

### 33. Virología Molecular

#### **Detección de Virus del Papiloma Humano en Liquen Plano oral y Lesiones Liquenoides Orales**

Tomasi, Ramiro Alejandro

[ramiro.tomasi@unc.edu.ar](mailto:ramiro.tomasi@unc.edu.ar)

Facultad de Odontología

Universidad Nacional de Córdoba

#### **Resumen**

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un pequeño virus circular ADN epiteliotrópico. Recientemente ha sido asociado a Trastornos Potencialmente Malignos Orales (TPMO) como Liquen Plano Oral (LPO) pero aún es controversial la asociación con Lesiones Liquenoides Orales (LLO).

Los objetivos del presente estudio fueron: detectar la presencia de VPH en LPO y LLO, especificar los genotipos asociados a estas lesiones y analizarlos filogenéticamente.

El estudio fue retrospectivo entre los años 2000 a 2014. Se diagnosticaron 112 biopsias LPO(n=36) y LLO (n=82), recibidas en el Servicio de Anatomía Patológica A de la FO -UNC, con diagnósticos presuntivos de LPO o LLO utilizando los criterios clínicos e histopatológicos de clasificación actuales de Van Der Meij-Van Der Waal excluyendo a lesiones similares como leucoplasias.

La detección de VPH fue realizada en el Instituto Viroológico JM Vanella-FCM mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la genotipificación se realizó por Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) y para el análisis filogenético, las secuencias fueron alineadas utilizando el programa MEGA versión 5.

Del total de casos estudiados, 7 casos (31,8%) fueron positivos y 15 (69,2%) negativos para VPH. Los positivos 6 (85,7%) fueron LLO y 1 (14,3%) fue LPO. Se halló en un 20% genotipos de AR y 60% a los de BR mientras que el restante 20% correspondió a un genotipo aún sin

definir su riesgo. El porcentaje de prevalencia de los genotipos 16, 6, 11,53 fue del 22,2% mientras que para el genotipo 13 fue del 11,1%.

Es trascendental, debido al potencial maligno de ambas lesiones y con mayor predominio en LLO, realizar nuevos estudios para profundizar sobre la asociación de VPH con LLO.

**Palabras clave:** liquen plano oral, lesiones liquenoides orales, virus del papiloma humano.

## **Introducción**

Como se describe en el estudio de Rautava & Syrjänen (2012) los Virus del Papiloma Humano, son un grupo de virus ADN que infectan el epitelio escamoso de la piel o mucosa (epiteliotrópicos). Syrjänen et.al (2011) en su estudio detalla que cerca de 150 tipos diferentes de HPV han sido reconocidos, de los cuales 120 han sido secuenciados. Los HPV han sido divididos en dos grupos; de alto riesgo (HPV-AR) y a los de bajo riesgo (HPV-BR). Los HPV-AR detectados en lesiones orales malignas como potencialmente malignas, incluyendo a los tipos 16, 18, 31,33,35, 39,45,51,52,56,58,59,66,68,73 y 82 mientras que los HPV-BR 2,4,6,11,13,32,43,44,54,61,70,72 y 81 se asocian a lesiones benignas.

Para Warnakulasuriya (2018), el espectro de Trastornos Potencialmente Malignos Orales (TPMO) incluye: leucoplasia oral, eritroplasia, eritroleucoplasia, fibrosis submucosa oral (FOS), lesiones palatinas en fumadores inversos, liquen plano oral, reacciones liquenoides orales, enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso oral y algunas afecciones hereditarias como la disqueratosis congénita, epidermólisis bullosa y queilitis actínica del labio inferior también se asocia con un mayor riesgo de cáncer de labio.

Mollaoglu (2000), describe al Liquen Plano Oral (LPO) como una enfermedad crónica autoinmune que afecta la piel y las mucosas (mucocutánea). En relación a su prevalencia Sapp, Eversole & Wisocky (2006) afirman que es del 1 al 2% de la población general, con mayor frecuencia en adultos de 30 a 70 años, con marcado predominio por el sexo femenino.

De acuerdo a estudios realizados por Minicucci, Weber, Stolf y Ribeiro (2008), el 50% de los pacientes con LPO simultáneamente presentan lesiones en piel y mucosas, mientras que el 25% sólo tiene lesiones orales. Lanfranchi (2004), describe que el LPO puede afectar cualquier sitio pero más comúnmente al sector medio y posterior de la mucosa yugal así como lengua y encías, mientras que la localización palatina es poco común.

Estudios como el de Sousa & Rosa (2008); Lanfranchi (2004) describen que las lesiones de LPO suelen ser simétricas, bilaterales o múltiples con una gran variedad de presentaciones clínicas, incluidas las formas reticulares con estrías de Wickham, papulares, en placa, atróficas, ampollares y erosivas.

Las lesiones Liquenoides Orales (LLO) presentan manifestaciones clínicas muy similares al LPO pero su etiología es diferente. Van der Waal (2009) afirma:

Se describen cuatro tipos de LLO: 1) restauraciones con amalgamas, topográficamente asociadas a estas lesiones, 2) lesiones liquenoides relacionadas con fármacos, 3) lesiones liquenoides en enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y 4) lesiones que tienen un aspecto de liquen plano, pero que le falta uno o más aspectos clínicos característicos. Clínicamente, se presentan en forma unilateral, frecuentes en paladar y asociados a EICH. (p.311)

## **Objetivos**

### General

- Detectar la presencia de Virus Papiloma Humano en Liquen Plano Oral y Lesiones Liquenoides Orales.

### Específicos

- Especificar los diferentes genotipos presentes en Liquen Plano Oral y Lesiones Liquenoides Orales.
- Analizar filogenéticamente los genotipos hallados en Liquen Plano Oral y Lesiones Liquenoides Orales.

## **Materiales y Métodos**

El estudio fue retrospectivo entre los años 2000 a 2014 y se diagnosticaron 112 biopsias LPO (n=36) y LLO (n=82), recibidas en el Servicio de Anatomía Patológica A de la FO -UNC, con diagnósticos presuntivos de LPO o LLO. La detección de VPH fue realizada en el Instituto

Viroológico JM Vanella-FCM en el Laboratorio de Virus del Papiloma Humano y Clamidia Trachomatis.

Criterios de inclusión: biopsias con diagnóstico clínico presuntivo de liquen plano oral y lesiones liquenoides orales, recibidos en el servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología U.N.C., entre los años 2000 a 2014.

Criterios de exclusión: protocolos de biopsias incompletos, tacos de biopsias con material insuficiente para su diagnóstico y lesiones blancas como leucoplasia y leucoplasia verrugosa proliferativa entre otras patologías blancas similares.

Los casos de LPO y LLO, se diagnosticaron según los criterios clínicos e histopatológicos de la OMS modificados por Van der Waal y Van der Meij (2003):

Criterios Clínicos;

- Presencia bilateral, más o menos lesiones simétricas.
- Presencia de un patrón en red de encaje de líneas blanco-gris ligeramente elevadas (patrón reticular).
- Lesiones erosivas, atróficas, ampollares y tipo placa, serán sólo aceptadas como un subtipo en la presencia de lesiones reticulares en otras partes de la mucosa oral.

En todas las otras lesiones que se asemejan a LPO pero que no completan los criterios antes mencionados, debe ser utilizado el término “clínicamente compatible con”.

Criterios Histopatológicos;

- Presencia de una banda bien definida como zona de infiltrado celular linfocitario que se limita a la parte superficial del tejido conectivo.
- Signos de degeneración hidrópica en la capa basal.
- Ausencia de displasia epitelial.

Cuando las características histopatológicas son menos evidentes, debe ser utilizado el término “histopatológicamente compatible con”.

Diagnóstico Final de LPO;

Para lograr un diagnóstico final clínico como histopatológico deben ser incluidos los siguientes criterios:

LPO (Liquen plano oral): un diagnóstico de LPO, requiere el cumplimiento de ambos criterios clínicos e histopatológicos.

LLO (Lesión liquenoide oral): el término LLO se utilizará en las siguientes condiciones:

1. clínicamente típico de LPO pero histopatológicamente sólo “compatible con LPO”.
2. histopatológicamente típico de LPO pero clínicamente sólo “compatible con LPO”.
3. clínicamente “compatible con LPO” e histopatológicamente “compatible con LPO”.

Extracción de Ac. nucleicos: se realizó una extracción de ADN genómico utilizando AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer) a partir de las muestras obtenidas.

Visualización de los productos de PCR: los productos de PCR se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa. Las bandas correspondientes al producto esperado fueron extraídas del gel empleando el Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen, Valencia, Ca, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Para el análisis filogenético se siguió el trabajo de Tamura et.al (2011) y las secuencias de la región E6 amplificadas fueron alineadas utilizando el programa MEGA versión 5. Se estimó el modelo apropiado utilizando el programa jModel Test Version 0.1.1 del trabajo de Posada (2008) y se construyó el árbol por máxima verosimilitud, utilizando el software PhyML versión 3.0 del trabajo de Guindon (2010) y el mismo fue evaluado bajo el procedimiento de bootstrap con 1000 pseudoréplicas.

Las secuencias patrones para la realización del árbol filogenético fueron tomadas de Smith et. al (2011). Los números de acceso a GenBank son los siguientes: variante Europea prototipo (Ep): HQ644286, Europea Asiática (Ea): HQ644251, Africana 1 (AF-1): HQ644238, Africana 2 (AF-2): AF472509 y Asiática Americana (AA): HQ644255.

## Resultados y Discusión

Del total de biopsias estudiadas solamente en 22 (19,6%) se pudo realizar la técnica de PCR. Resultaron 7 (31,8%) casos positivos y 15(68,2%) negativos para VPH.

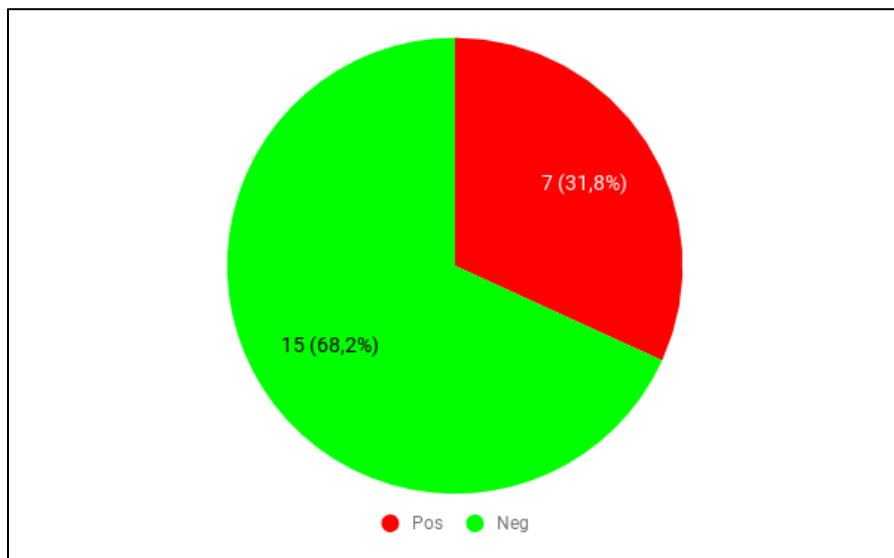
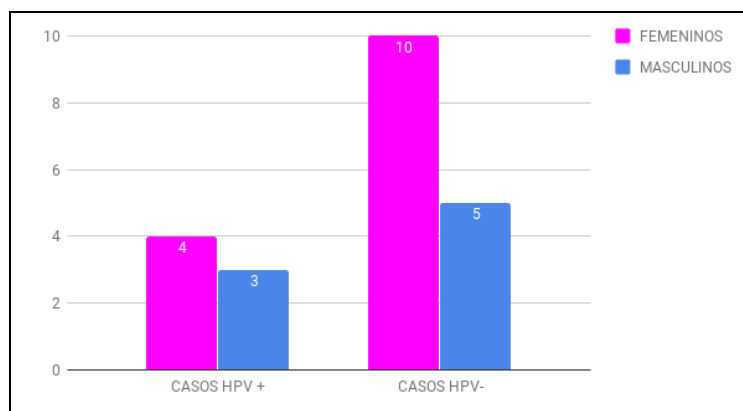


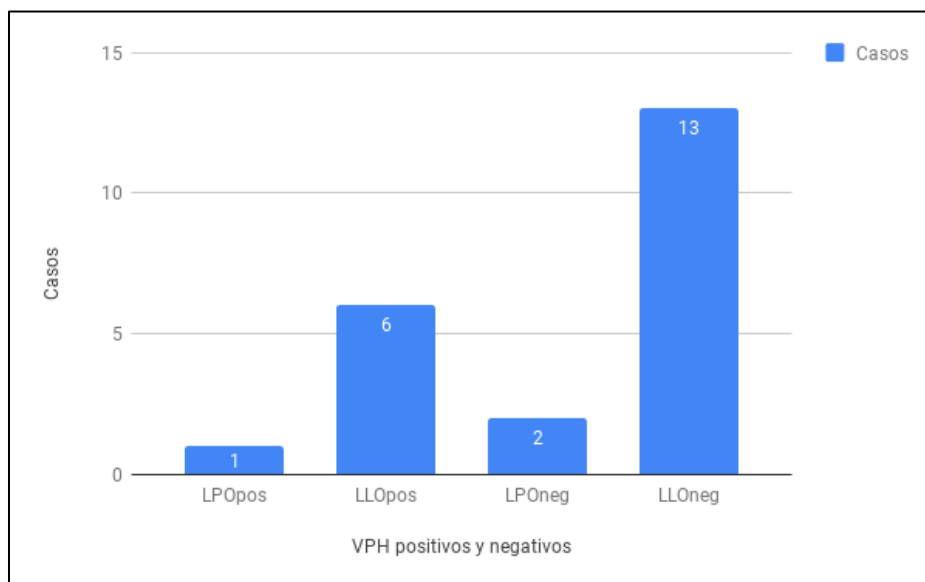
Figura 1. Porcentaje de casos VPH positivos y negativos

El género que prevaleció fue el femenino con 12 casos (54,5%) mientras que masculinos fueron 10 casos (45,5%). En los casos positivos 4 (57,1%) fueron femeninos mientras que 3 (42,9%) fueron masculinos y en los casos negativos 11 (73,3%) fueron femeninos y 4 (26,7%) masculinos



*Figura 2. Casos Femeninos Vs. Masculinos VPH positivos y negativos*

Los casos positivos fueron histopatológicamente 6 (27,3%) LLO y 1 (4,5%) LPO con zonas histopatológicas en placa (queratósico) y ampollar. Los casos negativos fueron 13 (59,1%) LLO y 2 (9,1%) LPO siendo uno de ellos en placa (queratósico).



*Figura 3. Casos LPO y LLO VPH positivos Vs. VPH negativos*

En el presente estudio muestra evidencias sobre la asociación del Virus del Papiloma Humano con Lesiones Liquenoides Orales en mayor porcentaje que Liquen Plano Oral. Sin embargo, otros estudios como el de Gorsky & Epstein (2011), Matilla, Rautava y Syrjänen (2012) y Ostwald et. al (2003) afirman que los VPH son más detectables en LPO.

En relación a las variedades histopatológicas de LPO en el estudio de Szarka et al, 2009 (24) la infección de VPH es más frecuente en las formas atróficas/erosivas que en las no atróficas/erosivas. Comparándolo con el presente estudio los LPO con zonas ampollares luego se transforman en zonas erosivas concediendo en parte con los resultados del estudio de Szarka.

La prevalencia fue del 22,2% para los genotipos 16, 6, 11,53 mientras que para el genotipo 13 fue del 11,1%. El porcentaje de genotipos de VPH, en relación al riesgo, se encontró que el

60% eran de BR (genotipos 6,11 y 13), el 20% de AR (genotipo16) mientras que el otro 20% representaba un genotipo posiblemente de alto riesgo (genotipo 53).

Estos resultados difieren de otros trabajos como por ejemplo con en el trabajo de Campisi et al (2004) donde se detectó el genotipo 18 como el más frecuente seguido por los genotipos 16,31 y 6. Esto se podría deber al lugar geográfico donde se realiza el estudio de Campisi ya que en Latinoamérica no sería frecuente el genotipo 18 pero si el 16. Este genotipo en el este estudio compartió el mismo porcentaje otros genotipos que no fueron hallados por Campisi et al.

Este estudio coincide en el predominio del genotipo VPH 16 con el estudio realizado por Cox, Maitland y Scully (1993) aunque su porcentaje de prevalencia fue mayor debido a que en ese estudio solamente se detectó ese genotipo. También hay similitudes en relación a la prevalencia del genotipo 16 con los estudios de Oflatharta, Flint, Toner, Butler y Mabruk (2003); y de Yildirim, Senguven y Demir (2011) donde se encontró más prevalente al genotipo VPH-16 en LPO en un porcentaje del 26,3% y 21% respectivamente pero siendo superior el porcentaje al hallado en el estudio de Oflatharta et.al, pero en comparación con el estudio de Yildirim et al, en el presente estudio fue más prevalente el VPH-16 y se utilizó la técnica de PCR para la detección de VPH.

Además, otra diferencia con los estudios de Oflatharta y Yildirim, es que en el presente estudio se detectó VPH-16 en LPO y LLO mientras que en los estudios comparados solamente se estudió al LPO.

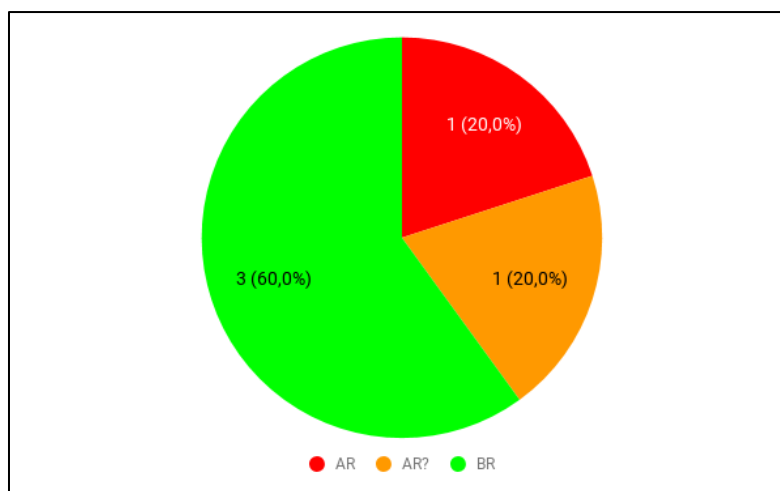




Figura 4. Porcentaje de Virus del Papiloma Humano según riesgo

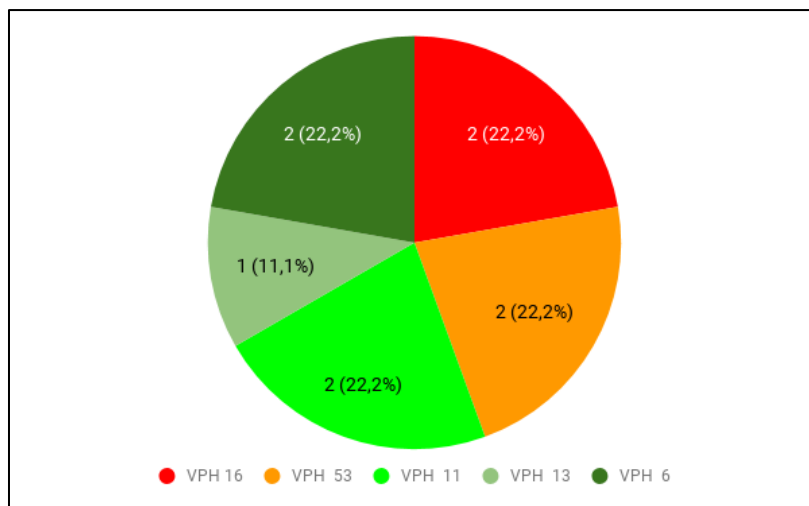


Figura 5. Prevalencia de Genotipos de VPH

De los 7 casos VPH positivos se pudo realizar el análisis filogenético en los genotipos 16. Se analizaron 2 casos y se secuenció la región E6 del VPH 16. Los resultados arrojados son que el caso N°1: 116T y el caso N°2: 184T ambos estaban asociados al linaje Europeo. Siendo el caso N°1 Europeo Asiático (Ea) y el caso N°2 Europeo prototipo (Ep).

Estudios realizados en Argentina y otros países de Sudamérica como los de Yamada et.al, 1997 (29) y Picconi et.al (2002; 2003) utilizando muestras cervicales en lugar de bucales, se detectaron un amplio porcentaje de variantes europeas. Esto se debería a que nuestro país recibió en las primeras décadas del siglo XX una fuerte inmigración europea, lo que pudo dar lugar al ingreso de esta variante por lo que las variantes europeas, podrían haber llegado a Sudamérica principalmente durante la colonización española.

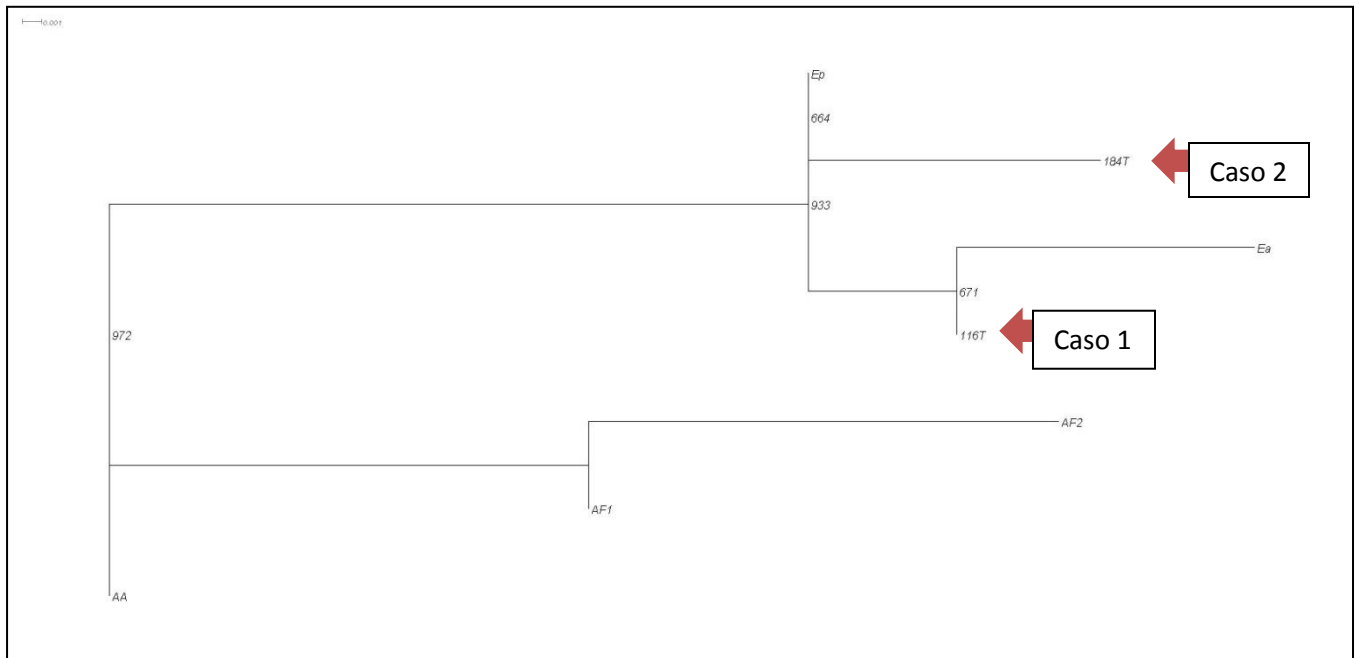


Figura 6. Árbol filogenético

## Conclusiones

En los años recientes, la infección oral por VPH ha ido incrementándose y podría, según diversos estudios, ser el probable y potencial factor etiológico de los TPMO. Sin embargo podemos notar como varían las frecuencias de la prevalencia de VPH en los diferentes estudios. Muchas razones hacen estas diferencias como probablemente el tamaño de la muestra, los métodos de detección utilizados y el lugar geográfico del estudio.

Los resultados del presente estudio usando los criterios actuales de clasificación para LPO-LLO muestran que las LLO se asocian más a VPH que los LPO. Además, que el género femenino sigue prevaleciendo en los casos positivos tanto en asociaciones de VPH con LPO y LLO.

En este estudio se encontraron variantes que no han sido halladas en trabajos anteriores estudiando TPMO como lo son el genotipo 53 y 13. El primero muestra un porcentaje del 22,2% prevaleciendo junto con otros genotipos ya conocidos pero aún es controversial su riesgo aunque se cree que sería de alto riesgo.

Otro punto importante, es el estudio filogenético del genotipo 16 ya que se podría inferir que las variantes europeas podrían haber llegado a Sudamérica principalmente durante la colonización española y es por esto que tenemos estas variantes genotípicas en nuestro país.

Es trascendental, debido al potencial maligno de ambas lesiones pero con mayor predominio en LLO, realizar nuevos estudios para profundizar la asociación de VPH con LLO y así contribuir a los profesionales clínicos y a otros estudios sobre el rol del VPH en la transformación maligna de LLO sobre LPO.

## **Bibliografía**

- Campisi G., Giovannelli L., Arico P., Lama A., Di Liberto C., Ammatuna P., y D'Angelo M. (2004). HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,98,705-11.
- Cox M., Maitland N., y Scully C. (1993). Human Herpes Simplex-I and Papillomavirus Type 16 Homologous DNA Sequences in Normal, Potentially Malignant and Malignant *Oral Mucosa. Oral Oncol*, 298,215-211.
- Gorsky M., y Epstein JB. (2011). Oral lichen planus: malignant transformation and human papilloma virus: a review of potential clinical implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,111,461-4.
- Guindon S., Dufayard JF., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., y Gascuel O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59, 307–321.
- Lanfranchi Tizera HE. (2004). Lesiones premalignas o cancerizables de la cavidad oral. *Revista de la Facultad de Odontología UBA*, 19,21-30.
- Mattila R., Rautava J., y Syrjanen S. (2012). Human papillomavirus in oral atrophic lichen planus lesions. *Oral Oncol*,48,980-4.
- Minicucci EM., Weber SAT., Stolf HO y Ribeiro DA. (2008). Oro-genital lichen planus: report of two cases. *Maturitas*,59,201–5.

- Mollaoglu N. (2001). Oral lichen planus: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg Br J Oral Maxillofac Surg*, 39,407.
- OFlatharta C., Flint SR., Toner M., Butler D., y Mabruk MJ. (2003). Investigation into a possible association between oral lichen planus, the human herpes viruses, and the human papillomaviruses. *Mol Diagn*,7,73-83.
- Ostwald C., Rutsatz K., Schweder J., Schmidt W., Gundlach K., y Barten M. (2003). Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. *Med Microbiol Immunol*,192,145-8.
- Picconi MA., Gronda J., Alonio LV., Villa LL., Sichero L., Miranda S.,... y Teyssié A. (2002). Virus papiloma humano en mujeres quechuas jujeñas con alta frecuencia de cáncer de cuello uterino. Tipos virales y variantes de HPV16. *Medicina*,62, 209-20.
- Picconi M, Alonio LV, Sichero L, Mbayed V, Villa LL, Gronda J,... y Teyssié A. (2003). Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina. *J Med Virol*,69, 546-52.
- Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. (2008). *Molecular Biology and Evolution*, 25,1253–1256.
- Rautava J., Syrjänen S. (2012) Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol*, 6, 3–15.
- Sapp, P.J., Eversole, L.R., Wysocki, G. P. (2006). *Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea*. España: Elsevier.
- Smith B., Chen Z, Reimers L., van Doorslaer K., Schiffman M., DeSalle R.... y Burk RD. (2011). Sequence Imputation of HPV16 Genomes for Genetic Association Studies. *PLoS ONE*, 6, e21375.
- Sousa FACG de., y Rosa LEB. (2008). Oral lichen planus: clinical and histopathological considerations. *Braz J Otorhinolaryngol*, 74,284–92.

- Szarka K., Tar I., Feher E., Gall T., Kis A., Toth ED., ... y Gergely L. (2009). Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. *Oral Microbiol Immunol*, 24, 314-8.
- Syrjänen S., Lodi G., von Bültzingslöwen I., Aliko A., Arduino P., Campisi G.,...Jontell M. (2011). Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis*, 17, 58–72.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., y Kumar S. (2011).MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. *Mol Biol Evol*,28, 2731-2739.
- Van der Meij EH., y van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. (2003).*J Oral Pathol Med*,32,507–12.
- Warnakulasuriya S. (2018). Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surgery, Oral Medicin, Oral Pathology and Oral Radiology*,1-32.
- Yamada T., Manos M., Peto J., Greer C., Muñoz M., Bosch X., y Wheeler C. (1997).Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*,71, 2463-72.
- Yildirim B., Senguven B., y Demir C. (2011).Prevalence of herpes simplex, Epstein Barr and human papilloma viruses in oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 16, e170-4.