

HPV E NEOPLASIA GENITALE

Luciano Mariani

Istituto Nazionale Tumori Regina Elena, Roma

Indirizzo per corrispondenza: Prof. Luciano Mariani
Clinica Ostetrica Ginecologica, Università di Modena
Via Elio Chianesi 53, 00144 Roma (RM) Italia
tel: +39 06 52665985 ; fax: +39 06 52666974 ; e-mail: luciorm@libero.it

ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is recognized as the commonest sexually transmitted disease and is usually divided into low- and high-risk group. The latter (particularly HPV-16 and HPV-18) are the well established necessary cause (although not sufficient) of cervical cancer, and are also involved in the carcinogenesis of other genital (vulva, vagina, anus, penis) and extra-genital malignancies (oral cavity, pharynx, larynx). The high-risk E7 proteins drive cell proliferation through their association with Rb (retinoblastoma), and contribute to neoplastic progression, whereas high-risk E6-mediated p53 degradation prevents the normal repair of chance mutations in the cellular genome. Cancers usually arise in individuals who fail to resolve their infection and who retain oncogene expression for years or decades. Cofactors (smoking, multiparity, OC use, others STDs) are necessary over the persistent high-risk HPV infection to cause cervical cancer.

Key words: *hpv, cervical cancer, carcinogenesi*

RIASSUNTO

La famiglia degli Human Papillomavirus (HPV) rappresenta la più comune e diffusa delle malattie a trasmissione sessuale, ed è comunemente suddivisa genotipi a basso-rischio ed alto-rischio. Quest'ultimi (in particolare l'HPV 16 e 18) sono riconosciuti come la causa necessaria del cancro del collo dell'utero e, in generale, tra i più importanti virus carcinogenetici per la specie umana. Il ruolo trasformante, infatti, non si esaurisce nella genesi del cervicocarcinoma, ma è fortemente correlato ad altre neoplasie della sfera genitale femminile e maschile (vulva, vagina, ano, pene) e neoplasie extra-genitali (cavità orale, faringe, laringe). Le potenzialità carcinogenetiche sono ascrivibili a due oncoproteine virali (E6 ed E7) che, dopo l'avvenuta integrazione del genoma virale in quello dell'ospite, determinano un incontrollato stimolo proliferativo, con diminuzione dei meccanismi di controllo e di sorveglianza cellulare, conseguente accumulo delle anomalie genetiche, aumento dell'instabilità genomica e comparsa di aneuploidia.

Parole chiave: *hpv, cervicocarcinoma; carcinogenesi*

INTRODUZIONE

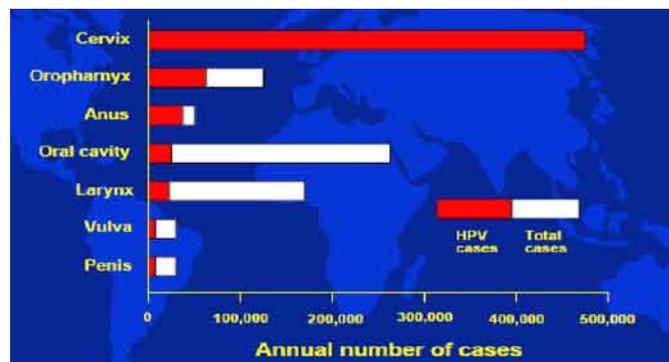
Negli ultimi 30 anni si è assistito, come in nessun altro campo della medicina, ad una crescente mole di acquisizioni scientifiche in merito alla carcinogenesi della cervice uterina. Le nozioni riguardanti il ruolo centrale dell'Human Papillomavirus (HPV) nel determinismo del cervicocarcinoma (che rappresenta, dopo il cancro della mammella, la seconda neoplasia per incidenza) hanno consentito di ridisegnare gran parte della storia naturale, consentendo una migliore comprensione dei fenomeni bio-molecolari e ottimizzando la gestione clinico-terapeutica. E' ben evidente a tutti l'importanza di aver descritto, in modo così dettagliato ed articolato, la correlazione etiologica che lega una neoplasia solida (ma sarebbe meglio dire numerose neoplasie solide) ad un'origine virale, a sua volta responsabile della più frequente malattia a trasmissione sessuale.

Per avere un'idea della dimensione universale di questa malattia, basterà pensare che nel mondo, secondo l'Organizzazione Mondiale di sanità, non vi sono meno di 630 milioni di individui infettati, tra uomini e donne, dall'HPV (1, 2).

Sarà inoltre necessario ricordare che l'HPV è coinvolto come "causa ne-

cessaria" non solo nella genesi del cervicocarcinoma, ma anche in una vasta serie di neoplasie del tratto genito-perineale (vulva, vagina, ano, pene) ed extra-genitale (cavità orale, faringe, laringe), con percentuali di attribuzione variabili dal 25% al 100% (Figura 1).

Figura 1: Patologia neoplastica genitale ed extragenitale riferibile all'HPV



Il razionale che conduce al nesso causale tra HPV e cancro della cervice uterina è ascrivibile ad almeno tre gruppi distinti di studi: epidemiologici, virologici e clinici. Ed è stato soprattutto grazie all'esplosione delle conoscenze avvenute con l'applicazione e l'evoluzione delle tecniche bio-molecolari, a partire dagli anni '80, che si è delineato in modo così dettagliato il ruolo carcinogenetico dell'HPV. I dati emersi da questi studi esaltano il ruolo causale del Papillomavirus nella genesi del cervicocarcinoma, confermandone l'etiologia infettiva così come ipotizzato da Rigoni Stern fin dalla metà dell'800. I concetti di regressione-progressione delle lesioni preneoplastiche sono stati rivisti alla luce dell'interazione col Papillomavirus, ponendo l'accento sull'importanza dei genotipi ad alto rischio nel processo di trasformazione. Le analisi epidemiologiche condotte negli ultimi anni, come già sottolineato, hanno esteso le potenzialità carcinogenetiche dell'HPV ad altre sedi genitali e distretti anatomici extra-genitali. Alla luce di queste evidenze il gruppo di lavoro dell'International Agency for Research on Cancer (IARC) ha classificato l'HPV come oncogeno non solo per la sede cervicale ma, più in generale, per la specie umana.

Le ricadute cliniche di questa mole di informazioni scientifiche (come si potrà constatare anche dagli altri articoli di questo numero monografico) si sono tradotte in termini diagnostici con la messa a punto di test diagnostici virali e l'elaborazione del vaccino profilattico (3), cioè preziosi strumenti di prevenzione. La disponibilità di questi nuovi presidi apre una riflessione su come possa o debba cambiare, nel futuro prossimo, la strategia di screening per il carcinoma della cervice uterina che certamente dovrà avvenire in modo razionale e sinergico.

Allo scopo di rendere comprensibili le interazioni virus-ospite ed i processi biologici legati al ruolo carcinogenetico del Papillomavirus a livello cervicale e, più generalmente, genitale è necessario introdurre alcune generalità su questo virus: l'organizzazione genomica, il ciclo vitale e la sua storia naturale.

GENERALITÀ

I Papillomavirus costituiscono un gruppo di DNA-virus appartenenti al genere A dei Papovavirus (acronimo per Papilloma, Polioma, Vacuolizzante). Sono in grado di infettare diverse specie animali (bovine-PV, canina-PV, cotton-tail rabbit-PV) e l'uomo (human-PV), dando origine ad un ampio spettro di lesioni. Sono stati infatti riconosciuti circa 200 tipi di HPV, capaci di causare proliferazioni epiteliali della cute e delle mucose: per lo più con caratteristiche di benignità e di transitorietà, ma anche patologie francamente neoplastiche.

L'albero filogenetico degli HPV è estremamente complesso e si articola in 16 generi identificati con le lettere dell'alfabeto greco: α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν , χ , \omicron , π . I papillomavirus umani (HPV) afferiscono ai generi α (circa 50 genotipi con prevalente tropismo mucosale) e β (a tropismo cutaneo, cioè responsabili delle verruche plantari o piane). La maggior parte di questi virus sono definiti a basso rischio (i prototipi di questo gruppo sono rappresentati dall'HPV 6 e 11) e quindi in grado di determinare manifestazioni proliferative benigne a livello cutaneo-mucosale. I genotipi virali definiti ad alto rischio sono invece fortemente correlati a lesioni neoplastiche, prime fra tutte quelle della cervice uterina. I principali genotipi ad alto-rischio appartengono alla specie A7 e specie A9.

Le similitudini nucleotidiche dei singoli genotipi

di papillomavirus sono alla base dell'ulteriore classificazione di HPV all'interno delle specie. Un singolo genotipo si distingue per un'uguaglianza della sequenza nucleotidica degli ORFs L1, E6 ed E7 di poco inferiore al 90%; il sottotipo di HPV è definito da una uguaglianza del DNA compresa tra il 90 e il 98%, mentre le varianti dimostrano un'uguaglianza superiore al 98%.

Il prototipo che caratterizza la specie A7 è l'HPV-18, accompagnato dai genotipi immunologicamente affini (HPV-45, 39, 59), mentre il prototipo della specie A9 è l'HPV-16, con i genotipi ad esso affini (HPV-31, 33, 35, 587, 52). L'affinità di alcuni genotipi virali rispetto ad altri è materia molto interessante sotto il profilo scientifico e di probabile utilità nel management delle lesioni HPV-correlate. In primo luogo va sottolineato che queste minime differenze nel patrimonio genomico possono giustificare la diversa capacità di progressione delle singole infezioni. Sono state identificate numerose varianti dell'HPV-16, che rappresenta il genotipo virale più importante dal punto di vista dell'oncogenesi. Queste varianti sono state raggruppate e denominate secondo la diversa prevalenza geografica: Europe, North America, Central and South America, Southeast Asia, Africa. Le non-European variants dell'HPV 16 e 18 sono considerate a maggior rischio cancerogeno nei confronti dei rispettivi prototipi virali. Infine, le analogie possono giustificare la cross-immunoreazione e cross-protezione del vaccino anti-HPV nei confronti di genotipi non presenti nella miscela vaccinale. In altre parole, le analogie immunologiche tra i genotipi molto simili (HPV-16 e HPV-35; HPV-18 e HPV-45) potrebbero condizionare un'estensione del beneficio vaccinale anche a tipi virali non presenti nel vaccino stesso.

HPV: ORGANIZZAZIONE GENOMICA E CICLO VITALE

Il Papillomavirus è costituito da un capsido proteico (a sua volta unione di 72 capsomeri, ciascuno risultante dall'assemblamento di 5 proteine strutturali L1) e racchiude una molecola circolare di DNA a doppia elica, formata da circa 8.000 coppie di basi.

L'organizzazione genomica è simile per tutti i papillomavirus. Il DNA è organizzato in due "domains" o regioni suddivisibili in sequenze nucleotidiche, definite Open Reading Frames (ORFs, o "quadri di lettura aperta"), che rappresentano tratti del genoma potenzialmente trascrizionali. Ciascuno ORF è capace di codificare per uno specifico mRNA e relativa proteina. Ognuna di queste proteine svolge una particolare funzione dall'interno del ciclo vitale dell'HPV.

Tabella 1 Regioni del genoma virale e funzioni proteiche

EARLY PROTEINS (Proteine precoci a replicazione virale)	
E1	Essenziale per la replicazione virale.
E2	Essenziale per la replicazione. Fattore di trascrizione virale. Controllo funzionale di E6 ed E7. Sito di integrazione.
E3	Funzione non conosciuta.
E1 [^] E4	Lega le proteine citoscheletriche.
E5	Interagisce con i recettori EGF/PDGF.
E6	Degradazione di p53 ed attivazione della telomerasi.
E7	Interazione con pRB .
E8 [^] E2C	Repressione della replicazione virale (a mantenimento della latenza virale ?)
LATE PROTEINS (proteine tardive a capsido virale)	
L1	Proteina capsidica maggiore. Altamente immunogenica.
L2	Proteina capsidica minore

Nel dettaglio (Tabella 1), il genoma virale comprende 3 regioni:

E (early): regione che codifica per le early-proteins, suddivisa in 6 ORFs (open-reading frames):

E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7. Sono geni responsabili dei processi di replicazione, trascrizione plasmidica e trasformazione cellulare. Costituiscono il 45% del genoma virale.

L (late): regione che codifica per le late-protein, suddivisa in 2 ORFs (open-reading frames):

L1 (proteina capsidica maggiore) e L2 (proteina capsidica minore). Questa regione rappresenta circa il 40% dell'intero DNA virale, e sono presenti le proteine strutturali del capsidico virale, capaci quindi di evocare risposta immunitaria da parte dell'ospite.

LCR (long-control-region): regione non codificante (cioè non possiede capacità trascrizionale autonoma) che rappresenta il 15% del genoma virale; è sede di interazione con fattori cellulari, per la modulazione della trascrizione di HPV (regione necessaria per la replicazione e per la trascrizione del genoma virale).

Il ciclo di replicazione virale è rigidamente modulato da alcune proteine virali ed avviene all'interno dello spessore epiteliale, sfruttando il processo di differenziazione e di maturazione dei cheratinociti. In questo senso il Papillomavirus è perfettamente adattato a utilizzare le potenzialità biologiche della struttura epiteliale (cutanea o mucosale) in cui penetra. Questa caratteristica, di fatto, ha reso difficoltose la coltura e la crescita in vitro dell'HPV.

Il virus si trasmette prevalentemente per via sessuale, penetra all'interno delle mucose attraverso micro-fenestrature o micro-abrasioni della cute o mucose, ed in particolare in alcune aree anatomiche favorevoli, come la Giunzione Squamo-Colonnare e l'area del vestibolo vulvare. L'HPV raggiunge quindi le cellule dello strato basale-parabasale. Questa è la parte più profonda dell'epitelio ove il virus, persa la parte proteica capsidica, penetra nel nucleo cellulare rimanendo in forma episomale (cioè in forma circolare, extra-cromosomica). Qui si replica lentamente, con un basso numero di copie (nell'ordine di 10-100 virus per cellula) ed esprime solo alcune proteine precoci (E1 ed E2). In altre parole, in questa fase non vi è, praticamente, sintesi di DNA virale e si assiste solo ad una modesta espressione di early-proteins. L'infezione, in questa sede, può rimanere silente come episoma per un periodo variabile da pochi mesi fino ad alcuni anni, in totale assenza di alterazioni cellulari o della struttura epiteliale. Peraltro, la scarsa immuno-sorveglianza in questa sede anatomica favorisce lo stato di latenza virale.

Inoltre, l'esiguo numero di copie virali rende difficile rilevarne la presenza anche ai più sensibili sistemi di riconoscimento. In altri termini, l'infezione latente si riferisce ad una condizione in cui in tessuti normali (sotto il profilo clinico, cito-istologico e colposcopico) il riconoscimento virale di sequenze di HPV-DNA avviene solo mediante metodiche di biologia molecolare.

Negli strati epiteliali medi il virus si replica attivamente dando luogo alla fase produttiva. Il passaggio dallo stato di latenza episomale a quello produttivo è favorito da una condizione di cosiddetta permissività cellulare. Qui si assiste alla penetrazione dell' HPV nel nucleo cellulare dove il suo DNA viene codificato per la sintesi dei messaggeri ed avviene la produzione delle proteine precoci. Questa fase (detta anche di replicazione vegetativa) è resa possibile dalla differenziazione cellulare, ed è caratterizzata da un'intensa espressione degli early-genes (E1a-E7), da un notevole aumento del numero delle copie (fino a 1000 virus per cellula ed oltre). A seguito di questi fenomeni biologici si manifestano marcate modifi-

cazioni strutturali in forma di proliferazione epiteliale ed accrescimento stromale con asse vascolare.

Negli strati più superficiali si esprimono compiutamente i late-genes (L1-L2) che producono le proteine strutturali del capsidico virale; questa fase è seguita dall'assemblamento del virus e dalla sua eliminazione (viral shedding) dalla superficie epiteliale con possibilità, quindi, di trasmissione della malattia.

Il carattere di infezione senza distruzione cellulare, cioè senza segnali di danno biologico per l'organismo, condiziona la modesta/assente componente infiammatoria che si traduce, a sua volta, in uno scarso coinvolgimento dell'immunità innata. Da qui, pertanto, uno degli elementi che caratterizzano la capacità del Papillomavirus di evadere il controllo immunologico dell'ospite.

STORIA NATURALE DELL'HPV: genotipi a basso-rischio e alto-rischio

L'infezione da HPV è considerata la più frequente delle malattie a trasmissione sessuale, quasi una "naturale conseguenza" dell'avere rapporti sessuali. I fattori di rischio per l'acquisizione dell'infezione sono rappresentati da: giovane età, numero di partner sessuali, età precoce al primo rapporto sessuale, abitudini sessuali del partner, fumo, contraccezione orale.

La probabilità nell'arco della vita di un contatto con l'HPV è stimata, sia per le donne che per gli uomini, nell'ordine del 70% circa, ma è assai probabile che sia ancor maggiore. Dati epidemiologici ampiamente confermati indicano che solo il 25% della popolazione sessualmente attiva ha, al momento dell'osservazione (in forma clinica o sub-clinica), o ha avuto nel passato, un contatto con il virus (4). Questo dato mette bene in evidenza quanto sia diffusa l'infezione da Papillomavirus e, quindi, il suo carattere universale.

I due elementi caratteristici della storia naturale dell'infezione da HPV sono rappresentati da:

1. alta prevalenza nelle coorti più giovani nelle quali si manifesta di solito con lesioni cliniche/subcliniche di basso-grad (LSIL, CIN1) caratterizzate, per lo più, dalla tendenza alla transitorietà ed all'eliminazione della carica virale (HPV clearance) (5);
2. possibilità di persistenza dell'infezione causata dai genotipi ad alto-rischio, con manifestazioni cliniche/subcliniche di lesioni di alto grado (HSIL, CIN2, CIN3) ed eventuale successivo innesco di una cascata di eventi che, in presenza di cofattori, conduce alla trasformazione carcinomatosa.

L'infezione tende ad avere il picco di prevalenza intorno ai 20-25 anni (15-25% delle giovani donne sessualmente attive), per poi diminuire progressivamente al 3-10% dopo i 30 anni. La maggior parte delle lesioni (sia dovute a genotipi di basso che di alto rischio) tende ad autolimitarsi spontaneamente (6) dopo un periodo di tempo variabile in relazione al genotipo virale (Tabella 2). Pertanto entro 18-24 mesi dall'esordio il 90% delle donne supera spontaneamente l'infezione (7, 8) in virtù dall'attivazione, dopo alcuni mesi, dei meccanismi immunitari cellulo-mediati (9). Rimane ancora da chiarire se la reazione immunitaria elimini completamente il virus o ne limiti la presenza ad un esiguo numero di copie.

Va infine segnalato un significativo rialzo della prevalenza in epoca post-menopausale di cui, al momento, si sta valutando il significato clinico (10, 11).

Le espressioni dell'infezione del Papillomavirus sono riconducibili a lesioni latenti, lesioni subcliniche (evidenziabili solo in colposcopia dopo applicazione di acido acetico) e lesioni cliniche (visibili ad occhio nudo).

Tabella 2 Clearance virale genotipo-specifica (8)

TIPO HPV	MEDIANA 95% IC Persistenza (mesi)	MEDIA 95% IC Persistenza (mesi)	% positivi al 1° anno (95% IC)
HPV 6	6.4 (4.9-7.8)	8.7 (6.8-10.6)	42 (19-65)
HPV 16	19.4 (11.2-27.5)	18.3 (12.9-23.7)	62 (46-78)
HPV 18	9.4 (4.8-14.0)	11.6 (8.8-14.4)	40 (15-65)
HPV 31	20.0 (13.4-23.6)	14.6 (11.0-18.1)	62 (35-89)
HPV 39	8.0 (5.8-10.1)	11.0 (7.0-14.9)	32 (3-61.9)
HPV 53	13.9 (11.1-16.8)	14.8 (11.4-18.3)	62 (41-83)
HPV HR any	16.6 (14.5-18.7)	17.4 (14.7-20.1)	61 (51-71)

Lo sviluppo di queste manifestazioni dipende da due ordini di macro-fattori che variamente interagiscono tra loro: quelli legati all'ospite (età, status immunocompetente, HLA, fumo di sigaretta, contraccezione orale (12) e quelli legati al virus: genotipi, varianti, carica virale, persistenza (7, 13).

Il genotipo virale è certamente il fattore virale di maggior rilevanza nella storia naturale dell'HPV. In base alle potenzialità trasformanti gli HPV sono classificati (14, 15) in tre gruppi:

1. alto rischio (high-risk, HR): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82;
2. rischio intermedio: 26, 53, 66;
3. basso rischio (low-risk, LR): 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108.

I genotipi a basso rischio non possiedono capacità trasformanti, cioè non hanno la possibilità di dar luogo a quella cascata di eventi biologici (in primo luogo l'integrazione nel genoma dell'ospite) necessari per lo sviluppo del cervicocarcinoma. Le oncoproteine espresse dalle regioni E6-E7 di questi genotipi hanno caratteristiche biologiche differenti da quelle dell'alto-rischio, tali cioè da non compromettere la stabilità genomica e l'integrità del ciclo cellulare dell'ospite. Va tuttavia sottolineato che le differenze biologiche tra le suindicate proteine E6 ed E7 sembrano essere più di natura quantitativa, piuttosto che qualitativa (16).

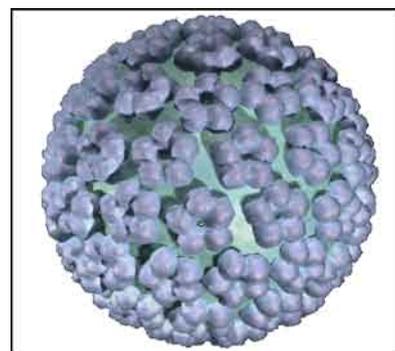
Le espressioni cliniche dei genotipi a basso rischio sono quindi ristrette a manifestazioni cliniche benigne, per lo più di tipo proliferativo, come la condilomatosi genitale (17) ed alla rara ma devastante (18, 19) papillomatosi respiratoria ricorrente (Jouvanile Recurrent Respiratory Laryngeal Papillomatosis, JORRP).

Benchè responsabili di oltre il 90% delle manifestazioni condilomatose l'HPV 6 e l'HPV 11 sono tuttavia presenti anche in rare condizioni a malignità borderline, come il condiloma di Buschke-Lowenstein (ora descritto come carcinoma verrucoso), nel 2-5% dei carcinomi vulvo-anali, e ancora più raramente in quelle forme di papillomatosi respiratorie ricorrenti che subiscono la trasformazione neoplastica (20). Quale sia il significato della presenza di genotipi a basso rischio in queste lesioni rimane ancora da stabilire.

I genotipi ad alto rischio svolgono un ruolo chiave nella oncogenesi cervicale, di cui ne rappresentano la causa necessaria (21). Poiché sono fortemente implicati in numerose altre neoplasie genitali ed extra-genitali, sia pure con una frazione di attribuzione inferiore rispetto alla sede cervicale, sono stati globalmente definiti come carcinogeni per la specie umana (Figura 2).

La persistenza dell'infezione da genotipi ad alto rischio è un punto centra-

Figura 2 Human Papillomavirus (elaborazione al computer)

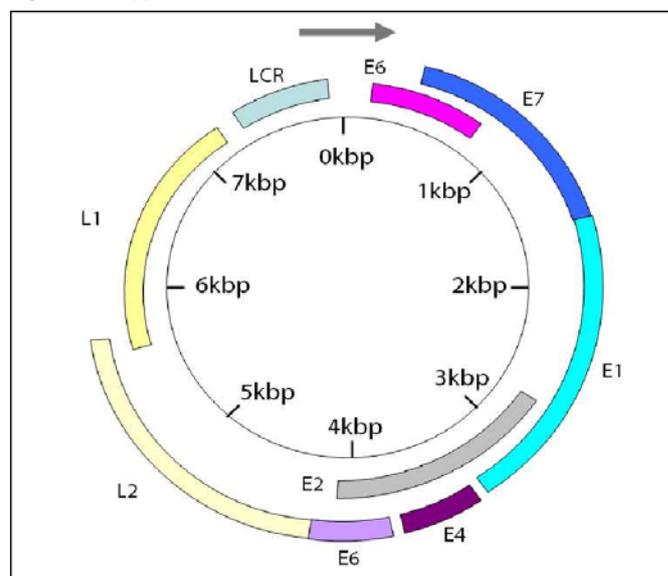


le nell'analisi degli eventi

che legano HPV alla genesi del cancro. La persistenza è definita come il riconoscimento dello stesso genotipo HPV nell'arco di 12-24 mesi, non riguarda più del 10% delle donne affette da infezione da HPV ad alto rischio, ma pone la donna ad un rischio 300 volte superiore di sviluppare una lesione intraepiteliale di alto-gradato (22). In altre parole, l'infezione persistente seppure rara, è però un momento indispensabile per la genesi quegli eventi biologici che portano alle lesioni di alto grado, cioè allo sviluppo e al mantenimento della lesione di alto-gradato (23, 24). E' quindi evidente che la persistenza virale rappresenta un rilevante indicatore di rischio nella popolazione generale: solo le donne che rimangono croniche portatrici di HPV-HR oltre l'età di 30-35 anni, infatti, sono descritte come il vero gruppo ad alto rischio per lo sviluppo del carcinoma della cervice (25-27). Va peraltro sottolineato che il concetto della persistenza sottintende quello del fattore tempo, che gioca un ruolo di primo piano nella genesi del cervicocarcinoma, poiché strettamente correlato con l'acquisizione di cofattori e con il manifestarsi di subentranti alterazioni dell'assetto biologico dell'epitelio infettato.

L'infezione da HPV ad alto-rischio è, in ultima analisi, lo start-point della carcinogenesi del carcinoma della cervice uterina. La storia naturale di quest'ultimo (Figura 3) è caratterizzata da una lunga fase preclinica caratterizzata dallo sviluppo delle lesioni intraepiteliali di alto-gradato, che rappresentano i veri precursori della malattia invasiva. Pur presentando caratteri cito-morfologici simili a quelli delle lesioni invasive, le lesioni

Figura 3: Rappresentazione del menoma virale



intraepiteliali cervicali non possiedono però alcuna potenzialità metastatica. In questo senso è utile, nell'analisi dell'interazione HPV-neoplasia cervicale, una considerazione storica sui precursori. La prima vera sistematizzazione delle lesioni preinvasive cervicali si deve a Reagan negli anni '50 (28) con la classificazione di displasia (lieve, moderata, grave) e carcinoma in situ. Una decina di anni dopo Richart (29) poneva le basi del concetto di "continuum patologico" in cui i precursori sono parte di un'unica entità (definita CIN, Neoplasia Intraepiteliale Cervicale), sottolineandone tutta la potenzialità evolutiva in senso neoplastico. Il sistema classificativo così unificato è suddiviso in tre gradi: CIN 1,2 e 3. Le tre categorie così articolate formano uno spettro unico di un evento patologico che, insorto come CIN1 e con spiccata tendenza alla regressione spontanea, ha tuttavia in sé la potenzialità di progredire a CIN2, a CIN3 per poi acquisire le caratteristiche del carcinoma invasivo (30).

Questa classificazione è stata ampiamente accettata dalla comunità scientifica per numerosi motivi, tra cui la visione unitaria ed organica di un'ampia gamma di eventi patologici, uniformità di linguaggio e quindi facilità di comunicazione, possibilità di utilizzo sia in ambito citologico che istologico. Tuttavia a partire dalla fine degli anni '80 sono state proprio le conoscenze in termini di infezione da HPV a modificare il concetto di "precursore", introducendo il sistema binario noto come the Bethesda System (TBS). La novità sostanziale di questo sistema classificativo citologico, modificato nel 1991 e nel 2001 (31, 32), sta nella definizione di due entità distinte, denominate rispettivamente: Lesione Squamosa Intraepiteliale (SIL) di basso-grado (Low-Grade SIL, LSIL) e Lesione Squamosa Intraepiteliale di alto-grado (High-Grade SIL, HSIL). Le due entità manifestano una differente evolutività e quindi una storia naturale caratterizzata da un diverso comportamento clinico. Quest'ultimo, a sua volta, è espressione rispettivamente della presenza di HPV ad alto o basso-rischio.

Le LSIL nella maggior parte dei casi (>80%) tendono a regredire spontaneamente e sono attribuibili ad entrambi i genotipi di HPV (alto e basso-rischio). Le lesioni di alto-grado, includono la CIN2 e la CIN3, sono associati nel 70% a virus ad alto-rischio (particolarmente 16 e 18) e manifestano un concreto potenziale di progressione, specie laddove è avviene l'integrazione nel genoma dell'ospite.

Sebbene il cervicocarcinoma rappresenti la seconda neoplasia femminile al mondo e la prima in assoluto nei Paesi in via di sviluppo, il numero di nuovi casi ogni anno in Europa è circoscritto a circa 25.000 (33) mentre nel mondo è nell'ordine di circa 400.000.

Pressoché in tutti i carcinomi della cervice uterina sono presenti frammenti di genoma virale integrato nel DNA dell'ospite (34). I genotipi 16 e 18 sono i più importanti sotto il profilo della carcinogenesi cervicale, poiché identificati nel 70% dei tumori squamosi (rispettivamente nel 60% dei casi l'HPV 16 e nel 10% l'HPV 18), seppure con alcune differenze geografiche (14, 15, 35-38). L'adenocarcinoma della cervice uterina merita una trattazione a parte rispetto alla forma squamosa. Rappresenta circa il 10-15% dei tumori invasivi della portio e, a dispetto dei programmi di screening, è in costante. In USA nel periodo 1973-1996 (39) gli istotipi ghiandolari sono quasi raddoppiati rispetto agli squamocellulari, specie nella popolazione di colore (40), rappresentando circa il 20% delle neoplasie cervicali.

La frazione attribuibile ai sottotipi 16 e 18 è globalmente dell'ordine dell'86% (41), senza consistenti differenze geografiche e con una maggior compartecipazione relativa del 18 rispetto alle forme squamose. In termini di rischio per l'adenocarcinoma, all'infezione da HPV 18 corrisponde un odd-ratio pari a 410, decisamente superiore rispetto all'HPV-16 (OR=164) (41). L'aumento di questa neoplasia, di cui rimane difficile un'esauriente interpretazione, potrebbe essere riferito ad una minor efficacia dello screening citologico nell'identificare le lesioni pre-tumoriali

ghiandolari indovate all'interno del canale cervicale. Non va dimenticato, infatti, che la maggior parte di questi istotipi viene rilevata nei Paesi con la più bassa incidenza di istotipi squamosi, cioè laddove si pratica un'efficace screening citologico (42). Peraltro anche il ruolo svolto dai cofattori nella genesi di questa neoplasia, come il fumo e la parità, sembra essere meno rilevante rispetto agli istotipi squamosi (43). Comunque sia, l'alta attribuzione ai genotipi 16 e 18 delle forme ghiandolari (86%) consente di ipotizzare un beneficio post-vaccinale superiore a quanto atteso per il carcinoma squamocellulare (70%).

La "sproporzione" numerica tra infezione da HPV ed evento neoplastico sta a testimoniare che il cancro della cervice uterina è una rara conseguenza di un'infezione persistente da parte di alcuni genotipi virali (35). Di questa affermazione e del concetto biologico che la sostiene sono evidenti non solo le implicazioni cliniche, ma anche quelle di ordine psicologico. Il ginecologo è infatti spesso chiamato a rassicurare la donna sull'estrema diffusione del contatto col virus, e su come questo non si identifichi affatto con l'insorgenza del cervicocarcinoma. Solo una minima parte delle infezioni da HPV, infatti, è associata alla trasformazione carcinomatosa. La "rarietà" della trasformazione carcinomatosa, trova le seguenti spiegazioni:

- l'infezione da HPV è transitoria nella grandissima parte dei casi (virus ad alto-rischio compresi) e si risolve spontaneamente in 12-24 mesi con una clearance virale;
- le lesioni di alto grado (CIN2 e CIN3) sono quasi sempre oggetto di terapia fisica (LEEP, conizzazione, laser-vaporizzazione), che ne interrompe pertanto la storia naturale e la possibile evoluzione verso il carcinoma;
- le capacità trasformanti delle oncoproteine virali sono limitate all'infezione persistente dei 15 sottotipi ad alto-rischio e dei 3 probabilmente a rischio e quindi alla successiva integrazione col genoma dell'ospite;
- esistono differenze prognostiche tra le numerose varianti virali all'interno del gruppo ad alto-rischio;
- è probabilmente necessario il mantenimento di alte cariche virali nel tempo;
- è certamente necessaria la presenza di cofattori che accelerano/agevolano i processi di cancerogenesi (alta parità, fumo di sigaretta, altre MTS, contraccezione orale) e alcuni eventi epigenetici, come la iper/ipometilazione.

LA CARCINOGENESI CERVICALE

Il processo della carcinogenesi cervicale si sviluppa secondo un modello multifasico-plurifattoriale strettamente legato all'infezione persistente da HPV ad alto rischio (di cui rappresenta la sua causa necessaria ma non sufficiente) e capace di originare un evento neoplastico monoclonale.

Gli elementi principali su cui si basa il rapporto causale sono:

- evidenze cliniche a sovrapposizione dei fattori di rischio e della storia naturale dell'HPV e della CIN
- conferme epidemiologiche alle evidenze sopra esposte;
- verifiche biologiche a costante presenza di HPV-DNA (pressoché il 100%), con dimostrazione dell'espressione delle oncoproteine (E6-E7) nella totalità dei carcinomi della portio.

La comprensione dei meccanismi implicati in questo processo obbliga

ad affrontare tre argomenti nei quali elementi di biologia e virologia si intrecciano strettamente con i dati della clinica: la capacità trasformante dell'HPV; la suscettibilità dell'epitelio cervicale; la presenza di variabili associate e cofattori.

CAPACITA' TRASFORMANTE DELL'HPV

La differenza tra i tipi virali a basso e ad alto rischio sta nella capacità di questi ultimi di interagire con i componenti del ciclo cellulare ed i meccanismi ad esso correlati. Un punto critico di differenza tra i due tipi di virus è la capacità di integrarsi col genoma dell'ospite e di dare origine ad un evento monoclonale caratterizzato da una destabilizzazione genomica (21, 35). I genotipi ad alto-rischio manifestano le potenzialità carcinogenetiche non solo nei confronti della cervice uterina, ma anche in altri tumori, seppure in proporzioni diverse (42). L'HPV è associato al 60% dei carcinomi vaginali; al 40-60% dei carcinomi vulvari (44); al 45%-95% dei carcinomi anali (14, 15); al 30% dei carcinomi della testa e del collo (10, 45).

Il percorso patogenetico vede la presenza di un'infezione persistente da HPV ad alto rischio che agisce sull'epitelio metaplasico della zona di trasformazione, dando origine ad una lesione intraepiteliale. L'integrazione del DNA virale in quello dell'ospite, che avviene nelle regioni genomiche E1-E2, e la successiva overespressione di E6 ed E7, con conseguente interazione con p53 e pRB, determinano la selezione di un clone atipico. La successiva evoluzione di questo clone è modulata dalla presenza di alcuni cofattori, in particolare il fumo di sigaretta e dalla risposta immunitaria locale.

Nel dettaglio, le capacità carcinogenetiche degli HPV ad alto rischio sono legate all'azione delle proteine virali E6 ed E7 su alcuni geni oncosoppressori: p53 e pRB. L'azione su queste proteine si manifesta dopo l'avvenuta integrazione del genoma virale in quello dell'ospite.

p53 e pRB sono indispensabili per mantenere il controllo sul ciclo cellulare e sull'integrità dei meccanismi di eliminazione di cloni alterati, cioè dell'apoptosi. A seguito dell'integrazione del genoma virale in quello dell'ospite (e la perdita della funzione di controllo della regione E2) la proteina E7 si lega alla pRB inattivandola, mentre

la proteina E6 determina una degradazione del p53. Questi eventi, a loro volta, determinano un intenso ed incontrollato stimolo proliferativo, la diminuzione dei meccanismi di controllo e di sorveglianza cellulare, con conseguente accumulo delle anomalie genetiche, aumento dell'instabilità genomica e comparsa di aneuploidia.

SUSCETTIBILITA' DELL'EPITELIO CERVICALE

Il carcinoma della cervice uterina origina a livello della giunzione squamo-colonnare (GSC), cioè nel punto di incontro tra due epitelii nativi: l'epitelio squamocellulare pluristratificato che riveste l'escervice e l'epitelio cilindrico monostratificato muciparo che riveste l'endocervice. La GSC mostra numerose e sensibili variazioni dinamiche, potendo fluttuare in occasione di alcuni momenti della vita: fase premenarcale, gravidanza, menopausa. In epoca fertile la GSC si trova in corrispondenza dell'orificio uterino esterno ed è pertanto facilmente valutabile con la colposcopia. Come tutte le linee di contatto inter-epiteliali, anche in questa sede si assiste ad un elevato turn-over cellulare e si manifestano continui rimodellamenti della struttura epiteliale. Tra questi il più importante, sotto il profilo della oncogenesi cervicale, è quello della metaplasia. Questa viene definita come un processo fisiologico attraverso il quale un fenotipo epiteliale si trasforma in un altro. Il processo metaplasico ha l'obiettivo di trasformare l'epitelio colonnare muciparo monostratificato in posizione ectopica (per sostituzione o per copertura) in epitelio squamoso pluristratificato, riportando il quadro anatomo-fisiologico della cervice uterina alla normalità. Il fenomeno dell'ectopia avviene in coincidenza con le grandi ondate estrogeniche (fase post-menarcale, gravidanza), durante le quali si attiva, contemporaneamente, anche il processo di metaplasia squamosa. Sono proprio l'alto tenore estrogenico con maturazione dell'epitelio, l'accumulo di glicogeno e lo sviluppo della flora lattobacillare ad attivare (attraverso l'acidificazione del pH vaginale) il processo metaplasico.

Quest'ultimo è caratterizzato dalla proliferazione delle cellule indifferenziate (cellule di riserva subcolonnari), che gradualmente si differenziano e maturano in epitelio squamoso. Si tratta di un fenomeno fisiologico multifocale modulato, come già ricordato, dalle condizio-

ni del microambiente vaginale (pH, traumatismi, flogosi), colposcopicamente valutabile nelle sue varie fasi, che ha lo scopo di sostituire l'epitelio ghiandolare ectopico con l'epitelio squamoso. L'area anatomica in cui avvengono i processi di metaplasia, e quindi di sostituzione o trasformazione dell'epitelio cilindrico in squamoso, viene definita Zona di Trasformazione (ZT).

Nel normale processo metaplasico si porta a compimento sia la differenziazione sia la maturazione cellulare che, attraverso lingue epiteliali centripete, coprirà l'epitelio cilindrico con uno squamoso del tutto simile a quello nativo. Le fasi iniziali di questo processo, in cui si manifesta un elevato turn-over

Figura 4: Storia naturale dell'HPV alto-rischio ed integrazione di carcinogenesi (35)

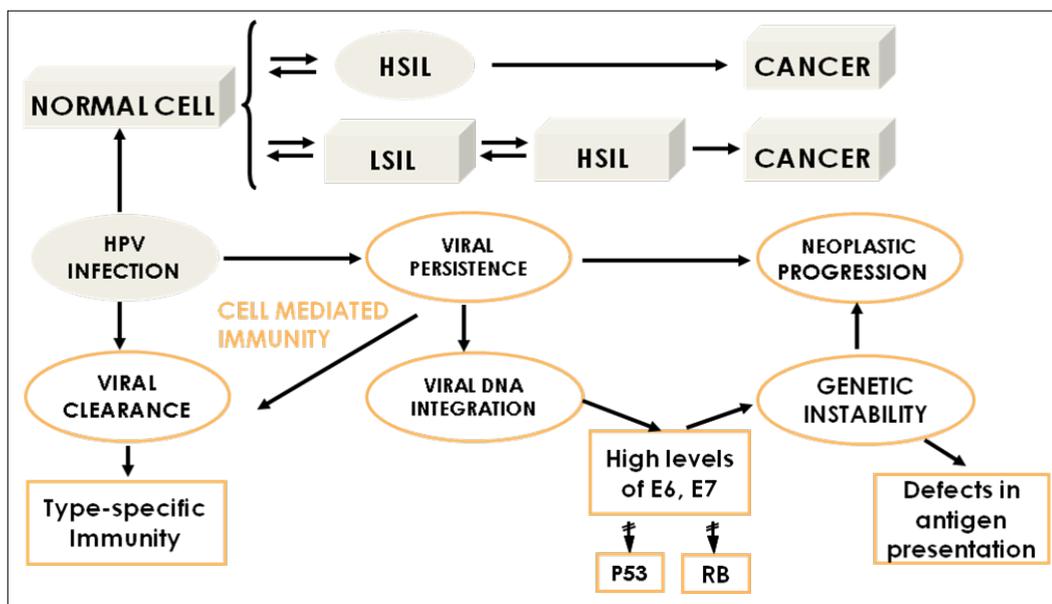
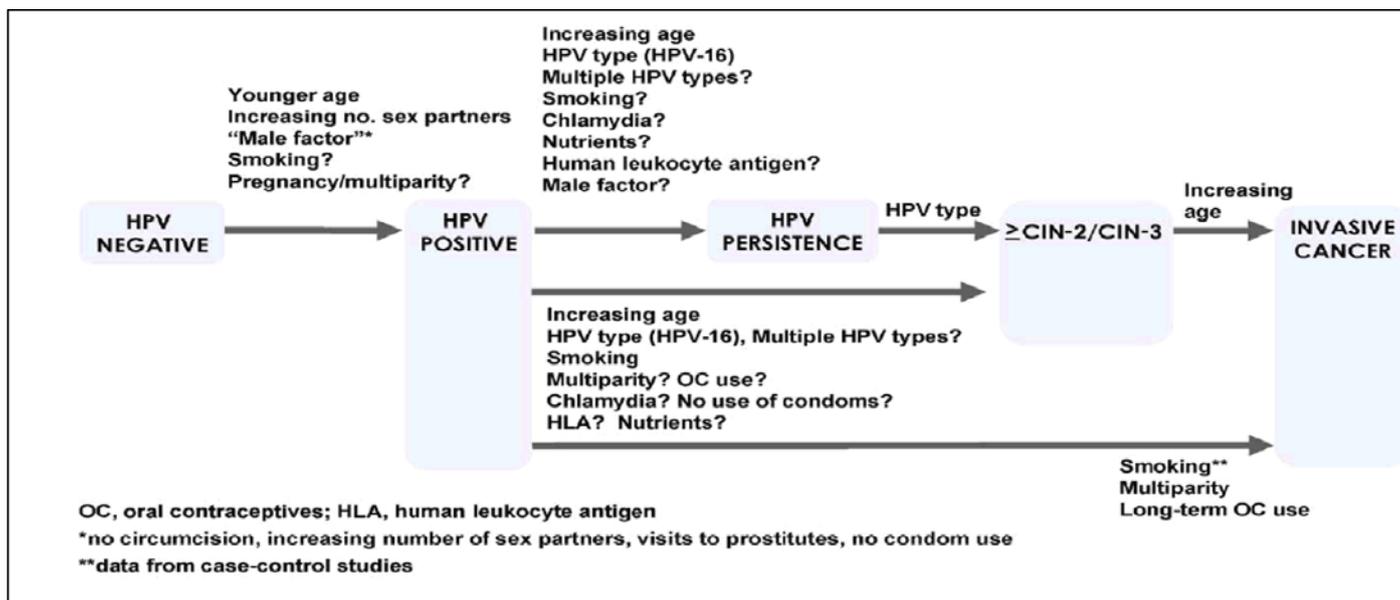


Figura 5 Fattori e cofattori nella genesi del cancro della cervice uterina (25)



cellulare, sono quelle probabilmente a maggior suscettibilità nei confronti dei genotipi virali ad alto-rischio (27). Al pari della giunzione squamo-colonnare della cervice uterina, altre zone anatomiche in cui si manifesta il processo metaplastico sono rappresentate dall'area anale e da quella tonsillare, e che possono quindi risultare analogamente suscettibili all'infezione da HPV.

Il primo segno dell'interazione dell'HPV sull'epitelio metaplastico darebbe origine a quello che è stata definita come iperplasia atipica delle cellule di riserva. La persistenza dell'infezione, i fenomeni di biologia virale descritti in precedenza, il grado di immunocompetenza, la partecipazione di altri cofattori, possono condizionare l'ulteriore progressione di questa iniziale entità patologica in quadri francamente displastici.

VARIABILI ASSOCIATE

Il ruolo dei cofattori nell'oncogenesi cervicale è tutt'altro che trascurabile (7, 14, 15, 46). Se, infatti, l'HPV è la causa centrale e necessaria del carcinoma della cervice, non è però sufficiente, poiché non tutte le donne infettate con HPV oncogeni sviluppano un carcinoma invasivo. È quindi del tutto verosimile che fattori addizionali (Figura 5) agiscano in sinergia con HPV in una qualche fase, iniziale o tardiva, della carcinogenesi. Al momento, tuttavia, non è ben chiaro quali siano nel dettaglio questi fattori e, soprattutto, quale sia la sequenza degli eventi extra-virali che contribuiscono all'insorgenza e alla crescita del cervicocarcinoma. I cofattori possono modulare l'acquisizione dell'HPV, o aumentare il rischio della persistenza dell'infezione, ovvero innescare cascate di processi favorevoli la progressione verso la malattia di alto grado e il cancro invasivo.

Per definizione il termine cofattore deve essere assegnato a quelle variabili il cui impatto sulla malattia è evidente solo nelle donne in cui sia presente la causa necessaria, cioè nelle HPV-positivo. In quest'ultima è stato riportato, sebbene con alcuni risultati conflittuali, un ulteriore aumento del rischio per:

1. elevata parità (\geq sette gravidanze); i motivi biologici dell'aumentato rischio risiederebbero nel mantenimento della zona di trasformazione a livello esocervicale, facilitando l'esposizione all'HPV (47);
2. fumo di tabacco; nei fumatori attuali il rischio relativo è pari a 1.60, aumenta con l'aumentare del numero di sigarette per giorno (sino a 1.98 per oltre 15/giorno) e tende a diminuire negli ex-fumatori (RR= 1.12); viene chiamata in causa un'azione immunodepressiva esercitata dai metaboliti della nicotina nel muco cervicale (48);
3. uso prolungato dei contraccettivi orali (\geq 5 anni), probabilmente per un effetto di amplificazione dell'espressione dei geni virali attraverso un meccanismo legato ai recettori del progesterone (49); il rischio tende a diminuire lentamente dopo la cessazione dell'utilizzo (50).
4. Immunodepressione; nelle pazienti affette da infezione da HIV aumenta il rischio di insorgenza di carcinomi ano-genitali HPV-correlati a causa della immunodeficienza indotta dall'HIV (51); il rischio è strettamente legato alla conta dei CD4 T-linfociti
5. altre MST; la sieropositività da HSV-2 e l'infezione da Chlamydia trachomatis sono significativamente associate, nelle donne HPV-positivo, ad un aumentato rischio di cancro della cervice: OR rispettivamente di 2.2 e 1.8. L'aumentato rischio potrebbe derivare dall'effetto della risposta infiammatoria a queste infezioni, responsabile di un aumento dei radicali liberi che esplicano un'azione negativa sulla stabilità genomica dell'epitelio cervicale (52).

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization; 2001. Available at: <http://www.who.int/vaccines/en/hpvrd/shtml>.
2. World Health Organization. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003: 1-74
3. Schiller J & Davies P. Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Apr; 2(4): 343-7
4. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997 May 5; 102(5A): 3-8. Review
5. Moscicki A et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet.* 2004 Nov 6-12; 364(9446): 1678-83
6. Meijer C et al. HPV typing and testing in gynaecological pathology: has the time come? *Histopathology.* 1998 Jul; 33(1): 83-6
7. Ho GY, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New England Journal of Medicine.* 1998, 338: 423-28
8. Trottier H, Franco E. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 1:S1-15
9. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* Sep 19 2005
10. Herrero R et al. Design and methods of a population-based natural history study of cervical neoplasia in a rural province of Costa Rica: the Guanacaste Project. *Rev Panam Salud Publica.* 1997 May; 1(5): 362-75
11. Sellors J et al. Prevalence of infection with carcinogenic human papillomavirus among older women. *Canadian Medical Association Journal.* 2002 Oct 15; 167(8): 871-3
12. Schiffman MH. New epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87: 132-34
13. Ho GYF et al. Persistent genital human papillomavirus infections as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87: 1365-71
14. Munoz N, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 518-27
15. Munoz, N et al. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24S3 (2006) S3/1-S3/10
16. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 362-72
17. Munk C et al. History of genital warts in 10,838 women 20 to 29 years of age from the general population. Risk factors and association with Papanicolaou smear history. *Sex Transm Dis* 1997; 24(10): 567-72
18. Silverberg MJ, et al. Clinical course of recurrent respiratory papillomatosis in Danish children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 711-16
19. Silverberg MJ et al. The impact of HIV infection and immunodeficiency on human papillomavirus type 6 or 11 infection and on genital warts. *Sex Transm Dis* 2002; 29(8): 427-35
20. Lacey C. et al Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease *Vaccine* 24S3 (2006) S3/35-S3/41
21. Zur Hausen H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-50
22. Bory JP et al. Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Int J Cancer,* 2002; 102: 519-25
23. Nobbenhuis MAE et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354: 20-5
24. Pagliusi SR, Aguado T. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine* 2004; 23: 569-78
25. Moscicki AB et al. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr.* 1998; 132(2): 277-84
26. Kjaer et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based. *BMJ* 2002 Sep 14; 325(7364): 572
27. Khan MJ et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(14): 1072-9
28. Reagan JW. The cellular pathology in carcinoma in situ. *Cancer* 1956; 9: 385-402
29. Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1967; 10: 748-84
30. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 186-92
31. National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *JAMA* 1989; 262: 931-34
32. National Cancer Institute. The 2001 Bethesda system. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287: 2114-19
33. Black RJ et al. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990 *Eur J Cancer.* 1997; 33: 1075-107
34. Walboomers JM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep; 189(1): 12-9
35. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65
36. Clifford GM et al. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89(1): 101-5
37. Clifford GM et al for the IARC HPV Prevalence Surveys Study Group* Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; 366: 991-98
38. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW et al. Multiple high risk HPV infection are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 2004; 57: 68-72
39. Smith HO et al. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States: a 24-year population based study. *Gynecol Oncol* 2000; 78: 97-105
40. Wang SS, et al. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. *Cancer* 2004 (Mar 1); 100(5): 1035-44
41. Castellsaguè X, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Mar 1; 98(5): 303-15

42. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB, editors. *Cancer incidence in five continents, vol. VIII*. Lyon: IARC Scientific Publications No. 155 IARC; 2002.
43. Berrington DG et al. Comparison of risk factors for squamous cell and adenocarcinomas of the cervix: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2004; 90: 1787-91
44. Srodon M et al. The distribution of low and high-risk HPV types in vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia (VIN, VaIN). *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 151-58
45. Kreimer AR et al. Human Papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 467-75
46. Vaccarella S et al. Reproductive factors oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15: 48-53
47. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: Collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006 Nov 27
48. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006; 118: 1481-95
49. Coglianò V et al. Carcinogenicity of combined oestrogen-progestagen contraceptives and menopausal treatment. *Lancet Oncol* 2005; 6: 552-3
50. Smith JS et al. Cervical cancer and the use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003; 361: 1159-67
51. Palefsky JM and Holly EA. Chapter 6: Immunosuppression and coinfection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 41-6
51. Castle PE and Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients—assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 29-34