



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**“ESTUDIO DEL CÁNCER CUTÁNEO NO
MELANOMA EN PACIENTES
TRASPLANTADOS RENALES: INCIDENCIA Y
FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS”.**

TESIS DOCTORAL presentada para la obtención del grado de
Doctora en Medicina por la *Universitat de València*

JOSEFA BERNAT GARCÍA

Dirigida por:
Dr. Juan José Vilata Corell
Dra. María Morales Suárez-Varela

VALENCIA 2012

JUAN JOSE VILATA CORELL, CATEDRÁTICO DE DERMATOLOGÍA Y VENEREOLOGIA DE LA *UNIVERSITAT DE VALÈNCIA*

Y

MARIA MORALES SUÁREZ-VARELA, CATEDRÁTICA DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA DE LA *UNIVERSITAT DE VALÈNCIA*

CERTIFICAMOS:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: **“ESTUDIO DEL CÁNCER CUTÁNEO NO MELANOMA EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES: INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS”**, que presenta Doña Josefa Bernat García para optar al Grado de Doctora por la *Universitat de València*, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia y la *Facultat de Medicina i Odontologia* de Valencia y que se encuentra finalizada y lista para su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia, a 15 de noviembre de 2012.

Fdo: Dr. Juan José Vilata Corell
Catedrático de Dermatología

Fdo: Dra. María Morales Suárez-Varela
Catedrática de Medicina Preventiva y
Salud Pública

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

AGRADECIMIENTOS

*A Jose por su paciencia,
complicidad y por su capacidad de hacerme feliz
y a mi hijo por su sonrisa y por el sentido que le da a mi vida.*

He tenido la suerte de rodearme de grandes personas que han sido fundamentales para el desarrollo de esta tesis doctoral:

A mi director de tesis, el Dr. Juan José Vilata, por sus sabios consejos y su experiencia.

A mi directora de tesis, la Dra. Maria Morales, por todas esas horas que hemos pasado juntas, por sus conocimientos en Bioestadística prioritarios para el análisis de todos los datos de esta tesis, por darme ánimos para seguir adelante, pero sobre todo por ser tan buena persona y estar ahí siempre que la he necesitado.

A mi Jefa de Servicio, la Dra. Amparo Marquina Vila, por animarme en todo momento y respaldarme como una Jefa ejemplar.

A los Drs. L.Pallardó y J. Crespo por los conocimientos que me han transmitido y su accesibilidad.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia por su trabajo y colaboración.

Al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia por su colaboración en la tesis.

Al Dr. Juan García de Lomas, por su ayuda en el procesado de las muestras para la determinación del virus del papiloma.

A Amparo Fuertes, Almudena Mateu, Amelia Prats, Ana Zayas, Edelmira Barberá, Begoña Escutia, Jose María Sánchez, Lidia Tomás, Francisco Ferrando, Leandro Rebert, Pilar Pérez, Tania Díaz, Sofía de Asis, María, Pilar, Lola, Encarna, Esther y Tere, por esas horas de quirófano y consulta juntos, por su ayuda en la tesis y por hacer de mi residencia como una segunda casa.

A mis padres, Emilio y Pepita, por estar siempre ahí, por quererme tanto y por todo lo que habéis hecho por mi.

A mis suegros, Mariví y Pepito, por ser mis segundos padres, por todo lo que me habéis ayudado sin pedir nada a cambio.

Y a ti, esa personita que se está formando...

A TODOS, GRACIAS.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	I
Índice de tablas.....	XIII
Abreviaturas.....	XV

INTRODUCCIÓN.....1

I- CÁNCER CUTÁNEO NO MELANOMA.....3

1-Carcinoma basocelular.....	4
2-Carcinoma epidermoide <i>in situ</i>	8
3-Carcinoma epidermoide.....	9
4-Queratoacantoma.....	13

II- EPIDEMIOLOGÍA.....16

III-FACTORES DE RIEGO IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE CÁNCER CUTÁNEO NO MELANOMA EN PACIENTES TRASPLANTADOS.19

1-Inmunosupresión.....	19
1.1-Protocolos de inmunosupresión.....	20
1.2-Fármacos inmunosupresores.....	21
1.3-Inmunosupresores como factores de riesgo de cáncer cutáneo....	38
2-Exposición solar y fototipo.....	40
3-Virus.....	41
4-Edad.....	41
5-Factores inmunológicos.....	42
6-Tipo de órgano trasplantado.....	43
7-Sexo.....	43
8-Tiempo de diálisis pretrasplante.....	44
9-Otros.....	44

IV- VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....46

1-Estructura del virus	46
2-Clasificación de los VPH.....	48
3-Poder oncogénico del VPH.....	53
3.1-Ciclo replicativo del VPH.....	53
3.2-VPH y CCNM: mecanismos moleculares.....	57
4-Estudio del VPH en el CCNM.....	59
5-VPH en CCNM de pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes. VPH en piel sana.....	61
5.1-VPH y epidermodisplasia verruciforme.....	62
5.2-VPH y CCNM en pacientes inmunocompetentes.....	63
5.3-VPH y CCNM en pacientes trasplantados.....	63
5.4-VPH en piel sana.....	64

<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	65
I-HIPOTESIS	67
II-OBJETIVOS	68
<u>MATERIAL Y MÉTODO</u>	71
I-MATERIAL	73
1-Diseño del estudio.....	73
2-Criterios de inclusión-exclusión.....	76
3-Descripción de las variables a estudio.....	76
II-METODO	80
1-Descripción de la recogida de muestras.....	80
2-Detección del genoma del VPH.....	82
3-Análisis estadístico.....	93
4-Anexos.....	95
<u>RESULTADOS</u>	107
I-INCIDENCIA ACUMULADA	109
II-DISTRIBUCIÓN Y EVOLUCIÓN del CCNM	110
III- FACTORES DE RIESGO	111
1.Características demográficas de los pacientes estudiados.....	111
2. Variables relacionadas con la exposición solar, hábitos tóxicos e historia familiar.....	113
3. Variables relacionadas con la patología renal y trasplante.	115
4. Variables relacionadas con el tratamiento inmunosupresor.....	116
5. Variables relacionadas con antecedentes de CCNM antes del trasplante, queratosis actínicas y verrugas.	119
6. Análisis multivariante.....	121
IV-ESTUDIO DEL VPH	123
1.Características de los pacientes.....	123
2.Factores de riesgo.....	124
3.Espectro y tipado VPH.....	126
4.Virus del papiloma humano en pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes.....	130
5.Virus del papiloma humano en piel tumoral y piel sana.....	130

<u>DISCUSIÓN</u>	135
I-INCIDENCIA ACUMULADA	137
II- FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A CCNM	138
III- VPH Y CÁNCER CUTÁNEO	144
IV- LIMITACIONES DEL ESTUDIO	152
<u>CONCLUSIONES</u>	153
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	157

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1- Resumen de los datos epidemiológicos de los diferentes estudios publicados.....	18
Tabla 2- Funciones de las proteínas “ <i>Early</i> ” y “ <i>Late</i> ”	47
Tabla 3- Características básicas de los géneros papilomavirus.....	50
Tabla 4- Número y tipo de CCNM diagnosticados.....	110
Tabla 5- Número de tumores por paciente.....	111
Tabla 6- Características demográficas.....	112
Tabla 7- Análisis univariado. Características demográficas.....	113
Tabla 8- Exposición solar, hábitos tóxicos y antecedentes familiares.....	114
Tabla 9- Análisis univariado. Exposición solar, hábitos tóxicos y antecedentes familiares.....	114
Tabla 10- Patología renal y trasplante.....	115
Tabla 11- Análisis univariado. Patología renal y trasplante.....	116
Tabla 12- Tratamiento de inducción con anticuerpos antilinfocitarios.....	117
Tabla 13- Análisis univariado. Tratamiento de inducción con anticuerpos antilinfocitarios.....	117
Tabla 14- Tratamiento inmunosupresor de mantenimiento.....	118
Tabla 15- Análisis univariado. Tratamiento inmunosupresor de mantenimiento.....	119
Tabla 16- CCNM antes del trasplante, verrugas y queratosis actínicas.....	120
Tabla 17- Análisis univariado. CCNM antes del trasplante, verrugas y queratosis actínicas.....	121
Tabla 18- Análisis multivariante.....	122

Tabla 19- Características clínicas de los casos y controles.....	123
Tabla 20- Factores de riesgo para VPH en casos y controles.....	125
Tabla 21- Distribución VPH en casos (lesión y perilesión) y controles (lesión y perilesión).....	127
Tabla 22- Tipos y géneros VPH en casos.....	128
Tabla 23- Tipos y géneros VPH en controles.....	129
Tabla 24- Detección DNA VPH en casos y controles.....	131
Tabla 25- Detección DNA VPH en casos y controles (OR ajustado).....	132
Tabla 26- Prevalencia VPH en tumores.....	133

ABREVIATURAS

- **VPH:** virus del papiloma humano
- **CCNM:** cáncer cutáneo no melanoma
- **CBC:** carcinoma basocelular
- **CEC:** carcinoma espinocelular
- **N.C:** no consta
- **RNA:** ácido ribonucleico
- **TGF:** factor de crecimiento transformante.
- **TPMT:** tio purina metil transferasa
- **mTOR:** *mammalian target of rapamycin*
- **MP:** mercaptopurina
- **MMF:** micofenolato mofetil
- **MPA:** ácido micofenólico
- **MPAG:** glucurónido de ácido micofenólico
- **IMPDH:** inosin-monofosfato-deshidrogenasa
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **PUVA:** fotoquimioterapia con psoralenos y radiación ultravioleta A.
- **EV:** epidermodisplasia verruciforme
- **CIUO:** Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones
- **CIN:** neoplasia intraepitelial cervical
- **UV:** ultravioleta
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **IVAMI:** Instituto Valenciano de Microbiología
- **HLA:** antígenos leucocitarios humanos
- **OR:** *odds ratio*
- **DS:** desviación estándar
- **CI:** intervalo de confianza
- **IL:** interleucina

INTRODUCCIÓN

I. CANCER CUTÁNEO NO MELANOMA

Los pacientes inmunodeprimidos muestran una mayor predisposición al desarrollo de cáncer cutáneo no melanoma (CCNM), con una edad más temprana de inicio, tumores más agresivos (elevada tendencia a la diseminación local y a distancia) y una mayor incidencia de tumores cutáneos múltiples primarios^{1,2,3}.

El creciente número de trasplantes realizados en las últimas décadas y el aumento de supervivencia de los receptores de los mismos determinan que cada vez sea más frecuente la valoración de este tipo de pacientes en las consultas dermatológicas. Los trasplantes de órganos sólidos se han convertido en un procedimiento cada día más frecuente, así en España hemos pasado de 1240 trasplantes renales en el año 1990 a 2498 trasplantes renales en el año 2011⁴.

El cáncer de piel es la neoplasia maligna más frecuente en pacientes trasplantados, el 95% de los cuales son cáncer de piel no melanoma, especialmente el carcinoma epidermoide y basocelular. En pacientes trasplantados el riesgo de desarrollar un carcinoma basocelular se incrementa en diez veces, y la incidencia de carcinoma epidermoide es hasta 65-250 veces mayor que en la población no inmunodeprimida, por lo que la proporción carcinoma basocelular/epidermoide de 4:1 en la población general se invierte en los pacientes trasplantados^{1,5}.

El 75% de los casos de cáncer epidermoide o basocelular ocurren en zonas fotoexpuestas (área de cabeza y cuello o superficie dorsal de las manos) dentro del área del “campo de cancerización” (extensas áreas de daño actínico y displasia epidérmica, con múltiples lesiones queratósicas).

En el presente estudio analizaremos la presencia de:

- Carcinoma basocelular
- Enfermedad de Bowen o carcinoma epidermoide *in situ*
- Carcinoma epidermoide
- Queratoacantoma

También determinaremos la existencia de queratosis actínicas y verrugas como factores precursores y componentes del campo de cancerización.

1- CARCINOMA BASOCELULAR (CBC)

El carcinoma basocelular es el tumor cutáneo maligno más frecuente en la raza blanca. Está constituido por células semejantes a las de la capa basal de la epidermis y los anejos cutáneos y sólo de forma muy excepcional produce metástasis. Al igual que en el carcinoma escamoso, el principal factor etiológico es la exposición solar y a diferencia del mismo, suele aparecer sobre piel sana y no afecta a mucosas.

Las características histológicas que definen un CBC son los agregados de células basaloides neoplásicas, con origen en la epidermis o en el epitelio de las estructuras anexiales. Estos agregados se organizan en lóbulos, islotes, nidos o cordones de células que muestran una disposición ordenada de los núcleos de las células basaloides en la periferia, morfología que se denomina “patrón en empalizada”.

Los islotes de células tumorales están rodeados por un estroma reactivo, diferente al de la dermis adyacente, dando lugar a la formación de hendiduras alrededor de los agregados tumorales. Es frecuente la presencia de mucina dentro o alrededor de los lóbulos tumorales. La dermis adyacente muestra una elastosis solar, de grado variable en la mayoría de los casos y la epidermis puede estar ulcerada.

Existen una serie de variantes definidas de CBC a nivel histológico. Estas variantes histológicas incluyen las formas nodular, superficial, micronodular, infiltrante, esclerosante (tipo morfea) y el infrecuente fibroepitelioma de Pinkus⁶⁻⁹.

- El CBC nodular es el subtipo más frecuente, y representa el 60% de estos tumores. Afecta en mayor medida a la cabeza y el cuello de individuos mayores de 60 años. Se presenta usualmente como una pápula o placa perlada o transparente de color entre carne y rosado. Con frecuencia el tumor se reviste de telangiectasias prominentes. No es rara la ulceración central. Histológicamente se aprecian en la dermis islotes de células tumorales redondeados y de tamaño variable, que se extienden desde la epidermis a la dermis reticular o incluso la sobrepasan.
- El CBC de extensión superficial es el segundo tipo más frecuente y representa el 15% de los CBC. Estos tumores se localizan con preferencia en el tronco y suelen aparecer en pacientes más jóvenes. A nivel clínico cursan como pápulas o placas bien definidas y poco elevadas, de color entre rosa y rojo y tienen por lo general un borde perlado fino. A nivel histológico el CBC de extensión superficial es una lesión amplia, compuesta por una epidermis atrófica salpicada de pequeños lóbulos incipientes de células tumorales, que se extiende desde la epidermis a la dermis papilar. Con frecuencia se decía que estas yemas eran multifocales (de ahí la antigua denominación de CBC superficial multifocal), pero los estudios tridimensionales demuestran que estas yemas se conectan entre ellas a modo de una red.

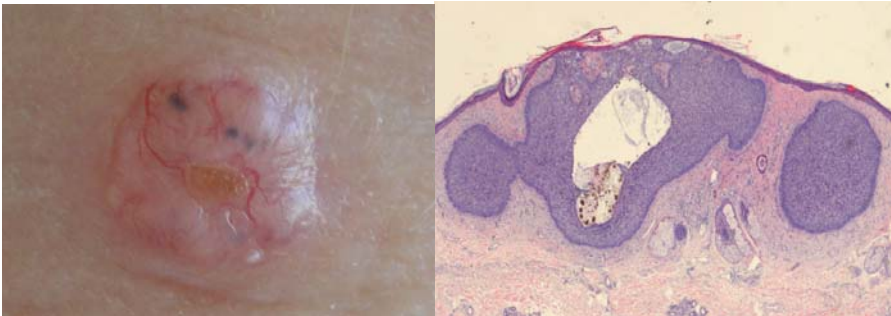


Figura 1 a y b: Aspecto clínico (a) e histológico (b) del carcinoma basocelular nodular

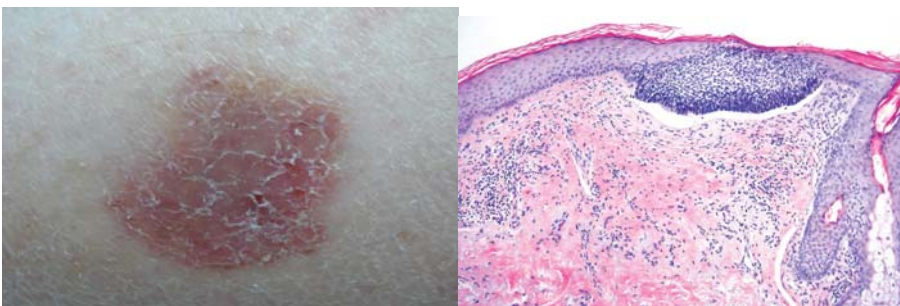


Figura 2 a y b: Aspecto clínico (a) e histológico (b) del carcinoma basocelular superficial

- El CBC micronodular no se puede distinguir a nivel clínico de la variante nodular clásica, pero histológicamente los islotes de células tumorales son menores y más uniformes que en el CBC nodular.
- El CBC infiltrante constituye más o menos un 5% de todos los CBC. Se localiza con frecuencia en cabeza y cuello de adultos mayores. El CBC infiltrante no tiene características morfológicas distintivas a nivel clínico, a menudo se parece a la forma nodular de CBC, pero a veces puede mostrarse como una placa o pápula plana de márgenes mal definidos, que

recuerda más a la forma esclerosante. La variante infiltrante se caracteriza por la presencia de pequeños islotes de células basaloides, irregulares y especulados, que invaden todo el espesor dérmico.

- El CBC de tipo esclerosante o morfea supone un 3% de los CBC. También se denomina CBC desmoplásico, fibrosante y de tipo cicatricial. Igual que el CBC infiltrante, este subtipo se desarrolla típicamente en la región de la cabeza y el cuello de pacientes ancianos. Se presenta como una pápula o placa plana o ligeramente elevada, indurada, de un color entre amarillo y blanco y que recuerda una cicatriz. Es frecuente la dificultad de distinguir los márgenes a nivel clínico. Histológicamente se caracteriza por la presencia de pequeños islotes de células basaloides, irregulares y especulados, que invaden todo el espesor dérmico, aunque en este caso el grosor de las trabéculas o cordones que se ramifican es de solo 1 ó 2 células y ellos determinan la disección de los haces de colágeno esclerótico de la dermis.

El comportamiento biológico de los CBC de tipo micronodular, infiltrante y esclerosante (tipo morfea) es más agresivo que el de las formas nodular o de extensión superficial. Estos tres tipos de “crecimiento agresivo” se caracterizan por un patrón de crecimiento infiltrativo con un límite mal definido. La reacción del estroma tiende a ser esclerótica más que fibrótica o mixoide. En estos tipos agresivos es más común la invasión perineural, que aparece en al menos el 3% de estos tumores. Los elementos histológicos que caracterizan a los CBC nodulares o de extensión superficial, como la formación de empalizadas periféricas de los núcleos o las hendiduras peritumorales, se advierten en menor medida en estos CBC más agresivos.

- El fibroepitelioma de Pinkus es una forma rara de CBC. Cursa como una pápula, placa o nódulo liso, sesil, en forma de cúpula o pediculado y de color rosado. Más frecuente en tórax y extremidades. El fibroepitelioma de Pinkus es una variante única de CBC con unos rasgos histológicos muy definidos. Se caracteriza por múltiples ramificaciones delgadas, alargadas y anastomosadas de células basaloideas, que se originan en la epidermis y se encuentran incluidas en el seno de un estroma laxo fibromixoide.

2- CARCINOMA EPIDERMOIDE *IN SITU*

El carcinoma epidermoide *in situ* es un carcinoma intraepidérmico que afecta a todo el espesor epidérmico e incluye entidades específicas como la enfermedad de Bowen y la eritroplasia de Queyrat. La mayor parte de los carcinomas epidermoides *in situ* son lesiones indolentes, que van creciendo de forma lenta durante años. A nivel clínico las lesiones de la enfermedad de Bowen se presentan muchas veces como placas descamativas solitarias, bien delimitadas y de color entre rosa y rojo intenso. Aunque pueden aparecer en cualquier lugar, suelen hacerlo en piel expuesta al sol. El subtipo denominado eritroplasia de Queyrat se origina en los genitales masculinos, típicamente a nivel del glande del pene en varones no circuncidados y a menudo guarda relación con la infección por el virus del papiloma humano.

Los criterios histopatológicos del carcinoma epidermoide *in situ* engloban la afectación de todo el espesor epidérmico por queratinocitos pleomórficos y la afectación del epitelio anexial. El grado de atipia a menudo es importante, con presencia de una marcada anaplasia y pérdida de la maduración de los queratinocitos de toda la epidermis. Se observan numerosas figuras de mitosis,

entre ellas algunas atípicas y anormales. La epidermis puede estar hiperplásica y tener aspecto psoriasiforme con crestas epidérmicas ensanchadas⁶⁻⁸.

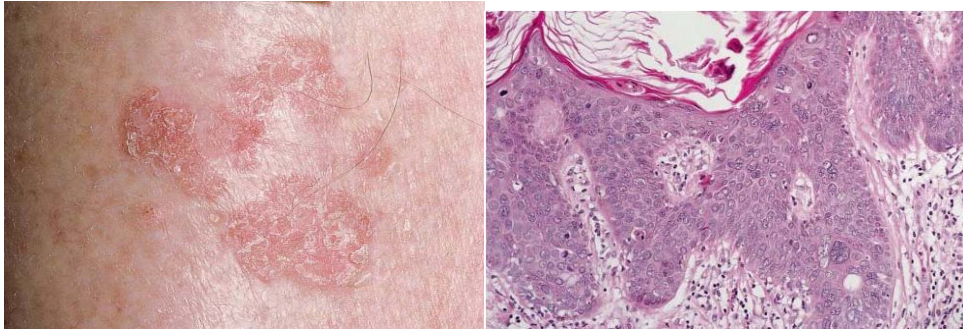


Figura 3 a y b: Aspecto clínico (a) e histológico (b) de la enfermedad de bowen

3- CARCINOMA EPIDERMOIDE (CEC)

El carcinoma escamoso o epidermoide es un tumor maligno originado en los queratinocitos de la epidermis y que tiene capacidad de metastatizar a los ganglios regionales o a distancia. Se origina con frecuencia sobre lesiones previas, llamadas lesiones precancerosas, dentro de estas lesiones incluimos la queratosis actínica, la queilitis actínica, la enfermedad de Bowen, la leucoplasia o la eritroplasia.

Clínicamente se presenta en forma de pápulas, placas o nódulos de color carnosos, rosados o rojos. Su superficie puede ser lisa, queratósica o ulcerada y la lesión puede ser exofítica o indurada. En algunos pacientes se producen síntomas como dolor o prurito. Estas lesiones suelen ser friables y pueden sangrar con mínimos traumatismos.

El CEC infiltrante inducido por la radiación UV (ultravioleta) suele aparecer en la región de la cabeza, el cuello y los brazos de los varones. El CEC relacionado con

la exposición a arsénico se produce sobre todo en las palmas y plantas, mientras que los asociados a la radiación ionizante afectan sobre todo a los márgenes de la zona expuesta.

Histopatológicamente encontraremos atipia de queratinocitos, con presencia de hiperchromasia, núcleos agrandados y de contornos irregulares, aumento en el número de nucleolos y figuras de mitosis irregulares. En los CEC bien diferenciados se reconoce queratinización citoplasmática por la presencia de perlas córneas y disqueratocitos aislados. En los CEC poco diferenciados e indiferenciados, la queratinización es escasa o no se produce, existe un mayor grado de atipia citológica, y se reconocen con facilidad figuras de mitosis. En algunos casos se tiene que realizar tinción de inmunohistoquímica para señalar queratinas.

La clasificación histológica del CEC propuesta por la Organización Mundial de la Salud contiene varias variantes^{6,9}: CEC con formación de cuerno cutáneo, CEC fusiforme, CEC acantolítico, CEC originado sobre enfermedad de Bowen, carcinoma verrucoso y carcinoma de tipo similar al linfoepitelioma. Otros subtipos histológicos son el CEC desmoplásico, el CEC adenoescamoso (productor de mucina) y el CEC quístico.

- En las formas más comunes de CEC infiltrante y CEC con cuerno cutáneo el cuadro histológico típico corresponde a islotes grandes o pequeños y/o hileras infiltrantes de queratinocitos atípicos de aspecto neoplásico que no tienen continuidad con la epidermis.
- El CEC fusiforme es una variante poco frecuente de CEC en la que los queratinocitos neoplásicos infiltran la dermis en forma de células sueltas de

núcleo alargado, en lugar de crear islotes o nidos cohesivos. La evidencia de queratinización es escasa o inexistente.

- Otra variante de CEC es la acantolítica (o adenoide), histológicamente el CEC acantolítico muestra un patrón arquitectural de tumor invasivo, con islotes que contienen focos pseudoglandulares, estructuras alveolares o tubulares y proyecciones papilares lumbales. Con frecuencia se reconocen queratinocitos neoplásicos disqueratósicos, que parecen flotar en estos espacios pseudoglandulares.
- En el carcinoma infiltrante que surge de una enfermedad de Bowen, en la epidermis y en el epitelio folicular se reconoce la histología típica de la enfermedad de Bowen, pero existen nidos de células atípicas similares que invaden la dermis sin continuidad con la epidermis.
- El carcinoma verrucoso es un CEC de bajo grado y consiste en un tumor expansivo de queratinocitos maduros y bien diferenciados sin atipia citológica significativa. La presencia de senos centrales rellenos de queratina y microabscesos epidérmicos se correlaciona con la presencia de depresiones en la lesión. El margen profundo de este tumor avanza de forma característica en un frente amplio, formando prolongaciones bulbosas con poca evidencia de infiltración.
- Microscópicamente el carcinoma cutáneo parecido al linfoepitelioma está constituido por hileras e islotes infiltrantes de células epiteliales pálidas sin conexión epidérmica ni anexial. Alrededor de ellas hay un denso infiltrado constituido por células plasmáticas y linfocitos, que pueden ocultar los islotes tumorales dérmicos.

- Otro subtipo de CEC con mayor riesgo de recidiva y metástasis es el CEC desmoplásico. Estos tumores suelen afectar al pabellón auricular y a nivel histológico se componen de cordones de queratinocitos neoplásicos infiltrantes en el seno de un estroma denso y esclerótico que representa al menos una tercera parte del tumor. Suele existir atipia citológica y es frecuente la invasión perineural.
- El CEC adenoescamoso o CEC productor de mucina tiene características citológicas de neoplasia de origen queratinocítico y también de neoplasia generada en el epitelio glandular. La arquitectura es como la del CEC habitual con presencia de nidos, islotes y cordones de células escamosas infiltrantes, que muestran con frecuencia puentes intercelulares y queratinocitos necróticos aislados. Además se observan espacios quísticos a modo de glándulas, con zonas de células productoras de moco.
- El CEC quístico afecta en mayor medida a ancianos y se localiza en las extremidades inferiores y el dorso de las manos. Aunque este subtipo se parece mucho al CEC común, la variante se define por la presencia histológica de grandes quistes intradérmicos llenos de queratina.

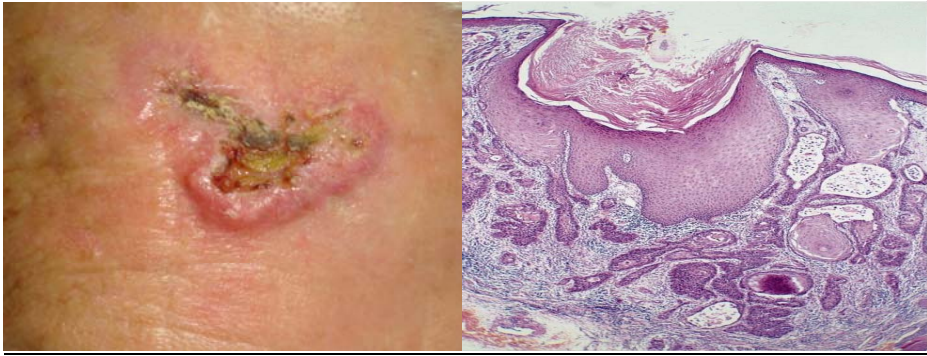


Figura 4 a y b: Aspecto clínico (a) e histológico (b) del carcinoma epidermoide

4- QUERATOACANTOMA

El queratoacantoma es una neoplasia epitelial muchas veces indistinguible de un carcinoma espinocelular a nivel clínico e histológico.

Históricamente se consideró un tumor benigno originado en el folículo piloso y que involucionaba de forma espontánea dejando cicatriz tras un periodo de entre cuatro y ocho semanas, después de haber tenido una etapa inicial de crecimiento rápido de pocas semanas. Actualmente la mayoría de los expertos consideran que el queratoacantoma es una variante de CEC, debido a su capacidad de destrucción local y metástasis, pero otros mantienen la idea histórica de que el queratoacantoma es una neoplasia distinta de naturaleza benigna por su capacidad de regresión espontánea⁶⁻⁸.

Si bien por lo general son lesiones únicas, se han descrito dos variedades de queratoacantomas múltiples¹⁰: los queratoacantomas autoinvolutivos de Ferguson-Smith y los queratoacantomas múltiples generalizados eruptivos de Gryzbowsky.

Clinicamente los queratoacantoma se presentan como nódulos con un centro crateriforme que contienen un tapón de queratina y es normal que midan más de 1 centímetro. Por lo general surgen en pacientes mayores, en regiones de piel expuesta al sol y con pelo. Sin embargo, también se han descrito en las áreas mucosas y subungueales, lo que sugiere que no siempre tienen origen folicular.

El queratoacantoma predomina en varones de raza blanca (2-3/1) y es menos frecuente que el resto de carcinomas espinocelulares (3-4/10). Surge con evidente predominio en piel expuesta al sol: cara, cuello, antebrazos y dorso de las manos.

El mecanismo patogénico todavía es un enigma. Sin duda intervienen las radiaciones ultravioletas solares, ya que casi el 90% de estos tumores surgen sobre intenso daño actínico, o en zonas tratadas con fotoquimioterapia o radioterapia superficial. Otras veces hay antecedentes de traumatismos mecánicos, heridas, etc. Las formas atípicas, eruptivas y múltiples, suelen ocurrir en pacientes inmunodeprimidos (leucemias, trasplantados...) o con incidencia familiar, involucrándose factores genéticos.

Casi siempre se trata de un tumor aislado, solitario, caracterizado por su peculiar historia natural, con tres fases:

-Fase inicial y de crecimiento rápido durante la que se forma una elevación hemisférica de color piel normal, rosada o roja, algo deprimida en el centro.

-Fase de estado: en tres-ocho semanas se constituye un tumor de varios centímetros de diámetro, cupuliforme o pediculado, a menudo lobulado, duro, desplazable con facilidad sobre los planos subyacentes a los que no se adhiere, con amplio cráter lleno de un tapón hiperqueratósico adyacente.

-Periodo de regresión: después de semanas o meses comienza el periodo de regresión aplanándose los bordes que pierden consistencia, y se desprende el tapón córneo.

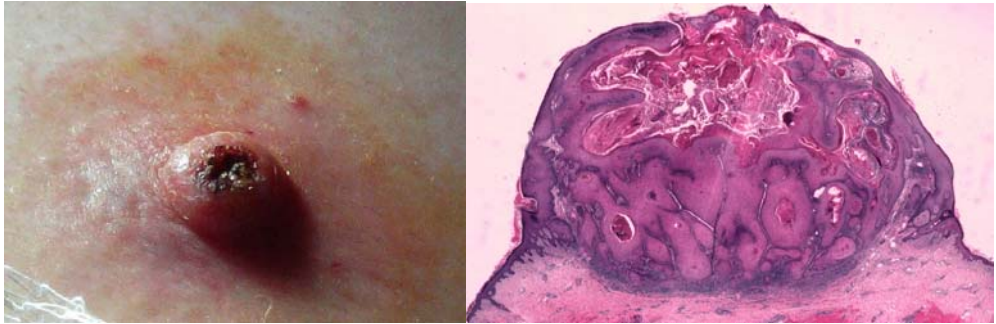


Figura 5 a y b: Aspecto clínico (a) e histológico (b) del queratoacantoma

La histopatología del queratoacantoma muestra una proliferación escamosa crateriforme con una zona central de hiperqueratosis compacta. La proliferación de queratinocitos está constituida por un epitelio hiperplásico con grados variables de maduración citológica, según el estadio en el que se biopsie la lesión. En la fase inicial proliferativa pueden reconocerse atipias citológicas y mitosis, algunas atípicas, aunque están limitadas al borde de queratinocitos periféricos en expansión. En la zona central del epitelio hiperplásico los queratinocitos muestran polaridad y orden madurativo conservado y tienen un citoplasma eosinófilo y vidrioso característico. Pueden advertirse microabscesos de neutrófilos intraepiteliales en las hileras de epitelio proliferativo, rodeadas por un infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos en la dermis. El queratoacantoma puede tener fenómenos de invasión perineural en la fase proliferativa.

Al madurar la lesión va disminuyendo la atipia citológica así como el tamaño del ribete proliferativo de queratinocitos basales. Se pueden observar perlas córneas y

también microabscesos intraepiteliales de neutrófilos. También es posible la presencia de nidos sueltos de queratinocitos, lo que dificulta más la distinción entre queratoacantoma y CEC. En la fase involutiva, el queratoacantoma se aplanan y los queratinocitos individuales se vuelven más pequeños.

II. EPIDEMIOLOGÍA

La estimación del riesgo de cáncer de piel en estos pacientes es difícil debido a la variabilidad de los estudios, tanto en la metodología como en la procedencia geográfica de cada población. La mayoría de estudios son retrospectivos y la procedencia de los datos depende de registros de tumores donde frecuentemente solo se recoge la incidencia de CEC (pues el CBC muchas veces está excluido de los registros por su mejor pronóstico y la posibilidad de tratamiento sin confirmación histológica). Además, con frecuencia se emplean diferentes variables estadísticas, difíciles de comparar entre sí. De las distintas series, las series australianas son las que presentan las cifras más elevadas de incidencia de CCNM tras trasplante renal, con una incidencia acumulada de cáncer cutáneo tras el trasplante del 45% a los 10 años y hasta del 82% por encima de los 20 años^{11,12}. Estudios europeos en Irlanda, los Países Bajos o el Reino Unido han descrito una incidencia acumulada en torno al 10-15% a los 10 años del trasplante^{3,13}. En la tabla I se muestra un resumen de las diferentes series publicadas hasta ahora.

En España se han publicado tres artículos al respecto durante el periodo 1995-2010. El estudio de *Marcén R et al*¹⁴ del Servicio de Nefrología del Hospital Ramón y Cajal incluye un total de 1029 pacientes trasplantados y presenta una prevalencia de cáncer de piel de 9,2% (95 tumores cutáneos), con una incidencia acumulada de cáncer de piel del 10% a los 10 años y del 18% a los 15 años del trasplante. Estas cifras son concordantes con los datos obtenidos en otras poblaciones europeas. El

estudio de *Fuente MJ et al*² de Barcelona del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, presenta una incidencia acumulada de cáncer cutáneo del 27% a los 6 años y de hasta el 48% a los 10 años del trasplante renal, con una prevalencia total de cáncer de piel del 25%, y en su mayoría son tumores múltiples (media de 3'6 tumores por pacientes). Este estudio tiene un diseño prospectivo en el que se recogen los datos de todos los tipos de cáncer de piel y lesiones displásicas en los pacientes trasplantados entre 1989-1999. Los autores de este estudio sugieren que la mayor incidencia de cáncer de piel en comparación con las publicaciones procedentes de países con latitudes similares, se podría deber a que el diseño de su estudio es prospectivo, mientras que muchos de los referenciados previamente son retrospectivos y dependen de la fiabilidad en la recogida de datos de la historia clínica. En el estudio de *Ferrández C et al*¹⁵ se analiza de forma prospectiva la incidencia de CCNM en 81 pacientes durante los tres primeros años del trasplante renal, con una incidencia acumulada del 18% a los tres años.

Tabla 1- Resumen de los datos epidemiológicos de los diferentes estudios publicados

Estudio/ año publicación	País	Nº pacientes	Prevalencia	Incidencia acumulada	Relación CBC/CEC	Otros datos
Keller B et al ¹⁶ 2010	Suiza	243	N.C	17'8% (10 años)	1:7	Ambiespectivo
Fekecs T et al ¹⁷ 2010	Hungría	116	9'5%	N.C	4:1	Retrospectivo
Marcén R et al ¹⁴ 2010	España	1029	9'2%	6%(5 años) 10%(10 años) 18%(15 años)	1:1	Retrospectivo Incluye CBC, CEC, S.Kaposi, melanoma
Ramsay HM et al ¹³ 2007	Reino Unido	269	N.C	3%(<5 años) 5'8%(5-10 años) 11%(>10 años)	1:1	Prospectivo (1998-2006)
Moloney FJ et al ³ 2006	Irlanda	1558	14%	12% (12 años)	N.C	Retrospectivo
Bordea C et al ⁵ 2004	Reino Unido	979	19'1%	9%(5 años) 27%(10 años) 43%(15 años)	1:3'2	Retrospectivo
Kasiske BL et al ¹⁸ 2004	EEUU	35765	N.C	2'3%(1 año) 7'5%(3 años)	N.C	Retrospectivo
Fuente MJ et al ² 2003	España	174	25%	13%(3 años) 27%(6 años) 48%(10 años)	1'4:1	Prospectivo (1989-1999)
Ramsay HM et al ¹¹ 2002	Australia	398	51'8%	29%(<5 años) 72%(10-20 años) 82%(>20 años)	1:2	Retrospectivo
Ramsay HM et al ¹⁹ 2000	Reino Unido	182	16'5%	5-6'5%(5-9 años) 10'5%(>10 años)	1:3'8	Prospectivo
Jensen P et al ²⁰ 1999	Noruega	2397	N.C	2%(5 años) 7%(10 años) 18%(20 años)	N.C	Retrospectivo Solo contabiliza CEC
Bouwes B. et al ¹² 1996	Australia	1098	32'7%	45%(11 años) 70%(20 años)	1:2'9	Retrospectivo (1969-1994)
Ferrándiz C et al ¹⁵ 1995	España	81	14'8%	18%(3 años)	3'1:1	Prospectivo
Hartevelt M. et al ²¹ 1990	Holanda	764	6'2%	10%(10 años) 40%(20 años)	1:3'6	Prospectivo (1966-1988)

N.C: no consta

III. FACTORES DE RIESGO IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE CÁNCER CUTÁNEO NO MELANOMA EN PACIENTES TRASPLANTADOS

Los estudios epidemiológicos han demostrado que en estos pacientes existe una asociación estrecha entre el desarrollo de tumores cutáneos no melanoma y diversos factores entre los más importantes: el tratamiento inmunosupresor, la exposición solar, las infecciones víricas, en concreto la infección por el virus del papiloma humano, la edad o factores genéticos e inmunológicos^{1,22,23}.

1- INMUNOSUPRESIÓN

La utilización de fármacos inmunosupresores tiene como finalidad prevenir o controlar la respuesta inmunológica del huésped contra el órgano trasplantado para conseguir la máxima supervivencia del injerto y del paciente, con la mejor calidad de vida. Actualmente disponemos de un auténtico arsenal de fármacos inmunosupresores que permite combinaciones potentes y selectivas.

El tratamiento inmunosupresor debe entenderse como un proceso dinámico, adaptándolo en cada momento según las características evolutivas del trasplante renal. En este contexto definimos un tratamiento de inducción, postrasplante inmediato, y un tratamiento de mantenimiento a largo plazo. Durante el periodo de inducción existe un mayor riesgo de rechazo agudo, por lo cual el tratamiento inmunosupresor deberá ser más potente e intenso. Posteriormente, el riesgo de rechazo agudo va disminuyendo, sin llegar nunca a desaparecer, y surgen nuevos elementos de riesgo para el paciente, como el rechazo crónico, la morbi-mortalidad cardiovascular y el desarrollo de cáncer.

1.1-PROTOCOLOS DE INMUNOSUPRESIÓN²⁴

TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN

Fase de máxima respuesta inmunológica, por lo que el tratamiento deberá ser potente e intenso para evitar el desarrollo de rechazo agudo. La combinación de fármacos inmunosupresores resulta esencial, pudiendo utilizar terapias de inducción con anticuerpos poli o monoclonales. En general se recomienda una triple terapia con esteroides+ inhibidores de la calcineurina+ micofenolato mofetil. La elección del inhibidor de la calcineurina dependerá de las características clínicas del paciente y de la experiencia clínica, siendo hoy más frecuente la utilización de tacrolimus que de ciclosporina. Las terapias de inducción con anticuerpos poli o monoclonales en forma de cuádruple terapia si bien anteriormente se restringían para pacientes con elevado riesgo inmunológico (hipersensibilizados o segundos trasplantes), la tendencia actual, desde 2009²⁵, es a utilizarlos siempre, recomendándose antagonistas del receptor de la IL-2 (basiliximab) en pacientes con bajo riesgo inmunológico, reservando los agentes depletors de linfocitos (muromonab-CD3 y anticuerpos policlonales) en pacientes de alto riesgo inmunológico.

TRATAMIENTO DE MANTENIMIENTO

El objetivo del tratamiento de mantenimiento es conseguir a largo plazo la máxima supervivencia del injerto con la mejor calidad de vida. El rechazo agudo deja de ser el principal problema en esta fase, aunque siempre es posible, siendo el rechazo crónico-nefropatía crónica del trasplante, la morbimortalidad cardiovascular y el desarrollo de cáncer los principales problemas que afrontamos en esta fase de mantenimiento. Durante la evolución del trasplante renal se debe intentar suprimir

y/o minimizar progresivamente los fármacos inmunosupresores que inciden negativamente en el desarrollo de estos procesos, y que condicionan de manera decisiva el futuro del trasplante renal. En primer lugar deberíamos plantear la supresión a medio plazo de los esteroides, por todos sus efectos adversos, especialmente las alteraciones óseas y los factores de riesgo cardiovascular (diabetes, hipertensión arterial y dislipemia). En segundo lugar se debería valorar la supresión y/o minimización del segundo fármaco inmunosupresor dependiendo de la situación clínica y funcional del trasplante. El objetivo final del tratamiento inmunosupresor de mantenimiento, en la mayoría de los pacientes, debería ser la monoterapia o la biterapia con dosis bajas de fármacos inmunosupresores buscando su sinergia inmunosupresora y un mejor perfil de seguridad. El fármaco inmunosupresor ideal en terapia de mantenimiento debería ser potente y específico, no ser nefrotóxico y no inducir factores de riesgo cardiovascular ni cáncer.

1.2- FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES

Los fármacos inmunosupresores se pueden clasificar según diversos criterios, mecanismo de acción, estructura química, momento postrasplante, perfil de seguridad, etc. Nosotros los clasificamos según su mecanismo de acción y estructura química en cinco grupos: 1) Corticoesteroides; 2) Inhibidores del calcineurina; 3) inhibidores mTOR (*mammalian target of rapamycin*); 4) inhibidores de nucleótidos 5) anticuerpos antilinfocitarios poli y monoclonales.

CORTICOESTEROIDES

La utilización de corticoesteroides en el trasplante de órganos se basa en su potente acción antiinflamatoria y en su capacidad inmunosupresora. El efecto antiinflamatorio es debido a su efecto sobre diversas estirpes celulares responsables de la inflamación como macrófagos-monocitos, neutrófilos, eosinófilos, células

endoteliales y fibroblastos, sobre las cuales bloquea la liberación de citocinas proinflamatorias, inhibe la proliferación celular y bloquea el reclutamiento celular. También ejercen un potente efecto antiinflamatorio bloqueando la síntesis de prostaglandinas proinflamatorias. Respecto a su acción inmunosupresora, no está completamente definida, aunque esencialmente suprimen la inmunidad celular mediada por linfocitos T al bloquear la síntesis de interleucina-2 y la activación celular antígeno-dependiente. Además inducen linfopenia periférica e inhiben la síntesis de anticuerpos de manera inespecífica. Por todos estos motivos, y a pesar de los efectos adversos asociados al tratamiento con corticoesteroides, su utilización está generalizada en el trasplante renal durante la terapia de inducción, valorando su progresiva eliminación durante la terapia de mantenimiento en los pacientes con una buena evolución y sin factores de riesgo inmunológicos para evitar los efectos secundarios de los corticoesteroides a largo plazo.

Indicaciones

Los corticoesteroides se emplean básicamente en inmunosupresión primaria (terapia de inducción y de mantenimiento) y en el tratamiento del rechazo agudo. En inmunosupresión primaria se utilizan siempre en combinación con otros fármacos (ciclosporina, tacrolimus, etc.) en régimen de doble o triple terapia o asociados a terapias de inducción con anticuerpos mono o policlonales en regímenes de cuádruple terapia. Constituyen la primera arma terapéutica en el tratamiento del rechazo agudo, administrados en forma de pulsos.

Modo de empleo

- Inmunosupresión primaria: se utilizan por vía endovenosa durante la primera semana postrasplante y posteriormente por vía oral. Habitualmente se emplea prednisolona o metilprednisolona en dosis de 0'25-1mg/kg/día, complementadas con una dosis intraoperatoria de 0'5-1 g. En los días siguientes se administran dosis

progresivamente decrecientes, hasta alcanzar los niveles de mantenimiento establecidos para cada paciente, que pueden oscilar entre 5-10 mg/día a los 3-6 meses postrasplante y 5 mg/día al final del año del trasplante. En pacientes seleccionados y a medio plazo se pretende la supresión total de los corticoesteroides.

- Rechazo agudo: se emplean dosis elevadas, generalmente en forma de pulsos endovenosos de 250-1.000 mg durante 3-5 días.

Efectos secundarios

Son innumerables y potencialmente graves. Los más destacados son: aumento de la susceptibilidad a las infecciones, obesidad, osteonecrosis aséptica de cabeza femoral, hiperglicemia, hipertensión arterial, dislipemia, úlcera péptica, hirsutismo y facies cushinoide. A largo plazo suele aparecer miopatía, osteoporosis, arterioesclerosis, cataratas y atrofia cutánea. En niños inducen retraso en el crecimiento estatural.

INHIBIDORES DE LA CALCINEURINA: CICLOSPORINA Y TACROLIMUS

La ciclosporina A y el tacrolimus son inhibidores de la calcineurina, con un mecanismo de acción común y con un perfil de seguridad similar.

La ciclosporina es un antibiótico aislado del hongo *Tolypocladium inflatum*. La biodisponibilidad de la forma oral es muy variable debido a su escasa solubilidad en agua. La composición de la solución clásica consiste en microgotas de aceite que contienen la mayor parte del fármaco en disolución. Para su digestión es imprescindible la presencia de bilis. La nueva formulación de ciclosporina en forma de microemulsión facilita la dispersión de las moléculas lipofílicas en el intestino y mejora sensiblemente la absorción, que es independiente de la bilis y

que no se ve interferida por los alimentos. De esta forma, se consigue una absorción más regular a lo largo del tubo digestivo alto y también más uniforme para cada paciente.

El tacrolimus es un macrólido, aislado a partir del hongo *Streptomyces tsukubaensis*. Se absorbe en el tracto digestivo alto, independientemente del flujo biliar.

Su mecanismo de acción fundamental se debe a la inhibición de la activación de los células T-CD4 en respuesta a los estímulos antigénicos. La ciclosporina y el tacrolimus inhiben la actividad calcio-dependiente de la calcineurina a través de la unión a inmunofilinas citoplasmáticas formando los complejos activos ciclosporina-ciclofilina y tacrolimus-FKBP. Estos complejos se unen a la calcineurina inhibiendo su actividad, la cual participa en el control de la transcripción de ácido ribonucleico (RNA) para la síntesis de citoquinas. En estas circunstancias la ciclosporina y el tacrolimus inhiben la síntesis de las interleucinas, en especial la interleucina-2, citosina principal en la activación linfocitaria. La ciclosporina además induce la formación de factor de crecimiento transformante - β (TGF- β).

Indicaciones

Se utilizan en inmunosupresión primaria (terapia de inducción y de mantenimiento), ajustando en cada caso y momento los niveles plasmáticos para conseguir el efecto inmunosupresor deseado y evitar la toxicidad asociada al fármaco. El tacrolimus se ha mostrado eficaz en algunos casos en el tratamiento del rechazo agudo corticorresistente e incluso en el rechazo refractario a otros tratamientos.

Modo de empleo

La ciclosporina y el tacrolimus se administran desde el primer día postrasplante, en combinación con otros fármacos inmunosupresores. En pacientes con necrosis tubular aguda es aconsejable retrasar su introducción algunos días, para facilitar la recuperación de la lesión tubular, ya que se ha demostrado que los inhibidores de la calcineurina retrasan la regeneración del epitelio tubular y prolongan el periodo de disfunción del injerto. Las dosis iniciales varían según el criterio de cada centro, el tipo de trasplante, las características de los pacientes y la inmunosupresión concomitante administrada.

- La dosis inicial de ciclosporina varía entre 8 y 12 mg/kg/día por vía oral, repartidos en dos tomas. La primera dosis se puede administrar por vía oral entre 2 y 6 horas antes del trasplante o en las 24 horas siguientes a la cirugía. Cuando la situación clínica del paciente lo requiera se puede administrar vía intravenosa, siendo la dosis una tercera parte de la administrada por vía oral. Debido a la variabilidad farmacocinética de la ciclosporina es necesario establecer una estrecha monitorización de los niveles sanguíneos. Los niveles de ciclosporina en sangre recomendados varían según el tiempo de evolución del trasplante. En general se recomienda entre 200 y 300 ng/dl en los primeros 3 meses y 100-200 ng/dl hasta el primer año postrasplante.

-La dosis inicial recomendada de tacrolimus es de 0'1-0'2 mg/kg/día dividida en dos tomas cada 12 horas. Se puede utilizar por vía intravenosa, para lo cual se recomienda administrar una quinta parte de la dosis oral equivalente. Los niveles sanguíneos recomendados son de 8-15 ng/ml durante el primer mes postrasplante, para posteriormente reducir los niveles a 5-10 ng/ml como terapia de mantenimiento.

La ciclosporina y el tacrolimus se metabolizan en el hígado por la misma vía enzimática mediante procesos de oxidación dependientes del citocromo p450. Este metabolismo es susceptible a la presencia de inductores e inhibidores que afectarán a la cinética de biotransformación y eliminación de ambos fármacos.

Efectos secundarios

El perfil de seguridad de los inhibidores de la calcineurina es similar, aunque existen algunas diferencias. En general la mayoría de los efectos adversos están relacionados con su mecanismo de acción y son dosis niveles dependientes. El principal efecto secundario de los inhibidores de la calcineurina es la nefrotoxicidad, que supone la principal limitación para su utilización.

-Nefrotoxicidad: se definen distintas variedades de nefrotoxicidad inducida por ciclosporina y tacrolimus.

a) Nefrotoxicidad aguda: suele estar relacionada con niveles elevados de los fármacos en sangre, y suele desarrollarse durante las primeras semanas postrasplante. Clínicamente se manifiesta por un deterioro agudo de la función renal, incluso con oliguria, acompañada de hipertensión arterial e hiperkaliemia. Supone un cuadro reversible al disminuir la dosis y los niveles de la ciclosporina o tacrolimus.

b) Nefrotoxicidad crónica: aparece como consecuencia de la exposición continuada y prolongada al fármaco. Clínicamente se manifiesta por una afectación progresiva e irreversible de la función renal. A nivel histológico se han descrito diversas lesiones, siendo las más características la arteriopatía hialina, la fibrosis intersticial en bandas y la presencia de atrofia tubular. A nivel tubular se puede observar vacuolización isométrica de las células epiteliales. Probablemente

tacrolimus tiene menos efecto nefrotóxico crónico que la ciclosporina, por una menor inducción en la síntesis de TGF- β .

c) Microangiopatía trombótica: es bastante infrecuente. Aparece en las primeras semanas postrasplante y clínicamente suele manifestarse en forma de anemia microangiopática (presencia de esquistocitos en sangre periférica, haptoglobina baja y elevación de reticulocitos) y alteración de la función renal. El mecanismo patogénico es probablemente por efecto tóxico de los inhibidores de la calcineurina sobre la célula endotelial.

d) Hipertensión y alteraciones electrolíticas: la ciclosporina induce hipertensión arterial en alrededor el 60% de los pacientes.

-Neurotoxicidad: relacionada directamente con el mecanismo de acción de la ciclosporina y tacrolimus, debido a la presencia de la enzima calcineurina a nivel cerebral. La neurotoxicidad es dosis y niveles dependientes. Las manifestaciones clínicas principales son la presencia de temblor, cefalea y mareo. Se han descrito cuadros neurológicos más severos, como convulsiones, encefalopatía, disartria, psicosis, etc., aunque actualmente son poco frecuentes. La mayoría de las series coinciden en que tacrolimus es más neurotóxico que la ciclosporina.

-*Diabetes mellitus*: tacrolimus y ciclosporina son tóxicos para la célula beta del páncreas, lo que contribuye al desarrollo de diabetes mellitus postrasplante. Este efecto es dosis dependiente y en general, se acepta que tacrolimus es más diabetogénico que ciclosporina.

-Carcinogénesis: sobre todo con la ciclosporina por su poder mutagénico e inducción de TGF- β ^{26,27}.

INHIBIDORES mTOR: SIROLIMUS y EVEROLIMUS

Sirolimus, macrólido obtenido a partir del hongo *Streptomyces hygroscopicus*, es el primer inhibidor mTOR desarrollado como inmunosupresor. Everolimus es un derivado de sirolimus con la sustitución de dos grupos hidroxilo en posición 40, desarrollado para tener una mejor biodisponibilidad oral, pero con algo menos de potencial inmunosupresor.

Su mecanismo de acción y perfil de seguridad son idénticos. Sirolimus desarrolla su actividad inmunosupresora a través de la inhibición de la señal específica para IL-2, inhibiendo la respuesta proliferativa a numerosos estímulos de los linfocitos B y T. Sirolimus se une a la misma ciclofilina que el tacrolimus, la FKBP, y a través de esta unión inhibe la enzima mTOR que bloquea la acción de la IL-2 y otros factores de crecimiento a través de dos vías: a) bloqueo de los procesos de traducción de fragmentos específicos de ARNm necesarios para la activación y proliferación celular y b) bloqueo de la síntesis proteica a nivel ribosomal. Por este doble bloqueo sirolimus detiene la activación del ciclo celular entre las fases G1 y S. Este efecto antiproliferativo no es específico de los linfocitos T y B, sino que también lo desarrolla sobre las células mesenquimales como fibroblastos, células endoteliales y musculares lisas.

Sirolimus se administra por vía oral, con una biodisponibilidad baja (20%) debido a un metabolismo activo a nivel gastrointestinal antes de alcanzar la circulación sistémica. Su vida media de eliminación es elevada (60 horas), lo que permite una administración única diaria.

Everolimus tiene una mejor biodisponibilidad intestinal y una menor vida media (36 horas), lo que condiciona la necesidad de su administración cada 12 horas. El

metabolismo es a nivel hepático por acción de las isoenzimas CYP450, siendo susceptible a la acción de inductores e inhibidores enzimáticos.

Indicaciones

Sirolimus se utiliza en inmunosupresión de mantenimiento, puede ser utilizado como terapia inmunosupresora de base (sin inhibidores de la calcineurina o en combinación con los mismos) o en sustitución de los inhibidores de la calcineurina en pacientes con toxicidad por los mismos, especialmente por neurotoxicidad y/o presencia de nefropatía crónica del trasplante. El cambio a sirolimus, previo tratamiento con inhibidores de la calcineurina, no se recomienda antes de los 6 meses después del trasplante (hasta que la función del injerto sea estable y las heridas quirúrgicas hayan sanado).

Modo de empleo

Sirolimus se puede administrar en combinación con los inhibidores de la calcineurina o en terapia libre de calcineuríticos, en combinación con micofenolato. La administración es siempre por vía oral. Se recomienda no administrarlo en el postoperatorio inmediato para evitar efectos secundarios relacionados con su actividad antiproliferativa y problemas de cicatrización de la herida quirúrgica. Las dosis utilizadas en trasplante renal oscilan entre 2 y 5 mg/día, administradas en una sola toma por vía oral, siendo los niveles plasmáticos óptimos entre 8-12 ng/ml. Las dosis de everolimus son similares, recomendando iniciar con 1-3 mg/día (en dos tomas), para alcanzar unos niveles plasmáticos entre 4-8 ng/ml.

Efectos secundarios

La principal aportación de los inhibidores mTOR es su potencial inmunosupresor con riesgo mínimo de nefrotoxicidad, a diferencia de los inhibidores de la calcineurina. El principal efecto adverso de sirolimus y everolimus es la inducción

de dislipemia, especialmente hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Este efecto secundario es dosis dependiente y controlable con fármacos hipolipemiantes. Otro efecto adverso es la presencia de una moderada mielotoxicidad, en forma de trombopenia, leucopenia y anemia macrocítica. Otros efectos secundarios menos frecuentes son incremento de la proteinuria después de la conversión por inhibidores de la calcineurina, linfocitos postrasplante, problemas en la cicatrización de la herida quirúrgica, edemas y anemia.

INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS: AZATIOPRINA Y MICOFENOLATO MOFETIL

AZATIOPRINA

La azatioprina es el derivado 5-imidazólico de la 6-mercaptopurina (6-MP), que reacciona con compuestos sulfhidrilo no enzimáticamente, lo que permite una liberación lenta de 6-MP, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos y obstaculizando la actividad proliferativa de los clones de linfocitos T y B, una vez activados por la IL-2. La azatioprina representa uno de los primeros inmunosupresores introducidos en la clínica del trasplante de órganos, aunque hoy en día su utilización está prácticamente en desuso, por la existencia de fármacos más potentes, selectivos y con un mejor perfil de seguridad. Se absorbe rápidamente por vía oral con una biodisponibilidad del 85-90% siendo su metabolismo básicamente hepático y un pequeño porcentaje por vía renal.

Indicaciones

La azatioprina se utiliza en inmunosupresión primaria de inducción y de mantenimiento en asociación con otros fármacos inmunosupresores. Actualmente su utilización está restringida a pacientes crónicos, de años de evolución, que

inicialmente fueron tratados con este fármaco. En trasplantes –de novo- su uso se limita a pacientes con alergia y/o intolerancia a los otros fármacos inmunosupresores.

Modo de empleo

El metabolismo de la azatioprina es idiosincrásico, dependiendo de los niveles en sangre de tío purina metil transferasa (TPMT). La determinación de TPMT orienta sobre la dosis inicial adecuada para cada paciente.

La dosis inicial suele ser de 1'5-2 mg/kg/día en una sola toma y por vía oral. En el postoperatorio inmediato puede administrarse también vía endovenosa (misma dosis). Después de los primeros meses de evolución se recomienda disminuir la dosis a 1-1'5 mg/kg/día.

Efectos adversos

El principal efecto secundario de la azatioprina es su mielotoxicidad, dosis dependiente, y que generalmente se manifiesta en forma de neutropenia y con menor frecuencia trombopenia. La administración conjunta con alopurinol, inhibidor de la xantina oxidasa, está contraindicada al interferir el alopurinol en el metabolismo de la azatioprina y aumentar su actividad y mielotoxicidad. También se han descrito casos de anemia megaloblástica y un componente de hepatotoxicidad. La azatioprina favorece el desarrollo de procesos tumorales, especialmente el cáncer cutáneo²⁸.

MICOFENOLATO MOFETIL Y ACIDO MICOFENOLICO

El micofenolato mofetil ha sustituido completamente a la azatioprina en la terapia inmunosupresora en trasplante de órganos, por su mayor potencial y mejor perfil de seguridad. El profármaco micofenolato mofetil (MMF) es un derivado

semisintético del ácido micofenólico (MPA), que es su principio activo. El MPA deriva de un producto de la fermentación de un hongo del género *Penicillium*. El ácido micofenólico con recubrimiento entérico es un nuevo preparado inmunosupresor, de acción farmacológica y perfil de seguridad idéntico al mofetil-micofenolato.

El MPA es un potente inhibidor reversible selectivo y no competitivo de la enzima inosín-monofosfato-deshidrogenasa (IMPDH). Esta enzima tiene un papel fundamental en la síntesis de novo de los purín-nucleótidos, de la cual depende específicamente la proliferación de los linfocitos T y B. Dada la escasa absorción del MPA se ha sintetizado su éster, el profármaco micofenolato mofetil, cuya absorción es prácticamente completa. El micofenolato mofetil se transforma rápida y completamente por un proceso de metabolización a MPA. Éste se metaboliza en el hígado formándose el glucorónido correspondiente (MPAG), sin actividad farmacológica, que se eliminará por vía biliar reabsorbiéndose nuevamente y constituyendo un ciclo enterohepático. El MPA se elimina principalmente (96%) por vía renal.

Indicaciones

La indicación principal del micofenolato mofetil es como terapia de inducción y mantenimiento en combinación con otros inmunosupresores, como inhibidores de la calcineurina (ciclosporina y tacrolimus) o inhibidores de mTOR (sirilimus). El micofenolato mofetil es muy eficaz en la prevención del rechazo agudo, aunque también se ha mostrado eficaz en algunos casos en el tratamiento del rechazo agudo refractario e incluso podría tener un papel importante en la prevención del rechazo crónico.

Modo de empleo

Está indicado como fármaco coadyuvante de otros inmunosupresores, como ciclosporina, tacrolimus o sirolimus. La dosis habitual inicial es de 1'5-3 g/día, por vía oral y repartido en 2 o 3 tomas, con unos niveles plasmáticos entre 2-4 ng/ml. Durante el curso postrasplante se pueden reducir progresivamente las dosis de micofenolato mofetil dependiendo de la eficacia y tolerancia del fármaco. En pacientes con insuficiencia renal es necesario reducir las dosis para evitar problemas de toxicidad.

Efectos secundarios

El principal efecto adverso del micofenolato mofetil y del ácido micofenólico son las alteraciones gastrointestinales como dolor abdominal, náuseas, vómitos y especialmente diarrea, y la toxicidad medular en forma de anemia, leucopenia o trombocitopenia. Son efectos secundarios dosis dependientes que mejoran reduciendo la dosis. Las dosis elevadas de micofenolato mofetil se han relacionado con una mayor incidencia de infecciones oportunistas.

ANTICUERPOS ANTILINFOCITARIOS MONO O POLICLONALES

Los anticuerpos antilinfocitarios mono o policlonales son productos biológicos dirigidos contra proteínas de superficie de la membrana linfocitaria, para bloquear de manera intensa y temporal la respuesta inmunológica. Su indicación es la prevención del rechazo agudo en inmunosupresión de inducción y el tratamiento del rechazo agudo corticorresistente.

ANTICUERPOS MONOCLONALES (muromonab-CD3 y basiliximab)

Las principales ventajas de los anticuerpos monoclonales frente a los policlonales son la pureza del producto, al no contener anticuerpos antiplaquetarios o antieritrocitarios, y la homogeneidad del producto, que evita variabilidades entre diferentes lotes.

MUROMONAB-CD3

Constituye el primer anticuerpo monoclonal antilinfocitario disponible en el mercado en la prevención y tratamiento del rechazo agudo. Actualmente, debido a la existencia de otros anticuerpos mono y policlonales más potentes y selectivos y con mejor perfil de seguridad, el muromonab-CD3 prácticamente ha dejado de ser utilizado en trasplante renal.

Mecanismo de acción

Anticuerpo monoclonal de origen murino que reacciona contra el complejo CD3/TCR, proporcionando un efecto de bloqueo en la generación y funcionalismo de las células T maduras. Las células T son lisadas y secuestradas por el sistema retículoendotelial, desapareciendo de la sangre periférica.

Indicaciones

1-Prevención del rechazo agudo como tratamiento de inducción. Especialmente indicado en receptores hiperinmunizados y en la prevención de la necrosis tubular aguda (donante de edad avanzada, isquemia fría prolongada, donante en asistolia).

2-Tratamiento del rechazo agudo. Especialmente en el rechazo agudo severo o corticorresistente.

Modo de empleo

La dosis habitual es de 5 mg/día (2'5 mg/día en pacientes pediátricos) durante 5-10 días. Se administra en forma de inyección intravenosa, que se infunde durante un minuto. Para prevenir el síndrome de liberación de citocinas se recomienda administrar concomitantemente dosis elevadas de corticosteroides y/o antihistamínicos.

Efectos secundarios

El más característico es el síndrome de liberación de citocinas que aparece tras la administración de la primera dosis y que está relacionado con la masiva liberación de TNF- α , IL-1 y interferón- γ . Suele manifestarse con fiebre, escalofríos, artromialgias, cefalea, vómitos y diarrea. En casos más graves se han descrito reacciones meníngeas, broncoespasmo y edema pulmonar. Existe un elevado riesgo de infección por gérmenes oportunista (CMV, Aspergillus, etc.) coincidiendo con su administración, por lo que se recomienda tratamientos profilácticos. También se ha descrito un mayor riesgo de neoplasias, sobre todo trastornos linfoproliferativos^{29,30}.

BASILIXIMAB

Anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad α del receptor de la IL-2 (antígeno CD25). Su utilización está especialmente indicada en la prevención de los episodios de rechazo agudo en el postrasplante inmediato, en pacientes con un riesgo inmunológico moderado. Su principal ventaja es su buena tolerancia clínica, no aumentando el riesgo de infecciones oportunistas. Se han descrito algunas reacciones alérgicas secundarias a su administración endovenosa.

El Basiliximab es un anticuerpo quimérico de origen murino, formado por IgG1k dirigida contra la cadena α del receptor de IL-2. Se administran únicamente dos dosis: en el momento del trasplante y el 4º día postrasplante (20 mg iv). Se tolera bien sin efectos secundarios importantes.

Anticuerpos ANTILINFOCITARIOS POLICLONALES

Los diferentes anticuerpos policlonales se distinguen entre sí por el tipo de material empleado para la inmunización (células tímicas o linfoblastos) y el animal al que se aplican (caballo, conejo). El suero obtenido de los animales inmunizados se somete a diversos procedimientos de purificación, con el fin de evitar la presencia de anticuerpos cruzados contra otros elementos (plaquetas, eritrocitos) obteniéndose un preparado rico en inmunoglobulinas. Están constituidos por IgG dirigidas contra diversos antígenos de superficie de las células T, con un mecanismo de acción basado en la depleción de linfocitos y en el bloqueo de su función. El principal inconveniente de estos productos es la falta de homogeneidad en la concentración de inmunoglobulinas entre los distintos tipos de preparado y también entre lotes de un mismo tipo de productos. Con el fin de ajustar la dosis a la respuesta individual, es aconsejable monitorizar el recuento de linfocitos y las subpoblaciones linfocitarias.

Mecanismo de acción

Presentan un mecanismo de acción múltiple: 1) Depleción de linfocitos (eliminación de las células diana); 2) Estimulación de mecanismos inmunorreguladores que redireccionan la respuesta celular, transformando la célula T activada con capacidad alodestructiva en tolerante.

Indicaciones

1- Prevención del rechazo agudo (tratamientos de inducción). Están especialmente indicados en receptores de riesgo inmunológico alto (hiperinmunizados y segundos trasplantes) y en la prevención de la necrosis tubular aguda en pacientes de riesgo.

2- Tratamiento del rechazo agudo corticorresistente. Constituyen el segundo escalón terapéutico en el tratamiento del rechazo agudo en casos de rechazo corticorresistente.

Modo de empleo

La dosificación depende del producto utilizado.

-Cuando se utiliza globulina de caballo (ATGAM®) la dosis suele oscilar entre 10-15 mg/kg por día.

-Con globulina de conejo (Timoglobulina®) la dosis suele variar ente 1'5-5 mg/kg/día.

La duración del tratamiento oscila entre 7 y 14 días. Se utilizan en infusión intravenosa lenta (4-6 horas) diluido en solución salina. El recuento de células T absolutas en un método eficaz para ajustar la dosis.

Efectos secundarios

Los efectos secundarios pueden deberse a fenómenos de intolerancia o a un efecto inmunosupresor excesivo. Se deben administrar de forma lenta (6-8 horas) a través de un cateter venoso central y diluidos en suero salino o glucosado.

Puede aparecer fiebre elevada y escalofríos y fenómenos de anafilaxia, especialmente en relación a las primeras dosis. Debe monitorizarse el recuento de plaquetas y leucocitos y suspender temporalmente el tratamiento si descienden por debajo de 50.000/mm o 2.500/mm, respectivamente. Existe un elevado riesgo de

infección por gérmenes oportunistas a corto plazo, por lo que se recomienda administrar tratamientos profilácticos, y de neoplasias a medio y largo plazo^{31,32}.

1.3-INMUNOSUPRESORES COMO FACTORES DE RIESGO DE CANCER CUTÁNEO

Existen múltiples estudios que determinan el papel etiopatogénico de la terapia inmunosupresora en la aparición de cáncer cutáneo en pacientes trasplantados. Existe controversia si más que el tipo de agente inmunosupresor utilizado, están más implicados en la patogenia de estos tumores la intensidad y duración de la inmunosupresión.

FARMACOS INMUNOSUPRESORES

Los fármacos inmunosupresores utilizados han variado a lo largo del tiempo. Al inicio de los años 70 los primeros trasplantes se mantuvieron gracias al uso de prednisona, azatioprina y ciclofosfamida. Posteriormente se introdujo la ciclosporina y desde los años 90 se usan nuevas moléculas con un mejor perfil farmacológico como el micofenolato –mofetil, tacrolimus y posteriormente los inhibidores mTOR: rapamicina, también llamado sirolimus y su análogo, la hidroxi-etil rapamicina (everolimus). Estos últimos, son responsables de una verdadera revolución en el campo de los trasplantes y en oncología.

Algunos autores sugieren un mayor riesgo asociado al uso de azatioprina y ciclosporina, ya que ambas drogas además de inmunosupresoras son mutagénicas. El tratamiento con azatioprina fotosensibiliza la piel humana a la radiación UVA. El ácido desoxirribonucleico (ADN) de la piel de los pacientes que reciben dosis terapéuticas de azatioprina contiene 6-tioguanina, lo que provoca fotosensibilidad

cutánea y fotocarcinogénesis acelerada²⁸. Se ha demostrado que la ciclosporina, mediante un aumento del TGF- β , induce la progresión del cáncer de piel interfiriendo en los mecanismos de reparación del ADN dependientes de p53^{22,23}.

La experiencia que existe hasta ahora respecto al uso de los inhibidores mTOR en pacientes trasplantados demuestra que el riesgo asociado a desarrollar neoplasias malignas es inferior a los tratamientos inmunosupresores previos. A sus propiedades inmunosupresoras debemos de añadir sus cualidades antitumorales y antiangiogénicas³³⁻⁴².

El papel potencial de la rapamicina como agente antiangiogénico ofrece una alternativa terapéutica en la progresión del sarcoma de kaposi en pacientes trasplantados, donde las estrategias anteriores incluían la reducción o suspensión de la terapia inmunosupresora. Así sirolimus se ha convertido en una de las principales opciones para el tratamiento de sarcoma de kaposi en pacientes trasplantados al demostrarse la mejoría o resolución de las lesiones al asociar este fármaco⁴³.

Varios ensayos prospectivos están en curso para evaluar los posibles efectos antineoplásicos de los inhibidores de mTOR en el cáncer de piel en pacientes trasplantados.

Asimismo, existen estudios que asocian el desarrollo de CCNM al tratamiento con anticuerpos mono/policlonales en el tratamiento de inducción^{31,32}.

INTENSIDAD Y DURACIÓN DE LA INMUNOSUPRESIÓN

Los regímenes inmunosupresores mantenidos largo tiempo y combinando varias drogas se asocian a un mayor riesgo de cáncer de piel.

Varios estudios^{38,44} han demostrado que los pacientes que reciben triple inmunosupresión (por ejemplo ciclosporina, prednisona o azatioprina o sirolimus) tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de piel en comparación con los que reciben dos fármacos (por ejemplo prednisona y azatioprina o sirolimus).

Diferentes centros de trasplantes han estudiado estrategias de minimización de la inmunosupresión para reducir la incidencia de tumores malignos cutáneos en pacientes seleccionados⁴⁵. En un estudio⁴⁶ compararon los beneficios a largo plazo de monoterapia con inhibidores de la calcineurina con respecto a la incidencia de cáncer de piel en comparación con bi o triterapia. En el grupo de monoterapia se observó una mayor supervivencia del injerto así como una reducción significativa en la incidencia de cáncer de piel después de 12 años postrasplante. Los autores concluyeron que la monoterapia con inhibidores de la calcineurina debía ser considerada un régimen beneficioso y seguro reduciendo la incidencia de cáncer de piel en determinados pacientes, pero a pesar de esta evidencia, los regímenes de terapia triple siguen siendo una práctica habitual.

2- EXPOSICIÓN SOLAR Y FOTOTIPO

Al igual que ocurre en la población general, la incidencia de carcinoma cutáneos en los pacientes trasplantados varía en función de la latitud del país, siendo más frecuentes en países con climas más cálidos, lo que demuestra la clara participación de la exposición solar en la etiopatogenia del CCNM^{1,2,5}.

La mayor parte de estos tumores aparecen en áreas de piel fotoexpuesta y la incidencia de los mismos es mayor en pacientes trasplantados con exposición solar elevada^{2,22}.

Además la tasa de aparición de CCNM disminuye si los pacientes adoptan prácticas para protegerse del sol^{47,48}.

TIPO DE PIEL

Pacientes con fototipo de piel Fitzpatrick I a III tienen más riesgo de desarrollar cáncer de piel al estar menos protegidos a las radiaciones UV¹⁹.

3- VIRUS

Los virus son los principales agentes infecciosos asociados al cáncer en humanos. La influencia del virus del papiloma humano en el desarrollo de carcinomas cutáneos es un tema controvertido que ha motivado la realización de numerosos estudios en las últimas décadas.

4- EDAD

Al igual que ocurre en la población general, la edad también ha demostrado ser un factor de riesgo importante para el desarrollo de los carcinomas cutáneos en pacientes trasplantados.

En los pacientes de edad avanzada existe una mayor incidencia de cáncer de piel frente a los pacientes más jóvenes.

Según *Weed M et al*⁴⁹, la mitad de los pacientes que recibieron el trasplante a partir de los 60 años desarrollaron al menos un carcinoma cutáneo en los primeros 12

años tras el trasplante y esta cifra se redujo al 6% cuando los pacientes recibieron el trasplante entre los 18 y 40 años.

Otros estudios remarcan la diferencia en la rapidez de aparición del cáncer de piel entre los receptores del trasplante de más de 50 años en comparación con los menores de 50 años. Así en el estudio de *Euvrard S et al*⁵⁰ el tiempo medio de latencia entre el trasplante y el primer tumor cutáneo fue de 8 años en pacientes trasplantados antes de los 40 años, mientras que los trasplantados después de los 60 años desarrollaron tumores en menos de 3 años.

La menor eficacia del sistema inmunológico con la edad, el estado de inmunosupresión y la radiación UV acumulada con el paso de los años pueden explicar estos hechos.

5- FACTORES INMUNOLÓGICOS

Algunos estudios sugieren que determinados factores inmunológicos pueden tener un cierto papel en la desarrollo de carcinomas cutáneos en pacientes trasplantados.

El complejo mayor de histocompatibilidad contiene un gran número de genes polimorfos que codifican antígenos de clase I (HLA-A, B y C) y antígenos de clase II (HLA-DR, DQ y DP). La importancia de la coincidencia de los antígenos HLA para la supervivencia del injerto renal está bien establecida⁵¹. Según algunos estudios estos antígenos también tendrían un papel importante en la defensa del huésped contra el desarrollo y diseminación de tumores. En el estudio de *Bouwes et al*⁵² el riesgo de carcinoma de células escamosas se incrementó en los receptores no coincidentes de los antígenos HLA-B. En este estudio, el riesgo relativo de aparición de CEC fue de 2'6 y 5 con desajuste de uno o dos antígenos HLA-B,

respectivamente, en comparación con ningún desajuste. Los desajustes de HLA-A y HLA-DR no tuvieron ningún efecto sobre el riesgo de aparición de CEC y no hubo asociación entre los desajustes de cualquier loci HLA y la aparición de carcinoma basocelular.

En otros estudios⁵³ se observó que la ausencia de HLA-A11 en los receptores de trasplante renal se asociaba con mayor frecuencia a cáncer cutáneo, hallazgo éste que sugería un papel protector del HLA-A11 en la aparición de tumores. Al mismo tiempo encontraron una asociación positiva entre HLA-B27 y HLA-DR7 y aparición de tumores. Sin embargo en otros estudios⁵⁴ no se confirmaron estas asociaciones.

6- TIPO DE ÓRGANO TRASPLANTADO

La mayoría de estudios^{55,56} consideran que en el trasplante cardíaco existe mayor riesgo de desarrollar CCNM que en el trasplante renal. Estas diferencias podrían explicarse por la mayor edad de los receptores o el mayor grado de inmunosupresión en el trasplante cardíaco. Los receptores de trasplante hepático parecen tener menor riesgo de CCNM⁵⁷.

7- SEXO

La mayoría de estudios no encuentran diferencias en la incidencia de CCNM entre hombres y mujeres⁵⁸. Algunos estudios²³ muestran una mayor predisposición del hombre frente a la mujer a desarrollar carcinoma cutáneo, aunque sin alcanzar significación estadística. Esto podría explicarse por una mayor frecuencia de actividades al aire libre en la población masculina, pero estos estudios no son concluyentes al respecto.

8- TIEMPO DE DIÁLISIS PRETRASPLANTE

Para algunos autores el tiempo de diálisis pretrasplante podría estar relacionado con el aumento del cáncer cutáneo, aunque tampoco hay estudios concluyentes al respecto^{59,60}.

9- OTROS

COFACTORES MOLECULARES

El gen p53 es el gen más frecuentemente mutado en los cánceres de piel. El gen p53 se sitúa en el brazo largo del cromosoma 17 y contiene 11 exones. La capacidad de p53 de inducir apoptosis resulta fundamental para su función como gen supresor de tumores. Mutaciones en el gen p53 han sido comúnmente detectadas en pacientes trasplantados y pueden servir como un buen indicador de riesgo de cáncer cutáneo¹.

Al mismo tiempo también se han reportado mutaciones en los genes PTCH a través de la vía de señalización “*Hedgehog*” en el carcinoma basocelular⁶¹.

VORICONAZOL

El voriconazol es un medicamento antimicótico aprobado para el tratamiento de la aspergilosis invasiva en receptores de trasplantes.

Aunque no existe suficiente evidencia para considerar esta droga un factor de riesgo de cáncer de piel, recientemente se han publicado varios trabajos que sugieren su implicación en el desarrollo de cáncer cutáneo y lesiones displásicas en pacientes inmunosuprimidos. Así, *Cowen et al*⁶² describe una serie de 8 pacientes inmunosuprimidos en tratamiento crónico con voriconazol, que en un tiempo muy

breve desarrollaron signos de daño actínico, múltiples lentigos y efélides, queratosis actínicas y un total de 51 carcinomas epidermoides. Una publicación⁶³ que se refiere a un caso aislado, presenta un paciente renal que a los 18 meses de recibir tratamiento continuado con voriconazol desarrolló una reacción fototóxica que coincidió temporalmente con la aparición de múltiples queratosis actínicas. A los pocos meses de la reacción cutánea se detectó un carcinoma espinocelular en la región temporal de rápido crecimiento, con invasión perineural y de los ganglios linfáticos y metástasis parotídeas. Es importante reseñar que el inicio de estas lesiones displásicas y de cáncer de piel se asocia con el antecedente del desarrollo de una reacción fototóxica, por lo que es necesario el seguimiento estrecho de estos pacientes inmunosuprimidos que reciben voriconazol especialmente si desarrollan esta reacción fototóxica.

PACIENTES CON ANTECEDENTES DE LEUCEMIA O LINFOMA

Los pacientes con antecedentes de linfoma o leucemia antes o después del trasplante tienen un riesgo adicional de desarrollar cáncer de piel en el periodo postrasplante⁶⁴.

TRATAMIENTOS PREVIOS CON BIOLÓGICOS/PUVA

Los tratamientos biológicos y la fototerapia pueden predisponer al desarrollo de CCNM postrasplante.

Los pacientes con psoriasis tratados con PUVA (fotoquimioterapia con psoraleno y radiación ultravioleta A) tienen mayor riesgo de CCNM, debido al poder mutagénico e inmunosupresor del PUVA⁶⁵. Además existen estudios⁶⁶ que demuestran una mayor prevalencia del virus del papiloma humano en los pacientes tratados con PUVA, lo cual podría aumentar el riesgo de CCNM en estos pacientes.

IV. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

1- ESTRUCTURA DEL VIRUS

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a la familia de virus *Papillomaviridae*. Anteriormente, compartían familia los papilomavirus y los poliomavirus formando la familia *Papoviridae* debido a que ambos compartían las características de poseer un genoma circular de ADN de doble cadena y tener una cápside icosaédrica sin envoltura. Sin embargo, con las nuevas técnicas de secuenciación del genoma, se ha demostrado que estas similitudes son superficiales y que existen diferencias suficientes para considerarlos dos familias de virus diferentes. Los papilomavirus son pequeños virus de ADN circular encapsulado de escasamente 8.000 pares de bases. Su estructura, esquematizada en la figura 6, es compartida por los más de 100 tipos de VPH secuenciados hasta la fecha y consta de varios genes de dos tipos diferentes: hasta ocho genes de expresión temprana o “*early*” (E1-E8), cuya expresión se traduce en proteínas implicadas en la regulación y replicación viral, y 2 genes de expresión tardía o “*late*” (L1, L2) cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cubierta viral, la cápside^{67,68}. Una región de control, denominada “*long control region*” (LCR), será la encargada de controlar la expresión de los genes tempranos E6 y E7. En la tabla 2 se esquematiza la función de las principales proteínas del VPH.

Mientras que los genes de expresión temprana difieren notablemente en su secuencia entre los diferentes tipos de VPH, los genes de expresión tardía presentan notables similitudes entre ellos. Esta peculiaridad convertirá a estos genes, especialmente a L1, en la diana principal de la detección de ADN viral.

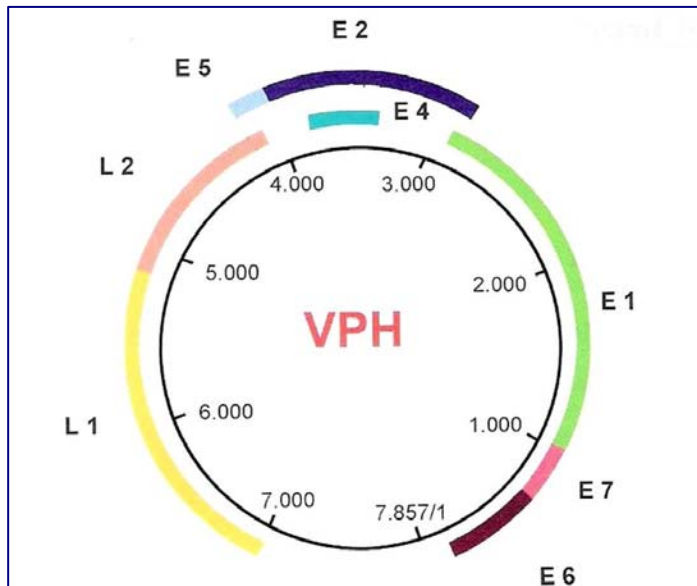


Figura 6. Estructura genómica del VPH

Tabla 2- Funciones de las proteínas “Early” y “Late”^{67,68}

PROTEINA	FUNCIONES
E1	Inicia replicación
E2	Transcripción, colabora con la E1 en la replicación. Reprime la expresión de E6 y E7
E4	Involucrada en la maduración de los viriones y en la salida de la célula
E5	Estimula proliferación de queratinocitos
E6	Coopera con E7 para inmortalizar los queratinocitos. Se une a p53
E7	Coopera con E6 en la inmortalización de los queratinocitos Se une a la proteína del gen Rb
L1	Proteína mayor de la cápside
L2	Proteína menor de la cápside

2- CLASIFICACIÓN DE LOS VPH

El virus del papiloma se conoce internacionalmente como *HPV*, aunque en castellano se emplea la abreviatura VPH respetando la gramática de nuestro idioma. Todos los tipos de VPH se caracterizan por ser epiteliotropos. Clásicamente⁶⁹ se han dividido en mucosos, cutáneos o asociados a epidermodisplasia verruciforme (EV). La introducción de las nuevas técnicas de biología molecular ha supuesto un cambio en la nomenclatura del VPH. De acuerdo con la actual clasificación taxonómica⁷⁰, la familia *Papillomaviridae* está compuesta por 16 géneros, que se identifican con las letras griegas (figura 7, tabla 3). Cada género incluye una o varias especies, que van numeradas, y dentro de las especies encontramos los tipos, subtipos y variante. El género engloba las especies con una homología de secuencia del gen L1 superior a un 60%. La especie incluye los tipos que comparten más de un 70% de secuencia en la región L1. Dentro de cada especie se incluyen los tipos virales. Los diferentes tipos virales de una misma especie comparten entre un 71-89% de secuencia en la región L1. Un grado de homología de un 90% hasta un 98% define un subtipo viral y una homología superior a un 98% define las variantes de un tipo (figura 8).

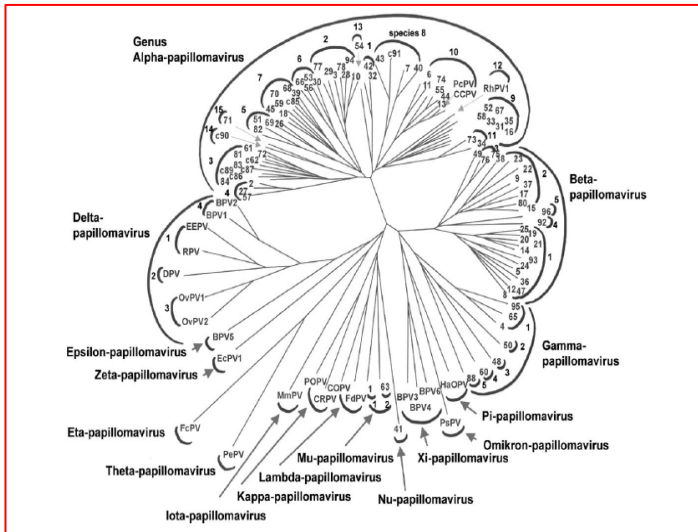


Figura 7. Árbol filogenético del VPH

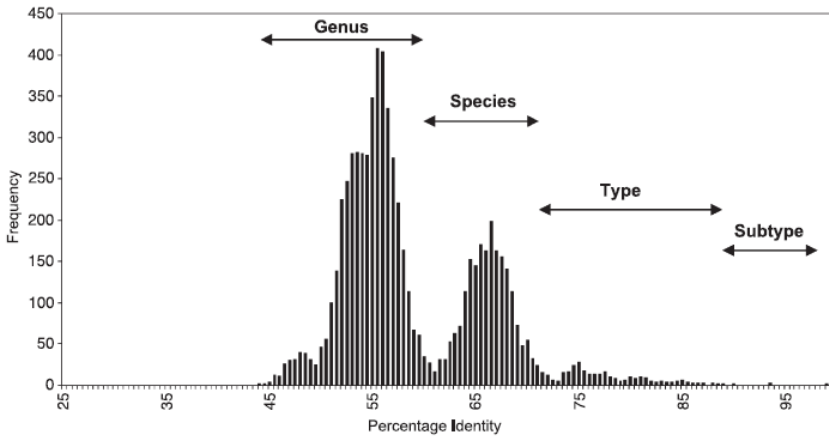


Figura 8. Clasificación de los VPH

Tabla 3- Características básicas de los géneros papilomavirus⁷⁰

<i>GENERO</i>	<i>Especie</i>	<i>TIPO</i>	<i>OTROS TIPOS</i>	<i>COMENTARIOS</i>
ALPHA	1	VPH-32	VPH-42	Lesiones benignas mucosa oral o genital
	2	VPH-10	VPH-3,28,29,78,94	Lesiones cutáneas y mucosas de bajo riesgo. Más frecuente lesiones cutáneas
	3	VPH-61	VPH-72,81,83,84	Lesiones mucosas bajo riesgo
	4	VPH-2	VPH-27,57	Verrugas vulgares. Verrugas genitales en niños.
	5	VPH-26	VPH-51,69,82	Lesiones mucosas de alto riesgo, pero también lesiones benignas
	6	VPH-53	VPH-30,56,66	Lesiones mucosas de alto riesgo, pero también lesiones benignas
	7	VPH-18	VPH-39,45,59,68,70	Lesiones mucosas de alto riesgo.
	8	VPH-7	VPH-40,43	Lesiones cutáneas y mucosas de bajo riesgo. HPV-7 conocido como HPV de las verrugas de los carniceros, afecta con frecuencia a pacientes HIV+
	9	VPH-16	VPH-31,33,35,52,58,67	Lesiones mucosas de alto riesgo
	10	VPH-6	VPH-11,13,44,74	Lesiones mucosas de bajo riesgo. HPV-6 en carcinoma verrucoso
	11	VPH-34	VPH-73	Lesiones mucosas alto riesgo
	12	RhPV-1	-	Lesiones mucosas en monos Rhesus
	13	VPH-54	-	Lesiones mucosas bajo riesgo
	14	CandVPH-90	-	Lesiones mucosas bajo riesgo
	15	VPH-71	-	Lesiones mucosas bajo riesgo

BETA	1	VPH-5	VPH-8,12,14,19,20,21,25,36,47,93	Lesiones cutáneas. Comúnmente asociado a lesiones en EV o pacientes inmunodeprimidos. Normalmente lesiones benignas, pero también asociado a lesiones malignas , incluso en pacientes inmunocompetentes.
	2	VPH-9	VPH-15,17,22,23,37,38,80	Lesiones cutáneas. Comúnmente asociado a lesiones en EV o pacientes inmunodeprimidos. Normalmente lesiones benignas, pero también asociado a lesiones malignas , incluso en pacientes inmunocompetentes.
	3	VPH-49	VPH-75,76	Lesiones cutaneas benignas
	4	VPHcand92	-	Lesiones cutaneas pre-y malignas
	5	VPHcand96	-	Lesiones cutaneas pre-y malignas
GAMMA	1	VPH-4	VPH-65,95	Lesiones cutáneas. Histológicamente distinguible por cuerpos de inclusión homogéneos intracitoplasmáticos.
	2	VPH-48	-	Lesiones cutáneas
	3	VPH-50	-	Lesiones cutáneas
	4	VPH-60	-	Lesiones cutáneas
	5	VPH-88	-	Lesiones cutáneas
DELTA	1	EEPV	RPV	Papilomavirus alce europeo. Gen E9 dentro ELR con capacidad transformadora.
	2	DPV	-	Papilomavirus ciervo. Gen E9 dentro ELR con capacidad transformadora.
	3	OvPV1	OvPV2	Papilomavirus ovino
	4	BPV-1	BPV-2	Papilomavirus bovino. Gen E5 dentro ELR con capacidad transformadora. Infección trans-especie. Causa infección en caballos

EV: epidermodisplasia verruciforme

EPSILON	1	BPV-5	-	Papilomavirus bovino, lesiones cutáneas
ZETA	1	EcPV	-	Lesiones cutáneas en caballos. <i>Equus caballus papillomavirus</i> .
ETA	1	FcPV	-	Papilomavirus de aves. Lesiones cutáneas. <i>Fringilla coelebs papillomavirus</i> . No tiene E6 y E7 es una forma ancestral E6/E7
THETA	1	PePV	-	Papilomavirus de aves. <i>Psittacus erithacus timneh papillomavirus</i> .
IOTA	1	MnPV	-	Papilomavirus de roedores. <i>Mastomys natalensis papillomavirus</i> .
KAPPA	1	CRPV	-	Papilomavirus aislado en conejos. Lesiones en piel
	2	ROPV	-	Papilomavirus aislado en conejos. Lesiones orales
LAMBDA	1	COPV	-	Papilomavirus oral canino.
	2	FdPV	-	Papilomavirus de gatos. <i>Felis domesticus papillomavirus</i> .
MU	1	VPH-1	-	Papilomavirus humano. Histológicamente distinguible por cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos heterogéneos.
	2	VPH-63	-	Papilomavirus humano. Histológicamente distinguible por cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos filamentosos.
NU	1	VPH-41	-	Papilomavirus humano. Lesiones benignas y malignas en piel.
XI	1	BPV-3	BPV-4,6	Papilomavirus bovino
OMIKRON	1	PsPV		Aislado en verrugas genitales en cetáceos. <i>Phocoena spinipinnis papillomavirus</i>
PI	1	HaOPV	-	Aislado en lesiones mucosa oral en hamsters.

Posteriormente se han ido caracterizando más tipos de VPH. En el artículo de *Bernard et al*⁷¹ del año 2010 se identifican un total de 189 tipos de VPH. *Köhler et al*⁷² en 2011 identifica 10 tipos nuevos de VPH cutáneos en lesiones queratósicas en pacientes inmunodeprimidos.

3- PODER ONCOGÉNICO DEL VPH

3.1-CICLO REPLICATIVO DEL VPH⁷³

La mayoría de los estudios del VPH se centran en el análisis de los tipos VPH de alto riesgo, en concreto el **VPH-16**, que es la primera causa de cáncer cervical.

1-Infeción e internalización del virus

La infección inicial requiere el acceso de las partículas infecciosas a las células de la capa basal, generalmente tras un microtraumatismo. Una vez en la capa basal, para que la infección se mantenga es preciso que afecte a una célula madre epitelial (en el caso de la piel, las células madre son abundantes dentro del folículo piloso).

El mecanismo de adhesión del virus a la superficie de la célula no es del todo conocido, pero parece que depende de la presencia de heparan sulfato en la superficie celular⁷⁴. La internalización del virus, que dura unas horas, se produce mediante la endocitosis de los virus en vesículas cubiertas de clatrina. Una vez dentro de la célula, para que el ADN viral sea transportado al núcleo, se produce la rotura de la cápside icosaédrica por sus puentes disulfuro.

2-Mantenimiento del genoma

Una vez el ADN del virus está dentro del núcleo de la célula basal del epitelio, se mantiene en su forma episómica, es decir como un plásmido, no integrado en el genoma celular. El genoma viral se mantiene en la capa basal bajo un reducido

número de copias por célula, alrededor de 10-200 copias por célula, y las proteínas virales tempranas (E6, E7, E1 y E2) se expresan en bajo nivel.

3-Fase proliferativa

En el epitelio no infectado, las células basales salen del ciclo celular en las capas suprabasales para seguir su ascenso por el epitelio a la vez que maduran, sometiéndose a un proceso de diferenciación terminal. En las células infectados por el VPH no se produce esta salida del ciclo celular, pues las proteínas E6 y E7 expresadas en las células infectadas por el virus impiden la salida del ciclo celular ayudadas por el promotor viral p97. La proteína E7 se asocia con la pRB (proteína reguladora del ciclo celular, que mientras se mantiene unida al factor de transcripción E2F impide la entrada en la fase S del ciclo celular). La unión de la proteína E7 a la pRb, desplaza a E2F y conduce a la expresión de proteínas necesarias para la replicación celular (como la ciclina E, necesaria para la entrada en la fase S del ciclo celular). Por otro lado, E7 también se puede asociar a otras proteínas involucradas en la proliferación celular como las histonas desacetilasas y los inhibidores de la ciclina dependientes de kinasa p21 y p27.

A pesar de esta capacidad de estimular la proliferación celular, en las capas suprabasales solo un subgrupo pequeño de células tiene actividad mitótica. Así parece que la capacidad de la proteína E7 de entrar en fase S se limita al conjunto de células con bajos niveles de p21/p27, o que expresan altos niveles de E7 capaces de superar el bloqueo para entrar en la fase S del ciclo celular.

La proteína viral E6 complementa el papel de la E7. E6 evita la apoptosis de las células con ADN alterado. Para ello, E6 se une a la proteína celular p53 inhibiendo su acción proapoptótica. Además, también se puede unir a las proteínas proapoptóticas *Bak* y *Bax*.

4-Replicación del genoma

Para la producción de viriones infecciosos, el papilomavirus debe ampliar sus genomas virales y empaquetarlos en partículas infecciosas.

La replicación se produce en las capas epiteliales medias y altas, en las células que han entrado en la fase S, y requiere la expresión de proteínas implicadas en la replicación viral (E1, E2, E4 y E5). El complejo de iniciación E1/E2 es necesario para iniciar la replicación del genoma viral. Así, niveles altos de E1 y E2 permitirán que haya un número elevado de copias de ADN viral en las capas altas del epitelio.

5-Síntesis del virus

El virus del papiloma codifica dos proteínas estructurales que son expresadas en las capas altas del epitelio del tejido infectado una vez la amplificación viral del genoma se ha completado. Estas proteínas estructurales son las proteínas L1 y L2 que corresponden a las proteínas de la cápside. Una vez ensambladas, el virus ya ha completado su ciclo y es capaz de infectar una vez se libera de la célula donde se hospeda. La proteína E4 contribuye a esta liberación del virus gracias a su capacidad de unirse a la queratina y alterar su integridad.

Una vez producida la infección puede ocurrir que la infección regrese y el virus se encuentre en forma latente o que exista una transformación tumoral.

A) Regresión de las lesiones y latencia viral

La importancia del sistema inmune para controlar la propagación de la enfermedad está bien establecida, así los pacientes con defectos inmunitarios pueden desarrollar lesiones generalizadas refractarias al tratamiento. La infección por VPH es un problema importante en pacientes trasplantados, infectados por VIH, y en algunos

pacientes con defectos genéticos que afectan a las células inmunitarias. Por otra parte, la detección frecuente de VPH-16 en lesiones cervicales en ausencia de enfermedad obvia puede ser explicada por el estado latente del virus gracias al control del sistema inmune.

B) Infección productiva, infección abortiva y cáncer asociado a VPH

En ausencia de regresión, las lesiones persisten y pueden en algunos casos progresar al cáncer. Una característica común de los virus tumorales es su capacidad para causar tumores en los lugares donde su ciclo de vida productiva no se puede completar. Los VPH de alto riesgo del género α han sido asociados con cáncer de cérvix en humanos, mientras que los virus del género β (especialmente $\beta 1$) han sido implicados en el desarrollo de CCNM. El evento clave en la progresión de las lesiones a cáncer resulta de una desregulación en la expresión viral de proteínas transformadoras (E6 y E7), lo que conduce a un aumento de la proliferación de células en las capas inferiores del epitelio y la incapacidad para reparar mutaciones secundarias en el ADN de la célula huésped. En el cáncer de cuello de útero la progresión de neoplasia intraepitelial grado 3 (CIN3) al cáncer ocurre en las lesiones que contienen copias integradas del genoma viral. El ciclo vital se ve alterado en su fase de proliferación, donde E6 y E7 están implicados. En esta fase se produce una proliferación celular descontrolada, debido a la acción de E7, con mutaciones en el ADN celular que la propia célula no puede reparar por la acción de E6. Por otro lado, E2 y E4, los genes que tienen un control negativo sobre el crecimiento celular, están disminuidos. Estos genes E2, E4 y también E5 y parte de L2 dejan de expresarse debido a la integración del ADN del virus al ADN de la célula. Aunque otros tipos de VPH tales como el supergrupo $\beta 1$ también están asociados con CCNM, no se ha podido demostrar en estos casos la integración del virus en el genoma de la célula huésped.

En las lesiones benignas causadas por el VPH, el ADN viral se encuentra generalmente en forma episómica, en el núcleo, no integrado en el genoma de la célula huésped. En el cáncer cervical, el ADN viral se encuentra integrado en el genoma celular. Por el contrario, no se ha reportado integración del genoma de VPH- β en el CEC cutáneo⁷⁵.

3.2-VPH Y CANCER CUTÁNEO NO MELANONA: MECANISMOS MOLECULARES

El mecanismo por el cual el VPH causa oncogénesis en el CCNM no está aún aclarado. El genoma de los VPH mucosos (VPH- α) contiene los genes E6 y E7 que se replican como episomas independientes del ADN del huésped y potencialmente actúan dañando los genes supresores p53 y Rb. La integración en el genoma del huésped pueda causar disrupción de la estabilidad genómica y facilita la progresión hacia la transformación celular; éste sería el mecanismo de inducción de cáncer de cervix y de carcinomas anogenitales. En un principio se intentó extrapolar los mecanismos identificados en los VPH mucosos oncogénicos para determinar cuáles serían las estrategias o mecanismos moleculares de los VPH- β (y VPH- γ) para inducir carcinogénesis cutánea. Sin embargo se comprobó que las vías de actuación de los tipos cutáneos son diferentes, bastante más complejas y posiblemente en colaboración con otros cofactores como la radiación UV o la inmunosupresión. Desde el punto de vista molecular parece que los VPH- β y la radiación UV se alían y se potencian. Asimismo, los VPH- β también parecen tener capacidad para interceptar el sistema inmune, en ocasiones ya bloqueado por una inmunosupresión subyacente en el paciente, logrando así evadir no solo las defensas intrínsecas del ciclo celular, sino los mecanismos de presentación antigénica de la inmunidad celular. Por tanto, parece que los VPH- β podrían

desempeñar un papel en el desarrollo de carcinomas cutáneos, sobre todo en circunstancias de inmunosupresión y exposición solar alta.

En las investigaciones realizadas en modelos animales, en concreto en ratones transgénicos a los que se les introdujeron genes de la región “*Early*” de diferentes VPH- β bajo el control de un gen promotor de las queratinas, inicialmente se obtuvieron datos muy inespecíficos, observándose cierta proliferación cutánea con escasos rasgos de atipia. No obstante, cuando se asoció la irradiación de estos ratones con luz ultravioleta se detectó un incremento significativo en la replicación vírica y una inducción de la proliferación epitelial con rasgos de atipia en un 40% de los casos⁷⁶. Así, los datos clínicos, epidemiológicos y biológicos apuntan que la radiación UV es un factor necesario para desencadenar un proceso en el que el VPH participa sabotando las estrategias de defensa celulares ante la agresión de la luz solar. Ello se confirma con la aparición de la mayoría de las lesiones neoplásicas en las zonas expuestas de los pacientes con epidermodisplasia verruciforme y pacientes trasplantados, y con la asociación epidemiológica entre la seroreactividad a los VPH- β y el desarrollo de carcinomas en pacientes con historia de exposición solar y queratosis actínicas.

De otros estudios moleculares realizados en cultivos celulares se desprende que las dianas principales de los VPH- β se centran en mecanismos antiapoptóticos y en el bloqueo de las vías protectoras de la integridad del genoma encargadas de reparar el daño provocado por la radiación UV. En este sentido, se ha observado que los VPH- β 8 y 20 tienen la capacidad de bloquear la acción de proteínas proapoptóticas *BAK* y *BAX*⁷⁷, cuya acción es similar pero independiente de la p53. Además, se ha identificado otra proteína (proteína *XRCCI*) reparadora de dímeros de timidina inducidos por la radiación UV, que puede ser interceptada por algunos VPH- β como el HPV-8⁷⁸. Estudios recientes han estudiado el papel de las

proteínas E6 y E7 en carcinomas epidermoides^{1,79,80}. Las proteínas E6 y E7 son oncoproteínas codificadas por el virus y están íntimamente relacionadas con la transformación maligna de las células infectadas por el virus. La proteína E6 inhibe la apoptosis en respuesta a la luz UV. Experimentos in vitro han demostrado que la proteína E6 del VPH sortea el control del ciclo celular en la fase G1 impidiendo la entrada en apoptosis y los mecanismos de reparación del ADN tras exposición a la luz UV. Transcripciones E6/7 de los virus del papiloma 8, 9 y 15 se encuentran en las queratosis actínicas y en el carcinoma epidermoide de los pacientes trasplantados⁸⁰, lo que sugiere un papel activo del VPH en la patogenia de estas lesiones. Por último, se ha descubierto que los VPH-8 y VPH-5 tienen una capacidad inhibitoria sobre la interleucina-8 que participa en la estimulación de una respuesta inmunitaria que controla a aquellas células dañadas por la radiación UV⁸¹. Según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, actualmente solo los tipos VPH-5 y 8 (VPH-β2) tendrían evidencia como posibles carcinógenos cutáneos, aunque esta evidencia es limitada y en el contexto únicamente de la epidermodisplasia verruciforme⁸².

4- ESTUDIO DEL VPH EN EL CCM

La influencia del virus del papiloma humano en el desarrollo de carcinomas cutáneos es un tema controvertido, que ha motivado la realización de numerosos estudios en las últimas décadas. Al principio, la heterogeneidad de las metodologías empleadas dificultaba extraer conclusiones, al ser los resultados difícilmente comparables. Sin embargo, en los últimos años, la mejora en las técnicas de biología molecular ha permitido la obtención de algunos datos que aunque aún no son concluyentes, apuntan a que las líneas de investigación actuales parecen bien encaminadas y es posible que en los próximos años se solventen algunas de las dudas actuales.

Para poder asumir la implicación del virus en el CCNM se requiere el cumplimiento de los criterios establecidos para los virus considerados oncogénicos.

Estos criterios se resumen en⁸²:

- Primero, la evidencia epidemiológica de que la infección viral es un factor de riesgo de padecer cáncer.
- Segundo, la coexistencia persistente del genoma del virus en las células tumorales.
- Tercero, la estimulación de la proliferación celular en cultivos mediante la transfección del genoma viral o parte del mismo.
- Y cuarto, la demostración de que el genoma viral induce la proliferación y el fenotipo neoplásico del tumor en un cultivo celular.

Siguiendo estas premisas, se han realizado dos tipos de estudios epidemiológicos: unos mediante determinación directa del genoma del VPH en las lesiones cutáneas⁸³ y otros a través del análisis de la respuesta serológica del individuo al VPH⁸⁴. Ambas metodologías parecen tener limitaciones. En el primer caso se postula que la presencia en la piel del virus no siempre implica una infección activa, y en el segundo caso, para que haya una seroreactividad parece necesario un sistema inmune competente, que la infección sea lo suficientemente extensa o que se asocie a inflamación local u otras condiciones que favorezcan la respuesta inmunitaria. Un handicap común para ambos tipos de trabajos es la gran variabilidad genotípica del VPH, lo que condiciona la sensibilidad de las diferentes técnicas empleadas y consecuentemente la dificultad de comparación de los resultados.

Concluyendo, diferentes trabajos han intentado demostrar una relación causal entre la infección por ciertos tipos de papilomavirus y la génesis de las carcinomas cutáneos. Sin embargo, para corroborar esta asociación se requiere la existencia de un mecanismo biológico sólido que explique la relación entre causa y efecto. Con los datos disponibles hasta el momento, no podemos afirmar que el VPH sea un virus oncogénico per se, aunque las consecuencias de su infección parecen abocar a un estado de predisposición celular a la transformación neoplásica.

5- VPH EN CCNM DE PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS E INMUNOCOMPETENTES. VPH EN PIEL SANA.

Son múltiples los estudios realizados para valorar la implicación del VPH en la oncogénesis cutáneas. Esta relación se ha sustentado en varios premisas como la asociación epidemiológica observada entre las verrugas y los CEC en pacientes con epidermodisplasia verruciforme⁸⁵, la coexistencia de signos histológicos de infección viral y displasia epitelial en una misma biopsia^{86,87} o la identificación de ADN del VPH en muchos CCNM^{88,89}.

Por otra parte, es interesante destacar que es en las lesiones más precoces, como los carcinomas *in situ* y las queratosis con displasia, donde el genoma del VPH se detecta con mayor frecuencia, con un mayor número de copias y con una replicación vírica más activa que en los carcinomas escamosos más evolucionados. Estos datos sugieren que la influencia del VPH se centraría fundamentalmente en las etapas iniciales de la carcinogénesis cutánea, más que en la perpetuación tumoral⁷⁵.

Puntualizar que la mayoría de trabajos relacionan la infección del VPH con el CEC. Los trabajos que intentan buscar una asociación entre infección por VPH y CBC son menores, y la mayoría no encuentran una asociación estadísticamente significativa.

*Shamanin et al*⁹⁰ en el año 1996, fue uno de los primeros autores que estudió el VPH en el carcinoma basocelular mediante *PCR* (reacción en cadena de la polimerasa), con una prevalencia de VPH del 36%. En el trabajo de *Boxman et al*⁹¹ se encontró una prevalencia de VPH-β del 43% en los CBC. En el trabajo de *Escutia et al*⁹², la prevalencia de VPH en carcinomas basocelulares de pacientes inmunocompetentes fue del 25'7%.

5.1-VPH Y EPIDERMODISPLASIA VERRUCIFORME (EV)

En la epidermodisplasia verruciforme encontramos la primera evidencia que relaciona el VPH con el cáncer cutáneo. Los pacientes con EV padecen un déficit genético de la inmunidad celular que condiciona una infección precoz por algunos tipos de VPH, que en un principio sólo se hallaron en estos pacientes y por ello se denominaron como VPH tipo EV, ahora incluidos en las VPH-β. Esta enfermedad clínicamente se caracteriza por la aparición de verrugas planas en las primeras décadas de la vida y desarrollo precoz de CEC que aparecen sobre las lesiones víricas localizadas en las zonas expuestas a la radiación UV⁸¹. Más del 90% de estos tumores contienen ADN de VPH-β en forma extracromosómica⁸⁹. Los tipos de VPH detectados en las lesiones benignas son muy variables, mientras que en un 90% de las lesiones malignas se han detectado los tipos VPH-5 y 8. La persistencia de la infección por los VPH-β se cree que es debida a un defecto genético que provoca una incapacidad del sistema inmune del paciente para eliminar los queratinocitos infectados. Se conocen dos locus para la epidermodisplasia

verruciforme: uno situado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q25) conocido como EV1, y el otro situado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p21-24) conocido como EV2.

5.2-VPH Y CCNM EN PACIENTES INMUNOCOMPETENTES

Los últimos trabajos en pacientes inmunocompetentes⁸⁸ detectan VPH en un elevado número de CEC invasivos. Los genotipos más frecuentemente identificados son los pertenecientes al género beta (VPH- β), género asociado clásicamente a la EV. Sin embargo, es preciso puntualizar que los tipos detectados en los diferentes trabajos son muy variables y de momento no se ha demostrado que haya unos tipos con un alto riesgo epidemiológico.

5.3-VPH Y CCNM EN PACIENTES TRASPLANTADOS

Con el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) los tipos VPH- β se han detectado en tumores de piel en pacientes trasplantados con mayor prevalencia que en pacientes inmunocompetentes⁹³.

Los pacientes trasplantados tienen una marcada susceptibilidad al desarrollo de verrugas virales y CCNM, sobre todo en zonas fotoexpuestas.

La asociación entre verrugas víricas y CEC se verifica por dos hechos. Por un lado, las características clínicas e histológicas de los CEC en los pacientes trasplantados constatan la progresión de las verrugas víricas a lesiones displásicas y finalmente a CEC invasor^{86,87}. Por otro lado, las verrugas víricas y los CEC se localizan normalmente en áreas fotoexpuestas, por lo que la luz UV parece ser un factor importante para el desarrollo de ambos.

Parece que el desarrollo de cáncer de piel en pacientes trasplantados es el resultado de una compleja interacción entre la exposición a la radiación UV, la infección por VPH y el estado de inmunosupresión.

5.4-VPH EN PIEL SANA

El ADN del VPH se encuentra ampliamente distribuido en la piel en la población general⁹⁴⁻⁹⁷. Según los datos actuales, en personas sanas la infección por VPH se presenta de forma latente en la piel, y en su mayor parte como flora residente en los folículos pilosebáceos. El bulbo es el reservorio conocido de VPH- β y los pelos de las cejas son un lugar de infección persistente⁹⁸. Los estudios realizados en personas inmunocompetentes han encontrado ADN del VPH en 67-74% de los pelos arrancados^{94,99} y en el 69-80% de los frotis de la piel⁹⁷. De manera similar, los anticuerpos frente VPH se han detectado en el 53% de los sueros en controles sanos⁸⁴. Estos estudios sugieren que el ADN del VPH está ampliamente distribuido en la población general y que pueden surgir infecciones ocultas en piel de apariencia normal.

Los VPH cutáneos se detectan habitualmente en lesiones benignas como verrugas vulgares, verrugas planas, verrugas plantares, etc. Las altas tasas de prevalencia de verrugas vulgares, planas y plantares en la población sana (sobre todo durante la infancia y adolescencia) y los mecanismos de contagio del VPH (por contacto personal y tras pequeños traumatismos o heridas cutáneas), son datos epidemiológicos que inducen a suponer que el VPH está presente de forma asintomática y probablemente saprofita en la superficie mucocutánea de la mayoría de individuos inmunocompetentes, tanto adultos como niños⁹⁵.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

I. HIPÓTESIS

La determinación de los factores de riesgo implicados en el desarrollo de cáncer de piel en nuestro medio nos ayudará a mejorar la calidad asistencial de los pacientes trasplantados así como a establecer las medidas preventivas y de tratamiento óptimas para el manejo de estos pacientes.

El estudio de la prevalencia y espectro de los tipos del VPH en pacientes trasplantados y en controles inmunocompetentes puede aportar evidencias sobre la implicación del VPH en la etiopatogenia del cáncer cutáneo.

II. OBJETIVOS

De acuerdo con los datos actuales, podemos generalizar que la incidencia de carcinomas cutáneos en pacientes trasplantados es más alta que en la población general y que estos tumores presentan ciertas peculiaridades clínicas (curso más agresivo, con un crecimiento más rápido, frecuente recidiva local tras su exéresis y una mayor tendencia a hacer metástasis a distancia).

Ahora bien, a pesar de aceptar que el riesgo relativo de padecer un carcinoma cutáneo en pacientes trasplantados es mucho mayor que en la población general, resulta difícil comparar los resultados de los distintos estudios entre sí, debido en parte a la diversidad metodológica utilizada en los trabajos existentes, así como a las diferencias entre las poblaciones estudiadas, las diferencias en la latitud entre los diferentes países o el tiempo de estudio, entre otros factores.

Hasta este momento son muy pocos los estudios realizados en nuestro país y resulta complejo extrapolar los resultados obtenidos en otros países a nuestra área, con unas condiciones sociales, ambientales y unos factores raciales diferentes.

La gran mayoría de estudios se centran en áreas con latitudes más altas que las nuestra (Norte de Europa); también existen algunos trabajos realizados en Australia, un país con alta exposición al sol, como el nuestro, pero con una población de características fenotípicas diferentes.

Además, ciertos factores de riesgo, como el tratamiento inmunosupresor o sus combinaciones, se modifican con el paso de los años. Los nuevos fármacos inhibidores mTOR y el tratamiento de inducción con anticuerpos antilinfocitarios

mono/policlonales son parámetros que no se reflejan en muchos estudios previos y que implican posiblemente un cambio en la etiopatogenia del cáncer cutáneo en pacientes trasplantados.

Por otra parte, con respecto al virus del papiloma humano, si bien está bien establecido su papel en el desarrollo del cáncer de cérvix, su implicación en la etiopatogenia del cáncer cutáneo es más discutida. En los últimos años, las mejoras en las técnicas de biología molecular han permitido la obtención de datos, que aunque no concluyentes, nos están ayudando a solventar muchas de las dudas actuales sobre la implicación del VPH en el desarrollo del cáncer de piel.

Por este motivo creemos pertinente la realización del presente estudio, cuyo objetivo fundamental es determinar la incidencia y los factores de riesgo asociados a la aparición de CCNM en pacientes trasplantados renales, haciendo hincapié en el papel del tratamiento inmunosupresor y el virus del papiloma humano como posibles agentes implicados en la etiopatogenia tumoral.

Por lo anteriormente expuesto nos planteamos los siguientes objetivos:

1-Determinar la incidencia de cáncer cutáneo no melanoma en pacientes trasplantados renales en nuestra área.

2-Valorar las características personales de los pacientes trasplantados renales con CCNM: características fenotípicas, sociolaborales, patológicas y exposición solar.

3-Estudiar el CCNM en pacientes trasplantados renales: tipo histológico, localización del tumor, tiempo de aparición y evolución de los mismos.

4-Estudiar los factores de riesgo asociados al desarrollo de los carcinomas cutáneos en pacientes trasplantados renales.

5-Comparar los resultados obtenidos en nuestro medio con los estudios descritos en la literatura.

6-Investigar la relación entre la infección por el virus del papiloma humano y el desarrollo de cáncer cutáneo.

MATERIAL Y MÉTODO

Tras la aprobación por el Comité de Ética del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia iniciamos el presente estudio.

I. MATERIAL

1- DISEÑO DEL ESTUDIO

Para la determinación de los factores de riesgo implicados en el desarrollo de CCNM en pacientes trasplantados se diseñó un estudio analítico observacional de tipo ambispectivo: retrospectivo a partir de la revisión de las historias clínicas y prospectivo al estar completado por una encuesta personal y examen físico y controles sucesivos hasta la finalización del estudio. Recogimos los datos de 305 pacientes trasplantados renales, los cuales habían sido trasplantados durante el periodo comprendido entre enero 1996 y diciembre de 2010. Las entrevistas se iniciaron en enero de 2010, con revisiones periódicas cada 6 meses, cerrando la recogida de datos en enero de 2012.

Para investigar la relación entre infección por el virus del papiloma humano y el desarrollo de cáncer cutáneo en pacientes trasplantados diseñamos un estudio observacional, prospectivo y de casos y controles. En el grupo de **casos** se analizaron las muestras de 30 CCNM de pacientes trasplantados y en el grupo **control** otras 30 muestras de CCNM de pacientes inmunocompetentes. La determinación del VPH se realizó con técnica de *PCR nested* y posterior secuenciación. En ambos grupos se analizó también la presencia del VPH en piel sana perilesional.

PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES

Un total de 305 pacientes trasplantados renales fueron estudiados. De estos 305 pacientes, 280 habían sido trasplantados en el Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia desde enero 1996 hasta diciembre 2010 y 25 pacientes habían recibido el trasplante renal en otros centros durante el mismo periodo (pero eran seguidos de forma periódica en el servicio de Dermatología de nuestro hospital). Excluimos del estudio a 16 pacientes (15 por haber recibido más de un trasplante y otro por fallecimiento durante el seguimiento). Así el número total de pacientes incluidos en el estudio fue de 289 pacientes.

Los pacientes trasplantados en nuestro hospital fueron reclutados de forma voluntaria desde el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia. Durante el periodo comprendido entre enero 1996- diciembre 2010 se realizaron un total de **622** trasplantes renales en este Hospital (los pacientes trasplantados procedían tanto de nuestra Área Sanitaria como de otras áreas dentro de nuestra provincia, al ser nuestro hospital centro de referencia de Trasplante renal). Desde la consulta de Trasplante Renal se invitaba a todos los pacientes a participar en el estudio. De esta forma reclutamos un total de 280 pacientes, de los cuales 170 pacientes ya eran revisados de forma periódica en nuestro Servicio de Dermatología (ya sea en el mismo hospital o de forma ambulatoria en los centros de Monteolivete o Catarroja, perteneciente a nuestra área sanitaria). En 25 pacientes la entrada en el estudio supuso la primera revisión dermatológica tras el trasplante. A los pacientes que no eran valorados en nuestro Servicio de Dermatología se les entregaba una hoja (**anexo 1**) con los datos necesarios para que el Dermatólogo que los controlaba la completara y posteriormente seguir revisiones con nosotros hasta la finalización del estudio.

Así mismo a los 25 pacientes que habían sido trasplantados en otro centro pero que eran revisados en nuestro Servicio de Dermatología, se les entregaba otra hoja (**anexo 2**) para que el nefrólogo que los controlaba nos aportara los datos necesarios para el estudio.

Desde enero 2010 hasta enero 2012 se seleccionaron de forma aleatoria 30 pacientes trasplantados con CCNM de novo (7 CEC, 10 enfermedad de Bowen y 13 CBC) para determinación y tipado del VPH en las muestras tumorales y en piel sana perilesional.

PACIENTES CONTROL

La muestra de pacientes control para el estudio del VPH en pacientes inmunocompetentes fue obtenida del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia de pacientes que acudieron a quirófano local del Servicio de Dermatología con lesiones de CCNM durante el periodo comprendido entre enero 2010-enero 2012. Se seleccionaron 30 pacientes con características fenotípicas (edad, sexo y fototipo) y lesiones similares a los pacientes caso (7 CEC, 10 enfermedad de Bowen y 13 CBC) .

2- CRITERIOS DE INCLUSIÓN-EXCLUSIÓN

Todos los pacientes incluidos en el estudio cumplían los siguientes requisitos:

- Mayores de 18 años.
- Pacientes colaboradores con capacidad de responder al cuestionario.
- Disponibilidad de todos los datos necesarios para el estudio.
- Consentimiento informado firmado.

Como criterios de exclusión adoptamos:

- No disponibilidad de datos necesarios para el estudio.
- Retrasplante (los pacientes con doble o triple trasplante decidimos excluirlos del estudio, sobre todo por la carga inmunosupresora previa al trasplante actual y porque muchos habían recibido un primer trasplante antes de 1996).
- En el caso del grupo control excluimos aquellos pacientes inmunodeprimidos en el momento del estudio o que habían recibido cualquier tratamiento inmunosupresor con anterioridad al estudio.

3- DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES A ESTUDIO

PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES

En la primera visita se le realizó al paciente una encuesta personal y una inspección cutánea completa. Los datos recogidos de la historia clínica y la entrevista personalizada e inspección cutánea se recogen en el **anexo 3**.

Las visitas de seguimiento se programaron cada 6 meses hasta la finalización del estudio. Las variables recogidas en las visitas sucesivas se recogen en la **anexo 4**. En cada visita de seguimiento se realizaba al paciente una exploración cutánea completa y si aparecían nuevas lesiones, se diagnosticaban y se trataban según el procedimiento habitual.

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron informados correctamente y debían firmar consentimiento informado previo a la inclusión en el mismo (**anexo 5**)

Las variables estudiadas fueron las siguientes:

A) Datos personales:

-Edad/sexo

-Medio en el que habita: rural o urbano

-Fototipo: Fitzpatrick diferencia 6 fototipos:

- **FOTOTIPO I:** Se queman con facilidad, nunca se broncean. Piel de tipo céltico, casi albino.
- **FOTOTIPO II:** Se queman con facilidad, bronceado mínimo. Piel blanca que adquiere un ligero tono café con leche después de mucha exposición.
- **FOTOTIPO III:** Se queman con cierta facilidad. Se broncean. Piel clara, caucásica. Con las primeras exposiciones solares se producen quemaduras, a las dos semanas se broncean.
- **FOTOTIPO IV:** Se queman si la exposición es intensa y prolongada. Se broncean fácilmente. Similar al fototipo III pero el bronceado se adquiere en pocos días. Piel morena, como grupos latinos.
- **FOTOTIPO V:** Para producir quemaduras la exposición ha de ser muy intensa. Se broncean muy fácilmente. Es una piel con un tono oscuro, como la que tienen los hindúes, indígenas americanos o árabes.
- **FOTOTIPO VI:** No se queman, piel negra.

-Color de ojos: claros (azules, verdes) o oscuros (marrones).

-Profesión y exposición solar ocupacional pretrasplante.

Utilizamos la clasificación CIUO -Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones (CIUO, también conocida como *ISCO*) para clasificar las ocupaciones de los pacientes. Dividimos a los pacientes en dos grupos según la exposición ocupacional pretrasplante: alta, si el paciente había trabajado más de tres años al aire libre previo al trasplante, y baja si no lo había hecho (según estudios previos²).

Clasificación CIUO

- 1-Directores y gerentes
- 2-Profesionales científicos e intelectuales
- 3-Técnicos y profesionales de nivel medio
- 4-Personal de apoyo administrativo
- 5-Trabajadores de los servicios y vendedores de comercios y mercados
- 6-Agricultores y trabajadores calificados agropecuarios, forestales y pesqueros.
- 7-Oficiales, operarios y artesanos de artes mecánicas y de otros oficios
- 8-Operarios de instalaciones y máquinas y ensambladores.
- 9-Ocupaciones elementales
- 0-Ocupaciones militares.

-Como marcador de exposición solar elegimos la exposición solar ocupacional pretrasplante. Preguntamos también por la exposición solar recreacional, historia de quemadura solar en la infancia y uso de medidas de fotoprotección, pero estos eran marcadores muy variables en el tiempo y limitados por el sesgo de memoria, por lo que no los incluimos en el estudio.

-Hábitos tóxicos: Fumador/bebedor

-Antecedentes familiares de cancer. La historia familiar positiva de cáncer se determinó cuando un familiar de primer grado había sido diagnosticado de cáncer (cutáneo o no cutáneo) previo al trasplante del paciente.

B) Datos nefrológicos:

-Etiología de la insuficiencia renal:

Glomerular/Intersticial/diabetes/Vascular/Poliquistosis/Otros

-Años de diálisis y tipo (hemodiálisis o peritoneal)

-Año del trasplante

-Edad en el momento del trasplante

-Compatibilidad HLA

-Tratamiento inmunosupresor principal:

A-Rapamicina/everolimus (inhibidores mTOR)+ micofenolato + prednisona

B-Tacrolimus+ micofenolato+ prednisona

C-Ciclosporina + micofenolato + prednisona

D-Otro (ciclosporina + azatioprina + prednisona, etc.)

-Tratamiento de inducción:

1-No inducción

2-Basiliximab

3-Timoglobulina®

4-ATGAM®

5-Muromonab-CD3

C) Datos dermatológicos:

-Tumores cutáneos antes del trasplante y tipo (CEC, CBC, Bowen, o queratoacantoma)

-Historia pasada y actual de verrugas

-Historia pasada y actual de queratosis actínicas

- En los diferentes tumores después del trasplante recogimos:
 - Edad en el momento del diagnóstico/Años tras el trasplante
 - Localización del tumor
 - Tipo histológico (CEC, CBC, Bowen o queratoacantoma)
 - Evolución (favorable o recidiva)

CONTROLES

Los controles fueron entrevistados por medio de un cuestionario estructurado para recopilar información relativa a las siguientes variables potenciales de confusión de cáncer de piel: edad, sexo, fototipo (según la clasificación de Fitzpatrick), exposición solar ocupacional (considerándola alta cuando el paciente trabajaba o había trabajado la mayor parte de su jornada laboral al aire libre), así como historia pasada o actual de verrugas y queratosis actínicas (**anexo 6**).

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron informados correctamente y firmaron el consentimiento informado (**anexo 7**).

II- METODO

1- DESCRIPCIÓN DE LA RECOGIDA DE MUESTRAS

Las lesiones diagnosticadas antes del inicio del estudio se recogieron de forma retrospectiva tras la revisión de la historia clínica. Se aceptó el diagnóstico clínico de las verrugas y queratosis actínicas, pero solo los casos de CCNM confirmados histológicamente fueron incluidos en el estudio.

Las lesiones detectadas de novo durante el tiempo de seguimiento (enero 2010-enero 2012) sugestivas de CBC, CEC, carcinoma epidermoide *in situ* o queratoacantoma fueron biopsiadas y /o extirpadas directamente. Las muestras eran procesadas según el procedimiento habitual fijando el material con formol e incluyendo la muestra en parafina.

Se analizó el tipo histológico de la lesión, localización y momento de aparición tras el trasplante. Las lesiones sugestivas de queratosis actínicas o verrugas fueron tratadas directamente con crioterapia (sin confirmación histológica) anotando en la historia clínica la presencia y localización de las mismas.

Con el fin de determinar el papel etiológico del virus del papiloma humano (VPH) en el CCNM determinamos de forma prospectiva, por reacción en cadena de la polimerasa, la prevalencia de VPH en muestras de CCNM de 30 pacientes trasplantados. Para determinar posibles diferencias en cuanto a prevalencia y tipado del VPH entre pacientes inmunodeprimidos y pacientes inmunocompetentes determinamos por el mismo método la presencia de VPH en 30 CCNM de pacientes inmunocompetentes. Analizamos a su vez la presencia del VPH en piel sana en los mismos pacientes para detectar diferencias, si las hay, entre piel afecta y piel sana. Elegimos como piel sana la parte externa del huso cutáneo de la exéresis tumoral no afecta de tumor (para evitar así mayor comorbilidad en los pacientes). Todas las muestras de piel lesional y sana perilesional fueron obtenidas en condiciones de esterilidad mediante biopsia en sacabocados de 3 mm del huso cutáneo (de la zona central del tumor para piel lesional y del borde externo del huso cutáneo de la pieza quirúrgica para piel sana). La zona era previamente preparada bajo anestesia local con mepivacaína al 3% y antisepsia con povidona yodada. Tras la retirada de ambos punch, el huso cutáneo se incluía en formol para su procesamiento en parafina y estudio histológico.

Las muestras de *punch* de piel lesional y piel sana se almacenaron en fresco a -80° C en el departamento de Microbiología del Hospital Universitario Doctor Peset hasta su procesamiento por *PCR* en el Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI).

2- DETECCIÓN DEL GENOMA DEL VPH

Se identificaron mediante *PCR nested* y posterior secuenciación los distintos tipos de VPH en las 120 muestras a estudio (60 muestras de pacientes trasplantados [casos]: 30 muestras de lesiones tumorales y 30 muestras de piel sana y 60 muestras de pacientes inmunocompetentes [controles]: 30 muestras de lesiones tumorales y 30 muestras de piel sana).

PCR anidada (*PCR nested* o *seminested*), es un método de *PCR* donde se realiza la amplificación en dos etapas. En una primera amplificación se utilizan dos *primers*/cebadores que se unen a unas secuencias complementarias (como en cualquier *PCR*). Se realiza un número de ciclos. Una vez realizados estos ciclos, se toma una alícuota de esta *PCR*. Con esa alícuota se realiza una segunda *PCR* en la que se utilizan unos *primers* que hibridan con una zona de la secuencia situada por dentro de la zona de la secuencia donde hibridaron los *primers* de la primera *PCR*. Esto tiene dos objetivos, por una parte aumentar la sensibilidad de la *PCR*, al realizar más ciclos y por otra conferir especificidad a la prueba.

Aparatos o equipos necesarios

- Baño de incubación.
- Cabina de flujo laminar de clase I.
- Cabina de flujo laminar de clase IIA.

- Congelador de -30°C .
- Congelador de -80°C .
- Cronómetro de laboratorio.
- Cubeta de geles de agarosa y fuente de electroforesis.
- Equipo de extracción de ácidos nucleicos Maxwell.
- Espectrofotómetro de luz ultravioleta para cuantificar DNA.
- Frigorífico de $+4^{\circ}\text{C}$.
- Microcentrífuga.
- pHmetro.
- Pipetas de precisión adecuadas.
- Secadora de ácidos nucleicos.
- Termociclador.
- Transiluminador de luz ultravioleta.

Materiales y reactivos necesarios

- Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA purification kit.
- Agua destilada calidad farmacéutica.
- Tampón sin MgCl_2 10X.
- Solución de MgCl_2 25 mM
- Solución de dNTPS.
- Primers (cebadores)
- Taq polimerasa
- Patrón de pares de bases
- Control positivo de ADN extraído del agente investigado o de un plásmido con el inserto de la diana elegida.
- Agarosa
- Tampón TE 1X para diluir los primers-cebadores.

- Tampón TBE 10X.
- Etanol absoluto.
- Microtubos de polipropileno de 1,5 a 2 mL de capacidad.
- Microtubos de polipropileno de 0,2 mL
- Puntas de pipetas de precisión.

a) Extracción del ADN

La extracción de ADN de las muestras se llevó a cabo mediante el equipo de extracción automática Maxwell 16 ® (Promega) usando para ello el kit Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA purification kit ®.

b) Controles

Se utilizaron distintos controles para comprobar la existencia de ADN tras su extracción, la contaminación de la muestra o la ausencia de inhibidores:

-Control positivo: ADN extraído de muestras positivas previas.

-Control blanco: agua en lugar de ADN extraído (es un control de contaminación ambiental).

-Control de ausencia de inhibidores: se realiza una *PCR* de β -actina a la muestra recibida:

Si la *PCR* de β -actina es positiva se considerará que la muestra no tiene inhibidores y se aceptará el resultado de la *PCR* de la muestra.

Si la *PCR* de β -actina es negativa no se acepta el resultado de la muestra y se procede a extraer de nuevo la muestra y los controles. Se repite *PCR* de β -actina y *PCR* de muestra.

Si vuelve a obtenerse la *PCR* de β -actina negativa se considerará que la muestra contiene inhibidores de la reacción *PCR* y se informará en este sentido.

c) Amplificación:Primera amplificación:

Preparación de la mezcla de amplificación:

	Volumen por tubo (μL)	Concentración final 1X
ADN	2,5 μL de ADN a la concentración 50 ng/ μL	
Agua destilada estéril	11,9 μL	-
Tampón 5X sin MgCl_2	5 μL	10 mM Tris·HCl 50 mM KCl; 0,1% tritón X-100
MgCl_2 25 mM*	3,5 μL	3,5 mM
DNTPs (25 mM de cada uno) mezclados	0,2 μL	200 μM de cada uno
DMSO	1,25 μL	
Primer 1 – 100 μM HPV-1p	0,2 μL	0,75 μM
Primer 2 – 100 μM HPV-2p	0,2 μL	0,75 μM
Taq polimerasa -5U/ μL	0,25 μL	1,25 U/tubo
	25 μL (1X)	25 μL (1X)

Programa de primera amplificación (con termocicladores calibrados)

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1-Desnaturalización inicial	95°	5 min	1
2-Desnaturalización en ciclos	94°	1,5 min	45
3-Apareamiento	50°	1,5 min	
4-Extensión	72°	1,5 min	
5- Extensión final	72°	5 min	1

Segunda amplificación (nested/anidada)

Preparación de la mezcla de amplificación:

Componente	Volumen por tubo (μL)	Concentración final 1X
ADN de primera amplificación	Se pondrán 2,5 μL de ADN de primera amplificación	-
Agua destilada estéril	11,9 μL	-
Tampón 5X sin MgCl_2	5 μL	10 mM Tris·HCl 50 mM KCl; 0,1% tritón X-100
MgCl_2 25 mM*	3,5 μL	3,5 μM
DNTPs (25 mM de cada uno) Mezclados	0,2 μL	0,2 mM de cada uno
DMSO	1,25 μL	
Primer 1 – 100 μM HPD-3p	0,2 μL	0,75 μM
Primer 2 – 100 μM HPV-4p	0,2 μL	0,75 μM
Taq polimerasa-5U/ μL	0,25 μL	1,25 U/tubo
	25 μL (1X)	25 μL (1X)

Programa de segunda amplificación (con termocicladores calibrados):

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1-Desnaturalización inicial	95°	5 min	1
2-Desnaturalización en ciclos	94°	1,5 min	30
3-Apareamiento	50°	1,5 min	
4-Extensión	72°	1,5 min	
5- Extensión final	72°	5 min	1

Se empleó 100 ng de ADN para la amplificación en un volumen final de 25 μ L (para las dos amplificaciones) con 3,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM Tris HCL, 50 mM KCL, 0,1% tritón X-100, 0,2 mM de cada uno de los dNTPs (Promega®), 0,75 μ M de cada cebador, DMSO al 5% y 1,25 U Taq DNA polimerasa (Promega®). Desde la primera a la segunda amplificación se traspasaron 2,5 μ L. La primera amplificación constó de 45 ciclos de amplificación de 94°C de desnaturalización (1,5 minutos), 50°C de apareamiento (1,5 minutos) y 72°C de extensión (1,5 minutos). La segunda amplificación constó de 30 ciclos de amplificación de 94°C de desnaturalización (1,5 minutos), 50°C de apareamiento (1,5 minutos) y 72°C de extensión (1,5 minutos).

d) Cebadores

Papillomavirus (HPV) (DNA) Region L1	HPV-1-p	Sense	Forslund, 1999	5'- TAA CWG TIG GIC AYC CWT ATT -3'
Papillomavirus (HPV) (DNA) Region L1	HPV-2-p	AntiSense	Forslund, 1999	5'-CCW ATA TCW VHCATI TCI CCATC-3'
Papillomavirus (HPV) (DNA) Region L1	HPV-3-p	Sense	Forslund, 2003	5'- CCW GAT CCH AAT MRR TTT GC -3'
Papillomavirus (HPV) (DNA) Region L1	HPV-4-p	AntiSense	Forslund, 2003	5'- ACA TTT GIA ITT G TDG GRT CAA-3'

Los cebadores utilizados en la primera amplificación corresponden a los descritos en la literatura con nombre FAP59 y FAP64, con posiciones situadas en los nucleótidos 5981 a 6001 (iniciador cadena directa, FAP59) y 6458 a 6436 (iniciador cadena complementaria, FAP64)⁹⁶. Los cebadores utilizados en la segunda amplificación corresponden a los descritos en la literatura con nombre FAP 6085F y FAP6319R, con posiciones situadas en los nucleótidos 6085 a 6104 (iniciador cadena directa, FAP6085F) y 6319 a 6296 (iniciador cadena complementaria, FAP6319R)⁸³. La posición de estos primers están referidas al genoma de HPV-8.

e) Lectura de resultado en gel de agarosa

La detección del amplificado de 235 pares de bases se realizó en gel de agarosa al 3%.

Preparación del gel

Para preparar el gel de agarosa se utilizó una solución de agarosa (**Pronadisa D-5** ó BioRad ref. M-3562) al 3 % en tampón TBE 1X.

La disolución de la agarosa es efectuada por calentamiento en un matraz Erlenmeyer hasta la ebullición en un microondas.

Una vez disuelta la agarosa, se agregan 10 µL por cada 100 mL de gel o tampón de una solución de SYBR Green II (Real Safe, Durviz-Real, ref. RBM Safe), para obtener una concentración final en el gel de 1X. La solución original es de 20.000X.

La solución de agarosa en tampón TBE conteniendo el colorante mencionado se dispensa sobre una placas de diferentes tamaños (1 x 15 x 15 ó 1 x 15 x 20 para geles normales, y 0,2 x 6 x 7,5 para minigeles), en la que se coloca previamente un peine (Bio-Rad ref. 170-4323) para formar pocillos donde depositar la muestra, y se deja solidificar por enfriamiento.

Al gel solidificado en el soporte se le retira el peine y se introduce en la cubeta horizontal para electroforesis de ácidos nucleicos, de forma que quede cubierto por tampón TBE 1X. Es muy importante que a los geles no les de en ningún momento la luz directamente.

Colocación de las muestras

Se depositan 10 μL de las muestras amplificadas y suspendidas en tampón de muestra (carga) en los pocillos respectivos elaborados en el gel. Para mezclar las muestras amplificadas con el tampón de muestra puede procederse a colocar 1 μL de este tampón sobre una hoja de papel encerado (parafilm), y sobre ellos mezclar el volumen de amplificación que vaya a depositarse en el pocillo del gel.

Se utiliza un control de peso molecular. Este control es “100 pb DNA ladder” (Invitrogen cat. 15625-019), que corresponde a fragmentos de ADN entre 100 pb y 2000 pb con diferencias de 100 pb.

También se dispone en el laboratorio de Biomarker EXT. Las bandas visualizadas son 50, 100, 200, 300, 400, 500, 525, 700, 1000, 1500, 2000.

Tras la carga del gel se efectúa la electroforesis a 5 V/cm (100 V) hasta que el azul de bromofenol haya avanzado lo suficiente para poder observar correctamente la banda.

Al finalizar visualizaremos en gel de agarosa al 3% la existencia de amplicones de 235-pb. El amplicón de la β -actina humana es de 381-pb.

Observación en transiluminador U.V.

Una vez efectuada la electroforesis los geles son visualizados en un transiluminador U.V. de 320 nm de longitud de onda, observándose, cuando existen amplificadas, la aparición de unas bandas fluorescentes, que representan los amplificados de DNA teñidos con SYBR Green II.

Criterios de aprobación y rechazo

No se considerará válida ninguna prueba cuando no haya resultado positivo la muestra introducida como control positivo (plásmido con un inserto de la secuencia genómica diana, o de ADN de la cepa de referencia).

No se considerará válida ninguna prueba realizada cuando se haya observado algún amplicón en el control negativo (blanco).

Son requisitos imprescindibles obtener un resultado positivo de un tamaño de amplicón acorde con el tamaño previsto, y que el control negativo (blanco), no haya producido ninguna amplificación.

f) Secuenciación

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L mediante BigDye Terminador v3.1 Cycle sequencing kit® (Applied Biosystems)

La reacción de secuenciación se realiza sintetizando nuevas moléculas de ADN mediante una amplificación en la que se incorporan dideoxynucleótidos terminales marcados con un fluorocromo de emisión de color distinta.

Se utiliza una mezcla enzimática de la firma Applied Biosystems (ref. 4336917) que contiene la enzima AmpliTaq DNA polimerasa y todos los componentes necesarios, a excepción del primer-cebador específico para cada secuencia. Esta mezcla de reacción contiene los dideoxynucleótidos terminadores marcados que permiten detectar las nuevas moléculas de ADN sintetizadas mediante un lector láser. Actualmente se utilizan nucleótidos terminadores marcados con *Big-Dye*.

Como primers-cebadores para la reacción de secuenciación se utilizan los mismos que se emplearon para la segunda amplificación, denominados respectivamente *sense* o *antisense* según la cadena que vaya a secuenciarse.

Las cadenas de ADN sintetizado, y detenidas prematuramente al incorporarse los didesoxinucleótidos terminales, se separan según su longitud en un capilar del aparato Applied Biosystems ABI Prism 310 (electroforésis en capilar).

Para la separación se dispone de dos tipos de capilar:

- Un capilar corto, que permite separar fragmentos de ADN aproximadamente hasta 400 pares de bases.
- Un capilar largo, que permite separar fragmentos de ADN aproximadamente hasta 600 pares de bases

La electroforesis es realizada de modo automático por el secuenciador.

Instrumental necesario para la secuenciación

- Secuenciador ABI-Prism 310.
- Microcentrífuga.
- Pipetas de precisión.
- Estufa de 37°C.
- Recipiente metálico para hervir.

Materiales y reactivos necesarios para la secuenciación

- Etanol absoluto.
- Etanol 70%
- Agua destilada estéril calidad farmacéutica.

- DMSO (dimetilsulfóxido)
- Big-dyes Ref. Applied Biosystems 4336917.
- Primers-cebadores según el agente a secuenciar diluidos a 10 μM (1X la concentración de uso).
- Microtubos de polipropileno estériles de 1,5 mL tipo Eppendorf.
- Formamida desionizada (Applied Biosystem ref 4311320).

Programas de secuenciación (con termocicladores calibrados)

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1-Desnaturalización inicial	94°C	4 min	1
2-Desnaturalización en ciclos	96°	10 seg	25
3-Apareamiento	50°C	10 seg	
4-Extensión	60°C	2 min	
5- Conservación	4°C	Indefinido	1

g) Purificación del ADN marcado

El nuevo ADN sintetizado se purifica por precipitación para eliminar los dideoxinucleótidos marcados no incorporados durante la reacción de secuenciación.

h) Análisis de la secuencia

Una vez obtenida la secuencia se realiza la comparación con la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnological Investigation*) usando el algoritmo blast-n.

3- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

El riesgo de cáncer de piel se examinó utilizando la presencia de CCNM como punto final. El número de persona-año en riesgo fue calculado desde la fecha del trasplante hasta la fecha del primer CCNM o fin del estudio. Las variables continuas se expresaron como mínima, mediana y valores máximos. Las variables nominales se expresaron en valores absolutos y porcentajes.

ESTADÍSTICA ANALÍTICA

Se utilizó el paquete estadístico SPSS v.19 software para el análisis estadístico. La incidencia acumulada de cáncer cutáneo fue calculada usando el método de *kaplan-Meier*.

La relación estadística entre el riesgo de desarrollar cáncer de piel y los factores de riesgo estudiados se evaluó mediante análisis univariado. Para finalmente identificar el riesgo individual de cada uno de estos factores se realizó un análisis multivariante utilizando el modelo de riesgos proporcionales de *Cox*. Un P-valor <0.05 fue considerado significativo.

ESTUDIO VPH

Este estudio se diseñó como un estudio prospectivo de casos y controles.

Las variables categóricas se expresaron como frecuencias y porcentajes y las variables continuas como media y desviación estándar (DS). Las diferencias en la distribución de las variables entre los grupos fueron evaluados con la prueba *Chi* cuadrado (χ^2) o prueba exacta de *Fisher* para la variables categóricas y el análisis

de la varianza (ANOVA) para los datos continuos. *Odds ratio* (OR) e intervalos de confianza (CI) del 95% fueron calculados. OR se estimó también ajustado a la exposición solar ocupacional, fototipo y localización de la muestra. Se utilizó un análisis de regresión logística múltiple para identificar las variables de forma independiente asociadas a la presencia de VPH en las muestras de piel. Los análisis se realizaron también con el paquete estadístico SPSS, v19. La significación estadística se fijó en $P < 0,05$.

4- ANEXOS

ANEXO 1

A la atención médico **especialista en Dermatología:**

Estimado compañero/a, estamos realizando un estudio sobre la patología cutánea tumoral en pacientes trasplantados renales.

Agradeceríamos que nos facilitarais la siguiente información sobre el paciente:

Controlado en el Servicio de Dermatología _____

1-Historia previa de verrugas (si/no, tratamiento y fecha aproximada)

2-Lesiones premalignas cutáneas (tipo, localización, tratamiento y fecha aproximada)

3-Tumores cutáneos (tipo, localización, tratamiento y fecha aproximada)

ANEXO 2

A la atención médico **especialista en Nefrología:**

Estimado compañero/a, estamos realizando un estudio sobre la patología cutánea tumoral en pacientes trasplantados renales.

Agradeceríamos que nos facilitarais la siguiente información sobre el paciente:

Controlado en el Servicio de Nefrología :

-Causa de la insuficiencia renal:

Glomerular/intersticial/diabetes/vascular/poliquistosis/otras

-Años de diálisis previo al trasplante:

-Tipo de diálisis:

Hemodiálisis/d. peritoneal/ambas

-Año del trasplante:

-Compatibilidades HLA donante/receptor :

-Tratamiento inmunosupresor actual y dosis:

-Tratamiento inmunosupresor inicial:

ANEXO 3: Cuaderno de recogida de datos

1-Datos Personales

- Nombre:
- SIP/NHC:
- Sexo/edad:
- Teléfono:
- Nacionalidad:
- Medio: rural/urbano
- Fototipo (según Fitzpatrick): I, II , III, IV, V y VI
- Color de ojos:
- Profesión:
- Exposición solar ocupacional: alta / baja
- Uso de medidas de Fotoprotección: si / no

2-Antecedentes médicos de interés

- Fumador: si / no
- Bebedor: si / no
- Antecedentes familiares de cancer:

3-Trasplante renal

- Causa de la insuficiencia renal: glomerular/ intersticial/ diabetes/ vascular/ poliquistosis/ otras
- Diálisis previa al trasplante: si/no duración Tipo: hemod/d.peritoneal
- Año trasplante:
- Edad en el momento del trasplante:
- HLA donante:
- HLA receptor:
- Compatibilidad:

4-Tratamiento:

-Tratamiento inmunosupresor de mantenimiento principal:

-Tratamiento de inducción:

5-Patología dermatológica

-Antes del trasplante:

-Lesiones precancerosas, localización y tratamiento:

-Tumores cutáneos, localización y tratamiento:

-Verrugas:

-Periodicidad consulta dermatológica:

-Seguimiento en :

-Después del trasplante:

-Lesiones precancerosas:

-Verrugas:.

-Periodicidad consulta dermatológica:

-Seguimiento en:

6-Patología maligna cutánea después del trasplante

-Fecha de aparición: Edad: Años tras el trasplante:

-Localización : Area fotoexpuesta/Area no fotoexpuesta:

-Diagnóstico histológico:

-Tratamiento:

-Evolución: favorable /recidiva/metástasis

ANEXO 4: Revisiones sucesivas semestrales

Revisiones sucesivas semestrales

Nombre:

SIP:

Fecha:

Presencia de lesiones cutáneas nuevas: si/no

-Fecha de aparición:

-Edad:

-Años tras el trasplante:

-Localización : Area fotoexpuesta/Area no fotoexpuesta:

-Diagnóstico histológico:

-Tratamiento:

-Evolución: favorable/recidiva/metástasis

ANEXO 5: CONSENTIMIENTO INFORMADO pacientes trasplantados

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

TITULO DEL ESTUDIO: “Estudio del cáncer cutáneo no melanoma en pacientes trasplantados renales: prevalencia, incidencia y factores de riesgo asociados”.

INVESTIGADOR: Nombre: Dra. Josefa Bernat García

Dirección: Hospital Universitario Dr.Peset; Servicio de Dermatología

Avda. Gaspar Aguilar, 90; 46017 Valencia

INTRODUCCIÓN

Los pacientes trasplantados renales muestran una mayor predisposición al desarrollo de tumores cutáneos, siendo este tipo de tumores los más frecuentes en estos pacientes.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que en estos pacientes existe una asociación estrecha entre el desarrollo de tumores cutáneos y diversos factores, entre los más importantes el tratamiento inmunosupresor, la exposición solar, las infecciones víricas, en concreto la infección por el virus del papiloma humano, la edad o factores genéticos e inmunológicos.

Con el presente estudio pretendemos identificar los factores asociados al desarrollo de tumores cutáneos en pacientes trasplantados renales así como mejorar las medidas preventivas y optimizar el manejo de estos pacientes en base a los resultados obtenidos.

Le pedimos que participe en este estudio, como paciente trasplantado renal. Por favor, lea atentamente este documento de consentimiento. Si decide que quiere participar en este estudio le pedimos que firme el consentimiento para confirmar que ha sido informado sobre este estudio, que se ha contestado a todas sus preguntas y que acepta participar.

Usted recibirá una copia del formulario de consentimiento firmado.

INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO, PROCEDIMIENTOS Y RESPONSABILIDADES DEL PACIENTE

Este estudio incluirá todos aquellos pacientes que hayan sido trasplantados renales en el desde 1996 hasta 2010 y que deseen participar voluntariamente.

En una primera visita se le realizará al paciente una encuesta personal sobre antecedentes médicos, exposición solar y características sociolaborales así como una inspección cutánea completa y una revisión de su historia nefrológica.

Las visitas de seguimiento se programaran cada 6-12 meses hasta la finalización del estudio (aproximadamente durante 2 años de seguimiento). En estas visitas de seguimiento se realizará una exploración cutánea completa.

Tanto en la visita inicial como en las visitas de seguimiento si se detectan lesiones cutáneas sugestivas de malignidad o premalignidad éstas se tratarán de forma pertinente. Por ello es importante que en estas visitas nos indique si ha aparecido alguna lesión cutánea nueva o se ha modificado alguna lesión preexistente.

Con el fin de determinar el papel etiológico del virus del papiloma humano en los tumores cutáneos determinaremos en las nuevas lesiones cutáneas su presencia con técnica de PCR en la pieza de biopsia o exéresis y en piel perilesional, comparándolo con un grupo control en pacientes no inmunodeprimidos con lesiones de características similares.

GASTOS y PAGO POR LA PARTICIPACIÓN

La participación en el estudio no le supondrá coste alguno. Usted no recibirá ninguna compensación económica, ni directa ni indirecta, por participar en este estudio.

PREGUNTAS

Si tiene cualquier pregunta relacionada con su participación en este estudio, póngase en contacto con: Dra. Josefa Bernat García; e-mail: josefabernat@hotmail.com
Teléfono de contacto: 961622496 (lunes a viernes de 9:00-14:00 h)

CONFIDENCIALIDAD

La información recogida en este estudio será empleada para identificar posibles factores de riesgo asociados al desarrollo de tumores cutáneos y para la búsqueda de medidas preventivas y optimización del manejo de los tumores cutáneos en pacientes trasplantados en base a los resultados obtenidos.

Sus datos personales serán tratados y custodiados con respeto a su intimidad y según la vigente normativa de protección de datos.

Los documentos e información que de usted pudieran recogerse durante la realización del estudio se manejarán de forma estrictamente confidencial. Por tanto la publicación de los resultados del estudio en ningún caso podrá permitir su identificación.

Conforme a las disposiciones legales, usted tiene derecho a conocer los datos del estudio que sobre usted se recojan, a obtener una copia, y a conocer el uso que puedan darse a los mismos. Dicha información le será suministrada por el investigador.

ABANDONO/PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted tiene derecho a no participar en este estudio y si participa, tiene derecho a retirar su consentimiento y suspender su participación en cualquier momento. En ninguno de los dos casos su decisión supondrá perjuicio alguno ni pérdida de beneficios a los que legítimamente tiene derecho en el cuidado de su salud.

Si decide suspender su participación en el estudio debe informar primero a su médico del estudio.

CONSENTIMIENTO

He leído esta información. Mis preguntas han sido contestadas y por ello firmo este consentimiento informado de forma voluntaria para MANIFESTAR MI DESEO DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN titulado ““Estudio del cáncer cutáneo no melanoma en pacientes trasplantados renales: prevalencia, incidencia y factores de riesgo asociados””.

Así mismo recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento. Con la firma de este formulario de consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos legales. Al firmar este impreso de consentimiento informado, yo en mi propio nombre autorizo al acceso a mis datos clínicos en los términos expuestos en este documento.

Firma del paciente:

Nombre del paciente:

Firma del investigador:

Fecha:

ANEXO 6: Entrevista controles

Nombre:

SIP:

Fecha:

-Edad:

-Sexo:

-Fototipo:

-Exposición solar ocupacional:

-Historia pasada o actual de verrugas:

-Historia pasada o actual de queratosis actínicas:

-Diagnóstico histológico:

-Localización : Area fotoexpuesta/Area no fotoexpuesta

ANEXO 7: CONSENTIMIENTO INFORMADO GRUPO CONTROL

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

PACIENTES CONTROL

TÍTULO DEL ESTUDIO: “Estudio del cáncer cutáneo no melanoma en pacientes trasplantados renales: prevalencia, incidencia y factores de riesgo asociados”.

INVESTIGADOR: Nombre: Dra. Josefa Bernat García

Dirección: Hospital Universitario Dr. Peset; Servicio de Dermatología

INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO

Los pacientes trasplantados renales muestran una mayor predisposición al desarrollo de tumores cutáneos, siendo este tipo de tumores los más frecuentes en estos pacientes.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que en estos pacientes existe una asociación estrecha entre el desarrollo de tumores cutáneos y diversos factores, entre los más importantes el tratamiento inmunosupresor, la exposición solar, **las infecciones víricas, en concreto la infección por el virus del papiloma humano**, la edad o factores genéticos e inmunológicos.

Dado que la presencia de un virus en tejido tumoral no es evidencia suficiente para demostrar la causalidad, para comprobar la relación entre cáncer cutáneo y infección por el virus del papiloma humano son necesarios más estudios epidemiológicos, de niveles de infección por virus del papiloma en casos (pacientes trasplantados renales) y controles (pacientes no inmunodeprimidos) así como estudios de seguimiento que establezcan la relación temporal entre infección y cáncer.

Con el fin de determinar el papel etiológico del virus del papiloma humano en los tumores cutáneos determinaremos su presencia con técnica de PCR en la pieza de biopsia o exéresis comparándolo con un grupo control en pacientes no inmunodeprimidos con lesiones de características similares

Le pedimos que participe en este estudio, como paciente control no inmunodeprimido. Si decide que quiere participar en este estudio le pedimos que firme el consentimiento para confirmar que ha sido informado sobre este estudio, que se ha contestado a todas sus preguntas y que acepta participar.

Usted recibirá una copia del formulario de consentimiento firmado.

GASTOS y PAGO POR LA PARTICIPACIÓN

La participación en el estudio no le supondrá coste alguno. Usted no recibirá ninguna compensación económica, ni directa ni indirecta, por participar en este estudio.

PREGUNTAS

Si tiene cualquier pregunta relacionada con su participación en este estudio, póngase en contacto con:

Dra. Josefa Bernat García; e-mail: josefabernat@hotmail.com

Teléfono de contacto: 961622496 (lunes a viernes de 9:00-14:00 h)

CONFIDENCIALIDAD

La información recogida en este estudio será empleada para identificar posibles factores de riesgo asociados al desarrollo de tumores cutáneos y para la búsqueda de medidas preventivas y optimización del manejo de los tumores cutáneos en base a los resultados obtenidos.

Sus datos personales serán tratados y custodiados con respeto a su intimidad y según la vigente normativa de protección de datos.

Los documentos e información que de usted pudieran recogerse durante la realización del estudio se manejarán de forma estrictamente confidencial. Por tanto la publicación de los resultados del estudio en ningún caso podrá permitir su identificación.

Conforme a las disposiciones legales, usted tiene derecho a conocer los datos del estudio que sobre usted se recojan, a obtener una copia, y a conocer el uso que puedan darse a los mismos. Dicha información le será suministrada por el investigador.

ABANDONO/PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted tiene derecho a no participar en este estudio y si participa, tiene derecho a retirar su consentimiento y suspender su participación en cualquier momento. En ninguno de los dos casos su decisión supondrá perjuicio alguno ni pérdida de beneficios a los que legítimamente tiene derecho en el cuidado de su salud.

Si decide suspender su participación en el estudio debe informar primero a su médico del estudio.

CONSENTIMIENTO

He leído esta información. Mis preguntas han sido contestadas y por ello firmo este consentimiento informado de forma voluntaria para MANIFESTAR MI DESEO DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN titulado ““Estudio del cáncer cutáneo no melanoma en pacientes trasplantados renales: prevalencia, incidencia y factores de riesgo asociados””.

Así mismo recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento.

Con la firma de este formulario de consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos legales. Al firmar este impreso de consentimiento informado, yo en mi propio nombre autorizo al acceso a mis datos clínicos en los términos expuestos en este documento.

Nombre del paciente

Firma del paciente:

RESULTADOS

Recogimos los datos de 305 pacientes trasplantados renales desde enero 1996 hasta diciembre 2010. Excluimos a 16 pacientes (15 pacientes por haber recibido más de un trasplante y 1 paciente por muerte durante el seguimiento), por lo que el total de pacientes incluidos en el estudio fue de 289 pacientes.

Detallaremos en primer lugar los datos sobre incidencia acumulada y distribución de los diferentes CCNM diagnosticados. A continuación se analizarán los diferentes factores de riesgo estudiados por análisis univariado, posteriormente se mostrarán los factores implicados en la aparición de CCNM en el análisis multivariante. Finalmente mostraremos los resultados del estudio del VPH.

I. INCIDENCIA ACUMULADA.

La incidencia acumulada para desarrollar cáncer de piel mostró una curva ascendente pasando del 20'78% a los 5 años, al 37'35% a los 10 años del trasplante hasta el 53'08% a los 15 años del trasplante (figura 3)

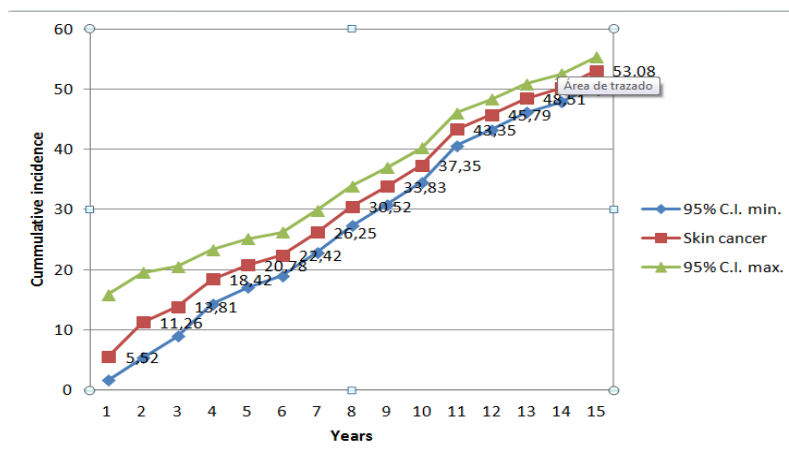


Figura 3: Incidencia acumulada

II. DISTRIBUCIÓN y EVOLUCIÓN DEL CCNM

De los 289 pacientes, 73 pacientes (25.2%) desarrollaron un total de 162 CCNM, de los cuales 41 fueron CEC, 92 CBC, 25 enfermedad de Bowen y 4 queratoacantomas (tabla 4). La relación CBC/CEC fue de 2.24:1.

De los 73 pacientes que desarrollaron CCNM, 38 pacientes solo desarrollaron 1 tumor, 30 pacientes tenían entre 2 y 5 tumores y 5 pacientes desarrollaron más de 5 tumores (tabla 5). De los 289 pacientes, 10 pacientes habían desarrollado algún CCNM antes del trasplante; 5 de estos 10 pacientes siguieron desarrollando CCNM después del trasplante.

El tiempo medio desde el trasplante hasta el diagnóstico del primer CCNM fue 58.8 meses.

Los tumores aparecieron predominantemente en zonas expuestas al sol (cabeza, cuello y región distal de brazos). El 20% de los tumores aparecieron en zonas no fotoexpuestas.

Tabla 4- Número y tipo de CCNM diagnosticados

	Pacientes con CCNM n=73	Número de CCNM n=162
CEC	22	41
CBC	49	92
Bowen	19	25
Queratoacantoma	4	4

El número de pacientes con al menos un CCNM fue 73. El número de pacientes en los respectivos grupos es mayor porque algunos de los pacientes tuvieron más de un tipo de tumor.

Tabla 5- Número de tumores por paciente

	Pacientes
1 CCNM	38
2-5 CCNM	30
>5 CCNM	5
Total	73

En cuanto a la **evolución** de los pacientes, comentar la ausencia de complicaciones graves en los CCNM de nuestra serie. Ningún paciente desarrolló metástasis por CCNM o muerte por evolución del tumor cutáneo. Destacar la presencia de recidivas tumorales en 3 de los 41 CEC (7.3%) y 2 de los 91 CBC (2.2%).

III. FACTORES DE RIESGO

1- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

Se incluyeron 289 pacientes, 170 varones y 119 mujeres. El tiempo medio de seguimiento fue de 72 meses (rango 12-180). La edad media en el momento del trasplante fue de 52.2 años (rango 13-78).

Las características clínicas y demográficas de la población estudiada se muestran en la tabla 6.

Tabla 6- Características demográficas

	CANCER CUTÁNEO	
	Sin CCNM (n=216)	Con CCNM (n=73)
Edad en momento trasplante (a)	51 (13-73)	56 (34-78)
Tiempo de seguimiento (a)	5 (1-15)	10 (1-15)
Sexo (%)		
Mujer	90 (41.7)	29 (39.7)
Hombre	126 (58.3)	44 (60.3)
Fototipo		
I-II	106 (49.1)	55 (75.3)
≥III	110 (50.9)	18 (24.7)
Color de ojos		
claros	51 (23.6)	28 (38.4)
oscuros	165 (76.4)	45 (61.6)

a: años

En el análisis estadístico no se encontraron diferencias en la incidencia de CCNM al comparar el sexo de los pacientes. En el análisis univariado la edad en el momento del trasplante (aumento del riesgo de CCNM a mayor edad en el momento del trasplante), los fototipos más bajos y el color de ojos claro mostraron mayor riesgo de tumores.

Tabla 7- Análisis univariado. Características demográficas

	Univariado Riesgo relativo	95% Intervalo de confianza	p-valor
Edad en el momento del trasplante (a)	1.09	1.06-1.12	<0.001
Sexo			
Masculino	Ref.		
Femenino	0.96	0.60-1.54	0.879
Fototipo			
I-II	Ref.		
≥III	0.55	0.32-0.94	0.029
Color de ojos			
Claros	Ref.		
Oscuros	0.57	0.36-0.91	0.021

Ref: referencia

2- VARIABLES RELACIONADAS CON LA EXPOSICIÓN SOLAR, HÁBITOS TÓXICOS E HISTORIA FAMILIAR

Dividimos la exposición solar ocupacional pretrasplante en alta o baja, considerándola alta cuando el paciente había trabajado más de tres años al aire libre previo al trasplante (según estudios previos²).

La historia familiar positiva de cáncer se determinó cuando un familiar de primer grado había sido diagnosticado de cáncer (cutáneo o no cutáneo) previo al trasplante.

Tabla 8- Exposición solar, hábitos tóxicos y antecedentes familiares

		CANCER DE PIEL	
		Sin CCNM (n=216)	Con CCNM (n=73)
Exposición solar ocupacional	Baja	209 (96.8)	29 (39.7)
	Alta	7 (3.2)	44 (60.3)
Hábito tabáquico	Ex-fumador	97 (44.9)	29 (39.7)
	No	90 (41.7)	34 (46.6)
	Si	28 (13.0)	10 (13.7)
Consumo de alcohol	Ex -alcoholico	6 (2.8)	3 (4.1)
	No	205 (95.9)	70 (95.9)
	Si	4 (1.9)	0 (0)
Historia familiar de cancer	No	113 (52.3)	35 (47.9)
	Si	103 (47.7)	37 (50.7)

En el análisis univariado solo la exposición ocupacional alta previa al trasplante se asoció a mayor riesgo de CCNM.

Tabla 9-Análisis univariado. Exposición solar, hábitos tóxicos y antecedentes familiares

		Univariado Riesgo Relativo	95% Intervalo de confianza	p-valor
Exposición solar ocupacional	Baja	Ref.		
	Alta	4.36	2.71-7.01	<0.001
Hábito tabáquico	No	Ref.		
	Ex -fumador	1.18	0.58-2.40	0.638
	Si	1.07	0.52-2.14	0.839
Consumo de alcohol	No	Ref.		
	Ex -alcoholico	1.19	0.37-3.80	0.764
	Si	-	-	0.973
Historia familiar de cancer	No	Ref.		
	Si	1.07	0.67-1.70	0.766

3- VARIABLES RELACIONADAS CON LA PATOLOGÍA RENAL Y TRASPLANTE.

El tiempo medio de diálisis en los dos grupos (pacientes con y sin CCNM) fue de 3 años, siendo el tipo de diálisis más frecuente en ambos grupos la hemodiálisis.

La causa conocida más frecuente de insuficiencia renal en pacientes sin CCNM fue la causa glomerular, en pacientes con CCNM la causa renal glomerular y riñones poliquisticos tuvieron una misma prevalencia, aunque en general la causa del fallo renal más frecuente fue la idiopática en el contexto de nefroangiosclerosis renal.

La mayoría de receptores presentaron tres o cuatro compatibilidades HLA.

Tabla 10- Patología renal y trasplante

		Cáncer de piel	
		Sin CCNM (n=216)	Con CCNM (n=73)
Diálisis (años)		3(1-13)	3 (1-10)
Causa enfermedad renal	Glomerular	52 (24.2)	13 (17.8)
	Intersticial	17 (7.9)	6 (8.2)
	Diabetes	5 (2.3)	1 (1.4)
	Vascular	1 (0.5)	0 (0)
	Poliquistosis	34 (15.8)	13 (17.8)
	Otras	106 (49.3)	40 (54.8)
Tipo de diálisis	Hemodiálisis	153 (70.8)	58 (79.5)
	Peritoneal	46 (21.3)	6 (8.2)
	Ambas	16 (7.4)	9 (12.3)
Concordancias HLA	N.C	3 (1.5)	1 (1.5)
	Una o dos	40 (19.8)	16 (23.5)
	Tres o cuatro	99 (49.0)	29 (42.6)
	Cinco o más	60 (29.7)	22 (32.4)

N.C: no consta

En este apartado solo los pacientes con menor compatibilidad HLA mostraron mayor riesgo de CCNM en el análisis univariado.

Tabla 11- Análisis univariado. Patología renal y trasplante

		Univariado Riesgo Relativo	95% Intervalo de Confianza	p-valor
Años de diálisis		1.01	0.93-1.10	0.742
Tipo de diálisis	Hemodiálisis	Ref.		
	Peritoneal	0.76	0.32-1.78	0.528
	Ambas	1.43	0.70-2.89	0.319
Concordancias HLA	Cinco o más	Ref.		
	Tres o cuatro	1.55	0.86-2.79	0.137
	Una o dos	2.28	1.16-4.45	0.016

4- VARIABLES RELACIONADAS CON EL TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR.

TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN con ANTICUERPOS ANTILINFOCITARIOS MONO/POLICLONALES

Del total de 289 pacientes, 110 no llevaron tratamiento de inducción. 81 pacientes fueron tratados con basiliximab y 90 con timoglobulina®. 6 pacientes recibieron ATGAM®. Muromonab-CD3 solo se administró en dos pacientes.

Tabla 12- Tratamiento de inducción con anticuerpos antilinfocitarios

Tratamiento de inducción	Cáncer de piel	
	Sin CCNM (n=216)	Con CCNM (n=73)
No inducción	79 (36.6)	31 (42.5)
Basiliximab	65 (30.1)	16 (21.9)
Timoglobulina®	66 (30.6)	24 (34.9)
ATGAM®	4 (1.9)	2 (2.7)
Muromomab-CD3	2 (0.9)	0 (0)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos en cuanto a terapia de inducción.

Tabla 13- Análisis univariado. Tratamiento de inducción con anticuerpos antilinfocitarios

Tratamiento de inducción	Univariado Riesgo Relativo	95% Intervalo de confianza	p-valor
No inducción	Ref.		
Basiliximab	0.81	0.44-1.47	0.489
Timoglobulina®	0.89	0.52-1.52	0.667
ATGAM®	0.59	0.14-2.48	0.473
Muromonab-CD3	-	-	0.970

TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR DE MANTENIMIENTO

Dividimos el tratamiento inmunosupresor de mantenimiento en cuatro grupos:

A-Rapamicina/everolimus (inhibidores mTOR)+ micofenolato + prednisona

B-Tacrolimus+ micofenolato+ prednisona

C-Ciclosporina + micofenolato + prednisona

D-Otros (ciclosporina + azatioprina + prednisona...)

Una limitación a nuestro estudio fue la falta de homogeneidad entre los diferentes grupos de tratamiento. La terapia inmunosupresora más frecuente fue la combinación de tacrolimus con micofenolato. Solo 18 pacientes recibían tratamiento con inhibidores mTOR.

Durante el seguimiento 13 pacientes tratados con inhibidores de la calcineurina pasaron a tratarse con inhibidores mTOR (5 pacientes por aparición de CCNM y 8 pacientes por efectos tóxicos del tacrolimus). De los 5 pacientes con CCNM, 3 pacientes siguieron haciendo CCNM a los 24 meses del seguimiento a pesar del cambio de tratamiento inmunosupresor a inhibidores mTOR.

Tabla 14- Tratamiento inmunosupresor de mantenimiento

Tratamiento inmunosupresor	Cáncer de piel	
	Sin CCNM (n=216)	Con CCNM (n=73)
A	16 (7.4)	2 (2.7)
B	156 (72.2)	36 (49.3)
C	43 (19.9)	31 (42.5)
D	1 (0.5)	4 (5.5)

En el análisis univariado el grupo A (inhibidores mTOR + micofenolato) mostró una clara tendencia hacia un menor riesgo de CCNM, pero estos valores no alcanzaron significación estadística.

Tabla 15- Análisis univariado. Tratamiento inmunosupresor de mantenimiento

Tratamiento inmunosupresor	Univariado Riesgo Relativo	95% Intervalo de confianza	p-valor
A	Ref.		
B	1.85	0.44-7.75	0.394
C	1.41	0.34-5.98	0.636
D	1.76	0.32-9.72	0.516

5- VARIABLES RELACIONADAS CON ANTECEDENTES DE CCNM ANTES DEL TRASPLANTE, QUERATOSIS ACTÍNICAS Y VERRUGAS

Solo 10 pacientes habían tenido algún CCNM antes del trasplante. Cinco de estos 10 pacientes siguieron haciendo tumores después del trasplante. Después del trasplante 128 pacientes desarrollaron verrugas virales (5 en área genital, 40 palmoplantares y el resto en tronco y extremidades). La mayoría de los pacientes desarrollaron menos de 10 verrugas, sólo cinco pacientes desarrollaron más de 10 verrugas (de éstos 5 pacientes todos desarrollaron CCNM).

Tabla 16- CCNM antes del trasplante, verrugas y queratosis actínicas

		CCNM	
		Sin CCNM (n=216)	Con CCNM (n=73)
CCNM antes del trasplante	No	211 (97.7)	67 (91.8)
	Si	5 (2.3)	5 (6.8)
Verrugas antes trasplante	No	189 (87.5)	69 (94.5)
	Si	27 (12.5)	4 (5.5)
Verrugas después trasplante	No	115 (53.2)	46 (63.0)
	Si	101 (46.8)	27 (37.0)
Keratosis actinicas antes trasplante	No	115 (53.2)	46 (63.0)
	Si	101 (46.8)	27 (37.0)
Keratosis actinicas después trasplante	No	170 (78.7)	13 (17.8)
	Si	46 (21.3)	60 (82.2)

En el análisis univariado la presencia de CCNM y queratosis actinicas antes del trasplante, así como la presencia de verrugas y queratosis actínicas después del trasplante se asoció a un mayor riesgo de CCNM.

Tabla 17- Análisis univariado. CCNM antes del trasplante, verrugas y queratosis actínicas

		Univariado Riesgo Relativo	95% intervalo de confianza	p-valor
CCNM antes del trasplante	No	Ref.		
	Si	3.74	1.49-9.39	0.005
Verrugas antes del trasplante	No	Ref.		
	Si	1.20	0.80-1.99	0.468
Verrugas después del trasplante	No	Ref.		
	Si	1.40	1.11-1.78	0.006
Queratosis actínicas antes trasplante	No	Ref.		
	Si	3.76	1.49-9.46	0.005
Queratosis actínicas después trasplante	No	Ref.		
	Si	4.38	2.39-8.03	0.001

6- ANÁLISIS MULTIVARIANTE

En el análisis multivariante los factores asociados de forma definitiva con un mayor riesgo de CCNM fueron la edad en el momento del trasplante (a mayor edad, mayor riesgo), el fototipo (los pacientes con fototipos más bajos tuvieron mayor riesgo de CCNM) y la exposición ocupacional pretrasplante alta.

Según los resultados obtenidos podemos observar como a medida que aumenta en un año la edad del paciente en el momento del trasplante, el riesgo de desarrollar un CCNM se incrementa en 1.06.

Los fototipos altos tienen la mitad de riesgo de desarrollar CCNM que los pacientes con fototipos I/II.

El otro factor implicado fue la exposición ocupacional pretrasplante alta. Según el análisis multivariante los pacientes con exposición ocupacional alta tenían un riesgo 2.15 mayor de desarrollar un CCNM que los pacientes con exposición ocupacional baja.

Tabla 18- Análisis multivariante. Modelo de riesgos proporcionales de Cox

	Riesgo Relativo	95% Intervalo de confianza	p-valor
Edad en momento trasplante	1.06	1.03-1.09	0.001
Fototipo	0.50	0.27-0.92	0.026
Exposición solar ocupacional	2.15	1.25-3.71	0.006

III. ESTUDIO DEL VPH

1- CARACTERISITICAS DE LOS PACIENTES

Los casos y los controles fueron similares en edad y sexo. Los casos y controles tampoco difirieron significativamente con respecto a la exposición solar, localización del tumor, fototipo o historia de verrugas o queratosis actínicas. La tabla 19 resume las características de los pacientes inmunodeprimidos (casos) y los pacientes inmunocompetentes (controles).

Tabla 19- Características clínicas de los casos y los controles.

	Casos (n=30) n./total(%)	Controles (n=30) n./total(%)	p-valor
Edad (media años±DS)	69.57±7.61	72.53±12.57	0.247
Sexo			
Mujer	14/30 (46.6%)	16/30 (53.3%)	0.605
Hombre	16/30 (53.3%)	14/30 (46.6%)	
Exposición solar ocupac.			
Alta	10/30 (33.3%)	15/30 (50.0%)	0.190
Baja	20/30 (66.7%)	15/30 (50.0%)	
Localización tumor			
Zona Expuesta	22/30 (73.3%)	16/30 (53.3%)	0.108
Zona no expuesta	8/30 (26.7%)	14/30 (46.7%)	
Fototipo			
I/II	24/30 (80.0%)	22/30 (73.3%)	0.754
≥ III	6/30 (20%)	8/30 (23.6%)	
Queratosis actínicas	23/30 (76.7%)	20/30 (66.7%)	0.390
Verrugas	10/30 (33.3%)	8/30 (26.7%)	0.573

2- FACTORES DE RIESGO

La localización del tumor en áreas fotoexpuestas fue la única variable asociada de forma significativa a un mayor riesgo de VPH en los casos. En controles, la exposición ocupacional alta, la localización en áreas fotoexpuestas y el fototipo bajo fueron significativamente más frecuentes en los pacientes VPH positivos. En pacientes inmunodeprimidos el riesgo de positividad del VPH también fue mayor en pacientes con queratosis actínicas y verrugas pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En los controles, en cambio, la presencia de verrugas y queratosis actínicas no se asoció a un mayor riesgo de infección por VPH. En la tabla 20 se analizan los factores de riesgo para VPH en casos y controles.

	Casos			Controles			P valor
	VPH +	VPH-	OR	VPH +	VPH -	OR	
Edad, media en años (DS)	71.5±8.1	67.6±6.5	1.1 (0.9-1.2)	73.1±12.6	72.0±12.9	1.0 (0.9-1.7)	0.80
Sexo							
Mujer	7 (35.0%)	7 (70.0%)	Ref.	9 (64.3%)	7 (43.8%)	Ref.	0.08
Varón	13 (65.0%)	3 (30.0%)	4.3 (0.8-22.2)	5 (35.7%)	9 (56.3%)	0.4 (0.1-1.9)	
Exposición ocup.							
Baja	12 (60.0%)	8 (80.0%)	Ref.	4 (28.6%)	11 (68.8%)	Ref.	0.03
Alta	8 (40.0%)	2 (20.0%)	2.7 (0.5-15.9)	10 (71.4%)	5 (31.3%)	5.5 (1.2-26.4)	
Localización							
Zona no exp.	2 (10.0%)	6 (60.0%)	Ref.	2 (14.3%)	12 (75.0%)	Ref.	0.01
Zona expuesta	18 (90.0%)	4 (40.0%)	13.5 (1.9-93.2)	12 (85.7%)	4 (25.0%)	18.0 (2.8-117.7)	
Fototipo							
≥ III	3 (15.0%)	3 (30.0%)	Ref.	1 (7.1%)	7 (43.8)	Ref.	0.02
I-II	17 (85.0%)	7 (70.0%)	2.4 (0.4-15.1)	13 (92.9%)	9 (56.3)	10.9 (1.1-103.9)	
Queratosis actínicas							
No	4 (20.0%)	3 (30.0%)	Ref.	7 (50.0%)	6 (37.5%)	Ref.	0.37
Si	16 (80.0%)	7 (70.0%)	1.7 (0.3-9.8)	7 (50.0%)	10 (62.5%)	0.6 (0.1-2.6)	
Verrugas							
No	12 (60.0%)	8 (80.0%)	Ref.	10 (71.4,0%)	12 (75.0%)	Ref.	0.57
Si	8 (40.0%)	2 (20.0%)	2.7 (0.4-15.9)	4 (28.6%)	4 (25.0%)	0.4 (0.2-6.1)	

Tabla 20: Factores de riesgos para VPH en casos y controles

3- ESPECTRO y TIPADO VPH

Los tipos VPH del género β fueron los más frecuentes, encontrándose en 35/60 (58.3%) de las muestras de pacientes inmunodeprimidos y en 26/60 (43.3%) de las muestras de pacientes inmunocompetentes. Dentro del género VPH- β , la especie VPH- β 1 fue la más prevalente, siendo el tipo más frecuente el VPH-20, aunque sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos. Sólo detectamos una muestra con VPH- α en un control. VPH- γ mostró una fuerte asociación a pacientes inmunodeprimidos, aunque sin alcanzar significación estadística. En seis determinaciones la PCR para VPH fue positiva de forma débil no pudiéndose realizar la secuenciación al tener poca cantidad de ADN viral. Se detectaron cuatro muestras de VPH no clasificadas en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnological Investigation*).

Infecciones mixtas (por múltiples tipos de VPH) se detectaron en 29 de las 120 determinaciones, siendo más frecuentes en los casos (17/60) que en los controles (12/60). Las infecciones mixtas fueron más frecuentes en piel tumoral que en piel sana en los pacientes inmunodeprimidos (11 infecciones en piel tumoral frente 6 en piel perilesional). Encontramos el mismo número de infecciones mixtas en piel tumoral y piel sana en el grupo control (6 infecciones mixtas en lesiones y 6 en piel sana).

La distribución de los diferentes tipos de VPH detectados se resume en la tabla 21. En las tablas 22 y 23 se muestran los tipos y géneros detectados de forma individualizada en casos y controles

Tabla 21- Distribución VPH en casos (lesión y perilesión) y controles (lesión y perilesión).

	Casos (lesión y peril.) (n=60) n.(%)	Controles (lesión y peril.) (n=60) n.(%)	OR (95% CI)	OR* (95% CI)
Algún VPH	44 (73.3%)	32 (53.3%)	2.4 (1.1-5.2)	3.4 (1.2-9.6)
<i>α-Papillomavirus</i>	0	1 (1.7%)	-	-
<i>β-Papillomavirus</i>	35 (58.3%)	26 (43.3%)	1.8 (0.9-3.8)	1.5 (0.6-3.9)
1	14 (23.3%)	16 (26.7%)	0.8 (0.4-1.9)	0.5 (0.1-1.7)
2	11 (18.3%)	4 (6.7%)	3.1 (0.9-10.5)	1.8 (0.4-8.4)
3	7 (11.7%)	5 (8.3%)	1.5 (0.4-4.9)	1.0 (0.9-1.2)
4	1 (1.7%)	0	-	-
5	1 (1.7%)	1(1.7%)	1.0 (0.1-16.4)	0.8 (0.1-18.9)
<i>γ-Papillomavirus</i>	5 (8.3%)	1 (1.6%)	5.4 (0.6-47.4)	9.8 (0.9-101.9)
1	1 (1.6%)	0	-	-
6	1 (1.6%)	0	-	-
10	1 (1.6%)	0	-	-
NC-Papillomavirus	2 (3.3%)	2 (3.3%)	1.0 (0.1-7.3)	1.4 (0.1-17.7)

OR*ajustado a localización, fototipo y exposición solar.

NC: no clasificado

Tabla 22- Tipos y géneros VPH en casos

PACIENTE	DIAGNOSTICO	Tipo-género VP		Tipo-género	
		tumor		VPH	perilesión
1	Bowen	12	β -1	-	
2	Bowen	23	β -2	23	β -2
3	CBC	-		93	β -1
4	CEC	130	γ -10	108	γ -6
5	Bowen	20	β -1	92	β -4
6	CEC	107	β -2	107	β -2
7	Bowen	96	β -5	Positivo débil	
8	CEC	111	β -2	9	β -2
9	CEC	9	β -2	9	β -2
10	Bowen	80	β -2	20	β -1
11	CBC	124	β -1	144	NC
12	CBC	-		Positivo débil	
13	Bowen	98	β -1	105	β -1
14	CBC	120	β -2	-	
15	CBC	93	β -1	124	β -1
16	CBC	129	γ	129	γ
17	CBC	-		49	β -3
18	CBC	-		-	
19	CBC	124	β -1	Positivo débil	
20	CBC	14	β -1	14	β -1
21	CEC	-		49	β -3
22	CBC	-		144	NC
23	CEC	75	β -3	-	
24	Bowen	98	β -1	49	β -3
25	CEC	-		-	
26	CBC	-		49	β -3
27	CBC	4	γ -1	-	
28	Bowen	5,12	β -1	49	β -3
29	Bowen	-		107	β -2
30	Bowen	-		49	β -3

Tabla 23- Tipos y géneros VPH en controles

PACIENTE	DIAGNOSTICO	Tipo-género VPH tumor	Tipo-género VPH perilesión
31	CBC	-	-
32	CBC	-	-
33	CEC	19 β -1	124 β -1
34	CBC	Positivo débil	-
35	Bowen	14 β -1	20 β -1
36	CBC	96 β -5	-
37	CEC	124 β -1	124 β -1
38	CBC	124 β -1	136 NC
39	CBC	-	146 NC
40	CEC	-	-
41	CBC	-	49 β -3
42	CBC	-	-
43	CBC	9, 11 β -2/ α	5 β -1
44	CEC	124 β -1	107 β -2
45	Bowen	110 β -2	49 β -3
46	CEC	20 β -1	20 β -1
47	CBC	-	-
48	Bowen	98 β -1	24 β -1
49	Bowen	-	-
50	Bowen	20 β -1	20 β -1
51	Bowen	-	Positivo débil
52	CBC	-	-
53	CEC	-	49 β -3
54	Bowen	110 β -2	134 γ
55	CEC	-	49 β -3
56	Bowen	-	-
57	CBC	-	49 β -3
58	CBC	-	-
59	Bowen	-	-
60	Bowen	20 β -1	Positivo débil

4- VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS E INMUNOCOMPETENTES

El ADN del VPH fue detectado con mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos que en pacientes inmunocompetentes. VPH fue detectado en un total de 44 de las 60 muestras (73.3%) en pacientes trasplantados, frente 32 de las 60 muestras (53.3%) en pacientes inmunocompetentes, siendo estas diferencias significativas [OR ajustado 3.4 (1.2-9.6)]. Al comparar los distintos géneros de VPH, el género más prevalente fue el VPH- β , aunque no encontramos diferencias significativas en la prevalencia de VPH entre casos y controles.

5- VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PIEL TUMORAL Y PIEL SANA

El ADN del VPH fue detectado con mayor frecuencia en piel sana que en piel tumoral tanto en casos como en controles. Al aparear las muestras de piel tumoral y piel sana entre casos y controles solo encontramos diferencias significativas al comparar la piel sana perilesional de los casos con la piel tumoral y piel sana perilesional de los controles [OR ajustado perilesión casos versus lesión controles 7.8 (1.6-36.7) y OR ajustado perilesión casos versus perilesión controles 5.9 (1.2-29.6)]. Al comparar los distintos géneros del VPH entre piel tumoral y piel sana, el género VPH- β , en concreto la especie β -1 fue el más prevalente, pero no se encontraron diferencias entre los grupos.

La tabla 24 muestra las tasas de detección de ADN del VPH y *odds ratio* (OR) para las muestras de los casos (lesión y perilesión) y controles (lesión y perilesión). En la tabla 25, la *odds ratio* la ajustamos al fototipo, exposición solar y localización de la muestra.

Género	Casos		Controles		Lesión versus perilesión ¹		Lesión versus perilesión ²		Lesión versus perilesión ³		ORs (95% CI)	
	Lesión (n=30) no. (%)	Perilesión (n=30) no. (%)	Lesión (n=30) no. (%)	Perilesión (n=30) no. (%)	Lesión versus perilesión ¹	Lesión versus perilesión ²	Lesión versus perilesión ²	Lesión versus perilesión ²	Lesión versus perilesión ³	Perilesión versus lesión ²	Perilesión versus perilesión ²	Perilesión versus perilesión ³
Todos los géneros	20 (66.7%)	24 (80.0%)	14 (46.7%)	18 (60.0%)	0.5 (0.2-1.6)	2.3 (0.8-6.5)	1.3 (0.5-3.8)	4.6 (1.5-14.4)	0.6 (0.2-1.6)	-	-	-
<i>α</i> -Papillomavirus	-	-	1 (3.3%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>β</i> -Papillomavirus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
All <i>β</i> -papillomavirus	17 (56.7%)	17 (56.7%)	13 (43.3%)	13 (43.3%)	1.0 (0.4-2.8)	1.7 (0.6-4.8)	1.7 (0.6-4.8)	1.7 (0.6-4.8)	1 (0.4-2.8)	1.7 (0.6-4.8)	1.7 (0.6-4.8)	1 (0.4-2.8)
1	9 (30.0%)	5 (16.7%)	9 (30.0%)	7 (23.3%)	2.1 (0.6-7.4)	1.0 (0.3-3.0)	1.4 (0.5-4.6)	0.5 (0.1-1.6)	1.4 (0.5-4.5)	0.7 (0.2-2.4)	0.7 (0.2-2.4)	1.4 (0.5-4.5)
2	6 (20.0%)	5 (16.7%)	3 (10.0%)	1 (3.3%)	1.3 (0.3-4.6)	2.3 (0.5-9.9)	7.3 (0.8-64.5)	1.8 (0.4-8.3)	3.2 (0.3-32.9)	5.8 (0.6-53.0)	5.8 (0.6-53.0)	3.2 (0.3-32.9)
3	1 (3.3%)	6 (20.0%)	0 (-)	5 (16.7%)	0.1 (0.1-1.2)	-	0.2 (0.1-1.6)	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1 (3.3%)	-	1 (3.3%)	-	-	1 (0.1-16.8)	-	-	-	-	-	-
<i>γ</i> -Papillomavirus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
All <i>γ</i> -papillomavirus	3 (10.0%)	2 (6.7%)	-	1 (3.3%)	1.5 (0.2-10.1)	-	3.2 (0.3-32.9)	-	-	2.1 (0.2-24.2)	-	-
1	1 (3.3%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	1 (3.3%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1 (3.3%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NC- Papillomavirus	-	-	2 (6.7%)	2 (6.7%)	-	-	-	-	-	-	-	-

CI: intervalo de confianza; OR: odds ratio.

1. Análisis pareado comparando detección VPH en casos (lesión y perilesión)

2. Ajustado a controles

3. Análisis pareado comparando detección VPH en controles (lesión y perilesión)

Tabla 24- Detección DNA del VPH en casos y controles.

Género	Casos		Controles		OR ajustado (95% CI)	Lesión versus perlesión ²	Lesión versus perlesión ²	Lesión versus perlesión ²
	Lesión (n=30) no. (%)	Perlesión (n=30) no. (%)	Lesión (n=30) no. (%)	Perlesión (n=30) no. (%)				
Todos los géneros	20 (66.7%)	24 (80.0%)	14 (46.7%)	18 (60.0%)	1.4 (0.3-6.7)	Lesión versus perlesión ²	Lesión versus perlesión ²	Lesión versus perlesión ²
β -Papillomavirus	17 (56.7%)	17 (56.7%)	13 (43.3%)	13 (43.3%)	1.1 (0.2-4.5)	Lesión versus lesión ²	Lesión versus lesión ²	Lesión versus perlesión ²
Todos β -papillomavirus	17 (56.7%)	17 (56.7%)	13 (43.3%)	13 (43.3%)	1.2 (0.3-5.6)	Lesión versus lesión ²	Lesión versus lesión ²	Lesión versus perlesión ²
					1.4 (0.3-6.7)	Lesión versus lesión ²	Lesión versus lesión ²	Lesión versus perlesión ²
					1.8 (0.5-6.3)	Lesión versus lesión ²	Lesión versus lesión ²	Lesión versus perlesión ²
					7.8 (1.6-36.7)	Lesión versus lesión ²	Lesión versus lesión ²	Lesión versus perlesión ²
					5.9 (1.2-29.6)	Lesión versus lesión ²	Lesión versus lesión ²	Lesión versus perlesión ²
					0.4 (0.1-1.7)	Lesión versus lesión ²	Lesión versus lesión ²	Lesión versus perlesión ²

OR* ajustado a localización, fototipo y exposición solar.

1. Análisis pareado comparando detección VPH en casos (lesión y perlesión)
2. Ajustado a controles
3. Análisis pareado comparando detección VPH en controles (lesión y perlesión)

Tabla 25- Detección DNA del VPH en casos y controles (OR ajustado)

Recogimos las muestras de 60 lesiones tumorales: 30 de pacientes inmunodeprimidos (7 CEC, 10 CEC *in situ* y 13 CBC) y 30 de pacientes inmunocompetentes (7 CEC, 10 CEC *in situ* y 13 CBC). Al estudiar la presencia del VPH en piel tumoral, la presencia de VPH fue más frecuente en CEC *in situ* tanto en casos como en controles, detectándose en 8/10 (80%) de los CEC *in situ* en pacientes inmunodeprimidos y en 6/10 (60%) de los CEC *in situ* de los pacientes inmunocompetentes. La prevalencia de VPH fue menor en CBC tanto en casos como en controles aunque estos resultados no alcanzaron significación estadística (tabla 26).

Tabla 26- Prevalencia VPH en tumores

	Total	VPH positivo(%)	p-valor
CASOS	30	20 (66.7%)	
CEC	7	5 (71.4%)	
BOWEN	10	8 (80.0%)	
CBC	13	7 (53.8%)	0.39
CONTROLES	30	14 (46.7%)	
CEC	7	4 (57.1%)	
BOWEN	10	6 (60.0%)	
CBC	13	4 (30.8%)	0.31

DISCUSIÓN

I. INCIDENCIA ACUMULADA

Los pacientes trasplantados tienen una elevada incidencia de enfermedades malignas cutáneas. El riesgo de desarrollar CCNM aumenta con los años del trasplante. En nuestro estudio la incidencia acumulada aumentó del 20'78% a los 5 años, al 37.35% a los 10 años, hasta el 53.08 % a los 15 años del trasplante. Si comparamos esta incidencia con otros estudios europeos^{16,17,19,20,21}, observamos que nuestros resultados reflejan una mayor incidencia. Esto podemos explicarlo porque estos trabajos están en gran parte realizados en países con latitudes más altas que la nuestra (Norte de Europa) con unas condiciones ambientales diferentes y un menor grado de exposición solar. Así en Suiza¹⁶ se registra una incidencia del 17'8% a los 10 años, o de solo un 7% a los 10 años en Noruega²⁰. En cambio, en Australia es donde se registran las cifras más altas de incidencia de CCNM en pacientes trasplantados renales con una incidencia acumulada de 52'2% a los 10 años y de hasta el 82'2% a los 20 años^{11,12}. Nuestros resultados son similares a los referenciados en el estudio de *Fuente MJ et al*², publicado en el año 2003 en el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Barcelona que registra una incidencia acumulada de cáncer cutáneo del 27% a los 6 años y de hasta el 48% a los 10 años del trasplante renal. Los autores de este estudio justifican esta mayor incidencia al hecho de que se trata de un estudio prospectivo y que sus datos no se basan en registros de tumores.

Un aspecto destacable de nuestro estudio es la elevada y preocupante incidencia de CCNM. La elevada exposición solar en nuestra área y la combinación de datos retrospectivos y prospectivos con un seguimiento semestral de los pacientes ha influido seguramente en una mayor detección y recogida fiable de todas las lesiones.

II. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A CCNM

Al igual que en la población general, los factores que influyen en el riesgo de cáncer de piel después del trasplante son múltiples e interactúan. En este estudio hemos examinado una combinación de factores fenotípicos, clínicos y ambientales como factores de riesgo para CCNM en receptores de trasplante renal.

La radiación **ultravioleta acumulada** (sobre todo UVB) es el principal agente cancerígeno responsable de la inducción de CCNM^{1,2,22} como lo sugiere el hecho de que las lesiones aparecen casi exclusivamente en sitios de piel expuesta a radiaciones UV dentro del campo de cancerización y son más numerosas en pacientes que viven en países soleados.

Nuestro resultados apoyan el hecho que la exposición solar es un factor fundamental para el desarrollo del CCNM. Así, los pacientes con fototipos más bajos y con exposición solar ocupacional alta presentaron mayor riesgo de CCNM después del trasplante. En nuestro estudio los pacientes con una exposición solar ocupacional alta mostraron un riesgo 2'15 veces mayor de CCNM que aquellos pacientes con exposición solar baja ocupacional. Además, la mayor parte de lesiones se localizaron en zonas fotoexpuestas.

La **edad** también es un importante factor de riesgo. En nuestro estudio la edad media en el momento del trasplante de los pacientes con CCNM fue mayor a la de los pacientes sin CCNM. Además la edad en el momento del trasplante ha sido una de las tres variables que ha demostrado tener una influencia significativa en el desarrollo de CCNM, junto con el fototipo bajo y la exposición solar alta. Son varios los artículos que reflejan estas tendencias. En el estudio de *Otley et al*¹⁰⁰ la razón de riesgo se informó 12 veces mayor en paciente que recibieron trasplante

más allá de los 55 años de edad en comparación con los pacientes que lo recibían antes de los 34 años.

La duración de la diálisis y el sexo del paciente no mostraron asociación estadística con el riesgo de desarrollar un CCNM.

En nuestro trabajo la **relación CBC/CEC** fue de 2.24:1. Esto contrasta con muchos estudios^{5,21} donde el cociente CBC/CEC se invierte a favor del CEC. Las diferencias pueden deberse a que la mayoría de estos estudios se basan en registros de tumores donde muchas veces solo se recoge el primer tumor, o solo se contabilizan los CEC. Además, aunque el diagnóstico histopatológico es el “*gold estándar*” para el diagnóstico del CCNM, las lesiones tratadas sin diagnóstico histopatológico no son incluidas en estos registros por lo que muchas veces la incidencia de CBC no se recoge de forma uniforme.

La importancia de la coincidencia de los **antígenos HLA** para la supervivencia del injerto renal está bien establecida⁵¹. Según algunos estudios estos antígenos también tendrían un papel importante en el desarrollo de tumores. Así en el estudio de *Bouwes et al*⁵² el riesgo de CEC se incrementó en los receptores no coincidentes de los antígenos HLA-B (“*mismatching*”). En nuestro estudio los pacientes con más coincidencia de antígenos HLA presentaron menor riesgo de CCNM en el análisis univariante aunque estos datos no se confirmaron en el análisis multivariante.

La **terapia de inducción con anticuerpos antilinfocitarios mono o policlonales**, si bien parece asociarse claramente con un mayor riesgo de aparición de trastornos linfoproliferativos (sobre todo con el uso de muromonab-CD3)²⁹, su papel en la etiopatogenia del cáncer cutáneo en pacientes trasplantados no está tan claro y

existe controversia al respecto. En el estudio de *Caillard et al*²⁹ el tratamiento con anticuerpos policlonales y muromonab-CD3 se asoció a un mayor riesgo de procesos linfoproliferativos a los 3 años. *Opelz et al*³² observaron que la terapia de inducción con muromonab-CD3 o con anticuerpos policlonales, pero no con antagonistas del receptor de la IL-2, aumentaba el riesgo de linfoma en el primer año. En el estudio de *Bustami et al*³⁰ la terapia de inducción tanto con agentes que agotaban los linfocitos, como con un antagonista del receptor de la IL-2, se asoció significativamente con un mayor riesgo de desarrollar procesos linfoproliferativos.

El papel de la terapia de inducción en la aparición de cáncer cutáneo no está tan definido, existiendo menos estudios al respecto. En el estudio de *Lampros et al*¹⁰¹ el tratamiento con muromonab-CD3 se asoció a un incremento en el riesgo de cáncer cutáneo. El tratamiento con muromonab-CD3 también se asoció a CBC y CEC en el estudio de *Molina et al*¹⁰², en este trabajo además, el tratamiento con timoglobulina® se asoció a un aumento de riesgo de CBC pero no de CEC.

Curiosamente en el estudio de *Wimmer et al*¹⁰³ el uso de antagonistas del receptor de la IL-2 redujo significativamente el riesgo de tumores, cutáneos y no cutáneos, en pacientes trasplantados.

En nuestro estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes sin tratamiento de inducción y los pacientes con diferentes regímenes de inducción con éstos fármacos, aunque debemos tener en cuenta que solo dos pacientes llevaban tratamiento de inducción con muromonab-CD3, por lo que no podemos obtener conclusiones significativas en este grupo. Resultados similares encontramos en el trabajo de *Geusau et al*¹⁰⁴ donde al comparar sus resultados con los datos publicados en otros centros de trasplante donde la terapia de inducción no

se aplicaba habitualmente, o solo se incluía en las modalidades de tratamiento en periodos de rechazo agudo, la terapia de inducción no parecía estar asociada con una mayor incidencia de CCNM.

De los tratamientos **inmunosupresores** el grupo A (inhibidores mTOR + micofenolato) mostró menor riesgo de aparición de cáncer cutáneo frente a los otros tratamientos, aunque estos resultados no fueron significativos estadísticamente, seguramente por el menor tamaño muestral de este grupo. Estos resultados son concordantes con otros estudios publicados previamente que sugieren que los inhibidores mTOR podrían tener una acción preventiva en la carcinogenesis. Un informe reciente de cinco estudios muticéntricos³⁹ mostró que la inmunosupresión de mantenimiento con siroliums se asoció a una reducción de la incidencia de tumores malignos a los 2 años del trasplante. *Kauffamn et al*³⁴ mostró una menor incidencia de cáncer de piel a los 2'6 años en pacientes que recibieron inhibidores mTOR en comparación con aquellos que habían recibido inhibidores de la calcineurina.

Estas propiedades antitumorales se manifiestan también después de la aparición de tumores malignos cutáneos, aunque es sobre todo en el contexto de pacientes con sarcoma de Kaposi donde se han evaluado estas propiedades antitumorales tras el cambio a inhibidores mTOR, con varios estudios que informan de la regresión del sarcoma de Kaposi después de la conversión a sirolimus. Con respecto a los tumores malignos cutáneos, *de Fitcher et al*³⁷ examinó el uso de los inhibidores mTOR en 53 receptores de trasplante renal que habían desarrollado CCNM después del trasplante. La regresión del cáncer de piel no melanoma se observó en 37 de los pacientes, un paciente se perdió durante el seguimiento y 15 pacientes siguieron desarrollando nuevas lesiones después de la conversión a inhibidores mTOR, dos de los cuales estaban recibiendo dosis bajas de inhibidores de la

calcineurina como parte de su régimen inmunosupresor. La conversión a inhibidores mTOR se ha observado también en pequeños estudios no controlados de trasplante renal con CCNM. En estos estudios el número de tumores disminuyó pero el seguimiento fue corto. En el estudio de *Fernández et al*³⁶, nueve receptores de trasplante renal tratados con inhibidores de la calcineurina cambiaron a tratamiento con everolimus debido a la presencia de tumores malignos o toxicidad neurológica por tacrolimus. De ellos seis pacientes habían tenido cáncer de piel recurrente. Al sustituir el tacrolimus o la ciclosporina por everolimus no presentaron más tumores cutáneos durante el tiempo de seguimiento (6'5 meses).

En nuestro estudio, en cambio, de 5 pacientes con CCNM que se convirtieron a inhibidores mTOR (después de haber recibido tratamiento con inhibidores de la calcineurina), 3 siguieron haciendo CCNM a pesar del cambio de tratamiento a los 24 meses de seguimiento. En este sentido en el estudio de *Lebbe et al*¹⁰⁵ observaron que el sarcoma de kaposi podía recaer bajo tratamiento con sirolimus tras un seguimiento prolongado y que además algunos pacientes no respondían.

Destacar la alta incidencia de CCNM en pacientes trasplantados y la importancia del tratamiento inmunosupresor en la etiopatogenia de estos tumores. Con el fin de reducir la carga tumoral en estos pacientes, su manejo requiere un enfoque multidisciplinar que incluya la revisión de la inmunosupresión. Aunque hay una considerable cantidad de datos que sugieren que el uso de los inhibidores mTOR se asocia con una reducción del riesgo de malignidad postrasplante queda por determinar si el cambio a un inhibidor mTOR en pacientes con CCNM puede modificar el comportamiento biológico de estos tumores. Investigaciones adicionales son necesarias para establecer el papel exacto de estos agentes.

Actualmente varios ensayos prospectivos están en curso para evaluar los posibles efectos antineoplásicos de los inhibidores mTOR en los cánceres cutáneos de pacientes trasplantados (www.clinicaltrials.gov). Los resultados prometedores del sirolimus podrían verse obstaculizados por la alta frecuencia de efectos secundarios que presenta cuando se administra durante varios años. Los más comunes: la hiperlipidemia y toxicidad hematológica, otros efectos adversos incluyen deterioro en la cicatrización de las heridas, proteinuria, edema, neumonitis y microangiopatía trombótica. *Fernández et al*³⁶ observaron que en el 20% a 46% de los pacientes con nefropatía crónica del injerto la conversión de inhibidores de la calcineurina a sirolimus produjo un aumento de la proteinuria y deterioro de la función del injerto. Es por ello que para establecer la conversión a inhibidores mTOR es primordial una buena función del injerto.

En cuanto a la presencia de lesiones premalignas, en el estudio de *Bouwes et al*¹⁰⁶ las **queratosis actínicas y verrugas** se asociaron a un aumento del riesgo de CEC en comparación con los pacientes que no tenían estas lesiones. En nuestro estudio la aparición de verrugas después del trasplante y la presencia de queratosis actínicas antes y después del trasplante se asociaron a mayor riesgo de CCNM en el análisis univariado. Pero en el análisis multivariante estos factores perdieron significación estadística. Con respecto a estos datos hemos de tener en cuenta las limitaciones del estudio, y debemos considerar la posibilidad de que las verrugas al considerarse una lesión “poco seria” muchas veces no se incluyeran en la historia clínica.

En cuanto a la **evolución** de los pacientes, comentar la ausencia de complicaciones graves en los CCNM de nuestra serie. Ningún paciente desarrolló metástasis por CCNM o muerte por evolución del tumor cutáneo. Destacar la presencia de recidivas tumorales en 3 de los 41 CEC (7.3%) y 2 de los 91 CBC (2.2%). Esto

contrasta con muchos estudios que reflejan un curso más agresivo en estos tumores con frecuentes recidivas locales tras su exéresis y mayor posibilidad de metástasis¹. El estrecho seguimiento de estos pacientes ha podido contribuir a estos resultados.

Los factores de riesgo asociados estadísticamente con CCNM fueron la edad en el momento del trasplante (mayor riesgo a mayor edad), la exposición ocupacional pretrasplante alta y los fototipos bajos, lo que demuestra el papel primordial de la radiación UV en la etiopatogenia del cáncer cutáneo.

III. VPH Y CANCER CUTÁNEO

Si bien la presencia de ciertos tipos de virus del papiloma humano es un conocido factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello útero^{107,108}, el papel del virus del papiloma en el desarrollo del cáncer de piel es muy discutido. Los estudios realizados para valorar la implicación del VPH en la oncogénesis cutánea son muy dispares, en parte debido a las diferencias en los métodos utilizados para la detección y tipificación del VPH, el tipo de muestra analizada, así como la falta de inclusión de potenciales factores de confusión de riesgo para cáncer de piel, sobre todo aquellos relacionados con la exposición solar. La relación entre VPH y cáncer de piel se ha sustentado en varios premisas como la asociación epidemiológica observada entre las verrugas y los CEC en pacientes con epidermodisplasia verruciforme⁸⁵, la coexistencia de signos histológicos de infección viral y displasia epitelial en una misma biopsia^{86,87} o la identificación de ADN del VPH en muchos CCNM^{88,89}.

Sin embargo, la falta de resultados consistentes de ADN del VPH en el cáncer de piel, el frecuente hallazgo de VPH en la piel normal y la falta de identificación de

un grupo de “alto riesgo” de VPH en cáncer de piel ponen en duda el papel del VPH en el desarrollo de CCNM.

Hemos examinado una población de pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes del área mediterránea para identificar la prevalencia y el espectro de los tipos de VPH presentes en tejido tumoral y en piel sana.

Los resultados de los estudios de *PCR* que han detectado ADN del VPH en los CCNM de los **pacientes trasplantados** han sido muy dispares. Sin embargo en los últimos años, la mayoría de estudios describen una positividad del VPH en los CEC de pacientes trasplantados que oscila entre un 60-90% de los casos, aunque los tipos encontrados son muy heterogéneos¹⁰⁹⁻¹¹¹.

La mayor prevalencia de VPH encontrada en nuestro estudio en pacientes inmunodeprimidos frente inmunocompetentes concuerda con otros artículos publicados previamente. En el estudio de *Harwood et al*⁹³ se compara por la técnica de *PCR* degenerada la prevalencia de VPH en 148 cánceres cutáneos: 85 muestras de pacientes inmunodeprimidos (44 CEC, 24 CBC y 17 lesiones premalignas: queratosis actínicas o CEC in situ) y 63 de pacientes inmunocompetentes (22 CEC, 30 CBC y 11 lesiones premalignas). Se detectó ADN de VPH en 37/44 (84'1%) de los CEC, 18/24 (75%) de los CBC y 15/17 (88'2%) de las lesiones premalignas de piel en pacientes inmunodeprimidos en comparación con la detección de ADN de VPH en 6/22 (27'2%) de los CEC, 11/30 (36'7%) de los CBC y 6/11 (54'4%) de las lesiones premalignas en pacientes inmunocompetentes. Los tipos VPH epidermodisplasia verruciforme (EV) fueron los más frecuentes en ambos grupos. Concluyen comentando que si bien hay claras diferencias en cuanto a prevalencia de VPH en pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes, siendo la prevalencia de infección por VPH mucho mayor en

pacientes inmunodeprimidos [82% frente 36%, $p<0.001$], no se encontraron diferencias en los tipos de VPH en las diferentes lesiones en las dos poblaciones.

*Casabonne et al*¹¹² examinó el rol de los anticuerpos frente VPH en dos poblaciones trasplantadas en Reino Unido. En general, el 86% de los participantes fueron seropositivos a por lo menos un VPH: 41% a tipos alfa mucosos, 33% a tipos alfa cutáneos, 56% a tipos beta, 47% a tipos gamma y 45% a otros tipos (*nu*, *mu*, VPH 101 y 103). Se encontraron diferencias en las seroprevalencias de 8 tipos de VPH entre los pacientes trasplantados de los dos centros de trasplantes, pero no se identificaron factores de riesgo asociados con la seropositividad a VPH cutáneos entre los pacientes trasplantados.

*Proby et al*¹¹³ examinó la asociación entre VPH- β y CEC en pacientes trasplantados. Se incluyeron un total de 210 pacientes trasplantados con CEC y 394 pacientes trasplantados sin CCNM. Se determinó la presencia de VPH- β por PCR en pelo de las cejas y por serología. Se detectó ADN de VPH- β en una elevada prevalencia (>94%) en ambos grupos. Se encontró una asociación significativa en la concordancia de ambas técnicas de detección del VPH para al menos un tipo de VPH- β [OR 1.6, IC 1.1-2.5]. Se encontró también una asociación significativa borderline entre CEC y VPH-36, con similar asociación para VPH-5, VPH-9 y VPH-24.

Parece que el desarrollo de cáncer de piel en pacientes trasplantados es el resultado de una compleja interacción entre la exposición UV, la infección por el virus del papiloma, y la predisposición genética. Investigaciones sucesivas son necesarias para delinear el papel exacto de VPH en el desarrollo de CEC en pacientes trasplantados.

En **pacientes inmunocompetentes**, diversos estudios^{90,93,114} han detectado tasas de infección de VPH muy variables (entre 27-70%) en pacientes con CEC.

En el estudio de *Asgari et al*⁸⁸, de casos y controles se buscó la presencia de VPH por técnica de *PCR* de alta sensibilidad en 85 pacientes inmunocompetentes con CEC (en piel tumoral y en piel sana perilesional) y en 95 pacientes control inmunocompetentes sin CEC (en piel expuesta y no expuesta al sol). Los resultados más concluyentes fueron que se identificó VPH en el 54% de los CEC y en el 50% de la piel perilesional, mientras que en los controles se aislaron VPH en el 59% de piel fotoexpuesta y en el 49% de piel no fotoexpuesta. Al comparar casos y controles no se observaron diferencias en la detección general del ADN del VPH, pero sin embargo, sí existía diferencia al analizar por separado los diferentes tipos de VPH. En este estudio se pudo comprobar que los VPH-β2 eran más numerosos en lesiones (34%) que en áreas perilesionales (17%) y en zonas fotoexpuestas (29%) que en zonas no fotoexpuestas (24%). Las infecciones múltiples fueron más frecuentes en muestras tumorales que en áreas no fotoexpuestas en pacientes control. El tipo HPV-20 fue el más frecuentemente detectado. Concluyen comentando que la alta prevalencia de ADN del VPH detectada en los controles sugería que el ADN del VPH estaba muy distribuido en la población general. Sin embargo, la detección diferencial del VPH-β en los tumores sugería que ciertos tipos de VPH estaban involucrados en la progresión del CEC. En este estudio también se especulaba que la disminución de la inmunidad celular mediada por células T inducida por la radiación solar sería la causante de la mayor infectividad en las zonas fotoexpuestas.

En el estudio de *Forslund et al*¹¹⁵ se examinaron 82 CEC, 126 CBC y 49 queratosis actíncias de 349 pacientes inmunocompetentes determinando la presencia del VPH en piel lesional y sana del mismo paciente. ADN del VPH fue

positivo en el 12% de las muestras de piel sana, en el 26% de los CEC, 18% de los CBC y en el 22% de las queratosis actínicas. El tipo predominante en los CEC fue el VPH- β 2 y las muestras positivas tanto en lesión como en piel sana se localizaron mayoritariamente en zonas fotoexpuestas. Llegaron a la conclusión que los VPH- β 2 se asociaba a CEC.

*Rollison et al*¹¹⁶ determinaron la presencia de VPH en 25 pacientes inmunocompetentes con CCNM (16 CBC y 9 CEC). En el 60% de los tejidos tumorales se comprobó la existencia de ADN de VPH- β , siendo positivo en un 71% de los CEC y en el 54% de los CBC.

En el estudio de *Patel et al*¹¹⁷ se determinaron 25 genotipos distintos de VPH- β en 98 CEC y 98 CBC en pacientes inmunocompetentes, mediante un nuevo método de hibridación reversa. El 83'7% de los CEC y el 77'6% de los CBC tenían algún VPH- β . Se detectó con mayor frecuencia infección por algún tipo de VPH- β 2 (67'3% de los CEC y 57'1% de CBC). Pero al comparar todos los tipos VPH- β 2 detectados, no se encontraron diferencias en la prevalencia entre CBC y CEC. Sin embargo, el CEC se asoció de forma significativa a mayor riesgo de infección por VPH- β 1 que el CBC. Sus datos sugerían que una gran proporción de CEC y CBC estudiados contenían ADN de VPH del género β , y específicamente explicaban un papel potencial del género VPH- β 1 y posiblemente otros tipos beta en la génesis tumoral de los CEC.

En general, en pacientes inmunocompetentes se detecta VPH (con predominio del VPH- β) en menor proporción que en pacientes inmunodeprimidos y con unos porcentajes similares a los encontrados en piel sana. Basándose en estos datos, algunos autores incluso opinan que los VPH- β solo serían saprofitos habituales de la piel⁹⁵.

En nuestro estudio al comparar la prevalencia de VPH entre piel tumoral y piel sana, la presencia de VPH ha sido mayor en **piel sana** que en piel tumoral tanto en casos como en controles, aunque estos resultados no alcanzaron significación estadística. La alta prevalencia de ADN del VPH en piel sana tanto en casos como en controles confirma los hallazgos de estudios anteriores que sugieren que el ADN del VPH se encuentra ampliamente distribuido en la piel de la población general^{84,94}. Estudios realizados en personas inmunocompetentes han encontrado ADN del VPH en 67-74% de los pelos arrancados^{94,99} y en el 69-80% de los frotis de piel⁹⁷. Estos estudios, junto con nuestros datos, sugieren que la presencia de ADN del VPH es generalizada en piel de apariencia normal. En otros estudios, en cambio, se detectó ADN del VPH con mayor frecuencia en piel tumoral que en piel sana. *Asgari et al*⁸⁸ al comparar piel tumoral con piel sana no encontró diferencias en la detección general del ADN del VPH, sin embargo al analizar por separado los diferentes tipos de VPH, los VPH- β 2 eran más numerosos en piel tumoral que en piel sana perilesional [OR 4, IC: 1.3-12]. En el estudio de *Forsslund et al*¹¹⁵ se comparó la presencia de VPH en CCNM y en piel sana del mismo paciente y la prevalencia de VPH fue mayor en piel tumoral.

Harwood en el año 2004¹¹⁸ ya comentaba que en los futuros estudios que se realizaran para valorar el VPH como factor de riesgo de CCNM se deberían incluir los posibles **factores de confusión** para cáncer de piel como la edad, el fototipo y la exposición solar.

En nuestro estudio las muestras de áreas fotoexpuestas mostraron mayor prevalencia de ADN del VPH tanto en casos como en controles. Nuestros resultados apoyan la teoría de la importante interacción de la luz UV y la presencia de VPH^{1,2,119}. En nuestro trabajo al estudiar los posibles factores de

confusión en pacientes inmunodeprimidos solo la localización del tumor en áreas fotoexpuestas se asoció a un mayor riesgo de VPH. En pacientes inmunocompetentes además de la localización del tumor en áreas fotoexpuestas, la exposición solar ocupacional alta y el fototipo bajo también se asociaron a un mayor riesgo de VPH de forma significativa. El importante papel de la radiación UV también se refleja en otros trabajos como el de *Forsslund et al*¹¹⁵ donde el ADN del VPH también se asoció de forma significativa a la exposición al sol, tanto en piel tumoral como en piel sana.

Al comparar la presencia de VPH en las muestras tumorales, la presencia de VPH fue mayor en los CEC *in situ* que en los CEC o CBC tanto en los casos como en los controles. La presencia de queratosis actínicas o verrugas se asoció a mayor riesgo de VPH en pacientes inmunodeprimidos pero éstos resultados no alcanzaron significación estadística, seguramente por el tamaño muestral limitado. Este hallazgo coincide con los estudios que sostienen la teoría de que el VPH en el cáncer de piel se detecta con mayor frecuencia en las lesiones más precoces como los CEC *in situ* y queratosis con displasia sugiriendo que la influencia del VPH se centraría fundamentalmente en las etapas iniciales de la carcinogénesis cutánea, más que en la perpetuación tumoral^{75,120}. Así en el estudio de *Pfister et al*¹²¹, se encontró una alta prevalencia de ADN del VPH-β en 114 pacientes con queratosis actinicas (85% en muestras congeladas y 67% en muestras parafinadas), lo que indica un papel potencial carcinogénico del VPH en las primeras etapas de desarrollo del CEC.

No hemos encontrado diferencias significativas en el **espectro de tipos del VPH** entre las dos poblaciones, si bien el género HPV-β fue el más prevalente, sobre todo la especie HPV-β1. Datos similares encontramos en otros artículos, aunque muchos de estos trabajos se basan en la clasificación taxonomía clásica de VPH

mucosos, cutáneos o asociados a epidermodisplasia verruciforme (EV)⁶⁹. Según la clasificación de Villiers de 2004⁷⁰ los tipos VPH-EV se incluyen actualmente en el género β : VPH- β 1 y VPH- β 2. En el estudio de *Asgari et al*⁸⁸, en cambio, la especie más prevalente fue VPH- β 2, aunque en este estudio, como en el nuestro, el tipo más frecuente detectado fue el VPH-20 (VPH- β 1).

El mecanismo por el cual el VPH causa tumores cutáneos no está aún aclarado. La presencia de un virus en tejido tumoral no es evidencia suficiente para demostrar una relación causal; para comprobar la relación entre CCNM e infección por VPH es necesario realizar estudios epidemiológicos, de niveles de infección por VPH en casos y controles, así como estudios prospectivos que establezcan la relación temporal entre infección y cáncer.

Nuestros datos ponen de relieve las diferencias potencialmente importantes en la prevalencia de VPH entre pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes, apoyando la compleja interacción entre VPH, la exposición a la radiación UV y el estado de inmunosupresión. Pero la prevalencia superior del VPH encontrada en piel sana cuestiona el papel del VPH en el desarrollo del CCNM y sugiere que el ADN del VPH se encuentra ampliamente distribuido en la población general. Si bien no hemos encontrado correlación entre la presencia de VPH y cáncer de piel hemos de tener en cuenta que se trata de una serie pequeña, de carácter informativo y que se necesitan estudios más amplios para descartar la implicación del virus del papiloma en el cáncer de piel.

IV. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1. Estudio ambispectivo.

El estudio ambispectivo se basa en la combinación de datos retrospectivos y prospectivos. La utilización de datos retrospectivos supone un mayor riesgo de sesgos de información y selección.

2. Tratamiento inmunosupresor: grupos no homogéneos.

Al comparar los distintos tratamientos inmunosupresores observamos que los grupos no son homogéneos. El tratamiento con inhibidores mTOR mostró una tendencia hacia un menor riesgo de CCNM, aunque estos resultados no alcanzaron significación estadística, probablemente por el menor tamaño muestral de este grupo.

3. Determinación VPH: tamaño muestral.

Por motivos de financiación solo pudimos realizar determinación de la prevalencia y genotipo del VPH mediante técnica de *PCR* en 120 muestras (60 determinaciones en pacientes trasplantados: 30 determinaciones de piel tumoral y 30 de piel sana perilesional y 60 determinaciones en pacientes inmunocompetentes: 30 de piel tumoral y 30 de piel sana perilesional). Por el pequeño tamaño muestral, los datos obtenidos en este apartado deben ser considerados tendencias, que deberán de ser confirmados en series más largas.

CONCLUSIONES

1. Los factores de riesgo independientes asociados de forma significativa a la aparición de CCNM en pacientes trasplantados fueron la exposición solar ocupacional pretrasplante alta, el fototipo bajo y la mayor edad en el momento del trasplante.
2. Se encontró alta incidencia acumulada de CCNM en pacientes trasplantados renales (20´78% a los 5 años del trasplante, 37´35% a los 10 años y 53´08% a los 15 años del trasplante).
3. El tratamiento con inhibidores mTOR mostró un menor riesgo de CCNM, aunque este resultado no alcanzó significación estadística.
4. La prevalencia del VPH fue mayor en pacientes trasplantados que en pacientes inmunocompetentes.
5. El género VPH más prevalente en casos y controles fue el VPH- β . El tipo VPH más frecuente fue el VPH-20.
6. Se encontró una mayor prevalencia de VPH en piel sana perilesional que en piel tumoral, tanto en pacientes trasplantados como inmunocompetentes, aunque esta diferencia no fue significativa.
7. Y destacamos la importancia de realizar revisiones cutáneas periódicas en estos pacientes así como la necesidad de incluir la valoración de los factores clínicos y ambientales en los programas de seguimiento de los pacientes trasplantados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zwald FO, Brown M. Skin cancer in solid organ transplant recipients: advances in therapy and management. Part I. Epidemiology of skin cancer in solid organ transplant recipients. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65:253-61.
2. Fuente MJ, Sabat M, Roca J, Lauzurica R, Fernández-Figueras MT, Ferrándiz C. A prospective study of the incidence of skin cancer and its risk factors in a Spanish Mediterranean population of kidney transplant recipients. *Br J Dermatol* 2003; 149:1221-6.
3. Moloney FJ, Comber H, O'Lorcain P, O'Kelly P, Conlon PJ, Murphy GM. A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 2006;154:498-504.
4. Organización Nacional de Trasplantes [en línea]. Disponible en <<https://reports.ont.es/datoshistoricos.aspx>> [2012-09-15].
5. Bordea C, Wojnarowska F, Millard PR, Doll H, Welsh K, Morris PJ. Skin cancers in renal-transplant recipients occur more frequently than previously recognized in a temperate climate. *Transplantation* 2004;77:574-9.
6. Rigel DS, Cockerell CJ, Carucci J, Wharton J. Actinic keratosis, Basal cell carcinoma and Squamous cell carcinoma. En: Bologna LD, Jorizzo JL, Rapini PR, editors. *Dermatology*. Second edition. UK: Elsevier; 2008.p.1641-1659.
7. Quinn A.G, Perkins W. Non-melanoma skin cancer and other epidermal skin tumours. En: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editores. *Rook's Textbook of Dermatology*. 8ª edición. Oxford: Blackwell Publishing; 2010.p.52.1-52.48.
8. Weedon D. Tumors of the epidermis. En: *Skin Pathology*. 3º Edition. U.K: Churchill Livingstone Elsevier;2010.p.667-708.
9. Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam k, Sobin L, Parkin D.M, et al. *International Classification of Diseases For Oncology*. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2000.

10. González-López M, Gómez-Díez S, Ceriera-Cantalapiedra J, Solar-Sánchez T, Pérez-Oliva N. Queratoacantomas múltiples. *Actas Dermosifiliogr.* 1999;90:245-9.
11. Ramsay HM, Fryer AA, Hawley CM, Smith AG, Harden PN. Non-melanoma skin cancer risk in the Queensland renal transplant population. *Br J Dermatol* 2002; 147:950-6.
12. Bouwes Bavinck JN, Hardie DR, Green A, Cutmore S, MacNaught A, O'Sullivan B, et al. The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. A follow-up study. *Transplantation.* 1996;61:715-21.
13. Ramsay HM, Reece SM, Fryer AA, Smith AG, Harden PN. Seven-year prospective study of nonmelanoma skin cancer incidence in U.K. renal transplant recipients. *Transplantation.* 2007;84:437-9.
14. Marcén R, Galeano C, Fernández-Rodríguez A, Jiménez-Alvaro S, Teruel JL, Rivera M, et al. Effects of the new immunosuppressive agents on the occurrence of malignancies after renal transplantation. *Transplant Proc.* 2010;42:3055-7.
15. Ferrándiz C, Fuente MJ, Ribera M, Bielsa I, Fernández MT, Lauzurica R, et al. Epidermal dysplasia and neoplasia in kidney transplant recipients. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33:590-6.
16. Keller B, Braathen LR, Marti HP, Hunger RE. Skin cancers in renal transplant recipients: a description of the renal transplant cohort in Bern. *Swiss Med Wkly.* 2010; 15:140:w13036.
17. Fekecs T, Kádár Z, Battyáni Z, Kalmár-Nagy K, Szakály P, Horváth OP, et al. Incidence of nonmelanoma skin cancer after human organ transplantation: single-center experience in Hungary. *Transplant Proc.* 2010;42:2333-5.
18. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant.* 2004;4:905-13.
19. Ramsay HM, Fryer AA, Reece S, Smith AG, Harden PN. Clinical risk factors associated with nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis.* 2000;36:167-76.

20. Jensen P, Hansen S, Møller B, Leivestad T, Pfeffer P, Geiran O, et al. Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40:177-86.
21. Hartevelt MM, Bavinck JN, Kootte AM, Vermeer BJ, Vandenbroucke JP. Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation*. 1990;49:506-9.
22. Ho WL, Murphy GM. Update on the pathogenesis of post-transplant skin cancer in renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 2008; 158:217-24.
23. Ramsay HM, Fryer AA, Hawley CM, Smith AG, Nicol DL, Harden PN et al. Factors associated with nonmelanoma skin cancer following renal transplantation in Queensland, Australia. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:397-406.
24. Danovitch G.M. Immunosuppressive Medications and Protocols for Kidney Transplantation. En: *Handbook of kidney Transplantation*. 5ª edición. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.p.77-126.
25. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J transplant* 2009; 9:S1-157.
26. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*. 1999;397:530-4.
27. Yarosh DB, Pena AV, Nay SL, Canning MT, Brown DA. Calcineurin inhibitors decrease DNA repair and apoptosis in human keratinocytes following ultraviolet B irradiation. *J Invest Dermatol*. 2005;125:1020-5.
28. Perrett CM, Walker SL, O'Donovan P, Warwick J, Harwood CA, Karran P, et al. Azathioprine treatment photosensitizes human skin to ultraviolet A radiation. *Br J Dermatol* 2008;159:198-204.

29. Caillard S, Dharnidharka V, Agodoa L, Bohem E, Abbott K. Posttransplant lymphoproliferative disorders after renal transplantation in the United States in era of modern immunosuppression. *Transplantation* 2005;80:1233-43.
30. Bustami RT, Ojo AO, Wolfe RA, Merion RM, Bennett WM, McDiarmid SV, et al. Immunosuppression and the risk of post-transplant malignancy among cadaveric first kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2004;4:87-93.
31. Geusau A, Dunkler D, Messeritsch E, Sandor N, Heidler G, Rödler S et al. Non-melanoma skin cancer and its risk factors in an Austrian population of heart transplant recipients receiving induction therapy. *Int J Dermatol* 2008;47:918-25.
32. Opelz G, Döhler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004;4:222-30.
33. Campbell SB, Walker R, Tai SS, Jiang Q, Russ GR. Randomized controlled trial of sirolimus for renal transplant recipients at high risk for nonmelanoma skin cancer. *Am J Transplant*. 2012;12:1146-56.
34. Kauffman HM, Cherikh WS, Cheng Y, Hanto DW, Kahan BD. Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies. *Transplantation* 2005;80:883-9.
35. Yakupoglu YK, Buell JF, Woodle S, Kahan BD. Individualization of immunosuppressive therapy. III. Sirolimus associated with a reduced incidence of malignancy. *Transplant Proc* 2006;38:358-61.
36. Fernández A, Marcén R, Pascual J, Galeano C, Ocaña J, Arellano EM et al. Conversion from calcineurin inhibitors to everolimus in kidney transplant recipients with malignant neoplasia. *Transplant Proc* 2006;38:2453-5.
37. De Fitjer JW. Use of proliferation signal inhibitors in non-melanoma skin cancer following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:23-6.
38. Ulrich C, Jürgensen JS, Degen A, Hackethal M, Ulrich M, Patel MJ, et al. Prevention of non-melanoma skin cancer in organ transplant patients by regular use of a

- sunscreen: a 24 months, prospective, case-control study. *Br J Dermatol.* 2009;161:78-84.
39. Mathew T, Kreis H, Friend P. Two-year incidence of malignancy in sirolimus-treated renal transplant recipients: results from five multicenter studies. *Clin Transplant* 2004;18:446-9.
40. McQuillan RF, O'Seaghdha CM, Bagatto A, Manusamy M, Errakiah N, Sinnott C, et al. The effect of switching from calcineurin inhibitor to sirolimus on the incidence of skin cancers in kidney transplant recipients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23:330-1.
41. Tessmer CS, Magalhaes LV, Keitel E, Valar C, Gnatta D, Pra RL, et al. Conversion to sirolimus in renal transplant recipients with skin cancer. *Transplantation* 2006; 82:1792-3.
42. Monaco AP. The role of mTOR inhibitors in the management of posttransplant malignancy. *Transplantation* 2009;87:157-63.
43. Pranteda G, Feliziani G, Grimaldi M, Paleologo G, Pranteda G, Melotti F, et al. Sirolimus and regression of Kaposi's sarcoma in immunosuppressed transplant patient. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22:1022-3.
44. Campistol JM, Eris J, Oberbauer R, Friend P, Hutchison B, Morales JM, et al. Sirolimus therapy after early cyclosporine withdrawal reduces the risk for cancer in adult renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:581-9.
45. Otley CC, Berg D, Ulrich C, Stasko T, Murphy GM, Salasche SJ, et al. Reduction of immunosuppression for transplant-associated skin cancer: expert consensus survey. *Br J Dermatol.* 2006;15:395-400.
46. Abou Ayache R, Thierry A, Bridoux F, Bauwens M, Belmouaz M, Desport E, et al. Long-term maintenance of calcineurin inhibitor monotherapy reduces the risk for squamous cell carcinomas after kidney transplantation compared with bi- or tritherapy. *Transplant Proc.* 2007;39:2592-4.

47. Ulrich C, Jürgensen JS, Degen A, Hackethal M, Ulrich M, Patel MJ, et al. Prevention of non-melanoma skin cancer in organ transplant patients by regular use of a sunscreen: a 24 months, prospective, case-control study. *Br J Dermatol.* 2009;161:78-84.
48. Skiveren J, Mortensen EL, Haedersdal M. Sun protective behaviour in renal transplant recipients. A qualitative study based on individual interviews and the Health Belief Model. *J Dermatolog Treat.* 2010;21:331-6.
49. Webb MC, Compton F, Andrews PA, Koffman CG. Skin tumours posttransplantation: a retrospective analysis of 28 years' experience at a single centre. *Transplant Proc.* 1997;29:828-30.
50. Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Dureau G, Touraine JL, Faure M, et al. Comparative epidemiologic study of premalignant and malignant epithelial cutaneous lesions developing after kidney and heart transplantation. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33:222-9.
51. Murphey CL, Bingaman AW. Histocompatibility considerations for kidney paired donor exchange programs. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012;17:427-32.
52. Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, van der Woude FJ, Vandenbroucke JP, Schreuder GM, Thorogood J, et al. Relation between skin cancer and HLA antigens in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 1991;325:843-8.
53. Bouwes Bavinck JN, Claas FH, Hardie DR, Green A, Vermeer BJ, Hardie IR. Relation between HLA antigens and skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. *J Invest Dermatol* 1997;108:708-11.
54. Bock A, Bliss RL, Matas A, Little JA. Human leukocyte antigen type as a risk factor for nonmelanomatous skin cancer in patients after renal transplantation. *Transplantation* 2004;78:775-8.
55. Jensen AO, Svaerke C, Farkas D, Pedersen L, Kragballe K, Sørensen HT. Skin cancer risk among solid organ recipients: a nationwide cohort study in Denmark. *Acta Derm Venérelol* 2010;90:474-9.

56. Naldi L, Fortina AB, Lovati S, Barba A, Gotti E, Tessari G, et al. Risk of nonmelanoma skin cancer in Italian organ transplant recipients. A registry-based study. *Transplantation*. 2000;70:1479-84.
57. Kelly DM, Emre S, Guy SR, Miller CM, Schwartz ME, Sheiner PA. Liver transplant recipients are not at increased risk for nonlymphoid solid organ tumors. *Cancer*. 1998;83:1237-43.
58. Zavos G, Karidis NP, Tsourouflis G, Bokos J, Diles K, Sotirchos G, et al. Nonmelanoma skin cancer after renal transplantation: a single-center experience in 1736 transplantations. *Int J Dermatol*. 2011;50:1496-500.
59. Berg D, Otley CC. Skin cancer in organ transplant recipients: Epidemiology, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47:1-17.
60. Sheil AG, Flavel S, Disney AP, Mathew TH. Cancer development in patients progressing to dialysis and renal transplantation. *Transplant Proc*. 1985;17:1685-8.
61. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2012;366:2171-9.
62. Cowen EW, Nguyen JC, Miller DD, McShane D, Arron ST, Prose NS, et al. Chronic phototoxicity and aggressive squamous cell carcinoma of the skin in children and adults during treatment with voriconazole. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62:31-7.
63. Vanacker A, Fabré G, Van Dorpe J, Peetermans WE, Maes B. Aggressive cutaneous squamous cell carcinoma associated with prolonged voriconazole therapy in a renal transplant patient. *Am J Transplant*. 2008;8:877-80.
64. Mehrany K, Weenig RH, Lee KK, Pittelkow MR, Otley CC. Increased metastasis and mortality from cutaneous squamous cell carcinoma in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:1067-71.
65. Stern RS; PUVA Follow-Up Study. The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: a 30-year prospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66:553-62.

66. Wolf P, Seidl H, Bäck B, Binder B, Höfler G, Quehenberger F, et al. Increased prevalence of human papillomavirus in hairs plucked from patients with psoriasis treated with psoralen-UV-A. *Arch Dermatol.* 2004;140:317-24
67. Müller F, Giroglou T, Sapp M. Characterization of the DNA-binding activity of the E1 and E2 proteins and the E1/E2 complex of human papillomavirus type 33. *J Gen Virol.* 1997;78:911-5.
68. Sapp M, Volpers C, Müller M, Streeck RE. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol.* 1995;76:2407-12.
69. de Villiers E.M. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Pap.Rep.* 2001;12:57-63.
70. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;20;324:17-27.
71. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen Hz, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401:70-9.
72. Köhler A, Gottschling M, Manning K, Lehmann MD, Schulz E, Krüger-Corcoran D, et al. Genomic characterization of ten novel cutaneous human papillomaviruses from keratotic lesions of immunosuppressed patients. *J Gen Virol.* 2011;92:1585-94.
73. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15.
74. Knappe M, Bodevin S, Selinka HC, Spillmann D, Streeck RE, Chen XS, et al. Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem.* 2007;282:27913-22.
75. Arron ST, Ruby JG, Dybbro E, Ganem D, Derisi JL. Transcriptome sequencing demonstrates that human papillomavirus is not active in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2011;131:1745-53.
76. Marcuzzi GP, Hufbauer M, Kasper HU, Weissenborn SJ, Smola S, Pfister H. Spontaneous tumour development in human papillomavirus type 8 E6 transgenic

- mice and rapid induction by UV-light exposure and wounding. *J Gen Virol.* 2009;90:2855-64.
77. Struijk L, van der Meijden E, Kazem S, ter Schegget J, de Gruijl FR, Steenbergen RD, et al. Specific betapapillomaviruses associated with squamous cell carcinoma of the skin inhibit UVB-induced apoptosis of primary human keratinocytes. *J Gen Virol.* 2008;89:2303-14.
78. Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, et al. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J.* 2002;21:4741-8.
79. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. The human papillomavirus E7 protein. *Virology.* 2009;384:335-44.
80. Dang C, Koehler a, Forschner T, Sehr R, Michael K, Pawlita M, et al. E6/E7 expression of human papillomavirus types in cutaneous squamous cell dysplasia and carcinoma in immunosuppressed organ transplant recipients. *Br J Dermatol.* 2006;155:129-36.
81. Akgül B, Bostanci N, Westphal K, Nindl I, Navsaria H, Storey A, et al. Human papillomavirus 5 and 8 E6 downregulate interleukin-8 secretion in primary human keratinocytes. *J Gen Virol.* 2010;91:888-92.
82. Arron ST, Jennings L, Nindl I, Rosl F, Bouwes Bavinck JN, Seçkin D, et al. Viral oncogenesis and its role in nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2011;164:1201-13.
83. Forslund O, Ly H, Higgins G. Improved detection of cutaneous human papillomavirus DNA by single tube nested “hanging droplet” PCR. *J Virol Methods.* 2003;110:129-36.
84. Karagas MR, Nelson HH, Sehr P, Waterboer T, Stukel TA, Andrew A, et al. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:389-95.

85. Majewski S, Jabłońska S, Orth G. Epidermodysplasia verruciformis. Immunological and nonimmunological surveillance mechanisms: role in tumor progression. *Clin Dermatol*. 1997;15:321-34.
86. Purdie KJ, Sexton CJ, Proby CM, Glover MT, Williams AT, Stables JN, et al. Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus. *Cancer Res*. 1993;53:5328-33.
87. Blessing K, McLaren KM, Benton EC, Barr BB, Bunney MH, Smith IW, et al. Histopathology of skin lesions in renal allograft recipients--an assessment of viral features and dysplasia. *Histopathology*. 1989;14:129-39.
88. Asgari MM, Kiviat NB, Critchlow CW, Stern JE, Argenyi ZB, Raugi GJ, et al. Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol*. 2008;128:1409-17.
89. Majewski S, Jablonska S. Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36:659-85; quiz 686-8.
90. Shamanin V, zur Hausen H, Lavergne D, Proby CM, Leigh IM, Neumann C, et al. Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:802-11.
91. Boxman IL, Russell A, Mulder LH, Bavinck JN, Schegget JT, Green A. Case-control study in a subtropical Australian population to assess the relation between non-melanoma skin cancer and epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs. The Nambour Skin Cancer Prevention Study Group. *Int J Cancer*. 2000;86:118-21.
92. Escutia B, Ledesma E, Serra-Guillen C, Gimeno C, Vilata JJ, Guillén C, et al. Detection of human papilloma virus in normal skin and in superficial and nodular basal cell carcinomas in immunocompetent subjects. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25:832-8.
93. Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, et al. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in

- immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 2000;61:289-297.
94. Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, et al. Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol.* 1997;108:712-5.
 95. Astori G, Lavergne D, Benton C, Höckmayr B, Egawa K, Garbe C, et al. Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *J Invest Dermatol.* 1998;110:752-5.
 96. Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Hansson BG. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol.* 1999;80:2437-43.
 97. Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol.* 2000;74:11636-41.
 98. Bouwes Bavinck JN, Plasmeijer EI, Feltkamp MC. Beta-papillomavirus infection and skin cancer. *J Invest Dermatol.* 2008;128:1355-8.
 99. de Koning MN, Struijk L, Bavinck JN, Kleter B, ter Schegget J, Quint WG, et al. Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *J Gen Virol.* 2007;88:1489-95.
 100. Otley CC, Cherkh WS, Salasche SJ, McBride MA, Christenson LJ, Kauffman HM. Skin cancer in organ transplant recipients: effect of pretransplant end-organ disease. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:783-90.
 101. Lampros TD, Cobanoglu A, Parker F, Ratkovec R, Norman DJ, Hershberger R. Squamous and basal cell carcinoma in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1998;17:586-91.
 102. Molina BD, Leiro MG, Pulpón LA, Mirabet S, Yáñez JF, Bonet LA, et al. Incidence and risk factors for nonmelanoma skin cancer after heart transplantation. *Transplant Proc* 2010;42:3001-5.

103. Wimmer CD, Rentsch M, Crispin A, Illner WD, Arbogast H, Graeb C, et al. The janus face of immunosuppression - de novo malignancy after renal transplantation: the experience of the Transplantation Center Munich. *Kidney Int* 2007;71:1271-8.
104. Geusau A, Dunkler D, Messeritsch E, Sandor N, Heidler G, Rödler S, et al. Non-melanoma skin cancer and its risk factors in an Austrian population of heart transplant recipients receiving induction therapy. *Int J Dermatol* 2008;47:918-2.
105. Lebbé C, Euvrard S, Barrou B, Pouteil-Noble C, Garnier JL, Glotz D, et al. Sirolimus conversion for patients with posttransplant Kaposi's sarcoma. *Am J Transplant*. 2006;6:2164-8.
106. Bouwes Bavinck JN, Euvrard S, Naldi L, Nindl I, Proby CM, Neale R et al. Keratotic skin lesions and other risk factors are associated with skin cancer in organ-transplant recipients: a case-control study in The Netherlands, United Kingdom, Germany, France, and Italy. *J Invest Dermatol* 2007;127:1647-56.
107. Zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1288:F55-78.
108. Kocken M, Berkhof J, van Kemenade FJ, Louwers JA, Zaal A, Nobbenhuis MA, et al. Long-term CIN3+ risk in women with abnormal cytology; role of hrHPV testing. *Br J Cancer*. 2012;106:817-25.
109. Tieben LM, Berkhout RJ, Smits HL, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, Bruijn JA, et al. Detection of epidermodysplasia verruciformis-like human papillomavirus types in malignant and premalignant skin lesions of renal transplant recipients. *Br J Dermatol*. 1994;131:226-30.
110. Berkhout RJ, Tieben LM, Smits HL, Bavinck JN, Vermeer BJ, ter Schegget J. Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 1995;33:690-5.
111. Dang C, Koehler A, Forschner T, Sehr P, Michael K, Pawlita M, et al. E6/E7 expression of human papillomavirus types in cutaneous squamous cell dysplasia and

- carcinoma in immunosuppressed organ transplant recipients. *Br J Dermatol.* 2006;155:129-36.
112. Casabonne D, Waterboer T, Michael KM, Pawlita M, Lally A, Mitchell L, et al. The sero-epidemiology of human papillomavirus among Caucasian transplant recipients in the UK. *Infect Agent Cancer.* 2009;4:13.
113. Proby CM, Harwood CA, Neale RE, Green AC, Euvrard S, Naldi L, et al; EPI-HPV-UV-CA group. A case-control study of betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma in organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2011;1:1498-508.
114. Iftner A, Klug SJ, Garbe C, Blum A, Stancu A, Wilczynski SP, et al. The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res.* 2003;63:7515-9.
115. Forslund O, Iftner T, Andersson K, Lindelof B, Hradil E, Nordin P, et al; Viraskin Study Group. Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. *J Infect Dis.* 2007;196:876-83.
116. Rollison DE, Pawlita M, Giuliano AR, Iannacone MR, Sondak VK, Messina JL, et al. Measures of cutaneous human papillomavirus infection in normal tissues as biomarkers of HPV in corresponding nonmelanoma skin cancers. *Int J Cancer.* 2008;123:2337-42.
117. Patel AS, Karagas MR, Perry AE, Nelson HH. Exposure profiles and human papillomavirus infection in skin cancer: an analysis of 25 genus beta-types in a population-based study. *J Invest Dermatol.* 2008;128:2888-93.
118. Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P, Proby CM, Bordea C, Leigh IM, et al. Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br J Dermatol.* 2004;150:949-57.

119. Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* 2000;14:3065-73.
120. Weissenborn SJ, Nindl I, Purdie K, Harwood C, Proby C, Breuer J, et al. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol.* 2005;125:93-7.
121. Pfister H, Fuchs PG, Majewski S, Jablonska S, Pniewska I, Malejczyk M. High prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in actinic keratoses of the immunocompetent population. *Arch Dermatol Res.* 2003;295:273-9.