



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E
INMUNOHISTOQUÍMICO DE LIQUEN PLANO ORAL Y
LESIONES LIQUENOIDES ORALES, Y SU ASOCIACIÓN
CON EL VIRUS PAPILOMA HUMANO”**

TESISTA:

OD. RAMIRO ALEJANDRO TOMASI

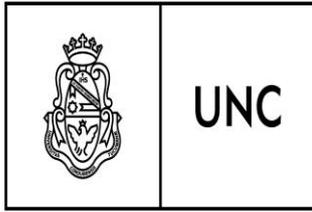
DIRECTOR:

PROF. DRA. RUTH FERREYRA DE PRATO

CÓRDOBA, 2020



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE POSGRADO

**ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LIQUEN
PLANO ORAL Y LESIONES LIQUENOIDES ORALES, Y SU ASOCIACIÓN
CON EL VIRUS PAPILOMA HUMANO**

Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor en Odontología

TESISTA: OD. RAMIRO ALEJANDRO TOMASI

DIRECTORA: PROF. DRA. RUTH FERREYRA DE PRATO

CO-DIRECTORA: PROF. DRA. CECILIA CUFFINI

AÑO 2020

COMISIÓN DE TESIS:

Prof. Dra. María Elisa Dionisio de Cabalier

Prof. Dra. Silvia López de Blanc

JURADO DE TESIS:

Prof. Dra. Silvia López de Blanc

Prof. Dra. María Elisa Dionisio de Cabalier

Prof. Dra. Silvia Carino de Castillo

DEDICATORIA

A mis padres que me dieron todo.

A mi sobrina y Ahijada.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por permitir cumplir mis sueños, guiarme y no abandonarme en los momentos más difíciles.
- A mis abuelos y bisabuela que me apoyaron siempre.
- A mi hermano y a mi cuñada, por su apoyo.
- A la Prof. Dra. Ruth Ferreyra de Prato por formarme y alentarme en este camino y darme buenos consejos siempre.
- A la Prof. Dra. Cecilia Cuffini por su constante guía y ayuda en este trabajo.
- A la Prof. Dra. Silvia López de Blanc y Prof. Dra. María Elisa Dionisio de Cabalier, maestras, que con generosidad y humildad supieron compartir sus conocimientos conmigo.
- A la Prof. Dra. Silvia Carino por sus valiosos aportes y sugerencias.
- A la Od. Juliana Castagno† y Dra. María Baró, por enseñarme tanto en mis primeros pasos en la vida académica.
- A la Od. Mónica Cisneros por su amistad, consejos y momentos compartidos.
- A mi mejor amiga y colega Od. Yamila Zumbay.
- A mis amigos de la Facultad por su sincero apoyo: Mgter. Mauricio Navarro, Esp. Graciela Robledo, Dra. Eugenia Verde.
- A la Dra. Paola Belardinelli, Med. Esp. Marco Mazzotta, TL. Agustina Pereira y Mgter. Raquel Carranza por su ayuda desinteresada.
- A mis compañeros de las cátedras de Anatomía Patológica A y Microbiología e inmunología B y del programa NEXOS.
- A mis amigos de UFMG, Brasil y UDELAR, Uruguay por su colaboración constante: Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca, Prof. Ronell Bologna-Molina, Mgter. Vanesa Pereira-Prado, Mgter. Sara Ferreira dos Santos Costa, Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita, Od. Gabriela Vigil, Lic. Estefanía Silveyra.
- A la ex secretaria de la cátedra: Sra. Elena Nacuse por sus charlas y sus consejos.
- A las secretarías de posgrado Sofía y Liliana.
- A todos mis alumnos y ex alumnos, quienes son el motor para seguir perfeccionándome.
- A todos los que ayudaron en mi trabajo.

CERTIFICADO DEL COMITÉ DE ÉTICA

  COMITÉ INSTITUCIONAL DE ETICA EN INVESTIGACION EN SALUD (CIEIS) FACULTAD DE ODONTOLOGIA. UNC			
Título del Proyecto N° de CIEIS- ODO-PSI. Otros	Estudio citológico, anatomopatológico y filogenético de líquenes orales en asociación con virus del papiloma humano.		
Autor responsable	Ramiro Tomasi		
Director responsable	Dra. Ruth Salomé Ferreira de Prato		
Trabajo Patrocinado	Describir brevemente:		
Doble instancia (genética humana, reproducción humana, estudios farmacológicos en fase I o II y vacunas, investigaciones de alto riesgo, nuevos procedimientos aún no consagrados en la literatura, conflictos de interés o discrepancias)	Describir brevemente:	Fecha de pase de informe y protocolo al COEIS:	Decisión:
Investigación en personas vulnerables (niños, pacientes psiquiátricos, discapacitados, personas privadas de su libertas)	Describir brevemente:	Fecha de pase de resumen de protocolo, consentimiento informado e informe con fundamentos al COEIS:	Decisión:

Investigación en personas no vulnerables	Describir brevemente:	Decisión:
Material biológico de origen humano	Describir brevemente: El objetivo general es detectar en líquenes planos orales, VPH mediante técnica de PCR y analizarlos filogenéticamente.	Decisión: APROBADO
Revisión de historias clínicas	Describir brevemente:	Decisión:
Otros	Describir brevemente:	Decisión:
Observaciones y recomendaciones	Fecha:	
Aprobación del CIEIS	Firma Coordinador (o en su reemplazo quien corresponda)  Dra. Alicia del V. Simbrón Subcoordinadora Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud Facultad de Odontología U.N.C.	Lugar y Fecha Córdoba, 01/04/14
<p>"Se recuerda que el CIEIS sólo realiza la validación ética de protocolos de investigación y quedan fuera de su decisión otras cuestiones metodológicas"</p>		

ÍNDICE

Resumen.....	1
Summary.....	3
Introducción	5
Marco teórico	7
Hipótesis	43
Objetivos	44
Materiales y Métodos.....	45
Resultados	61
Discusión.....	92
Conclusiones	104
Referencias Bibliográficas	107
Anexos	124

ABREVIATURAS

AAOMP: Asociación Americana de Patología Oral y Maxilofacial

CCE: Carcinoma de Células Escamosas

CIN: Neoplasia Cervical Intraepitelial

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CMV: Citomegalovirus

CPA: Célula presentadora de Antígenos

DPM: Desórdenes Potencialmente Malignos

DEO: Displasia Epitelial Oral

EICH: Enfermedad Injerto contra Huésped

HSP: Proteínas de Choque Térmico

LLO: Lesiones Liquenoides Orales

LPO: Liquen Plano Oral

LVP: Leucoplasia Verrugosa Proliferativa

MMP: Metaloproteinasas de la Matriz

MO: Microscopio Óptico

OMS: Organización Mundial de la Salud

TCMH: Trasplante de Células Madre Hematopoyéticas

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

VEB: Virus del Epstein Barr

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

VHH-6: Virus del Herpes Humano tipo 6

VHS-1: Virus del Herpes Simple tipo 1

VPH-AR: Genotipos de alto riesgo

VPH-BR: Genotipos de bajo riesgo

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

VPH: Virus del Papiloma Humano

WB: *Western Blot*

RESUMEN

El correcto diagnóstico de Liquen Plano Oral (LPO) y Lesiones Liquenoides Orales (LLO) genera más controversias que certezas. Se debe a que en algunos estudios, la confirmación diagnóstica se basa únicamente en la presentación clínica sin la ratificación histopatológica o solo con la confirmación histopatológica sin tener en cuenta los aspectos clínicos. Objetivo: Estudiar en liquen plano y lesiones liquenoides orales, marcadores apoptóticos, de proliferación celular y su asociación con la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH). Materiales y Métodos: Se realizó un estudio de tipo retrospectivo observacional descriptivo y transversal. Se conformaron dos grupos; LPO (n: 13) y LLO (n: 32), con tacsos de biopsias de pacientes. Se aplicaron los criterios de van der Meij y van der Waal, y se describieron las características clínicas e histopatológicas de ambas lesiones. Se analizaron biomarcadores de proliferación celular (Ki67) y de apoptosis (Bax y Bcl-2) con técnicas de inmunohistoquímica. Se determinó por PCR la presencia de VPH, se identificó el genotipo mediante RFLP y se realizó el análisis filogenético del VPH 16. Resultados: En el LPO, la bilateralidad y forma en red de las lesiones estuvieron presentes todos los casos, por ser criterios diagnósticos, mientras que en las LLO en el 50% (estadísticamente significativo). Las lesiones elementales más frecuentes, seleccionadas como sitio de toma biópsica, fueron; la erosión en el LPO (38%) y la queratosis en las LLO (47%), $p < 0,002$. En el 38% de los casos de LPO y en el 13% de los casos de LLO, se observó la presencia de cuerpos apoptóticos de Civatte, OR 4,38 (1,01-18,89), $p = 0,05$. En LPO, el 100% de los casos presentaron degeneración hidrópica e infiltrado inflamatorio en banda y ningún caso presentó displasia epitelial (estadísticamente significativo), por ser criterios diagnósticos, mientras que en las LLO el 41% de los casos presentaron degeneración hidrópica, el 69% infiltrado inflamatorio en banda y el 75% displasia epitelial ($p < 0,0001$). El porcentaje promedio de Ki67, fue mayor en LLO (26%) que en LPO (24%). Al aplicar el score de Nakagawa, los casos de LLO mostraron mayor porcentaje score 1 en la capa parabasal ($p = 0,005$). Los pacientes con LLO y VPH positivos, que consumían alcohol, demostraron más inmunomarcación positiva de Bcl-2. El porcentaje de positividad de Bax, fue mayor en la capa basal en LPO (92%) que en las LLO (87%). Las LLO presentaron un mayor porcentaje de infección por VPH (71%) que el LPO (33%). Los genotipos predominantes fueron el VPH 16 en LPO, el VPH 6 y 53 en LLO. Conclusiones: El VPH 16 (genotipo AR) predominó en LPO y el VPH 6 (genotipo

BR) y 53 (genotipo AR) los más predominantes en LLO. Los VPH 16 hallados correspondieron al linaje; Europeo prototipo (LPO) y Europeo Asiático (LLO). Cuando las LLO se infectan por el VPH, en pacientes que consumen alcohol, se observa más antiapoptosis en la capa basal, parabasal e infiltrado, que favorece el acúmulo de mutaciones, junto a un índice de proliferación celular aumentado, podría estar indicando una mayor posibilidad de transformación maligna.

SUMMARY

The correct diagnosis of Oral Lichen Planus (OLP) and Oral Lichenoid Lesions (OLL) generates more controversy than certainties, which is due to the fact that in some studies the diagnostic confirmation is based solely on the clinical presentation without histopathological ratification or only with histopathological confirmation without taking into account the clinical aspects. Aim: To study apoptotic markers, cell proliferation and its association with infection with Human Papilloma Virus (HPV) in lichen planus and oral lichenoid lesions. Materials and Methods: A descriptive and cross-sectional observational retrospective study was conducted. Two groups were formed; OLP (n: 13) and OLL (n: 32) with paraffin blocks from biopsies of patients. The criteria of van der Meij and van der Waal were applied and the clinical and histopathological characteristics of both lesions were described. Biomarkers of cell proliferation (Ki67) and apoptosis (Bax and Bcl-2) were analyzed with immunohistochemical techniques. The presence of HPV was determined by PCR, the genotype was identified by RFLP and the phylogenetic analysis of HPV 16 was performed. Results: In the OLP, the bilaterality and the red shape of the affected lesions present in all the cases, due to the diagnostic criteria while in the OLL in 50% (statistically significant). The most frequent elementary lesions, chosen as the biopsy collection site, were; erosion in the OLP (38%) and keratosis in the OLL (47%), $p < 0.002$. In 38% of the cases of OLP and in 13% of the cases of OLL, the presence of apoptotic bodies of Civatte are presented, OR 4.38 (1.01-18.89), $p = 0.05$. In OLP, 100% of the cases indicated with liquefaction degeneration and inflammatory band infiltrate and no case presented with epithelial dysplasia (statistically significant), as they are diagnostic criteria, while in OLL, 41% of the cases with liquefaction degeneration, 69 % inflammatory band infiltrate and 75% epithelial dysplasia ($p < 0.0001$). The average percentage of Ki67 was higher in OLL (26%) than in OLP (24%). When applying the Nakagawa score, the OLL cases showed a higher percentage score 1 in the parabasal layer $p = 0.005$. Patients with OLL and HPV positive, who consumed alcohol, demonstrated more positive immunostaining for Bcl-2. The percentage of Bax positivity was higher in the basal layer in OLP (92%) than in the OLL (87%), it was not significant. The OLL presented a higher percentage of HPV infection (71%) than the OLP (33%). The predominant genotypes were HPV 16 in OLP, HPV 6 and 53 in OLL. Conclusions: HPV 16 (HR genotype) predominated in OLP and HPV 6 (LR genotype) and HPV 53 (HR genotype) predominated in OLL. The HPV 16 found

corresponded to the lineage; Prototype European (OLP) and Asian European (OLL). When OLL are infected by HPV, in patients who consume alcohol, more antiapoptosis is observed in the basal, parabasal layer and in the infiltrate, which favors the accumulation of mutations, together with an increased cell proliferation index, could be indicating a greater possibility of malignant transformation.

INTRODUCCIÓN

En el campo de la patología oral, ninguna enfermedad genera más controversias que certezas que el Liquen Plano Oral (LPO) y las Lesiones Liquenoides Orales (LLO).

Se ha invertido mucho esfuerzo en la práctica clínica, como en estudios de investigación en estas patologías. Los resultados inconsistentes y opiniones diversas todavía dejan muchas preguntas sin respuestas sobre aspectos relacionados con el diagnóstico, la etiología, la patogenia y el potencial de malignización. Si bien esta situación genera la necesidad de realizar más investigaciones sobre LPO y LLO, un diagnóstico confiable de ambas patologías constituye un reto, fundamentalmente por los desacuerdos entre patólogos y clínicos.

Este debate sobre el correcto diagnóstico de LPO y LLO (1) se debe a las siguientes razones:

- a) En algunos estudios, la confirmación diagnóstica se basa únicamente en la presentación clínica sin la ratificación histopatológica. Por lo tanto, es difícil determinar si los casos son diagnosticados con exactitud.
- b) Muchas otras enfermedades orales pueden mostrar síntomas clínicos y características microscópicas similares a las encontradas en LPO como Leucoplasia Verrugosa Proliferativa (LVP), y en LLO: aspectos liquenoides en Displasia Epitelial Oral (DEO) y en Carcinomas de Células Escamosas (CCE) en particular sus estadios iniciales.
- c) Los subconjuntos de células inflamatorias en el infiltrado pueden ser influenciados por el tipo clínico (reticular vs erosivo), el sitio anatómico (mucosa bucal vs gingiva), o por otro proceso inflamatorio concomitante, por ejemplo; en la forma erosiva del LPO, existe la presencia de neutrófilos relacionada con la pérdida de sustancia que podría alterar las características microscópicas; y del mismo modo, ocurre en lesiones gingivales de LPO que a menudo presentan sobreagregado de células plasmáticas ya que los procesos de gingivitis y periodontitis se asocian a *biofilm* o al cálculo dental.
- d) Otro punto importante es la etiología del LPO. Esta es desconocida, y presenta posibles factores desencadenantes y contribuyentes incluyendo factores locales y sistémicos (que actúan como inductores de hipersensibilidad mediada por células), estrés, respuesta autoinmune a antígenos epiteliales y microorganismos.

Sobre la asociación de estas dos patologías con microorganismos, existen evidencias sobre la relación del LPO y LLO con el Virus Papiloma Humano (VPH) pero aún se discute sobre la etiopatogenia del VPH en el desarrollo del LPO, según diversos autores (2-10).

Sobre el potencial maligno de estas lesiones, existen eventos moleculares y mecanismos implicados en la carcinogénesis tales como actividad de la telomerasa, anomalías citogenéticas, expresión de p53, MDM2, p21, pequeño modificador parecido a la ubiquitina-1 (SUMO-1), antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), región organizadora del núcleo teñidas con plata (AgNOR), Ki-67, Bcl-2, Bax y pérdida de heterocigosidad en el gen supresor de tumores. Sin embargo, los resultados de los estudios no muestran evidencias claras sobre su transformación maligna (1).

En el presente estudio, además de la aplicación de los criterios de diagnóstico para LPO y LLO, modificados de la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuestos por van der Meij y van der Waal (11), se realiza una observación y descripción de las características clínicas e histopatológicas, un análisis de biomarcadores de proliferación celular y apoptosis por medio de inmunohistoquímica en ambas patologías, una descripción de citologías exfoliativas (en aquellos casos que tienen realizada biopsia) y se determina por biología molecular la presencia de VPH en estas lesiones, identificando el genotipo y se completa con el análisis filogenético del VPH16 detectado.

MARCO TEÓRICO

LIQUEN PLANO ORAL

Concepto, Prevalencia y Epidemiología

La designación del LPO fue presentada por primera vez por el médico inglés Erasmus Wilson en 1866. En 1892, Kaposi informó la primera variante clínica de la enfermedad, el líquen *rubé pemphigoides*. Luego en 1895, Wickham observa las líneas blancas reticuladas hoy reconocidas como estrías de Wickham (12).

En la actualidad el LPO es considerado una enfermedad inflamatoria, crónica y posiblemente autoinmune (1,13) que afecta la piel y las mucosas (mucocutánea). Su prevalencia es del 1 al 2% de la población general, con mayor frecuencia en adultos de 30 a 70 años, y marcado predominio en el género femenino (13).

La presentación en niños es rara. Afecta a todos los grupos raciales. Sin embargo, según la literatura, los individuos blancos tienen cinco veces y media más probabilidades de desarrollar esta enfermedad en comparación con otras razas (12).

Etiología y Patogénesis

La etiología exacta del LPO es incierta pero algunos factores están asociados:

- Características genéticas: los casos familiares son raros. Se ha observado una asociación con el Antígeno Leucocitario Humano (HLA); A3, A11, A26, A28, B3, B5, B7, B8, DR1 y DRW9 (12).
- Infecciones virales: recientemente se consideran a los agentes virales: Virus del Herpes Simple-1 (VHS-1) (14,15), Citomegalovirus (CMV) (12,14), Virus de Herpes Humano- 6 (VHH-6) (12,14,15), Virus de Epstein Barr (VEB) (12,15), Virus del Papiloma Humano (VPH) (12, 15, 16), Hepatitis C (VHC) (12,17-19) y Hepatitis B (VHB) (12,19).
- Estrés y factores psicológicos: los factores responsables del desarrollo de LPO son: ansiedad, estrés y depresión (12,18). En el estudio realizado por Chaudhary, se estudiaron factores psicológicos mediante la realización de cuestionarios en pacientes que presentaban LPO y se compararon con pacientes sin lesiones. Los pacientes con LPO presentaron estrés, ansiedad y depresión comparados con los pacientes que no presentaron lesiones en sus mucosas, lo que fue estadísticamente significativo (20).

- Diabetes e hipertensión: estudios demuestran que tanto la presión sanguínea alta y la diabetes mellitus están asociados a LPO lo que conforma el Síndrome de Grinspan (12).
- Patrón vascular: un mayor diámetro o aumento del patrón vascular, podría jugar un rol en la etiopatogenia del LPO, sobre todo en la forma queratósica (21,22).

Otro factor descripto, en algunos estudios, es el hábito de fumar. Aunque no existe una asociación entre el consumo de tabaco y el LPO, en algunas comunidades de la India se ha sugerido como posible factor etiológico ya que el LPO se observa con mayor frecuencia en pacientes que mastican nuez de betel (23,24).

En la patogénesis del LPO existen evidencias que los mecanismos involucrados (14, 25,26) son:

1. Respuesta inmune mediada por células específicas de antígeno.
2. Mecanismos no específicos.
3. Respuesta autoinmune.
4. Inmunidad humoral.

1-El antígeno de LPO es desconocido, aunque podría ser un autopéptido; lo que definiría al LPO como una verdadera enfermedad autoinmune. El antígeno podría ser el queratinocito o bien estar inducido por drogas sistémicas, alérgenos de contacto en materiales de restauración o pastas dentales (reacción de hipersensibilidad de contacto), traumático (fenómeno de Koebner), infección bacteriana o viral, o bien un agente aún no identificado (14,25).

Las proteínas de choque térmico (HSP), están consideradas como probables antígenos en la patogénesis del LPO, pero su sobreexpresión puede ser una vía final común de una variedad de agentes exógenos (drogas sistémicas, contacto con alérgenos, trauma, infección bacteriana o viral). En este contexto, el calor de las HSP expresadas por queratinocitos orales podría ser autoantigénico.

Existen discusiones sobre el número (uno o dos) de antígenos involucrados en el proceso de patogénesis (14,22). Ambas células (T auxiliares CD4+ y citotóxicas CD8+) se activan cuando moléculas del Complemento Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I y II respectivamente presentan antígenos.

Los antígenos que son presentados por el CMH clase II son procesados a través de una vía celular endosomal y los presentados por CMH clase I son procesados a través de una vía celular citosólica. Por lo tanto, el antígeno presentado por el CMH clase II a células T auxiliares CD4+ puede diferir del presentado por CMH

clase I a células T citotóxicas CD8+. Alternativamente, un solo antígeno puede ingresar en ambas vías celulares de presentación de antígenos (14,25).

La inmunidad mediada por células parece jugar un papel importante en la patogenia del LPO ya que la mayoría de células T adyacentes a los queratinocitos basales dañados son CD8+ (14,25).

La respuesta inmune específica en esta patología implica los siguientes pasos:

- I) La migración de los linfocitos T hacia el epitelio donde; al respecto se han propuesto dos hipótesis (14, 25,26): la hipótesis del encuentro fortuito (antígeno pionero), en la cual las células T específicas CD8+ citotóxicas entran de rutina a vigilar el epitelio encontrando el antígeno de casualidad; y la hipótesis de la migración dirigida, en la cual las citoquinas secretadas por los queratinocitos dirigen a las células T a migrar hacia el epitelio.
- II) La activación de los linfocitos T: el infiltrado de linfocitos se compone casi exclusivamente de linfocitos T. La mayoría de linfocitos T dentro del epitelio y adyacentes a los queratinocitos basales dañados son linfocitos CD8+ activados. La unión del antígeno al CMH-1, en el queratinocito, activa directamente las células T CD8+ citotóxicas. La presentación de antígeno CMH-2 puede estar mediada por células de Langerhans o queratinocitos y la unión del antígeno a CMH-2 junto a la secreción de interleuquina 12 (IL-12) activan las células T CD4+ auxiliares. Estos a su vez, activan las células citotóxicas CD8+ por interacción del Receptor de Actividad Citotóxica (RAC), la secreción de IL-12 e interferón gamma (INF- γ) (14,25).
- III) La “matanza” de los queratinocitos: las células T citotóxicas activadas matan a los queratinocitos basales y estas secretan Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNT- α). El mecanismo preciso no está claro pero hay posibles mecanismos de apoptosis de los queratinocitos: a) la unión de FNT- α , secretado por células T, al receptor R1 del FNT- α en la superficie del queratinocito; b) la superficie de CD95L (Ligando Fas) se une a CD95 (Receptor Fas) en la superficie del queratinocito y; c) Granzima B, secretada por células T, ingresa al queratinocito a través de los poros de la membrana inducido por las perforinas. Todos estos mecanismos activan una cascada de caspasas lo que da como resultado la apoptosis de los queratinocitos (14,25).

2-Mecanismos no específicos: algunas de las células T del infiltrado no son específicas. Estos mecanismos están dirigidos al movimiento de linfocitos dentro del epitelio para causar destrucción de los queratinocitos. Los diversos factores propuestos responsables de la respuesta no específica son: la membrana basal epitelial, las metaloproteinasas de la matriz (MMP), quimiocinas y mastocitos (14, 25,26).

Los queratinocitos contribuyen a la estructura de la membrana basal epitelial; secretan colágeno tipo IV y laminina V en la zona de la membrana basal, sin embargo los queratinocitos apoptóticos ya no pueden realizar esta función (Figura 1) por lo que; se desencadena la apoptosis del queratinocito que es provocada por las células T citotóxicas CD8+ intraepiteliales y resulta: en la ruptura de la membrana basal epitelial; esto permite la presencia de linfocitos T no específicos por debajo de la zona epitelial para migrar hacia el epitelio (14,25).

Tanto la apoptosis queratinocitaria como la interrupción de la membrana basal podrían estar involucradas en la patogénesis del LPO; por ejemplo: la ruptura de la membrana basal puede desencadenar la apoptosis de los queratinocitos y los queratinocitos apoptóticos son incapaces de reparar la membrana basal rota. Este mecanismo cíclico, puede ser la base de la cronicidad de la enfermedad (14, 25,26).

Las MMP tienen por función la degradación de las proteínas de la matriz del tejido conectivo. Las gelatinasas (MMP-2 y -9) escinden colágeno tipo IV y las estromelinas (MMP-3 y -10) colágeno tipo IV y laminina (14,25).

La proteólisis de las MMP está regulada por la acción de los inhibidores endógenos, incluyendo los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (ITMP), que forman complejos estables inactivos enzimas-inhibidores con MMP o zimógenos latentes (proMMP). Las MMP-9 liberadas de la célula T activan a proMMP-9 provocando como resultado la ruptura de la membrana basal (14,25).

Un miembro de la familia de quimiocinas CC (quimiocinas beta) llamada quimiocina ligando 5 (CCL5) es producida por varias células como linfocitos T activados, queratinocitos orales y mastocitos, y juega un papel crítico en el reclutamiento de linfocitos, monocitos, células NK, eosinófilos, basófilos, y mastocitos, que posteriormente sufrirían degranulación y se liberaría: FNT- α y Quimasa que a su vez regulan la secreción de CCL5 pudiendo tal mecanismo ser cíclico y explicar la cronicidad del LPO (14,25).

Los mastocitos también podrían estar involucrados en la patogenia del LPO. La degranulación de estos libera una gama de mediadores proinflamatorios como el FNT- α , quimasa y triptasa. El FNT- α puede regular la expresión de moléculas de adhesión celular endotelial (CD62E, CD54 y CD106), que se requieren para la adhesión a la superficies lumenales de los vasos sanguíneos y extravasación posterior de los linfocitos, y regular la expresión de receptor-1 de quimiocinas (CCR1) por un variedad de células inflamatorias (incluyendo células T y mastocitos).

La secreción de CCL5 por células T lesionadas atrae a receptores de quimiocinas (CCR), mastocitos y células inflamatorias desencadenando más degranulación de los mastocitos. Por otro lado, Quimasa (que es una proteasa de mastocitos) es un activador conocido de gelatinasas (MMP-9) por lo tanto la ruptura de la membrana basal puede ser mediada directamente por proteasas de mastocitos o indirectamente a través de la activación de MMP-9 secretada por células T (25).

Tanto el FNT- α como la Quimasa estimulan la secreción de CCL5 por los linfocitos T y estos estimulan mastocitos para liberar FNT- α y quimasa. Esta actividad cíclica es la responsable de la cronicidad del LPO (14, 25,26).

3-Autoinmunidad: se presume que el LPO es una enfermedad autoinmune por muchas características como la cronicidad de la enfermedad, la aparición en adultos, la predilección por el género femenino, la asociación con otras enfermedades autoinmunes y la presencia de clones de células T de autocitotóxicas. Por estas razones, se han propuesto cuatro hipótesis (14):

a) Inmunosupresión deficiente (antígeno-específico) de Factor de Crecimiento Transformante beta-1 (TGF- β 1) (14): la cronicidad LPO podría deberse a un número insuficiente de reguladores Th3 de células T secretoras de TGF- β 1, bloqueo de la secreción de TGF- β 1, secreción de TGF- β 1 no funcional, expresión del receptor TGF- β 1 inadecuada, señalización intracelular defectuosa de los receptores de TGF- β 1. La sobreproducción local de Interferón-c (IFN-c) por células T CD4+ Th1 afecta negativamente el efecto inmunosupresor de TGF- β 1 y positivamente la expresión de CMH clase II, queratinocito y la actividad de células T citotóxicas CD8+.

b) Ruptura del privilegio inmunológico (14): el LPO podría resultar de una falla de los queratinocitos residentes que desencadenan la apoptosis de células T. La actividad de la enfermedad puede ser determinada por el equilibrio entre la apoptosis queratinocitaria disparada por infiltración de células T y apoptosis de

células T desencadenada por queratinocitos residentes. La mucosa oral normal puede ser un sitio inmunológico privilegiado, mediado por el CD95L, expresado por células estromales, que dispara apoptosis de células inflamatorias infiltrantes que expresan CD95. El queratinocito oral, el CD95L o FNT- α desencadenan la apoptosis de células T a través de CD95 o receptor-1 del factor de necrosis Tumoral (TNF-R1), respectivamente, y pueden prevenir la infiltración excesiva de células T en la mucosa oral normal, mientras que la falla de tal mecanismo podría resultar en el desarrollo del LPO y posiblemente de otra enfermedad oral autoinmune.

c) Apoptosis de los queratinocitos y la maduración de las células de Langerhans (CL) estímulos para la maduración de células dendríticas (CD) y de CL incluye: citoquinas inflamatorias (IL-1b, FNT- α), ligando del grupo de diferenciación 40 (CD40L) expresado por células T activadas, células necróticas, proteínas de choque térmico (HSPs), nucleótidos, oxígeno reactivo intermedio, neurotransmisores, MMP-9, productos extracelulares de degradación de la matriz, trauma, varios alérgenos, bloqueo del canal iónico, receptor de agregación Fc, ARN viral y lipopolisacárido bacteriano (14). En circunstancias normales, las Células Presentadoras de Antígenos (CPA) portadoras de autopéptidos, no reciben un estímulo de maduración y por lo tanto no activan una respuesta autoreactiva de células T. Los queratinocitos basales apoptóticos se endocitan seguido de la maduración de las CPA y esto puede activar en forma autoreactiva células T CD4+ que se diferencian en Th1 o Th2 y promover células o anticuerpos mediados por reacciones autoinmunes contra los queratinocitos basales.

d) Proteínas de choque térmico: los queratinocitos en el LPO muestran aumento de expresión de HSPs. La regulación positiva puede ser desencadenada por drogas, infecciones, productos bacterianos y trauma. Las células T proliferan en respuesta a estas proteínas y se sospecha que las proteínas de choque térmico son autoantigénicas para el LPO, aunque el antígeno exacto todavía es desconocido (14).

4-Inmunidad Humoral: se identificaron autoanticuerpos contra desmogleína 1 y 3 que indicaría el papel de la inmunidad humoral en LPO (25).

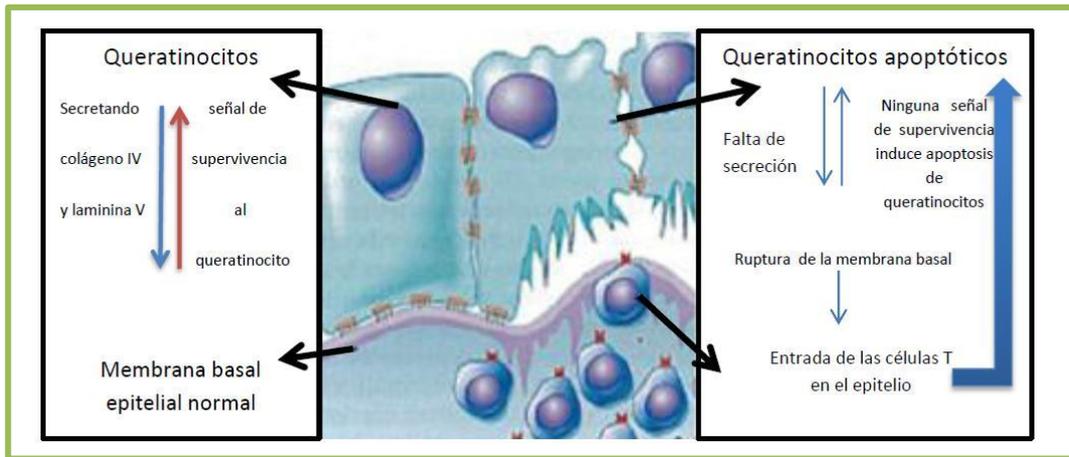


Figura 1. Rol de la membrana basal en la supervivencia de los queratinocitos (Roopashre *et al.*, 2010).

Presentación clínica

De acuerdo con la literatura, el 50% de todos los pacientes con LPO presentan simultáneamente lesiones en piel y mucosas, mientras que el 25% sólo tiene lesiones orales (26,27).

Puede afectar cualquier sitio de la cavidad bucal 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 (28,29).

Las lesiones en el LPO son simétricas, bilaterales o múltiples y tiene una gran variedad de presentaciones clínicas, incluidas las formas reticulares con estrías de Wickham, en placa, atróficas, ampollares y erosivas (13, 27,30-33). Las formas reticulares son las no cancerizables mientras que las en placa, atróficas, ampollares y erosivas corresponden a formas consideradas cancerizables (12).

La forma reticular es la más frecuente y está ubicada en el sector posterior de la mucosa yugal en forma bilateral y generalmente asintomática. La forma erosiva no es tan frecuente como la anterior, pero es más significativa para los pacientes ya que las lesiones son comúnmente sintomáticas mientras que la forma ampollar es rara (12). Algunos pacientes pueden presentar áreas de pigmentación y más de un subtipo simultáneamente. (30,33).

Histopatología

Dubreuilh en 1906, por primera vez, describe la histopatología del LPO y luego Shklar identifica la presencia de paraqueratosis, acantosis, engrosamiento del estrato granular, degeneración hidrópica (licuefacción) de las células basales y crestas epiteliales romas, que en piel se llaman en "diente de sierra o serrucho" y describe las tres características microscópicas clásicas del LPO (34):

queratinización suprayacente, una banda de infiltrado crónico en el tejido conectivo subyacente y degeneración hidrópica (licuefacción) de las células basales. Posteriormente, se describen las células de Langerhans y cuerpos apoptóticos de Civatte presentes en la capa basal (redondos, eosinófilos).

La OMS en 1997 describió las características histológicas halladas en el LPO: hiperqueratosis (ortoqueratinización o paraqueratinización), acantosis, atrofia epitelial, degeneración de licuefacción de células basales, una banda amorfa eosinofílica subepitelial y una densa bien definida de infiltrado de linfocitos en la lámina propia superficial (35).

La degeneración de los queratinocitos basales y la alteración de los elementos de anclaje de la membrana basal epitelial (hemidesmosomas, filamentos, fibrillas) debilitan la interfaz del tejido conectivo epitelial y como resultado pueden formarse fisuras histológicas (espacios de Max-Joseph) que en la clínica se observan en la presentación de LPO del tipo ampollar (12).

La Academia Americana de Patología Oral y Maxilofacial (AAOMP) actualmente describe la presencia de hiperortoqueratosis, hiperparaqueratosis o ambas y estas características se observan histopatológicamente en las formas reticulares mientras que en las otras formas clínicas, se puede observar acantosis, atrofia e incontinencia de melanina (1).

Sapp menciona las características histopatológicas según el tipo de LPO. El LPO reticular presenta áreas focales de hiperplasia epitelial que en cuya superficie existe una gruesa capa de ortoqueratina o paraqueratina, acantosis, crestas epiteliales cortas y puntiagudas (en dientes de sierra), algunas áreas con atrofia, cuerpos amorfos, eosinófilos, redondos u ovalados (cuerpos apoptóticos de Civatte) y en el tejido conectivo un acumulo denso de linfocitos T que atraviesa la membrana basal observándose en la capa basal y parabasal del epitelio (13). El LPO erosivo muestra atrofia epitelial, infiltrado denso de linfocitos T, licuefacción y vacuolización de la basal con destrucción de células basales (13). El LPO queratótico muestra histopatología similar al reticular con áreas de hiperortoqueratosis e hiperparaqueratosis combinadas con acantosis y sin áreas de atrofia epiteliales (13).

En el trabajo de Aguas y Lanfranchi, se describen características histopatológicas del LPO: hiperqueratosis, degeneración hidrópica de la basal, cuerpos de Civatte, infiltrado dérmico yuxtaepitelial (22).

Nuestro equipo en el año 2012, observó la presencia de acantosis, hiperqueratosis, granulosis, degeneración hidrópica de los queratinocitos, infiltrado con dispersión liquenoide y en banda (29).

Diagnósticos diferenciales

El principal diagnóstico diferencial debe realizarse con las LLO debido a sus similares características clínicas como histopatológicas (1,11). El proceso inflamatorio crónico en el LPO puede conducir a la apariencia de trastornos celulares similares a los observados en la displasia epitelial oral (DEO), lo que hace el diagnóstico aún más difícil. Existen otras condiciones clínicas e histopatológicas similares a LPO como lupus eritematoso discoide (LED), candidiasis crónica, penfigoide benigno de las mucosas, eritema multiforme, leucoplasias, eritroplasia, LVP, algunos CCE con aspecto liquenoide (1,14).

Krutchkoff y Fitzpatrick, consideraban que los casos de displasia epitelial tenían hallazgos histopatológicos similares al LPO y era llamada “displasia liquenoide” (35,37). Esta se describía como una condición precancerosa con características liquenoides y la presencia de displasia es la característica principal que diferencia ambas entidades. (36).

Diagnóstico

Algunos autores consideran que las lesiones orales típicas junto a otras manifestaciones extraorales, como son la afección de la piel o de las uñas, suelen ser suficientes para realizar un diagnóstico clínico de la LPO. Sin embargo, aunque cambios citológicos pueden detectarse en LPO, se recomienda la realización de una biopsia ya que es el procedimiento de certeza diagnóstica para diferenciarlo de otras lesiones (12,22).

Los criterios de clasificación para LPO propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1978 (38) son los siguientes:

➤ Criterios clínicos:

- Presencia de pápula blanca, reticular, lesiones tipo placa anular, líneas grises blancas que irradian de las pápulas.
- Presencia de una red similar a un cordón de líneas blancas grises ligeramente elevadas (patrón reticular)
- Presencia de lesiones atróficas con o sin erosión, también ampollas.

➤ Criterios Histopatológicos:

- Presencia de capa ortoqueratinizada o paraqueratinizada en sitios normalmente queratinizados y si el sitio está normalmente queratinizado esta capa puede ser muy fina.
- Presencia de cuerpos de Civatte en la capa basal, epitelio y parte superficial del tejido conectivo.
- Presencia de una banda bien definida como zona celular de infiltración que es confinada a la parte superficial del tejido conectivo, que consiste principalmente en linfocitos.
- Signos de licuefacción-degeneración en la capa basal.

Rad *et al.*, sugiere el uso de los criterios de clasificación de la OMS modificados por van der Meij y van der Waal para el correcto diagnóstico de LPO y LLO (39) y la AAOMP indica que existen mayores acuerdos entre clínicos y patólogos cuando se utilizan estos criterios (1).

Para el diagnóstico de LPO, muchas veces se puede realizar inmunofluorescencia (22). En la inmunofluorescencia directa, los depósitos de inmunoglobulina G y M (Ig G e Ig M) o complemento 3 (C3) no son una característica constante en el LPO (12). En algunos casos, el fibrinógeno y la fibrina se depositan en un patrón lineal en la zona de la membrana basal (12,13). En cambio, la Inmunofluorescencia indirecta resulta negativa y no es una técnica útil para el diagnóstico de LPO (1).

Por otro lado, la microscopía electrónica (ME) se utiliza principalmente como herramienta de investigación pero no de diagnóstico (12,33).

LESIONES LIQUENOIDES ORALES

Concepto, Prevalencia y Epidemiología

Las interacciones farmacológicas que dieron lugar a lesiones orales (clínicamente similares a LPO) fueron mencionadas por primera vez en la literatura por Almeyda y Levantine en 1971 (40). El uso de antimaláricos, quinacrina y metacrina durante la Segunda Guerra Mundial dio lugar a muchos informes del desarrollo de estas lesiones.

El término "reacción liquenoide" fue acuñado por Lind en 1986 y lo asoció al uso de materiales dentales de restauración. El oro se consideraba como el precursor de estas lesiones (41).

Las LLO se asemejan clínica e histológicamente al LPO y se denominan de manera variable como "lesiones liquenoides orales", "reacciones liquenoides orales", "reacciones liquenoides" y "reacciones liquenoides inducidas por fármacos orales" (42) pero el término "Lesiones Liquenoides Orales" parece ser el más adecuado (41).

En las LLO, las mujeres se ven afectadas en el 80,4% y en el rango de los 47 a 55 años (43).

Etiología y Patogénesis

Los factores asociados a las LLO son:

1. Materiales dentales de restauración (1,41,44,45)
2. Drogas y medicamentos (1,13, 41,45).
3. Enfermedad Injerto Contra Hospedador (EICH) (1,41)
4. Otros factores (41)

1-La biocompatibilidad de los materiales dentales depende de su biodegradación y liberación de elementos que pueden o no incitar una reacción adversa (41). Se han postulado dos mecanismos principales para la aparición de estas reacciones adversas:

- A. Reacciones electroquímicas: la interacción entre los materiales dentales, especialmente la amalgama y los fluidos orales, resulta en una degradación estructural de los materiales (41, 44,45). La liberación de subproductos de estas degradaciones desencadena una reacción adversa. La corrosión más severa de las restauraciones de amalgama tiene lugar en fosas y fisuras de los elementos dentarios restaurados (41).
- B. Degradación mecánica de la fuerza: las fuerzas de masticación inducen un desgaste considerable en los materiales dentales. Abrusiones y

fracturas de componentes estructurales de materiales dentales, liberan subproductos que incitan a las reacciones de los tejidos de la mucosa oral generando sinergismos entre las fuerzas electroquímicas y mecánicas (41).

Las reacciones adversas, en los tejidos de la mucosa oral, pueden deberse a la naturaleza tóxica-irritativa del material o alergias. Las lesiones causadas por la naturaleza tóxica o irritante del material dental son una forma de inflamación local inducida por el contacto primario con productos químicos y no están mediadas por linfocitos. Se puede establecer una reacción tóxica crónica debido a la influencia repetida o constante de agentes tóxicos en bajas concentraciones durante largos períodos de tiempo.

Dichas reacciones se localizan con mayor frecuencia en la zona de contacto con el agente tóxico y pueden observarse en áreas de la mucosa oral en contacto directo con las restauraciones (41, 44,45). Por otro lado, las lesiones alérgicas de contacto representan un tipo de reacción de hipersensibilidad retardada mediada por linfocitos que requiere una sensibilización previa al mismo producto químico. El dicromato de níquel, cobalto y potasio fueron informados por algunos autores como los tres sensibilizadores más comunes (41, 44,45).

La literatura informa que la amalgama dental es el material restaurador más relacionado a la inducción de LLO, aunque también se describen casos asociados a *composite*, cromo, cobalto, oro y sustancias usadas en odontología como el eugenol (1,41, 44,45). Los eventos biológicos como la disolución, evaporación, corrosión u otra forma de degradación causan liberación de mercurio de las aleaciones de amalgama, que es absorbido por los tejidos blandos orales, causan efectos tóxicos o alérgicos en individuos sensibilizados (41) aunque se ha reportado la desaparición de las lesiones después de la eliminación de las restauraciones de amalgama (41,45).

Por lo tanto, la etiología de las LLO podría ser una irritación crónica en algunos pacientes o una reacción de hipersensibilidad retardada en otros. Para reacciones de tipo alérgicas, los iones de sales de mercurio como otros metales se liberan, penetran el revestimiento epitelial uniéndose con proteínas de superficie del queratinocito y se genera una respuesta dirigida a los queratinocitos basales.

La fisiopatología de la hipersensibilidad tipo IV es compleja. Las células T citotóxicas CD8+ y las células T auxiliares CD4+ reconocen el antígeno (elementos metálicos en este caso) en un CMH de tipo I o II. Las CPA

normalmente son macrófagos que secretan interleucinas que estimulan la proliferación de más células T CD4+ y estas activadas inducen aún más a la liberación de otras citoquinas tipo 1, mediando así la respuesta del sistema inmune (44).

2- Los primeros casos notificados de LLO, estuvieron relacionados e inducidos por fármacos. Los fármacos más relacionados a la aparición de estas lesiones son los antiinflamatorios no esteroideos y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (12,45-48).

Los medicamentos sistémicos como los antimaláricos (1, 12,49) y los fármacos antihipertensivos (1, 12,50) también están implicados. Los diuréticos, los agentes hipoglucemiantes orales, las sales de oro, la penicilamina (producto de degradación de la penicilina) y los betabloqueantes también se relacionan con el desarrollo de LLO (1, 12, 41,45). En muchos casos, estos medicamentos se usan combinados, lo que sugiere la posibilidad de efectos sinérgicos entre ellos (41).

La patogenia de las LLO inducidas por fármacos aún se desconoce, aunque se presumen diferentes rutas de presentación de (51).

3-La EICH es la complicación más común del trasplante alogénico de células madres hematopoyéticas (TCMH) y se produce cuando las células inmunitarias de los donantes reaccionan a los tejidos del paciente (hospedador) y tratan de destruirlos (41, 52,53).

Un reciente estudio demuestra que las CPA derivadas del hospedador, en lugar de las derivadas del donante, inician la EICH (52) y como consecuencia de esta acción, los órganos del paciente afectan su capacidad para funcionar y aumentan la susceptibilidad del paciente a la infección (41). La EICH generalmente se divide en dos síndromes: agudo y crónico. El agudo ocurre dentro de los tres meses posteriores al trasplante, y el crónico generalmente se desarrolla después del tercer mes posterior al TCMH; los pacientes pueden desarrollar una, ambas o ninguna reacción. Ambos síndromes difieren en sus síntomas, signos clínicos y tiempo de inicio. La forma aguda afecta principalmente la piel, el hígado, la mucosa oral y el tracto gastrointestinal. En contraste, la forma crónica presenta un cuadro clínico mucho más variado que incluye disfunción hepática, fibrosis pulmonar, cambios en la piel, cambios en la mucosa gastrointestinal como en la oral y una disminución en la secreción de lágrimas y saliva (41, 52,53). Las manifestaciones orales ocurren entre un 33 al 75% en los pacientes con EICH aguda y hasta en un 80% en los pacientes con EICH crónica (53) y son lesiones similares al LPO (41).

4- La aparición de LLO en pacientes sin evidencia de asociación con alguno de los factores mencionados anteriormente, se citan factores como cálculo dental, acumulación de *biofilm* y *Candida albicans* (54). El papel de los microorganismos en el desarrollo de las “reacciones liquenoides” aún no están claras y tienen muchos aspectos en común con la reacción de hipersensibilidad retardada que pueden ser provocadas por microorganismos como *Candida albicans*. Este hongo es parte del hábitat oral normal en aproximadamente el 40% de la población y puede ser incluso mayor en pacientes con hiposalivación causada por medicamentos (54).

Presentación clínica y localización

Las LLO presentan características clínicas similares al LPO y se ven como placas, erosiones con presencia de “estrías de Wickham”. Se conoce que las LLO se asemejan a todas las variedades clínicas observadas en el LPO como la reticular, atrófica, erosiva, ampollar y queratósica (41,45). Las LLO generalmente son unilaterales (45,55) y se describen cuatro tipos (55):

- 1) Asociadas topográficamente con restauraciones de amalgamas.
- 2) Relacionadas con fármacos.
- 3) Lesiones liquenoides en enfermedad de injerto contra hospedador (EICH)
- 4) Lesiones eritematosas en encía u otros sitios de la cavidad bucal que tienen un aspecto de líquen plano, pero que les falta uno o más aspectos clínicos característicos, como por ejemplo la bilateralidad.

Las LLO se presentan en el sector posterior de la mucosa bucal (12) y rara vez se observan en sitios como el paladar y la lengua (41,56).

Histopatología

El infiltrado en las LLO es más difuso y extenso con presencia de células plasmáticas, eosinófilos y linfocitos. Hay una tendencia a la conglomeración perivascular de las células inflamatorias, como se observa en muchas reacciones de tipo alérgicas (41,57).

Los cambios epiteliales descritos por Juneja *et al.*, incluyen paraqueratosis focal, interrupción focal de la capa granular y presencia de cuerpos citoides en las capas granular y cornea (58).

No presentan aumento de la vascularización y aumento de la positividad al ácido Peryódico de Schiff (PAS) en la membrana basal (59).

Diagnósticos diferenciales

Diversos estudios demuestran que el principal diagnóstico diferencial de las LLO es el LPO, debido a sus similitudes clínicas como histopatológicas (1, 12,43-45,60-63), y con otras lesiones similares como lupus eritematoso sistémico (LES) o discoide (LED) que pueden presentar características clínicas como histopatológicas similares a las formas atróficas y erosivas del LPO (1,44).

Diagnóstico

Un examen clínico completo de la mucosa oral en el sitio de la lesión y la prueba de parche epicutáneo, para algunos autores, son importantes a la hora de realizar el diagnóstico de LLO (41,57).

La mayoría de los autores destaca que es recomendable realizar una biopsia para el diagnóstico de certeza y así poder diferenciarla de otras lesiones (12, 22,61).

Algunos autores sugieren el uso estricto de los criterios de clasificación de la OMS modificados por van der Meij y van der Waal, teniendo en cuenta las características clínicas como histopatológicas para el correcto diagnóstico de LLO (1,39).

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LPO Y LLO

Son muchos los factores de riesgo que se asocian a LPO y LLO. Entre los más estudiados se encuentran el fumar tabaco, consumir alcohol, y la infección con el VPH.

La combinación de tabaco y alcohol sumado a una deficiente nutrición, microtraumatismos, sepsis bucal y asociación con VPH son factores de riesgo convencionales para la posible transformación de LPO (64).

En el trabajo de tesis doctoral de Alberdi-Navarro (65), se describió un mayor porcentaje de consumo de tabaco en el grupo LPO (21,1%) en relación al grupo LLO (17,6%) aunque no fue estadísticamente significativo ($p=0,554$).

Aghbari *et al*, en su metaanálisis, concluyen que existiría una alta incidencia de transformación maligna en pacientes que fuman y beben alcohol (66).

Lanfranchi *et al*, indican que el trauma crónico produce irritación continua y puede llegar a provocar una solución de continuidad lo que favorece la acción de otros agentes como tabaco, alcohol, *Candida albicans* y VPH (21).

El trauma crónico de la mucosa bucal es un factor actualmente en debate y que se encuentra bajo estudio. Puede definirse como el resultado de una irritación en forma permanente por parte de un agente que puede ser el borde de un elemento dentario en mala posición o con un borde filoso, defectos en la superficie de las prótesis o hábitos parafuncionales, capaces de generar lesiones intrabucales. Este factor puede actuar como promotor en el proceso de transformación maligna, especialmente en localizaciones favorables como borde de lengua y en asociación con otros carcinógenos (67).

En relación a la infección de la mucosa oral por VPH, el estudio realizado por Syrjanen *et al.*, demostró una fuerte asociación entre VPH y LPO debido a las alteraciones que presentaba el epitelio: erosiones o atrofas, que lo hacen ser más susceptible para la infección por VPH (4).

La prevalencia de VPH en LPO, en algunos estudios, es del 15% hasta un 75%, detectándose positivo en las formas erosivas (8,68-72).

MARCADORES MOLECULARES DE APOPTOSIS, PROLIFERACIÓN CELULAR Y POTENCIAL DE CANCERIZACIÓN

Lanfranchi *et al.*, definía como lesiones cancerizables, a los actuales Desórdenes Potencialmente Malignos (DPM), como aquel tejido de morfología alterada con mayor predisposición a la cancerización (superior al 5%) que el tejido equivalente de apariencia normal, independientemente de sus características clínicas o histológicas, reversible y que no implica necesariamente el desarrollo de una neoplasia (21).

Actualmente, la OMS emplea el término DPM a las presentaciones clínicas que conllevan un riesgo de desarrollo de cáncer en la cavidad oral (71).

Los DPM reconocidos por la OMS, en su última publicación, son: Eritroplasia, Eritroleucoplasia, Leucoplasia, Fibrosis Oral Submucosa (FOS), Disqueratosis congénita, Candidiasis crónica, LPO, LES, Glositis sífilítica, Queratosis actínica en labio. No reconoce a las LLO como DPM (71).

Warnakulasuriya propone, además de los DPM mencionados por la OMS, otras entidades como EICH, epidermólisis bullosa y LLO (30).

El riesgo de desarrollo de cáncer en estos pacientes es estimado entre 0,4-6,25% (72-74); siendo los factores decisivos para el desarrollo de cáncer las alteraciones en los mecanismos y porcentajes de la proliferación celular y apoptosis, por lo que podría definirse con la siguiente ecuación: porcentaje (%) de células acumuladas = % de proliferación celular - % muerte celular (75).

El desarrollo de cáncer se evidenciaría en el aumento de la tasa de proliferación celular en células epiteliales de LPO y en el aumento de la apoptosis, como de la proliferación celular simultáneamente (76).

Las técnicas modernas de inmunohistoquímica utilizan anticuerpos monoclonales y policlonales para poder detectar marcadores tisulares que informan: el porcentaje de proliferación como la presencia de apoptosis existente en una determinada muestra de tejido perteneciente a una lesión potencialmente maligna (75, 77,78).

Familia Bcl-2

El gen Bcl-2 codifica una familia de proteínas que se localizan en la membrana externa mitocondrial, en la envoltura nuclear y en el retículo endoplásmico de las células (79,80). La familia de Bcl-2 se divide en dos grupos: proteínas, proapoptóticas como Bax, Bad y Bak, y antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, MCL-1 y A1. (81-83).

Las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas forman heterodímeros en los que se produce la inhibición de la actividad del otro respectivamente. Esta dimerización se ve influenciada por la fosforilación de los residuos terminales de aminoácidos de los miembros proapoptóticos, Bax, Bak y Bik. Así pues, la apoptosis está muy relacionada con la fosforilación de las proteínas de la familia Bcl-2 (81).

El protooncogén Bcl-2 bloquea una vía común de apoptosis, impidiendo que el ADN dañado actúe como una señal de activación de muerte celular programada o mediante el bloqueo de los propios productos de los genes implicados en la muerte celular programada. Por lo tanto, su acción es prevenir la muerte prematura de las células mitóticas y prolongar la supervivencia celular para favorecer la aparición de más mutaciones (84).

Li *et al.*, encontró una sobreexpresión de Bcl-2 en el infiltrado linfocítico de LPO y un aumento en la expresión de Bax en los queratinocitos basales epiteliales comparado con el del grupo control (que incluía pacientes sin lesiones orales). Estas observaciones sugieren un vínculo entre alteración de la apoptosis y carcinogénesis (85).

En el estudio de Pigatti *et al.*, el 92% de los casos de LPO analizados tenían una expresión positiva para Bcl-2 en el infiltrado inflamatorio (86) y en el trabajo de Arreaza *et al.*, concluyeron que Bcl-2 se expresa tanto en LPO como LLO (87).

En la investigación realizada por Leyva-Huerta *et al.*, la inmunexpresión de Bcl-2 fue negativa en todos los casos de LPO (88).

En relación a la proteína Bax, Bascones *et al.*, obtienen como resultado que el biomarcador se expresa en LPO fuertemente positivo (+++) en un 50%, 45,5% y 65% en las capas parabasal, basal e infiltrado respectivamente, lo que fue estadísticamente significativo a nivel de la capa parabasal e infiltrado (89).

Ki-67

Ki-67 es una proteína nuclear no histónica expresada en las células durante las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, M), y ausente en las células en estado de reposo (G0) (77,90). Por lo tanto, Ki-67 puede ser empleada para medir la fracción de crecimiento en tejidos normales y en neoplasias malignas (75).

La capa basal del epitelio oral es la zona donde en condiciones normales se ubica el compartimento celular en proliferación mientras que la capa suprabasal incluye las zonas de maduración celular, por lo tanto la detección de Ki-67 en la capa suprabasal es un indicador objetivo de la presencia de displasia epitelial oral (91).

Desde hace varios años, el LPO es propuesto como modelo inflamatorio preneoplásico. El modelo sugiere que los cambios en las células epiteliales (queratinocitos) es el resultado de la alteración en la replicación celular, el daño al ADN y la desorganización de la integridad epitelial (secundaria al estrés oxidativo), las citoquinas inflamatorias y señales de factores de transcripción, que se originan en el infiltrado inflamatorio (76).

Acay *et al.*, detectaron en el 50% de las células de LPO y LLO, la expresión de Ki-67 (90).

Zargarán determinó que la expresión Ki-67 en LPO es mayor que en la hiperplasia epitelial y similar a la displasia leve (92).

Una revisión realizada sobre marcadores que puedan predecir el potencial maligno de LPO, sugiere que el proceso de malignización se basa en el aumento de la proliferación de las células de la capa basal bajo la influencia de los mediadores liberados del infiltrado inflamatorio que activa diferentes vías y puede conducir al desarrollo tumoral (93).

Se describen dos vías principales de la apoptosis (Figura 2): la intrínseca (mitocondrial) y la extrínseca (receptor de muerte) (93).

Ciertos estímulos, como la hipoxia o los radicales libres, desencadenan el inicio de la vía intrínseca que induce un aumento de la permeabilidad de los poros mitocondriales seguido de la liberación de moléculas proapoptóticas (como el citocromo C y el Factor Inductor de la Apoptosis), desde las mitocondrias hasta el citoplasma celular (93).

El citocromo C activa la procaspasa 9 y da como resultado la formación del apoptosoma. Esta vía está modulada por la familia de proteínas Bcl-2 y proteínas proapoptóticas: Bax, Bak, Bad, Bid y antiapoptóticas: Bcl-xl, Bcl-w, MCL-1 (93). La vía extrínseca implica la unión de receptores de transmembrana (llamados

receptores de muerte), principalmente FNT, receptor Fas y sus correspondientes ligandos: el Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNT- α) y Ligando Fas (FasL) (93). Después de la conexión del ligando al receptor, se reclutan los dominios de muerte: asociado a FNTR (TRADD) y asociado a Fas (FADD). Los complejos formados y asociados con procaspasa 8, resultan en la formación del complejo de señalización que induce la muerte (DISC) y posteriormente activación de la caspasa 8 (93).

El punto final de ambas vías es la activación de las caspasas, lo que lleva a la destrucción celular (93).

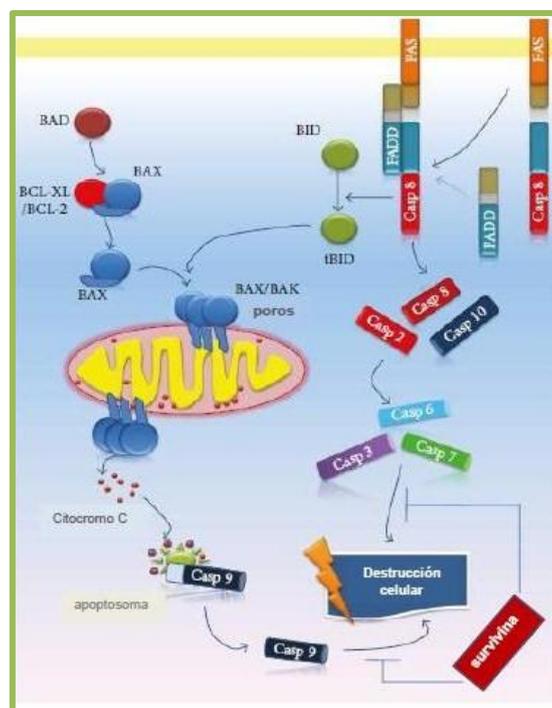


Figura 2. Ilustración esquemática de la apoptosis (Tampa *et al.*, 2018).

Bcl-2 participa en la inhibición de la apoptosis de los linfocitos, mientras que Bax participa en la inducción de la apoptosis de los queratinocitos. La expresión elevada de Bcl-2 promueve la supervivencia de células malignas que predispone a un mayor riesgo de desarrollar nuevas mutaciones (93).

En relación al proceso de apoptosis en el LPO del tipo reticular, un estudio de análisis metabólico (94) muestra que las expresiones anormales de ciertos metabolitos pueden contribuir a este proceso (Figura 3):

1. El aumento en la concentración de serotonina por p-clorofenilalanina puede conducir a la apoptosis.

2. El PE, que es un miembro de fosfatidiletanolaminas, puede causar apoptosis a través de la vía Bcl-2 / Bax.
3. La L-histidina puede inducir apoptosis en el caso de lesión por estrés oxidativo celular.
4. Además de la lesión de ADN, la deficiencia de colina también provoca altas tasas de apoptosis en el organismo.
5. La desregulación de la S-etil isotiourea puede inducir el proceso de apoptosis al aumentar la producción de óxido nítrico.
6. La sobreabundancia de 6,8-dihidroxipurina y L-serina así como la deficiencia de didimina pueden estar involucradas en los procesos de apoptosis.
7. Taurina puede inhibir la apoptosis.

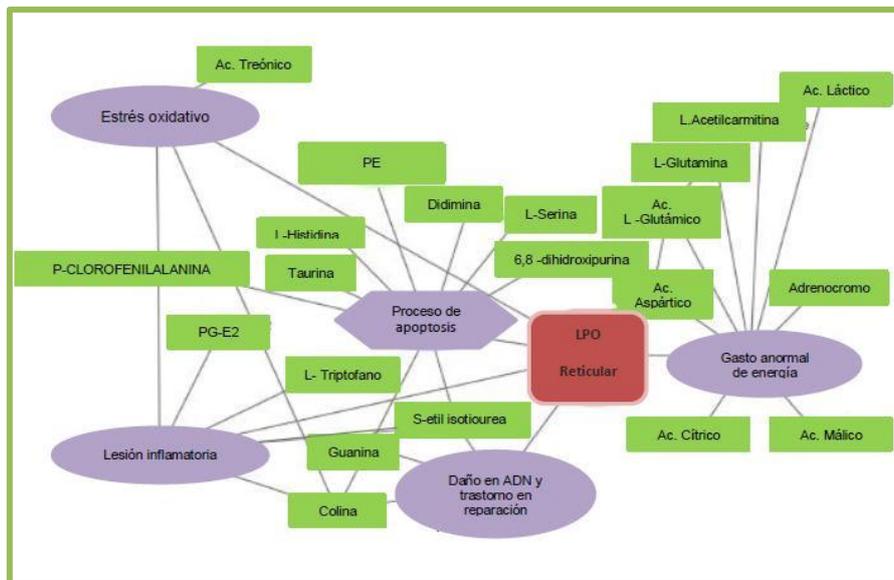


Figura 3: Red patológica asociada a LPO de tipo reticular (Yang *et al.*, 2018).

Ostwald *et al.*, afirman que la infección por VPH, sobre todo por los genotipos 16 y 18, está asociada con el índice de proliferación celular debido a la interacción con proteínas del ciclo celular (70).

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

Reseña histórica

La comprensión actual de la investigación del VPH es el resultado de una larga historia que consiste en importantes innovaciones y contribuciones de científicos del pasado y del presente.

La historia en la investigación de VPH consiste en investigación básica de virología y en una creciente conciencia del VPH como una causa importante de enfermedades humanas emergentes desde finales de los años 70 (95).

En 1942, Parsons y Kidd publicaron su estudio de hitos demostrando que la papilomatosis oral de conejos era una enfermedad viral y describieron los sitios más probables, de la mucosa oral, que podían ser infectados con Virus Papiloma (95).

En 1949, Ayre y Ayre (96) describen la morfología de las "células halo", en técnica de Papanicolaou, frotis y biopsias cervicales, denominándolas originalmente como un complejo de células precancerosas que luego en 1956 Koss y Durfee pudieron confirmar y cambiar su nombre por el de "atipia coilocítica" (97).

Gissmann *et al.*, en 1982 lograron el aislamiento del virus papiloma de una laringe, que hoy recibe el nombre de genotipo VPH 11. Luego Dürst *et al.*, en 1983 logran la caracterización de un nuevo tipo de VPH del cáncer cervical: el genotipo VPH 16, y en 1984, se aísla el genotipo VPH18 caracterizándolo a partir de un carcinoma cervical (95).

La posible asociación de las lesiones orales premalignas y del cáncer oral con el VPH son comunicadas por Syrjanen *et al.*, en 1983. Luego comienzan un número indefinido de estudios sobre esta asociación (98).

En 1985, el ADN del VPH se encuentra en muestras de cáncer. Löning *et al.*, (95) reportaron ADN del genotipo VPH 11 y VPH 16 en el 50% de los carcinomas orales, y de Villiers *et al.*, reportan el genotipo VPH 2 y VPH16 en carcinomas de lengua (99).

Desde principios de la década de 2000, los estudios sobre el VPH y el cáncer de cabeza y cuello aumentaron abrumadoramente con diferentes tipos de muestreos como citologías orales o biopsias con técnicas de diferente sensibilidad y especificidad (95).

En la ciudad de Córdoba, Argentina en los últimos años se han realizado estudios en relación a la presencia de VPH en lesiones orales que detectan

genotipos de VPH de alto y bajo riesgo en DPM (100,102) y estudios de prevalencia de este virus, en nuestro medio, que hallan coinfecciones (101).

Características Generales

Papillomaviridae es una familia de virus pequeños, no envueltos con doble cadena de Ácido desoxirribonucleico (ADN), alrededor de 8.000 pb que infectan los epitelios (epiteliotrópicos) y las mucosas (mucosotrópicos). En la actualidad alrededor de 200 tipos, están secuenciados (103-105).

Estructura genómica

El virus del papiloma tiene un diámetro de 55-60 nm y una cápside viral que consta de 72 capsómeros, ordenados de forma icosaédrica (106).

Las secuencias codificadoras de las proteínas se encuentran en una única hebra de ADN y se denominan tempranas o tardías, debido a que indican el momento de su expresión en el ciclo celular (figura 4).

La hebra simple codificadora del ADN viral del VPH tipo 16, el más conocido, se puede dividir en tres regiones (107):

- Región temprana (E), contiene 8 fragmentos de lectura abierta (ORF), responsables de la regulación de la replicación viral. Los genes E6 y E7 tienen potencial transformador.
- Región tardía (L), consta de dos genes (L1 y L2) cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cápside viral.
- Región no codificante (LCR) o también denominada URR, que no codifica proteínas, pero contiene elementos necesarios para la regulación de la expresión de los genes, la replicación del genoma y su ensamblaje en partículas virales (108) (Figura 4).

La región temprana representa aproximadamente un 45% del genoma viral, la tardía un 40% y un 5% la región no codificante.

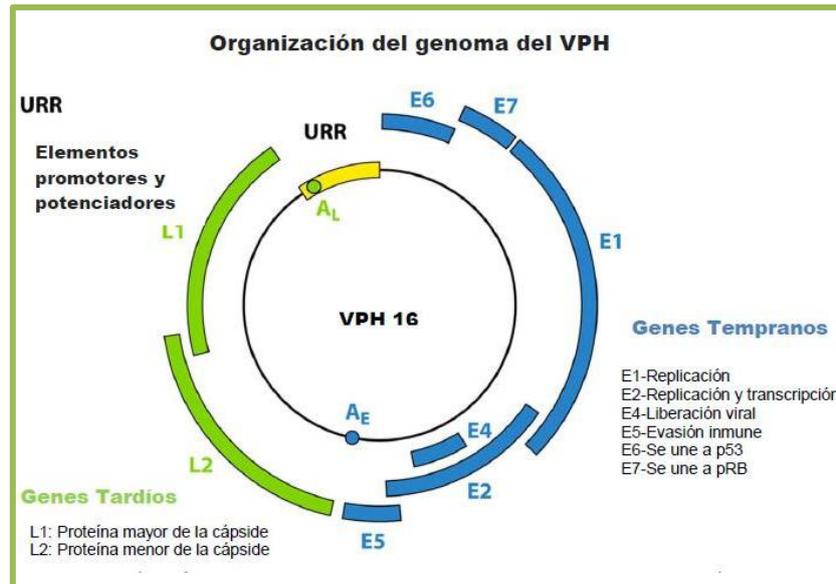


Figura. 4: Organización genómica del VPH 16 (Stanley, 2012)

Los genes de expresión temprana difieren notablemente en la secuencia, entre los diferentes tipos de VPH y los genes de expresión tardía presentan notables similitudes entre ellos. Esta particularidad convierte a estos genes, especialmente a L1 (proteína mayor de la cápside), en la diana principal de la detección de ADN viral por los métodos “consenso”, al contrario de la detección “tipo específica” que utilizará los genes con alta variabilidad intertipo como E6 y E7 (109).

A continuación, se destacan las principales funciones de cada región (Tabla 1):

Tabla 1: Funciones de cada ORF

Región	Función
E1	Es la única enzima viral esencial para la replicación del ADN viral y la amplificación del cromosoma viral en el núcleo de células infectadas(92,100)
E2	Es el regulador maestro del ciclo de vida viral y desempeña papeles clave en la regulación transcripcional, el inicio de la replicación del ADN y la división del genoma viral (103). Reprime a los promotores p97 (VPH 16) y p105 (VPH 18), encargados de la transcripción de las proteínas E6 y E7 (oncogenes virales), reduciendo la síntesis de estas. Interfiere en la síntesis de la proteína p53, lo que produciría finalmente la

	detención del ciclo celular en G1 y la apoptosis (111).
E3	Su función no es conocida, solo está presente en algunos tipos de VPH (112)
E4	Detiene el ciclo celular (113). Interviene en el ciclo celular en G2, a través de la unión a ciclinas y quinasas dependientes. Por bloqueo de E7, lo que altera el soporte estructural del citoesqueleto y produce daño mitocondrial y apoptosis.
E5	Induce a la proliferación celular; inhibe la apoptosis y la migración de CMH a la superficie celular (114).
E6	Induce a la síntesis de ADN y evita la diferenciación celular (112,114).
E7	Induce a la proliferación celular no programada (112,114).
E8	Mantenimiento de la latencia viral (115) en las células del epitelio infectado.
L1	Proteína estructural mayor de la cápside viral. Interacciona con receptores celulares.
L2	Proteína estructural menor. Facilita el ensamblaje de viriones y puede interactuar con receptores de las células. Participa en todo el proceso infeccioso (103).
LCR	No codifica proteínas pero contiene elementos <i>cis</i> necesarios para la regulación de la expresión de los genes, la replicación del genoma y su ensamblaje en partículas virales (108).

Los genes E6 y E7 de VPH16 y 18 son considerados como potentes oncogenes virales, ya que sus productos interactúan con numerosas proteínas celulares lo que induce a la proliferación celular, inmortalización y transformación maligna de las células infectadas (116). Una constante actividad de las oncoproteínas E6 y E7, durante la infección viral provoca una inestabilidad cromosómica severa, la acumulación de mutaciones en oncogenes, pérdida del control de crecimiento celular y finalmente cáncer (117).

Ciclo de vida

El VPH es un virus altamente epiteliotrópico; solo puede causar infecciones productivas en los epitelios estratificados de la piel, tracto anogenital y la cavidad oral.

El establecimiento de la infección por el virus del VPH se realiza según las siguientes etapas (Figura 5):

1-Infección y descubrimiento: la infección inicial requiere acceso de partículas infecciosas en las células de la capa basal. Para algunos tipos de VPH se cree que requiere una ruptura en el epitelio estratificado (118) (leve abrasión o microtrauma).

Aún no se identificó el receptor específico que permite la unión inicial del virus a las células, aunque recientes trabajos sugieren que la internalización de los viriones es un proceso lento y que ocurre mediante la endocitosis de vesículas recubiertas de clatrina (118). Dentro de las vesículas de endocitosis se desarrolla el desencapsulamiento del virus y la posterior liberación del ADN viral, proceso en el que interviene la proteína menor de la cápside viral (119).

2-Mantenimiento del genoma: después de la infección, se cree que el virus mantiene su genoma con un bajo número de copias en las células basales del epitelio. Aprovecha la maquinaria celular para replicarse, y cuando alcanza las células basales, puede permanecer en ellas en forma episomal (no integrado en la célula), en estado latente, o bien abandonar esa latencia y aprovechar la maduración celular propia del epitelio (118)

De este modo, paralelamente a la maduración del epitelio, los VPH expresarán sus genes de forma secuencial: en primer lugar, los genes tempranos (E1- E8), en las capas basales; y posteriormente sus genes tardíos (L1 y L2), en las capas superficiales del epitelio más diferenciado, formarán la cápside y permitirán el ensamblaje de nuevas partículas virales que repetirán el ciclo (95,118).

3-Fase proliferativa: una serie de acontecimientos ocurren durante este proceso de integración viral, entre los cuales se destaca el bloqueo de proteínas con funciones importantes en el ciclo celular como p53 y retinoblastoma (pRB). Como consecuencia, se producen alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio, seguidas de un cúmulo de errores genéticos (clastogénesis) que pueden ser la base de la transformación tumoral (118).

El estado físico del ADN del VPH dentro del núcleo de las células infectadas predice el curso biológico de la lesión inducida por el virus. El ADN viral se encuentra en forma episomal en las lesiones intraepiteliales de bajo grado

(LSIL), mientras que en las lesiones de alto grado (HSIL) y en el cáncer invasor, se encuentra integrado formando parte del genoma celular (120).

La integración del ADN del VPH al genoma celular ocurre en cualquier lugar donde existe fragilidad cromosómica, es decir, no existe un *locus* específico de integración (121). Sin embargo, se conoce que, durante la integración, la secuencia genómica del VPH se interrumpe en la región E1/E2; esto hace que pierda su capacidad de actuar sobre la región control del genoma viral, responsable de que se mantenga reprimida la expresión E6/E7, lo que aumenta así la expresión de estos genes transformantes (122).

Hasta la fecha, las interacciones mejor caracterizadas se producen con las proteínas pRB y p53, las cuales constituyen moléculas fundamentales en el control del ciclo celular.

El producto del gen E6 de los VPH de alto riesgo (AR) interfiere con varias proteínas reguladoras del ciclo celular (116); la más conocida es la unión a la proteína celular E6AP que regula la transcripción en las células proliferantes, lo que ocasiona una degradación proteolítica del gen p53 mediada por la ubiquitina. La unión de E7 a la proteína pRB activa el factor de transcripción E2F, que desencadena la expresión de las proteínas necesarias para la replicación del ADN (95,116). En condiciones normales, la fase S no programada conduciría a la apoptosis mediada por p53; sin embargo, en las células infectadas por VPH, este proceso se bloquea por la proteína viral E6, que provoca la degradación proteolítica de p53 (123).

Como consecuencia, se anula la dependencia del control del ciclo celular y se retrasa la diferenciación normal de los queratinocitos (115).

El proceso de bloqueo de p53 y Rb por los genes virales E6 y E7, conduce a una inmortalización celular; la célula no solamente es incapaz de eliminar el ADN viral, sino que también se ve imposibilitada para corregir errores intrínsecos al ADN celular, de modo que va acumulando alteraciones genéticas de forma progresiva y se convierte en una célula con fenotipo neoplásico (119). Además, E6 también se asocia con otras proteínas proapoptóticas como Bak y Bax (118).

4-Amplificación del genoma: para la producción de viriones infecciosos, deben amplificar sus genomas virales y empaquetarlos en partículas infecciosas. Para VPH de tipo 16,11 y 2, esto ocurre en la parte media o superior de las capas epiteliales, tras un aumento de la actividad del promotor tardío (112) (dependiente de la diferenciación).

Se piensa que la regulación positiva del promotor tardío conduce a una mayor expresión de proteínas involucradas en la replicación del ADN viral (es decir, E1, E2, E4 y E5) sin afectar directamente la expresión de proteínas E6 y E7 que son necesarias para la entrada de la fase S (124).

La amplificación de genomas virales comienza en un subconjunto de células en el compartimento proliferativo y requiere expresión de todos los productos génicos tempranos virales, incluido E4 y E5, cuyos roles en la replicación aún no están completamente comprendidos. Los modelos actuales sugieren que un incremento modesto en la activación del promotor durante la diferenciación puede llevar a un aumento en el nivel de E1 y E2 (también de E4 y E5), y un aumento posterior en el número de copias del genoma (118).

5-Síntesis del virus: los papilomavirus codifican dos proteínas estructurales que son expresadas en las capas superiores del tejido infectado una vez que el genoma viral ha sido amplificado. L2 es producido en un subconjunto de células que expresan E4. La principal proteína de la cápside L1 se expresa después de L2 lo que permite el ensamblaje de partículas infecciosas en las capas superiores del epitelio (125).

Los papilomavirus no son líticos y no se liberan hasta que las células infectadas alcanzan la superficie epitelial; la supervivencia extracelular puede mejorarse si se eliminan dentro de una superficie epitelial cornificada. Se ha sugerido que la proteína viral E4 puede contribuir directamente a la salida del virus en la capa epitelial superior por perturbar la integridad de la queratina (118).

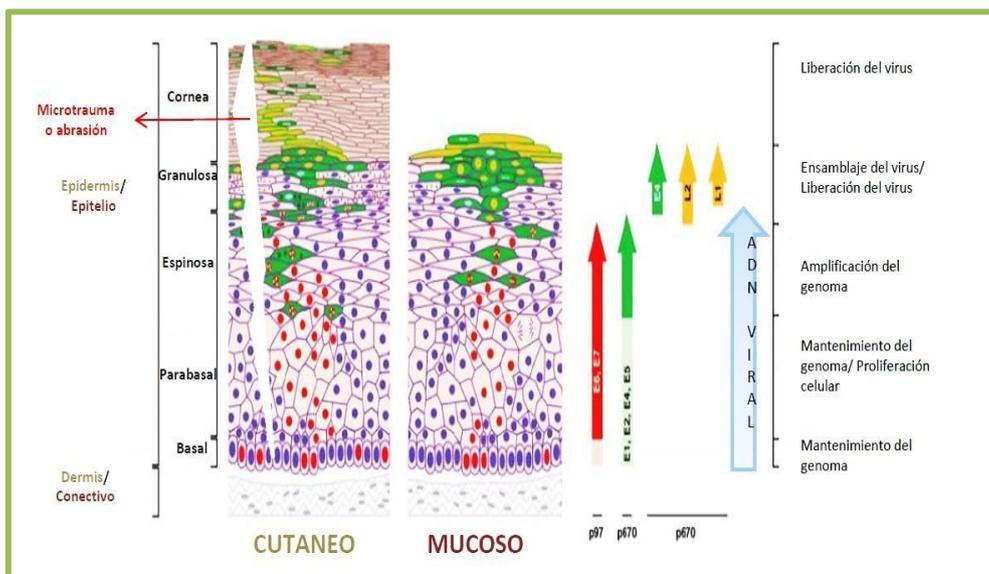


Figura 5. Organización y ciclo de vida del VPH (Adaptado de Doorbar, 2006)

Clasificación del VPH

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, la cual se divide en 39 géneros diferentes, designados cada uno de ellos por una letra del alfabeto griego. Tomando como referencia la secuencia L1 del genoma viral, se define como un género a las secuencias que tengan una identidad nucleotídica mayor o igual al 60%. Dentro de un género, aquellas secuencias genómicas que comparten 60 a 70% de identidad, se denominan especies. Además, dentro de una especie, aquellas con 71–89% de identidad de secuencia L1 se consideran un tipo (126).

Las diferencias entre un 2% y un 10% definirían un subtipo, y las inferiores al 2%, una variante (103).

A partir del año 2016, se identificaron 205 tipos diferentes de VPH, que fueron incluidos en cinco de los géneros ya definidos: 65 *Alphapapillomavirus*, 51 *Betapapillomavirus*, 84 *Gammapapillomavirus*, 4 *Mupapillomavirus* y un solo *Nupapillomavirus*. A su vez, se identificaron al menos 19 tipos adicionales que están actualmente pendientes de clasificación (126).

El género clínicamente más importante es el *Alphapapillomavirus*, que contiene la mayoría de los VPH asociados con lesiones mucosas y genitales. Dentro del género *Alphapapillomavirus* existen diferentes especies, entre las que se destaca la especie 7 que incluye el VPH 18 y la especie 9 que incluye el VPH 16 ambos genotipos oncogénicos (126).

Con respecto a las variantes del VPH, existe un número limitado para cada tipo de VPH y presentan una divergencia máxima cuando pertenecen a grupos étnicos diferentes. El mejor ejemplo para las variantes lo constituye el tipo VPH 16, del cual se conocen cuatro variantes ampliamente estudiadas en su distribución mundial: E (europea), As (asiática), AA (asiática-americana) y Af (africana) (127).

En el estudio de Mosmann *et al.*, en el año 2015, en el árbol filogenético de las secuencias de LCR se encontraron las variantes Europeas (E):54% Ep y 46% Ea, 7% a variantes AF-1 como AF-2 y no se encontraron muestras del linaje AA. En el árbol filogenético de las secuencias E6, las variantes encontradas fueron: E (77% Ep, 33% Ea), 7% variantes AF-1, 7% variantes AF-2 y no se encontraron muestras del linaje AA. En el árbol filogenético de las secuencias LCR-E6, las variantes encontradas fueron: E (77% Ep, 33% Ea), 7% variantes AF-1 y 7% variantes AF-2 y no se encontraron muestras del linaje AA (128).

La clasificación en géneros es útil ya que agrupa virus relacionados filogenéticamente, pero biológicamente distintos. A su vez, la especie reúne tipos virales próximos no solo en su filogenia, sino también en sus propiedades biológicas y patogénicas.

Clasificación según riesgo oncogénico

Los VPH se clasifican epidemiológicamente según su riesgo oncogénico (4, 103, 108, 118,129) en:

- A. VPH de alto riesgo (VPH-AR).
- B. VPH de probable alto riesgo.
- C. VPH de bajo riesgo (VPH-BR).

Dentro del género *Alphapapillomavirus* existen diferentes especies de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico (Tabla 2).

Tabla 2: Riesgo oncogénico de las especies del género alfa de VPH

Especie alfa de VPH	Genotipo de VPH	Riesgo oncogénico
9	VPH52	Alto
	VPH67	Indeterminado
	VPH33	Alto
	VPH58	Alto
	VPH16	Alto
	VPH31	Alto
	VPH35	Alto
11	VPH34	Bajo
	VPH73	Bajo
7	VPH59	Alto
	VPH18	Alto
	VPH45	Alto
	VPH70	Alto
	VPH39	Alto
	VPH68	Alto
	VPH85	Alto
5	VPH26	Alto
	VPH69	Alto
	VPH51	Alto
	VPH82	Alto
6	VPH30	Alto
	VPH53	Alto
	VPH56	Alto
	VPH66	Alto
10	VPH6	Bajo
	VPH11	Bajo
	VPH13	Bajo

	VPH74 VPH44 VPH55	Bajo Bajo Bajo
8	VPH91 VPH7 VPH40 VPH43	Indeterminado Bajo Bajo Bajo
1	VPH32 VPH42	Bajo Bajo
13	VPH54	Bajo
4	VPH57 VPH2 VPH27	Indeterminado Indeterminado Indeterminado
14	VPH71 VPH90	Indeterminado Indeterminado
3	VPH61 VPH72 VPH62 VPH81 VPH83 VPH89 VPH84 VPH86 VPH87	Bajo Bajo Indeterminado Bajo Indeterminado Bajo Indeterminado Indeterminado Indeterminado
2	VPH28 VPH3 VPH10 VPH29 VPH77	Indeterminado Indeterminado Indeterminado Indeterminado Indeterminado

Infección en mucosa oral y asociación con LPO y LLO

Hasta la fecha, la mayoría de la información sobre la infección de VPH en mucosa, proviene de estudios sobre carcinogénesis cervical uterina, porque los pacientes con lesiones de cabeza y cuello que contienen VPH-AR generalmente se presentan con enfermedad avanzada y sólo raras veces con lesiones premalignas (130).

Algunos estudios (131,132) detectaron, en mucosa oral normal, los genotipos: VPH 2, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 31,33 y 35. Sin embargo, el significado del VPH en mucosa aparentemente sana no es conocido aunque pueden tratarse de infecciones transitorias.

En el estudio de Cab-Sánchez *et al.*, sobre epidemiología del VPH, se estudiaron pacientes sanos y se recolectaron muestras de mucosa de pilares amigdalinos, amígdalas, paladar, carrillos, lengua, piso de boca y labios. En todos los casos positivos, los pacientes eliminaron el virus espontáneamente (133).

Algunos estudios han puesto de manifiesto que más de 50% de las infecciones son eliminadas antes de los 12 meses; observándose diferencias entre los genotipos (132,134).

Syrjänen y de Villiers *et al.*, (129,135) afirman que el género alfa del VPH es de gran importancia clínica ya que este género contiene la mayoría de los VPH de la mucosa e incluyen los llamados VPH de bajo riesgo y de alto riesgo. Los VPH-BR de la mucosa, como el VPH 6 y 11, causan papilomas y condilomas, el VPH 13 y 32 causan enfermedad de Heck, mientras que los VPH-AR, como el VPH 16 y HPV 18, causan lesiones intraepiteliales que pueden progresar a CCE. En el estudio de Szarka *et al.*, (136) el VPH se detectó con más frecuencia en casos de DPM y estos autores concluyen que los VPH-BR como VPH-AR se pueden encontrar en DPM.

El metaanálisis realizado por Ma *et al.*, (7) incluye 22 artículos de 12 países de Asia, Europa y Norteamérica. En el mismo, varía la asociación de VPH significativamente según la población geográfica. En Asia, la asociación fue mayor en la India seguido por Turquía, China, Irán y Tailandia mientras que en Europa fue mayor en Alemania seguido por Hungría, Suecia, Inglaterra e Italia. En el mismo metaanálisis, el genotipo VPH 16 fue el más frecuente seguido por el VPH 18 y las formas más asociadas del LPO fueron erosivas-atróficas.

Sameera *et al.*, (6) registraron asociación de LPO con VPH en 13 de los 15 casos con un porcentaje del 86.6%.

Syrjänen *et al.*, mostraron que la asociación del genotipo VPH 16 fue mayor en LPO y en leucoplasias orales (4).

En el año 2003, Oflatharta *et al.*, detectaron el genotipo VPH 16 en el 26,3% de los casos en pacientes con LPO (9) y Campisi *et al.*, indicaron que el rango de prevalencia de los genotipos VPH 16 y VPH 18 en DPM oscila entre 0% al 85% (2).

En nuestro medio (Córdoba, Argentina), Venezuela *et al.*, estudiaron la frecuencia de los genotipos circulantes de VPH en lesiones de la cavidad oral e identificaron los genotipos VPH 6, 11,13, 16, 52 y 61 en DPM. Los genotipos 11,13 y 52 estaban asociados a pacientes con LPO del tipo queratósico (100).

Luego en el año 2018, Criscuolo *et al.*, estudiaron la prevalencia del VPH en la población adulta de Córdoba, Argentina, y fue del 3% (13/401). Todos los genotipos identificados fueron de bajo riesgo y el VPH 11 fue el tipo más frecuente (101).

Recientemente, Mosmann *et al.*, detectaron en DPM los genotipos VPH 6, 11, 16, 31, 53,84 y coinfecciones del VPH 6-11, VPH 11-16, y VPH 16 -53 (102).

En relación con la asociación entre género y VPH, Syrjänen en su estudio sobre cáncer de cabeza y cuello, afirma que la proporción de hombres sobre mujeres es 4:1 (137).

Yildirim *et al.*, en el año 2011, obtuvieron resultados estadísticamente no significativos sobre la asociación del VPH y género en casos de LPO (15).

Un trabajo realizado en Tailandia en el año 2013, que investigó la prevalencia de VPH en LPO, determinó que la proporción de hombre sobre mujeres era 12:25 (138).

En el estudio de Kato *et al.*, sobre la asociación entre VPH y LPO, los porcentajes positivos en hombres y mujeres fueron de 39% y 43.1% respectivamente, lo que no fue estadísticamente significativo (5).

En el estudio de Estrada-Pereira *et al.*, tampoco encontraron prevalencia del VPH en ningún sexo (139).

Métodos de diagnóstico para Virus del Papiloma Humano

Los métodos que se utilizan en la actualidad para el diagnóstico de VPH en general son descriptos desde la ginecología pero algunos se utilizan para cavidad oral (140):

1) Detección de ácidos nucleicos:

- Hibridación *in situ*: es una técnica mediante la cual se identifican secuencias de nucleótidos específicas en las células o secciones de tejido con morfología conservada, lo que permite la precisa localización espacial de genomas diana en el espécimen biológico. Una gran ventaja de la hibridación *in situ* es que puede aplicarse a tejidos fijados y procesados de forma rutinaria, lo que supera la relativamente baja sensibilidad analítica de este método.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): el ADN del VPH se puede amplificar de manera selectiva mediante una serie de reacciones que conducen a un aumento exponencial reproducible en las secuencias virales presentes en el espécimen biológico. Los protocolos más utilizados utilizan cebadores de consenso que se dirigen a la región conservada del gen L1, ya que son potencialmente capaces de detectar todos los tipos de VPH de mucosa. Entre ellos se encuentran los cebadores consenso GP5/6, su versión ampliada GP5 + / 6 +, los

cebadores degenerados MY09/11 y su versión modificada, PGMY09/11 (100-102,128).

El análisis de los productos amplificados se realiza generalmente mediante *dot blot*, hibridación de línea y polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) que en última instancia puede acoplarse con secuenciación directa del ADN (100-102,128).

- PCR en tiempo real (*real time PCR*): es una variante de la PCR, utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN.
 - *Southern* o hibridación *Southern y Northern Blot* o inmunoblot: para el análisis de genomas de VPH, procedimientos de hibridación en fase sólida, como *Southern Blot* para ADN y *Northern Blot* para moléculas de ARN, son excelentes y pueden generar información de alta calidad. Sin embargo, consumen mucho tiempo y requieren grandes cantidades de ácidos nucleicos altamente purificados. Por otra parte, requieren moléculas de tamaño completo bien conservadas y, por lo tanto, no pueden llevarse a cabo en todas las muestras biológicas, particularmente en los derivados de tejidos fijos en los que a menudo se observa degradación del ADN. También son técnicamente engorrosos y no son adecuados para estudios de población a gran escala.
 - Métodos comerciales de hibridación de ácidos nucleicos (*Hybrid Capture*): Este es el único ensayo disponible comercialmente para la detección del ADN del VPH que ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). Es la prueba de VPH más utilizada en entornos epidemiológicos y clínicos. Se basa en la hibridación en solución de sondas largas de ARN sintético que son complementarios a la secuencia genómica de 13 tipos de VPH alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 y cinco tipos de VPH de bajo riesgo 6, 11, 42, 43 y 44.
- 2) Detección de infecciones por ensayos serológicos: la respuesta de anticuerpos a *Papillomavirus* es un determinante clave de la inmunidad protectora. La serología del VPH es también una herramienta epidemiológica importante para el análisis de infecciones pasadas y/o actuales y para la predicción de los cánceres asociados con VPH y sus lesiones precursoras.

- Detección de anticuerpos de la cápside-ELISA: Detecta anticuerpos en sueros humanos y secreciones de la mucosa para los tipos VPH 1, 6, 11, 16 y 18.
- Detección de anticuerpos para E6 y E7: los anticuerpos contra las proteínas E6 y E7 de los tipos VPH-16 y 18 son marcadores de VPH asociados.
- Detección de anticuerpos para E1, E2, E4 y E5: mediante la realización de ELISA o *Western blot*.

Tipificación de VPH

Después de realizar la amplificación, a partir del producto de la PCR de la secuencia genética del fragmento L1 del VPH, se realiza la digestión enzimática con 7 endonucleasas de restricción (BamHI, HaeIII, HinfI, RsaI, DdeI y Sau3 AI/Mbol) que genera una serie de fragmentos, que pueden ser analizados en un gel de electroforesis, lo que produce un patrón de banda particular. Este método sirve para encontrar mutaciones específicas (140-142).

Análisis de las secuencias de VPH

Los primeros trabajos de variabilidad genética se iniciaron con VPH 16, por ser el virus de alto riesgo más prevalente en cáncer de cérvix, a nivel mundial.

El genoma del VPH de referencia se secuenció por primera vez por Seedorf *et al.*, en 1985; fue revisado por Myers *et al.*, en 1995 y se encontraron muchas variantes que ocurrían naturalmente. El primer estudio mundial de las variantes de VPH 16 lo realiza Ho *et al.*, en 1993, quien informó primeramente que las variantes de LCR VPH 16 (elegida por ser la región más variable del genoma) describen un árbol filogenético con cinco ramas principales: dos africanas (AF-1 y AF-2), asiática americana (AA), europea (E) y asiática (AS); el clon referencial queda dentro de la rama E (143).

Se ha propuesto que el origen de las distintas variantes del VPH estaría en concordancia con los patrones de migración humana; los nombres de estas derivan del origen geográfico de la población en la cual son más prevalentes. Así, las variantes de VPH 16 de la rama asiática-americana estarían asociadas a etnias nativas americanas. Por otro lado, las variantes europeas podrían haber llegado a Sudamérica principalmente durante la colonización española (144).

Ho *et al.*, fue quien luego determina que la variante asiática emerge de la rama europea y contiene variantes que son frecuentes en las poblaciones del este de

Asia, por lo que más tarde otros autores (145-147) optan por utilizar un árbol filogenético con cuatro ramas principales: africana 1 (AF-1), africana 2 (AF-2), asiática americana (AA) y europea (E) (la cual incluye a la antes llamada variante asiática). Debido a las escasas diferencias entre las secuencias de las variantes europea y asiática (entre 0.5 a 1%), Smith propone un “sublinaje” dentro de la variante E (europea), a la que denomina Europea Asiática (Ea), diferenciando de esta manera Europea prototipo (Ep) y Europea Asiática (Ea) (147,148).

El aumento en la calidad de las tecnologías de secuenciación de ADN permite una resolución más detallada en cuanto a los diferentes linajes. A su vez, la utilización de secuencias cortas provee evidencia sobre la más fuerte asociación de los linajes no europeos con neoplasias de alto grado y cáncer de cérvix, en referencia al linaje europeo (147,149) aunque las bases genéticas que hacen más carcinogénicas a las variantes no europeas del VPH 16 no se conocen (150).

Existen trabajos realizados en Argentina y en otros países de Sudamérica donde se detectaron amplios porcentajes de variantes europeas en muestras cervicales (128, 151,152).

HIPÓTESIS

“Liquen plano y lesiones liquenoides orales muestran una expresión diferente de proteínas Bcl-2, Bax y Ki-67”.

OBJETIVOS

General

Estudiar en liquen plano y lesiones liquenoides orales, marcadores apoptóticos, de proliferación celular y su infección por el VPH.

Específicos

1. Describir y caracterizar la población de pacientes con liquen plano y lesiones liquenoides orales.
2. Estudiar la presencia de VPH en liquen plano y lesiones liquenoides orales.
3. Describir los cambios histopatológicos, citológicos en liquen plano oral y lesiones liquenoides orales, y en los casos asociados a VPH.
4. Describir el riesgo de hábitos nocivos (tabaco y alcohol) en los casos de liquen plano y lesiones liquenoides orales, y en los casos asociados a VPH.
5. Comparar la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax y Ki-67 en liquen plano y lesiones liquenoides orales, y en los casos asociados VPH.
6. Determinar los diferentes genotipos de VPH presentes en liquen plano y lesiones liquenoides orales.
7. Analizar filogenéticamente el VPH16 presente en liquen plano y lesiones liquenoides orales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud (CIEIS), de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba.

El mismo fue de tipo retrospectivo observacional descriptivo y transversal. Se estudiaron muestras de pacientes cuyas biopsias estaban en tacos (material de archivo) y muestras de citologías exfoliativas recibidos en el laboratorio de Anatomía Patológica, entre los años 2000 a 2017, que fueron enviadas por las cátedras de Estomatología A y B de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

Criterios de inclusión y exclusión:

- **Inclusión:** tacos de biopsias y citologías (en aquellos pacientes que tenían realizada la biopsia) de pacientes que presentaban diagnóstico clínico e histopatológico de LPO o LLO siguiendo los criterios de Van der Meij y Van der Waal, entre los años 2000 a 2017.
- **Exclusión:** aquellos pedidos de examen de anatomía patológica e historias clínicas con datos incompletos, tacos de biopsias o citologías con material insuficiente para su diagnóstico, leucoplasias y otras patologías que presentan manifestaciones clínicas e histológicas similares a LPO y LLO.

MATERIALES

Sobre el total de 192 tacos revisados y una vez aplicados los criterios de inclusión y exclusión, la muestra quedó conformada por;

- Grupo Líquen Plano Oral: 13 casos (tacos de biopsias de pacientes) diagnosticados clínica e histopatológicamente como LPO.
- Grupo Lesiones Líquenoides Orales: 32 casos (tacos de biopsias de pacientes) diagnosticados clínica e histopatológicamente como LLO.

Se conformó un subgrupo con 6 pacientes (1 con LPO y 5 con LLO) que además tenían realizadas citologías exfoliativas.

Los datos de género, edad, sitio de toma de la biopsia, hábitos de riesgo (tabaco y alcohol) síntomas relatados por el paciente y la descripción clínica de las lesiones, se obtuvieron a partir del pedido de examen histopatológico que adjuntaban las biopsias y citologías (anexo 1) entregadas en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina y también se consultaron las correspondientes historias clínicas de los pacientes que acudieron a las Cátedras de Estomatología de la misma Facultad (anexo 2).

Registros de variables

- Género: se consideró femenino (F) y masculino (M).
- Edad: se decidió registrarla arbitrariamente en décadas:
 - Primera década: 10 a 19 años
 - Segunda década: 20 a 29 años
 - Tercera década: 30 a 39 años
 - Cuarta década: 40 a 49 años
 - Quinta década: 50 a 59 años
 - Sexta década: 60 a 69 años
 - Séptima década: 70 a 79 años
 - Octava década: 80 a 89 años
 - Novena década: 90 a 99 años
- Primeros síntomas relatados por el paciente: <6 meses de aparición, entre 6 a 12 meses de aparición, >12 meses de aparición y no valorado (NV) (153).
- Lesiones elementales: se registraron siguiendo la clasificación de Grinspan (154).
- Hábitos de riesgo:

-Alcohol: no bebedor (NB), bebedor (B) o ex bebedor (EXB), no valorado (NV) (153).

-Tabaco: no fumador (NF), fumador (F) o ex fumador (EXF), no valorado (NV) (153).

Estudios histopatológicos

Las biopsias fueron fijadas en formol tamponado al 10 % pH 7,0, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo para técnicas histoquímicas; los cortes fueron de 6 a 8 micrómetros (μm) para Hematoxilina-Eosina (H/E) y PAS, mientras que para inmunohistoquímica (IHQ) fueron; de 5 μm en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Las citologías fueron fijadas en alcohol al 96%, se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se les realizó coloración de Papanicolaou (PAP) en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad antes mencionada.

Finalmente, los vidrios de biopsias y citologías fueron observadas a triple ciego para su diagnóstico al microscopio óptico (MO) en la cátedra de Anatomía Patológica A de la Facultad de Odontología y en la primera cátedra de Patología del Hospital Nacional de Clínicas (HNC) de la UNC.

Diagnóstico clínico e histopatológico de LPO y LLO

Los casos de LPO y LLO se diagnosticaron según los criterios de clasificación clínicos e histopatológicos de la OMS modificados (11) por van der Meij y van der Waal (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios de van der Meij y van der Waal (11)

Criterios Clínicos	Criterios Histopatológicos
<p>→ Presencia bilateral, más o menos lesiones simétricas.</p> <p>→ Presencia de un patrón en red de encaje de líneas blanco-gris ligeramente elevadas (patrón reticular).</p> <p>→ Lesiones erosivas, atróficas, ampollares y tipo placa; serán solo aceptadas como un subtipo en la presencia de lesiones reticulares en otras partes de la mucosa oral.</p> <p>En todas las otras lesiones que se asemejan a LPO pero que no completen los criterios antes mencionados, debe ser utilizado el término “clínicamente compatible con”.</p>	<p>→ Presencia de una banda bien definida como zona de infiltrado celular linfocitario que se limita a la parte superficial del tejido conectivo.</p> <p>→ Signos de degeneración hidrópica en la capa basal.</p> <p>→ Ausencia de displasia epitelial.</p> <p>Cuando las características histopatológicas son menos evidentes, debe ser utilizado el término “histopatológicamente compatible con”.</p>
<p style="text-align: center;">Diagnóstico Final de LPO;</p> <p>Para lograr un diagnóstico final clínico como histopatológico deben ser incluidos los siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 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: <ol style="list-style-type: none"> 1. Clínicamente típico de LPO pero histopatológicamente solo “compatible con LPO”. 2. Histopatológicamente típico de LPO pero clínicamente solo “compatible con LPO”. 3. Clínicamente “compatible con LPO” e histopatológicamente “compatible con LPO”. 	

Diagnóstico histopatológico de Displasia Epitelial Oral

La displasia epitelial, se diagnosticó siguiendo la clasificación tradicional de la OMS 2005 (155), dividiendo el epitelio en tres tercios:

- A. Leve: alteración arquitectónica presente limitada en el tercio inferior del epitelio acompañada de atipia citológica.
- B. Moderada: alteración arquitectónica que se extiende hasta el tercio medio del epitelio.
- C. Severa: alteración arquitectónica en más de dos tercios del epitelio con atipia citológica asociada.

Además, se utilizó el sistema binario de la OMS 2017 para categorizar la displasia epitelial (71):

- A. Displasia de bajo grado (incluye la displasia leve).
- B. Displasia de alto grado (incluye la displasia moderada y severa).

La atipia arquitectónica y citológica, y la arquitectura de la interfaz del tejido conectivo, aumentaron el grado de displasia. Una marcada atipia en el tercio basal del epitelio fue suficiente para un diagnóstico de displasia severa. Si bien, actualmente, la OMS considera que el carcinoma *in situ* es sinónimo con displasia severa, en el presente estudio al usar la clasificación tradicional de tres categorías; se diferenció la displasia severa del carcinoma *in situ*.

Los criterios diagnósticos (71) utilizados para la displasia epitelial fueron los siguientes (Tabla 4):

Tabla 4. Criterios diagnósticos para displasia epitelial (WHO, 2017).

Cambios Arquitectónicos	Cambios Citológicos
<ul style="list-style-type: none"> ● Estratificación irregular epitelial ● Pérdida de polaridad de células basales ● Crestas epiteliales en forma de gota ● Número de figuras mitóticas aumentadas ● Figuras mitóticas superficiales anormales ● Queratinización individual en células ● Perlas córneas dentro de crestas epiteliales ● Pérdida de cohesión de células epiteliales 	<ul style="list-style-type: none"> ● Variación anormal del tamaño nuclear ● Variación anormal de la forma nuclear ● Variación anormal del tamaño celular ● Variación anormal de la forma celular ● Relación núcleo-citoplasma aumentada ● Figuras mitóticas atípicas ● Aumento del tamaño y forma de los nucléolos ● Hiperchromasia

Diagnóstico de citologías exfoliativas

Los diagnósticos de las citologías exfoliativas fueron realizados siguiendo el sistema de clasificación para los hallazgos citológicos de Papanicolaou (156):

- Grado I: Ausencia de células atípicas o anormales (normal).
- Grado II: Citología atípica pero no evidencia de malignidad (inflamatorio).
- Grado III: Citología sugestiva, pero no concluyente de malignidad.
- Grado IV: Citología fuertemente sugestiva de malignidad.
- Grado V: Citología concluyente de malignidad.

Cambios histopatológicos

Los cambios histopatológicos estudiados fueron los siguientes (13, 31,157):

- Hiperqueratosis: aumento del espesor de la capa córnea con queratinización incompleta con núcleos picnóticos en la capa córnea (hiperparaqueratosis) o queratinización completa de las capas superficiales sin núcleos (hiperortoqueratosis).
- Atrofia: disminución del espesor normal del epitelio. Hay poca queratinización en la superficie y el estrato córneo tiende a mezclarse con el estrato espinoso.
- Acantosis: aumento del espesor del estrato espinoso.
- Granulosis: aumento del espesor de la capa granulosa.
- Degeneración hidrópica (licuefacción) de la basal: degeneración hidrópica de los queratinocitos.
- Cuerpos apoptóticos de Civatte (31): estructuras eosinófilas, redondeadas o lobuladas que a veces contienen núcleos picnóticos o fragmentos nucleares localizados principalmente en la capa basal. Serían los queratinocitos basales que han sufrido necrosis prematura por la degeneración hidrópica de las células basales.
- Infiltrado linfocitario en banda (yuxtaepitelial): infiltrado con un patrón “en banda” a lo largo de la unión epitelio-tejido conjuntivo, directamente debajo de la membrana basal.
- Displasia epitelial (71): cambio del epitelio caracterizado por una combinación de alteraciones arquitectónicas y citológicas.

En los casos VPH positivos se tuvieron en cuenta especialmente los siguientes cambios:

- Papilomatosis: elevación de la superficie causada por hiperplasia y alargamiento de las papilas dérmicas (157).
- Imágenes tipo collocíticas: células grandes con núcleos relativamente pequeños, irregulares e hiper cromáticos, con citoplasma claro (95,156).

Recolección de las muestras

Se realizó el raspado de la lesión mediante citobrush, la muestra se colocó en tubo cónico estéril con 2-5 ml con solución buffer fosfato (PBS), y se conservó en freezer a 4°C.

MÉTODOS

Las técnicas histológicas se realizaron en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Técnicas Histoquímicas

Para la coloración H/E (158):

1. Se desparafinaron las láminas e hidrataron hasta llegar al agua.
2. Se tiñeron en la solución de hematoxilina de Mayer durante 15 minutos.
3. Se lavaron con agua corriente apenas tibia por 15 minutos.
4. Se colocaron en agua destilada.
5. Se colocaron en etanol al 80% durante 2 minutos.
6. Se contrastaron en solución de eosina-floxina por 2 minutos.
7. Se deshidrataron y aclararon a través de dos cambios cada uno de 95% de etanol, etanol absoluto y xileno, 2 minutos cada uno.
8. Se montaron en medio resinoso (bálsamo).

Para la coloración PAS (158):

1. Se desparafinaron las láminas e hidrataron hasta llegar al agua destilada.
2. Se oxidaron en la solución de ácido peryódico durante 10 minutos.
3. Se enjuagaron en agua destilada.
4. Se colocaron en el reactivo de Schiff de Coleman durante 15 minutos.
5. Se lavaron con agua corriente tibia durante 10 minutos.
6. Se contrastaron con la solución de hematoxilina de Mayer durante 15 minutos.
7. Se lavaron con agua corriente durante 15 minutos.
8. Se deshidrataron y aclararon a través de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno. dos cambios, 2 minutos cada uno.
9. Se montaron en medio resinoso (bálsamo).

Para coloración PAP (156,158):

1. Se desparafinaron las láminas e hidrataron hasta llegar al agua destilada.
2. Se oxidaron en la solución de ácido peryódico durante 10 minutos.
3. Se enjuagaron en agua destilada.
4. Se colocaron en el reactivo de Schiff de Coleman durante 15 minutos.
5. Se lavaron con agua corriente tibia durante 10 minutos.
6. Se contrastaron con la solución de hematoxilina de Harris durante 6 minutos

7. Se lavaron con agua corriente durante 15 minutos.
8. Se deshidrataron y aclararon a través de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno. 2 cambios, 2 minutos cada uno.
9. Se montaron en medio resinoso (bálsamo).

Técnicas de Inmunohistoquímica

Las técnicas de inmunohistoquímica se realizaron en forma manual en pasantías de formación y entrenamiento realizadas en el Laboratorio de Patología Molecular Estomatológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República, Uruguay (UDELAR), en el laboratorio de Inmunohistoquímica y de Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil (UFMG).

Para las técnicas de IHQ se utilizaron los siguientes anticuerpos (Tabla 5):

Tabla 5. Descripción de reactivos utilizados para identificar los biomarcadores estudiados.

Ac	Tipo	Clon	Isótopo	Catálogo N°	Tipo de Ac	Dilución	Localización
Bax	conejo policlonal	3533	IgG	A3533 DAKO	Concentrado	1:50	Citoplasma Membrana celular
Bcl-2	ratón monoclonal	100/D5	IgG/ kappa	ACR003AC Biocare	Concentrado	1:50	Citoplasma
Ki-67	conejo monoclonal	SP6	IgG	M3064 Spring Bioscience	Concentrado	1:100	Nuclear

AC: Anticuerpo

En los marcadores Bcl-2 y Bax se utilizó el procedimiento del complejo Avidina-Biotina con pretratamiento de las muestras, y en el marcador ki-67 el procedimiento con *kit* libre de biotina.

Como control positivo para Bcl-2 y Bax, se utilizó un corte de amígdala mientras que para Ki-67 se utilizó un corte de linfoma. Como control negativo se utilizó la sustitución de los anticuerpos primarios con *Buffer* Fosfato Salino (PBS) o *Buffer* Tris Salino (TBS).

Protocolo de IHQ para biomarcadores Bcl-2 y Bax (FO/UDELAR)

1. Las láminas fueron desparafinadas en la estufa a 60°C durante 60 minutos.

2. Se colocaron en xilol por 5 minutos solamente un baño.
3. Las láminas se hidrataron en un tren de concentraciones decrecientes de alcoholes (absoluto, 96, 80, 70 y 50 %) mediante quince baños y fueron lavados con agua destilada.
4. Recuperación antigénica: se colocaron las láminas desparafinadas e hidratadas en vasos *coplin* de plástico con la solución recuperadora de citrato de sodio 10 milímetros (mm) pH 6,2. Estas fueron colocadas dentro de una olla a presión con agua destilada durante 5 min y dentro del microondas a 450 watt (W) durante 6 minutos (esperar el punto de ebullición).Luego se dejó enfriar durante 8 a 10 minutos y se dejó reposar en agua 10 minutos.
5. Se realizaron tres cambios con agua destilada o PBS durante el lavado de las láminas.
6. Peróxido de hidrógeno al 0,9% durante 5 minutos, seguido por tres lavados con agua destilada.
7. Montaje de los *coverplates* y *rack*: se montaron las laminillas en placas de cubiertas y se colocaron en bastidores para la realización de inmunohistoquímica por capilaridad.
8. Bloqueo de las peroxidasa con *kit* durante 5 minutos.
9. Se colocó PBS durante 5 minutos y se incubó el anticuerpo primario monoclonal por un período de 45 minutos.
10. Se colocó PBS durante 5 minutos y se incubó el anticuerpo secundario biotinilado
11. Se colocó PBS durante 5 minutos y el complejo streptavidina/peroxidasa por 30 minutos cada uno.
12. Se colocó PBS durante 5 minutos y los productos de la reacción fueron visualizados con sustrato de 3,3'-diaminobenzidina-H₂O₂ (DAB) controlando en el microscopio óptico y colocando agua.
13. Descontaminación de mesada y del microscopio óptico con Hipoclorito.
14. Se colocaron las laminillas en canastillas y se realizó coloración con Hematoxilina de Mayer durante 30 segundos.
15. Se realizó lavado con agua corriente y diez baños en hidróxido de amonio.
16. Se realizaron tres baños en agua corriente y luego se deshidrataron hasta llegar al alcohol 100%.

17. Se dejaron secar, se montaron en solución a base de polímeros de xileno y cubreobjetos.

Protocolo de IHQ para biomarcador ki-67 (FO-UFMG)

1. Las láminas se colocaron el día anterior en Xilol *overnight* durante 15 horas.
2. Se colocó en un segundo paso en Xilol durante 5 minutos.
3. Se secaron bien las láminas para no contaminar.
4. Se pasaron en el tren de alcoholes de concentraciones decrecientes de alcoholes (absoluto, 96%, 80%, 70% y 50 %).
5. Se realizaron 5 baños de agua destilada.
6. Recuperación antigénica: se colocaron en baño maría 96°C y se controló con termómetro durante 30 minutos con ácido cítrico (la temperatura ideal es de 94-100°).
7. Se dejaron enfriar en agua durante 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Se realizaron 5 baños de agua destilada.
9. Se preparó la cuba húmeda (con agua destilada en el fondo), se delimitaron los cortes con lápiz, se secaron detrás de la lámina con gasa y adelante, en los excesos, con papel absorbente.
10. Se incubaron con peróxido de hidrógeno durante 10 minutos .Se colocó el peróxido de hidrógeno en el área delimitada con el lápiz y se las dejó en la cuba húmeda.
11. Se realizó un baño con trisaminometano-TRIS HCL (solo se lavó) y luego se realizaron dos baños con TRIS HCL durante 5 minutos.
12. Se colocó la solución de bloqueo (*kit*) 10 minutos en cuba húmeda cerrada.
13. Se realizó un baño con TRIS (solo se lavó) y un baño con TRIS durante 5 minutos.
14. Se incubó el anticuerpo primario durante 60 minutos.
15. Se realizaron tres baños de TRIS durante 5 minutos.
16. Se incubó el anticuerpo secundario durante 10 minutos.
17. Se secó el exceso con papel absorbente.
18. Se Incubó con revelador *spring* HRP conjugado durante 15 minutos.
19. Se realizaron tres baños con TRIS durante 5 minutos
20. Se colocó la coloración con DAB *kit*.
21. Se lavó con TRIS y se realizaron cinco baños con agua destilada.

22. Se realizó la contra coloración con hematoxilina durante 30 segundos.
23. Se realizaron cinco baños de agua destilada
18. Se deshidrataron hasta llegar al alcohol 100%.
24. Se realizó el montaje de las láminas.

Interpretación de la inmunomarcación para Ki67

En la interpretación del biomarcador Ki67 fueron considerados como positivos: núcleos de células teñidas de color marrón independientemente de la intensidad de tinción, siguiendo el método propuesto por Bologna-Molina *et al.* (159). Se registró también si las células teñidas estaban en la capa basal, parabasal o en el infiltrado de LPO y LLO.

Conteo celular para ki67

Para realizar el conteo celular en Ki67 (159), las fotografías fueron tomadas con microscopio ZEISS PRIMO STAR y cámara AXIOCAM ERc5s ZEISS, en la primera Cátedra de Anatomía Patológica del Hospital Nacional de Clínicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. El conteo celular se realizó en forma manual, por dos observadores calibrados, en la cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba.

Cada lámina se colocó en el microscopio óptico y se observó en el objetivo 40x. Se tomaron, de las zonas más representativas, cinco fotos de cada lámina y se almacenaron imágenes digitales como archivos jpeg. Cada archivo se abrió con el programa Microsoft Office PowerPoint™ (*Microsoft Corporation*, Redmond, WA, USA) y se utilizó la función "tabla" colocándose una cuadrícula 6x6 sobre la imagen. La cuadrícula se divide en 36 cuadrados con las mismas dimensiones.

Para cubrir completamente la imagen inmunohistoquímica, la grilla fue agrandada y las áreas que no pertenecían al tejido de interés fueron visualmente excluidas. En cada imagen, el recuento de células se inició en el marco superior izquierdo y terminado en el marco superior derecho, siguiendo las flechas. Células negativas y positivas fueron contadas manualmente en cada imagen y en cada cuadro (Figura 6).

Para obtener los porcentajes de la capa basal, parabasal e infiltrado se operó de la misma manera: se dividió la cantidad de células positivas de cada capa por el total de células y se multiplicó por 100, como se mostró en la figura 5.

Los casos con porcentajes de proliferación celular mayores al promedio de cada grupo (LPO y LLO) fueron considerados arbitrariamente de alto índice de proliferación (AIP) y los menores al promedio de cada grupo de patologías fueron considerados arbitrariamente de bajo índice de proliferación (BIP).

Se aplicó también el score de Nakagawa *et al.*, (160) para registrar positividad de Ki-67 (tabla 6).

Tabla 6. Score para Ki-67 (Nakagawa *et al.*, 1994).

Score	Porcentaje	Interpretación
0	<5	Negativo
1	5-25	Leve
2	26-50	Moderado
3	>50	Severo

Categorización del índice de proliferación de Ki67

Se obtuvo la media del porcentaje total en cada grupo de patologías estudiadas. Un porcentaje igual o mayor a la media del grupo, se lo consideró como alto índice de proliferación (AIP) celular total. Cuando el porcentaje fue menor a la media del grupo, se lo consideró como bajo índice de proliferación (BIP) celular total en cada caso.

Interpretación de inmunomarcación Bax y Bcl-2

En la interpretación de los biomarcadores Bax y Bcl-2 en los casos de LPO y LLO, fueron considerados positivos por la intensidad de tinción de color marrón que presentaba el citoplasma y membrana celular en la capa basal, parabasal e infiltrado. Se siguió el método de Hercep-TestTM de Dako que es utilizado para cáncer de mama y fue realizado por dos observadores calibrados previamente

Conteo celular para Bax y Bcl-2

El conteo celular se realizó en forma manual usando un microscopio óptico a doble ciego en la Cátedra de Anatomía Patológica A de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Primero se observó el preparado en 4x (para corroborar su marcación), luego en 10x (para verificar la intensidad e integridad de la marcación) de las zonas bien teñidas. En los casos con dudas entre score: 1+ y 2+, se usó 20x o 40x.

Tabla 7. Score utilizado para Bax y Bcl-2 (Hercep-Test, Dako)

Score	Expresión	Patrón de inmunomarcación (Figura 8)
0	Negativo	No se observa marcación o se observa marcación de la membrana en <10% de células.
1+	Negativo	Se detecta marcación débil apenas perceptible en la membrana en >10% de células. Las células muestran marcación incompleta de la membrana.
2+	Débilmente positivo	Se observa una marcación de membrana completa débil o moderada en >10% de células (aunque las demás no estén marcadas).
3+	Positivo	Se observa una fuerte marcación de la membrana en >10% de las células.

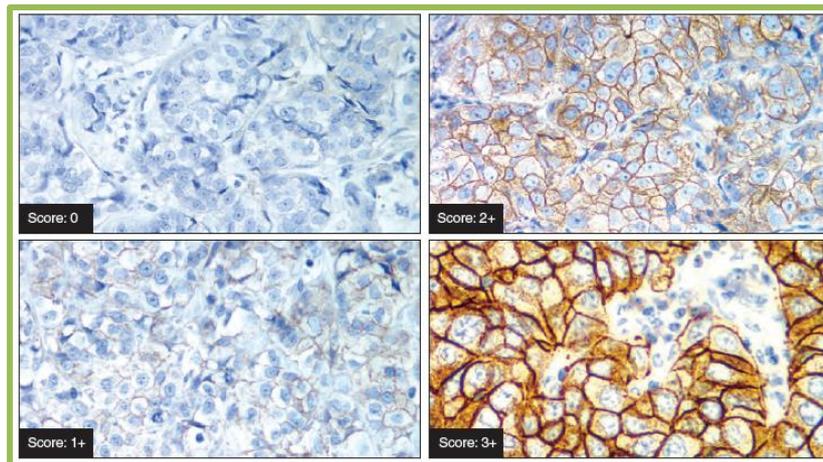


Figura 8. Ejemplos de patrones de inmunomarcación en tejido (Hercep-Test, Dako).

Detección de VPH

La detección de VPH se realizó en el Laboratorio de Clamydia y Virus del Papiloma Humano del Instituto de Virología Dr. José María Vanella (INVIV) de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Se realizó una extracción de ADN genómico utilizando AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer) a partir de las muestras obtenidas para PCR usando los cebadores MY11 y MY09 que amplifican un fragmento de 450 pb de la región conservada L1 del virus (142).

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, California, USA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (127,131).

La genotipificación del VPH se realizó por RFLP con 7 enzimas de restricción: Bam H1, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, Sau3 AI. El resultado da un patrón en banda característico (161).

Se alinearon las secuencias de ADN empleando el programa Clustal X (162,163). Las secuencias fueron utilizadas para genotipificación por método filogenético o la herramienta de genotipificación viral del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>).

Análisis filogenético

Las secuencias de la región E6 amplificadas fueron alineadas usando el programa MEGA versión 5 (164). Para el análisis filogenético se estimó el modelo apropiado utilizando el programa *jModel Test* versión 0.1.1 (166); se construyó el árbol por máxima verosimilitud, utilizando el software PhyML versión 3.0 (166), el cual fue evaluado bajo el procedimiento de *bootstrap* con 1000 pseudoréplicas (161).

Las secuencias patrones para la realización del árbol filogenético fueron tomadas de Smith et. Al, 2011(147). Los números de acceso a GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/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 (167).

Análisis estadístico

Los datos cualitativos se expresaron en porcentajes de frecuencias. Los datos cuantitativos se describieron utilizando valores medios.

La información se procesó utilizando la prueba de Chi-Cuadrado, OR para ver la intensidad de la asociación y ANAVA. Se estableció un $p < 0,05$ para diferencias significativas. Se realizó con Infostat Profesional (<http://www.infostat.com.ar>) versión 2018 (168).

RESULTADOS

Se analizaron, entre los años 2000 a 2017, un total de 6.320 biopsias enviadas al laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Del total de biopsias recibidas en el período estudiado, se revisaron diagnosticaron y clasificaron histopatológicamente 192 casos: LPO (n: 45) y LLO (n: 147), siguiendo los criterios de OMS de 1978 (38).

Luego se reclasificaron mediante la aplicación de los criterios de clasificación actuales de clasificación de Van der Meij y Van der Waal (11) y se aplicaron los criterios de exclusión, quedando excluidos del presente estudio; 147 casos.

De esos 147 casos excluidos, 6 no fueron clasificados clínicamente como LPO ni LLO; de los cuales un caso fue diagnosticado clínicamente como queilitis y 5 como CCE. En los 141 casos restantes, el 30% (42/141) eran de género masculino y el 70% (99/141) de género femenino, con una edad promedio de 56 años, un rango de 19-90 años. Presentaron diagnóstico clínico de LPO (n: 36) y de LLO (n: 105) e histopatológico de LPO (n: 33) y de LLO (n: 108), pero que al no poseer fotos clínicas, historias clínicas completas, 96 casos fueron excluidos.

Finalmente, la muestra quedó integrada por 45 casos diagnosticados clínicamente e histopatológicamente como LPO (13) y LLO (32), en los siguientes grupos:

1. Grupo Liquen Plano Oral (GLPO): 13 (26%), con una edad media de 62 años y un rango de 31-85 años; el 85% eran del género femenino.
2. Grupo Lesiones Liquenoides Orales (GLLO): 32 (64%), con una edad media de 57 años y un rango de 25-84 años; el 59 % eran del género femeninos.
3. Subgrupo de Citologías de LPO y LLO (GC): 6 casos (citologías de pacientes). Un caso que corresponde al grupo de LPO y cinco que corresponden al grupo de LLO, con una edad media de 62 años y un rango de 41-83 años; el 83% eran femeninos (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de los grupos estudiados según género y edad

Grupo	Género		Edad media	D.E	Total		
		n			%	n	%
Grupo LPO	F	11	85	62 (31-85)	16	13	100
	M	2	15				
Grupo LLO	F	19	59	57 (25-84)	13	32	100
	M	13	41				
Subgrupo citologías	F	5	83	62 (41-83)	14	6	100
	M	1	17				

Durante el período estudiado, en ambas patologías, existieron picos máximos de casos diagnosticados. En los años 2012 y 2016, se registraron los picos más altos (Gráfico 1). En los casos de LPO podría deberse a que en esos años, los pacientes podrían haber sufrido estrés, depresión o problemas socioeconómicos. Con relación a la prevalencia de estas patologías, durante el período estudiado, fue menor en el LPO (0,2%) que en las LLO (0,5%).

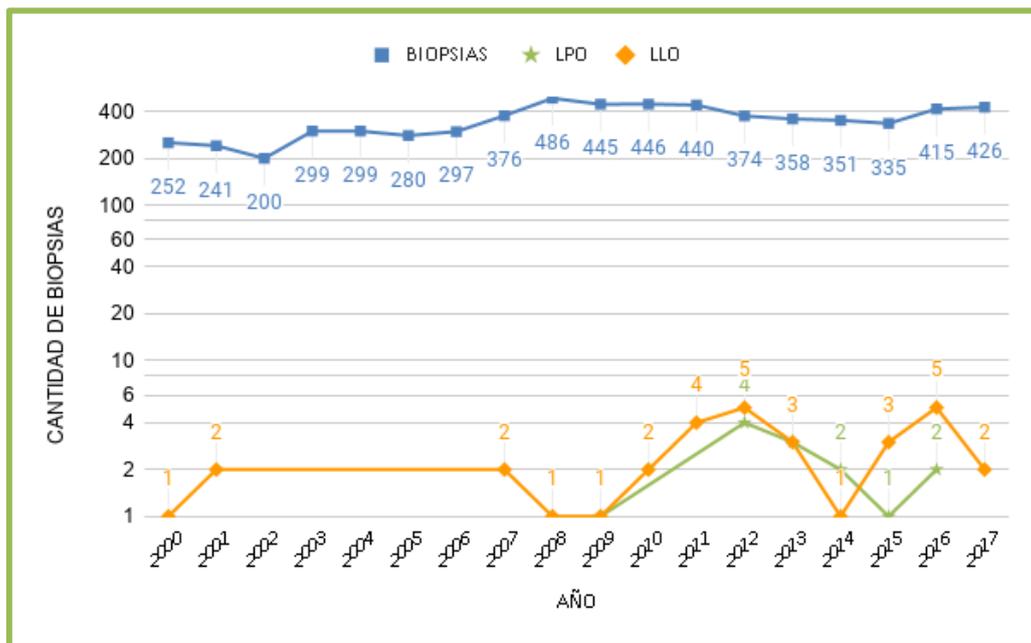


Gráfico 1. Distribución por años de LPO (n: 13) y LLO (n: 32).

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CLÍNICAS

En el grupo de LPO, el 85% (n: 11) de los pacientes fueron del género femenino y el 15% (n: 2) del género masculino, mientras que en el grupo de LLO, el 59% (n: 19) de los pacientes fueron del género femenino y el 41% (n: 13) del género masculino. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Ambas patologías predominaron en el género femenino (gráfico 2 y 3).

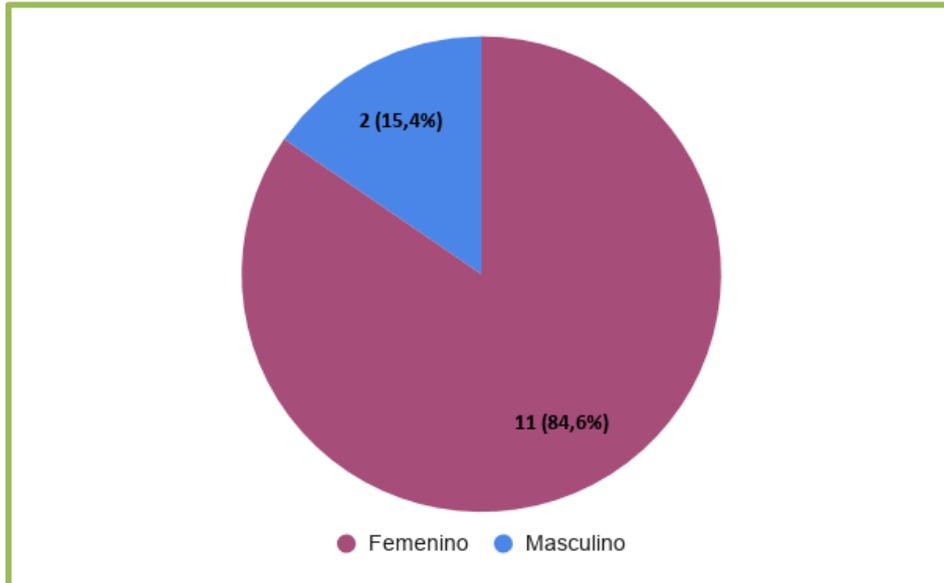


Gráfico 2. LPO: distribución por género (n: 13).

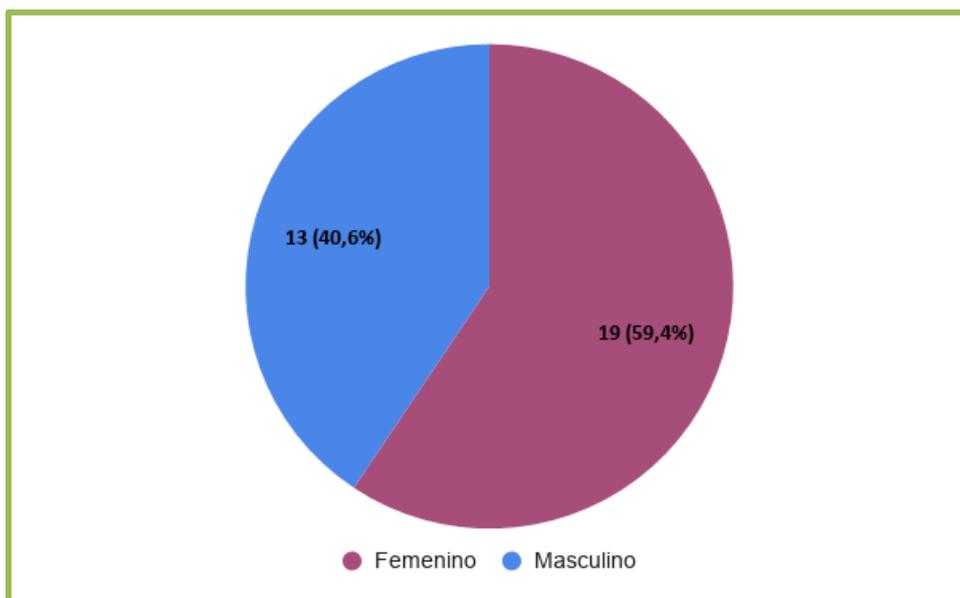


Gráfico 3. LLO: distribución por género (n: 32).

La edad promedio de los pacientes con LPO fue mayor que en los pacientes con LLO (62 y 57 años respectivamente). Liquen Plano Oral afectó pacientes en un rango de 41-85 años mientras que para LLO fue de 25-84 años; estas diferencias en la edad no fueron estadísticamente significativas.

El LPO fue más prevalente en la sexta década mientras que las LLO fueron en la quinta década (gráfico 4).

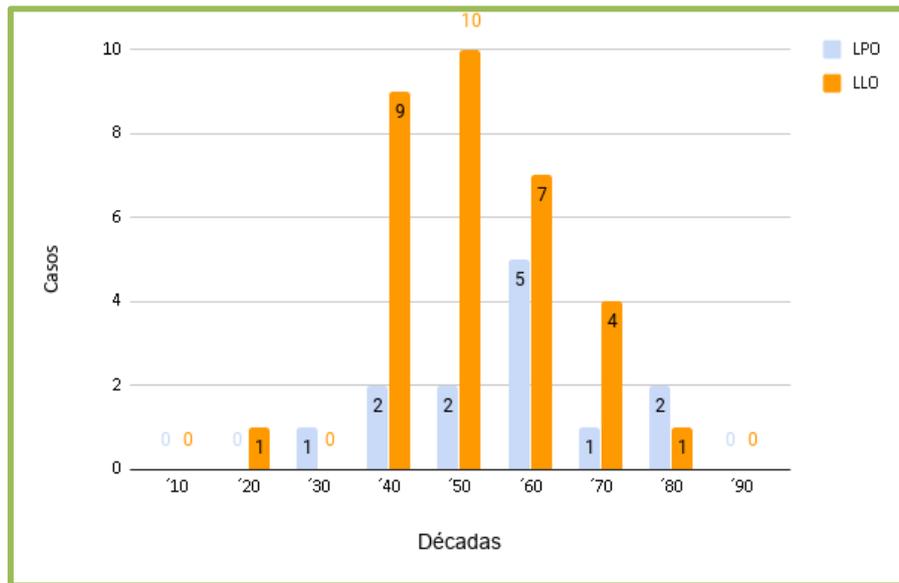


Gráfico 4. Distribución por edad expresada en décadas en LPO (n: 13) y LLO (n: 32).

Aparición del primer síntoma

El primer síntoma relatado en las anamnesis por los pacientes, en ambas patologías, fue luego de los seis meses. El mismo presentó un menor porcentaje en el LPO del 73% mientras que en las LLO fue del 90%, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. El rango para LPO fue entre 2 meses a 15 años y para LLO entre un mes a 27 años.

Sitio de toma de biopsia

Los sitios de toma de biopsia generalmente fueron elegidos por ser clínicamente las áreas más alteradas de las lesiones. En LPO el 85% fue en mucosa yugal mientras que en LLO el 37% fue en la lengua (mayor porcentaje en el borde de lengua), el 31% en la mucosa yugal y el 12% en labio (gráfico 5 y 6).

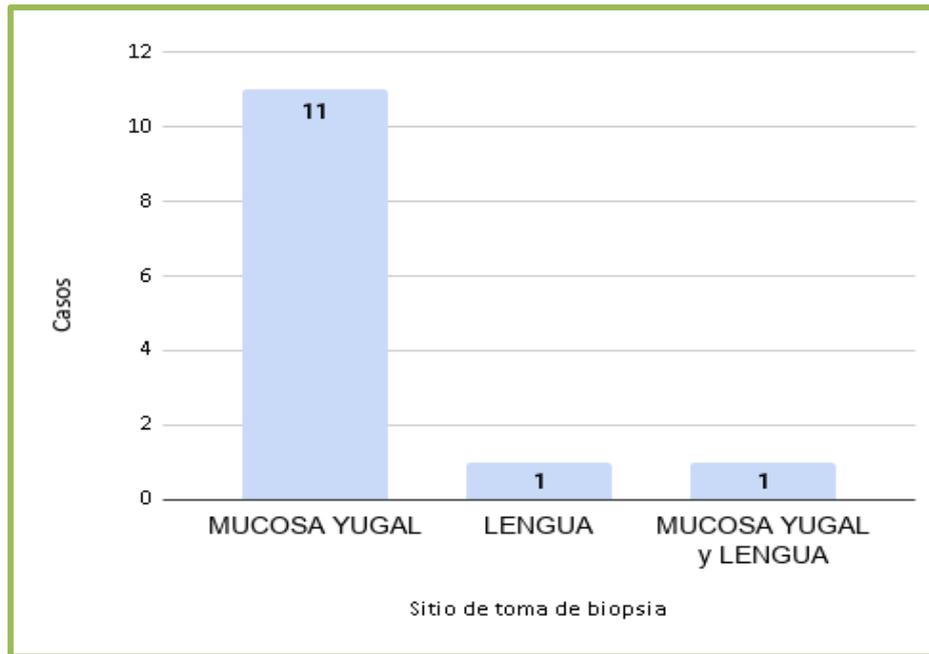


Gráfico 5. Distribución de las muestras de LPO según el sitio de toma de biopsia en LPO (n: 13).

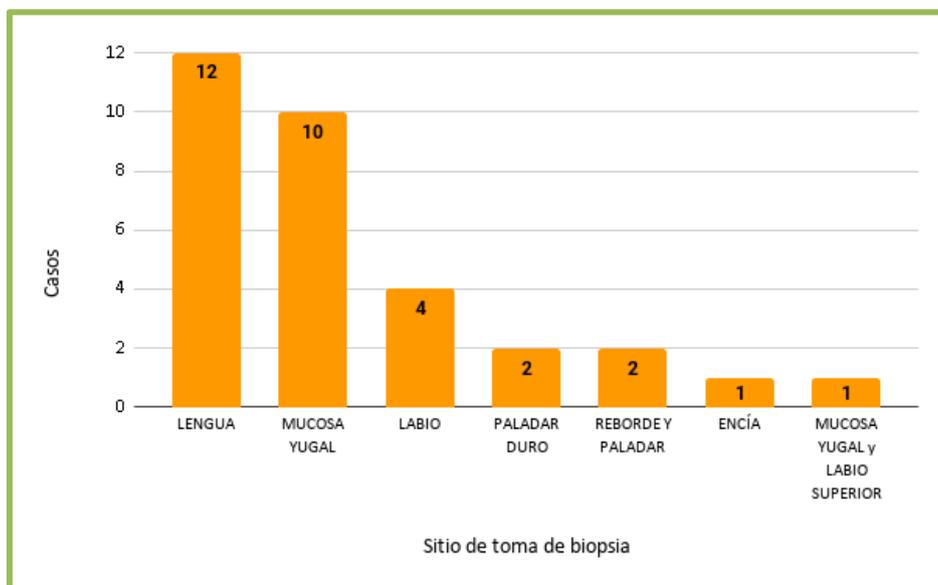


Gráfico 6. Distribución de las muestras de LLO según sitio de toma de biopsia en LLO (n: 32).

Lesiones elementales seleccionadas como sitio de toma de biopsia

La erosión en LPO y la queratosis en LLO fueron las lesiones elementales más frecuentes (gráfico 7 y 8).

La presencia clínica de erosión en LPO fue del 38% mientras que en las LLO fue del 19% y no fue estadísticamente significativo. La presencia clínica de queratosis en el LPO fue del 8% y en las LLO del 47% lo que fue estadísticamente significativo ($p < 0,002$).

La presencia clínica de mancha blanca en LPO fue del 31% mientras que en las LLO fue del 34% y no fue estadísticamente significativo.

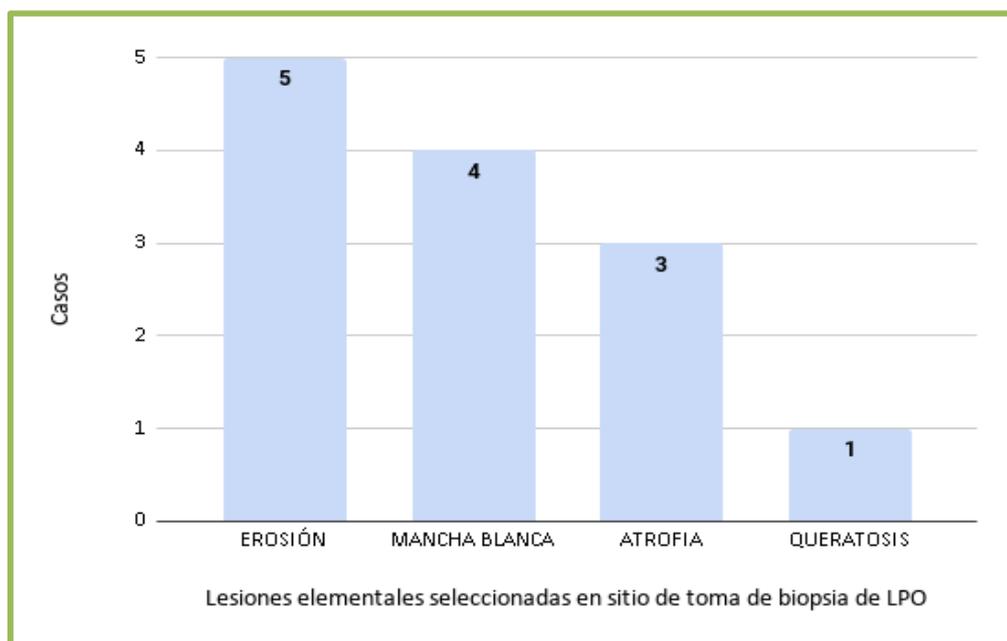


Gráfico 7. LPO: lesiones elementales clínicas seleccionadas como sitio de toma de biopsia (n: 13)

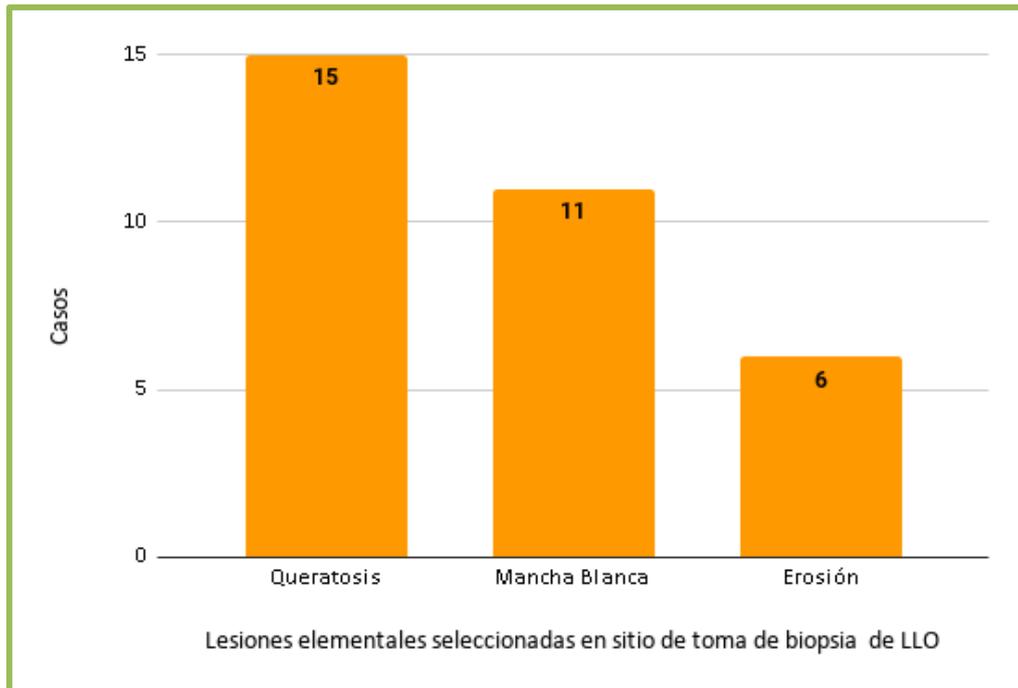


Gráfico 8. LLO: lesiones elementales clínicas seleccionadas como sitio de toma de biopsia (n: 32)

En el LPO (figura 9), la bilateralidad y forma en red de las lesiones (tabla 9), estuvieron presentes en la totalidad de los casos mientras que en las LLO (figura 10 y 11) la mitad de los casos; fueron bilaterales. Estos resultados fueron estadísticamente significativos en ambas variables ya que son parte de los criterios diagnósticos aplicados.

Tabla 9. Criterios diagnósticos clínicos para LPO y LLO

Características clínicas	LPO n (%)	LLO n (%)	Valor de p
Bilateralidad	13 (100)	17(53)	<0,002
Red	13 (100)	16 (50)	<0,006

1-OR 11,47 IC (1,86-70,81)

2-OR 13,00 IC (2,11-80,21)



Figura 9. Presentación clínica de LPO
(Fotografías cedidas-Cátedra de Estomatología B, FO-UNC)



Figura 10. Presentación clínica unilateral de LLO
(Fotografía cedida -Cátedra de Estomatología B, FO-UNC)



Figura 11. Presentación clínica en lengua de LLO (Fotografía cedida -Cátedra de Estomatología B, FO-UNC)

Análisis de la asociación de LPO y LLO a VPH

La presencia de VPH fue estudiada en diez casos (3 LPO y 7 LLO). Seis casos (60%) resultaron positivos (1 LPO y 5 LLO) y cuatro casos (40%) resultaron negativos (2 LPO y 2 LLO). La edad media de asociación fue 58 años con un rango de 40-83 años y el género femenino estuvo más asociado al VPH.

Las LLO presentaron mayor porcentaje de asociación (71%) al VPH que el LPO (33%).

Las presentaciones clínicas reticulares del LPO fueron negativas para el VPH mientras que solo un caso fue positivo con presentación escleroatrófica.

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS

En el LPO, el infiltrado linfocitario en banda (figura 12 C) y la degeneración hidrópica (figura 13 A) estuvieron presentes en el 100% de los casos mientras que la displasia epitelial estuvo ausente en el 100% de los casos, obviamente por ser criterios diagnósticos.

La presencia de cuerpos apoptóticos de Civatte (figura 13 B) en el LPO estuvo presente en un 38% mientras que en las LLO en un 13%, lo que fue estadísticamente significativo, como se puede observar en la tabla 10.

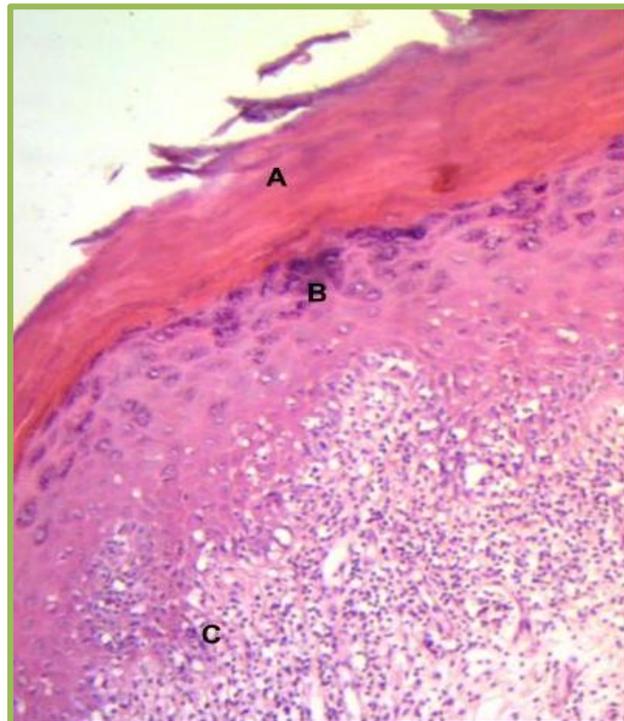


Figura 12. Microfotografía que muestra la presencia de hiperortoqueratosis (A), granulosis (B) e infiltrado en banda (C) (H/E 400X)

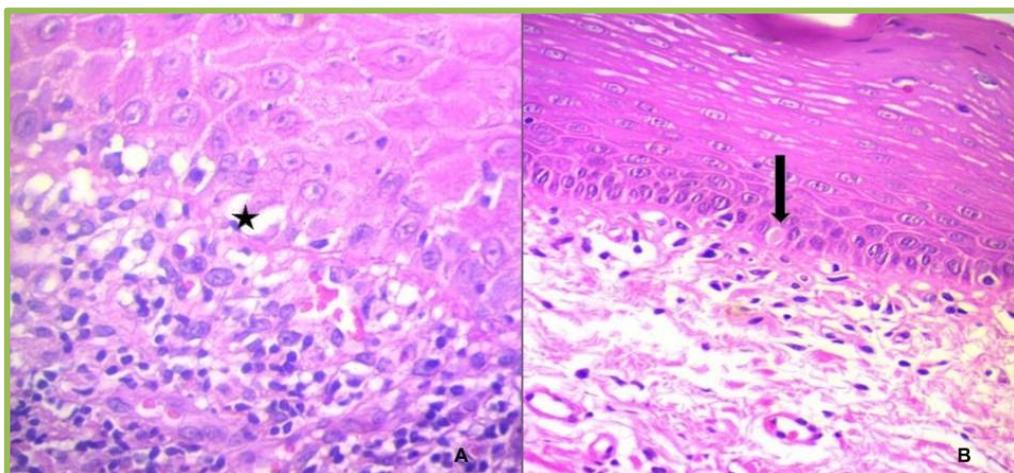


Figura 13. Microfotografía que muestra degeneración hidrópica en queratinocitos (Asterisco-A) y cuerpo apoptótico de Civatte (Flecha B) (H/E 400X)

Tabla 10. Cambios Histopatológicos

Cambios histopatológicos	LPO n (%)	LLO n (%)			Valor de p
Infiltrado en banda	13 (100)	22 (69)			0,02
Degeneración hidrópica	13 (100)	13 (41)			0,0003
Displasia epitelial	0 (0)	24 (75)	AG 17 (71)	SEVERA 2 (8) MODERADA 15 (63)	<0,0001
			BG 7 (29)	LEVE 72(29)	
Acantosis	2 (15)	12 (38)			0,09
Granulosis	5 (38)	6 (19)			0,16
Cuerpos apoptóticos	5 (38)	4 (13)			0,05 OR. 4,38 (1,01-18,89)
Atrofia	6 (46)	8 (25)			0,16
Hiperqueratosis	HP 10 (77)	HP 17 (55)			0,51
	HO 2 (15)	HO 8 (26)			
	HP-HO 1 (8)	HP-HO 6 (19)			

AIP: Alto índice de proliferación, BIP: Bajo índice de proliferación

En las LLO, el 75% (24/32) de los casos presentaban displasia epitelial (figura 14). En el 62% de los casos (15/32) predominó la displasia epitelial moderada (gráfico 9). Además, el 41% de los casos presentaba degeneración hidrópica (13/32) y el 69% (22/32) infiltrado linfocitario en banda.

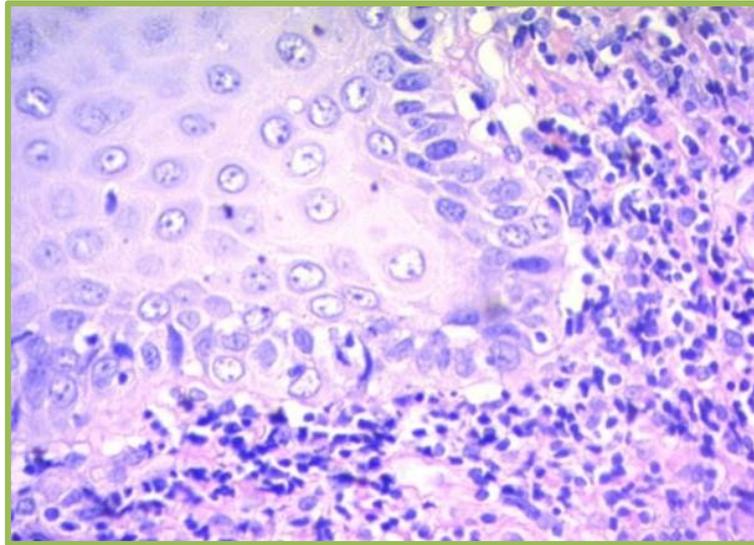


Figura 14. Microfotografía que muestra la presencia de displasia epitelial leve (H/E 400X)

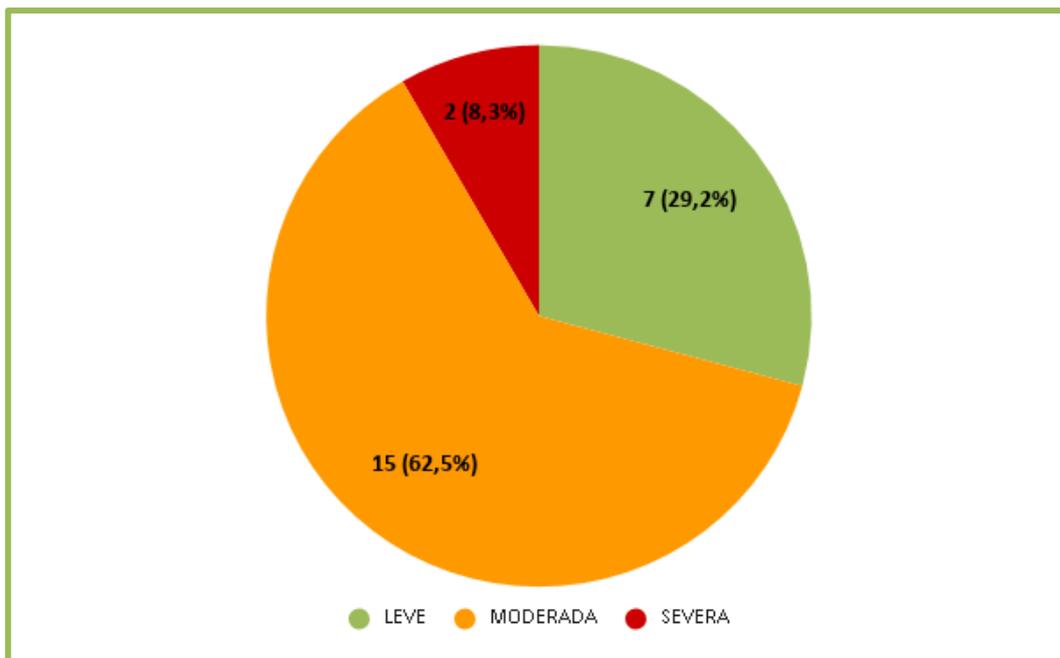


Gráfico 9. Porcentaje de displasia epitelial oral en LLO (n: 24)

La atrofia epitelial estuvo presente en el 46% de los casos de LPO mientras que en las LLO en el 25%, pero no fue estadísticamente significativo ($p=0,16$).

Los cambios histopatológicos relacionados con la presencia de hiperqueratosis, como se observa en el gráfico 10, muestran que en ambas patologías predominó la presencia de hiperparaqueratosis.

En LPO la presencia de hiperparaqueratosis fue del 77% (10/13) mientras que en LLO fue del 53% (17/32) lo que no fue estadísticamente significativo ($p=0,37$).

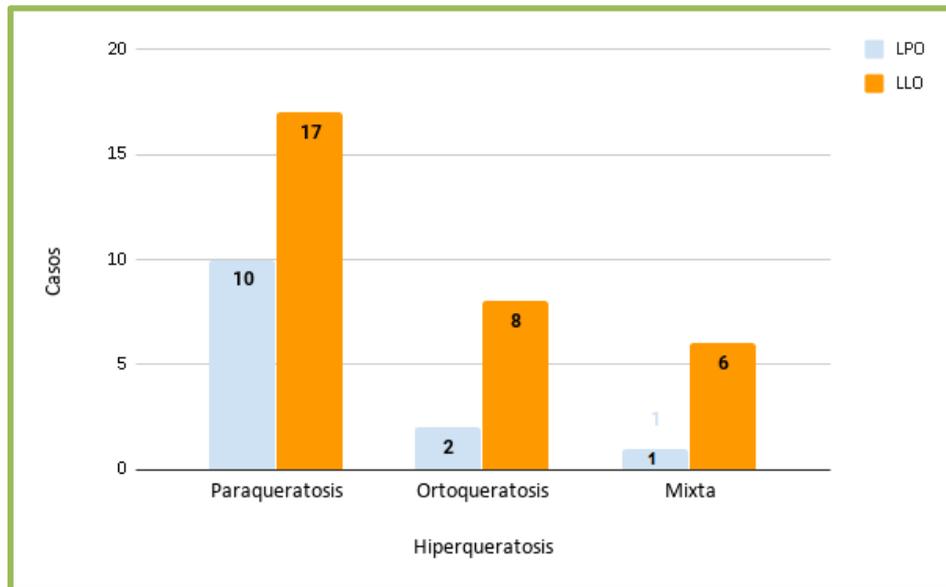


Gráfico 10. Presencia de Hiperqueratosis en LPO (n: 13) y LLO (n: 32)

Hallazgos histopatológicos

En el 31% (n: 4) de los casos de LPO, se observó la presencia de degeneración hidrópica en áreas focales, abundantes melanófagos cercanos a trayectos vasculares y crestas elongadas en forma de “dientes de sierra”.

Debido a la cronicidad de las lesiones, en el 23% (n: 3) de los casos de LPO, el infiltrado en banda (yuxtaepitelial) y la degeneración hidrópica se observaron disminuidos.

En el 6% (n: 2) de los casos de LLO, se observó duplicación de la capa basal, zonas de hiperparaqueratosis con hiperortoqueratosis, centros germinales, linfocitos en exocitosis.

Cambios Histopatológicos en casos VPH positivos

En los casos VPH positivos (1LPO y 5 LLO), también se estudiaron los cambios histopatológicos asociados a la infección de este virus.

Las imágenes tipo coilocíticas e hiperqueratosis estuvieron presentes en la totalidad de los casos positivos estudiados, pero solamente las imágenes tipo coilocíticas fueron estadísticamente significativas.

La acantopapilomatosis y la displasia epitelial estuvieron presentes en el 83% de los casos estudiados pero solamente el valor de p para acantopapilomatosis fue estadísticamente significativo ($p=0,004$).

La variable granulosis solamente estuvo presente en el 33%, con un valor de $p=0,81$ estadísticamente no significativo (tabla 11).

La variable infiltrado en banda y degeneración hidrópica estuvieron presentes en el 67% de los casos, estadísticamente no significativo.

Los cuerpos apoptóticos de Civatte estuvieron presentes en el 17% de los casos, lo que no fue estadísticamente significativo.

Tabla 11. Cambios histopatológicos en casos VPH positivos y negativos

Cambios histopatológicos	VPH positivos n (%)		VPH negativos n (%)		Valor de p
Imágenes tipo coilocíticas	6 (100)		3 (75)		0,01
Acantopapilomatosis	5 (83)		0 (0)		0,003
Granulosis	2 (33)		2 (50)		0,81
Infiltrado en banda	4 (67)		3 (75)		0,78
Degeneración hidrópica	4 (67)		3 (75)		0,78
Cuerpos apoptóticos	1 (17)		1 (25)		0,75
Displasia epitelial	5 (83)		1 (25)		0,06
	Leve 1 (17)	BG 1 (20)	1 (100)	BG 1 (100)	
	Moderada 2 (33)	AG 4 (80)	0 (0)	AG 0 (0)	
Severa 2 (33)	0 (0)				
Hiperqueratosis	6 (100)		4 (100)		0,53
	Hiperortoqueratosis 3 (50)		1 (25)		
	Hiperparaqueratosis 3 (50)		3 (75)		

Análisis de muestras de citologías exfoliativas en pacientes con biopsia (subgrupo)

Se analizaron seis citologías de pacientes con diagnóstico de LPO (n: 1) y LLO (n: 5). Cinco muestras fueron pacientes del género femenino y una del género masculino.

La lengua fue el sitio de toma predilecto en un 67% (el borde y cara ventral de la lengua, fueron los lugares más elegidos).

El 67% de las citologías presentaron un resultado de grado III mientras que en un 33% de grado II. En la mitad de las citologías exfoliativas (3/6), no se encontró la presencia de displasia epitelial. De los casos que presentaban displasia epitelial, el 67% (2/3) presentaban displasia leve y el 33% (1/3), displasia moderada.

La mitad de las citologías presentó leucocitos (3/6), y el 100% (6/6), hematíes. En relación a la flora encontrada, la presencia de hongos fue del 33% (2/6) y de cocos en 100% (6/6) en los casos estudiados (tabla 11). El 100% de los casos que presentaban displasia epitelial (3/3) tenían presencia de leucocitos 2+ mientras que los casos sin displasia epitelial no presentaban leucocitos, esta diferencia fue estadísticamente significativa $p=0,01$.

Los hallazgos citológicos encontrados, en el 75% de los casos que tenían realizada citología exfoliativa y eran VPH positivos, fue la presencia de células intermedias y superficiales con gránulos intracitoplasmáticos, naranjofilia, anfofilia, células intermedias binucleadas y células paraqueratinizadas, ortoqueratinizadas en colgajos.

Tabla 12. Perfil citopatológico de los pacientes

C A S O	Diag	Género	Edad	% Células					Flora		Hematíes	Leucocitos	DE
				O	P	C	I	P	Cocos	Hongos			
1	LLO	M	41	22	29	17	33	0	+	+	2+	2+	Leve
2	LLO	F	60	29	7	15	49	0	+	-	1+	-	NO
3	LLO	F	60	3	17	2	78	0	+	-	1+	-	NO
4	LLO	F	61	2	9	5	72	12	+	-	1+	2+	Mod
5	LLO	F	75	21	2	2	60	15	+	+	2+	-	NO
6	LPO	F	85	22	12	1	65	0	+	-	2+	2+	Leve

Diag: Diagnóstico, DE: Displasia epitelial, Mod: Moderada, Células: O (Ortoqueratinizadas), P (Paraqueratinizadas), C (Cianófilas), I (intermedias), P (Parabasaes).

ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO

En ambas patologías, el consumo de tabaco fue registrado en el informe anatomopatológico solamente en el 31% de los pacientes y el valor de $p=0,91$ no fue estadísticamente significativo (gráfico 11).

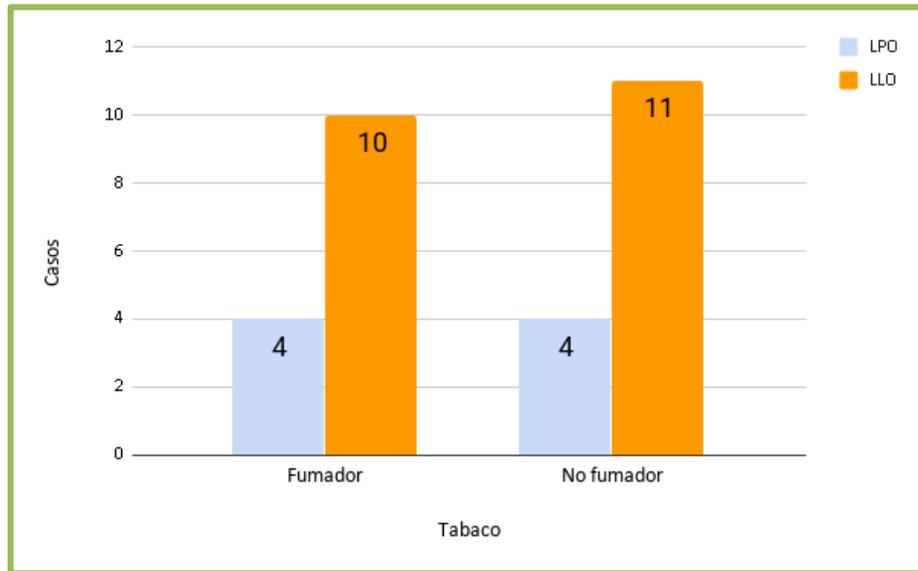


Gráfico 11. Consumo de tabaco en pacientes con LPO (n: 8) y LLO (n: 21)

El consumo de alcohol fue registrado en el informe anatomopatológico solamente en el 15% (2) de los pacientes que presentaban LPO y en el 34% (11) de los pacientes con LLO; el valor de $p=0,14$ no fue estadísticamente significativo (gráfico 12).

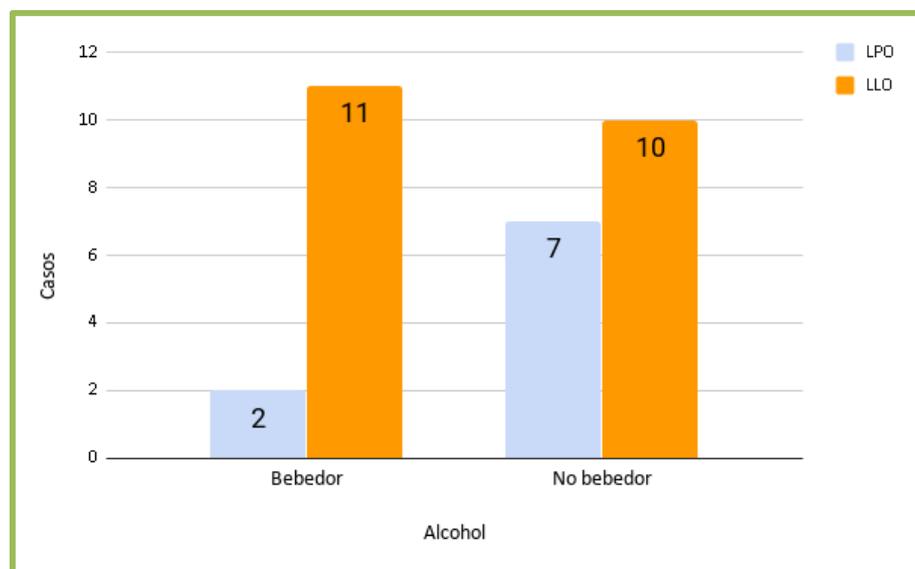


Gráfico 12. Consumo de alcohol en pacientes con LPO (n: 9) y LLO (n: 21)

Factores de riesgo en casos VPH positivos

En los casos VPH positivos (1 LPO y 5 LLO), el 17% de los pacientes fumaban mientras que en los VPH negativos lo hacían en el 25%; esto no fue estadísticamente significativo ($p=0,63$).

En los casos VPH positivos, el 50% consumía alcohol mientras que en los casos VPH negativos consumía alcohol sólo el 25%, esta diferencia estadísticamente no fue significativa ($p=0,35$).

ANÁLISIS DE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

Biomarcador Ki-67

Para el biomarcador Ki-67, todos los casos de LPO como LLO presentaban más del 5% de positividad, considerado el parámetro para definirlo como positivos.

Las LLO en el 56% (18/32) fueron moderadamente positivas y en el 44% (14/32) levemente positivas, mientras que en el LPO, el 38,5% (5/13) fueron moderadamente positivas y el 61,5% (8/13) levemente positivas.

El porcentaje promedio de proliferación celular total fue mayor en LLO (figura 15) que en LPO (26 y 24 por ciento respectivamente) pero no fue estadísticamente significativo. El porcentaje promedio de proliferación celular en la capa parabasal como en el infiltrado también fue mayor en las LLO, y no fue estadísticamente significativo (tabla 13).

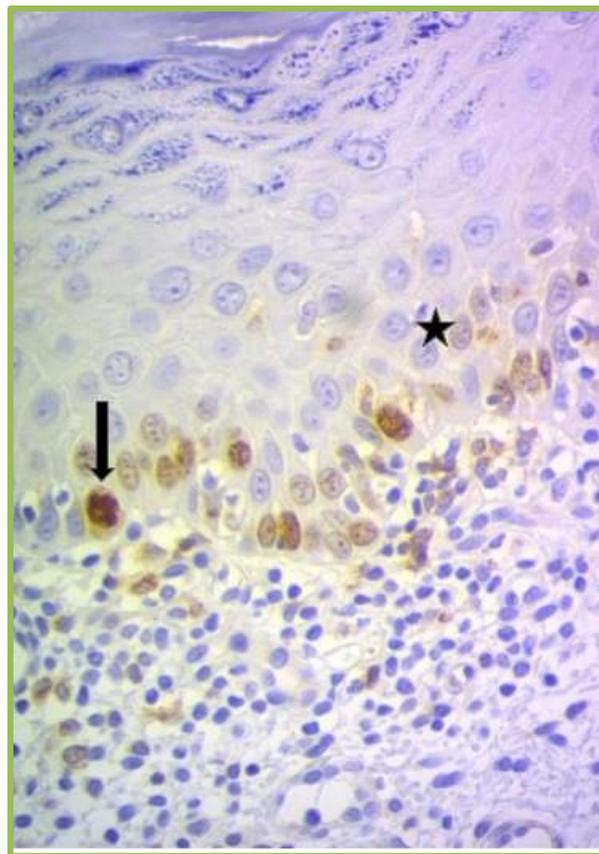


Figura 15. Inmunomarcación de Ki-67 en células Basales (flecha) y parabasales (asterisco) en LLO (400X)

Tabla 13. Porcentajes de proliferación celular de Ki-67 en LPO y LLO

KI67 (%)	LPO (n=13)	LLO (n=32)
Total	24 %	26%
Basal	10%	9%
Parabasal	12%	14%
Infiltrado	2%	3%

Cuando se aplicó el score de Nakagawa, los casos de LLO presentaron mayor porcentaje score 1 (positivo leve) en la capa parabasal, lo que fue estadísticamente significativo; $p=0,005$ (tabla 14).

Tabla 14. Porcentajes de proliferación celular en LPO y LLO según score Nakagawa

KI67 (score Nakagawa)	LPO n %	LLO n %	Valor de p
Negativo basal	1 (8)	2 (6)	0,86
Leve basal	12 (92)	30(93)	0,86
Negativo Parabasal	3 (23)	0 (0)	0,32
Leve Parabasal	10 (77)	32 (100)	0,005
Negativo infiltrado	12 (92)	26 (81)	0,35
Leve infiltrado	1 (8)	4 (13)	0,58
Moderado infiltrado	0 (0)	2(6)	0,36

Cuando se clasificaron los casos de LPO y LLO, según el índice de proliferación, existieron diferencias entre ambas patologías. Las LLO presentaron mayor porcentaje de alto índice de proliferación celular total que el LPO, lo que no fue estadísticamente significativo (tabla 15).

El porcentaje promedio de bajo índice de proliferación celular cuando se lo comparó entre ambas patologías, no fue estadísticamente significativo (tabla 15).

Tabla 15. Índice de proliferación celular total Ki-67 en LPO y LLO

KI67 (índice de proliferación)	LPO n %	LLO n %
AIP	7 (54)	20 (62,5)
BIP	6 (46)	12 (37,5)

AIP: Alto índice de proliferación, BIP: Bajo índice de proliferación

Los casos VPH positivos fueron solamente 6 y su inmunomarcación se detalla en la tabla 16.

Tabla 16. Inmunomarcación en casos VPH positivos y negativos

CASO /VPH	G*	Ki67 IP	Ki67 %	Ki67 %NAK	Ki67 B	Ki67 PB	Ki67 IN	Bax B	Bax PB	Bax IN	Bcl-2 B	Bcl-2 PB	Bcl-2 IN
LLO+	M	BIP	23	Leve	Leve	Leve	Neg	+	+	+	-	+	+
LLO+	F	AIP	27	Mod	Leve	Leve	Neg	+	+	+	-	+	+
LLO+	M	AIP	26	Mod	Leve	Leve	Neg	+	+	+	+	+	+
LLO+	F	AIP	28	Mod	Leve	Leve	Neg	+	+	+	+	+	+
LLO+	F	BIP	25	Leve	Leve	Leve	Neg	+	+	+	+	+	+
LPO+	F	BIP	16	Leve	Neg	Leve	Neg	+	+	+	+	+	+
LLO-	M	AIP	38	Mod	Leve	Leve	Neg	+	+	+	-	-	-
LLO-	M	AIP	34	Mod	Leve	Leve	Neg	+	+	+	-	-	-
LPO-	M	BIP	15	Leve	Leve	Neg	Neg	+	+	+	-	-	+
LPO-	F	BIP	13	Leve	Leve	Neg	Neg	+	+	+	-	-	+

G* (género), M: masculino, F: Femenino, Neg: negativo, Mod: moderado, AIP: Alto índice de proliferación, BIP: Bajo índice de proliferación, NAK: score de Nakagawa

Cuando se comparó el porcentaje promedio del índice de proliferación celular total entre casos VPH positivos y negativos, fue similar en VPH positivos (25%) y en VPH negativos (24%). En la capa parabasal los casos VPH positivos también presentaron un mayor porcentaje (14%) en relación a los negativos (11%), como se muestra en la tabla 17.

Tabla 17. Porcentajes de proliferación de Ki-67 en casos VPH positivos y negativos

Ki-67 (%)	VPH positivos (n=6)	VPH negativos (n=4)
Total	24%	25%
Basal	7%	11%
Parabasal	14%	11%
Infiltrado	2%	2%

Cuando se comparó el índice promedio de proliferación celular total entre ambas patologías, en relación a la asociación con el VPH, las LLO VPH positivas presentaron un 26% que fue mayor al porcentaje de las LPO VPH positivos (16%), como se observa en la tabla 18.

Las LLO VPH negativas también presentaron un porcentaje mayor de proliferación celular total en relación a los casos de LPO VPH negativos de 36 y 14 respectivamente.

A nivel de la capa parabasal, existieron diferencias entre los porcentajes de LLO VPH negativas (18%) y LPO (3%) y entre los casos de LLO positivos (15%) con LPO positivos (11%) como se puede observar en la tabla 18.

Tabla 18. Porcentaje de proliferación de Ki-67 en LPO y LLO VPH negativo y positivo.

KI67	LPO NEG (n=2)	LLO NEG (n=2)	LPO POS (n=1)	LLO POS (n=5)
Total	14%	36%	16%	26%
Basal	9%	13%	4%	8%
Parabasal	3%	18%	11%	15%
Infiltrado	2%	3%	0%	3%

Biomarcador Bax

En relación a la inmunomarcación positiva del biomarcador proapoptótico (Bax), en LPO fue mayor el porcentaje de casos positivos en la capa basal y parabasal (figura 16).

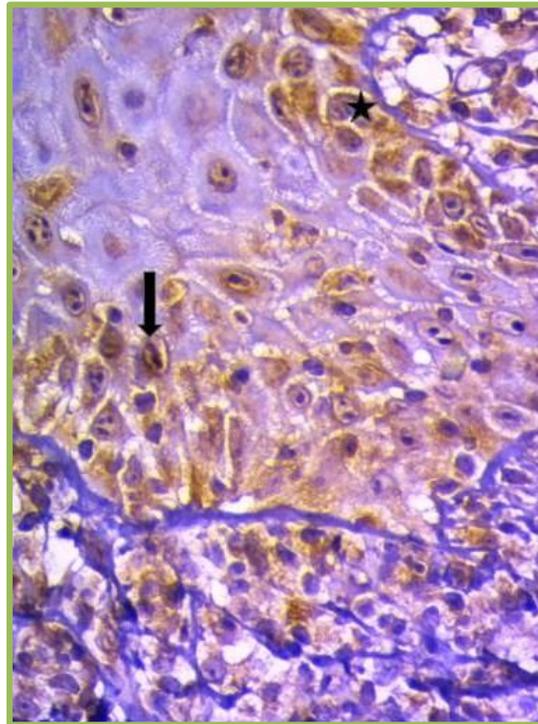


Figura 16. Inmunomarcación positiva de Bax en células Basales (asterisco) y parabasales (flecha) en LPO (400X).

Cuando se compararon ambas patologías, en la capa basal, parabasal y a nivel del infiltrado, estos resultados no fueron estadísticamente significativos; como se observa en la tabla 19.

Tabla 19. Porcentajes de casos con expresión Bax positiva y negativa en LPO y LLO

BAX (expresión positiva y negativa)	LPO n (%)	LLO n (%)
Basal (+)	12 (92)	28 (87)
Parabasal (+)	12 (92)	29 (91)
Infiltrado (+)	12 (92)	30 (94)
Basal (-)	1 (8)	4(12)
Parabasal (-)	1(8)	3(9)
Infiltrado (-)	1(8)	2(6)

+: Positivo,-: Negativo

Cuando se comparó la inmunomarcación de Bax con relación a la asociación con el VPH, los resultados fueron iguales entre ambas patologías (tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje de casos VPH positivos y negativos con expresión positiva de Bax

BAX (expresión positiva)	VPH + n (%)	VPH- n (%)
Basal	6 (100)	4 (100)
Parabasal	6 (100)	4 (100)
Infiltrado	6 (100)	4 (100)

Cuando se comparó la inmunomarcación de Bax en las biopsias de los pacientes estudiados, según su género, no existieron diferencias (tabla 21).

Tabla 21. Porcentaje de casos femeninos y masculinos con expresión de Bax

Bax (expresión positiva y negativa)	CASOS FEMENINOS n %	CASOS MASCULINOS n %
Basal (+)	5 (100)	5 (100)
Basal (-)	0 (0)	0 (0)
Parabasal (+)	5(100)	5 (100)
Parabasal (-)	0 (0)	0 (0)
Infiltrado (+)	5 (100)	5 (100)
Infiltrado (-)	0 (0)	0 (0)

+: Positivo, -: Negativo

Biomarcador Bcl-2

En la expresión positiva del biomarcador antiapoptótico (Bcl-2), existieron diferencias entre ambas patologías aunque no fueron estadísticamente significativas.

Fue mayor el porcentaje de casos positivos en la capa basal, parabasal e infiltrado en LLO (figura 17), como podemos observar en la tabla 22.

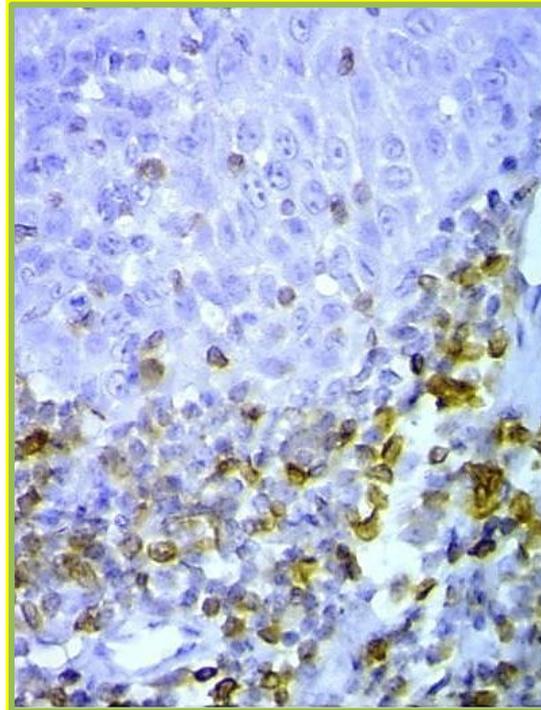


Figura 17. Inmunomarcación de Bcl-2 en LLO (200X)

Tabla 22. Porcentajes de casos con expresión de Bcl-2 en LPO y LLO

Bcl-2 (expresión positiva y negativa)	LPO n (%)	LLO n (%)
+ Basal	9 (69)	25 (78)
+ Parabasal	10 (77)	26 (81)
+ Infiltrado	10 (77)	28 (87,5)
- Basal	4(31)	7(22)
-Parabasal	3 (23)	6 (19)
-Infiltrado	3 (23)	4(12,5)

+: Positivo, -: Negativo

Cuando se comparó la inmunomarcación de Bcl-2 con relación a la asociación con el VPH, los casos VPH positivos presentaron mayor expresión positiva que los casos VPH negativos en la capa basal.

En la capa parabasal, todos los casos VPH positivos presentaron expresión positiva y expresión negativa en todos los casos VPH negativos (tabla 23).

Tabla 23. Porcentaje de casos VPH positivos y negativos con expresión positiva del biomarcador Bcl-2

Bcl-2 (expresión positiva)	VPH + n (%)	VPH - n (%)
Basal	4 (70)	0 (0)
Parabasal	6 (100)	0 (0)
Infiltrado	6 (100)	1 (25)

Cuando se comparó la inmunomarcación de Bcl-2, según su género, no existieron diferencias estadísticamente significativas (tabla 24).

Tabla 24. Porcentaje de expresión del biomarcador Bcl-2 en casos femeninos y masculinos

Bcl-2 (expresión positiva y negativa)	CASOS FEMENINOS n %	CASOS MASCULINOS n %
Basal (+)	3 (60)	1 (20)
Basal (-)	2 (40)	5 (100)
Parabasal (+)	4(80)	2 (40)
Parabasal (-)	1 (20)	3 (60)
Infiltrado (+)	5 (100)	2 (40)
Infiltrado (-)	0 (0)	3 (60)

Los pacientes con LLO que consumían alcohol, presentaron 6 veces más posibilidades de expresión fuertemente positiva (3+) de Bcl-2 a nivel del infiltrado; OR 6,67 (0,92- 48,31) aunque no fue estadísticamente significativo ($p=0,08$).

Los pacientes con LLO que consumían tabaco, presentaron 3 veces más posibilidades de expresión fuertemente positiva (3+) de Bcl-2 a nivel del infiltrado; OR 3,50 (0,43- 28,37) aunque no fue estadísticamente significativo ($p=0,29$).

ANÁLISIS DE LOS GENOTIPOS DE VPH DETECTADOS

Los genotipos detectados fueron VPH 6, VPH 11, VPH 13, VPH 16 y VPH 53 (gráfico 13), todos pertenecientes a la subfamilia *Firstpapillomavirinae*, género *Alphapapillomavirus*; el 60% correspondió a la especie *Alphapapillomavirus 10* (VPH 6, VPH 11, VPH 13), el 20% a la especie *Alphapapillomavirus 9* (VPH 16) y el 20% a la especie *Alphapapillomavirus 6* (VPH 53).

Los genotipos más frecuentes fueron VPH 6, VPH 53 y VPH 16 en un 25%.

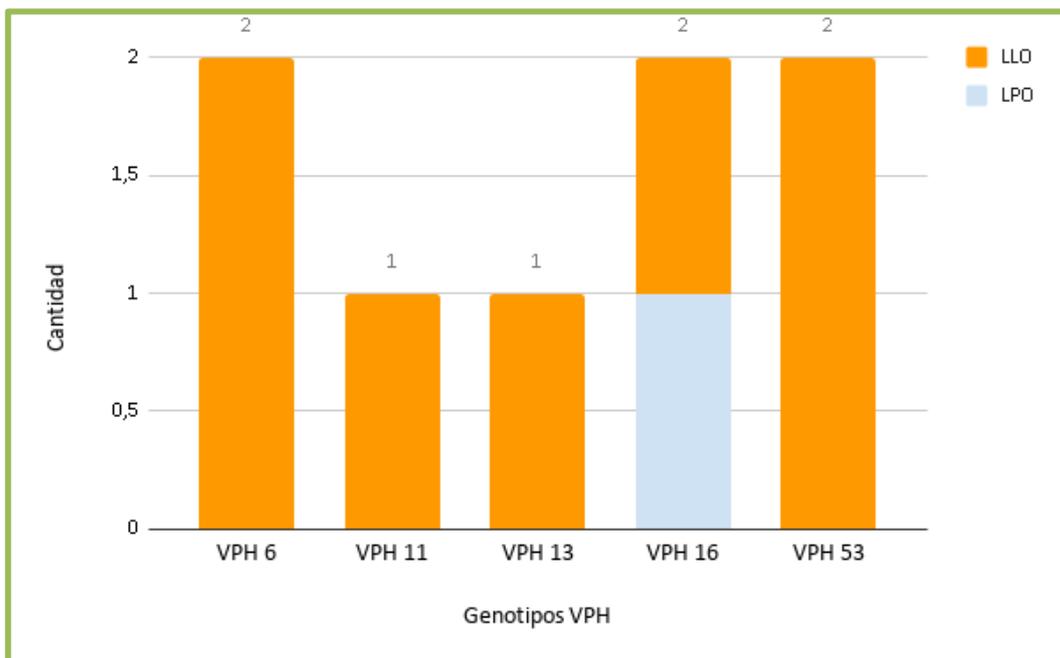
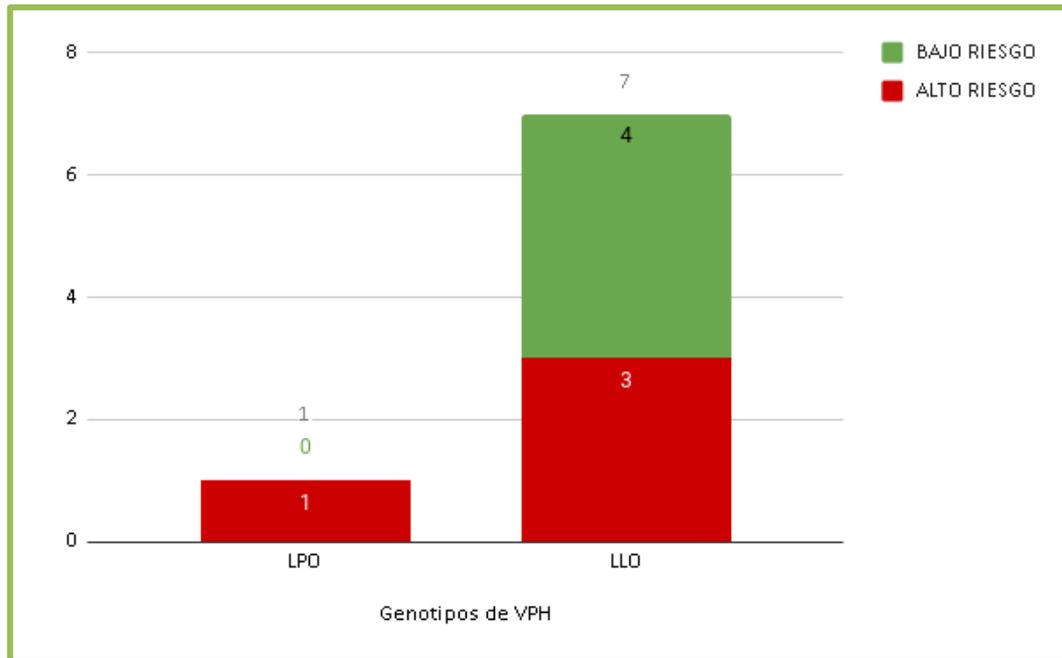


Gráfico 13. Distribución de genotipos detectados en LPO y LLO (n: 6)

Los genotipos de alto riesgo fueron el VPH 16 y VPH 53, mientras que los de bajo riesgo fueron el VPH 6, VPH 11 y VPH 13. No existió predominio entre genotipos de alto o bajo riesgo.

En los VPH-AR, no hubo predominio de algún genotipo sobre otro y en los VPH-BR sobresalió el genotipo 6 en un 50%.

En LPO, el único genotipo detectado fue el VPH 16, de alto riesgo, en la forma escleroatrófica, mientras que en las LLO fueron genotipos de bajo riesgo (VPH 6, VPH 11, VPH 13) y de alto riesgo (VPH 16 y VPH 53), predominaron los genotipos de bajo riesgo (gráfico 14).



BR: Bajo riesgo, AR: alto riesgo

Gráfico 14. Distribución de genotipos según riesgo en LPO y LLO (n: 8)

Un paciente con LLO presentó tres genotipos simultáneos: VPH 6, VPH 16 y VPH 53, dos de ellos de alto riesgo (VPH16 y 53) y uno de bajo riesgo (VPH6). Cuando se estudió la proliferación celular total, la mayoría de los genotipos presentaron índices similares aunque el genotipo 53 presentó el mayor índice de proliferación (28%) y los porcentajes de proliferación a nivel de la capa parabasal también fueron similares aunque el VPH 11 y 53 presentaron mayor porcentaje, 18 y 16 respectivamente (tabla 25).

Tabla 25. Proliferación de Ki-67 según VPH de alto y bajo riesgo

Proliferación ki67	VPH BR 6	VPH BR 11	VPH BR 13	VPH AR 16	VPH AR 53	VPH BR-AR-AR (coinfeción) 6-16-53
% Total	23	27	26	16	28	25
% Basal	7,5	6	8	4	8	11
% Parabasal	15	18	15	11	16	9
% Infiltrado	1	3	3	1	4	4

BR: Bajo riesgo, AR: alto riesgo

Cuando se evaluó la expresión de Bax en relación con los genotipos detectados, en las muestras estudiadas, no existieron diferencias (tabla 26).

Tabla 26. Expresión de Bax en VPH de alto y bajo riesgo

Bax score	VPH BR 6-11	VPH BR 13	VPH AR 16	VPH AR 53	VPH 6-16-53 (coinfeción)
Basal	3+	3+	3+	3+	3+
Parabasal	3+	3+	3+	3+	3+
Infiltrado	3+	3+	3+	3+	3+

En el biomarcador bcl-2, se observó que los genotipos VPH 6 y VPH 11 fueron negativos (1+) en la capa basal. El genotipo VPH 13 y los VPH-AR fueron positivos (2+).

En la capa parabasal, también existieron diferencias, los genotipos de bajo riesgo fueron negativos y los de alto riesgo positivos.

A nivel del infiltrado, todos los genotipos fueron fuertemente positivos 3+ (tabla 27).

Tabla 27. Expresión de Bcl-2 en genotipos VPH de alto y bajo riesgo

Bcl-2 score	VPH BR 6-11	VPH BR 13	VPH AR 16	VPH AR 53	VPH 6-16-53
Basal	1+	2+	2+	2+	2+
Parabasal	0	1+	2+	2+	2+
Infiltrado	3+	3+	3+	3+	3+

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se identificaron VPH16 en dos pacientes, cuyas secuencias de genes E6 y LCR pudieron ser analizadas filogenéticamente. Luego de secuenciar la región E6 del VPH 16 de los dos casos; se pudo llegar al siguiente resultado que se refleja en el árbol filogenético del VPH 16 de la figura 18.

El paciente 116T que presentaba el diagnóstico de LLO resultó Europeo Asiático (Ea), mientras que el paciente 184T que presentaba el diagnóstico de LPO resultó Europeo Prototipo (Ep), como se puede observar en la figura 18.

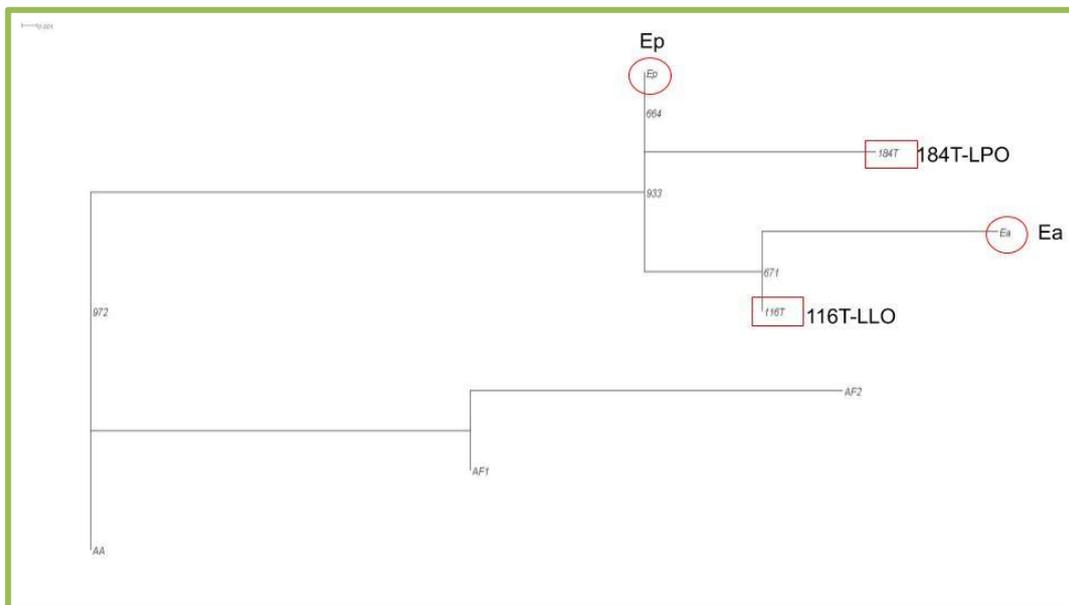


Figura 18. Árbol filogenético VPH 16

DISCUSIÓN

En la actualidad, existen criterios de clasificación clínicos e histopatológicos para LPO y LLO. Algunos autores sugieren el uso de los criterios de clasificación de la OMS modificados por van der Meij y van der Waal para el correcto diagnóstico de ambas patologías (1,39), por lo tanto existen mayores acuerdos entre clínicos y patólogos cuando se utilizan estos criterios (1).

En el presente estudio, se aplicaron los criterios diagnósticos propuestos por van der Meij y van der Waal, quienes mencionan los siguientes criterios clínicos: presencia bilateral de las lesiones (más o menos lesiones simétricas), presencia de un patrón en red de encaje de líneas blanco-gris ligeramente elevadas (patrón reticular), presencia de 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; y criterios histopatológicos: presencia de una banda bien definida de infiltrado celular linfocitario que se limita a la parte superficial del tejido conectivo, signos de degeneración hidrópica en la capa basal y ausencia de displasia epitelial.

Para llegar al diagnóstico final de LPO se requiere el cumplimiento de ambos criterios clínicos e histopatológicos y para el diagnóstico final de LLO, se utilizará en las siguientes condiciones: a) clínicamente típico de LPO pero histopatológicamente sólo "compatible con LPO", b) histopatológicamente típico de LPO pero clínicamente sólo "compatible con LPO" y c) clínicamente "compatible con LPO" e histopatológicamente "compatible con LPO" (11).

Diversos autores han investigado los factores de riesgo que se asocian al LPO y a las LLO. Entre los más estudiados, se encuentran el consumo de tabaco, el consumo de alcohol, y la infección con VPH (4, 8, 21,65-72).

Estudios previos describen la asociación del VPH con algunos DPM como LPO y LLO (2,4-6, 9, 15,100-102,137-139).

Algunos estudios afirman que la infección por VPH, sobre todo por los genotipos VPH 16 y VPH 18, está asociada con el índice de proliferación celular debido a la interacción de este virus con proteínas del ciclo celular (70,93).

El LPO presenta un marcado predominio en el género femenino (13,29). En el presente estudio los resultados obtenidos referidos a la distribución por género mostraron una mayor prevalencia del género femenino en ambas patologías. Estos resultados coinciden con estudios locales realizados por nuestro equipo (29), Lanfranchi *et al.*, (169) y con otros estudios en España (65), Brasil (27), China (61) e Irán (43).

Característicamente, el LPO afecta a personas adultas entre los 30 a 70 años de edad (13). Los resultados obtenidos muestran que la edad media de los pacientes estudiados fue de 62 años en LPO y 58 en LLO. Este resultado difiere con el trabajo de Alberdi-Navarro (62), que muestra que la edad media fue 57,1 años para LPO aunque coincide con el estudio mencionado en LLO que fue de 57,7 años para LLO, y con el trabajo de Aminzadeh *et al.*, (43) en el que la edad media fue mucho menor: de 46,1 años para LPO y de 46,9 años para LLO. Además, los resultados relacionados al rango de edad son entre 41-85 años en LPO y 25-84 años en las LLO. Estos resultados difieren con los resultados obtenidos para LPO en estudios realizados en Argentina (169), Brasil (24) y Estados Unidos (27).

En nuestro estudio, preferimos denominar aparición del primer síntoma relatado por el paciente en lugar de tiempo de evolución, ya que en el momento de la primera consulta el paciente muchas veces manifiesta que ha venido a la misma por aparición de dolor, ardor, por derivación o por autodescubrimiento de las lesiones y no significa que estas no hayan aparecido mucho tiempo atrás ya que generalmente son asintomáticas y “en consecuencia” el paciente puede desconocer el momento exacto.

Con relación a los resultados sobre la aparición del primer síntoma, relatado por el paciente durante la anamnesis (registrado en las historias clínicas), en ambas patologías se produjo a los seis meses de su aparición. El 31% de los pacientes de LPO y el 28% de los pacientes de LLO lo relataron entre los 6-12 meses y mayor a 12 meses; este resultado es diferente al encontrado por Bascones-Ilundain (153), quienes el 43,8% presentaba un tiempo de evolución mayor a 12 meses.

En relación con el sitio de toma de la biopsia, elegimos denominarlo así ya que los estomatólogos eligen los sitios clínicamente más “graves” para realizar la biopsia de la lesión en busca de posibles transformaciones o la presencia de displasia epitelial. Además, los LPO pueden tener más de una localización, por lo que el sitio de toma de biopsia generalmente es uno solo.

Se conoce que el LPO puede afectar en cualquier sitio de la cavidad bucal pero más comúnmente el sector medio y posterior de la mucosa yugal (28,29).

La mayoría de los trabajos describen los sitios de localización de la lesión (22, 27, 30,43) y no hacen referencia al sitio de toma de biopsia. El trabajo de Alberdi-Navarro (65) realiza la distinción entre sitio de localización y sitio de biopsia, pero agrupa a ambas patologías como “Enfermedades Líquenoides

Orales” (ELO), lo que discrepa con la clasificación de las lesiones estudiadas del presente trabajo.

El sitio predilecto para la toma de biopsia, en LPO, fue la mucosa yugal seguido por la lengua, y en LLO fue en la lengua, seguido por la mucosa yugal y el labio. Estos resultados coinciden en el LPO con los estudios realizados en Argentina por Aguas y Lanfranchi (22), en Estados Unidos y Brasil (27,30), por Bascones-Ilundain *et al.*, (153) en España y Aminzadeh *et al.*, (43) en los que se señala que el sitio de afectación del LPO fue la mucosa yugal aunque seguido por la encía (no por la lengua como en el presente estudio).

En el estudio de Aminzadeh *et al.*, (43), las LLO se localizaron en la mucosa yugal, lo que difiere con el presente estudio donde estas lesiones se encontraban más frecuentemente en la lengua y en segundo lugar en la mucosa yugal.

Durante años, los criterios de clasificación para LPO fueron los propuestos por la OMS en 1978 (38). Nuestro equipo, ha trabajado anteriormente el estudio de los aspectos clínico-patológicos de LPO siguiendo la anterior clasificación de la OMS (29).

En el presente estudio, los casos fueron clasificados siguiendo los criterios modificados por van der Meij y van der Waal del año 2003 (11) por lo que la comparación de los resultados obtenidos con los de otros estudios es un poco engorrosa, ya que la mayoría de los estudios actuales como en anteriores han utilizado otras clasificaciones.

Cabe remarcar que nuestro equipo aplicó esta nueva clasificación y comenzó una reclasificación de las biopsias diagnosticadas histopatológicamente como LPO y LLO de manera retrospectiva desde el año 2000.

Las lesiones en el LPO son simétricas, bilaterales o múltiples y tienen una gran variedad de presentaciones clínicas, incluidas las formas reticulares con estrías de Wickham, en placa, atróficas, ampollares y erosivas (13,27, 29-33) y las LLO pueden ser muy similares al LPO (42).

Con referencia a las lesiones elementales seleccionadas como sitio de toma de biopsia del LPO, la forma erosiva fue la más frecuente seguida por la forma reticular. Este resultado, difiere con otros estudios como por ejemplo el de Bascones-Ilundain *et al.*, (153) quienes relatan que la forma reticular fue la más frecuente seguida por la atrófica-erosiva; el de Oliveira *et al.*, (27) quienes informan que la forma reticular fue la más prevalente seguida por la forma erosiva.

En el estudio de Alberdi-Navarro (62), la presentación papular fue la más frecuente seguida por la erosivo-ulcerativa, lo que hace pensar que las lesiones elementales registradas y la clasificación utilizada difieren ampliamente con el presente estudio. En la clasificación actual de LPO y LLO, los criterios clínicos indican que la forma reticular se debe observar como líneas de color blanco-gris ligeramente elevadas (patrón reticular) y que las lesiones erosivas, deben tener además la presencia de lesiones reticulares en otras partes de la mucosa oral.

La presencia de criterios clínicos diagnósticos, bilateralidad y forma de red en las lesiones, también fueron estudiadas en el presente estudio. La bilateralidad en LPO estuvo presente en la totalidad de los casos (13/13) mientras que en LLO solamente en un poco más de la mitad (17/32), fue estadísticamente significativa ($p < 0,002$) y la forma de red de las lesiones estuvo presente en la totalidad de los casos (13/13) mientras que en LLO en la mitad de los casos (16/32), fue estadísticamente significativa ($p < 0,006$). Estos resultados difieren con el trabajo de De Lima *et al.*, (170) en el cual se registró que las lesiones de LPO, en el 51,29%, se observaron en un solo sitio, fueron simétricas y bilaterales mientras que en el 46,4% se observaron en múltiples sitios, fueron simétricas y bilaterales.

Los resultados sobre la presencia de bilateralidad y forma de red de las lesiones no pueden ser comparados exhaustivamente con otros estudios, debido a que estos no especifican (aunque sí referencian la presencia del patrón o forma reticular en LPO) los porcentajes de casos que presentaban ambos aspectos en las lesiones estudiadas. Estas características se describen aplicando los criterios diagnósticos clínicos de van der Meij y van der Waal (11); muchos de estos trabajos no utilizaron estos criterios de clasificación, lo que revela en el presente estudio que los criterios de clasificación, inclusión y exclusión fueron estrictos.

Existe una fuerte asociación entre VPH y LPO que se debe a las alteraciones que puede presentar el epitelio como erosiones o atrofas, que lo hace más susceptible a la infección por VPH (4).

El resultado obtenido en relación a la asociación de LPO y LLO con el VPH muestra que el mayor porcentaje de asociación a este virus lo presentaron las LLO (71%) y en menor porcentaje el LPO (33%). Este resultado en LLO, no puede ser comparado con otros estudios similares ya que no existen investigaciones que involucren estas lesiones pero vale destacar que en el estudio de Sahebjamiee *et al.*, los resultados indican que el VPH se encontró en un 57% asociado a LPO con presencia de displasia epitelial. Por lo que estos

casos, teniendo en cuenta los criterios de clasificación de LPO actuales, serían reclasificados como LLO (171).

Con relación a la asociación del LPO con el VPH, en el presente estudio, fue del 33%; este resultado difiere del estudio de Sahebjamiee *et al.*, (171) en el que LPO estuvo asociado en el 15%; del estudio de Campisi *et al.*, (2) en el que LPO estuvo asociado en el 19,7%; del estudio de Ostwald *et al.*, (70) en el que LPO estuvo asociado en el 15,4% y del estudio de Yildirim *et al.*, (15). En contraste, estos resultados son similares a los hallados en el estudio de Szarka *et al.*, (136) en el cual el LPO estuvo asociado en un 32,8%.

Las formas reticulares de LPO resultaron negativas para el VPH y un caso de LPO con presentación escleroatrófica fue VPH positivo. Los resultados negativos difieren de los resultados hallados en el estudio de Yildirim *et al.*, (15) en el que los casos reticulares de LPO fueron los que más se asociaron al VPH. Los resultados positivos son diferentes a los encontrados en los trabajos de Yildirim *et al.*, (15) en el cual los casos positivos fueron: erosivos, en placa y reticulares. También difiere del estudio local realizado en Córdoba, Argentina por Venezuela *et al.*, (100) en el cual las formas clínicas de LPO asociadas al VPH fueron en su totalidad las queratóticas y difiere también del estudio de Campisi *et al.*, (2) en el cual los casos asociados fueron atróficos-erosivos.

Con respecto a la asociación del género de los pacientes con el VPH, el género femenino estuvo más asociado. Este resultado coincide con los trabajos de Yildirim *et al.*, (15), Pol *et al.*, (16) en los que el género femenino estuvo más asociado al VPH.

Los cambios histopatológicos observados en el presente estudio coinciden con los trabajos de Hiremath *et al.*, (172) y Mravak-Stipetic *et al.*, (173) en los cuales existe una correlación entre características histopatológicas patognomónicas o definitorias de LPO y LLO. Estos resultados difieren de los hallados en los estudios de Alberdi-Navarro (65), Aguirre (174), Cortés *et al.*, (175) y Alberdi-Navarro *et al.*, (176) quienes en sus trabajos consideran que no existe una correlación entre los diferentes subtipos clínicos y los histopatológicos de LPO y LLO.

Las LLO se han denominado de manera variable a lo largo de la historia y según los diferentes autores como: "lesiones líquenoides orales", "reacciones líquenoides orales", "reacciones líquenoides" y "reacciones líquenoides inducidas por fármacos orales" (42) pero el término "Lesiones Líquenoides Orales" parece ser el más adecuado (41). El término sugerido por Aguirre (173) "Enfermedad

Liquenoide Oral” no sería el más adecuado para agrupar a LPO y LLO, ya que presentan diferente etiología, patogenia e histopatología pero podría ser muy útil incluir en ese grupo las diferentes etiologías asociadas a la presencia de LLO.

Desde el año 1906, la histopatología del LPO ha sido objeto de numerosas descripciones incluidas las clasificaciones de la OMS en 1978 (38) y la de van der Meij y van der Waal en 2003 (11).

En el presente estudio, el infiltrado linfocitario en banda y la degeneración hidrópica de los queratinocitos se registraron en la totalidad de los casos y la displasia epitelial estuvo ausente en el 100% de los casos de LPO, resultando estadísticamente significativas todas las variables relacionadas con los criterios diagnósticos histopatológicos para LPO. Estos resultados coinciden con el trabajo realizado por Fernández-González (177) en el cual el infiltrado y la degeneración hidrópica se observaron en el 100% de los casos de LPO aunque el registro de la displasia epitelial difiere debido a que se observó en un 5,12%.

También los resultados asociados a esas variables, en el presente estudio, difieren del trabajo de Aminzadeh *et al.*, (43) ya que se observó el infiltrado linfocitario en banda y la degeneración hidrópica en el 91,7% y 81,3% respectivamente en LPO.

Los cuerpos apoptóticos de Civatte en el LPO, en el presente estudio, fueron registrados en el 38% de los casos, lo que fue estadísticamente significativo ($p=0,05$) lo que difiere del estudio de Alberdi-Navarro *et al.*, (176) quienes en los casos “típicos clínicamente con LPO” los registraron en el 43,3% y en los casos “típicos histológicamente con LPO” los registraron en el 60%, lo cual fue estadísticamente significativo en este último.

En el estudio de Alberdi-Navarro *et al.*, (176) no se especifica si todos los casos de cada grupo mencionado fueron finalmente clasificados clínica e histológicamente como LPO, pese a seguir la clasificación actual para esta patología.

En las LLO, el 75% de los casos presentaban displasia epitelial. Estos resultados, difieren del estudio de Alberdi-Navarro *et al.*, (176) en el cual en los casos “típicos clínicamente con LLO” se registró la presencia de displasia en un 11,1% y en los casos “típicos histológicamente con LLO” en un 17,7%.

En el presente estudio, el 41% de los casos estudiados de LLO presentaban degeneración hidrópica y en el 69% presentaban infiltrado linfocitario en banda. Estos resultados difieren de los obtenidos por Aminzadeh *et al.*, (43) cuyos porcentajes obtenidos fueron superiores: 71,7% y 76,1% respectivamente y de

los de Alberdi-Navarro *et al.*, (176) cuyos casos “típicos clínicamente con LLO” presentaron degeneración hidrópica en el 50% e infiltrado linfocitario en banda, en el 88,9%. Además, en los casos “típicos histológicamente con LLO” registraron degeneración hidrópica en un 11,1% e infiltrado inflamatorio en un 86,7%. En el estudio de Alberdi-Navarro *et al.*, no se especifica si todos los casos, en cada grupo mencionado, fueron clasificados clínica e histológicamente como LLO, pese a seguir la clasificación actual para esta patología.

La Academia Americana de Patología Oral y Maxilofacial describe la presencia de hiperortoqueratosis, hiperparaqueratosis o ambas en las formas reticulares de LPO mientras que en las otras formas clínicas describe acantosis y atrofia (1)

Con relación a la presencia de hiperqueratosis, en ambas patologías predominó la hiperparaqueratosis. La presencia de ésta fue mayor en el LPO (77%) que en las LLO (53%), pero esto no fue estadísticamente significativo ($p=0,51$). Este resultado coincide con los resultados de Aminzadeh (43) donde la presencia de hiperpaqueratosis predominó en ambas patologías pero difirió en los porcentajes de hiperqueratosis hallados en cada patología; fue mayor en las LLO (LPO: 46,9% y LLO: 56,5).

En la literatura, existen muchos trabajos que han estudiado la asociación del VPH y LPO; sin embargo estos no han detallado los cambios histopatológicos que se observan en los casos VPH positivos.

En el presente estudio, los cambios observados en los casos estudiados (5 LLO y 1 LPO) fueron imágenes tipo coilocíticas e hiperqueratosis fueron registrados en la totalidad de los casos aunque la variable imágenes tipo coilocíticas solamente fue estadísticamente significativa $p=0,01$ La acantopapilomatosis y displasia epitelial se observaron en el 83% de los casos estudiados pero solamente el valor de p para la variable acantopapilomatosis fue estadísticamente significativo ($p=0,003$).

La variable granulosis fue registrada solamente en el 33% de los casos y no fue estadísticamente significativa ($p=0,16$). Estos resultados coinciden con el trabajo de Estrada-Pereira *et al.*, (139) donde coilocitos e hiperqueratosis estuvieron presentes en el 100% de los casos y difieren en los porcentajes de las variables hipergranulosis (59%), acantosis (53%), papilomatosis (14%) y displasia epitelial (68%); es decir que 58/85 casos presentaban displasia epitelial por lo que, aplicando criterios actuales de clasificación, estos casos serían reclasificados como LLO.

En el presente estudio, también se realizó el análisis de citologías exfoliativas en 6 casos (5 LLO y 1 LPO). Los resultados demuestran que prevaleció el género femenino, la presencia de displasia epitelial leve fue del 67% y del 33% para la displasia epitelial moderada y ningún caso presentó displasia epitelial severa. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio de Werneck *et al.*, (178) los que muestran que el género femenino también prevaleció aunque difiere en que todos los casos fueron LPO y con el porcentaje de displasia epitelial observado (46,7%) para displasia epitelial leve y 4,76% para la moderada; pero coincide en que ningún caso presentó displasia severa.

En relación con el consumo de tabaco, la Secretaría de Políticas Integrales sobre Drogas de la Nación Argentina (SEDRONAR) (179) en el año 2017 informó que algo más de la mitad de la población entre 12 a 65 años fumó cigarrillos alguna vez en su vida y unas 5.418.431 personas, es decir casi 29 personas de cada 100 fumaban. Entre los varones el consumo era mayor que entre las mujeres (32,2% y 25,3 % respectivamente).

En la mayoría de los estudios no se encontraron datos sobre estos hábitos en pacientes con LLO pero sí está ampliamente estudiado en el LPO.

En el presente estudio, los resultados muestran que el 31% de los pacientes con ambas patologías fumaban lo que estadísticamente no fue significativo ($p=0,91$). Este resultado difiere del estudio de Alberdi-Navarro (65) en el cual el 21,1% de los pacientes con LPO fumaban y el 17,6% de los casos de LLO también lo hacían, esta diferencia no fue significativa. En el estudio de Patil *et al.*, (180) en la India, donde se registraron las diferentes formas de consumir tabaco a lesiones en la cavidad bucal, el hábito de fumar fue mayor en LPO (2,5%) con respecto a LLO.

En otros estudios donde se analizó solamente el hábito de fumar en los pacientes con LPO, presentaron porcentajes similares a nuestro estudio como en el trabajo de Mostafa y Ahmed (181), realizado en Egipto, quienes registraron el hábito de fumar en el 31,25%; en el trabajo de Campisi *et al.*, (2), realizado en Italia, se registró en el 35,2%; en el trabajo de Oliveira *et al.*, (27), realizado en Brasil, fue registrado en el 20% y en el estudio Shen *et al.*, (182), realizado en China, donde el 8,3% de los pacientes con LPO presentaban asociación con tabaco; este porcentaje obtenido fue mucho menor que en el presente trabajo.

La Secretaría de Políticas Integrales sobre Drogas de la Nación Argentina (SEDRONAR) (179), en el año 2017, informó que el 81% de las personas tomaron alguna bebida alcohólica en su vida y unas 2.299.598 personas

comenzaron a beber en el último año. El consumo de alcohol se encuentra presente en el 53% de la población y, en mayor medida, en los varones.

El consumo de alcohol fue registrado en el 15% de los pacientes que presentaban LPO y en el 34% de los pacientes con LLO, con un el valor de $p=0,14$, que no fue estadísticamente significativo. Este resultado, difiere de los resultados de Alberdi-Navarro (65) cuyos porcentajes en ambas patologías, fue del 41.

El presente estudio comparó el consumo de alcohol y tabaco en relación con la presencia o ausencia del VPH. En los casos VPH positivos, el 17% de los pacientes fumaban mientras que en los VPH negativos lo hacía el 25%, lo cual no fue estadísticamente significativo ($p=0,63$). En los casos VPH positivos, el 50% consumía alcohol mientras que en los casos VPH negativos solo el 25% lo hacía, lo cual no fue estadísticamente significativo ($p=0,35$). Estos resultados son difíciles de comparar con los de otros estudios ya que no han registrado y comparado estos hábitos entre ambas patologías pero en el estudio de Zendeli-Bedjeti *et al.*, (183) se registraron los porcentajes del consumo de tabaco y alcohol en pacientes con lesiones orales potencialmente malignas; el consumo de tabaco en los casos VPH negativos fue del 22,5% y en los positivos fue del 5%. Con respecto al porcentaje de alcohol en los casos VPH positivos fue del 16,25% y en los negativos del 83,75%. Estos porcentajes son mayores a los encontrados en el presente trabajo pero en el estudio del mencionado autor, se excluyeron las LLO de las lesiones potencialmente malignas.

Las técnicas modernas de inmunohistoquímica, permiten detectar marcadores tisulares que informan el porcentaje de proliferación celular como de apoptosis existente en una determinada muestra de tejido perteneciente a una lesión potencialmente maligna (75, 77,78).

En la capa basal del epitelio oral, en condiciones normales, se ubica el compartimento celular en proliferación mientras que la capa suprabasal incluye zonas de maduración celular, por lo tanto la detección de Ki-67 en la capa suprabasal es un indicador objetivo de la presencia de displasia epitelial (91). Bcl-2 participa en la inhibición de la apoptosis de linfocitos mientras que Bax participa en la inducción de la apoptosis de los queratinocitos (93).

En relación con las variables inmunohistoquímicas estudiadas, el porcentaje promedio de proliferación celular total de Ki-67 fue mayor en los casos de LLO que en los de LPO, 26 y 24 por ciento respectivamente, pero esto no fue estadísticamente significativo. Estos resultados difieren de los observados en el

estudio de Acay *et al.*, (90) en el que ambas patologías presentaron un porcentaje del 50%.

El biomarcador Ki-67 se expresó positivo en todos los casos de LPO y LLO. Este resultado difiere del estudio de Acay *et al.*, (90) en el que se encontró un porcentaje mayor en LPO (95,4%) con respecto a las LLO (89%).

Se estudió también la proliferación celular, mediante el biomarcador Ki-67, en la capa basal y parabasal del epitelio, así como a nivel del infiltrado. En la capa parabasal y en el infiltrado, el porcentaje de proliferación fue mayor en las LLO que en el LPO, lo que no fue estadísticamente significativo. Este resultado no puede ser comparado con otros estudios ya que los autores que han estudiado este marcador no han realizado la división por capas (basal y parabasal) e infiltrado, sino que tomaron como resultado una proliferación total del marcador y no compararon ambas patologías.

En el estudio de Dávila *et al.*, (184), realizado en Uruguay, el índice de proliferación celular en LPO fue del 12,40% y se observó principalmente en la capa basal del epitelio. Este resultado es menor al del presente estudio, que fue del 24%, y se observó principalmente en la capa basal y parabasal.

También se comparó la proliferación celular entre casos VPH positivos y negativos, y además entre ambas patologías relacionado a la positividad o negatividad de estas para el Virus del Papiloma Humano, pero no se puede realizar una discusión con otras investigaciones ya que no hay estudios que comparen ni que estudien estos aspectos, lo que destaca la originalidad de la presente investigación.

Con relación a la expresión positiva del biomarcador proapoptótico (Bax), se observaron resultados similares en ambas patologías; pero fue mayor el porcentaje en la basal y parabasal en los casos de LPO VPH positivos. Este resultado es similar al resultado de Bascones *et al.*, (89) en el cual el biomarcador Bax fue positivo en la capa basal y parabasal, aunque el porcentaje de casos positivos fue diferente.

En el presente estudio, la expresión positiva del biomarcador antiapoptótico (Bcl-2), en las LLO, fue mayor el porcentaje en la capa basal, parabasal y en el infiltrado en los casos VPH positivos. Este resultado, difiere del resultado obtenido por Arreaza *et al.*, (87) en el cual a nivel de la capa basal ambas patologías presentaron igual porcentaje y a nivel del infiltrado fue mayor el porcentaje en LPO, mientras que a nivel de la capa parabasal no fue estudiado.

Distintos autores afirman, que el género alfa del VPH es de gran importancia clínica ya que este género contiene la mayoría de los VPH de la mucosa oral e incluyen los llamados VPH de bajo riesgo y de alto riesgo (129,135).

Los genotipos del VPH encontrados en el presente estudio fueron cinco: VPH 6, VPH 11, VPH 13, VPH 16 y VPH 53. Los más frecuentes fueron el genotipo VPH 6, VPH 53 y VPH 16 en un 25%. Estos resultados difieren del metaanálisis realizado por Ma *et al.*, (7) en el cual el VPH16 fue el más frecuente seguido por el VPH18; del trabajo de Gómez-Armayones *et al.*, (185) quienes detectaron al genotipo 16 como el más prevalente; del trabajo de Ostwald *et al.*, (70) quienes reportaron la presencia del genotipo 16 y 18 en un 9,4% en el LPO; y del trabajo de Sameera *et al.*, (6) quienes detectaron en un 86,6% al genotipo 18; lo que da referencia de la importancia de realizar estudios regionales de estas lesiones asociadas a la infección por VPH.

Los resultados del presente estudio coinciden con los obtenidos por Szarka *et al.*, (136) quienes en su estudio identificaron los genotipos: 6, 11,16, pero además identificaron otros genotipos como el 18, 32, 33, 39,55; con otros estudios previos de la región, realizados por Mosmann *et al.*, y Venezuela *et al.*, (100, 102,128) quienes demostraron que el VPH 18 no es el más frecuentemente identificado en nuestra población, ya sea en lesiones genitales como en lesiones orales.

En estudios locales, como en el de Venezuela *et al.*, (100), se identificaron los genotipos 11, 13 y 52 en LPO del tipo queratósico. Los genotipos VPH 11 y 13 coinciden con los hallados en el presente estudio aunque el estudio del mencionado autor solo define lesiones malignas y potencialmente malignas al clasificar los casos estudiados.

En el presente trabajo, los genotipos de VPH de alto riesgo fueron: el VPH 16 y VPH 53 mientras que los de bajo riesgo fueron los VPH 6,11 y 13, y no existió predominio entre los genotipos de alto y bajo riesgo. En los de alto riesgo, no hubo predominio de algún genotipo sobre otro y en los de bajo riesgo prevaleció el genotipo 6 en un 50%. Estos resultados coinciden con los de Szarka *et al.*, (136), en los cuales los genotipos encontrados fueron de bajo riesgo (6 y 11) y el genotipo 16 (de alto riesgo) aunque en el estudio del mencionado autor los genotipos más frecuentes fueron los de alto riesgo.

En nuestro estudio, en los casos de LPO, el único genotipo detectado (en un caso con presentación clínica escleroatrófica) fue el 16 que es de alto riesgo mientras que en las LLO se detectaron genotipos de bajo riesgo 6, 11,13 y de

alto riesgo 16 y 53, prevaleciendo los genotipos de bajo riesgo. Estos resultados difieren del estudio de Szarka *et al.*, (136) en el cual el genotipo 16 fue asociado a LPO en las formas reticulares y erosivas atróficas.

En la actualidad, no existen estudios que identifiquen la presencia del VPH ni de los genotipos asociados a las LLO. Si bien el estudio de Knezevic (186) se estudió a las lesiones potencialmente malignas, que incluía a LPO y LLO, no se especificaron los genotipos encontrados en cada patología.

Sobre la distribución de las variantes del VPH, se ha informado que para Europa y América predomina la variante europea; para África las variantes africanas 1 y 2; la variante asiática (rama emergente de la variante europea) predomina en el sur de Asia, y en el caso de la variante asiática americana se encuentra en el centro y sur de América, y en Europa. La distribución geográfica de los tipos de VPH y variantes específicas puede estar influenciada por varios factores incluyendo efectos fundadores, la coevolución de los VPH con el hombre, los patrones de migración humana y las aptitudes virales tales como la transmisión viral (151).

En relación con el estudio filogenético del VPH 16, en el presente estudio, se lograron analizar sólo dos casos. Uno en una lesión con diagnóstico de LLO que correspondió a la variante Europea Asiática (Ea) y otro en una lesión con diagnóstico de LPO que correspondió a la variante Europea Prototipo (Ep). Estos resultados difieren del estudio de Arirachakaran *et al.*, (187) quienes realizaron el estudio filogenético del genotipo 16 en un caso de LPO que estuvo asociado a variantes asiáticas del Este. Además, ese estudio no indica si los casos fueron clasificados con los criterios actuales.

CONCLUSIONES

1. La aplicación de los criterios de diagnóstico, clínicos como histopatológicos, de la OMS modificados por van der Meij y van der Waal; son de utilidad para clasificar con certeza al Liquen Plano Oral y a las Lesiones Liquenoides Orales así como para realizar el diagnóstico diferencial entre ambas lesiones.
2. Resulta interesante destacar que las Lesiones Liquenoides Orales presentan características clínicas de bilateralidad y forma de red en la mitad de los casos.
3. Las Lesiones Liquenoides Orales presentan la queratosis, en el 47% de los casos, como lesión elemental seleccionada como sitio de toma de biopsia.
4. En relación con las características histopatológicas de las Lesiones Liquenoides Orales, el infiltrado linfocitario en banda fue observado en un alto porcentaje (69%) y la degeneración hidrópica solo en el 41%.
5. Es fundamental destacar la presencia de displasia epitelial en las Lesiones Liquenoides Orales, que se observa en el 75% de los casos. De estos casos, el 21% presentó infiltrado en banda y degeneración hidrópica.
6. La presencia de cuerpos apoptóticos de Civatte y de atrofia epitelial se observaron en mayor porcentaje en los casos de Liquen Plano Oral. Si bien estos no son criterios diagnósticos para esta patología, servirían al momento de “inclinarse la balanza” hacia el diagnóstico de Liquen Plano Oral. La presencia de un epitelio atrófico, es un dato de relevancia clínica en el diagnóstico y pronóstico en estas lesiones.
7. No se observó asociación, en la muestra estudiada y en ambas patologías, con factores de riesgo como el consumo de tabaco y de alcohol así como tampoco con la infección por Virus del Papiloma Humano.
8. Los cambios histopatológicos, que se observan de manera constante en todos los casos positivos para el Virus del Papiloma Humano, son: imágenes tipo coilocíticas y la hiperqueratosis. Aunque en la cuantificación de la muestra, la hiperqueratosis no pudo asociarse a la presencia del Virus del Papiloma Humano; las imágenes tipo coilocíticas sí se asocian a la presencia de este virus.

9. Las variables acantopapilomatosis y displasia epitelial, aunque no se observan de manera constante en todos los casos VPH positivos, son los cambios que se asocian a la presencia de este virus. Estos hallazgos podrían considerarse como otros cambios citopáticos del Virus Papiloma Humano, en la muestra estudiada.
10. Si bien el índice de proliferación celular total en cada grupo de patologías, revelado por la positividad de Ki67, fueron similares; en las Lesiones Liquenoides Orales es mayor y más intenso en el infiltrado así como en la capa parabasal. Su positividad en la capa parabasal, podría indicar mayores posibilidades de transformación maligna.
11. El Liquen Plano Oral presenta mayor apoptosis en la capa basal y parabasal, es decir que presenta muerte celular en estos estratos. En cambio, las Lesiones Liquenoides orales presentan mayor antiapoptosis en todos los estratos, lo que indicaría su mayor porcentaje de transformación maligna.
12. Las Lesiones Liquenoides Orales, en la muestra estudiada, presentan mayor porcentaje de asociación a la infección con el Virus del Papiloma Humano y las pacientes del género femenino, que presentan estas lesiones, son las más afectadas.
13. Las lesiones Liquenoides orales, cuando están infectadas con el Virus del Papiloma Humano, presentan mayor antiapoptosis en la capa basal, parabasal e infiltrado: esto favorecería el acúmulo de mutaciones y cuando los pacientes con estas lesiones consumen alcohol; presentan mayor antiapoptosis (expresión 3+ de Bcl-2) a nivel del infiltrado, lo que en ambas circunstancias podría estar indicando mayor posibilidad de transformación maligna.
14. Los genotipos del Virus del Papiloma Humano de alto riesgo y la infección con más de un genotipo, presentan mayor expresión positiva de Bcl-2 en la capa parabasal; lo que indica una disminución de la apoptosis y favorecería el daño celular.
15. El VPH 16 es el genotipo de alto riesgo, en la muestra estudiada, asociado al Liquen Plano Oral. El VPH 6 (genotipo de bajo riesgo) y el VPH 53 (genotipo de alto riesgo) son los genotipos más frecuentes en las Lesiones Liquenoides Orales.
16. Los genotipos VPH16 hallados, corresponden al linaje Europeo. El Europeo prototipo en Liquen Plano Oral y el Europeo Asiático en Lesión

Liquenoide Oral. Estas variantes europeas podrían haber llegado a Sudamérica principalmente durante la colonización española y es por eso que estas variantes genotípicas circulan en nuestro país y en la Provincia de Córdoba.

Más allá de las limitaciones que presentó el estudio, por ser un trabajo retrospectivo, como el elevado número de casos que debieron ser excluidos por la ausencia de datos; aplicar los criterios de van der Meij y van der Waal, fue útil en la valoración clínica e histopatológica así como en el pronóstico de ambas patologías.

Medir el índice de proliferación celular total de Ki67 y especialmente en la capa parabasal podría alertar el comportamiento de estas patologías.

El estudio del Virus del Papiloma Humano en todos los casos de Liquen Plano Oral y Lesiones Liquenoides Orales, debería ser realizado de rutina para conocer el comportamiento biológico de estas lesiones y aportar más datos histopatológicos que permitan predecir su infección.

El alto porcentaje de displasia epitelial registrada, nos lleva a pensar en la necesidad imperiosa de realizar controles periódicos, valorar la evolución de estas lesiones y quizás poder predecir su posible transformación maligna.

Como proyecciones resultaría interesante, a futuro, profundizar el estudio de proliferación celular de Ki67 así como la identificación del Virus de Papiloma Humano y continuar con el estudio de las interacciones entre factores como el alcohol y estas lesiones, mediante la realización de investigaciones prospectivas con un seguimiento adecuado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cheng Y, Gould A, Kurago Z, Fantasia J, Muller S. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surg, Oral Med, Oral Path, Oral Radiol* 2016;122(3):332-354.
2. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, et al. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol* 2007; 30(4):813–23.
3. Giovannelli L, Campisi G, Colella G, Capra G, Di Liberto C, Caleca MP, Matranga D, D'Angelo M, Lo Muzio L, Ammatuna P. Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with potentially malignant and malignant oral lesions. *Mol Diagn Ther* 2006; 10(1):49–55.
4. Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis* 2011; 17(1):58–72.
5. Kato S, Kawai R, Isomura M, Sato N, Yoshida W, Kamiya K et al. Human Papillomavirus in Oral Lichen Planus of Japanese Patients. *J Hard Tissue Biol.* 2015; 24(2):181-188.
6. Sameera R, Kotikalpudi KP, Kranti KR, Md P, Sridhar RE.,Molecular Detection of Human Papillomavirus DNA in Oral Lichen Planus Patients. *JCDR* 2019;13(1):20-24.
7. Ma J, Zhang J, Zhang Y, Lv T, Liu J. The Magnitude of the Association between Human Papillomavirus and Oral Lichen Planus: A Meta-Analysis. *PLOS ONE* 2016;11(8):e0161339
8. Campisi G, Giovannelli L, Arico P, Lama A, Di Liberto C, Ammatuna P, et al. HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98(6):705–11.
9. OFlatharta C, Flint SR, Toner M, Butler D, Mabruk MJ. Investigation into a possible association between oral lichen planus, the human herpesviruses, and the human papillomaviruses. *Mol Diagn* 2003; 7(2):73–83.

10. Gupta S, Gupta S. Role of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders: A review of the literature. *Ind J Dent* 2015;6:91-98
11. Van der Meij EH, 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. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(9):507–12.
12. Gupta S, Jawanda MK. Oral lichen planus: An update on etiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and management. *Ind J of Derm* 2015; 60(3):222-229.
13. Sapp Philip J, Eversole Lewis R, Wysocki George P. "Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea". 2ª Ed. Elsevier. España 2006, pp 244-276.
14. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100(1):40–51.
15. Yildirim B, Sengüven B, Demir C. Prevalence of herpes simplex, Epstein Barr and human papilloma viruses in oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16(2):e170–174.
16. Pol C, Ghige S, Gosavi S. Role of human papillomavirus-16 in the pathogenesis of oral lichen planus - an immunohistochemical study. *Int Dent J* 2014; 65(1):11-14.
17. Campisi G, Di Fede O, Craxi A, Di Stefano R, Margiotta V. Oral lichen planus, hepatitis C virus, and HIV: no association in a cohort study from an area of high hepatitis C virus endemicity. *J. Am. Acad. Dermatol* 2004; 51(3):364–70.
18. Zhou Y, Jiang L, Liu J, Zeng X, Chen Q. The prevalence of hepatitis C virus infection in oral lichen planus in an ethnic Chinese cohort of 232 patients. *Int J Oral Sci* 2010; 2(2):90–7.
19. Míco-Llorens JM, Delgado-Molina E, Baliellas-Comellas C, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Association between B and/or C chronic viral hepatitis and oral lichen planus. *Med Oral* 2004; 9(3):183–90.
20. Chaudhary S. Psychosocial stressors in oral lichen planus. *Aus Dent J* 2004;49:(4):192-195

21. López De Blanc S, Gendelman H, Itoiz M, Lanfranchi H. Study of the vascular pattern in oral lichen planus. *Acta Odont. Latinoam.* 1996; 9(1):27-36.
22. Aguas SC, Lanfranchi-Tizeira HE. Lesiones premalignas o cancerizables de la cavidad oral. *Rev. Fac. Odont. UBA* 2004; 19 (47):21-30.
23. Scully C, Eisen D, Carrozzo M. Management of Oral Lichen Planus. *Am J Clin Dermatol* 2000;1(5): 287-306.
24. Pindborg JJ, Mehta FS, Daftary DK, Gupta PC, Bhonsle RB. Prevalence of oral lichen planus among 7639 Indian villagers in Kerala, South India. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1972; 52:216-9.
25. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 2002; 13 : (4):350–65.
26. Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus--a review. *J. Oral Pathol. Med* 2010; 39:(10):729–34.
27. Oliveira Alves MG, Almeida JD, Balducci I, Guimarães Cabral LA. Oral lichen planus: A retrospective study of 110 Brazilian patients. *BMC Res Notes* 2010; 3:157.
28. Mollaoglu N. Oral lichen planus: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000; 38: 370-377.
29. Ferreyra de Prato RS, Rocamundi MR, Tomasi RA, Tello-Roldán E, Asis G. Líquen Plano Oral: correlación histopatológica. *UNlar Ciencia* 2012; 1:2-6.
30. Eisen D. The clinical features, malignant potential and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J. Am. Acad. Dermatol* 2002; 46(2):207–14.
31. Sousa FACG de, Rosa LEB. Oral lichen planus: clinical and histopathological considerations. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008;74(2):284–292.
32. Thorn JJ, Holmstrup P, Rindum J, Pindborg JJ. Course of various clinical forms of oral lichen planus. A prospective follow-up study of 611 patients. *J Oral Pathol* 1988; 17: 213-218.
33. Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg, oral Med, oral Pathol, oral Radiol* 2018; 125:582-590.

34. Shklar G. Lichen planus as an oral ulcerative disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972; 33:376-388.
35. World Health Organization. International Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I eds. Berlin: Springer Eds.; 1997.
36. Krutchkoff DJ, Cutler L, Laskowski S. Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. *J Oral Pathol* 1978; 7:1-7.
37. Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a systematic review. *J Am Dent Assoc* 2014; 145:45–56.
38. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46:518-39.
39. Rad M, Hashemipoor MA, Mojtahedi A, Zarei MR, Chamani G, et al. Correlation between clinical and histopathologic diagnoses of oral lichen planus based on modified WHO diagnostic criteria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2009;107:796-800
40. Almeyda J, Levantine A. Drug reactions. XVI. Lichenoid drug eruptions. *Br J Dermatol* 1971; 85:604-7.
41. Kamath V, Setlur K, Yerlagudda K. Oral lichenoid lesions - A review and update. *Indian Journal of Dermatology* 2015; 60(1):1-102.
42. Cortés-Ramírez DA, Rodríguez-Tojo MJ, Gainza-Cirauqui ML, Martínez-Conde R, Aguirre-Urizar JM. Overexpression of cyclooxygenase-2 as a biomarker in different subtypes of the oral lichenoid disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:738-43
43. Aminzadeh A, Jahanshahi G, Ahmadi M. A retrospective comparative study on clinico- pathologic features of oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *Dent Res J (Isfahan)* 2013; 10: 168–172.
44. McParland H, Warnakulasuriya S. Oral Lichenoid Contact Lesions to Mercury and Dental Amalgam—A Review. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012.
45. Cawson R, Odell E. Cawson's essentials of oral pathology and oral medicine. 8th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2012.
46. Serrano-Sánchez P, Bagán JV, Jiménez-Soriano, Sarrión G. Drug-induced oral lichenoid reactions. A literature review. *J Clin Exp Dent* 2010; 2:e71-5.

47. Scully C, Bagan JV. Adverse drug reactions in the orofacial region. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15:221-39.
48. Bagán JV, Thongprasom K, Scully C. Adverse oral reactions associated with the COX-2 inhibitor rofecoxib. *Oral Dis* 2004; 10:401-3.
49. Zain RB. Oral lichenoid reactions during prophylaxis with sulphadoxine-pyrimethamine combination. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1989; 20:253-6.
50. Upadhyayai JB, Nangia AK, Mukhija RD, Misra M, Mohan L, Singh KK. Cutaneous reactions due to antihypertensive drugs. *Indian J Dermatol* 2006;51:189-91.
51. McCartan BE, Lamey PJ. Expression of CD1 and HLA-DR by Langerhan cells (LC) in oral drug induced lichenoid reactions (LDE) and idiopathic oral lichen planus (LP). *J Oral Pathol Med* 1997;26:176-80.
52. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, *et al.* Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999;285:412-5.
53. Schubert MM, Sullivan KM. Recognition, incidence, and management of oral graft-versus-host disease. *NCI Monogr* 1990;9:135-43.
54. Bäckman K, Jontell M. Microbial-associated oral lichenoid reactions. *Oral Dis* 2007;13:402-6.
55. Van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14(7):E310–314.
56. Krupaa R, Sankari S, Masthan KMK, Rajesh E. Oral lichen planus: An overview. *J Pharm Bioall Sciences* 2015;7(5):158-161.
57. Van den Haute V, Antoine JL, Lachapelle JM. Histopathological discriminant criteria between lichenoid drug eruption and idiopathic lichen planus: Retrospective study on selected samples. *Dermatologica* 1989;179:10-3.
58. Juneja M, Mahajan S, Rao NN, George T, Boaz K. Histochemical analysis of pathological alterations in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *J Oral Sci* 2006;48:185-93.
59. Laine J, Kalimo K, Happonen RP. Contact allergy to dental restorative materials in patients with oral lichenoid lesions. *Contact Dermatitis* 1997;36:141-6.

60. Thongprasom K, Mravak-Stipetić M, Luckprom P, Canjuga I, Biocina-Lukenda D, Vidović-Juras D, et al. Oral lichen planus: A retrospective comparative study between Thai and Croatian patients. *Acta Dermatovenerol Croat* 2009;17:2–8
61. Xue JL, Fan MW, Wang SZ, Chen XM, Li Y, Wang L. A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *J Oral Pathol Med* 2005;34:467–72.
62. Mares S, Ben Slama L, Gruffaz F, Goudot P, Bertolus C. Potentially malignant character of oral lichen planus and lichenoid lesions. *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale* 2013;114(5):293–298.
63. Ingafou M, Leao JC, Porter SR, Scully C. Oral lichen planus: A retrospective study of 690 British patients. *Oral Dis* 2006;12:463–8.
64. Silverman Jr S. Atlas of clinical oncology oral cancer. London: American Cancer Society.2003.
65. Alberdi-Navarro J. Caracterización clínico-patológica de la enfermedad liquenoide oral y sus principales subtipos. Universidad del País Vasco; 2017:pp 206.
66. Aghbari S, Abushouk A, Attia A, Elmaraezy A, Menshawy A, Ahmed M et al. Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A meta-analysis of 20095 patient data. *Oral Oncology* 2017;68:92-102.
67. Piemonte ED, Lazos JP, Brunotto M. Relationship between trauma of the oral mucosa, oral potentially malignant disorders and oral cancer *J Oral Pathol & Med* 2010; 39: 513-17.
68. Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol* 2012;6 (1):3–15.
69. Mattila R, Rautava J and Syrjanen S. Human papillomavirus in oral atrophic lichen planus lesions. *Oral Oncol* 2012;48: 980-4.
70. Ostwald C, Rutsatz K, Schweder J, Schmidt W, Gundlach K and Barten M. Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. *Med Microbiol Immunol* 2003;192: 145-8.
71. World Health Organization Classification of Tumours. Eds:EI-Nagggar AK., Chan J.K, .Grandis J.R , Takata T., Slootweg P. J.Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx In:WHO Classification of Head and Neck Tumours (4th edition).IARC, Lyon 2017,pp104-131.

72. Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, Broccoletti R, Carbone M, Pagano M, Vestita C, Rosso S, Merletti F. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol* 2004; 40(1):77-83.
73. Van der Meij EH, Schepman KP, Smeele LE, van der Wal JE, Bezemer PD, van der Waal I. A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88(3):307-10.
74. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100(2):164-78.
75. Aguado Gil JM, Rubio Flores D. Apoptosis and oral lichen planus. Actual state. *Av.Odontol* 2009;25(1):11-18
76. Georgakopoulou E, Ahtari M, Ahtaris M, Foukas P, Kotsinas A. Oral Lichen Planus as a Preneoplastic Inflammatory Model. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:1-8.
77. García García V, González-Moles MA, Bascones Martínez A. Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral. Resultados preliminares. *Av. Odontoestomatol* 2006; 22 (5): 263-269.
78. Sousa FA, Rosa LE. Oral lichen planus: clinical and histopathological considerations. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008; 74(2):284-292.
79. Teni T, Pawar S, Sanghvi V, Saranath D. Expression of Bcl-2 and Bax In Chewing Tobacco-Induced Oral Cancers and Oral Lesions from India. *Pathol Oncol Res* 2002; 8 (2):109-14.
80. Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med* 2003;32:125-38
81. Li D, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci* 2004;95:644-50.
82. Loro LL, Johannessen AC, Vintermyr OK. Decreased expression of bcl-2 in moderate and severe oral epithelia dysplasias. *Oral Oncology* 2002; 38:691-8.

83. Schoelch ML, Le QT, Silverman S Jr, McMillan A, Dekker NP, Fu KK, Ziober BL, Regezi JA. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 1999;35:77-85.
84. Mc Alinden RL, Maxwell P, Napier S, Hamilton P, Cowan CG, Lundy FT, Lamey PJ, Marley JJ. Bcl-2 expression in sequential biopsies of potentially malignant oral mucosal lesions assessed by immunocytochemistry. *Oral Diseases* 2000;6:318-26.
85. Li XR, Guo J, Li XM. The expression and changes of apoptosis protein Bcl-2 and Bax in oral lichen planus. *Shanghai Journal of Stomatology* 2015;24(4):465–469.
86. Pigatti FM, de Assis Taveira LA, Soares CT. Immunohistochemical expression of Bcl-2 and Ki-67 in oral lichen planus and leukoplakia with different degrees of dysplasia. *Inter J Dermatol* 2015;54(2):150–155.
87. Arreaza A, Rivera H, Correnti, M. p53 expression in oral lichenoid lesions and oral lichen planus. *Gen Dent* 2005; 63(1):69-72.
88. Leyva-Huerta E, Ledesma-Montes C, Rojo-Botello R, Vega-Memije E. P53 and bcl-2 immunoreexpression in patients with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;745-750.
89. Bascones C, Gonzalez-Moles MA, Esparza G, Bravo M, Acevedo A, Gil-Montoya JA, et al. Apoptosis and cell cycle arrest in oral lichen planus. Hypothesis on their possible influence on its malignant transformation. *Arch. Oral Biol* 2005; 50(10):873–81.
90. Acay RR, Felizzola CR, de Araújo N, de Sousa SOM. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. *Oral Oncol* 2006; 42(5):475–80.
91. González-Moles M.A., Rodríguez-Archilla A. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head and Neck* 2000; 22: 658-61.
92. Zargar M, Jamshidi S, Eshghyar N, Moghimbeigi A. Suitability/unsuitability of cell proliferation as an indicator of malignant potential in oral lichen planus: an immunohistochemical study. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2013;14(11): 6979–6983.

93. Tampa M, Caruntu C, Mitran M, Madalina, Mitran CL, Sarbu, ML, Rusu L, Matei C, Constantin C, Neagu M, Georgescu SR. Markers of Oral Lichen Planus Malignant Transformation. *Disease markers* 2018: 1-13.
94. Yang XY, Li XZ, Zhang SN. Metabolomics analysis of oral mucosa reveals profile perturbation in reticular oral lichen planus. *Clinica Chimica Acta* 2018;487:28-32.
95. Schlag PM, Senn HJ. HPV in Head and Neck Cancer—30 Years of History. In: HPV Infection in Head and Neck Cancer. Eds. Golusiński, Leemans, Dietz. Springer International Publishing, Suiza, 2017, pp3-25.
96. Ayre JE, Ayre WB. Progression of precancer stage to early carcinoma of the cervix within 1 year; combined cytologic and histologic study with report of a case. *Am J Clin Pathol* 1948;19:770-778
97. Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann NY Acad Sci* 1956;63:1245-1261
98. Syrjänen KJ, Pyrhönen S, Syrjänen SM. Evidence suggesting human papillomavirus (HPV) etiology for the squamous cell papilloma of the paranasal sinus. *Arch Geschwulstforsch* 1983; 53:77-82
99. de Villiers EM, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985;36(5):575-578
100. Venezuela RF, Talavera A, Frutos MC, Kiguen AX, Monetti MS, Sollazo M, Panico R, Ferreyra de Prato R, Cuffini C. Human Papillomavirus (HPV) in Oral cavity Lesions: Comparison with Other Cancer Risk Factors. *J of Microbiol Res* 2013;3(6): 228-233.
101. Criscuolo MI, Belardinelli PA, Morelato RA, Mosmann J, Venezuela RF, Kiguen AX, Cuffini C, Lopez de Blanc S. Prevalence of oral human papillomavirus (HPV) in the adult population of Cordoba, Argentina. *Transl Res Oral Oncol* 2018; 3:1-8.
102. Mosmann JP, Talavera AD, Criscuolo MI, Venezuela RF, Kiguen AX, Panico R, Ferreyra De Prato R, López De Blanc SA, Ré V, Cuffini CG. Sexually transmitted infections in oral cavity lesions: Human papillomavirus, Chlamydia trachomatis and Herpes simplex virus. *J Oral Microbiol* 2019;11: 1-7.
103. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard H, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, Forslund O, Haga T, McBride AA, Villa LL, Burk RD, ICTV

- Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Papillomaviridae*, J Gen Vir 2018;99:989–990.
104. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol 2005;32(1):1-6.
105. Chen X, Zhao Y. Human papillomavirus infection in oral potentially malignant disorders and cancer. Arch Oral Biology 2017;83:334-339.
106. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. Biophys J 1991; 60:1445-1456.
107. Stanley M. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. Clin Microbiol Rev 2012;25(2):215-222.
108. Muñoz N, Castellsagué X, Berrington A, Gissmann L. HPV in etiology of human cancer. Virology 2006; 24(3):1-10.
109. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 2002;55:244-65.
110. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human papillomavirus DNA replication. J Biol Chem 1999;274:2696-705.
111. Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, Gaston K. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. J Biol Chem 2000;275:87-94.
112. International Agency for Research on Cancer. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Cervix cancer screening. Lyon: IARC Press. 2005.
113. Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. J Virol 2004;78:7199-207.
114. Campo MS. The essential transforming proteins of HPV: E5, E6 and E7 HPV Today. 2005, pp: 8-10.
115. Hiller T, Iftner T. The human papillomavirus. Human papillomavirus and cervical cancer. HPV Handbook 2004;1:11-26.
116. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. Virus Res 2002;89:213-28.

117. Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004;109:157-62.
118. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 2006;110:524-41.
119. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32(1):7-15.
120. Cullen AP, Reid R, Champion M, Lörinicz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991;65:606-12.
121. Mincheva A, Gissman L, zur Hausen A. Chromosomal integration sites of papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by in situ hybridization. *Med Microbiol Immunol* 1987;176:245-56.
122. Thierry F, Benotmane MA, Demeret C, Mori M, Teissier S, Desaintes C. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis. *Cancer Res* 2004;64:895-903.
123. Thomas M, Pirn D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999;18-7690-700.
124. Middleton K, Peh W, Southern SA, Griffin HM, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organisation of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J Virol* 2003;77:10186–10201.
125. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* 2002;76:10009–14.
126. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Rev Mutat Res* 2017;772:3-12
127. Villa L, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco E. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol* 2000;81(12):2959-2968.
128. Mosmann J, Kiguen AX, Venezuela F, Monetti M, Frutos MC, Cuffini C. Mutation detection of E6 and LCR genes from HPV 16, associated with carcinogenesis. *Asian Pacific J of Cancer Prev* 2015;16: 1151-57.
129. Syrjänen, S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J of Oral Sci* 2018; 126:49-66.

130. Mooren JJ, Gultekin SE, Straetmans JM, Haesevoets A, Peutz-Kootstra CJ, Huebbers CU, Dienes HP, Wieland U, Ramaekers FC, Kremer B, Speel EJ, Klussmann JP. P16 (INK4A) immunostaining is a strong indicator for high-risk-HPV-associated oropharyngeal carcinomas and dysplasias, but is unreliable to predict low-risk-HPV-infection in head and neck papillomas and laryngeal dysplasias. *Int J Cancer* 2014; 134(9):2108–2117.
131. Syrjänen S, Syrjänen K HPV infections of the oral mucosa, Chapter 17. In: Syrjänen K, Syrjänen S, eds. *Papillomavirus infections in human pathology*. J. Wiley & Sons: New York; 2000. pp. 379–412.
132. Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature, *Sex. Transm Dis* 2010; 37:386-391.
133. Cab-Sánchez BG, Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Conde-Ferrández L, Gómez-Carballo JG, González-Losa M. Epidemiología de la infección oral por VPH en sujetos jóvenes sanos. *Rev Chilena Infectol* 2017; 34 (6): 557-562.
134. van Aar F, Mooij SH, van der Sande MA, Meijer CJ, King AJ, Verhagen DW, Heijman T, Coutinho RA, Schim van der Loeff MF. Twelve-month incidence and clearance of oral HPV infection in HIV-negative and HIV-infected men who have sex with men: the H2M cohort study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:668.
135. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27.
136. Szarka K, Tar I, Fehér E, Gáll T, Kis A, Tóth E et al. Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. *Oral Microbiology and Immunology* 2009;24(4):314-318.
137. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32-S59–S66
138. Arirachakaran P, Chansaengroj J, Lurchachaiwong W, Kanjanabud P, Thongprasom K, Poovorawan Y. Oral Lichen Planus in Thai Patients Has a Low Prevalence of Human Papillomavirus. *ISRN Dent* 2013; 362750.

139. Estrada-Pereira GA, Márquez-Filiu, González- Heredia E. Infección por papilomavirus humano en pacientes con líquen plano bucal. MEDISAN 2013; 17(5):784.
140. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol Drinking. Lyon, 1988;44.
141. Molijn A, Kleter B, Quint W, Doorn L. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. J Clin Virol 2005;32:43-51.
142. Venezuela F, Kiguen X, Paván J, Cuffini C. Virus Papiloma Humano en Virología Médica in vivo. Editores: Adamo MP, Contigiani ML. Córdoba, Argentina 2015;18: 243-622.
143. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle J, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. Journal of Virology 1993; 67(11): 6413-6423.
144. Picconi M, Gronda J, Alonio LV, Villa LL, Sicheo L, Miranda S, et al. Virus papiloma humano en mujeres quechuas jujeñas con alta frecuencia de cáncer de cuello uterino. Tipos virales y variantes de HPV16. Medicina 2002;62: 209-220.
145. Bernard HU. Phylogeny and taxonomy of papillomaviruses. In: Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond. Ed Saveria Campo M. Institute Of Comparative Medicine University Of Glasgow, UK, 2006, pp.11.
146. Cento V, Ciccozzi M, Ronga L, Perno, Ciotti M. Genetic diversity of human papillomavirus type 16 E6, E7 and L1 genes in Italian women with different grades of cervical lesions. J Med Virol 2009;81: 1627-1634.
147. Smith B, Chen Z, Reimers L, van Doorslaer K, Schiffman M, DeSalle R, et al. Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. PLoS ONE. 2011;6: 1-8.
148. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RB, Sylla BS, et al. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. J Virol 2012;86:6855-6861.
149. Xi L, Koutsky L, Hildesheim A, Galloway D, Wheeler C, Winer R et al. Risk for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2007;16(1):4-10.

150. Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res* 2010;70:3159–3169.
151. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997;71: 2463–2472.
152. Picconi M, Alonio L, Sichero L, Mbayed V, Villa L, Gronda J et al. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina. *Journal of Medical Virology* 2003;69(4):546-552.
153. Bascones-Ilundain C, González Moles MA, Campo-Trapero J, Bascones-Martínez A. Líquen plano oral (II). Mecanismos apoptóticos y posible malignización. *Av. Odontoestomatol* 2006; 22(1): 21-31.
154. Grinspan D. Enfermedades de la boca. *Mundi SACIF*, 1977.
155. World Health Organization. Classification of Tumours. Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx. In: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours- WHO Classification of Tumours, 3rd Edition, Volume 9. Eds: Barnes, L., Eveson, J., Reichart, P. and Sidransky, D. Lyon, IARC 2005, pp 163-208.
156. Papanicolaou GN. Criteria of malignancy. In: Atlas of Exfoliative Cytology. Commonwealth Fund by Harvard University Press, Cambridge, 1954, p 13-21.
157. Kumar V, Abbas A, Aster J, Robbins S. Robbins basic pathology. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Inc, 2018.
158. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP). Métodos histotecnológicos. Eds: Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L. Registro de Patología de los Estados Unidos de America, Washington, 1992.
159. Bologna-Molina R, Damián-Matsumura P, Molina-Frechero N. An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology* 2011;59(4):801-803.

160. Nakagawa K, Yamamura K, Maeda S, Ichihashi M. bc/-2 Expression in Epidermal Keratinocytic Diseases. *Cancer* 1994;74(6):1720-4.
161. Bernard H, Chan S, Manos M, Ong C, Villa L, Delius H et al. Identification and Assessment Of Known And Novel Human Papillomaviruses by Polymerase Chain Reaction Amplification, Restriction Fragment Length Polymorphisms, Nucleotide Sequence, and Phylogenetic Algorithms. *Journal of Infectious Diseases* 1994;170(5):1077-1085.
162. Chenna R. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research* 2003;31(13):3497-3500.
163. Thompson J. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997;25(24):4876-4882.
164. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-2739.
165. Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2008;25(7):1253-1256.
166. Guindon S, Dufayard J, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 2010;59(3):307-321.
167. Benson D, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman D, Ostell J et al. GenBank. *Nucleic Acids Research* 2012;41(D1):D36-D42.
168. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2018. Centro de transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
169. Lanfranchi Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Transformación maligna del Líquen Plano Bucal atípico: Análisis de 32 casos. *Medical Oral*. 2003;8:2-9.
170. de Lima S, de Arruda J, Abreu L, Mesquita R, Ribeiro-Rotta R, Mendonca E et al. Clinicopathologic data of individuals with oral lichen planus: A Brazilian case series. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* 2019;11(12):e1109-19.

171. Sahebjamiee M, Sand L, Karimi S, Biettolahi J, Jabalameli F, Jalouli J. Prevalence of human papillomavirus in oral lichen planus in an Iranian cohort. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 2015;19(2):170-174.
172. Hiremath S, Charantimath S, Kale A. Oral lichenoid lesions: Clinico-pathological mimicry and its diagnostic implications. *Indian Journal of Dental Research*. 2011;22(6):827.
173. Mravak-Stipetić M, Lončar-Brzak B, Bakale-Hodak I, Sabol I, Seiwert S, Majstorović M et al. Clinicopathologic Correlation of Oral Lichen Planus and Oral Lichenoid Lesions: A Preliminary Study. *Sci World J* 2014;2014:1-6.
174. Aguirre-Urizar JM. Letter to the editor: oral lichenoid disease. A new classification proposal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 1:13(4):E224.
175. Cortés D, Agurne Uribarri M, Gainza M, Echebarria M, Aguirre J. Enfermedad liquenoide oral: condición premaligna emergente y controvertida. *Gaceta Méd Bilbao* 2010;107(2):72-78.
176. Alberdi-Navarro J, Marichalar-Mendia X, Lartitegui-Sebastian M, Gainza-Cirauqui M, Echebarria-Goikouria M, Aguirre-Urizar J. Histopathological characterization of the oral lichenoid disease subtypes and the relation with the clinical data. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2017;22 (3):e307-13.
177. Fernandez-Gonzalez F, Vazquez-Alvarez R, Reboiras-Lopez D, Gandara-Vila P, Garcia-Garcia A, Gandara-Rey J. Histopathological findings in oral lichen planus and their correlation with the clinical manifestations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;e641-e646.
178. Werneck J, Costa T, Stibich C, Leite C, Dias E, Silva Junior A. Oral lichen planus: study of 21 cases. *An Bras Dermatol* 2015;90(3):321-326.
179. Secretaria de Políticas Integrales sobre Drogas de la Nación Argentina. Factores de riesgo en el consumo de sustancias psicoactivas. 2017.
180. Patil P, Bathi R, Chaudhari S. Prevalence of oral mucosal lesions in dental patients with tobacco smoking, chewing, and mixed habits: A cross-sectional study in South India. *J Fam Comm Med* 2013;20(2):130.

181. Mostafa B, Ahmed E. Prevalence of oral lichen planus among a sample of the Egyptian population. *J of Clin Exp Dent* 2015;7(1):e7-e12
182. Shen Z, Liu W, Zhu L, Feng J, Tang G, Zhou Z. A retrospective clinicopathological study on oral lichen planus and malignant transformation: Analysis of 518 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;17(6):e943-e947.
183. Zendeli-Bedjeti L, Popovska M, Atanasosvska-Stojanovska A, Duvlis S. Human Papillomavirus as a Potential Risk Factor for Oral Premalignant Lesions. *Acta Clinica Croatica* 2017;56 (3);369-374.
184. Dávila L, Suárez T, Pereira-Prado V, Vigil G, Tomasi R, Tapia G, Del muro Delgado R, Bologna-Molina R. Immunoexpression of biomarkers Bax, Bcl-2, CD-138, H3, Ki-67, MCM3 and p53 in oral lichen planus. *Odontoestomatol* 2019; 21(34):16-26.
185. Gomez-Armayones S, Chimenos-Küstner E, Marí A, Tous S, Penin R, Clavero O et al. Human papillomavirus in premalignant oral lesions: No evidence of association in a Spanish cohort. *PLOS ONE* 2019;14(1):e1-e13.
186. Knezevic M. The role of human papillomavirus (hpv) in the development of benign and malignant changes of the oral mucosa. *University of zagreb*;2017:pp 47.
187. Arirachakaran P, Chansaengroj J, Lurchachaiwong W, Kanjanabud P, Thongprasom K, Poovorawan Y. Oral Lichen Planus in Thai Patients Has a Low Prevalence of Human Papillomavirus. *ISRN Dent* 2013;2013:1-6.

ANEXOS

Anexo 1. Pedido de examen histopatológico para registro de variables

 <p>UNC Universidad Nacional de Córdoba</p>	 <p>1613 - 2013 400 AÑOS</p>	 <p>FACULTAD DE ODONTOLOGÍA</p>
CÁTEDRA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA		
PEDIDO DE EXAMEN ANATOMOPATOLOGICO		Nro
Fecha _____	Solicitado por _____	
Cátedra/Centro Asistencial _____	Tel/Int. _____	
Dirección _____	Historia Clínica Nro _____	
PACIENTE _____	DNI _____	
Sexo _____	Edad _____	Ocupación _____
Estado Civil _____		_____
Domicilio _____		Teléfono _____
Antecedentes personales y familiares _____		
Fuma _____		Bebe Alcohol _____
LESIÓN: Tiempo de Aparición _____ Evolución previa _____		
Región anatómica _____		
Descripción (forma, dimensión, superficie, color, síntomas, etc.) _____		

DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO _____		
BIOPSIA (parcial, extirpación, punción) _____		
Material remitido (Zona, tipo) _____		
Método de obtención _____		Fijador _____
Imágenes Enviadas* (Rx, TAC, RM, CD, etc) _____		
Biopsia/s Citología/s Anterior/es (Patólogo) _____		
Resultado/s _____		
Análisis clínicos u otros estudios (adjuntar resultados) _____		

TRATAMIENTO/S ANTERIOR/ES (fecha/s) _____		

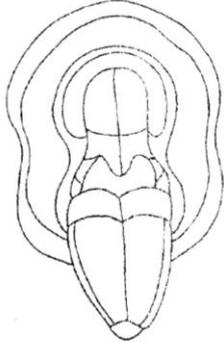
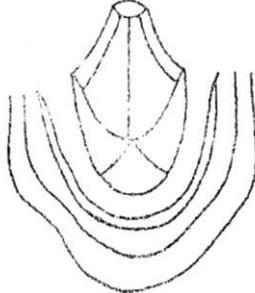
_____ Profesional Firma y Aclaración		_____ Tel. y/o E-mail.
<p>IMPORTANTE: Se solicitan para completar la información requerida otros datos tales como: esquemas, diagnósticos por imágenes, análisis de laboratorio, etc. haciendo figurar en el mismo el nombre del paciente, el del profesional que remite el material y el número de entrada. Con el propósito de acogerse a la reglamentación vigente no se recibirá material sin haber realizado el consentimiento informado a cargo del profesional actuante.</p>		

Anexo 2. Historia clínica para registro de variables

 		HISTORIA CLÍNICA ESTOMATOLOGÍA		H.C. N°/...../..... Fecha/...../..... Dx. Presuntivo Dx. Histopatológico				
DATOS FILIATORIOS								
APELLIDO Y NOMBRE:								
Edad:	Género:	Estado Civil:	Nacionalidad:					
Documento N°	Lugar y Fecha de Nacimiento							
Domicilio actual:	Tel./Cel.:							
Residencias Anteriores:	Obra Social:	Af. N°:						
Nivel de Instrucción:	Profesión/Oficio:							
Derivado por	Alumno:	Demanda Espontánea	Campaña SLC					
	Profesional:	Docente responsable:						
MOTIVO DE CONSULTA								
ANTECEDENTES DE ENFERMEDAD ACTUAL (Tiempo de evolución, consultas, tratamientos previos, sintomatología)								
ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS								
Diabetes	SI	NO	TIPO I	TIPO II	Compensada SI NO			
Hipertensión Arterial	SI	NO	Idiopática	Emocional	Compensada SI NO			
Hipotensión Arterial	SI	NO						
Alergia	SI	NO	medicamentosas	alimentarias	ambientales			
Alteraciones en tracto digestivo	SI	NO						
Alteraciones en sistema respiratorio	SI	NO						
Alteraciones en hígado / vesicular biliar	SI	NO						
Alteraciones dermatológicas	SI	NO						
Alteraciones en sistema genito-urinario	SI	NO						
Enfermedades infectocontagiosas	SI	NO						
Infecciones de transmisión sexual	SI	NO						
Verrugas (HPV)	SI	NO						
Hongos en piel / mucosas	SI	NO						
Alteraciones neurológicas	SI	NO						
Terapia psicológica / Psiquiátrica	SI	NO						
Alteraciones inmunológicas / reumáticas	SI	NO						
Agua de consumo habitual			de red	de pozo	potabilizada	mineral	de aljibe	
Agua de pozo en zona arsenical	SI	NO	Años:					
Exposición solar o fuentes de calor	SI	NO	Motivo/s:					
Tratamiento médico actual	SI	NO	Cuál/Cuáles:					
Medicación de consumo regular (indicar uso terapéutico)							
Tratamientos de medicina alternativa	SI	NO	Cuál/Cuáles:					

Intervenciones quirúrgicas	SI	NO	Motivo y año:					
Internaciones	SI	NO	Motivo y año:					
Antecedentes Oncológicos	SI	NO	Diagnóstico:					
Menstruación regular SI / NO			Cirugía	Quimioterapia	Radioterapia			
Embarazo SI / NO Semanas:			Amenorrea-Metrorragia - Menopausia (edad.....)					
			Controles Ginecológicos Regulares SI NO					
			Anticonceptivos SI NO					
ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES								
	SI	NO	Patologías o motivo de fallecimiento	SI	NO	Patologías o motivo de fallecimiento		
Madre viva			Abuela Maternaviva					
Padre vivo			Abuelo Maternovivo					
Hermano/s			Abuela Paternaviva					
Hijos (indicar n°)			Abuelo Paternovivo					
NUTRICION y DIETA								
Dieta	Omnívora	Vegano	Vegetariano	Otra:	Autoadministrada	Por indicación médica		
Alimentación	Frecuencia semanal de frutas y verduras frescas			Orgánica SI NO				
	Frecuencia semanal de carnes rojas y procesadas, frituras y asados							
TABACO								
¿Fuma?	SI	NO	Desde- Hasta	Cantidad diaria	Subtotal			
¿Ha fumado?	SI	NO						
Cantidad de años de consumo								
TOTAL								
Fumador pasivo	SI	NO	familiar	laboral	durante la infancia			
Tipo de tabaco	cigarrillos rubios		cigarrillos negros	cigarrillos armados	cigarros	pipa		
MARIHUANA Y OTRAS DROGAS								
¿Consumes? ¿Ha consumido?	SI	NO	Cigarrillos semanales	años de consumo				
	Cultivada		Comercializada		Estimación total			
¿Consumes otro tipo de drogas?	SI	NO	¿Cuáles? ¿Cuánto?					
BEBIDAS ALCOHOLICAS								
¿Consumes?	nunca	ocasionalmente	diariamente	semanalmente	ha consumido			
Tipo de bebida	desde	hasta	cantidad diaria	cantidad semanal	subtotal en litros	subtotal en g		
Cerveza								
Vino (tinto-blanco)								
Fernet								
Bebidas blancas								
Total	años:				T	T		
MATE Y OTRAS INFUSIONES								
Consumes	nunca	ocasionalmente	diariamente	ha consumido	período	Cantidad diaria	total	temperatura
mate								F - T - C - MC
té								F - T - C - MC
café								F - T - C - MC
TIPO DE YERBA			normal	orgánica		compuesta		
HÁBITOS SEXUALES								
Sexo genital	SI - NO - No contesta		Sexo oral	SI - NO - No contesta		N° de parejas		

EXÁMEN CLÍNICOEXTRAORAL	
EXÁMEN CLÍNICOINTRAORAL	
Estomatograma	

1 - Semimucosa labial superior	13 - Base de lengua
2 - Mucosa labial superior	14 - Semimucosa labial inferior
3 - Fondo de surco superior	15 - Mucosa labial inferior
4 - Comisura labial	16 - Fondo de surco inferior
5 - Reborde superior	17 - Reborde inferior
6 - Paladar duro	18 - Piso de boca
7 - Paladar blando	19 - Cara ventral de lengua
8 - Úvula	20 - Punta de lengua ventral
9 - Pilares ant, medio y post.	21 - Mucosa yugal izq.
10 - Lengua bordes	22 - Mucosa yugal der.
11 - Punta de lengua dorsal	23 - Encía superior
12 - Lengua dorso	24 - Encía inferior

Odontograma

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
<input type="checkbox"/>															
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
Derecha								Izquierda							
55	54	53	52	51	61	62	63	64	65						
<input type="checkbox"/>															
85	84	83	82	81	71	72	73	74	75						
<input type="checkbox"/>															

REFERENCIAS

COLOR ROJO Prestaciones existentes

COLOR AZUL Prestaciones requeridas

X Diente ausente o a extraer

PROTESIS REMOVIBLE

CORONAS

CANTIDAD DE DIENTES EXISTENTES

Anexo 3. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Cátedras de Estomatología A y B, FOUNC

Servicio de Prevención y Diagnóstico Precoz de Cáncer Bucal Dr. Héctor Lanfranchi

El abajo firmante, Sr./a.....

DNI/LE/LC/.....de.....años de edad. Teléfono.....

Domiciliado en.....

1. Acepto que se me realice el examen estomatológico, Historia Clínica, registros fotográficos y de video, o algún otro procedimiento de registro de información, por el odontólogo M.P....., consintiendo que todos los datos y registros obtenidos puedan ser utilizados con fines docentes y de estudios científicos, con la condición de que no se revele mi identidad.
2. Declaro haber sido informado y haber comprendido acabadamente la conveniencia y el objetivo de realizar toma de material para diagnóstico a través de biopsia, citología exfoliativa, toma de material para examen micológico o bacteriológico y/o recolección de saliva, como así también las consecuencias de no llevar a cabo dicho procedimiento.
3. Declaro que se me informó que el material obtenido va a ser analizado por laboratorios o profesionales especializados, los cuales informarán un resultado que podrá ser útil para definir el diagnóstico de certeza de la patología que afecta mi boca.
4. Declaro que se me informó que la biopsia es un procedimiento quirúrgico para obtener muestras de la lesión bucal que presento. Asimismo, doy consentimiento para la administración de anestesia local que se aplicará para la realización de dicho tratamiento, delegando al odontólogo el tipo de anestesia.
5. Declaro que he sido informado sobre el tipo de tratamiento que necesito, la posibilidad de riesgos o complicaciones que pudiere ocasionar, las consecuencias de no realizar tratamiento y la no garantía de los resultados de dicho tratamiento.
6. Me reservo el derecho de interrumpir el estudio o tratamiento cuando lo desee, quedando bajo mi responsabilidad, todo compromiso posterior en relación a mi enfermedad.
7. Confirmando que he leído y comprendido todos los términos que anteceden antes de firmar este consentimiento.

Córdoba, a losdías del mes de.....de 20.....

Firma del paciente o representante legal:

Aclaración:

Tipo y número de documento:

Anexo 4. Presentaciones a congresos científicos originados por esta tesis

Título: Caracterización histopatológica de Líquen Plano Oral y Lesiones Líquenoides Orales (estudio preliminar).

Autores: Tomasi RA, Cuffini CG, Ferreyra de Prato RS

Presentado en: IADR Argentine Division Annual Meeting, SAIO, 17 al 19 de Octubre de 2018, Córdoba.

Resumen

Warnakulasuriya (2018) sugiere considerar a Líquen Plano Oral (LPO) y Lesiones Líquenoides Orales (LLO) como Trastornos Potencialmente Malignos Orales (TPMO).

Objetivo: El objetivo del estudio fue analizar las características histopatológicas de casos con diagnósticos histopatológicos de LPO y LLO.

Material y métodos: El estudio fue de tipo retrospectivo, se analizaron 118 biopsias (81 mujeres y 33 hombres, edad media de 56.7 años) recibidas en el Laboratorio de Anatomía Patológica entre los años 2004 a 2015. Los casos fueron diagnosticados con criterios de van der Meij y van der Waal. Se recolectaron los datos de los protocolos en relación a la localización y de los diagnósticos histopatológicos en relación a los cambios histopatológicos y presencia de displasia epitelial en ambas patologías. Se realizó análisis estadístico descriptivo y comparativo de los resultados.

Resultados: Histológicamente, el 69,49% de los casos se clasificaron como LLO mientras que el 30.51% como LPO. La ubicación más frecuente para LLO fue la lengua (34,1%) mientras que en LPO fue mucosa yugal (44,4%). Dentro de los cambios histopatológicos en LLO predominó: Displasia Epitelial (DE) con el 28,8%, seguido de Infiltrado con el 27,3% y degeneración hidrópica con el 21% mientras que en LPO predominó: infiltrado yuxtaepitelial con el 36%, degeneración hidrópica con el 31% y acantosis con el 14%. Siendo estadísticamente significativas las características histopatológicas: displasia epitelial grave ($p=0,028$), infiltrado y paraqueratosis ($p=0,05$).

Conclusión: Las características histopatológicas predominantes observadas coinciden con los criterios histopatológicos de Van der Meij y van der Wall para el diagnóstico de cada entidad (DE para LLO e infiltrado yuxtaepitelial para LPO). Creemos que, al realizar una biopsia, la ubicación y el tipo de lesión clínica son aspectos muy importantes a evaluar ya que pueden modificar los aspectos histopatológicos y consideramos que, cuando sea posible, se deben realizar las biopsias de lesiones en lengua y mucosa yugal ya que éstas han mostrado un porcentaje mayor de DE en LLO como LPO y, por lo tanto, tendrían una mayor riesgo de transformación maligna.

Título: Detección de Virus del Papiloma Humano en Liquen Plano oral y Lesiones Liquenoides Orales

Autores: Tomasi RA, Cuffini CG, Ferreyra de Prato RS

Presentado en: Jornadas de Jóvenes Investigadores, Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), 17 al 19 de Octubre de 2018. Universidad Nacional de Cuyo Mendoza, Argentina.

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.



XXVI JJI
JORNADA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN Facultad de Odontología
14, 15 y 16 de octubre de 2014

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

33.Virología Molecular
Tomasi Ramiro Alejandro
ramiro.tomasi@unc.edu.ar
Facultad de Odontología Universidad Nacional de Córdoba

Introducción

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

LPO es una enfermedad crónica autoinmune que afecta la piel y las mucosas (mucocutáneas) son bilaterales con ubicación en mucosa sagital (sector medio-posterior) mientras que las LLO están asociadas al tratamiento con antineoplásicos (Bupropión, metilfenidato), enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y lesiones que tienen un aspecto de liquen plano, pero que no presentan uno o más aspectos clínicos característicos. Clínicamente, se presentan en forma unilateral, frecuentes en palatary asociados a EICH.

Objetivos

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.

Materiales y Métodos

Se recibieron 5.144 biopsias (N) y se diagnosticaron 118 biopsias como LPO (n=38) y LLO (n=82) en el Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la UNC entre los años 2004 a 2014 con diagnósticos presuntivos de LPO o LLO y utilizando los criterios clínicos e histopatológicos de clasificación actuales de Van der Meij-Van der Waal (2005).

La detección de VPH fue realizada en el Instituto Virología del Virología FCM-UNC mediante la técnica de PCR del fragmento L1 del VPH con los primers MY08/MY11 y la genotipificación se realizó por RFLP con enzimas de restricción.

Para el análisis filogenético del genotipo 16, las secuencias fueron alineadas utilizando el programa MEGA versión 5.

Resultados y Discusión

Se detectó VPH en el 31.3% (7) de los casos estudiados. La prevalencia de VPH en LPO fue del 4.5% (1) mientras que para LLO fue del 27.2% (6) siendo estadísticamente significativo $p=0.053$ ($n=5,144$). El género que prevaleció fue el betaferón en los casos positivos como negativos para VPH.

Histopatológicamente los casos positivos fueron 6 LLO y 1 LPO (LPO-Q-A) mientras que en los estudios de González Epstein (2011), Gylden et al (2012) afirman que los VPH son más detectables en LPO.

Se identificaron los genotipos 6, 11, 53 en el 22.2% y el genotipo 13 en el 11.1% de los casos estudiados, siendo similar a otros estudios de Ojeda et al (2003) y Vidán et al (2011) en relación a la prevalencia del genotipo 16.

Genotipo	Nº de casos	%
6	2	22.2%
11	1	11.1%
53	1	11.1%
13	1	11.1%
Negativo	15	166.7%
Total	38	100%



Conclusiones

Respecto al estudio filogenético realizado se puede 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.

Debido al potencial maligno de LPO como LLO y su asociación con VPH (con mayor frecuencia en las últimas) se podría ampliar el número de casos y/o realizar nuevos estudios para profundizar sobre esta asociación y contribuir a los profesionales clínicos así como a otros estudios, sobre el rol del VPH y genotipos detectados, en la transformación maligna de estas patologías como probable potencial factor etiológico de los TPMO junto a los factores de riesgo convencionales (tabaco, alcohol, inmunosupresión, entre otros).

Bibliografía

- González M. y Epstein JI. (2011) Oral lichen planus: malignant transformation and human papilloma virus: a review of potential clinical implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 111:661-4.
- OPacheco C., Pitt SR., Turner M., Butler D., y Malvar ML. (2003) Investigating the possible association between oral lichen planus, the human herpes virus-8, and the human papillomavirus. *Mol Diagn* 7:73-83.
- Randow J., Gylden B. (2012) Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol* 6: 3-10.
- Van der Meij SH., y van der Waal I. LAR of histopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. (2005) *J Oral Pathol Med* 112:203-12.
- Vidán B., Bergman B., y Demir C. (2011) Prevalence of herpes simplex, Epstein-Barr and human papilloma viruses in oral lichen planus. *Med Oral Pathol Oral Maxil Surg* 16: e101-4.



Figura 1. Lesión de LP oral.



Figura 2. Lesión de LP oral.



Figura 3. Lesión de LLO oral.



Figura 4. Lesión de LLO oral.



Título: Expresión de Ki67 en Lesiones Liquenoides Orales VPH positivas y negativas

Autores: Tomasi-Correa, Ramiro –Cuffini-Gavranic, Cecilia – Ferreyra-Maldonado, Ruth

Presentado en: Congreso internacional: Pathology of Oral Mucosa, Chile 27 al 29 de Julio de 2019. Universidad Mayor de Chile.

Resumen

Las lesiones Liquenoides Orales (LLO) son similares clínica e histológicamente al Liquen Plano Oral, pueden sobreinfectarse con Virus del Papiloma Humano (VPH).

En la actualidad, no hay estudios que comparen la expresión de Ki67 en LLO VPH positivas y negativas y que utilicen criterios actuales de clasificación.

Objetivo: Comparar la expresión de Ki67 en LLO VPH positivas y negativas.

Materiales y Métodos: Se analizaron biopsias (N=14) período 2009-2016 siguiendo criterios de Van der Waal-Van der Meij, se detectó VPH mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). Se aplicó consentimiento informado a pacientes ODO-CIEIS60.

Resultados: LLO VPH negativas presentaron mayor porcentaje (28,78%). En LLO VPH positivas como negativas la expresión fue mayor en el género femenino. En los casos VPH positivos, el genotipo 31 presentó mayor expresión. **Discusión:** Acay et al. (2006), en su trabajo demostraron que la mitad de los casos de LLO fueron positivos para Ki-67 en más del 50% de las células mientras que en nuestro trabajo: todos los casos fueron positivos pero con porcentajes de proliferación más bajos. García-Pola et al. (2001), detectaron expresión de Ki67 en la capa basal (CB), mientras que en nuestro trabajo se observó en las CB, capas parabasales (CPB) e infiltrado (IN) de LLO. **Conclusiones:** La expresión de ki67 fue mayor en LLO VPH negativas y en el género femenino tanto en VPH positivas como negativas. En la CB, CPB e IN fue mayor en LLO negativas, e indicaría una posible predicción potencial de transformación.

El presente estudio muestra que la expresión de Ki67 no tiene relación con la presencia o ausencia del VPH pero sí con el género. Aunque se necesitaría seguir ampliando la muestra y realizar más estudios que puedan seguir contribuyendo al pronóstico de estas lesiones.

