



Persistenza della infezione da HPV in donne in età postmenopausale

E.M. Smith^{a,b}, S.R. Johnson^{a,b}, J.M. Ritchie^c, D. Feddersen^a, D. Wang^d, L.P. Turek^d, T.H. Haugen^d

PERSISTENT HPV INFECTION IN POSTMENOPAUSAL AGE WOMEN

E.M. Smith^{a,b*}, S.R. Johnson^{a,b}, J.M. Ritchie^c, D. Feddersen^a,
D. Wang^d, L.P. Turek^d, T.H. Haugen^d

^aDepartment of Epidemiology, College of Public Health, University of Iowa,
Iowa City, IA 52242, USA

^bDepartment of Obstetrics/Gynecology, College of Medicine, University of
Iowa, Iowa City, IA 52242, USA

^cDepartment of Biostatistics, College of Public Health, University of Iowa
City, IA 52242, USA

^dVeterans Affairs Medical Center and Department of Pathology, College of
Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA 52242, USA

Int. J. of Gynecol. & Obstet., 87: 131-137, 2004
0020-7292/04 / \$ see front matter

© 2004 International Federation of Gynecology
and Obstetrics

KEY WORDS: Papillomavirus umano - Postmenopausa - Persistenza - Cancro cervicale.

Introduzione

Il papillomavirus umano (HPV) è una causa necessaria per lo sviluppo delle neoplasie cervicali e di gran parte di altri tumori genitali (1). Negli Stati Uniti, l'incidenza del cancro cervicale invasivo aumenta fino all'età di 45 anni (16 per 100.000), dopodiché raggiunge un *plateau* senza poi diminuire nelle età più avanzate (2). È stato dimostrato che le donne in premenopausa che risultano permanentemente HPV-positive nel tempo, hanno un rischio

Riassunto

Obiettivo: nelle donne giovani, la persistenza del papillomavirus umano (HPV) si associa a un aumentato rischio di sviluppo di SIL e di cancro della cervice uterina. Poiché nelle donne più anziane in postmenopausa questa associazione ha ricevuto scarsa attenzione, abbiamo valutato la persistenza dell'HPV in questo gruppo di età.

Metodi: donne (n=105) di età compresa tra 45 e 64 anni sono state esaminate annualmente per 7 anni per valutare la presenza di HPV in campioni citologici cervicali. Per evidenziare i tipi di HPV sono state impiegate PCR, ibridizzazione dot blot e sequenziamento del DNA.

Risultati: la prevalenza cumulativa di HPV è risultata pari al 34%, e nel 24% dei casi erano presenti tipi oncogeni ad alto rischio del virus, che sono associati a neoplasie genitali. I tipi oncogeni più comuni erano HPV-16 (72%) e HPV-31 (16%). Il tasso di persistenza dell'infezione era del 16%. Nessun fattore di rischio era associato con la ripetuta positività per il virus.

Conclusioni: le donne in postmenopausa sono persistentemente infettate in notevole proporzione con HPV oncogeni. Ciò indica la necessità di eseguire, in esse, screening continui per evidenziare lesioni genitali precancerose.

massimo di sviluppare lesioni genitali precancerose (3-7). Solo pochi studi hanno valutato donne sane ultraquarantenni per determinare la prevalenza o la persistenza dell'infezione da HPV nelle vie genitali inferiori, la cui frequenza è stata riportata come ampiamente variabile (8,11). Mentre in una indagine trasversale, condotta in donne sulla base di una singola ricerca dell'HPV, Ferenczy et al., (9) hanno riscontrato l'infezione nell'1% soltanto dei casi, in uno studio prospettico (11) noi abbiamo osservato una prevalenza cumulativa del 14% in un periodo di 2 anni. Da un confronto tra donne di ogni età in Spagna, Colombia e Brasile (10) è risultato che la frequenza dell'HPV non solo variava ampiamente da un Paese all'altro, ma anche tra le donne di età compresa tra 40

TABELLA 1 - FATTORI DI RISCHIO ASSOCIATI ALLA INFEZIONE DA HPV: DATI BASALI

Rischio	N = 105	% HPV+
Età ^a		
46-55/46	13,0	
56-65/59	20,3	
Livello di istruzione ^a		
□ 12	48	16,7
>12	57	17,5
Età del primo rapporto sessuale		
□ 18	39	18,0
>18	66	16,7
No. di partner ^b		
□ 1	63	11,1
□ 2	42	26,2
No. di gravidanze		
0-3	50	18,0
4-5	35	8,6
□ 6	20	30,0
Durata di assunzione dei CO ^a		
0	39	17,9
1-12	25	16,0
□ 13	41	21,1
TOS ^b		
Mai	62	19,4
Sempre	43	14,0
Durata della TOS		
0	62	19,4
1-12	14	21,4
□ 13	29	10,3
Età della menopausa		
40-49/27	14,8	
50-55/53	22,6	
Età dell'isterectomia		
30-45/13	7,7	
46-55/14	14,3	
Fumo		
Mai/Ex	92	17,4
Attuale	13	15,4
Storia delle malattie HPV-correlate ^c		
No	98	16,3
Si	7	28,6
Pap anormale nel corso dello studio		
No	83	15,7
Si	22	22,7
^a Anni.		
^b P<0,05		
^c Include condilomi acuminati, L-SIL, H-SIL, VIN/cancro		

e 60 e più anni che vivono in differenti parti del mondo (1-22%). In due di questi Paesi, la prevalenza dell'HPV nel gruppo □ 60 anni era simile a quella del gruppo di età < 25 anni. È stato dimostrato che, in presenza di una infezione da HPV, nelle donne più giovani gli ormoni steroidei impiegati quali contraccettivi orali (CO) aumentano il rischio di displasia cervicale e di cancro (1, 12). Al contrario, il rischio associato all'impiego della terapia ormonale sostitutiva (TOS) è relativamente sconosciuto. Nonostante le recenti segnalazioni di un aumentato rischio di cancro della mammella e di altre patologie, molte donne in postmenopausa continuano a seguirla per evitare gli effetti collaterali della menopausa e l'osteoporosi. Gli effetti avversi dell'impiego della TOS per un lungo periodo di tempo e il successivo sviluppo di neoplasia intraepiteliale squamosa della cervice uterina (SIL, *Squamous Intraepithelial Lesion*) non sono noti, né è chiaro se essi imitano quello dei CO. Studi *in vitro* indicano che in presenza dei progestinici, l'espressione del gene HPV e la trasformazione cellulare ad opera del DNA virale sono maggiori (13-15).

I precedenti risultati ottenuti in questa popolazione esaminata (8) si basavano su un intervallo di tempo più breve (2 anni) e sull'impiego di una tecnica di tipizzazione dell'HPV meno sensibile di quella usata nel presente studio, i cui scopi sono stati quelli di determinare, in donne in postmenopausa, la prevalenza dell'HPV e dei tipi oncogeni ogni anno per 7 anni (dal 1990 al 1996), quella dei tipi di HPV associati a infezione virale persistente, e l'associazione tra regimi TOS e identificazione dell'HPV nel tempo.

Metodi

Popolazione delle pazienti

Le caratteristiche delle pazienti e i dettagli del disegno della ricerca sono stati descritti in precedenza (16). In breve, le donne sono state arruolate in questo studio presso l'Università dello Iowa tra il 1989 e il 1990, quale parte del trial clinico randomizzato (RCT, *Randomized Clinical Trial*) PEPI (*Postmenopausal Estrogen and Progestin Intervention*). Prima della randomizzazione, le partecipanti avevano un'età compresa tra 45 e 64 anni, da almeno 6 mesi prima dell'arruolamento non avevano più seguito la TOS, ed erano in menopausa da almeno un anno, oppure erano state isterectomizzate almeno 2 mesi prima dell'ingresso nello studio.

Queste ultime venivano incluse in quanto erano anche a rischio di condilomi e di neoplasie genitali diverse da quelle cervicali e associate alla infezione da HPV. Nessuna presentava displasia o tumore cervicali all'atto dell'arruolamento, prima del quale veniva loro

TABELLA 2 - PREVALENZA CUMULATIVA E TIPI DELL'HPV.		
Stato HPV ^a	n=105	%
HPV+ ^b	36	34,3
Persistenza HPV ^c	17	16,2
HPV+ per periodo di tempo		
Baseline	18	17,1
Follow-up 1	12	11,9
Follow-up 2	11	10,9
Follow-up 3	12	12,2
Follow-up 4	10	14,3
Follow-up 5	10	16,4
Follow-up 6	5	8,3
HPV-HR	25	23,8
16	18	17,1
Altri ^d	10	9,5
HPV-LR	20	19,0
62	6	5,7
Other ^e	17	16,2

^a 4 infezioni doppie/multiple; 12 con differenti tipi di HPV nell'intervallo.
^b Sempre positive nell'intervallo
^c HPV+>1 intervallo
^d Include HPV-18, 31, 33, 39, 45, 51, 58
^e Include HPV-6, 11, 38, 44, 53, 61, AF042004, U01532,U12480, U12490

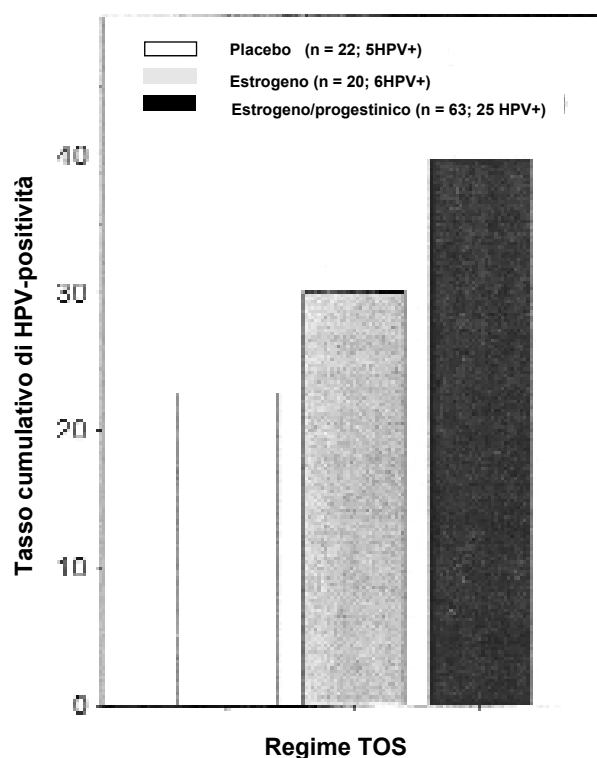


Fig. 1 - Prevalenza cumulativa di HPV per regime TOS.

somministrata una scheda per questo studio del trial PEPI, approvata dall'Università. Le partecipanti sono state seguite con prelievi di campioni per la ricerca dell'HPV e con Pap-test al basale e ogni anno, e con 3 visite di follow-up, con un intervallo di 1 anno dopo la conclusione del RCT e prima del finanziamento di altri 3 follow-up annuali, per un totale di 1 campione basale e 6 di follow-up sia dell'HPV che del Pap-test.

Questi campioni sono stati raccolti annualmente tra il 1990 e il 1993, e di nuovo tra il 1994 e il 1996. I ricercatori e il personale del laboratorio sono rimasti in condizioni di cecità, per quanto riguarda il gruppo di trattamento TOS, i risultati del Pap-test e i fattori di rischio, fino al completamento dello studio sull'HPV.

Gruppi di sostituzione ormonale

Le donne arruolate sono state assegnate in maniera randomizzata a uno di 5 gruppi di trattamento: (1) placebo, (2) 0,625 mg/die di estrogeni equini coniugati (EEC), (3) 0,625 mg/die di EEC + 10 mg/die medrospirogesterone acetato (MPA) somministrati nei giorni 1-12 di ogni ciclo, (4) 0,625 mg/die di EEC + 2,5 mg/die di MPA, oppure (5) 0,625 mg/die di EEC + 200 mg/die di progesterone micronizzato nei giorni 1-

12 di ogni ciclo. Per gli scopi della ricerca, i confronti relativi al TOS venivano fatti tra il gruppo placebo (#1) e il gruppo con soli estrogeni (#2) o quello con estrogeni/progestinici combinati (# 3-5).

Striscio Pap e raccolta dei campioni di HPV

Prima e dopo la randomizzazione venivano eseguiti, a intervalli di 12 mesi, un Pap-test e un tampone vaginale per la raccolta del DNA dell'HPV. Le procedure di randomizzazione e le tappe temporali del trattamento e le informazioni sulle visite annuali sono state descritte precedentemente (16). La cecità per il gruppo di TOS non è stata sollevata fino alla fine del terzo anno dello studio.

Soltanto le partecipanti che rimanevano nel protocollo erano incluse nel trial PEPI e in questo studio della durata di 7 anni, che comprendeva 105 delle 125 donne originariamente arruolate nel trial clinico. Un unico infermiere (D.F.) ha raccolto tutti i campioni per l'intera durata dello studio.

Le donne venivano innanzitutto sottoposte a un Pap-test e poi, per mezzo di un tampone con la punta di cotone, al prelievo di cellule dalla zona di transizione, dall'endocervice e dall'ectocervice, nonché di tutte le secrezioni raccolte nel fornice vaginale posteriore,

per la ricerca dell'HPV. Posizionando uno speculum, si inseriva con cura il tampone fino alla cervice/vagina, evitando la superficie cutanea perianale, e il campione veniva preparato e congelato fino al momento dell'esecuzione dei test. Gli strisci Pap sono stati rivisti da un unico citopatologo della SmithKline, in forza nel trial clinico e cieco riguardo alla assegnazione del soggetto al gruppo TOS, e i risultati sono stati riportati seguendo il sistema Bethesda. Sono state comprese nella categoria dei Pap-test anormali le cellule squamose atipiche di significato non determinato (ASCUS, *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*), il SIL di basso e di alto grado (L-SIL, *Low-grade SIL*; H-SIL, *High-grade SIL*), e l'adenocarcinoma o il carcinoma a cellule squamose.

Identificazione e tipizzazione del DNA dell'HPV

La processazione delle cellule cervicali è stata descritta in altra sede (8, 11). In breve, dopo aver processato le cellule, l'HPV-DNA è stato amplificato mediante PCR con il primer MY09/MY11 HPV L1 (17), usando come template il DNA di circa 30.000 cellule e includendo un ulteriore primer 3' che facilita l'amplificazione di HPV-51 (3). Come controllo interno sono stati impiegati primer per amplificare una porzione di 294 paia di basi del gene della β -globina (18). Ogni set di amplificazioni PCR comprendeva controlli positivi e negativi. In via presuntiva, l'amplificazione dell'HPV-DNA era giudicata positiva se l'elettroforesi su gel di agarosio 1% mostrava una banda di circa 450 paia di basi alla colorazione con bromuro di etidio o se mediante ibridizzazione con sonde generiche HPV marcate con (α -32P) dATP veniva rilevato un segnale dalla membrana di nylon "dot blot". Tutti i campioni sono risultati β -globina-positivi alla elettroforesi su gel in tutte le determinazioni.

Per confermare e tipizzare l'HPV-DNA è stato eseguito il suo sequenziamento automatizzato. I DNA amplificati sono stati purificati usando il *Wizard PCR Preps DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA) e sequenziati su un sequenziatore automatico PE Applied Biosystem (Perkin Elmer Cetus, Foster City, CA, USA). Quando il DNA era presente in quantità insufficiente per il sequenziamento, le sequenze di HPV-DNA venivano riamplicate per 25 cicli in una seconda reazione PCR, usando 1 μ L del prodotto della PCR iniziale e i primer MY09/MY11 oppure i primer *heminested* MY09/GP5+ (19) e confrontate con quelle di isolati noti di HPV del database GenBank, usando il programma BLAST di analisi delle sequenze (20).

Un campione veniva identificato come uno specifico tipo di HPV se corrispondeva per oltre il 90% a

un tipo contenuto nel database. Nello studio sono stati riscontrati molti dei tipi di HPV delle mucose ad alto rischio oncogeno [HPV-HR (HPV-*High Risk*)], quelli più frequentemente associati a un aumentato rischio di SIL e di carcinoma cervicale, e quelli più strettamente correlati ad essi. Il sequenziamento ha anche identificato HPV non-oncogeni e cutanei e sequenze corrispondenti ai numeri di acquisizione GenBank di tipi ancora non numerati.

Gli HPV non-oncogeni mucosi e quelli cutanei erano considerati a basso rischio [HPV-LR (HPV-*Low Risk*)], vista la loro abituale associazione con lesioni benigne o perché la sequenza del loro DNA è geneticamente più vicina a questi tipi benigni che non a quelli ad alto rischio.

Tutti i campioni tentativamente positivi davano risultati interpretabili. Su alcuni di essi è stata eseguita l'analisi del polimorfismo di conformazione di filamento singolo (SSCP, *Single-Strand Conformational Polymorphism*) per identificare più tipi di HPV, esame praticato nelle donne nelle quali durante il periodo dello studio sono stati identificati differenti tipi di HPV. Le procedure dell'SSCP sono state descritte precedentemente (11). I campioni con omologia <95% con una qualsiasi delle sequenze HPV del database GenBank erano considerati di un tipo differente. Il DNA a filamento singolo veniva risolto da un elettroforesi su poliacrilamide 6% in tampone contenente glicole 10%. Le bande isolate sono state ulteriormente caratterizzate mediante sequenziamento del DNA.

Analisi statistiche

Per testare al basale le differenze tra gruppi per quanto riguarda le variabili continue è stato usato il metodo di Kruskal-Wallis, per quelle categoriche il Chi quadrato e il test esatto di Fisher.

La regressione logistica è stata impiegata per valutare al basale l'associazione tra fattori di rischio e identificazione dell'HPV. Poiché in ogni paziente sono stati ottenuti ripetuti risultati riguardo all'HPV, è stata adottata la metodologia dell'equazione generalizzata di stima (GEE, *General Estimating Equation*) (21, 23) per dati longitudinali impiegando un *link logit* onde valutare l'associazione tra l'identificazione dell'HPV nel tempo in occasione delle sole visite di follow-up e i possibili fattori di rischio tra cui regime TOS, status HPV al basale, e tempo.

Nell'ambito della metodologia GEE, è stata impiegata la matrice di correlazione "*independence working*", tenendo conto nelle analisi della correlazione intraindividuale, pur non essendo questa esplicitamente specificata. È stato calcolato un totale di intervalli di confidenza al 95%, usando gli errori standard della regressione logistica corrispondente o dei

modelli GEE e l'approssimazione normale. Tutti i calcoli sono stati eseguiti con il pacchetto statistico SAS (24).

Risultati

Prima della randomizzazione nel trial clinico PEPI nel 1990, l'età mediana delle 105 partecipanti era di 56 anni, il livello medio di istruzione di 13,4 anni, e il reddito familiare < 50.000 dollari USA in quasi i tre quarti di esse. La maggior parte delle donne era coniugata (80%), e la maggioranza aveva avuto il primo rapporto sessuale a una età \leq 19 anni (63%), e aveva avuto nella loro vita un solo partner (59%). L'età mediana di quelle isterectomizzate prima dell'arruolamento nello studio (26%) era di 46 anni, quella delle donne con menopausa naturale (74%) di 51 anni. Le donne che in passato avevano assunto CO (63%) avevano seguito il trattamento per un media di 58 mesi, mentre quelle che prima dell'arruolamento nello studio avevano adottato una TOS (41%) l'avevano praticata per 37 mesi.

Tra queste ultime (n=43), il 42% aveva usato soli estrogeni, il 56% una combinazione di estrogeni e progestinici, e una soltanto non ricordava quale/i, ormone/i avesse assunto.

La Tabella 1 mostra le caratteristiche demografiche e i fattori di rischio associati con la scoperta dell'HPV al basale. I risultati non sono descritti per gruppo di regime TOS, perché tra i gruppi al basale non c'erano differenze significative per quanto riguarda i fattori di rischio, incluse le incidenze di positività per HPV e HPV-HR. L'identificazione di HPV al basale era associata a livello statisticamente significativo con un aumento nel numero di partner sessuali \geq 2 rispetto a 1, nel corso dell'intera vita; odds ratio (OR), 2,8; intervallo di confidenza al 95% (IC 95%), 1,0-8,1]. In questo gruppo di età anziano, il rischio associato a una storia di malattia HPV-correlata, all'aver fatto uso in passato di CO, o all'essere fumatrici non correlava con una aumentata frequenza di identificazione dell'HPV.

La frequenza della positività per l'HPV, la sua persistenza, l'HPV-HR, l'HPV-LR, e i tipi sono mostrati nella Tabella 2. In un periodo di 7 anni, oltre un terzo delle donne in postmenopausa sono risultate almeno una volta infettate dall'HPV. La prevalenza cumulativa dell'infezione da HPV-HR era del 24% e includeva i tipi HPV-16, 18, 31, 33, 39, 45, 51 e 58. Il sequenziamento ha identificato anche il 19% di soggetti con tipi HPV-LR: HPV-6, 11, 38, 44, 53, 61, 62, nonché sequenze corrispondenti ai numeri di acquisizione GenBank AF042004, U01532, U12480 e U12490. La prevalenza annua di identificazione dell'HPV variava

tra l'8% e il 17% (Tab. 2), e tra il 3% e l'11% per i tipi HPV-HR. Non era rilevabile una tendenza all'aumento o alla diminuzione della prevalenza nel tempo. Tra le donne mai indagate per presenza di HPV, il 44% sono state identificate come portatrici di tipi oncogeni, il 31% di tipi ad alto rischio, e il 25% con tipi sia ad alto che a basso rischio. Il tipo di HPV più frequente era HPV-16, che rendeva conto del 50% delle infezioni, seguito da quello a basso rischio HPV-62 (17%). Quattro donne si sono rivelate portatrici di più tipi. Non è stata osservata alcuna differenza nella frequenza di HPV-HR tra donne sottoposte (23%) o no (26%) a isterectomia.

Infezione persistente, definita come HPV-positività a 2 o più valutazioni a qualsivoglia visita durante il periodo di 7 anni, è stata riscontrata nel 16% delle partecipanti (Tab. 2) ossia nel 47% delle donne infettate, e per il 41% dei casi la persistenza riguardava tipi di HPV-HR. Soltanto il 2% (n=2) è risultata positiva a tutte le visite, e entrambe lo erano, a differenti intervalli di tempo, a tipi sia LH che RH.

Un altro 18% del gruppo studiato ha presentato un'infezione transitoria in un unico periodo. Le donne con infezione persistente avevano un rischio più elevato di riscontro di una citologia anormale: OR = 2,3 (IC 95%; 0,6-8,6). A tutti gli intervalli di tempo, nelle donne persistentemente HPV-HR positive non vi erano differenze statisticamente significative, per quanto riguarda la frequenza degli altri fattori di rischio presentati nella Tabella 1, rispetto a quelle persistentemente HPV-negative. Nelle prime era anche presente una storia di assunzione maggiormente protratta di CO, rispetto a quelle non infettate (80 mesi contro 38), ma la differenza non era statisticamente significativa.

La probabilità di essere identificate nel tempo come portatrici del virus in occasione delle visite di follow-up, dopo aggiustamento per gli altri fattori di rischio significativi, la pregressa isterectomia e il numero di gravidanze, ha dimostrato che lo stato HPV al basale costituiva un importante fattore (P = 0,02) predittivo della successiva infezione. Le probabilità che le donne inizialmente identificate come portatrici di HPV si rivelassero in seguito sempre positive erano tre volte maggiori che in quelle inizialmente HPV-negative (OR = 3,0; IC 95%, 1,2-7,7), né si modificavano se nel modello veniva inclusa una storia pregressa di malattia HPV-correlata.

Nell'arco dei 7 anni, il 23% (n = 22) delle donne hanno mostrato almeno una volta un Pap-test anormale: 16 ASCUS, 5 L-SIL e 1 H-SIL (Tab. 1). Tra di esse, tutte quelle che albergavano il virus (36,4%) avevano solo tipi HR: in 4 casi ASCUS, in 3 H-SIL e 1 L-SIL, e tutte le altre con ASCUS, H-SIL o L-SIL sono apparse HPV-negative in tutti i periodi. Tra le donne

il cui Pap-test è risultato sempre normale (79%), il 7% avevano tipi HPV-HR persistenti, e un altro 5% tipi HPV-LR anch'essi persistenti.

La Figura 1 mostra la prevalenza cumulativa dell'HPV per gruppi TOS. Il tasso di positività nelle donne non-TOS era del 23%, rispetto al 30% in quelle che prendevano soli estrogeni e al 40% nei casi di assunzione di estrogeni e progestinici. Nonostante l'aumento di frequenza di HPV-positività nei gruppi TOS, la differenza tra quello delle non-TOS e quello delle TOS non era statisticamente significativa, anche dopo aggiustamento per il numero di gravidanze, la progressa isterectomia o una precedente storia di malattie HPV-correlate, fattori dimostratisi associati ad un aumentato rischio di HPV-positività (dati non presentati).

Discussione

In questo studio è stata osservata un'elevata prevalenza di DNA dell'HPV nella cervice uterina o nella vagina delle donne in postmenopausa. In oltre un terzo, la presenza del virus è stata evidenziata almeno una volta nel corso dei 7 anni, e in due terzi dei casi si trattava di tipi oncogeni.

Questo reperto contrasta con la annosa credenza secondo cui soltanto le donne giovani, e in particolare quelle di età <25 anni, avrebbero alte incidenze di infezione da HPV, che sarebbero invece molto più basse nelle donne di età media o anziane (9, 25). Questa elevata frequenza di identificazione dell'HPV è sorprendente anche perché il gruppo da noi studiato sembrerebbe essere a basso rischio di infezione per l'assenza di fattori di rischio, come ad esempio l'aver avuto in media un solo partner sessuale per tutta la vita. Gli studi precedenti hanno riguardato poche donne, o addirittura nessuna donna, di età avanzata, intendendo in genere con questa le ultraquarantenni, hanno concentrato l'attenzione su popolazioni anziane a più alto rischio, e raramente hanno seguito più volte nel tempo soggetti di questo gruppo di età per esaminare la persistenza dell'infezione virale (10). Al contrario, la nostra ricerca ha riguardato donne in età compresa tra i 45 e i 64 anni al basale, e i 52 e i 71 anni al termine del follow up.

Due i problemi considerati di maggiore importanza: la persistenza dei tipi HPV-HR e il rapporto tra persistenza a breve e a lungo termine (4, 26), che nel nostro studio si sono anche rivelati relativamente stabili, tra il 7% e il 10%. Nelle donne più giovani è stato dimostrato che la scoperta di una persistenza dell'infezione rappresenta una misura del rischio di sviluppo di una neoplasia cervicale più accurata di quelle osservate in un unico punto nel tempo (3, 4,

27). Come nei soggetti più giovani, la prevalenza cumulativa di HPV nelle donne in postmenopausa era molto maggiore di quella rilevata in singoli punti nel tempo. La nota associazione tra identificazione di tipi oncogeni di HPV in donne con Pap-test anormali è risultata confermata dai nostri dati, con soltanto tipi HPV-HR evidenziati tra coloro che avevano una citologia anormale, mentre le prevalenze di persistenza di questi tipi erano molto più basse in quelle con Pap-test normali durante l'intero studio (36% e 7% rispettivamente). Nel nostro studio, una piccola percentuale di donne era persistentemente positiva per soli tipi LR (4%), e nessuna ha prodotto Pap-test anormali. Al contrario, in un gruppo di età principalmente premenopausale, le donne identificate come portatrici di tipi LR avevano un rischio più elevato di avere un Pap-test anormale (3, 4).

Tuttavia, queste indagini sottoponevano di nuovo a test le donne a intervalli di tempo più ravvicinati e potrebbero non avere rilevato alcuni dei tipi oncogeni intermittenti che noi abbiamo invece identificato con un intervallo di tempo più lungo.

Sappiamo bene che in questa ricerca il mancato riscontro di una aumentata identificazione di HPV associata al TOS può essere dovuto alle piccole dimensioni del nostro campione. Ciononostante, riteniamo che i nostri reperti, ottenuti in un trial randomizzato e strettamente controllato, siano sufficientemente stimolanti e interessanti da far sì che più ampi studi indaghino sui problemi HPV-correlati nelle donne più anziane. La replicazione *in vitro* dell'HPV aumenta in presenza di ormoni steroidei e glucorticoidi (15, 28). L'esposizione ai primi potenzia la trasformazione neoplastica delle cellule in coltura indotta dall'HPV (15, 28). Questi esperimenti molecolari contribuiscono a spiegare la nota associazione tra uso di CO e aumentato rischio di carcinoma della cervice uterina HPV-correlato. I nostri dati *in vivo* sul trattamento sostitutivo con steroidi hanno evidenziato una frequenza di identificazione dell'HPV lievemente maggiore tra le non-utilizzatrici del TOS, rispetto alle donne che assumevano estrogeni da soli o in combinazione con progestinici, il che suggerisce forse che questi ormoni up-regolano il gene HPV. In un precedente, più vasto studio che ha esaminato l'HPV in due periodi, abbiamo dimostrato una significativa associazione tra la sua identificazione e la durata del trattamento sostitutivo con estrogeni/progestinici (OR = 1,8; IC 95%, 1,1-3,1), rispetto a chi non ne aveva mai assunti. Per stabilire se le donne che usano la TOS avranno un rischio più elevato di sviluppare un cancro della cervice uterina e altri tumori ginecologici, è necessario un ulteriore chiarimento.

L'errata opinione secondo cui la prevalenza di HPV nella cervice delle donne anziane sarebbe bassa

può essere pregiudizievole per la loro salute, poiché molte donne dopo gli anni riproduttivi non hanno più praticato Pap-test o esami ginecologici di routine. Insieme alla relativamente alta frequenza di HPV-HR che questo studio di 7 anni ha riscontrato in un gruppo di donne a basso rischio di neoplasie genitali HPV-correlate, esso indica che l'identificazione di questi soggetti quali portatrici del virus è un fattore predittivo significativo di successiva HPV-positività e può esserlo di sviluppo di lesioni precancerose come lo è nelle donne più giovani.

Il fatto che l'incidenza di una neoplasia cervicale non diminuisca con l'aumentare dell'età è un argomento in favore della ricerca del virus HPV nelle donne anziane quale metodo costo-efficace di prevenzione

della malattia, dal momento che l'HPV è una causa necessaria di questo tipo di tumore e l'HPV-positività è predittiva di successiva infezione. Pertanto, la continua necessità di eseguite Pap-test ed esami pelvici nelle donne in età menopausale va fatta presente alle pazienti e agli operatori sanitari.

Ringraziamento

Questo studio è stato finanziato dal contratto NHI NHLBI no. 5 U01 HL40195 (SRJ, DF), dal Cancer Research Foundation Award (EMS, JMR) e dai Veterans Affairs Merit Review Funds (LPT, THH).

Bibliografia

- MUNOZ N., BOSCH F.X.: *HPV and cervical neoplasia: review of case-control and cohort studies*. IARC Publ 119:251-61, 1992.
- RIES L.A., KOSARY C.L., HANKEY B.F., MILLER B.A., HARRAS A., EDWARDS B.K., eds.: *SEER Cancer Statistics Review, 1973-1994*, USPH, HHS, NIH, Bethesda, Md. Publ. no. 97-2789.
- HILDESHEIM A., SCHIFFMAN M.H., GRAVITT P.E., GLASS A.G., GREER C.E., ZHANG T.: *Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women*. J Infect Dis. 169:235-40, 1994.
- SCHLECHT N.F., KULAGA S., ROBITAILLE J., FERREIRA S., SANTOS M., MIYAMURA R.A., DUARTE-FRANCO E., ROHAN T.E., FERENCZY A., VILLA L.L., FANCO E.L.: *Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia*. J Am Med Assoc., 286:3106-14, 2001.
- LIAW K-L., GLASS A.G., MANOS M.M., GREER C.E., SCOTT D.R., SHERMAN M. et al.: *Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions*. J Natl Cancer Inst, 91:954-60, 1999.
- CHUA K.L., HJERPE A.: *Persistence of human papillomavirus (HPV) infections preceding cervical carcinoma*. Cancer, 77:121-7, 1996.
- HO G.Y., BIERMAN R., BERADSLEY L., CHANG C.J., BURK R.D.: *Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women*. N Engl J Med, 338:423-8, 1998.
- SMITH E.M., JOHNSON S.R., FIGUERRES E.J., MENDOZA M., FEDDERSON D., HAUGEN T.H., et al.: *The frequency of human papillomavirus detection in postmenopausal women on hormone replacement therapy*. Gynecol Oncol, 65:441-6, 1997.
- FERENCZY A., GEIFAND M.M., FRANCO E., MAN-SOUR N.: *Human papillomavirus infection in postmenopausal women with and without hormone therapy*. Obstet Gynecol, 90:7-11, 1997.
- MUNOZ N., KATI I., BOSCH F.X., ELUF-NETO J., DE SANJOSE S., ASCUNCE N., GILI M., et al.: *Risk factor for HPV DNA detection in middle-aged women*. J STD, 23:504-10, 1999.
- SMITH E.M., RITCHIE J.M., LEVY B.T., ZHANG W., WANG D.H., HAUGEN T.H., TUREK L.P.: *Prevalence and persistence of human papillomavirus in postmenopausal women*. Cancer Detec Prev, 27:472-80, 2003.
- HILDESHEIM A., REEVES W.C., BRINTON L.A., LAVERY C. BRENES M., DELA GUARDIA M.E. et al.: *Association of oral contraceptive use and human papillomavirus in invasive cervical cancers*. Int J Cancer, 45:860-4, 1990.
- CHAN W.K., KLOCK G., BERNARD H.U.: *Progesterone and glucorticoid response elements occur in the long control region of human papillomaviruses*. J Virol, 63:3261-9, 1989.
- CROOK T., STOREY A., ALMOND N., OSBORN K., CRAWFORD L.: *Human papillomavirus type 16 cooperates with activated ras and fos oncogenes in hormone dependent transformation of primary mouse cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 85:8820-24, 1988.
- CRIFE T.P., HAUGEN T.H., TURK J.C., TABATABAI F., SCHMID III P.G., DURST M. et al.: *Transcriptional regulation of the human papillomavirus - 16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis*. EMBO J 6:3745-53, 1987.
- EPELAND M.A., BUSH T.L., MEBANE-SIMS I., STEFANICK M.L., JOHNSON R., WACLAWIWI M.: *The postmenopausal estrogen/progestins interventions trial: rationale, design, and conduct*. Control Clin Trials, 16:54S-65S, 1995.
- TING Y., MANOS M.M.: *Detections and typing of genital human papillomavirus*. In: Innis M., Gelfand D., Sninsky J., White T., editors. PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. San Diego, CA: Academic Press, 356-67, 1990.
- CHEHAB F.F., DOHERTY M., CAI S.P., KAN Y.W., COOPER S., RUBIN E.M.: *Detection of sickle cell anaemia and thalassaemias*. Nature 1987;329:293 -4 [letter, published erratum appears in Nature 1987 Oct 22-28;329(6141):678].
- DE RODA HUSMAN A.M., WALBOOMERS J.M., van den Brule A.J., MEIJER C.J., SNIJERS P.J.: *The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR*. J Gen Virol, 76:1057-62, 1995.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J.: *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 215:403-10, 1990.
- ZEGER S.L., LIANG K.Y.: *Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes*. Biometrics 42:121-30, 1986.

22. LIANGK Y., ZEGER S.L.: *Longitudinal data analysis using generalized linear models*. Biometrika, 73:13-22, 1986.
 23. ZEGER S.L., LIANG K.Y., ALBERT P.S.: *Models for longitudinal data: a generalized estimating equation approach*. Biometrics, 44:1049-60, 1988.
 24. SAS SYSTEM FOR WINDOWS. Version 8.0. Cary, NC: SAS Institute, 1999.
 25. BURK R.D., KELLY P., FELDMAN J., BROMBERG J., VERMUND S.H., DEHOVITZ J.A., et al.: *Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors*. Sex Transm Dis, 23:333-41, 1996.
 26. WHEELER M.M., GREER C.E., BECHER T.M., HUNT W.C., ANDERSON S.M., MANOS M.M.: *Short-term fluctuations in the detection of cervical human papillomavirus DNA*. Obstet Gynecol, 88:261-8, 1996.
 27. MITTAL R., PATER A., PATER M.M.: *Multiple human papillomavirus type 16 response elements functional for transformation, transient expression, and DNA-protein interactions*. J Virol, 67:5656-9, 1993.
 28. PATER M.M., HUGHES G.A., HYSLOP D.E., NAKSHATRI H., PARE A.: *Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not by type 11 human papillomavirus DNA*. Nature, 335:832-5, 1988.
-