

Detección de ADN de papilomavirus humano, en el liquen plano mediante hibridación *in situ*

Detection of human papillomavirus (HPV) DNA using *in situ* hybridization in oral lichen planus

AUTORES:

Miguel Angel González Moles (1), Salvador González Moles (2), Isabel Ruiz Ávila (3), Alberto Rodríguez Archilla (4), José Vicente Bagán (5), Alejandro Ceballos Salobreña (6).

- (1) Profesor Titular de Universidad. Departamento de Medicina Oral. Facultad de Odontología. Universidad de Granada. España.
- (2) Médico Odontólogo. Departamento de Medicina Oral. Facultad de Odontología. Universidad de Granada. España.
- (3) Especialista en Anatomía Patológica. Departamento de Anatomía Patológica. Hospital General de Jaén. España.
- (4) Profesor Asociado. Departamento de Medicina Oral. Facultad de Odontología. Universidad de Granada. España.
- (5) Catedrático de Universidad. Departamento de Medicina Oral. Facultad de Odontología. Universidad de Valencia. España.
- (6) Catedrático de Universidad. Departamento de Medicina Oral. Facultad de Odontología. Universidad de Granada. España.

González Moles MA, González Moles S, Ruiz Ávila I, Rodríguez Archilla A, Bagán JV, Ceballos Salobreña A. Detección de ADN de papilomavirus humano, en el liquen plano oral mediante hibridación *in situ*. Medicina Oral 1999; 4: 391-7.
© Medicina Oral. B-96689336.
ISSN 1137-2834

RESUMEN

Objetivos: el liquen plano oral (LPO) es una enfermedad inflamatoria considerada como precancerosa. Recientemente se ha puesto de manifiesto que existe una relación entre los papilomavirus humanos (PVH), los procesos neoplásicos y las lesiones y afecciones precancerosas. El objetivo de este estudio fue detectar qué proporción de casos de LPO eran positivos, en una prueba específica de hibridación de ADN *in situ*, para los tipos de PVH 6/11, 16/18 y 31/33/35. **Diseño del estudio:** se han estudiado 47 LPO mediante hibridación de ADN *in situ*. **Resultados:** el 31,9% de los casos de LPO fueron positivos para ADN de PVH. Los tipos virales 31/33/35 se encontraron en el 19,9% (9 casos), mientras que los tipos 6/11 y 16/18 se detectaron en el 12,8% (6 casos) y en el 8,5% (4 casos), respectivamente. No se observó relación entre la positividad para ADN de PVH y la localización y apariencia clínica del LPO. Los casos positivos para ADN de PVH 16/18 presentaron frecuentemente displasia epitelial ($p < 0.05$) y, asimismo, se observó un número de coiloci-

Recibido: 20/10/97. Modificado: 29/10/97. Aceptado: 9/12/97.

AUTHORS:

Miguel A. González-Moles MD, PhD (1), Salvador González-Moles MD, PhD (2), Isabel Ruiz-Ávila MD, PhD (3), Alberto Rodríguez-Archilla DDS, PhD (4), José V. Bagán MD, PhD (5), Alejandro Ceballos-Salobreña MD, PhD (6).

- (1) Staff Professor. Department of Oral Medicine. Odontology School. University of Granada. Spain.
- (2) Odontologist. Department of Oral Medicine. Odontology School. University of Granada. Spain.
- (3) Pathologist. Department of Pathology. Jaén General Hospital. Jaén, Spain.
- (4) Associated Professor. Department of Oral Medicine. Odontology School. University of Granada, Spain.
- (5) Full professor. Department of Oral Medicine. Odontology School. University of Valencia, Spain.
- (6) Full Professor. Department of Oral Medicine. Odontology School. University of Granada, Spain.

González-Moles MA, González-Moles S, Ruiz-Ávila I, Rodríguez-Archilla A, Bagán JV, Ceballos-Salobreña A. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA using *in situ* hybridization in oral lichen planus. Medicina Oral 1999; 4: 391-7.
© Medicina Oral. B-96689336.
ISSN 1137-2834

SUMMARY

Objectives: Oral lichen planus (OLP) is an inflammatory disease which is considered to be a pre-cancerous condition. The association between human papillomavirus (HPV) and malignant and potentially malignant lesions and conditions has recently been established. The aim of this study is to determine the proportion of patients who test positive for specific HPV DNA types 6/11, 16/18 and 31/33/35 by *in situ* DNA hybridization. **Study design:** in a series of 47 individuals with OLP. **Results:** Positivity was established for 31.9% of the OLP cases. HPV DNA 31/33/35 was present in 19.9% (9 cases), whereas HPV DNA 6/11 and 31/33/35 were respectively present in 12.8% (6 cases) and 8.5% (4 cases). No relationship was observed between HPV DNA positivity and the location or clinical appearance of OLP. Positive HPV DNA 16/18 cases were frequently associated with the presence of epithelial dysplasia ($p < 0.05$), and a significantly higher number of koilocytic cells was noted among HPV positive individuals with OLP ($p < 0.01$).

Received: 20/10/97. Modified: 29/10/97. Accepted: 9/12/97.



tos significativamente mayor en las lesiones positivas. **Conclusiones:** en opinión de los autores, los PVH podrían ser los responsables del desarrollo del liquen plano oral, posiblemente actuando como iniciadores del proceso. Los PVH 16 y 18 pueden inducir alteraciones displásicas en el epitelio oral a través de sus genes E6 y E7.

Palabras clave: hibridación *in situ*, PVH, liquen plano oral.

INTRODUCCIÓN

El liquen plano oral (LPO) es una enfermedad inflamatoria de la mucosa oral que actualmente se considera como un trastorno inmunitario. Las lesiones erosivas crónicas requieren un seguimiento regular a consecuencia de su reconocido potencial de transformación neoplásica. El porcentaje de transformaciones malignas se estima aproximadamente en el 1% de los casos (1).

Recientemente se ha establecido una asociación (2-8) entre los papilomavirus humanos (PVH) y algunas lesiones orales benignas, premalignas y malignas, incluido el LPO, existiendo evidencias que involucran a los PVH en la carcinogénesis oral (9-13).

El objetivo del presente estudio ha sido determinar la proporción de casos de LPO positivos respecto al ADN específico de los tipos de PVH 6/11, 16/18 y 31/33/35, y analizar la relación entre la presencia de ADN de PVH y las características clínicas e histopatológicas del LPO.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se han analizado 47 pacientes (27 hombres y 20 mujeres, edad media=52 años, rango=25-87) afectados de LPO. Todos ellos han sido diagnosticados y tratados en los departamentos de estomatología de la Universidad de Granada y Valencia, España. El criterio de inclusión seguido en el estudio fue el diagnóstico histopatológico de liquen plano mediante biopsia de mucosa oral (fijada en formol, incluida en parafina y teñida con hematoxilina-eosina). En todos los casos se cumplimentó un protocolo de estudio en el que se recogió la edad, el sexo, la localización de las lesiones, la apariencia clínica de las mismas (reticular, atrófica, erosiva, ampollosa, papulosa, en placas) y las alteraciones histopatológicas (hiperplasia epitelial, atrofia, acantosis, hiperqueratosis, erosión o displasia). Se realizó una valoración semicuantitativa, siempre por el mismo especialista en anatomía patológica, de la intensidad del infiltrado inflamatorio (grado I, II, III) y de la intensidad de la degeneración de la capa de células basales (grado I, II, III), así como un recuento del número de cuerpos coloides/8 campos/40X (0-1,2-4,>4), del número de leucocitos intraepiteliales/8 campos/40X (1-10,11-25,>25) y del número de coilocitos/8 campos/40X (0, 1-4, 5-10, >10).

Conclusions: we consider that HPV could be responsible for the development of OLP, possibly by triggering the process. HPV 16 and 18 may induce dysplastic alterations in the oral epithelium via their genes E6 and E7. Furthermore, HPV 16 and 18 could induce dysplastic alterations in the oral epithelium through the activity of their genes E6 and E7.

Key words: *In situ* hybridization, human papillomavirus, oral lichen planus.

INTRODUCTION

Oral lichen planus (OLP), an inflammatory disease of the oral mucosa, is presently considered to be an immune disorder. Moreover, chronic atrophic-erosive lesions require regular examination, since OLP is thought to be a potentially malignant condition. In this sense, the rate of malignant transformation has been estimated to be approximately 1% (1).

In recent years, an association has been established (2-8) between human papillomavirus (HPV) and a number of benign, premalignant and malignant oral lesions, including OLP. In this context, there is some evidence that HPV may be involved in oral carcinogenesis (9-13).

The aim of the present study is to determine the proportion of OLP cases which test positive for specific HPV DNA types 6/11, 16/18 and 31/33/35, and to analyze the relationship between the presence of HPV DNA and the clinical and histopathological characteristics of OLP.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The present study analyzes 47 patients (27 males and 20 females; mean age 52 years, range 25-87) with oral lichen planus (OLP). All patients were treated in the Departments of Stomatology of the Universities of Granada and Valencia (Spain). A criterion for inclusion in the study was the conventional histopathological confirmation of lichen planus from an oral biopsy. The following data were collected in all cases: age, gender, oral location, clinical appearance (reticular, atrophic, erosive, bullous, papular, plaque-like) and histopathological parameters (epithelial hyperplasia or atrophy, hyperkeratosis, acanthosis, erosion or dysplasia). The same pathologist established a semi-quantitative grading of inflammatory infiltrate intensity (grades I-III), basal cell layer degeneration (grades I-III), Civatte body count/8 fields/40x (0-1, 2-4, >4), intraepithelial leukocyte count/8 fields/40x (1-10, 11-25, >25), and of the number of koilocytic cells/8 fields/40x (0, 1-4, 5-10, >10).

ADN identification with *in situ* hybridization of HPV

In situ hybridization of HPV DNA was performed on sections obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks using the HPV Vira Type *in situ* system (Life Technologies, Gaithersburg, Md.), following the instructions of the manufacturer.

Identificación de ADN de PVH mediante hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* del ADN de PVH se realizó en secciones de bloques de tejido fijados en formol e incluidos en parafina mediante el sistema «HPV Vira Type *in situ*» (Life Technologies, Gaithersburg, Md), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Métodos estadísticos

Se ha calculado la distribución de cada variable. La asociación estadística entre dos variables categóricas se ha determinado a través del uso del test de Chi cuadrado (o el test exacto de Fisher, cuando fue necesario). En el análisis de las variables ordinales se aplicó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman (ver nota al pie de página de la Tabla 1). En el procesamiento de los datos se utilizó el programa SPSS-4.0. -1990- (SPSS Inc. Chicago, Illinois).

RESULTADOS

Resultados clínicos

El LPO se presentó habitualmente con formas clínicas reticulares (91,5%;43 casos) y atróficas (31,9%;15 casos). El 40,4% de los pacientes (19 casos) presentaron más de un tipo clínico, siendo la asociación entre formas reticulares y atróficas la más frecuente (14,9%; 7 casos). Las mucosas yugal (97,9%; 46 casos) y gingival (68%; 32 casos) fueron las más frecuentemente afectadas por el proceso. La afectación simultánea de varias localizaciones intraorales apareció en el 34% de los enfermos (34 casos), siendo lo habitual la combinación de la afectación de la mucosa yugal y gingival (36,2%;17 casos).

Resultados histopatológicos

Todas las muestras exhibieron características histopatológicas de liquen plano (infiltrado inflamatorio en banda y degeneración vacuolizante de la capa basal del epitelio). Las alteraciones histopatológicas se recogen en detalle en la Tabla 1.

Resultados de la hibridación *in situ*

El 31,9% de los casos de LPO fueron positivos para ADN de PVH (15 de 47). Los tipos de PVH más frecuentes fueron el 31/33/35 (19,1%; 9 casos). Los tipos virales 6/11 y 16/18 se encontraron en el 12,8% (6 casos) y en el 8,5% (4 casos), respectivamente. El 6,4% de las lesiones (3 casos) fueron positivas para más de un tipo viral. No se observó ninguna correlación estadística entre la positividad para ADN de PVH y la localización o la presentación clínica de las lesiones. En los casos positivos al DNA de PVH 16/18, fue más frecuente la aparición de displasia epitelial (50%; 2 casos con displasia epite-

Statistical methods

The distribution for each variable was calculated. The statistical association between two categorical variables was assessed by the Chi-square test (or Fisher exact test where appropriate). The Spearman correlation coefficient was used when dealing with ordinal variables (see footnote to Table 1). Analyses were performed using the SPSS-PC+, 4.0-1990 statistical package (SPSS Inc. Chicago, Illinois).

RESULTS

Clinical results

Reticular lesions were the most frequent clinical form of OLP (91.5%; 43 cases), followed by atrophic presentations (31.9%; 15 cases). Nineteen patients (40.4%) exhibited more than one clinical type, and the association of reticular and atrophic forms was the most common presentation (14.9%; 7 cases). The buccal (97.9%; 46 cases) and gingival (68%; 32 cases) mucosa were the most frequent oral locations of lichen planus. The simultaneous involvement of different intraoral locations was recorded in 34% of cases (34 patients), and the buccal and gingival mucosa were simultaneously affected more frequently than other locations (36.2%; 17 cases).

Histopathological results

All samples exhibited histopathological characteristics of lichen planus, with a subepithelial band-like infiltrate of lymphocytes and basal layer liquefaction. The detailed histopathological alterations are reflected in Table 1.

In situ hybridization results

As regards *in situ* hybridization, OLP positivity for HPV DNA was 31.9% (15 out of 47 cases). The most frequent types were HPV 31/33/35 (19.1%, 9 cases), HPV 6/11 and HPV 16/18 were found in 12.8% (6 cases) and 8.5% (4 cases), respectively. In turn, 6.4% (3 cases) were positive for more than one type. No statistical association was found between HPV DNA positivity of OLP and either location or clinical presentation. HPV 16/18 positive cases were more frequently associated with the presence of epithelial dysplasia (50%; 2 cases of dysplasia corresponding to 4 HPV 16/18 positive cases)($p < 0.05$). Lastly, koilocytic cells were more abundant in HPV positive OLP (Table 2). The statistical association was more intense when the HPV types found were 6/11 or 31/33/35 ($p < 0.01$)(Figure 1).

DISCUSSION

In the present study, HPV DNA types 6/11, 16/18 and 31/33/35 were detected in 15 of the total 47 cases (31.9%). This percentage positivity coincides with the results reported in the scant literature available. Thus, Jontell et al. (7) found 30% of erosive OLP to be positive for HPV DNA types 6/11 when using Southern blot hybridization; in comparison, DNA types 6, 11,

lial entre 4 casos positivos para los tipos 16/18) ($p < 0,05$). Finalmente, encontramos un mayor número de coilocitos en los líquenes positivos al PVH (Tabla 2). Esta asociación estadística fue más intensa cuando los tipos virales encontrados fueron el 6/11 y el 31/33/35 ($p < 0,01$) (Figura 1).

DISCUSIÓN

En el presente estudio encontramos ADN de PVH de los tipos 6/11, 16/18 y 31/33/35 en 15 de los 47 casos analizados (31,9%). Este porcentaje de positividad coincide con los resultados comunicados en la escasa literatura publicada sobre el tema. Así, Jontell y cols. (7) comunicaron, usando *Southern blot*, un 30% de positivities en casos de liquen plano erosivo de la mucosa oral para los tipos virales 6/11, mientras que, a través de la utilización de PCR, el ADN de los tipos virales 6, 11, 16 ó 18 se amplificó en el 65% de los casos (13 de 20). Syrjänen y cols. (5), al incluir 2 casos de LPO entre las lesiones orales de su serie, encontraron un caso positivo para el ADN del PVH tipo 11 y otro del tipo 16, mediante la utilización de la técnica de hibridación *in situ*. Maitland y cols. (6), también con la utilización de hibridación *in situ*, encuentran ADN de PVH tipo 16 en el 87% de los casos de su serie (7 de 8). Por otra parte, Young y Min (14) no encuentran ADN de PVH 6/11, 16/18 ó 31/33/35 en ninguno de los 6 LPO por ellos estudiados. Debe decirse que el número de casos analizados por los autores anteriormente mencionados es, en general, escaso. En este sentido, la serie más amplia es la de Jontell y cols. (7), con 20 casos. Nuestro estudio incluye el mayor número de casos recogidos en la literatura hasta el momento actual, aunque nuestros resultados son difíciles de comparar con los de otros investigadores, debido a las diferentes técnicas utilizadas y a los diversos tipos de PVH analizados. No obstante, la frecuente detección de ADN de PVH en el liquen plano de la mucosa oral podría traducir implicaciones etiológicas que habrán de ser estudiadas en profundidad en el futuro.

La detección de ADN de PVH en el LPO no se relacionó estadísticamente con la localización o con el tipo clínico lesional. De acuerdo con nuestra observación, tampoco Jontell y cols. (7) encuentran relación entre la positividad para PVH y la localización de las lesiones de LPO. En nuestra opinión, esta observación puede ser explicada si los papilomavirus humanos son considerados exclusivamente como hipotéticos agentes iniciadores del proceso, sin que ejerzan ninguna influencia en los diferentes eventos que se desarrollan en la enfermedad.

En el presente estudio se encontró un número significativamente mayor de coilocitos en los casos de LPO positivos al PVH ($p < 0,01$). Esta asociación estadística fue mayor para los tipos virales 6/11 y 31/33/35 ($p < 0,01$) que para los tipos 16/18 ($p < 0,05$). Los cambios coilocíticos fueron inicialmente descritos por Koss y Durfee (15) en 1956, y se consideran como el efecto celular característico de la replicación de los PVH. Para que se produzca la replicación viral, el ADN de los PVH debe estar en un estado episomal o no integrado. Actualmente se acepta que la replicación viral está relacionada con la diferenciación de las células epiteliales, ya que sólo las células epite-

16 or 18 were amplified in 65% of cases (13 out of 20) when employing PCR. Syrjänen et al. (5), who included two cases of OLP among the oral lesions of their series, observed one HPV DNA type 11 positive case and one case of HPV DNA 16 positivity based on *in situ* hybridization. Maitland et al. (6) likewise employed *in situ* hybridization to detect HPV DNA type 16 in 87% of cases (7 out of 8). On the other hand, Young and Min (14) failed to detect HPV DNA 6/11, 16/18 or 31/33/35 in any of the 6 cases of OLP included in their series. The number of cases of OLP studied by the aforementioned authors is very limited - the most extensive series corresponding to that of Jontell et al. (20 cases)(7). In this context, our study comprises the most extensive series published in the literature to date. However, it is difficult to compare the results obtained in the present study with those of other authors, due to differences in methodology and the diverse HPV types analyzed. Nevertheless, the frequent detection of HPV DNA in OLP may have etiological implications that should be addressed by further research.

The detection of HPV DNA in OLP was not statistically related to any particular clinical type of lesion or location - a finding that agrees with the observations of Jontell et al. (7), who established no relation between HPV positivity and the location of OLP. In our opinion, this could be explained by only considering HPV to be a hypothetical trigger of OLP - with no bearing upon the subsequent development of the disease.

In the present study, koilocytic cells were found to be significantly more numerous in HPV positive cases of OLP ($p < 0,01$). This statistical association was greater for HPV types 6/11 and 31/33/35 ($p < 0,01$) than for types 16/18 ($p < 0,05$). This koilocytic change was first described in 1956 by Koss and Durfee (15), and is considered to reflect the cellular effects of HPV replication. In order for replication to occur, the viral DNA must be in a non-integrated or episomal state. At present, viral replication is thought to be related to epithelial cell differentiation, whereby only mature epithelial cells are

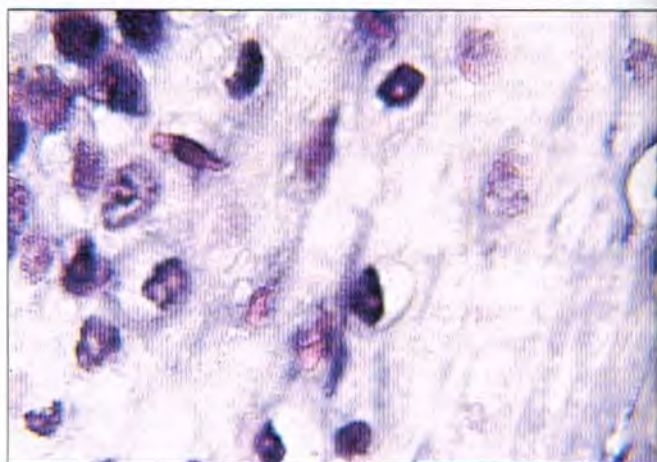


Fig. 1: Coilocitos positivos para ADN de PVH 6/11. (técnica de hibridación *in situ*) (40x).

*Koilocytes exhibiting positivity for human papillomavirus (HPV) 6/11 DNA according to the *in situ* hybridization technique (40x).*

liales maduras permiten la multiplicación de los papilomavirus (16). En este sentido, los productos del gen viral E4 juegan un papel fundamental, estimulando la proliferación y diferenciación de las células epiteliales basales hacia queratinocitos maduros, en los que los PVH encuentran un ambiente favorable para su replicación (17). Durante el proceso de replicación en las células maduras, los genes virales L1 y L2 codifican la síntesis de proteínas estructurales de la cápside viral (18), que se acumulan en el citoplasma celular dando lugar al halo claro perinuclear característico de los coilocitos (19). Probablemente, el mayor número de coilocitos encontrados en LPO positivos a los tipos virales 6/11 y 31/33/35 puede ser debido a la menor tendencia de estos virus a integrarse dentro del genoma celular y a su mayor actividad replicativa. No obstante, en el presente estudio algunas lesiones con coilocitos fueron negativas al PVH. En nuestra opinión, estas alteraciones coilocíticas pueden ser consecuencia de la infección por papilomavirus no incluidos en nuestro análisis o, incluso, aun no identificados.

Se ha observado una asociación estadística entre la presencia de displasia epitelial y la positividad al PVH 16/18 ($p < 0.05$). Para la interpretación de esta observación se requiere analizar someramente las funciones de los genes virales E2, E6 y E7 de los

amenable to HPV multiplication (16). Accordingly, the viral E4 gene products are believed to play a major role in stimulating the proliferation and differentiation of basal epithelial cells to mature keratinocytes, where HPV is able to replicate (17). During the replication process in mature cells, the L1 and L2 viral genes encode the synthesis of structural proteins in the viral capsid (18). These in turn accumulate in the cellular cytoplasm, generating the clear perinuclear halo that characterizes koilocytic cells (19). The greater number of koilocytic cells found in HPV 6/11 and 31/33/35 positive OLP could be attributed to a lesser tendency of these viruses to become integrated within the cellular genome, and to their replication activity. Nevertheless, we found some lesions exhibiting koilocytic changes to be HPV negative - a fact that we attribute to the existence of unidentified HPV, or to HPV not included in the analysis of the present study.

We observed a statistically significant association between the presence of epithelial dysplasia and positive testing for HPV 16/18 ($p < 0.05$). This finding could be explained by the functions of the E2, E6 and E7 genes of HPV 16 and 18 (20). In this sense, E2 genes encode a regulatory protein whose function is to repress the regulatory transcription activity of

TABLA I

Aspectos histopatológicos del LPO

Características	n (%)
Hiperplasia	38 (80,9)
Acanthosis	38 (80,9)
Hiperqueratosis	26 (55,3)
Atrofia	13 (27,7)
Erosión	4 (8,5)
Displasia	3 (6,4)
Infiltrado inflamatorio	
Grado I	12 (25,5)
Grado II	10 (21,3)
Grado III	25 (53,2)
Cuerpos de Civatte	
0-1/8 C/40x	34 (72,3)
2-4/8 C/40x	11 (23,4)
>4/8 C/40x	2 (4,3)
Linfocitos intraepiteliales ^a	
1-10/8 C/40x	30 (63,8)
11-25/8 C/40x	13 (27,7)
>25/8 C/40x	4 (8,5)
Coilocitos ^a	
no	34 (72,3)
1-4/8 C/40x	5 (16,6)
5-15/8 C/40x	5 (16,6)
>15/8 C/40x	3 (6,4)
Degeneración vacuolizante ^a	
Grado I	14 (29,8)
Grado II	9 (19,1)
Grado III	24 (51,1)

C: campos.

a: variables consideradas ordinales.

TABLA I

Histopathological characteristics of oral lichen planus (OLP)

Characteristic	Number of cases (%)
Hyperplasia	38 (80.9)
Acanthosis	38 (80.9)
Hyperkeratosis	26 (55.3)
Atrophy	13 (27.7)
Erosion	4 (8.5)
Dysplasia	3 (6.4)
Inflammatory infiltrate	
Grade I	12 (25.5)
Grade II	10 (21.3)
Grade III	25 (53.2)
Civatte bodies (per field/40x)	
0-1/8	34 (72.3)
2-4/8	11 (23.4)
>4/8	2 (4.3)
Intraepithelial lymphocytes (per field/40x) ^a	
1-10/8	30 (63.8)
11-25/8	13 (27.7)
>25/8	4 (8.5)
Koilocytes (per field/40x) ^a	
no	34 (72.3)
1-4/8	5 (16.6)
5-15/8	5 (16.6)
>15/8	3 (6.4)
Vacuolizing degeneration ^a	
Grade I	14 (29.8)
Grade II	9 (19.1)
Grade III	24 (51.1)

^a: variable considered as ordinal.

PVH 16 y 18 (20). El gen E2 codifica una proteína reguladora cuya función es reprimir la actividad transcritiva de los genes virales E6 y E7 (21). El genoma de los PVH 16 y 18 se encuentra generalmente integrado en el cromosoma celular (22); además, se ha comprobado que el patrón de integración muestra una marcada especificidad en relación al lugar en el que se rompe la doble cadena circular del ADN viral, paso previo e imprescindible para la integración. Este fenómeno ocurre en las cercanías del gen E2, lo que altera su función represora de la actividad transcritiva de los genes virales E6 y E7 (18). La integración de PVH 16 y 18, por tanto, incrementa la actividad transcritiva de los genes E6 y E7. La integración de los productos de estos genes con proteínas celulares reguladoras de la proliferación (p53 y pRB), y la consiguiente inactivación de estas proteínas, permite la entrada de la célula en un estado de proliferación no controlado, en el que la influencia de otros factores puede producir una transformación neoplásica celular (23). Puesto que la displasia epitelial no es más que un estado de transformación limitado a algunas o todas las capas del epitelio, los autores consideran que los eventos genéticos acontecidos por la integración del ADN de los PVH 16 y 18 justifican la asociación estadística encontrada en el presente estudio entre la displasia epitelial y la positividad al PVH 16/18 en el LPO. Esto ha de tenerse en cuenta, desde una perspectiva fisiopatológica, a la hora de interpretar los acontecimientos que ocurren en el liquen plano de la mucosa oral que experimenta una transformación maligna. Así, Jontell y cols. (7) encuentran una alta proporción de LPO erosivos positivos al PVH 16, lo que justifican por la facilidad que encuentran estas partículas virales para acceder a la capa basal del epitelio en este tipo de liquen. Esta observación de los autores antes mencionados puede justificar la mayor frecuencia de transformaciones de los LPO erosivos.

En conclusión, nosotros pensamos que los PVH podrían ser los responsables del desarrollo del LPO, actuando como iniciadores del proceso. Además, los PVH 16 y 18 pueden inducir alteraciones displásicas en el epitelio oral a través de las funciones de sus genes E6 y E7.

TABLA II

Distribución de la displasia epitelial y coilocitos en LPO PVH positivos y negativos

número de casos	6/11		16/18		31/33/35		Cualquier PVH	
	-	+	-	+	-	+	-	+
Displasia								
No	38	6	42	2	36	8	31	13
Sí	3	0	1	2*	2	1	1	2
Coilocitos								
No	32	2	33	1	33	1	30	4
1-4/8 C/40x	5	0	4	1	2	3	2	3
5-15/8 C/40x	2	3	3	2	2	3	0	5
>15/8 C/40x	2	1**	3	0*	1	2**	0	3**

C: campos; * p<0.05; ** p<0.01

viral E6 and E7 genes (21). HPV 16 and 18 are usually integrated within the cellular chromosome (22). Furthermore, in cancers or cell lines where the number of integrated genomes is low enough to allow detailed analysis, the integration pattern exhibits marked specificity regarding the site where the double circular chain of the viral genome splits as a pre-requisite for integration. This phenomenon occurs near gene E2, whose repressor function upon the transcriptional activity of viral genes E6 and E7 is altered as a result (18). The integration of HPV 16 and 18 within the cellular genome facilitates the transcription activation of genes E6 and E7. The products of these genes interact with (and deactivate) cell proteins that regulate cellular proliferation (p53 y pRB), thus allowing uncontrolled proliferation where the influence of other factors may in turn lead to neoplastic transformation (23). Since epithelial dysplasia is merely a case of cellular transformation confined to some or all of the epithelial layers, we consider that the genetic events resulting from HPV 16 and 18 integration are able to account for the statistical association observed in the present study between epithelial dysplasia and positive HPV 16/18 testing in OLP. This should be taken into account when physiopathologically analyzing the events occurring in OLP with malignant transformation. In this context, Jontell et al. (7) reported a high proportion of cases of HPV 16 positive erosive OLP - a fact that they attributed to the ease with which the viral particles gain access to the basal layer of the epithelium in this type of lichen planus. This could in turn explain the greater frequency of erosive OLP transformation recorded.

In conclusion, we consider that HPV could be responsible for the development of OLP, possibly by triggering the process. HPV 16 and 18 may induce dysplastic alterations in the oral epithelium via their genes E6 and E7. Furthermore, HPV 16 and 18 could induce dysplastic alterations in the oral epithelium through the activity of their genes E6 and E7.

TABLA II

Distribución de epitelial displasia and koilocitos in human papillomavirus (HPV) positive and negative oral lichen planus (OLP)

number of cases	HPV type 6/11 (N)		HPV type 16/18 (N)		HPV type 31/33/35(N)		Any type of PVH (N)	
	-	+	-	+	-	+	-	+
Dysplasia								
No	38	6	42	2	36	8	31	13
Yes	3	0	1	2*	2	1	1	2
Koilocytes (field/40x)								
No	32	2	33	1	33	1	30	4
1-4/8	5	0	4	1	2	3	2	3
5-15/8	2	3	3	2	2	3	0	5
>15/8	2	1**	3	0*	1	2**	0	3**

* p<0.05; ** p<0.01

CORRESPONDENCIA/CORRESPONDENCE

Profesor Miguel Ángel González Moles
Departamento de Estomatología,
Facultad de Odontología,
Campus Universitario de Cartuja, 18071,
Granada, España
Tf/Fax: 34-958-246358/244085

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

1. Holmstrup P, Thorn JJ, Rindum J, Pindborg JJ. Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa. *J Oral Pathol* 1988; 17: 219-25.
2. Cox M, Maitland N, Scully C. Human herpes simplex-1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1993; 29B: 215-9.
3. Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 305-17.
4. Kashima HK, Kutcher M, Kesis T. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus, and clinically normal epithelium of the oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laringol* 1990; 99: 55-61.
5. Syrjänen SM, Syrjänen KJ, Lamberg MA. Detection of human papillomavirus DNA in oral mucosa lesions using in situ DNA-hybridisation applied on paraffin sections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986; 62: 660-7.
6. Maitland NJ, Cox MF, Lyman C. Detection of human papillomavirus DNA in biopsies of human oral tissue. *Br J Cancer* 1987; 56: 245-50.
7. Jontell M, Watts S, Wallström M, Levin L, Sloberg K. Human papillomavirus in erosive oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 273-7.
8. González-Moles MA, Ruiz I, González-Moles S, Martínez I, Ceballos A, Nogales F. Detection of HPV DNA by in situ hybridisation in benign, premalignant and malignant lesions of the oral mucosa. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol et Odontol* 1994; 37: 79-85.
9. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983; 12: 418-24.
10. Syrjänen K, Happonen RP, Syrjänen S, Calonius B. Human papillomavirus (HPV) antigens and localized immunological reactivity in oral squamous cell tumours and hyperplasias. *Scand J Dent Res* 1984; 92: 358-70.
11. De Villiers EM, Weidauer H, Otto H, Zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985; 36: 575-8.
12. Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissman L, Hoepfer I, Zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol* 1985; 84: 417-20.
13. Eisenberg E, Rosenberg B, Krutchkoff DJ. Verrucous carcinoma: a possible viral pathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 59: 52-7.
14. Young SK, Min KW. In situ DNA Hybridisation analysis of oral papillomavirus, leukoplakias, and carcinomas for human papillomavirus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 726-9.
15. Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytological and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann NY Acad Sci* 1956; 63: 1245-61.
16. Howley PM, Schlegel R. The human papillomaviruses. *Am J Med* 1988; 84: 155-8.
17. Doobar J, Campbell D, Grand R. Identification of the human papillomavirus-1a gene products. *EMBO J* 1986; 5: 355-62.
18. Baker CC, Howley PM. Different promoter by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissue. *EMBO J* 1987; 6: 1515-22.
19. Pfister H. Biology and biochemistry of papillomaviruses types. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1984; 99: 111-81.
20. Munger K, Phelps WC, Bubbs V. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63: 4417-21.
21. Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC. The human papillomavirus type 18 (HPV 18) E2 gene product is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 1989; 62: 2994-3002.
22. Gissman L. Papillomavirus and their association with cancer in animals and man. *Cancer Surveys* 1984; 3: 161-81.
23. Barten M, Ostwald C, Milde-Langosch K, Muller P, Wukasch Y, Loning T. HPV DNA and p53 alterations in oropharyngeal carcinomas. *Virchows-Arch* 1995; 427: 153-7.