

Lesiones condilomatosas de cérvix uterino: conización LLETZ

R. Fanjul, S. Pintado, J. Velasco

*Clínica Ginecológica del Dr. Fanjul
Hospital San Agustín*

RESUMEN. Presentamos una serie de ocho mujeres diagnosticadas de lesiones relacionadas con HPV. A todas ellas se realizó un tipaje viral por el método dot-blot con sondas radioactivas y una conización con asa diatérmica (LLETZ) y se controlaron en el postoperatorio con estudios citológicos, colposcopia e hibridación molecular. Consideramos que el método de manejo de las lesiones HPV utilizado por nosotros ofrece las garantías de un diagnóstico exacto de la lesión, aportando el genotipo viral del HPV implicado y descartando, en la pieza de conización de la posibilidad de un carcinoma infiltrante. La hibridación molecular es útil como complemento de citología, para conocer el genotipo infectante y para excluir la posibilidad de una infección residual oculta en el postoperatorio. La conización LLETZ se comportó como método rápido, sin problemas postoperatorios y de gran eficacia terapéutica, puesto que no se detectaron recidivas citológicas ni presencia de ADN vírico, su metodología no es excesivamente complicada y el tiempo de ejecución no superó los 30 minutos por término medio.

SUMMARY. Eight cases are reported about women with the diagnosis of HPV related lesions; a "dot-blot" hybridization technique with radioactive probes was done with each of them, also a conization with a diathermic loop (LLETZ) and a post operative follow-up with methods such as Pap smear, colposcopy and hybridization. We think the way we manage HPV related lesions has the advantage of an accurate diagnosis, with the exact involved HPV type, and it discards the possibility of an infiltrating carcinoma, after studying the conization sample. Hybridization techniques are complementary to Pap smear in order to know the in-

fective viral type and to exclude a possible occult infection in the post-operative period. LLETZ conization ended up as a quick and easy technique with no post-operative problems and with a proved efficiency, since neither recurrences were found (with cytology) nor viral DNA was detected; the technique is not too complicated and takes about 30 minutes.

Introducción

Los virus del papiloma humano (HPVs) son virus epidermotrópicos causantes de varias enfermedades cutáneas y ano-genitales. En el cérvix uterino algunos genotipos, generalmente los HPV-6 y HPV-11, ocasionan los condilomas planos, endofíticos y exofíticos. Los denominados genotipos transformadores o de "alto riesgo" (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 y HPV-35 son los más prevalentes), además de producir condilomas, están relacionados, con más del 80% de carcinomas escamosos y lesiones preneoplásicas (1,2), con más del 40% de adenocarcinomas y lesiones precursoras y con el 36% de carcinomas adenoescamosos (3). También se ha observado ADN vírico en carcinomas cervicales de célula pequeña o neuroendocrinos (4). El mecanismo de oncogénesis es que la unión del ORF 7 con el producto del gen del retinoblastoma y del ORF 6 con el producto del gen P53 inhabilitan funcionalmente ambos genes reguladores (5,6). En el pequeño porcentaje de carcinomas de cuello del útero sin ADN HPV se ha demostrado un mecanismo de oncogénesis similar al ocasionado por los HPVs, si bien la pérdida funcional de la proteína P53 es debida a una mutación del gen que la codifica (7).

Aunque España es un país de baja incidencia de carcinoma de cuello uterino, es probable que, al igual que se ha demostrado en muchos países desarrollados,

se haya producido un incremento de neoplasias y lesiones precursoras en mujeres jóvenes.

Otro de los motivos del enorme interés que despiertan estos virus es el incremento en su prevalencia de manera que hoy puede considerarse como la infección genital vírica más frecuente, estimándose que entre 5 y 10 millones de mujeres americanas comprendidas entre los 15 y los 50 años son portadoras de una infección por HPV.

Un buena herramienta para la disminución de la morbilidad y mortalidad por las lesiones relacionadas con HPV es la universalización del frotis citológico cérvico-vaginal. Con esta técnica se han producido llamativos descensos en la mortalidad por carcinoma de cérvix en la mayoría de los países en los que se realizaron campañas masivas y bien diseñadas de detección precoz de este tumor. No obstante la citología cérvico vaginal tiene algunas limitaciones para el diagnóstico de lesiones cervicales producidas por HPV, fundamentalmente su baja sensibilidad (entre el 15% y el 60%) y la imposibilidad de discernir entre una lesión condilomatosa producida por un genotipo de "alto riesgo" y la originada por un HPV no transformante. Esta laguna diagnóstica de la citología puede ser eficazmente cubierta con métodos de biología molecular de extraordinaria sensibilidad y especificidad y que permiten además realizar un tipaje viral, imprescindible para conocer el previsible comportamiento biológico de la lesión y para un manejo adecuado de la misma.

El tratamiento de las lesiones preneoplásicas a nivel de cérvix uterino se basa fundamentalmente en la destrucción de las lesiones por medio de agentes tópicos citotóxicos, como el podofilino, el ácido tricloracético o el 5-fluoracilo al 5% (8), por medios físicos como la crioterapia, la vaporización con laser o la conización, con bisturí, con asa diatérmica o con rayo laser. La destrucción tisular se puede complementar con tratamientos médicos como pueden ser los interferones por vía sistémica o intralesionales (9, 10) y el ácido retinoico (11).

Material y métodos

El estudio fue realizado entre Enero y Agosto de 1993. Las pacientes procedían de una Clínica Ginecológica (RF). En todas se realizó anamnesis, examen físico, frotis citológico cérvico-vaginal y estudio colposcópico con ácido acético al 5 % y solución de lugol. El diagnóstico citológico de infección HPV se realizó en base a criterios clásicos (presencia de coilocitos y/o disqueratocitos) y a signos citológicos menores, descritos por Schneider et al (12,13). La terminología uti-

lizada en los diagnósticos citológicos es la descrita en el sistema Bethesda (14). Ante la sospecha de infección del tracto genital por HPV citológica o colposcópica y en mujeres consideradas de alto riesgo de contraer la infección viral por su conducta sexual o por alteraciones en la inmunidad, se practicó detección y tipaje viral con el sistema Viratype.

Tests Virapap (VP) y Viratype (VT)

El sistema VP y VT es una hibridación slot blot que detecta los HPV de los grupos: 6/11, 16/18 y 31/33/35 por medio de sondas de ARN marcadas P32. El ADN desnaturalizado se fija a membranas de nailon, donde se produce la hibridación con una mezcla de sondas 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35 (test VP). Los especímenes considerados como positivos se hibridan en tres blots diferentes, utilizando tres mezclas diferentes de sondas: 6/11; 16/18 y 31/33/35 (test VT). Los resultados se objetivan por medio de una autorradiografía 4 días-1 semana después de la hibridación. La intensidad de la señal autorradiográfica se estableció entre 0 y 2; 0 (ausencia de señal autorradiográfica), 1 (positivo bajo), 2 (positivo alto).

Conización LLETZ

Tras el diagnóstico citológico y/o por hibridación molecular de infección cervical por HPV se procedió a una valoración de la de la distribución de las lesiones, seguida de una conización electroquirúrgica con el asa standard, un fino electrodo de 1,5 x 2 cms, previamente se anestesió localmente el cérvix. La metodología empleada viene exhaustivamente descrita en el trabajo de Wrigth et al (15).

Estudio histológico

El espécimen de conización se estudió histológicamente en totalidad por medio de cortes seriados a 5 micras. En ellos se descartó la posibilidad de un carcinoma infiltrante y se valoró la presencia/ausencia de neoplasia cervical intraepitelial (CIN), así como la de condilomas exofíticos, endofíticos y planos. Asimismo se hizo una minuciosa comprobación microscópica de los bordes de resección.

Técnica de hibridación in situ

Uno de los cortes en parafina se reservó para técnicas de hibridación in situ con sondas ADN complementarias de los HPV 6/11, 16/18 y 31/33/35, marcadas con biotina. Como método de detección se utilizó fosfatasa alcalina/estreptavidina y como cromógeno NBT.

Seguimiento de las pacientes

En un intervalo nunca superior a los seis meses de realizada la conización se procedió a un nuevo examen físico, colposcópico, citológico y detección de ADN HPV.

Resultados

En ocho de las mujeres estudiadas con cambios citológicos de HPV y/o ADN vírico detectado por hibridación dot-blot se practicó una conización LLETZ. El resumen de las diferentes pruebas diagnósticas puede observarse en la tabla 1. La técnica quirúrgica se desarrolló siempre en menos de 30 minutos. En ningún caso existió pérdida hemática superior a los 20 ml. ni cualquier otro tipo de incidencia quirúrgica. En el estudio histológico de las muestras se pudo comprobar la casi inexistencia de alteraciones artefactuales que limitasen, ni siquiera minimamente, la valoración correcta de los especímenes.

El seguimiento a los seis meses de la intervención se pudo comprobar que en ninguna de las pacientes existía estenosis cervical ni alteraciones en el patrón colposcópico. En ninguna paciente existía clínica de enfermedad inflamatoria pélvica, o de cualquier otra patología que pudiese ser relacionada con la práctica de la conización. Los estudios citológicos no objetivaron cambios displásicos ni HPV y los de biología molecular no detectaron ADN viral en ninguno de los 8 casos.

Tabla 1

Caso nº	Diagnóstico histológico	dot blot	hibrid. in situ
1	CIN-3 + condiloma plano + condiloma endofítico	16/18	(-)
2	CIN 2 + condiloma plano	6/11+ 31/33/35	6/11
3	CIN 1 + condiloma plano	6/11+ 16/18	6/11
4	paraqueratosis	(-)	(-)
5	CIN 1 + condiloma plano	16/18	16/18
6	CIN 3	(-)	(-)
7	CIN 1 + condiloma plano	6/11	(-)
8	CIN 2 + condiloma plano + condiloma endofítico	(-)	(-)

Tabla 1: Memorandum de los hallazgos histológicos y de los resultados obtenidos con el tipaje viral en las pacientes estudiadas.

Discusión

El tratamiento de las lesiones genitales por HPV es extraordinariamente complicado, frecuentemente son múltiples, muchas recidivan tras una remisión espontánea o inducida por tratamiento. También, si no se trata el/los compañero/s sexuales de las pacientes ocurren reinfecciones. El manejo de las lesiones condilomatosas se complica por el escaso conocimiento que aún tenemos sobre los mecanismos fisiopatológicos de este tipo de infección. Así no podemos olvidar que un porcentaje habitualmente superior al 10% (16-24) (variable en función de la sensibilidad de la técnica de biología molecular empleada y del tipo del colectivo analizado), de las infecciones cervicales HPV son exclusivamente detectables por metodología de biología molecular, son clínicamente indetectables y todavía es una incógnita si se deben y como se deben tratar.

Es reseñable el buen resultado obtenido con el sistema de conización LLETZ, de manera que en ningún caso se detectó enfermedad residual o reciva en el intervalo del estudio. Una de las críticas que se han hecho de este tipo de conización es la gran cantidad de tejido removido, en nuestra pequeña serie el volumen de tejido obtenido siempre fué inferior al de un cono quirúrgico con bisturí. En los trabajos revisados tampoco se comunicaron complicaciones en los embarazos de mujeres conizadas con este sistema (25). La pérdida hemática de nuestras pacientes fué inferior a la comunicada por Delmore et al (26) para la conización con bisturí (65 ml por término medio) y similar a la conización con laser (35ml). Dentro de los métodos de destrucción tisular se suele considerar la vaporización por laser como el mejor, fundamentalmente por la posibilidad de erradicar una gran superficie mucosa. Aunque las lesiones HPV son extensas y multifocales con gran frecuencia, existen trabajos, como el de Richart et al. (27) en los que se demostró que las mujeres en las que se destruyó exclusivamente el epitelio cervical el riesgo de contraer CIN fué el mismo que el de la población general, de forma adicional se han comunicado detecciones de ADN viral en el 24% de mujeres sometidas a vaporización con laser CO2 (28). La técnica de conización LLETZ ofrece otras ventajas importantes, no es demasiado compleja, no precisa de anestesia general y el tiempo de ejecución, de 30 minutos de media, es ligeramente inferior al comunicado para la conización con bisturí o con laser (26), el coste del aparataje es sensiblemente superior, casi cuatro veces, al utilizado para crioterapia, pero diez veces

mas barato que el laser CO2. Mencionaremos la ausencia de artefacto que limitase el estudio histológico e impidiese, por ejemplo, el descartar la posibilidad de un carcinoma escamoso.

En todos los casos presentados en este trabajo se realizó tipaje viral, factible en siete especímenes. La correlación del genotipo detectado por el sistema VP-VT con el método de hibridación in situ fué del 100%, aunque con este método solo se pudieron tipar tres casos, este fenómeno es causa de la gran diferencia de sensibilidad entre el método dot blot radioactivo, capaz de detectar una copia de ADN HPV por célula y el

de hibridación en tejido que necesita más de 20 copias de ADN vírico/célula. Además de su extraordinaria sensibilidad, el método VP-VT no necesita de muestra tisular y su metodología está bien estandarizada, lo cual disminuye la posibilidad, muy importante en técnicas de biología molecular, de la variabilidad interlaboratorio (29). El sistema VP-VT es único sistema de hibridación molecular para HPV diseñado específicamente para el área genital, aprobado por la Drug and Food Administration de los EE.UU. en el año 1991, ha sido probado y comparado por numerosos autores (30-35), siempre con excelentes resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. Barnes W, Delgado G, Kurman R.J, et al.: Possible prognostic significance of human papillomavirus in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1988; 29: 267-273.

2. Kurman R.J., Scifman M.H., Lancaster W.D., et al.: Analysis of individual human papillomavirus in cervical neoplasia: a possible rol for type 18 in rapid progression. *Obstet Gynecol* 1988; 159: 293-296.

3. Tase T., Okagaki T., Clark B.A., et al.: Human papillomavirus DNA in glandular dysplasia and microglandular hyperplasia: presumed precursors of adenocarcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1989; 73: 1005-1008.

4. Stoller M.H., Walker A.N., Mills S.E. Small cell neuroendocrine carcinoma of the cervix: a human papillomavirus type

18 associated cervix cancer. *Lab Invest* 1989; 60: 92-A.

5. Gage J.R., Meyers C., Wettstein F. The E7 proteins of the Nononcogenic Human Papillomavirus Type Gb and of the Oncogenic HPV-16 Differ in Retinoblastoma Protein Binding and other Properties. *J Virol* 1990, 64: 723-730.

6. Watanabe S., Kanda T., Sato H., Furuno A., Ypshike K. Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 E7 functions. *J Virol* 1990; 64: 207-214.

7. Crook T., Wrede D., Tidy J.A. et al.: Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human papillomavirus negative tumors. *Lancet* 1992; 339: 1070-1073.

8. Ferenczy, A. Comparison of 5-fluoracil and cO2 laser for the treatment of

vaginal condilomata. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 773-778.

9. Ysiloski M., Syrjanen K., Syrjanen S., Saarikoski S., Nethersell A. Systemic alpha-interferon (Wellferon) treatment of genital papillomavirus type 6, 11, 16 and 18 infections: doble-blind placebo-controlled trial. *Gynecol Oncol* 1991; 43: 55-60

10. Micheletti L., Barbero M., Preti M., et al.: Il beta-interferone intralesionale nel trattamento delle CIN associate ad infezione da HPV. *Minerva Ginecol* 1992; 44: 329-334.

11. Batova A., Danielpour D., Pirisi L., Creek K.E. Retinoic acid induces secretion of latent transforming growth factor beta 1 and beta 2 in normal and human papillomavirus type 16-immortalized human keratinocytes.

12. Scheneider A., Meinhardt C., de Villiers Ems, Gissmann L. Sensitivity of the Cytologic Diagnosis of Cervical Condyloma in Comparison with HPV-DNA Hybridization Studies. *Diagnostic Cytopathology* 1987; 3: 250-255.

13. Schneider A., Grubert T.: Diagnosis of HPV infections by recombinant DNA technology. *Clin Obst Gynecol* 1989; 32: 127-139.

14. NATIONAL CANCER INSTITUT WORKSHOP: The Revised Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: Report of the 1991 14-Bethesda Workshop. *Acta Cytol* 1992; 36: 273-276.

15. Wriqth T., Richart R.M., Ferenczy A. Electrosurgery for HPV-related diseases of the lower genital tract. *Artur Vision*, incorporated. 1992 New York.

16. De Villiers E.M., Schneider A., Miklaw H., et al.: Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cytology. *Lancet* 1987; 1: 703-706.

17. Wagner D., Ikenberg H., Boehn, Gissmann. Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 767-772.

18. Lorincz A.T., Temple G.F., Patterson J.A., Bennett A.B., Kurman R.J., Lancaster W.D. Correlation of cellular atypia and human papillomavirus deoxyribonucleic acid sequences in exfoliated cells of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1986; 68: 508-512.

19. Toon P.G., Arrand J.R., Sharp D.S. Human papillomavirus infection of the uterine cervix of womwn without cervical signs of neoplasia. *Br Med J* 1986; 293: 1261-1264.

20. Martinez J., Smith R., Framer M., et al.: High prevalence of genital tract papi-

llomavirus infection in female adolescents. *Pediatrics* 1988; 82: 604-608.

21. Kiviat N.B., Koutski L.A., Critchlow C.W., et al.: Prevalence and cytologic manifestations of human papillomavirus (HPV) types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, and 56 among 500 consecutive women. *Int J Gynecol Pat-hol* 1992; 11: 197-203.

22. Schneider A., Hotz M., Gissmann L. Increased prevalence of human papillomavirus in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* 1987; 40: 198-201.

23. Herrington C.S., Troncone G., Evans M.F., Mc Gee Jo. Screening for high- and low-risk human papillomavirus types in single routine cervical smears by non-isotopic in situ hybridization. *Cytopathology* 1992; 3: 71-78.

24. Pao C.C., Lai CH., Wu S.Y., Chang P.L., Soong Y.K. Detection of human papillomaviruses in exfoliated cervicovaginal cells by in situ DNA hybridization analysis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 168-173.

25. Bigrigg M.A., Codling B.W., Pearson P., et al.: Pregnancy after cervical loop diathermy. *Lancet* 1991; 337: 119.

26. Delmore J., Holbert D.V., Kakkail K.J. Cervical conization: cold knife and laser excision in residency training. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 1016-1019.

27. Richart R.M., Townsend D.E., Crisp W., et al.: An analysis of "long term" follow-up results in patients with cervical intraepithelial neoplasia treated by cryotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 823-826.

28. Wang A.C., Hsueh S., Sun C.F. Therapeutic effect of carbon dioxide laser versus single application of trichloro-

acetic acid for koilocitic squamous papillae. *J Formos Med Assoc* 1992; 91: 1054-1058.

29. Brandsma J., Burk R.D., Lancaster W.D., Pfister H., Schiffman M.H. Inter-laboratory variation as an explanation for varying prevalence estimates of human papillavirus infection. *Int J Cancer* 1989; 43: 260-262.

30. Utsuno T. Fundamental and clinical studies on human papillomavirus infection in the uterine cervix specially by Vira Pap method. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1989; 41: 744-750.

31. Burmer G.C., Parker J.D., Bates J., East K., Kulander B.G. Comparative analysis of human papillomavirus detection by polymerase chain reaction and Virapap/Viratyp kits. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 554-560.

32. Nieminen P., Soares V.R.X., Aho M., et al.: Cervical human papillomavirus deoxyribonucleic acid and cytologic evaluations in gynecologic outpatients. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1265-1269.

33. Bauer H., Img Y., Greer C., et al.: Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991; 265: 472-477.

34. Ranki M., Leinonen A.W., Jalava T., Nieminen P, et al.: Use of Affiprobe HPV test kit for detection of human papillomavirus DNA in genital scrapes. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2076-2081.

35. Kiviat N.B., Koutsky L.A., Critchlow C.W., et al.: Comparison of Southern transfer hybridization and dot filter hybridization for detection of cervical human papillomavirus infection with types 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 36. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 561-565.