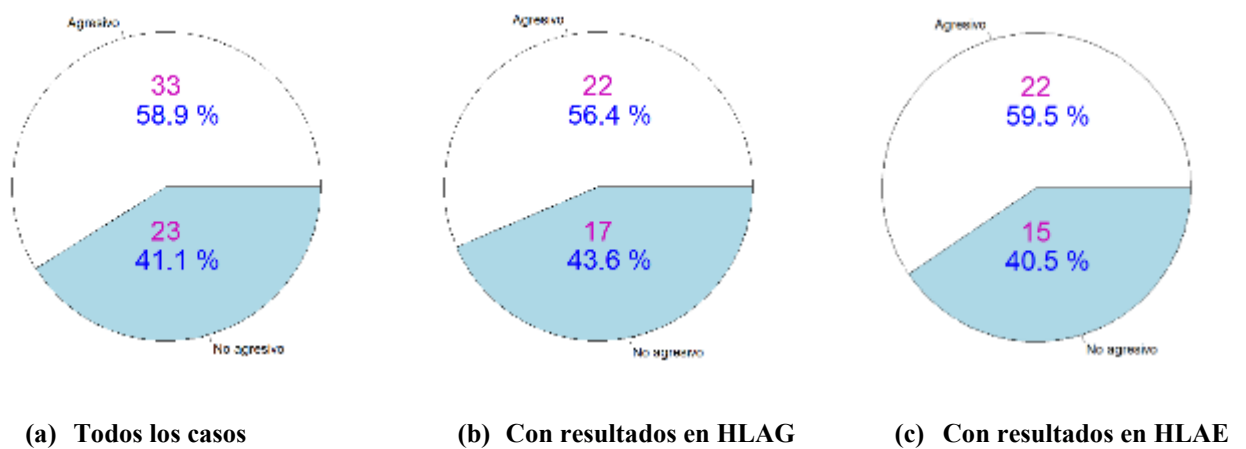
Figura 8 - Ejemplos de tumores basocelulares presentando o no expresión de las moléculas HLA-E y HLA-G en las áreas tumorales. El panel superior ilustra muestras de basocelulares no agresivos y el panel inferior ilustra las muestras agresivas. Ampliación original 200X.



Fuente: La autora

El conjunto de resultados de expresiones de HLA-G y HLA-E según agresividad se muestra en la **Figura 9**. Se puede notar que para HLA-G predominan resultados negativos y para HLA-E resultados positivos. Las pruebas de independencia muestran, en los dos casos, que en resultado de positividad es independiente de agresividad ($p > 0.05$)

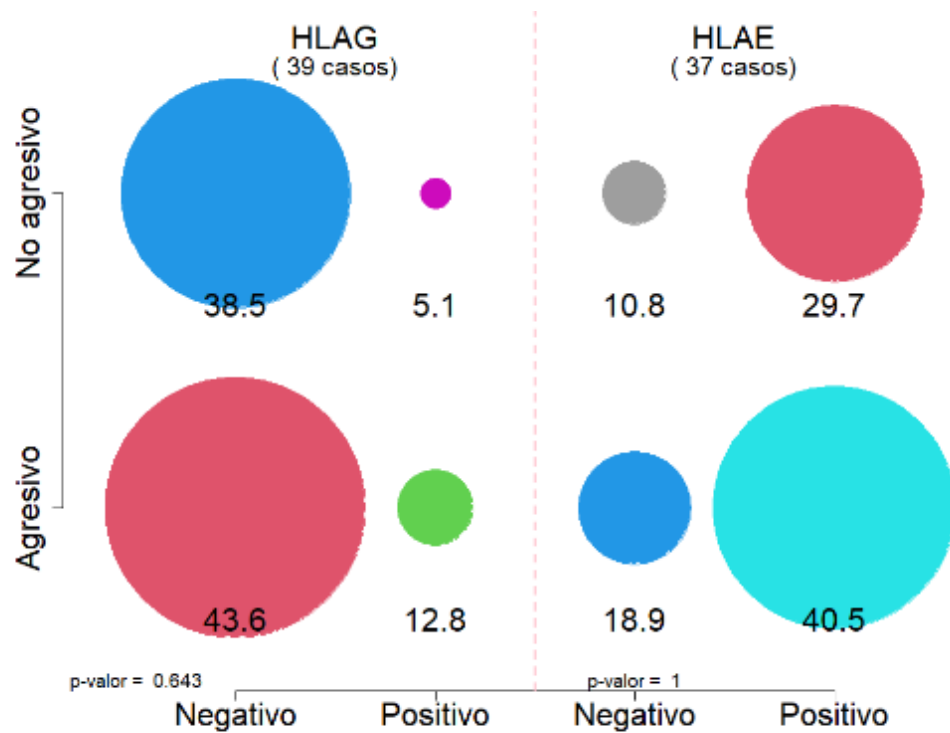
Figura 9 - Expresión de las moléculas inmunoregulatorias HLA-E y HLA-G en muestras de carcinoma basocelular agresivos (n =33) y no agresivos (n =23).



Fuente: La autora.

Considerando solo resultados positivos, según la agresividad del carcinoma basocelular, se puede notar que la expresión de HLAG oscila entre 11.8% y 22.7%, sin marcarse diferencia significativa entre agresividad y no agresividad; más, en HLA-E los porcentajes de casos positivos varía entre 68.9% y 73.3%, también sin marcarse diferencia significativa entre agresividad y no agresividad. En todos los casos, se ratifica que en HLA-E los resultados positivos son mucho mayores que en HLA-G; indistintamente de la agresividad (**Figura 10**).

Figura 10 - Expresión inmunohistoquímica de HLA-G (n=39) y HLA-E (n = 37) en carcinomas basocelulares agresivos y no agresivos. Aún que la expresión de HLA-E sea más intensa que HLA-G ($p < 0.001$), no hay diferencias entre las expresiones de esas moléculas entre carcinomas agresivos y no agresivos.



Fuente: La autora

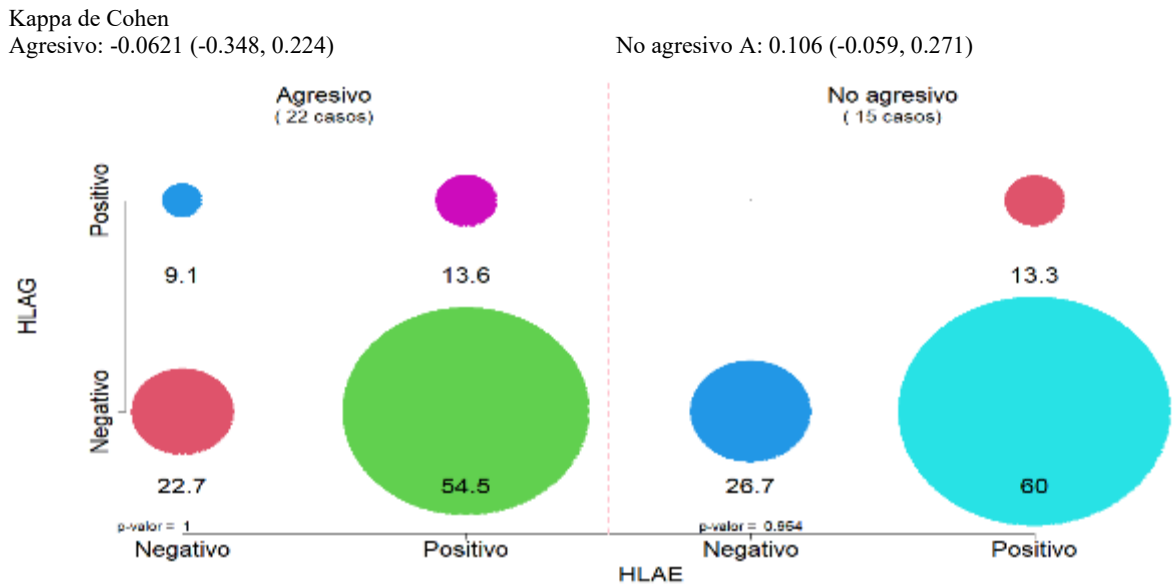
Se observa que aún que la expresión de HLA-E sea más intensa que HLA-G ($p < 0.001$), no hay diferencias entre las expresiones de esas moléculas entre carcinomas agresivos y no agresivos

Para evaluar la expresión conjunta de los dos tipos de moléculas, se establece el porcentaje de casos según sea positivo o negativo y según la agresividad. Fueron realizados dos tipos de análisis, en el primer se calcula el indicador de concordancia Kappa de Cohen, en lo cual los valores con intervalos negativos o valores con intervalos positivos indican discordancias o concordancias de expresión. Sin embargo, intervalos incluyendo el valor cero muestran ausencia de asociaciones. En el segundo tipo, se hace un análisis factorial de correspondencias múltiples, construyéndose mapas de correspondencias.

El indicador de concordancia Kappa de Cohen refleja ínfima concordancia entre resultados de expresión conjunta, pues que los intervalos incluyen el valor cero, como indicado en la **Figura 11**. El análisis factorial de correspondencias múltiples también muestra poca discrepancia entre agresivos y no agresivos según los resultados de HLA-G y HLA-E; más, se confirma que HLAG positivos tienden a mostrarse en agresivos. Las **Figuras 12 y 13** muestran

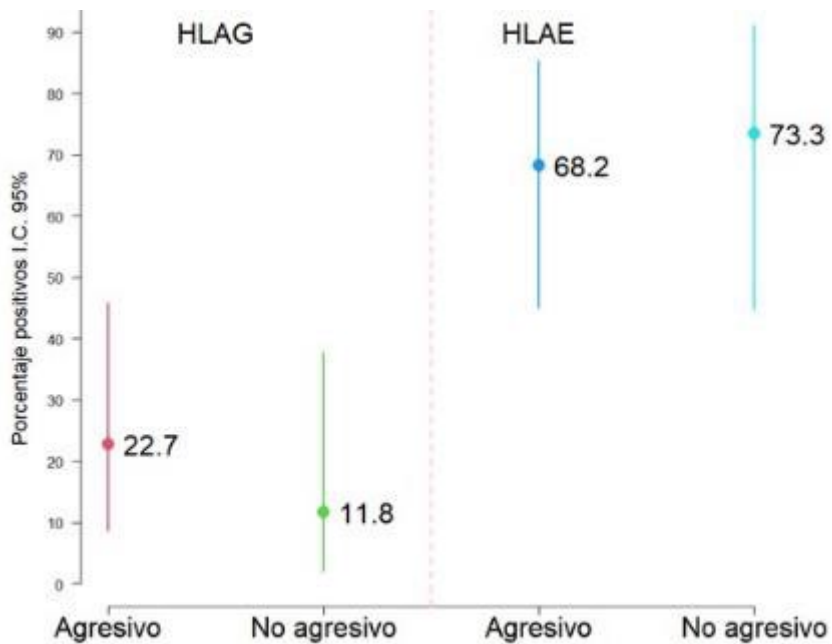
los mapas de correspondencia, evaluando las expresiones de HLA-G e HLA-E en carcinomas agresivos y no agresivos.

Figura 11 - Evaluación de la concordancia entre las expresiones de HLA-E y HLA-G, utilizando el indicador de concordancia Kappa de Cohen, que incluye en valor nulo; lo cual refleja la ínfima concordancia entre resultados de expresión conjunta.



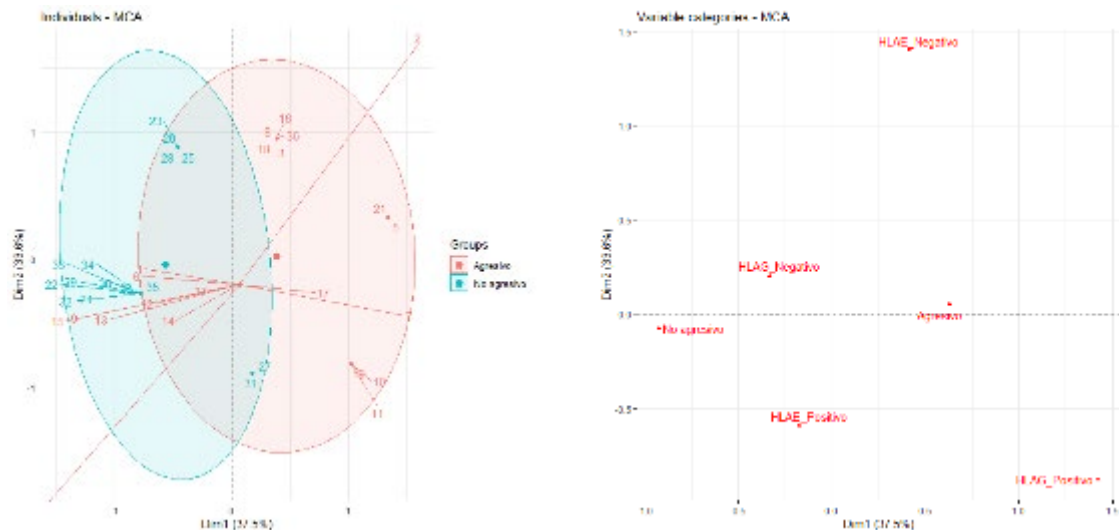
Fuente: La autora

Figura 12 - Mapa de correspondencia, evaluando las expresiones de HLA-G e HLA-E en carcinomas agresivos y no agresivos.



Fuente: La Autora

Figura 13 - Mapas de correspondencias evaluando simultáneamente las expresiones de HLA-E y HLA-G en carcinomas agresivos y no agresivos. El cuadro a la izquierda muestra la expresión de esas moléculas en muestras de carcinoma no agresivo (diagrama azul), mientras que las muestras agresivas están incluidas en el diagrama rojo. Como se observa, no hay una separación nítida entre los dos diagramas, observándose una intersección entre ellos (muestras con características de agresividad y no agresividad). El cuadro de la derecha muestra los mismos hallazgos del cuadro a la izquierda, pero individualizando el rol de las moléculas HLA-E y HLA-G. Así, las muestras de carcinoma basocelular no agresivos son primordialmente HLA-E positivas y HLA-G negativas, mientras que las muestras agresivas son primordialmente HLA-G positivas y HLA-E negativas.



Fuente: La autora

V.2 Efecto de la RUV sobre los explantes de piel

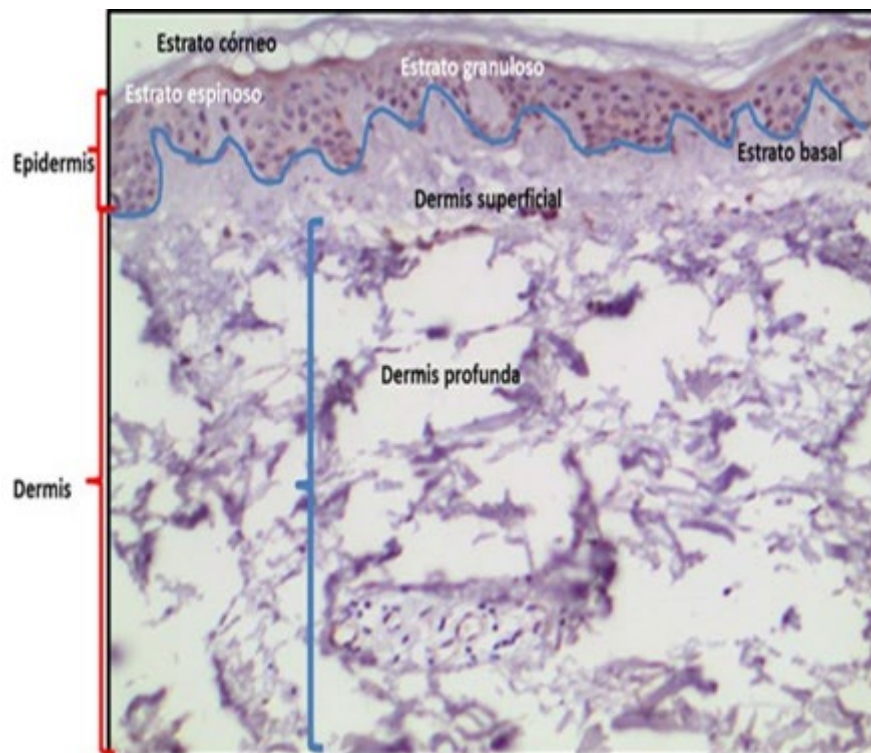
Considerando únicamente la tinción de hematoxilina de Harris en los días D1 y D7, en explantes radiados como no radiados, las pieles permanecen intactas, lo que permite visualizar las capas epidérmica y dérmica y sus sustratos principales, es decir, el estrato córneo, granuloso y espinoso y basal de la epidermis y las capas de la dermis superficial y profunda.

Considerando los explantes no irradiados (control), en el día D1 se observa que los diversos estratos de la capa epidérmica y dérmica están bien conservados (**Figura 14**). En D7 hay un aumento del estrato córneo, pero la piel permanece intacta, lo que permite observar todos los estratos de la capa epidérmica y dérmica. En D13, el estrato córneo aumenta aún más, probablemente debido al tiempo de cultivo del explante y, en consecuencia, al envejecimiento celular. El estrato granuloso está desapareciendo, el estrato espinoso tiene queratinocitos

hinchados (apoptóticos) con núcleos más redondeados y el estrato basal aún se conserva, manteniendo la unión dermis/epidermis.

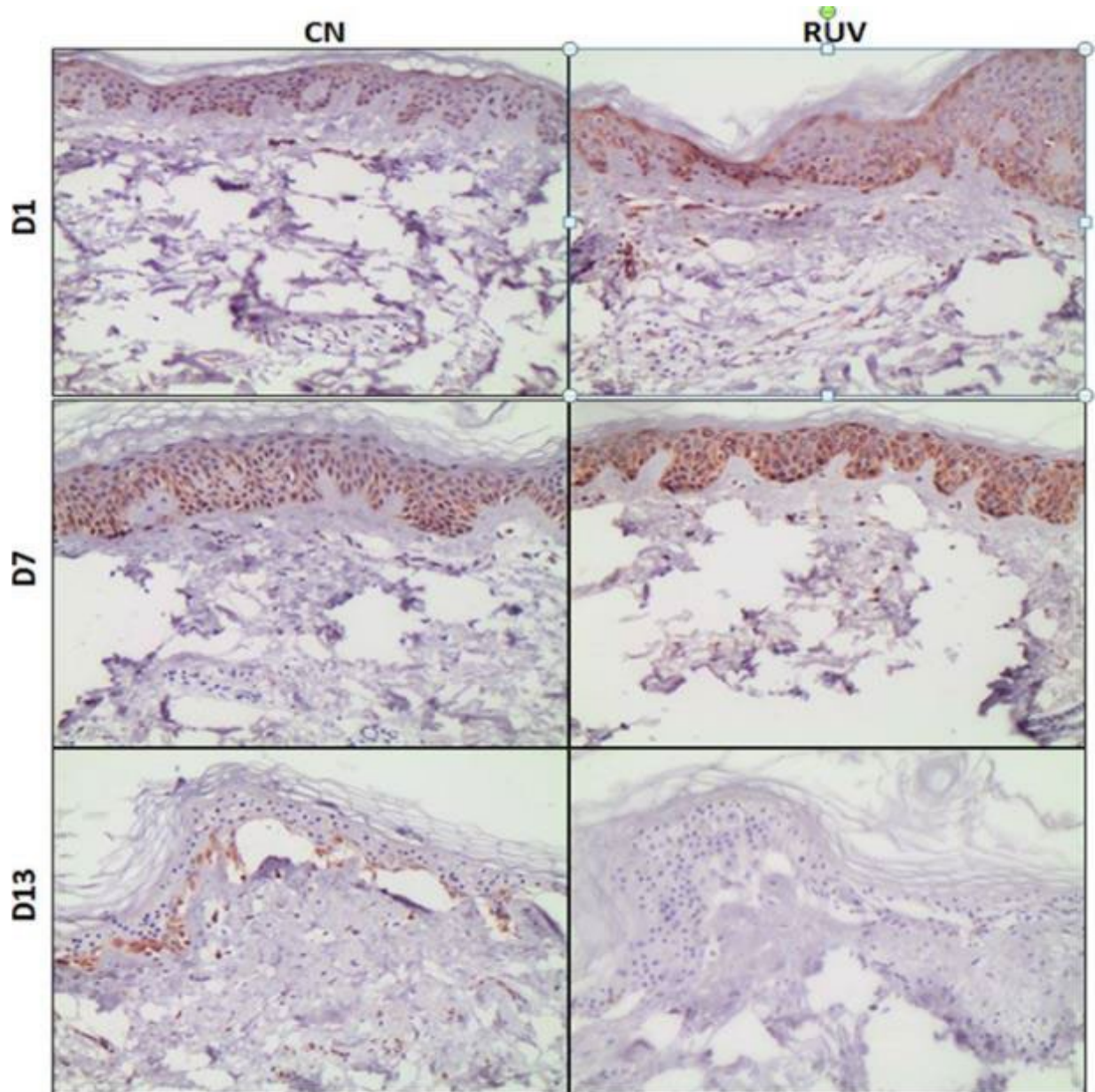
En los explantes sometidos a RUV, en D1 ya hay aumento del estrato córneo y mejor definición de la capa granular, el estrato espinoso se presenta con mayor diferenciación de queratinocitos y el estrato basal se mantiene intacto. En D7, el estrato córneo es más compacto, manteniendo los estratos granular, espinoso y basal, posiblemente debido a la liberación de factores tróficos protectores para la defensa contra la RUV. En la dermis superficial y profunda se produce infiltración de células inflamatorias. En D13, el estrato córneo es bastante grueso y lacio (incluso D7 fue compacto). El estrato granuloso está ausente, las células del estrato espinoso están disminuidas, desorganizadas y los queratinocitos están más diferenciados, con núcleos redondeados. El estrato basal está desorganizado con pérdida de la unión dermis/epidermis. En las capas de la dermis superficial y profunda se encuentran algunas células inflamatorias (¿fototoxicidad acumulada?). La **Figura 15** ilustra explantes de piel sometidos o no a la RUV en los días D1, D7 y D13, incubadas con anticuerpo anti-HLA-E.

Figura 14 -. Imagen ilustrativa de un explante de piel, cultivado durante 24 horas, sin exposición a la radiación ultravioleta, mostrando los diversos estratos de las capas epidérmica y dérmica.



Fuente: La autora.

Figura 15 - Expresión de HLA-E en explantes de piel sometidos o no (control: CN) a la radiación ultravioleta (RUV, 105 Joules por 5 minutos), realizadas en los días D0, D2, D4, D6, D10 y D12 y evaluadas 24 horas después de la primera (D1), 24 horas después de la cuarta (D7) y 24 horas después de la sexta (D13) RUV. Ampliación original $\times 200$.



Fuente: La autora

V. 2. 1. Expresión inmunohistoquímica de HLA-E en explantes de piel

Las **Figuras 16, 17 y 18** ilustran los hallazgos diferenciales entre las expresiones de HLA-E en explantes de piel sometidos o no (controles) a la RUV, en los días D1, D7 y D13, respectivamente.

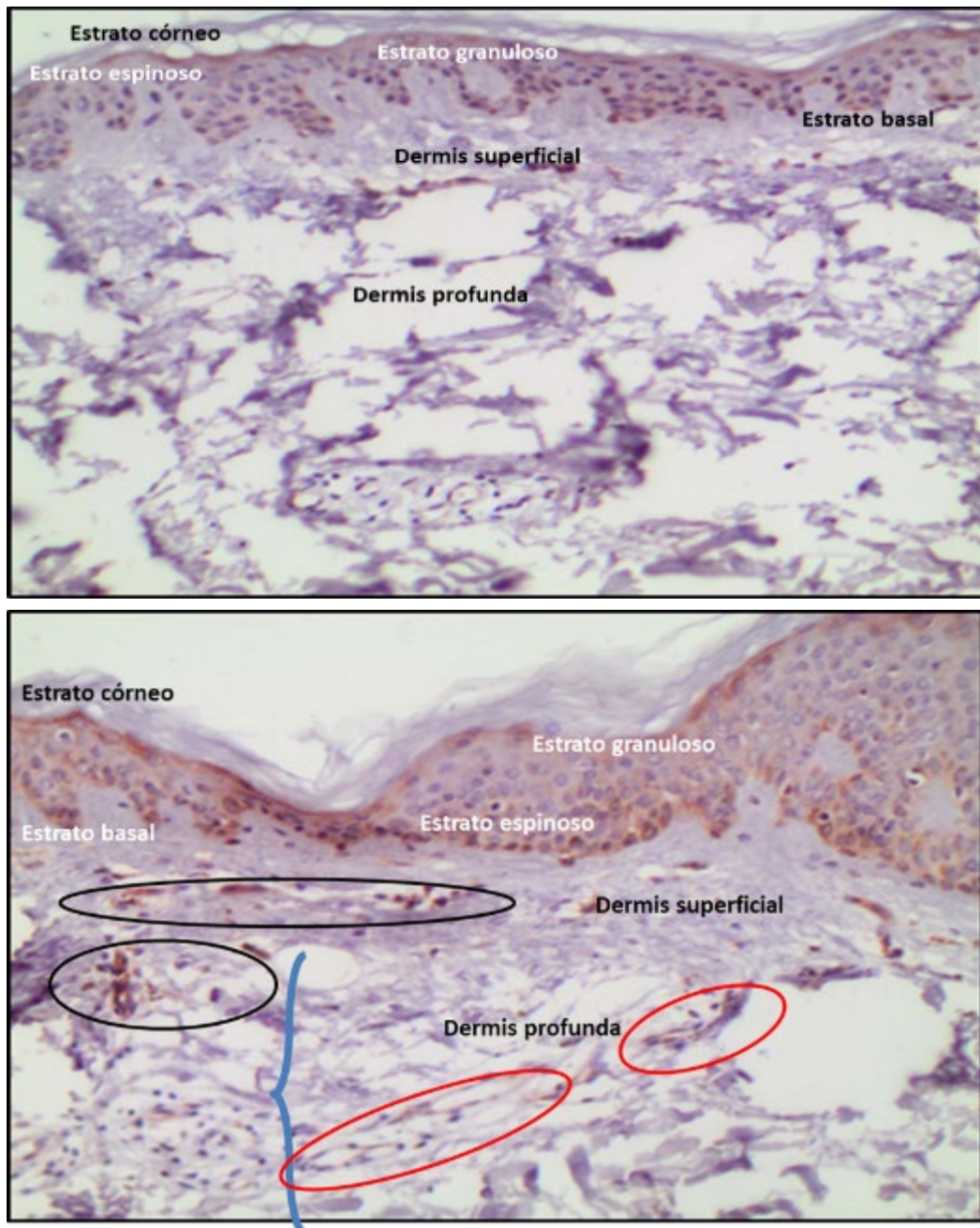
Control sin irradiación:

Hay expresión de HLA-E en la epidermis en los días D0 y D7 y expresión mínima en células inflamatorias, disminuyendo notablemente en el día D14, pues que el estrato espinoso de la epidérmica y los otros estratos superiores sufren apoptosis e incluso se desprenden después de mucho tiempo de cultura. Por lo tanto, no vemos toda la capa de epidermis porque las células están hinchadas. Sin embargo, el estrato basal aún es viable y se observa expresión de HLA-E en la unión dermoepidérmica, incluso en melanocitos. Además, se observa múltiples células inflamatorias dérmicas, lo que corrobora la viabilidad del modelo.

Células irradiadas:

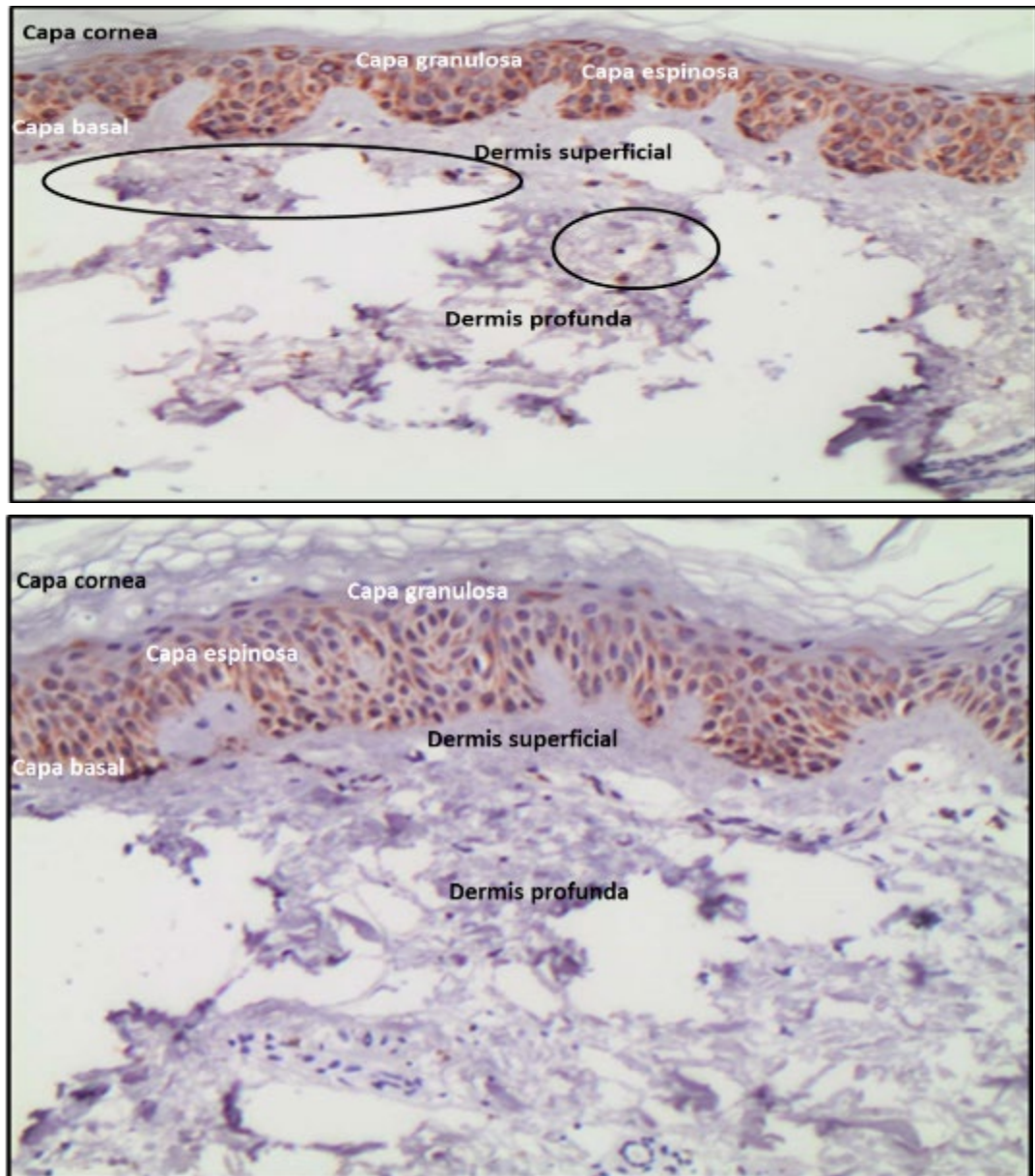
Hubo expresión de HLA-E contra la irradiación en los días D0 y D7 (día de análisis después de la irradiación en D6) tanto en la epidermis como en las células inflamatorias dérmicas. Este hallazgo demuestra cuánta radiación llegó a la dermis, también por UVA, con una estimulación de expresión mucho mayor en las células inflamatorias dérmicas en comparación con el grupo no irradiado. La expresión de HLA-E es prácticamente nula el día D14 (probablemente la radiación dañó mucho al modelo, ya que la unión dermoepidérmica también está rota).

Figura 16 - Tinción inmunohistoquímica para el antígeno leucocitario humano HLA-E en explantes de piel sometida no (control) a la radiación ultravioleta en el día D1 (24 horas de cultivo), mostrando las capas de la piel (epidermis y dermis) y los estratos de las dos capas. En la piel control (superior) observase discreta expresión de la molécula HLA-E (marrón rojizo) en el estrato granuloso y muy discreta expresión en la dermis superficial. En la epidermis de la piel irradiada observase: i) aumento del estrato córneo, ii) mayor definición del estrato granuloso, iii) estrato espinoso con mayor diferenciación de queratinocitos y estrato basal intacto. La dermis superficial está más gruesa/densa. Comparada al control, la expresión de HLA-E está aumentada y se observa expresión en los estratos granuloso y basal. Sin embargo, la capa espinosa disminuyó la expresión de HLA-E, ya que tiene queratinocitos más diferenciados (núcleos redondeados o balonzados). En la dermis superficial hay un aumento de células inflamatorias (círculos negros) con expresión de HLA-E. En la dermis profunda destacan las células del endotelio capilar con expresión de HLA-E (círculos rojos). Ampliación original $\times 200$



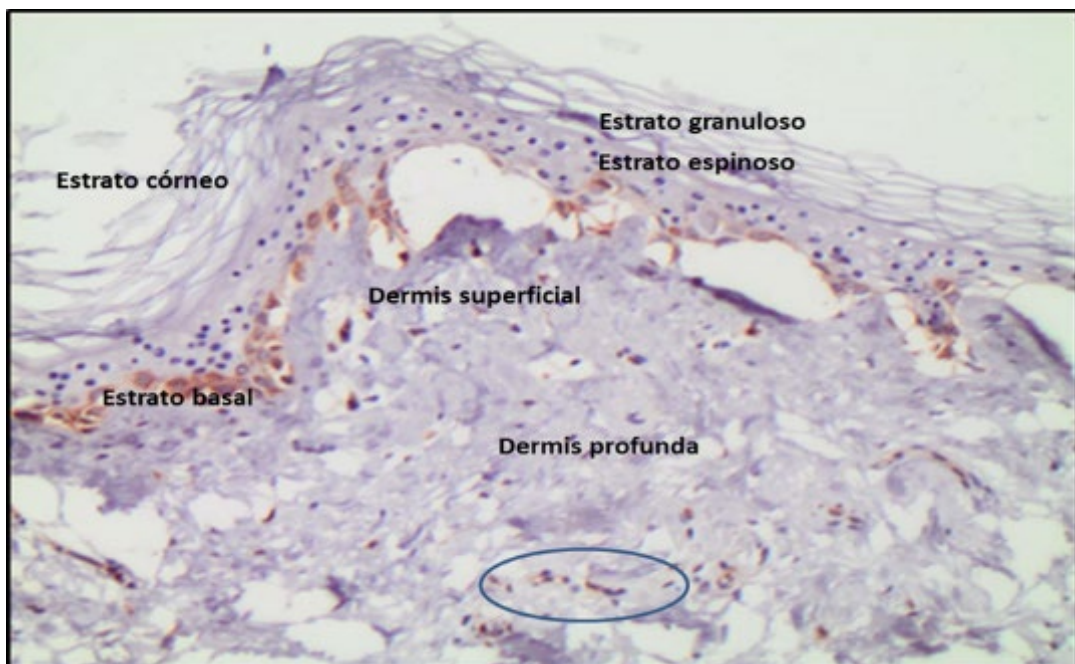
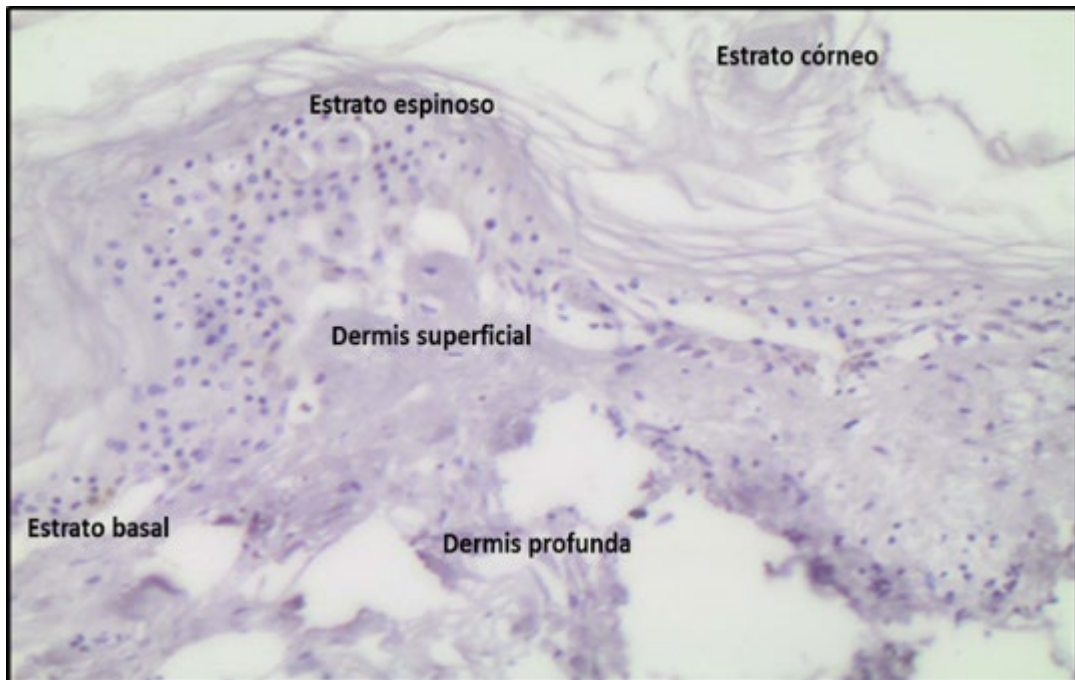
Fuente: La autora

Figura 17 - Tinción inmunohistoquímica para el antígeno leucocitario humano HLA-E en explantes de piel sometida o no (control) a la radiación ultravioleta en el día D7. En el explante control (superior), hay un aumento del estrato córneo, pero la piel permanece intacta, lo que permite observar todos los estratos de las capas epidérmica y dérmica. La expresión de HLA-E está más evidente en el estrato basal. En la piel sometida a la RUV (inferior), el estrato córneo es más compacto, manteniendo los estratos granular, espinoso y basal. Observase expresión de HLA-E en los estratos granuloso, espinoso y basal. En la dermis superficial y profunda se observan células inflamatorias (círculos negros) con expresión de HLA-E. Ampliación original $\times 200$.



Fuente: La autora.

Figura 18 - Tinción inmunohistoquímica para el antígeno leucocitario humano HLA-E en explantes de piel sometida o no (control) a la radiación ultravioleta en el día D13. En el explante control (superior), hay un grande aumento del estrato córneo y el estrato granuloso está prácticamente ausente. En el estrato espinoso observase queratinocitos hinchados (apoptóticos) con núcleos más redondeados y el estrato basal aún se conserva, manteniendo la unión dermis/epidermis. La expresión de HLA-E es observada donde hay células viables en el estrato basal. En la dermis superficial y en la dermis profunda observase expresión de HLA-E en las células inflamatorias (círculo azul). En explantes sometidos a la RUV (inferior), el estrato córneo es bastante grueso. El estrato granuloso está ausente, las células del estrato espinoso están disminuidas, desorganizadas y los queratinocitos están más diferenciados, con núcleos redondeados. El estrato basal está desorganizado con pérdida de la unión dermis/epidermis. En las capas de la dermis superficial y profunda se encuentran algunas células inflamatorias. No se observa ninguna expresión de HLA-E. Ampliación original $\times 200$.

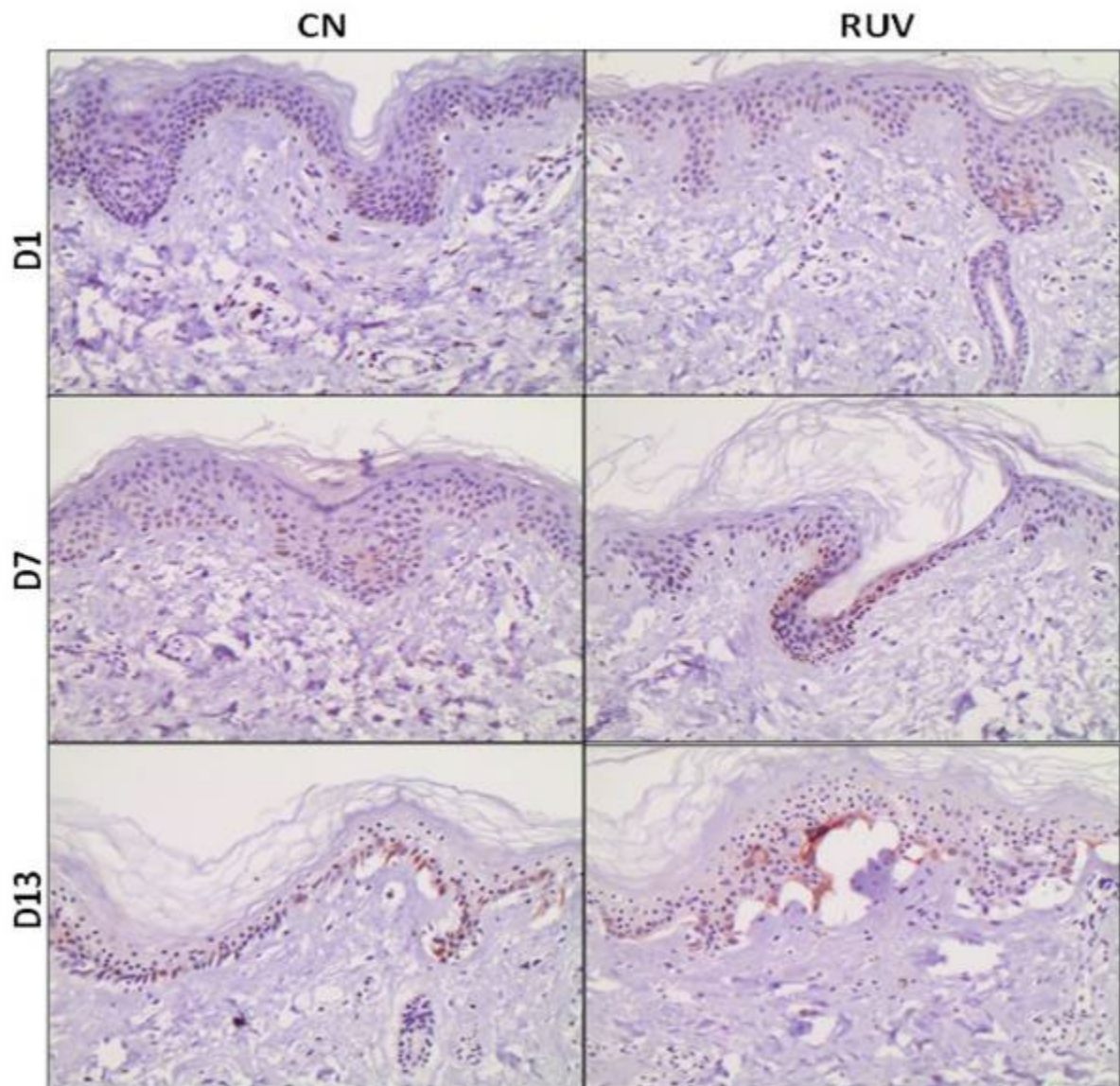


Fuente: La autora

V. 2. 2. Expresión inmunohistoquímica de HLA-G en explantes de piel

En comparación con los explantes no irradiados por RUV, la expresión de HLA-G fue primordialmente observada en células dendríticas, con aumento progresivo de expresión en los sucesivos días de observación (**Figura 19**).

Figura 19 - Tinción inmunohistoquímica para el antígeno leucocitario humano HLA-G en explantes de piel sometida o no (control) a la radiación ultravioleta en los días D1, D7 y D13. En los explantes controles e irradiados observase aumento del estrato corneo en todos los tiempos examinados. El estrato granuloso está prácticamente ausente en el los explantes irradiados y continúan ausentes en los dos grupos hasta el día D13. En el estrato espinoso observase queratinocitos hinchados (apoptóticos) con núcleos más redondeados y el estrato basal aún se conserva, manteniendo la unión dermis/epidermis. Ampliación original $\times 200$



Fuente: La autora

V. 3. Características demográficas, geográficas e histopatológicas de los cánceres de piel melanoma y no-melanoma y sus correlaciones con la radiación solar (RS) en Ecuador

V.3.1. Números absolutos de casos de cánceres de piel

Inicialmente, se hizo la caracterización de los cánceres de piel considerando todos los cánceres en números absolutos (casos) a lo largo de los años 2015 hasta 2022, estratificando según el tipo histológico de cáncer y sexo. Después, se hicieron correlaciones entre esas variables y la RS en las ciudades más pobladas de Ecuador (Quito y Guayaquil).

En orden de frecuencia, se observa que los cánceres no melanoma son los más frecuentes, seguidos de los melanomas malignos, carcinoma *in situ* y los melanomas *in situ* son los menos frecuentes. La **Figura 20** ilustra los casos de cáncer de piel (estratificados por el tipo histológico y por sexo), incluyendo melanoma (melanoma *in situ* y melanoma maligno) y no melanoma (carcinoma *in situ* de la piel y otros tumores malignos), registrados desde 2015 hasta 2022.

Los análisis de las correlaciones entre el número total de cánceres de piel melanoma y no melanoma en egresos hospitalarios, registrados en el INEC de 2015 hasta 2022, con el promedio de la RS registrada en todo el país no muestran diferencias significantes para todos los tipos de cánceres de piel, analizados como total de casos nacionales o estratificados según el tipo de tumor (**Figura 21**).

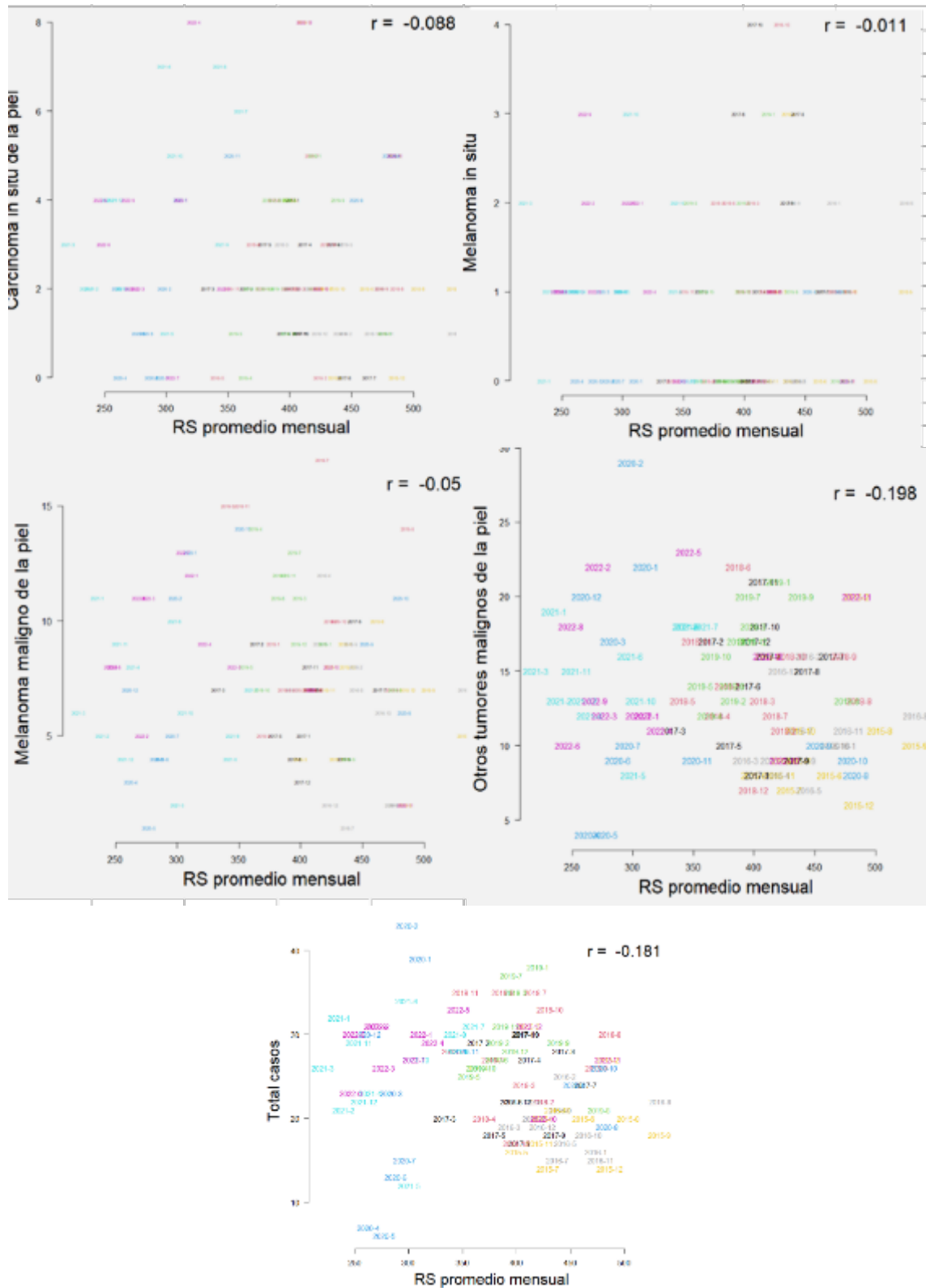
La **Figura 22** muestra la evolución de la RS (promedio mensual) en las ciudades de Quito (2015-2022) y Guayaquil (2018-2022). La correlación, en el periodo común, muestra un valor $r = 0.647$ ($p = 0.000$); lo cual da indicios de que en Quito existe mayor RS que en Guayaquil. Más, se puede notar como los valores de RS tienden a diferenciarse según el año; salvo los meses de agosto, septiembre y octubre de 2018, 2019 y 2020. Además, la RS en Quito tiende a ser ligeramente superior a la RS Guayaquil, en una relación menor a 3:2.

Figura 20 - Número total de casos de cáncer de piel melanoma y no melanoma, registrados como egresos hospitalarios por el INEC en todo el territorio nacional de Ecuador (superior) y estratificados según el sexo (inferior) de 2015 hasta 2022.



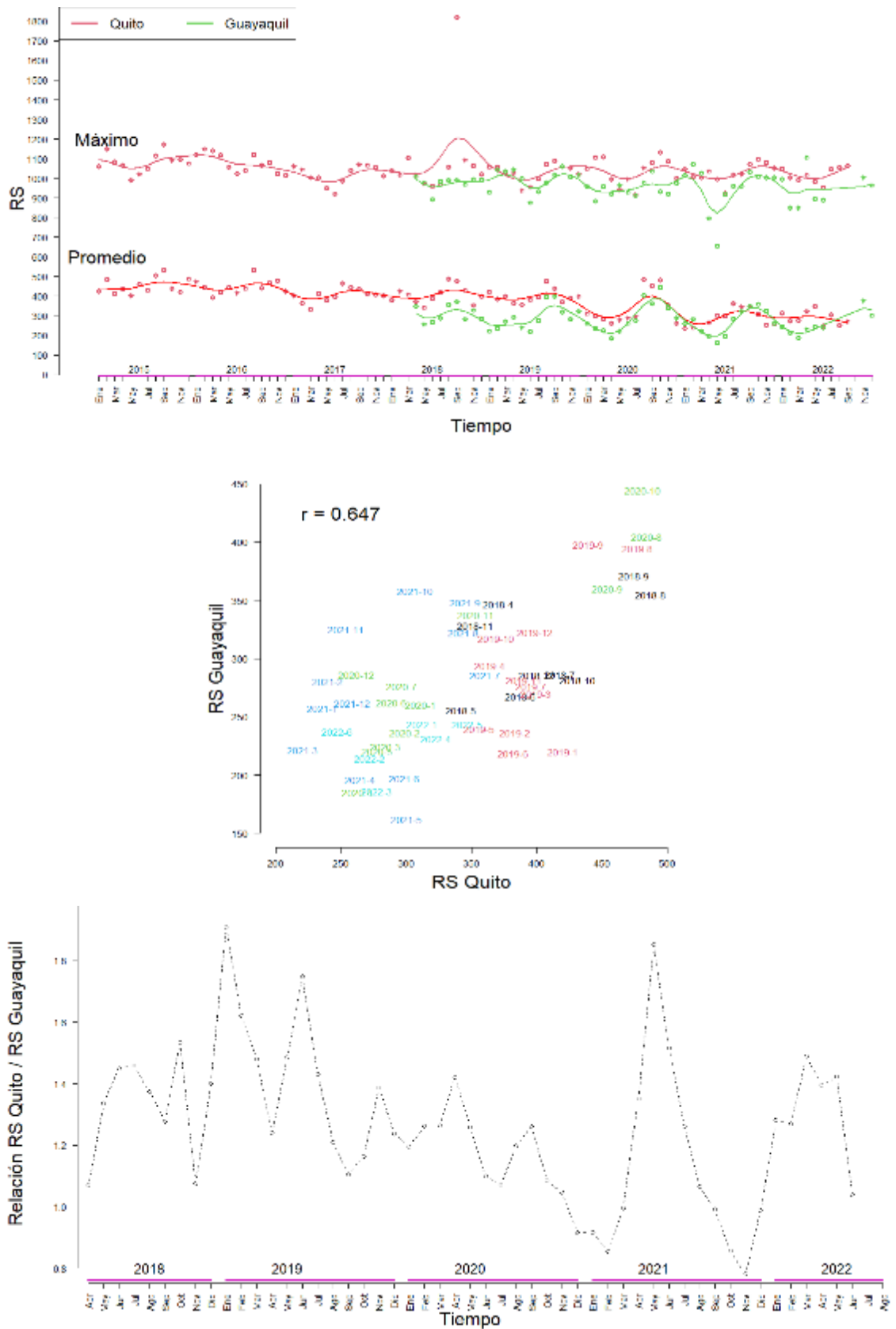
Fuente: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/camas-y-egresos-hospitalarios/> acceso 6 de junio 2023

Figura 21 - Correlaciones entre el número total de casos cánceres de piel melanoma y no melanoma en egresos hospitalarios, registrados en el INEC de 2015 hasta 2022, con el promedio de la RS (https://www.ecuadrencifras.gob.ec/camas-y-egresos-hospitalarios/ acceso 6 de junio 2023) registrada en todo el país



Fuente: La autora

Figura 22 - Radiación solar (RS) mensual para Quito y Guayaquil (gráfico superior). Correlación entre RS en Quito y Guayaquil en el periodo común de evaluación ($r = 0.647$, $p = 0.000$) (gráfico mediano) y relación RS promedio-mensual Quito *versus* Guayaquil (gráfico inferior).



Fuente: La autora

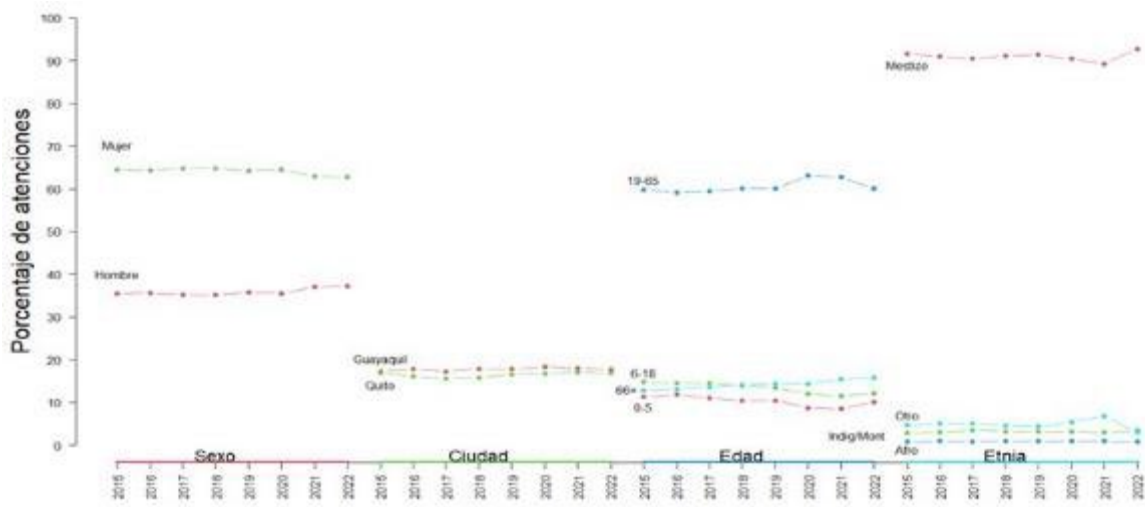
V.3.2. Números relativos de cánceres de piel y características demográficas

Además de los números totales de cánceres de piel, evaluamos los casos de cánceres de piel en relación con las atenciones médicas totales. Así, de los registros de egresos hospitalarios se obtienen informaciones de los pacientes en cuanto a: i) año de atención del egreso hospitalario, ii) número total de atenciones médicas de los egresos, independiente del tipo de enfermedad, iii) sexo, iv) número total de atenciones por ciudad donde se realizó la atención médica, considerando las dos principales ciudades del Ecuador (Quito y Guayaquil), v) edad, vi) color de la piel (etnia auto declarada) y vii) número total de casos de tumor de piel. En todos los años considerados, las mujeres superan los hombres en relación con los hombres. No hay diferencias con relación a las ciudades de Quito y Guayaquil. El grupo etario entre 19 a 65 años y los mestizos predominan en relación con los otros grupos (**Figura 23 y Tabla 3**). Considerando las mismas variables, pero tomando en cuenta el porcentaje de casos de casos de tumores de piel (melanoma y no melanoma), se observa que: i) no hay diferencias entre hombres y mujeres, ii) en Quito hay más casos que el Guayaquil, iii) predominan las edades entre 19 a 65 años y en lo pacientes con más de 66 años, y iv) los mestizos son los más afectados que los otros grupos (**Figura 24 y Tabla 4**).

Tabla 3 - El número total de atenciones médicas, estratificadas según en año, sexo, ciudad de la atención, edad y etnia auto declarada

Año	Atenciones	Hombres	Mujeres	Quito	Guayaquil	0 - 5	6 - 18	19-65	66+	Mestizo	Indígena	Afro	Otro
											Montuvio		
2015	1160980	412355	748625	199196	196822	131269	171624	709645	148442	1063675	33085	9802	54418
2016	1128148	402397	725751	200748	181104	133526	163473	683698	147451	1026349	34065	11471	56263
2017	1143821	403084	740732	197636	178656	125990	165641	696290	155900	1035567	40287	10073	57894
2018	1165797	410682	755114	208703	184152	121182	162750	717571	164294	1062482	37891	11562	53862
2019	1195145	427313	767831	212634	197842	124920	161240	737623	171362	1092652	38041	11564	52888
2020	906058	321853	584203	165909	151871	79174	109303	587192	130389	819708	29183	8814	48353
2021	1038858	385152	653706	186785	177221	88614	119170	670975	160099	928010	30715	9294	70839
2022	1121525	418409	703113	198847	188615	113693	136853	693178	177801	1040426	38768	8588	33743
Promedio	1107542	397656	709884	196307	182035	114796	148757	669639	156967	1008609	35254	10146	53533

Figura 23 - Porcentaje de atenciones, estratificado según en año, sexo, ciudad de la atención, edad y etnia auto declarada.

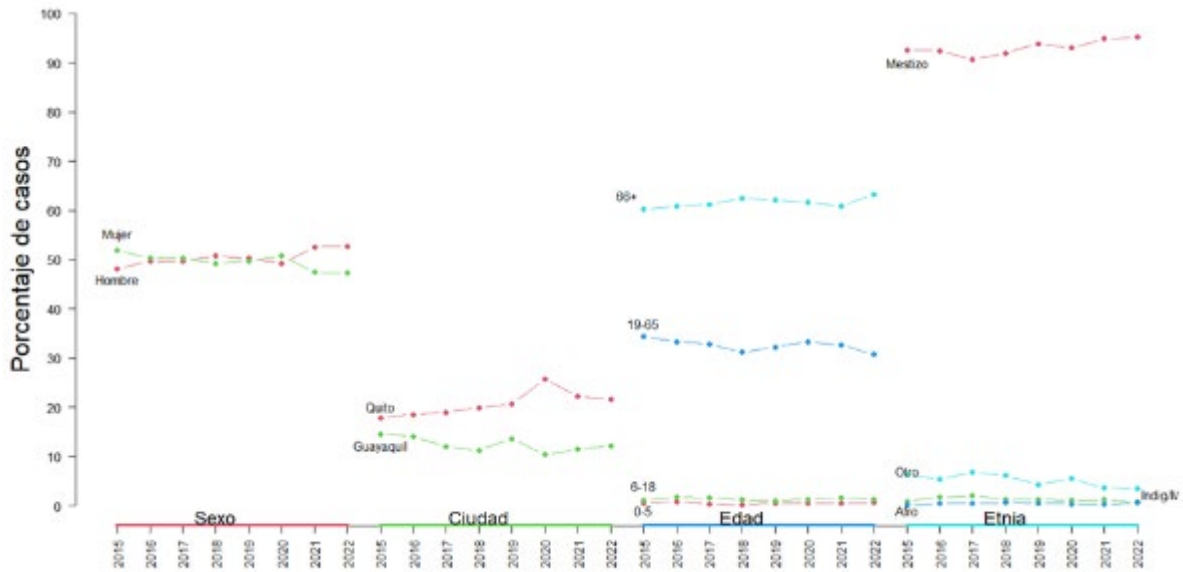


Fuente: La autora

Tabla 4 - El número total de cánceres de piel (melanoma y no melanoma), estratificado según el año, sexo, ciudad de atención, edad y etnia auto declarada.

Año	Casos	Hombres	Mujeres	Quito	Guayaquil	0 - 5	6 - 18	19-65	66+	Mestizo	Indígena	Afro	Otro
2015	1256	604	652	225	183	7	15	477	757	1163	11	2	80
2016	1182	588	594	219	166	10	21	432	719	1093	21	5	63
2017	1402	697	705	266	168	5	23	515	859	1271	28	7	96
2018	1532	777	755	305	173	3	19	553	957	1409	20	9	94
2019	1601	805	796	332	218	8	16	583	994	1503	20	9	69
2020	1014	499	515	261	105	5	13	371	625	943	11	4	56
2021	1324	696	628	294	153	6	22	491	805	1256	16	4	48
2022	1491	786	705	323	181	9	20	519	943	1420	11	9	51
Promedio	1350	682	669	278	168	7	19	439	832	1257	17	6	70

Figura 24 - Porcentaje de casos de cáncer de piel con relación al número total de atenciones médicas, estratificado según el año, sexo, ciudad de atención, edad y etnia auto declarada.



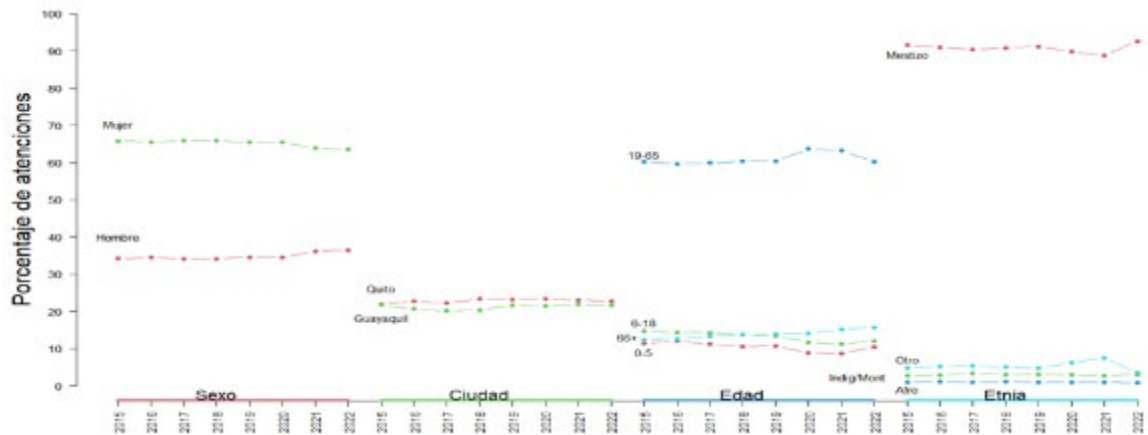
Fuente: La autora

Por otro lado, considerando las atenciones y casos de tumores de piel en pacientes residentes en la región de atención (no solamente los atendidos en la región de atención), se denota hallazgos similares aquellos observados cuando no se controla por región de atención. Así, el porcentaje de mujeres es mayor que los hombres, no hay diferencias entre Quito y Guayaquil, hay predominancia de las edades entre 19 y 65 años y de mestizos (**Figura 25 y Tabla 5**). De modo similar, los porcentajes de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) son similares entre hombres y mujeres y predominan en Quito, en pacientes con edades entre 19 a 65 años y en mestizos (**Figura 26 y Tabla 6**).

Tabla 5 - El número total de cánceres de piel (melanoma y no melanoma), estratificado según en año, sexo, ciudad de atención, edad y etnia auto declarada.

Año	Atenciones	Hombres	Mujeres	Quito	Guayaquil	0 - 5	jun-18	19-65	66+	Mestizo	Indígena	Afro	Otro
											Montuvio		
2015	878313	300829	577484	193193	191037	100423	128795	528879	108419	804622	23852	8071	41768
2016	855121	294843	560278	194204	176556	103139	122466	510067	107921	777446	24338	9302	44035
2017	861087	293545	567538	191865	173566	96568	123001	515464	114176	778252	28647	8056	46132
2018	867838	296060	571777	202077	176951	92270	119793	524142	119020	788560	26302	9283	43693
2019	890994	308193	582800	206010	192329	95839	118916	538771	124232	812587	26829	9134	42444
2020	687445	237208	450235	160511	147817	60986	80705	437582	96950	617550	20557	6893	42445
2021	781901	282959	498942	180111	171391	67874	87087	494474	118429	694484	21512	7238	58667
2022	846783	308957	537823	192284	182828	88650	102005	510252	131797	784451	25994	6836	29502
Promedio	741054	258066	482986	168917	156942	78417	98085	451070	102327	673106	22003	7201	38743

Figura 25 - Porcentaje de casos de cáncer de piel con relación al número total de atenciones médicas, estratificado según el año, sexo, ciudad de atención, edad y etnia auto declarada.

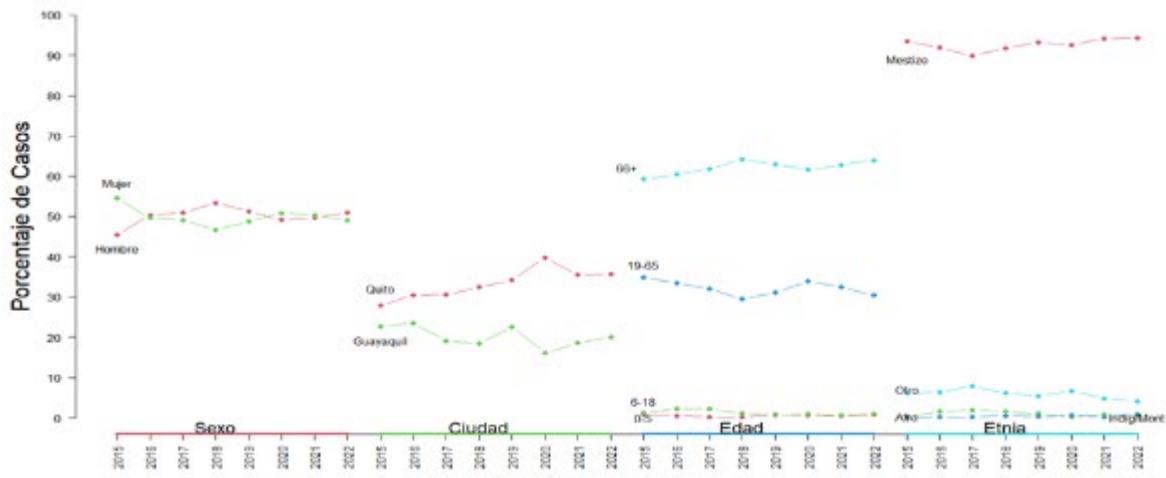


Fuente: La autora

Tabla 6 -El número total de atenciones médicas, considerando el sitio de residencia del paciente, estratificado según el año, sexo, ciudad de la residencia, edad y etnia auto declarada.

Año	Casos	Hombres	Mujeres	Quito	Guayaquil	0 - 5	jun-18	19-65	66+	Mestizo	Indígena	Afro	Otro
											Montuvio		
2015	795	361	434	222	181	6	10	277	471	743	1	2	49
2016	699	352	347	213	164	4	16	234	422	643	11	1	44
2017	861	438	423	263	165	2	19	276	532	774	17	2	68
2018	917	489	428	298	169	2	10	270	589	841	15	5	56
2019	950	487	463	325	215	7	6	295	598	886	10	3	51
2020	641	315	326	255	103	4	6	217	395	593	1	4	43
2021	817	406	411	290	152	4	5	265	513	769	7	2	39
2022	895	456	439	319	179	7	9	272	572	844	8	6	37
Promedio	731	367	363	243	148	4	9	234	455	677	8	3	43

Figura 26 - Porcentaje de atenciones, estratificado según el año, sexo, ciudad de atención, edad y etnia auto declarada.



Fuente: La autora

Para evaluar las tasas de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) con relación al número total de atenciones en todas las regiones (provincias) ecuatorianas, se consideró solamente la provincia de residencia del paciente. Para evaluar estos resultados se define la severidad para cada año mediante las siguientes expresiones:

$$\text{Proporción de casos} = (\text{Casos en provincia}) / (\text{Atenciones en provincia})$$

$$\text{Severidad} = (\text{Proporción de casos}) / (\sum \text{Proporción de casos})$$

En este sentido se establece en Pichincha, Guayas y Manabí la presencia de muchos de los casos de cánceres de piel; más, relativizando por el número de atenciones (severidad), Loja, Manabí y Azuay se muestran como las provincias más severas (**Tablas 7 y 8**).

Tabla 7 - Muestra los números totales de atenciones (a la izquierda) y los números total de casos de cánceres de piel melanoma y no melanoma (a la derecha) en pacientes residentes en las diversas provincias de Ecuador, estratificados según el año de evaluación.

Provincia de residencia	Atenciones								Casos							
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Azuay	68818	68352	69770	70783	71095	52475	61490	66491	137	132	152	184	154	109	112	159
Bolívar	13123	12635	12813	13218	13670	9767	10778	12088	14	10	9	16	22	6	14	9
Cañar	21997	22961	22788	23632	23675	17024	18780	20728	23	20	50	45	30	19	36	26
Carchi	11927	11532	11425	11904	12388	10223	11337	11436	8	13	4	11	11	11	9	11
Cotopaxi	28953	29800	29438	30419	30744	22124	24603	27733	32	37	29	37	37	24	37	38
Chimborazo	35381	36918	37195	38172	38477	26211	30637	35671	37	48	48	55	74	48	56	70
El Oro	57990	60158	58556	55441	55656	40201	45959	49078	51	55	53	42	45	35	50	41
Esmeraldas	29627	29279	31873	36240	36048	26675	28263	30275	9	15	20	25	24	14	13	29
Guayas	281290	260553	258744	258231	275295	213368	243580	256785	257	209	213	243	280	141	199	230
Imbabura	30589	30113	31412	32604	32270	25549	38393	40171	23	26	27	46	35	32	55	49
Loja	36193	35686	38589	39975	39418	28093	34439	37007	89	61	86	78	72	56	72	89
Los Ríos	53591	51814	59434	55208	54998	43262	47938	51276	14	24	27	55	49	17	31	36
Manabí	102206	90908	91877	96646	98441	72422	84481	96420	222	179	207	209	260	121	169	206
Morona Santiago	17690	18271	18987	18576	19002	13977	15312	16554	8	12	11	7	6	9	12	18
Napo	9508	8648	8020	8256	9406	6516	8033	8574	3	5	3	3	5	7	8	3
Pastaza	9388	9387	9612	9811	9546	6820	8069	9105	4	2	15	23	7	8	10	8
Pichincha	217555	220254	218254	229270	232955	182713	204671	218323	239	229	285	332	352	273	315	355
Tunguragua	42254	44233	44717	45697	46685	34671	38416	43815	48	65	91	72	71	42	73	67
Zamora Chinchipe	8147	8383	9292	10132	10764	8378	9452	10612	5	2	4	9	19	15	4	7
Galapagos	2018	2205	2162	2280	2301	1628	1781	1924	1		1		2			1
Sucumbios	15610	14581	14234	13939	14367	11241	12196	12479	4	3	8	4	3	3	6	4
Orellana	8250	7517	7455	7603	8457	6461	7556	7994	2		6	3	4	4	3	3
Santo Domingo	33729	29655	31133	31587	32577	27079	31402	34318	13	18	35	25	28	12	30	26
Santa Elena	24112	23728	25199	24862	24524	18315	20490	22247	12	17	18	8	11	7	10	6

Tabla 8 - Muestra la proporción de casos (casos en provincia/atenciones en provincia) y la severidad de los casos (Proporción de casos / \sum Proporción de casos). En rojo están destacadas las provincias con las tasas más altas de cánceres de piel y en amarillo las tasas más bajas.

Provincia de residencia	% severidad							
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Azuay	9.67	9.55	8.44	9.63	7.96	8.56	6.77	9.12
Bolívar	5.18	3.91	2.72	4.48	5.91	2.53	4.83	2.84
Cañar	5.08	4.31	8.50	7.05	4.65	4.60	7.12	4.79
Carchi	3.26	5.57	1.36	3.42	3.26	4.43	2.95	3.67
Cotopaxi	5.37	6.14	3.82	4.51	4.42	4.47	5.59	5.23
Chimborazo	5.08	6.43	5.00	5.34	7.06	7.55	6.79	7.49
El Oro	4.27	4.52	3.51	2.81	2.97	3.59	4.04	3.19
Esmeraldas	1.48	2.53	2.43	2.56	2.45	2.16	1.71	3.65
Guayas	4.44	3.97	3.19	3.49	3.74	2.72	3.04	3.42
Imbabura	3.65	4.27	3.33	5.23	3.98	5.16	5.32	4.65
Loja	11.95	8.45	8.64	7.23	6.71	8.22	7.77	9.18
Los Ríos	1.27	2.29	1.76	3.69	3.27	1.62	2.40	2.68
Manabí	10.55	9.74	8.73	8.01	9.70	6.89	7.43	8.15
Morona Santiago	2.20	3.25	2.25	1.40	1.16	2.65	2.91	4.15
Napo	1.53	2.86	1.45	1.35	1.95	4.43	3.70	1.33
Pastaza	2.07	1.05	6.05	8.68	2.69	4.83	4.61	3.35
Pichincha	5.34	5.14	5.06	5.36	5.55	6.16	5.72	6.20
Tunguragua	5.52	7.27	7.89	5.84	5.59	4.99	7.06	5.83
Zamora Chinchipe	2.98	1.18	1.67	3.29	6.48	7.38	1.57	2.52
Galapagos	2.41	0.00	1.79	0.00	3.19	0.00	0.00	1.98
Sucumbios	1.24	1.02	2.18	1.06	0.77	1.10	1.83	1.22
Orellana	1.18	0.00	3.12	1.46	1.74	2.55	1.48	1.43
Santo Domingo	1.87	3.00	4.36	2.93	3.16	1.83	3.55	2.89
Santa Elena	2.42	3.54	2.77	1.19	1.65	1.58	1.81	1.03

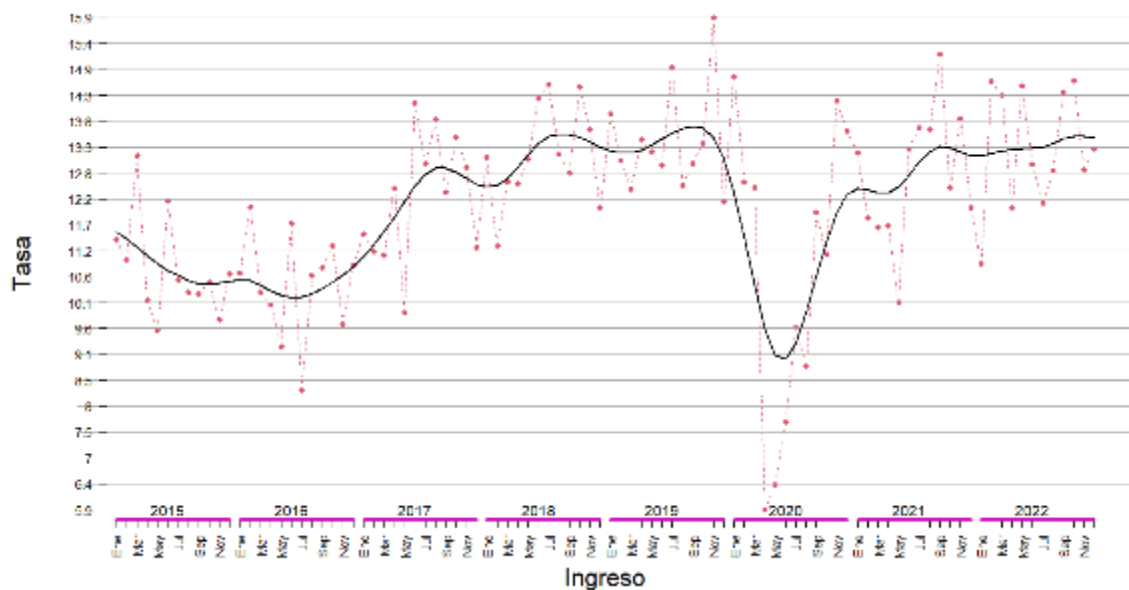
En lo que sigue, se presentan resultados de los casos de interés considerando las ciudades de residencia de los pacientes, en particular las ciudades de Quito y Guayaquil; también se desagrega por sexo, etnia y grupo de edad. Se presentan gráficas con desagregación mensual que buscan evidenciar los cambios temporales de los casos registrados; se muestra también la tendencia temporal suavizada por polinomios Spline.

Para mejores contrastes, se relativiza respecto al total de atenciones:

$$Tasa = \frac{Casos\ en\ Grupo\ Objetivo}{Atenciones\ en\ Grupo\ Objetivo} * 10\ 000$$

La tendencia general de la tasa muestra crecimiento hasta el 2018 en que se estabiliza, más, se nota el efecto pandemia y se retoma la tendencia estable a partir de 2021 con 13.3 casos por cada 10 000 atenciones a nivel nacional (**Figura 27**).

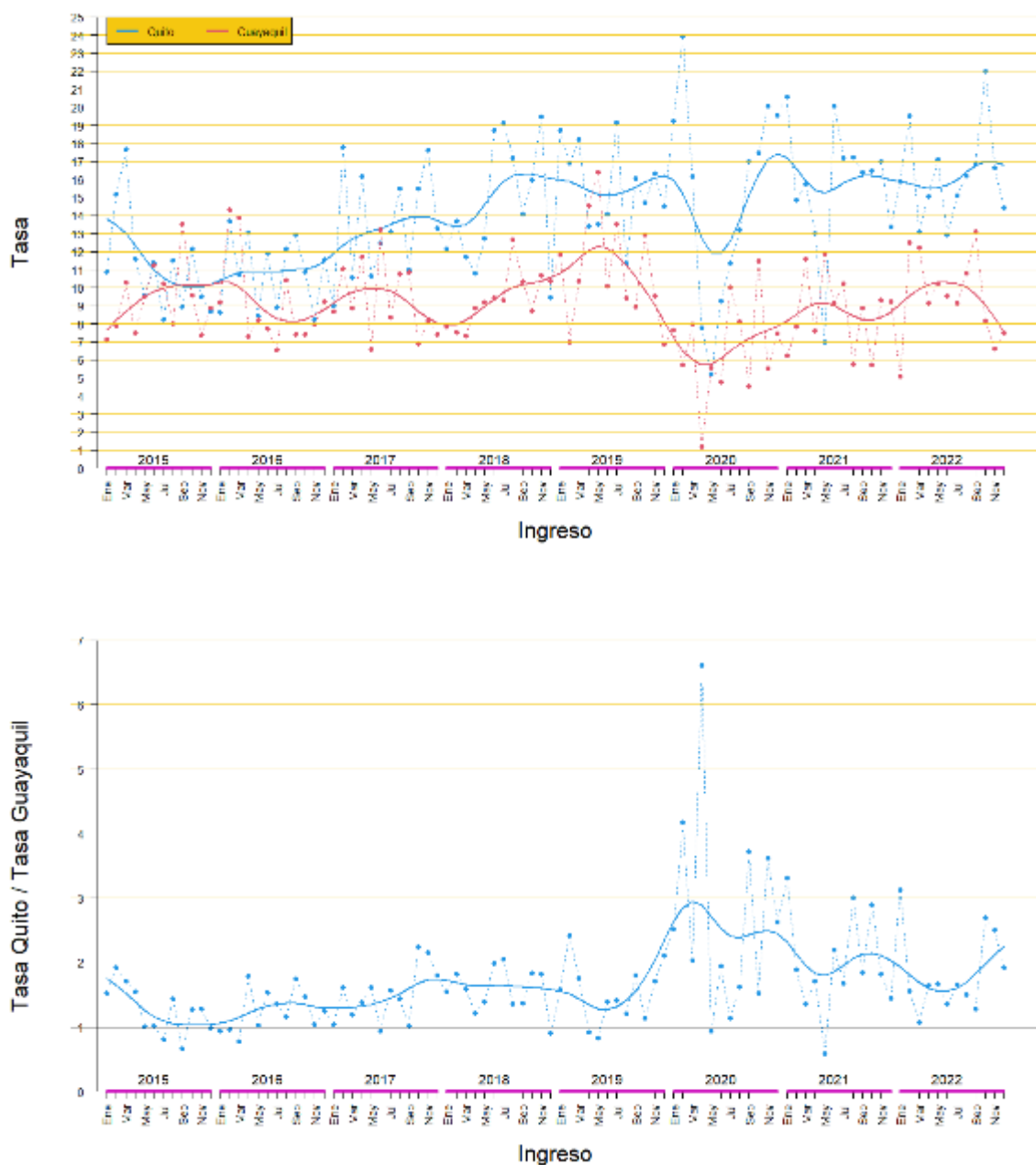
Figura 27 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones.



Fuente: La autora

La tasa por ciudad (casos Quito / atenciones Quito, casos Guayaquil / atenciones Guayaquil) se visualiza en la siguiente grafica; en la que se percibe que en Quito hay una mayor tasa a partir del 2019; incluso en época de pandemia (**Figura 28**, gráfico superior). La relación de tasas confirma que en Quito siempre hay una mayor tasa, llegando en algún momento a ser el triple de Guayaquil; aunque en general oscila en una relación 3:2 hasta 2019 y 2:1 a partir de 2020 (**Figura 28**, gráfico inferior).

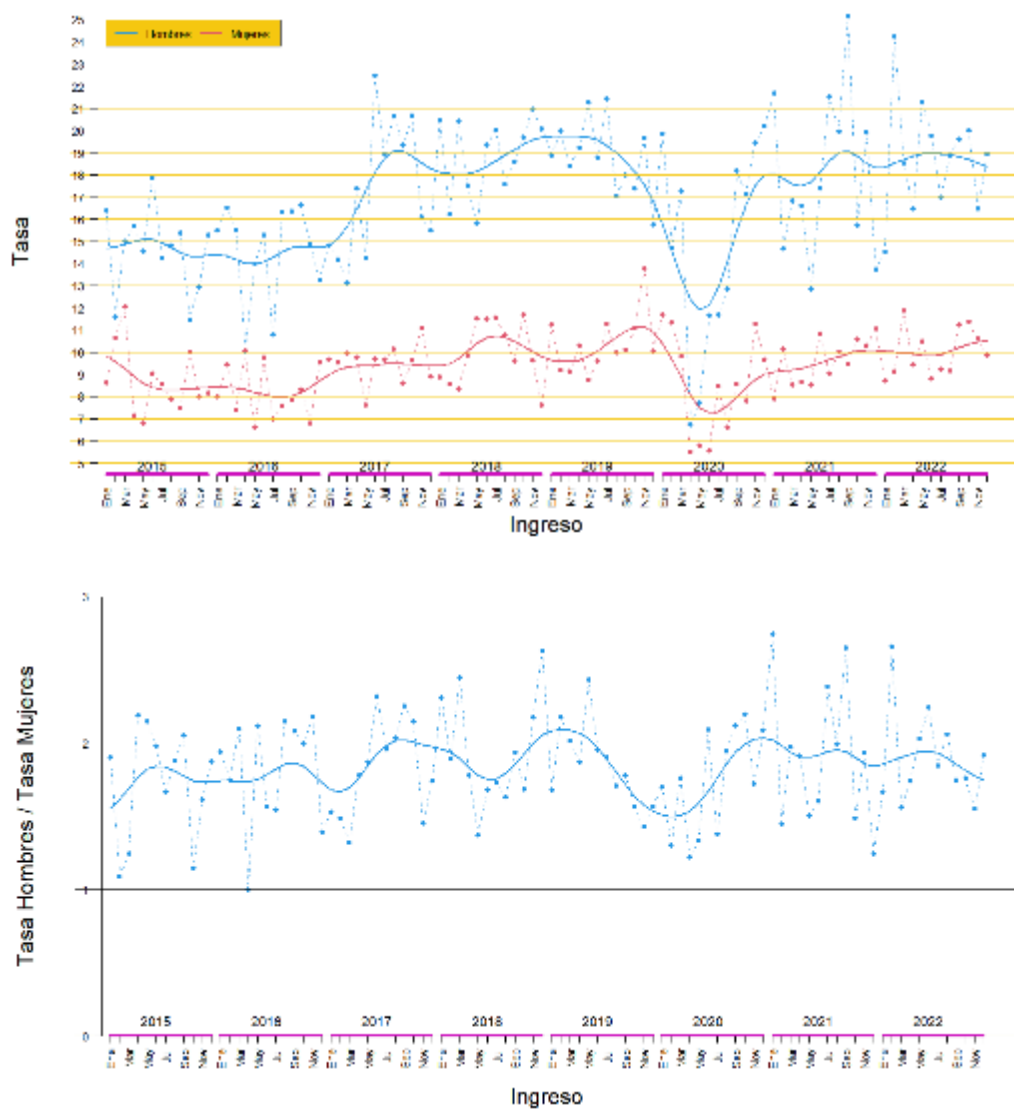
Figura 28 -El gráfico superior muestra la tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la ciudad (Quito y Guayaquil). El gráfico inferior muestra la relación Tasa Quito / Tasa Guayaquil.



Fuente: La autora

La tasa por sexo (casos hombres / atenciones hombres, casos mujeres / atenciones mujeres) se visualiza en la siguiente grafica (**Figura 29**, gráfico superior); en la que se percibe que en hombres hay una mayor tasa en todo el periodo considerado; a partir de 2017 se incrementa sustancialmente los hombres y salvo el periodo de pandemia la tasa de hombres oscila entre 17 y 20 casos por 10 000 atenciones. La tasa de mujeres es mucho menor a la de los hombres y oscila entre 8 y 11 casos por cada 10 000 atenciones. El hecho de que la tasa de hombres sea mayor que de las mujeres se confirma en la siguiente grafica que muestra como la tasa de hombres respecto a la de mujeres se acerca a una relación 2:1 en casi todo el periodo considerado (**Figura 29**, gráfico inferior).

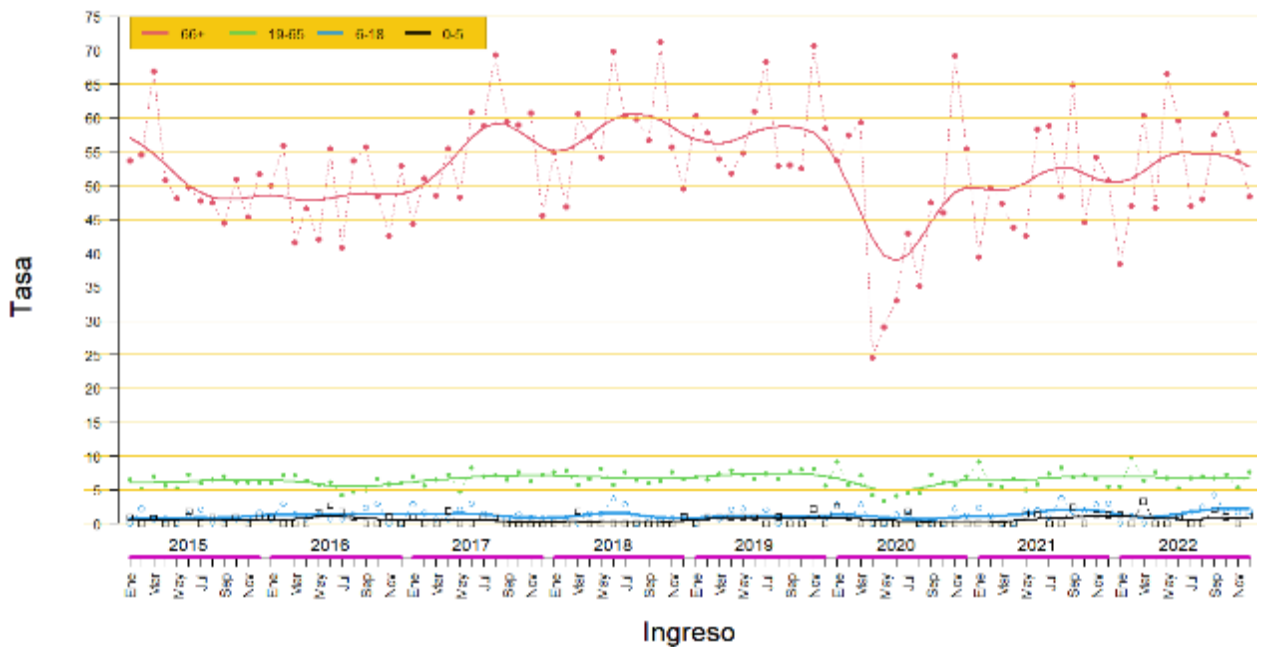
Figura 29 - El gráfico superior muestra la tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según el sexo. El gráfico inferior muestra la relación Tasa hombres / Tasa mujeres.



Fuente: La autora

Para la tasa por grupo de edad (casos k-ésima edad / atenciones k-ésima edad) se nota que los adultos mayores (personas de 66 años o más) son los predominantes, llegando hasta 60 adultos mayores por cada 10 000 adultos mayores atendidos. Para los otros grupos de edad la tasa no supera 10 casos por cada 10 000; y, se mantiene con cierta estabilidad. Para el grupo de 0 a 5 años los casos atendidos se dan en ciertos periodos de tiempo (**Figura 30**).

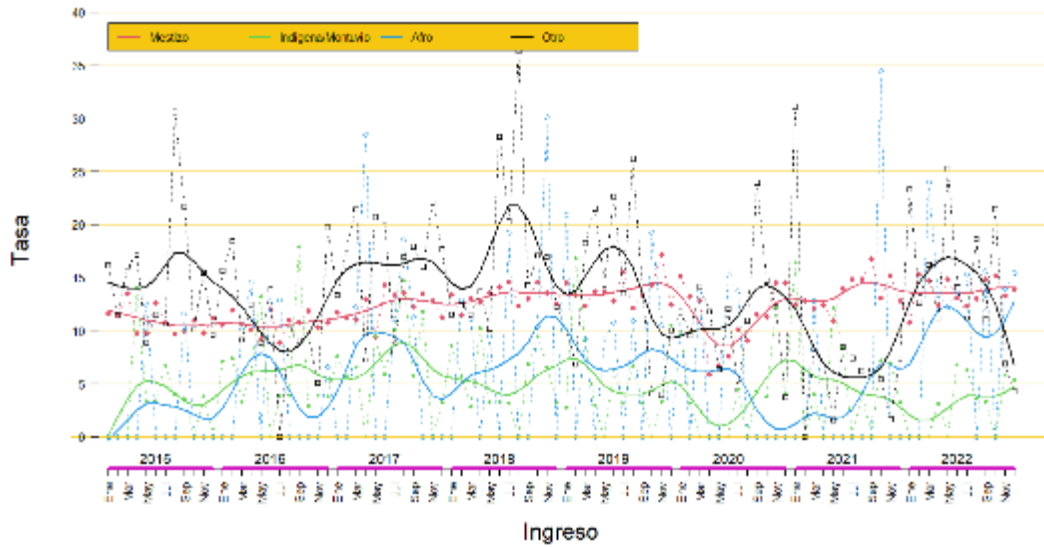
Figura 30 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la edad.



Fuente: La autora

La tasa por etnia (casos k-ésima etnia / atenciones k-ésima etnia) se muestra oscilante a lo largo del tiempo; predominando casos en otras etnias. Llama la atención como el grupo Afro e indígena/montuvio se entrelazan a lo largo del tiempo, presentando tasas similares de hasta 10 casos por cada 10 000 atenciones al mes. La etnia mestiza muestra una tasa más estable, oscilando entre 10 y 15 casos por cada 10 000 atenciones (**Figura 31**).

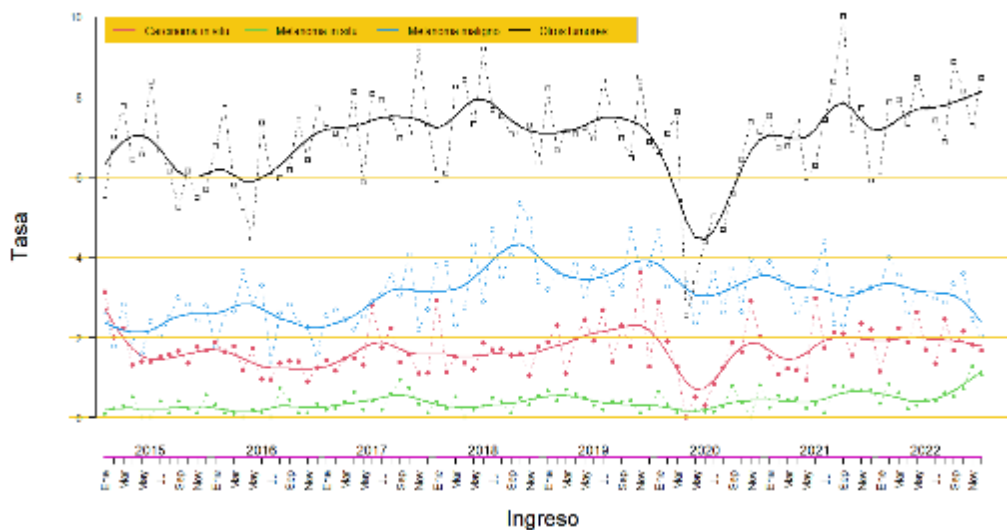
Figura 31 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la etnia.



Fuente: La autora.

Para evaluar el comportamiento de los diversos tipos de cáncer a lo largo de los años 2015 hasta 2022 también se presenta la tasa de casos por cada 10 000 atenciones del grupo objetivo. En primer lugar, se presenta la tasa general (casos totales / atenciones totales) que muestra que otros tumores son los que predominan, oscilando en el tiempo entre 6 y 8 casos por cada 10 000 atenciones. Le sigue melanoma maligno, carcinoma *in situ* y en bajo valor la tasa de melanoma *in situ* (**Figura 32**).

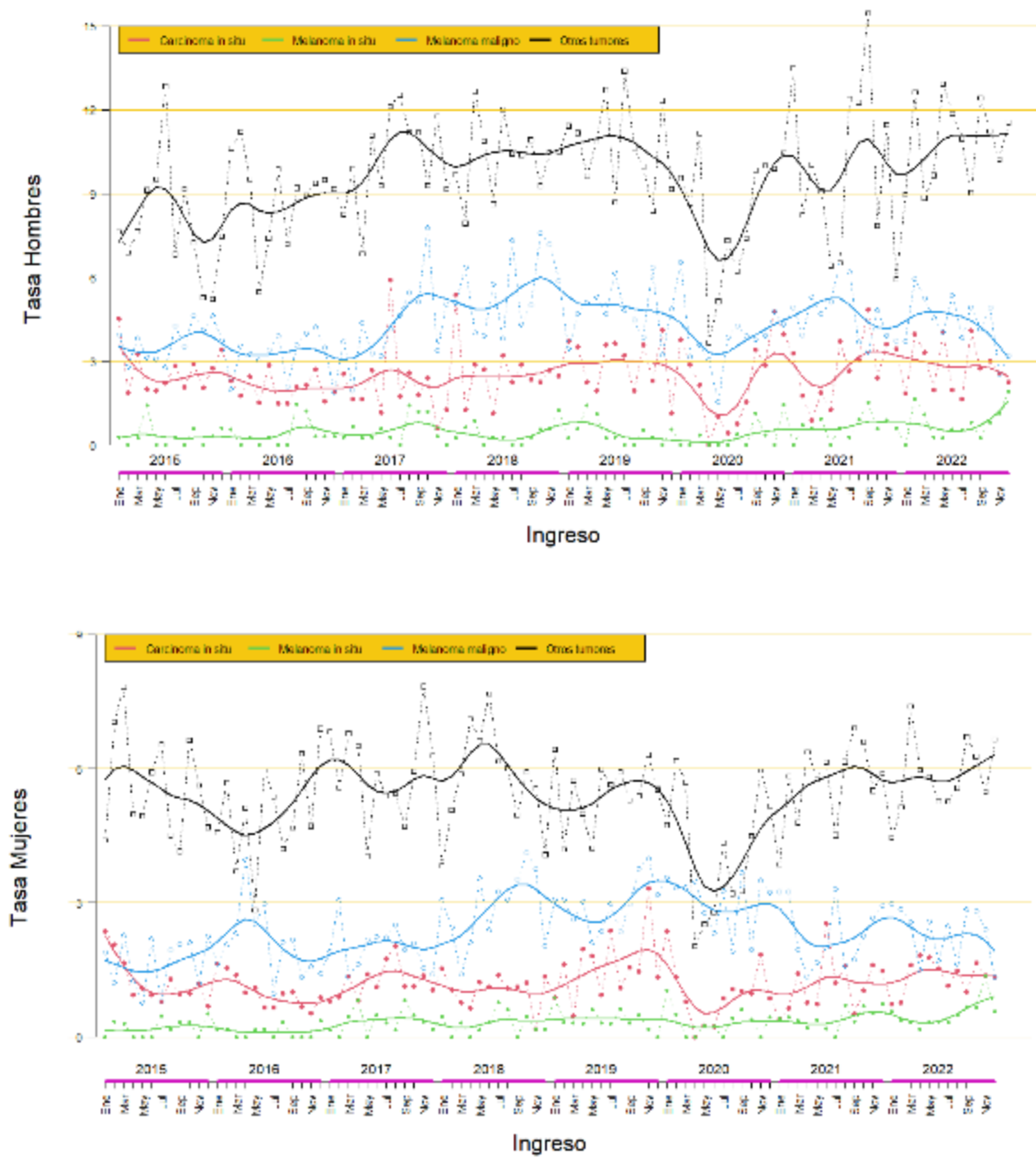
Figura 32 - Tasa general (casos totales / atenciones totales) que muestra que otros tumores son los que predominan, oscilando en el tiempo entre 6 y 8 casos por cada 10 000 atenciones



Fuente: La autora

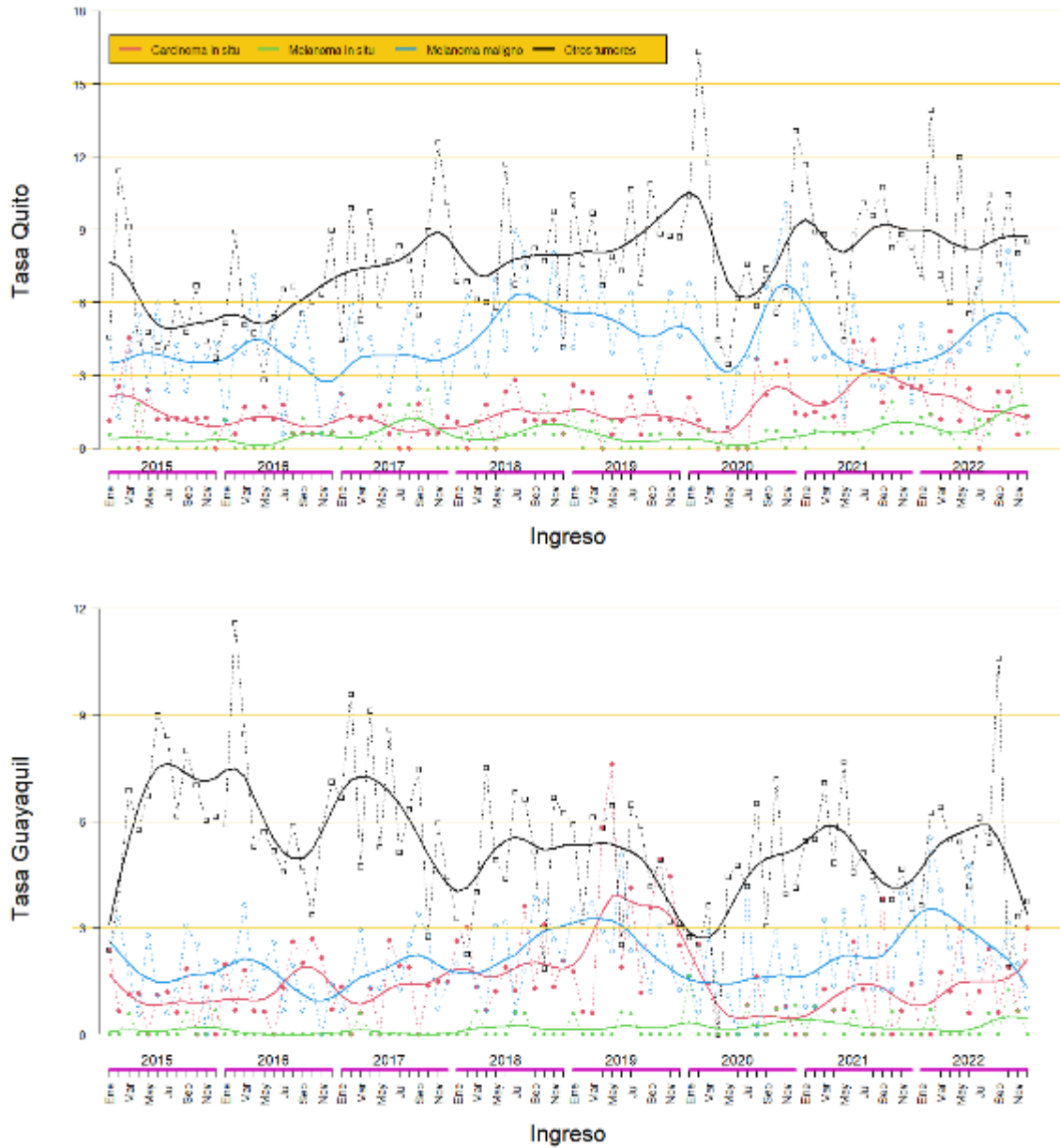
A seguir, son mostrados los comportamientos de los diversos tipos de cáncer de piel a lo largo de los años, considerando: **i)** separadamente las tasas para hombres (casos hombres / hombres atendidos) y las tasas para mujeres (casos mujeres / mujeres atendidas). De modo general, las tasas de tipos de cánceres de piel se mantienen (**Figura 33**), **ii)** separadamente las tasas para Quito (casos residentes en Quito / atendidos residentes en Quito) y Guayaquil (casos residentes en Guayaquil / atendidos residentes en Guayaquil). Se observa que, en Quito, las tasas de otros carcinomas se aproximan de los melanomas malignos y las tasas de carcinoma *in situ* y melanoma *in situ* se mantienen. En Guayaquil, las tasas de otros carcinomas se distancian de los otros carcinomas y las tasas de melanoma maligno y carcinoma *in situ* se aproximan (**Figura 34**), **iii)** separadamente las tasas según los grupos etarios. Así, para los pacientes de 0 a 5 años (casos de 0 a 5 años / atenciones a pacientes de 0 a 5 años) no llegan a 1 caso por cada 10000 atenciones; predominando los otros tumores y con la presencia de casos esporádicamente en el tiempo. Para el grupo de 6 a 18 años, hay predominio de los otros cánceres de piel, mientras que carcinoma *in situ*, melanoma *in situ* y melanoma maligno se entrelazan (**Figura 35**). Para el grupo etario comprendido entre los 19 hasta 65 años, otros tumores y melanoma maligno siguen paralelos, mientras que carcinoma *in situ* y melanoma *in situ* se entrelazan. Para los pacientes con 66 años o más, otros carcinomas son los más frecuentes y carcinoma *in situ*, y melanoma maligno se entrelazan (**Figura 36**), y **iv)** con respecto a las etnias, otros carcinomas predominan entre los mestizos; para indígenas y montubios melanoma maligno y carcinoma *in situ* caminan juntos (**Figura 37**); para los afros hay picos de melanoma maligno y otros tumores; y para las otras etnias hay picos de otros carcinomas y melanoma maligno (**Figura 38**).

Figura 33 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según el sexo. La gráfica superior muestra las tasas para hombres (casos hombres / hombres atendidos) y la gráfica inferior las tasas para mujeres (casos mujeres / mujeres atendidas).



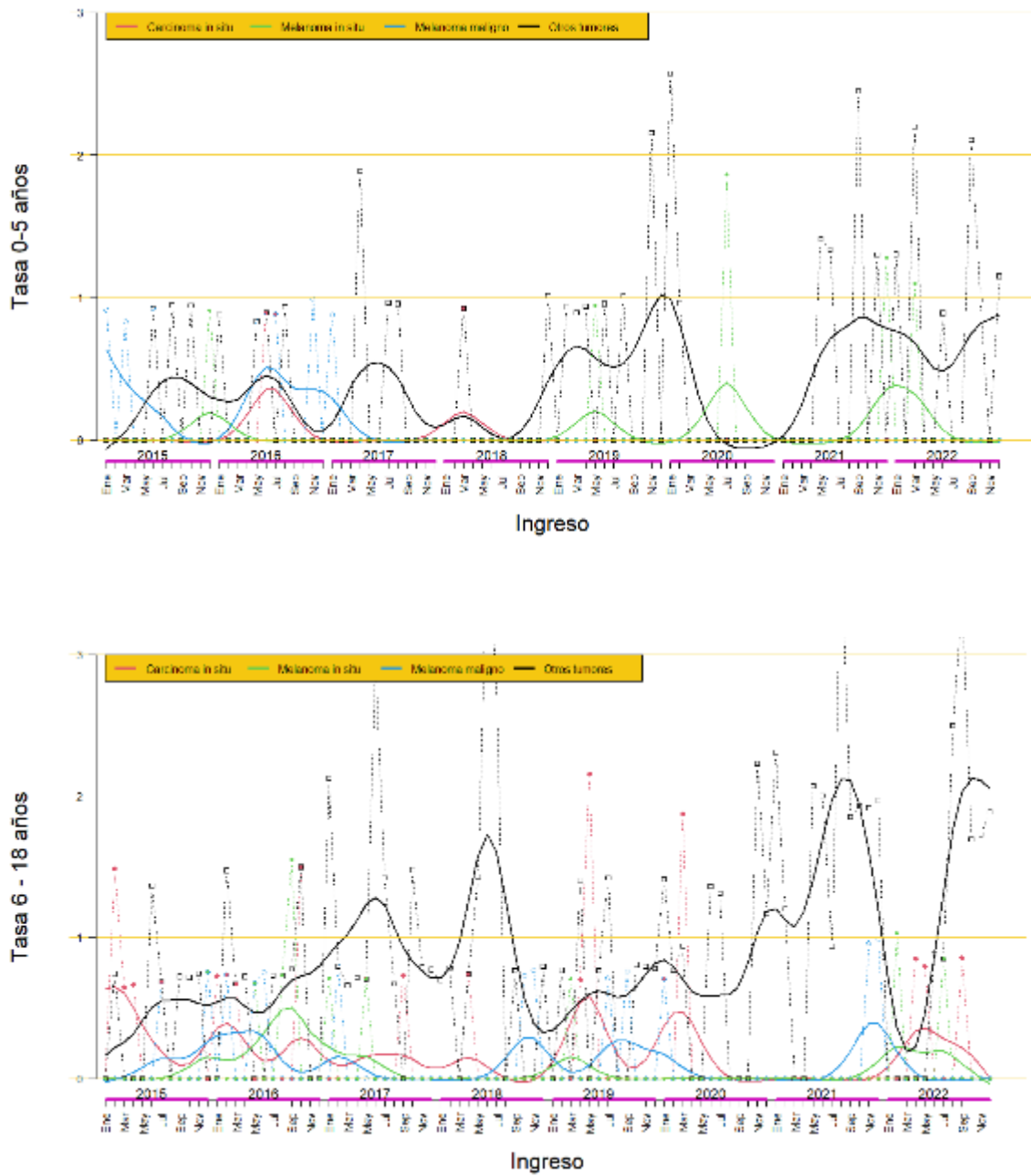
Fuente: La autora

Figura 34 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la ciudad de residencia. La gráfica superior muestra las tasas para Quito (casos residentes en Quito / atendidos residentes en Quito) y Guayaquil (casos residentes en Guayaquil / atendidos residentes en Guayaquil).



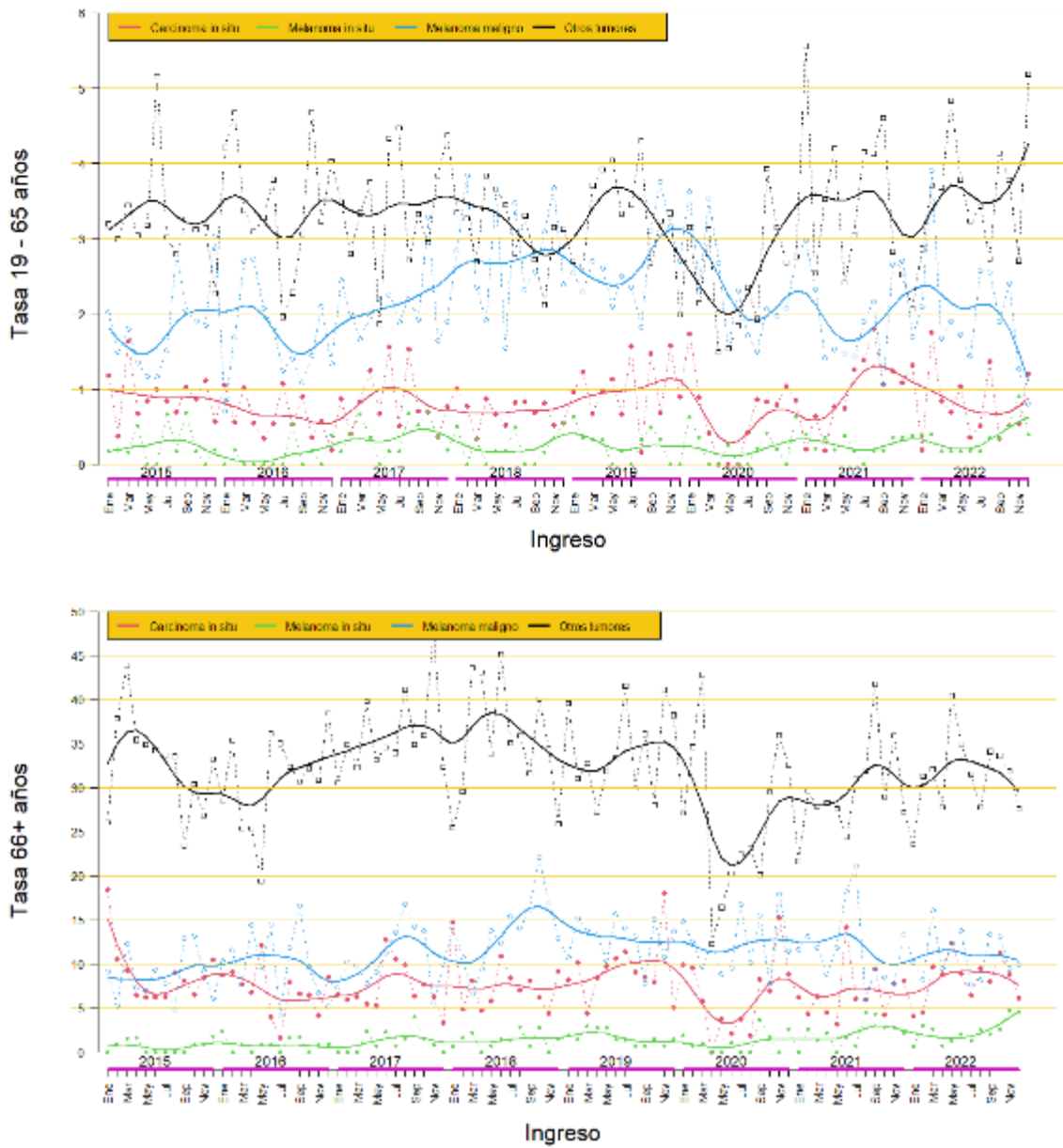
Fuente: La autora

Figura 35 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según el grupo etario de 0-5 años (gráfica superior) y el grupo entre 6-18 años (gráfica inferior).



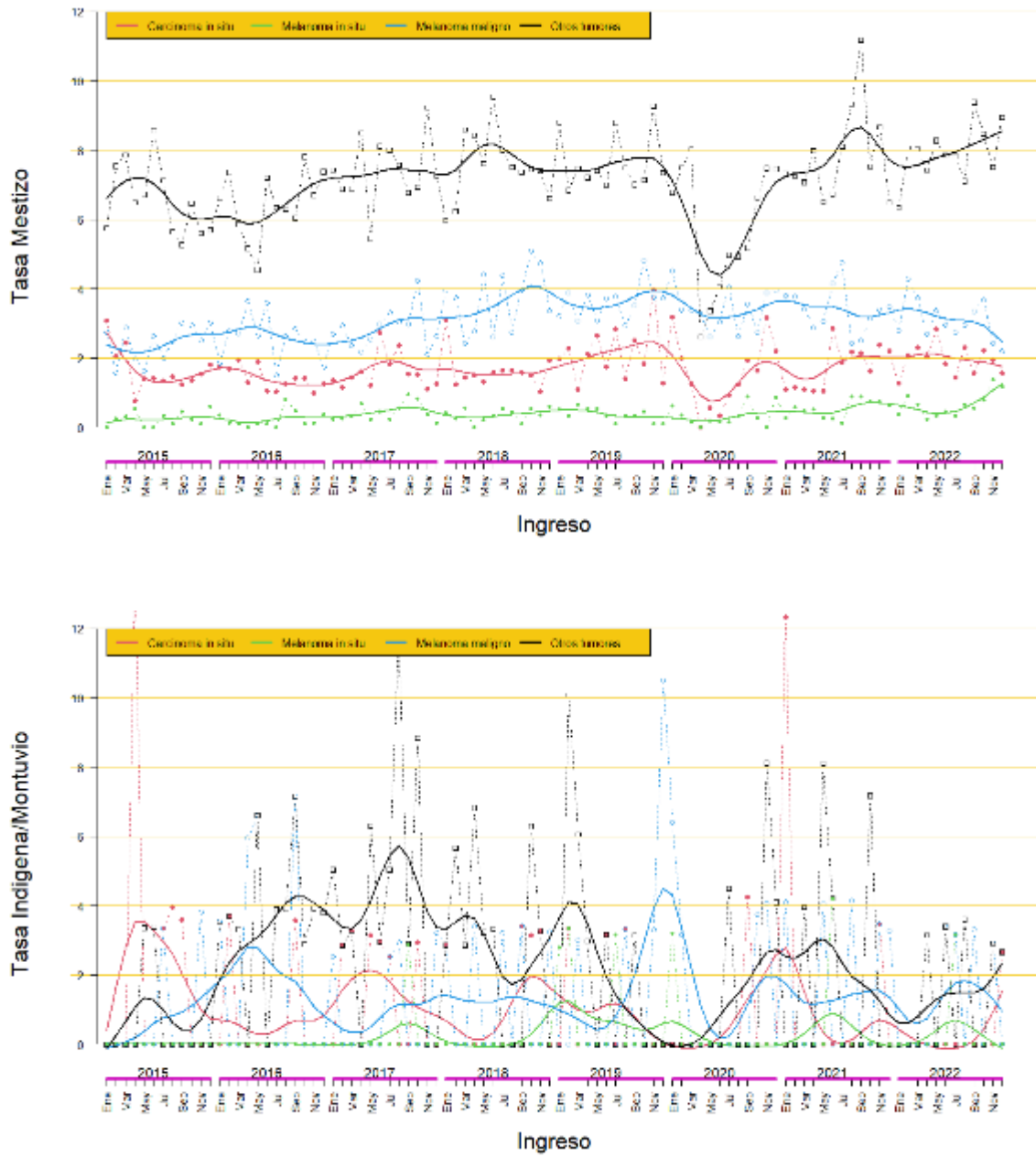
Fuente: La autora

Figura 36 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según el grupo etario de 19-65 años (gráfico superior) y el grupo de más de 66 años (gráfico inferior).



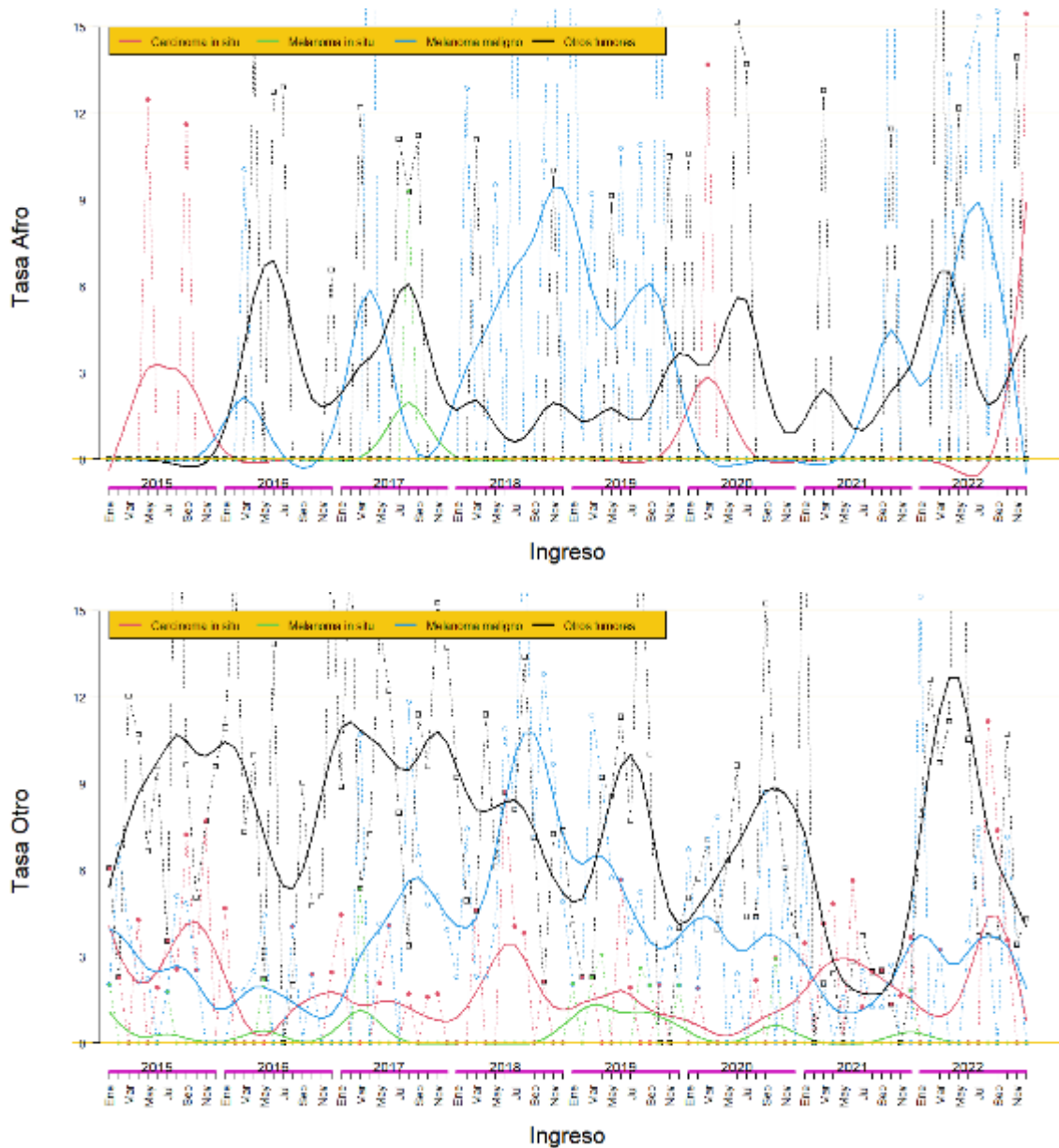
Fuente: La autora.

Figura 37 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la etnia, incluyendo mestizos e indígenas y montubios (gráfico inferior).



Fuente: La autora

Figura 38 - Tasa de cánceres de piel (melanoma y no melanoma) por mes-año por cada 10 000 atenciones, relativizadas según la etnia, incluyendo afros (gráfico superior) y otras etnias (gráfico inferior).

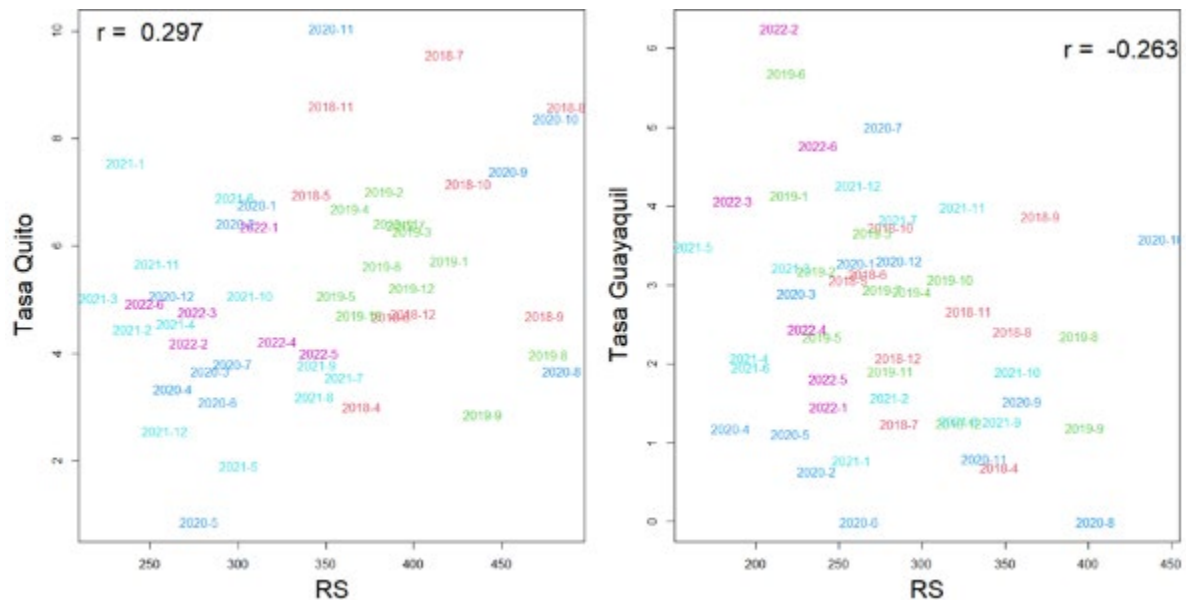


Fuente: La autora

Considerando que el melanoma es el más agresivo tipo de cáncer de piel, evaluamos las correlaciones entre la tasa de casos residentes / residentes atendidos en Quito y en Guayaquil con la RS. Hay que anotar que la RS en las dos ciudades es en general estable y en una relación cercana a uno; además, la información conjunta disponible permite considerar el periodo entre enero – 2015 y septiembre-2022. Se puede notar que tanto en Quito como en Guayaquil la tasa (casos residentes / residentes atendidos) es independiente de la RS. Se percibe cierta tendencia

positiva para Quito y negativa para Guayaquil; es decir, cierta tendencia a que en Quito más RS incrementa la tasa; mientras que en Guayaquil más RS menos tasa (**Figura 39**).

Figura 39 -Correlación de Pearson entre la tasa de casos residentes / residentes atendidos en Quito y en Guayaquil con la radiación solar

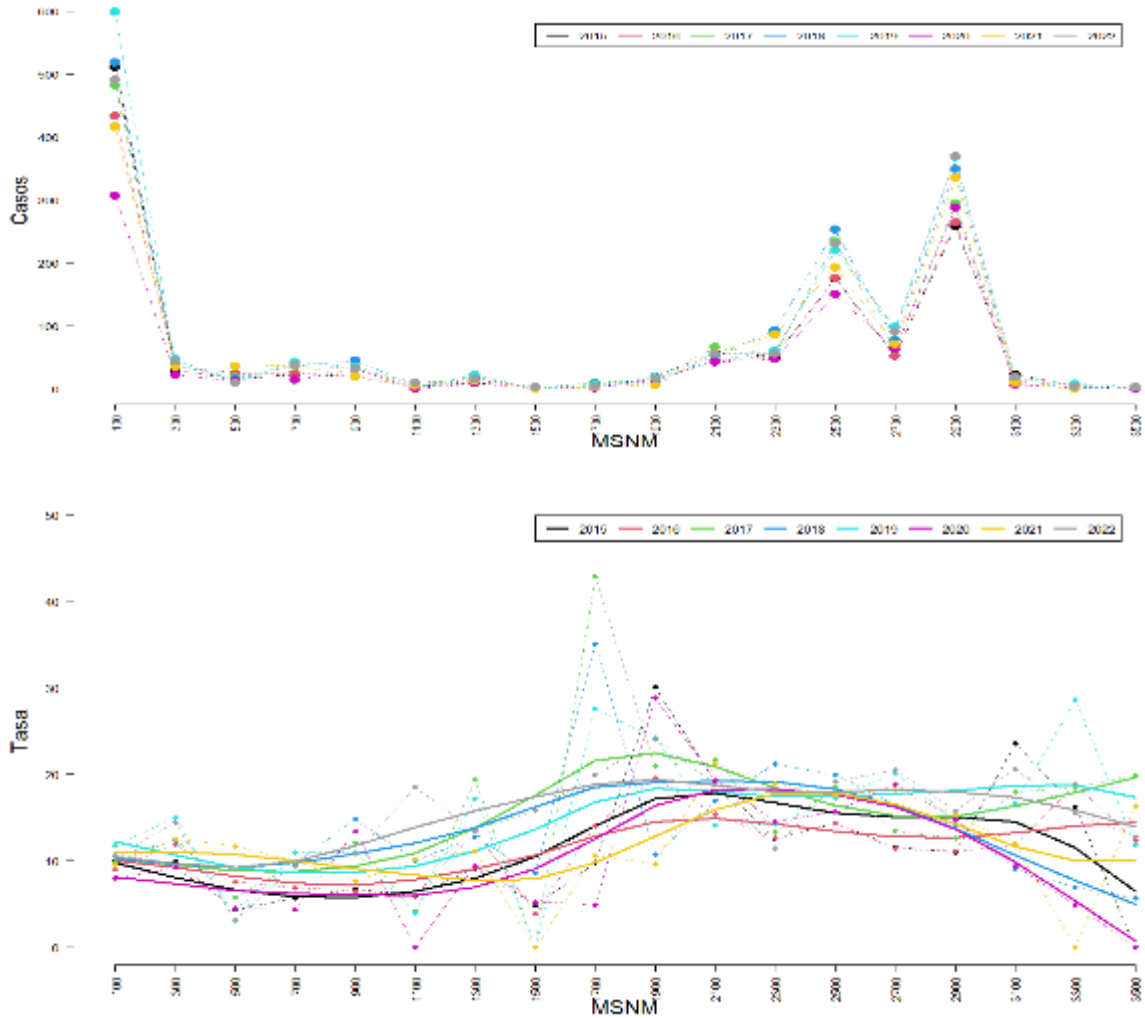


Fuente: La autora.

V. 3.3 Asociación entre casos de cáncer de piel con la altura de las regiones ecuatorianas

Al revisar los casos según la altura de la ciudad de residencia no es posible encontrar una clara relación en virtud de la magnitud de atenciones. Es así como por ejemplo la cantidad de casos en Guayaquil se muestran en el grupo de ciudades a no más de 100 metros sobre el nivel del mar (msnm). Para una mejor visualización la relación tasa-altura, gracias a los ajustes con polinomios Splin. Se puede notar como, para todos los años, la tasa sufre un ligero incremento a medida que la altura de la ciudad de residencia aumenta; más, esto ocurre hasta los 2100 msnm en que se estabiliza la tasa. Para ciudades de a más de 3100 msnm se nota un ligero descenso; más esto podría deberse a la presencia de pocas ciudades a tales alturas (**Figura 40**).

Figura 40 - Distribución de los casos de cáncer de piel a lo largo de los años 2015-2022, estratificados según la altura de las provincias ecuatorianas.



Fuente: La autora

VI. DISCUSIÓN

VI.1. La radiación ultravioleta asociada a inflamación e inmunosupresión

La exposición a la RUV puede proporcionar efectos beneficiosos (obtención de vitamina D3 y fototerapia para diversas enfermedades dermatológicas) y efectos nocivos (riesgo de desarrollar cánceres de piel). El proceso de obtención de la vitamina D3 comienza con la acción de RUVB sobre los precursores del colesterol (7-dehidrocolesterol) en las células epidérmicas de la piel, transformándolo en provitamina D, que polimeriza para formar vitamina D3 inactiva (colecalfiferol). A través de diversos procesos enzimáticos en el hígado, los riñones y otros lugares (macrófagos alveolares, osteoblastos, ganglios linfáticos, placenta, cuello uterino, mama y queratinocitos) y con la participación de diversas hormonas (hormona paratiroidea, hormona del crecimiento y otros factores) se produce la transformación en su forma activa (1,25(OH)₂D). Una vez activada, actúa sobre los receptores de vitamina D expresados predominantemente en los intestinos, jugando un papel importante en la diferenciación de los enterocitos, la absorción intestinal y la distribución del calcio a todos los tejidos. Además, la presencia de receptores de vitamina D en osteoblastos, linfocitos T y B activados, células mononucleares y en diversos tejidos como cerebro, corazón, piel, gónadas, próstata y mamas refuerza su acción paracrina. Por lo tanto, la deficiencia de vitamina D no solo se asocia con la osteoporosis y un mayor riesgo de fracturas, sino también con un mayor riesgo de enfermedades autoinmunes, inflamatorias crónicas e incluso varios tipos de cáncer. En vista del riesgo bien documentado de desarrollar cánceres de piel debido a la exposición a los rayos UV, se ha recomendado obtener la vitamina D o su suplemento con el uso de ergocalciferol (vitamina D2), obtenido de plantas (Chang; Lee, 2019).

La fototerapia con UVA o UVB se ha utilizado para varias enfermedades dermatológicas, como monoterapia o asociada a otras formas de tratamiento, entre ellas: i) fototerapia UVA y UVA-1 para el tratamiento de la esclerosis cutánea de diferentes etiologías, mostrando eficacia y pocos efectos secundarios (Kroft *et al.*, 2008), ii) UVA y UVB para el tratamiento de la psoriasis, afectando a áreas pequeñas o incluso en casos de psoriasis en placas refractaria al tratamiento, también con buenos efectos curativos (Zhang; Wu, 2018), iii) UVB para el tratamiento de vitíligo con buenos resultados (Zubair *et al.*, 2020) iv) UVB para el tratamiento de casos moderados y graves de dermatitis atópica que no responden al tratamiento de primera línea (Frazier; Bhardwaj, 2020). Aunque estos tratamientos muestran buenos

resultados, los mecanismos por los cuales la RUV promueve la mejoría y los efectos a largo plazo de este tipo de tratamiento no están bien estudiados.

A pesar de los efectos beneficiosos asociados a la exposición a la RUV, los médicos, la población y los medios de comunicación son cada vez más conscientes de los efectos nocivos de esta exposición, en particular aquellos relacionados con el desarrollo de cánceres de piel. Se destacan dos mecanismos fisiopatológicos, no excluyentes entre sí, tras la exposición a la RUV (agudo, crónico, intermitente), a saber, la inflamación crónica y el desarrollo de mecanismos inmunosupresores (Narayanan; Saladi; Fox, 2010). De modo general, la inflamación crónica puede: i) inducir la expresión de factores de transcripción (NF- κ B, STAT3, HIF1 α), ii) producir mediadores inflamatorios (proteína C reactiva), citoquinas (interferones, TNF, TGF), factores estimulantes de colonias, especies reactivas de oxígeno, prostaglandinas, enzimas, entre otros, y iii) incrementar la susceptibilidad a varios tipos de cáncer como mama, colorrectal, pulmones, ovario, próstata, y otros (Michels *et al.*, 2021). Particularmente, bajo la exposición a la RUV, también son desencadenados mecanismos inflamatorios en la piel, caracterizados por la inducción de factores de transcripción (NF- κ B y p38MAPK), citoquinas (IL-1 β , IL-1 α , IL-6 y TNF- α), quimiocinas (CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL8) y los factores estimulantes de colonias (GM-CSF) (Salminen; Kaarniranta; Kauppinen, 2022). Así, cuando hay inflamación también son activados los mecanismos de control antiinflamatorio y el equilibrio entre estos dos mecanismos puede determinar el resultado final, es decir, la reparación del proceso de inflamación crónica o mantenimiento del proceso, con o sin desarrollo de procesos malignos.

Además de la inflamación crónica, la exposición a la RUV causa inmunosupresión, como lo demuestran los hallazgos experimentales en ratones y en humanos. En animales de experimentación: i) la exposición a UVB durante unas 30 semanas induce la formación de un tumor primario en la piel y el trasplante de este tumor en animales inmunodeprimidos por fármacos o RUV permite la tolerancia tumoral, ii) la exposición a RUVB en ratones albinos promueve la inducción de tumores dependiente de la dosis, pero el crecimiento tumoral es independiente de la dosis, iii) la RUVB reduce la respuesta de hipersensibilidad cutánea retardada, iv) inicia la inducción de varios mediadores inmunosupresores en los queratinocitos, que a su vez afectan la función de las células dendríticas, mastocitos que migran a los ganglios linfáticos, produciendo inmunosupresión local y sistémica (revisto por Hart; Norval, 2018). Varias líneas de evidencia indican la asociación entre inmunosupresión, RUV y el desarrollo de cánceres de piel en humanos: i) aumento de la prevalencia de cánceres de melanoma y no melanoma en pacientes inmunodeprimidos para prevenir rechazos de trasplantes o para el

tratamiento de enfermedades hematológicas, ii) pacientes que presentan mecanismos defectuosos de reparación del ADN y sometidos a RUV también muestran un aumento en los cánceres de piel, iii) disminución en la respuesta de hipersensibilidad retardada en pacientes con los fototipos I y II en comparación con los fototipos III y IV, presentando mayor susceptibilidad de desarrollar cánceres de piel después de la exposición a la RUV (Hart; Norval, 2018).

VI.2. Las moléculas inmunoregulatoras HLA-E y HLA-G en el carcinoma basocelular

En vista de los argumentos anteriormente expuestos, es claro el papel de las moléculas inmunoregulatoras en la exposición a la RUV y en el desarrollo de manifestaciones neoplásicas de la piel. Entre las moléculas inmunoregulatoras, elegimos dos muy representativas, una de las cuales HLA-E puede modular positiva o negativamente la respuesta células citotóxicas, mientras que la molécula HLA-G tiene efectos de modulación predominantemente negativos en una gran variedad de células. En este contexto, evaluamos la expresión de estas moléculas en muestras de piel obtenidas de pacientes con carcinoma basocelular agresivo y no agresivo. Así, observamos que tanto las muestras agresivas como aquellas no agresivas mostraban expresión diferencial de HLA-E y HLA-G. Se observó expresión de HLA-E en el 59,5% de los casos agresivos y en el 40,5% de los no agresivos, mientras que se observó la expresión de HLA-G en el 43,6% de los casos no agresivos y en el 56,4% de los casos agresivos. Aunque no se observaron diferencias significativas entre estas expresiones, el mapa de correspondencia que evalúa simultáneamente las expresiones HLA-E y HLA-G en carcinomas basocelulares agresivos y no agresivos indica que las muestras de carcinoma basocelular no agresivo son principalmente HLA-E positivas y HLA-G negativo, mientras que las muestras agresivas son principalmente HLA-G positivas y HLA-E negativas. Considerando que las moléculas HLA-E tienen actividades inhibitorias (unión a los receptores NKG2A/CD94) o estimuladoras (unión a los receptores NKG2C/CD94) y considerando que HLA-G tiene propiedades predominantemente inmunosupresoras, estos hallazgos indican que es el equilibrio entre las actividades inmunomoduladoras de estas moléculas que podrá determinar el efecto final, protegiendo o confiriendo susceptibilidad a una determinada situación clínica. De hecho, las proteínas transmembrana de la familia de receptores tipo lectina de las células asesinas (NK), también denominada familia NKG2, son expresan casi exclusivamente en las células NK (Borst; Van der Burg; Van Hall, 2020). Por el contrario, los receptores leucocitarios inhibitorios LILRB1 y LILRB2 están expresas en un conjunto mucho

más importante de células (linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas) y se unen con más afinidad con las moléculas HLA-G, en comparación con las otras moléculas HLA clásicas, como HLA-A, HLA-B y HLA-C (Carosella *et al.*, 2015). Así, para tener una idea más clara sobre el rol de las moléculas HLA-E y HLA-G en el carcinoma basocelular, necesitaría evaluar la expresión de los receptores leucocitarios NKG2 (NKG2A y NKG2C) y LILRB (LILRB1 y LILRB2) en las poblaciones celulares infiltrantes de los tumores de células basales, es decir en las células NK y las células T CD8⁺.

No existen estudios evaluando la expresión de las moléculas HLA-E en los tumores cutáneos no melanoma, sin embargo, varias líneas de evidencia apuntan un rol importante de HLA-E en los melanomas. Así: i) el gene *HLA-E* está entre los veinte más expresos en células obtenidas de pacientes con melanoma, siendo detectado en aproximadamente dos tercios de los casos (Tremante *et al.*, 2014), ii) estudios *ex vivo* reportan que algunas líneas celulares de melanoma no expresan o expresan poco HLA-E en sus superficies celulares, pero el tratamiento con IFN- γ aumenta la expresión de la molécula. Además, células tumorales expresando HLA-E son menos susceptibles a la actividad de células citotóxicas (Derré *et al.*, 2006), iii) en estudio evaluando la expresión de moléculas de histocompatibilidad como marcadores predictivos de pronóstico en muestras de pacientes con melanoma cutáneo primario, la expresión de HLA-E no se correlacionó con agresividad del tumor. Además, la expresión de HLA-E, HLA-F y FOXP3⁺ en los linfocitos infiltrantes de tumor también no se asociaron con el pronóstico del tumor (Melsted *et al.*, 2017), y iv) altos niveles de HLA-E soluble son observados en pacientes con melanoma, siendo inducidos por citoquinas como IFN- γ , IFN- α y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Allard *et al.*, 2011)

La molécula HLA-G también es más frecuentemente evaluada en tumores melanoma que en los tumores no melanoma. En estudio anterior de nuestro grupo, se analizó la expresión de HLA-G juntamente con el perfil de citoquinas en subtipos de carcinoma basocelular no agresivos de distintas ubicaciones. La expresión de HLA-G fue observada en el infiltrado inflamatorio alrededor de los nidos tumorales, con localización predominantemente citoplásmica, habiendo una correlación positiva entre la expresión de HLA-G con la expresión génica de IFN- γ e IL-10, citoquinas que inducen la expresión de HLA-G (Westin *et al.*, 2022). Otro estudio evaluó la expresión de HLA-G en carcinomas basocelulares primarios y recurrentes después de la radioterapia, relatando mayor expresión de HLA-G en casos más agresivos (esclerosantes y nodulares) (Urosevic *et al.*, 2005). En pacientes receptores de trasplantes de órganos, tratados con inmunosupresores para evitar el rechazo del órgano, la expresión de HLA-G fue observada solamente en lesiones cutáneas malignas, incluyendo

tumores de células escamosas (35%), carcinoma *in situ* (47%), queratosis actínica (27%) y carcinoma basocelular (14%), pero HLA-G nunca fue expresa en las lesiones benignas observadas en los mismos pacientes que presentaban lesiones malignas, indicando que la expresión de HLA-G estaba restringida a los sitios malignos. Cuando expreso, HLA-G fue observado en queratinocitos proliferativos, infiltrados inflamatorios e incluso células endoteliales (Aractingi *et al.*, 2003). La expresión de HLA-G en los carcinomas de células escamosas ha sido estudiada en pacientes presentando tumores de otras localizaciones (Yie *et al.*, 2007), pero no ha sido estudiado en tumores de piel. En los melanomas, la alta expresión de HLA-G en el tumor fue asociada con mal pronóstico, asociándose con tumores gruesos, ulceración y acometimiento del ganglio centinela. Por otro lado, la alta expresión de las moléculas HLA-A, -B, -C y HLA-G se asociaron con la agresividad del tumor, siendo sugerido que esas moléculas podrían ser marcadores predictivos relevantes para la inmunoterapia eficaz de los tumores de melanoma (Melsted *et al.*, 2017). En una búsqueda sistemática de más de 1700 artículos sobre la expresión de HLA-G en lesiones melanocíticas malignas fueron seleccionados 16 reportes con datos adecuados para los análisis. Aún que se observe una expresión de HLA-G en más de la mitad de los estudios elegidos, no se identificó correlación con su comportamiento agresivo, concluyéndose que HLA-G está involucrado en la patogénesis del melanoma, pero no está asociado con pronóstico (Marletta *et al.*, 2021)

Como observado en los párrafos anteriores, hay evidencias que corroboran y otras que refutan el rol de HLA-E y HLA-G en el pronóstico de pacientes con los cánceres de piel, particularmente, en los melanomas. Non obstante, las evidencias muestran que HLA-E y HLA-G participan de los mecanismos patogénicos de estos tipos de cáncer. De la misma forma, hay grande heterogeneidad de formas de presentación de los cánceres melanoma y non-melanoma que pueden introducir variables de confusión para el entendimiento del rol de estas moléculas en la patogénesis y en la evolución de los cánceres de piel. Estas observaciones también corroboran el estudio simultaneo de la expresión de HLA-E y HLA-G juntamente con las expresiones de los receptores específicos en las células infiltrantes de los tumores de piel.

VI.3. Las moléculas HLA-E y HLA-G en explantes de piel bajo la influencia de la RUV

Los explantes de piel son considerados buenos modelos alternativos para evaluación de los efectos de agentes químicos y físicos sobre la piel en sustitución a los modelos utilizándose animales. Como previamente relatado, la estandarización del modelo fue realizado por ocasión de una tese de maestría, definiéndose las mejores condiciones para los estudios de

la RUV, no obstante, la idea de evaluar la relación entre la exposición a la RUV y la expresión de las moléculas HLA-E y HLA-G hace parte exclusivamente de esta tesis de doctorado. Como se trata de una muestra de piel cultivada sin la influencia de mediadores sistémicos, es un modelo ideal para el estudio de factores locales involucrados en las respuestas contra factores agresivos. Así, considerando que las moléculas HLA-E y HLA-G son inducidas por la acción de diversos factores de transcripción, particularmente incluyendo las citoquinas del grupo de los interferones (IFN- α , IFN- β y IFN- γ), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor inductor de hipoxia 1 (HIF-1) y las hormonas, especialmente la progesterona (Castelli *et al.*, 2014), la utilización del modelo hOSEC sirve para ilustrar como los mediadores locales pueden actuar induciendo la expresión de moléculas inmunoregulatorias, sin la acción de los mediadores sistémicos.

Evaluándose exclusivamente los hallazgos histológicos de los explantes, de modo general, las capas y sus estratos epidérmicos se quedan relativamente bien conservados hasta el séptimo día de cultura, observándose un aumento progresivo del estrato córneo. Después de 14 días de cultivo, los diversos estratos están un poco dañados, particularmente en los casos de exposición a la RUV.

La expresión de HLA-E fue observada en pieles controles, pero en las pieles sometidas a RUV hubo un aumento de la expresión particularmente en los queratinocitos y en las células mononucleares de la piel. Cuando sometidos a la RUVB, los queratinocitos inician diversos procesos relacionados con inflamación e inmunosupresión, incluyendo: i) formación de dímeros de pirimidina ciclobutanato (*cyclobutane pyrimidine dimers* – CPD), pirimidina y fotoproductos de pirimidona, ii) oxidación de lípidos de membrana y formación del factor activador de plaquetas (*platelet activating factor*: PAF), iii) PAF y CPD estimulan la producción de citoquinas (TNF, IL-6, IL-8, IL-10, IL-33), quimioquinas (CCL20), ciclooxigenase-2 y prostaglandina-E2. En conjunto, estos mediadores contribuyen para el desencadenamiento de inflamación e inmunosupresión (Hart; Norval, 2018). Además de inducir la expresión de diversos mediadores inflamatorios, los queratinocitos están involucrados en diversos procesos de la respuesta inmune innata y adquirida, incluyéndose: i) el reconocimiento de patrones moleculares asociados con patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* : PAMPS), ii) reconocimiento de antígenos por moléculas relacionadas al complejo principal de histocompatibilidad, iii) interacción con linfocitos T efectores, células NKT e linfocitos T $\gamma\delta$, iv) reclutamiento de linfocitos T de memoria, células dendríticas y linfocitos T circulantes, y v) secreción de citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias (Mestrallet *et al.*, 2021). Además de los queratinocitos, las células mononucleares de la piel

también participan de procesos inmunológicos asociados con la inmunidad innata y adquirida. La epidermis alberga varios tipos celulares, incluyendo las células T $\alpha\beta$ de memoria, las células dendríticas, las células de Langerhans y los linfocitos T $\gamma\delta$ (Mestrallet *et al.*, 2022). Considerando que solamente las células residentes ya existentes están presentes en los explantes de piel y considerando que la molécula HLA-E fue expresada en las células residentes, los factores inductores de la expresión de HLA-E solamente deben ser provenientes del tejido local, sin estímulos de factores sistémicos. Entre los factores generados localmente que están asociados con el aumento de la expresión de HLA-E están los interferones y IL-10, que están inducidas bajo la exposición a la RUV (Michels *et al.*, 2021). Considerando que la molécula HLA-E puede ligarse a receptores leucocitarios inhibitorios o estimuladores, su presencia en la piel puede ser beneficiosa o maléfica, dependiendo de los receptores exhibidos por las células residentes. Para aclarar este tipo de efecto, sería interesante evaluar los tipos de receptores leucocitarios ligantes de HLA-E (NKG2A o NKG2C) presentes en las células mononucleares residentes.

Por lo general, la molécula HLA-G no se expresa en la piel normal (Wastowski *et al.*, 2009), pero la molécula se expresa en varios cánceres de piel, como ya mencionado. En este estudio, la expresión de HLA-G bajo la exposición RUV presentó un patrón diferente con relación a la expresión de HLA-E. La piel irradiada con RUV mostró una mayor y progresiva expresión de HLA-G en las células dendríticas en comparación con la piel no irradiada a partir de D0, independientemente del estrés inducido por el cultivo. A diferencia de HLA-E, la expresión de HLA-G se observó principalmente en el citoplasma de las células dendríticas en D7 y D14. Considerando que: **i)** las células dendríticas presentan un papel fundamental para una respuesta eficaz contra las células cancerosas (Bayerl *et al.*, 2023), **ii)** HLA-G disminuye la función y diferenciación de las células dendríticas, lo que afecta la activación de los linfocitos efectores (Carosella *et al.*, 2015), **iii)** HLA-G puede generar diversos tipos de células reguladoras, promoviendo redes de tolerancia inmunológica, **iv)** HLA-G puede ser producida por células dendríticas tolerogénicas, también denominadas DC-10 (*dendritic cells induced by IL-10*), por su extraordinaria capacidad para producir IL-10. Además de los altos niveles de HLA-G, las DC10 producen ligantes de HLA-G (LILRB1 y LILRB2) y son potentes inductores de células reguladoras del tipo Tr1 (Carosella; Gregori; LeMaoult, 2011), la expresión de HLA-G inducida por RUV representa un factor adicional que puede contribuir a la inmunosupresión de la piel. Para aclarar el rol de la expresión de HLA-G en células dendríticas bajo la exposición a la RUV, sería interesante evaluar si estas células producen IL-10 y puedan comportarse como las DC-10, inductoras de células T regulatorias.

Evidencias relatadas en la literatura también indican que la RUV puede suprimir la inmunidad de la piel, induciendo la expresión de otras moléculas inmunosupresoras. Así, la RUV aumenta la expresión de la molécula de chequeo inmunológico PD-L1 en células de melanoma, reduciendo actividad citotóxica de células T CD8⁺, inhibiendo la cascada mediada por los factores de transcripción IRF3/NF- κ B o bloqueando la interacción de PD-1 con su ligante PD-L1 y facilitando los mecanismos de inmunoevasión de melanocitos oncogénicos y el desarrollo de melanoma (Wang *et al.*, 2019). Además de la RUV, otros tipos de radiación también pueden modular la expresión de moléculas inmunosupresoras. Así, la exposición de dosis crecientes de radiación ionizante en células de melanoma que expresan HLA-G induce una disminución de la expresión de esas moléculas por escisión proteolítica y consecuentemente aumentando los niveles solubles de HLA-G. Este efecto también es perjudicial para la respuesta inmunológica contra las células tumorales, pues que las moléculas HLA-G solubles también son capaces de inhibir las células de la inmunidad innata y adquirida (Michelin *et al.*, 2009).

Importante observar que, en este estudio, la exposición a la RUV fue realizada por solamente cinco minutos por seis veces en un período de 13 días y mismo con esto corto espacio de tiempo hubo expresión de las moléculas inmunoregulatorias en queratinocitos, células linfomononucleares residentes, células dendríticas y en células endoteliales, sin la influencia de factores sistémicos. En condiciones fisiológicas, la exposición de la piel a la RUV de forma aguda, subaguda, crónica, de forma continuada o intermitente a lo largo de la vida se puede inferir que la expresión de las moléculas inmunoregulatorias sea aún más importante para producir futuros daños en la piel. Así, la inducción de moléculas inmunoregulatorias puede ser el primer paso para el desarrollo de células tumorales, que no controladas pueden generar los cánceres de piel.

VI.4. Asociación entre la exposición a la radiación solar (RS) y los cánceres de piel en Ecuador

Los efectos de la RS y su asociación con los cánceres de piel fueron evaluados en Ecuador, pues que en este país la RS incide perpendicular o casi perpendicularmente en sus varias regiones, utilizando datos disponibles en la base INEC, que registra los diagnósticos de cáncer de piel, confirmados por examen histopatológico, en los ingresos y egresos hospitalarios. Todavía, los datos de INEC no incluyen los casos de cánceres de piel de pacientes o de muestras obtenidas en los centros privados de dermatología o de pacientes que no procuraran atención médica por falta de tiempo o por consideraren que algunas de esas lesiones no fuesen

importantes. Así, los números totales y los números relativos de cánceres de piel pueden ser aún mayores do que los relatados en esta investigación.

Considerando que las dos ciudades más grandes del país (Quito y Guayaquil) son los principales centros de referencia en los diversos niveles de atención para pacientes de las distintas regiones del país, y considerando que los datos disponibles registran los números totales de cánceres de piel en los ingresos de cada región, se utilizaron cuatro estrategias para los análisis de los datos, incluyéndose: i) casos totales registrados en Ecuador y en las principales ciudades, ii) razón entre el número total de casos de cánceres de piel y el número total de atenciones hospitalarias, independientes de sus sitios de residencia, iii) razón entre el número total de casos de cánceres de piel y el número total de ingresos hospitalarios que vivían en las regiones analizadas y iv) razón entre las tasa de cánceres de piel por 10 000 atenciones.

Luego de realizar la caracterización de los cánceres de piel considerando todos los cánceres en números absolutos (casos) a lo largo de los años 2015 hasta 2022, estratificados según el tipo histológico de cáncer y sexo se observa que los más frecuentes son cánceres no melanoma, luego melanoma, después cáncer *in situ* y melanoma *in situ*. En seguida, se hicieron correlaciones entre esas variables y la RS en las ciudades más pobladas de Ecuador (Quito y Guayaquil) sin encontrarse asociación relevante. Este hallazgo se explica debido a que la radiación solar directa no es el referente específico para analizar las patologías dermatológicas, sino que más bien se debe al índice de RUV que contiene a la radiación solar directa juntamente con otros factores como son la luz reflejada, la nubosidad, la altura, entre otros (Modenese; Korpinen; Gobba, 2018). Lo ideal sería evaluar directamente la asociación entre los cánceres de piel con la RUV, pero estos datos solamente son disponibles en Ecuador mediante pagos de alto costo y no fueron realizados.

Comparando las atenciones de ingresos hospitalarios entre Quito y Guayaquil, el porcentaje de atención fue mayor en Quito y esta fue la tendencia en el 2018, época en la cual la población de Quito superaba aquella de Guayaquil. Se analizó también la RS en Quito y Guayaquil, encontrándose que en Quito existe mayor RS que en Guayaquil, esto podría explicarse debido a que la RS constituye radiación luminosa que en Quito es ligeramente mayor debido a la inclinación terrestre y la perpendicularidad que existe en Quito en relación con Guayaquil, y esto coincide con los períodos de verano. Quito está a 2850 msnm y Guayaquil al nivel del mar, observándose más casos de melanoma en Quito, corroborando la observación que indica que a mayores alturas (superiores a los 700 msnm) aumenta la frecuencia del melanoma (Atlas Dermo-sifiliográficas, disponible en <https://www.actasdermo.org/es-melanoma-altitud-radiacion-uvb-articulo-S0001731010004709>). En un estudio realizado en la

provincia de Granada, España, fue evaluada la prevalencia del melanoma, asociando altura con la intensidad de la RUV. Las tasas más altas de cánceres de piel y las dosis diarias más altas de eritema solar fueron observadas entre 1400 hasta 1499 msnm (Aceituno-Madera *et al.*, 2011). Además de la altura, el aumento de la temperatura global debida a emisiones atmosféricas de causa antropogénica y debida al efecto estufa también pueden implicar en un gran aumento de los cánceres basocelulares y escamosos en los próximos siglos (Piacentini; Della Ceca; Ipiña, 2018)

Los datos en cuanto al sexo denotan que las mujeres consultan y se tratan en un número significativamente mayor que los hombres, lo cual podría ser debido a que la mayor parte de la población laboral activa es masculina, mientras que las mujeres se dedican a labores domésticos en sus hogares. Esto repercute en las atenciones de cáncer de piel ya que en forma categórica los hombres presentan más cánceres de piel no melanoma y melanoma pese a que ellos se atienden en menor cantidad, esto se observa de mejor forma al verificar las tasas donde se hace referencia a 10 000 atenciones o ingresos hospitalarios. Además, se observa que los hombres tienen más melanoma que las mujeres debido a sus exposiciones laborales a la RS, conforme también relatado por otros estudios (Rastrelli, *et al.*, 2014).

También se observó que, si comparamos las atenciones de ingresos hospitalarios entre Quito y Guayaquil, el porcentaje de atención fue mayor en Quito que en Guayaquil. En cambio, en la edad la mayor parte de personas con cáncer de piel en Ecuador son mayores de 66 años, de forma similar a los Estados Unidos, donde el cáncer de piel empieza a los 70 años (Skin Cancer Foundation, disponible en <https://www.skincancer.org/es/skin-cancer-information/skin-cancer-facts/>)

La auto identificación étnica a nivel nacional es mestiza, luego indígena, afro y demás, lo cual constituye una observación importante a la hora de hablar de foto tipos cutáneos que se encuentran entre el IV, V y VI como los predominantes, basados en la clasificación de Fitz Patrick (Bologna, Jorizzo; Schaffer, 2019). Como la identificación étnica es auto referida, es difícil de comparar con otras poblaciones sin que se conozca los fototipos cutáneos. Sin embargo, hay distribuciones interesantes de cánceres de piel que merecen otros estudios más detallados.

Los cánceres melanoma y no melanoma se presentan en gran proporción en las provincias de Pichincha, Azuay, Guayas, Manabí y Loja. Así, se encuentra que las provincias de la Sierra ecuatoriana en primer lugar Pichincha, Azuay son las que más se afectan de melanoma a diferencia de Guayas y Manabí que tienen una tendencia mayor a afectarse de cáncer de piel no melanoma, esta observación se puede deber a la diferencia de altura como

reportado en España (Aceituno-Madera *et al.*, 2011), pero también por causa de la nubosidad y RUV entre estas provincias de la Sierra y la Costa ecuatorianas.

VII. CONCLUSIONES

Las moléculas HLA-E y HLA-G fueron expresas en las áreas tumorales de carcinomas basocelulares agresivos y no agresivos. Los basocelulares no agresivos fueron primordialmente HLA-E positivas y HLA-G negativas, mientras que las muestras agresivas fueron primordialmente HLA-G positivas y HLA-E negativas, indicando el rol de moléculas inmunoreguladoras en la patogénesis de estos carcinomas.

La RUV indujo la expresión de HLA-E (queratinocitos y células mononucleares) y HLA-G (células dendríticas) en explantes de piel, siendo una evidencia adicional de inmunoregulación inducida por la RUV.

La incidencia perpendicular de la RS en Ecuador produjo características particulares de cánceres de piel melanoma y non melanoma, según el sexo, la edad, la ciudad de referencia de ingresos y egresos hospitalarios, la altura de las ciudades ecuatorianas, la edad y la etnia auto referida.

REFERENCIAS*

ACEITUNO-MADERA, P. *et al.* Melanoma, altitud y radiación UVB [Melanoma, altitude, and UV-B radiation]. **Actas Dermo-sifiliográficas**. v. 102, n. 3, p. 199-205, 2011. Spanish. DOI: 10.1016/j.ad.2010.08.003.

ACOSTA, A. E. *et al.* Melanoma: patogénesis, clínica e histopatología. **Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología & Cirugía Dermatológica**, Bogotá, v. 17, n. 2, jun. 2009.

ACOSTA DE HART, A. *et al.* Guías de práctica clínica para el tratamiento del carcinoma escamocelular. **Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología & Cirugía Dermatológica**, Bogotá, v. 16, n. 2, p. 116-134, 2008.

ALLARD, M *et al.* Serum soluble HLA-E in melanoma: a new potential immune-related marker in cancer. **PLoS One**. v. 6, n. 6, p. e21118, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0021118.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Inmunoterapia para el cáncer de piel tipo melanoma**. 2022a. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-piel-tipo-melanoma/tratamiento/inmunoterapia.html>. Accedido en: 10 fev 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Tratamiento del cáncer de piel de células basales y de células escamosas**. 2022b. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-piel-de-celulas-basales-y-escamosas/tratamiento.html>. Accedido en: 23 jul 2023.

ARACTINGI, S. *et al.* Selective expression of HLA-G in malignant and premalignant skin specimens in kidney transplant recipients. **International Journal of Cancer**, Hoboken, v. 106, n. 2, p. 232-235, 2003. DOI: 10.1002/ijc.11217.

AYALA REINA, Z. E. *et al.* Caracterización histopatológica del melanoma maligno cutáneo. Provincia de Cienfuegos. 2009-2011. **Medisur**, Cienfuegos, v. 16, n. 4, p. 552-560, 2018. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2018000400010&lng=es&nrm=iso. Accedido en : 13 jul. 2023.

BAYERL, F. *et al.* Tumor-derived prostaglandin E2 programs cDC1 dysfunction to impair intratumoral orchestration of anti-cancer T cell responses. **Immunity**. v. 56, n 6, 1341-1358.e11, 2023. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.05.011.

BERTOL, B. C. *et al.* Human Antigen Leucocyte (HLA)-G and HLA-E are differentially expressed in pancreatic disorders. **Human Immunology**, Amsterdam, v. 80, n. 11, 948-954, 2019. DOI: 10.1016/j.humimm.2019.09.002.

BOLOGNIA, J. L.; JORIZZO, J. L.; SCHAFFER, J. V. **Dermatología: principales diagnósticos y tratamientos**. Amsterdam: Elsevier, 2019. *E-book*.

BORST, L.; VAN DER BURG, S. H.; VAN HALL, T. The NKG2A-HLA-E Axis as a Novel checkpoint in the tumor microenvironment. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 26, n. 21, p. 5549-5556, 2020. DOI: 10.1158/1078-0432.

BOUJELBENE, N. *et al.* HLA-G, HLA-E, and IDO overexpression predicts a worse survival of Tunisian patients with vulvar squamous cell carcinoma. **HLA**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 11-24, 2019. DOI: 10.1111/tan.13536.

CABRERA MORALES, C. M.; LOPEZ-NEVOT, M. A. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. **Oncología (Barcelona)**, Barcelona, v. 29, n. 7, p. 25-32, set. 2006. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352006000700003&lng=es&nrm=iso. Accedido en 6 jul. 2023.

CAJINA-VASQUEZ, A. Carcinoma basocelular. **Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica**, [s. l.], v. 69, n. 603, p. 325-329, 2012. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=36651>. Accedido en 6 jul. 2023.

CARLINO, M. S.; LARKIN, J.; LONG, G. V. Immune checkpoint inhibitors in melanoma. **Lancet**, London, v. 398, n. 10304, p. 1002-1014, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01206-X.

CAROSELLA, E. D. *et al.* Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, New York, v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008. DOI: 10.1182/blood-2007-12-127662.

CAROSELLA ED, GREGORI S, LEMAOULT J. The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells. **Blood**, New York, v. 118, n. 25, p. 6499-505, 2011. DOI: 10.1182/blood-2011-07-370742.

CAROSELLA, E. D. *et al.* HLA-G: an immune checkpoint molecule. **Advances in Immunology**, New York, n. 127, p. 33-144, 2015. DOI: 10.1016/bs.ai.2015.04.001.

CASTANEDA GAMEROS, P.; ELJURE TELLEZ, J. El cáncer de piel, un problema actual. **Revista de la Facultad de Medicina (México)**, Ciudad de México, v. 59, n. 2, p. 6-14, abr. 2016. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422016000200006&lng=es&nrm=iso. Accedido en 6 jul. 2023.

CASTELLI, E.C. *et al.* Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. **Journal Immunological Research**. v. 2014. P. 734068, 2014. DOI: 10.1155/2014/734068.

CASTELLI, E. C. *et al.* HLA-G genetic diversity and evolutive aspects in worldwide populations. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1, p. 23070, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-02106-4.

CELA, E. M. Exposición cutánea a la radiación ultravioleta: implicancias sobre funciones del sistema inmune. Tesis (Doctorado) - Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2016.

CERÓN CHIMARRO, D. E.; AYON GENKUONG, A. M. Prevalencia de cáncer de piel en pacientes de 18 a 50 años en el Hospital Teodoro Maldonado Carbo durante el periodo 2014 - 2019.: Artículo Original. **Oncología** (Ecuador), [S. l.], v. 30, n. 1, p. 82–91, 2020. DOI: 10.33821/474. Disponible en: <https://roe-solca.ec/index.php/johs/article/view/474>. (Accedido en: 17 ago. 2023).

CHANG SW, LEE HC. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. **Pediatric Neonatology**. v. 60, n 3, p. 237-244, 2019. DOI: 10.1016/j.pedneo.2019.04.007.

CHINEM, V. P.; MIOT, H. A. Epidemiologia do carcinoma basocelular. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 292–305, 2011.

CRUZ, A. R.; ISAZA, C. Fotocarcinogénesis: un enfoque práctico. **Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica**, Bogotá, v. 12, n. 2, p. 51–60, 2004. Disponible en: <https://revista.asocolderma.org.co/index.php/asocolderma/article/view/574>. Accedido en: 6 jul. 2023.

DARIAS DOMINGUEZ, C.; GARRIDO CELIS, J. Carcinoma basocelular. Un reto actual para el dermatólogo. **Revista Médica Electrónica**, Matanzas, v. 40, n. 1, 172-182, 2018. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242018000100017&lng=es. Accedido en: 10 fev 2023.

DERRÉ, L. *et al.* Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 177, n. 5, p. 3100-3107, 2006. DOI: 10.4049/jimmunol.177.5.3100.

DIAS, F. *et al.* The role of HLA-G molecule and HLA-G gene polymorphisms in tumors, viral hepatitis, and parasitic diseases. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 6, p. 1-10, 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00009.

DONADI, E. A. *et al.* Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution, and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 68, n. 3, p. 369–395, 2011. DOI: 10.1007/s00018-010-0580-7.

FRADE, M. A. Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Barcelona, v. 90, n. 3, p. 347-350, 2015. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20153645.

FRAZIER, W., BHARDWAJ., N. Atopic Dermatitis: Diagnosis and Treatment. **American Fam Physician**. v.10, n 10, p. 590-598, 2020.

HART, PH, NORVAL, M. Ultraviolet radiation-induced immunosuppression and its relevance for skin carcinogenesis. **Photochemical Photobiology Sciences**. v. 17, n 12, p. 1872-1884, 2018. DOI: 10.1039/c7pp00312a.

INFANTE CARBONELL, M. C. *et al.* Melanoma cutáneo: algunas consideraciones actuales. **Medisan**, Santiago de Cuba, v. 23, n. 1, p. 146-164, feb. 2019. Disponible en

<http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192019000100146&lng=es&nrm=iso>. (accedido en: 17 agosto 2023)

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Cáncer de pele não melanoma**. 2022. Disponible en: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-nao-melanoma>. Accedido en: 6 jul. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSO. **Registro estadístico de camas e egresos hospitalarios**. 2020. Disponible en: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/camas-y-egresos-hospitalarios/>. Accedido en: 6 jun. 2023.

KING, A. *et al.* HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 30, n. 6, p. 1623-1631, 2000. DOI: 10.1002/1521-4141

KROFT, E.B. *et al.* Ultraviolet A phototherapy for sclerotic skin diseases: a systematic review. **Journal American Academy of Dermatology**. v. 59, n. 6, p. 1017-30, 2008. DOI: 10.1016/j.jaad.2008.07.042.

LEE, J. *et al.* Monalizumab efficacy correlates with HLA-E surface expression and NK cell activity in head and neck squamous carcinoma cell lines. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 149, n. 9, p. 5705-5715, 2023. DOI: 10.1007/s00432-022-04532-x.

LEITE, M. N. *et al.* Ex vivo model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the anti-melanoma drug Dacarbazine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 160, n. 105769, 2021. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105769.

MARLETTA, S. *et al.* HLA-G expression in melanomas. **International Reviews of Immunology**, London, v. 40, n. 5, p. 330-343, 2021. DOI: 10.1080/08830185.2020.1869732.

MARQUEZ RODAS, I. *et al.* **Melanoma**. Madrid: SEOM, 2022. Disponible en: <https://seom.org/118-Informaci%C3%B3n%20al%20P%C3%ABlico%20-%20Patolog%C3%ADas/melanoma>. Accedido en: 23 jul. 2023.

MAYO CLINIC HEALTH LIBRARY. 2023 **Mayo Foundation for Medical Education and Research**. (<https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/skin-cancer/symptoms-causes/syc-20377605>)

MELSTED, W.N. *et al.* HLA class Ia and Ib molecules and FOXP3+ TILs in relation to the prognosis of malignant melanoma patients. **Clinical Immunology**. v. 183, p. 191-197, 2017. DOI: 10.1016/j.clim.2017.09.004.

MESTRALLET, G. *et al.* Skin Immunity and Tolerance: Focus on Epidermal Keratinocytes Expressing HLA-G. **Frontiers Immunology**. v. 12, p. 772516, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.772516.

MICHELIN, S. *et al.* Ionizing radiation modulates the surface expression of human leukocyte antigen-G in a human melanoma cell line. **Human Immunology**. v. 70, n. 12, p.1010-5, 2009. DOI: 10.1016/j.humimm.2009.07.030.

MICHELS, N. *et al.* Chronic inflammation towards cancer incidence: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **Critical Review Oncology Hematology**. v. 157, p. 103177, 2021. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.103177.

MODENESE, A.; KORPINEN, L.; GOBBA, F. Solar Radiation Exposure and Outdoor Work: An Underestimated Occupational Risk. **International Journal Environmental Research Public Health**. v. 15, n. 10, p. 2063, 2018. DOI: 10.3390/ijerph15102063).

MONTERO TORRES, J. Relación de la radiación solar con la producción de plantas: agroproductivas. RIIARn, La Paz, v. 9, n. 1, p. 48-62, 2022. Disponible en <https://www.aros-solar.com/es/la-radiacion-solar>

MORANDI, F.; PISTOIA, V. Interactions between HLA-G and HLA-E in physiological and pathological conditions. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 5, p. 1-6, 2014. article 394. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00394.

NARAYANAN, D. L.; SALADI, R.N.; FOX, J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**. v. 49, n 9, p. 978-86, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x.

ONCOGUIA. **Estatística para câncer de pele basocelular e espinocelular**. 2020. Disponible en: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistica-para-cancer-de-pele-basocelular-e-espinocelular/6806/268>. Accedido en: 6 jul. 2023.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud CIE-10**. 10. ed. rev. Washington: OPS, 2008. v. 1. Disponible en: <https://ais.paho.org/classifications/chapters/pdf/volume1.pdf>. Accedido en: 28 jul. 23.

PIACENTINI, R.D.; DELLA CECA, L.S.; IPIÑA, A. Climate change and its relationship with non-melanoma skin cancers. **Photochemical Photobiological Sciences**. v.17, n. 12, p. 1913-1917, 2018. DOI: 10.1039/c7pp00405b.

RASTRELLI, M. *et al.* Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis, and classification. **In Vivo**. v. 28, n. 6, p. 1005-11, 2014.

REQUENA, C.; SERRA-GUILLÉN, C.; SANMARTÍN, O. Histologically aggressive basal cell carcinoma with particular emphasis on galeal infiltration of the scalp. **Actas Dermosifiliográficas**, Madrid, v. 113, n. 6, p. 575-582, 2022. DOI: 10.1016/j.ad.2022.01.026.

RESTREPO, C.; VELÁSQUEZ, M. M. Mecanismos de patogénesis del melanoma maligno. **Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología & Cirugía Dermatológica**, Bogotá, v. 20, n. 2, p. 161-172, 2012. DOI : <https://doi.org/10.29176/2590843X.225>

RICHMOND-SINCLAIR, N. M. *et al.* Incidence of basal cell carcinoma multiplicity and detailed anatomic distribution: longitudinal study of an Australian population. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 129, n. 2, p. 323-328, 2009. DOI: 10.1038/jid.2008.234

ROBINSON, J. *et al.* IPD-IMGT/HLA Database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 48, p. D948-D955, 2020.

SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K.; KAUPPINEN A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. **Inflammation Research**. v.71, n. 7-8, p. 817-831, 2022. DOI: 10.1007/s00011-022-01598-8

SOCIEDAD AMERICANA CONTRA EL CÁNCER, 2021. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-piel-de-celulas-basales-y-escamosas/acerca/estadisticas-clave.html> (accedido en 16 junio 2023)

TINKER, A. V. *et al.* Dose-ranging and cohort-expansion study of monalizumab (iph2201) in patients with advanced gynecologic malignancies: a trial of the Canadian Cancer Trials Group (CCTG): IND221. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 25, n. 20, p. 6052-6060, 2019. DOI: 10.1158/1078-0432.

TREMANTE, E. *et al.* A melanoma immune response signature including Human Leukocyte Antigen-E. **Pigment Cell and Melanoma Research**, Oxford, v. 27, n. 1, 103-112, Jan. 2014. DOI: 10.1111/pcmr.12164.

UROSEVIC, M. *et al.* HLA-G expression in basal cell carcinomas of the skin recurring after radiotherapy. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 30, n. 4, 422-425, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2230.2005.01790.x.

VAN HALL, T. *et al.* Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, London, v. 7, n. 1, p. 263, 2019. DOI: 10.1186/s40425-019-0761-3.

VÁZQUEZ BLANCO, E. *et al.* Caracterización clínica y epidemiológica del carcinoma basocelular en el Hospital Celia Sánchez Manduley, 2017- 2019. **Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río**, Pinar del Río, v. 25, n. 5, p. e5053, 2021.

VASQUEZ, M. *et al.* Carcinoma espinocelular cutáneo invasivo de alto riesgo: uso de clasificaciones actuales. **Revista Argentina de Dermatología**. Ciudad Autónoma de Buenos Aires , v. 98, n. 3, sept. 2017.

WANG, W. *et al.* Upregulation of PD-L1 via HMGB1-Activated IRF3 and NF-κB Contributes to UV Radiation-Induced Immune Suppression. **Cancer Research**. v.79, n. 11, p. 2909-2922, 2019. DOI: 10.1158/0008-5472.

WASTOWSKI, I.J. *et al.* **Journal Rheumatology**. v. 36, n. 6, p.1230-1234, 2009. DOI : 10.3899/jrheum.080552.

WESTIN, A. T. *et al.* HLA-G, cytokines, and cytokine receptors in the non-aggressive basal cell carcinoma microenvironment. **Archives of Dermatological Research**, Berlin, v. 314, n. 3, p. 247-256, 2022. DOI: 10.1007/s00403-021-02218-x.

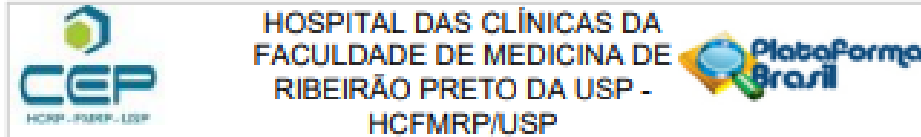
Yie, S.M. *et al.* Expression of HLA-G is associated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**. v.128, n. 6, p. 1002-9, 2007. DOI: 10.1309/JNCW1QLDFB6AM9WE.

ZHANG, P.; WU, M.X. A clinical review of phototherapy for psoriasis. **Lasers Medical Science**. 2018 Jan;33(1):173-180. DOI: 10.1007/s10103-017-2360-1.

ZUBAIR, R.; HAMZAVI, I.H. Phototherapy for Vitiligo. **Dermatology Clinics**. v. 38, n. 1, p. 55-62, 2020. DOI: 10.1016/j.det.2019.08.005.

* Norma ABNT

ANEXO 1.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de HLA-G e HLA-E no câncer da pele não melanoma

Pesquisador: CACILDA DA SILVA SOUZA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68552223.3.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

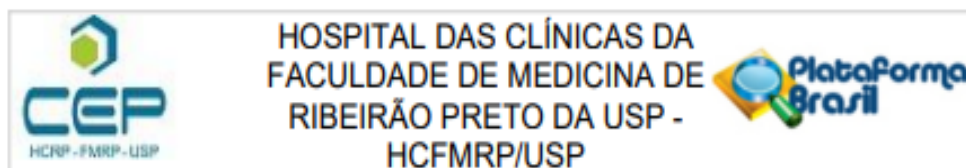
Número do Parecer: 5.991.692

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa", "Avaliação dos Riscos e Benefícios" e "Comentários e Considerações sobre a Pesquisa" foram retiradas do documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2043987.pdf de 06/04/2023 e de seus anexos.

Introdução: Os cânceres de pele não-melanoma (CPNM) compreendem o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular (CEC), e são as neoplasias malignas mais frequentes na população mundial. Os vários subtipos dessas neoplasias possuem características de interesse para um modelo de estudo, a fim de identificar os fatores determinantes dos diferentes padrões de crescimento e de agressividade na invasão dos tecidos subjacentes. O HLA-G está presente primariamente no trofoblasto placentário, sendo responsável pela tolerância materno-fetal. A expressão do HLA -E é encontrada em um conjunto restrito de tecidos, em particular, leucócitos, endotélio e células do trofoblasto. A expressão do HLA-G e HLA-E pode ser encontrada em várias neoplasias malignas e representar uma forma das células tumorais evadirem o sistema imune do hospedeiro. **Objetivos:** Neste estudo buscamos analisar, a expressão de HLA-G e HLA-E e seus possíveis mecanismos imunomoduladores envolvidos nos diferentes subtipos, graus de diferenciação e localizações topográficas dos CPNM. **Métodos:** Em 50 amostras de fragmentos dos subtipos agressivos e não agressivos do CBC e do CEC serão analisadas a expressão do HLA-G e

Endereço: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/Campus Universitário, Prédio Central-
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)2632-3228 **Fax:** (16)2632-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 5.991.692

HLA-E por meio imunistoquímica (IHQ). Justificativa: A compreensão da ação mecanismos imunomoduladores de elevada prevalência mundial constitui-se em um campo atraente de investigação e de perspectivas terapêuticas. Resultados esperados: A expressão do HLA-G HLA-E podem atuar com ação imunomoduladora, favorecer a supressão de células efectoras no microambiente das neoplasias cutâneas propiciando o seu desenvolvimento e escape tumoral.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Considerando-se que o câncer cutâneo primário não-melanoma é a forma mais comum de câncer na população caucasiana, e a exposição excessiva à radiação o seu principal fator causal, a elucidação dos mecanismos imunomoduladores envolvidos no desenvolvimento deste tumor se constitui um atraente campo de investigação e de perspectivas terapêuticas. No presente estudo, buscamos avaliar os possíveis mecanismos imunomoduladores envolvidos nos cânceres cutâneos primários não-melanoma, CBC e CEC, por meio da análise da expressão do antígeno leucocitário humano G (HLA-G) e HLA-E.

Objetivo Secundário:

a) Avaliar a imunexpressão e a distribuição do HLA-G e HLA-E nos subtipos de CBC agressivos e não-agressivos, comparada à pele normal e controles; b) Avaliar imunexpressão e a distribuição do HLA-G e HLA-E nos CECs de diferentes graus de diferenciação, comparada à pele normal e dos controles.

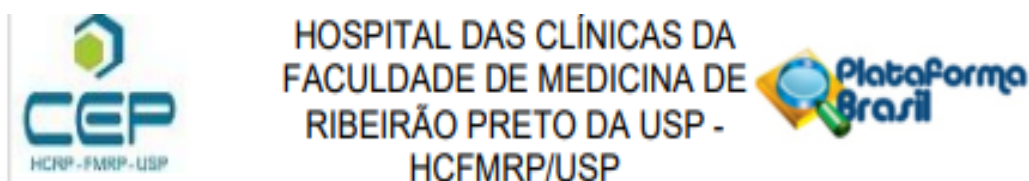
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os dados serão tratados em conjunto, e serão preservadas a confidencialidade e a privacidade dos sujeitos do estudo. Portanto, o risco de quebra de confidencialidade é desprezível.

Benefícios:

Os benefícios são gerais e aqueles da compreensão da ação mecanismos imunomoduladores de elevada prevalência mundial constitui-se em um campo atraente de investigação e de perspectivas terapêuticas.



Continuação do Parecer: 5.991.892

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa conforme PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2043987.pdf de 06/04/2023.

Desenho: Estudo observacional transversal

Hipótese: HIPÓTESES I) A expressão do HLA-G e HLA-E pode ser encontrada em várias neoplasias malignas e representar uma forma das células tumorais evadirem o sistema imune do hospedeiro. II) A expressão do HLA-G e HLA-E pode ser distinta nas neoplasias da pele em acordo com a agressividade e grau de diferenciação.

Desfecho Primário: Imunomarcagem para HLA-G e HLA-E das células neoplásicas dos carcinomas basocelulares e carcinomas de células escamosas.

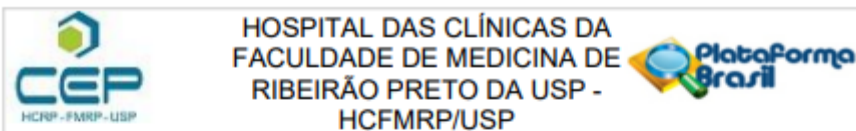
Desfecho Secundário: Distinção na análise de imunomarcagem de HLA-G e HLA-E nos carcinomas basocelulares agressivos e não agressivos e carcinomas de células escamosas de diferentes graus de diferenciação.

Tamanho da Amostra no Brasil: 65

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro:

1. Grupo de Controles - 15 - Autorização para uso de pele normal descartadas em cirurgias corretivas, propõe a aplicação do TCLE.

2. Propõe dispensa do TCLE (grupo pacientes), com a justificativa de que a proposta é do uso de blocos parafinados de neoplasias cutâneas, carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas já removidas. Será solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por dificuldades de localização, perda do seguimento ou situação de óbito desses pacientes. Os indivíduos do grupo controle serão convidados a participar do estudo e terão a liberdade de recusar a participação no estudo, sem nenhum prejuízo para o seu seguimento. Para aqueles indivíduos do grupo controle que aceitarem a participar do estudo será apresentado o TCLE para leitura e esclarecimento de dúvidas, e então será solicitada a concordância por meio de



Continuação do Parecer: 5.991.692

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HLAG_v1_1_11_22_Controles.docx	02/11/2022 20:56:32	CACILDA DA SILVA SOUZA	Aceito
---	-------------------------------------	------------------------	------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 10 de Abril de 2023

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador(a))

ANEXO. 2



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



OFÍCIO Nº 3460/2018
CEP/MGV

RIBEIRÃO PRETO, 06 DE DEZEMBRO DE 2018

PREZADOS SENHORES,

O TRABALHO INTITULADO "AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E APLICAÇÃO DO MODELO DE PELE HUMANA EX VIVO (HOSEC) PARA ESTUDOS DE FOTOENVELHECIMENTO A LONGO PRAZO", FOI ANALISADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SUA 482ª REUNIÃO ORDINÁRIA, REALIZADA EM 03/12/2018 E ENQUADRADO NA CATEGORIA: **APROVADO**, BEM COMO O BIORREPOSITÓRIO E O TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO – VERSÃO 1, DE 23/10/2018, DE ACORDO COM O PROCESSO HCRP Nº 11290/2018.

DE ACORDO COM CARTA CIRCULAR Nº 003/2011/CONEP/CNS, DATADA DE 21/03/2011, O SUJEITO DE PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE, QUANDO FOR O CASO, DEVERÁ RUBRICAR TODAS AS FOLHAS DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE – APONDO SUA ASSINATURA NA ÚLTIMA DO REFERIDO TERMO; O PESQUISADOR RESPONSÁVEL DEVERÁ DA MESMA FORMA, RUBRICAR TODAS AS FOLHAS DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE – APONDO SUA ASSINATURA NA ÚLTIMA PÁGINA DO REFERIDO TERMO.

ESTE COMITÊ SEGUE INTEGRALMENTE A RESOLUÇÃO Nº 466/12 CNS/MS. LEMBRAMOS QUE DEVEM SER APRESENTADOS A ESTE CEP, O RELATÓRIO PARCIAL E O RELATÓRIO FINAL DA PESQUISA.

ATENCIOSAMENTE.

DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
MÁRCIA APARECIDA RAMOS LOPES
PROF.DR.MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE(ORIENTADOR)
Depto. de Clínica Médica