

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

# **Giza papilomabirusa eta umetoki lepoko minbizia: aldakortasun genetikoa, biomarkatzaileak eta epidemiologia**

---

Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila

*DOKTORETZA-TESIA*

**NEREA FONTECHA URCELAY**

**Leioa, 2015**



Orain doktoretza tesia bukatzen ari naizela lagundu egin didaten guztiei eskertu nahi nieke. Lehenik eta behin Euskal Herriko Unibertsitateko Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Sailari eskertu nahi nioke eta sail honen zuzendaria denari, Ramón Cisterna Cancer, lan hau egiteko aukera eman izanagatik.

Eskerrak eman nahi nizkioke Miren Basaraseri, bera gabe ezineskoa izango zen lan hau egitea eta bukatzea. Eskerrik asko zure konfidantzagatik eta zure laguntzagatik. Era berean Elixabete Arreseri eskertu nahi nioke bere laguntza eta sostenguagatik. UPV/EHUko Zientzia eta Teknologia Fakultatearen DNA sekuentziazio zerbitzuari (SGIker), bereziki Irati Miguel doktoreari. Basurtuko Unibertsitate Ospitaleko Mikrobiologia Klinikoko eta Infekzioaren kontroleko eta Ginekologia eta Obstetrizia departamentuei, bereziki Silvia Hernaez doktoreari bere kolaborazio aktiboagatik. Baita ere nire alboan egon direnei eta lan honetan ez etsitzera lagundu didatenei, Sara, bere sostenguagatik eta, nahiz eta urrun egon, bere laguntza eskuzabalagatik eta Miren, Olatz, Albert, Asier eta bestelako adiskideei. Baita ere nire lehengusuari Urtzi, beti laguntzeko prest egoteagatik.

Nola ez nire familia eta lagunei eskertu nahi nieke lan honen bitartean izan ditudan momentu on zein txarretan nire alboan egoteagatik, batez ere, nire amari, aitari, nire ahiztari, Nagore, nire koinatuari, Mikel eta, nola ez, nire bi ilobei, Laida eta Jare.

Gainera, eskerrak eman nahi nizkioke Eusko Jaurlaritzako Industria Departamentuari (S-PC11BF002 proiektuak – SAIOTEK) eta Osasun Departamentuari (proiektu zenbakia 2008111058) eta Euskal Herriko Unibertsitateari (EHU13/04) lan hau partzialki finantziateagatik. Era berean, eskerrak eman nizkioke Euskal Herriko Unibertsitateari nire Ikerlari kontratua finantziatu izanagatik (PIC 73/14).







# Aurkibidea

<b>LABURDURAK</b>	5
<b>1. SARRERA</b>	11
1.1. GIZA PAPILOMABIRUSAREN MUGARRI HISTORIKOAK	13
1.2. GIZA PAPILOMABIRUSAREN EZAUGARRIAK	15
1.2.1. Birusaren egitura eta bere geneen funtzioak	15
1.2.2. Erreplikazio-zikloa	17
1.2.3. Aldakortasun genomikoa	19
1.2.4. Epidemiologia	22
1.3. GIZA PAPILOMABIRUSAREN INFEKZIOA	25
1.3.1. Historia naturala	25
1.3.2. Infekzio motak	26
1.3.3. Onkogenesi prozesua	27
1.3.4. Umetoki lepoko minbiziaren prebalentzia eta hilkortasuna	28
1.4. GIZA PAPILOMABIRUSAREN DETEKZIORAKO METODOAK	31
1.4.1. Papanicolaouren proba edo zitologia baginala	31
1.4.2. DNAn oinarritutako detekzio metodoak	34
1.4.2.1. Hibrido harrapaketa proba (HC2)	34
1.4.2.2. Cobas HPV	34
1.4.2.3. Linear Array	35
1.4.2.4. CLART	35
1.4.2.5. Amplicor	35
1.4.2.6. Abbott RealTime High Risk HPV testa	36
1.4.2.7. Aldaera intratipikoen analisisa	36
1.4.2.8. Sekuentziazio masiboa	38
1.5. BIOMARKATZAILEAK	39
1.6. TRATAMENDUA ETA PREBENTZIOA	41
1.6.1. Lesioen aurkako tratamendua	41
1.6.2. Prebentzioa	42
1.6.2.1. Txertoak	42
1.6.2.2. Populazioa-bahetzea	45
<b>2. HELBURUAK</b>	49
<b>3. METODOLOGIA</b>	53

3.1. POPULAZIO BAHEKETA BILBOKO BASURTUKO UNIBERTSITATE OSPITALEAREN ALDEAN	55
3.1.1. Laginak	55
3.1.2. Cobas HPV Testa	55
3.1.3. DNA genomikoaren erauzketa	55
3.1.4. HPV-16aren anplifikazioa eta sekuentziazioa	56
3.1.5. Aldaera intratipikoak, birkonbinazioa eta zuhaitz filogenetikoak	57
3.2. HPV-16 GENOTIPOAREN ALDAERA INTRATIPIKOEN DETERMINAZIOA	59
3.2.1. Laginak	59
3.2.2. Linear Array testa	59
3.2.3. DNA genomikoaren erauzketa	60
3.2.4. Anplifikazioa eta sekuentziazioa	60
3.2.5. Aldaera intratipikoak, birkonbinazioa eta zuhaitz filogenetikoak	60
3.2.6. Adinarekin eta lesioen korrelazioa HPV-16 aldaerekin	61
3.3. E6/E7 mRNA BIOMARKATZAILEAREN AZTERKETA	62
3.3.1. E6/E7 mRNA biomarkatzailearen eraginkortasunaren azterketa	62
3.3.1.1. Laginak	62
3.3.1.2. Genotipoen determinazioa	62
3.3.1.3. RNAREN erauzketa	62
3.3.1.4. Onkogeneen detekzioa	63
3.3.2. RNAREN erauzketarako metodoen garrantzia	64
3.3.2.1. Laginak	64
3.3.2.2. Genotipoen determinazioa	65
3.3.2.3. RNA erauzketa metodoak	65
3.3.2.4. Onkogeneen detekzioa	65
3.3.2.5. Diseinu esperimentalak	66
3.3.2.6. Datuen analisisa	66
<b>4. EMAITZAK</b>	67
4.1. POPULAZIO BAHEKETA BILBOKO BASURTUKO UNIBERTSITATE OSPITALEAREN ALDEAN	69
4.2. HPV-16 GENOTIPOAREN ALDAERA INTRATIPIKOEN DETERMINAZIOA	72
4.2.1. HPV-16aren aldaera intratipikoak HPV infekzio anitzetan	72
4.2.1.1. Aldakortasun genetikoa	72
4.2.1.2. Analisi filogenetikoa eta birkonbinazioa	77
4.2.1.3. Adinaren eta lesioen erkaketa aldaera intratipikoekin	82



4.2.2. Aldaera intratipikoen erkaketa HPV-16aren infekzio anitzen eta banako infekzioen artean	83
4.2.2.1. Aldaera intratipikoen eta lesioen azterketa infekzio motaren arabera	83
4.2.2.2. Adinaren azterketa: aldaera intratipikoen, patologiaren eta infekzio motaren arabera	85
4.2.2.3. Aldakortasun genetikoa	86
4.2.2.4. Aminoazidoen aldaketa eta lesio mota	90
4.2.2.5. Analisi filogenetikoa eta birkonbinazioa	92
4.3. E6/E7 mRNA BIOMARKATZAILEAREN AZTERKETA	97
4.3.1. E6/E7 mRNA biomarkatzailearen eraginkortasunaren azterketa	97
4.3.1.1. mRNA adierazpena behin aztertutako emakumeetan	97
4.3.1.2. mRNA adierazpena birritan aztertutako emakumeetan	101
4.3.2. RNA erauzketa metodoen garrantzia	104
4.3.2.1. mRNA positibotasun ratioa eta genotipo desberdinen adierazpena	104
4.3.2.2. Onkogeneen adierazpenaren eta emakumeen patologia	105
4.3.2.3. Patologiaren eboluzioa	106
4.3.2.4. bioMérieux eta Roche RNA erauzketa metodoen arteko konparaketa	107
<b>5. EZTABAIDA</b>	111
5.1. POPULAZIO BAHEKETA BILBOKO BASURTUKO UNIBERTSITATE OSPITALEAREN ALDEAN	114
5.2. HPV-16 GENOTIPOAREN ALDAERA INTRATIPIKOEN DETERMINAZIOA	116
5.3. E6/E7 mRNA BIOMARKATZAILEAREN AZTERKETA	120
<b>6. ONDORIOAK</b>	127
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	131



## ***LABURDURAK***

---



**AAHS** - *Amorphous Aluminum Hydroxyphosphate Sulfate*; aluminioko hidroxifosfato sulfato amorfoa

**AEB** – Ameriketako Estatu Batuak

**AGC-neoplastic** - *Atypical Glandular Cells, suspicious for cancer*; Zelula neoplasiko posibleak izan daitezkeen ezohiko zelula glandularrak

**AGC-NOS** - *Atypical Glandular Cells not otherwise specified*; Esanahi zalantzarrikoko ezohiko zelula glandularrak

**AMV** - *Avian myeloblastosis virus*; hegaztien mieloblastosis birusa

**ASC**- *Atypical squamous cells*; ezohiko zelula ezkatadunak

**ASCUS** - *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*; esanahi zalantzarrikoko ezohiko zelula ezkatadunak

**BLAST** - *Basic Local Alignment Search Tool*

**CIN** - *Cervical Intraepithelial Neoplasia*; neoplasia zerbikal intraepiteliala

**CIN1** - *Cervical intraepithelial neoplasia grade 1*; 1. graduko neoplasia zerbikal intraepiteliala

**CIN2** - *Cervical intraepithelial neoplasia grade 2*; 2. graduko neoplasia zerbikal intraepiteliala

**CIN3** - *Cervical intraepithelial neoplasia grade 3*; 3. graduko neoplasia zerbikal intraepiteliala

**EMA** - *European Medicines Agency*; Europako Medikamendu Agentzia

**FDA** - *Food and Drug Agency*; Elikagai eta Medikamentu Agentzia

**GIB** - *Giza Immunoeskasiaren Birusa*

**HC2** - *Hybrid Capture 2 Test*; Hibrido harrapaketa proba

**HPV** - *Human Papillomavirus*; Giza papilomabirusa

**HR-HPV** - *High Risk HPV*; arrisku altuko HPVak

**HSIL** - *High-grade squamous intraepithelial lesion*; gradu altuko lesio ezkatadun intraepiteliala

**IARC** - *International Agency for Research on Cancer*; Minbiziaren ikerketarako nazioarteko agentzia

**LCR** - *Long Control Region*; kontrol eskualde luzea

**LR-HPV** – *Low Risk HPV*; arrisku baxuko HPVak

**LSIL** - *Low grade squamous intraepithelial lesion*; gradu baxuko lesio ezkatadun intraepiteliala

**MMLV** - *Moloney Murine Leukemia Virus*; Moloney murina leuzemia birusa

**MOE** - Munduko Osasun Erakundea

**NASBA** – *nucleic acid sequence-based amplification*; azido nukleikoen sekuentzian oinarritutako anplifikazioa

**NCI** - *National Cancer Institute*; Estatu Batuetako minbiaren nazio-institutoa

**NGS** - *Next-generation sequencing*; hurrengo belaunaldiko sekuentziazioa

**NPV** - *Negative predictive value*; balio prediktibo negatiboa

**ORF** - *Open Reading Factor*; irakurmen zabaleko gunek

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction*; Polimerasaren kate erreakzioa

**pHR-HPV** – *probable High Risk HPV*; arrisku altu posibleko HPVak

**PPV** - *Positive predictive value*; balio prediktibo positiboa

**PV** - *Papillomavirus*; Papilomabirusa

**STI** - Sexu bidez transmitituriko infekzioa

**TMA** - *Transcription-mediated amplification*; transkripzio-bitarteko anplifikazioa

**VLP** – *Virus Like Particles*; birusaren antzeko partikulak





## ***1. SARRERA***

---



## 1.1. GIZA PAPILOMABIRUSAREN MUGARRI HISTORIKOAK

Jadanik Kristo aurreko 400. urtean Hipokratesek garatxoak deskribatu zituen. Geroago Erromatarrek “pikuak” esaten zieten uzki alboko zonaldean agertzen ziren lesio kondilomatosoi (1, 2). Hala ere, 1842. urterarte umetoki lepoko minbizi agerpenaren eta sexu-harremanen arteko erlazio posiblea ez zen iradoki. Hau Rigoni Stern medikuak iradoki zuen (2, 3).

XX. mendean biologia molekularren garapenarekin batera hainbat aurrerakuntza eman ziren Giza papilomavirusaren (HPV - Human Papillomavirus) inguruan. 1933. urtean lehen papilomavirusa (PV- Papillomavirus) identifikatu zen kottoi- buztaneko untxietan. Ondoren 1949. urtean, mikroskopia elektronikoaren bidez, birusa garatxoetan zegoela ikusi zen. 1975. urtean zur Hausenek umetoki lepoko minbizia HPVak sortzen zuela proposatu zuen. 1983 eta 1984 urteetan HPV-16 eta HPV-18 genotipoak identifikatu ziren. Bi genotipo hauek, gaur egun dakigun moduan, genotiporik onkogenikoenak dira. 1989. urtean umetoki lepoko minbizian transkripzio birala desberdina zela antzeman zuten. 2000. urtetik aurrera epidemiologia molekularren garapenarekin batera *Papillomaviridae* familia desberdin bat bezala sailkatu zen (4). Lehenago, papilomavirusak, poliomavirusekin batera, *Papovaviridae* familiaren barnean sailkatzen ziren (5); hala ere, papilomavirusen genomen sekuentziazioarekin, nahiz eta antzeko antolaketa genetikoa izan, beraien transkripzioa desberdina zela ikusi zen: noranzko bakarreako papilomavirusetan eta bidirekzionala poliomavirusetan, beraz, birusen Nazioarteko Taxonomia Batzordeak papilomavirusak familia desberdina izan behar zuela erabaki zuen, *Papillomaviridae* izendatua (6).

HPV detekzio teknikei dagokionez azken 100 urteetan hainbat aurrerapen egin dira. 1925. urtean kolposkopia asmatu zen. Geroago, 1942. urtean Papanicolaouren proba edo zitologia baginala asmatu zen. Hurrengo hamarkadan sekuentziazio metodoak eta PCRa (Polymerase Chain Reaction) garatu ziren. Teknika hauek HPV genomen sekuentziazioa eta HPV aldaera intratipikoen identifikazioa ahalbidetu zuten (4).

HPVaren epidemiologiaren inguruan 1990. urtetik aurrera hainbat aurkikuntza egin ziren. 1992. urtean arrisku altuko HPV genotipoen (HR-HPV) infekzioa umetoki lepoko minbizia pairatzeko arrisku faktorea zela antzeman zuten. Hurrengo urtean giza papilomavirusaren 16 genotipoaren aldaera intratipikoak deskribatu ziren. 1995. urtean IARC agentziak (International Agency for Research on Cancer) gizakiontzat agente kartzinogenikotzat jo zituen HPV-16 eta HPV-18 genotipoak. Urte berean, FDAak (Food and Drug Agency), HPV detektatzeko lehen DNA testa onartu zuen. 2000. urtean HPV orofaringeko minbizia sortzen zuela baieztatu zen eta 6 urte geroago, FDAak, umetoki lepoko minbizia prebenitzeko HPV txertoaren kalerapena baimendu zuen. 2012. urtean umetoki lepoko minbiziaren prebentziorako HPV DNA testa eta zitologia baginala proposatu ziren (4).

Azkenik, aipatu beharra dago HPVaren ikerketan egondako ikertzaile garrantzitsuenetariko bat, Harald zur Hausen, 2008. urtean Nobel saria jaso zuela HPV umetoki lepoko minbizia sortzen zuelaz konturatu izanagatik (7).

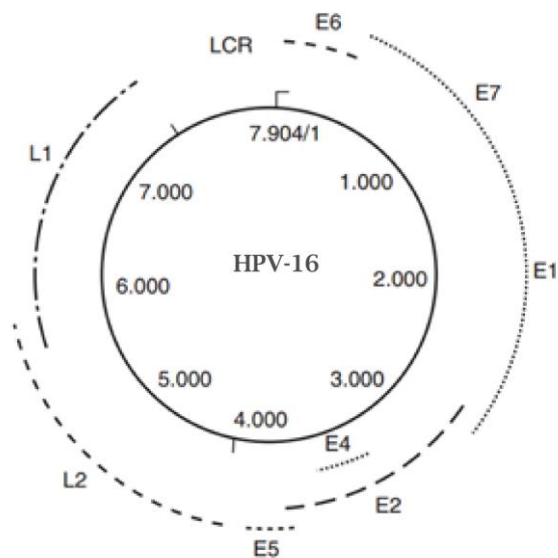
## 1.2. GIZA PAPILOMABIRUSAREN EZAUGARRIAK

### 1.2.1. Birusaren egitura eta bere geneen funtzioak

Papilomavirus terminoa latineko *papilla* (titiburu edo pustula) eta oma (tumorea) atzizki grekotik dator (8). Papilomavirusak PV laburdura eta espezie ostalaria identifikatzen duen letra bat edo biz identifikatuak dira; adibidez, giza papilomavirusa HPV (Human Papillomavirus) bezala ezagutzen da (9).

Giza papilomavirusa kate bikoitzeko DNA duen birus biluzia da, zeina larruazalaren eta mukosen barne estaldura kutsatzen dituen (10). 50 nm inguruko diametroa du eta bere kapside ikosahedrikoa 72 kapsomeroz osatua dago (5).

HPVren genoma biribila da eta, gutxi gorabehera, 8.000 base pare ditu zeinak 9 edo 10 eskualde kodetzaile dituen, irakurmen zabaleko guneak deituak (ORF, Open Reading Factor) (1. irudia) (11). ORF horiek birusaren funtzioen antolaketan inplikatuak dauden proteina ez egituralak eta proteina egituralak kodetzen dituzten nukleotido sekuentziak dira. Proteina ez egituralak kodetzen dituzten eskualdeak adierazpen goiztiarreko edo E (“Early”) gene moduan ezagunak dira, eta proteina egituralak kodetzen dituzten eskualdeak adierazpen berantiarreko edo L (“Late”) gene bezala ezagutzen dira, leinu biraleko partikuletan muntatuko diren DNAREN sintesian lehenago edo ondoren adierazten baldin badira (6). Birusaren bizi-zikloaren fase goiztiarretan adierazten diren proteinak erreplikazio biralaren eta birusaren patogenotasun ezaugarrien arduradunak dira, fase berantiarretan adierazten diren proteinak (L1-L2) egiturazko proteina soilak diren bitartean. Birusaren genomak adierazpen goiztiarreko zazpi edo zortzi gene (*E1-E8*), birusaren arabera, eta adierazpen berantiarreko bi gene (*L1* eta *L2*) kodetzen ditu (1. taula).



1. irudia. Giza papilomavirus 16 genotipoaren genomaren antolaketa (5).

1. taula. Giza papilomavirusaren irakurmen zabaleko guneak eta gene hauen funtzio nagusiak (11).

ORF	Funtzioa
E1	DNA erreplikazioaren modulatuzailea
E2	Transkripzio biralaren erregulazioa
E3	Ezezaguna
E4	Zelula ezkatadunen zitokeratinaren disrupzioa
E5	Zelula-transformazioari eta hazkuntza-faktoreen hartzaileei lotua
E6	p53-ri lotutako proliferazio eta zelula-transformazioa
E7	Rb geneari lotutako proliferazio eta transformazioa, transkripzioaren aktibazioa
L1	Kapsidearen proteina nagusia
L2	Kapsidearen proteina txikia

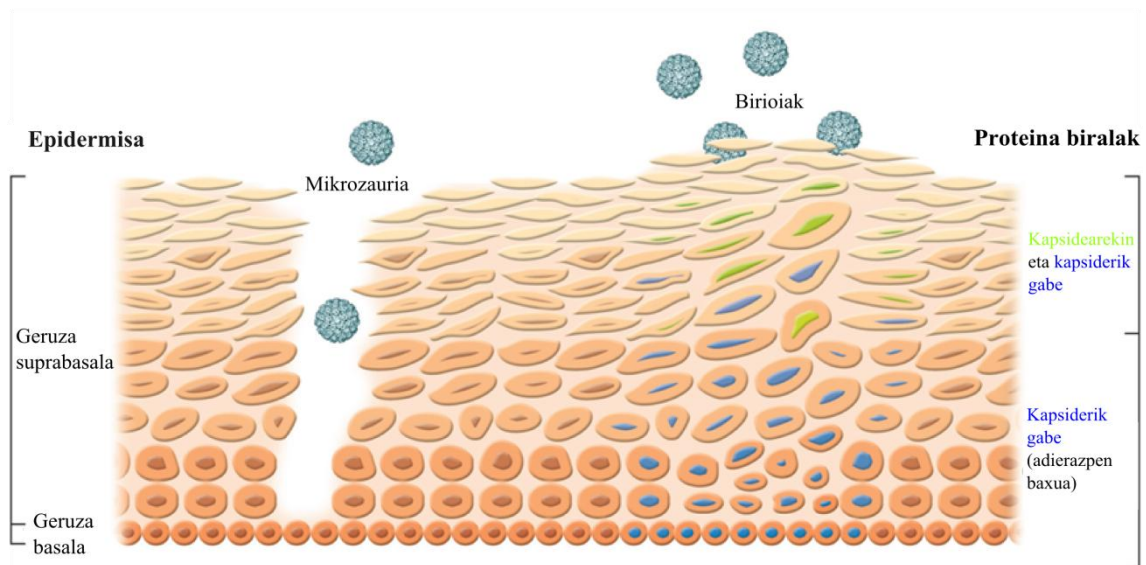
Giza papilomavirusaren genomak DNA biralaren erreplikazioarako eta transkripzioarako beharrezkoak diren proteinak ez ditu kodetzen, horregatik, papilomavirusak, ostalariaren zelula-proliferazioa mantendu behar du erreplikatu ahal izateko; hori hiru transformazio proteinen bitartez egiten du: E5, E6 eta E7, erreplikazio biralaz eta birus helduen sorreraz arduratzen direnak (12). E6 eta E7 geneen produktuak ikertuenetarikoak izan dira p53 eta Rb (erretinoblastoma) tumore isiltzaile geneekin duten elkarrekintzagatik eta zelula-transformazioan duten funtzioagatik; hori dela eta, onkogene edo gene transformatzaile bezala ezagutzen dira (6). Gainera, HPVaren geneen adierazpenaren erregulazioarako, genomaren erreplikazioarako eta partikula biralen muntaiarako beharrezkoak diren elementuak dituen kontrol eskualde luze (LCR, long control region) bat du (5).

### 1.2.2. Erreplikazio-zikloa

Birusaren itu zelulak dermisa eta epidermisa banatzen dituen epitelioaren geruza basalean dauden keratinozitoak dira. Zatitzen diren zelulek desberdintzen doazen bitartean gorantz migratzen dute. Keratinozitoen desberdintzapen prozesua azalaren kanpoaldean geruza korneoaren sorrerarekin bukatzen da (13). Papilomavirusen bizizikloa infektatu dituzten zelulen desberdintzapen prozesuari lotua dagoenez oraindik ezin izan dira HPVaren zelula-kulturak garatu. Erreplikazioaren lehen lekua zelula basalen eta ama zelulen erresebetan dago, zeinak metabolikoki aktiboak diren eta erreplikazio birala mantentzen duten. DNAren erreplikazioa (E1-E8) epidermisaren gutxi desberdintutako geruzetan gerta liteke, eta proteina berantiarren sintesia eta birusaren mihizadura (L1-L2) zelula epitelialen geruza desberdinduagoetan soilik ematen da (2. irudia eta 3. irudia) (2).

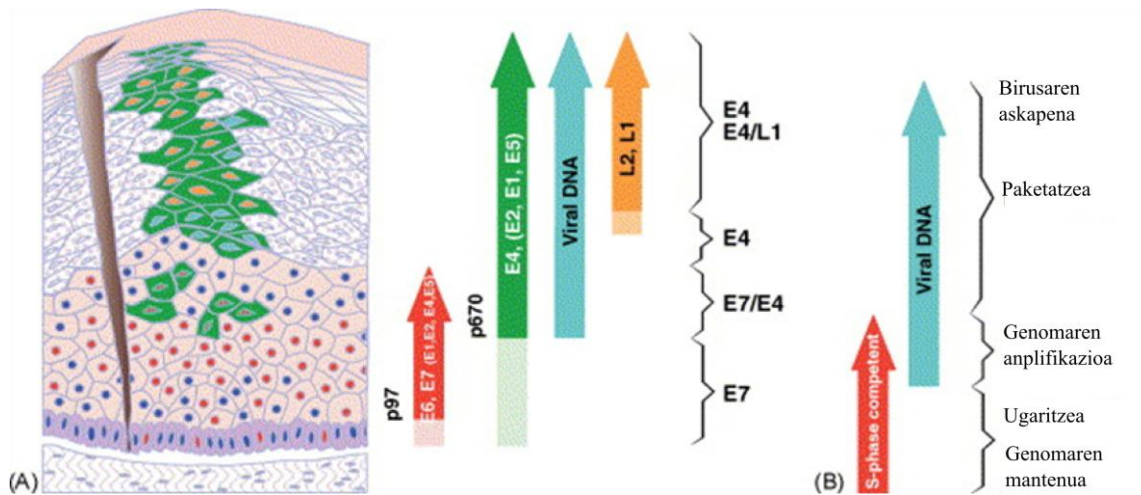
HPVaren genomaren erreplikazioa, nukleokapsidearen eraketa eta birioiaren heltzea zelula epitelialen nukleoan ematen da (2). Infekzio birala mugatua da eta normalean, modu espontaneoan igortzen da; immunokonpetentzia baldintzetan lehen edo bigarren urtean zehar espontaneoki desagertzen da, hala ere, infekzioa mantendu egin liteke (5, 11). HPVaren infekzioaren lehen pausua epitelio ezkatadunaren zeluletara birioi osoen atxikimendua da eta honen ondoren bi motatako infekzioak gerta litezke: produktiboak edo latenteak. Infekzio produktibo edo aktiboetan, erreplikazio birala, nagusiki, diferentziatuak dauden zelula ezkatadunetan ematen da, hau da, epitelio ezkatadunaren

geruza ertainean eta gainazalekoetan. Bertan DNA biralaren erreplikazio aktibitatea bizia da, zelula infektatuen ezaugarri zelularretan aldaketak eragiten dituzten proteinen ekoizpenarekin eta birioi berrien muntaiarekin. Infekzio latentetan, aldiz, infekzioa gehienbat epitelio ezkatadunaren zelula ez helduetan (zelula basaletan edo zelula metaplasikoetan) ematen da. DNA biralak zelularen barnean forma zirkular askean (forma episomalean) irauten du erreplikatu barik. Zitologian ez da aldaketa morfologiko identifikagarriarik antzematen, beraz, infekzio mota hauetan detekzio birala metodo molekularren bidez baino ezin liteke egin (6).



**2. irudia.** Giza papilomavirusaren bizi-zikloa. Lowy eta Schiller, 2006 artikulutik eraldatua (14).





**3. irudia.** Giza papilomavirusaren bizi-zikloaren fase bakoitzean adierazten diren proteinak. Doorbar, 2005 artikulutik eraldatua (15).

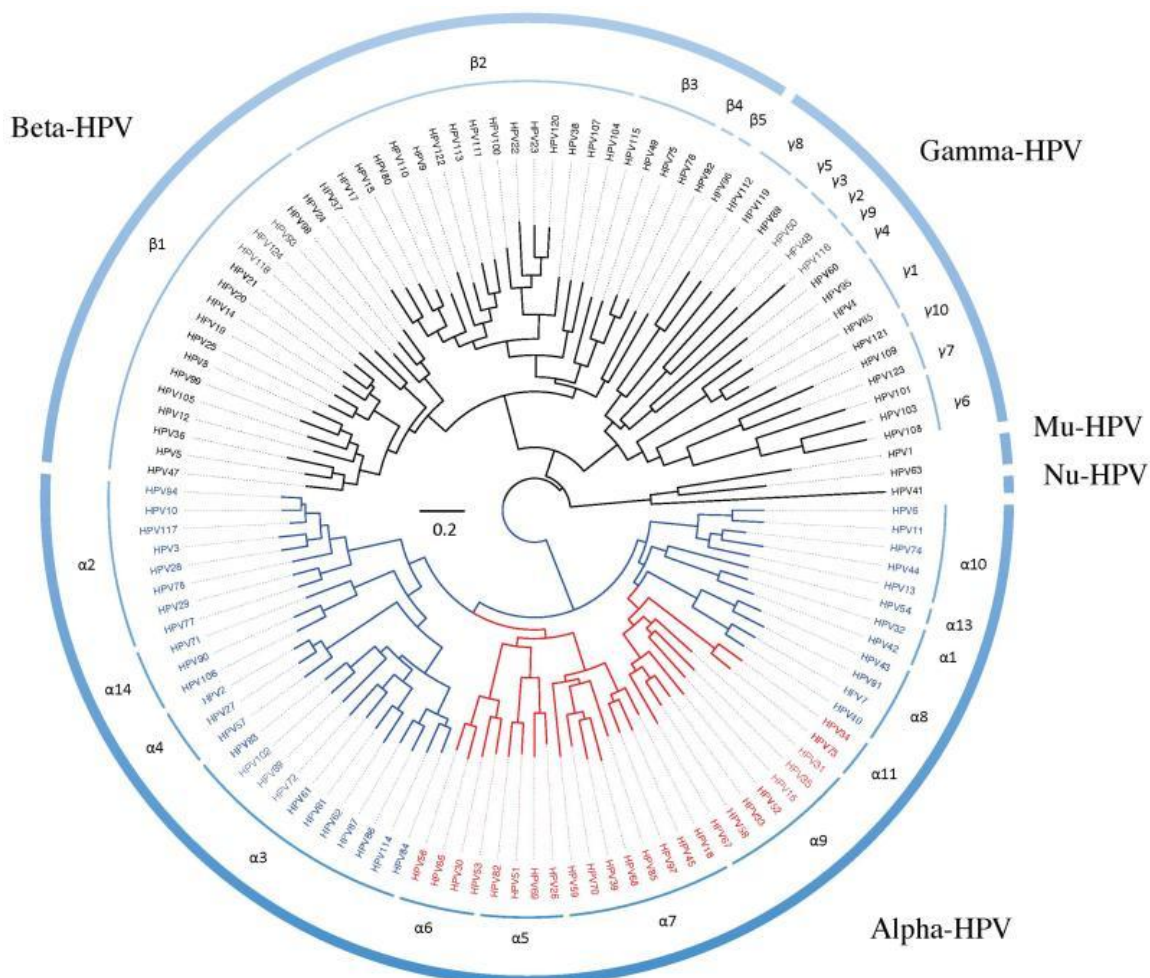
### 1.2.3. Aldakortasun genomikoa

HPVak 150 genotipo baino gehiago barneratzen ditu; horien artean gutxi gorabehera 40ek emakume eta gizonezkoen alde genitaleko epitelio ezkatadun geruzatua kutsatzen dute epitelioekiko tropismoa daukatelako. Genotipo horien sailkapena E6, E7 eta L1 proteinen eskualde kodetzaileen DNA sekuentzien homologian oinarritzen da (4, 11):

- Genotipoek % 90ko homologia baino gutxiago dute eskualde hauetako sekuentzietan.
- Subtipoek, genotipo baten barnean, % 90-98 arteko homologia dute.
- Aldaerek, subtipo baten barnean, % 98 baino gehiagoko homologia dute (16).

Gaur egun, giza papilomavirusaren 150 genotipo baino gehiago ezagutzen dira. Genotipo hauek 3 genero nagusitan banatuta daude: alfapapilomavirusak, gammapapilomavirusak eta betapapilomavirusak (4. irudia). Alfapapilomabirusek mukosak eta alde genitaleko epitelioak kutsatzen dituzte eta alde genitaleko minbizien eragileak dira. Bestalde, gammapapilomabirusek eta betapapilomabirusek larruazala kutsatzen dute eta larruazaleko lesioak sortzen dituzte. Gainera bi papilomavirus genero hauek tropismo altua aurkezten dute aho barrunbearekiko (17-19).

Beste bi papilomavirus genero daude; mupapilomavirusak eta nupapilomavirusak, baina hauek 3 HPV genotipo baino ez dituzte barneratzen.



**4. irudia.** Giza papilomavirus genotipo gehienaren zuhaitz filogenetikoa (4).

Genotipoak 5 genero desberdinetan sailkatuz agertzen dira: alfapapilomavirusak, gampapapilomavirusak, betapapilomavirusak, mupapilomavirusak eta nupapilomavirusak.

Hiru genero nagusi horien barnean genotipo desberdinak sailkatzen dira. Genotipo motak HPVaz infektaturiko pertsonak jasango duen lesio mota determinatzen du. Larruzaleko garatxoak normalean 1, 2, 3, 4 eta 10 genotipoek sortzen dituzte (2. taula). Bestalde 6 eta 11 genotipoek mukosetako lesioak sortzen dituzte gehienetan, eta 16 eta 18 genotipoak umetoki lepoko minbiziaren garapenarekin estuki loturik daude.

**2. taula.** Giza papilomavirus genotipo desberdinek sortutako lesioak (20).

Lesioa	Giza papilomavirus genotipoak	
	Ohikoak	Noizbehinkakoak
<b>Larruazaleko lesioak</b>		
Larruazaleko garatxoak	1, 2, 3, 4, 10	1, 2, 4, 7, 26, 27, 28, 29, 41
<b>Mukosetako lesioak</b>		
Laringeko papiloma	6, 11	/
Ahoko papiloma	6, 11	2, 16
Konjuntibako papiloma	11	/
<b>Alde genitaleko garatxoak</b>		
<i>Condiloma acuminata</i>	6, 11	1, 2, 10, 16, 30, 44, 45
Umetoki lepoko neoplasia intraepiteliala, minbizia	16, 18	31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 69, 73, 82

Bestalde, aldaerei dagokionez bi kontzeptu nagusi daude: HPV genotipo bakoitzerako aldaera kopuru mugatua existitzen da eta aldaera hauek dibergentzia maximoa aurkezten dute urte askotan zehar beraien arteko harremanik izan gabe eboluzionatu duten talde etnikoetan, adibidez, afrikarrak eta amerindiarrak. HPV aldaerak biologian zein etiologian desberdintzen dira (21).

HPV-16 eta HPV-18 genotipoen aldaera intratipikoak deskribatu egin dira. Genotipo hauen aldaera desberdinak deskribatu dira *L1*, *E6* eta *E2* geneen sekuentzien heterogenotasunean oinarrituta. 2013. urterarte HPV-16aren eta HPV-18aren aldaera intratipikoak 5 adar filogenetiko nagusitan sailkatzen ziren: Europarra (E), Asiarra (As), Asiar-amerikarra (AA), Afrikarra 1 (AF-1) eta Afrikarra 2 (AF-2). Aldaerek banaketa geografiko desberdina aurkezten dute (22). Aldaera hauek etnia eta kokapen geografikoaren arabera banatzen dira; aldaera Asiarra Asiako hegoekialdean aurkitzen da batez ere, aldaera Asiar-amerikarra erdialdeko Amerikan eta Hego Amerikan topatzen da, aldaera Afrikarrak Afrikan aurkitzen dira eta aldaera Europarra Afrika ez den beste lurraldeetan aurkitzen da (23-25). Aldaera hauek beraien patogenotasunean

desberdintzen dira; normalean aldaera ez-europarrek (europarrak ez diren beste aldaerak) lesioak sortzeko gaitasun handiagoa dute (26-28).

Hala ere, 2013. urtetik aurrera 16 eta 18 genotipoen aldaera intratipikoen sailkapena aldatu egin da. HPV-16 genotipoaren aldaerak 4 leinu desberdinetan sailkatzen dira orain: A leinuak, lehengo aldaera Europarrak eta Asiarrak barneratzen ditu; B leinuak, lehengo Afrikarra-1 aldaera barneratzen du; C leinuak lehengo Afrikarra-2 aldaera barneratzen du eta D leinuak lehengo aldaera Asiar-amerikarra barneratzen du. Berdina gertatzen da HPV-18 genotipoarekin. Sailkapen berriarekin HPV-18aren aldaerak 3 leinu desberdinetan banatzen dira: A leinuak, lehengo aldaera Asiar-amerikarra eta Europarra barneratzen ditu, hain zuen, A1-A2 azpi-leinuak lehengo aldaera Asiar-amerikarrak barneratzen ditu eta A3-A5 azpi-leinuak lehengo aldaera Europarrak; B eta C leinuek lehengo aldaera Afrikarra-1 eta Afrikarra-2 barneratzen dituzte (29).

Autore gehienek L1 eskualdea baino ez dute erabiltzen aldaera desberdinak sailkatzeko. Eskualde bakar baten analisia genotipo horren aldaeraren identifikaziorako balio du baina ez da nahikoa errekonbinazio prozesurik gertatu ahal den antzemateko (9, 30, 31). Izatez, errekonbinazioa minbizia pairatzeko beste arrisku faktore bat da eta, beraz, HPV infekzioak aztertzen ari garenean kontuan hartu beharreko faktorea da. Hau dela eta, errekonbinazioa antzemateko, eskualde genomiko bat baino gehiago aztertzea gomendarria da.

#### **1.2.4. Epidemiologia**

HPV epitelialen transmisio-bidea pertsonatik pertsonara ematen da, hau da, infektatutako azalaren arteko kontaktu zuzena behar da. HPV genitalak bide sexualetik transmititzen dira eta transmisibilitate tasa altua dute. Adierazgarriak ez diren beste bide batzuk ere, instrumentala eta fomiteak, iradoki dira. Plazenta bideko transmisioa frogatu da erditze naturalaren bidez jaiotako birusaren eramaileak diren pazienteen umeetan papiloma laringeoak eraginez, nahiz eta maiztasun baxua izan (5, 32).

Papilomabirusek eragindako infekzio genitala munduan sexu bidez transmitituriko infekzio (STI) ohikoena kontsideratzen da, munduan berrehun eta laurogeita hamaika milioi emakume HPVaren eramaileak direla estimatzen da eta, umetoki lepoko minbiziarekin erlazionatuz, 15 eta 44 urte arteko emakumeen artean bigarren minbizi mota arruntena da (5, 33).

Zitologia normala duten emakumeen artean HPV infekzioaren prebalentzia % 10,4koa dela balioztatu da. Espainian, zitologia normala duten emakumeen artean, eremu geografikoaren arabera, prebalentzia % 3tik % 8,3ra alda daiteke (22, 34). Umetoki lepoko minbiziaren batez besteko intzidentzia ehun mila emakumeen artean 8/urteko da, umetoki lepoko minbizi aurretiko lesioen, hau da, maila altuko lesioen (Cervical Intraepithelial Neoplasia grade 3, CIN3) populazio tasa ehun mila emakumeen artean 30/urteko balioak dituen bitartean (32). Ikerketa berri baten arabera, prebalentzia oraindik altuagoa da arrisku altuko hainbat taldeetan, hala nola, sexu langileetan eta espetxeratutako emakumeetan, arrisku altuko talde hauetan sartzen diren emakumeak % 29,9 espainiarrak, % 23,1 afrikar etorkinak eta % 32,8 latinoamerikar etorkinak direlarik (22).

Hamar emakumeetatik lau HPV positiboak dira beraien debut sexualaren lehen urtean; hamarretik sei bigarren urtean. Mundu populazioaren % 80ak bere bizitzan zehar HPV gertaera bat izango duela estimatzen da. Espainian, 30-35 urteetatik aurrera populazio orokorraren % 3a HPVaren eramaile kronikoa dela balioztatzen da. Talde honek umetoki lepoko minbizia garatzeko arrisku altuagoa du. Amerikan eta Europan, 50-55 urteetatik aurrera, prebalentziaren igoera berri bat ikusten da kontaktu sexual berriengatik edo aurretik antzeman ez diren infekzio latenteen adierazpena baimentzen duen sistema immunearen zaharkitzeagatik (32).

HPV genotipoak berain gaitasun onkogenikoaren arabera arrisku altukoak (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) (HR-HPV), arrisku altu posiblekoak (26, 53) (pHR-HPV) eta umetoki lepoko minbizia sortzeko arrisku baxukoak (LR-HPV) (beste genotipoak) bezala sailkatu dira (35). 16 genotipoa iraunkorrena da eta hurrengo 10 urteetan maila altuko lesioa (CIN3) garatzeko aukera gehien daukana (5).

HPVaz kutsatutako emakumeetan HR-HPVek arrisku baxuko HPVak baino gehiago irauten dute, eta, aldi berean, infekzio anitzak iraunkortasunaren faktore garrantzitsuak dira. Gizonezkoetan prebalentzia eta historia naturalarekiko dauden datu eskasek HPVaren intzidentzia 18 eta 44 urte arteko heterosexualetan % 56 eta % 65 artean dagoela adierazten dute, HR-HPVentzat % 26-50 delarik. Homosexualetan eta bisexualetan kasuan prebalentzia altuagoa da (5). Frogatuta dago birus honen infekzio iraunkorra emakumeen umetoki lepoko minbiziaren eta gizonezkoen uzki-kartzinoma ezkatadunaren eragilea dela, horrez gain, garatxo genitalak bezalako beste lesio onberak sor ditzake (36).

### 1.3. GIZA PAPILOMABIRUSAREN INFEKZIOA

#### 1.3.1. Historia naturala

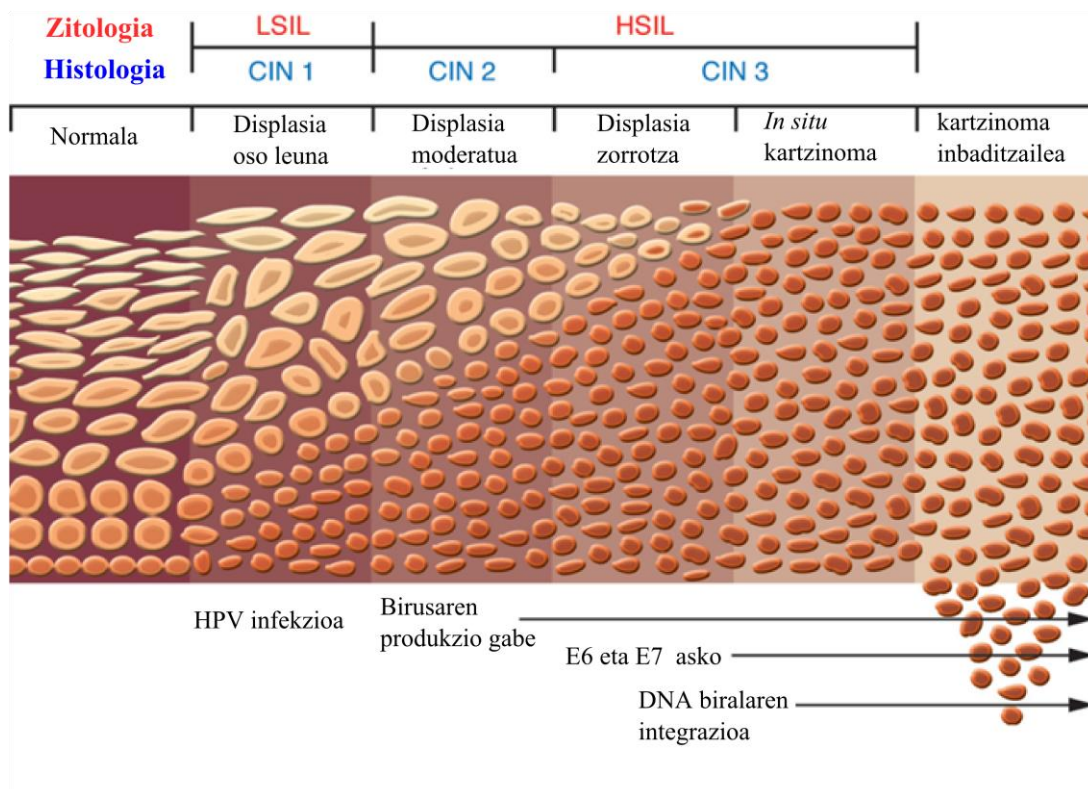
1976an Harald Zur Hausen giza papilomavirusak kartzinogenesisian zuen eragina azaltzen eta aztertzen lehena izan zen; geroago ikerketa kliniko, epidemiologiko eta molekular gehiagok umetoki lepoko minbiziaren eragile etiologiko nagusitzat adierazi zuten. Ondoren, umetoki lepoko kartzinoma zuten emakume guztiek HPVaren genotiporen batekin infektatuta zeudela frogatu zen (5).

HPVa umetoki lepoko % 99 minbizi ezkatadun edo glandularren erantzulea da. Gainera, birus hau uzki-kanaleko % 90 minbiziek, bulba eta zakileko % 40 minbiziek eta orofaringeko % 12 minbiziek erlazionatu da (5). 16, 18 eta 45 genotipoak talde histologiko bakoitzean (zelula ezkatadunen kartzinoma, zelula adenozkatadunen kartzinoma eta adenokartzinoma) arruntenak dira. Genotipo horiekin (16, 18 eta 45) erlazionatutako umetoki lepoko minbizi inbaditzaileak adin askoz ere goiztiarragoan diagnostikatzen dira (50 urte baino gutxiago) eta arrisku altuko beste HPV genotipoak eragiten dituztenak baino 4 urte lehenago (37).

Emakume gazteetan ematen diren HPV infekzio gehienak denborazkoak dira eta epe luzean ez daukate garrantzi handirik. Infekzioen % 70 infekzioaren lehen urtean eta % 90 infekzioaren bigarren urtean desagertzen dira. Hala ere, infekzioa irauten duenean umetoki lepoko minbizi aurreko lesioak garatzeko arriskua dago (38).

Berezko immunitateak eta immunitate zelularrak HPV infekzioaren kontrolean eta ebazpenean garrantzia dute. Birus honek erantzun immune babestzaileak ezabatu edo ekidin ditzake. Gainera, antigenoen adierazpen maila baxuak aurkezten ditu ("ia hilak" dauden azaleko zelula desberdintzatuetan izan ezik), ikuspuntu immunologikotik, keratinozitoa, erreplikaziorako leku pribilegiatua baita. Hanturazko erantzunak erantzun zitolitiko babestzailea aktibatze eta garatxoaren ebazpena faboratzeko beharrezkoak dira. Immunogutxitutako pertsonak erreurrentziak maizago aurkezten dituzte eta HPVaren adierazpen larriagoak dituzte (11).

Infekzioa arrakastarekin ebazten ez duten emakumeetan HPVak umetoki lepoan sortutako lesioek CIN1era aurrera egin dezakete eta CIN2ra eta CIN3ra bilakaera jarraitu dezakete (5. irudia).



**5. irudia.** Umetoki lepoko lesio onbera batetik minbizi zerbikal inbaditzaileartereko aurreratzea. Lowy eta Schiller, 2006 artikulutik eraldatua (14).

### 1.3.2. Infekzio motak

HPVaz kutsatutako emakumeetan infekzio mota desberdinak eman daitezke. Infekzio “produktiboa” edo aktiboa desberdindutako zelula ezkatadunetan birusaren erreplikazioa baimentzen da; honetan DNA biralaren erreplikazio aktibitate biziak birioi osoen ekoizpena baimentzen du (6).

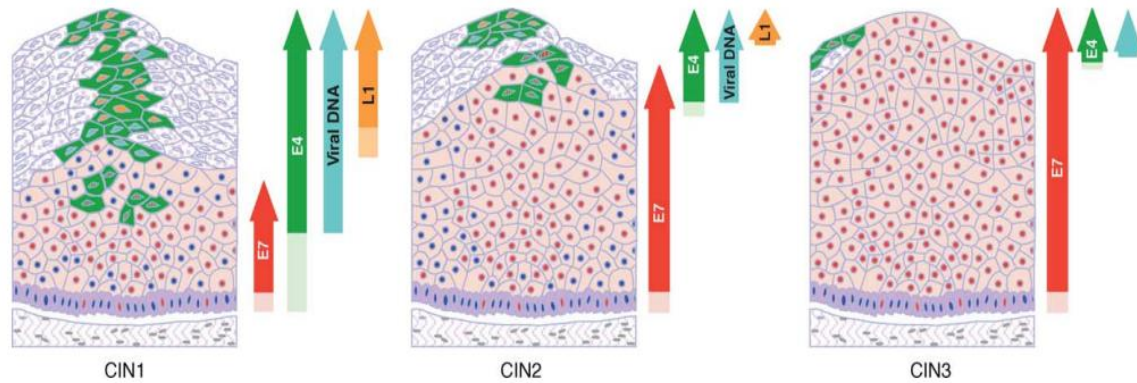
Bestalde, infekzio latenteetan DNA birala modu episomalean mantentzen da zelularen barnean. Episomatik transkribatutako RNA molekulek sekuentzia ezegonkortzaile bat dute (5’AUUUA3’) (2).



Gainera HPVak sortutako infekzioak banako infekzioak edo infekzio anitzak izan daitezke. Infekzioa HPV genotipo bakar batek sortzen duenean banako infekzioa izango litzateke eta infekzioan HPV genotipo bat baino gehiago inplikaturik dagoenean infekzio anitza izango du pertsona horrek. Gaur egun, alde genitaleko HPV infekzio asko infekzio anitzak dira. Genotipo desberdinen elkarrekintza aldaera intratipikoetan, nukleotido aldaketetan eta errekonbinazioan eragina izan dezake eta, horregatik, infekzio anitz hauek kontuan hartu behar dira. Gainera, genotipoen arteko elkarrekintzak patogenotasunean ere eragina izan dezake (39-41). Beste autore batzuek deskribatu duten moduan, HPV-6aren eta HPV-16aren infekzio anitza duten emakumeek umetoki lepoko minbizia pairatzeko probabilitate gutxiago dute (42).

### 1.3.3. Onkogenesi prozesua

Ugaritze zelularren kontrol-galeraren erantzuleak *E6* eta *E7* gene biral transformatzaileak dira. Gene transformatzaile horien gain-adierazpena *E2* gene biralaren galeraren ondorioa izan daiteke. Izatez, gene honen funtzioa *E6/E7* geneen transkripzioa erreprimitzea eta birusaren eskualde goiztiarren transkripzioaren proteina erregulatzaileak ekoiztea da (6). Birusaren genoma umetoki lepoko zelulen kromosomen DNAan barneratuta dagoenean, *E6* eta *E7* geneen irakurmen zabaleko guneetako (ORF) muturrak desregulatuta daude. Desregulazio honen eraginez, ekoiztutako mRNAk ez du sekuentzia ezegonkortzailerik eta, beraz, gene horiek gain-adierazita daude (2). HPV modu episomalean eta *E2* ukigabe aurkitzen da gradu baxuko eta gradu altuko lesio gehienetan. Hala ere, kartzinomen % 90an baino gehiagotan HPVa zelula ostalariaren DNAan barneratuta dago. Integrazioak *E2/E1* geneen irakurmen lekuak mozten ditu baina *E6/E7* ukitu gabe uzten ditu, erregulaziotik askatuz eta beraien gain-adierazpena baimenduz (6. irudia) (6). Gene horien adierazpena oraindik zatitu daitezkeen zelula populazioan ematen denean epitelioan zeharreko zelula-proliferazioa hasten da *E6* eta *E7* proteinak p53 eta Rb tumore isiltzaile geneen inaktibazioa sortzen dutelako. *E6* p53 proteinari lotzen zaio eta degradaziorako markatzen du. Bestalde, *E7* erretinoblastoma geneari lotzen zaio eta berau inaktibatzen du. Guzti honek zelula-ziklo normala aldatzen du zelula basalen gain-hazkuntzarekin heltze ezkatadun nahasia sortuz (2, 11). Morfologikoki, aldaketa horiek, gradu altuko lesio epitelial bezala interpretatzen dira (HSIL, High-grade squamous intraepithelial lesion) (6).



**6. irudia.** Umetoki lepoko minbiziaren garapenean HPV-16aren bizi-zikloan ematen diren aldaketak (15).

HPV-16aren E6 onkoproteina p53ari lotzen zaio, p21 eta p16 proteinen estimulazioaren eraginez, hazkuntza eta desberdintzapen zelularren errepresioegile eta kontrolatzaile garrantzitsua dena. E7 proteinak zelula-hazkuntza erregulazioa eragozten du A1 ziklina, p107 proteina eta erretinoblastoma proteina lotura lehiakor baten eraginez. Hauek ziklo zelularreko G1 faseetik S fasera progresioa erregulatzen dute. Honek zelula-proliferazioaren kontrolaren galera garrantzitsua sortzen du eta honen eraginez kontrolik gabeko hazkuntza ematen da eta, beraz, zelula epitelialak transformatu egiten dira (6).

#### 1.3.4. Umetoki lepoko minbiziaren prebalentzia eta hilkortasuna

Giza papilomabirusa minbizia sor dezakeen birusa da, hau da, birus onkogenikoa. Birus honek sortzen dituen infekzio gehienek ez dute sintomarik edo lesiorik sortzen baina infekzioa denboran zehar mantendu egiten bada umetoki lepoko minbizia sor dezake. Birusak gehienetan emakumeak kutsatzen ditu, baina gizonezkoak ere infektatu ditzake eta hauetan ere minbizia sor dezake.

Giza papilomabirusa umetoki lepoko minbizi kasuen % 99an inplikaturik dago. Umetoki lepoko minbizia emakumeei eragiten dien laugarren minbizi motarik ohikoena da (43-45). Urtero 530.000 infekzio kasu berri agertzen direla estimatzen da eta, infektaturiko emakumeen artean, urtero 270.000 emakumeen heriotza eragiten du birus honek (46).

Halaber, kontuan izan behar da HPV genotipo guztiek ez dutela onkogenizitate gradu bera aurkezten; adibidez, 16 eta 18 genotipoak gradu altuko lesioen % 70etan eta umetoki lepoko minbizi kasuen % 75etan aurkitzen dira (36). Umetoki lepoko minbizia sortzen duten genotipo arruntenak hurrengokoak dira: HPV-16, HPV-18, HPV-58, HPV-33, HPV-45, HPV-31 eta HPV-52 (47) (3. taula).

**3. taula.** Umetoki lepoko minbizia sortzen duten 10 HPV genotipo nagusienak (47).

HPV genotipoa	Prebalentzia (%)
16	54,4
18	16,5
58	5,1
33	4,7
45	4,4
31	3,6
52	3,4
35	1,9
39	1,3
59	1,3

Genotipo onkogeniko hauen banaketa desberdina da kontinente bakoitzean. European HPVren prebalentzia % 6,6koa da eta gure inguruan topa ditzakegun genotipo nagusienak HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 eta HPV-58 dira. Asian birusaren prebalentzia gure ingurukoaren antzerakoa da, % 8,3koa. Asian topa ditzakegun genotipo nagusienak HPV-16, HPV-52, HPV-58, HPV-18 eta HPV-56 dira. Ipar Amerikan eta Hego Amerikan HPVren prebalentzia antzekoa da, % 13,8 Ipar Amerikan eta % 14,3 Hego Amerikan. Ipar Amerikan aurkitzen diren genotipo nagusienak HPV-16, HPV-53, HPV-52, HPV-18 eta HPV-39 dira eta Hego Amerikan, aldiz, HPV-16, HPV-58, HPV-18, HPV-45 eta HPV-31. Munduan, birus honen prebalentziaren daturik altuenak Erdialdeko Amerikan eta Afrikan aurkitzen dira (% 20,5 eta % 22,9, hurrenez hurren). Erdialdeko Amerikan HPV infekzio gehienak HPV-16, HPV-31, HPV-18, HPV-53 eta HPV-58 genotipoek sortzen dituzte. Afrikan, aldiz, HPV-16, HPV-52, HPV-18, HPV-58 eta HPV-31 genotipoak dira nagusi (47).

Umetoki lepoko minbizi kasuen intzidentziak ere banaketa geografiko desberdina aurkezten du. Europan, urtero 100.000 emakumeko, umetoki lepoko minbiziaren intzidentzia ratioa 6,9 eta 12,9 artekoa da. Ipar Amerikan minbizi honen intzidentzia ratioa Europako datuaren antzekoa da, 6,9ko intzidentzia ratioa 100.000 emakumeko urtero. Asian aldiz, intzidentzia ratioa Europan eta Ipar Amerikan baino altuagoa da, 12,9-30 artekoa da. Azkenik, umetoki lepoko minbiziaren intzidentzia ratorik altuenak Afrikan, Hego Amerikan eta Erdialdeko Amerikan aurkitzen dira; Erdialdeko Amerikan eta Hego Amerikan intzidentzia ratioa 20,3 eta 56,3 artekoa da eta Afrikan 100.000 emakumeko kalkulatu den intzidentzia ratioa 6,9tik 56,3ra aldatu daiteke (47).

## 1.4. GIZA PAPILOMABIRUSAREN DETEKZIORAKO METODOAK

Azken 100 urteetan, HPVaren inguruan egindako hainbat aurkikuntzak eta zientziaren alor desberdinetan egindako hainbat aurrerakuntzak, giza papilomabirusaren detekziorako metodo desberdinen garapena baimendu izan du. Ondoren, gaur egun HPVaren detekziorako ditugun metodo desberdinak agertzen dira.

### 1.4.1. Papanicolaouren proba edo zitologia baginala

Georgios Papanicolaou mediku grekoak zitologiaren aitzindaria izan zen eta bere ohorean zitologia baginalak bere izena jaso du; Papanicolaouren proba.

Proba honen bidez umetoki lepoko zelula esfoliatuak hartzen dira eta, hauek tindatu ondoren, mikroskopiaoren bidez aztertzen dira. Honen helburua zelula esfoliatuen azterketaren ondorioz umetoki lepoko minbizi inbaditzailea detektatzea da. Proba honen aitzindariak Papanicolaou and Babes izan ziren 20ko hamarkadan (48, 49).

Proba honen meritua diagnostikorako teknika sistematizatzea izan zen eta umetoki lepoko minbiziarekin erlazionatuta zeuden aldaketa zitologiko bakoitzarentzako nomenklatura desberdina ezartzea. Horrela zitologia kliniko moderno hasi zen (50).

Zitologia kliniko modernoaren garapenarekin batera umetoki lepoko minbiziaren zitologia-txostenaren eboluzioa eman da (7. irudia). James Reagan 1958. urtean displasia terminoa sartu zuen zitologiaren emaitzak sailkatzeko. Displasia bere larritasunaren arabera displasia arina, moderatua edo zorrotza bezala sailkatzea proposatu zuen Reaganek. Geroago 1967. urtean, Richardek CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia) terminoa proposatu zuen umetoki lepoko neoplasia intraepiteliala sailkatzeko. Proposamen honen arabera 4 talde sortu ziren: 1) CIN I, displasia arinaren parekoa zena; 2) CIN II, displasia moderatuaren parekoa zena; 3) CIN III, displasia zorrotzaren parekoa zena eta 4) *In situ* kartzinoma. Ondoren, 1989. urtean, Estatu Batuetako minbiziaren nazio-institutoak (NCI-National Cancer Institute) Bethesda sistemaren ezarpena proposatu zuen. Sistema honen berritasuna ezohiko zelula ezkatadun (ASC- Atypical Squamous Cells) terminoaren sarrera izan zen (51).

James Reagan, 1958	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Displasia terminoaren sarrera</li> <li>• 3 talde honen barruan: arina, moderatua eta zorrotza</li> </ul>
Richard, 1967	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CIN terminoaren proposamena (Cervical Intraepitelial Neoplasia)</li> <li>• 4 talde: <ul style="list-style-type: none"> <li>• CIN I= displasia arina</li> <li>• CIN II= displasia moderatua</li> <li>• CIN III= displasia zorrotza</li> <li>• <i>In situ</i> kartzinoma</li> </ul> </li> </ul>
AEBtako minbiziaren nazio- institutoa, 1989	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bethesda sistemaren ezarpena</li> <li>• Ezohiko zelula ezkatadunak (ASC - Atypical squamous cells) terminoaren sarrera</li> </ul>

## 7. irudia. Zitologia baginalaren inguruko terminologiaren eboluzioa (51, 52).

Azkenik, 2001. urtean, zitologia baginalaren diagnostikorako Bethesda sistema ezarri zen 1989 urtean proposatutako terminologia bateratzeko. 2001 urteko Bethesda sistemaren bidez zitologiaren ezohiko emaitzak 7 taldetan banatzen dira (4. taula) (53). Sailkapen honen bidez zitologiako emaitza guztiak talde desberdinetan bana daitezke. Lesioak 3 talde nagusi desberdinetan sailkatzen dira: zelula ezkatadunen inguruko lesioak, zelula glandularren inguruko lesioak eta *in situ* adenokartzinoma edota minbizia. Zelula ezkatadunen inguruko lesioen artean Esanahi zalantzagarriko ezohiko zelula ezkataduna edo ASCUS izeneko lesioak aurkitu daitezke. Hauek ez dira lesio kaltegarriak izan behar, askotan, denboran zehar zelula hauek beraien izaera normalera bueltatzen dira, beste batzuetan lesio gaizto baten hasiera determinatzen dute. Gradu baxuko lesio intraepitelial ezkataduna edo LSIL izeneko lesioak normalean tratamendurik gabe hilabete gutxitan desagertzen dira. Azkenik gradu altuko lesio intraepitelial ezkataduna edo HSIL eta zelula ezkatadunen kartzinoma tratamendurik gabe ez dute atzera egiten eta lesio larri bezala definitzen dira (4, 47).

**4. taula.** Zitologia emaitzen sailkapena 2001 urteko Besthesda sistemaren arabera (53).

<p><b>Zelula ezkatadunen inguruko lesioak</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ezohiko zelula ezkatadunak (ASC- Atypical squamous cells)</li> <li>➤ Gradu baxuko lesio intraepitelial ezkataduna (LSIL- Low grade squamous intraepithelial lesion)</li> <li>➤ Gradu altuko lesio intraepitelial ezkataduna (HSIL- High grade squamous intraepithelial lesion)</li> <li>➤ Zelula ezkatadunen kartzinoma</li> </ul>
<p><b>Zelula glandularren inguruko lesioak</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Esanahi zalantzarriko ezohiko zelula glandularrak (AGC-NOS - Atypical Glandular Cells not otherwise specified)</li> <li>➤ Zelula neoplasiko posibleak izan daitezkeen ezohiko zelula glandularrak (AGC-neoplastic - Atypical Glandular Cells, suspicious for AIS or cancer)</li> </ul>
<p><b><i>In situ</i> Adenokartzinoma (AIS- Adenocarcinoma <i>in situ</i>)</b></p>	

Nahiz eta zitologia baginalaren proba birus honek sortutako umetoki lepoko minbiziaren hilkortasun tasa gutxitzeko baliagarria izan den, minbizi aurreko lesioak detektatzeko proba honen sentsibilitatea oso baxua da, % 55,4 gutxi gorabehera. Hau dela eta, beste proba batzuk garatu izan dira HPVaren detekziorako.

## **1.4.2. DNA oinarritutako detekzio metodoak**

HPVaren DNA oinarritutako detekzio metodo nagusiak ondoren agertzen dira (5. taula). Metodo hauen arteko konkordantzia kontuan hartzekoa da ezohizko zitologia duten emakumeen bahetzea burutzen denean. Hala ere, metodoen arteko desadostasunak behatu izan dira HPVaren bahetze primarioa 30 urte baino gehigoko emakumeetan egiterakoan. Aurkikuntza hau kontuan hartu beharrekoa da; HPVaren bahetze primarioak umetoki lepoko minbiziaren bahetzerako hainbat onura sortzen baititu. Gainera, nahiz eta metodo desberdinek positiboak diren laginen proportzio antzerakoa aurkezten duten, metodo desberdinek ez dituzte emakume berdinak markatzen HPVrako positibo gisa (54).

### 1.4.2.1. Hibrido harrapaketa proba (HC2)

HPVa antzemateko eta genotipoa determinatzeko hainbat saiakera proposatu dira. Haien artean, hibrido harrapaketa proba (HC2) izan zen AEBetako FDAk (Food and Drug Administration) arrisku altuko 13 HPVen detekziorako onartutako lehen entsegua (55).

HC2 arrisku altuko zein arrisku baxuko genotipoak antzemateko metodo oso espezifikoa da. Metodo honek 5 fase ditu: desnaturalizazioa, hibridazioa, hibrido harrapaketa, detekzioa eta emaitzen irakurketa (6).

Bere erabilera oso zabala izan da, bai baheketa programak aurrera eramateko zein txertoen inguruko ikerketa burutzeko (56). Hala ere, gaur egun ez da metodorik erabiliena.

### 1.4.2.2. Cobas HPV

Bestalde, denbora errealeko PCRan oinarritutako saiakerak garatu dira, zeinak HPV-16 eta 18 genotipoak eta arrisku altuko beste genotipo batzuk batera antzemateko gai diren. 2011ko apirilean Roche-ren Cobas<sup>®</sup> HPV testa, arrisku altuko HPVaren detekziorako denbora errealeko PCR printzipioa darabilena, AEBetako FDAk onartu zuen (55).



Cobas<sup>®</sup> HPV testa HC2 baino espezifikotasun handiagoa dauka (55). Gainera, Cobas<sup>®</sup> HPV testa beste testekin konparatuz hainbat abantaila ditu: 16, 18 eta gainerako beste arrisku altuko genotipoak banan-banan identifikatu ditzake, laborategian lan fluxu erraza du, probaren erabateko automatizazio, zitologia likidozko bialak erabiltzeko aukera, lagin-kopuru altua sartzeko posibilitatea, laginak jaso ondorengo lau orduetan emaitza lortzeko aukera eta genotipo ez kartzinogenikoekin erreaktibitate gurutzatuaren falta (57). Halaber, FDAk burututako ikerketa berriek Cobas<sup>®</sup> HPV testa arrisku altuko HPVen errutinazko bahetzerako egokia dela frogatu dute (58).

#### 1.4.2.3. Linear Array

Linear Array Roche Molecular Diagnostics etxe komertzialeko entsegua da. Metodo honen bidez HPV genotipo desberdinen DNA detektatzen da Line-Blot baten bidez, hau da, genotipo bat edo beste detektatzen duen arabera lerro patroia desberdina agertzen da. Metodo honen itua genea *L1* genea da eta metodo honen bitartez 37 HPV genotipo detektatu daitezke: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, CP6108 (59).

#### 1.4.2.4. CLART

CLART, Genomica etxe komertzialeko HPV detekzio metodoak, HPV 35 genotipo antzeman ditzake. Metodo honek HPV genotipo desberdinen detekzioarako PCRA eta mikroarrayen teknologia erabiltzen du. Teknika honen bidez hibridazioa modu espezifikoan burutzen da arrayeko zunda bakoitzean. Gainera, genotipo bakoitzerako hiru aldiz burutzen da hibridazioa. Hau dela eta, metodo honen sentsibilitatea eta espezifikotasuna oso altuak dira (54).

#### 1.4.2.5. Amplicor

Amplicor Roche Molecular Diagnostics etxe komertzialeko entsegua da. Metodo honen bidez HR-HPV 13 genotipo detektatu daitezke: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. Metodo honen bidez HPV genoma osoa detektatzen da.

Genotipatzerako orduan, DNAaren detekzioan onarritzen diren metodoak, Cobas<sup>®</sup> HPV, Linear Array, CLART eta Amplicor, beraien artean konkordantzia altua aurkezten dute. Metodo hauen artean, CLART eta Cobas<sup>®</sup> HPV metodoek adostasun handia aurkezten dute. Linear array beste bi metodoekin, Cobas<sup>®</sup> HPV eta Amplicor, konkordantzia altua aurkezten duen metodoa da (54, 59).

#### 1.4.2.6. Abbott RealTime High Risk HPV testa

Abbott RealTime High Risk HPV testa, aurrekoen moduan, HPVaren DNAren detekzioan oinarritzen da birusaren detekziorako. Metodo honen bidez HPVaren 14 genotipo antzeman daitezke eta denbora errealeko metodoek ematen dituzten onurak ditu.

Metodo honen erreproduzibilitatea, bai laborategi berdinen barnean zein laborategi desberdinetan, adostasun altua aurkezten du eta, hau dela eta, metodo hau, 30 urte edo adin gehiago duten emakumeetan umetoki lepoko minbiziaren bahetze primarioa egiteko balioetsi da (60).

#### 1.4.2.7. Aldaera intratipikoen analisisia

Aurreko ataletan deskribatu izan diren metodo gehienek HPV DNAren detekzioa PCRan oinarritzen dute. Teknika hau aldaera intratipikoen detekziorako ere erabili daiteke. HPV-16ren edo HPV-18ren eskualde desberdinetarako espezifikoak diren primerrak erabiltzen dira PCRren bidez intereseko HPVaren eskualdea amplifikatzeko. Ondoren, aplikoiak sekuentziatu egiten dira. Lortutako sekuentziak, Genbank base datuan dauden beste erreferentziazko sekuentziekin konparatzen dira eta horrela HPV-16 eta HPV-18 genotipoen aldaera intratipikoak definitu daitezke (30, 31).

**5. taula.** DNAn oinarriz HPVaren detekziorako dauden metodo desberdin nagusienak (54, 60-62).

HPV TEKNIKA						
	Linear Array	Cobas HPV	Amplicor	Hibrido harrapaketa proba (HC2)	Abbott RealTime High Risk HPV testa	CLART
<b>Etxe komertziala</b>	Roche Molecular Diagnostic, Alemania	Roche Molecular Diagnosti, Alemania	Roche Molecular Diagnostics, Alemania	Qiagen, AEB	Abbott, AEB	Genomica, Espainia
<b>Detektaturiko genotipoak</b>	6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, CP6108	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85, 89
<b>Detekziorako erabilitako teknologia</b>	<b>Line-blot assay</b>	Denbora errealeko PCRa	PCRa	Sandwich erako harrapaketa molekularra	Denbora errealeko PCRa	PCRa + mikroarray
<b>DNA/RNA eta HPV itu genea</b>	DNA <i>L1</i> genea	DNA <i>L1</i> genea	DNA Genoma osoa	DNA Genoma osoa	DNA <i>L1</i> genea	DNA <i>L1</i> genea

#### 1.4.2.8. Sekuentziazio masiboa

Gaur egun HPVaren genotipoen determinaziorako PCR bidezko anplifikazioan oinarritzen diren metodo desberdinak erabiltzen dira. Hala ere, oso garrantzitzua bihurtzen ari da HPV aplikoiaren sekuentziazio eraginkorra egin dezaketen metodologiaren aplikazioa, bai birusaren aldaeren ikerketa epidemiologirako zein birusaren aurkako txertaketa programen eraginkortasunaren ikerketarako. Gainera, HPVaren genotipo desberdinek eta aldaera intratipiko desberdinek ahalmen onkogeniko desberdina dutela behatu egin da. Hau dela eta, HPVaren detekzioa eta genotipoaren determinazio zehatza funtzeskoa da (63, 64).

Munduko Osasun Erakundearen (MOE) gaitasun ikerketa globalaren arabera, HPVaren genotipoaren determinaziorako erabiltzen diren metodoak hobetzearen beharra dago ikerketan parte hartu zuten laborategietan lortu ziren positibo-faltsu eta negatibo-faltsu kopuru altua dela eta (64). Honetarako NGS (*Next-generation sequencing*) teknologia proposatu da.

Lehen giza genoma sekuentziatu zenetik, sekuentziazio metodo arinago eta merkeagoen eskaera hazi egin da. Eskaera honek bigarren belaunaldiko sekuentziazio metodoen edo next-generation sequencing (NGS) teknologiaren garapena ekarri du. NGS plataformek sekuentziazio masibo paraleloa burutzen dute eta, honen bitartez, lagin bakarreko milioika DNA zati aldi berean sekuentziatuak dira. Sekuentziazio masibo paralelo honen bitartez genoma osoa egun bakar batean sekuentziatu daiteke (65).

NGS teknologiak HPVaren tipifikazio prozesurako hainbat abantaila eskaintzen ditu (64):

- ✓ Sekuentziazioan oinarritzen den metodo batek ematen duen espezifikotasun altua.
- ✓ Detektagarriak diren HPV genotipoen espektro zabala, oraindik aurkitu ez diren HPV genotipoak barne.
- ✓ Aldaera intratipikoak eta mutazioak antzemateko ahalmena.
- ✓ HPV genotipo desberdinak antzemateko ahalmena eta infekzio anitzetan genotipo bakoitzaren kopuru erlatiboa balioztatzeko aukera.

## 1.5. BIOMARKATZAILEAK

Lehen aipatu bezala, HPVaren infekzioak aktiboak, latenteak edo iraunkorrak izan daitezke. Infekzioak iraunkorrak direnean *E6* eta *E7* onkogeneen desregulazioa gertatzen da eta honen ondorioz, *E6* eta *E7* onkoproteinen etengabeko adierazpena ematen da (66-69).

Aurreko ataletan deskribatutako metodoen bidez, HPVak sortutako lesioak (zitologia baginala) edo HPVaren presentzia (DNAREN detekzioa PCRren bidez edo HC2 metodoa) antzeman dezakegu eta, nahiz eta umetoki lepoko minbiziaren intzidentzia eta hilkortasuna gutxitzeko baliagarriak izan diren, estrategia hauek ez dira guztiz eraginkorrak umetoki lepoko minbizia aurreratzeko (70-72).

Hau dela eta gero eta garrantzitsuagoa bihurtzen ari da infekzioaren egoerari buruzko informazioa ematen duten biomarkatzaileak aurkitzea. Markatzaile hauek balio prediktibo positibo (PPV- Positive Predictive Value) altua izan beharko lukete umetoki lepoko minbiziaren baheketarako erabili ahal izateko. Orain arteko ikerketen arabera, umetoki lepoko minbiziarentzako etorkizun handiko biomarkatzailea *E6* eta *E7* onkogeneen RNA mezulariaren (mRNA) adierazpenaren detekzioa da (73).

HPVaren *E6/E7* mRNAREN detekziorako testa DNAREN detekzioa baino espezifikagoa da. Hau dela eta, HPVarekin kutsatuta dauden emakumeen jarraipenerako erabilgarria izan daiteke, emakume hauei egindako kolposkopia kopurua txikituz. Hala ere, HPVaren mRNAREN detekzioaren bidez metodoaren sentsibilitate baxuagoa onartu behar dugu (74, 75).

*E6* eta *E7* onkogeneen detekziorako hainbat metodo desberdin daude: PreTect HPV-Proofer, NucliSens EasyQ eta APTIMA (6. taula). Lehenengo bi metodoek denbora errealeko azido nukleikoen sekuentzian oinarritutako anplifikazio (NASBA) entsegu konplexua erabiltzen dute onkogeneen detekziorako eta 16, 18, 31, 33 eta 45 genotipoen *E6* eta *E7* onkogeneen RNA mezularia detektatzen dituzte. Hirugarren metodoak transkripzio-bitarteko anplifikazioa erabiltzen du onkogeneen detekziorako eta 14 HPV genotiporen onkogeneen adierazpena antzemateko gai da (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 genotipoak). PreTect HPV-Proofer eta NucliSens EasyQ probak NASBA teknologia erabiltzen dute. NASBA kondizio isotermaletan (41°C) anplifikatzen duen anplifikazio entzimatikoa da. Honetarako *Escherichia coli* Rnasa H,

AMV alderantzizko transkriptasa eta T7 RNA polimerasa entzimak erabiltzen dira. Aldiz, APTIMA probak, TMA teknologian oinarritzen dena, MMLV alderantzizko transkriptasa eta T7 RNA polimerasaren bitartez burutzen du anplifikazioa (54, 61, 62).

PreTect HPV-Proofer eta NucliSens EasyQ metodoek APTIMA baino espezifikotasun kliniko altuagoa dute, baina, bestalde, APTIMAk beste bi metodoak baino sentsibilitate altuagoa aurkezten du (61). Metodoen arteko adostasunari dagokionez, hasiera batean RNAREN detekzioan oinarritzen diren metodoen arteko konkordantzia altuagoa izatea espero da. Hala ere, *E6* eta *E7* onkogeneen mRNAREN detekziorako APTIMA testa, DNAAREN detekzioan oinarritzen diren metodoekin adostasun altuagoa erakusten du. Aldiz, PreTect HPV-Proofer testa mRNAREN detekzioan oinarritutako metodoekin konkordantzia altuagoa du (59).

Beraz, onkogeneen detekziorako metodoaren aukeraketa guztiz erabakigarria izan daitekela ikus daiteke, bai hauen artean aurkezten dituzten desadostasunegatik, bai hauen sentsibilitate eta espezifikotasun balioak desberdinak direlako.

**6. taula.** HPVaren *E6* eta *E7* onkogeneen detekziorako dauden metodo desberdin nagusienak (54, 60-62).

	HPV TEKNIKA		
	PreTect HPV-Proofer	NucliSens EasyQ	APTIMA
<b>Etxe komertziala</b>	NorChip, Norbegia	bioMérieux, Frantzia	Hologic, AEB
<b>Detektaturiko genotipoak</b>	16, 18, 31, 33, 45	16, 18, 31, 33, 45	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
<b>Detekziorako erabilitako teknologia</b>	Denbora errealeko NASBA entsegu konplexua	Denbora errealeko NASBA entsegu konplexua	TMA
<b>DNA/RNA eta HPV itu genea</b>	RNA <i>E6</i> eta <i>E7</i> geneak	RNA <i>E6</i> eta <i>E7</i> geneak	RNA <i>E6</i> eta <i>E7</i> geneak

## 1.6. TRATAMENDUA ETA PREBENTZIOA

### 1.6.1. Lesioen aurkako tratamendua

HPVak sortutako lesioen tratamenduari dagokionez, emakumeetan, gradu altuko lesio guztiak tratatzeko akordioa dago medikuen artean. Lesio hauek minbiziraino aurrera egin dezakete eta horregatik tratatu behar dira.

Normalean lesio hauen tratamendua ekszizionala da (euskarri diatermiko erabiliz). Modu honetan lesio osoaren azterketa histologikoa baimentzen da eta gainera, metodo honek, mikroinbasioak baztertzea baimentzen du. Beste lesio batzuetan, minbiziraino aurrera egitea hain agerikoa ez den lesioetan, laserra erabili daiteke lesioen tratamendurako. Laserraren bidezko tratamenduaren abantaila hain agresibo eta ebakitzaila ez dela da. Hala ere emakume hauei jarraipen zorrotza egin behar zaie berreritzeak eman ahal direlako. Kontrolak 3 hilero izaten dira lehen urtean, 4 hilero bigarren urtean eta, berreritzerik ez agertzekotan, ondoren urteko kontrola egiten zaie (76).

Gradu baxuko lesioen artean ez dago tratamenduaren inguruko adosmenik. Iritzi desberdinak daude lesio hauen tratamenduaren inguruan (76):

- Lesioen eboluzioaren zain mantentze eta bakarrik iraunkorrak edo aurrera egin duten lesioak tratatzea. Izan ere gradu baxuko lesioen kopuru oso altu batek tratamendurik gabe atzera egiten dute eta modu honetan bakarrik senda daitezkeen lesioen tratamendua ekiditen da.
- Lesio guztiak tratatzea. Jokaera honen aldekoak direnen ustez, gaur egun dauden tratamenduen sendaketa tasa oso altua da eta horrela minbiziraino aurrera egin dezaketen lesioekin bukatzea posiblea da. Gainera lesioak tratatzeak, lesioen eboluzioari itxarroteak baino inpaktu psikologiko baxuagoa du emakumeetan.
- Genotipoaren arabera tratamendua ezartzea. Honen aldekoak direnen ustez, HPVarekin infektaturik dauden emakumetan genotipoaren edo genotipoen determinazioa burutu behar da eta emakume hauek arrisku altuko genotiporen batekin kutsaturik egotekotan emakume hauek soilik tratatu behar dira.

Gradu baxuko lesioak dituzten emakumeen jarraipena 6 hilero egiten da lehen urtean eta ondoren urtero kontrola burutzen zaie.

Birus honek gizonezkoetan ere lesioak sor ditzake. Gizonezkoetan sortutako lesio azpiklinikoen tratamenduaren inguruan eztabaida handia dago. Gizonezkoetan birusak duen ahalmen kutsakorren gradua ez da ezagutzen eta gainera lesio hauetako gehienak atzera egiten dute tratamenduaren beharrik gabe. Hala ere, nahiz eta lesioen tratamendurik ez egin, HPV infekzioaren adierazpen morfologikoa den lesio azpikliniko bat antzematen denean gizon horien jarraipena eta zainketa egin behar da (76).

### **1.6.2. Prebentzioa**

Gaur egun HPVaren prebentziorako bi programa desberdin ditugu: txertoak, lehen mailako prebentzioa, eta bahetzea, bigarren mailako prebentzioa.

#### 1.6.2.1. Txertoak

Orain arte giza papilomabirusaren aurkako bi txerto eskuragarri izan ditugu: txerto bibalente bat, Cervarix<sup>®</sup> izena duena (16 eta 18 genotipoen aurkako immunitatea sortzen duena) eta txerto tetrabalente bat, Gardasil<sup>®</sup> izena duena (arriku baxuko 6 eta 11 genotipoen aurkako eta arriku altuko 16 eta 18 genotipoen aurkako immunitatea sortzen duena) (77). Cervarix<sup>®</sup> GlaxoSmithKline etxe komertzialeko produktua da eta Gardasil<sup>®</sup> Merck Sharp & Dohme edo MSD enpresa farmazeutikoaren txertoa da.

Baina aurten, 2015. urtean, txerto berri bat onartu egin da; Gardasil<sup>®</sup> 9 txertoa, MSD etxe komertzialeko txerto berria. Komisio Europarrak Gardasil<sup>®</sup> 9 txertoa kaleratzea baimendu du. Txerto hau 9 urte baino gehiagoko emakume eta gizonezkoetan erabili daiteke HPVak sortutako lesioen prebentziorako. Txerto berri honen berritasuna 9 genotipoekiko babesa eskaintzen duela da; Gardasil<sup>®</sup> 9 txertoa arriku altuko 7 genotipoen aurkako immunitatea ematen du (16, 18, 31, 33, 45, 52 eta 58 genotipoak) eta arriku baxuko 2 genotipoekiko babesa eskaintzen du (6 eta 11 genotipoak) (7. taula) (78).



**7. taula.** HPVaren prebentziorako eskuragarri dauden 3 txertoen ezaugarriak.

<b>Txertoaren izena</b>	<b>Cervarix®</b>	<b>Gardasil®</b>	<b>Gardasil® 9</b>
<b>Etxe komertziala</b>	GlaxoSmithKline	Merck Sharp & Dohme	Merck Sharp & Dohme
<b>Printzipio aktiboa (VLPs - Virus Like Particles)</b>	16 eta 18 (20, 20 µg)	6, 11, 16 eta 18 (20, 40, 40, 20 µg)	6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 eta 58  (30, 40, 60, 40, 20, 20, 20, 20, 20 µg)
<b>Laguntzailea</b>	AS04 formulazioa: aluminio hidroxido 500 µg, A lipido monofosforil 50 µg.	AAHS edo aluminiozko hidroxifosfato sulfato amorfoa (Amorphous Aluminum Hydroxyphosphate Sulfate)	AAHS edo aluminiozko hidroxifosfato sulfato amorfoa (Amorphous Aluminum Hydroxyphosphate Sulfate)
<b>L1 proteinaren produkzioa</b>	<i>Baculovirus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Cervarix® eta Gardasil® txertoak bai FDAak (Food and Drug Agency) zein EMEAak (European Medicines Agency) onartu egin dituzte. Txertaketarako gomendioak herrialde bakoitzean desberdinak badira ere, orokorki, neska nerabe gazteak izaten dira txertaketaren hartzaileak. Hamaika edo hamabi urte arteko neskek txertatzea gomendatzen da, harreman sexualak hasi aurretik. Hala ere, Gardasil® emakume gazteetan ere eraginkorra dela frogatu izan da. EABtan Gardasil® 26 urte baino gutxiagoko emakumeetan erabiltzea onartu izan da, baina ez 26 urte baino gehiagoko emakumeetan. Aldiz, Australian, Cervarix® txertoa 26 urte baino gehiagoko emakumeetan erabiltzea baimendu izan da, emakume talde honetan txertoaren eraginkortasuna frogatu ondoren (79).

Txertaketarako jarraibide desberdinak jarraitzen dira bai txertoaren arabera zein emakumearen adinaren arabera. Cervarix<sup>®</sup> txertoaren 2 dosi eman behar dira 9-14 urte arteko emakumetan immunitate osoa lortzeko. Aldiz, txerto berdina 15 urte baino gehiagoko emakumeetan erabiltzen bada 3 dosi eman behar dira: 0, 1 eta 6 hilabetetan. Bestalde, Gardasil<sup>®</sup> txertoaren kasuan, 2 edo 3 dosi eman daitezke 9-13 urte arteko emakumeetan immunitate osoa lortzeko. Hiru dosi ematen badira, bigarren dosia, lehenengo dosia eman eta hilabete bete edo bi hilabete ondoren eman behar da eta, hirugarren dosia, lehen dosia eta 6 hilabete geroago eman behar da. Bi dosi administratzea aukeratzen bada, bigarren dosia lehen dosia eman eta 6 hilabete geroago eman behar da. Gardasil<sup>®</sup> txertoaren 3 dosi eman behar dira 14 urte baino gehiagoko emakumeen kasuan: 0, 2 eta 6 hilabeteetan (80). *Euskal Autonomia Erkidegoan 2 dosi ematen zaizkie Derrigorrezko Lehen Hezkuntzaren 6. kurtsoa ikasten ari diren neskei (81)*. Dosiak, ahal den neurrian, HPV txerto berdinenak izatea gomendatzen da. Hala ere, txertoa eskuragarri ez badago, edozein HPV txerto erabil daiteke 3 dosien bidezko txertaketa bukatzeko (79).

Giza papilomavirusaren kontrako txerto hori, minbizia prebenitzen duen lehen txertoa, txertaketa-egutegian barneratuta dago (gure lurraldean soilik emakumeentzat) eta beraz etorkizunean 16 eta 18 genotipoen detekzioa murriztea espero da. Horren eraginez, arrisku altuko beste genotipo batzuen prebalentzia handitzea espero da. HPV 16 eta 18 genotipo ohikoenak direnez, txertoaren eraginez hauek murriztean, portzentaje baxuan agertzen diren arrisku altuko beste genotipo batzuen prebalentziaren igoera gertatzea espero da. Hori dela eta, gaur egun populazioan portzentaje txikiagoan agertzen diren arrisku altuko genotipoen banaketa ezagutzea izugarri garrantzitsua da. Gainera, arrisku altuko beste genotipo horiek patologiarekin duten erlazioa ezagutzea oso baliagarria izan daiteke.

Bestalde, gaur egun, gizonezkoak ere txertatu beharko liriatekeen ala ez gori-gorian dagoen gaia da (82, 83). Izatez, lurralde batzuetan, Australia kasu, gizonezkoak ere txertatu egin dira. Izan ere, gizonezkoen genitaletan minbizia sortzeko ahalmena ere badu birus honek, nahiz eta minbizi mota horien kasu kopurua askoz ere baxuagoa izan. Gainera, sexu bidez transmitituriko gaixotasuna denez, gizonezkoak txertatuz beraien bikote sexualak ere babestuko liriateke. Hala ere, gizonezkoetan Gardasil<sup>®</sup> txertoa erabiltzea baino ez dago onartua eta 9 eta 26 urteko gizonezkoetan soilik (79).

### 1.6.2.2. Populazioa-bahetzea

Bahetzea sintomarik gabeko pertsonak gaixotasun bat izateko "probable" edo "gertagaitz" bezala sailkatzeko aurrez baliozkotutako testa erabiltzen duen Osasun Publikoko ekimena da. Bahetze-proba batek bere erabileran erraza izan behar du, jasotzen duenarentzako eroso eta errepikagarria bere emaitzetan; baina hartatik ez da diagnostiko bat itxaron behar: helburua bere aplikazio sistematikoaren ondorioz ikertutako populazioarengan gaixotasun arazoak eragindako hilkortasuna txikiagotzea da. Populazio-Bahetzeak Lehen Mailako Asistentzian oinarritutako berezko egitura du, errolda-oinarria erabiltzen du itu emakumeen bilketa aktiborako, etortzen ez diren emakumeentzako bir-dei sistemekin, soilik baliozkotutako bahetze-teknika eskaintzen du eta ebaluazio, kontrol eta antzemandako kasuen balizko tratamendurako Asistentzia Espezializatuko bigarren mailako deribazio zirkuituak ditu (38).

Umetoki lepoko minbizi bahetzerako, tradizionalki, zitologia edo Papanicolaouren proba erabili izan da. Nahiz eta zitologia umetoki lepoko minbiziaren morbiditatearen murriztapenari ikaragarri lagundu izan dion, minbiziaren aurrekariak diren lesioak antzemateko bere sentzibilitatea oso baxua da, % 55,4tako gutxi gorabehera. Ginekologiako eta Obstetriziako Gizarte Espainiarrak proba hori proposatzen du 30 urte baino gehiagoko emakumeentzat eta txertatutako kohorteen bahetzerako (84).

Bestalde, bahetze zitologikoa eskasa azaldu da umetoki lepoko adenokartzinomaren aurkako prebentzioan. Espainian umetoki lepoko kartzinoma ezkatadun inbaditzailearen intzidentzia egonkor mantendu da. Hala ere, azken datuek urteroko % 1eko igoera estimatu dute, ziur aski bahetze zitologikoaren egitura oportunistagatik, egitura hobegarria, zeina ekitatea zigortzen duen (kontsultara ez doan emakumea ez da bahetzen), osasun-sistemarengan maiztasun altuaz jotzen duten emakumeen errekurtsoak gain-erabiltzeko joera duen eta nekez, estaldura nahikoetara heltzen den (eraginkortasun eza). Estaldura altuetara heltzea prebentzio-programako arrakastarekin erlazionatutako funtsezko aldagai da. Espainian umetoki lepoko minbiziaren hamar kasuetatik zortzik bahetze desegokiko historia duten emakumeengan agertzen dira. Espainian bahetze zitologikoaren estaldura % 75,6an estimatu da, lurralde arteko desberdintasun zabalekin (32).

Espainian DNA biralaren determinazioa barneratzen duen bahetze estrategia berria proposatu da 35 urte baino gehiagoko emakumeentzat (8. irudia). Politika horiek

eraginkortasuna hobetzen duela deskribatu da, bahetze zitologiko konbentzionala baino eraginkorragoa da eta adenokartzinoma zerbikalen tasen gainean inpaktua izan dezake. DNA zunda molekularren erabilera eta frotis zerbikal eta laginetako PCRa diagnostikoa egiaztatzeke eta HPVaren infekzioa sailkatzeko aukera metodoak dira. Hala ere, HR-HPVetako DNAREN detekzio probaren egiazkoa balioa, CIN3rik garatuko ez denaren segurtasunarekin bahetzeak denboran zehar banatzea baimentzen duena % 100 inguruko bere predikzio balio negatibo altua da, gutxienez 3 urtez eta autore batzuen ustez 5 urtez. Halaber, kontuan izan behar da HPV genotipo guztiek ez dutela onkogenizitate gradu bera aurkezten. 16 eta 18 genotipoak CIN3 lesioen % 70etan eta umetoki lepoko minbizi kasuen % 75etan aurkitzen dira (32, 36). Genotipo hauengatik infektatuak dauden emakumeek CIN3 garatzeko arrisku altuagoa dutela egiaztatu da.

Konparatuz, umetoki lepoko laginetan HR-HPV genotipoen DNAREN detekzioak minbizi aurreko lesioak antzemateko % 96,6 sentsibilitatea du, nahiz eta zitologia baino espezifikotasun baxuagoa duen (85). Berriki, nahiz eta zitologia normala edo esanahi zalantzarik ezohiko zelulak (ASCUS) izan, genotipo hauekin infektatutako 30 urte baino gehiagoko pazienteen jarraipen desberdina proposatu da (84, 86). Beraz, oso garrantzitsua da DNAREN detekzio probek HR-HPV genotipoak detektatzea eta aldi berean, 16 eta 18 genotipoak identifikatzea paziente hauen jarraipen sakona egiteko.

Lehen sexu harremanaren ondorengo 3. urtean lehen zitologia.

Urtero zitologia lehengo 2 urteetan.

3 urtero 30 urte izan arte (lehenengo 2 zitologiak negatiboak izan ondoren).

Urtero GIB birusarentzako positiboak diren emakumeetan edo immunokonprometituak dauden emakumeetan.

30 urte betetzerakoan zitologia eta HPV testa.

- Biak negatiboak badira 5 urte geroago biak errepikatu
- Zitologia normala baina HPV positiboa bada --> Genotipoaren determinazioa
- HPV-16 edo HPV-18rako positiboa bada: kolposkopia
- Beste genotipo batzuk baditu: urte bete geroago zitologia eta HPV testa errepikatu
- Zitologia positiboa bada:
  - **ASCUS:**
    - <21 urte: urte bete geroago zitologia errepikatu.
    - >21 urte: kolposkopia
  - **LSIL:**
    - <21 urte: urte bete geroago zitologia errepikatu
    - >21 urte: kolposkopia
    - +50 urte: HPV testa
  - **HSIL/ minbizia: kolposkopia**

**8. irudia.** Ginekologiako eta Obstetriziako Gizarte Espainiarrak umetoki lepoko minbiziaren bahetzerako proposatutako estrategia (38).



## ***2. HELBURUAK***

---





Giza papilomavirusak sortzen duen umetoki lepoko minbizia emakumeen artean bigarren minbizi mota arruntena da eta urtero 250.000 emakume baino gehiagoren heriotza sortzen du. Hori dela eta, guztiz beharrezkoa da HPVaren infekzioan inplikaturik dauden HPV genotipo eta aldaera intratipikoak ezagutzea.

Aurrekoarekin batera, gure ikerketa honen helburua hurrengoak izan da:

- ✓ **1. helburua:** arrisku altuko genotipoen detekzioarako teknika azkarra erabiliz, Bilboko Basurtuko Unibertsitate Ospitalearen eremuko emakume populazio batengan giza papilomavirusaren presentziaren populazio-bahetzea burutzea eta bahetutako emakumeen artean, HPV-16 eta HPV-18 genotipoen aldaera intratipikoak antzematea.

Aurreko ikerketetan ikusi ahal izan denez, aldaera intratipikoak onkogenotasun desberdina aurkezten dute eta, beraz, hauen banaketa ezagutzea funtsezkoa izan daiteke HPVaz kutsatutako emakumeen jarraipenerako.

Hau dela eta, gure lan honen beste helburu bat hurrengoak izan da:

- ✓ **2. helburua:** HPV-16arekin eta beste genotipo batzuekin kutsatuta zeuden, hau da, HPV-16 infekzio anizkoitza zuten emakume eta gizonezkoetan aldaera intratipikoen banaketa aztertzea eta aldaera intratipikoen eta pazienteen adin eta patologiaren arteko erlazioa aztertzea.

Gainera, gaur egun, infekzio anizkoitzak maiz detektatzen dira HPVaz kutsaturiko emakume eta gizonezkoetan. Hau dela eta gure ikerketaren beste helburu bat hurrengoak izan da:

- ✓ **3. helburua:** HPV-16 infekzio anitza edo banako infekzioa duten pazienteetan aldaera intratipikoak patologiarekin izan dezaketen erlazio posiblea aztertzea.

Bestalde, HPVak sortzen duen umetoki lepoko minbiziarentzako biomarkatzaileen bilaketan, HPVaren E6 eta E7 geneen RNA mezulariaren azterketa etorkizun handikoa dirudi. RNA mezulariaren ikerketaren inguruan gure lan honetan hurrengo bi helburuak izan ditugu:

- ✓ **4. helburua:** HPV E6/E7 mRNA umetoki lepoko minbiziarentzat biomarkatzaile eraginkorra ahal den aztertzea, aztertutako emakumeei lagina hartu eta hurrengoko bi urteetan klinikaren jarraipena burutuz.
- ✓ **5. helburua:** RNAren erauzketarako hiru metodo desberdinek E6/E7 mRNAren detekzioan duten inpaktua aztertzea erauzketa metodoen emaitzak eta patologia erkatuz.

### ***3. METODOLOGIA***

---



### **3.1. POPULAZIO BAHEKETA BILBOKO BASURTUKO UNIBERTSITATE OSPITALEAREN ALDEAN**

#### **3.1.1 Laginak**

Bilboko Basurtuko Unibertsitate Ospitalearen aldean Ginekologia zerbitzuetan arduratutako 912 emakumeen 912 umetoki lepoko lagin azertu ziren HPVaren populazio-bahetzerako. Laginak zitologia likidoko ontzietan jaso ziren (PreservCyt, Cytoc Corporation, Boxborough, MA) eta giro tenperaturan metatu ziren Cobas<sup>®</sup> HPV Testarekin ikertu arte (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

#### **3.1.2 Cobas HPV Testa**

Arrisku altuko giza papilomavirusen detekziorako Cobas<sup>®</sup> HPV Testa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) erabili da. Test hori 14 HR-HPV aldi berean antzematen dituen denbora errealeko PCR sistema erabat automatizatua da: HPV-16 eta HPV-18 banaka eta gainera arrisku altuko beste 12 genotipo aldi berean (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Azido nukleikoen erauzketa sistema (cobas X), amplifikazioa sistema (cobas Z) eta HPV L1 eskualdeko primerrekin denbora errealeko PCR buruketarako beharrezko softwareaz osatuta dago.

Emaitzak lau kanale berezietan agertzen dira pantailan: 16 genotipoa, 18 genotipoa, beste HR-HPV batzuk (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) eta lagin bakoitzean barne kontrol gisa erabiltzen den beta-globina. Sistemak Ct balioa (threshold cycle) edo atalase-zikloa adierazten digu, amplifikatutakoa antzematen den zikloaren balioa adierazten duena.

#### **3.1.3 DNA genomikoaren erauzketa**

HPV-16 eta HPV-18 positiboak ziren laginen DNA erauzketa QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kita (Qiagen, Hilden, Alemania) erabiliz burutu zen. Kita fabrikatzailearen argibideak jarraituz erabili zen. Kit honek zutabeak erabiltzen ditu DNAREN erauzketarako. Gainera, DNAREN erauzketarako proteasa bat, bi garbiketa buffer eta eluzio bufferra (AE) erabiltzen ditu.

Erauzitako DNA 100 µl AE eluzio bufferraren bidez eluitu zen eta -20°Ctan gorde zen amplifikazioa burutu arte.

### 3.1.4 Anplifikazioa eta sekuentziak

DNA erauzketaren ondoren, aldaerak antzemateko, PCRaren bidez HPV-16aren eta HPV-18aren E6, E7 eta L1 eskualdeen amplifikazioa burutu zen. E6, E7 eta L1 geneen amplifikazioa HPV-16arentzeko eta HPV-18arentzako espezifikoak ziren primerrak erabiliz burutu zen. Primer hauek HPV-16 eta HPV-18 genotipoen prototipoa den genomari oinarrituz diseinatuak izan ziren (Genbank sarrera zenbakia K02718 eta NC001357, hurrenez hurren) (8. taula).

**8. taula.** Hiru eskualdeen amplifikazioarentzat erabilitako primerrak: L1, E6 eta E7 .

Genotipoa	Eskualdea	Primerrak	Anplifikatutako zatia (bp)
HPV-16	L1	MY9 → 5'- CGTCCTAAAGGAACTGATC -3' MY11 → 5'- GCACAGGGCCACAATAATGG -3'	452
	E6	E6a → 5'- GAAACCGGTTAGTATAAAAAGCAGA -3' E6b → 5'- AGCTGGGTTTCTCTACGTGTTCT -3'	503
	E7	E7a → 5'- CCATAATATAAGGGGTCGGTGGA -3' E7b → 5'- CATTTTCGTTCTCGTCATCTG -3'	507
HPV-18	L1	MY9 → 5'- CGTCCAAGGGATATTGATC -3' MY11 → 5'- GCACAGGGTCATAACAATGG -3'	455
	E6	E6F → 5'- AGTAACCGAAAACGGTCGGGA-3' E6R → 5'- GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA-3'	454
	E7	E7F → 5'- TGAAAAACGACGATTCACAAC-3' E7R → 5'- ACCTTCTGGATCAGCCATTG-3'	462

PCRren bidezko amplifikazioa 30 µl erreazio nahasketan egin zen. Anplifikazio nahasketak hurrengo osagaiak zituen: 10×PCR Bufferra, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, deoxinukleosido bakoitzeko 25 mmol/L, primer bakoitzeko 100 pmol/L, intereseko DNAREN 5 µl eta Taq DNA polimerasaren (Qiagen) 2,5 U.

Laginak 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems) termoziklatzailean amplifikatu ziren 40 zikloko programa baten bitartez. PCR baldintzak direla eta, profil termikoa 95°Cko aurre-beroketa 15 minuturekin hasten zen, ondoren eraztuntzea 55°Cko 40 ziklorekin jarraitzen zuen eta amaitzeko, azken luzapena, 10 minutuz 72°Ctan eman zen (9. taula).

**9. taula.** Amplifikazio baldintzak.

Ziklo-kopurua	Temperatura	Denbora
1	95°C	15 minutu
40	95°C	30 segundu
	55°C	30 segundu
	72°C	30 segundu
1	72°C	10 minutu

Ondoren, amplifikazio prozesuaren egiaztapenerako agarosa gelean egindako elektroforesia erabili zen. Agarosa gelean (% 2) xingola espezifikoen bistaratzeak amplifikatutako DNAREN presentzia egiaztatu zuen. Ondoren amplifikatutako DNA sekuentzien sekuentziazioa burutu zen Big Dye Terminator Cycle Sequencing kita (Applied Biosystems) fabrikatzailearen argibideen arabera erabiliz. Sekuentziaziorako amplifikazioan erabilitako forward primer berdinak erabili ziren. Sekuentziazioa egiteko UPV/EHUKO Zientzia eta Teknologia Fakultatearen DNA sekuentziazio zerbitzura (SGIker) bidali ziren laginak.

### **3.1.5. Aldaera intratipikoak, birkonbinazioa eta zuhaitz filogenetikoak**

Lortutako segidak GenBankean mugatutako erreferentzia segida desberdinekin konparatu ziren eta lerrokatzea eta segida erkaketa ClustalW eta BLAST programen bitartez egin zen.

HPV sekuentziak A leinukoa den HPV-16 prototipoaren eta HPV-18 prototipoaren sekuentziarekiko lerrokatu eta konparatu ziren (Genbank sarrera zenbakia K02718 eta NC001357, hurrenez hurren). Lerrokapenerako Chromas Lite Sequence Alignment Editorearen 2.1.1 bertsioa eta Clustal W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) programak erabili ziren. Sekuentziak HPV-16arekiko edo HPV-18arekiko bere antzekotasunaren arabera leinu batera edo bestera esleitu ziren.

HPV-16aren aldaera intratipikoen konparaketarako 4 leinu desberdinen erreferentziako DNA sekuentziak erabili ziren: A leinuko erreferentzia sekuentziak (AY686580, AY686581, AY686584, EU11817, AF536179), B leinuko sekuentziak (AF472508, AF536180), C leinuko sekuentzia (AF472509) eta D leinuko erreferentzia sekuentziak (AF402678, AY686579). Hala ere, *L1* genearekiko diseinatutako primerrak HPV-16 genotipoaz gain beste genotipo batzuk ere amplifikatzen zituen. Beraz, eskualde horren sailkapen egokia egiteko, hau da, DNA sekuentziak HPV-16 genotipoarenak zirela baieztatzeko, BLAST programa erabili zen (87).

HPV-18aren aldaera intratipikoen konparaketarako 3 leinu desberdinen erreferentziako DNA sekuentziak erabili ziren: A leinuko erreferentzia sekuentziak (A2 azpi-leinuko sekuentzia EF202146 eta A3 eta A4 azpi-leinuetako sekuentziak EF202147 eta EF202151, hurrenez hurren), B leinuko sekuentziak (EF202155, EF202152) eta C leinuko sekuntzia (KC470229).

Behin aldaera intratipikoen sailkapena eginda zegoela, sekuentzien analisi filogenetikoa burutu zen. Analisi filogenetikoa zuhaitz filogenetikoaren bitartez egin zen; horretarako MEGA softwarearen 5. bertsioa erabili zen (88). Software hau erabiliz Maximum likelihood edo probabilitate maximoko metodoa erabili zen eskualde bakoitzeko eta aztertutako hiru eskualdeetako zuhaitz filogenetikoak eraikitzeko.

Gainera, birkonbinazio prozesurik gertatu ahal zen antzemateko RDP3 programa informatikoaren hiru metodo desberdin erabili ziren (89). Sekuentziak Recombination Detection Program/RDP, Maxchi eta Chimaera metodoen bidez aztertu ziren RDP3 programa erabiliz.



## 3.2. HPV-16 GENOTIPOAREN ALDAERA INTRATIPIKOEN DETERMINAZIOA

### 3.2.1. Laginak

Basurtuko Unibertsitate Ospitaleko Mikrobiologia Klinikoko eta Infekzioaren kontroleko departamentuek 2007. urtetik 2013. urtera Harreman Sexualen bidez Transmittituriko Gaixotasunen kontsultatik bidalitako emakume eta gizonezkoen laginak aztertu zituzten HPVaz kutsatuta ahal zeuden aztertzeko.

Emakumeen laginak isipu baten bidez alde endo/ektozerbikaletik jaso ziren. Bestalde, HPVaren kutsapenarekin erlazionaturiko manifestazio klinikoak erakusten zituzten gizonezkoen laginak aztertu ziren. Gizonezkoen laginak lesioaren gainazaletik hartu ziren gatz-soluzio batez bustitako Dacron isipu batekin eta gatz-soluzio mililitro batean eseki ziren. Laginak  $-80^{\circ}\text{C}$ tan gorde ziren zitologia likidoko garraio medio konbentzionalean HPVaren presentzia aztertu arte.

Patologiari dagokionez, laginak 5 talde desberdinetan sailkatu ziren Bethesda sistema jarraituz: 1) normala (lesiorik gabe), 2) esanahi zalantzarrikoko ezohiko zelula ezkatadunak (ASCUS), 3) gradu baxuko lesio ezkatadun intraepiteliala (LSIL), 4) gradu altuko lesio ezkatadun intraepiteliala (HSIL) eta 5) zelula ezkatadunen kartzinoma. Gizonezkoen kasuan beste talde berri bat gehitu zen: kondiloma akuminatua.

### 3.2.2. Linear Array testa

Aztertutako laginetan genotipoen determinazio Linear Array HPV Genotyping Test (LA) kitaren bitartez burutu zen (Roche Molecular Diagnostics). Testa aurrera eramanez fabrikatzailearen argibideak jarraituz. Jabetza intelektualaren eskubideak direla eta, LA testak ez du HPV-52 genotipoa zuzenean antzematen. Genotipo hau detektatzeko zunda multzo bat erabiltzen du, HPV mix deitua. Zunda multzo honek 33, 35, 52 eta 58 genotipoen konbinazioa detektatzen du. Ikerketa honetan, HPV-33, 35 eta 58 genotipoentzat, banaka aztertutako, negatiboak ziren laginak baina HPV mix horrentzako positiboak zirenak HPV-52 bezala sailkatu ziren. Aldiz, HPV mixarentzako eta baita ere HPV-33, 35 eta/edo 58rako positiboak ziren laginak HPV-52 genotipoarentzako positibitate zalantzarria aurkeztu zuten eta, beste autore batzuek egiten duten bezala, lagin hauek HPV-52 genotipoarentzako negatibotzat hartu ziren (90). Orohar, test honek

HPV 37 genotipo antzeman ditzake (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 eta CP6108).

Genotipoaren determinazioaren ondoren aldaera intratipikoen azterketarako HPV-16arentzako positiboak ziren laginak hautatu ziren. HPVaren presentzia 2085 laginetan aztertu zen eta hautatik 243 lagin aukeratu ziren. Ikerketan barneratutako 92 lagin HPV-16az bakarrik kutsatuta zeuden eta 151 HPV-16 infekzio anitza zuten, hau da, HPV-16 eta beste genotipo batzuz kutsaturik zeuden emakumeetatik etorritako laginak ziren.

Paziente guztiei ikerketan parte hartuko zutelaz informatu zitzairen eta baimen informatua eman zuten ikerketan barneratu ahal izateko.

### **3.2.3. DNA genomikoaren erauzketa**

DNA erauzketa QIAamp<sup>®</sup>DNA mini Kita (Qiagen, Hilden, Alemania) erabiliz burutu zen 3.1.3. atalean azaldu den moduan.

### **3.2.4. Anplifikazioa eta sekuentziazioa**

*E6*, *E7* eta *L1* geneen amplifikazioa HPV-16arentzeko espezifikokoak ziren primerrak erabiliz burutu zen 3.1.4 atalean deskribatu izan den moduan.

### **3.2.5. Aldaera intratipikoak, birkonbinazioa eta zuhaitz filogenetikoak**

Aldaera intratipikoen determinaziorako, birkonbinazioaren detekziorako eta zuhaitz filogenetikoaren eraketarako 3.1.5. atalean definitutako pausuak jarraitu ziren.

### **3.2.6. Adinarekin eta lesioen korrelazioa HPV-16 aldaerekin**

Pazienteen adina eta lesio mota aldaera intratipiko talde bakoitzarekin erkatu egin ziren. Hauen arteko harremana aztertzeko Chi karratuaren proba eta elkarte estatistikoki garrantzitsurako Faktore Analisia egin zen Real Statistics Resource Pack erabiliz.

### **3.3. E6/E7 mRNA BIOMARKATZAILEAREN AZTERKETA**

#### **3.3.1. E6/E7 mRNA biomarkatzailearen eraginkortasunaren azterketa**

##### 3.3.1.1. Laginak

Bai Basurtu Unibertsitate Ospitaleko Sexu Harremanen bidez Transmittitutako Gaixotasunen kontsultatik bai Ginekologia kontsultatik 2007 eta 2014 urteen artean bidalitako emakumeen laginak aztertu ziren HPV infekzio posiblearen detekziorako. Laginak isipu baten bidez alde endo/ektozerbikaletik jaso ziren eta zitologia likidoko garraio medio konbentzionalan -80°Ctan gorde ziren HPVaren presentzia aztertu arte.

Patologoek laginak Bethesda sistema jarraituz sailkatu zituzten.

##### 3.3.1.2. Genotipoen determinazioa

Laginak arrisku altuko 14 genotipo antzematen dituen Cobas<sup>®</sup> HPV probarekin aztertuak izan ziren (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Alemania) (3.1.2. atalean definitua agertzen den moduan). Cobas<sup>®</sup> HPV proban 16 eta 18 genotipoak ez diren beste genotipoentzako positiboak izan ziren laginak Linear Array HPV Genotyping Testaren bitartez aztertu ziren lagin horien genotipo zehatzak zeintzuk ziren ezagutzeko (3.2.2. atalean deskribatzen den moduan).

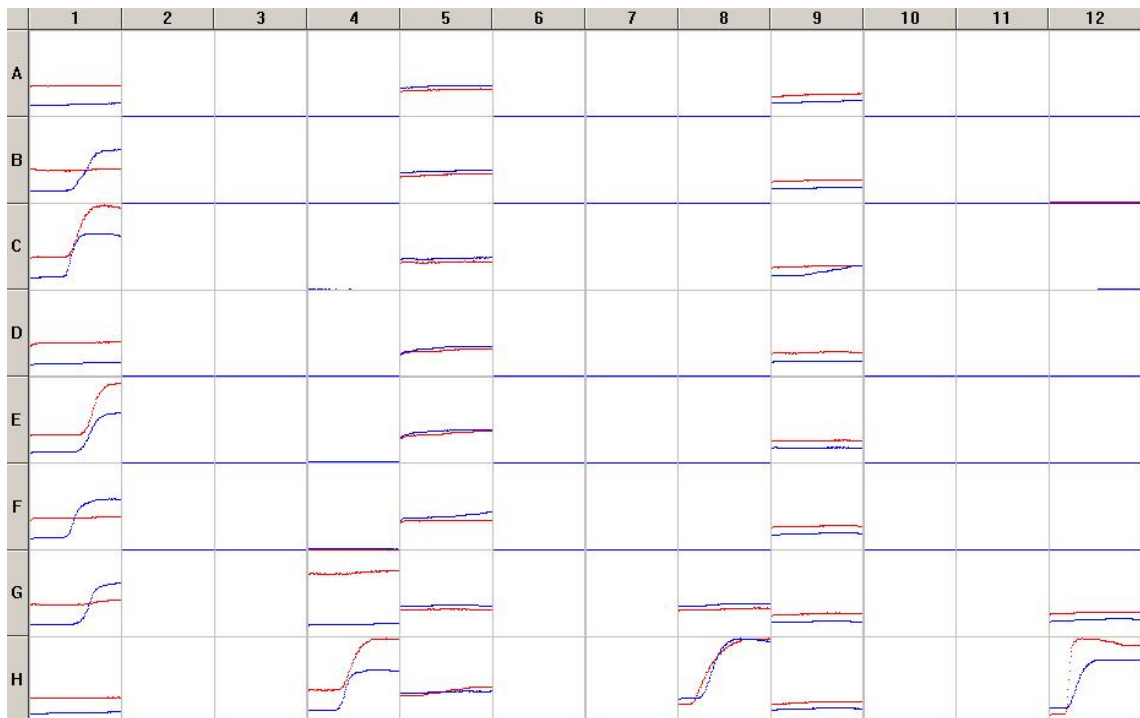
##### 3.3.1.3. RNAren erauzketa

RNA erauzketarako lagin bakoitzaren 200 µl erabili ziren. RNA erauzketarako NucliSENS lisis bufferra eta NucliSENS<sup>®</sup> miniMAG<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frantzia) erabili egin ziren fabrikatzailearen argibideei jarraituz. bioMérieux etxe komertzialeko RNA erauzketa metodo honek silizearen bidezko erauzketa magnetikoa erabiliz RNA erauzten du.

#### 3.3.1.4. Onkogeneen detekzioa

*E6* eta *E7* onkogeneen RNA mezularia NucliSens®EasyQ®HPV v1 Testaren bidez detektatu zen (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frantzia) fabrikatzailearen argibideei jarraituz. NucliSens EasyQ HPV probak bost HR-HPV genotipoen E6/E7 onkogeneen adierazpena antzeman dezake (16, 18, 31, 33 eta 45). NucliSens®EasyQ®HPV v1 Testa RNAREN erauzketa prozesuaren kalitatearen kontrolerako barne kontrol bat erabiltzen du: gizakiaren U1 erribonukleoproteinaren A proteina nuklear txiki espezifikoa (U1A). Bai U1A zein mRNAren detekziorik ez egotekotan probaren emaitza baliogabetzak hartu zen. Baliogabeko txandak berriro errepikatu ziren RNA lagin beretik berriz erauziz.

Genotipo hauen mRNAren detekzioa denbora errealean burutzen da beacon edo baliza molekularren erabileraren bidez. Beacon molekular hauek fluoreszentzia igortzen dute itu sekuentziarekin hibridatzen direnean. mRNA espezifikoen amplifikazioa detektatzeko 6 beacon molekular desberdin erabiltzen dira; beacon molekular espezifiko bana genotipo desberdin bakoitzaren aplikoiarentzat eta beste beacon bat U1A aplikoiarentzat. Bi koloragarri fluoreszenteren erabilerak (6-FAM eta 6-ROX) itu HPVaren mRNAren detekzioa baimentzen du hiru amplifikazio erreakzioa duplexen bitartez: U1A eta HPV-16, HPV-18 eta HPV-31, HPV-33 eta HPV-45 (9. irudia).



**9. irudia.** Fluoreszentzia intentsitate neurketak mRNAren detekzioan NucliSens®EasyQ®HPV v1 Testean.

### 3.3.2. RNAren erauzketarako metodoen garrantzia

#### 3.3.2.1. Laginak

Bai Basurtu Unibertsitate Ospitaleko Sexu Harremanen bidez Transmittitutako Gaixotasunen kontsultatik bai Ginekologia kontsultatik 2007 eta 2014 urteen artean bidalitako emakumeen laginak aztertu ziren HPV infekzio posiblea aztertzeko. Laginak isipu baten bidez alde endo/ektozerbikaletik jaso ziren eta PreservCyt (Hologic, Inc., Marlborough, MA) garraio medioan giro tenperaturan gorde ziren HPVaren presentzia aztertu arte.

Patologoek laginak Bethesda sistema jarraituz sailkatu zituzten.

### 3.3.2.2. Genotipoen determinazioa

Laginak arrisku altuko 14 genotipo antzematen dituen Cobas<sup>®</sup> HPV probarekin aztertuak izan ziren (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Alemania) (3.1.2 atalean agertzen den moduan). HPV-16 eta HPV-18 genotipoak ez diren beste genotipoentzako positiboak izan ziren laginak Linear Array HPV Genotyping Testaren bitartez aztertu ziren lagin horien genotipo zehatzak zeintzuk ziren ezagutzeko (3.2.2 atalean deskribatzen den moduan).

### 3.3.2.3. RNA erauzketa metodoak

RNAren erauzketarako hiru metodo erabili ziren. Lehena eskuzko Nuclisens erauzketa kita izan zen (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frantzia). Metodo honetan RNA 200 µl laginetik erauzia izan zen NucliSENS lisis bufferra eta NucliSENS<sup>®</sup> miniMAG<sup>®</sup> erabiliz. Fabrikatzailearen argibideen arabera erauzi zen RNA eta azkenik RNA 60 µl eluzio-bufferrean eluitu egin zen.

Erabilitako bigarren RNA erauzketa metodoa High Pure Viral RNA Kita izan zen (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Alemania). RNA 200 µl laginetik erauzia izan zen fabrikatzailearen argibideei jarraituz. RNA erauzketa metodo honetan zutabeak erabiliz burutzen da. Azkenik RNA 50 µl eluzio-bufferrean eluitua izan zen.

Hirugarren RNA erauzketa metodoa RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini kita izan zen (Qiagen, Hilden, Alemania). 400 µl lagin erabili ziren RNA erauzteko fabrikatzailearen argibideei jarraituz. Metodo hau ere zutabeak erabiltzen ditu RNA erauzteko. Azkenik, RNA 50 µl RNAasa gabeko uraren bidez eluitu egin zen.

Eluitutako RNA -20°Ctan gorde egin zen E6/E7 onkogeneen detekzioa burutu arte. E6/E7 mRNAren detekzioaren ondoren erauzitako RNA -80°Ctan gorde egin zen.

### 3.3.2.4. Onkogeneen detekzioa

*E6* eta *E7* onkogeneen adierazpena hiru aldiz aztertu egin zen NucliSens<sup>®</sup> EasyQ<sup>®</sup> HPV v1 Testaren bidez (RNA erauzketa metodo bakoitzeko adierazpena aztertu zen) (3.3.1.4. atalean azalduta agertzen den moduan).

### 3.3.2.5. Diseinu esperimental

Ikerketa honetan HPVaren 16, 18, 31, 33 eta/edo 45 genotipoarentzako positiboak izan ziren emakumeen laginak barneratu ziren. Guztira 50 emakume aztertuak izan ziren. RNA adierazpena emakume bakoitzean hiru RNA erauzketa metodoak erabiliz aztertua izan zen, beraz, azkenean, *E6* eta *E7* onkogeneen adierazpena 150 laginetan aztertua izan zen.

*E6/E7* mRNAaren adierazpenaren analisiaren ondoren hiru RNA erauzketa metodoak erkatuak izan ziren. Gainera, onkogeneen adierazpenaren eta emakumeen patologiaren arteko erlazioa aztertua izan zen.

Emakume guztiek idatzitako eta informatutako onarpena eman zuten ikerketan parte hartu aurretik.

### 3.3.2.6. Datuen analisis

RNA erauzketa metodoen arteko konkordantzia aztertua izan zen. Qiagen erauzketa metodoa ez zen konparaketan barneratu metodo honen bidez lortutako zentzugabeko emaitzak zirela eta. bioMérieux eta Roche erauzketa metodoen bitartez lortutako emaitzak behatutako adostasun erlatiboaren ( $Pr(a)$ ) eta Cohen Kappa koefizientearen ( $\kappa$ ) bidez aztertuak izan ziren. Metodo bakoitzarekin lortutako emaitzak patologiarekin eta lesioen progresioarekin zuten erlazioa aztertu egin zen. Gainera, bioMérieux eta Roche erauzketa metodoak beraien artean konparatuak izan ziren.

Emaitza estatistikoak Landis eta Kochen sailkapena jarraituz sailkatuak izan ziren: 0 baino baxuagoak diren balioak adostasunik ez dagoela adierazten dute, 0tik 0,20rako balioek adostasun arina adierazten dute, 0,21tik 0,40rako balioek bidezko adostasuna, 0,41tik 0,60rako balioek adostasun moderatua, 0,61tik 0,80rako balioek funtsezko adostasuna eta 0,81tik 1reko balioek adostasun ia perfektua adierazten dute (91).

Azkenik, metodo bakoitzerako, PPVa (balio prediktibo positiboa) eta NPVa (balio prediktibo negatiboa), sentikortasuna eta espezifikotasuna aztertu ziren.



## ***4. EMAITZAK***

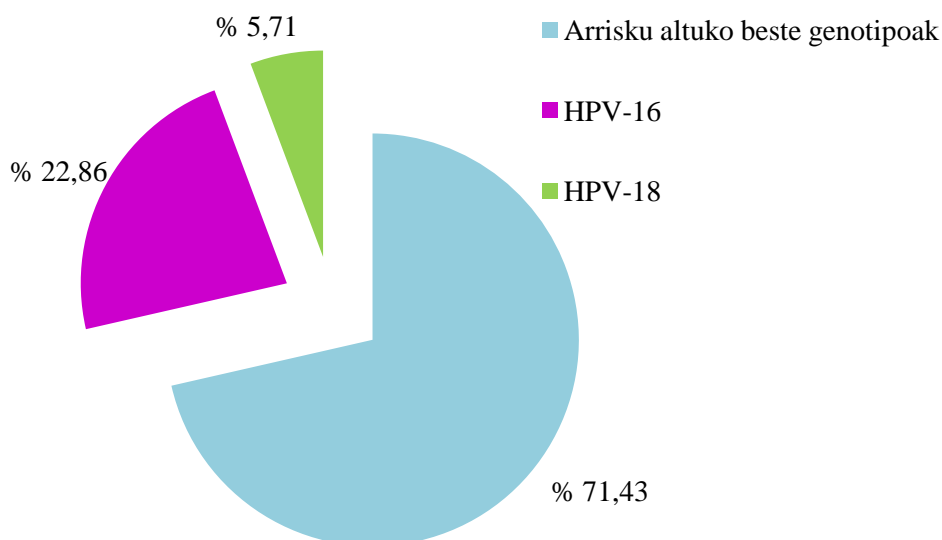
---



#### 4.1. POPULAZIO BAHEKETA BILBOKO BASURTUKO UNIBERTSITATE OSPITALEAREN ALDEAN

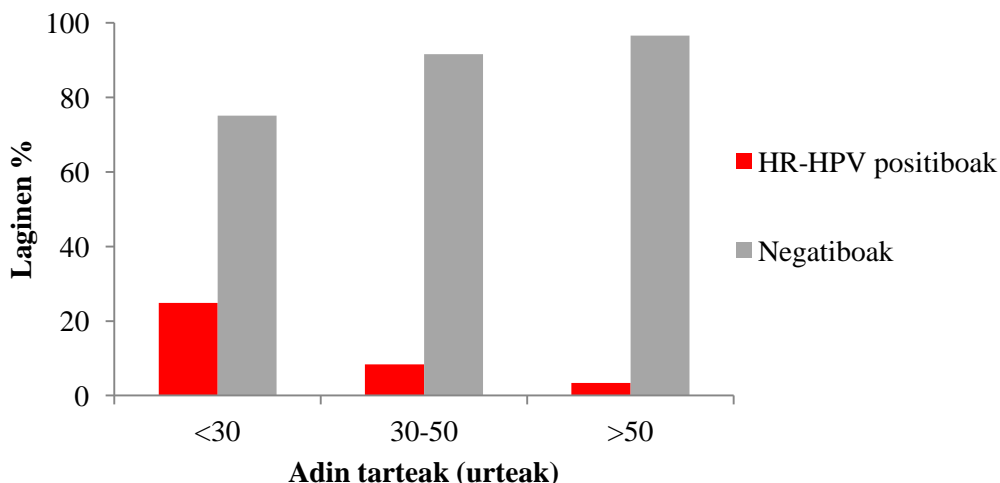
Bilboko Basurtuko Unibertsitate Ospitalearen eremuan Cobas HPV Testarekin burututako populazio baheketan 912 lagin aztertu ziren; horietatik 97 lagin positiboak izan ziren arrisku altuko HPV genotipoentzako, hau da, arrisku altuko HPVen intzidentzia % 10,63 izan zen. Gainera, aztertutako emakume populazioaren batez besteko adina  $41,30 \pm 11,64$  urtekoa izan zen eta, aldiz, HR-HPVrako positiboak izan ziren emakumeen batez besteko adina  $34,12 \pm 10,57$  urtetakoa.

Lagin positiboetan genotipoen banaketa hurrengoa izan zen: HPV-16 genotipoa 24 laginetan (% 22,86), HPV-18 genotipoa 6 laginetan (% 5,71) eta arrisku altuko beste 12 genotipoak 75 laginetan (% 71,43) (10. irudia).



#### 10. irudia. Arrisku altuko HPV (HR-HPV) genotipoen banaketa lagin positiboetan.

Bestalde, HR-HPVen presentzia aztertu genuen adin tarte desberdinetan. Emaizta horien arabera 30 urte baino gutxiagoko emakumeetan birusaren prebalentzia % 24,87koa zen, 30 eta 50 urte arteko emakumeetan % 8,37koa eta 50 urte baino nagusiagoak ziren emakumeetan % 3,36koa (11. irudia).

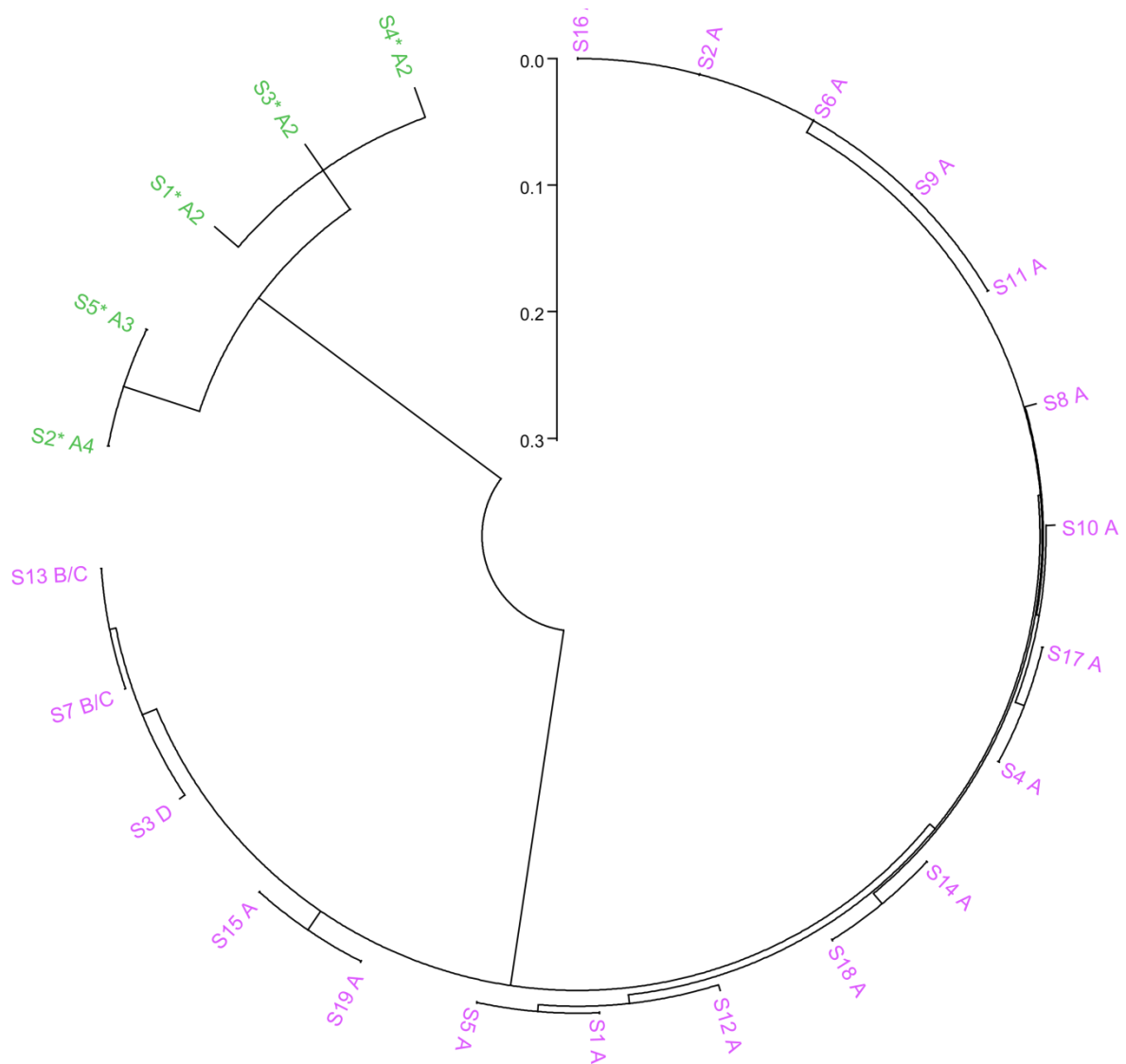


**11. irudia.** Adin tarte bakoitzean HR-HPV lagin positibo eta negatiboen kasuak.

Esan beharra dago lagin horietako batzuetan infekzio anitzak agertzen zirela, hau da, genotipo batez baino gehiagoz kutsatuak zeudela. Ikerketa honetako 9 laginetan infekzio anitza aurkitu genuen; 8 laginetan 16 genotipoa arrisku altuko beste genotipo batzuekin batera eta lagin bakar batean 18 genotipoarekin batera. Emakume horien adin tarte 19-38 urtetakoa zen, batez besteko adina  $28,89 \pm 6,05$  urtetakoa zelarrik.

HPV-16rako eta HPV-18rako positiboak izan ziren laginetan aldaera intratipikoa determinatu egin zen. HPV-16arekin infektatu zeuden 19 laginetan aldaera intratipikoa zehaztea lortu zen; hauetatik 16 A leinuko aldaera zuten (% 84,21), 2 B/C leinuko aldaerak (% 10,52) eta lagin bat D leinuko aldaerarekin kutsatuta zegoen (% 5,27). HPV-18 genotipoarekin kutsatuta zeuden 5 laginetan aldaera intratipikoa determinatu ahal izan zen; 3 lagin A2 azpi-leinuko aldaera zuten (% 60) eta 2 lagin A3 eta A4 azpi-leinuko aldaerarekin kutsatuta zeuden (% 40).

Bestalde, HPV-16aren eta HPV-18aren sekuentziekin zuhaitz filogenetikoa eraiki egin zen (12. irudia). Genotipo bakoitzaren laginak adar desberdinetan taldekatzen ziren eta, gainera, genotipo bakoitzaren barnean, leinu desberdin bakoitzeko laginak talde desberdinetan taldekatzen ziren.



**12. irudia.** HPV-16aren eta HPV-18aren *E6*, *E7* eta *L1* geneen zuhaitz filogenetikoa.

Hiru eskualdeak sekuentziatzea lortu ziren laginak baino ez ziren zuhaitz filogenetikoan barneratu. MEGA programaren bidez eta Maximum likelihood edo probabilitate maximoko metodoaren bidez eraiki zen zuhaitz filogenetikoa. HPV-16an A leinua, B/C leinua eta D leinua eta HPV-18an A2 azpi-leinua, A3 azpi-leinua eta A4 azpi-leinua. Larrosaz markatuta ageri diren laginak HPV-16aren sekuentziak dira eta berdez eta izartxo batez markatuta dauden laginak HPV-18aren sekuentziak dira.

## **4.2. HPV-16 GENOTIPOAREN ALDAERA INTRATIPIKOEN DETERMINAZIOA**

### **4.2.1. HPV-16aren aldaera intratipikoak HPV infekzio anitzetan**

HPV-16 eta beste HPV genotipo batzuekin kutsatuta zeuden 151 pazienteen laginak aztertu egin ziren. Aztertutako lagin guztietatik 136 emakumezkoen laginak ziren (% 90,14) eta 15 gizonezkoen laginak (% 9,86). Aztertutako pertsona guztien adin batez bestekoa  $31,27 \pm 9,13$  izan zen; emakumeen batez besteko adina  $30,27 \pm 8,17$  urtetakoa zelarik 16-72 urte tartean eta gizonezkoetan batez besteko adina  $41,33 \pm 12,41$  urtetakoa zelarik 24-62 urte tartean.

Aztertutako 151 lagin hauetan, HPV-16az gain, beste 31 HPV genotipo desberdin detektatu egin ziren. Gehien errepikatzen ziren genotipoak HPV-52, HPV-83, HPV-61, HPV-6, HPV-31, HPV-73 eta HPV-42 izan ziren. HPV-52 37 laginetan HPV-16arekin batera agertzen zen (% 24,5), HPV-83 33 laginetan (% 21,8), HPV-61 30 laginetan (% 19,8), HPV-6 23 laginetan (% 15,2), HPV-31 22 laginetan (% 14,6), HPV-73 21 laginetan (% 13,9) eta HPV-42 20 laginetan HPV-16arekin batera agertzen zen (% 13,2). Patogenotasuneri dagokionez, HPV-16a HPV-52 edo HPV-83 genotipoekin batera gradu altuko zein baxuko lesioetan maizago detektatu egin zen; gradu altuko lesioen % 31,03an eta gradu baxuko lesioen % 29,31an. Bestalde HPV-16aren eta HPV-61aren infekzio anitza lesiorik ez zuten pazienteen % 24,73an detektatu egin zen.

#### 4.2.1.1. Aldakortasun genetikoa

Aldaera intratipikoaren determinaziorako *E6*, *E7* eta *L1* geneen sekuentziak aztertu ziren. Aztertutako 151 laginetan *E6* eskualdea 144 laginetan amplifikatzea lortu zen, *E7* eskualdea 145 laginetan eta *L1* eskualdea 124 laginetan amplifikatu ahal izan zen. Nukleotido aldaketak aztertuz, *E7* eta *L1* eskualde genomikoak *E6* genea baino kontserbadoreagoak dira bai nukleotido sekuentziaren aldetik zein aminoazido sekuentziaren aldetik.

*E6* genearen aldakortasun genetikoaren analisiak 7 nukleotido aldaketa ez-sinonimo aurkeztu zituen (10. taula).

**10. taula.** HPV-16aren E6 genearen nukleotido aldaketa errepikariak. HPV-16 prototipoaren genoma (Genbank sarrera zenbakia K02718). AY686580, AY686581, AY686584, EU118173, AF536179 sekuentziak HPV-16aren A leinuaren erreferentzia sekuentziak dira; AF472508, AF536180, AF472509 B/C leinukoak eta AY686579, AF402678 D leinukoak. Urdinez agertzen diren nukleotido aldaketan posizioak aminoazido aldaketa sortzen dute. Aminoazidoetara itzultzen ez diren nukleotido posizioak letra etzanean agertzen dira.

Eskualdea	E6																Lagin kopurua	Genbank sarrera zenbakia		
	83	91	94	97	98	104	109	112	131	132	145	286	289	335	350	532				
Nukleotido posizioa	A	A	G	A	A	A	T	G	A	G	G	T	A	C	T	A				
Prototipoa	A	A	G	A	A	A	T	G	A	G	G	T	A	C	T	A				
AY686581(A)																				
EU118173(A)																G				
AY686580(A)																G				
AY686584(A)																				
AF536179(A)								G								G				
AY686579(D)											T	A	G	T	G	G				
AF402678(D)											T	A	G	T	G	G				
AF472508(B)	C									C	T	A	G	T						
AF536180(B)	C									C	T	A	G	T						
AF472509(C)							C			T	T	A	G	T						
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	KJ152721		
	-	-	-	-	-	Del	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	KJ152722	
	-	-	-	-	-	Del	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	16	KJ152723	
	-	-	-	-	Del	Del	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	KJ152724
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	11	KJ152725
	-	-	A	G	-	Del	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	KJ152726
	-	-	-	-	Del	Del	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	6	KJ152727
	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	5	KJ152728
	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	5	KJ152729
	G	-	-	G	-	Del	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	KJ152730
	-	-	-	-	-	Del	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	KJ152731
	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	3	KJ152732
-	-	-	-	-	Del	-	-	G	-	-	-	-	-	-	G	-	-	4	KJ152733	
-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	G	-	-	-	1	KJ152734	
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	G	T	G	-	3	KJ152735		
	-	-	A	-	-	Del	-	-	-	-	T	A	G	T	G	G	3	KJ152736		
	-	-	-	-	-	Del	-	-	-	-	T	A	G	T	G	-	2	KJ152737		
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	G	T	G	G	2	KJ152738		
	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	T	A	G	T	G	G	2	KJ152739		
B/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	A	G	T	-	-	3	KJ152740		
	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	G	T	G	-	2	KJ152741		
	-	-	-	-	-	Del	C	-	-	T	T	A	G	T	-	-	2	KJ152742		

Detektatutako 7 nukleotido aldaketa ez-sinonimo horietatik, lau, B/C eta D leinuen nukleotido aldaketa espezifikoa ziren: G145T, T286A, A289G eta C335T (B/C eta D leinuko lagin guztietan agertzen ziren nukleotido aldaketa hauek). Gainera, D leinurako espezifikoa zen ordezkapen bat (A532G) eta B/C leinurako espezifikoa ziren bi nukleotido aldaketa detektatu ziren (T109C and G132C). A532G eta T109C mutazio isilak dira eta ez dute nukleotido aldaketarik sortzen baina, aldiz, G132C nukleotido ordezkapena R10T aminoazido aldaketa sortzen du. Gainera A131G nukleotido ordezkapena A leinuaren nukleotido espezifikoa zela behatu zen. Bestalde, nukleotido delezio bat (A104del) eta nukleotido aldaketa ez-sinonimo bat (T350G, L83V) leinu guztietan detektatuak izan ziren.

E7 eskualdean 6 nukleotido aldaketa detektatu egin ziren (11. taula). T789C eta T795G nukleotido ordezkapenak B/C eta D leinuentzako espezifikoa ziren, aldiz, T732C eta T921C nukleotido aldaketak D leinuko aldaketa espezifikoa zirela behatu ahal izan zen. Bestalde, G849A nukleotido ordezkapena leinu desberdin guztietan aurkitu egin zen. T732C nukleotido aldaketa ez ezik beste nukleotido ordezkapenak mutazio isilak ziren eta ez zuten aminoazido aldaketarik sortzen.

HPV-16aren *L1* genean 14 ordezkapen detektatu egin ziren (12. taula). B/C eta D leinuentzako espezifikoa ziren 6 ordezkapen sinonimo aurkitu ziren: A6693C, G6719A, C6852T, C6863T, C6968T eta G6992A. A6801T D leinuko mutazio ez-sinonimo espezifikoa zela behatu zen (T415S) eta D leinuko lagin guztietan detektatu ahal izan zen. Beste lau nukleotido aldaketa leinu desberdin guztietan detektatu egin ziren (G6690A, 6902insAT, 6902insATC eta ATG6949del). Azken lau nukleotido ordezkapen hauek aminoazido aldaketa sortzen zuten; G6690A nukleotido aldaketak E378K aminoazido aldaketa sortzen zuen, 6902insAT eta 6902insATC serina bat sortzen zuten eta ATG6949del mutazioak 465 posizioan azido aspartikoaren falta sortzen zuen.

Ikerketa honetan detektatutako nukleotido aldaketa gehienak dagoeneko literaturan deskribatuak zeuden, A83G, A91C, A98del, G112T eta G784A nukleotido ordezkapenak izan ezik. Ordezkapen guzti hauek aminoazido aldaketak sortzen dituzte leinu guztietan. Hala ere, lehen lau nukleotido aldaketa “berriak” ez dira aminoazidoetara itzultzen transkripzio biralean.



**11. taula.** HPV-16aren E7 genearen nukleotido aldaketa errepikariarenak. HPV-16 prototipoaren genoma (Genbank sarrera zenbakia K02718). AY686580, AY686581, AY686584, EU118173, AF536179 sekuentziak HPV-16aren A leinuaren erreferentzia sekuentziak dira; AF472508, AF536180, AF472509 B/C leinukoak eta AY686579, AF402678 D leinukoak. Urdinez agertzen diren nukleotido aldaketan posizioak aminoazido aldaketa sortzen dute.

Eskualdea	E7						Lagin kopurua	Genbank sarrera zenbakia
	732	784	789	795	849	921		
Prototipoa	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>		
AY686581(A)								
EU118173(A)								
AY686580(A)								
AY686584(A)								
AF536179(A)								
AY686579(D)	C		C	G				
AF402678(D)	C		C	G				
AF472508(B)			C	G				
AF536180(B)			C	G				
AF472509(C)			C	G				
A	-	-	-	-	-	-	70	KJ152697
	-	-	-	-	A	-	43	KJ152698
	-	A	-	-	A	-	8	KJ152699
	-	A	-	-	-	-	6	KJ152700
D	C	-	C	G	A	C	5	KJ152703
	C	-	C	G	-	C	2	KJ152704
	C	-	C	G	-	-	2	KJ152705
	C	-	C	G	A	-	2	KJ152706
B/C	-	-	C	G	-	-	4	KJ152707
	-	-	C	G	A	-	3	KJ152708

**12. taula.** HPV-16aren *L1* genearen nukleotido aldaketa errepikariak. HPV-16 prototipoaren genoma (Genbank sarrera zenbakia K02718). AY686580, AY686581, AY686584, EU118173, AF536179 sekuentziak HPV-16aren A leinuaren erreferentzia sekuentziak dira; AF472508, AF536180, AF472509 B/C leinukoak eta AY686579, AF402678 D leinukoak. Urdinez agertzen diren nukleotido aldaketan posizioak aminoazido aldaketa sortzen dute.

Eskualdea	L1														Lagin kopurua	Genbank sarrera zenbakia
Nukleotido posizioa	6690	6693	6719	6801	6852	6863	6902	6903	6904	6949	6950	6951	6968	6992		
Prototipoa	G	A	G	A	C	C	Del	Del	Del	G	A	T	C	G		
AY686581(A)							A	T	C	Del	Del	Del				
EU118173(A)							A	T	C	Del	Del	Del				
AY686580(A)							A	T	C	Del	Del	Del				
AY686584(A)							A	T	C	Del	Del	Del				
AF536179(A)							A	T	C	Del	Del	Del				
AY686579(D)		C	A		T	T	A	T	C	Del	Del	Del	T	A		
AF402678(D)		C	A	T	T	T	A	T	C	Del	Del	Del	T	A		
AF472508(B)		C	A		T	T	A	T	C	Del	Del	Del	T	A		
AF536180(B)			A		T		A	T	C	Del	Del	Del	T	A		
AF472509(C)			A		T		A	T	C	Del	Del	Del	T	A		
A	-	-	-	-	-	-	A	T	C	Del	Del	Del	-	-	63	KJ152709
	A	-	-	-	-	-	A	T	C	Del	Del	Del	-	-	17	KJ152710
	-	-	-	-	-	-	A	T	-	Del	Del	Del	-	-	16	KJ152711
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	KJ152712
	A	-	-	-	-	-	A	T	-	Del	Del	Del	-	-	3	KJ152713
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Del	Del	Del	-	-	3	KJ152714
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	KJ152715
D	-	C	A	T	T	T	A	T	C	Del	Del	Del	T	A	6	KJ152717
	A	C	A	T	T	T	A	T	C	Del	Del	Del	T	A	2	KJ152718
	-	-	A	T	-	T	A	T	C	Del	Del	Del	T	A	2	KJ152719
B/C	-	C	A	-	T	T	A	T	C	Del	Del	Del	T	A	6	KJ152720

#### 4.2.1.2. Análisi filogenetikoak eta birkonbinazioak

Lan honetan A leinuko aldaera izan zen aldaerarik errepikakorrena bai gizon zein emakumeetan (% 86,8 - 131/151). Bestalde, D eta B/C leinuko aldaerak proportzio txikiagoan aurkitu ziren (% 7,95 - 12/151- eta % 5,3 - 8/151-, hurrenez hurren).

E6, E7 eta L1 eskualdeetako analisi filogenetikoari dagokionez, aldaera Europarrak (A) eta aldaera ez-europarrak (B/C/D) erlazionatutako nodoak eratzen dituzte (13. irudia). Gainera, eskualde bakoitzeko analisi filogenetikoak banaka egiterakoan, aldaera Europarrak eta ez-europarrak talde desberdinetan multzokaturik agertu ziren (14., 15. eta 16. irudiak).

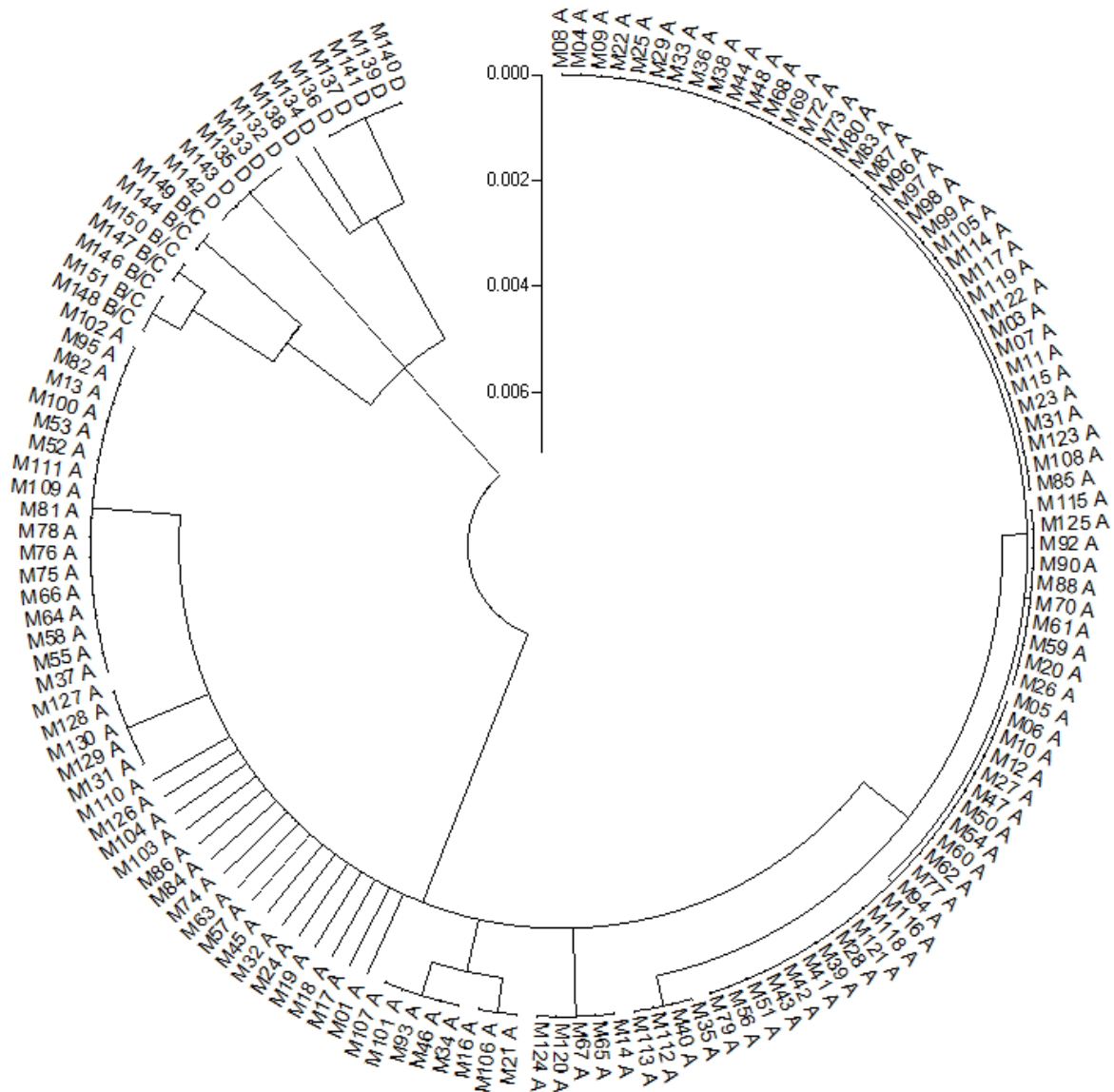
Aztertutako 151 laginetatik 149 laginetan hiru eskualdeak bat etortzen ziren aldaeren sailkapenean. Aztertutako bi laginetan, M144 eta M149, E6 eskualdearen analisi filogenetikoak D leinuko aldaera zela adierazten zuen baina beste bi eskualdeen analisiaren arabera B/C leinuko aldaera intratipikoak ziren. Bi lagin hauek RDP, MaxChi eta Chimaerarekin aztertu ziren birkonbinazioa detektatu ahal izateko. Hiru metodo hauen bidez egindako analisiak bi lagin hauek lagin birkonbinatuak zirela baieztatu zuen (13. taula).

**13.taula.** Lagin birkonbinatu posibleak.

Lagina	Genea			Programaren inferentzia
	<i>E6</i>	<i>E7</i>	<i>L1</i>	
<b>M144</b>	D	B/C	B/C	RDP eta MaxChi birkonbinazioa detektatu zuten (M135 emailea zen).
<b>M149</b>	D	B/C	B/C	Chimera birkonbinazioa detektatu zuten (M134 emailea zen).

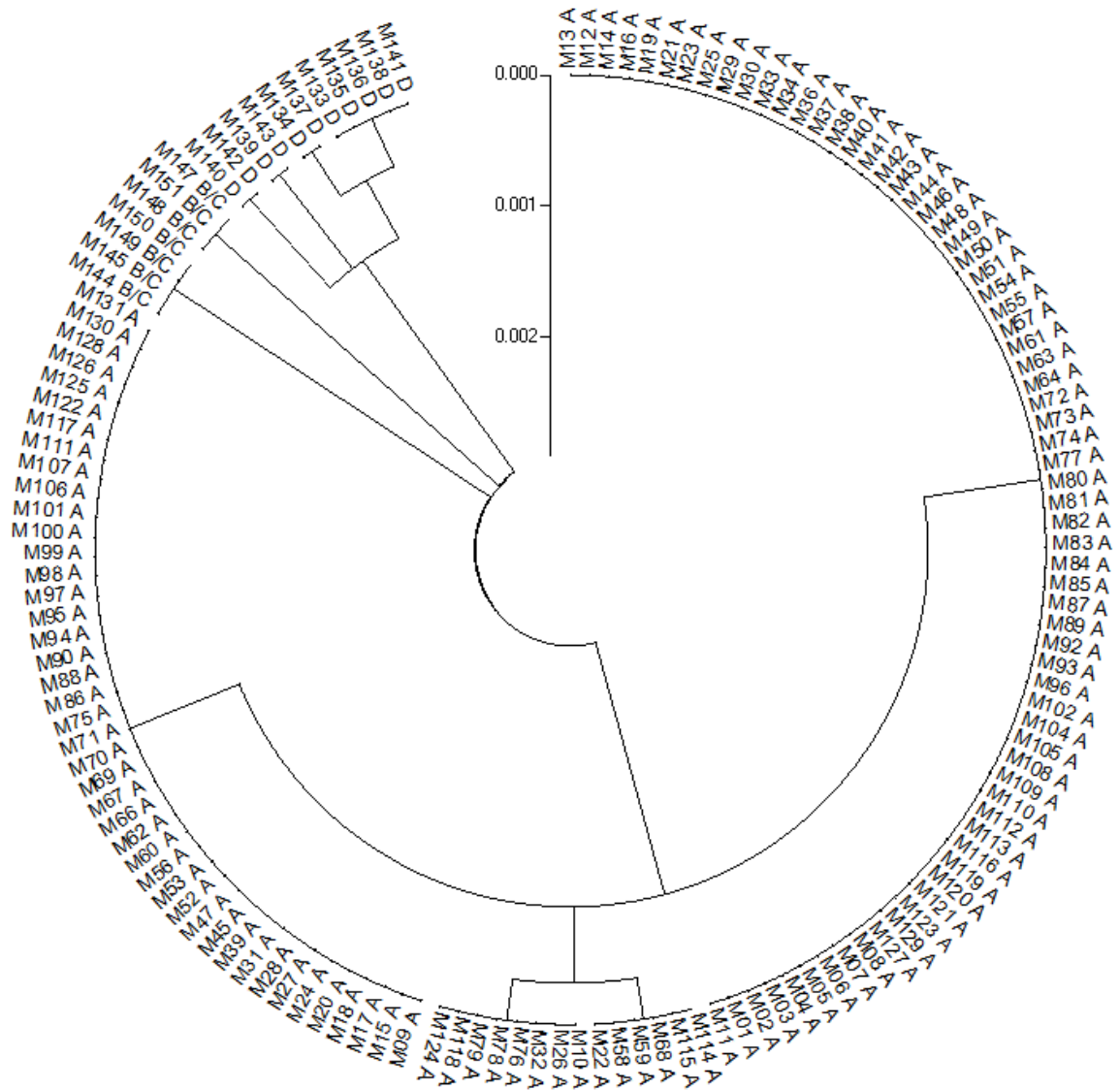
RDP, Maxchi eta Chimaera metodoak birkonbinazioaren detekzioerako erabili ziren.





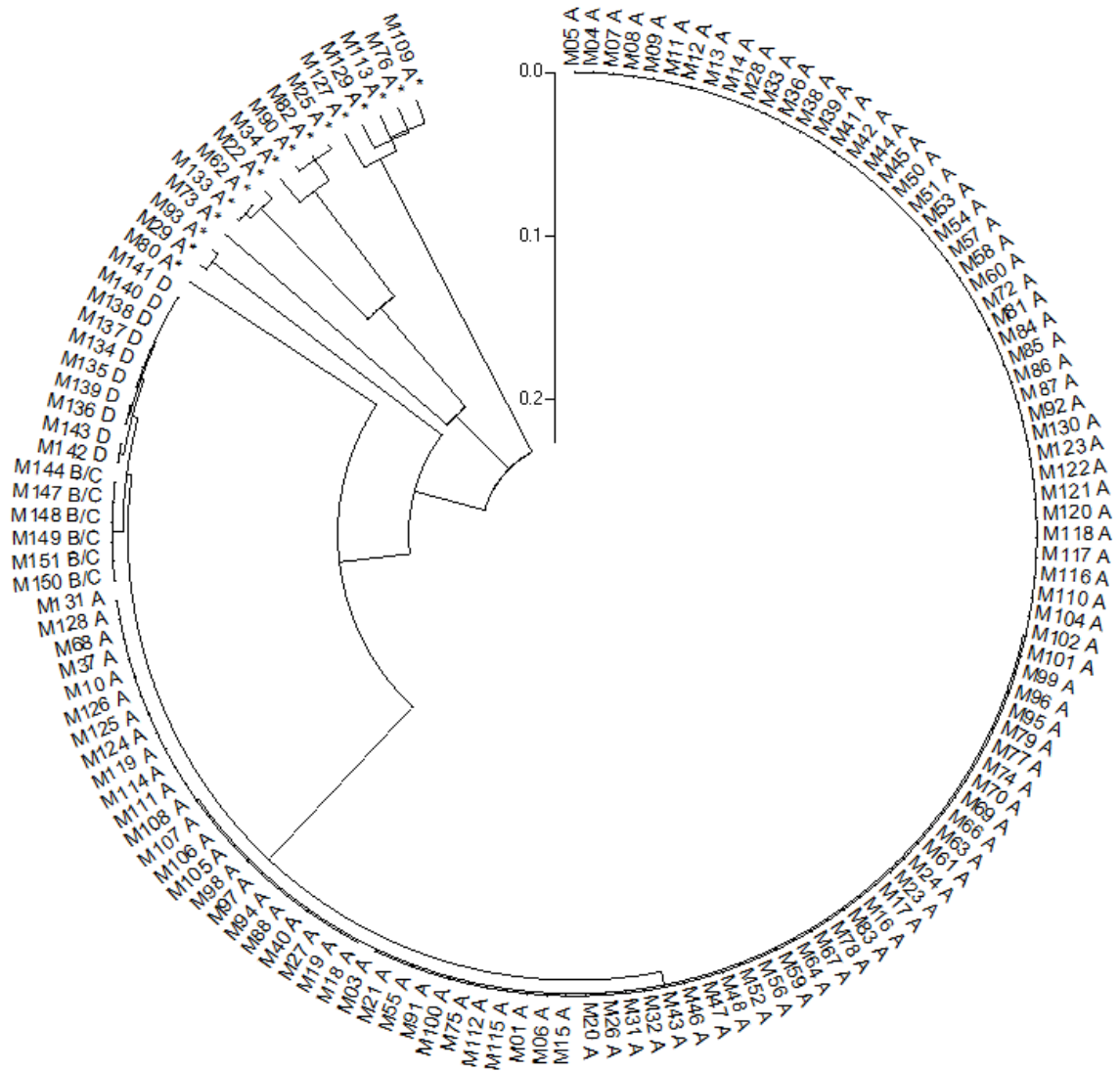
#### 14. irudia. HPV-16aren *E6* genearen zuhaitz filogenetikoa.

MEGA programaren bidez eta Maximum likelihood edo probabilitate maximoko metodoaren bidez eraiki zen zuhaitz filogenetikoa. A leinua, B/C leinua eta D leinua.



**15. irudia.** HPV-16aren *E7* genearen zuhaitz filogenetikoa.

MEGA programaren bidez eta Maximum likelihood edo probabilitate maximoko metodoaren bidez eraiki zen zuhaitz filogenetikoa. A leinua, B/C leinua eta D leinua.



## 16. irudia. HPV-16aren *L1* genearen zuhaitz filogenetikoa.

MEGA programaren bidez eta Maximum likelihood edo probabilitate maximoko metodoaren bidez eraiki zen zuhaitz filogenetikoa. A leinua, B/C leinua eta D leinua. HPV-16a ez zen beste genotipo bat anplifikatu izan zen laginetan izartxo bat ageri da.

#### 4.2.1.3. Adinaren eta lesioen erkaketa aldaera intratipikoekin

Aztertutako laginetatik 136 emakumeen laginak ziren. Emakumeen artean, A leinuko aldaerekin kutsatuta zeudenen adin batez bestekoa  $29,3 \pm 7,54$  urtetakoa izan zen, aldiz, B/C leinuko laginentzako  $40,5 \pm 4,93$  izan zen eta D leinuko aldaerak zituzten emakumeentzako  $36,6 \pm 11,23$  urtetakoa izan zen. Gainera, A leinuko aldaeren eta gaztetasunaren arteko asoziazioa estatistikoki esangarria izan zen ( $p < 0,05$ ). Aldi berean, B/C/D leinuko aldaeren eta emakumeen adin handiagoaren arteko asoziazioa estatistikoki esangarria izan zen ( $p < 0,05$ ).

Patologiari dagokionez, 78 emakumeen laginak normal gisa sailkatu ziren (% 57,35), hau da, ez zen lesiorik detektatu edo ASCUS detektatu egin zen. Bestalde, 58 emakumeetan (% 42,65) lesioak detektatu ziren, gradu baxukoak zein altukoak (36/58 LSIL eta 22/58 HSIL). Lesioak zituzten emakumeetan B/C/D leinuko aldaerak nagusi izan ziren (aldaera ez-europarren % 70,59), aldiz, lesiorik ez zituzten edo ASCUS zituzten emakumetan nagusiki A leinuko aldaerak detektatu ziren (aldaera Europarren % 58,82). Aldaera banaketaren eta lesio motaren arteko erlazioa, emakumeen laginetan, esangarritasun estatistikoa erakutsi zuen ( $p < 0,05$ ). Bestalde, lesio mota eta emakumeen adina konparatuz, lesiorik gabeko edo ASCUS zuten emakumeen adin batez bestekoa  $30,18 \pm 8,91$  urtetakoa izan zen, LSIL zuten emakumeena  $29,36 \pm 6,90$  eta HSIL zuten emakumeena  $32,06 \pm 7,71$  urtetakoa izan zen. Analisi estatistikoak, emakumeen adinaren eta lesio motaren artean korrelaziorik ez zegoela erakutsi zuen.

Gizonei dagokionez, 15 gizonezkoen laginak aztertu ziren lan honetan. Hauetatik 13k lesio gabe bezala sailkatu ziren eta bik gradu baxuko lesioa zuten. Aldaeren eta lesioaren edo adinaren arteko asoziazioa emakumeen laginetan behatutako patroia berdina jarraitzen zuen. Hala ere, gizonezkoen lagin kopuru baxua dela eta, ez zen analisi estatistikorik burutu.

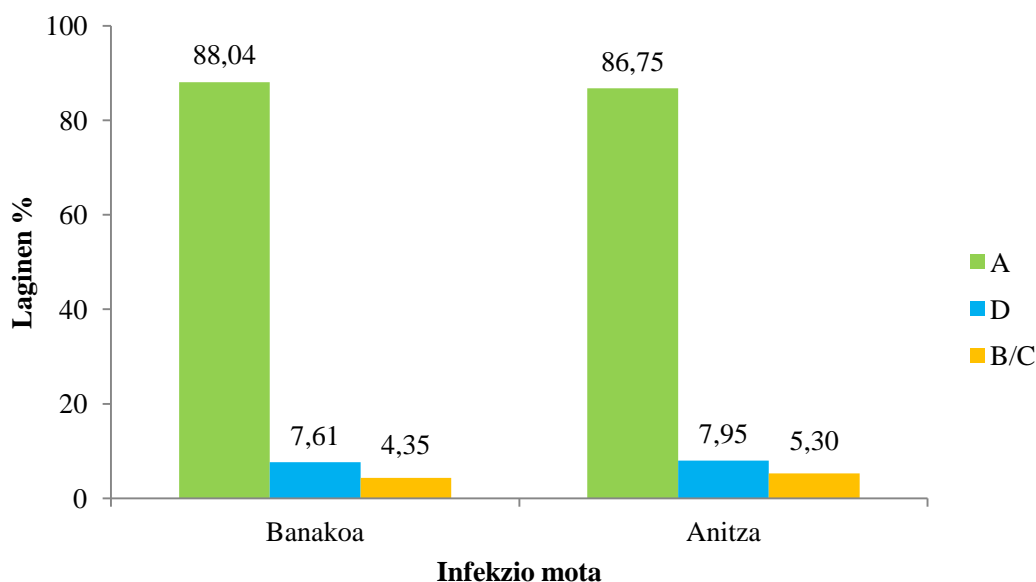


#### 4.2.2. Aldaera intratipikoen erkaketa HPV-16aren infekzio anitzen eta banako infekzioen artean

Aurreko atalean HPV-16aren infekzio anitzak zuten 151 pertsonen laginak aztertu izan dira. Atal honetan, aurreko atalean aztertutako 151 lagin horiek HPV-16aren banako infekzioa zuten 92 pertsonen laginekin erkatu izan dira; guztira 243 lagin aztertu ziren. Lagin hauetatik 224 (% 92,18) emakumeen laginak ziren eta 19 (% 7,82) gizonezkoen laginak. Pazienteen adin batez bestekoa  $34,05 \pm 10,82$  urtetakoa izan zen; emakumeen artean adin batez bestekoa  $33,63 \pm 10,67$  urtetakoa izan zen, 14-72 adin tartean, eta, aldiz, gizonezkoen artean adin batez bestekoa  $38,94 \pm 11,65$  urtetakoa izan, 23-62 adin tartean.

##### 4.2.2.1. Aldaera intratipikoen eta lesioen azterketa infekzio motaren arabera

HPV-16 genotipoaren aldaera intratipikoen banaketak patroia bera jarraitu zuen bai infekzio anitzetan zein banako infekzioetan. Bi infekzio motetan A leinuko aldaerak izan ziren (% 88-86), D (% 7-8) eta B/C (% 4-5) leinuetako aldaerak kopuru baxuagoan aurkitzen zirelarik (17. irudia).

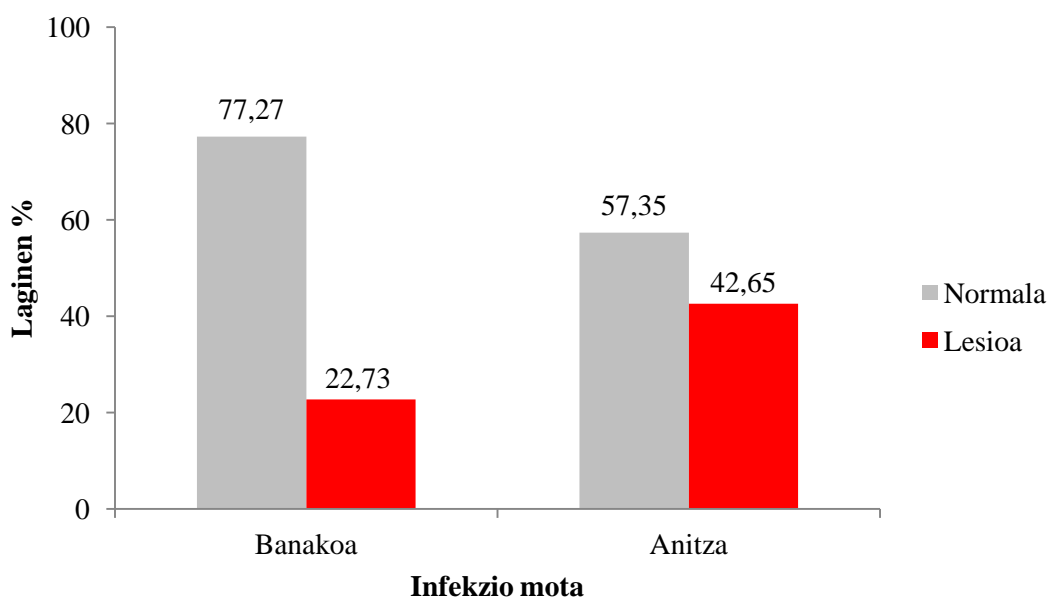


**17. irudia.** HPV-16aren aldaera intratipikoen banaketa.

A leinuko aldaerak (A), B edo C leinuko aldaerak (B/C) eta D leinuko aldaerak (D).

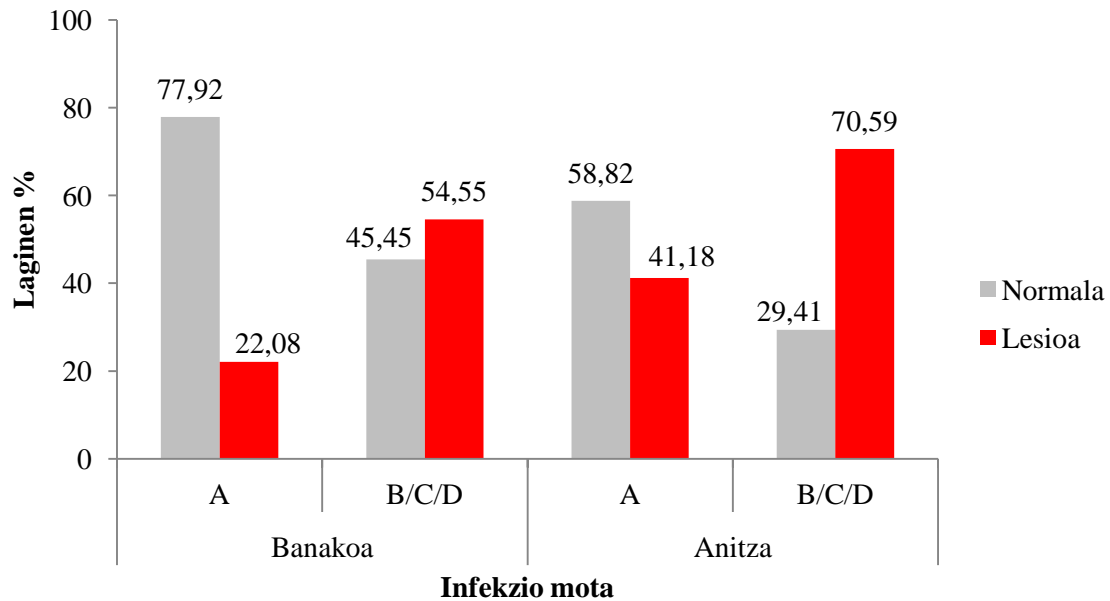
Patologiari dagokionez, bai gradu altuko zein gradu baxuko lesioak 81 laginetan diagnostikatu ziren, aldiz, 162 pazienteen laginak normalak moduan sailkatu ziren (lesiorik ez zuten edo ASCUS detektatu egin zen; 1, eta 2. kategoriak Bethesda sistemaren arabera). Emakumeen laginei dagokionez, 146 normalak moduan sailkatu ziren eta 78 laginetan gradu altuko edo baxuko lesioak detektatu ziren (3-6 kategoriak).

Lesio mota dela eta, emakumeetan, HPV-16aren infekzio anitzek banako infekzioak baino erlazionatuagoak zeuden lesioen garapenarekin; infekzio anitzak zituzten pazienteen % 42,65a lesioak zituzten eta, aldiz, banako infekzioak zituzten pazienteen % 22,73a soilik lesioa zuten (18. irudia).



**18. irudia.** Infekzio mota eta lesioen garapena HPV-16rako positiboak ziren emakumeetan.

Bi infekzio motetan, anitza zein banakoa, aldaera ez-europarrak (B/C/D leinuak) aldaera Europarrak (A leinua) baino lotura estuagoa zuten lesioen garapenarekin (19. irudia). Asoziazio hau estatistikoki esangarria izan zen HPV-16aren infekzio anitza zuten emakumeetan ( $p < 0,05$ ), aldiz, banako infekzioa zuten emakumeetan ez zen estatistikoki esangarria izan.



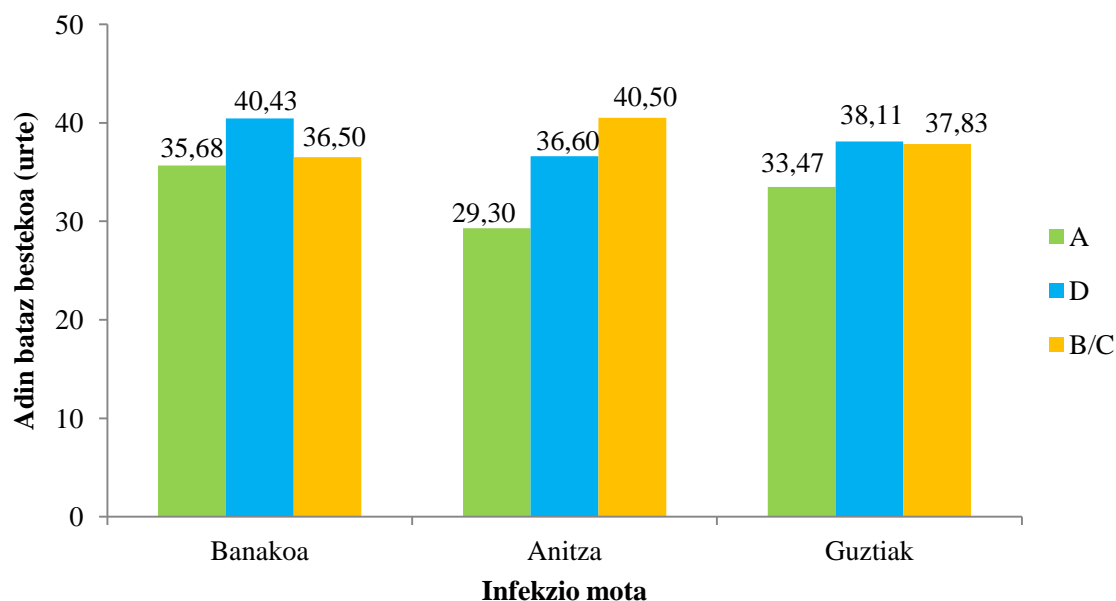
**19. irudia.** Aldaera intratipikoen eta lesioen garapenaren arteko erlazioa bi infekzio motetan.

A leinuko aldaerak (A), B edo C leinuko aldaerak (B/C) eta D leinuko aldaerak (D).

Gizonezkoen 19 lagin azertu ziren. Horietatik bi gizon gradu baxuko lesioak zituzten eta gizon bati gradu altuko lesioa diagnostikatu zitzaion. Gainerako gizonezkoen laginak (16/19) normalak moduan sailkatu ziren. Aurrekoan gertatu zen moduan, gizonezkoen lagin kopuru txikia zen eta ez zen analisi estatistikorik burutu.

#### 4.2.2.2. Adinaren azterketa: aldaera intratipikoen, patologiaren eta infekzio motaren arabera

Pazienteen adinari dagokiola, banako infekzioa zuten pazienteetan, batez besteko adin baxuena zuten pazienteak A eta B/C leinuko aldaera intratipikoak zituztenak ziren ( $35,68 \pm 9,64$  eta  $36,5 \pm 15,67$  urte, hurrenez hurren) (20. irudia). Aldiz, D leinuko aldaera intratipikoak zituzten pazienteen adin batez bestekoa altuagoa zen ( $40,43 \pm 3,46$  urte). Bestalde, infekzio anitza zuten pazienteen adin batez besteko baxuena A leinuko aldaera intratipikoa zuten pertsonetan detektatu zen,  $29,3 \pm 7,54$  urte, aldiz, adin batez besteko altuenak B/C eta D leinuko aldaerekin kutsatuta zeuden pazienteetan aurkitu zen ( $40,5 \pm 4,93$  eta  $36,6 \pm 11,23$  urte, hurrenez hurren).



**20. irudia.** Aldaera intratipiko desberdinekin kutsatuta zeuden pazienteen adin batez bestekoa.

A leinuko aldaerak (A), B edo C leinuko aldaerak (B/C) eta D leinuko aldaerak (D).

HPV-16aren infekzio anitzetan aldaera ez-europarren eta adin altuagoaren arteko asoziazioa estatistikoki esangarria izan zen ( $p < 0,05$ ). Aldiz, adina eta lesio mota aztertzerakoan, ez zen desberdintasun estatistiko esangarririk aurkitu lesioa zuten eta lesiorik ez zuten emakumeen laginen artean.

#### 4.2.2.3. Aldakortasun genetikoa

Aldakortasun genetikoari dagokionez, aldaera intratipikoak *E6*, *E7* eta *L1* geneen sekuentzietan oinarrituz definitu ziren. HPV-16aren E6 eskualdea 235/243 laginetan anplifikatu egin zen, E7 eskualdea 231/243 laginetan eta L1 eskualdea 208/243 laginetan. Nukleotido eta aminoazido sekuentzien analisiaren ondoren E7 eskualdea eskualderik kontserbatuena zela ikusi zen.

E6 genearen analisisian 11 nukleotido aldaketa ez-sinonimo detektatu ziren (14. taula). Bi infekzio motetan, nukleotido aldaketa hauetako lau B/C eta D leinuetako aldaketa espezifikoak ziren: G145T, T286A, A289G eta C335T (B/C eta D leinuko lagin guztietan detektatu ziren). Bestalde, D leinurako espezifikoa zen nukleotido ordezkapen bat (A532G) eta B/C leinurako espezifikoak ziren 3 nukleotido aldaketa identifikatu egin ziren (T109C, G132T eta G132C). Nukleotido ordezkapen hauen artean, A532G eta T109C mutazio isilak dira, ez dute aminoazido aldaketarik sortzen, eta G132T/C nukleotido aldaketa R10I eta R10T aminoazido aldaketa sortzen du hurrenez hurren. A131G nukleotido ordezkapena A leinuko laginentzako espezifikoa zela behatu zen. Bestalde, delezio bat (A104del) eta nukleotido ordezkapen bat (T350G, L83V) leinu guztietako laginetan eta bi infekzio motetan detektatuak izan ziren. Bi nukleotido aldaketa hauek lesioak zituzten A leinuko laginen kopuru handian detektatuak izan ziren (3-6 kategoriak): A104del A leinukoak ziren eta lesioak zituzten pazienteen % 62,12an detektatuak izan zen (41/66) eta T350G % 33,33an (22/66). Oro har, E6 eskualdean, banako infekzioetan infekzio anitzetan baino nukleotido sekuentziaren patroia gutxiago identifikatu egin ziren (16 patroia desberdin eta 22 patroia desberdin, hurrenez hurren).

E7 eskualdean zortzi nukleotido aldaketa identifikatu egin ziren (15. taula). Nukleotido aldaketa hauetariko bi, T789C eta T795G, B/C eta D leinuko aldaerentzako espezifikoak zirela behatu zen. Aldiz, T732C eta T921C nukleotido ordezkapenak, soilik D leinurako espezifikoak ziren. Bestalde, G849A nukleotido aldaketa leinu guztietan detektatua izan zen. Bost nukleotido ordezkapen hauek, T732C izan ezik, mutazio isilak dira. Eskualde honetan ere infekzio anitzak zituzten laginek nukleotido sekuentziaren patroia desberdin gehiago azaldu zituzten; infekzio anitzak zituzten laginen artean 10 patroia desberdin behatu ziren eta banako infekzioa zuten laginen artean 6 patroia.

**14. taula.** HPV-16aren E6 genearen nukleotido aldaketa errepikarienak HPV-16aren bi infekzio motetan.

HPV-16 prototipoaren genoma (Genbank sarrera zenbakia K02718). AY686580, AY686581, AY686584, EU118173, AF536179 sekuentziak HPV-16aren A leinuaren erreferentzia sekuentziak dira; AF472508, AF536180, AF472509 B/C leinukoak eta AY686579, AF402678 D leinukoak. Urdinez agertzen diren nukleotido aldaketen posizioak aminoazido aldaketa sortzen dute. Aminoazidoetara itzultzen ez diren nukleotido posizioak letra etzanean agertzen dira.

Eskualdea	E6																			HPV-16 infekzio amirza duten lagin kop.	HPV-16 banako infekzioa duten lagin kop.	GenBank sarrera zenbakia				
Nukleotido posizioa	83	91	94	97	98	104	109	112	131	132	135	143	145	191	286	289	335	350	443				532			
Prototipoa	A	A	G	A	A	A	T	G	A	G	A	C	G	T	T	A	C	T	G	A						
A																					25	7	KJ152721			
A						Del																		18	26	KJ152722
A						Del													G					16	16	KJ152723
A					Del	Del																		14	0	KJ152724
A																			G					11	2	KJ152725
D			A	G		Del																		10	0	KJ152726
D					Del	Del													G					6	0	KJ152727
B	C																		G					5	0	KJ152728
B								T											G					5	0	KJ152729
B				G		Del																		4	0	KJ152730
C						Del		T																3	0	KJ152731
				G															G					3	0	KJ152732
						Del		T											G					0	6	KM030554
															A						0	5	KM030563			
						Del				Del									G		0	5	KM030555			
						Del													G	A	0	3	KM030556			
						Del									A						0	3	KM030557			
								T							A				G		0	3	KM030564			
						Del				Del											0	2	KM030558			
						Del			G										G		4	0	KJ152733			
									G										G		1	2	KJ152734			
D													T		A	G	T	G			3	0	KJ152735			
			A			Del							T		A	G	T	G		G	3	0	KJ152736			
						Del							T		A	G	T	G			2	4	KJ152737			
													T		A	G	T	G		G	2	0	KJ152738			
			A										T		A	G	T	G		G	2	0	KJ152739			
						Del							T		A	G	T	G		G	0	3	KM030559			
B/C										T			T		A	G	T				3	0	KJ152740			
		C											T		A	G	T	G			2	0	KJ152741			
						Del	C			T			T		A	G	T				2	0	KJ152742			
										C		G	T		A	G	T				0	2	KM030565			
						Del				C			T		A	G	T				0	2	KM030560			

**15. taula.** HPV-16aren E7 genearen nukleotido aldaketa errepikarientan HPV-16aren bi infekzio motetan.

HPV-16 prototipoaren genoma (Genbank sarrera zenbakia K02718). AY686580, AY686581, AY686584, EU118173, AF536179 sekuentziak HPV-16aren A leinuaren erreferentzia sekuentziak dira; AF472508, AF536180, AF472509 B/C leinukoak eta AY686579, AF402678 D leinukoak. Urdinez agertzen diren nukleotido aldaketen posizioak aminoazido aldaketa sortzen dute.

Eskualdea	E7								HPV-16 infekzio anitza duten lagin kop.	HPV-16 banako infekzioa duten lagin kop.	GenBank sarrera zenbakia
	649	732	784	789	795	849	921	937			
Prototipoa	G	T	G	T	T	G	T	G			
A											K02718
A											AY686581
A											EU118173
A											AY686580
A											AY686584
D		C		C	G						AF536179
D		C		C	G						AY686579
B				C	G						AF402678
B				C	G						AF472508
C				C	G						AF536180
				C	G						AF472509
A	-	-	-	-	-	-	-	-	70	57	KJ152697
	-	-	-	-	-	A	-	-	43	14	KJ152698
	-	-	A	-	-	A	-	-	8	0	KJ152699
	-	-	A	-	-	-	-	-	6	0	KJ152700
	-	-	-	-	-	A	-	A	0	4	KM030566
D	-	C	-	C	G	A	C	-	5	7	KJ152703
	-	C	-	C	G	-	C	-	2	0	KJ152704
	-	C	-	C	G	-	-	-	2	0	KJ152705
	-	C	-	C	G	A	-	-	2	0	KJ152706
B/C	-	-	-	C	G	-	-	-	4	2	KJ152707
	-	-	-	C	G	A	-	-	3	0	KJ152708
	T	-	-	C	G	-	-	-	0	2	KM030567

*L1* genearen aldakortasun genetikoak 17 nukleotido ordezkapen azaldu zituen (16. taula). A6693C, G6719A, C6852T, C6968T eta G6992A bai D leinuko zein B/C leinuko aldaerentzako espezifikokoak ziren eta aminoazido aldaketa sinonimoak sortzen zituzten. D leinuko lagin guztietan leinu honentzat espezifikokoak ziren bi nukleotido aldaketa detektatu ziren, A6801T mutazio ez-sinonimoa (T415S) eta C6863T mutazio sinonimoa. Lau nukleotido ordezkapen leinu desberdin guztietako laginetan aurkitu ziren; G6690A, 6902insAT, 6902insATC eta GAT6951del. Nukleotido aldaketa hauen ondorioz aminoazidoen aldaketa sortzen zen; G6690A E378K aminoazido aldaketa sortzen du, 6902insAT eta 6902insATCren ondorioz serina berri bat sortzen da eta, azkenik, GAT6951del delezioaren ondorioz 465 posizioan azido aspartikoaren falta sortzen da. Orokorki, eskualde honetan infekzio anitzek eta banako infekzioek sortutako nukleotido sekuentziaren patroi kopurua berdina izan zen; 11 patroi desberdin bi infekzio motetan.

#### 4.2.2.4. Aminoazidoen aldaketa eta lesio mota

Aminoazidoen aldaketaren eta lesio motaren arteko erlazioa aztertu zen eta nukleotido ordezkapen batzuk lesioen garapenarekin erlazionatuagoak zeudela behatu ahal izan zen; adibidez, A104del nukleotido aldaketa lesioak zituzten laginen % 61,44an agertu zen eta T350G nukleotido ordezkapena lesioak zituzten pazienteen % 44,57an detektatu egin zen. Gainera, A leinuko espezifikoa den A131G nukleotido aldaketa lesioen agerpenarekin erlazio estua zuela behatu zen; nukleotido ordezkapen hau zuten paziente guztiek lesioa zeukaten. Antzekoa behatu zen D leinurako espezifikoa zen A532G nukleotido ordezkapenarekin; lesioak zituzten laginen % 66,66an nukleotido aldaketa hori detektatu egin zen. Bestalde, HPV-16 banako infekzioetan aurkitutako T191A nukleotido aldaketa eta infekzio mota honetarako espezifikoa zena, lesioen agerpenarekin erlazionatua egon liteke lesioak zituzten pazienteen % 25an ageri baitzen.



**16. taula.** HPV-16aren *L1* genearen nukleotido aldaketa errepikarientan HPV-16aren bi infekzio motetan.

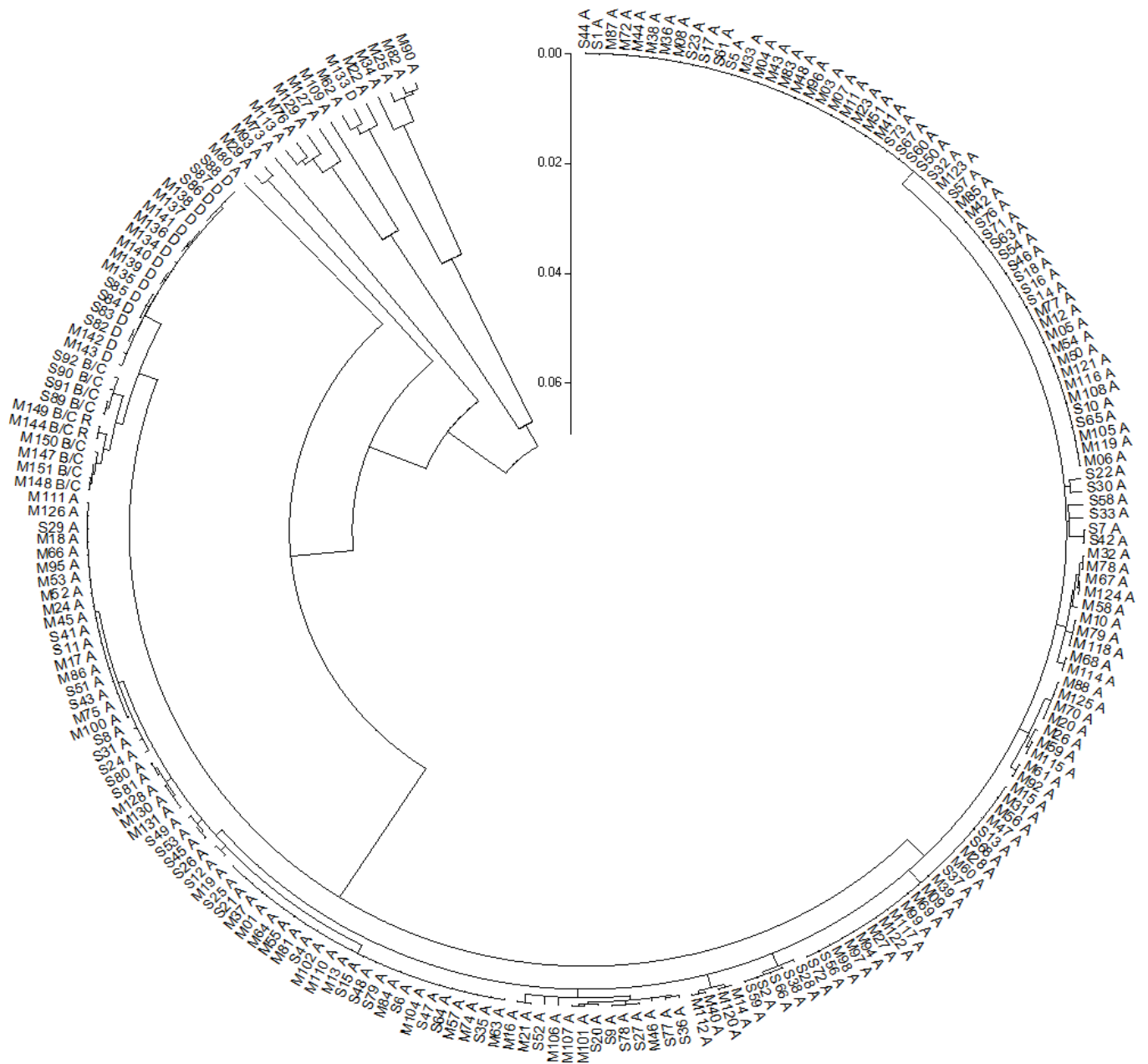
HPV-16 prototipoaren genoma (Genbank sarrera zenbakia K02718). AY686580, AY686581, AY686584, EU118173, AF536179 sekuentziak HPV-16aren A leinuaren erreferentzia sekuentziak dira; AF472508, AF536180, AF472509 B/C leinukoak eta AY686579, AF402678 D leinukoak. Urdinez agertzen diren nukleotido aldaketen posizioak aminoazido aldaketa sortzen dute.

Eskualdea	L1																HPV-16 infekzio anitza duten lagin kop.	HPV-16 banako infekzioa duten lagin kop.	GenBank sarrera zenbakia		
	6642	6690	6693	6719	6730	6801	6852	6863	6901	6902	6903	6945	6951	6952	6953	6968				6992	
Prototipoa	A	G	A	G	G	A	C	C	Del	Del	Del	G	G	A	T	C	G			K02718	
A									A	T	C		Del	Del	Del					AY686581	
A									A	T	C		Del	Del	Del					EU118173	
A									A	T	C		Del	Del	Del					AY686580	
A									A	T	C		Del	Del	Del					AY686584	
A									A	T	C		Del	Del	Del					AF536179	
D			C	A			T	T	A	T	C		Del	Del	Del	T	A			AY686579	
D			C	A		T	T	T	A	T	C		Del	Del	Del	T	A			AF402678	
B			C	A			T	T	A	T	C		Del	Del	Del	T	A			AF472508	
B				A			T		A	T	C		Del	Del	Del	T	A			AF536180	
C				A			T		A	T	C		Del	Del	Del	T	A			AF472509	
A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	C	-	Del	Del	Del	-	-	63	48	KJ152709	
	-	A	-	-	-	-	-	-	A	T	C	-	Del	Del	Del	-	-	17	8	KJ152710	
	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	-	-	Del	Del	Del	-	-	16	0	KJ152711	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	KJ152712	
	-	A	-	-	-	-	-	-	A	T	-	-	Del	Del	Del	-	-	3	0	KJ152713	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Del	Del	Del	-	-	3	0	KJ152714
	Del	-	-	-	-	-	-	-	A	T	C	-	Del	Del	Del	-	-	0	5	KM030561	
	-	-	-	-	T	-	-	-	A	T	C	-	Del	Del	Del	-	-	0	4	KM030568	
	-	A	-	-	T	-	-	-	A	T	C	-	Del	Del	Del	-	-	0	3	KM030569	
	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	C	A	Del	Del	Del	-	-	0	3	KM030570	
Del	A	-	-	-	-	-	-	A	T	C	-	Del	Del	Del	-	-	0	2	KM030562		
-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	KJ152715		
D	-	-	C	A	-	T	T	T	A	T	C	-	Del	Del	Del	T	A	6	0	KJ152717	
	-	A	C	A	-	T	T	T	A	T	C	-	Del	Del	Del	T	A	2	0	KJ152718	
	-	-	-	A	-	T	-	T	A	T	C	-	Del	Del	Del	T	A	2	0	KJ152719	
	-	-	-	A	-	T	T	T	A	T	C	-	Del	Del	Del	T	A	0	5	KM030571	
	-	-	-	A	-	-	T	T	A	T	C	-	Del	Del	Del	T	A	0	2	KM030572	
B/C	-	-	-	A	-	-	T	-	A	T	C	-	Del	Del	Del	T	A	6	0	KJ152720	
	-	A	-	A	-	-	T	-	A	T	C	-	Del	Del	Del	T	A	0	3	KM030573	
	-	-	-	A	T	-	T	-	A	T	C	-	Del	Del	Del	T	A	0	1	KM030574	

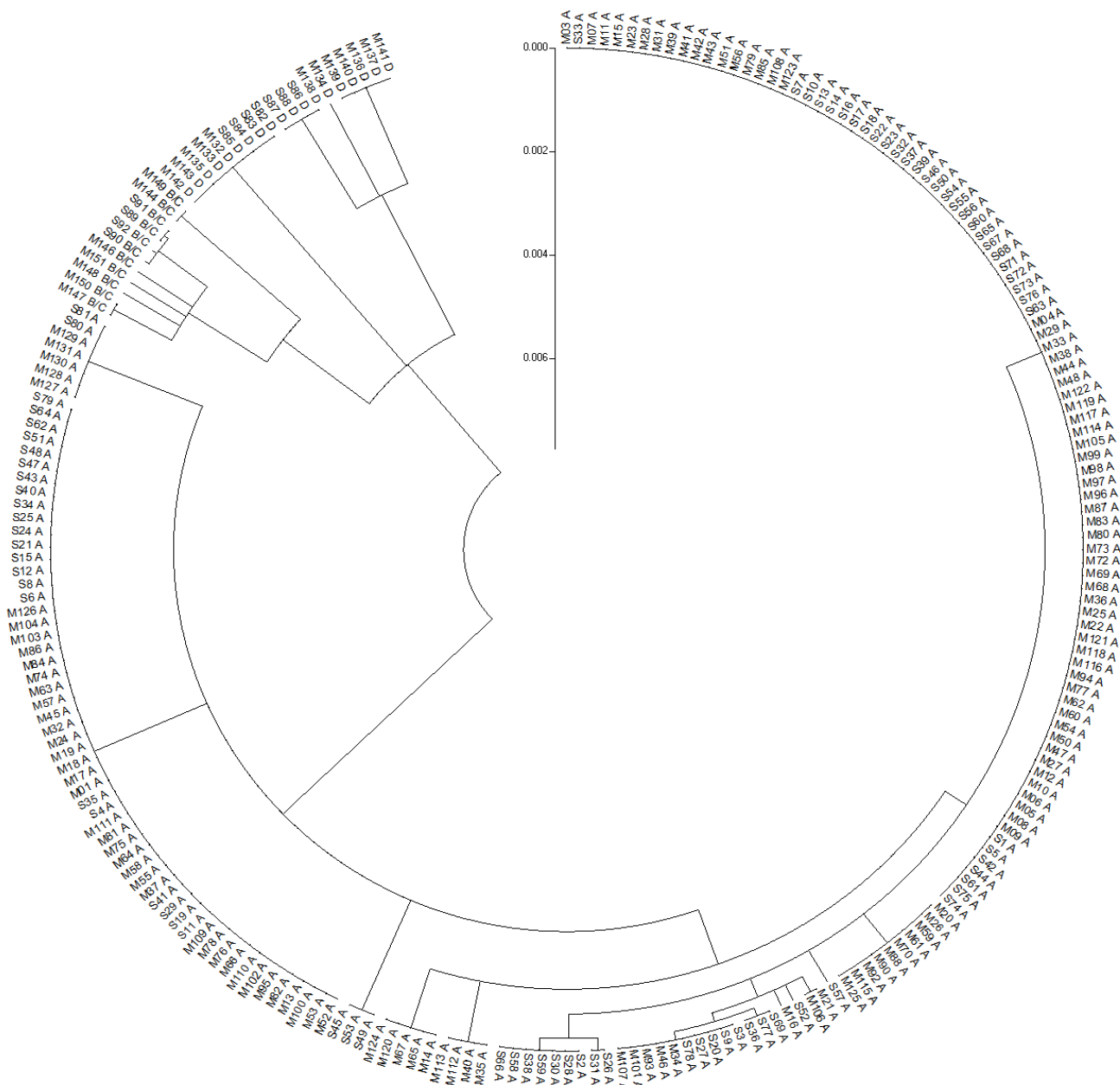
#### 4.2.2.5. Analisi filogenetikoak eta birkonbinazioa

*E6*, *E7* eta *L1* geneen analisi filogenetikoak adar Europarreko aldaerak zituzten laginak (A leinua) eta adar ez-europarreko aldaerak zituzten laginak (B/C/D leinuak) erlazionatuta zeuden nodoak sortzen zituztela erakutsi zuen (21. irudia). HPV-16arentzako positiboak ziren bi infekzio motetako laginetan nukleotido sekuentziaren analisi filogenetikoak bi talde bereiztu zituen: aldaera Europarrak zituzten laginak eta aldaera ez-europarrak zituztenak. Bi infekzio motetako laginen nukleotido sekuentziak talde filogenetiko bakoitzaren barnean beraien artean nahasturik agertzen ziren. Gainera, eskualde bakoitzaren analisi bereizian aldaera Europarrak eta aldaera ez-europarrak, hiru geneetan eta bi infekzio motetan, talde independenteak sortzen zituztela behatu zen (22., 23. eta 24. irudiak).

Birkonbinazioari dagokiola, aurreko atalean azaldu izan den moduan, HPV-16aren infekzio anitza zuten bi laginek birkonbinazioa jasan zutela behatu zen. Hala ere, HPV-16aren banako infekzioa zuten laginetan ez zen lagin birkonbinatu posiblerik identifikatu.

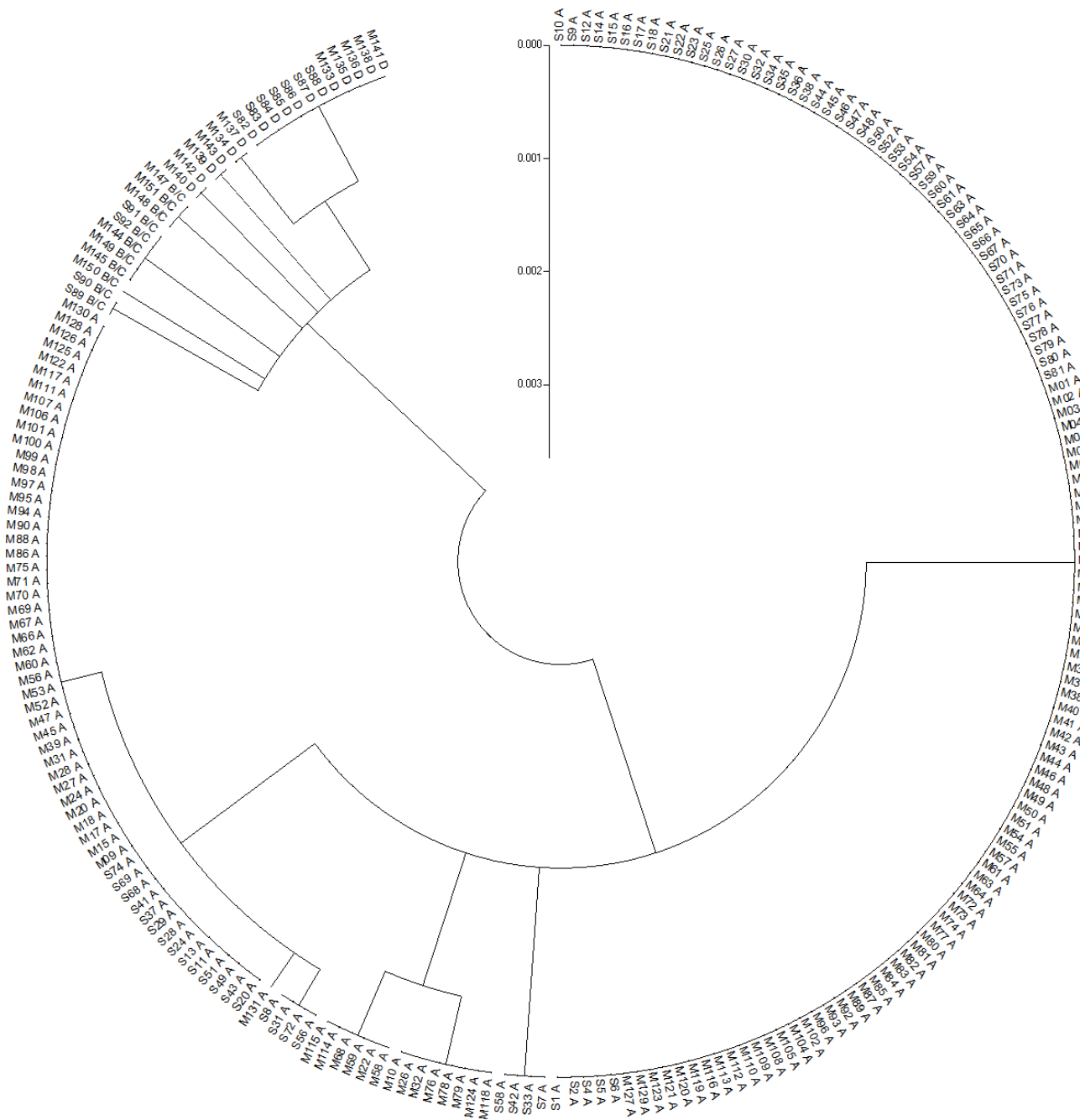


**20. irudia.** HPV-16aren *E6*, *E7* eta *L1* geneen zuhaitz filogenetikoa bi infekzio motetan. MEGA programaren bidez eta Maximum likelihood edo probabilitate maximoko metodoaren bidez eraiki zen zuhaitz filogenetikoa. M: HPV-16aren infekzio anitza eta S: HPV-16aren banako infekzioa. A leinua, B/C leinua eta D leinua. R batez markaturiko laginak, birkonbinazio lagin posibleak dira.



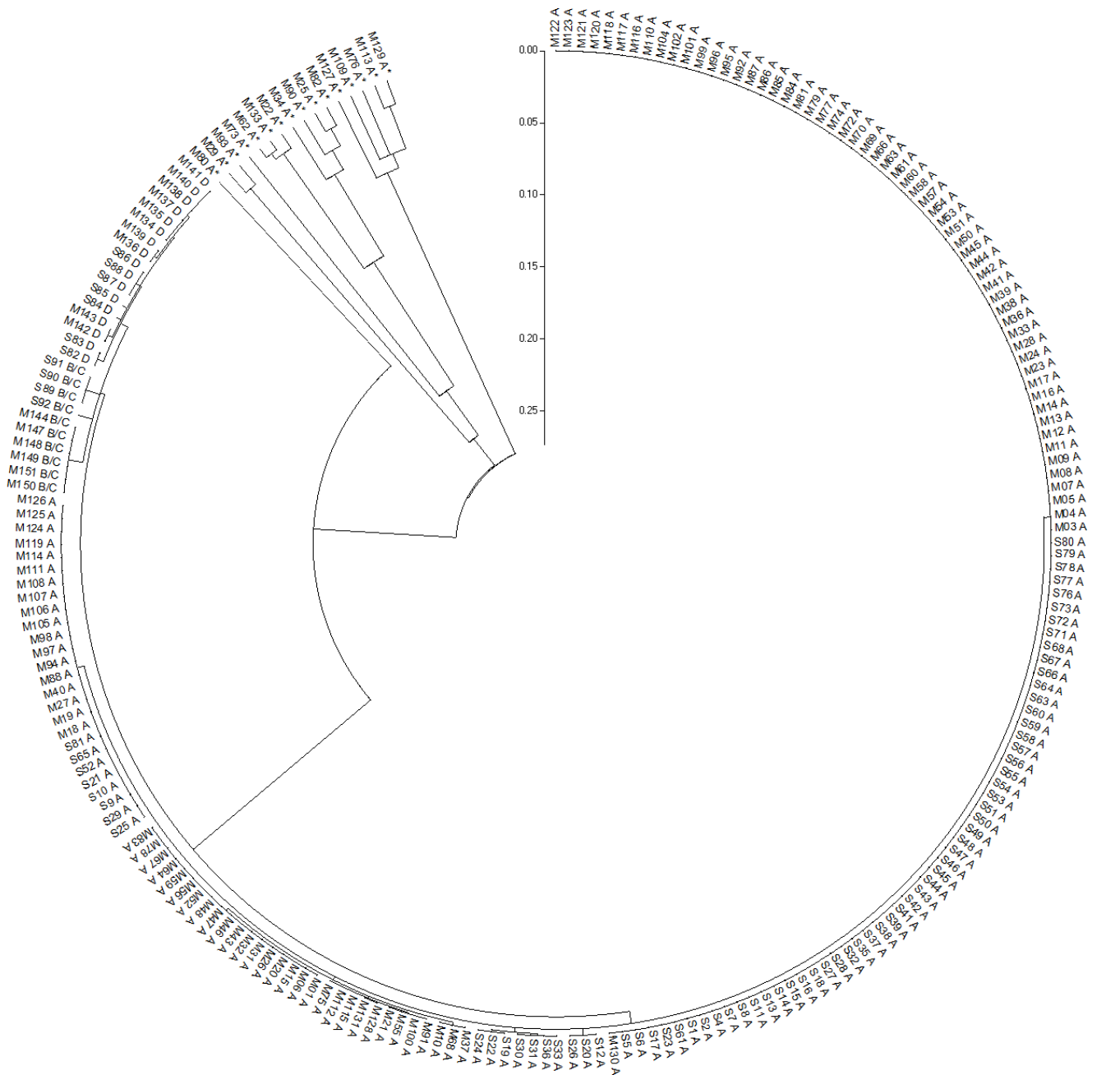
**21. irudia.** HPV-16aren *E6* genearen zuhaitz filogenetikoa bi infekzio motetan.

MEGA programaren bidez eta Maximum likelihood edo probabilitate maximoko metodoaren bidez eraiki zen zuhaitz filogenetikoa. M: HPV-16aren infekzio anitza eta S: HPV-16aren banako infekzioa. A leinua, B/C leinua eta D leinua.



**22. irudia.** HPV-16aren E7 genearen zuhaitz filogenetikoa bi infekzio motetan.

MEGA programaren bidez eta Maximum likelihood edo probabilitate maximoko metodoaren bidez eraiki zen zuhaitz filogenetikoa. M: HPV-16aren infekzio anitza eta S: HPV-16aren banako infekzioa. A leinua, B/C leinua eta D leinua.



**23. irudia.** HPV-16aren *L1* genearen zuhaitz filogenetikoa bi infekzio motetan.

MEGA programaren bidez eta Maximum likelihood edo probabilitate maximoko metodoaren bidez eraiki zen zuhaitz filogenetikoa. M: HPV-16aren infekzio anitza eta S: HPV-16aren banako infekzioa. A leinua, B/C leinua eta D leinua. HPV-16a ez zen beste genotipo bat amplifikatu izan zen laginetan izartxo bat ageri da.

### 4.3. E6/E7 mRNA BIOMARKATZAILEAREN AZTERKETA

#### 4.3.1. E6/E7 mRNA biomarkatzailearen eraginkortasunaren azterketa

Lan honetan, *E6* eta *E7* onkogeneen RNA mezulariaren adierazpena 128 laginetan aztertu egin zen. Lagin hauek 105 emakumeetatik jaso izan ziren; 82 emakumeren laginak behin bakarrik aztertu ziren eta 23 emakumeren laginetan mRNAren adierazpena birritan aztertu zen (2012/2013 urtean jasotako lagin bat eta 2014 urtean jasotako beste lagin bat).

Lagin hauek zituzten genotipoei dagokiola, NucliSens®EasyQ®HPV v1 Testak detektatzen dituen 5 genotipoen artean HPV-16 izan zen genotipo nagusia (% 68,71, 101/147), HPV-18 (% 12,25, 18/147), HPV-45 (% 8,16, 12/147), HPV-31 (% 6,80, 10/147) eta HPV-33 genotipoez jarraiturik (% 4,08, 6/147). Hala ere, onkogeneen adierazpenari dagokionez, HPV-33 genotipoa izan zen gehien adierazi zen genotipoa (% 100, 6/6), HPV-18 (% 77,77, 14/18), HPV-16 (% 70,29, 71/101), HPV-31 (% 70, 7/10) eta HPV-45 genotipoez jarraiturik (% 25, 3/12).

##### 4.3.1.1. mRNA adierazpena behin aztertutako emakumeetan

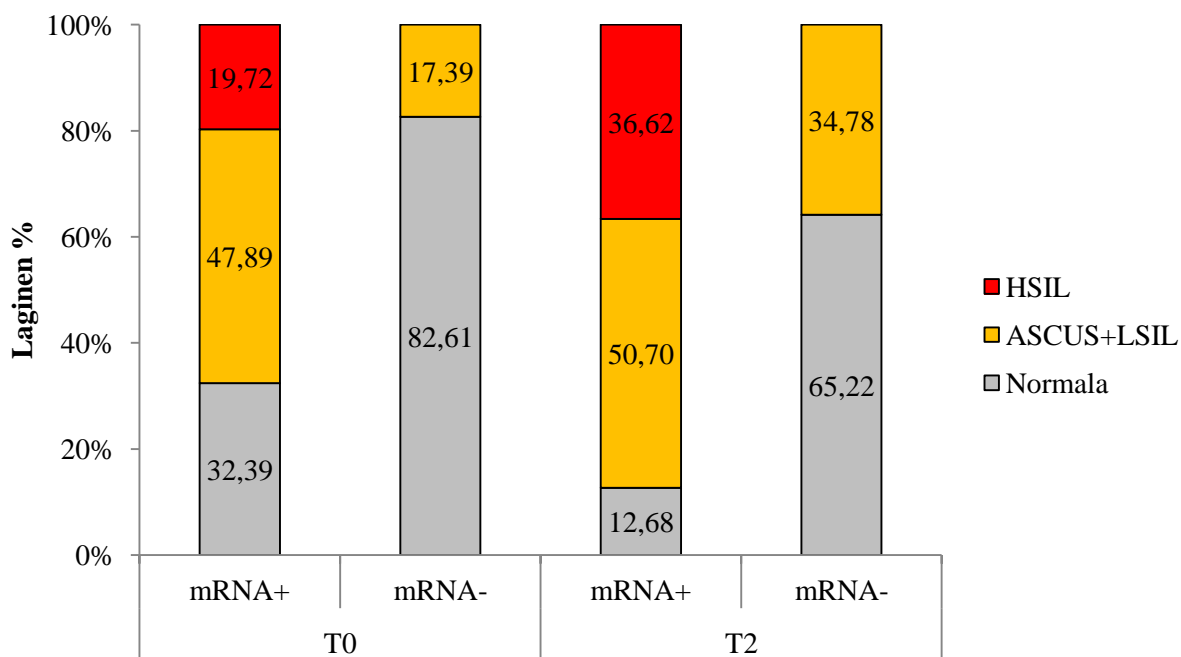
*E6* eta *E7* onkogeneen mRNAren adierazpena behin bakarrik aztertu egin zen 82 emakumeen laginetan. Emakume hauen adin batez bestekoa  $33,62 \pm 10,57$  urtetakoa izan zen 17-63 adin tartean. Emakume hauen gehiengoa, 82 emakumeetatik 54, HPV infekzio anitzekin kutsatuta zeuden, aldiz, emakume hauen % 34,15ak HPV banako infekzioa zuen.

Behin bakarrik aztertutako 82 emakumeen laginetan, maizago detektaturiko genotipoa 16a izan zen (% 67,01), 18, 45, 31 eta 33 genotipoez jarraiturik (% 11,34, % 10,31, % 7,21 eta % 4,13, hurrenez hurren).

E6/E7 mRNAren positibitate ratioa % 68,29koa izan zen, hau da, aztertutako 82 laginetatik 52 laginetan *E6* eta *E7* onkogeneen mRNA detektatu egin zen. mRNArentzako positiboak eta negatiboak izan ziren emakumeen adin batez bestekoa antzekoa izan zen; onkogeneen adierazpenerako positiboak izan ziren emakumeen adin batez bestekoa  $33,53 \pm 11,12$  urtetakoa izan zen eta negatiboak izan ziren emakumeena  $33,8 \pm 9,62$  urtetakoa. E6/E7 mRNArentzako positiboak izan ziren laginen % 71,42an

HPV-16aren onkogeneak detektatu ziren (40/56), HPV-18renak % 10,71an (6/56), HPV-33renak % 3,57an (2/56), HPV-16renak + HPV-33renak % 3,57an (2/56) eta beste genotipoenak bakarrik % 1,78ko proportzioan aurkitu ziren (1/56): 31; 45; 16, 18, 31 + 45; 16, 18 + 33; 16, 31 + 45 eta, azkenik, 16 + 31 genotipoa.

Bestalde, onkogeneen adierazpenaren emaitzak emakumeen zitologia egoerarekin erkatu ziren. Zitologiaren eta E6/E7 mRNA testaren emaitzak 77 emakumeetan lortu ziren. Patogenotasuna hiru taldetan banatu egin zen: 1) normala edo negatiboa (ez zen lesiorik aurkitu), 2) ASCUS eta LSIL eta 3) HSIL. E6/E7 mRNArentzako positiboak izan ziren laginen artean, % 47,89a ASCUS edo LSIL zituzten emakumeenak ziren (25. irudia). mRNAren negatibotasun ratioa, zitologia normala zuten laginetan % 82,61 izan zen eta ASCUS edo LSIL zuten emakumeen laginetan % 17,39.



**25. irudia.** Emakumeen zitologia emaitzak mRNA positibotasun eta negatibotasun ratioen arabera.

mRNA+: E6/E7 mRNA adierazpen positiboa eta mRNA-: E6/E7 mRNAren adierazpenik gabe. T0 lagina jaso zen unean zeukaten zitologia emaitzari dagokio eta T2 lagina jaso ondorengo bi urtetan izandako zitologia emaitzari.



Patologiaren azterketa dela eta, lagina hartu eta hurrengo bi urteetan 77 emakume horien patologiaren jarraipena egin zen. Laginen patogenotasuna kontuan izanik, E6/E7 mRNArentzako positiboak ziren laginen artean, % 50,70 ASCUS edo LSIL zuten emakumeenak ziren eta %36,62 HSIL zuten emakumeenak. Gainera E6/E7 mRNAren adierazpenik izan ez zuten laginen artean % 65,22 zitologiaren emaitza normala zuten emakumeenak ziren.

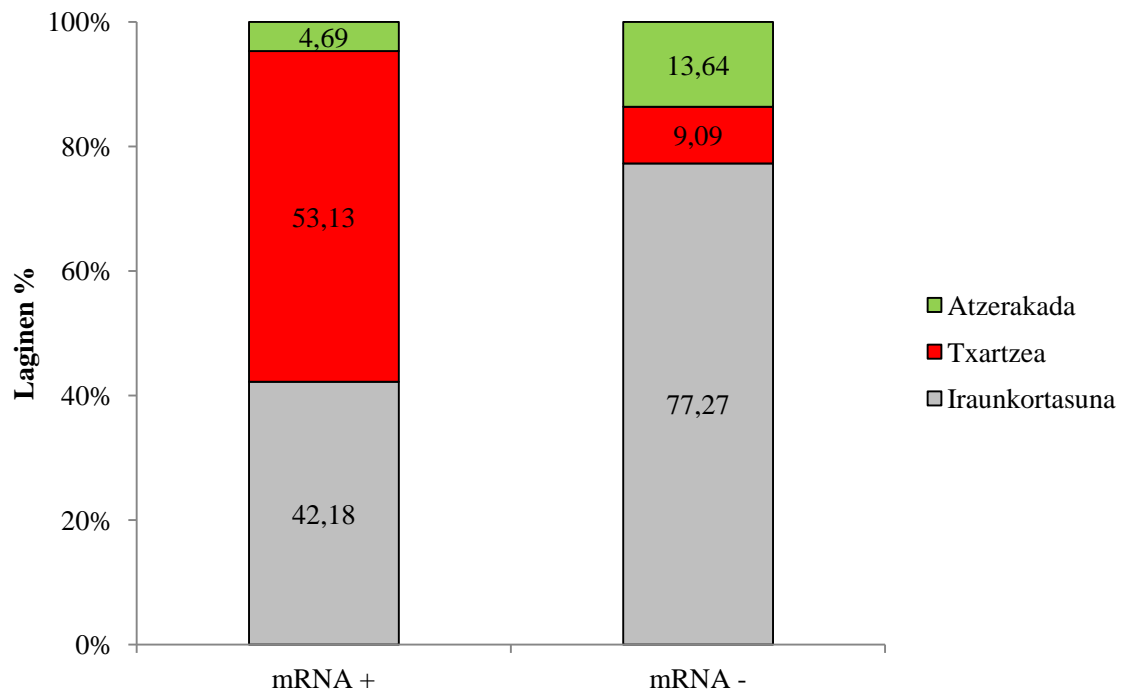
Halaber, E6/E7 mRNA patologia talde bakoitzeko ikertua izan zen (17. taula). Urteetan zehar zitologiaren emaitzaren jarraipena egiterakoan, HSIL zuten emakumeetan, E6/E7 mRNAren positibotasun ratio % 100an mantentzen zen urteetan zehar. Aldiz, ASCUS edo LSIL zuten emakumeetan, positibotasun ratio hori % 89,28tik % 84ra aldatu zen. Gainera, patologia talde honetan, E6/E7 mRNAren negatibotasun ratio % 50etik % 58,62ra igo zen.

**17. taula.** E6/E7 mRNA detekzioa zitologia emaitzen arabera.

		Zitologia emaitza	E6/E7mRNA adierazpena (n/%)	
			mRNA positiboa	mRNA negatiboa
Behin aztertutako emakumeak	T0	Normala	19/50,00	19/50,00
		ASCUS+LSIL	25/89,28	3/10,72
		HSIL	11/100,00	0/0,00
	T2	Normala	12/41,38	17/58,62
		ASCUS+LSIL	21/84,00	4/16,00
		HSIL	23/100,00	0/0,00
Birritan aztertutako emakumeak	T0	Normala	7/63,63	4/36,37
		ASCUS+LSIL	7/77,77	2/22,23
		HSIL	3/100,00	0/0,00
	T2	Normala	4/44,44	5/55,56
		ASCUS+LSIL	7/70,00	3/30,00
		HSIL	4/100,00	0/0,00

T0 lagina jaso zen unean zeukaten zitologia emaitzari dagokio eta T2 lagina jaso ondorengo bi urtetan izandako zitologia emaitzari.

Bestalde, lesioen eboluzioa aztertu egin zen (26. irudia). Laginak hiru talde desberdinetan sailkatu ziren: 1) iraunkortasuna: lagin hauek lesio maila bera mantentzen zuten denboran zehar (ez zuten txarrera egiten baina ez zuten hobetzen ere ez), 2) txartzea: lagin hauek txarrera egiten zuten (lagina hartu eta ondorengo urteetan txartu egiten ziren) eta 3) atzerakada: emakume hauen lesioa atzera egiten zuen. Sailkapen hau jarraituz, mRNA positibotasun ratioarik altuena txarrera egiten zuten lesioak zituzten emakumeetan behatu zen (% 53,13) eta, aldiz, ratioarik baxuenak lesioen iraunkortasuna azaltzen zuten emakumeetan (% 42,18) eta denboran zehar lesioen atzerakada izan zuten emakumeetan (% 4,69) behatu zen. Gainera korrelazio indartsua behatu zen mRNA negatibotasun ratioaren eta lesioen iraunkortasuna edo atzerakada zuten emakumeen laginen artean (% 77,27 eta % 13,64, hurrenez hurren).



**26. irudia.** E6/E7 mRNAren adierazpenaren eta lesioen eboluzioaren arteko erlazioa.

mRNA+: E6/E7 mRNAren adierazpen positiboa eta mRNA-: E6/E7 mRNAren adierazpenik gabe.

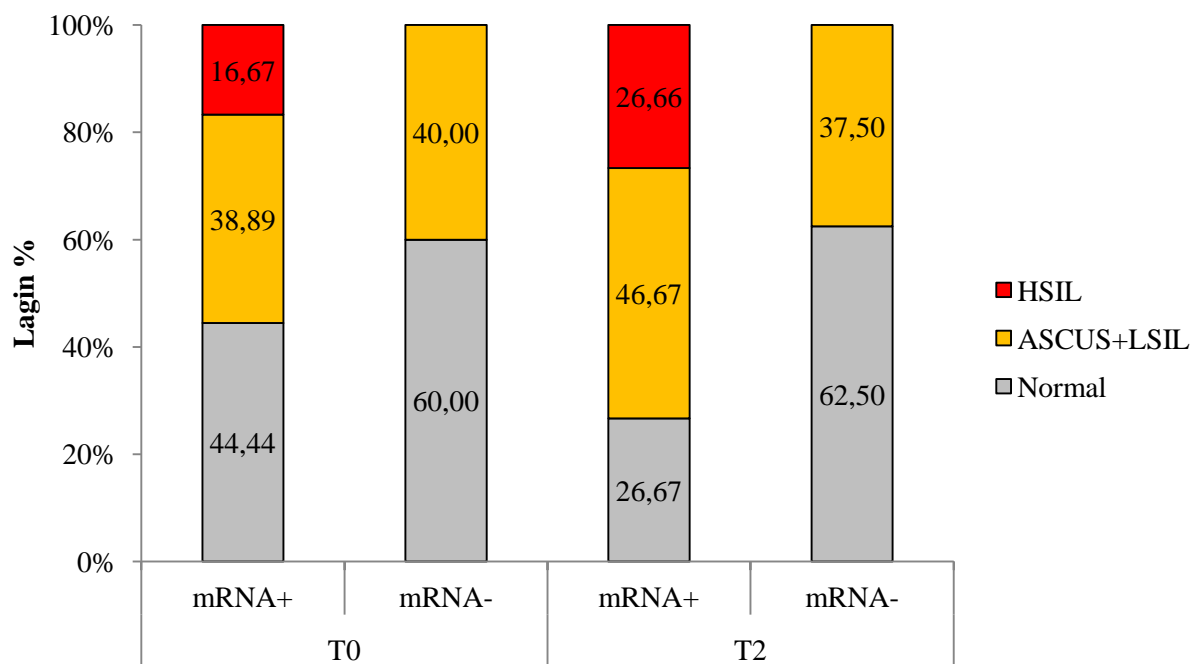
#### 4.3.1.2. mRNA adierazpena birritan aztertutako emakumeetan

Lan honetan, 23 emakumeei lagin bat hartu zitzaien bi urte desberdinetan; lehenengo lagina 2012 edo 2013 urtean jaso zen eta bigarren lagina 2014 urtean. Emakume hauen adin batez bestekoa  $38,87 \pm 11,93$  urtetakoa izan zen, 24-58 adin tartean. HPVaren banako infekzioa emakumeen % 52,17an detektatu zen (12/23) eta HPV infekzio anitza emakumeen % 47,83an (11/23). Gehien detektaturiko genotipoa 16a izan zen (% 73,47) eta ondoren, 18 genotipoa (% 14,29) eta 31, 33 eta 45 genotipoak izan ziren nagusi (% 4,08 genotipo bakoitza).

E6/E7 mRNAaren positibotasun ratioa % 69,56koa izan zen (32/46). HPV-16aren onkogeneen adierazpena % 68,75an detektatu zen (22/32), HPV-18arena % 15,63an (5/32), HPV-16 + HPV-31arena % 6,26an (2/32) eta beste genotipoak % 3,12an (1/32): 33; 16 + 18 eta 16, 31 + 33.

E6 eta E7 onkogeneen mRNAaren positibotasun ratioari dagokionez, mRNArentzako positiboak izan ziren laginetatik, harturako lehen laginean, % 55,56a lesio motaren bat zuten (% 38,89 ASCUS edo LSIL eta % 16,67 HSIL) (27. irudia). Hala ere, lesioren bat eta onkogeneen adierazpena azaltzen zuten emakumeen portzentajearen funtsezko igoera behatu zen hartutako bigarren laginetan (% 46,67 ASCUS edo LSIL zuten emakumeetan eta % 26,66 HSIL zuten emakumeetan). Bestalde, E6/E7 mRNAaren negatibotasun ratioa denboran zehar egonkor mantendu zen ASCUS edo LSIL zuten emakumeetan (% 40tik % 37,5ra) eta lesiorik ez zuten emakumeetan (% 60tik % 62,5ra).

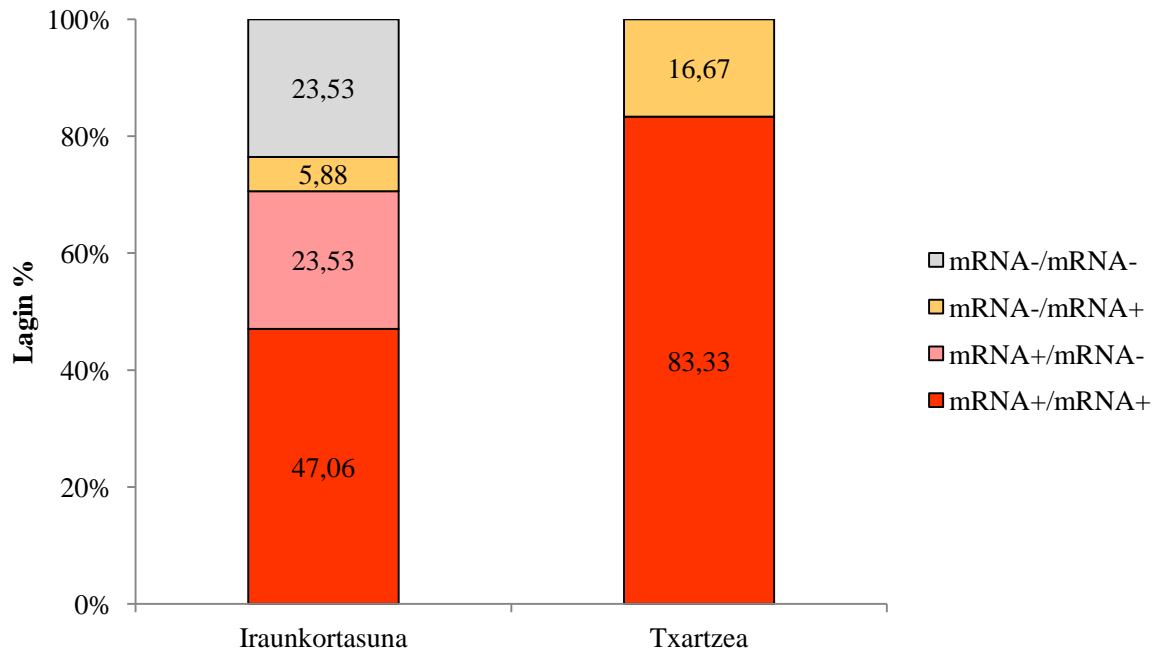
Patologia taldeei dagokionez, ASCUS eta LSIL erako lesioak zituzten emakumeen eta HSIL zuten emakumeen artean mRNA ratioa egonkor mantendu zen denboran zehar (% 77,77tik % 70ra eta % 100) (17. taula). Lesiorik ez zituzten emakumeen artean mRNA positibotasun ratioa txikitu egin zen urteetan zehar (% 63,63tik % 44,44ra). E6/E7 mRNAaren negatibotasun ratioari dagokionez, lesiorik gabeko emakumeen artean urteetan zehar handitu egin zela behatu ahal izan zen (% 36,37tik % 55,56ra).



**27. irudia.** Emakumeen zitologia emaitzak mRNA positibotasun eta negatibotasun ratioen arabera.

mRNA+: E6/E7 mRNAren adierazpen positiboa eta mRNA-: E6/E7 mRNAren adierazpenik gabe. T0 jasotako lehen laginaren emaitzak adierazten ditu eta T2 jasotako bigarren laginaren emaitzak adierazten ditu.

Lesioen eboluzioari dagokionez, lesioen txarrera egiteko prozesua pairatu zuten emakumeetan aztertutako bi laginetan onkogeneen mRNA detektatu egin zen portzentaje altu batean (% 83,33) edo, bestela, lehen emaitza negatibo bat izan zuten eta gero, bigarren laginean, mRNA detektatu egin zen (% 16,67) (28. irudia). Aldiz, lesio mailaren iraunkortasuna mantendu zuten emakumeen % 23,53an bi laginetan ez zen mRNArik detektatu edo % 23,53an ere, lehengo laginean mRNA detektatu egin zen baina ez bigarrean. Hala ere, lesioaren iraunkortasuna mantendu zuten emakumeen % 47,06an bi laginak positiboak izan ziren onkogeneen adierazpenean.



**28. irudia.** E6/E7 mRNAren detekzioa lesioen eboluzioaren arabera.

Emakumeen laginak bi urte desberdinetan jaso ziren: 2012/2013 eta 2014. mRNA-/mRNA-: bi laginak negatiboak izan ziren mRNAren detekziorako; mRNA-/mRNA+: lehenengo laginean ez zen mRNArik detektatu baina bigarrean mRNA detektatu egin zen; mRNA+/mRNA-: lehenengo laginean mRNA detektatu zen baina bigarrean ez; mRNA+/mRNA+: bi laginetan mRNA detektatu egin zen.

### **4.3.2. RNA erauzketa metodoen garrantzia**

Azterketa hau burutzeko 50 emakume aukeratu egin ziren. Emakume hauen adin tartea 19-63 urtetakoa zen eta beraien adin batez bestekoa  $34,96 \pm 10,63$  urtetakoa. Aztertutako emakume hauen % 58 (29/50) HPV infekzio anitza zuten eta % 42 (21/50) HPV banako infekzioa. Genotipoen determinazioari dagokionez, gehien detektaturiko genotipoa 16a izan zen (% 60,37), 45 (% 13,21), 18 (% 11,32), 31 (% 9,43) eta 33 genotipoez jarraiturik (% 5,67).

#### 4.3.2.1. mRNA positibotasun ratioa eta genotipo desberdinen adierazpena

bioMérieux erauzketa metodoarekin aztertutako laginetan E6/E7 mRNA positibotasun ratioa % 62koa izan zen (31/50) (18. taula). Nahiz eta gehien detektaturiko genotipoa 16a izan, gehien adierazten zen genotipoa HPV-33 izan zen, HPV-18, HPV-16, HPV-31 eta HPV-45 genotipoez jarraiturik.

Roche erauzketa metodoan onkogeneen adierazpenaren positibotasun ratioa % 24koa izan zen (12/50). Metodo honen bidez gehien adierazten zen genotipoa HPV-33 zela behatu zen, HPV-18, HPV-45, HPV-31 eta HPV-16 genotipoez jarraiturik.

Qiagen erauzketa metodoaren bidez, aztertutako laginen % 6a soilik E6/E7 mRNAren adierazpenerako positiboak izan ziren (3/50). Gainera, ez zen erlazorik behatu emakumeen lesioen eta onkogeneen adierazpenaren artean. Ondorioz, E6/E7 mRNA positiboak ziren lagin kopuru baxua eta lesioekin zuten korrelazio falta zela eta metodo honen bidez lortutako emaitzak ez ziren metodoen arteko konparaketan kontuan hartu.

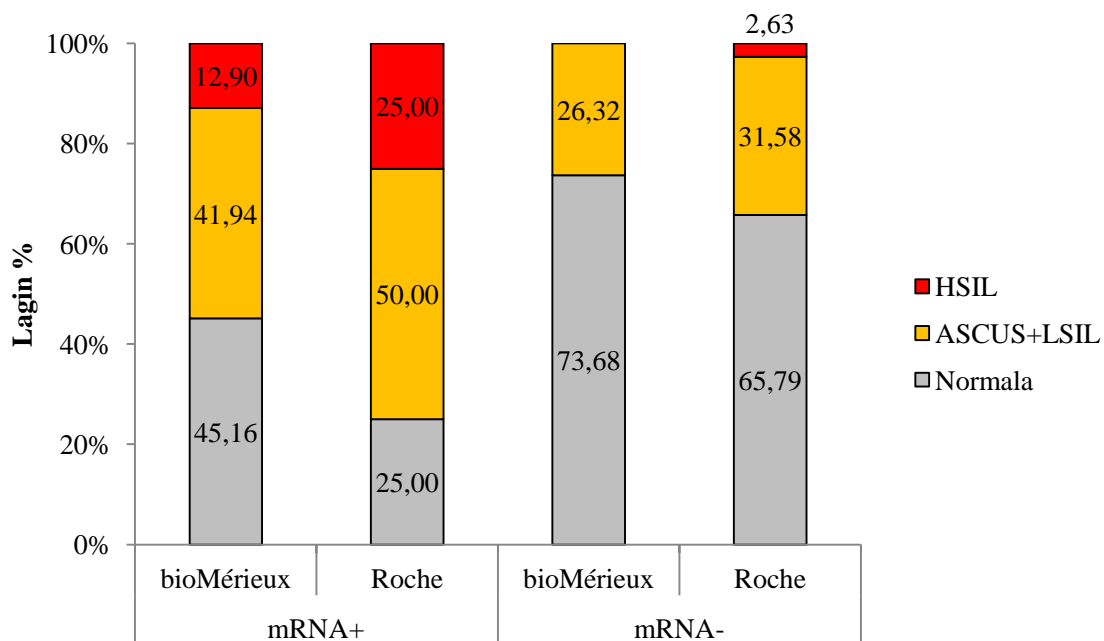
**18. taula.** E6/E7 mRNA adierazpena genotipo bakoitzerako eta positibotasun ratioa erabilitako hiru RNA erauzketa metodoetan.

Genotipoa (lagin kop)	E6/E7 mRNA adierazpena (nº, %)		
	Nuclisens erauzketa kita (bioMérieux)	High Pure Viral RNA Kita (Roche)	RNeasy Plus Mini kita (Qiagen)
HPV-16 (32)	22/68,75	6/18,75	2/6,25
HPV-18 (6)	5/83,33	3/50,00	0/0,00
HPV-31 (5)	2/40,00	1/20,00	1/20,00
HPV-33 (3)	3/100,00	2/66,67	0/0,00
HPV-45 (7)	2/28,57	2/28,57	0/0,00
<b>E6/E7 mRNA positibotasun ratioa (%)</b>	62	24	6

#### 4.3.2.2. Onkogeneen adierazpenaren eta emakumeen patologia

Onkogeneen adierazpenaren eta emakumeen patologiarekin erlazioa ikertua izan zen (29. irudia). bioMérieux erauzketa metodoarekin aztertutako laginetan, E6/E7 mRNArentzako positiboak ziren laginen % 54,84 lesioak zituzten emakumeenak ziren; % 41,94 ASCUS edo LSIL zuten emakumeena eta % 12,90 HSIL zuten emakumeena. Bestalde, mRNAren adierazpenerako negatiboak ziren laginen % 73,68a lesiorik ez zuten emakumeenak ziren. Gainera, gradu altuko lesioak zituzten emakume guztiak E6/E7 mRNAren adierazpenerako positiboak izan ziren.

Roche erauzketa metodoari dagokionez, E6/E7 mRNArentzako positiboak ziren emakumeen % 75ak lesio motaren bat zuten (% 50 ASCUS edo LSIL zutenak eta % 25 HSIL zutenak). Bestalde, onkogeneen adierazpenerako negatiboak ziren laginen artean % 65,79 lesiorik ez zuten emakumeen laginak ziren, % 31,58 ASCUS edo LSIL zuten emakumeenak eta % 2,63 gradu altuko lesioa zuten emakumeenak.



**29. irudia.** Emakumeen patologia E6/E7 mRNA adierazpenaren arabera bioMérieux eta Roche erazketa metodoetan.

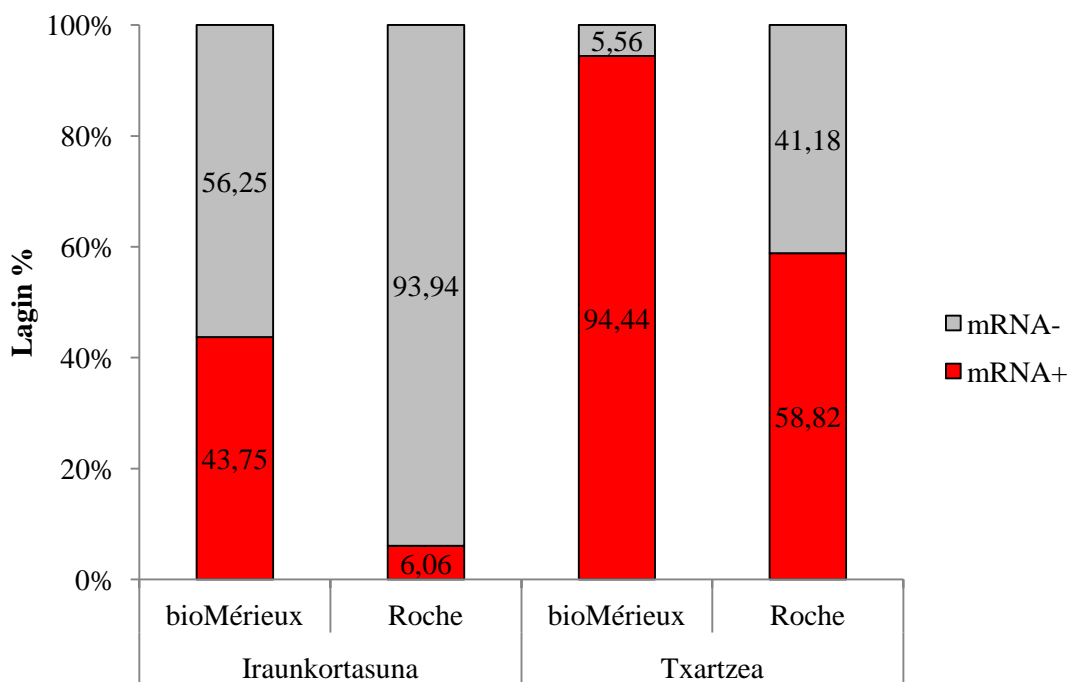
mRNA+: E6/E7 mRNAREN adierazpen positiboa eta mRNA-: E6/E7 mRNAREN adierazpenik gabe.

#### 4.3.2.3. Patologiaren eboluzioa

Gainera, onkogeneen adierazpena lesioen eboluzioaren arabera aztertu zen (30. irudia). Aurreko atalean ikusitako moduan, lesioen eboluzioa hiru taldetan sailkatu zen: 1) iraunkortasuna, 2) txartzea eta 3) atzerakada. bioMérieux erazkera metodoarekin aztertutako laginetan, lesioen egoeraren txartze prozesu bat jasan zuten emakumeen % 94,44an onkogeneen adierazpena detektatu egin zen. Gainera lesioen iraunkortasuna azaltzen zuten emakumeen % 43,75ak E6/E7 mRNARENtzako positiboak izan ziren. Aztertutako emakumeen artean batek ere ez ez zuen lesioen atzerakada pairatu.

Roche erazketa metodoari dagokionez, lesioen iraunkortasuna azaldu zuten emakumeen % 93,94ak onkogeneen adierazpenerako negatiboak izan ziren. Hala ere, lesioen txartze prozesua jasan zuten emakumeen % 58,82a E6/E7 mRNAREN adierazpenerako positiboak izan ziren eta % 41,18an ez zen onkogeneen adierazpenik detektatu.





**30. irudia.** Lesioen eboluzioa E6/E7 mRNA adierazpenaren arabera bioMérieux eta Roche erauzketa metodoetan.

mRNA+: E6/E7 mRNAREN adierazpen positiboa eta mRNA-: E6/E7 mRNAREN adierazpenik gabe.

#### 4.3.2.4. bioMérieux eta Roche RNA erauzketa metodoen arteko konparaketa

Behatutako adostasun erlatiboa kontuan izanik ( $Pr(a)$ ), patologiar dagokionez, lesioak zituzten emakumeek onkogeneak adieraziko zituztela eta lesio gabeko emakumeetan ez zela adierazpenik behatuko esperotako emaitzak zirela kontuan izanik, bioMérieux erauzketa metodoak adostasun handiagoa azaltzen zuen lesioen bat zuten emakumeetan (0,72 gradu baxuko lesioetan eta 1 gradu altuko lesioetan) eta, aldiz, Roche erauzketa metodoak adostasun handiagoa erakusten zuen lesiorik gabeko emakumeetan (0,89) (19. taula). Lesioen garapenari dagokionez, bioMérieux erauzketa metodoak konkordantzia altua erakutsi zuen txarrera egin zuten lesioak zituzten emakumeetan (0,74) eta Roche erauzketa metodoak, ostera, adostasun ia perfektua erakutsi zuen lesio berdinen iraunkortasuna aurkeztu zuten emakumeetan (0,95).

Bestalde, bi RNA erauzketa metodoak erkatuak izan zirenean, E6/E7 mRNAren detekzio ratioari dagokiola, adostasun moderatua behatu zen beraien artean (0,58). Gainera, lesio gabeko emakumeetan edo gradu altuko lesioak zituzten emakumeetan metodoen arteko adostasuna funtsezkoa zen, baina, adostasun hau, moderatua izan zen gradu baxuko lesioak zituzten emakumeetan (0,50) eta lesioen garapenari dagokionez (0,57 lesioen iraunkortasuna azaltzen zuten emakumeetan eta 0,60 txarrera egindako lesioak zituzten emakumeetan).

**19. taula.** Behatutako adostasun erlatiboa patologia eta lesioen eboluzioaren arabera bioMérieux eta Roche erauzketa metodoetan.

<b>ERAUZKETA METODO BAKOITZAREN ANALISI BEREIZIA</b>			
	<b>Metodoa</b>		<b>Behatutako adostasun erlatiboa Pr(a)</b>
Patologia	Nuclisens erauzketa kita (bioMérieux)	Lesio gabe	0,5
		ASCUS+LSIL	0,72
		HSIL	1
	High Pure Viral RNA Kita (Roche)	Lesio gabe	0,89
		ASCUS+LSIL	0,33
		HSIL	0,75
Lesioen eboluzioa	Nuclisens erauzketa kita (bioMérieux)	Iraunkortasuna	0,52
		Txartzea	0,74
	High Pure Viral RNA Kita (Roche)	Iraunkortasuna	0,95
		Txartzea	0,40
<b>BIOMERIEUX ETA ROCHE ERAUZKETA METODOEN ARTEKO ERKAKETA</b>			
E6/E7 mRNA detekzio ratioa			0,58
Patologia	Lesio gabe	0,61	
	ASCUS+LSIL	0,50	
	HSIL	0,75	
Lesioen eboluzioa	Iraunkortasuna	0,57	
	Txartzea	0,60	

Beste alde batetik, Cohen kappa koefizientea kontuan izanik, bi metodoek bidezko adostasuna azaldu zuten (0,26 bioMérieux eta 0,32 Roche) (20. taula). Hala ere, lesioen aurrera egiteari dagokionez, Roche erauzketa metodoak adostasun moderatua erakutsi zuen bitartean (0,41) bioMérieux metodoaren adostasuna bidezkoa izan zen (0,26). Azkenik, E6/E7 mRNA detekzio ratioari dagokionez, metodoen arteko konkordantzia bidezkoa izan zen (0,26).

**20. taula.** Cohen kappa koefizientea patologia eta lesioen garapenaren arabera bioMérieux eta Roche erauzketa metodoetan.

<b>ERAUZKETA METODO BAKOITZAREN ANALISI BEREIZIA</b>		
	<b>Metodoa</b>	<b>Cohen kappa koefizientea κ</b>
Patologia	Nuclisens erauzketa kita (bioMérieux)	0,26
	High Pure Viral RNA Kita (Roche)	0,32
Lesioen eboluzioa	Nuclisens erauzketa kita (bioMérieux)	0,26
	High Pure Viral RNA Kita (Roche)	0,41
<b>BIOMERIEUX ETA ROCHE ERAUZKETA METODOEN ARTEKO ERKAKETA</b>		
E6/E7 mRNA detekzio ratioa		0,26

Azkenik, bioMérieux metodoan NPV balioa Roche metodoan lortutakoaren antzekoa izan zen (% 73,68 vs. % 65,79, hurrenez hurren) baina PPV balioa bioMérieux erauzketa metodoan Roche metodoan baino baxuagoa izan zen (% 54,84 eta % 75, hurrenez hurren). Gainera, bioMérieux erauzketa metodoaren sentsibilitatea Roche metodoarena baino altuagoa izan zen (% 77,27 eta % 40,90, hurrenez hurren). Hala ere, bioMérieux erauzketa metodoaren espezifikotasuna Roche metodoarena baino baxuagoa izan zen (% 50 vs. % 89,28).



## ***5. EZTABAIDA***

---



Giza papilomabirusa onkobirusa da, hau da, minbizia sor dezakeen birusa da. Birus honen eraginez alde genitaleko minbiziak garatu daitezke bai emakumezkoetan zein gizonezkoetan. Hala ere, gehienbat emakumeak kutsatzen dituen birusa da eta hauetan umetoki lepoko minbizia sortzen du. Mundu osoan, urtero sexu harremanen bidez transmititzen den birus honek 530.000 emakume berri kutsatzen ditu. Gainera emakumeen artean laugarren minbizi motarik ohikoena birus honek sortzen duen umetoki lepoko minbizia da, urtero 270.000 emakumeen heriotza sortzen duelarik.

Umetoki lepoko minbiziaren hilkortasun altua tratamendu programa eta baheketa programa eraginkorren bidez murriztu daiteke. Izatez, garapen bidean dauden herrialdeetan, non emakumeak baheketa programa eraginkorretara heltzea zaila duten, birusak sortutako gaixotasuna ez da identifikatzen gaixotasuna oso aurreratua dagoen arte eta sintomak agertzen diren arte. Honen eraginez, garapen bidean dauden herrialdeetan minbizi mota honen heriotza-tasa altuagoa da. Bestalde, herrialde garatuetan, bahetze eta tratamendu programek umetoki lepoko minbizi kasuen % 80 prebenitzen dute (46).

Birus honekin kutsatuta dagoen emakume edo gizonezko batek minbizia garatzea faktore desberdinen pean dago, hala nola, pertsonaren sistema immunearen egoera, erretzailea ala ez izan, antisorgailuak hartu edo ez emakumeen kasuan eta bikote sexualen kopurua. Hala ere, infekzioan inplikaturik dagoen HPVaren genotipoak eta baita ere aldaera intratipikoak sekulako garrantzia izan dezake onkogenesi prozesuan (20, 21).

Bestalde, HPVaren detekziorako gaur egun erabiltzen diren teknika gehienak DNA biralaren detekzioan oinarritzen dira. Alabaina, DNAk birusaren presentziari buruzko informazioa baino ez digu ematen eta, beraz, ez dakigu infekzio aktibo baten aurrean gauden, onkoproteinak adierazten ari diren, edo ez. Hori dela eta, guztiz garrantzitsua da infekzioaren egoera aktiboari buruzko informazioa eskaintzen duen biomarkatzailearen bilaketa.

## 5.1. POPULAZIO BAHEKETA BILBOKO BASURTUKO UNIBERTSITATE OSPITALEAREN ALDEAN

Gure inguruan minbizia sortzeko arrisku altua zuten giza papilomavirusaren genotipoen intzidentzia % 10,63 izan zen, hau da, aztertutako 10 emakumeetatik bat infektatua zegoen hain zuzen. Emaizta hori beste ikerketa batzuetako emaitzekin bat zetorren; lesio gabeko emakumeen HPV prebalentzia % 10,4 dela antzeman izan da eta (92, 93).

Gure ikerketa honetan HR-HPVrako positiboak ziren emakumeen batez besteko adina aztertutako populazioarena baino baxuago zela behatu ahal izan genuen. Emaizta honek agerian uzten du, beste autore batzuek behatu duten bezala, batez ere emakume gazteei eragiten dien birusa dela (33).

HPV genotipo guztien artean 16 genotipoa da umetoki lepoko lesioetan arruntena eta prebalenteena (92, 93), gure ikerketan behatu ahal izan zen bezala. Gure ikerketan HPV-16 genotipoa lagin positiboan % 22,86an antzeman genuen, Euskadin egindako beste ikerketa batean lortutako balioen antzekoa (% 29,7), nahiz eta ezohiko zitologien laginak erabili zituzten (93). Gure ikerketan HPV-18arentzat lortutako balioak, % 5,71, Delgado *et al.* lortutakoenetatik (% 9,40) pixka bat aldentzen ziren arren, gure balioek Europa hegoaldeko herrialdeetan egindako ikerketekin bat zetozen (37, 92, 93). Hala ere, gure ikerketan talde ugariena arrisku altuko beste genotipoena izan zen, egile batzuek deskribatu duten bezala, ehuneko honen barruan beste 12 genotipo gehitzen direlako izan daiteke (93).

HR-HPVen presentzia adin tarte desberdinetan kontuan izanik lehen aztertutako hipotesia indartzen da: emakume gazteei eragiten dien birusa dela. Hala ere, aipatu beharra dago emakume gazteetan HPV infekzio gehienak sendakorrak direla; infekzioaren lehen urtean infekzioen % 70 desagertzen da eta bigarren urteetan % 90 (94).

Gure ikerketan infekzio anitzeko emakume guztiak gazteak ziren. Beste ikerketa batean antzeman zenarekin bat dator: infekzio anitzen eragina adinarekin gutxitzen dela (93). Bestalde, gaur egun nahiko argi dago infekzio anitzek umetoki lepoko minbizia garatzeko arrisku handiagoa dakartela eta ondorioz minbizia garatzeko arrisku faktorea dela (30).



HPVaren 16 genotipoa arrisku altuko HPV genotipoen artean onkogenotasun handienetarikoa duen genotipoa da. HPV-16 eta HPV-18 umetoki lepoko minbizi inbaditzaile kasuen % 70-76aren erantzuleak dira. Gainera bi genotipo hauekin kutsatuta dauden emakumeak umetoki lepoko infekzioan pronostiko txarragoa dute (95). Bestalde, HPV-16aren geneen sekuentziaren aldakortasuna, nagusiki *E6* eta *E7* onkogeneetan gertatzen dena, birusaren onkogenotasunean, patogenotasunean eta ostalariaren erantzun immunean eragin dezake (96). Beraz, ezinbestekoa da arrisku altuko genotipoen (HR-HPV) DNA detektatzen duten frogak erabiltzea, zeinak 16 eta 18 genotipoak banaka identifikatzen dituzten. Horrela kutsatutako paziente horien segimendua egin daiteke. Kontutan izan behar da, 12 urteren buruan, HPV-16 eramaileak umetoki lepoko epitelioetan gradu altuko lesioak izateko arriskua % 25tik gorakoa dela eta HPV-18 eramaileentzako % 19tik gorakoa (36), eta ondorioz, pazienteen segimendua izugarri garrantzitsua dela umetoki lepoko minbizia ekiditeko.

Aldaera intratipikoei dagokionez, aldaeren banaketa kokapen geografikoaren eta arrazaren araberakoa da (23, 97) eta, hau dela eta, gure inguruan, aldaera nagusia A leinuko aldaera izan beharko litzateke, B/C leinuko eta D leinuko aldaerengatik jarraituta. Gure ikerketan lortutako emaitzak baieztapen honekin bat zetozen HPV-16aren aldaera intratipikoen kasuan; A leinuko aldaera intratipikoak nagusi izan ziren (% 84,21) eta B/C leinuko (% 10,52) eta D leinuko (% 5,27) aldaerak kopuru baxuagoan agertu ziren. Aldiz, HPV-18arekin kutsatuta zeuden laginen kasuan ez zen B/C aldaeratik detektatu eta A2 azpi-leinuko aldaerak izan ziren nagusi. Hala ere, emaitza hau HPV-18aren lagin kopuru baxuarekin lotua egon liteke.

Gainera, zuhaitz filogenetikoan behatu zen moduan, HPV-16aren eta HPV-18aren aldaera intratipikoak talde desberdinetan sailkatu ziren. Gainera, 16 genotipoan aldaera Europarrak edo A leinuko aldaerak talde batean sailkatzen zirela behatu zen eta aldaera ez-europarrak edo B/C/D leinuko aldaerak beste talde batean. Emaitza hauekin aldaera Europarren eta aldaera ez-europarren desberdintasun genetikoa aldaera ez-europarrek beraien barnean dutena baino handiagoa dela ikus daiteke.

## 5.2. HPV-16 GENOTIPOAREN ALDAERA INTRATIPIKOEN DETERMINAZIOA

Giza papilomavirusaren 16 genotipoa arrisku altuko HPV genotipoen artean genotiporik onkogenikoeneratarikoa da. HPV-16ak HPV-18arekin batera umetoki lepoko minbizi inbaditzaileen %70-76 sortzen dute. Gainera, bi genotipo hauekin kutsatutako emakumeak umetoki lepoko infekzioan eta gaixotasunari lotutako infekzioaren lehen pausuetan pronostiko txarragoa dute (95). Bestalde, HPV-16aren gene desberdinetan ematen den sekuentziaren aldakortasuna, gehienbat *E6* eta *E7* onkogeneetan ematen dena, birusaren gaitasun onkogenikoan, patogenotasunean eta ostalariaren erantzun immunean eragin dezake. Gainera, birus honen aurkako txertoen diseinua HPVaren geneek sortutako peptidoen antigeno espezifikokoekiko diseinatuak izan direnez, nukleotido aldaketa horiek txertoaren eragin terapeutikoan eragina izan dezakete (96).

HPVaren aldaera intratipikoen banaketa arrazaren eta kokapen geografikoaren arabera da; Europan A leinuko aldaerak izan beharko lirateke nagusi, B/C leinuko aldaerengatik eta D leinuko aldaerengatik jarraituta (23, 24, 97). Kasu honetan, bai HPV-16aren infekzio anitzak zein banako infekzioak aztertzerakoan, A leinuko aldaerak izan ziren nagusi, D leinuko aldaerengatik jarraituta eta, azkenik, B/C leinuko aldaerak izan ziren maiztasun baxuenean detektatu zirenak. Hala ere D leinuko aldaerak B/C leinuko aldaerak baino maizago detektatuak izan ziren (% 7,95 eta % 5,3 infekzio anitzetan eta % 7,61 eta % 4,35 banako infekzioetan, hurrenez hurren). Hau beste autore batzuk esandakoarekin bat dator, Cornet *et al.* 2012 urtean argitaratu zuten moduan B/C leinuetako aldaeren proportzioa umetoki lepoko minbizi kasuetan azpibalioztatua egon liteke Europan (24, 97).

Lehen azaldu izan den moduan, HPV-16aren aldaera intratipikoak aurkezten dituzten nukleotido aldaketak minbiziaren garapenarekin asoziatua izan dira aldaketa genetiko horiek patogenotasunean desberdintasunak sortzen dituztelako (29, 98, 99). Beste ikerketa batzuetan ikusi denez, HPV-16aren prototipoarekiko (A leinukoa) ordezkapen nukleotidikoak dituzten aldaerak minbiziaren garapenarekin erlazio estuagoa dute (27, 99-102). Gure emaitzak guztiz bat etortzen dira autore hauekin, bi infekzio motetan, bai HPV-16 infekzio anitzetan zein banako infekzioetan, aldaera ez-europarrak, hau da B/C/D leinukoak diren aldaerak, A leinuko aldaera Europarrak baino lotura estuagoa baitute lesioen agerpenarekin. Gainera, infekzio anitzetan, A leinuko aldaerak zitologia

emaitza negatiboak edo ASCUS duten emakumetan gehiago detektatzen dela ere esangarria izan zen estatistikoki ( $p < 0,05$ ). Hau da, aldaeren eta lesioen garapenaren arteko asoziazio hau estuagoa izan zen infekzio anitzak zituzten laginetan banako infekzioa zutenetan baino; honen bidez HPV infekzio anitzetan beste genotipo batzuen presentziak minbiziaren garapenean eragina izan dezakeela ondorioztatu daiteke (42, 103-105). HPV-16aren infekzio anitzetan ikusi zenez, HPV-52 genotipoa HPV-16arekin batera gradu altuko lesioak zituzten pazienteen % 40an detektatu egin zen (9/22). Gainera, beste ikerketa lanetan behatu izanenez, zenbait genotipo, hala nola, HPV-6, HPV-31, HPV-52 eta HPV-61, HPV-16aren infekzio anitzetan agertzeko probabilitate gehiago dituzte (15, 42, 106, 107). Aurkikuntza honek txertaketan sekulako garrantzia dauka. Txertoek genotipo jakin batzuekiko immunitatea eskaintzen dute eta, beraz, txertoaren eraginez gaur egun proportzio altuetan agertzen diren genotipo horien murrizketa emango da etorkizunean baina honek beste genotipo batzuen proportzioaren igoera ekarri ahalko luke. Horregatik funtsezkoa da gaur egun proportzio altuan agertzen diren eta onkogenotasun altua duten genotipo horiekin batera agertzen diren beste genotipoen azterketa burutzea.

Pazienteen adinaren eta infekzio motaren arteko erlazioa ere ikertu egin zen. Behatu egin ahal izan zenez, HPV-16aren banako infekzioa zuten pazienteak infekzio anitza zuten pazienteak baino gazteagoak ziren. Gainera, infekzio anitzetan, aldaera ez-europarren eta adin gehiago pazienteen arteko asoziazioa estatistikoki esangarria izan zen. Onkogenotasun botere baxuagoa duten aldaerak infekzioaren lehenengo edo bigarren urtean desagertzen dira eta, aldiz, aldaera iraunkorrek minbiziaren garapena sortzen dutenak dira (33). B/C/D leinuetako aldaerak minbizia garatzeko arrisku altuarekin lotuak daude, beraz, aldaera mota hauek dira minbizi kasuetan gehien detektatzen direnak. Minbizia garatzeko denbora behar da eta, arrunki, emakume nagusiek minbizia aurkezten dute eta horregatik B/C/D leinuetako aldaerak dira gaixotasun hau duten emakumeetan detektatzen direnak. Hau dela eta, pertsona nagusiagoak aldaera ez-europarrekin kutsatuta daude eta hauek ez direnez desagertzen gradu altuko lesioak garatzeko probabilitate altuagoak dituzte.

Gure ikerketan detektatutako nukleotido aldaketa batzuk aurreko ikerketetan deskribatuak izan ziren eta hauetako batzuk esanahi garrantzitsua dute (101, 108). A131G, G145T eta C335T nukleotido aldaketek p53 proteinaren lotura oztopatzen dute eta proteina honen degradazioa sortzen dute. p53 ziklo zelularra erregulatzen duen proteina da eta tumore isiltzaile gisa funtzionatzen du. Beraz, mutazio ez-sinonimo hauek tumoreen hazkuntza eta garapena errazten dute. T732C nukleotido ordezkapenak pRBaren (beste tumore isiltzailea) lotura oztopatzen du eta E2F-pRbren disoziazioa sortzen du. Bestalde, T350G nukleotido aldaketa aktibitate transkripzionala areagotzen duela ikusi da. G849C nukleotido ordezkapenak tranformazioa, metalen loturarako domeinua eta ostalariaren hainbat proteina zelularren asoziazioa moduko funtzio biologikoak eragiten ditu (96, 101, 108, 109).

Jadanik deskribatuak izan ziren nukleotido ordezkapen horietaz gain, lan honetan, bost nukleotido aldaketa berri detektatu ziren. Aldaketa berri hauetako bat, G784A, mutazio ez-sinonimoa da eta E7 onkoproteinan aminoazido aldaketa eragiten du. Hala ere, ez zen asoziaziorik behatu nukleotido aldaketa hauen eta lesioen garapenaren artean.

Bestalde, bi infekzio motetan sekuentzien patroia desberdinak ikertu zirenean, banako infekzioek infekzio anitzek baino sekuentzia desberdinen patroia gutxiago aurkezten zituzten. Hori dela eta, genotipo desberdinen presentzia nukleotido sekuentzian eragina duela behatu zen eta, beraz, minbiziaren garapenean eragina izan dezakeela ondorioztatu da (110, 111). Aitzitik, banako infekzioek eta infekzio anitzek nukleotido ordezkapen desberdinak azaldu zituzten eta, beraz, nukleotido aldaketak banako infekzioekiko edo/eta infekzio anitzekiko eta lesioen progresiorako espezifikoak izan daitezke. Horren adibidea T350G nukleotido ordezkapena da; nukleotido aldaketa hau lesioak zituzten eta A leinuko aldaerekin kutsatuta zeuden laginen kantitate handian agertzen baitziren (% 34,92).

Analisi filogenetikoari esker, eskualde bakoitzean, aldaera Europarrak (A) eta aldaera ez-europarrak (B/C/D) talde independenteetan multzokatzen zirela ikusi zen. Gainera bi lagin birkonbinante identifikatu ziren infekzio anitzetan. Lagin hauek B/C aldaera gisa sailkatu egin ziren bi eskualdeetan (E7 eta L1 eskualdeetan) eta D leinuko aldaera gisa E6 genea aztertzerakoan. Gene bakarra aztertu izan balitz, lagin birkonbinante hauek gaizki sailkatuak egongo lirатеke (31). Bestalde, aurkikuntza horrek lagin birkonbinante horietan HPV-16aren beste bi infekzio desberdin egon ahal zirela adierazten du.

Birkonbinazio prozesua birkonbinazio homologoarengatik edo HPV genotipo berdinen baina aldaera desberdinen infekzio errepikakorrerengatik gerta daiteke. Autore asko baieztatu duten moduan aldaera birkonbinanteak HPV infekzio anitzak dituzten pazienteetan detektatzea ohiko aurkikuntza bihurtu da. Kasu hauek HPV batek beste HPV bat eragin ahal duela inplikatu du (112). Horregatik gure ikerketa HPVaren infekzio anitza zuten laginekin ere burutu da. Gainera, HPV-16a gradu altuko lesio intraepitelialen garapenarekin estuki erlazionatua dagoenez eta, gaur egun, HPV infekzio anitzak sarri detektatzen direnez, oso garrantzitsua da HPV-16aren infekzio anitza duen populazioa aztertzea (40, 41, 113, 114). Gainera, HPV genotipo desberdinekin kutsatuta dauden banakoetan genotipo batek beste genotipo batean eragina izan dezake (115, 116). Mejlhede *et al.* HPV-16 genotipoa HPV-6, HPV-31, HPV-52 eta HPV-61 genotipoekin estuki erlazionatua zegoela behatu zuten (42). Gainera, Mejlhede eta bere lan taldeak behatu zuten moduan, HPV-6 eta HPV-16 genotipoekin kutsatuta dauden emakumeak HPV-16aren banako infekzioa duten emakumeak baino umetoki lepoko minbizia izateko probabilitate gutxiago dute (42). Gure ikerketan, 16 eta 6 genotipoen infekzio anitza zuten laginen % 57a lesioentzako negatiboak ziren (13/23). Aitzitik, gradu altuko lesioak zituzten laginen % 40an HPV-52 genotipoa HPV-16arekin batera agertzen zen (9/22). Gainera, berriki Tota eta bere lan taldea aurkitu duten moduan HPV-52 genotipoa HPV-16aren infekzio anitzetan ezkatatuta geratzen da (117). Horrela, genotipoen arteko interakzioak lesioen garapenean eta txertaketa ondorengo genotipoen banaketan sekulako garrantzia duela ikusi da eta, beraz, pazienteen jarraipena egiterakoan kontuan hartu beharrekoa da.

Azkenik, HPVaren aldaera intratipikoak identifikatzea, aldakortasun nukleotidikoa eskualde batean baino gehiagotan aztertzea (birkonbinazioa detektatu ahal izateko) eta genotipo desberdinen arteko interakzioa ikertzea guztiz garrantzitsua da HPVaren epidemiologia eta patogenotasunaren ezagutzarako.

### 5.3. E6/E7 mRNA BIOMARKATZAILEAREN AZTERKETA

Giza papilomabirusa umetoki lepoko minbiziarekin estuki lotua dago. HPV infekzioak askotan atzera egite prozesua aurkezten duten infekzioaren lehenengo bi urteetan, baina HR-HPVekin kutsatuta dauden pazienteak umetoki lepoko minbizia garatzeko arriskua dute (118, 119). Kartzinogenesi prozesuan zehar, E6 eta E7 onkoproteinen gainadierazpena umetoki lepoko neoplasia garatzeko beharrezko faktorea da (68). Gaur egun arte, umetoki lepoko minbiziaren bahetzea gaixotasun hau prebenitzeko tresna eraginkorra izan da eta, gaur egun, DNA testaren erabilera mundu osoan zehar hasten ari da. Hala ere, DNAk birusaren presentziari buruzko informazioa baino ez du ematen eta ez du infekzio iraunkorren edo aktiboen eta latenteen artean bereizten (86). Infekzio iraunkorretan *E6* eta *E7* geneen adierazpena ez dago erregulatua eta onkoproteinen gainadierazpena minbizidun lesioen garapena suspertu egiten du. Hau dela eta, izugarri garrantzitsua da umetoki lepoko minbiziaren biomarkatzaile pronostikoa aurkitzea 1) gradu altuko lesioen agerpenari aurrea hartzeko, 2) bahetze programak hobetzeko eta 3) beharrik gabe kolposkopiara bidalitako emakume-kopurua txikitzeko.

DNA positibotasun ratioa erabilera klinikoan mRNA baino balio gutxiago dauka aurreko ikerketetan behatu den moduan (74, 75, 120). HPV mRNA DNA testa baino espezifikoagoa da baina sentsibilitate baxuagoa dauka, beraz, mRNA bahetze test moduan erabilia kolposkopiara bidalitako emakume DNA positiboen kopuru txikitu dezake zitologiarekin konparatuz, hori bai, sentsibilitate baxuagoa onartuz (74, 75). Gainera, behatu ahal izan denez, mRNA testa gehi zitologia DNA bahetzea baino garrantzi kliniko handiagoa dauka (120, 121).

mRNArentzako positiboak izan ziren emakumeen artean, HPV-16aren banako infekzioaren transkriptoak errepikatuena izan zen, nahiz eta, aztertutako emakume gehienek HPV infekzio anitza izan. HPV-16 beste genotipoak baino adierazteko joera gehiago aurkeztu zuen. Hau genotiporik kartzinogenikoentzat hartzen delarekin lotua egon liteke (122). Alabaina, HPV-16aren transkriptoak errepikatuena izan daiteke laginetan duen bere intzidentzia altua dela eta (% 68,71). Gainera, genotipo guztien adierazpena aztertu ondoren HPV-33 gehien adierazten zen genotipoa izan zen (% 100), 18 eta 16 genotipoengandik jarraituta (% 77,77 eta % 70,29, hurrenez hurren). Emaitza horiek HPV-33aren lagin kopuru baxuarengatik izan zitezken baina, hala ere, kontuan hartu beharko lirarteke. Izatez, txertoaren eraginez etorkizunean 16 eta 18 genotipoen

intzidentzia jaitsi egingo da eta, ondorioz, beste genotipo batzuk bihurtuko dira nagusi. Beraz garrantzitsua da beraien intzidentzia handituko duten genotipo horien onkogenotasuna ezagutzea.

E6/E7 mRNA positibotasun ratioa gradu altuko lesioak dituzten emakumeetan gradu baxuko lesioak edota lesiorik ez duten emakumeetan baino altuagoa zela frogatu zen (75, 123, 124). Gainera, E6/E7 mRNA negatibotasun ratioa lesiorik ez zuten emakumeetan altuagoa izan zen. Aurkikuntza honek birusaren egoera episomala dela eta transkripzioaren erregulazioa eraginkorra dela aditzera ematen digu eta birusaren berezko desagerpenerako probabilitate gehiago daudela. Halaber, aurreko lanetan behatu den moduan, sentsibilitatea HPV DNA testan HPV mRNA testan baino handiagoa da ASCUS eta LSIL laginetan, baina, aldiz, espezifikotasuna mRNA testan DNA testan baino handiagoa da. Berdina gertatzen da HSIL duten emakumeen laginetan (75). Hau da, mRNA testaren bidez espezifikotasunean irabazten da. Hala ere, espezifikotasun honen irabazia mRNA biralaren amplifikazioa genotipo gutxi batzuetara mugatua egoteari lotua egon daiteke (125). Gainera, sentsibilitatearen eta espezifikotasunaren arteko desberdintasun hauek ikerketa gehiagoren beharra adierazten dute. Izatez, populazioen bahetze programentzat espezifikotasun eta sentsibilitate maila altuko HPV testa erabili beharko litzateke eta (59).

E6/E7 mRNA umetoki lepoko minbiziarentzako biomarkatzaile gisa erabiltzeari dagokionez, mRNA positibotasuna lesioak zituzten emakumeetan handitu egin zen denboran zehar, bai behin zein bi aldiz aztertutako laginetan, hots, E6/E7 mRNA lagin positiboak gaiztotu edo txarrera egin zuten hurrengo urteetan. Emaizta hauek esperotakoak dira, E6 eta E7 onkogeneak minbizi aurreko lesioetan gain adierazita ageri baitziren eta, probatua izan denez, onkogeneen positibotasuna eta umetoki lepoko lesioen larritasuna aldi berean handitzen dira (126). Hau dela eta, E6/E7 mRNA umetoki lepoko minbiziarentzako biomarkatzaile oso erabilgarria izan liteke; E6/E7 mRNArentzako positiboak diren emakumeen jarraipen estua egin beharko litzateke nahiz eta emaitza zitologiko normalak izan. Gainera, soilik behin azertu ziren emakumeetan, mRNA negatiboak ziren laginetan ASCUS eta LSIL zuten emakumeen igoera detektatu zen hurrengo urteetan. Laginak hartu zirenean lagin horiek mRNArentzako negatiboak zirela izan daiteke baina denboran zehar transkripzio biralaren desregulazioa umetoki lepoko lesioen garapena sortu zuela izan daiteke honen arrazoa. Hala ere, birritan aztertutako emakumeetan, lehen aldiz aztertutako eta

urtebete edo bi urte geroago testatutako laginen artean ez zen mRNAren negatibotasunean desberdintasunik egon, beraz, laginen kopuru adierazgarri bat gradu baxuko lesioak zituzten baina E6/E7 mRNArentzako negatiboak izan ziren. Gradu baxuko lesioak, normalean, tratamendurik gabe hurrengo hilabeteetan desagertzen dira eta aurrekoa gertaera honekin lotua egon liteke (47). Hala ere, gradu baxuko lesioetan mRNA testa DNA testa baino espezifikagoa eta erabilera kliniko altuagokoa dela aurkitu da (74).

Azkenik, behatu izan zenez E6/E7 mRNArentzako positiboak diren emakumeak lesioak garatzeko probabilitate gehiago dauzkate eta, horregatik, E6/E7 mRNA markatzaile pronostiko ona izan daiteke. Gainera, mRNArentzako negatiboak diren emakumeak gradu patologikoa mantentzeko edo infekzioaren desagertzea izateko aukera gehiago dituzte. Aurkikuntza hauek aurreko lanekin bat datoz; E6/E7 mRNA epe-laburreko faktore pronostikoa dela gradu altuko lesioentzat (127). Hala ere, Discacciati *et al.*-ren arabera, E6/E7 mRNA ez da epe-luzeko faktore pronostikoa; izatez, DNArentzako positiboak eta E6/E7 mRNArentzako negatiboak diren emakumeak E6/E7 mRNA positiboak bihurtu ahal dira beraien emaitza patologikoa aldatuz (127). Hala ere, ikerketa gehiago behar dira NucliSens®EasyQ®HPV v1 Testa HPVaz kutsatuta dauden emakumeetan bahetze metodo estandar gisa erabili ahal izateko.

Esan bezala, mRNAk ezegonkortasun genetikoa eta umetoki lepoko epitelioaren eraldaketa gaiztoa eragiten duten *E6* eta *E7* onkogeneen mailaren igoera detektatzen du. Horregatik, lehen aipatu bezala, E6/E7 mRNA etorkizun handiko umetoki lepoko markatzaile pronostiko gisa proposatu da (128). Lan honetan, RNA erauzketa metodoaren hautaketa *E6* eta *E7* onkogeneen adierazpenaren detekzioarako erabakigarria zela behatu zen.

Gure lanean hiru RNA erauzketa metodo erabili ziren *E6* eta *E7* onkogeneen mRNA adierazpena aztertzeko. Erabilitako hiru erauzketa metodoen artean E6/E7 mRNA positibotasun ratioa eskuzko Nuclisens erauzketa kitaren (bioMérieux) bidez aztertutako laginetan High Pure viral nucleic acid kitaren (Roche) bidez aztertutako laginetan baino altuagoa izan zen. Gainera RNeasy Plus Mini kitaren (Qiagen) bidez lortutako emaitzak baliogabeak izan ziren, onkogeneen adierazpenarako 3 lagin baino ez ziren positibo izan eta. Emaitza hauek aurreko lan batean lortutako emaitzekin bat datoz; lan horretan



RNA erauzketa metodo hauek giza immunoeskasiaren birusean ikertuak izan ziren eta, behatu ahal izan zenez, erauzketaren ondorengo RNA berreskuratzea bioMérieux erauzketa metodoarekin Roche eta Qiagen metodoekin lortutakoa baino handiagoa izan zen (129). bioMérieux erauzketa metodoa zelulen lisian eta magnetizatutako silize dioxidoko partikuletan oinarritzen da, aldiz, Roche eta Qiagen erauzketa metodoak zutabe tekniken erabileran oinarritzen dira. Gertaera hori mRNA positibotasun ratio altuagoa edo baxuagoa izatearen erantzulea izan daiteke, probatu izan denez, silize partikulen bidez burututako RNA berreskuratzea beste teknika batzuekin burututakoa baino altuagoa, edo behintzat berdina, baita (130, 131). Hala ere, desberdintasun hauek lisis bufferren konposizioaren desberdintasunei lotuak egon litezke Monleau *et al.* iradoki zuten bezala edo oinarri likidoko zitologia sistema desberdinaren erabilerari zor litzaioke (129, 132). Bestalde, emaitza hauek eluzio prozesuari lotuak egon litezke, izan ere, bioMérieux eta Roche erauzketa kitak eluzio bufferra erabiltzen baitute RNA eluitzeko eta Qiagen erauzketa metodoa RNasa gabeko ura erabiltzen baitu. Hala ere, ezin dugu ahaztu bioMérieux produktu lerroko produktuak beraiekiko optimizatuak egongo direla eta Roche erauzketa metodoa bezalako beste etxe komertzialen produktuak baliogabeko lan-fluxua aurkeztuko luketela.

Behatutako adostasun erlatiboari dagokionez, bioMérieux eta Roche erauzketa metodoak aztertutako parametroetan, hau da, E6/E7 mRNA positibotasun ratioa, patologia taldea eta lesioen eboluzioa, korrelazio moderatua edo funtsezko korrelazioa aurkeztu zuten. Beraz, bi RNA erauzketa metodoetako edozein aukeratzek zuzena izan daitekeela ondorioztatu zen. Hala ere, metodo bakoitza patologia eta lesio garapenerako banaka aztertu zen eta RNA bioMérieux metodoarekin erauzi zen laginetan bat etortzearen handiagotze graduala behatu zen patologiaren larritasuna handitzen zen aldi berean. Beraz, bioMérieux metodoa lesio motaren bat duten emakumeak detektatzeko aproposagoa zirudien. Gainera, metodo hori lesioen garapena detektatzeko egokiagoa zirudien. Aldiz, Roche erauzketa metodoa lesioen iraunkortasuna mantentzen zuten emakumeak detektatzea aproposagoa zirudien.

Beste alde batetik, Cohen kappa koefizientearen balioak ez ziren hain adierazleak izan. Aurreko lanetan behatu zenez, Kappa koefiziente mRNAren detekzioan oinarritzen ziren testetan DNAren detekzioan oinarritzen ziren testetan baino baxuagoa zen (59). Hala ere, mRNAren detekzioan oinarritzen diren metodoen korrelazioa handitzeko lan gehiago behar direla dirudi. Lan honetan lortu ziren emaitzei dagokionez, metodoen arteko erlazioa eta metodo bakoitzaren eta patologia eta lesioen eboluzioaren adostasuna bidezkoa edo moderatua izan zen aztertutako faktorearen arabera. Koefiziente honen arabera, Roche erauzketa metodoa emakumeen patologia edo denboran zehar lesioen aurrera egitea aztertzeko metodorik hoberena zen.

Bestalde, bioMérieux erauzketa metodoa markatzaile pronostiko gisa erabiltzearen eraginkortasuna probatu zen; denboran zehar txarrera egin zuten lesioak zituzten emakumeen % 94,44 E6/E7 mRNAren detekziorako positiboak izan baitziren. Gainera, Roche erauzketa metodoa lesioen iraunkortasuna zuten emakumeentzat markatzaile pronostiko ona zela frogatu zen; denboran zehar lesio berdina mantendu zuten emakumeen artean % 93,94 E6/E7 mRNAren detekziorako negatiboak izan baitziren. Emaitza hauek E6/E7 mRNA lesio altuko lesioentzat faktore pronostikoa kontsideratzen duten beste autoreekin bat datoz (127).

Patologiari dagokionez, bioMérieux erauzketa metodoa lesioak zituzten emakumeak detektatzeko eraginkorragoa zen eta metodo honen eta patologiaren arteko adostasuna lesioaren gradua handitzen zen heinean handitzen zen HSIL zuten emakumeetan adostasunik onena lortuz. Emaitza hori beste ikerketa lan batzuetan lortutako emaitzekin bat zetorren; lan horietan E6/E7 mRNAren eta umetoki lepoko lesioen larritasunaren korrelazioa frogatu egin zen (133, 134). Gainera bioMérieux erauzketa metodoaren sentsibilitatea Roche erauzketa metodoarena baino altuagoa izan zen; honek, bioMérieux erauzketa metodoa lesioak dituzten emakumeak zuzenki sailkatzeko test egokia bihurtzen du. Hala ere, Roche erauzketa metodoa espezifikotasun hobeagoa izan zuen eta, ondorioz, lesio gabeko emakumeak zuzenki sailkatzeko test aproposa da. Espezifikotasun altuko test batek kolposkopiara bidalitako emakumeen kopurua txikitu dezake zeina bahetze programen aplikaziorako abantaila eskaintzen duen (135). Gainera, bahetze programak borondatezkoak direnez espezifikotasun altuko bahetze testa hautatzea garrantzitsua da emakumeen artean programaren egiazkotasuna ez galtzeko; emaitza faltsu asko egotekotan, emakumeen etortze ratioa txikitu daiteke eta

(74). Roche erauzketa metodoa bioMérieux baino metodo egokiagoa dirudi umetoki lepoko minbiziaren bahetzerako bere espezifikotasun altua dela eta. Hala ere, azken urteotan umetoki lepoko minbiziarentzako DNAREN detekzioa erabili izan da bahetze metodo gisa eta test hau bere sentsibilitate altuan oinarritzen da, beraz, umetoki lepoko minbiziaren bahetzerako sentsibilitate altua zinez garrantzitsua da (136). Gainera, Ovestad *et al.* adierazi zuten moduan populazioaren bahetzea egiteko testak sentsibilitate eta espezifikotasun balio altuak izan behar ditu eta erabilitako metodoen artean batek ere ez zituen balio altuak lortu bi parametro horietan (59). Hala ere, nahiz eta gaur egunerarte ez den onkogeneen adierazpenaren detekziorako *gold standar* testik deskribatu, % 100 gertuko NPV, PPV, sentsibilitate eta espezifikotasun balioak dituen testa hautagai egokia izango litzateke (137). bioMérieux eta Roche erauzketa metodoen artean bioMérieux erauzketa metodoak NPV eta sentsibilitate balio hobetoak ditu baina Roche metodoak espezifikotasun eta PPV balio hobetoak ditu eta NPV balioan bioMérieux metodoarekin duen aldea baxua da. Honek Roche erauzketa metodoa bioMérieux metodoa baino bahetze estandar test egokiagoa bihurtzen du.

NucliSens®EasyQ®HPV v1 Testaren bidez detektatu ahal diren bost genotipoen adierazpen ratioak ere aztertuak izan ziren. HPV-16 gure laginetan gehien detektatzen zen genotipoa izan arren, ez zen bere onkogeneak gehien adierazten zituen genotipoa izan. Beraien onkogeneak gehien adierazten zituzten genotipoak HPV-33 eta HPV-18 izan ziren, beraz, bai bioMérieux zein Roche erauzketa metodoekin lortutako emaitzen arabera, bi genotipo hauek umetoki lepoko epitelioen gaiztotzea sortzeko ahalmen handiagoa dute. Gainera, behatu ahal izanenez, hiru erauzketa metodoetako baten ere ez zen HPV-16a bere onkogeneak gehien adierazten zituen genotipoa izan, nahiz eta, HPV-16a HPV-18arekin batera genotiporik onkogenikoak direla kontsideratzen den (105). Hortaz, HPV-16 eta HPV-18 genotipoen gain arrisku altuko beste genotipoetan fokatu beharko ginateke beraien ahalmen onkogeniko altua dela eta. Halaber, HPV genotipoen desberdintasun geografikoak kontuan hartu beharko lirateke HPV genotipo nagusienak onkogeneen detekzio testetan barneratzeko (138).

Laburbiltzeko, HR-HPV genotipoen populazio-bahetzea guztiz beharrezkoa da bai gure inguruan arrisku altuko genotipo hauen egoera zein den ezagutzeko baita txertaketa programak hobetzeko. Infekzioaren egoera zein den ezagutzeko eta infekzioan inplikaturik dauden genotipoak zeintzuk diren ezagutzeko pazienteen jarraipen estua eta tratamendu goiztiarra egin daiteke birus honek sortzen duen umetoki lepoko minbiziaren heriotzatasua murriztuz. Gainera, lan honetan frogatu denez, birusaren aldakortasuna, hau da, aldaera intratipiko desberdinek, patogenotasunean eragina dute. Horrela, B/C/D leinuko aldaerek lesio onkogenikoak sortzeko ahalmen handiagoa dute eta, beraz, emakume hauen jarraipena funtsezkoa da umetoki lepoko minbiziaren kontrolerako. Azkenik, *E6* eta *E7* onkogeneen mRNAren detekzioa infekzioaren egoerari buruzko informazioa ematen digu. Lan honetan behatu denez, onkogene hauen adierazpena minbizidun lesioen garapenarekin estuki lotua dago. Beraz, ikerketa gehiagoren ondoren, bahetze programetan erabiltzeko hautagai ona dirudi, hain zuzen, biomarkatzaile gisa erabiltzeko. Honen erabileraren bidez birusarekin kutsatuta dauden emakumeei kolposkopia kopurua murriztu ahal izango litzaieke eta gainera, markatzaile pronostikoa denez, RNA mezulariaren detekzioaren arabera jarraipena denbora laburragoan edo luzeagoan egin ahalko litzateke. Hori bai, ikusi dugun moduan RNA erauzketa metodoak sekulako garrantzia dauka onkogeneen adierazpenaren emaitzetan eta, beraz, bahetze programetan erabili aurretik metodologia estandarizatzea eta bateratzea beharrezkoa da.

## **6. ONDORIOAK**

---



- ✚ Gure inguruan birus honen prebalentzia nahikoa altua dela ikusi ahal izan dugu, 10 emakumetarik batek giza papilomabirusaren arrisku altuko genotiporen batekin kutsatua dago eta, gainera, bereziki emakume gazteei eragiten dien birusa da. Emakume hauek umetoki lepoko minbizia garatzeko probabilitate altua izango dute.
- ✚ Ezinbestekoa da arrisku altuko genotipoen (HR-HPV) DNA detektatzen duten frogak erabiltzea, zeinak 16 eta 18 genotipoak banaka identifikatzen dituzten.
- ✚ Nukleotido ordezkapena, leinu espezifiko batzuetako aldaera intratipikoekin edo genotipo zehatz batzuekin infektatua egoteak minbizidun lesioen garapenarekin hertsiki lotua dago. Horrela, HPV-16 eta HPV-52aren infekzio anitzak edo HPV-16aren B/C/D leinuko aldaerekin infektatuta dauden emakumeek gradu altuko lesioak garatzeko probabilitate altuagoak dituzte.
- ✚ Aldakortasun genetikoa, aldaera intratipikoa eta infekzioan parte hartzen duten genotipoen moduan infekzio mota ere guztiz garrantzitsua da HPVaren diagnostikoari, epidemiologiari eta patogenotasunari buruzko ezagutza lortzeko eta birusak sortzen duen lesioaren eta gaixotasunaren murrizpenerako.
- ✚ HPVaren 16, 18, 31, 33 eta/edo 45 genotipoekin kutsatuta dauden emakumetan *E6* eta *E7* onkogeneen mRNAren detekzioa emakume hauen bahetzerako tresna erabilgarria da. Gainera, *E6/E7* mRNA etorkizun handiko biomarkatzaile izan daiteke lesio mailarekin duen erlazioa frogatu delako eta, beraz, kolposkopiara bidalitako emakume HPV positiboen gutxiagotzea posiblea egin dezake.
- ✚ RNA erauzketa metodoaren hautaketa *E6* eta *E7* onkogeneen adierazpenaren detekziorako erabakigarria dela frogatu da; eskuzko Nuclisens erauzketa kita (bioMérieux) eta High Pure Viral RNA Kita (Roche) erauzketa metodoen arteko adostasuna, erabilitako estatistikoaren arabera, moderatua edo bidezkoa da.
- ✚ bioMérieux erauzketa metodoa lesioak dituzten emakumeak sailkatzeko metodo egokia da bere sentsibilitate balio altuagatik. Aldiz, Roche erauzketa metodoa lesio gabeko emakumeak sailkatzeko metodo egokiagoa dirudi bere espezifikotasun balio altua iradokitzen duen moduan. Gainera, bioMérieux RNA erauzketa metodoa txarrera egin duten lesioak dituzten emakumeak detektatzeko egokiagoa dirudi eta Roche,

aldiz, denboran zehar txarrera egin ez duten lesioak dituzten emakumeak baztertzeko egokiagoa da.

✚ High Pure Viral RNA erauzketa metodoa (Roche) umetoki lepoko minbiziaren bahetzea burutzeko metodo egokiena dirudi bere PPV, NPV eta espezifikotasun altuak direla eta. Hala ere, metodoen arteko adostasuna handitzeko eta sentsibilitate eta espezifikotasun balio altuagoak lortzeko ikerketa lan gehiago burutu behar dira. Horrela, E6/E7 mRNAren detekzioa ohiko bahetze metodo gisa ezarri ahalko litzateke.



## ***7. BIBLIOGRAFIA***

---



1. Burns DA. 'Warts and all'--the history and folklore of warts: a review. *J R Soc Med* 1992;85:37–40.
2. Shors T. *Virus; Estudio molecular con orientación clínica*. Editorial Medica Panamericana. 2009.
3. Rowson KE, Mahy BW. Human papova (wart) virus. *Bacteriol Rev* 1967;31:110–131.
4. Harari A, Chen Z, Burk RD. HPV Genomics: Past, Present and Future. *Curr Probl Dermatol* 2014;45:1-18.
5. Menéndez A. Virus del papiloma humano. Aspectos virológicos e inmunitarios. *SEMERGEN* 2007; 33 Supl 2:3-8.
6. De la Fuente-Villarreal D, Guzmán-López S, Barboza-Quintana O, González-Ramírez RA. Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria* 2010;12(49):231-238.
7. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 2009;384:260–265.
8. Sanclemente G, Gill D. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002;16:231-240.
9. De Villiers E, Fauquet C, Broker T, Bernard H, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
10. Vorsters A, Micalessi I, Bilcke J, Ieven M, Bogers J, Van Damme P. Detection of human papillomavirus DNA in urine. A review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:627–640.
11. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica*. Elsevier. 2009.
12. Saveria Campo M. Las proteínas de transformación esenciales del HPV: E5, E6 y E7. *HPV Today* 2005;7:8-10.

13. Gottschling M, Stamatakis A, Nindl I, Stockfleth E, Alonso A, Bravo IG. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Mol Biol Evol* 2007; 24:1242-1258.
14. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 2006;116(5):1167-1173.
15. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32:7–15.
16. Quint KD, de Koning MN, van Doorn LJ, Quint WG, Pirog EC. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2010; 117:297–301.
17. Gottschling M, Kohler A, Stockfleth E, Nindl I. Phylogenetic analysis of beta-papillomaviruses as inferred from nucleotide and amino acid sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 2007;42:213–222.
18. Egawa K, Delius H, Matsukura T, Kawashima M, de Villiers EM. Two novel types of human papillomavirus, HPV 63 and HPV 65: comparisons of their clinical and histological features and DNA sequences to other HPV types. *Virology* 1993;194:789–799.
19. Bottalico D, Chen Z, Dunne A, Ostolozza J, McKinney S, Sun C, Schlecht NF, Fatahzadeh M, Herrero R, Schiffman M, Burk RD. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis* 2011;204(5):787-792.
20. Murray PR, Rosenthal KS & Pfaller MA. *Microbiologia médica* (7. edizioa). Elsevier. 2014.
21. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 2006; 118:1071–1076.
22. Ortiz M, Torres M, Muñoz L, Fernández-García E, Canals J, Cabornero AI, Aguilar E, Ballesteros J, Del Amo J, García-Sáiz A. Oncogenic human papillomavirus (HPV)

type distribution and HPV type 16 variants in two Spanish population groups with different levels of HPV infection risk. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1428–1434.

23. Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, Koutsky LA. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: Race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(15):1045-1052.

24. Cornet I, Gheit T, Iannacone MR, Vignat J, Sylla BS, Del Mistro A, Franceschi S, Tommasino M, Clifford GM. HPV-16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer* 2013 ;108(1):240-244.

25. Huertas-Salgado A, Martín-Gámez DC, Moreno P, Murillo R, Bravo MM, Villa L, Molano M. E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology* 2011;410(1):201-215.

26. de Araujo Souza PS, Sichero L, Maciag PC. HPV variants and HLA polymorphisms: the role of variability on the risk of cervical cancer. *Future Oncol* 2009; 5:359-370.

27. Giannoudis A, Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* 2001;193(3):295-302.

28. Pientong C, Wongwarissara P, Ekalaksananan T, Swangphon P, Kleebkaow P, Kongyingyoes B, Siriaunkgul S, Tungsinmunkong K, Suthipintawong C. Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer. *Virol J* 2013;10:30.

29. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology* 2013;445(1-2):232-243.

30. Arroyo SL, Basaras M, Arrese E, Hernáez S, Andía D, Esteban V, Garcia-Etxebarria K, Jugo BM, Cisterna R. Human Papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical manifestations of HPV related infections in Bilbao, Spain. *Virol J* 2012;9:258.

31. Fontecha N, Basaras M, Arrese E, Hernáez S, Andía D, Cisterna R. Human Papillomavirus 16 Variants May Be Identified by E6 Gene Analysis. *Intervirology* 2015;58(3):143-148.
32. Vacunas Profilácticas frente al Virus del Papiloma Humano. Documento de Consenso de las Sociedades Científicas Españolas 2008.
33. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518–527.
34. de Sanjose S, Almirall R, Lloveras B, Font R, Diaz M, Muñoz N, Català I, Meijer CJ, Snijders PJ, Herrero R, Bosch FX. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis* 2003;30:788–793.
35. Muñoz N, Castellsague X, Berrington de González A, Gissman L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.
36. Mateos ML, Chacón de Antonio J, Rodríguez-Domínguez M, Sanz I, Rubio MD. Evaluation of a prototype real-time PCR assay for the separate detection of human papilloma virus genotypes 16 and 18 and other high risk human papillomavirus in cervical cancer screening. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29(6):411–414.
37. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menéndez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andújar M, Castellsagué X, Sánchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Muñoz N, Bosch FX. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010;11:1048–1056.

38. Cortés J, Garrido R, Miranda P, Xercavins J, Vidart JA. Recomendaciones para el diagnóstico precoz y el cribado del cáncer de cuello de útero. *SEGO*. 2011.
39. Mendez F, Munoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, van den Brule AJ, Ronderos M, Meijer C, Munoz A. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis* 2005;192:1158–1165.
40. Nielson CM, Harris RB, Flores R, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, Markowitz LE, Giuliano AR. Multiple-type human papillomavirus infection in male anogenital sites: prevalence and associated factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:1077–1083.
41. Tinelli A, Leo G, Dell'Edera D, Storelli F, Galante MM, Guido M, Hudelist G, Malvasi A. Molecular methods for a correct diagnosis of multiple HPV infections and clinical implications for vaccine. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:545–550
42. Mejlhede N, Pedersen BV, Frisch M, Fomsgaard A. Multiple human papilloma virus types in cervical infections: competition or synergy? *APMIS* 2010;118(5):346-352.
43. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000;19(1-2):1-5.
44. Bray F, Ren J, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2013;132(5):1133-1145.
45. Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Parkin DM, Ferlay J, Mathers C, Forman D, Bray F. Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions. *Lancet* 2012;(9856):1840-1850.
46. WHO – Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/> (2015ko Urriaren 13a)
47. Crow JM. HPV: The global burden. *Nature* 2012;488(7413):S2-3.
48. Papanicolaou GN. *New Cancer Diagnosis* in Proceedings of 3rd Race Betterment Conference. Battle Creek: Michigan, 1928:528-534.

49. Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnosis value of vaginal smears in carcinoma of uterus. 1941. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121(3):211-224.
50. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *JAMA* 1989;261(5):737-743.
51. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *JAMA* 1989;262:931–934.
52. Apgar BS, Zoschnick L, Wright TC. The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician* 2003;68(10):1992–1998.
53. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114–2119.
54. Rebolj M, Preisler S, Ejegod DM, Rygaard C, Lynge E, Bonde J. Disagreement between human papillomavirus assays: an unexpected challenge for the choice of an assay in primary cervical screening. *PLoS One* 2014;9(1):e86835.
55. Park Y, Lee E, Choi J, Jeong S, Kim HS. Comparison of the Abbott RealTime High-Risk Human Papillomavirus (HPV), Roche Cobas HPV, and Hybrid Capture 2 Assays to Direct Sequencing and Genotyping of HPV DNA. *J Clin Microbiol* 2012;50(7):2359–2365.
56. Castle PE, Solomon D, Wheeler CM, Gravitt PE, Wacholder S, Schiffman M. Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2. *J Clin Microbiol* 2008;46:2595-2604.
57. Martínez SB, Palomares JC, Artura A, Parra M, Cabezas JL, Romo JM, Martín-Mazuelos E. Comparison of the Cobas 4800 Human Papillomavirus test against a combination of the Amplicor Human Papillomavirus and the Linear Array tests for detection of HPV types 16 and 18 in cervical samples. *J Virol Methods* 2012;180(1-2):7-10.



58. Stoler MH, Wright TC Jr, Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL. High-Risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology. *Am J Clin Pathol* 2011;135(3):468-475
59. Ovestad IT, Vennestrøm U, Andersen L, Gudlaugsson E, Munk AC, Malpica A, Feng W, Voorhorst F, Janssen EA, Baak JP. Comparison of different commercial methods for HPV detection in follow-up cytology after ASCUS/LSIL, prediction of CIN 2–3 in follow up biopsies and spontaneous regression of CIN 2–3. *Gynecol Oncol* 2011;123:278–283.
60. Poljak M, Oštrbenk A. The Abbott RealTime High Risk HPV test is a clinically validated human papillomavirus assay for triage in the referral population and use in primary cervical cancer screening in women 30 years and older: a review of validation studies. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 2013;22(2):43-47.
61. Burger EA, Kornør H, Klemp M, Lauvrak V, Kristiansen IS. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol* 2011;120(3):430-438.
62. Jeantet D, Schwarzmann F, Tromp J, Melchers WJ, van der Wurff AA, Oosterlaken T, Jacobs M, Troesch A. NucliSENS EasyQ HPV v1 test - Testing for oncogenic activity of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2009;45 Suppl 1:S29-37.
63. Arroyo LS, Smelov V, Bzhalava D, Eklund C, Hultin E, Dillner J. Next generation sequencing for human papillomavirus genotyping. *J Clin Virol* 2013;58(2):437-442.
64. Militello V, Lavezzo E, Costanzi G, Franchin E, Di Camillo B, Toppo S, Palù G, Barzon L. Accurate human papillomavirus genotyping by 454 pyrosequencing. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(10):E428-434.
65. Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *J Invest Dermatol* 2013;133,e11; doi:10.1038/jid.2013.248
66. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 2000;181(6):1911-1919.

67. Frazer IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: A well evolved relationship. *Virology* 2009;384(2):410-414.
68. Wechsler EI, Wang Q, Roberts I, Pagliarulo E, Jackson D, Untersperger C, Coleman N, Griffin H, Doorbar J. Reconstruction of human papillomavirus type 16-mediated early-stage neoplasia implicates E6/E7 deregulation and the loss of contact inhibition in neoplastic progression. *J Virol* 2012;86(11):6358-6364.
69. von Knebel Doeberitz M, Rittmuller C, Aengeneyndt F, Jansen-Durr P, Spitkovsky D. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical-carcinoma cells - consequences for the phenotype and E6-P53 and E7-Prb interactions. *J Virol* 1994;68(5):2811-2821.
70. Vaccarella S, Lortet-Tieulent J, Plummer M, Franceschi S, Bray F. Worldwide trends in cervical cancer incidence: Impact of screening against changes in disease risk factors. *Eur J Cancer* 2013;49(15):3262-3273.
71. Bray F, Loos AH, McCarron P, Weiderpass E, Arbyn M, Møller H, Hakama M, Parkin DM. Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: Changing risk and the effects of screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(3):677-686.
72. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006;119(5):1095-1101.
73. Ho CM, Lee BH, Chang SF, Chien TY, Huang SH, Yan CC, Cheng WF. Type-specific human papillomavirus oncogene mRNA levels correlate with the severity of cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2010;127(3):622-632.
74. Sørbye SW, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES, Skjeldestad FE. HPV mRNA is more specific than HPV DNA in triage of women with minor cervical lesions. *PLoS One* 2014;18;9(11):e112934.
75. Benevolo M, Vocaturo A, Caraceni D, French D, Rosini S, Zappacosta R, Terrenato I, Ciccocioppo L, Frega A, Giorgi Rossi P. Sensitivity, specificity, and clinical value of

human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA assay as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test. *J Clin Microbiol* 2011;49(7):2643-2650.

76. Ponce i Sebastián J. Cancer de cervix: ¿enfermedad oncológica o enfermedad infecciosa? *Prog Obstet Ginecol* 2001;44:285-323.

77. Kim KS, Park SA, Ko KN, Yi S, Cho YJ. Current status of human papillomavirus vaccines. *Clin Exp Vaccine Res* 2014;3(2):168-175.

78. Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, Moreira ED Jr, Ngan Y, Petersen LK, Lazcano-Ponce E, Pitisuttithum P, Restrepo JA, Stuart G, Woelber L, Yang YC, Cuzick J, Garland SM, Huh W, Kjaer SK, Bautista OM, Chan IS, Chen J, Gesser R, Moeller E, Ritter M, Vuocolo S, Luxembourg A. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med* 2015;372(8):711-723.

79. Plotkin S. *Vaccine*. Elsevier 6. edizioa. 2013.

80. Comité Asesor de Vacunas (CAV) de la Asociación Española de Pediatría. <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-42#9>. (2015ko Irailaren 10a).

81. Osakidetza - Vacunación infantil. [http://www.osakidetza.euskadi.eus/r85-cksalu04/es/contenidos/informacion/vacunacion\\_infantil/es\\_infantil/vacunacion\\_infantil.html](http://www.osakidetza.euskadi.eus/r85-cksalu04/es/contenidos/informacion/vacunacion_infantil/es_infantil/vacunacion_infantil.html). (2015ko Irailaren 10a).

82. Stanley M. HPV vaccination in boys and men. *Hum Vaccin Immunother* 2014;10(7):2109–2111.

83. Georgousakis M, Jayasinghe S, Brotherton J, Gilroy N, Chiu C, Macartney K. Population-wide vaccination against human papillomavirus in adolescent boys: Australia as a case study. *Lancet Infect Dis* 2012;12(8):627-634.

84. Cortés J, Martín-Torres F, Ramón y Cajal JM, Gil A, Velasco J, Abizanda M, Miranda P, Garrido R. Prevención primaria y secundaria de los cánceres de cuello de útero y vulva: recomendaciones para la práctica clínica. *Prog Obstet Ginecol* 2010;53 Suppl 1:1–19.

85. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlée F, Franco EL. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1579–1588.
86. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. Consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:346–355.
87. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215(3):403-410.
88. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28(10):2731-2739.
89. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 2010;26(19):2462-2463.
90. Castle PE, Gravitt PE, Solomon D, Wheeler CM, Schiffman M. Comparison of Linear Array and Line Blot Assay for detection of human papillomavirus and diagnosis of cervical precancer and cancer in the Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance and Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion triage study. *J Clin Microbiol* 2008;46(1):109–117.
91. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33(1):159–174.
92. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7(7):453-459.
93. Delgado D, Marín JM, de Diego J, Guerra S, González B, Barrios JL, Canut A. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in women with abnormal cervical cytology in the Basque Country, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30(5):230-235.

94. National Vital Statistics Reports. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; National Center for Health Statistics; 2009;58:15.
95. Cuschieri K, Brewster DH, Graham C, Nicoll S, Williams AR, Murray GI, Millan D, Johannessen I, Hardie A, Cubie HA. Influence of HPV type on prognosis in patients diagnosed with invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2014;135(11):2721-2726.
96. Yang L, Yang H, Wu K, Shi X, Ma S, Sun Q. Prevalence of HPV and variation of HPV 16/HPV 18 E6/E7 genes in cervical cancer in women in South West China. *J Med Virol* 2014;86(11):1926-1936
97. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, Tommasino M, Clifford GM. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol* 2012;86:6855–6861.
98. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G. Risk factors for Human Papillomavirus Exposure and Co-factors for Cervical Cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine* 2008;26:16–36.
99. Tsakogiannis D, Darmis F, Gortsilas P, Ruether IGA, Kyriakopoulou Z, Dimitriou TG, Amoutzias G, Markoulatos P. Nucleotide polymorphisms of the human papillomavirus 16 E1 gene. *Arch Virol* 2014;159:51–63.
100. Cuschieri K, Brewster DH, Graham C, Nicoll S, Williams AR, Murray GI, Millan D, Johannessen I, Hardie A, Cubie HA. Influence of HPV type on prognosis in patients diagnosed with invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2014;135(11):2721-2726.
101. Qmichou Z, Khyatti M, Berraho M, Ennaji MM, Benbacer L, Nejjari C, Benjaafar N, Benider A, Attaleb M, El Mzibri M. Analysis of mutations in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroccan women. *BMC Infect Dis* 2013;13:378.
102. Pérez S, Cid A, Iñarrea A, Pato M, Lamas MJ, Couso B, Gil M, Alvarez MJ, Rey S, López-Miragaya I, Melón S, Oña Md. Prevalence of HPV 16 and HPV 18 lineages in Galicia, Spain. *PLoS One* 2014;9(8).

103. Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A, Miura S, Yamasaki K, Yoshiura K, Masuzaki H. Initial viral load in cases of single human papillomavirus 16 or 52 persistent infection is associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix. *J Med Virol* 2013;85(12):2093-2100.
104. Xi LF, Hughes JP, Castle PE, Edelstein ZR, Wang C, Galloway DA, Koutsky LA, Kiviat NB, Schiffman M. Viral Load in the Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Infection: A Nested Case-control Study. *J Infect Dis* 2011;203(10):1425-1433.
105. Kjær SK, Munk C, Junge J, Iftner T. Carcinogenic HPV prevalence and age-specific type distribution in 40,382 women with normal cervical cytology, ASCUS/LSIL, HSIL, or cervical cancer: what is the potential for prevention? *Cancer Causes Control* 2014;25(2):179-189.
106. Goldman B, Rebolj M, Rygaard C, Preisler S, Ejegod DM, Lyng E, Bonde J. Patterns of cervical co-infection with multiple human papilloma virus types in a screening population in Denmark. *Vaccine* 2013;31(12):1604-1609.
107. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Cecilia Rodriguez A, Quint W, Schiffman M, Van Doorn LJ, Porras C, Wacholder S, Gonzalez P, Sherman ME, Herrero R. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of co-infection and risk of cervical disease. *J Infect Dis* 2011;203(7):910-920.
108. Yang L, Yang H, Wu K, Shi X, Ma S, Sun Q. Prevalence of HPV and variation of HPV 16/HPV 18 E6/E7 genes in cervical cancer in women in South West China. *J Med Virol* 2014;86(11):1926-1936.
109. Pillai MR, Hariharan R, Babu JM, Lakshmi S, Chiplunkar SV, Patkar M, Tongaonkar H, Dinshaw K, Jayshree RS, Reddy BK, Siddiqui M, Roychoudury S, Saha B, Abraham P, Gnanamony M, Peedicayil A, Subhashini J, Ram TS, Dey B, Sharma C, Jain SK, Singh N. Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer in Indian population. *Int J Cancer* 2009;125(1):91-103.

110. Tsakogiannis D, Kyriakopoulou Z, Amoutzias G, Ruether IGA, Dimitriou TG, Panotopoulou E, Markoulatos P. Identification of novel E6-E7 sequence variants of human papillomavirus 16. *Arch Virol* 2013;158(4):821-828.
111. Carvajal-Rodriguez A. Detecting recombination and diversifying selection in human alpha-papillomavirus. *Infect Genet Evol* 2008;8(5):689-692.
112. Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, Gupta S, Sharma R, Batra S, Das BC. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol* 2008;46(3):1060-1066.
113. Shang Q, Wang Y, Fang Y, Wei L, Chen S, Sun Y, Li B, Zhang F, Gu H. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and Long Control Region in identification of cervical carcinomas in patients in Northeast China. *J Clin Microbiol* 2011;49(7):2656-2663.
114. Angulo M, Carvajal-Rodríguez A. Evidence of recombination within human alpha-papillomavirus. *Virol J* 2007;4:33.
115. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370(9590):890–907.
116. Méndez F, Muñoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, van den Brule AJ, Ronderos M, Meijer C, Munoz A. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis* 2005;192:1158–1165.
117. Tota JE, Ramanakumar AV, Villa LL, Richardson H, Burchel AN, Koushik A, Mayrand MH, Coutlée F, Franco EL. Evaluation of Human Papillomavirus Type Replacement Post-vaccination Must Account for Diagnostic Artifacts: Masking of HPV-52 by HPV-16 in Anogenital Specimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2014;24(1):286-290.
118. Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995;171:1026-1030.

119. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE, Burk RD. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005;337:76-84.
120. Tezcan S, Ozgur D, Ulger M, Aslan G, Gurses I, Serin MS, Giray BG, Dilek S, Emekdas G. Human papillomavirus genotype distribution and E6/E7 oncogene expression in turkish women with cervical cytological findings. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(9):3997-4003.
121. Spathis A, Kottaridi C, Chranioti A, Meristoudis C, Chrelias C, Panayiotides IG, Paraskevaidis E, Karakitsos P. mRNA and DNA detection of human papillomaviruses in women of all ages attending two colposcopy clinics. *PLoS One* 2012;7(11):e49205.
122. De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S. HPV infection in Europe. *Eur J Cancer* 2009;45(15):2632-2639.
123. Sjoborg KD, Trope A, Lie AK, Jonassen CM, Steinbakk M, Hansen M, Jacobsen MB, Cuschieri K, Eskild A. HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2010;118(1):29-34.
124. Perez Castro S, Iñarrea Fernández A, Lamas González MJ, Sarán Diez MT, Cid Lama A, Alvarez Martín MJ, Pato Mosquera M, López-Miragaya I, Estévez N, Torres Piñón J, Oña Navarro M. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA as a triage test after detection of HPV 16 and HPV 18 DNA. *J Med Virol* 2013;85(6):1063-1068.
125. Boulet GA, Micalessi IM, Horvath CA, Benoy IH, Depuydt CE, Bogers JJ. Nucleic acid sequence-based amplification assay for human papillomavirus mRNA detection and typing: Evidence for DNA amplification. *J Clin Microbiol* 2010;48:2524–2529.
126. Benevolo M, Terrenato I, Mottolese M, Marandino F, Carosi M, Rollo F, Ronchetti L, Muti P, Mariani L, Sindico S, Vocaturo G, Vocaturo A. Diagnostic and prognostic validity of the human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical cytological samples of HC2-positive patients. *Cancer Causes Control* 2011;22(6):869-875.



127. Discacciati MG, da Silva ID, Villa LL, Reis L, Hayashi P, Costa MC, Rabelo-Santos SH, Zeferino LC. Prognostic value of DNA and mRNA E6/E7 of human papillomavirus in the evolution of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Biomark Insights* 2014;9:15-22.
128. Frega A, Sesti F, Lombardi D, Votano S, Sopracordevole F, Catalano A, Milazzo GN, Lombardo R, Assorgi C, Olivola S, Chiusuri V, Ricciardi E, French D, Moscarini M. Assessment of HPV-mRNA test to predict recurrent disease in patients previously treated for CIN 2/3. *J Clin Virol* 2014;60(1):39-43.
129. Monleau M, Montavon C, Laurent C, Segondy M, Montes B, Delaporte E, Boillot F, Peeters M. Evaluation of different RNA extraction methods and storage conditions of dried plasma or blood spots for human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance testing. *J Clin Microbiol* 2009;47(4):1107-1118.
130. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28(3):495-503.
131. Cheung RC, Matsui SM, Greenberg HB. Rapid and sensitive method for detection of hepatitis C virus RNA by using silica particles. *J Clin Microbiol* 1994;32(10):2593-2597.
132. Powell N, Smith K, Fiander A. Recovery of human papillomavirus nucleic acids from liquid-based cytology media. *J Virol Methods* 2006;137(1):58-62.
133. Coquillard G, Palao B, Patterson BK. Quantification of intracellular HPV E6/E7 mRNA expression increases the specificity and positive predictive value of cervical cancer screening compared to HPV DNA. *Gynecol Oncol* 2011;120:89-93.
134. Pierry D, Weiss G, Lack B, Chen V, Fusco J. Intracellular human papillomavirus E6, E7 mRNA quantification predicts CIN 2+ in cervical biopsies better than Papanicolaou screening for women regardless of age. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:956-960.

135. Liu TY, Xie R, Luo L, Reilly KH, He C, Lin YZ, Chen G, Zheng XW, Zhang LL, Wang HB. Diagnostic validity of human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical cytological samples. *J Virol Methods* 2014;196:120-125.
136. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, Garcia FA, Moriarty AT, Waxman AG, Wilbur DC, Wentzensen N, Downs LS Jr, Spitzer M, Moscicki AB, Franco EL, Stoler MH, Schiffman M, Castle PE, Myers ER. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin* 2012;62(3):147-172.
137. Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol* 2008;56(1):45-50.
138. Munkhdelger J, Kim G, Wang HY, Lee D, Kim S, Choi Y, Choi E, Park S, Jin H, Park KH, Lee H. Performance of HPV E6/E7 mRNA RT-qPCR for screening and diagnosis of cervical cancer with ThinPrep Pap test samples. *Exp Mol Pathol* 2014;97(2):279-284.