

Presencia del virus del papiloma humano en lesiones de liquen escleroso y atrófico vulvar. Estudio por inmunohistoquímica e hibridización *in situ*

Raúl Vignale Peirano, Gisele Acosta Dibarráz, José Paciel Vaz y Victoria González Domínguez

Departamento de Anatomía Patológica. Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela. Facultad de Medicina. Montevideo (Uruguay).

Resumen.—Se presentan dos pacientes con liquen escleroso y atrófico (LEA) de localización vulvar. Se estudió la presencia del virus del papiloma humano (VPH) por inmunohistoquímica y por hibridización en las células del epitelio. En ambos la prueba fue positiva para dicho virus. Este hallazgo plantea dos interrogantes: a) el VPH podría tener relación directa con el desarrollo del LEA al actuar como antígeno en las células epiteliales, desencadenando diversos mecanismos inmunológicos, y también podría ser un cofactor para el desarrollo del carcinoma espinocelular, dado que esta afección se considera preneoplásica, y b) que el VPH se encuentre como un contaminante, como sucede en numerosas lesiones que no son de etiología vírica primaria. Creemos que en nuestros casos hay alta probabilidad de tener una relación directa del virus con la producción del LEA. Nos apoyamos en la bibliografía consultada de numerosos casos con esta asociación y porque además la mejoría más rápida de sus lesiones se obtuvo cuando a los tratamientos clásicos por vía local y sistémica se agregó el tratamiento específico antivírico (imiquimod).

Palabras clave: liquen escleroso y atrófico, virus papiloma humano, vulva.

Vignale R, Acosta G, Paciel J, González V. Presencia del virus del papiloma humano en lesiones de liquen escleroso y atrófico vulvar. Estudio por inmunohistoquímica e hibridización *in situ*. *Actas Dermosifiliogr* 2002;93(6):389-92.

HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN VULVAR LESIONS OF LICHEN SCLEROSUS ET ATROPHICUS. STUDY BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND *IN SITU* HIBRIDIZATION

Abstract.—We studied two patients with vulvar lichen sclerosus et atrophicus. We investigate the human papillomavirus infection by immunohistochemistry and *in situ* hybridization methods. In both cases it was positive for human papilloma virus. This finding proposes two questions: a) the human papillomavirus could be related to lichen sclerosus development acting as an antigen in epithelial cells, provoking several immune mechanisms and could also be a co-factor to development of a squamous carcinoma, since this disease is considered a preneoplastic one, and b) the virus is found as contaminant as happens in several cutaneous lesions of non viral primary aetiology. We suggest that in these cases there is a high probability of the virus being directly related to lichen sclerosus disease. We support this last statement on multiple references about this association as an aetiology of lichen sclerosus and also because the fastest improvement of lesions was obtained when the specific antiviral treatment (imiquimod) was added to local and systemic treatment.

Key words: lichen sclerosus et atrophic, human papillomavirus, vulva.

INTRODUCCIÓN

El liquen escleroso y atrófico (LEA) es una dermatosis inflamatoria de piel y semimucosas, más frecuente en la mujer, que se presenta a cualquier edad. Puede localizarse en cualquier área del cuerpo, con predominio de las áreas genitales y perianales y su evolución es crónica. La etiología es desconocida y en la patogenia se describen múltiples factores: genéticos, hormonales, infecciosos, traumáticos e inmunológicos, especialmente los de autoinmunidad^{1,4}. La complicación más frecuente cuando se localiza en áreas genitales es el carcinoma espinocelular, que aparece en el 3% al 5% de los casos⁵⁻⁸. Se ha descrito como factor desencadenante

del carcinoma espinocelular en el LEA, el virus del papiloma humano⁹⁻¹⁵. En este trabajo se describen dos pacientes que presentaban clínica e histológicamente lesiones de LEA en las que se investigó la presencia del virus del papiloma humano (VPH) en la epidermis, hallándose positivo en ambos. La presencia de este virus podría constituir un factor antigénico para desarrollar distintos fenómenos inmunológicos locales característicos del LEA y ser un cofactor para desarrollar más tarde un carcinoma espinocelular.

DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS

Clínica

Caso 1

Mujer de 48 años que consultó en la Clínica Ginecológica por ardor y prurito en áreas genitales. En el

Correspondencia:

Raúl Vignale. Palmar 2542. CP 11600 Montevideo (Uruguay).

Aceptado el 8 de octubre de 2001.

examen físico se observaron lesiones blanquecinas, discretamente atróficas, en cara interna de labio mayor, menor y región periuretral y clitoridiana. No había lesiones en vagina, ni en regiones perineal y perianal. Tampoco se hallaban otras manifestaciones cutáneas o sistémicas de interés. La paciente tenía múltiples relaciones sexuales con distintas parejas desconocidas. Los análisis de laboratorio, incluyendo los de orden inmunológico, fueron normales.

Caso 2

Mujer de 38 años, diabética tipo 2, que consultó por intenso prurito en zonas genitales, acompañado de dispareumia, desde hacía 4 años. Al examen físico se observó en la cara interna de labios mayores, menores, región del clítoris y perineal extensas placas blanquecinas, brillantes, de límites difusos y muy dolorosas. El examen ginecológico demostró una cervicitis crónica. En múltiples exudados vaginales se detectó una candidiasis que fue tratada con relativo éxito. La paciente tenía una única pareja sexual sin lesiones clínicas en los genitales, aunque nunca realizó análisis específicos para el VPH. Desde el punto de vista sistémico presentaba un bocio con hipertiroidismo. Los análisis de laboratorio fueron normales.

La histopatología mostró en ambos casos lesiones similares de LEA en período de estado con marcada hiperqueratosis ortoqueratósica, ausencia de granulosa y una epidermis atrófica, sin crestas y sin degeneración hidrópica de la basal. Destacamos que en la parte superior de la capa de Malpighi se observaban numerosos coilocitos (fig. 1). En la dermis papilar y reticular alta las fibras colágenas eran esclerosas. Ausencia de infiltrado inflamatorio, excepto algunos linfocitos de disposición perivascular en la dermis reticular.

En el caso 1 se investigó el VPH por el método de fluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales (Biodesign, Maine, USA) sobre células epiteliales exfoliadas obtenidas por rascado de las lesiones previa asepsia.

Dicha prueba se repitió en tres oportunidades. Las pruebas fueron positivas para el VPH cuando las células mostraron un patrón de fluorescencia idéntico a los obtenidos por controles positivos para este virus. En el caso 2 se realizó una biopsia por *punch*, fijación en formol y los cortes se colorearon en láminas silanizadas para emplear la técnica de hidridización *in situ*. Esta prueba fue efectuada con fluoresceína (DAKO, USA) para VPH general. Los cortes fueron desparafinados y pepsinizados durante 15 minutos, luego denaturalizados a 95° C durante 5 minutos, posteriormente se efectuó la hibridización con HOOPV toda la noche (37° C) y luego lavados con una solución a 48° C durante 30 minutos. Se efectuó la tinción con fosfataza alcalina con anticuerpo anti-fluoresceína por 1 hora y después con NBT-BCIP por 2 horas. La tinción de contraste se realizó con *fast red* y observación al microscopio óptico (fig. 2). La prueba de fluorescencia indirecta se repitió a los 12 meses de tratamiento en las dos pacientes con resultados negativos.

Ambas pacientes recibieron tratamiento local con cremas con corticosteroides de tercera generación y retinoides (isotretinoína) por vía oral a razón de tres comprimidos de 20 mg/ d y alfa tocoferol 800 mg/ d por tiempo prolongado, mejorando muy lentamente. Cuando se le instituyó localmente medicación con imiquimod (1 hora por la noche, en días alternos durante 2 semanas, y luego dos veces por semana durante 3 meses, aunque en numerosas ocasiones se interrumpió dada su intensa acción irritante) la mejoría fue algo más rápida, tanto desde el punto de vista clínico, en su prurito que era incoercible, como funcional en sus relaciones sexuales. Es llamativo que después de 1 año de tratamiento no se logró aislar por frotis el VPH.

DISCUSIÓN

El VPH fue detectado por el método de fluorescencia en el caso 1 y por hidridización *in situ* en el caso 2. En todos se observó el virus en los núcleos de las células epiteliales. La técnica más sensible, pero menos

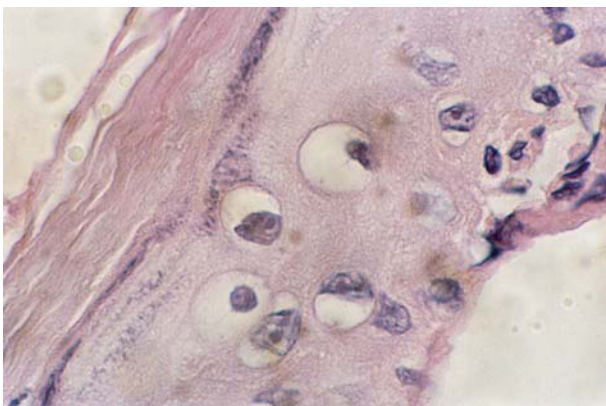


Fig 1.—Histopatología de la epidermis con presencia de coilocitos en los queratinocitos.

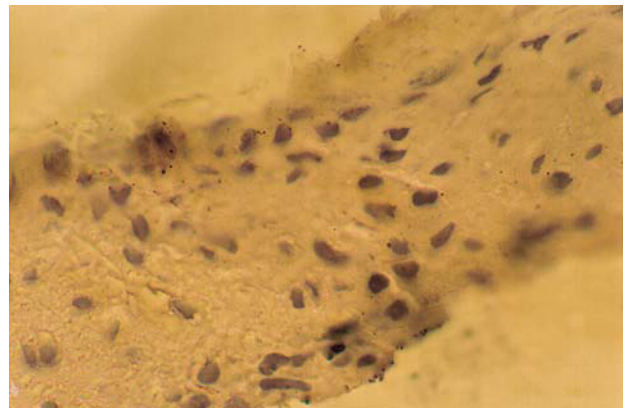


Fig. 2.—Caso 2. Queratinocitos con presencia del virus del papiloma humano por hidridización *in situ*.

específica para afirmar la presencia del virus es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con relación a la seguridad de la presencia para el VPH por ambas técnicas empleadas en nuestros casos, Zaki et al¹⁶ sostienen que no son de confianza en el sentido de una seguridad absoluta para la presencia del virus, y Jablonska et al¹⁷ agregaron que la hibridización *in situ* puede no ser sensible debido al defecto del bajo número de copias del VPH-ADN. Sin embargo, en el caso efectuado por la hibridización fue muy demostrativa en las células epiteliales, lo que nos permite afirmar su presencia. En cambio, cuando los resultados son negativos no se descarta la presencia del virus.

El LEA es una afección de no muy rara frecuencia, con predominio en áreas genitales, que se caracteriza por lesiones blanquecinas, brillantes, en placas, de límites difusos, bilaterales y simétricas y de aspecto atrófico. Son muy pruriginosas y de evolución crónica. Se localizan en ambos labios de la vulva, clítoris, vestíbulo y regiones perineales y perianales. Provocan diversas manifestaciones subjetivas en la esfera genital y urológica. La histopatología muestra una hiperqueratosis ortoqueratósica, asociada a una atrofia del cuerpo mucoso con degeneración hidrópica de la capa basal en períodos de actividad, edema en la dermis superior y homogeneización del colágeno asociada con un proceso inflamatorio a predominio linfocitario. De esta manera se puede clasificar el LEA como una dermatitis de interfase con alteraciones de la epidermis, membrana basal y dermis¹⁸. La etiopatogenia es desconocida¹⁻⁵. Se trata de un síndrome multifactorial que cuando está localizado en piel y generalizado debe tener una etiología y mecanismos fisiopatológicos totalmente diferentes al de localización genital. Una de sus posibles causas en este área puede ser la presencia del VPH⁹⁻¹⁵. En este trabajo se estudiaron dos pacientes con lesiones de LEA vulvar en períodos de estado después de años de evolución. En ambas se encontró el VPH por dos métodos de laboratorio diferentes. El hallazgo del virus del papiloma humano en nuestros casos nos plantea varias interrogantes: a) que el virus pueda estar vinculado directamente al desarrollo del LEA y que pudiera producir una predisposición hacia la malignidad⁵, y b) que, como en numerosas lesiones cutáneas, sea un contaminante sin ninguna relación con el desarrollo de la enfermedad. En el primer caso el virus actuaría como un antígeno localizado en los queratinocitos desencadenando fenómenos inmunes de tipo retardado mediado por linfocitos citotóxicos, a los que se suman liberación de citocinas, que atacan la membrana basal y las propias células de la epidermis, de ahí la degeneración hidrópica de las células basales en el período de actividad, sumada a otros factores inmunes provocarían la hialinización de las fibras colágenas¹⁸. Se ha descrito en la inmunohistoquímica, la activación de los queratinocitos y linfocitos HLA DR+ , linfocitos

CD4+ y especialmente los CD8+ en la dermis, lo mismo con las células de Langerhans CD1a + en la epidermis^{19,20}. Sin embargo, nosotros apoyamos la hipótesis de la acción patógena del virus, ya que con los tratamientos locales y orales no se consiguió una remisión importante sino cuando se asoció un tratamiento antivírico específico local por tiempo prologado, aunque discontinuo, dada la acción adversa de esta medicación. Sugerimos efectuar un seguimiento de estas enfermas por tiempo prolongado a fin de lograr un diagnóstico precoz en caso de una transformación neoplásica de las lesiones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ridley CM. Lichen sclerosus et atrophicus. Arch Dermatol 1987;123:457-60.
2. Ridley CM. Lichen sclerosus et atrophicus. Seminars Dermatol 1989;8:54-63.
3. Meffert JJ, Davis BM, Grimwood RE. Lichen sclerosus. J Am Acad Dermatol 1995;32:393-416.
4. Moyal-Barranco M. Lichen sclereux vulvaire. Ann Dermatol Venereol 1997;124:479-89.
5. Wakelin S, Marren P. Lichen sclerosus in women. Clinics Dermatol 1997; 15:155-68.
6. Hart WR, Norris HJ, Helwig EB. Relation of lichen sclerosus et atrophicus of the vulva to development carcinoma. Obstet Gynecol 1975;45:369-77.
7. Carli P, Cattaneo A, De-Magnis A, Biggeri A, Taddei G, Giannotti B. Squamous cell carcinoma arising in vulvar lichen sclerosus: a longitudinal cohort study. Eur J Cancer Pre 1991;4:491-5.
8. Carlson JA, Ambros R, Malfetano J, Ross J, Grabowski R, Lamb P, et al. Vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma. A cohort case control and investigational study with historical perspective, implications for chronic inflammation and sclerosis in the development of neoplasia. Human Pathol 1998;29:932-48.
9. Andersen WA, Frenquemont DW, Willians J, Taylor PT, Crum CHP. Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: two separate entities ? Am J Obstet Gynecol 1991; 165:329-36.
10. Bloss JD, Liao S-Y, Wilczynski SP, Macri C, Walker J, Peake M, Berman ML. Clinical and histologic features of vulvar carcinomas analyzed for human papillomavirus status. Human Pathol 1991;22:711-8.
11. Kiene P, Milda-Langosch K, Loning T. Human papillomavirus infection in vulvar lesions of lichen sclerosus et atrophicus. Arch Dermatol Res 1991;283:445-8.
12. Crum CHP. Carcinoma of the vulva: epidemiology and pathogenesis. Obstet Gynecol 1992;79:448-54.
13. Kurman RJ, Toki T, Schiffman MH. Basaloid and warty carcinomas of the vulva. Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. Am J Surg Pathol 1993;17:133-45.
14. Ansink AC, Krul MR, De-Weger RA, Kleyne JA, Fijpers H, Van-Tinteren H, et al. Human papillomavirus, lichen sclerosus and squamous cell carcinoma of the vulva: detection and prognostic significance. Gynecol Oncol 1994;52: 180-4.

15. Crum Chp, McLachlin CM, Tate JE, Mutter GL. Pathobiology of vulvar squamous neoplasia. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1997;9:63-9.
16. Zaki I, Dalziel KL, Solomosz FA, Stevens A. The under-reporting of skin disease in association with squamous cell carcinoma of the vulva. *Clin Exp Dermatol* 1996;21:334-7.
17. Jablonska S, Majewski S. Human papillomavirus infection in women. Special aspects of infectious disease in women. *Clinics Dermatol* 1997;15:67-79.
18. Marren P, Dean D, Charnock M, Wojnarowska E. The basement membrane zone in lichen sclerosus: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol* 1997;136:508-14.
19. Auböch J, Romani N, Grubauer G, Fritsch P. HLA-DR expression on keratinocytes in a common feature of disease skin. *Br J Dermatol* 1986;114:465-72.
20. Carli P, Cattaneo A, Pimpinelli N, Cozza A, Bracco G, Giannotti B. Immunohistochemical evidence of skin immune system involvement in vulvar lichen sclerosus et atrophicus. *Dermatologica* 1991;182:18-22.