



Universitat Autònoma de Barcelona

**FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**CARCINOMAS CUTÁNEOS EN LOS
PACIENTES RECEPTORES DE UN TRASPLANTE RENAL.
ESTUDIO DE SU INCIDENCIA, IDENTIFICACIÓN DE LAS
VARIABLES CLÍNICAS RELACIONADAS E INVESTIGACIÓN DE
SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO.**

M^a José Fuente González

2003

TÍTULO

CARCINOMAS CUTÁNEOS EN LOS
PACIENTES RECEPTORES DE UN TRASPLANTE RENAL.
ESTUDIO DE SU INCIDENCIA, IDENTIFICACIÓN DE LAS
VARIABLES CLÍNICAS RELACIONADAS E INVESTIGACIÓN DE
SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO.

Tesis presentada por M^a José Fuente González
para optar al grado de Doctor en Medicina.

Director de la Tesis:

Doctor Carlos Ferrándiz Foraster,
Profesor Titular de Dermatología de la Universitat Autònoma de Barcelona
Jefe de Servicio de Dermatología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.

DEDICATORIA

A mis padres, por todo.

A Paco, Javier y Miquel por ser la ilusión de cada día.

AGRADECIMIENTOS

Desearía expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han colaborado a la realización de esta tesis. Podría ocurrir que en esta lista existiera alguna omisión involuntaria, por lo cual pido disculpas de antemano.

Al Prof. Carlos Ferrándiz, Jefe de Servicio de Dermatología del Hospital Germans Trias i Pujol, Profesor Titular de Dermatología de la Universitat Autònoma de Barcelona y director de esta Tesis. Reconozco que sin su ayuda, su estímulo, su paciencia y sus valiosos consejos, esta tesis no hubiera sido posible. Pero además, le agradezco el ejemplo de amor al trabajo y el modelo de integridad moral que ha representado para mí.

A los Dr. Miquel Ribera y la Dra. Isabel Bielsa, mis maestros y compañeros. Ellos colaboraron en el diseño e hicieron posible el inicio de este estudio. Pero además, cada uno de ellos, de una forma u otra, ha colaborado en mi "formación integral" como dermatóloga y como persona. Les agradezco su amistad y sus consejos que han sido fundamentales para mí.

A mi compañero y amigo, el Dr. José Manuel Carrascosa, un buen profesional y buen compañero. Le agradezco su amistad y apoyo.

A los Residentes de Dermatología del HUGTiP, por su colaboración y camaradería que me ha ayudado a disfrutar con el trabajo diario.

Al Dr. Ricardo Lauzurica y la Dra. Elisabeth Bayés del Servicio de Nefrología, por facilitar la labor de recogida y seguimiento de los enfermos.

A Ana Julià, Nuria Piqué y resto del equipo de enfermería del Servicio de Dermatología, por su buena disposición en el trabajo diario y su capacidad de animarme en los momentos bajos.

Al Dr. Josep Roca, responsable de la Unidad de Epidemiología, al que agradezco su asesoramiento y ayuda en los análisis estadísticos de los datos.

Al Servicio de Anatomía Patológica, en concreto a la Dra. Maite Fernández-Figueras, por su colaboración en los estudios inmunohistoquímicos y a la Sra. Angeles Fernández-Vasalo, técnica del laboratorio de Inmunohistoquímica, por su impecable labor de preparación y procesamiento de las numerosas muestras estudiadas.

Al Dr. Ricardo Pujol, responsable de la Unidad de Investigación de nuestro centro que puso a mi disposición todos los recursos necesarios para la realización de una parte del trabajo. Al Dr. Orlando Dominguez y a la Srta. Pepi Caro de la Unidad de Investigación, que me enseñaron todo lo necesario para llevar a cabo la secuenciación del ADN.

A la Dra. Belén Lloveras, Dra. Silvia de Sanjosé y el Dr. Xavier Bosch del Institut Català d' Oncología que colaboran en la continuación de este estudio donde se aplicaran nuevas técnicas de biología molecular para el estudio de las muestras.

A todos los pacientes que de forma voluntaria y desinteresada aceptaron participar en este estudio.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias que con sus becas (PI 93/0101 y PI 97/0978) permitió la realización de este proyecto.

A la Beca Predoctoral del Plan de Formación del Personal Investigador (AP 94 33917876) de Ministerio de Educación y Ciencia que recibí durante los años 94-97.

ÍNDICE

ÍNDICE

TITULO	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
INDICE	6
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	10
1. EL CÁNCER CUTÁNEO EN EL PACIENTE RECEPTOR DE UN ÓRGANO TRASPLANTADO (PROT)	13
1.1. Los carcinomas cutáneos en el PROT. Incidencia y características.	13
1.2. Factores de riesgo para el desarrollo de carcinomas cutáneos en el PROT	19
1.2.1. El tratamiento inmunosupresor	19
1.2.2. La exposición solar	20
1.2.3. Las infecciones víricas. La infección por el virus del papiloma humano	23
1.2.4. Los factores genéticos e inmunológicos	24
1.2.5. La edad	25
1.2.6. Otros factores	26
2. LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)	27
2.1. Estructura y comportamiento biológico	27
2.2. Clasificación y filogenia	30
2.3. Técnicas de detección de la infección por el VPH	33
2.4. El VPH y el cáncer	36
2.4.1. El VPH y el cáncer anogenital	36
2.4.2. El VPH y los carcinomas cutáneos	37
2.4.2.1. Epidermodisplasia verruciforme	38
2.4.2.2. Paciente receptor de un órgano trasplantado	40
2.4.2.3. Pacientes tratados con PUVA	43
2.4.2.4. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana	45
2.4.2.5. Individuos inmunocompetentes	45
2.5. Presencia del VPH en la piel normal y en las enfermedades inflamatorias de la piel	47
2.6. Lesiones benignas inducidas por el VPH en los PROTs	48
3. LA PROTEÍNA P53	49
3.1. Expresión de la p53 en los carcinomas cutáneos	51
3.2. Expresión de la p53 en los carcinomas cutáneos de los PROTs	53
II. <u>OBJETIVOS</u>	55
III. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	57
1. INCIDENCIA DE CARCINOMAS CUTÁNEOS EN LOS RECEPTORES DE UN TRASPLANTE RENAL (RTR) Y ESTUDIO DE LAS VARIABLES RELACIONADAS	58

1.1. Pacientes y métodos	58
1.1.1. Inclusión de los pacientes	58
1.1.2. Recogida de las muestras	62
1.2. Metodología estadística	62
2. DETECCIÓN DEL ADN DEL VPH	64
2.1. Muestras estudiadas	64
2.2. Método para la detección del ADN del VPH.	64
2.2.1. Extracción del ADN a partir de tejido incluido en parafina.	65
2.2.2. Reacción de amplificación del ADN. Técnica de la PCR.	65
2.2.3. Identificación de los tipos de VPH por digestión con enzimas de restricción	66
2.2.3.1. Comprobación del amplificado	67
2.2.3.2. Digestión del producto amplificado	
2.2.4. Secuenciación de los tipos de VPH no identificados mediante los patrones de restricción	74
3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUIMICA DE LA PROTEÍNA P53	77
3.1. Muestras estudiadas	77
3.2. Técnica de inmunohistoquímica	77
3.3. Metodología estadística	79
IV. RESULTADOS	80
1. INCIDENCIA DE CARCINOMAS CUTÁNEOS EN LOS RTRS Y ESTUDIO DE LAS VARIABLES RELACIONADAS	81
1.1. Estudio de la incidencia de lesiones cutáneas en los RTRs	81
1.1.1. Estudio de la incidencia de los carcinomas cutáneos	81
1.1.2. Estudio de la incidencia de las queratosis displásicas	87
1.1.3. Estudio de la incidencia de las verrugas víricas	88
1.1.4. incidencia de otros cánceres no cutáneos	88
1.2. Estudio de las variables relacionadas con el desarrollo de las lesiones cutáneas de los RTRs.	89
1.2.1. Variables relacionadas con el desarrollo de los carcinomas cutáneos	89
1.2.2. Variables relacionadas con el desarrollo de las queratosis displásicas	94
1.2.3. Variables relacionadas con el desarrollo de las verrugas víricas	95
2. DETECCIÓN DEL VPH EN LAS LESIONES CUTÁNEAS DE LOS RTRs	96
2.1. Prevalencia de detección del VPH en las lesiones cutáneas de los RTRs	96
2.2. Tipos de VPH detectados en las lesiones cutáneas de los RTRs	96
3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUIMICA DE LA PROTEÍNA P53 EN LAS LESIONES CUTÁNEAS DE LOS RTRs	102

V. <u>DISCUSIÓN</u>	104
1. ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE LOS CARCINOMAS CUTÁNEOS EN LOS TRASPLANTADOS RENALES Y DE SUS VARIABLES RELACIONADAS	105
2. INFECCIÓN POR EL VPH EN LOS RECEPTORES DE UN TRASPLANTE RENAL	119
3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA P53 EN LAS LESIONES CUTÁNEAS DE LOS RTRS	126
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	130
VII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	135

INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que las infecciones y las neoplasias de diferentes localizaciones, entre ellas la piel, forman parte de las complicaciones más frecuentes y temidas de los pacientes receptores de un órgano trasplantado (PROTs) (Penn I., 1994 y Hardie IR y cols., 1980). El aumento incesante del número de trasplantes realizados en las últimas décadas y el alargamiento en la supervivencia de los receptores de los mismos ha condicionado que el conjunto de pacientes con riesgo de desarrollar este tipo de complicaciones crezca día a día. Sólo en esta última década, según la Organización Nacional de Trasplantes, unos 30.000 pacientes han recibido un trasplante de órgano en nuestro país. Entre las complicaciones cutáneas de estos pacientes merece la pena destacar a las neoplasias cutáneas, fundamentalmente a los carcinomas cutáneos (CCs) que, en algunos casos, pueden llegar a ser una causa de mortalidad (Ong CS y cols., 1999).

Los CCs son los cánceres más frecuentes en los seres humanos. Dentro de estos destacamos, fundamentalmente, dos tipos: el carcinoma escamoso o epidermoide y el carcinoma basocelular. En la población general la incidencia del carcinoma basocelular es 4 veces mayor a la del carcinoma escamoso (Silverberg E y Lubera J. 1986).

El *carcinoma escamoso o epidermoide* (CE) es una proliferación maligna que deriva de los queratinocitos de la epidermis y que tiene la capacidad de metastatizar. La mayoría de los casos se originan sobre lesiones previas, llamadas lesiones premalignas o precancerosas. Dentro de estas lesiones podemos incluir a la

queratosis actínica, la queilitis actínica, la enfermedad de Bowen, la leucoplasia y la eritroplasia. El principal factor etiológico del CE es la exposición solar crónica, lo que condiciona el predominio del tumor en las zonas expuestas del cuerpo y justifica su mayor incidencia en aquellos individuos que desarrollan su actividad profesional al aire libre, o bien, tienen una piel clara. Otros factores etiológicos son la exposición a carcinógenos químicos como el arsénico y el alquitrán, a fuentes de radiaciones ionizantes y, también, se ha relacionado con la infección por el VPH y los procesos inflamatorios crónicos.

El *carcinoma basocelular* (CB) es el tumor cutáneo maligno más frecuente en la raza blanca que, probablemente, deriva de células pluripotenciales del germen epitelial primario. Su nombre se debe a que está constituido por células semejantes a las de la capa basal de la epidermis y los anejos cutáneos y se caracteriza porque sólo de forma excepcional produce metástasis. Al igual que en el CE, el principal factor etiopatogénico conocido es la exposición solar, lo que condiciona su mayor incidencia en los países con latitudes bajas. A diferencia del CE suele aparecer sobre piel sana y nunca afecta a mucosas, palmas y plantas.

1. EL CÁNCER CUTÁNEO EN EL PACIENTE RECEPTOR DE UN ÓRGANO TRASPLANTADO (PROT)

En los pacientes trasplantados se ha observado un número elevado de neoplasias que, en muchos casos afectan, de forma primitiva o bien a lo largo de su evolución, a la piel (Penn I., 1994). De este modo, se ha encontrado que el riesgo de desarrollar un linfoma en trasplantados es de 20 a 120 veces mayor que en la población general y que la incidencia del sarcoma de Kaposi está aumentada de 150 a 1000 veces, dependiendo del tipo de inmunosupresión (Berg D y cols., 2002). En lo que hace referencia a la piel destacan los CCs con una incidencia extraordinariamente alta y una evolución clínica más agresiva que en la población general (Gupta AK y cols., 1986 y Barret WL y cols., 1993).

1. 1. Los carcinomas cutáneos en el PROT. Incidencia y características.

Si hacemos una abstracción de los datos aparecidos en la literatura, podemos generalizar que la incidencia de los CCs en los PROTs es más alta que en la población general y que, además, estos tumores presentan ciertas peculiaridades clínicas.

Respecto a la incidencia, dos estudios recientes realizados en los países escandinavos han comparado los datos de incidencia del CE en los PROTs con los de la población general y han puesto de manifiesto que el riesgo relativo para desarrollar un CE es hasta 65 veces superior en los PROTs (Lindelöf B y cols., 2000 y Jensen P y cols., 1999).

A pesar de la unanimidad en aceptar que el riesgo relativo de padecer CCs en pacientes trasplantados es mucho mayor que en la población general, resulta difícil conocer y, sobre todo, comparar, las cifras de incidencia de estos tumores en diferentes países, debido al irregular y, a menudo, poco acertado diseño, de los estudios existentes. En la tabla 1 se intenta reflejar los resultados de los estudios más importantes realizados. En ella se puede ver que la mayoría de datos de incidencia corresponden a estudios retrospectivos que se basan en datos extraídos de registros de tumores, donde habitualmente sólo figuran los CE. Además, con frecuencia estos estudios utilizan para valorar la incidencia términos estadísticos difíciles de comparar entre sí como es el periodo prevalencia, la incidencia acumulada, el riesgo relativo y, además, en muchos casos no queda claro el tiempo de seguimiento post-trasplante.

Tabla 1: Resumen de los resultados obtenidos por los diferentes estudios publicados entre los años 1980 y 2001.

AUTOR AÑO	PAIS LATITUD	TIPO ESTUDIO	EDAD TR	PACIENTES	SEGUIMIENTO	CC (prevalencia)	OBSERVACIONES
HARDIE 1980	Australia 27°28'	prospectivo	NC	301	máximo 9 años	8,6%	44% a los 9 a CE/CB= 1,7/1 73% CCs múltiples
BLOHME 1984	Suecia 57°43'	retrospectivo	NC	129	3-16 años 42 pac. (3-4 a) 44 pac. (5-9 a) 43 pac.(10-16 a)	10,1%	70% CCs múltiples
GUPTA 1986	Canadá 43°40'	retrospectivo	40	523	máximo 18 años	5,3%	CE/CB=2,3/1 40% CCs múltiples
COHEN 1987	USA 43°	retrospectivo	NC	580	media 12,5 a	3,6%	CE/CB=2/1
LIDDINGTON 1989	Reino Unido 50-58°	prospectivo	39,2	598	máximo 12 a	5%	75% CCs múltiples
BLOHME 1990	Suecia 57°43'	prospectivo	50	98	10-23 a	25%	no inversión cociente CE/CB
HARTEVELT 1990	Holanda 52°	prospectivo	37,7	764	media 8,7a(1-21a)	6,2%	IA 10% (10 a) 40% (20 a) CE/CB=3,6/1 70% de CCs múltiples
TAYLOR 1992	Reino Unido 50-58°	retrospectivo	45	167	máximo 9 a	7,7%	
GAYA 1995	Reino Unido 50-58°	retrospectivo	39,7	274	NC	6,9%	IA 6,7% (10 a) y 26,3% (20 a) CE/CB=1,3/1 47% CCs múltiples

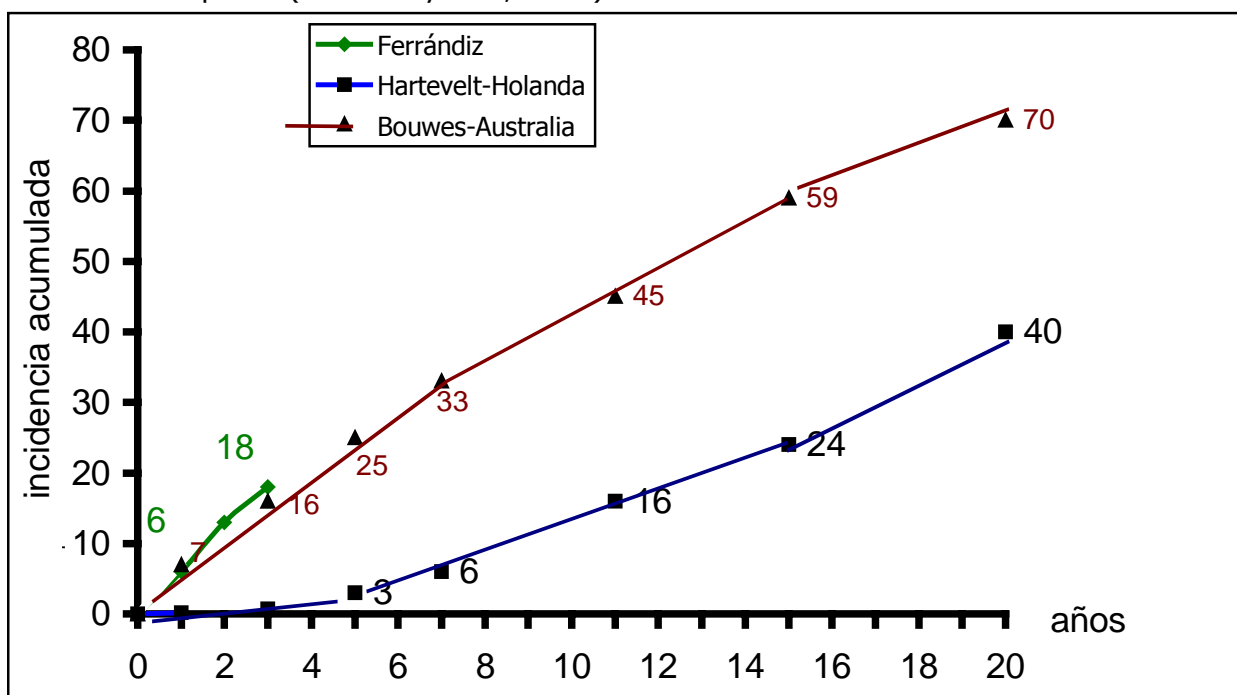
AUTOR AÑO	PAIS LATITUD	TIPO ESTUDIO	EDAD TR	PACIENTES	SEGUIMIENTO	CCs (prevalencia)	OBSERVACIONES
FERRÁNDIZ 1995	España 41°	prospectivo	45	81	Mediana. 34 m (1-3 a)	14,8%	IA 18,1% (3 a) CE/CB: 1/3,1
BOUWES - BAVINCK 1996	Australia 27°28'	retrospectivo	42,3	1098	media 5,2 a	32,7%	IA: 45% (11a) y 70%(20 a) CE/CB= 2,9/1
WEBB 1997	Reino Unido 51°31'	retrospectivo	NC	1075	media 4,9 a	NC	IA 16% (10 a) y 52% (20 a) CE/CB= 2,7/1
BEHREND 1997	Alemania 52°23'	retrospectivo	37,8	2372	1097 >5 a, 409 >10 a 142 >15 a 16 > 20 a	NC	IA 4,8% (10 a) y 8,8% (20 a)
JENSEN 1999	Noruega 57°-70°	retrospectivo	46,8	2397	Media 4,8(-28 a)	NC	<u>Importante sólo contabiliza CE</u> IA 2% (5 a), 7% (10 a) y 18% (20 a)
LINDELÖF 2000	Suecia 56°-68°	retrospectivo	NC	5356	Media 5,6(0-24 a)	3,2%	<u>Importante sólo contabiliza CE</u> Calcula riesgo relativo respecto a la población general
RAMSAY 2000	Reino Unido 52°48'	prospectivo	37	182	Media 7,6 a	16,5%	Nuevos casos /año: 5-6,5% de 5-9 a 10,5% más de 10 a CE/CB=3,8/1
NALDI 2000	Italia 45°45'	retrospectivo	37	1062	Media 4a (0,3-26 a)	6,7%	IA 4,3% (5 a) y 9,7% (10 a) CE/CB=1/2,1

NC: este dato no consta en el estudio.

IA: incidencia acumulada

Sin embargo, sorprende que los datos de los escasos estudios que utilizan una metodología estadística semejante (cálculo de la incidencia acumulada) varían en términos muy amplios. De esta manera, a los 3 años de seguimiento, se publica una incidencia acumulada de un 0% en Holanda (Hartevelt MM y cols., 1990), un 13% en Australia (Bouwes Bavinck JN y cols., 1996) y un 18% en España (Ferrándiz C y cols., 1995), a los 10 años esta alcanza un 10% en Holanda y un 44% en Australia, cifras que se incrementan al 40% y 70%, respectivamente, tras 20 de seguimiento, (Hartevelt MM y cols., 1990, Bouwes Bavinck JN y cols., 1996,) (figura 1). Otros estudios de Alemania y Reino Unido refieren unas incidencias acumuladas que oscilan entre el 4,8% y el 10% a los 10 años postrasplante (Behren y cols; 1997 y Gaya 1995). En Italia, en una zona de latitud semejante a la nuestra, un estudio basado en un registro de tumores refiere una incidencia del 9,7% a los 10 años.

Figura 1: Comparación de las incidencias acumuladas de CCs en varios países. En la gráfica podemos observar la gran similitud entre los resultados de Bouwes- Bavinck en Australia y nuestro estudio previo (Ferrándiz y cols., 1995).



Además de esta mayor incidencia de CCs en la población de PROTs que en la población general, existen otras diferencias que podríamos definir como de índole cualitativa. Por un lado, la mayoría de estudios señalan un cambio en el cociente CB/CE. En la población general este cociente es favorable al CB con una relación de 4/1 (Silverberg E y Lubera J., 1986). En cambio, en las series de pacientes se ha observado que el CE es más frecuente que el CB, provocando una inversión en dicho cociente proporcional al tiempo de inmunosupresión (Hardie IR y cols., 1980 y Hartevelt MM y cols., 1990). La importancia fundamental de esto proviene del peor pronóstico del CE que, como ya hemos comentado, tiene una mayor agresividad local y además posee capacidad de metastatizar.

Por otro lado, el comportamiento biológico de los tumores cutáneos de los trasplantados también tiene un curso más agresivo, con un crecimiento más rápido y con frecuente recidiva local tras su exéresis e, incluso, con cierta frecuencia provocan metástasis a distancia (Ong CS y cols., 1999). Así, en algunas series largas, se ha determinado que entre un 8-11,7% de los pacientes con CEs desarrollaban metástasis y que un 3% de estos pacientes morían a consecuencia de ellas (Berg D y cols., 2002). En esta agresividad clínica, probablemente influye la tolerancia inmunológica a la progresión tumoral debida a la inmunosupresión yatrogénica.

1.2. Factores de riesgo para el desarrollo de los CCs en el PROT

El elemento diferencial más importante, entre la población general y los PROT, es el tratamiento inmunosupresor y, sin duda, es este el factor de riesgo más importante para el desarrollo de un CC. Sin embargo han de existir otros que nos ayuden a explicar las diferentes cifras de incidencia entre los distintos países. Entre ellos consideraremos:

1. El tratamiento inmunosupresor.
2. La exposición solar.
3. Las infecciones víricas. La infección por el virus del papiloma humano.
4. Los factores genéticos e inmunológicos.
5. La edad.
6. Otros factores.

1.2.1. El tratamiento inmunosupresor

Los fármacos inmunosupresores utilizados han variado a lo largo del tiempo. En los primeros años, los fármacos empleados eran los corticoides y la azatioprina, añadiéndose posteriormente la ciclosporina y, más recientemente, el tacrolimus y el micofenolato de mofetilo.

En los primeros estudios se culpó a la azatioprina de la espectacular incidencia de CCs en los trasplantados, atribuyéndole un doble efecto carcinogénico. Por una parte estaba su capacidad inmunosupresora y, por otra, un poder oncogénico directo como carcinógeno químico al interferir en la reparación del ADN (Taylor AE y Shuster S.,

1992, Lennard L y cols., 1985). Sin embargo, al introducir la ciclosporina se pudo observar que la incidencia del cáncer cutáneo no sólo no disminuía, sino que en algunas series se describe un aumento (Shuttleworth D y cols., 1989).

Estudios posteriores han demostrado que más que el tipo de agente inmunosupresor utilizado, el tiempo y la intensidad de la inmunosupresión son las variables que podrían guardar una relación directa con la aparición de los CCs . En este sentido, Jensen y cols (1999) demostraron que el riesgo de desarrollar CE se triplicaban cuando se utilizaba la asociación de 3 fármacos inmunosupresores en lugar de 2, con independencia del fármaco usado. Y en la misma línea el grupo de Dantal compara dos grupos de pacientes en tratamiento con altas y bajas dosis de ciclosporina y, advierten que el riesgo de desarrollar un CC es proporcional a la dosis del inmunosupresor (Dantal y cols., 1998). Por lo tanto, según estos estudios sería más importante el grado de inmunosupresión que alcanza el paciente más que el fármaco utilizado para ello.

1.2.2. La exposición solar

Si revisamos los estudios publicados, podemos deducir que, al igual de lo que ocurre en la población general, la incidencia de los CCs en los trasplantados aumenta a medida que disminuye la latitud del país (tabla 1), lo que claramente sugiere una más que probable participación de la radiación actínica en la génesis de estos tumores. Esta teoría se refuerza si consideramos que la mayor parte de estos tumores aparecen en la piel fotoexpuesta (Ramsay y cols., 2000), que su incidencia es mayor en los individuos trasplantados con exposición solar recreacional y ocupacional elevada (Ramsay y cols.,

2000) y que se han detectado anomalías en la proteína p53, probablemente inducidas por mutaciones provocadas por la radiación ultravioleta (RUV) en los tumores de estos pacientes (Gibson y cols., 1997).

En la actualidad sabemos que el papel de la RUV en el desarrollo de los CCs es doble (Grossman D y Leffel DJ., 1997). En un primer lugar, la RUV causa mutaciones en el ADN celular y estas alteraciones genéticas pueden dar lugar a un crecimiento celular incontrolado y a la formación de tumores. Por otra parte, la RUV ejerce profundos efectos sobre el sistema inmune cutáneo, induciendo un estatus de inmunosupresión relativo que impide el rechazo del tumor, que parece ser tan importante como los efectos carcinogénicos, en cuanto al establecimiento y posterior crecimiento progresivo de los CCs(fig. 2). Por lo tanto la RUV actuaría como iniciador, al provocar la mutación en el ADN y como promotor al inducir la supresión del sistema inmune.

Figura 2:

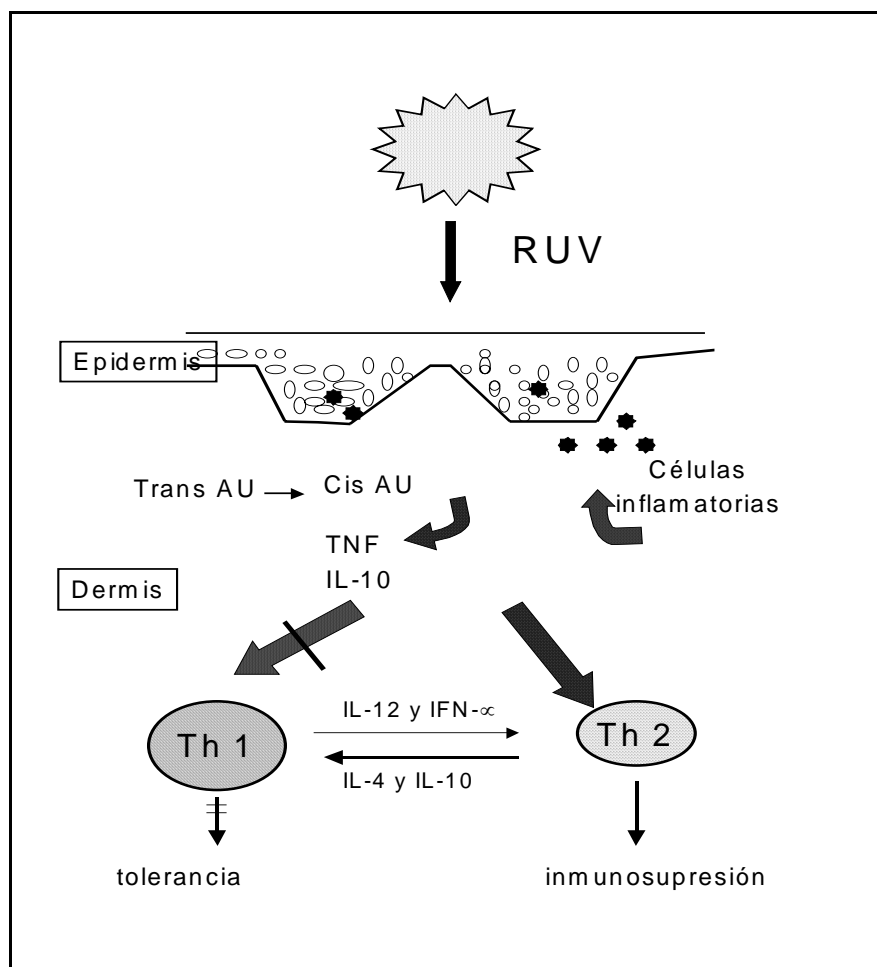


Figura 2:

En concreto, la RUV favorece la generación de vías inmunes supresoras en detrimento de las colaboradoras, alterando la función celular presentadora de antígenos de las células de Langerhans y determinando un flujo de células inflamatorias no Langerhans. Además, la RUV induce la isomerización del ácido urocánico y la producción de Factor de Necrosis Tumoral α (TNF) e Interleucina 10 por parte de los queratinocitos. La combinación de estos acontecimientos promueve el desarrollo de células colaboradoras de tipo 2 (Th2) y la inhibición de células colaboradoras de tipo 1 (Th1) lo que genera una tolerancia inmunológica.

1.2.3. Las infecciones víricas. La infección por el virus del papiloma humano (VPH)

Los virus son los principales agentes infecciosos asociados al cáncer en el ser humano. Hasta ahora se han identificado seis virus con capacidad oncogénica en diferentes órganos (tabla 2).

Tabla 2: Esquema de los virus con capacidad oncogénica conocida.

VIRUS	CÉLULAS DIANA	CÁNCER
HTLV-1	Células T	Linfoma o leucemia cels. T
Virus Epstein Barr	Células B	Linfoma de Burkitt
Virus del papiloma humano	Células epiteliales	Carcinomas de mucosas
Virus hepatitis B	Hepatocitos	Hepatocarcinoma
Virus hepatitis C	Hepatocitos	Hepatocarcinoma
Virus herpes 8?	Endotelio	Sarcoma de Kaposi?

El VPH ha sido relacionado con el desarrollo de los CCs en los PROTs. Esta idea se ha basado en varios acontecimientos:

- a. La frecuente asociación epidemiológica de verrugas y CCs en estos pacientes.
- b. La evidencia de signos histológicos de infección viral en algunos carcinomas
- c. El potencial oncogénico conocido de algunos tipos de VPH.
- d. La similitud clínica de los PROTs con la epidermodisplasia verruciforme, una enfermedad hereditaria que condiciona un defecto en la inmunidad celular. La consecuencia de esta es la aparición de verrugas víricas en las primeras décadas de la vida y la aparición precoz de carcinomas sobre las lesiones localizadas en las zonas expuestas.

Esto ha motivado a muchos investigadores a estudiar el papel de este virus en el

desarrollo de los CCs. A pesar del gran entusiasmo con el que se ha investigado, no se han obtenido, de momento, resultados concluyentes. Este punto será analizado, de forma exhaustiva, en los apartados dedicados a la infección por el VPH.

1.2.4. Los factores genéticos e inmunológicos

Algunas investigaciones sugieren que determinados factores inmunogenéticos pueden tener un cierto papel en el desarrollo de los CCs de los PROTs. Estas teorías proponen que determinados halotipos confieren la facultad de que las células presentadoras de antígeno procesen de forma más eficaz algunos antígenos tumorales y virales. En consecuencia, los individuos que posean estos halotipos "protectores" tienen un menor riesgo de padecer cáncer y, en contraposición, los otros halotipos "no protectores" estarán asociados a un mayor riesgo. En los PROT, el HLA A11 ha sido relacionado estadísticamente con un menor riesgo de desarrollar un cáncer cutáneo, mientras que el HLA-B27 y el antígeno de histocompatibilidad de clase II HLA-DR7 se han asociado a un aumento del cáncer cutáneo en estos pacientes (Bouwes Bavinck y cols., 1991 y 1997 y Czarnecki D y cols., 1992). Sin embargo, otros autores no han podido demostrar esta relación (Jensen P y cols., 1999, Dylla-Smith D y Ross JB., 1995 y Glover MT y cols., 1993)

Del mismo modo, se ha especulado que la presencia de un órgano extraño para el receptor, sobre todo en aquellos pacientes en los que existe una elevada discrepancia entre el HLA del donante y el receptor, también implica un mayor riesgo para

desarrollar cánceres (Persijn GG y cols., 1982). Esto explicaría el porqué es más frecuente el cáncer en los trasplantados que en otros pacientes que toman inmunosupresores por otras causas (Kinlen LJ ., 1985). Al parecer, el órgano trasplantado actuaría como una fuente de antígenos extraños para el huésped, lo que originaría una desregulación inmunológica que se vería potenciada por los cambios inmunológicos que genera el tratamiento inmunosupresor. La combinación de estos dos factores generaría un estado de tolerancia inmunológica.

1.2.5. La edad

El paso de los años provoca unos cambios en la piel que condicionan un aumento en la incidencia de carcinomas. Estos cambios se resumen en una menor eficacia en los mecanismos de reparación del DNA y en un estado de tolerancia inmunológica secundario a una menor respuesta de los linfocitos T y B ante estímulos mitógenos. Al igual de lo que ocurre en la población general, la edad también ha demostrado ser una factor de riesgo importante para el desarrollo de los CCs en el paciente trasplantado. Esto se refleja en la mayoría de estudios y para ilustrar este punto podemos mencionar los datos de Weeb y cols que observaron que un 50% de los pacientes que reciben el trasplante a partir de los 60 años desarrollan, al menos, un CE en los primeros 12 años tras el trasplante y esta cifra se reduce al 6% cuando los pacientes reciben el trasplante entre los 18 y los 40 años (Weeb M y cols., 1997). La explicación a estas observaciones podría estar en la menor eficacia del sistema inmunológico debido a la edad, que se suma al estado de inmunosupresión subyacente

de estos individuos y a la acumulación de los efectos nocivos de la RUV en nuestra piel.

1.2.6. Otros factores

Además de los ya mencionados, otros agentes han sido implicados en la carcinogénesis del PROT, aunque su participación es más discutida.

1. La influencia del tipo de órgano trasplantado es un punto controvertido. Algunos autores han apuntado que el trasplante cardíaco condicionaba un mayor riesgo de cáncer que el trasplante renal (Jensen y cols., 1999); mientras que otros atribuyen esta diferencia a la mayor edad de los receptores de un trasplante cardíaco o a un mayor grado de inmunosupresión (Euvard S y cols., 1995)
2. El tiempo de uremia y de diálisis pre-trasplante, es en sí mismo un motivo de inmunosupresión y, para algunos autores, este factor podría estar relacionado con el aumento del cáncer cutáneo (Tolkoff-Rubin NE y Rubin RH ., 1990), aunque no hay estudios concluyentes al respecto.

2. LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El VPH es un virus con doble cadena de ADN, que se asocia a una amplia variedad de lesiones proliferativas de origen epitelial. Desde el descubrimiento de su implicación en el desarrollo de cánceres de las mucosas (Zur Hausen .,1996) , este virus ha despertado un gran interés entre los investigadores. Este hecho, unido a la sospecha de su relación con el desarrollo de los CCs en los pacientes inmunodeprimidos y, a la mejora en las técnicas de biología molecular, ha contribuido a que se hayan realizado numerosos estudios y publicaciones al respecto. Los resultados de esta afanosa búsqueda han llevado a un mejor conocimiento del comportamiento biológico del virus, a la detección de nuevos tipos de VPH y a la aparición de nuevos interrogantes sobre su papel en el desarrollo de determinadas enfermedades cutáneas.

2 .1. Estructura y comportamiento biológico

El VPH es un virus de pequeño tamaño, no envuelto, con una estructura icosaédrica y una doble cadena de ADN circular de 7500-8000 Pb. La organización del genoma es la misma para los diferentes tipos de VPH y consiste en tres regiones: la E (early) que codifica proteínas reguladoras, transformadoras y replicadoras, la región L (late) que codifica las proteínas estructurales de la cápside y las regiones no codificantes (tabla 3).

Tabla 3: Funciones de las diferentes proteínas del VPH

PROTEÍNA	FUNCIONES
E1	Inicia replicación.
E2	Trascrición, colabora con la E1 en la replicación. Reprime la expresión de la E6 y la E7.
E3	Sólo está presente en los virus del papilloma bovino (VPB).
E4	Interacciona con el citoesqueleto celular. Puede estar involucrada en la maduración de viriones y en la salida de la célula.
E5	Proteína asociada a la membrana. Estimula la proliferación de los queratinocitos.
E6	Coopera con la E7 para inmortalizar los queratinocitos. Se une a la p53 y causa su degradación prematura en los tipos de alto riesgo.
E7	Coopera con la E6 en la inmortalización de los queratinocitos. Se une a la proteína del gen pRB.
E8	Sólo presente en VPB y VPH 6.
L1	Proteína mayor de la cápside.
L2	Proteína menor de la cápside.

El ciclo vital del VPH tiene varias fases, que se asocian a las diferentes etapas de la diferenciación de los queratinocitos. Este ciclo se inicia con la infección de los queratinocitos de la capa basal de las células epiteliales donde el virus expresa las proteínas E1 y E2, asociadas a la replicación y transcripción del ADN viral. Las proteínas E6, E7 y, probablemente la E5, son las responsables de inducir la proliferación de las

células basales y parabasales provocando la hiperplasia epitelial. La segunda etapa en la vida del virus, ocurre en las capas más superficiales de la epidermis, donde expresa las proteínas L1 y L2 que codifican a la cápside, y en la que se produce el ensamblaje de las partículas virales (Favre M y cols., 1997).

Durante el proceso de replicación, el virus produce una interferencia con la diferenciación de las células huésped, provocando unos efectos citopáticos como son la acumulación de material vírico formando inclusiones intracitoplásmicas o nucleares, o bien, la vacualización perinuclear que caracteriza a las células coilocíticas (Favre M y cols., 1997).

Es importante destacar las funciones ejercidas por las proteínas víricas E6 y E7, ya que se ha demostrado su implicación en el proceso de la carcinogénesis de muchos carcinomas anogenitales. Estas proteínas pueden tener, según el tipo de VPH, la capacidad de interactuar con algunas proteínas celulares involucradas en la regulación del ciclo celular. Así, la proteína E6 de los tipos de VPH considerados de alto riesgo (VPH 16/18) tiene la capacidad de interactuar con la proteína p53, cuya misión es proteger la integridad del genoma durante el ciclo celular, provocando una rápida degradación de la misma. Como consecuencia de la pérdida de la función protectora de la p53, las posibles mutaciones o errores genéticos se propagan a las células hijas que pueden evolucionar a la neoplasia. Por otra parte, la E7 de los tipos de VPH de "alto riesgo" coopera con la E6 en la inmortalización de los queratinocitos, interactuando con

algunas de las proteínas reguladoras del crecimiento celular como son la p107 y p 130 relacionadas con el gen del retinoblastoma, la ciclina A y los factores de transcripción de la familia AP1 (fig. 3) (Favre y cols., 1997, Howley PM.,1996).

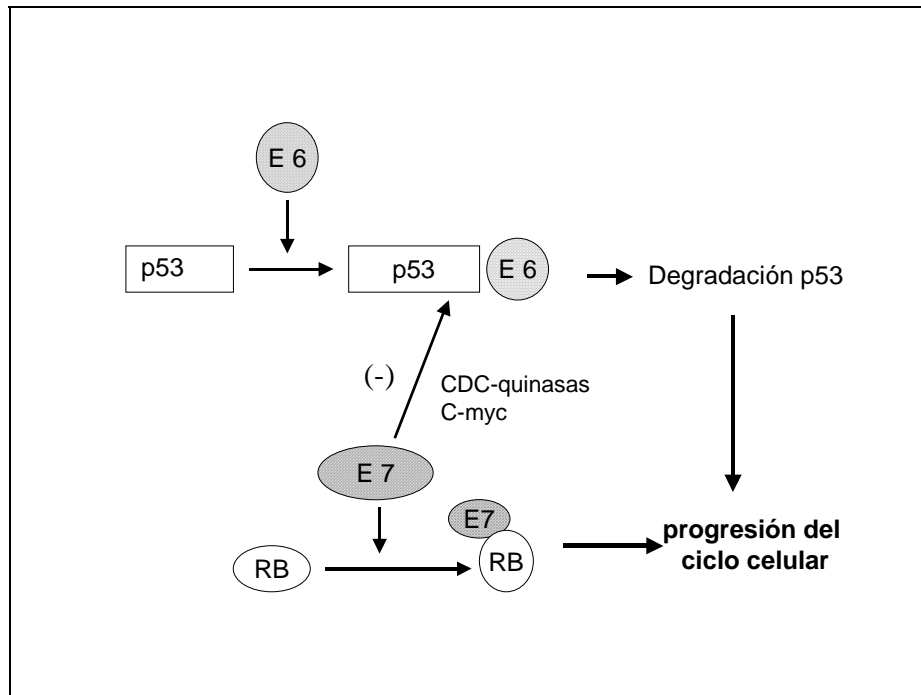


Figura 3: Interacción de las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo con las proteínas celulares. Cuando se une la E6 a la p53 se produce una rápida inactivación del complejo, perdiéndose el papel protector sobre el buen funcionamiento del ciclo celular que esta proteína ejerce. La proteína E7 se une a la proteína del retinoblastoma y las proteínas relacionadas con esta. La unión de la proteína del retinoblastoma con la proteína E7 estimula la progresión del ciclo celular favoreciendo la propagación de los defectos genéticos.

2.2. Clasificación y filogenia.

Todos los tipos de VPH se caracterizan por ser epiteliotropos y, según el epitelio que infectan, clásicamente, se han dividido en cutáneotropos y mucosotropos (tabla 4). Los tipos mucosos infectan preferentemente a la mucosa genital, aunque también han sido

detectados en la mucosa respiratoria y digestiva. Los tipos cutáneos afectan normalmente a la capa córnea. Dentro de los cutáneotropos se ha diferenciado un grupo de VPH que afectan de forma exclusiva a pacientes con epidermodisplasia verruciforme y dentro de los mucosotropos un subgrupo con claro potencial oncogénico. A pesar de ello, las fronteras entre las diferentes categorías no son rígidas y existen numerosas referencias de tipos mucosos que producen infección en la piel y viceversa. Por ejemplo, algunos autores (Ashinoff R y cols., 1991) han detectado el VPH-16 en lesiones localizadas en los dedos de las manos.

Tabla 4: Clasificación de los tipos de VPH según su tropismo y el tipo de lesión clínica que producen.

	Manifestaciones clínicas	Tipos de VPH
Piel	Verrugas plantares	1,2,4
	Verrugas comunes	2, 4,26,27,29,57
	Verrugas planas	3,10,29,49
	Verrugas de los carnívoros	7
	Lesiones benignas de epidermodisplasia verruciforme	2,3,10,12,15,19,36,46,47,50
	Lesiones benignas y malignas de epidermodisplasia verruciforme	5,8,9,10,14,17,20-25,37
Mucosa genital	Condilomas	6,11,42-44,54
	Lesiones no condilomatosas y/o carcinomas <i>in situ</i>	6,11,16,18,30,31,33,34,35,39,40,42,43,51,52,55,56,57-59,61,62, 64,67-70
	Carcinomas	16,18,31,33,35,39,45,51,52,54,56,66,68,
Mucosa extragenital	Boca (hiperplasia epitelial focal)	13,32
	Papilomas laríngeos	6,11,30
	Papilomas del seno maxilar	57
	Carcinomas	2,6,11,16,18,30

La introducción de las nuevas técnicas de biología molecular ha comportado un cambio en el concepto de tipo. Cuando se utilizaban las técnicas de hibridación, se consideraba un nuevo tipo cuando había menos de un 50% de reacción cruzada con el ADN de otro VPH. Si un ADN tenía más del 50% de reacciones cruzada, pero con un patrón de restricción diferente, se consideraba un subtipo. Actualmente la clasificación se basa exclusivamente en la caracterización del genoma. Así, se considera que es un nuevo tipo cuando la región L1, la parte menos variable del genoma del VPH, muestra una homología menor del 90% con otros tipos conocidos de VPH (de Villiers EM y cols., 1997). Cuando la homología se sitúa en el rango del 90-98% se considera un subtipo y, cuando la identidad es mayor del 98%, es una variante (Favre M y cols., 1997). Los tipos son designados por números y los subtipos con letras siguiendo un orden cronológico respecto a su descripción. En los últimos años, la utilización de primers degenerados y la posterior secuenciación del fragmento amplificado está incrementando de forma considerable el número de tipos nuevos de VPH. De esta manera, actualmente han sido identificados más de 130 tipos, aunque sólo unos 80 han sido completamente caracterizados.

2.3. Técnicas de detección de la infección por el VPH

En la actualidad, el diagnóstico de infección por VPH se basa en la detección del ADN vírico en las biopsias de tejido o en células exfoliadas (Vittorio y cols., 1995). Las técnicas de detección del ADN se podrían dividir en aquellas que detectan el ADN directamente (*Southern blot*, *do blot*, hibridación *in situ* y la captura híbrida) y la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que produce una amplificación del ADN y a continuación se detecta el producto amplificado, lo que aumenta de forma extraordinaria su sensibilidad. En concreto, se ha estimado que la PCR es capaz de detectar un límite de 10 copias del VPH, mientras que las técnicas de hibridación necesitan unas 10000 copias (Tyring SK., 2000).

Un importante inconveniente, en el estudio de la infección por el VPH, es la gran diversidad de tipos de VPH existentes. Esto hace que cuando se utilizan técnicas que detectan un número limitado de tipos de VPH, la prevalencia de la infección por VPH pueda infraestimarse (Surentheran T y cols., 1998). Para intentar solucionar este problema se han diseñado la técnica de la PCR con *primers* degenerados. Estos *primers* o cebadores contienen una secuencia con bases modificadas, complementarias de más de una base, situadas en algunas posiciones estratégicas para que coincidan con zonas variables del ADN vírico. Esto permite ampliar el número de secuencias complementarias de estos *primers* y ampliar, de este modo, el espectro de tipos de VPH detectables, aunque en contrapartida se produce una reducción en la afinidad (Surentheran T y cols., 1998).

En la teoría, el diseño de unos *primers* que combinen sensibilidad y detecten un amplio espectro de tipos de VPH sería la solución ideal, aunque esto en la práctica resulta, hoy por hoy, una utopía. Ello obliga a que para interpretar los resultados de los diferentes autores se haya de tener en cuenta que *primers* se han utilizado (tabla 5), ya que

según cuales se utilicen, la prevalencia de los diferentes tipos variarán. Como consecuencia de todo ello, la verdadera prevalencia de la infección por el VPH continúa siendo desconocida, puesto que la detección del VPH se ve influida por el método de obtención de la muestra, el tejido analizado y el protocolo de análisis del ADN.

Tabla 5: *Primers* más utilizados y grupo de VPHs que detectan cada uno (Harwood CA y cols., 1998).

Nombre Primers	Grupo de VPH ^a	Secuencias (5'-3') ^b	Tamaño producto (pb)
HVP2 B5	general	TCNMGNGGNCANCCNYTNGG AYNCCRTRTRTRTGNCCYTG	650
C4F C4R	B1 VPH 4, 48, 50,60,65	GGAGATACAGAAAATCCT SHATCTCCATAGATATCTTT	330-335
CN1F CN1R	E VPH 1, 41,63	AATARGTTWGATGATGCWGAA AKRTARTCWGGATATTTGCA	309-328
CN3F CN3R	A2 VPH 3, 10,28, 29,77	AACTCTAAYATWGCACATG CAVGTRCSYTGCAAATATC	273
CN2F CN2R	A4 VPH 2, 27,57	GGGGATATGGTTGAAACAGGT CAGAGGACACCATAGAGCCA	294
CP62 CP69	EV	GTWAATGAAAYTTGYAANTATCC GWTAGATCWACATTCCARAA	690
CP65 CP68	EV	CARGGTCAAYAAYATTGGYAT GGDACRAAACCYARYTGCCA	250
EN1F EN1R	EV subgrupo a1 VPH 5,8,12,36,47	TATTTCCWACHGTHAGTGGCTC TCATAYTCYTCTACATGTCT	254
EN2F EN2R	EV subgrupo a2 VPH 14,19,20,21,25	CTGTCAGTGGCTCATTGGT CATWGCATTAATTTGAGCTA	314
EN3F EN3R	EV subgrupo b1, b2 VPH 9,15,17,37,22,23,38	ATGKCWAATGATGHTATGG TGRTRYCCAYAAAATRCCATT	293
MY11 MY09	Mucosos	GCMCAGGGWCATAAAYAAYTGG CGGTCCMARRGGAWACTGATC	450
GP5 GP6	Mucosos	TTTGTTACTGTGGTAGATAC GAAAATAAACTGTAATCA	150

A.- Los grupos de VPH fueron definidos por Chan (Chan SY y cols., 1995).

B.- Bases degeneradas: N=G, A, C o T; R=A o G; Y=T o C; M=A o C; D=G, A, o T; S=C o G; K=G o T, H=A, T o C, V= G, A o C.

2.4. El VPH y el cáncer

2.4 .1. El VPH y el cáncer anogenital

Existe una relación probada entre algunos tipos del VPH y los carcinomas anogenitales. El VPH se detecta, con frecuencia, en las lesiones displásicas de cérvix uterino y en hasta un 90% de los cánceres cervicales (Zur Hausen H., 1991). Los tipos de VPH más frecuentemente asociados a los carcinomas de mucosas son el 16 y 18, que se aíslan en un 70-80% de las lesiones positivas, lo que ha implicado que estos tipos de VPH sean considerados de alto riesgo. Otros tipos de VPH relacionados con los carcinomas de cervix, aunque con menor frecuencia, son los tipos 45, 31,33,35, 39, 52,56, 58, 59 y 68. En otros carcinomas de las mucosas, como el de vagina, el vulvar, el de pene y el anal, la frecuencia de detección del VPH se aproxima al 50%.

Estudios experimentales han conseguido revelar cuales son los mecanismos oncogénicos de los tipos de VPH considerados de alto riesgo (Favre M y cols., 1997). Por una parte, la proteínas codificadas por los genes E6 y E7 de los tipos 16 y 18 tienen una elevada afinidad para interactuar con algunas proteínas celulares implicadas en la regulación del ciclo celular (p53, gen del retinoblastoma, proteína p107...), en cambio, en el resto de tipos, la afinidad de estas proteínas por la p53 es mucho menor.

Por otro lado, se ha observado que en la mayoría de las lesiones malignas, donde se detecta el VPH, este se encuentra integrado dentro del ADN de la célula huésped, mientras que en las lesiones benignas el ADN viral se encuentra en situación episomal. La integración del ADN vírico en el genoma también contribuye a la expresión de las

proteínas E6 y E7, ya que al integrarse se provoca una alteración en la porción E1-E2 que es la encargada de reprimir la expresión de los oncogenes E6 y E7.

2.4.2. El VPH y los carcinomas cutáneos.

Los carcinomas cutáneos son los tumores más frecuentes en la raza blanca y además su incidencia está en continuo crecimiento. En la población inmunocompetente, el CB es más frecuente que el CE; sin embargo, en los inmunodeprimidos se observa un aumento de incidencia del CE. Aunque existen indicios de que el VPH pudiera estar implicado en la carcinogénesis cutánea de los inmunodeprimidos, de momento, la relación entre estos carcinomas y el VPH no está probada.

En algunas enfermedades como la Epidermodisplasia verruciforme (EV) se ha observado el potencial oncogénico del VPH en la piel. Estos individuos padecen un déficit genético de la inmunidad celular que condiciona una infección precoz por algunos tipos de VPH. Posteriormente, en la 3ª y 4ª década de la vida se observa una transformación maligna de un porcentaje importante de las lesiones (30-60%) localizadas en las zonas expuestas a la RUV.

En otros individuos inmunodeprimidos, como los PROTs, se ha observado una situación clínica que recuerda a la EV. Esta observación ha llevado a que algunos autores teoricen sobre el posible potencial oncogénico de los VPH cutaneotropos. A continuación realizaremos una revisión de los conocimientos existentes sobre esta cuestión.

2.4.2.1. Epidermodisplasia verruciforme (EV).

En 1922, mucho antes de que la relación entre el VPH y el carcinoma de cérvix fuera sospechada, se describió la asociación de verrugas víricas y CCs en una enfermedad denominada EV, lo que supuso el primer modelo para el estudio de un cáncer asociado a una infección vírica (Lewandowsky F y Lutz W., 1922).

La EV es una genodermatosis caracterizada por un defecto en la inmunidad celular, no bien definido hasta ahora, que origina una anormal susceptibilidad para la infección cutánea por un grupo específico del VPH, poco frecuente en la población general (tabla 4). El patrón de herencia genética de la enfermedad es heterogéneo, ya que en algunas familias se ha observado un patrón autosómico recesivo, en otras una herencia ligada al cromosoma X y, en algún caso, un patrón autosómico dominante (Ramos N y cols., 1999). Recientemente se ha localizado el posible defecto genético en el cromosoma 17q (Ramos N y cols., 1999).

Clínicamente, esta enfermedad se caracteriza por una elevada incidencia de verrugas en las primeras décadas de la vida y un desarrollo precoz de CCs, que aparecen sobre las lesiones víricas localizadas en las zonas expuestas a la RUV. Los tipos de VPH detectados en las lesiones benignas son muy variables (tabla 4), mientras que, en un 90% de las lesiones malignas se han detectado los tipos 5 y 8 (Orth G., 1986). El mecanismo por el cual estos tipos producen la transformación maligna no se conoce, pues, al contrario de los que ocurre con los tipos VPH 16/18, no parecen haber

interacciones entre las proteínas víricas E6 y E7 y las proteínas celulares p53 y pRB (Steger G y Pfister.H, 1992). Algunos autores han implicado en dicho proceso a otra proteína vírica, la proteína E2, que actuaría activando elementos reguladores dentro de la región no codificante del genoma (Harwood CA y cols., 1999). Una limitación importante en la realización de estudios de estudios concluyentes, es el escaso número de pacientes y, sobretodo, la falta de una línea celular de queratinocitos con infección por tipos de VPH relacionados con la EV.

Los estudios realizados "*in vitro*" no han podido demostrar el potencial oncogénico de los tipos de VPH 5 y 8 (Pfister H y cols., 1997). Esto ha inducido a postular algunas teorías que sugieren que la infección por VPH puede actuar como un co-factor o co-carcinógeno asociado a otros factores potencialmente oncogénicos como la RUV. Esta hipótesis explicaría tanto la imposibilidad, hasta el momento, de demostrar una transformación *in vitro* de los queratinocitos usando los genes de los tipos de VPH relacionados con la EV, como la transformación maligna de las lesiones expuestas a la RUV. Otro factor probablemente implicado es la alteración del sistema inmune de estos pacientes similar a la de los PROTs, que actuaría permitiendo la persistencia de la infección vírica y la progresión tumoral.

2.4.2.2 Pacientes receptores de un órgano trasplantado

Algunos estudios han apuntado al VPH como posible responsable de la elevada incidencia de VPH en los PROTs. Esta relación se había sustentado en la asociación epidemiológica observada entre las verrugas y los CCs, la coexistencia de signos histológicos de infección viral y displasia epitelial en una misma biopsia y, por último, en la identificación de ADN del VPH en algunos tumores cutáneos. El grupo más estudiado son los receptores de un trasplante renal, dado que es un grupo numeroso y con una elevada supervivencia. Los resultados obtenidos, por los diferentes autores, son muy variables e influidos por las técnicas de detección empleadas en cada caso.

Los primeros estudios se realizaron en la década de los 80 mediante técnicas de hibridación (tabla 6). Los resultados de estos primeros estudios fueron prometedores, así Barr y cols (Barr BB y cols., 1989) detectaron los tipos 5 y 8 en un 60% (15/25) de los CE estudiados. La detección de estos tipos, implicados también en el desarrollo de carcinomas de los pacientes con EV, apuntaba a la posibilidad de que existieran unos tipos cutáneos cuya infección podría considerarse de "alto riesgo". Sin embargo, en estudios posteriores los resultados fueron muy heterogéneo y no siempre confirmaron los hallazgos de Barr (tabla 6).

Tabla 6: Detección del VPH en CEs mediante técnicas de hibridación. Modificado de *Pfister H y cols 1997*.

AUTOR (AÑO)	METODOS (SONDAS)	NUMERO LESIONES	DETECCION VPH	TIPOS DETECTADOS
Lutzner (1983)	SB 3,5,8,9	2	100%	5
Barr (1989)	DB 1,2,4,5,8	25	64%	4,5/8
Euvrad (1993)	IS 1a,2a,5,16,18	30	47%	1,2,16,18
Stark (1994)	SB 3,8,13	30	33%	No identificados
Pélisson (1994)	HIS 1,2,5,6,11,16,18	13	68%	1,2,16,18
Rüdlinguer (1989)	SB 1-8,11,16,18, 31-36	4	0%	--
Soler (1993)	SB, HIS 1,2,5,6,11,16,18	10	40%	6/11,16/18 1,2,5

SB: southern blot, **DB:** do blot, **HIS:** hibridación *in situ*

Con la introducción de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se confió en que estos resultados se unificaran, sin embargo, no ha sido así. Los primeros estudios fueron realizados con *primers* específicos para algunos tipos concretos, lo que restringía de forma importante el espectro de VPH detectables. Con la introducción de los *primers* degenerados, la prevalencia de ADN de VPH en los CEs se ha incrementado hasta oscilar entre un 65-91% (tabla 7). El problema actual se centra en la gran heterogeneidad en los tipos detectados por los diferentes investigadores, lo que implica que sea difícil el señalar que tipos de VPH pueden considerarse de "alto riesgo" para el desarrollo de carcinomas.

Tabla 7: Detección del VPH en los CE de receptores de un trasplante renal mediante técnicas de PCR. Modificado de *Pfister H y cols 1997*.

AUTOR (AÑO)	METODOS (PRIMERS)	NUMERO LESIONES	DETECCION VPH	TIPOS DETECTADOS
Dyall-Smith (1991)	PCR*	235	0	-
Smith (1993)	PCR*	28	0	-
Goldberg (1995)	PCR tipos mucosos	21	20%	16
Shamanin (1994)	PCR degenerado	20	55%	29,41,7X
Tieben (1994)	PCR degenerado	24	21%	5/8,14,14R,2X
Berkhout (1995)	PCR degenerado	53	81%	15,19,20,23, 24,25,38, 15X
De Jong-Tieben (1995)	PCR degenerado	63	80%	15,19,20,21, 23,24,25,38
Shamanin (1996)	PCR degenerado	20	65%	4R,19R,41,48R, 65R, 16,54,61,69,24R,13X
De Villiers (1997)	PCR degenerado	33	91%	1,57,38,23,20, 11 no identificados

* *primers* que detectan la presencia del VPH sin concretar el tipo.

X: tipos desconocidos **R:** tipos relacionados.

Es probable que estas discrepancias sean exclusivamente debidas a las diferentes sensibilidades entre los métodos empleados para la detección. Una prueba de ello son los resultados obtenidos recientemente por de Villiers (de Villiers EM y cols., 1997). En este estudio, primero se analizaron las muestras con el panel de primers utilizado por Shamanin et al (Shamanin V y cols., 1994), detectándose preferentemente tipos cutáneos habituales. Posteriormente, las mismas muestras fueron estudiadas mediante la técnica ideada por Berkhout (Berkhout RJM y cols., 1995) encontrando un elevado número de tipos de VPH relacionados con la EV. Al combinar ambos métodos se detectó una prevalencia para el VPH en un 91% de los CE estudiados. Algunos autores

(Hawoord CA y cols., 1997) han detectado infecciones mixtas en más de la mitad de los CE positivos (60%).

Aunque la gran mayoría de los estudios realizados son en CEs, existen algunos en CBs (tabla 8). En estos estudios, aunque con un escaso número de lesiones, se observa una frecuencia de detección del VPH mucho menor que en el CE.

Tabla 8: Detección del VPH en los CBs de TRs.(Modificado de Pfister H y cols., 1997)

AUTOR (AÑO)	MÉTODO DETECCION	NUMERO LESIONES	DETECCIÓN VPH	TIPOS DE VPH DETECTADOS
Rüdlinger (1986)	SB 1-4,5/8,6/11,16	1	0%	-
Van der Leest (1987)	DB 1,2,4,5,8	2	0%	-
Obalek (1988)	SB 1,2, 4,5,10,11,16,38	2	100%	2
Trenfield (1993)	SB 1-7,8,10,11,16,18,41	11	9%	1a
Shamanin (1994)	PCR Primer degenerados	5	60%	No identificados
De Jong-Tieben (1995)	PCR Primer degenerados	8	50%	24 y no identificados
Shamanin (1996)	PCR Primer degenerados	5	60%	60,14R,48R,65R,51,56

SB: Southern blot, **DB:** Do blot.

2.4.2.3. Pacientes tratados con PUVA

En los últimos 20 años, la terapia con PUVA (Psoraleno más UVA) ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento de dermatosis inflamatorias y otros procesos. Se ha estimado que, en estos individuos, la incidencia de CEs es hasta 80 veces superior a la población general (Harwoord CA y cols., 1998). En este hecho se han implicado varios

factores: la dosis acumulativa de la RUV, el fototipo cutáneo y la inmunosupresión sistémica inducida por el tratamiento (Ullrich SE y cols., 1991). Esta inmunosupresión sería, a la vez, la responsable de facilitar la infección cutánea por el VPH.

De los estudios realizados destaca el de Harwood (Harwoord CA y cols., 1998) que utiliza una PCR con un panel de 16 *primers* degenerados y estudia 20 CCs, 17 lesiones premalignas, 5 verrugas y 12 biopsias de piel normal de pacientes tratados con PUVA. Estos autores detectan el VPH en un 75% de las lesiones cancerosas y en un 33% de la piel normal. En la mayoría de las lesiones positivas se detectaron tipos de VPH relacionados con la EV, datos semejantes a los ya descritos en los pacientes receptores de un trasplante renal (Berkhout RJM y cols., 1995).

La elevada positividad del VPH plantea la posibilidad de que la terapia con PUVA facilite la infección por el VPH, o bien, active la infección latente por el virus. Aunque el VPH se detecta en mayor proporción en los CCs que en la piel normal, no queda claro el papel que el virus desarrolla en la carcinogénesis. Otras observaciones, en cambio, apoyan la inocencia del VPH e implican a la RUV como principal responsable de la elevada carcinogénesis. En este sentido, la elevada detección de mutaciones, con el patrón característico de la RUV en el gen que codifica la proteína p53 sugiere que esta ejerce un papel principal y el VPH podría ser un "espectador inocente" (Proby CM y cols., 1993 y Natara AJ y cols., 1997).

2.4.2.4. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana

Existen pocos estudios realizados sobre los CCs de este grupo de pacientes. Probablemente esto es debido a que la baja supervivencia de estos pacientes no permitía, hasta el momento, realizar seguimientos a largo plazo, que permitieran investigar la incidencia de lesiones que necesitan un tiempo de latencia. Es posible que, con la introducción de las nuevas terapias antiretrovirales que alargan la supervivencia de estos pacientes, observemos un aumento en la incidencia de los CCs. En los estudios realizados no se ha observado una asociación entre el VPH y los CCs. Los únicos factores de riesgo asociados son la exposición solar y el fototipo (Lobo DV y cols., 1992 y Maurer JA y cols., 1997).

2.4.2.5. Individuos inmunocompetentes

En algunos estudios se ha demostrado la presencia de ADN del VPH en lesiones cutáneas malignas de inmunocompetentes, aunque el número de casos aportados es bajo y el número de tipos del VPH buscados muy limitados (tablas 9 y 10) (McGregor JM y Proby CM 1996 y Proby CM y cols ., 1996).

Tabla 9: Estudios realizados en CEs de individuos inmunocompetentes. Modificado de Pfister H y cols., 1997.

AUTOR (AÑO)	MÉTODO DETECCION	NUMERO LESIONES	DETECCIÓN VPH	TIPOS DETECTADOS
Grimmel (1988)	SB Sonda 41	10	20%	41
Kawashima (1990)	SB Sonda 1-8, 10,11,14,16, 18,20,23,24, 28	51	2%	-
Pierceall (1991)	PCR <i>Primers</i> 6,11,16,18	21	20%	16
Shamanin (1996)	PCR degenerados	26	31%	4,32,42,51,8,9,23
Berkhout (1995)	PCR degenerados	30	62%	15,19,23,24,

SB: Southern blot, **DB:** Do blot, **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

Tabla 10: Detección del VPH en CBs de pacientes inmunocompetentes. Modificado de Pfister H y cols 1997.

AUTOR (AÑO)	MÉTODO DETECCION	NUMERO LESIONES	DETECCIÓN VPH	TIPOS DETECTADOS
Kawashima (1990)	SB 1-8,10,11,14, 16-18,20,23,24,28	53	2%	20
Eliezri (1990)	HIS Tipos mucosos	26	4%	No identificado
Pierceall (1991)	PCR <i>Primers</i> 6,11,16,18	16	19%	16
Stark (1994)	SB Sondas 2,3,4,8,12,13 PCR 1,2,5,6,8,11,16,18	16	19%	16
Shamanin (1996)	PCR <i>Primers</i> degenerados	11	36%	4,7,6,8, 24R,25
Berkhout (1995)	PCR <i>Primers</i> degenerados (<i>nested</i> -PCR)	41	37%	14,25R,36,38, 5 no identificados y 4 nuevos tipos

SB: Southern blot, **DB:** Do blot, **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa **HIS:** Hibridación *in situ*.

Los resultados de estos autores son diferentes y, probablemente, estas diferencias estriban en las distintas técnicas utilizadas. Pero se podría decir que, a grandes rasgos, los tipos de VPH relacionados con la EV predominan sobre los tipos cutáneos y mucosos y las infecciones mixtas son menos frecuentes que en los inmunodeprimidos (Harwood CA y cols., 1999). El mayor grado de detección del VPH en trasplantados que en inmunocompetentes, podría ser debido a que la inmunosupresión provoca una tolerancia inmunológica que permite la infección persistente por el VPH.

Un caso que puede considerarse especial son los CEs localizados en los dedos de las manos, donde se ha observado una elevada asociación con tipos de VPH mucosos considerados de alto riesgo, especialmente el VPH 16. Es posible que dada la localización y el tipo de VPH que se trata, el mecanismo de contagio sea por autoinoculación o venéreo (Ashinoff R y cols., 1991).

2.5. Presencia del VPH en la piel normal y en las enfermedades inflamatorias de la piel

En los últimos años ha sido detectado el ADN del VPH en la piel sana (Astori G y cols., 1998, Boxman ILA y cols., 1999), la raíz de pelos arrancados (Boxman ILA y cols., 1997) y en la piel con psoriasis (Favre M y cols 1998 y Weissenborn SJ y cols 1999). Lo que ha aportado aún más desconcierto sobre el papel del VPH en la oncogénesis cutánea.

2.6. Lesiones benignas inducidas por el VPH en los PROTs.

La presencia de verrugas víricas en los PROTs es un problema común con una morbilidad significativa. Según algunos autores, a los tres años post-trasplante, entre un 25-45% de pacientes padecen verrugas y, a los 5 años, esta cifra se eleva a un 92% (Leigh IM y cols., 1999).

Las verrugas en estos pacientes son más grandes, múltiples y recidivantes. En los periodos precoces post-trasplante estas se localizan más en las zonas palmo-plantares, pero más tarde localizan en las áreas expuestas, frecuentemente en el dorso de las manos y los antebrazos (Leigh IM y cols., 1999).

En los primeros estudios realizados con técnicas de hibridación se detectaron tipos del VPH similares a los observados en la población general (el 2,4 y, menos frecuentemente, el 1, 3 y el 10). Con la introducción de técnicas más sensibles como la PCR, las discrepancias en los estudios publicados continúan en aumento, ya que dependiendo de si se utilizan *primers* específicos o degenerados los resultados son diferentes. No obstante, podríamos decir que en las verrugas de los trasplantados están asociados a un rango más amplio de tipos del VPH que en la población general. En estas verrugas, ha sido detectado un espectro amplio de tipos cutáneos del VPH, muchos tipos mucosos, tipos relacionados con la EV, e incluso, infecciones múltiples.

3.- LA PROTEÍNA P53

La p53 es una proteína celular de 53 kDa codificada por el gen p53, un gen recesivo ubicado en la banda 13 del brazo corto del cromosoma 17, en una región especialmente sensible a las mutaciones. Esta proteína, en su forma natural o salvaje, ejerce el control de la proliferación celular a través de la vigilancia del normal desarrollo de algunos puntos críticos del ciclo celular. La observación de mutaciones en dicha proteína en más de la mitad de los cánceres humanos, ha puesto de manifiesto la importancia de su función (Basset-Séguin N y cols., 1994) .

Su labor fundamental es la coordinación de la respuesta celular al daño genético. Cuando se produce una alteración en el ADN, la p53 interacciona con algunas proteínas nucleares de la célula lesionada y determina una detención del ciclo celular en G1, lo que permite un tiempo adicional para la reparación celular o, en el caso de que esta no sea posible, se conduce a la eliminación de la célula mediante la muerte celular o apoptosis . Así pues, la proteína p53 actuaría como un supresor tumoral, impidiendo la formación de una progenie de células con mutaciones que puedan provocar un crecimiento celular descontrolado.

En las células normales la p53 salvaje o natural se produce en muy pequeñas cantidades y, además, tiene un tiempo de vida media bastante corto (15-45 minutos), lo que hace que, en condiciones normales, sea casi indetectable mediante las técnicas de inmunohistoquímica de rutina. La proteína mutada, debido a su cambio

conformacional, forma complejos estables con las "heat shock protein" 70 nucleares y con el resto de p53 no mutada, alargándose el tiempo de vida media de 15 minutos a varias horas, lo que facilita su detección inmunohistoquímica.

Otra propiedad bioquímica que puede alterar su tiempo de vida media es su habilidad para formar polímeros con proteínas víricas y celulares lo que puede influir sobre su actividad y/o degradación (Basset-Séguin N y cols., 1994) . En este sentido es conocida su capacidad para unirse a la proteína vírica E6 de tipo de VPH 16, implicado en el carcinoma de cérvix y otros carcinomas escamosos de mucosas, provocándose la rápida degradación de este complejo y perdiéndose la función protectora que ejerce la p53 (figura 3).

Sin embargo, a pesar de que la detección inmunohistoquímica de la proteína p53 se ha propuesto como un método rápido y simple para la detección de la proteína mutada y que, en la mayoría de tumores, se ha observado una buena correlación entre la presencia de una p53 más estable y la presencia de mutaciones, determinadas por secuenciación u otros métodos (Gannon JV y cols., 1990), la detección inmunohistoquímica de la proteína p53 no siempre es indicativa de que la proteína está mutada o es inactiva. Por ejemplo pueden existir mutaciones en los controladores del gen p53 que provoquen un aumento en la producción de una proteína activa. Otra situación similar se da por la interacción de la proteína con otros genes o con proteínas (virales o celulares) que pueden estabilizar la proteína salvaje aumentando su

expresión, con independencia de su estado de actividad o funcionalidad. Otros estados con pérdida funcional pero con inmunohistoquímica negativa puede ser por mutaciones en las zonas cercanas al gen que impidan la fabricación de la proteína, o una gran delección del gen que abola toda su expresión, o bien, que la proteína p53 interactúe con otras proteínas (celulares o virales) que precipiten su degradación.

3.1- Expresión de la p53 en los carcinomas cutáneos

La RUV ha sido considerada como el factor principal en la carcinogénesis cutánea (Grossman D y Leffel DJ., 1997). Desde el punto de vista clínico, numerosos indicios sugerían esto, sin embargo la demostración de la capacidad de la RUV para provocar mutaciones específicas en la proteína p53, controlador de la integridad del genoma durante el ciclo celular, ha sido fundamental para afianzar esta hipótesis. Estas mutaciones consisten en cambios de las bases C→ T y CC→TT que han sido detectados en los CEs, los CBs y las queratosis actínicas (Leffel DJ y cols., 1996).

La participación de la RUV en estos tumores se ha demostrado en estudios realizados que han comparado la expresión inmunohistoquímica de la p53 en CEs inducidos por la RUV frente a CEs aparecidos sobre radiodermatitis, cicatrices y lesiones orales. Estos estudios demostraron más tinción para la proteína en las lesiones relacionadas con la RUV (54% frente a 19%) (Nagano T y cols., 1993). Otros autores, mediante técnicas de biología molecular han conseguido detectar las mutaciones anteriormente mencionadas en un 58% de los casos de CEs de zonas expuestas a la radiación solar, mientras que

no las han hallado en ninguno de los CEs localizados en zonas no expuestas (Brash DE y cols., 1991).

Y la confirmación de que estas mutaciones son el origen de esta neoplasia viene dada porque, aunque en diferentes lesiones se pueden observar diferentes mutaciones, se ha demostrado que en una misma lesión todas las células presentan el mismo tipo de mutación, sugiriendo que, inicialmente, la alteración genética se produjo en una única célula, que se originó una expansión clonal (Ren ZP y cols., 1996).

Por otro lado, se ha podido comprobar que tras la RUV los niveles de la p53 en la piel aumentan (McNutt NS y cols., 1994). Teniendo en cuenta los mecanismos de actuación de esta proteína, esto podría interpretarse como una respuesta fisiológica protectora tras el daño provocado por la RUV. La función protectora que la proteína ejercerá será doble. En primer lugar, provocará una la detección del ciclo celular que proporcionará tiempo para la reparación de los fotoproductos que podrían dar lugar a mutaciones oncogénicas. En un segundo lugar, mediante la conducción a la apoptosis elimina a los queratinocitos que pudieran haber adquirido condiciones malignas o premalignas antes de que se produzca la expansión clonal. Sin embargo, también es posible esta sobreexpresión que sea secundaria a la provocación de una mutación en el gen p53 que codificará una proteína defectuosa, con un tiempo de vida media mayor, lo que dará lugar a una generación de células mutantes con un crecimiento descontrolado que pueden llegar a originar un carcinoma.

En los estudios que han investigado la expresión inmunohistoquímica de la p53 en los CCs, se han publicado unos resultados variables, con una detección de la proteína en el 27-74% de las queratosis actínicas y en el 25-80% de los CEs (McNutt NS y cols., 1994). Los resultados obtenidos en los CBs son bastante similares a los de los CEs, pero en general se describe una menor inmunotinción. Llama la atención esta disparidad de resultados aunque se ha de tener en cuenta que la expresión inmunohistoquímica de la proteína puede variar en función de la afinidad de los anticuerpos utilizados, el nivel de antígeno existente, la concentración de anticuerpo, la duración de la incubación, la sensibilidad del sistema de detección e incluso los métodos de fijación del tejido (Hall PA y Lane DP., 1994)

3.2 .Expresión de la p53 en los carcinomas cutáneos de los PROTs

Los PROTs presentan una elevada susceptibilidad para el desarrollo de CCs, especialmente CEs. Estas lesiones aparecen, en general, con mayor frecuencia en los pacientes con mayor tiempo de inmunosupresión y en aquellos con una mayor exposición a la RUV. Dentro de los potenciales agentes etiológicos de los carcinomas de los PROTs se han incluido a la RUV y a la infección por el VPH. Dado que, tanto la infección por el VPH como la RUV pueden provocar una pérdida de función de la proteína supresora tumoral p53, se ha considerado interesante estudiar este punto para poder esclarecer los eventos genéticos asociados a la elevada carcinogénesis de estos pacientes. Estos dos factores, la RUV y el VPH, pueden anular la función de la p53, sin embargo la imagen de la inmunohistoquímica será totalmente diferente en cada caso.

En los carcinomas provocados por la RUV es de esperar una sobreexpresión producida por la codificación de una p53 mutante de mayor tiempo de vida media, mientras que en los carcinomas inducidos por el VPH no encontraremos p53 dado que la interacción de la proteína E6 con la p53, provoca la acelerada degradación de esta. Los resultados de los estudios publicados difieren según las series, las técnicas empleadas y los anticuerpos usados (tabla 11).

Tabla 11: Resumen de la expresión inmunohistoquímica de la p53 detectada en lesiones cutáneas pertenecientes a trasplantados e inmunocompetentes.

Autor (año)	Anti- cuerpo	CE*			CB*			QA o QD*		
		RTR	IC	Valor p	RTR	IC	Valor p	RTR	IC	Valor p
Mc Gregor 1994	CM-1	40%	55%	NC	60%	58%	NC	61 %	57%	NC
Khorshid 1996	CM-1	21%	54%	<0,05	50%	57%	>0.05	38%	57 %	>0.05
Stark 1994	DO7	56%	53%	--	--	--	--	41%	25%	>0,05
Gibson 1997	DO7	65%	58%	>0,05	60%	--	--	80%	--	--

RTRs: Receptores de un trasplante renal

IC: Inmunocompetentes

*Porcentaje de positividad de las lesiones

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En este trabajo se ha pretendido estudiar la incidencia de los carcinomas cutáneos en pacientes receptores de un trasplante renal, determinar los factores de riesgo para el desarrollo de estos carcinomas e investigar el papel del virus del papiloma humano en la oncogénesis cutánea de estos paciente.

Para ello, se diseñó un estudio prospectivo con un seguimiento semestral de todos los trasplantados renales de nuestro centro. La identificación de estos factores de riesgo nos permitiría definir el perfil del paciente con riesgo de padecer un carcinoma. Los trasplantados que se ajustaran a este perfil deberían realizar un seguimiento dermatológico más estrecho, e incluso se podrían realizar algunas terapias profilácticas.

Así, los objetivos concretos de esta Tesis han sido los siguientes:

- 1. Determinar la incidencia de los carcinomas cutáneos en los pacientes receptores de un trasplante renal en nuestro medio.**
- 2. Estudiar los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de los carcinomas cutáneos.**
- 3. Investigar la relación entre la infección por el virus del papiloma humano y el desarrollo de carcinomas cutáneos.**
- 4. Estudio de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en lesiones cutáneas benignas y malignas de trasplantados. Su expresión nos podría orientar sobre la etiopatogenia de estas lesiones.**

MATERIAL Y MÉTODOS

1. INCIDENCIA DE CARCINOMAS CUTÁNEOS EN LOS RTRs Y ESTUDIO DE LAS VARIABLES RELACIONADAS

1.1. Pacientes y métodos

1.1.1 Inclusión de los pacientes

Se incluyeron en el estudio a todos los pacientes que recibieron un trasplante renal en el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona entre los años 1989 y 1999. La recogida de los datos se cerró el 30 de septiembre del año 2000. Todos los pacientes fueron visitados en los 15 primeros días tras el trasplante. En la primera entrevista se anotaban las características clínicas del paciente (tabla 12) y se realizaba una inspección cutánea completa de cara a detectar las lesiones cutáneas ya presentes en este momento.

Tabla 12:

Variables recogidas en la primera visita
1. Edad en el momento del trasplante
2. Fototipo (según Fitzpatrick TB., 1988) <ul style="list-style-type: none">I. Siempre se quema y nunca se bronceaII. Siempre se quema y se broncea muy discretamenteIII. A veces se quema y se pigmenta lentamenteIV. Nunca se quema y siempre se pigmentaV. Siempre hiperpigmentadosVI. Negros
2. Causa de la insuficiencia renal (según la clasificación de la European Dialysis Transplantation Association) <ul style="list-style-type: none">1. Glomerular2. Intersticial3. Poliquistosis4. Vascular5. Diabetes6. Otras7. Desconocidas
3. Pauta de inmunosupresión <ul style="list-style-type: none">A: Corticoides + ciclosporina,B: Cortisona + ciclosporina + azatioprinaC: Otros (corticoides +micofenolato y/o tacrolimus)
4. Duración de la diálisis previa al trasplante
5. Tipo de diálisis <ul style="list-style-type: none">1.Hemodiálisis2.Diálisis peritoneal
6. Historia previa de verrugas y carcinomas cutáneos
7. Exposición solar ocupacional: <ul style="list-style-type: none">alta: 3 o más horas al día durante al menos tres añosbaja: menos de 3 horas al día

Dada la baja latitud de nuestra región (41° 22'), se consideró que todos los pacientes tenían una elevada exposición solar recreacional. Para estratificar los grupos con distinto grado de exposición solar se tuvo en cuenta, únicamente, la exposición solar ocupacional (tabla 12)

Las visitas de seguimiento fueron programadas cada 6 meses. Se advirtió al paciente que en el caso de que se detectara alguna lesión cutánea de nueva aparición, adelantara la visita de control. El seguimiento mínimo para todos los pacientes paciente fue de al menos 1 año. En cada visita de seguimiento se realizaba una exploración cutánea completa y, en el caso de que se detectaran lesiones cutáneas, se anotaba el tipo, la localización y el momento de aparición tras el trasplante (tabla 13). Todas las lesiones detectadas fueron biopsiadas, estudiadas histológicamente y tratadas de la forma más oportuna. En las lesiones tumorales se realizó extirpación quirúrgica y en las verrugas y queratosis se realizó curetaje y electrocoagulación o crioterapia.

Tabla 13:

Variables recogidas en las visitas sucesivas
1. Presencia de lesiones cutáneas: Sí No
2. Tipo de lesión Verruga Queratosis Carcinoma basocelular Carcinoma escamoso Otros
3. Localización anatómica de la lesión Cabeza Tronco Extremidades superiores Extremidades inferiores Genitales
4. Exposición solar de la zona sobre la que aparece la lesión Sí No
5. Momento de aparición desde el trasplante (meses)
6. Aparición de otras neoplasias no cutáneas No Sí (tipo)

1.1.2. Recogida de las muestras

Las lesiones detectadas fueron biopsiadas, o bien extirpadas directamente. El material obtenido se fijó en formol tamponado al 10% y se incluyó en parafina según el procedimiento habitual. Todas las lesiones fueron estudiadas histológicamente para confirmar el diagnóstico clínico. Los diagnósticos histológicos de verrugas víricas, CEs y CBs, fueron realizados basándonos en criterios histológicos bien definidos (Lever WF y Schaumburg-Lever G.,1990) . El término de queratosis displásica (QD) se aplicó a aquellas lesiones queratósicas con atipia citológica y/o arquitectural. Se anotó también la presencia de cambios histológicos por daño actínico en los CEs y CBs.

1.2. Metodología estadística.

Para conocer la distribución de las variables continuas registradas (edad en el momento del trasplante y duración de la diálisis pretrasplante) se calculó la mediana y para las variables cualitativas (causa del fallo renal, tipo de pauta de inmunosupresión, fototipo e historia de exposición solar ocupacional) se calcularon las proporciones de cada una de las categorías.

El tiempo de seguimiento de los pacientes se calculó contabilizando el tiempo transcurrido desde el momento del trasplante hasta la última visita realizada con anterioridad a la fecha de cierre de la recogida de datos, o bien, hasta el momento de la pérdida funcional del riñón trasplantado o de la muerte del paciente. En los casos de pacientes con un segundo trasplante, tras la pérdida funcional del primero, no se

contabilizó el tiempo transcurrido entre los trasplantes.

La incidencia acumulada de las diferentes lesiones (CC, QD y verrugas) estudiadas se calculó mediante la estimación de Kaplan–Meier (Miller RG y cols., 1981).

Se investigó la influencia de las diferentes variables sobre el riesgo de desarrollar las diferentes lesiones cutáneas. Las variables analizadas fueron la edad en el momento del trasplante, la causa de fallo renal, duración de la diálisis pre-trasplante, la pauta de inmunosupresión, el fototipo y la exposición solar ocupacional. La relación estadística, entre el riesgo de desarrollar lesiones cutáneas (CCs, QDs y verrugas víricas) y las diferentes variables analizadas, fue evaluada mediante la prueba de Mantel-Haenszel (Mantel-Cox o test de rangos logarítmicos). Para valorar la contribución independiente de las variables con significación estadística ($p < 0,05$) se realizó el análisis multivariado mediante el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. La magnitud de la asociación se cuantificó mediante la estimación del riesgo relativo y de los intervalos de confianza asociados.

Todos los análisis estadísticos (estimación de Kaplan-Meier, la prueba de Mantel-Haenszel y el análisis multivariado) fueron realizados con el paquete de software estadístico EGRET.

2. DETECCIÓN DEL ADN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

2.1. Muestras estudiadas

Se estudiaron en total 184 biopsias, 141 pertenecían a los RTRs de nuestro estudio y 43 a pacientes inmunocompetentes (IC). Las biopsias de las lesiones de los ICs fueron elegidas, de forma arbitraria, entre los que acudían a la consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. El número de lesiones estudiadas de cada tipo se refleja en la tabla 14.

TABLA 14: Número y tipos de lesiones estudiadas

	VERRUGAS	QD	CB	CE	TOTAL
RTRs	70	30	30	11	141
ICs	20	5	8	10	43
TOTAL	90	35	38	21	184

2. 2. Método de detección del ADN del VPH (Reacción en cadena de la polimerasa)

Para la detección del ADN del VPH se utilizó el Kit de diagnóstico PVH fast® (Laboratorios Pharmagen SA, Madrid). Este kit permite la detección y tipificación del VPH mediante la amplificación de un fragmento de unos 450 pb. perteneciente a la región L1. Se siguieron los siguientes pasos:

2.2.1 - Extracción de ADN a partir de tejido fijado e incluido en parafina.

1. De cada muestra se realizaron dos cortes de 5 μm que se pusieron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml previamente autoclavado. Con objeto de evitar contaminaciones se limpió la cuchilla del micrótopo con xileno antes y después de cada corte.
2. Se descongeló a 37° el tubo de Solución de digestión y un tubo de Proteínasa K. Se añadió al corte 50 μl de Solución de Digestión y 50 μl de Proteínasa K y se empujó el corte con la micropipeta para que quedara completamente cubierto.

Se realizó un control negativo formado por 50 μl de Solución de digestión y 50 μl de Proteínasa K que se procesó igual que el resto de las muestras.
3. La mezcla resultante se incubó a 55° C durante 3 horas.
4. Después se incubó a 94°C durante 10 minutos para inactivar la proteínasa K.
5. A continuación, esta mezcla se centrifugó en microfuga durante 10 minutos. Después se atravesó, con la punta de la micropipeta, la capa superior de parafina solidificada y se cogió una alícuota de 5 μl del sobrenadante para hacer la reacción de amplificación. Se guardó el resto de la solución a 4°C.

2.2.2. Reacción de amplificación de la polimerasa.

1. Se descongelaron los Tubos de reacción durante 1 minuto a 37 °C y se guardaron en hielo, donde se les añadió 5 μl del ADN extraído en el paso anterior.

2. Se programó el termociclador según los siguientes ciclos de temperaturas:

1 ciclo	94 °C	4 min.
35 ciclos	94 °C	1 min.
	52 °C	1,5 min.
	72 °C	2 min.
1 ciclo	72 °C	10 min.

A continuación se mantuvo a 4 °C hasta la recogida de los tubos

2.2.3. Identificación de los tipos de VPH por digestión con enzimas de restricción.

Una vez amplificadas las muestras, en los casos positivos se identificaron los tipos obtenidos mediante la digestión de los fragmentos amplificados con los dos enzimas provistos en el kit. Los patrones de restricción observados después de la digestión 1 y 2 fueron comparados con los patrones conocidos (figuras 4 y 5).

A continuación detallaremos los pasos de la identificación de los tipos.

2.2.3.1. Comprobación del amplificado.

Antes de añadir los enzimas para la restricción de los fragmentos amplificados se comprobó la presencia de ADN amplificado. Para ello se tomó 10 µl del producto y se añadió 2 µl de solución de carga. A continuación se cargó en un gel de agarosa al 3% (en TBE IX y a 8 V / cm).

A.- Se consideró una muestra como positiva cuando apareció:

- una banda de 450 pb correspondiente al genoma de VPH
- una banda de 1200 pb correspondiente al control positivo interno. Esta banda no es visible si la cantidad de ADN vírico es muy alta

B.- Se consideró una muestra como negativa cuando:

-Se detectó sólo una banda de 1200pb correspondiente al control positivo interno.

C.- Se consideró que la reacción de amplificación estaba inhibida cuando:

-No se identificó ninguna banda.

D.- Cuando en el control negativo aparecía una banda de 450 pb se consideró que había habido una contaminación entre las muestras al realizar el proceso de extracción de ADN de las muestras.

A continuación, en las muestras positivas, se realizó la digestión con los dos enzimas y la identificación de los patrones de digestión.

2.2.3.2. Digestión del producto amplificado

1. Se añadió al tubo de reacción, resultante de la PCR, 1µl de Rsa 1 (enzima 1) con la micropipeta.

2. Se incubó a 37 ° C durante 2 horas

3. Se añadió 7 µl de Solución de carga al producto de la digestión y se cargó 20 µl en un gel de agarosa de alta resolución (agarosa al 2,5% en TBE IX a 8 V/cm). Se utilizó como marcador de peso molecular 0,5 µg de DNA Molecular Weight Marker VIII (Boehringer Mannheim).

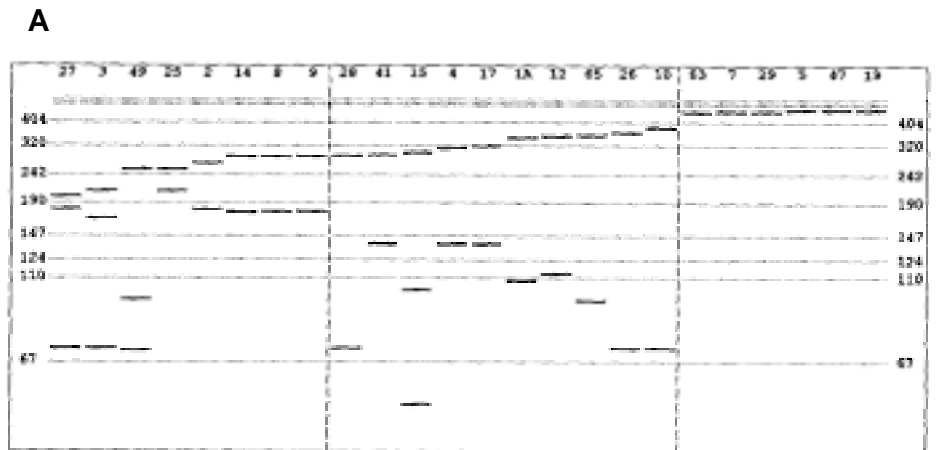
-En los casos positivos, se observó el patrón de restricción de bandas característico de cada virus (figuras 4 y 5).

-Cuando la digestión enzimática no funcionó, en lugar de las dos bandas de 550 y 650, apareció una única banda de 1200pb.

4. Después se realizó una segunda digestión, en la que se añadió 1µl del Enzima 2 de restricción provisto en el kit.

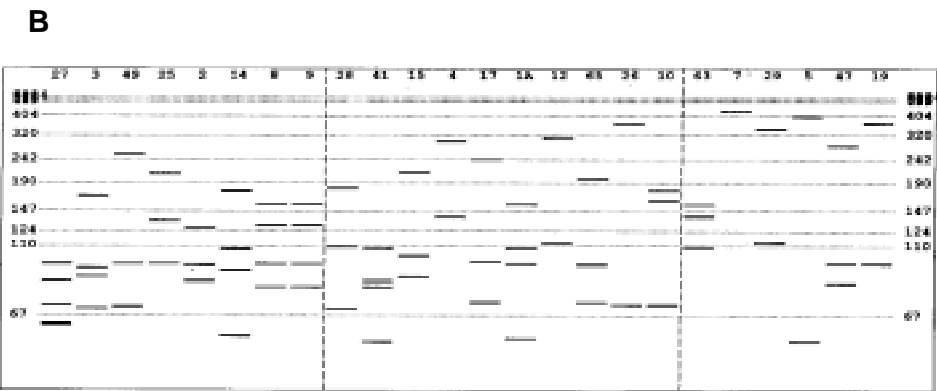
5. Se incubó durante 2 h a 37°C.
6. Se cargó 20 µl de la solución en un gel de agarosa de alta resolución. Se utilizó como marcador de peso molecular 0,5 µg de DNA Molecular Weight Marker VIII (Boehringer Mannheim).
7. Se anotó el patrón de bandas obtenidos tras esta segunda digestión, y se compararon los dos patrones con los descritos por los tipos de VPH cutaneotropos (figura 4) y los tipos de VPH mucosotropos (figura 5).

Figura 4: Patrones de restricción de los tipos cutáneos del VPH. En la figura **A** tras la primera digestión con Rsa I y en la **B** tras la digestión con los dos enzimas.



Patrones de Restricción para Rsa I de los distintos tipos de PVII dérmicos
(según de Villiers E.M., J. Virol. 1989; 63:4898-903)

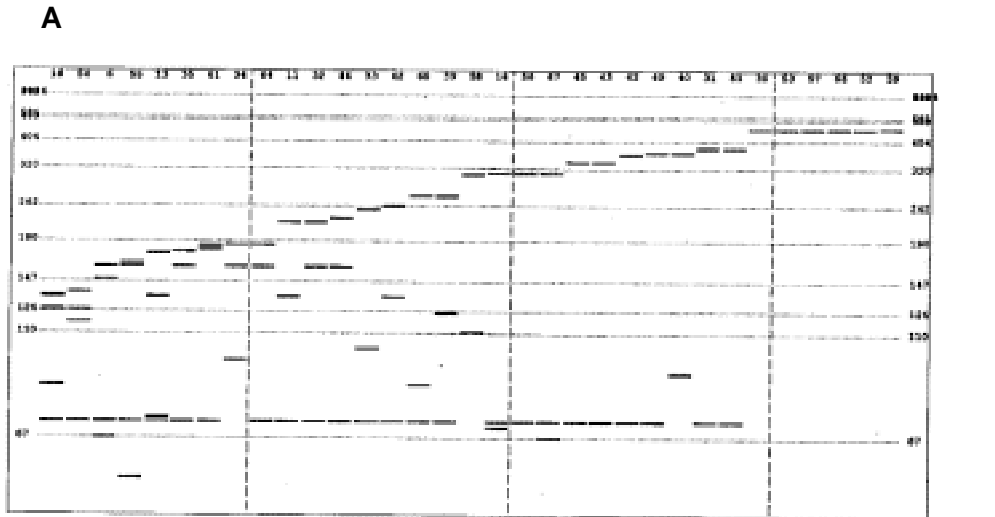
MPV	27	3	49	25	2	14	8	9	28	41	15	4	17	1A	12	65	26	10	63	7	29	5	47	19
pb	200	209	255	255	269	287	287	287	289	290	299	310	316	344	351	354	365	383	420	431	433	464	464	464
	190	168	096	209	160	174	173	171	072	139	102	139	139	100	113	085	072	072						
	072	072	071						045	020	054	009			009	018								
				033					042															



Patrones de Restricción para Rsa I y la Enzima 2, de los distintos tipos de PVII dérmicos
(según de Villiers E.M., J. Virol. 1989; 63:4898-903)

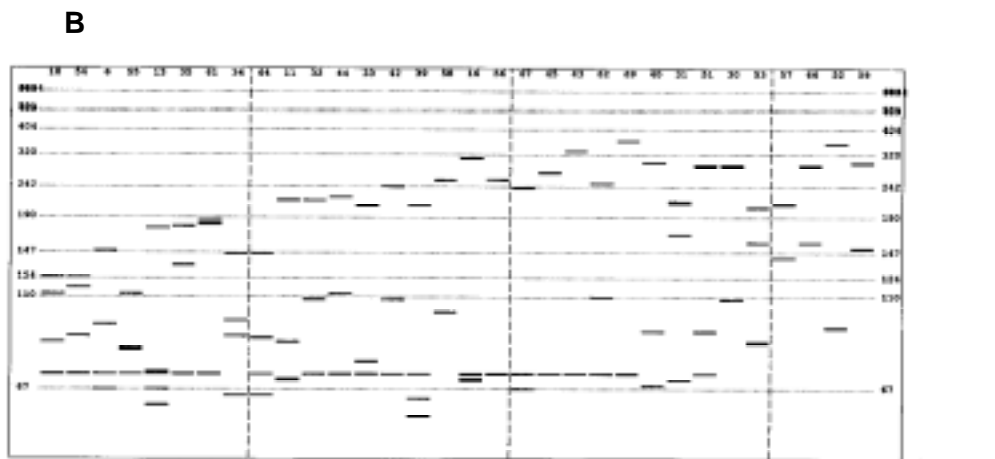
MPV	27	3	49	25	2	14	8	9	28	41	15	4	17	1A	12	65	26	10	63	7	29	5	47	19
pb	096	168	255	209	127	176	157	157	100	100	212	209	243	256	309	199	365	177	194	428	342	399	283	368
	094	093	096	135	095	107	130	130	108	084	102	139	097	108	113	095	072	162	140	027	113	027	096	096
	072	087	071	098	084	091	088	096	070	081	087	080	073	096	034	073	018	022	109			059	053	
	064	070	033	024	050	059	081	081	046	057	037	027	042	058	008	048		026	046			002	002	
	048	029		047	020				043	018	027	003		034	019			018						

Figura 5: Patrones de restricción para los tipos mucosos. En la figura **A** tras la primera digestión con Rsa I y en la **B** tras la digestión con los dos enzimas.



Patrones de Restricción para Rsa I de los distintos tipos de PVH que afectan mucosas (según de Villiers E.M., J. Virol. 1989; 63:4898-903)

18	54	6	55	13	35	41	24	44	11	32	44	33	42	38	38	24	44	47	45	43	42	40	40	31	43	18	47	47	44	32	18	
123	128	142	165	175	177	185	186	186	216	216	222	256	263	269	280	280	310	310	310	318	318	349	349	385	385	385	449	449	449	449	449	449
123	128	149	181	225	181	220	161	141	138	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141
143	133	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172
172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172
172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172



Patrones de Restricción para Rsa I y la Enzima 2, de los distintos tipos de PVH que afectan mucosas (según de Villiers E.M., J. Virol. 1989; 63:4898-903)

18	54	6	55	13	35	41	24	44	11	32	44	33	42	38	38	24	44	47	45	43	42	40	40	31	43	18	47	47	44	32	18		
123	128	149	172	175	177	185	186	186	216	216	222	256	263	269	280	280	310	310	310	318	318	349	349	385	385	385	449	449	449	449	449	449	
123	128	149	181	225	181	220	161	141	138	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	141	
143	133	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	
172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172
172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172

Cuando el patrón de restricción resultante tras la digestión con los enzimas 1 y 2 no coincidió con los patrones publicados y reportados en las figuras anteriores (4 y 5). Se consideraron tres posibilidades:

- A. Que se tratase de un tipo de VPH nuevo, es decir no descrito previamente.
- B. Que fuese una variante de un tipo de VPH conocido. Las variaciones dentro de un tipo tienen una diferencia del 1-2% en la secuencia del ADN. Si la discordancia está en una zona diana del enzima dará un patrón de restricción diferente.
- C. Que hubiese habido un problema en la digestión (digestión parcial de algún fragmento).

En estos casos se realizó la secuenciación del fragmento amplificado. Una vez obtenida la secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en las bases de datos Gen Bank y EMBL databank.

Para la detección del VPH se utilizó un método de detección comercializado (HPV fast[®] Pharma Gen SA), esto nos supuso un problema a la hora de secuenciar ya que no conocíamos la secuencia de los *primers* provistos en el kit. Este inconveniente lo pudimos solucionar mediante la introducción del fragmento de ADN problema (resultado de la PCR) en un vector de secuencia ya conocida (pZero). Así, conociendo la secuencia del vector y el punto donde insertamos nuestro ADN problema, pudimos diseñar unos primers complementarios a las últimas bases del vector. A continuación detallaremos la técnica empleada para ello. En las figuras 6 y 7 se puede observar un esquema de los pasos seguidos para la secuenciación.

FIGURA 6:

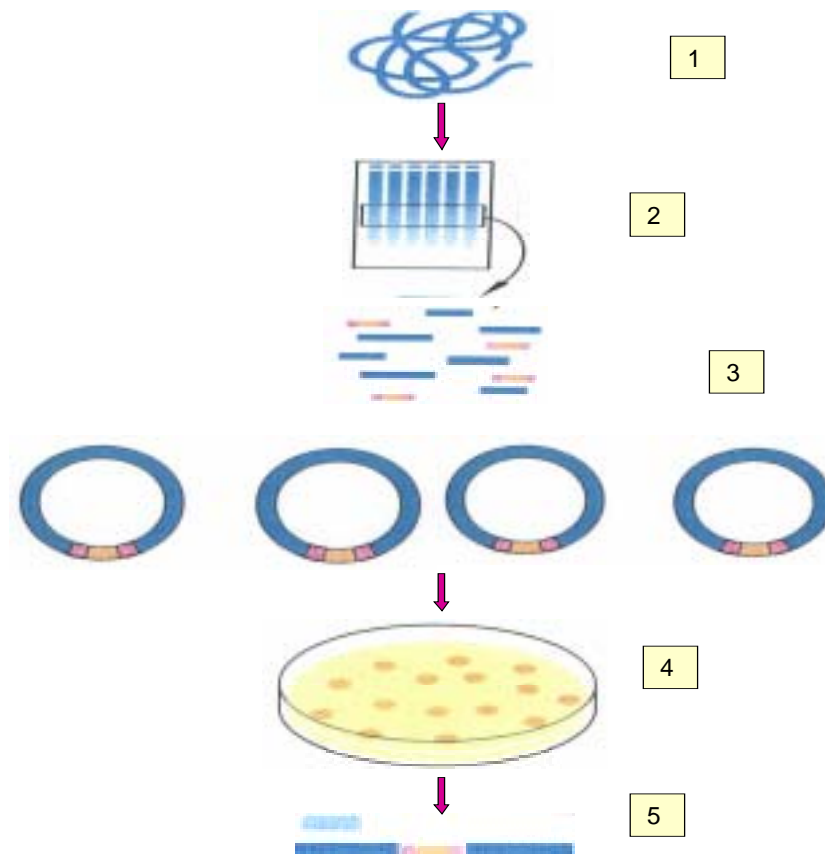


Figura 6: Esquema de los pasos iniciales del proceso de la secuenciación.

- (1) ADN producto de la amplificación
- (2) Lo ponemos en un gel de agarosa y recortamos la banda que nos interesa.
- (3) Purificamos este fragmento y lo insertamos en un vector de secuencia ya conocida
- (4) Estos vectores se introducen en *E coli* (transformación bacteriana). Después se realiza la extracción de los vectores mediante un proceso de lisis bacteriana y posterior purificación.
- (5) Entonces ya podemos utilizar un *primer* que coincida con la zona del vector cercana al inserto

FIGURA 7

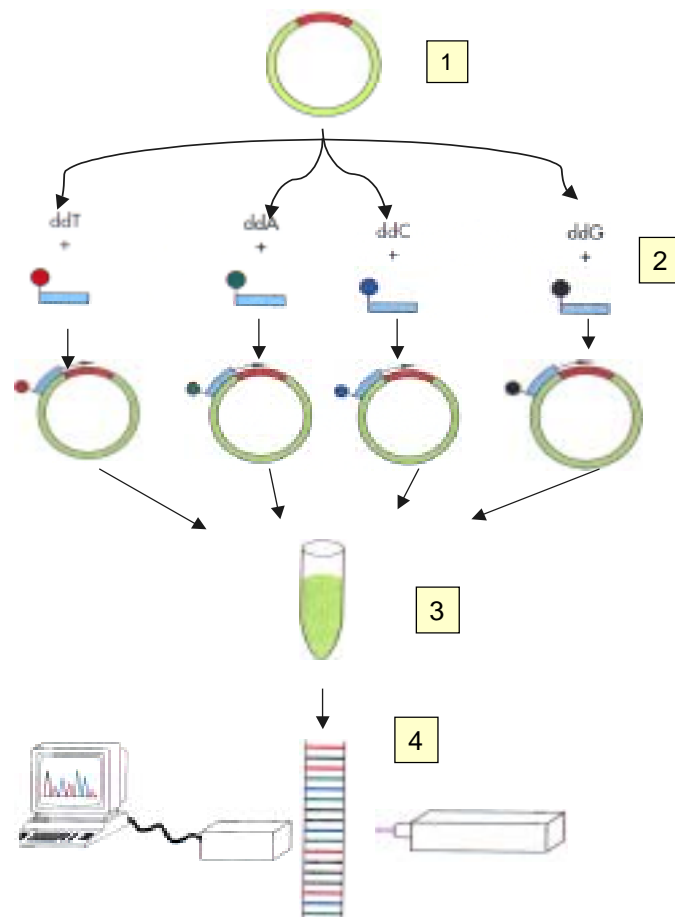


Figura 4: Esquema de la secuenciación automática del ADN.

- (1) Tenemos el ADN problema incluido en el vector.
- (2) Se realiza 4 mezclas, cada una contiene una base diferente con una terminación dideoxido y un primer para el vector pZERO con un marcador fluorescente diferente.
- (3) Cuando las reacciones hayan acabado, se mezclan los productos obtenidos
- (4) A continuación, se colocan en un gel especial para la secuenciación, que hace correr a los productos según su peso molecular. La fluorescencia emitida es detectada y registrada por un ordenador que la registra como una serie de puntas.

2.2.4. Secuenciación de los tipos de VPH no identificados mediante los patrones de restricción.

El vial resultado de la PCR de contenía:

- El control positivo de la PCR
- Los primers y oligonucleótidos
- La banda de 450 pb que se correspondía con el ADN problema

Por lo tanto fue necesario aislar y purificar este ADN problema. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- 1.- Se recortó el ADN problema (banda de 450 pb) de un gel de agarosa de bajo punto de fusión con una concentración de 1,5% (agarosa NiuSieve)
- 2.- Se purificó este ADN mediante GFX-PCR DNA and gel band purification kit® (Amershan Pharmacia) según las indicaciones del protocolo del proveedor.
- 3.- Una vez obtenido y purificado el fragmento del ADN problema se procede a su inserción o clonación en el vector pZErO según las técnicas habituales. Este vector posee un gen con resistencia a la Kanamicina.(figura 8)

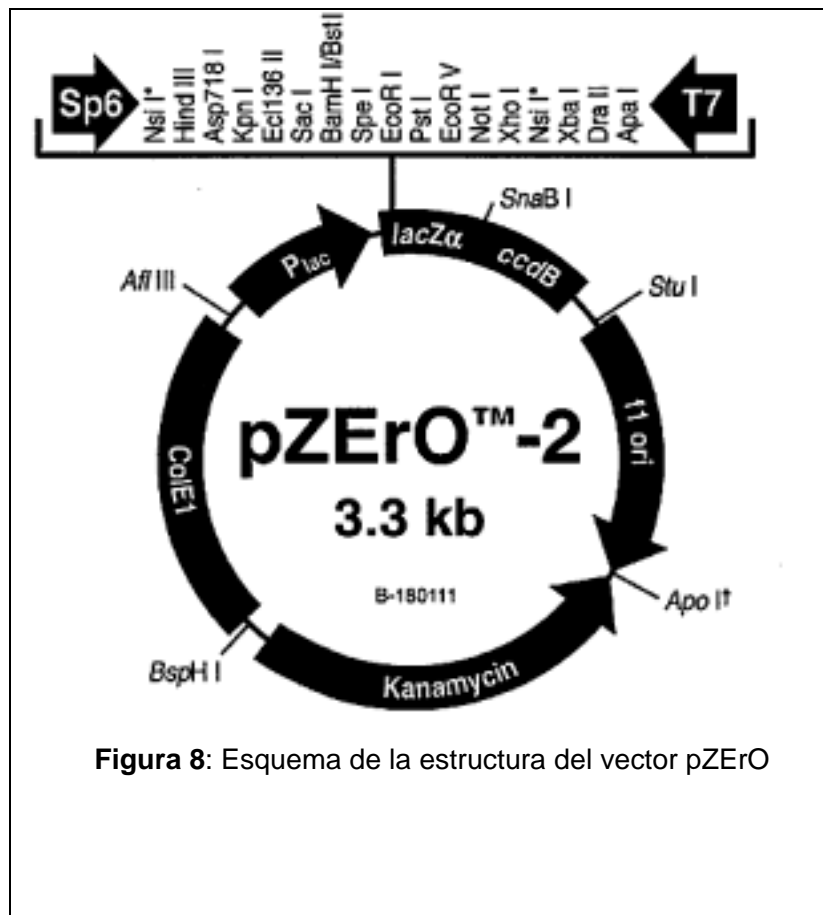


Figura 8: Esquema de la estructura del vector pZErO

- 4.- El vector con el inserto se introdujo en cepas de *E.coli* modificadas (transformación bacteriana) y se cultivó en placas de LB-agar con Kanamicina a 37° durante toda la noche.
- 5.- Al día siguiente se picaron las colonias crecidas (mínimo 10-12) y se comprobó la presencia del inserto mediante una PCR. Para ello se utilizaron el par de primers M13 y M13rev (senso y antisenso).
- 6.- Una vez comprobada la presencia del inserto, se procedió a la amplificación mediante PCR, previa a la secuenciación directa, con los primers ANp y NAP (senso y antisenso).

7.- A continuación se realizó la secuenciación directa mediante el análisis de la fluorescencia de las terminaciones de los dideoxidonucleótidos (directly sequenced by fluorescent dideoxynucleotide chain termination cycle sequencing). Para ello se siguieron las instrucciones provistas en el kit "ABI Prism Dye terminator cycle sequencing Ready reaction kit®" de Perkin-Elmer y se utilizó el secuenciador automático 377 ABI Prism (Applied Biosystems, Langer, Germany).

8.- La secuencia obtenida se remitió al BLAST Server (National Center for Biotechnology Information [NCBI]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/cgi>) que comparó nuestra secuencia con las depositadas en los bancos de datos (GenBank y EMBOL databank).

9.- Una vez obtenido el grado de homología con los tipos de VPH conocidos, de acuerdo con lo acordado por el "Papillomavirus Nomenclature Committee en 1995", se consideró un nuevo tipo cuando la homología con L1 fue menor del 90%, un subtipo cuando la homología osciló entre el 90-98% y una variante cuando la homología fue mayor del 98%.

3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA P53

3.1. Muestras estudiadas

Se estudiaron 77 biopsias, 47 biopsias de lesiones pertenecientes a los RTRs de nuestro estudio y 30 de pacientes inmunocompetentes (tabla 15).

TABLA 15: Número y tipos de lesiones estudiadas.

	QD	CB	CE	TOTAL
RTR	22	18	7	47
IC	10	10	10	30
TOTAL	32	28	17	77

3.2. Técnica de inmunohistoquímica

Se usó como técnica base el método de Avidina-Biotina-Peroxidasa de acuerdo con la siguiente metodología:

- 1.- Se efectuaron los cortes en parafina que fueron depositados en preparaciones pre-tratadas con gelatina o polilisina para aumentar su adhesividad.
- 2.- Se desparafinaron los cortes mediante tres pasos por xilol, de 5 minutos cada uno, y se hidrataron las secciones mediante el paso por alcoholes de graduación decreciente (alcohol absoluto, alcohol 95° y alcohol 70°).
- 3.- Se lavaron durante 5 minutos en agua destilada y se procedió a la digestión enzimática con tripsina en tampón citrato (pH 6).

- 4.- A continuación, se lavaron las muestras con PBS (Phosphate- buffered saline) (tres inmersiones de 5 minutos).
- 5.-Se secaron las secciones, se aplicó suero supresor (suero normal de caballo, vector S-2000) y se incubó durante 20-30 minutos.
- 6.- Se retiró el exceso de suero por decantación, se secó alrededor del tejido y se incubó con el antisuero primario anti-p53 D07 (Novocastra Laboratories, Newcastle, England) a 37° durante toda la noche. EL D07 es un anticuerpo monoclonal murino que reacciona tanto con la forma natural de la proteína como con la forma mutada (Vojtesek B y cols., 1992). En concreto se une a los epítomos de una zona altamente conservada cerca de la N-terminal.
- 7.-Se eliminaron los restos de anticuerpo primario con tres baños en PBS.
- 8.- Se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo secundario, eliminando a continuación los restos de anticuerpo mediante lavados con PBS a los que se añadió peróxido de hidrógeno al 6%.
- 9.- A continuación, se incubó las secciones con ABC (avidina biotina complex) durante 45-60 minutos.
- 10.-Tras dos lavados con PBS, se sumergió en Triton X-100 al 0,5% en PBS durante 30 segundos.
- 11.-Se procedió a la reacción final empleando diaminobenzidina (Sigma N° D-5637), desencadenando la reacción cromógena mediante incubación durante 5 minutos en una solución de PBS a la que se ha añadido peróxido de hidrógeno
- 12.- Se lavó con agua destilada durante 5 minutos y se contrastó con hematoxilina de

Harris durante 1 minuto.

13.- Por último, se deshidrató mediante la inmersión en soluciones alcohólicas de concentraciones progresivamente altas.

Este proceso nos permitió hacer reaccionar la peroxidasa con su sustrato específico, el peróxido de hidrógeno, en presencia del cromógeno DAB (tetrahidrocloruro de 3-3' diaminobenzidina). En la primera fase de la reacción la enzima y el peróxido de hidrógeno forman un complejo que seguidamente interacciona con el DAB, quedando esta última en estado oxidado. Las moléculas de DAB, ya oxidadas, presentan una serie de radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros insolubles de color marrón oscuro que son los que indican las áreas positivas marcadas por el anticuerpo monoclonal.

Para los controles positivos se utilizaron secciones positivas de CE de pulmón que expresaron elevados niveles de p53 mutante. Para los controles negativos se evaluaron las estructuras epiteliales de los anexos.

Las secciones fueron evaluadas por dos observadores independientes.

Se consideró positivas a aquellas lesiones con más del 5% de positividad nuclear.

3.3. Metodología estadística

El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba exacta de Fisher.

RESULTADOS

1. INCIDENCIA DE CARCINOMAS CUTÁNEOS EN LOS RTRS Y ESTUDIO DE LAS VARIABLES RELACIONADAS

1.1. Estudio de la incidencia de lesiones cutáneas en los RTRs

1.1.1. Estudio de la incidencia de los carcinomas cutáneos.

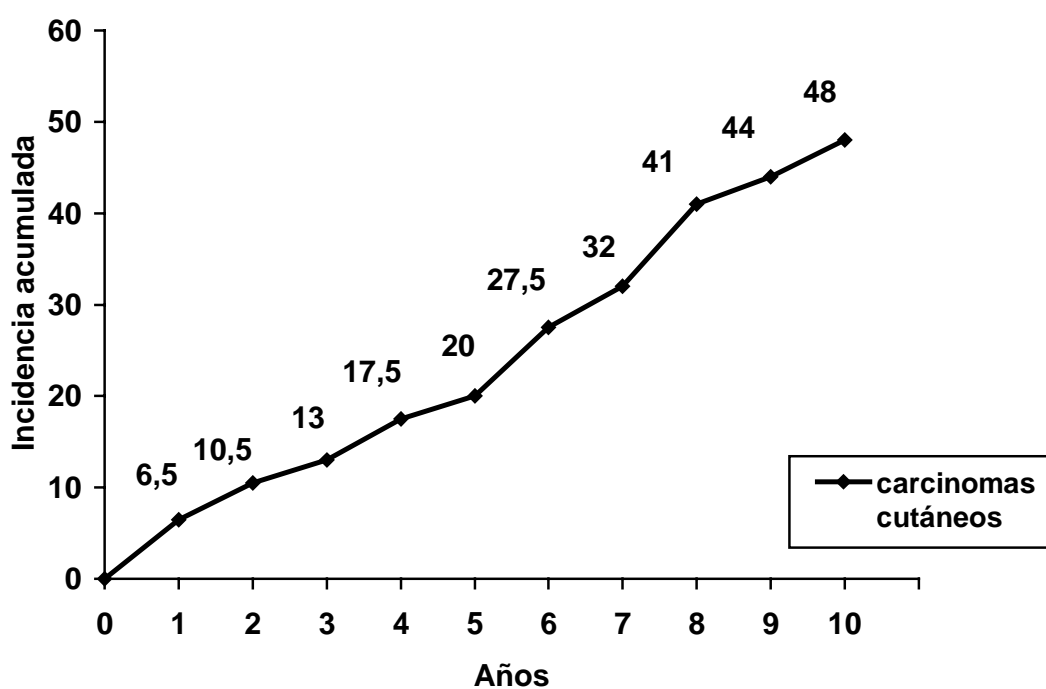
Se incluyeron 174 pacientes, 118 varones y 56 mujeres, con una mediana de seguimiento de 72 meses (rango 12-140 meses). De estos pacientes, 20 abandonaron el seguimiento por la pérdida funcional del riñón trasplantado, necesitando de nuevo diálisis, y 10 por fallecimiento. Las características de la población estudiada se resumen en la tabla 16.

Tabla 16: Resumen de los datos demográficos observados para las diferentes variables.

	Población total N= 174	Poblacion sin cáncer N=135	Población con cáncer N=39
Edad en el momento del trasplante (mediana)	45(15-67)	45(15-67)	53(37-65)
Duración diálisis pre-trasplante (mediana)	27,7(0-200)	20(0-200)	26,4(6-120)
Tiempo de seguimiento (mediana)	72(12-140)	60(12-140)	108(12-140)
Sexo. N (%)			
Varones	118(68)	89(66)	29(74)
Mujeres	56(32)	46(34)	10(26)
Enfermedad renal. Nº (%)			
Glomerular	50(28,7)	39(28,8)	11(28,2)
Intersticial	24(13,8)	19(14,0)	5(12,8)
Poliquistosis	32(18,4)	23(17,0)	9(23,0)
Vascular	15 (8,6)	10(7,4)	5(12,8)
Diabetes	1 (2,8)	5(3,7)	0
Otras	10 (5,7)	9(6,7)	1 (2,5)
Desconocidas	38(21,8)	30(22,3)	8(20,5)
Fototipo.Nº (%)			
I	3 (1,7)	3(2,2)	0
II	32(18,4)	24(17,8)	8(20,5)
III	81(46,5)	61(45,3)	20(51,2)
IV	54(31,0)	43(31,8)	11(28,3)
V	3 (1,7)	3(2,2)	0
VI	1 (0,5)	1(0,7)	0
Exposición solar ocupacional. Nº (%)			
Alta	72(41,4)	43(31,8)	29(74,5)
Baja	102(58,6)	92(68,2)	10(25,5)
Tipo de inmunosupresión. Nº (%)			
A (corticoides+ciclosporina)	87(50,0)	61(45,2)	26(66,6)
B (corticoides+ciclosporina+azatioprina)	56(32,2)	46(34,0)	10(25,6)
Otras(corticoides+tacrolimus+micofenolato)	31(17,8)	28(20,8)	3(7,7)

39 pacientes (29 varones y 10 mujeres) desarrollaron algún CC, lo que se corresponde con una prevalencia del 22,5%. El cálculo de la incidencia acumulada, mediante la estimación de Kaplan-Meier, reveló que a los 3 años un 13% de los pacientes desarrollaron algún tipo de CC, esta cifra se incrementó hasta un 27,5% a los 6 años y a un 48% a los 10 años (figura 9).

Figura 9: Incidencia acumulada de CCs en los RTRs de nuestro estudio. Como se demuestra en la gráfica, la incidencia acumulada fue alta desde los primeros años y creció de forma progresiva hasta alcanzar a casi la mitad de los pacientes seguidos durante 10 años.

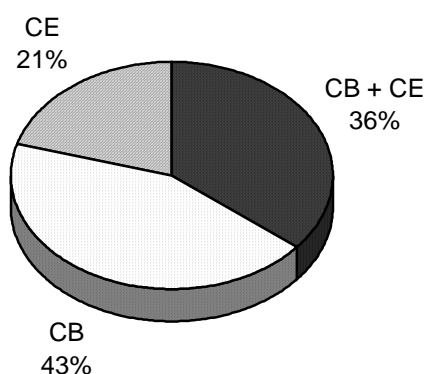


En total todos los pacientes con CCs desarrollaron 142 CCs (media por paciente 3,6). El 59% de los pacientes con CCs presentaron más de un tumor, mientras que sólo 16(41%) desarrollaron un único carcinoma.

El carcinoma detectado con más frecuencia fue el CB, ya que de los 142 observados al final del seguimiento, 84 fueron CBs y 58 CEs, siendo la proporción entre ambos de 1,4/1. Cuando se consideró sólo los CCs aparecidos en los 3 primeros años tras el trasplante la ratio CB/CE fue de 3,4/1.

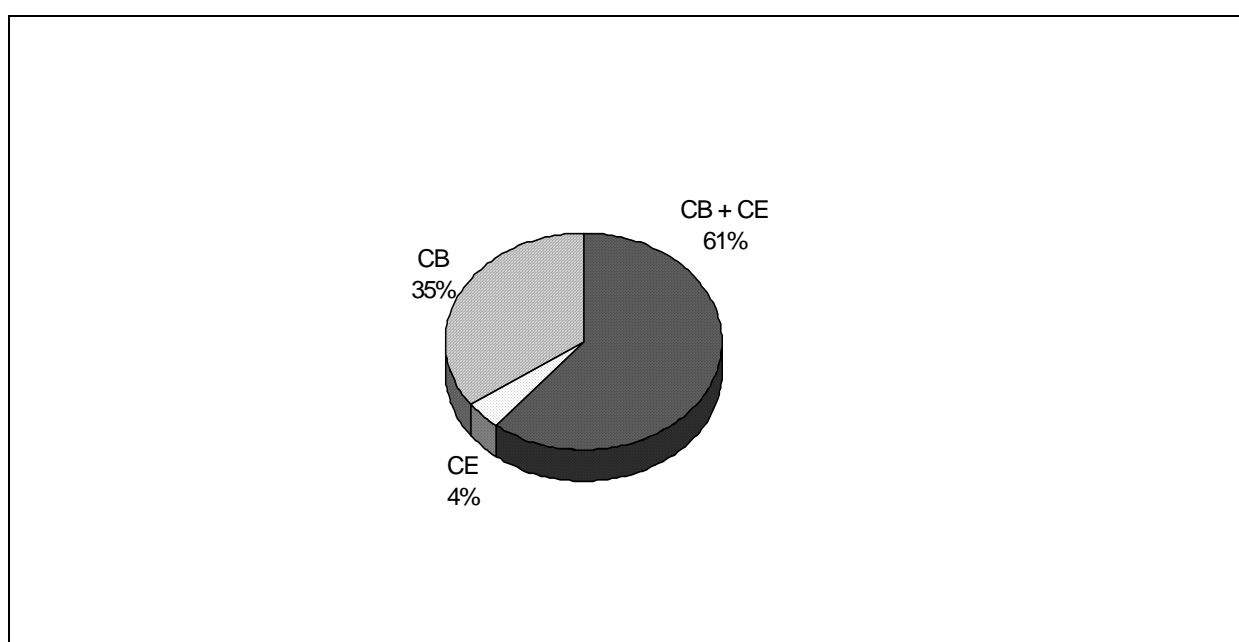
Si contabilizamos el número de pacientes con cada tipo de CC, también observamos que hubo más pacientes con CBs que con CEs. Como se puede apreciar en la figura 10, un 43% de los pacientes tuvo CBs, mientras que sólo un 21% de los pacientes desarrolló CEs de forma exclusiva. En un 36% de los pacientes coexistieron ambos tipos histológicos.

Figura 10: Tipos histológicos en los 39 pacientes con CCs



Si consideramos sólo a los pacientes con CCs múltiples (figura 11), se puede observar que, lo más frecuente, fue la coexistencia de ambos tipos histológicos en un mismo paciente (61%), seguido de los casos de pacientes con más de un CB (35%), mientras que, sólo un paciente (4%) con CCs múltiples desarrolló exclusivamente CEs.

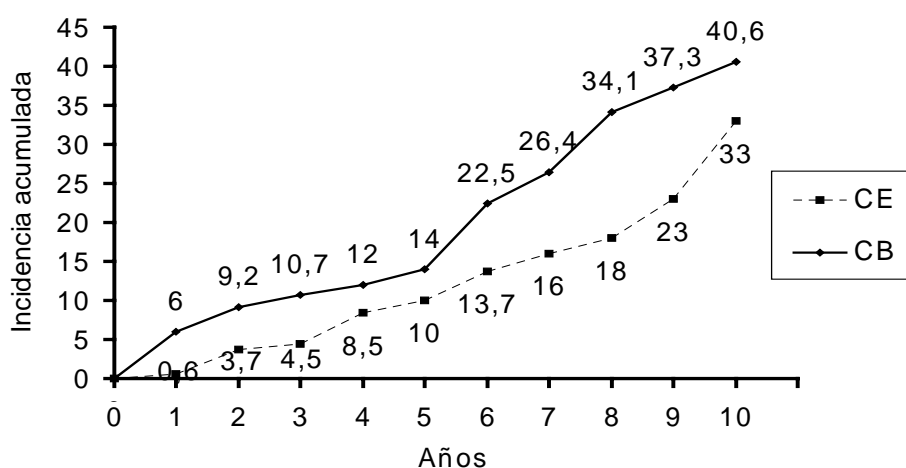
Figura 11: Tipos histológicos en los 23 pacientes con tumores múltiples



El tiempo medio de latencia para el primer carcinoma fue de 39,5 meses. Si calculamos por separado los dos tipos histológicos, observamos que el primer CB aparece de forma más precoz (43 meses), mientras que el periodo de latencia para el primer CE es de casi un año más (54 meses). Al calcular la incidencia acumulada de ambos tumores (figura 12) pudimos comprobar como el CB aparece más precozmente, con una incidencia acumulada del 10,7% a los 3 años, mientras que la incidencia del CE es del 4,5% para este mismo período. Con el paso de los años, como consecuencia de un más rápido crecimiento en la incidencia del CE, las cifras de incidencia se aproximan, siendo al final del estudio, la incidencia del CB del 40,6% mientras que la del CE fue de un 33% (figura 12).

Figura 12: Comparación entre las incidencias acumuladas del CB y del CE.

La incidencia acumulada del CB creció de forma proporcional a lo largo de los 10 años. Sin embargo, la incidencia del CE creció de forma lenta en los primeros años, aumentando de forma rápida a partir de los 6-7 años, con una tendencia de crecimiento exponencial.

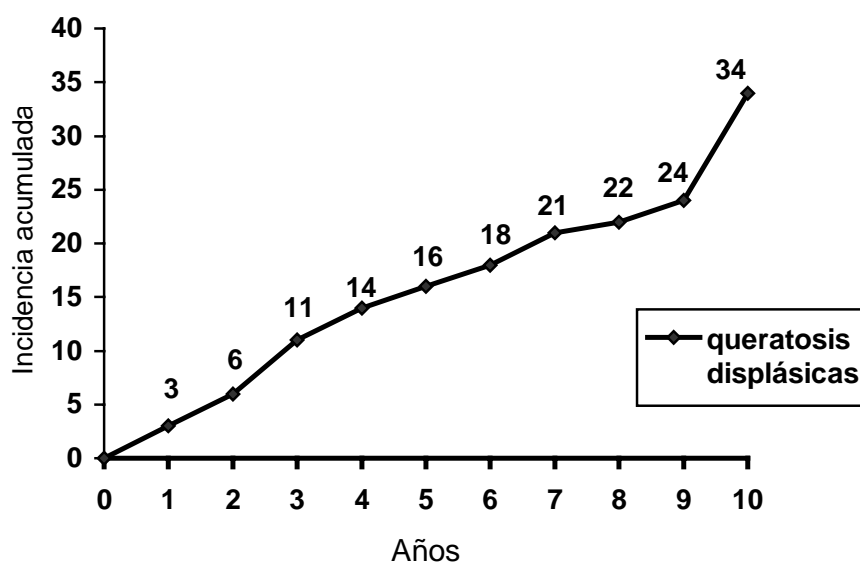


En la mayoría de los casos (88%) los CCs se localizaron en las áreas expuestas a la radiación solar (cabeza, dorso de manos y escote), predominando en la cabeza (76%). 86

1.1.2. Estudio de la incidencia de las queratosis displásicas

Se observó la presencia de lesiones premalignas o queratosis displásicas (QD) en 27 pacientes (prevalencia 15,5%). Al final del estudio, la incidencia acumulada de QD fue cercana al 35% (figura 13). Más de la mitad de los pacientes con QD (62%), desarrollaron algún CC.

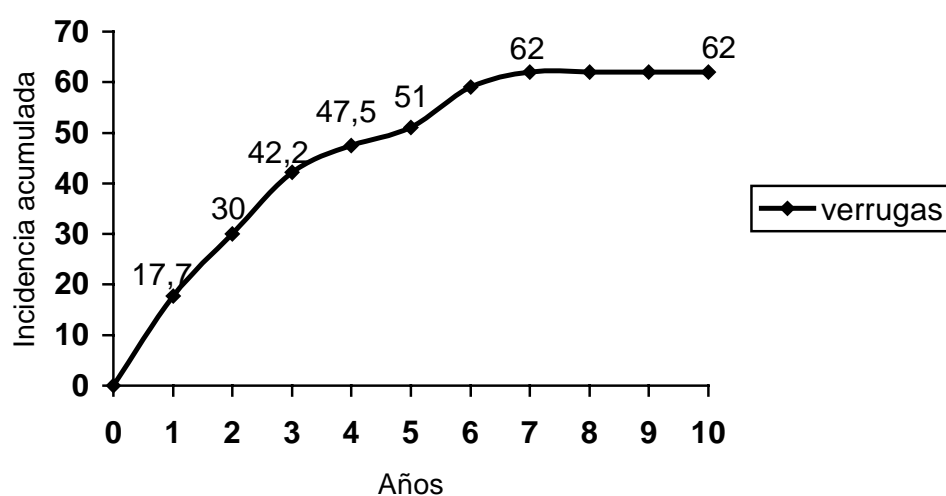
Figura 13: Incidencia acumulada de las QDs en los RTRs de nuestro estudio. La incidencia acumulada creció de forma proporcional durante todo el estudio.



1.1.3. Estudio de la incidencia de las verrugas víricas

Se detectó alguna verruga en 68 RTRs (39%). En la gran mayoría de los casos las verrugas fueron múltiples y recidivantes. La incidencia acumulada de verrugas fue de un 62% al final del estudio (figura 14).

Figura 14: Incidencia acumulada de verrugas en los RTRs de nuestro estudio. Llama la atención, el rápido crecimiento de la incidencia en los primeros 5 años (51%) y el posterior aplanamiento de la curva.



La gran mayoría de las lesiones se localizaron en las extremidades (80%) siendo muy baja incidencia de verrugas en los genitales (3%).

1.1.4. Incidencia de otros cánceres no cutáneos

Además de los CCs, otros 10 pacientes (5,7%) desarrollaron otros tumores. Estos fueron: 2 sarcomas de Kaposi, 2 neoplasias de próstata, 1 linfoma, 1 leucemia, 1 neoplasia de colon, 1 neoplasia de pulmón, 1 teratoma y 1 carcinoma de conjuntiva. No se detectó una mayor incidencia de CCs en los pacientes con otros tumores.

1.2. Estudio de las variables relacionadas con el desarrollo de las lesiones cutáneas de los RTRs.

1.2.1. Variables relacionadas con el desarrollo de los carcinomas cutáneos.

En el análisis univariado de la relación de las diferentes covariables con el riesgo de desarrollar un CC (tabla 17), sólo la mayor edad en el momento del trasplante y la elevada exposición solar ocupacional, demostraron ser factores de riesgo estadísticamente significativos ($p < 0,001$ en ambos casos).

Tabla 17: Análisis univariado de la relación entre el riesgo para desarrollar un CC y las diferentes covariables de la población estudiada mediante la prueba de Mantel-Haenszel (Mantel-Cox o test de rangos logarítmicos).

COVARIABLES*	Riesgo relativo univariado	95% Intervalo de confianza	Valor p
Edad en el momento del trasplante	1,05	1,03-1,07	<0,001
Sexo (varón es la referencia)	0,55	0,26-1,18	0,26
Duración de la diálisis pre-trasplante	0,99	0,98-1,01	0,88
Exposición solar ocupacional (Baja exposición es la referencia)	4,78	2,26-10.1	<0,001
Tipo de inmunosupresión	.		
Tipo A (referencia)	1		
Tipo B	0,67	0,32-1,4	0,32
Tipo C	0,60	0,18-2,0	0,18

*En los casos del fototipo cutáneo y la enfermedad renal no se obtuvo convergencia.

Para investigar la contribución independiente de las dos covariables con significación estadística se realizó un análisis multivariado mediante el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox (Tabla 18). El resultado final del estudio multivariado demostró que las dos variables significativas en el análisis univariado actuaban de forma independiente.

Tabla 18: Estudio multivariado mediante el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox.

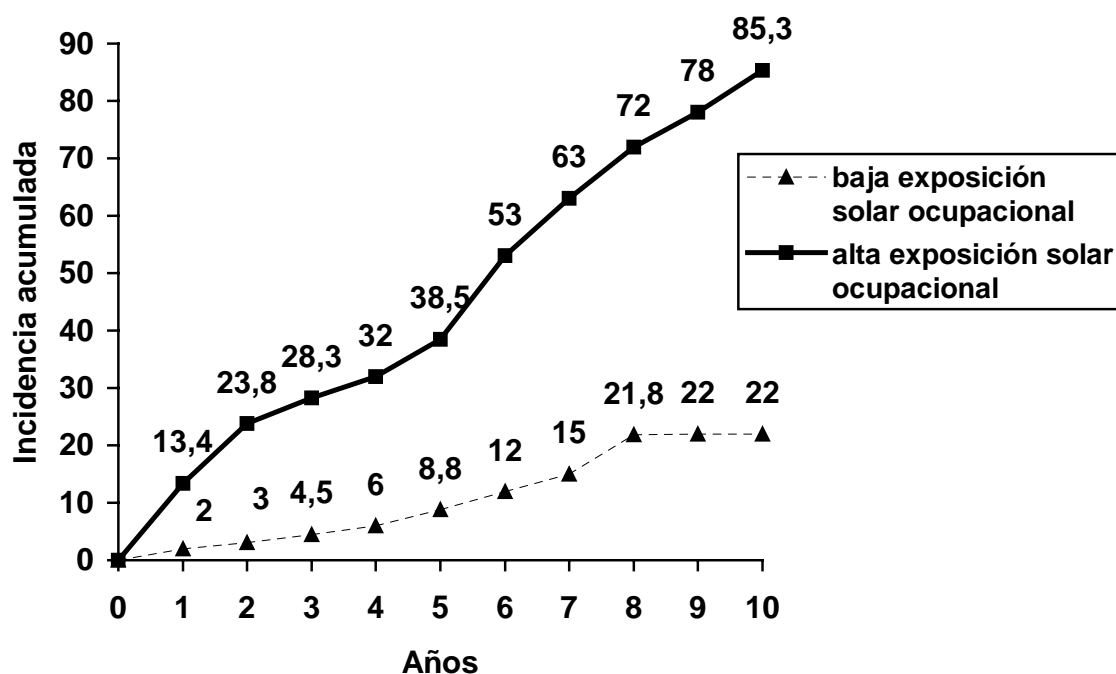
VARIABLES	Riesgo relativo	95% Intervalo de confianza	Valor p
Edad en el momento del trasplante	1,06	1,03-1,8	<0,001
Exposición solar ocupacional	5,15	2,39-11,05	<0.001

Según los resultados obtenidos (tabla 18) podemos calcular que a medida que se incrementaba en un año la edad del paciente en el momento de recibir el trasplante, el riesgo de desarrollar un CC aumentaba un 1,06. Esto se traduce en que un individuo trasplantado a los 40 años tiene casi el doble de posibilidades (1,8) de desarrollar un CC que el que recibe el trasplante a los 30 (Riesgo relativo/año=1,06, riesgo relativo a los 10 años= $1,06^{10}=1,8$).

El otro factor de riesgo fundamental para el desarrollo de los CCs fue la exposición solar ocupacional. Según el resultado final del estudio multivariado, los individuos con una elevada exposición solar ocupacional tienen un riesgo 5,15 veces mayor de desarrollar

un CC (tabla 18). Pero además de este resultado, otros datos apoyan el importante papel de esta variable. En primer lugar, al calcular la incidencia acumulada de los CCs en los RTRs, según su exposición solar ocupacional, en los RTRs con elevada exposición solar ocupacional se alcanzó una elevada cifra (85,3%) mientras que en los RTRs con baja exposición solar ocupacional, esta fue sólo de un 22% (figura 15). Por otro lado, el 74,5% de los pacientes con CCs tenían una elevada exposición solar ocupacional, mientras que en los RTRs sin CCs sólo un 35,1% tenían una elevada exposición solar ocupacional (tabla 16). Además, como ya hemos comentado, el 88% de los CCs aparecieron en las áreas corporales expuestas a la radiación solar, sobre todo en la cabeza (76%).

Figura 15: Comparación entre la incidencia acumulada de CCs en los RTRs con una elevada exposición solar ocupacional y los RTRs con una baja exposición solar ocupacional.



Otras variables estudiadas como el sexo, la duración de la diálisis pre-trasplante y el tipo de inmunosupresión administrado no han demostrado tener una influencia estadísticamente significativa sobre el desarrollo de los CC.

Para investigar si las variables estudiadas pudieran influir, de forma aislada, sobre la aparición de CE ó CB se realizó el cálculo del análisis univariado de su relación de forma separada en los dos tumores. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 19.

Tabla 19: Análisis univariado de la relación entre el riesgo para desarrollar un CB o un CE y las diferentes covariables de la población estudiada.

covariables*		Riesgo relativo univariado	95% Intervalo de confianza	Valor P
Edad en el momento del trasplante	CB	1,05	1,03-1,07	<0.01
	CE	1,05	1,02-1,08	<0.01
Sexo (varón es la referencia)	CB	0,62	0,27-1,37	0,22
	CE	0,19	0,04-0,83	<0,01
Duración de la diálisis pre-trasplante	CB	0,99	0,97-1,0	0,24
	CE	1,0	0,99-1,02	0,23
Exposición solar ocupacional (Baja exposición es la referencia)	CB	5,15	2,22-11,92	<0.01
	CE	5,41	1,81-16,11	<0.01
Tipo de inmunosupresión Tipo A (referencia)		1		
Tipo B	CB	0,83	0,38-1,83	0,65
	CE	0,66	0,24-1,87	0,44
Tipo C	CB	0,83	0,24-2,9	0,78
	CE	0,98	0,21-4,53	0,98

* En los casos del fototipo cutáneo y la enfermedad renal no se obtuvo convergencia.

Como podemos observar en la tabla 19, las principales variables de riesgo para desarrollar un CB o un CE, al igual que ocurrió en el análisis de los CCs en su conjunto, son la exposición solar ocupacional y la edad en el momento del trasplante. No obstante, en el caso del CE, el sexo también demuestra tener influencia, teniendo los varones un riesgo 5 veces mayor que las mujeres.

Otros factores como la duración de la diálisis pre-trasplante y el régimen de inmunosupresión administrado no han demostrado tener una influencia significativa para el desarrollo de CBs o CEs.

1.2.2. Variables relacionadas con el desarrollo de queratosis displásicas

La edad en el momento del trasplante y la elevada exposición solar ocupacional demostraron ser las variables que influían de forma significativa en el desarrollo de QDs (tabla 20). En el análisis multivariado (tabla 21) se demostró que estas variables actuaban de forma independiente.

Tabla 20: Análisis univariado de la relación entre el riesgo para desarrollar una QDs y las diferentes covariables de la población estudiada.

COVARIABLES*	Riesgo relativo univariado	95% Intervalo de confianza	Valor P
Edad en el momento del trasplante	1,04	1,02-1,07	<0,01
Sexo (varón es la referencia)	0,72	0,30-1,69	0,43
Duración de la diálisis pre-trasplante	1,0	0,99-1,01	0,43
Exposición solar ocupacional (Baja exposición es la referencia)	3,25	1,42-7,44	<0,01
Tipo de inmunosupresión			
Tipo A (referencia)	1	1	
Tipo B	0,93	0,39-2,22	0,88
Tipo C	1,22	0,39-3,77	0,72

*En los casos del fototipo cutáneo y la enfermedad renal no se obtuvo convergencia.

Tabla 21: Resultado final del estudio multivariado mediante el modelo de regresión de riesgo proporcional de Cox. En este se demostró que las dos variables significativas en el análisis univariado actuaban de forma independiente.

Variables	Riesgo relativo	95% Intervalo de confianza	Valor P
Edad en el momento del trasplante	3,02	1,31-6,95	<0,01
Exposición solar ocupacional	1,04	1,01-1,07	<0,01

1.2.3. Variables relacionadas con el desarrollo de las verrugas víricas

En el caso de las verrugas víricas, sólo el sexo demostró tener una influencia significativa sobre la aparición de verrugas (tabla 22). Según esto los hombres trasplantados tienen el doble de posibilidades de desarrollar verrugas que las mujeres trasplantadas.

Tabla 22: Análisis univariado de la relación entre el riesgo para desarrollar una verruga vírica y las diferentes covariables de la población estudiada.

COVARIABLES*	Riesgo relativo univariado	95% Intervalo de confianza	Valor P
Edad en el momento del trasplante	1,00	0,98-1,02	0,62
Sexo (varón es la referencia)	0,58	0,33-1,01	<0,05
Duración de la diálisis pre-trasplante	1,00	0,99-1,01	0,67
Exposición solar ocupacional (Baja exposición es la referencia)	1,08	0,66-1,77	0,73
Tipo de inmunosupresión			
Tipo A (referencia)	1		
Tipo B	0,94	0,55-1,58	0,81
Tipo C	0,48	0,20-1,16	0,10

*En los casos del fototipo cutáneo y la enfermedad renal no se obtuvo convergencia.

2. DETECCIÓN DEL VPH EN LAS LESIONES CUTÁNEAS DE LOS RTR

2.1. Prevalencia de la detección del VPH en las lesiones cutáneas de RTR

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 23. Como se muestra en esta tabla, sólo pudimos detectar el ADN del VPH en un 22% de las lesiones cutáneas estudiadas. La proporción de casos positivos fue similar en el grupo de los inmunocompetentes (28%) que en el de los RTRs (20%). En el grupo de las verrugas, sólo fueron positivas un 42% de las lesiones, siendo un poco más frecuente la detección del virus en las verrugas pertenecientes a inmunocompetentes. Si exceptuamos las verrugas, en el resto de lesiones sólo se halló positividad en un 3% (3/94) de las lesiones estudiadas.

TABLA 23: Prevalencia del ADN vírico detectada en lesiones cutáneas de pacientes trasplantados e inmunocompetentes.

	VERRUGAS	QD	CB	CE	TOTAL
RTRs	26/70 (37%)	2/30 (6%)	1/30 (3%)	0/11	29/141 (20%)
IC	12/20 (60%)	0/5	0/8	0/10	12/43 (28%)
TOTAL	38/90 (42%)	2/35 (5%)	1/38 (2.5%)	0/21	41/184 (22%)

2.2. Tipos de VPH detectados en las lesiones cutáneas de los RTRs.

Como se puede observar en la tabla 24, dónde se resumen los resultados obtenidos de la identificación de los tipos de VPH en las muestras positivas, en la mayoría de las lesiones se detectaron los tipos 1a, 2, 4 y 10. Como ya hemos comentado, la identificación de los tipos se realizó mediante la comparación de los fragmentos de

Figura 16 A: Los productos de la PCR se observaron tras la electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En las muestras positivas se pudo observar una banda de 450 pb, la banda de 1200 pb observada corresponde al control positivo. En los casos con mucha cantidad de VPH la banda de 1200pb puede desaparecer

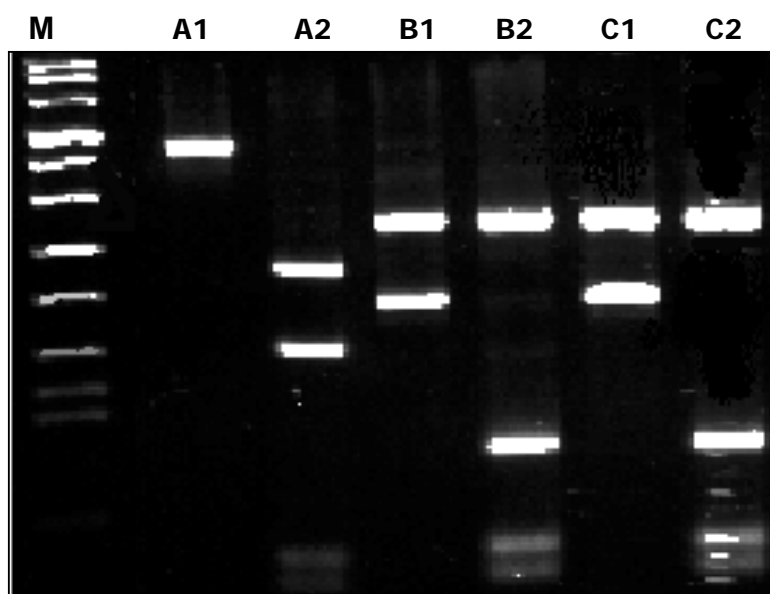


Figura 16 B: Imagen de los patrones de restricción obtenidos tras la digestión con los enzimas 1 y 2. En la columnas A1 y A2 se muestra el patrón de restricción obtenido tras la primera y segunda digestión. Como el patrón obtenido no tenía correspondencia con ninguno de los que conocíamos se decidió llamar a este patrón X1. En las columnas B (1 y 2) y C (1 y 2) se observó el mismo patrón al que se llamó X5.

Para poder considerar si estos tipos no identificados eran tipos nuevos, o bien, variaciones de otros ya conocidos se realizó la secuenciación de los fragmentos amplificados.

Tras estos resultados se realizó la secuenciación de los tipos de VPH con patrón de restricción no reconocido y se obtuvieron los resultados que a continuación relatamos. La secuencia obtenida para el patrón al que denominamos **X1** se correspondió con la secuencia del **VPH-57** (figura 17). En el caso de los patrones denominados **X2** y **X5**, a pesar de que sus patrones de restricción eran diferentes, la secuencia obtenida presentaba una elevada homología (>99,5%) con el **VPH 57b**. Los cambios observados en el patrón de restricción de estos casos se deben a que las secuencias presentaban diferencias puntuales localizadas en las zonas dianas de los enzimas, lo que hacía variar el patrón de restricción.

La secuencia del **X3** fue idéntica al **VPH-3**.

Al intentar amplificar el patrón denominado **X4**, obtuvimos muy poco material, con lo que no fue posible la secuenciación.

En resumen, en la mayoría de los casos secuenciados se obtuvieron tipos del VPH del grupo 57 (VPH-57 y dos variantes del VPH 57b). En la tabla 25 se describen las características clínicas de las lesiones dónde se hallaron los tipos de VPH del grupo 57 y de los pacientes a los que pertenecían.

Figura 17: Secuencia obtenida tras realizar la secuenciación de una de las dos cadenas de ADN del X1. Para asegurar que esta secuencia era absolutamente correcta se realizó la secuenciación de la cadena complementaria y se compararon ambas. Una vez que se confirmó la secuencia se remitió al banco de datos EMBL o Gen Bank donde se realizó la comparación con las secuencias víricas ya conocidas.

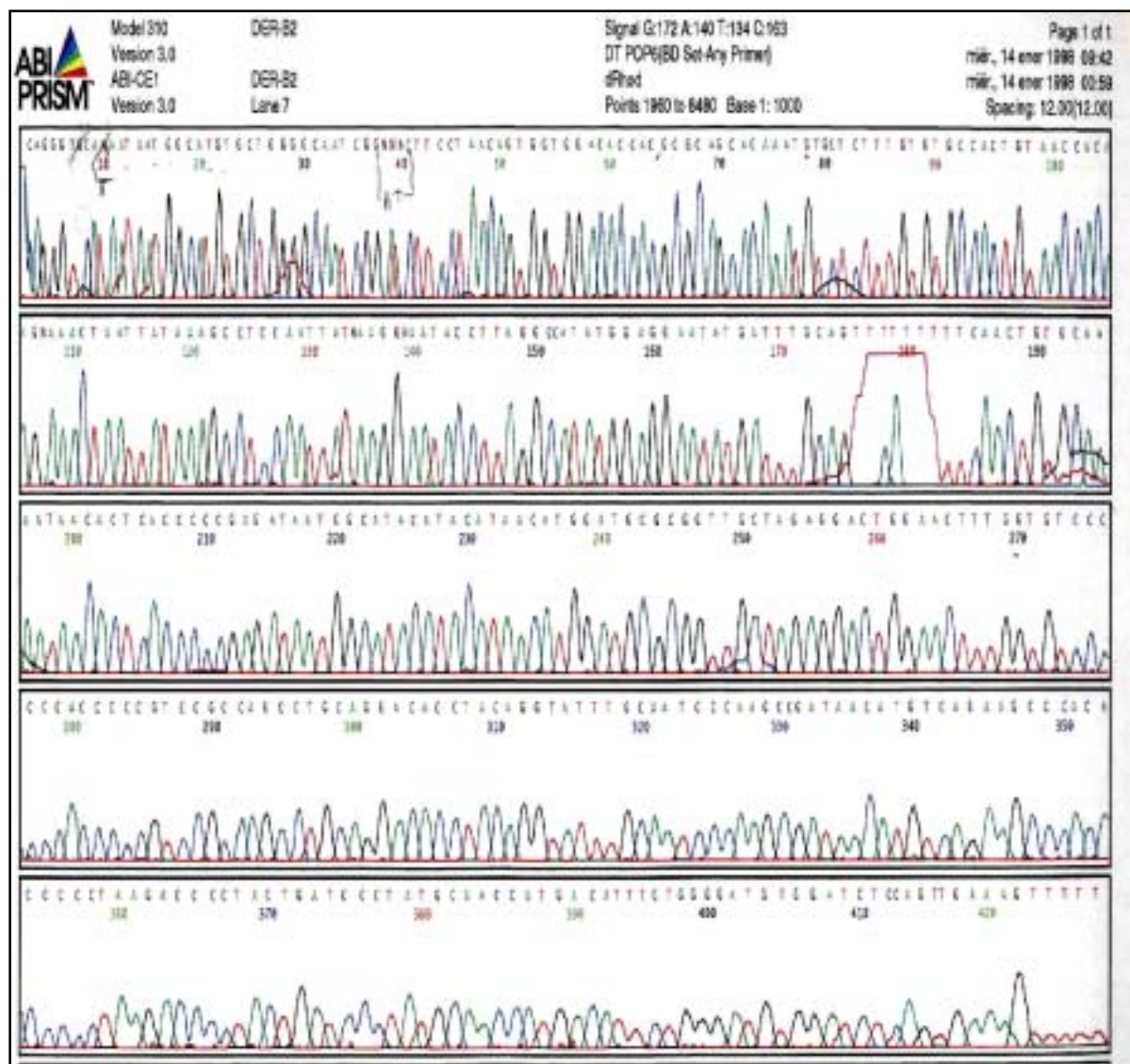


TABLA 25: Características de los pacientes y de las lesiones con detección de tipos de VPH del grupo 57.

	NÚMERO PACIENTE	INMUNO-SUPRESIÓN	NÚMERO LESION	LOCALIZACIÓN	TIPO DE LESION	OTRAS LESIONES
X1 (57)	1	SÍ	1	Mano	Verruga	SÍ (Verrugas)
			2	Mano	Verruga	
	2*	SÍ	3	Pierna	Verruga	SÍ (Verrugas)
	3	NO	4	Mano	Verruga	NO
	4	NO	5	Cara	Verruga	NO
X2 (57b)	5	SÍ	6	Cara	QD	SÍ (CE, CB)
	2*	SÍ	7	Pierna	Verruga	SÍ (Verrugas)
			8	Mano	Verruga	
			9	Mano	Verruga	
	6	SÍ	10	Pierna	Verruga	SÍ (QA,CB,CE)
	7	SÍ	11	Tronco	QD	SÍ (CB, CE)
X5 (57b)	8	NO	12	Cara	Verruga	NO
		NO	13	Cara	Verruga	

*en el mismo paciente se identificó VPH 57 y VPH 57b

3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA P53 EN LAS LESIONES CUTÁNEAS DE RTRs

Aunque la expresión inmunohistoquímica de la p53 fue más prevalente en los CCs y las QDs de los RTRs que en las lesiones equivalentes de inmunocompetentes, en el análisis estadístico la diferencia sólo fue significativa para las QDs (tabla 26). Es probable que en el caso de los CE la diferencia no llegue a ser significativa por el pequeño número de casos estudiados. La proporción de células positivas, si la expresamos de forma semicuantitativa, fue bastante similar para ambos grupos. En la imagen de la figura 18, correspondiente a un CE de un RTR, podemos observar un ejemplo de la positividad encontrada.

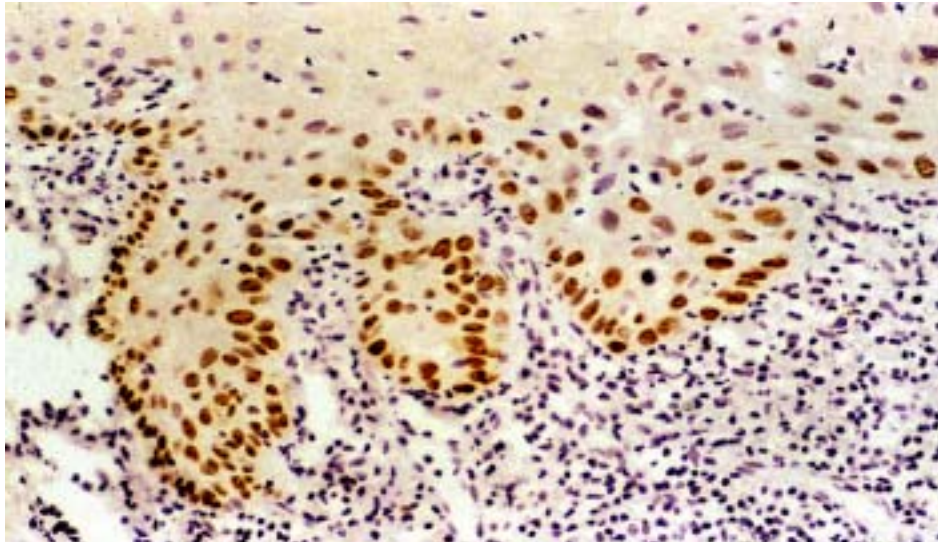
TABLA 26: Inmunoreactividad de la p53 en RTRs, así como, en lesiones equivalentes de individuos inmunocompetentes.

	RTRs		Ics		Valor P	Odds ratio (95% intervalo de confianza)
	NEGATIVO**	POSITIVO*	NEGATIVO**	POSITIVO*		
QD	4/22 (18%)	18/22 (82%)	6/10 (60%)	4/10 (40%)	0,03	6,75 (0,98-53,4)
CE	1/7 (15%)	6/7 (85%)	6/10 (60%)	4/10 (40%)	0,13	9,0 (0,55-30,0)
CB	10/18 (56%)	8/18 (44%)	7/10 (70%)	3/10 (30%)	0,68	1,87 (0,28-13,4)

* **Positivo:** > o = 5% de las células tumorales exhiben una inmunoreactividad nuclear positiva

** **Negativo:** menos del 5% de las células tienen inmunoreactividad nuclear positiva

Figura 18: imagen de la elevada positividad de una queratosis displásica de un RTR.



DISCUSIÓN

1 - ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE LOS CARCINOMAS CUTÁNEOS EN LOS TRASPLANTADOS RENALES Y DE SUS VARIABLES RELACIONADAS.

En las últimas décadas se han publicado numerosos estudios, la mayoría de ellos retrospectivos, donde se demuestra que los PROTs tienen una elevada incidencia de CCs (tabla 1). Sin embargo, hasta este momento no había ninguna referencia de estudios realizados en nuestra área y creemos que la extrapolación de los resultados obtenidos en dichos estudios a nuestra zona es compleja y probablemente errónea, dados los rasgos distintivos de nuestra población y la heterogeneidad de las diferentes metodologías estadísticas utilizadas.

Las principales diferencias, entre nuestra población y el resto de series publicadas, estriban en unas condiciones ambientales y unos rasgos raciales diferentes. Así, la gran mayoría de los estudios realizados se centran en áreas con latitudes más altas que las nuestras (Norte de Europa y Norte de América). Esta mayor latitud conlleva un número menor de horas de sol anuales y unas bajas temperaturas, lo que no propicia que la población realice actividades al aire libre y, sin duda, se refleja en una menor exposición solar. No obstante, existe algún trabajo realizado en Australia, un país con una latitud similar a la nuestra, pero dado que su población presenta unas características de pigmentación diferente, es factible que la incidencia de CCs en estos individuos también pueda ser distinta.

Por otra parte, la comparación de los resultados de las diferentes series es difícil, ya que tanto el modo de seguimiento de los pacientes como los métodos utilizados para los cálculos estadísticos no son uniformes. Al punto que la mayor parte de los estudios realizados son retrospectivos y los datos están extraídos de registros de tumores que, en muchos casos, son incompletos o sólo son contabilizados los CEs. Lógicamente, al ignorarse la presencia del CB en estas series, los datos de incidencia de los CCs serán mucho menores. Respecto a la metodología estadística empleada, llama la atención la gran diversidad de métodos estadísticos utilizados para expresar la incidencia o riesgo de CCs en estos pacientes, algunos de ellos de cuestionable validez como el llamado "período-prevalencia".

Por estos motivos creímos pertinente la realización del presente estudio, objeto de esta Tesis Doctoral, que ha sido realizado de forma prospectiva y pretende documentar la incidencia de los CCs en los pacientes receptores de un trasplante renal en nuestra área e investigar los posibles factores de riesgo asociados.

El aspecto más destacable de los resultados obtenidos es la elevada y preocupante incidencia de CCs observada en nuestros pacientes. Este resultado ya había sido intuido en nuestro primer estudio, limitado a la etapa precoz post-transplante, donde pudimos observar una aparición precoz de los CCs con una incidencia acumulada del 18% a los tres años (Ferrándiz C y cols., 1995). En el actual trabajo, se amplió el tiempo de seguimiento y el número de pacientes y, pudimos confirmar que esta

elevada incidencia de CCs sigue creciendo de forma lineal hasta el final del estudio (figura 9). Así, a los 3 años post-trasplante la incidencia acumulada fue del 13%, a los 6 años se multiplicó por dos (27,5%), y a los 10 años casi la mitad de los trasplantados seguidos (48%) habían desarrollado algún CC. Además, muchos de estos pacientes (58%) desarrollaron, posteriormente, otros CCs.

Si estos datos los contrastamos con las cifras de incidencia de otros estudios realizados con una metodología estadística similar, nuestros resultados tan sólo son comparables a los observados en Australia, donde se calculó una incidencia acumulada del 45% a los 11 años (Bouwes Bavinck JN y cols., 1996), y difieren ampliamente con los publicados en otros países menos cálidos. Entre estos últimos es interesante mencionar que en Holanda se obtuvo una la incidencia de solo un 10% a los 10 años del trasplante (Hartevelt MM y cols., 1990); en Reino Unido se han referido incidencias para este período de seguimiento que han oscilado entre el 6,7% (Gaya SBM y cols., 1995) y el 16% (Weeb M y cols., 1997), mientras que los datos de incidencia obtenidos en Alemania e Italia fueron de un 4,8% y 9,7% respectivamente (Behrend M y cols., 1997, Naldi L y cols., 2000). La baja incidencia observada en países como Italia es sorprendente ya que su latitud se puede considerar similar a la nuestra. Creemos que la diferencia puede estribar en que dicho estudio es retrospectivo y basado en los datos de un registro de tumores, que puede no ser completo y que, además, la edad media de la población de trasplantados italianos fue bastante más baja que la de nuestros pacientes (37 años vs. 45 años). Esta diferencia de edad puede ser fundamental para valorar los

resultados ya que, como comentaremos más adelante, la edad en el momento del trasplante ha demostrado ser uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de un CC. En este sentido, nosotros hemos calculado que por cada año de aumento en la edad del paciente en el momento de recibir el trasplante el riesgo de desarrollar un CCs se multiplica por 1,06 (casi el doble en 10 años), como ya será comentado posteriormente.

Tras estos resultados hemos intentado investigar los factores que han determinado la incidencia de CCs en nuestro grupo.

En primer lugar, pensamos que el hecho de que nuestro estudio sea prospectivo, con un seguimiento semestral de los pacientes, ha influido en que todas las lesiones hayan sido detectadas y registradas de forma precoz, haciendo difícil que algún CC haya escapado a la detección. Sin duda es muy probable que en otros trabajos realizados de forma retrospectiva, sobre bases de datos de registros de tumores, algunos carcinomas no se hayan registrado, o bien, lo hayan hecho más tarde, cuando ya llevaban un periodo de evolución largo.

Por otra parte, las únicas variables que han demostrado tener una influencia significativa en el desarrollo de CCs han sido la edad en el momento del trasplante y la exposición solar ocupacional. Es posible que estos factores hayan sido fundamentales a la hora de condicionar esta alta incidencia, ya que la edad media del grupo estudiado es

mayor a la de otras series (tabla 1) y, además, se puede considerar, como ya concretaremos más adelante, que los individuos estudiados poseen una elevada exposición solar total (tanto recreacional como ocupacional).

Respecto a la edad, según nuestros resultados calculamos que cada 10 años que aumenta la edad en el momento del trasplante, el riesgo de padecer un CC casi se duplica (riesgo relativo / año =1,06 y a los 10 años $1,06^{10}=1,8$). Otros autores como Webb (Webb M y cols., 1997), también destacan la importancia de esta variable, calculando que la mitad de los pacientes que habían recibido un trasplante renal a partir de los 60 años desarrollaban al menos un CC en los primeros 12 años tras el trasplante, mientras que sólo un 6% de los pacientes que habían recibido el trasplante entre los 18 y 40 años desarrollaban un CC.

Es un hecho conocido que la exposición a la RUV es el factor riesgo más importante para el CC en la población general. Como ya fue comentado en la introducción, el papel que juega la RUV en la carcinogénesis cutánea de la población general es complejo (Grossman D y Leffel DJ., 1997). Por una parte actúa como iniciadora del proceso oncogénico, al inducir mutaciones genéticas que inactivan a la proteína p53, lo que provoca un crecimiento celular descontrolado y, por otra parte, como promotora ya que la inmunodepresión local que produce permite la progresión del tumor originado.

Nuestros resultados apoyan que la exposición solar también parece ser fundamental en el desarrollo del cáncer cutáneo en el RTR. Dadas la características de nuestra

población, hemos considerado que la exposición solar recreacional puede ser considerada elevada para todos los pacientes y, buscando algún factor diferencial dentro de esta variable, hemos considerado la exposición solar ocupacional como rasgo diferencial dentro del grupo estudiado (Boyle J y cols., 1984 y Shuttleworth D y cols., 1989). Así, hemos podido comprobar que los RTRs con una elevada exposición solar ocupacional tienen hasta 5 veces más riesgo de CCs que los que tienen una baja exposición solar ocupacional (tabla 18) y, hemos calculado que la incidencia acumulada en los RTRs con una elevada exposición solar ocupacional asciende a un 85,3%, mientras que en los RTRs de baja exposición ésta sólo llega a un 22% (figura 15). Por otro lado, la gran mayoría de tumores (88%) aparecen en las zonas expuestas a la RUV y, además, en un porcentaje importante de las lesiones malignas y premalignas de RTRs se han detectado alteraciones en la expresión de la p53 sugestivas de ser provocadas por la RUV (tabla 26). Todo ello nos confirma que la RUV puede ser uno de los principales responsables, o quizás el factor más importante, en la oncogénesis cutánea de los PROTs y justificaría, al menos en parte, las diferencias existentes entre las elevadas cifras de incidencia observadas en los países con latitudes bajas y las más moderadas de los países con latitudes altas.

Sin embargo, los mecanismos patogénicos por los que la RUV incide en la oncogénesis cutánea de los PROTs no están aún aclarados. Se ha sugerido que en los PROTs los efectos carcinogénicos de la RUV están amplificados debido a la inmunosupresión general provocada de forma iatrógena. Sin embargo, en algunos estudios recientes, se

apunta a la colaboración de otros factores como es la infección por el VPH, de forma similar a lo que ocurre en la EV, enfermedad con unas condiciones clínicas similares a la de los PROTs. En concreto, se ha sugerido que algunas proteínas víricas (E6) pueden tener la capacidad de inhibir la apoptosis inducida por la RUV mediante un mecanismo p53-independiente (Jackson S y Storey A., 2000) y, por otra parte, también se ha apuntado que la RUV puede actuar sobre una región reguladora de algunos tipos de VPH a través de un mecanismo dependiente de la p53 (Purdie KJ y cols., 1999).

Desde los primeros artículos, donde se observó el aumento de incidencia de CCs en los PROTs, se planteó si el agente inmunodepresor podría ser el responsable de la aparición de los CCs en los trasplantados. Estos fármacos generan en el paciente un estado de inmunosupresión crónico que condiciona una situación clínica donde la vigilancia inmunológica y los mecanismos para erradicar las lesiones precancerosas están dañados y, además, a algunos inmunosupresores se les había atribuido la capacidad de provocar mutaciones genéticas que pudieran evolucionar a un carcinoma (Berg D y Otley C., 2002). Brevemente, si recopilamos sobre los estudios realizados, observamos que en las primeras series se atribuía a la azatioprina y a sus metabolitos una capacidad mutagénica que favorecía la aparición de los CCs (Lennard L y cols., 1985). Con la introducción de la ciclosporina, en los regímenes de inmunosupresión, se observó que la incidencia de los CCs en los PROTs no disminuía (Bunney MH y cols., 1990) y, en los últimos años, con la introducción de otros nuevos inmunosupresores como el tacrolimus, de momento, no se han encontrado diferencias significativas respecto a las pautas

anteriores (Berg D y Otley C., 2002).

En nuestro estudio no hemos observado diferencias entre las diferentes pautas de inmunosupresión usadas, lo que coincide con otros autores como Bouwes Bavinck y Naldi (Bouwes Bavinck JN y cols., 1996 y Naldi L y cols., 2000) que apuntan que el riesgo de CCs no se ve influido por el fármaco utilizado, sino por la intensidad y el tiempo de inmunosupresión. En esta misma dirección también podemos incluir los resultados de los estudios de Jensen (Jensen y cols., 1999) y Dantal (Dantal J y cols., 1998). Concretamente, Jensen compara dos grupos de pacientes, unos tomaban dos fármacos inmunosupresores (corticoides + ciclosporina ó corticoides + azatioprina) y otro con tres (corticoides + ciclosporina + azatioprina), demostrando que los pacientes que recibían tres fármacos tenían un riesgo mayor, independientemente de la pauta usada y, en otro estudio, Dantal compara dos grupos de pacientes, uno con dosis altas y otro con dosis bajas de ciclosporina, señalando que la incidencia de CCs fue proporcional a la dosis del fármaco utilizada. De todas formas, es difícil establecer una valoración de la influencia del tipo de terapia inmunosupresora, ya que existen factores individuales que condicionan que una misma dosis del fármaco inmunosupresor pueda originar diferentes grados de inmunodepresión según el individuo.

La duración de la diálisis previa al trasplante y el sexo del paciente, no han mostrado asociación estadística con el riesgo de desarrollar un CC. Sin embargo, al analizar por separado el CE, sí se ha manifestado una asociación estadística entre el sexo masculino

y un mayor riesgo para desarrollar este tipo de cáncer. Para algunos autores la mayor predisposición del hombre a padecer un CE podría deberse a que los estrógenos femeninos ejercen una función protectora al estimular la producción de melanina (McLeod SD y cols., 1994), pero es posible que el más frecuente desarrollo de actividades al aire libre en la población masculina haya contribuido.

Un aspecto que creemos merece consideración es la ratio CB/CE obtenida en el grupo analizado. En España no existen estudios epidemiológicos que valoren la incidencia del CB y CE en la población general, por lo que hemos tomado como referencia los datos de otros autores que cifran esta proporción en 4/1 (Silverberg E y Lubera J.,1986). En la mayoría de estudios a largo plazo, se detecta una inversión en el cociente CB/CE en pacientes trasplantados respecto al de la población general (tabla 1) (Hartevelt M y cols., 1990; Hardie IR y cols 1980; Gupta y cols., 1986). En nuestro primer estudio, centrado en los tres primeros años tras el trasplante, habíamos detectado un cociente bastante similar al de la población general (3,1/1) (Ferrándiz C y cols., 1995). En los primeros años del presente estudio, la tendencia ha sido similar a la anterior, sin embargo el incremento más rápido en la incidencia del CE, a partir de los 5 años tras el trasplante, ha comportado que al final del estudio la ratio CB/CE haya sido menos favorable al CB (1,4/1), aunque no se ha llegado a invertir. Al analizar por separado el comportamiento de cada tumor, hemos observado que el tiempo de latencia medio de aparición del primer CB ha sido casi un año menor al del primer CE y, que al realizar las curvas de incidencia acumulada en ambos tumores (figura 12), en el caso del CB el

crecimiento es más rápido en los primeros años siguiendo posteriormente con una progresión lineal, mientras que la incidencia de CE en los primeros años es más baja y a continuación sigue una tendencia exponencial, tal y como había sido sugerido por Webb (Webb M y cols., 1997). Esto hace que, si se mantienen estas tendencias, es de esperar que en los próximos años los CE superen en número a los CB, invirtiéndose definitivamente el cociente entre ambos y llegando a resultados similares a los de otros estudios con tiempos de seguimiento más prolongados (Hartevelt M y cols., 1990; Hardie IR y cols 1980; Gupta y cols., 1986). La explicación a este fenómeno es difícil, pero podemos especular que podría estar en relación con el tiempo de inmunosupresión necesario para desarrollar cada tipo de tumor, aunque también pueden contribuir otros factores que a continuación comentaremos.

Es interesante reseñar que Naldi en Italia, otro país del área mediterránea, publicó una ratio CB/CE similar a la nuestra (Naldi L y cols., 2000). Esto nos lleva a plantearnos si otros factores como el patrimonio genético de nuestra población, los hábitos de exposición solar y el fototipo, bastante similares en ambos países, pueden haber influido en el desarrollo de los diferentes tipos de carcinomas. Otra posible explicación podría hallarse en el diseño de nuestro estudio, realizado de forma prospectiva y con un estrecho seguimiento de los pacientes. Lógicamente esto conlleva que las QDs detectadas fueron tratadas de forma precoz evitando de esta manera su posible progresión a CEs. Las observaciones de algunos autores como Ramsay que encuentran una asociación entre el número de QDs de sus pacientes y la aparición posterior de CE

apoyarían a esta hipótesis (Ramsay HM y cols., 2000). Por otro lado, en algunos estudios se extraen los datos de registros de tumores, donde frecuentemente el CB no se refleja de forma constante, lo que también podría ayudar a explicar las diferencias de nuestro estudio respecto a otros. Por último, también cabe la posibilidad de que la proporción CB/CE en nuestra población sea mayor de la que se ha tomado como referencia y, por dicho motivo, sea más difícil la inversión de dicho cociente.

En otro ámbito, merece la pena ser subrayada la total ausencia de complicaciones secundarias a los tumores aparecidos en nuestros pacientes. Numerosos estudios refieren que los CCs de los PROTs tienen un curso más agresivo, crecen más rápido y con frecuencia recidivan localmente tras su exéresis, pudiendo llegar a provocar metástasis a distancia con cierta frecuencia (Ong CS y cols., 1999). Así, en algunas series largas se ha determinado que entre un 8-11,7% de los pacientes con CEs desarrollaban metástasis, y que hasta un 3% de estos pacientes morían a consecuencia de ellas (Barret WL y cols, 1993). La explicación a nuestros resultados creemos que podría radicar en las características de este estudio, realizado de forma prospectiva, con una cercana supervisión de nuestros pacientes (revisiones semestrales, e incluso en los pacientes con tumores múltiples, estas revisiones se realizaron cada 2-4 meses) lo que ha permitido detectar los tumores en fases muy iniciales, reduciendo de este modo, las posibles complicaciones. Solo un paciente desarrolló metástasis de un CE aparecido a los 12 años del trasplante, cuando el estudio ya había sido cerrado.

En este punto creemos que es necesario subrayar la importancia de la práctica de las revisiones periódicas por el dermatólogo. La realización de la visita periódica al paciente trasplantado ejerce una función múltiple. En primer lugar, sirven para concienciar y educar al paciente, frecuentemente más preocupado por otras posibles complicaciones de su enfermedad, sobre el riesgo y la importancia de la aparición de un CC y la posibilidad de disminuir este riesgo mediante la utilización de medidas de protección contra la radiación solar. Desde el punto de vista de la prevención, debemos tener en cuenta que el principal factor etiológico y sobre el que más podemos actuar es la exposición solar. Algunos estudios han demostrado que la mayoría de los trasplantados desconocen el peligro de la exposición solar o no saben como protegerse (Seukeran DC y cols., 1998). En los manuales de consejos editados para los PROTs por asociaciones de enfermos trasplantados e, incluso, en los publicados por la Organización Nacional de Trasplantes, no existe ninguna referencia al riesgo de CC ni a las medidas de protección solar que se pueden realizar para prevenirlo (<http://www.donacion.organos.ua.es/ont/index.html>). Esto apoya la necesidad de la realización de una concienciación del colectivo de PROTs mediante la promoción de campañas de educación del paciente trasplantado en las medidas de protección solar y en el uso de cremas fotoprotectoras. Esta formación debería iniciarse ya en el período pre-trasplante y recordarse durante las visitas periódicas posteriores.

En estas visitas, además de informar al paciente sobre las medidas de protección solar, se le debe aleccionar sobre la realización de la autoexploración de su piel y animarlo a

que consulte ante cualquier lesión sospechosa de reciente aparición, dada la mejora significativa en el pronóstico que condiciona el diagnóstico precoz. Con todo, dado que, frecuentemente, en los inmunodeprimidos las manifestaciones clínicas de las lesiones cutáneas son atípicas, es importante la valoración por el dermatólogo que tiene la posibilidad de detectar de forma precoz una lesión maligna o premaligna que podría haber pasado desapercibida, o bien, minusvalorada o desdeñada por el paciente, e incluso, por un facultativo no especialista en Dermatología.

En estas revisiones se recomienda explorar todo el tegumento cutáneo, incluidos los genitales, porque a pesar de que la gran mayoría de las lesiones se localizan en las áreas expuestas, es frecuente que el paciente ignore la presencia de algunas lesiones en las zonas no expuestas (Ramsay HM y cols., 2000). Por otra parte, teniendo en cuenta que el riesgo de CCs aumenta con el tiempo de inmunodepresión es recomendable que estas revisiones se realicen durante todo el tiempo post-trasplante (Lindelöf B y cols., 2000).

Hasta ahora no ha sido fijada la frecuencia con que deberían realizarse estos controles. Nosotros, sobre la base de todas las consideraciones anteriores y dado que los principales factores de riesgo demostrado son la edad en el momento del trasplante renal y la elevada exposición solar ocupacional, proponemos unas pautas de visitas diseñadas según estas dos variables (tabla 27).

Tabla 27: Calendario de seguimiento dermatológico propuesto para los RTRs según sus factores de riesgo.

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE			FRECUENCIA REVISIONES
EDAD	EXPOSICIÓN SOLAR OCUPACIONAL ALTA	ANTECEDENTES DE CC	
<40	-	-	Anual
<40	+	-	6 meses
<40	+/-	+	2-4-6 meses*
40-60	-	-	6 meses
40-60	+	-	4-6 meses
40-60	+/-	+	2-4-6 meses*
>60	+/-	-	4-6 meses
>60	+/-	+	2-4-6 meses*

* dependiendo del número de tumores desarrollados

2. INFECCIÓN POR EL VPH EN LOS RECEPTORES DE UN TRASPLANTE RENAL

Como hemos podido comprobar en nuestro estudio, los pacientes RTRs presentan, por un lado, una elevada incidencia de CCs y, por otro, una elevada incidencia de verrugas víricas. Si bien estos dos eventos podrían deberse a la inmunodepresión crónica a la que estos pacientes están sometidos, algunas observaciones han sugerido la existencia de una relación etiológica entre ambos procesos, apoyando la teoría de que la infección por el VPH podría ser la causante, o bien, uno de los cofactores implicados en el desarrollo de CCs de los PROT. Las hipótesis o teorías que han relacionado al VPH con el desarrollo de los CCs en el PROT se basan en hallazgos clínicos o biológicos, como son la frecuente coexistencia de ambos procesos en un mismo paciente, la evidencia de signos histológicos de infección viral en algunos carcinomas y, por último, la detección de secuencias de ADN de algunos de los tipos del VPH en los CC. Los tipos de VPH que han sido detectados con una mayor frecuencia en los PROTs son los tipos relacionados con la EV, una situación clínica bastante semejante a la del trasplantado (De Jong-Tieben LM y cols., 1995).

En nuestro estudio hemos investigado la presencia del VPH en las lesiones de los RTRs desde varias perspectivas. En primer lugar, desde el punto de vista clínico hemos analizado la incidencia de verrugas víricas, sus características clínicas y los factores de riesgo para su desarrollo. Por otro lado, mediante estudios de biología molecular hemos intentado detectar la presencia del VPH e identificar a los posibles tipos responsables de

la infección en las verrugas víricas, en los CCs y en las QDs de los RTRs comparándola con lesiones similares de inmunocompetentes. Y por último, conociendo que algunas proteínas víricas (E6) de algunos tipos de VPH son capaces de acelerar el metabolismo de la proteína supresora tumoral p53, hemos estudiado la expresión inmunohistoquímica de dicha proteína en las lesiones de RTRs y de inmunocompetentes.

De los resultados obtenidos, cabe destacar que la frecuencia de verrugas víricas en nuestros pacientes fue elevada (incidencia acumulada a los 10 años 62%). Es interesante comentar que la curva de incidencia refleja un rápido crecimiento en los primeros años tras el trasplante y posteriormente se aplana (figura 14). Se podría especular que este fenómeno puede ser debido a que en los pacientes trasplantados que adquieren o presentan una infección latente por el VPH durante su período de diálisis, al iniciar la inmunosupresión se establece una situación de tolerancia que favorece el rápido crecimiento de la lesión. En este sentido, algunos autores habían relacionado el tiempo de diálisis previo al trasplante con la aparición de verrugas, considerando que hay un cierto grado de inmunosupresión durante este período a lo que hay que añadir el elevado grado de instrumentalización del paciente que podría favorecer el contagio del virus.

De todos los factores de riesgo estudiados, sólo el sexo masculino ha demostrado estar relacionado con la incidencia de verrugas. A pesar de que la mayoría de verrugas

se localizaron en zonas expuestas no fue posible demostrar una asociación estadística con la exposición solar ocupacional.

Es difícil valorar el significado de la asociación epidemiológica existente entre la presencia de verrugas víricas y el ulterior desarrollo de CCs. En nuestros pacientes hubo una mayor prevalencia de verrugas en el grupo con CCs, sin embargo esto no puede considerarse suficiente como para atribuir una relación etiológica entre ambos procesos. Para ello sería necesario demostrar que la infección por el VPH era previa al desarrollo del CC, como ocurre en la EV y, además, aclarar los mecanismos moleculares mediante los cuales los tipos cutáneos del VPH son capaces de provocar la degeneración neoplásica, tal y como se ha demostrado en los carcinomas de mucosas. La simple asociación epidemiológica de ambos procesos podría explicarse, sencillamente, porque estos pacientes podrían tener un mayor grado de inmunodepresión que favoreciera la aparición de ambas complicaciones.

Nuestro siguiente objetivo fue detectar el VPH e identificar los tipos de VPH presentes en las lesiones cutáneas de los RTRs y comparar los resultados obtenidos con una muestra de lesiones similares de individuos inmunocompetentes. Sin embargo los resultados obtenidos fueron bastante insatisfactorios. En el caso de las verrugas víricas, tanto de inmunocompetentes como de RTRs, donde era esperable un elevado grado de positividad, hemos encontrado la presencia del VPH en sólo un 42% de las lesiones analizadas. Si comparamos estos resultados con los de otros estudios realizados con

técnicas similares observamos que el número de positividades es muy inferior a lo publicado (Rübber A y cols., 1993).

Los resultados de los estudios de biología molecular que han intentado la demostración del ADN del VPH en los CCs de los PROTs han sido muy dispares y, a veces, contradictorios (tablas 6 a 10). Sin embargo, a grandes rasgos se puede decir que en los últimos años, la mayoría de estudios describen una positividad del VPH en los CCs que oscila entre un 60-90% de los casos, aunque los tipos encontrados son muy heterogéneos. En nuestro estudio no hemos conseguido detectar una presencia significativa del VPH en las lesiones malignas y premalignas analizadas. A pesar de que estos resultados están en consonancia con lo ya observado por algunos autores (Smith SA y cols., 1991 y McGregor JN y cols., 1994), la baja sensibilidad de la técnica empleada no nos permite realizar conclusiones definitivas.

Al analizar nuestros resultados, creemos que la baja sensibilidad de la técnica que hemos utilizado es el fruto de varios factores. En primer lugar, el diseño del primer probablemente era demasiado grande para detectar ADN en tejido parafinado y, además, al intentar abarcar un rango amplio de tipos de VPH se introdujeron bases degeneradas que aumentaban las posibilidades de complementariedad pero disminuyendo de forma proporcional la afinidad (Greer CE y cols., 1991). Es por ello que en los últimos estudios, se recomienda la utilización de una batería de primers (hasta 16 diferentes) donde cada par cubrirá unos grupos de tipos de VPH (Harwood

CA y cols., 1998). Otro factor probablemente implicado fue el tiempo de almacenaje de las muestras, ya que las biopsias de las lesiones de trasplantados se habían recogido a lo largo de todo el estudio, por lo que, lógicamente, en el momento de realizar la detección del VPH las primeras muestras ya llevaban un tiempo almacenadas, mientras que las biopsias de los inmunocompetentes se recogieron todas al final y, al parecer, la sensibilidad de las técnicas de PCR se puede ver afectada por el tiempo de almacenaje de los tejidos en parafina (Greer CE y cols., 1991). Esto podría explicar la mayor positividad detectada en las verrugas de inmunocompetentes respecto a las de RTRs.

En estos momentos, estas muestras están siendo analizadas de nuevo mediante otra técnica de PCR, con unos nuevos *primers* diseñados para los grupos A y B del VPH. Se utiliza una PCR con una combinación de 9 *primers* diferentes. Los *primers* (biotinados) se dirigen a una región corta del ADN (72 pb) de L1 que permite, a pesar de su tamaño, el diseño de sondas tipo-específicas para su identificación posterior mediante hibridación (Reverse Line Blotting). La detección de los casos positivos se realiza con enzimoimmunoensayo (ELISA) con sondas genéricas marcadas con digoxigenina, lo que aumenta de forma sustancial la sensibilidad. La optimización de esta nueva técnica se efectuó con plámidos pHPV 5, 8, 21, 50 y se ha demostrado una sensibilidad de 10 fg que corresponde a 1000 copias de VPH. Con esta nueva técnica estamos obteniendo unos esperanzadores resultados preliminares, ya que de momento el 76% de las lesiones testadas (lesiones malignas y premalignas) son

positivas para los grupos estudiados.

Por otro lado, señalar que en las muestras positivas nos sorprendió que junto a tipos del VPH ya conocidos se detectaron otros tipos de VPH con patrones no definidos. Estos casos fueron más frecuentes en los trasplantados, lo que nos hizo especular sobre la posibilidad de la existencia de nuevos tipos o subtipos de VPH con elevada afinidad por los pacientes inmunodeprimidos. Tras la secuenciación del ADN amplificado en estos casos, pudimos comprobar que estos tipos se correspondían, en su mayoría, con el VPH-57 y sus variantes. El VPH-57 estaba, clásicamente, considerado como un tipo asociado a la infección en las mucosas, sin embargo algunos estudios recientes (Rübber A y cols., 1993, Chan SY y cols., 1997 y de Villiers EM y cols., 1997) apuntan a la posibilidad de que también pueda provocar infecciones cutáneas, incluso de forma bastante frecuente, lo que concuerda con lo que nosotros hemos observado. La observación de estos tipos en las lesiones de nuestros pacientes, tanto RTRs como de inmunocompetentes, refuerza la idea de que las infecciones por estos tipos son más frecuentes de lo referido en la literatura. Los tipos 2, 27 y 57 pertenecen a un mismo grupo, existiendo una elevada homología (81%) entre los tipos 57 y 2. Esto hace probable que en los primeros estudios epidemiológicos del VPH, realizados mediante técnicas de hibridación, algunas infecciones provocadas por el VPH-57 fueran atribuidas con anterioridad al VPH-2. Por último, creemos interesante comentar que no hemos detectado tipos relacionados con la EV ni mucosostropos ni lesiones con infección por múltiples tipos de

VPH, a diferencia de otros autores. No sabemos si esto puede ser debido a problemas en nuestra técnica, o bien a diferencias en la distribución geográfica de los tipos de VPH.

En síntesis, por el momento no se conoce el papel exacto que juega el VPH en el desarrollo de CCs de inmunodeprimidos. En las lesiones de estos pacientes han sido detectados un amplio espectro de tipos de VPH (epidermotropos y mucosotropos) con una mayor o menor prevalencia dependiendo de las técnicas usadas, pero también se ha detectado el virus en la piel normal (Boxman ILA y cols., 2000, Antonsson A y cols., 2000). Si realmente el VPH está involucrado en el desarrollo de CCs de estos pacientes seguramente actúa a través de mecanismos oncogénicos distintos a los tipos de VPH que causan el cáncer cervical. Estudios recientes sugieren que interviene interaccionando en los procesos de proliferación y diferenciación de los queratinocitos, así como, alterando el control de la apoptosis (Jackson S y Storey A., 2002, Boxman ILA y cols., 2001). A pesar de que varios grupos están trabajando en este campo, quedan muchas incógnitas sobre la posible participación de este virus en la carcinogénesis cutánea y sobre los mecanismo involucrados que, probablemente, son diversos y complejos (Leigh IM y cols., 1999, Harwood CA y cols., 1999 y 2002).

3.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA P53 EN LAS LESIONES CUTÁNEAS DE RTRs

Las mutaciones en el gen p53 se han asociado a un gran número de cánceres humanos, entre los que se encuentran los carcinomas cutáneos (Basset-Séguin N y cols., 1994). Estas mutaciones, en muchos casos, se traducen en la producción de una proteína con una vida media mayor que la proteína natural pero sin capacidad para su función como supresora tumoral. Este aumento de vida media nos permite su detección por medio de técnicas de inmunohistoquímica. Y a pesar de que existen otras situaciones, aparte de las mutaciones, que pueden dar lugar a una sobreexpresión de la proteína se considera que existe una importante correlación entre el grado de expresión de la proteína y la presencia de mutaciones determinadas por secuenciación y otros métodos (Gannon JV y cols., 1990).

Desde este punto de vista, numerosos autores han estudiado la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en los CCs de la población normal (Gusterson BA y cols., 1991, McGregor JM y cols., 1992, Ro YS y cols., 1992) y de algunos grupos de pacientes con un mayor riesgo para desarrollar CC, como son los PROTs (Khorshid SM y cols., 1996 ; McGregor JM y cols., 1994, Stark LA y cols., 1994; Gibson GE y cols., 1997). Los resultados de unos y otros se han de evaluar y comparar con cautela ya que varían según las series, las técnicas empleadas y los anticuerpos usados.

Al contrario de lo descrito por otros autores (tabla 11), en nuestro estudio hemos observado que existe una mayor expresión de la p53 en las muestras de RTRs respecto a las de inmunocompetentes, aunque sólo en las lesiones premalignas esta diferencia alcanza un grado estadísticamente significativo (tabla 26). Este último punto nos parece interesante, ya que si en las lesiones premalignas de RTRs hay una mayor expresión de la p53, aceptando que la alteración funcional de dicha proteína representa un paso importante en la progresión maligna, esto indicaría una progresión más fácil de las lesiones premalignas a malignas en los RTRs que en los inmunocompetentes, lo que podría ser una de las explicaciones a la elevada incidencia de CCs presente en estos pacientes.

La elevada expresión de la proteína en los CE de los RTRs es bastante similar a lo referido por otros autores como Stark (Stark LA y cols., 1994) y Gibson (Gibson GE y cols., 1997) y diferente a los resultados de Khorshid, que sólo encuentra positivos en el 21% de los CEs de trasplantados (Khorshid SM y cols., 1996). La explicación a las diferencias observadas con este autor podría estribar en el tiempo de evolución de las lesiones analizadas. Dado el diseño de nuestro estudio, las lesiones eran de corta evolución clínica, menos de 6 meses, mientras que Khorshid utilizaba tejidos de pacientes con más de 3 años tras el trasplante. (Khorshid SM y cols., 1996). Se ha observado que en los CEs la expresión inmunohistoquímica es mucho más elevada en las zonas de displasia epidérmica superficial y en las zonas no invasivas, pero esta expresión se pierde en las zonas donde el CE se vuelve invasivo. Este evento puede ser

secundario a que en las zonas más agresivas de los carcinomas se producen deleciones cromosómicas, que pueden afectar al brazo 17p, aboliéndose por completo la expresión del gen p53.

Tanto Gibson (Gibson GE y cols., 1997) como nosotros, coincidimos en la observación de una mayor expresión de la p53 en las lesiones premalignas de RTRs que en las malignas. Aunque esto se podría explicar por el mecanismo anteriormente mencionado, creemos que la observación de una sobreexpresión de la p53 en las etapas precoces de la carcinogénesis, es decir, en las lesiones premalignas, podría sugerir que el defecto en el papel de la p53 actuaría sobre las etapas más tempranas de la carcinogénesis más que en la progresión tumoral. Por otro lado, la observación de una mayor expresión detectada en zonas de epidermis perilesional, con aspecto totalmente normal (Gibson GE y cols., 1997), podría también indicar que se trata de una respuesta biológica normal de la proteína natural, que se acumula en mayor grado en respuesta al elevado grado de errores en el ADN, probablemente inducida por la RUV.

En otro ámbito, hay autores que han implicado al VPH en el desarrollo de los CCs de los PROTs (Wang XW y Harris CC.,1997 y Barr BB y cols 1989) y se ha demostrado que algunos serotipos de este virus, concretamente el VPH-16, tienen una capacidad oncogénica mediada por la proteína E6 que interacciona con la p53. Esta unión provoca la rápida degradación de la proteína, lo que hace que en los carcinomas derivados de la infección por este virus la proteína sea prácticamente indetectable mediante las técnicas

de inmunohistoquímica. Como ya ha sido comentado en el apartado anterior, no hemos sido capaces de detectar ADN del VPH en los tumores de los RTRs. Por otra parte, hemos observado una sobreexpresión de la p53 en los CCs de RTRs, lo que parece oponerse a las teorías que relacionaban a este virus con la carcinogénesis cutánea. Aunque la baja sensibilidad de la técnica de detección del VPH no nos permite descartar la presencia del virus, en el caso de que este estuviera presente, el mecanismo oncogénico parece diferir de lo descrito en los carcinomas de mucosas.

Recapitulando, si tenemos en cuenta que, desde el punto de vista clínico, la exposición solar fue el factor de riesgo fundamental en el desarrollo de CCs de nuestros pacientes y, por otra parte, conociendo la capacidad de esta para producir mutaciones en el gen p53, que generan una proteína anómala, con un tiempo de vida mayor pero sin actividad reparadora, se podría sugerir que la RUV podría ser, más que la interacción de la proteína p53 con proteínas víricas, el factor biológico fundamental en la carcinogénesis cutánea de los trasplantados.

CONCLUSIONES

Detallamos a continuación las conclusiones alcanzadas en relación con los objetivos inicialmente fijados:

1. La incidencia de carcinomas cutáneos en los receptores de un trasplante renal de nuestro medio es la más alta de los países de Europa y equiparable a la observada en Australia. El hecho de que la incidencia acumulada a los 10 años sea del 48% y que un número considerable de pacientes desarrollen múltiples carcinomas es muy preocupante y justifica que el control dermatológico, realizado por un facultativo especialista, no debe faltar en los protocolos de seguimiento de los pacientes receptores de un trasplante.
2. Los factores de riesgo fundamentales en el desarrollo de los carcinomas cutáneos de los trasplantados son la edad del paciente en el momento del trasplante y la elevada exposición solar laboral, lo que justifica una intensa educación sanitaria dirigida a las medidas de protección solar.
3. La proteína p53 tiene una elevada expresión inmunohistoquímica en las lesiones malignas y premalignas de los trasplantados renales en comparación con las mismas lesiones de la población inmunocompetente. Su presencia en las lesiones premalignas indica que la anomalía de esta proteína es un hecho precoz en el proceso de la carcinogénesis.

La mayor expresión de inmunohistoquímica de la p53 en la queratosis displásicas de los trasplantados renales que en las queratosis actínicas de la población inmunocompetente podría estar en relación con una más fácil transformación de estas lesiones en carcinomas invasivos, lo que ayudaría a explicar el que numerosos pacientes desarrollen varios carcinomas.

4. La infección por el virus del papiloma humano no parece intervenir, de manera definitiva, en el desarrollo de los carcinomas cutáneos de los trasplantados, aunque la baja sensibilidad demostrada por la técnica que hemos utilizado no nos permite establecer una conclusión definitiva a este respecto. El desarrollo de una nueva técnica, que actualmente estamos utilizando, mucho más sensible y centrada en los tipos de VPH con reconocido potencial oncogénico, permitirá aclarar, en un futuro próximo, este punto.

Además, durante la realización de esta Tesis Doctoral, se realizaron otras observaciones que han permitido llegar a conclusiones adicionales que no habían sido planteadas en los objetivos iniciales y que se detallan a continuación:

1. El diagnóstico precoz ha sido fundamental en el buen pronóstico de los carcinomas cutáneos diagnosticados en nuestro estudio en comparación con los de otros países. Esto nos confirma el valor de la realización periódica de revisiones cutáneas por el dermatólogo.
2. En nuestros pacientes no hemos observado la clara inversión en el cociente CB/CE descrita en otras series. Desconocemos si esta diferencia es atribuible al tiempo de seguimiento, al tratamiento precoz de lesiones precancerosas realizado durante el estudio, o bien, a otros factores como el patrimonio genético, los hábitos de exposición solar y el fototipo de nuestra población.
3. La incidencia de verrugas víricas en los trasplantados renales es elevada. La incidencia de nuevos casos crece de forma rápida en los primeros 5 años post-trasplante para luego estabilizarse. A excepción del sexo, no se ha detectado un factor de riesgo asociado a su aparición.
4. En las verrugas con PCR positiva los tipos detectados predominantemente son los habitualmente descritos en la población normal (1,2,4,10,27). No obstante, en un porcentaje significativo de las verrugas comunes de los trasplantados renales y en las de algunos inmunocompetentes, hemos detectado la presencia de los tipos VPH-57 y VPH-57b, considerados, hasta el momento, como poco frecuentes y mucosotropos. El VPH 57 presenta una elevada homología con otros tipos más conocidos como el VPH-2 y el VPH-27, por lo que es probable que en estudios realizados con técnicas de hibridación hubiera reacciones cruzadas e infecciones provocadas por el VPH-57 se atribuyeran al VPH-2.

5. Al contrario de otras series, no hemos detectado infecciones múltiples ni infecciones con tipos del VPH relacionados con la epidermodisplasia verruciforme, aunque estos resultados pueden estar sesgados por el diseño del *primer* utilizado.

6. La baja sensibilidad obtenida por la técnica que hemos utilizado junto con la observación de tipos considerados como poco frecuentes sugieren que sería necesario realizar estudios epidemiológicos más amplios, con un número mayor de casos y una combinación de *primers* adecuada, para establecer cuales son los tipos de VPH más frecuentes, tanto en la población general como en los inmunodeprimidos, en nuestro medio.

BIBLIOGRAFÍA

Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Stemer G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol* 2000;74:11636-11641

Ashinoff R, Li JJ, Jacobsen M, Friedman-Kien AE, Geronimus RG. Detection of human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the nail bed and finger determined by polymerase chain reaction. *Arch Dermatol* 1991;127:1813-1818

Astori G, Lavergne D, Benton C, Hockmayr B, Egawa K, Garbe C, et al. Human papillomavirus are commonly found in normal skin of immunocompetent host. *J Invest Dermatol* 1998;110:752-755

Barr BB, Benton EC, Mc Lauren KM, Bunney MHS, Smith IW, Blessing K et al . Human papillomavirus infection and skin cancer in renal allograft recipients. *Lancet* 1989;1:124-129

Barret WL, First MR, Aron BS, Penn I. Clinical course of malignancies in renal transplant recipients. *Cancer* 1993;72:2186-2189

Basset-Séguin N, Moles JP, Mils V, Dereure O, Guilhou JJ. TP53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 1994;103:1025-1065 .

Behren M, Kolditz M, Kliem V, Oldhafer KJ, Brunkhorst R, Frei U, Pichlmayr R. Malignancies in patients under long-term immunosuppression after kidney transplantation. *Transplantation Proc* 1997;29:834-835

Berg D, Otley CC. Skin cancer in organ transplant recipients. Epidemiology, pathogenesis and management. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:1-17

Berkhout RJM, Tieben LM, Smits HL, Bouwes 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;33:690-695.

Blohmé I, Larkö O. Premalignant and malignant skin lesions in renal transplant patients. *Transplantation* 1984;37:165-167

Blohmé I, Larkö O. Skin cancers in renal transplant patients after 10-23 years of immunosuppressive therapy. *Acta Derm Venerol (Stockh)* 1990;70:491-494

Bouwes Bavinck JN, Claas FHJ, 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;108:708-711.

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. *Transplantation* 1996;61:715-721

Bouwes Bavinck JN, Kootte AMM, van der Woude FJ, Vanderbroucke JP, Vermeer BJ, Claas FHJ. On a possible protective effect of HLA A11 against skin cancer and keratotic skin lesions in renal transplant recipients. *J Invest Dermatol* 1991;97:269-272.

Boxman ILA, Berkhout RJM, Mulder LHC, Wolkers MC, Bavinck JNB, Vermeer BJ, et al. Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol* 1997;108:712-715

Boxman ILA, Mulder LHC, Russell A, Bouwes Bavinck JN, Green A, ter Schegget J. Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br J Dermatol* 1999;141:246-249.

Boxman ILA, Russell A, Mulder LHC, Bouwes Bavinck JN, ter Schegget, 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 hair. The Nambour Skin Cancer Prevention Study Group. *Int J Cancer* 2000;86:118-121.

Boyle J, Mackie RM, Briggs JD, Junor BJ, Aitchison TC. Cancer, warts and sunshine in renal transplant recipients. *Lancet* 1984;i:702-704

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10124-10128.

Bunney MH, Benton EC, Barr B, Smith IW, Anderton JL, Hunter JA. The prevalence of skin disorders in renal allograft recipients receiving cyclosporin A compared with those receiving azathioprine. *Nephrol Dial Transplant* 1990;5:379

Chan SY, Chew SH, Egawa K, Grussendorf-Conen EI, Honda Y, Rubben A, et al. Phylogenetic analysis of the human papillomavirus type 2 (HPV-2), HPV-27, and HPV-57 group, which is associated with common warts. *Virology* 1997;239:296-302

Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard H-U. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny and taxonomy. *J Virol* 1995;69:3074-3083

Cohen EB, Komorowski RA, Clowry LJ. Cutaneous complications in renal transplant recipients. *Am J Clin Pathol* 1987;88:32-37

Czarnecki D, Watkins F, Leahy S, Dyll-Smith D, Levis A, Nicholson I, et al. Skin cancer and HLA frequencies in renal transplant recipients. *Dermatology* 1992;185:44-49.

Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blancho G, Dreno B et al. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomized comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 1998;351:623-628.

- De Jong-Tieben LM, Berkhout RJM, Smits HL, Bowes Bavinck JN, Vermeer BJ, et al. High frequency of detection of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in biopsies from malignant and premalignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Invest Dermatol* 1995; 105:367-371
- de Villiers E-M. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:1-12
- de Villiers EM. Papillomavirus and HPV typing. *Clin Dermatol* 1997;15:199-206
- de Villiers EM; Lavergne D; McLaren K; Benton EC. Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* 1997;73:356-360
- Dyall-Smith D, Ross JB. Cutaneous malignancies in renal transplant recipients from Nova Scotia, Canada. *Australas J Dermatol* 1995;36:79-82.
- Dyall-Smith D, Trowell H, Mark A, Dyall-Smith M. Cutaneous squamous cell carcinomas and papillomavirus in renal transplant recipients: a clinical and molecular biological study. *J Dermatol Sci* 1991;2:139-146
- Eliezri YD, Silverstein SJ, Nuovo GJ. Occurrence of human papillomavirus type 16 DNA in cutaneous squamous and basal cell neoplasms. *J Am Acad Dermatol* 1990;23:836-842.
- Euvard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Dureau G, Touraine JL, Faure M, et al. Comparative epidemiological study of premalignant and malignant epithelial cutaneous lesions developing after kidney and heart transplantation. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:222-229
- Euvard S, Chardonnet Y, Puoteil-Noble C, Kanitakis J, Chignol MC, Thivolet J et al. Association of skin malignancies with various and multiple carcinogenic and non-carcinogenic human papillomaviruses in renal transplant recipients. *Cancer* 1993;72:2198-2206
- Favre M, Orth G, Majewski S, Baloul S, Pura A, Jablonska S. Psoriasis: A possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol* 1998;110: 311-317
- Favre M, Ramoz N, Orth G. Human papillomaviruses: General features. *Clin Dermatol* 1997;15:181-198
- Ferrándiz C, Fuente MJ, Ribera M, Bielsa I, Fernandez MT, Lauzurica R, et al. Epidermal dysplasia and neoplasia in kidney transplant recipients. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33:590-596
- Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988;124: 869-871.
- Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990;9:1595-1602

- Gaya SBM, Rees AJ, Lechler RI, Williams G, Mason PD. Malignant disease in patients with long-term renal transplant. *Transplantation* 1995;59:1705-1709
- Gibson GE, O'Grady A, Kay EW, Leader H, Murphy GM. p53 tumor suppressor gene protein expression in premalignant and malignant skin lesions of kidney transplant recipients. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36:924-931
- Glover MT, Bodmer J, Bodmer W, Kennedy LJ, Brown J, Navarrete C, et al. HLA antigens frequencies in renal transplant recipients and non-immunosuppressed patients with non melanoma skin cancer. *Eur J Cancer* 1995;332:1052-1057
- Goldberg LH, Griego RD. Absence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of nongenital skin from immunocompromised renal transplant patients. *Arch Dermatol* 1995;131:107-108
- Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin embedded tissues: Recommendation on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods and applications* 1991;1:46-50
- Grimmel M, de Villiers EM, Neumann C, Pawlita M, zur Hausen H. Characterization of a new human papillomavirus (HPV 41) from disseminated warts and detection of its DNA in some skin carcinoma. *Int J Cancer* 1988;41:5-9
- Grossman D y Leffel DJ. The molecular basis of non-melanoma skin cancer: new understanding. *Arch Dermatol* 1997;133:1263-1270
- Gupta AK, Cardella CJ, Haberman HF. Cutaneous malignant neoplasm in patients with renal transplant. *Arch Dermatol* 1986;122:1288-1293
- Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W, Midgely C, Lane DP, O'Hare M et al. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* 1991;6:1785-1789.
- Hall PA, Lane DP. P53 in tumors pathology: can we trust immunohistochemistry? Revisited. *J Pathol* 1994;172:1-4.
- Hardie IR, Strong RW, Hartley LCJ, Woodruff PWH, Clunie GJA. Skin cancer in Caucasian renal allograft recipients living in a subtropical climate. *Surgery* 1980;87:177-183
- Hartevelt MM, Bouwes Bavinck JN, Kootte AMM, Vermeer BJ, Vandenbroucke JP. Incidence od skin cancer after renal transplantation in the Netherlands. *Transplantation* 1990;49:506-509
- Harwood CA, Mc Gregor JM, Proby CM, Breuer J. Human papillomavirus and the development of non- melanoma skin cancer .*J Clin Pathol* 1999;52:249-253
- Harwood CA, Spink PJ, Suretheran T, Leigh IM, Hawke JL, Proby CM, et al. Detection of human papillomavirus in PUVA-associated non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol* 1998; 111:123-127.

Harwood CA, Proby CM. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:101-114

Howley PM. Papillomaviridae: the viruses and their replications. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology* vol. 2. Philadelphia: Lippicott-Raven 1996:2045-2076

<http://www.donacion.organos.ua.es/ont/index.html>. 9-1- 2001

<http://www.msc.es/ont/esp/estadisticas/evoont.htm>. 7-11-00

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/cgi>

Itakura Y, Sasano F, Date F, Kato K, Sekine H, Mori S et al. DNA ploidy, p53 expression and cellular proliferation in normal epithelium and squamous dysplasia of non-cancerous and cancerous human oesophagi. *Anticancer Res* 1996;16:201-208

Jackson S, Storey A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000;19:592-598

Jensen P, Hansen S, Moller 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;40:177-186

Kawashima M, Favre M, Obalek S, Jablonska S, Orth G. Premalignant lesions and cancers of the skin in the general population: evaluation of the role of human papillomaviruses. *J Invest Dermatol* 1990;95:537-542

Khorshid SM, Glover MT, Churchill L, Mc Gregor JM, Proby CM. P53 immunoreactivity in non-melanoma skin cancer from immunosuppressed and immunocompetent: a comparative study of 246 tumours. *J Cutan Pathol* 1996;23:229-233.

Kinlen LJ. Incidence of cancer in rheumatoid arthritis and other disorders after immunosuppressive treatment. *Am J Med* 1985;78:44-49

Leffell DJ, Brash DE. Sunlight and skin cancer. *Sci Am* 1996;275:52-53

Leigh IM, Buchanan JAG, Harwood CA, Cerio R, Storey A. Role of human papillomaviruses in cutaneous and oral manifestations of immunosuppression. *JAIDS* 1999;21:S49-S57

Lennard L, Thomas S, Harrington CI, Maddocks JL. Skin cancer in renal transplant recipients is associated with increased concentrations of 6-thioguanine nucleotide in red blood cells. *Br J Dermatol* 1985;113:723

Lever WF, Schaumburg-Lever G. *Histopathology of the skin*. 7th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1990

Lewandowsky F, Lutz W. Ein fall einer bisher nicht beschriebenen Hauterkrankung (epidermidysplasia verruciformis). *Arch Dermatol Syphilol* 1922;141:193-203.

Liddington M, Richardson AJ, Higgins RM, Endul ZA, Venning VA, Murie JA, Morris PJ. Skin cancer in renal transplant recipients. *Br J Surg* 1989;76:1002-1005

Lindelöf B, Sigurgeirsson B, Gäbel H, Stern RS. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol* 2000;143:513-519

Lobo DV, Chu P, Grekin RC, Berger TG. Non-melanoma skin cancers and infection with the human immunodeficiency. *Arch Dermatol* 1992;128:623-627

Lutzner M, Croissant O, Ducasse MF . A potentially oncogenic human papillomavirus (HPV-5) found in two renal allograft recipients. *J Invest Dermatol* 1980;75:353-356

Majewski S, Jablonska S. Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus - induced genetic cancer of the skin. *Arch Dermatol* 1995;131:1312-1318

Maurer TA, Christian KV, Kerschmann RL, Berzin B, Palefsky JM, Payne D, et al. Cutaneous squamous cell carcinoma in human immunodeficiency virus-infected patients. A study of epidemiologic risk factors, human papillomavirus, and p53 expression. *Arch Dermatol* 1997;133:577-583

McLeod SD, Ranson M, Mason RS. Effects of estrogens on human melanocytes in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994;49:9-14.

McGregor JM, Proby CM. The role of papillomaviruses in human non-melanoma skin cancer. In: Leigh IM, Newton Bishop JA, Kripke ML, eds. *Cancer surveys: skin cancer*. Vol 26. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1996;219-236

McGregor JM, Farthing A, Crook T, Yu CC, Dublin EA, Levison DA et al. Post-transplant skin cancer: a possible role for p53 gene mutation but not for oncogenic human papillomaviruses. *J Am Acad Dermatol* 1994;30:701-706

McGregor JM, Yu CCW, Dublin EA, Levison DA, McDonald DM. Aberrant expression of p53 tumour suppressor protein in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 1992;127:463-469.

McNutt NS, Saenz-Santamaría C, Volkenandt M, Shea CR, Albino AP. Abnormalities of p53 expression in cutaneous disorders. *Arch Dermatol* 1994;130:225-232

Nagano T, Uedo M, Ichihashi M. Expression of p53 protein is an early event in ultraviolet light-induced cutaneous squamous cell carcinogenesis. *Arch Dermatol* 1993;129:1157-1161.

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(10):1479-1484

Nataraj AJ, Wolf P, Cerroni L, Ananthaswamy HN. P53 mutation in squamous cell carcinomas from psoriasis patients treated with psoralen + UVA.. *J Invest Dermatol* 1997;109:238-243

- Obaleck S, Favre M, Jablonska S, Szymanczyk J, Orth G. Human papillomavirus type 2-associated basal cell carcinoma in two immunosuppressed patients. *Arch Dermatol* 1988;124:930-934
- Ong CS, Keogh AM, Kossard S, Macdonald PS, Spratt PM. Skin cancer in Australian heart transplant recipients. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:177-186.
- Orth G. Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. En: *Ciba Foundation Symposium 120, Papillomaviruses*, Wiley, Chichester, 1986:157-174
- Pelisson I, Chardonnet Y, Euvrard S, Schmitt D. Immunohistochemical detection of p53 in cutaneous lesions from transplant recipients harboring human papillomavirus DNA. *Wirchows Arch* 1994;424:623-630.
- Penn I. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplants recipients. *Clin Transpl* 1994:99-109
- Persijn GG, Cohen B, Lansbergen Q. Effect of HLA-A and HLA-B matching on survival of grafts and recipients after transplantation. *N Eng J Med* 1982;307:905-908.
- Pfister H, ter Schegget J.. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol* 1997;15:335-337
- Pierceall WE, Goldberg LH, Ananthaswamy HN. Presence of human papilloma virus type 16 DNA sequences in human nonmelanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* 1991;97:880-884
- Proby CM, du Peloux Menage H, McGregor JM, Hobbs C, Norris PG, Smith N, et al. P53 immunoreactivity in cutaneous PUVA tumors is similar to that in other non-melanoma skin neoplasm. *J Cutan Pathol* 1993;20:435-441.
- Proby CM, Storey A, McGregor J, . Does human papillomavirus infection play a role in non-melanoma skin cancer?. *Papillomavirus Rep* 1996;7:53-60
- Purdie KJ, Pennington J, Proby CM y cols. The promoter of a novel human papillomavirus (HPV 77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *EMBO J* 1999;18:5359-5369
- Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Favre M, Orth G. A susceptibility locus for epidermodysplasia verruciformis, an abnormal predisposition to infection with the oncogenic human papillomavirus type 5, maps to chromosome 17qter in a region containing a psoriasis locus. *J Invest Dermatol* 1999;112:259-263
- Ramsay HM, Fryer AA, Reece S, Smith AG, Harden PH. Clinical risk factors associated with non-melanoma skin cancer in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2000;36:167-176

- Ren ZP, Hedrum A, Pontén F, Nister M, Ahmandian A, Lundeberg J, Uhlén M, Pontén J. Human epidermal cancer and accompanying precursors have identical p53 mutations different from p53 mutations in adjacent areas of clonally expanded non-neoplastic keratinocytes. *Oncogene* 1996;12:765-773
- Ro YS, Vojtesek B, Cooper PN, et al. P53 protein expression in benign and malignant squamous and melanocytic skin tumours - an immunohistochemical study. *J Invest Dermatol* 1992;98:540-544.
- Rübber A, Krones R, Schwestschenau B, Grussendorf-Conen EI. Common warts from immunocompetent patients show the same distribution of human papillomavirus types as common warts from immunocompromised patients. *Br J Dermatol* 1993;128:264-270.
- Rüdlinger R, Grob R. Papillomavirus infection and skin cancer in renal allograft. *Lancet* 1989;1:1132-1133
- Seukeran DC, Newstead CG, Cunliffe WJ. The compliance of renal transplant recipients with advice about sun protection measures. *Br J Dermatol* 1998;138:301-303
- Shamanin V, Glover M, Rausch C, Proby C, Leigh IM, zur Hausen H, et al. Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer res* 1994; 54:4610-4613.
- Shamanin V, zur Hausen H, Laveragner D, Proby CM, Leigh IM, Neumen C, et al. Human papillomavirus infections in non-melanoma skin cancers from renal transplant recipients and non-immunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:802-811 .
- Shuttleworth D, Marks R, Griffin PJ, Salaman JR. Epidermal dysplasia and cyclosporine therapy in renal transplant patients: a comparison with azathioprina. *Br J Dermatol* 1989;120:551-554
- Silverberg E, Lubera J. *Cancer Statistics*. CA 1986;36:9-25
- Smith SE, Davis IC, Leshin B, Fleischer AB, White WC, Feldman SR.. Absence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of nongenital skin from immunocompromised renal transplant patients. *Arch Dermatol* 1993;129:1585-1588.
- Soler C, Chardonnet Y, Allibert P, Euvard S, Schmitt D, Mandrand B. Detection of mucosal human papillomaviruses types 6/11 in cutaneous lesions from renal transplant recipients. *J Invest Dermatol* 1993;101:286-291
- Stark LA, Arends MJ, McLaren KM, Benton EC, Shahidullah H, Hunter JA et al. Accumulation of p53 is associated with tumor progression in cutaneous lesions of renal allograft recipients. *Br J Cancer* 1994;70:662-667
- Stark LA, Arends MJ, McLaren KM, Benton EC, Shahidullah H, Hunter JA et al. Prevalence of human papillomavirus DNA in cutaneous neoplasm from renal allograft recipients supports a possible viral role in tumor promotion .*Br J Cancer* 1994;69:222-229

Steger G, Pfister H. *In vitro* expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53. Arch Virol 1992; 125:355-360.

Surentheran T, Harwood CA, Spink PJ, Sinclair AL, Leigh IM, Proby CM, et al. Detection and typing of human papillomaviruses in mucosal and cutaneous biopsies from immunosuppressed and immunocompetent patients and patients with epidermodysplasia verruciformis: a unified diagnostic approach. J Clin Pathol 1998;51:606-610.

Taylor AE, Shuster S. Skin cancer after renal transplantation: the causal role of azathioprine. Acta Derm Venerol (Stockh) 1992;72:115-119

Tieben LM, Berkhout RJM, Smits HL. Detection of epidermodysplasia verruciformis-like human papillomavirus types in malignant and premalignant skin lesions of renal transplant recipients. Br J Dermatol 1994;131:226-230.

Tolkoff-Rubin NE, Rubin RH. Uremia and host defenses. N Engl J Med 1990;322:770-772

Trenfield K, Salmond CA, Pope JH, Hardie IR. Southern blot analysis of skin biopsies for human papillomavirus DNA: renal allograft recipients in South-Eastern Queensland. Aust J Dermatol 1993;34:71-78

Tyring SK. Human papillomavirus infections: Epidemiology, pathogenesis and host immune response. J Am Acad Dermatol 2000;43:S18-26

Ullrich SE. Systemic immunosuppression of cell mediated immune reactions by monofunctional psoralen plus ultraviolet A radiation. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1991;8:116-122.

Van der Leest RJ, Zachow KR, Ostrow RS, Benden M, Pass F et al. Human papillomavirus heterogeneity in 36 renal transplant recipients. Arch Dermatol 1987;123:354-357.

Vittorio CC, Schiffman MH, Weinstocks MA. Epidemiology of human papillomaviruses. Dermatol Clin 1995;13:561-574

Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53 new monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. J Immunol Methods 1992;151:237-244.

Volgstein B, Kinzel KW. P53 function and dysfunction. Cell 1992;70:523-526

Wang XW, Harris CC. P53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. J Cell Physiol 1997;173:247-255.

Webb M, Compton F, Andrews P, Koffman C. Skin tumors post-transplantation: a retrospective analysis of 28 years experience at a single center. Transplant Proc 1997;29:828-830

Weissenborn SJ, Hopfl R, Weber F, Smola H, Pfister HJ, Fuchs PG. High prevalence of a variety of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses in psoriatic skin of patients treated or not treated with PUVA. J Invest Dermatol 1999;113:122-126

Yandel DW, Dryja TP, Little JB. Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations. *Somat Cell Mol Genet* 1986;12:255-263.

zur Hausen H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991;184:9-13

zur Hausen H. Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:F55-78

—