



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΜΕ ΤΟΝ ΙΟ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ
ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ ΗΡΝ ΩΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ**

ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΜΕ ΤΟΝ ΙΟ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ
ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ ΗΡΝ ΩΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ**

ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης του κ. Ευαγγέλου Θεοχάρη: 24-4-2015

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 780^α/2-7-2015

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ναυρόζογλου Ιορδάνης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Γυναικολογική Ογκολογία και Παθολογία του Μαστού, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βρεκούσης Θωμάς, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 2-10-2015

«Διερεύνηση της λοίμωξης με τον Ιό των Ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) ως παράγοντα υπογονιμότητας»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 947^α/6-10-2020

Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ναυρόζογλου Ιορδάνης	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Γυναικολογική Ογκολογία και Παθολογία του Μαστού του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πασχόπουλος Μηνάς	Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στέφος Θεόδωρος	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπαλτογιάννης Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας Του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βρεκούσης Θωμάς	Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29-10-2020

Ιωάννινα 29-10-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ιορδάνη Ναυρόζογλου, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία και Παθολογία του Μαστού, για την επίβλεψη της διδακτορικής διατριβής, καθώς και τους κυρίους Ιωάννη Γεωργίου, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Κοσμήτορα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Θωμά Βρεκούση, Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία, για τις καίριες επιστημονικές τους παρατηρήσεις.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον κύριο Μηνά Πασχόπουλο, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Αντιπρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κύριο Κωνσταντίνο Ζηκόπουλο, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή, τον κύριο Θεόδωρο Στέφο, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική και τον κύριο Δημήτριο Μπαλτογιάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή Ουρολογίας, για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κυρία Χρυσούλα Κίτσου, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Βιολογίας, για τη βοήθειά της και την κυρία Ειρήνη Μάστορα, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Ιατρικής, Επιστημονική Συνεργάτη της Μονάδας Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, για τη συνεργασία μας.

Πίνακας Περιεχομένων

	Σελίδα
1. Εισαγωγή	4
1.1. Αναπαραγωγικά Κύτταρα	5
1.1.1. Ωογένεση	7
1.1.1.2. Κύκλος Οίστου Μυός	10
1.1.2. Σπερματογένεση	12
1.1.2.1. Σπερματοζώαριο	14
1.1.3. Γονιμοποίηση	19
1.1.4. Διαγονιδιακοί Οργανισμοί	23
1.1.4.1. Μεταφορά Γονιδίων μέσω Σπέρματος	25
1.2. Ιός του Ανθρώπινου Θηλώματος	29
1.2.1. Δομή του Ιού HPV	30
1.2.1.1. Ιϊκό Καψίδιο και Ιϊκό Γονιδίωμα	30
1.2.1.2. Ιϊκές Ογκοπρωτεΐνες E6 και E7	34
1.2.2. Κύκλος Ζωής του Ιού HPV	37
1.3. Επιδημιολογία	40
1.4. Ιός HPV και Υπογονιμότητα	42
1.5. Ιός HPV και Σπερματοζώαριο	43
1.6. Ιός HPV και Εμβρυογένεση	44

1.7. Ιός HPV και Κύηση	45
2. Υλικά και Μέθοδοι	47
2.1. Πειραματόζωα	50
2.2. Απομόνωση Σπερματοζωαρίων από Αρσενικούς Μύες	50
2.3. Υπολογισμός Συγκέντρωσης Σπερματοζωαρίων	51
2.4. Επεξεργασία Σπέρματος	51
2.5. Απομόνωση Ωαρίων από Θηλυκές Μύες μετά από Πρόκληση Πολλαπλής Ωοθυλακιορρηξίας	52
2.6. In Vitro Γονιμοποίηση	53
2.7. Κυτταρομετρία Ροής	54
2.8. Συνεστιακή Μικροσκοπία	54
3. Αποτελέσματα	56
3.1. Ανίχνευση Ενσωμάτωσης των Ιών HPV 16 και HPV 18 σε Σπερματοζωάρια Μυός με Κυτταρομετρία Ροής	57
3.2. Ανίχνευση Μεταφοράς των Ιών HPV 16 και HPV 18 σε Έμβρυα Μυός με Συνεστιακή Μικροσκοπία	58
4. Συζήτηση	60
4.1. Ενσωμάτωση των Ιών HPV 16 και HPV 18 σε Σπερματοζωάρια Μυός	63
4.2. Μεταφορά των Ιών HPV 16 και HPV 18 σε Έμβρυα Μυός	63
5. Συμπεράσματα	66
Περίληψη	68
Abstract	69
6. Βιβλιογραφία	70

1. Εισαγωγή

1.1. Αναπαραγωγικά Κύτταρα

Τα κύρια όργανα της φυλετικής αναπαραγωγής των οργανισμών και της δημιουργίας των αναπαραγωγικών κυττάρων είναι οι γονάδες, οι όρχις στους άρρενες και οι ωθήκες στα θήλεα. Εκεί παράγονται, αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται τα αναπαραγωγικά κύτταρα και εκκρίνονται οι στεροειδείς ορμόνες του φύλου, η τεστοστερόνη, η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη, οι οποίες υποστηρίζουν τη φυσιολογική λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος. Ο έλεγχος της αναπαραγωγικής λειτουργίας των γονάδων, πραγματοποιείται με τη συμμετοχή μίας αλυσιδωτής σειράς ορμονών του κεντρικού νευρικού συστήματος και αυτών καθ'αυτών των γονάδων. Η πρώτη ορμόνη αυτής της αλυσίδας είναι η γοναδοεκλυτίνη (GnRH). Η GnRH εκκρίνεται από τα νευροενδοεκρινή κύτταρα του υποθαλάμου και καταλήγει στην πρόσθια υπόφυση μέσω των υποθαλαμοϋποφυσιακών πυλαίων αιμοφόρων αγγείων. Εκεί, η GnRH διεγείρει την απελευθέρωση των υποφυσιακών γοναδοτροπινών, της θυλακιοτροπίνης (FSH) και της ωχρινοτροπίνης (LH). Η FSH και η LH δρουν στις γονάδες επιφέροντας τη γαμετογένεση και την έκκριση των στεροειδών ορμονών του φύλου. Οι στεροειδείς ορμόνες του φύλου, οι οποίες παράγονται στις γονάδες, ασκούν ανατροφοδοτική επίδραση στην έκκριση της GnRH, της FSH και της LH, ενώ ανατροφοδοτική επίδραση στην πρόσθια υπόφυση ασκεί και η γοναδιακή ορμόνη ανασταλτίνη.

Κατά τη γαμετογένεση, παρατηρείται η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των αρσενικών και θηλυκών γαμετών. Τα βασικά της στάδια είναι κοινά για τα δύο φύλα. Το πρώτο στάδιο αφορά τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων με μιτωτικές διαιρέσεις και όλα τα προκύπτοντα θυγατρικά κύτταρα διαθέτουν συνολικά 46 χρωμοσώματα, με δύο αδελφές χρωματίδες το καθένα. Το δεύτερο στάδιο αφορά την παραγωγή ώριμων γαμετών μετά από δύο αλληπάλληλες μειωτικές διαιρέσεις και τα προκύπτοντα κύτταρα διαθέτουν 23 χρωμοσώματα, μονής χρωματίδης. Οι μιτωτικές διαιρέσεις στα θήλεα ξεκινούν κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ενώ στους άρρενες αν και παρατηρείται ένας

μικρός αριθμός διαιρέσεων κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, ξεκινούν κατά την εφηβεία και συνεχίζονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής.

1.1.1. Ωογένεση

Ωογένεση καλείται η διαδικασία της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των θηλυκών γαμετών. Ακολουθεί μία κυκλική πορεία σε όλα τα είδη οργανισμών, στον άνθρωπο ονομάζεται έμμηνος κύκλος και στο μυ κύκλος οίστρου. Πραγματοποιείται στις ωοθήκες, οι οποίες μαζί με τους ωαγωγούς και τη μήτρα, συνιστούν το αναπαραγωγικό σύστημα στα θήλεα. Οι ωοθήκες, πέραν της λειτουργίας τους ως όργανα παραγωγής των θηλυκών γαμετών, εξυπηρετούν την έκκριση των στεροειδών ορμονών του φύλου, των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, αλλά και τη ρύθμιση της μεταγεννητικής αύξησης των αναπαραγωγικών οργάνων και της ανάπτυξης των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου.

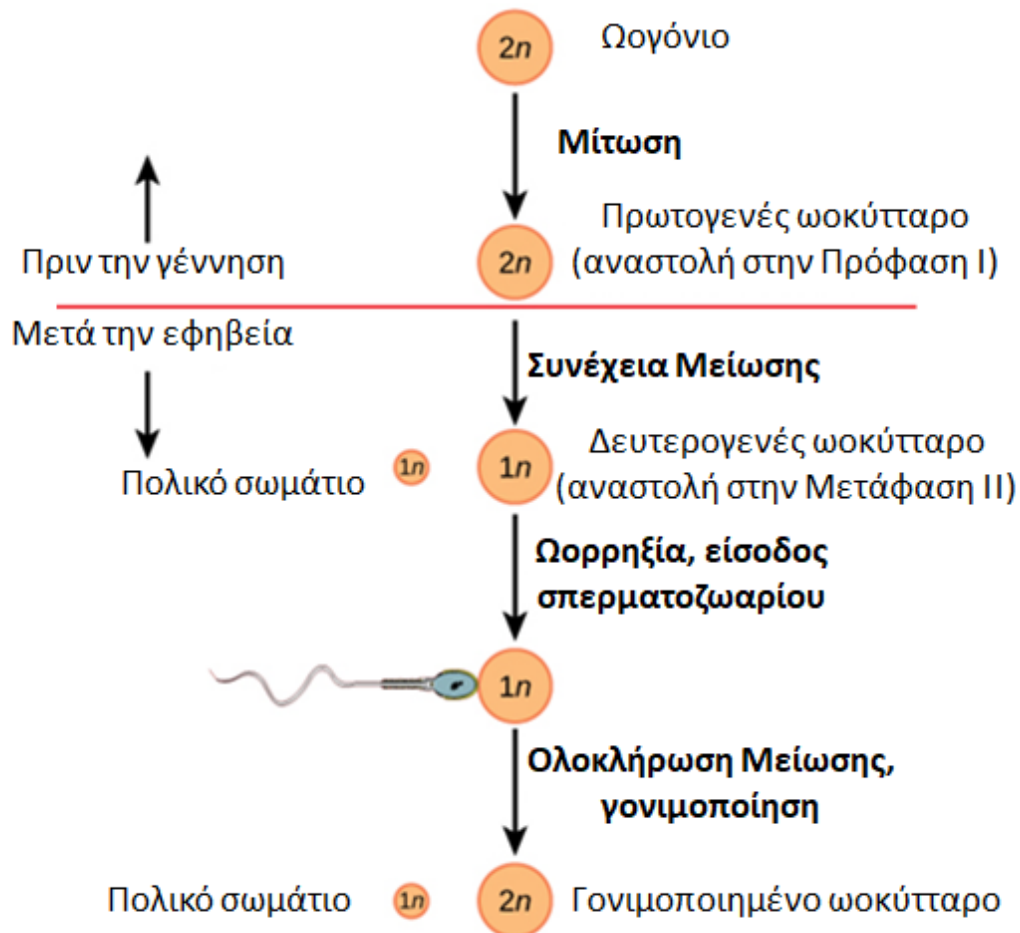
Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου στη μήτρα, τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, τα ωογόνια, υπόκεινται σε πολλαπλές μιτωτικές διαιρέσεις παράγοντας ικανό αριθμό θυγατρικών κυττάρων. Σε κάποιο στάδιο της ανάπτυξης (στον άνθρωπο μετά το 1ο τρίμηνο), οι διαιρέσεις παύουν και η παραγωγή νέων ωογονίων σταματά. Όλα τα ωογόνια εισέρχονται στη φάση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και αναπτύσσονται σε πρωτογενή ωοκύτταρα. Η πρώτη μειωτική διαίρεση δεν ολοκληρώνεται, μα αναστέλλεται στο στάδιο της πρόφασης. Κατά τη γέννηση, οι ωοθήκες ενός θήλεος περιέχουν ένα δεδομένο αριθμό πρωτογενών ωοκυττάρων, ο οποίος δε μεταβάλλεται περαιτέρω. Από την εφηβεία κι έπειτα, κάποια πρωτογενή ωοκύτταρα ολοκληρώνουν την πρώτη μειωτική διαίρεση, μετατρέπονται σε δευτερογενή και προορίζονται για ωοθυλακιορρηξία. Τα δευτερογενή ωοκύτταρα ολοκληρώνουν τη δεύτερη μειωτική διαίρεση στη μήτρα του θηλυκού ατόμου και παράγουν τον ώριμο θηλυκό γαμέτη μονάχα μετά τη γονιμοποίηση.

Τα στάδια της ανάπτυξης και της ωρίμανσης των ωοκυττάρων συνιστούν τον ωοθηκικό κύκλο, ο οποίος χωρίζεται σε τρεις φάσεις, τη θυλακική (follicular phase), την ωορρηκτική (ovulatory phase) και την ωχρινική φάση (luteal phase). Σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησής τους, τα ωοκύτταρα περιβάλλονται από ένα είδος σωματικών κυττάρων, τα κοκκώδη κύτταρα,

σχηματίζοντας μία ανατομική δομή γνωστή ως θυλάκιο ή ωθυλάκιο. Η μορφολογία των ωθυλακίων μεταβάλλεται στην πορεία του ωθητικού κύκλου.

Στη θυλακική φάση, ξεκινά η ανάπτυξη των αρχέγονων ωθυλακίων, τα οποία περιλαμβάνουν και το πρωτογενές ωκύτταρο, επενδυμένο με μια μονήρη στρώση κοκκωδών κυττάρων. Η περαιτέρω ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από την αύξηση του μεγέθους των ωκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων σε πολλαπλές στρώσεις και το διαχωρισμό του ωκυττάρου από τα έσω κοκκώδη κύτταρα με ένα παχύ στρώμα υλικού, τη διαφανή ζώνη. Τα αρχέγονα ωθυλάκια μετατρέπονται σε πρωτογενή ωθυλάκια. Το ωθυλάκιο αυξάνεται καθώς τα κοκκώδη κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με μιτωτικές διαιρέσεις, ενώ συσσωρεύεται ανάμεσά τους υγρό, για το μετέπειτα σχηματισμό του άντρου. Τα κύτταρα συνδετικού ιστού που περιβάλλουν τα κοκκώδη κύτταρα διαφοροποιούνται σε στρώσεις, σχηματίζοντας τα κύτταρα της θήκης, τα οποία οργανώνονται σε δύο διακριτές στρώσεις, την έσω και την έξω θήκη. Τα ωθυλάκια σε αυτό το στάδιο καλούνται ωθυλάκια χωρίς άντρο. Σύντομα, ξεκινά ο σχηματισμός του άντρου, μίας δομής γεμάτης εκκριτικά υγρά προερχόμενα από τα κοκκώδη κύτταρα. Τα ωθυλάκια καλούνται πρώιμα ή ωθυλάκια με άντρο. Το κυρίαρχο ωθυλάκιο επιλέγεται ώστε να ωριμάσει πλήρως και χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός αξιοσημείωτου αριθμού κοκκωδών κυττάρων, κυττάρων θήκης, μα και ενός διογκωμένου άντρου. Η αύξηση του μεγέθους του άντρου, ωθεί τα στρώματα των κοκκωδών κυττάρων που περιβάλλουν τα ωκύτταρα, να σχηματίσουν τον ωφόρο δίσκο. Σε αυτό το στάδιο, το ώριμο ωθυλάκιο περιέχει ένα δευτερογενές ωκύτταρο έτοιμο για ωορρηξία. Στην ωορρηκτική φάση, το τοίχωμα του θυλακίου και της ωθήκης διαρρηγνύεται με ενζυμική πέψη, ο ωφόρος δίσκος αποκόπτεται από το τοίχωμα του θυλακίου και το ωκύτταρο, το οποίο επιπλέει στο υγρό του άντρου, μεταφέρεται στην επιφάνεια της ωθήκης. Στην ωχρινική φάση, μετά την ωορρηξία, το εναπομείναν θυλάκιο συρρικνώνεται γύρω από το άντρο και τα κοκκώδη κύτταρα μεγεθύνονται. Αυτή η δομή του θυλακίου, το ωχρο σωματίο, ξεκινά να εκκρίνει οιστρογόνα, προγεστερόνη και ανασταλίνη. Η ανάπτυξή του συνεχίζεται και το μέγεθός του αυξάνεται, ενώ εκφυλίζεται με απόπτωση εάν δεν επέλθει γονιμοποίηση. Παράγοντα ελέγχου του

ωοθηκικού κύκλου αποτελεί η συνδυαστική δράση των ορμονών GnRH, των προσθιοϋποφυσιακών ορμονών FSH και LH και των γοναδικών ορμονών του φύλου, των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, καθώς συμμετέχουν δραστικά στην ανάπτυξη και στην ωρίμανση του θυλακίου (1).



Εικόνα 1: Η διαδικασία της ωογένεσης.

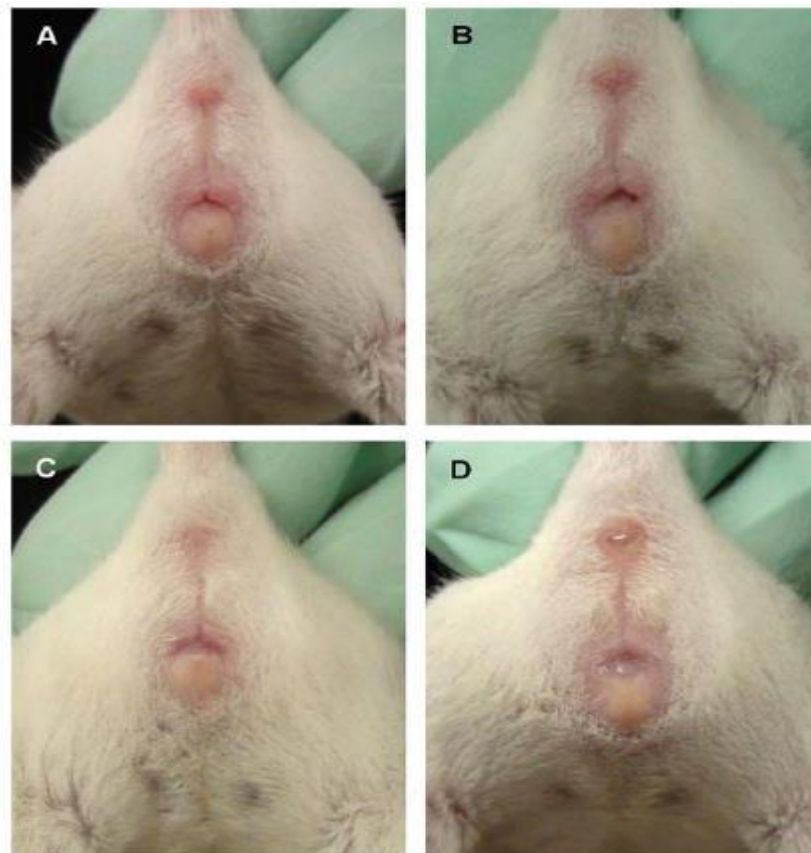
1.1.1.2. Κύκλος Οίστρου Μυός

Ο οίστρος του κύκλου στο μύ περιλαμβάνει τέσσερις φάσεις, τον προοίστρο, τον οίστρο, το μετοίστρο και το διοίστρο. Επαναλαμβάνεται κάθε 4 με 5 ημέρες, εκτός εάν διακοπεί από κύηση, ψευδοκύηση ή ανοίστρο. Η χρονική διάρκεια της κάθε φάσης διαφέρει, ενώ συχνά παρατηρούνται και ανωμαλίες του κύκλου (παρατεταμένος διοίστρος ή οίστρος), οφειλόμενες κυρίως σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Ο προοίστρος αποτελεί την προ-ωοθυλακιορρηκτική φάση, κατά την οποία η συγκέντρωση των οιστρογόνων ξεκινά να αυξάνεται. Στη διάρκεια της νύκτας, οι τιμές της FSH και της LH ενισχύονται και έπεται η απελευθέρωση του ωαρίου, συνήθως νωρίς το πρωί. Ο οίστρος αποτελεί την περίοδο της σεξουαλικής δεκτικότητας του μυός. Σε αυτή τη φάση, τα επίπεδα των οιστρογόνων είναι υψηλά το πρωί και ξεκινούν να μειώνονται το απόγευμα. Διαρκεί 1 ημέρα σε ένα κύκλο 4 ημερών και 2 ημέρες σε ένα κύκλο 5 ημερών. Κατά το μετοίστρο, τα επίπεδα των οιστρογόνων εξακολουθούν να είναι χαμηλά. Αυτό το στάδιο περιγράφει τη μετάβαση από τον οίστρο στην πρώιμη φάση του διοίστρου κατά την πρώτη ημέρα. Στη φάση του διοίστρου ξεκινούν και πάλι να αυξάνονται τα επίπεδα των οιστρογόνων, ενώ οι τιμές της FSH και της LH παραμένουν χαμηλές. Ο διοίστρος διαρκεί συνήθως 2 ημέρες (2), (3).

Ο προσδιορισμός της φάσης του αναπαραγωγικού κύκλου μπορεί να επιτευχθεί με την κυτταρολογική εξέταση του κολπικού επιχρίσματος (4), με τον προσδιορισμό της ηλεκτρικής αντίστασης (5), με τη βιοχημική ανάλυση των ούρων (6) και με την παρατήρηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων (7). Η εξέταση της μορφολογίας των κυττάρων του κόλπου αποτελεί την ακριβέστερη μέθοδο προσδιορισμού της φάσης του αναπαραγωγικού κύκλου του μυός. Σε κάθε φάση του κύκλου κυριαρχεί συνήθως ένας συγκεκριμένος τύπος κυττάρου, ενώ δεν αποκλείεται να εντοπισθεί και δεύτερος ή τρίτος σε μικρότερη αναλογία. Στον προοίστρο, εμφανίζονται κυρίως εμπύρνηνα επιθηλιακά κύτταρα, μεμονωμένα ή σε ομάδες, καθώς και ορισμένα κερατινοποιημένα κύτταρα. Στο στάδιο του οίστρου παρατηρούνται μονάχα ομάδες

απύρηνων κερατινοποιημένων πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων. Στο μετοίστρο επικρατούν τα λευκοκύτταρα, με λίγα εμπύρηννα ή και κερατινοποιημένα κύτταρα. Στο διοίστρο ανευρίσκονται μονάχα λευκοκύτταρα (8). Η παρατήρηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων του μύος συνιστά μία αρκετά γρήγορη μέθοδο, καθώς επιτρέπει τον άμεσο προσδιορισμό της φάσης του κύκλου αναπαραγωγής, με απλή παρατήρηση και χωρίς μηχανική επέμβαση. Τα χαρακτηριστικά του κόλπου του μύος στα διάφορα στάδια του κύκλου είναι τα εξής: Στον προοίστρο, ο κόλπος είναι ανοικτός. Οι ιστοί γύρω του είναι υγροί, με κόκκινο χρώμα, ενώ στο ραχιαίο και στο κοιλιακό χείλος του κόλπου είναι ορατές αρκετές επιμήκεις πτυχές και ραβδώσεις. Στον οίστρο, το άνοιγμα του κόλπου είναι παρόμοιο με αυτό του προοίστρου. Οι ιστοί είναι λιγότερο υγροί, με βαθύ ροζ χρώμα, ενώ οι ραβδώσεις στο ραχιαίο και στο κοιλιακό χείλος είναι πιο έντονες. Στο μετοίστρο, ο κόλπος είναι κλειστός. Οι ιστοί είναι υγροί και ωχροί, ενώ το ραχιαίο χείλος εμφανίζεται λιγότερο διογκωμένο. Στο διοίστρο, ο κόλπος είναι ελάχιστα ανοικτός. Οι ιστοί είναι υγροί, με αχνό μωβ χρώμα.



Εικόνα 2: Ο κύκλος οίστρου του μύος: προοίστρος, οίστρος, μετοίστρος, διοίστρος.

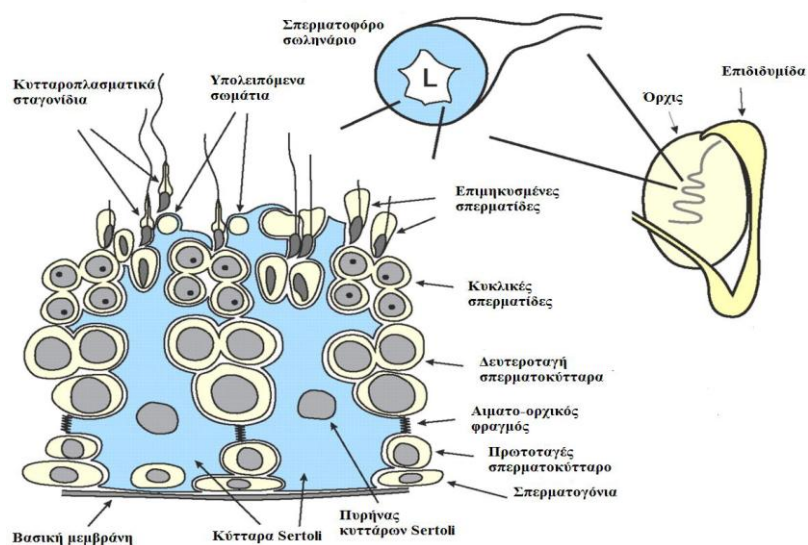
1.1.2. Σπερματογένεση

Σπερματογένεση καλείται η διαδικασία του σχηματισμού απλοειδών, λειτουργικών και ευκίνητων σπερματοζωαρίων από διπλοειδή σπερματογόνια. Το στάδιο της σπερματογένεσης, κατά το οποίο οι απλοειδείς σπερματίδες διαφοροποιούνται σε σπερματοζωάρια, χαρακτηρίζεται ως σπερμιογένεση. Το σπέρμα γενικώς επιτελεί δύο κύριες λειτουργίες, επιδίδει το γένωμά του στο ωάριο για το γενετικό ανασυνδυασμό και ενεργοποιεί το αναπτυξιακό πρόγραμμα του ωαρίου.

Η σπερματογένεση αποτελεί συνεχή διαδικασία και επιτελείται στα σπερματικά σωληνάκια των όρχεων. Τα σπερματικά σωληνάκια διαφορετικών περιοχών του όρχεος ενοποιούνται και σχηματίζουν το ορχικό δίκτυο, ένα πλέγμα αλληλοσυνδεόμενων σωλήνων. Οι απαγωγοί σωληνίσκοι, τρυπούν το ινώδες περίβλημα των όρχεων και εκβάλλουν σ' ένα μικρό αγωγό εντός της επιδιδυμίδας. Κάθε σπερματικό σωληνάριο οριοθετείται από μια βασική μεμβράνη και ένα στρώμα κυττάρων λείου μυός, το οποίο είναι υπεύθυνο για τις περισταλτικές κινήσεις των σωληναρίων. Στο κέντρο κάθε σωληναρίου βρίσκεται ένα υγροφόρος αυλός, ο οποίος περιέχει σπερματοζωάρια. Το σωληναριακό επιθήλιο αποτελείται από δύο διακριτούς τύπους κυττάρων, τα αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα και τα σωματικά κύτταρα Sertoli. Τα κύτταρα Sertoli συνιστούν μόνιμα κύτταρα του σπερματοφόρου σωληναρίου και διατηρούν μια στενή σχέση με τους γαμέτες σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησής τους. Ανάμεσα στα σπερματικά σωληνάκια τοποθετούνται τα κύτταρα Leydig ή διάμεσα κύτταρα, τα οποία παράγουν την τεστοστερόνη, όντας σε επαφή με τα αιμοφόρα αγγεία και τους λεμφικούς διαύλους.

Η σπερματογένεση ξεκινά με τις μιτωτικές διαιρέσεις των πρωτογενών βλαστικών κυττάρων ή διπλοειδών σπερματογόνιων, τα οποία βρίσκονται στη βάση των σπερματοφόρων σωληναρίων, τοποθετημένα μεταξύ των κυττάρων Sertoli και της υποκείμενης βασικής μεμβράνης. Τα διπλοειδή σπερματογόνια παραμένουν εκεί, λειτουργώντας ως στελεχιαία κύτταρα και συνεχίζοντας τις κυτταρικές διαιρέσεις. Κάποια από τα παραχθέντα θυγατρικά κύτταρα εξέρχονται από τον κύκλο των

μιτωτικών διαιρέσεων, υπόκεινται διαφοροποίηση, μετατρέπονται σε πρωτογενή σπερματοκύτταρα και ξεκινούν τις μειωτικές διαιρέσεις. Κάθε πρωτογενές σπερματοκύτταρο διαιρείται αρχικά σε δύο δευτερογενή σπερματοκύτταρα και έπειτα σε τέσσερις σπερματίδες με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Βέβαια, τα αναπτυσσόμενα βλαστικά κύτταρα αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν τις κυτταροπλασματικές τους διαιρέσεις (κυτοκίνηση) κατά τη διάρκεια της μίτωσης και της μείωσης, με αποτέλεσμα όλα τα θυγατρικά κύτταρα να παραμένουν συνδεδεμένα με κυτταροπλασματικές γέφυρες και να αποτελούν ένα συγκύτιο. Οι κυτταροπλασματικές γέφυρες επιτρέπουν τη διέλευση ιόντων και μορίων μεταξύ των κυττάρων. Η επικοινωνία μεταξύ των αναπτυσσόμενων σπερματοζωαρίων διατηρείται ως την πλήρη και ταυτόχρονη διαφοροποίησή τους. Κατά τη διάρκεια των μειωτικών διαιρέσεων, τα κύτταρα που βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια της σπερματογένεσης, τοποθετούνται διαδοχικά σε υψηλότερες θέσεις στα σπερματοφόρα σωληνάρια. Η σπερματογένεση ολοκληρώνεται με τη διαφοροποίηση των σπερματίδων σε ώριμα σπερματοζωάρια, μέσω της σπερμιογένεσης, κατά την οποία παρατηρείται κυτταρική αναδόμηση και εκτεταμένη επιμήκυνση των σπερματίδων και της σπερμιάσης, κατά την οποία τα υπολειπόμενα σωματίδια αποβάλλονται από τις επιμήκεις σπερματίδες, οι κυτταροπλασματικές γέφυρες αποκόπτονται, σχηματίζονται τα ώριμα σπερματοζωάρια και απελευθερώνονται στον αυλό (1).



Εικόνα 3: Η διαδικασία της σπερματογένεσης.

1.1.2.1. Σπερματοζωάριο

Το σπερματοζωάριο δομείται από την κεφαλή και την ουρά, τα οποία περιβάλλονται από την πλασματική μεμβράνη. Η κεφαλή του σπερματοζωαρίου των τρωκτικών κατέχει μορφή άγκιστρου (hook-shaped), ενώ στα πρωτεύοντα είναι σπαθοειδής (spatula-shaped). Το σπερματοζωάριο των τρωκτικών χαρακτηρίζεται από πλήρη απουσία κεντροσώματος και κεντριολίων. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της κεφαλής και της ουράς των σπερματοζωαρίων είναι κοινά μεταξύ των θηλαστικών (9).

κεφαλή σπερματοζωαρίου

Στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου, το DNA βρίσκεται συνδεδεμένο με τις πρωταμίνες, θετικά φορτισμένες DNA πρωτεΐνες πλούσιες στο αμινοξύ αργινίνη, οι οποίες συμμετέχουν στην υπερσυμπύκνωση του πυρήνα. Δημιουργείται έτσι μια συμπαγής, υδροδυναμική δομή, η οποία προσδίδει στο σπέρμα την ικανότητα της κίνησης και της διείσδυσης στη μεμβράνη του ωαρίου κατά τη γονιμοποίηση. Ο πυρήνας περικλείεται από μια στοιχειώδη πυρηνική μεμβράνη, αποτελούμενη από δύο επιμέρους μεμβράνες, μία εσωτερική και μία εξωτερική. Κατά διαστήματα, στην πυρηνική μεμβράνη εμφανίζονται πόροι, οι οποίοι σχηματίζονται από τη συνένωση των δύο μεμβρανών, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία του πυρήνα με τον κυτταροπλασματικό χώρο και ελέγχοντας τη μεταφορά μορίων από και προς τον πυρήνα. Κατά τη σπερμιογένεση, οι πυρηνικοί πόροι συνήθως απουσιάζουν. Ωστόσο, σε ορισμένα είδη (άνθρωπος, μύς), διατηρούνται στο στοιχειώδη πυρηνικό φάκελο, στη βάση του πυρήνα του σπερματοζωαρίου (10). Το περιπυρηνικό στρώμα προστατεύει το DNA της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Αποτελεί ένα άκαμπτο κέλυφος, ενώ περιέχει δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες σταθεροποιούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς και δημιουργούν σύμπλοκα με άλλα πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία απελευθερώνονται από το περιπυρηνικό στρώμα στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση, συμμετέχοντας στη διαδικασία της κυτταρικής επικοινωνίας. Διακρίνεται σε τρία επιμέρους τμήματα, όπου αντανακλούν ουσιαστικά τα τμήματα της κεφαλής του σπερματοζωαρίου,

εξυπηρετούν μοναδικές λειτουργίες κατά τη γονιμοποίηση του ωαρίου και είναι: α. η υποακροσωματική περιοχή (subacrosomal segment): αποτελεί το κάλυμμα της κεφαλής, βρίσκεται στο άνω εμπρόσθιο ημισφαίριο της κεφαλής του σπερματοζωαρίου, συνιστά τη βάση του ακροσώματος, χαρακτηρίζεται ως υπόλειμμα της συσκευής Golgi και περιέχει πρωτεάσες και υποδοχείς, απαραίτητους για την αλληλεπίδραση του σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη του ωαρίου, β. ισημερινή περιοχή (equatorial segment): συνίσταται από ένα σύμπλοκο που σχηματίζει η περιουκλειϊκή περιοχή με την εσωτερική και την εξωτερική ακροσωμική μεμβράνη και διαθέτει υποδοχείς που συμμετέχουν στην αρχική πρόσδεση του σπερματοζωαρίου με την πλασματική μεμβράνη του ωαρίου, γ. μετακροσωμική περιοχή (postacrosomal seath): αποτελεί ένα σύνολο πρωτεϊνικών σηματοδοτικών μορίων, που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του ωαρίου, στην περαιτέρω ανάπτυξη του ζυγωτού, καθώς και στη διαδικασία μετατροπής του αρσενικού πυρήνα σε προπυρήνα κατά το στάδιο του σχηματισμού του ζυγώτη (9).

ουρά σπερματοζωαρίου

Το αξονήμιο είναι υπεύθυνο για τη μαστιγοειδή κίνηση, η οποία προωθεί το σπέρμα προς το ωάριο. Αποτελείται από 2 κεντρικά μικροσωληνάρια, που περιβάλλονται από 9 περιφερειακά ζεύγη μικροσωληναρίων, τα οποία περικλείονται επίσης από 9 πυκνές ίνες. Κάθε ίνα τοποθετείται παράλληλα με ένα ζεύγος μικροσωληναρίων, ενώ το πάχος τους είναι αυξημένο στο πρόσθιο τμήμα της ουράς και μειώνεται σταδιακά προς το οπίσθιο άκρο. Η ουρά διακρίνεται σε τέσσερα επιμέρους τμήματα, το εσωτερικό των οποίων είναι ίδιο με τη δομή των μικροσωληναρίων και των πυκνών ινών, ενώ το εξωτερικό τους διαφορετικό.

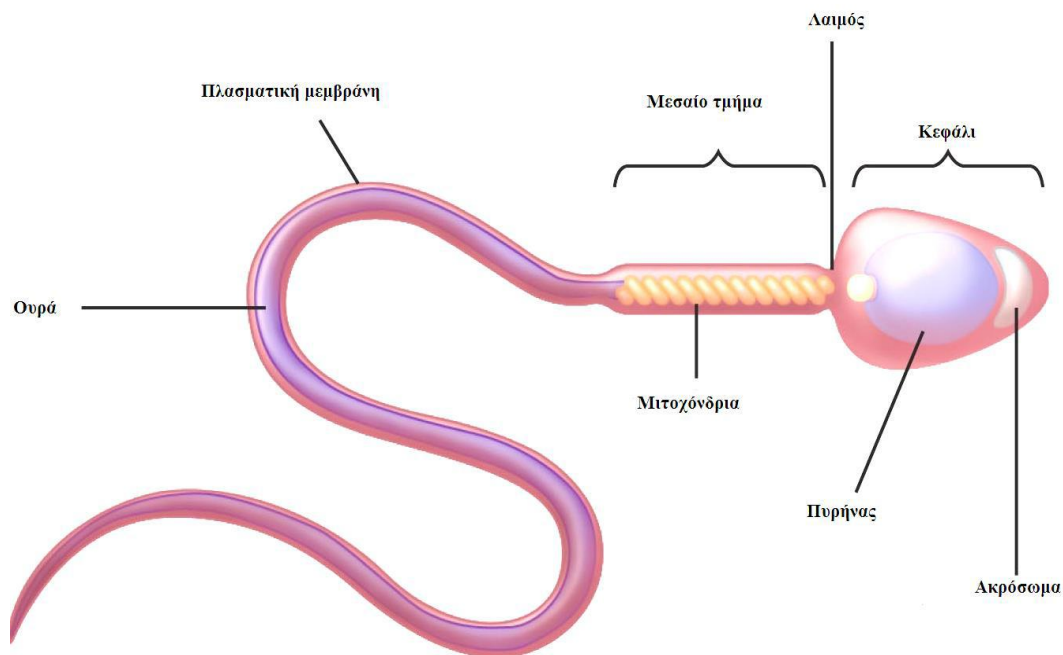
α. τμήμα σύνδεσης: αποτελείται από 9 τμηματικές ραβδωτές, γραμμωτές, λεπτές ίνες που αποτελούν συνέχεια των 9 πυκνών ινών του αξονημίου. Εκεί, εντοπίζεται μία συμπαγής μάζα, η οποία σε όλα τα θηλαστικά πέραν των τρωκτικών, περιέχει το πρόσθιο κεντριόλιο. Το δεύτερο ή μακρινό κεντριόλιο αποικοδομείται κατά την ανάπτυξη του μεσαίου τμήματος. Η πλήρης αποδόμηση των δύο κεντριολίων στη σπερμιόγνεση αποτελεί στοιχείο διάκρισης μεταξύ των σπερματοζωαρίων στα

τρωκτικά και στα πρωτεύοντα. Η βασική πλάκα παρέχει τη σύνδεση μεταξύ του πρόσθιου τμήματος και της κοιλότητας που σχηματίζει η βάση της κεφαλής του σπερματοζωαρίου.

β. μεσαίο τμήμα: περικλείεται από ένα μιτοχονδριακό περίβλημα, το οποίο αποτελείται από 70-100 μιτοχόνδρια, που παράγουν την απαραίτητη ενέργεια για την κίνηση των σπερματοζωαρίων. Διευθετούνται το ένα πίσω από το άλλο και σχηματίζουν μία έλικα, η οποία περιβάλλει το αξονήμιο του μεσαίου τμήματος. Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει πολλαπλά αντίγραφα του πατρικού μιτοχονδριακού γενώματος. Τα μιτοχόνδρια που μεταφέρουν το πατρικό DNA (mtDNA) αποδομούνται από πρωτεολυτικά ένζυμα του ωαρίου, καθώς φέρουν μεταλλάξεις εξαιτίας του οξειδωτικού στρες που υφίστανται κατά τη διαδικασία ωρίμανσης.

γ. κύριο τμήμα: διαχωρίζεται από το μεσαίο τμήμα μέσω ενός δακτυλίου και περιβάλλεται από μια ινώδη κάψα, η οποία παρέχει υποστήριξη στο αξονήμιο.

δ. τελικό ή ακραίο τμήμα: περιλαμβάνει το αξονήμιο, τα τελικά τμήματα της ινώδους κάψας και τα τελικά τμήματα του εξωτερικού πυκνού στρώματος των ινών (9).



Εικόνα 4: Η δομή του σπερματοζωαρίου.

Γονιμοποιητική Ικανότητα Σπερματοζωαρίου

Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των σπερματοζωαρίων αρχίζει στις γονάδες, συνεχίζεται στην επιδιδυμίδα και τελειώνει στο εσωτερικό του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος. Τα σπερματοζωάρια, μετά την απελευθέρωσή τους στον αυλό των σπερματοφόρων σωληνάρων, περιέχουν την κατάλληλη ποσότητα γενετικού υλικού, είναι μορφολογικά ώριμα, δεν διαθέτουν όμως ικανότητα κίνησης και γονιμοποίησης. Ένας πλήρως ώριμος αρσενικός γαμέτης χαρακτηρίζεται από την ικανότητα της αύξησης και της μεταβολής του προτύπου της κίνησής του (hyperactivation) και από την ικανότητα της γονιμοποίησης (capacitation) και της σύντηξης του με το θηλυκό γαμέτη.

Η μεταγοναδική ωρίμανση των σπερματοζωαρίων ξεκινά στην επιδιδυμίδα. Εκεί, παρατηρούνται τροποποιήσεις στη μορφολογία και στην πρωτεϊνική σύσταση των σπερματοζωαρίων, μα και αλλαγές όπως η σταδιακή αύξηση των επιπέδων του cAMP και της κίνησής τους (11). Στην εκσπερμάτωση, τα σπερματοζωάρια εμφανίζουν κινητικότητα, αλλά όχι γονιμοποιητική ικανότητα. Η απόκτηση ικανότητας για γονιμοποίηση (capacitation) πραγματοποιείται μετά την είσοδό τους στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα και περιλαμβάνει μια σειρά μορφολογικών και βιοχημικών τροποποιήσεων, όπως την αύξηση της μεμβρανικής ρευστότητας, τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης, την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του cAMP, του Ca²⁺ και μία σημαντική μεταβολή στα φυσικά χαρακτηριστικά της κίνησής τους, που καλείται υπερενεργοποίηση (hyperactivation) (12).

Κίνηση Υπερενεργοποίησης Σπερματοζωαρίου

Η κίνηση των σπερματοζωαρίων διαφέρει μεταξύ των ειδών, ενώ επηρεάζεται και από τη σύσταση του περιβάλλοντος. Στην επιδιδυμίδα, τα σπερματοζωάρια είναι ανενεργά, σχεδόν ακίνητα (13). Όταν απελευθερώνονται στο σπερματικό υγρό *in vivo*, ή σε κάποιο καλλιεργητικό μέσο *in vitro*, ξεκινούν να κινούνται γρήγορα και δυνατά, ακολουθώντας σχεδόν ευθεία κατεύθυνση. Ως κίνηση υπερενεργοποίησης, ορίζεται η κίνηση των σπερματοζωαρίων όταν συλλέγονται από τον ωαγωγό κατά τη γονιμοποίηση. Η κίνηση του μαστιγίου χαρακτηρίζεται από έντονες, μη συμμετρικές αναδιπλώσεις και το σπερματοζωάριο κινείται σχεδόν κυκλικά. Η

υπερενεργοποίηση πρέπει να συμβεί την κατάλληλη στιγμή και στο ιδανικό σημείο ώστε να επιτευχθεί η γονιμοποίηση. Ενδεχομένως, η διαδικασία ελέγχεται από μηχανισμούς και σηματοδοτικά μόρια, προερχόμενα από το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Το ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό επηρεάζει πιθανόν κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο τη συχνότητα κάμψης του μαστιγίου και την υπερενεργοποίηση του σπερματοζωαρίου (14). Η ανίχνευση σπερματοζωαρίων με χαρακτηριστική κίνηση υπερενεργοποίησης στον ωαγωγό των μυών (15), υποδεικνύει επίσης τη συμμετοχή του ωοθυλακικού υγρού και των κοκκιωδών κυττάρων στη ρύθμιση της διαδικασίας.

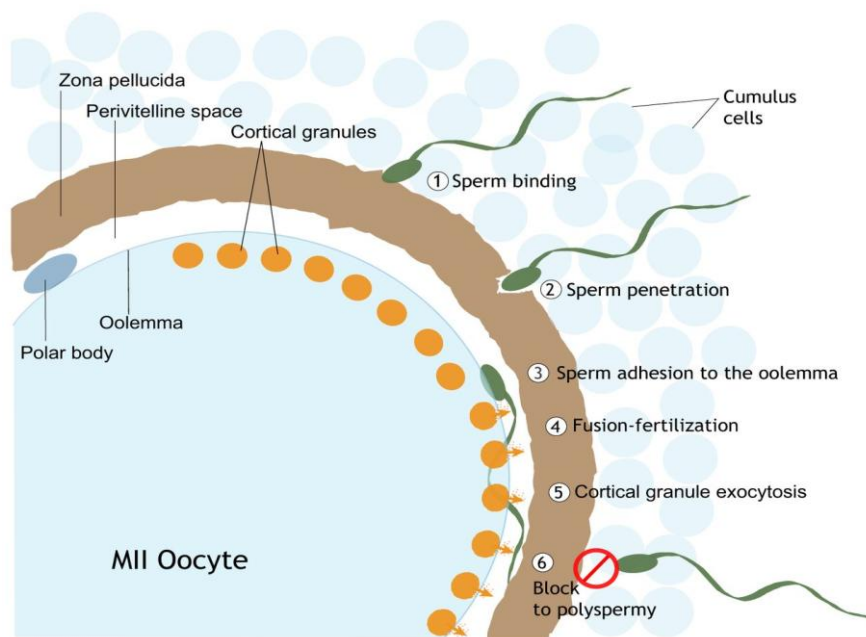
Παράγοντες όπως το Ca^{+2} , το cAMP και οι διττανθρακικοί μεταβολίτες είναι απαραίτητοι για την έναρξη και τη διατήρηση της υπερενεργοποίησης *in vitro*. Το Ca^{+2} διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κινητικότητας (13). Αυξημένα επίπεδα cAMP συσχετίζονται με την κίνηση των σπερματοζωαρίων κατά την υπερενεργοποίηση (16). Το cAMP, εμπλέκεται πιθανώς στη ρύθμιση της κυματοειδούς κίνησης του μαστιγίου, μέσω της διατήρησης της συγκέντρωσης του Ca^{+2} σε κατάλληλα επίπεδα (17). Οι διττανθρακικοί μεταβολίτες υποστηρίζουν την υπερενεργοποίηση σε σπερματοζωάρια μυός (18), μέσω της ρύθμισης της δράσης της αδενυλικής κυκλάσης του μαστιγίου (19), ή ακόμη και της ενεργοποίησής της (20).

1.1.3. Γονιμοποίηση

Η γονιμοποίηση ορίζεται ως η σύντηξη ενός αρσενικού και ενός θηλυκού γαμέτη, η οποία συνοδεύεται από τη συνένωση των πυρήνων τους. Τα κύρια χαρακτηριστικά της διαδικασίας είναι η αναγνώριση των γαμετών, η έλξη, η επαφή και η συνένωσή τους, η σύντηξη των γαμετών και ο φραγμός στη πολυσπερμία, η μεταβολική ενεργοποίηση του ωαρίου, οι ανακατατάξεις των κυτταροπλασματικών ουσιών και η σύντηξη του γενετικού υλικού.

Τα σπερματοζωάρια, κινούμενα στον αγωγό του θηλυκού ατόμου, αποκτούν την ικανότητα γονιμοποίησης, διαπερνούν το στρώμα των κοκκωδών κυττάρων που περιβάλλουν το ωάριο και προσδένονται στη διαφανή ζώνη. Η πρόσδεση πραγματοποιείται μεταξύ των πρωτεϊνών της κεφαλής των σπερματοζωαρίων και των γλυκοπρωτεϊνών (ZP3) της επιφάνειας της διαφανούς ζώνης των ωαρίων. Ακολουθεί η αντίδραση του ακροσώματος, κατά την οποία η πλασματική μεμβράνη της κεφαλής του σπερματοζωαρίου μεταβάλλεται έτσι, ώστε τα υποκείμενα προσδεμένα μεμβρανικά ένζυμα του ακροσώματος να εκτίθενται στη διαφανή ζώνη, διασπώντας τη και σχηματίζοντας μια οπή για τη δίοδο των σπερματοζωαρίων. Το σπερματοζωάριο το οποίο διατρυπά ολόκληρη τη διαφανή ζώνη, προσκολλάται στην πλασματική μεμβράνη του ωαρίου και εισέρχεται σταδιακά στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου. Η σύντηξη του ωαρίου με ένα και μόνο σπερματοζωάριο ενεργοποιεί μηχανισμούς, οι οποίοι παρεμποδίζουν τη σύντηξη πρόσθετων σπερματοζωαρίων με το ίδιο ωάριο. Εκκριτικοί θύλακες, τοποθετημένοι στην περιφερική επιφάνεια του ωαρίου, εκχύνουν το περιεχόμενό τους στο χώρο μεταξύ της μεμβράνης του ωαρίου και της διαφανούς ζώνης. Στα εκκρινόμενα συστατικά συμπεριλαμβάνονται και ένζυμα, τα οποία εισέρχονται στη διαφανή ζώνη, προκαλώντας την απενεργοποίηση των υποδοχέων του σπέρματος και τη γενική σκλήρυνση της ζώνης. Αποφεύγεται έτσι, η πρόσδεση νέων σπερματοζωαρίων, διακόπτεται η πορεία των ήδη προσδεμένων σπερματοζωαρίων και εμποδίζεται η πολυσπερμία, η οποία συνήθως οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη.

Το αγονιμοποίητο ωάριο χαρακτηρίζεται από περιορισμένες μεταβολικές δραστηριότητες. Η γονιμοποίηση αποτελεί το έναυσμα για την έναρξη των μεταβολικών λειτουργιών, ενώ επιφέρει ουσιαστική αναδιοργάνωση των κυτταροπλασματικών συστατικών. Η μεταβολική ενεργοποίηση περιλαμβάνει την αύξηση της δραστηρότητας ορισμένων ενζύμων και την έναρξη της μακρομοριακής σύνθεσης, ώστε να διασφαλιστεί η κυτταρική διαίρεση και η εμβρυογένεση. Το γονιμοποιημένο πλέον ωάριο συμπληρώνει τη δεύτερη μειωτική διαίρεση, το δεύτερο πολικό σωματίο αποβάλλεται και σχηματίζεται ο θηλυκός απλοειδής γαμέτης. Οι δύο απλοειδείς γαμέτες, περιβαλλόμενοι από ειδικές μεμβράνες (θηλυκός και αρσενικός προπυρήνας) μεταναστεύουν στο κέντρο του κυττάρου και αντιγράφουν το DNA τους, οι προπυρηνικές μεμβράνες διαλύονται και ο μονοκύτταρος ζυγώτης είναι πια έτοιμος να διαιρεθεί μιτωτικά.



Εικόνα 5: Η διαδικασία της γονιμοποίησης.

Στο μυ, απελευθερώνονται στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού περίπου 58×10^6 σπερματοζωάρια. Σε 5 μόλις λεπτά, κάποια φθάνουν στον ωαγωγό και σχεδόν 1 ώρα αργότερα αποκτούν ικανότητα γονιμοποίησης. Σε διάστημα 24 ωρών, στο μονοκύτταρο ζυγώτη ο αρσενικός και ο θηλυκός προπυρήνας αντιγράφουν το

γενετικό τους υλικό και διαιρούνται μιτωτικά, ώστε να σχηματιστεί το έμβρυο στο στάδιο των δύο κυττάρων. Η πρώτη και η δεύτερη μιτωτική διαίρεση πραγματοποιούνται ανά 12 ώρες και τα προκύπτοντα βλαστομερίδια είναι ίδιου μεγέθους. Η διαίρεση που έπεται του σταδίου των 8 κυττάρων οδηγεί στη μετατροπή του εμβρύου σε μία συμπαγή δομή, το μορίδιο, όπου η επιφάνεια επαφής μεταξύ των βλαστομεριδίων διευρύνεται (21). Τα κύτταρα του μοριδίου εκκρίνουν υγρό στο εσωτερικό της μάζας του, δημιουργώντας μια κοιλότητα, το βλαστόκοιλο. Ακολουθούν ασύμμετρες μιτωτικές διαιρέσεις των βλαστομεριδίων και στο στάδιο των 32 κυττάρων, η κοιλότητα μετατοπίζεται στο ένα άκρο του εμβρύου και το έμβρυο ονομάζεται βλαστοκύστη. Σε αυτό το στάδιο, διακρίνονται δύο ξεχωριστοί πληθυσμοί κυττάρων, η ομάδα των κυττάρων που συγκεντρώνονται στο ένα άκρο και σχηματίζουν την εσωτερική κυτταρική μάζα και η εξωτερική στοιβάδα κυττάρων που περιβάλλουν την κοιλότητα της βλαστοκύστης. Η εσωτερική κυτταρική μάζα αποτελεί το μελλοντικό έμβρυο και προωθεί τη δημιουργία εξωεμβρυϊκών δομών, όπως το άμνιο. Η εξωτερική μάζα κυττάρων προάγει τη διαμόρφωση της τροφοβλάστης, η οποία συνθέτει το χόριο και το εμβρυϊκό τμήμα του πλακούντα (22), (23). Ο σχηματισμός της βλαστοκύστης ολοκληρώνεται 3,5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Σε *in vitro* μελέτες προεμφυτευτικής ανάπτυξης εμβρύων μυός, ο χρόνος αυτός συνήθως διευρύνεται κατά 24 ώρες (24).

Η πορεία της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης και της μετέπειτα εμφύτευσης εξαρτάται, τόσο από την επιτυχή εκτέλεση του γενετικού και αναπτυξιακού προγράμματος, όσο και από την αλληλεπίδραση του εμβρύου με τον περιβάλλοντα χώρο του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος. Έτσι, ενώ στις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις χρησιμοποιούνται RNA και πρωτεΐνες του ωαρίου, τα συστατικά αυτά αποδομούνται σταδιακά και πλέον στο στάδιο των 2 κυττάρων χρησιμοποιείται μονάχα το 25% του RNA και το 50% των πρωτεϊνών μητρικής προέλευσης (25), (26), (27). Το γενετικό πρόγραμμα και η ανάπτυξη του εμβρύου ελέγχονται περαιτέρω από την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γενώματος, η οποία παρατηρείται μετά το στάδιο των 2 κυττάρων και στο στάδιο των 4-8 κυττάρων (28), (29), (30). Στην πορεία ανάπτυξης του εμβρύου, ενεργοποιούνται κυρίως γονίδια, τα οποία

κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, συστατικά σύνδεσης των κυττάρων και μεταφορείς ιόντων διαμέσου των πλασματικών μεμβρανών. Η επιλογή των γονιδίων που θα εκφραστούν εξαρτάται κυρίως από τη γονιδιακή αποτύπωση και από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος.

1.1.4. Διαγονιδιακοί Οργανισμοί

Διαγονιδιακός, καλείται ο οργανισμός, ο οποίος έχει υποστεί τροποποίηση του γενετικού του υλικού, μέσω της εισαγωγής ενός νέου εξωγενούς κλωνοποιημένου τμήματος DNA (transgenesis) ή μέσω της αντικατάστασης και της τροποποίησης της λειτουργίας των γονιδίων του με ομόλογο ανασυνδυασμό (gene targeting, knock in and knock out mutations). Εξωγενές DNA αποτελούν α. τα κλωνοποιημένα τμήματα DNA ή cDNA σε ανασυνδυασμένους φορείς (πλασμίδια, κοσμίδια, ιϊκοί φορείς), οι οποίοι επιτρέπουν την ενσωμάτωση και την έκφραση του DNA στόχου στον οργανισμό όπου εισάγονται, β. τα DNA constructs, στα οποία το DNA στόχος βρίσκεται ενσωματωμένο σε ειδική κατασκευή μαζί με κάποιο γονίδιο αναφοράς, η έκφραση του οποίου δύναται να προσδιοριστεί και να αναλυθεί (reporter genes: firefly luciferase gene, lacZ, GFP gene, enhanced GFP), και γ. μεγάλα τμήματα DNA (yeast artificial chromosomes YACS, bacterial artificial chromosomes BACS).

Η εισαγωγή του εξωγενούς μορίου DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί σε γαμετικά, σε εμβρυϊκά και σε σωματικά κύτταρα. Στην όλη διαδικασία, εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι για την επίτευξη της εισόδου, όπως η χρήση ιικών φορέων, η πρόσληψη DNA με τη μεσολάβηση φωσφορικού ασβεστίου, η μικροένεση του DNA στο εσωτερικό των ωαρίων, η σύντηξη των μεμβρανικών κυστιδίων που περιέχουν DNA με τα κύτταρα στόχους και η ηλεκτροδιάτρηση, η πρόσληψη δηλαδή DNA με τη μεσολάβηση ηλεκτρικού ρεύματος. Στις βασικές τεχνικές δημιουργίας διαγονιδιακών οργανισμών συμπεριλαμβάνονται: η τεχνική της μικροένεσης του εξωγενούς DNA στον αρσενικό προπυρήνα των γονιμοποιημένων ωαρίων (pronuclear microinjection), η χρήση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (embryonic stem cell method) και η χρήση ιϊκών φορέων (viral infection). Επιπλέον εφαρμοζόμενες τεχνικές αποτελούν: η μεταφορά του πυρήνα ενός σωματικού κυττάρου στο εσωτερικό ενός ωαρίου (nuclear transfer), η χρήση πλασμιδικών φορέων που φέρουν ενσωματωμένα ρετρομεταθετά στοιχεία (transposable elements), η χρήση ενδιάμεσων μορίων RNA (RNAi interference) και η μεταφορά

του γενετικού υλικού μέσω των σπερματοζωαρίων (Sperm Mediated Gene Transfer SMGT).

1.1.4.1. Μεταφορά Γονιδίων μέσω Σπέρματος

Η τεχνική Sperm Mediated Gene Transfer στηρίζεται στην ικανότητα των σπερματοζωαρίων να μεταφέρουν στο έμβρυο μέσω της γονιμοποίησης, όχι μόνο το δικό τους γενετικό υλικό, αλλά και γενετικό υλικό με το οποίο μπορεί να έλθουν σε επαφή. Η πρώτη σχετική αναφορά έγινε το 1971 από τον Brackett και τους συνεργάτες του, οι οποίοι απέδειξαν την ενσωμάτωση του DNA του Simian Virus στα σπερματοζωάρια του κουνελιού και τη μεταφορά του στα ωάρια κατά τη γονιμοποίηση (31). Το 1989, ο Spadafora (32) και οι συνεργάτες του, μελέτησαν τη μεταφορά εξωγενούς υλικού σε έμβρυα μυός, μετά από επώαση με σπερματοζωάρια. Έκτοτε, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε διάφορα είδη, ώσπου να διευκρινιστεί ο βασικός μοριακός μηχανισμός που διέπει αυτή την ιδιότητα των σπερματοζωαρίων και να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη βιοτεχνολογικών εφαρμογών για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών.

Τα εξωγενή μόρια νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) προσδένονται στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων, μεταφέρονται στο εσωτερικό τους και ένα μέρος τους ενσωματώνεται στο DNA των σπερματοζωαρίων. Η όλη διαδικασία δεν εκτελείται τυχαία, αλλά ελέγχεται από συγκεκριμένα πρωτεϊνικά μόρια. Τα εξωγενή μόρια DNA, προσδένονται επιλεκτικά στη μετακροσωμική ή στην ισημερινή περιοχή της κεφαλής των σπερματοζωαρίων. Στον άνθρωπο, συνδέονται στη μετακροσωμική περιοχή και στο τμήμα σύνδεσης μεταξύ της ουράς και της κεφαλής, ενώ στο μυ, συνδέονται στη μετακροσωμική και στην ισημερινή περιοχή της κεφαλής. Ο χρόνος πρόσδεσης είναι αρκετά μικρός και κυμαίνεται μεταξύ 20-40 λεπτών. Στον άνθρωπο, το μεγαλύτερο ποσοστό των σπερματοζωαρίων προσδένεται σε 20 λεπτά (33).

Η σύνδεση ελέγχεται από ιοντικές αλληλεπιδράσεις και επηρεάζεται από το συνολικό φορτίο του εξωγενούς μορίου. Μεγαλύτερου μήκους μόρια συνδέονται πιο αποτελεσματικά συγκριτικά με μικρότερου μήκους, πιθανώς λόγω της δημιουργίας περισσότερων ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Η πρόσδεση αφορά, πέρα από τα μόρια του DNA, και κάθε αρνητικά φορτισμένο μακρομόριο, ενώ είναι

αντιστρεπτή και ρυθμίζεται από την παρουσία κατάλληλων ιοντικών μακρομορίων. Τα αρνητικά φορτισμένα μακρομόρια, όπως η ηπαρίνη και η θειϊκή δεξτράνη, συνιστούν αποτελεσματικούς ανταγωνιστές, τα θετικά φορτισμένα μακρομόρια, όπως η πολύ-λυσίνη ευνοούν τη σύνδεση, ενώ τα μη φορτισμένα μακρομόρια δεν επηρεάζουν την πρόσδεση των μορίων DNA στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων (34). Στη διαδικασία της σύνδεσης μεσολαβούν ορισμένες πρωτεΐνες μεγέθους 30-35 kDA, οι οποίες εντοπίζονται στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων και λειτουργούν ως υποδοχείς των εξωγενών μορίων (35). Τα προϊόντα έκφρασης των γονιδίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (Major Histocompatibility Complex class II, MHC class II), ελέγχουν επίσης τη δεδομένη σύνδεση (36).

Η πρόσδεση αναστέλλεται από ένα γλυκοπρωτεϊνικό παράγοντα (Inhibitory Factor 1), ο οποίος εμπεριέχεται στο σπερματικό υγρό και συνδέεται ειδικά στους DNA πρωτεϊνικούς υποδοχείς της επιφάνειας των σπερματοζωαρίων. Συνεπώς, μόνο σπερματοζωάρια από την επιδιδυμίδα ή σπερματοζωάρια από εκσπερμάτιση, από τα οποία το σπερματικό υγρό απομακρύνεται με συνεχείς κατάλληλες πλύσεις, είναι ικανά να δεσμεύουν και να προσλαμβάνουν εξωγενή μόρια DNA. Η παρουσία του ανασταλτικού παράγοντα στο σπερματικό υγρό αποτελεί ενδεχομένως ένα προστατευτικό μηχανισμό δράσης ενάντια στην πρόσδεση των εξωγενών μορίων DNA, τα οποία συναντούν τα σπερματοζωάρια στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα. Ένα ακόμη μηχανισμό, αποτελεί η ενεργοποίηση των ενδονουκλεασών ως απόκριση στην ενσωμάτωση του εξωγενούς DNA, η οποία εξαρτάται από την ποσότητα του προσδεμένου DNA, προκαλεί αποικοδόμηση του εξωγενούς DNA και σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγεί τα σπερματοζωάρια σε θάνατο μέσω απόπτωσης (37).

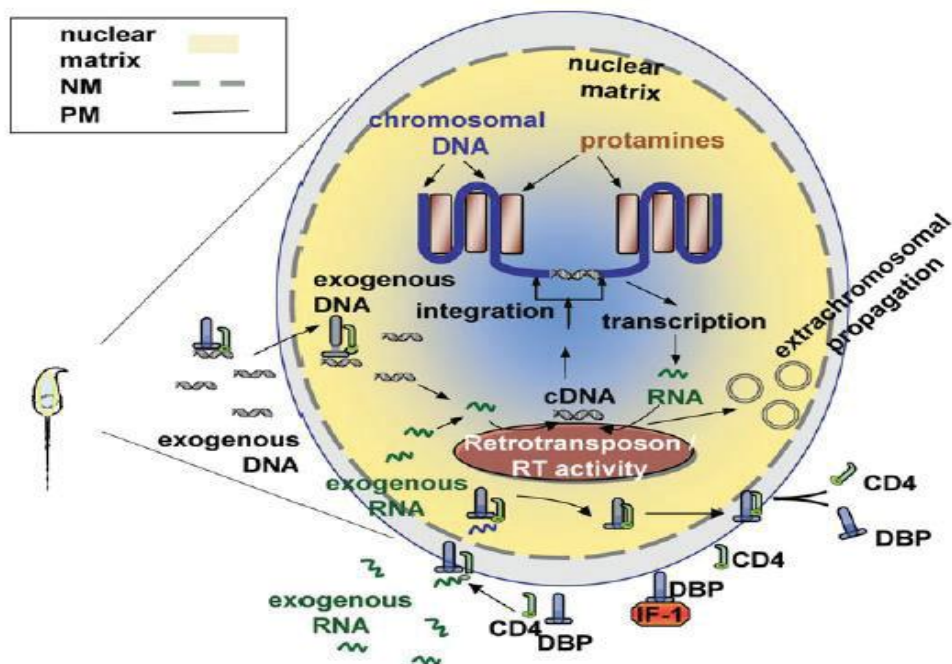
Μετά τη σύνδεση, ένα μικρό ποσοστό των εξωγενών μορίων DNA, συνήθως το 15-22%, μεταφέρεται στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων. Η είσοδος των εξωγενών μορίων ελέγχεται από τις πρωτεΐνες CD4, οι οποίες βρίσκονται στη κεφαλή των σπερματοζωαρίων. Η συνολική διαδικασία απαιτεί μικρό χρονικό διάστημα, ενώ στα σπερματοζωάρια από την επιδιδυμίδα του μυός ολοκληρώνεται σε μόλις 30 λεπτά (38). Την ενσωμάτωση ακολουθεί η δέσμευση των μορίων DNA στον πυρήνα

των σπερματοζωαρίων, η οποία είναι δυνατό να συνοδεύεται και από ενσωμάτωσή τους, μετά από γεγονότα ανασυνδυασμού, σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος των σπερματοζωαρίων (39).

Το γεγονός αυτό, υπέδειξε την ύπαρξη περιοχών στο γένωμα των σπερματοζωαρίων με λιγότερο συμπαγή δομή, που ευνοούν την ενσωμάτωση εξωγενών μορίων DNA. Μετέπειτα πειράματα απέδειξαν πως όντως ένα τμήμα του DNA των σπερματοζωαρίων διαθέτει νουκλεοσωμική δομή, δεν είναι πακεταρισμένο με πρωταμίνες και επομένως θεωρείται ευαίσθητο στη δράση των νουκλεασών. Το συγκεκριμένο τμήμα εντοπίζεται περιφερικά του πυρήνα, κοντά σε περιοχές πλούσιες σε μη μεθυλιωμένα ρετρομεταθετά στοιχεία, εκεί όπου ενδεχομένως πραγματοποιείται η ένθεση, η οποία επιτελείται με τη συμμετοχή των ρετρομεταθετών στοιχείων (40) και σχετίζεται με την έκφραση του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης. Μετά την είσοδό τους στα σπερματοζωάρια, τα εξωγενή μόρια DNA ή RNA υπόκεινται πρωτίστως σε ένα στάδιο ανάστροφης μεταγραφής, και στη συνέχεια ένα μέρος τους δύναται είτε να ενσωματωθεί στο DNA των σπερματοζωαρίων, είτε να παραμένει ως εξωχρωμοσωμική δομή.

Για να είναι επιτυχής η εφαρμογή της τεχνικής SMGT, πρέπει να επιτευχθεί η δέσμευση των εξωγενών μορίων DNA στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων, η μεταφορά τους στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων και κατόπιν η ενσωμάτωσή τους στο γενετικό υλικό των σπερματοζωαρίων. Η επιτυχία της τεχνικής εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο επώασης κατά την εφαρμογή της. Η απλή επώαση των σπερματοζωαρίων με τα εξωγενή μόρια DNA, συνήθως οδηγεί σε μικρό ποσοστό ενσωμάτωσης. Η εφαρμογή βελτιωμένων πρωτοκόλλων επιτυγχάνει βελτιωμένα ποσοστά, μέσω α. του συνδυασμού της τεχνικής Sperm Mediated Gene Transfer και της τεχνικής Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), όπου η αρχική επώαση των σπερματοζωαρίων με τα εξωγενή μόρια DNA ακολουθείται από μικροένεση του σπερματοζωαρίου στο εσωτερικό του ωαρίου (41), (42), β. της τεχνικής Restriction Enzyme Mediated Integration (REMI), η οποία ενισχύει την ενσωμάτωση των εξωγενών μορίων DNA στο DNA των σπερματοζωαρίων μέσω της μετατροπής των κυκλικών πλασμιδιακών φορέων σε γραμμικά μόρια με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και της επακόλουθης επιμόλυνσης των γραμμικών φορέων

και των περιοριστικών ενζύμων με λιποσώματα (43), (44), (45), γ. της τεχνικής Linker-Based Membrane Transgenesis (LMT), όπου η επώαση των σπερματοζωαρίων με αντισώματα, ειδικά προς τους υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης, διευκολύνει την πρόσδεση και τη μεταφορά των εξωγενών μορίων στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων (46).



Εικόνα 6: Μοντέλο ενσωμάτωσης εξωγενούς DNA και RNA στο γενετικό υλικό του σπερματοζωαρίου.

1.2. Ιός του Ανθρώπινου Θηλώματος

Οι ιοί του ανθρώπινου θηλώματος είναι δίκλωνοι, κυκλικοί, DNA ιοί, χωρίς εξωτερικό περίβλημα, με μέγεθος περίπου 8000 ζεύγη βάσεων και διάμετρο 50 ως 60 νανόμετρα. Οι ιοί HPV προσβάλλουν κυρίως τη βασική στοιβάδα του επιθηλίου και συνδέονται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων, ενώ προκαλούν μία σειρά βλαβών στον ξενιστή τους, οι οποίες εκτείνονται από κοινά θηλώματα μέχρι καρκίνο (47).

Οι ιοί HPV διακρίνονται βάσει του χαρακτηριστικού τροπισμού τους, στους δερματικούς ιούς και στους ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι δερματικοί τύποι προκαλούν καλοήγη δερματικά θηλώματα, ενώ οι τύποι που επιτίθενται στο επιθήλιο του βλεννογόνου οδηγούν σε αλλοιώσεις και αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και καρκίνου. Οι δερματοτρόποι HPV 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63, 65 απομονώνονται στα δερματικά και στα πελματιαία κονδυλώματα, ενώ οι βλεννογονοτρόποι HPV 6, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 44, 52, 55, 58, 67 εντοπίζονται σε καλοήθεις και κακοήθεις βλάβες της γεννητικής οδού, της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα (48).

Οι ιοί HPV, ανάλογα με τη σοβαρότητα και την έκταση της βλάβης, κατηγοριοποιούνται στην ομάδα υψηλού κινδύνου, τα μέλη της οποίας συνδέονται με το διηθητικό καρκίνο του γεννητικού συστήματος και στην ομάδα χαμηλού κινδύνου, τα μέλη της οποίας σχετίζονται με τη δημιουργία των θηλωμάτων, ενώ συναντώνται σπανίως στον καρκίνο (48).

1.2.1. Δομή του Ιού HPV

1.2.1.1. Ίικό Καψίδιο και Ίικό Γονιδίωμα

Στο ιικό καψίδιο, οι κυτταρικές ιστόνες συμπυκνώνουν το γονιδίωμα του ιού HPV σε ένα δίκλωνο κυκλικό DNA χρωμόσωμα.

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 περικλείει το ιικό σωματίο, ενώ συνεισφέρει καθοριστικά στην αλληλεπίδραση του ιού HPV με τον ξενιστή του και στην αναγνώριση των ιικών σωματίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου (49), (50).

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 τοποθετείται κεντρικά του σκελετού της πρωτεΐνης L1, μέσω μίας υδρόφοβης περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο της (51), ενώ αποσπάται από το καψίδιο κατά την πρόσβαση του ιού HPV στο κύτταρο (52), (53). Συμμετέχει στο πακετάρισμα του ιικού DNA στα νεοσχηματιζόμενα ιικά καψίδια, παρεμβαίνει στις αλλαγές της διαμόρφωσης των ιικών σωματίων κατά την πρόσδεσή τους στο κύτταρο ξενιστή και συμβάλλει στην καταστροφή των ενδοσωμικών μεμβρανών για την απελευθέρωσή τους (54), (55), (56), (57).

Το ιικό σωματίο σχηματίζει T=7 εικοσαεδρικά καψίδια (58). Η δομική μονάδα T=1 περιλαμβάνει δώδεκα πενταμερή L1 (59). Κάθε πενταμερές L1 περιέχει πέντε θηλιές, που μοιάζουν με πλαϊνές προεξοχές και διαθέτουν 100 C-τελικά άκρα. Κάθε προεξέχουσα θηλιά αποτελείται από μία α-έλικα αγκιστρωμένη στο δομικό πυρήνα του πενταμερούς L1 μέσω δύο ελίκων, της έλικας 2 και της έλικας 3. Τα πενταμερή L1 συνδέονται με υδρόφοβους δεσμούς μέσω της έλικας 4 του ενός πενταμερούς και των ελίκων 2 και 3 του γειτονικού πενταμερούς. Τα υπόλοιπα C-τελικά άκρα επιστρέφουν στον πυρήνα της πρωτεΐνης L1, συνθέτοντας την έλικα 5 (60).





Εικόνα 7: Το ιικό καψίδιο.

Η οργάνωση του ιϊκού γονιδιώματος είναι σχετικά συντηρημένη. Το γονιδίωμα του ιού HPV περιλαμβάνει 6 μη δομικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 και δύο δομικά γονίδια L1, L2, εμπλεκόμενα σε διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής. Τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζουν έναν επιπλέον αριθμό προϊόντων λόγω του ματίσματος του ιϊκού mRNA (61). Το γονιδίωμα του ιού HPV περιέχει οκτώ ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης.

Το ιϊκό γονιδίωμα διαχωρίζεται βάσει των λειτουργικών του δραστηριοτήτων, στην πρώιμη περιοχή E (early region), στην όψιμη περιοχή L (late region) και στη ρυθμιστική περιοχή LCR (long control region). Η πρώιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρώιμες ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7, που επηρεάζουν την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη μετάφραση του DNA του ιού HPV. Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες L1 και L2, που σχηματίζουν το ιϊκό καψίδιο (62). Η ρυθμιστική περιοχή LCR, μεγέθους 850 bp, συναντάται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και της αρχής του γονιδίου E6. Η αλληλουχία της δεν περιέχει ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, περιλαμβάνει όμως τη θέση έναρξης της αντιγραφής και τις θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, απαραίτητων για την έκφραση των ιϊκών γονιδίων (63).

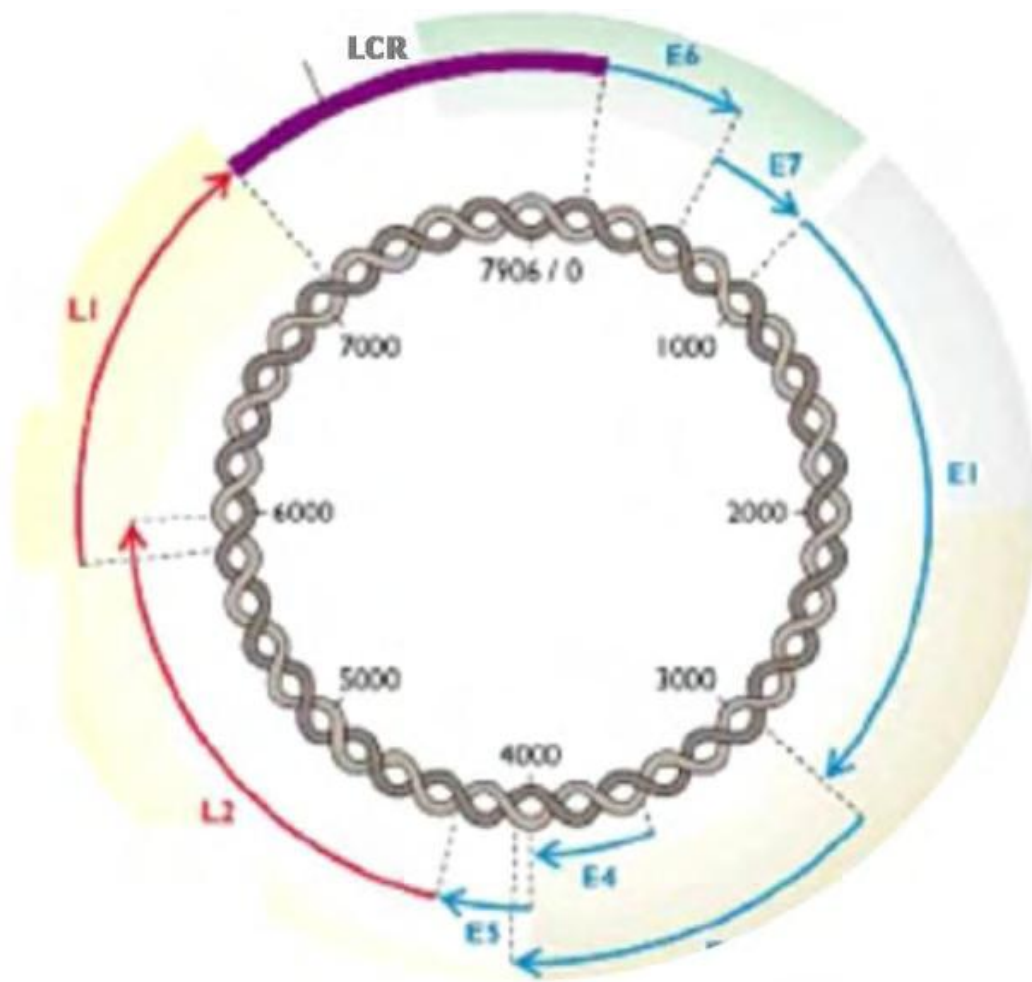
Η έκφραση του γονιδιώματος του ιού HPV καθορίζεται από δύο βασικούς υποκινητές, τον υποκινητή PE (p97), που τοποθετείται στην περιοχή LCR και συντονίζει την έκφραση των πρώιμων γονιδίων και τον υποκινητή PL (p670), που εντοπίζεται στο γονίδιο E7 και ρυθμίζει την έκφραση των όψιμων γονιδίων (64), (65). Οι θέσεις 97 και 670 αποτελούν την 5' καλύπτρα των ιικών μεταγράφων.

Το γονιδίωμα του ιού HPV εμφανίζεται ως επίσωμα, ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Το ιικό γονιδίωμα αντιγράφεται στη φάση S με συχνότητα μία φορά ανά κυτταρικό κύκλο, εξασφαλίζοντας τη σταθεροποίηση της μόλυνσης στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας (66). Η ενσωμάτωση του ιού HPV εκτελείται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επιδιόρθωσης των ασταθών χρωμοσωμικά κυττάρων (67), (68).

Η ρήξη του ιικού γονιδιώματος πραγματοποιείται συνήθως στο 3' άκρο του ιικού DNA. Η ρυθμιστική περιοχή LCR και τα ογκογονίδια E6 και E7 διατηρούνται ακέραια, σε αντίθεση με τα γονίδια E1 και E2 (69), (70), (71), (72), (73) και τα γονίδια L1 και L2 (74), (75), (76). Η ρήξη των πρώιμων γονιδίων E1 και E2 οδηγεί στην απορύθμιση του ελέγχου αντιγραφής των επισωμικών αντιγράφων του ιού HPV, καθώς αναστέλλεται η ελικάση E1 και στη σταθεροποίηση της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7, εφόσον παρεμποδίζεται ο καταστολέας E2 του πρώιμου υποκινητή (77), (78), (79). Η συνολική αποδιοργάνωση επιδρά σταδιακά στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και στην προώθηση γενετικών λαθών στο γονιδίωμα του ξενιστή (80), (81).

Η εμμένουσα λοίμωξη κυρίως από υψηλού κινδύνου τύπους HPV συντελεί πιθανώς στην ενσωμάτωση του ιού HPV στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (82), (83), (84), (85), (86), (87), (88), (89). Τα μετάγραφα των ενσωματωμένων ογκογονιδίων περιλαμβάνουν κυτταρικές αλληλουχίες, ενώ διαθέτουν επιπλέον σταθερότητα και χρόνο ζωής στο κυτταρόπλασμα, σε σύγκριση με τα μετάγραφα των επισωμάτων. (90). Έτσι, ο ιός HPV διεγείρει έντονα τον κυτταρικό κύκλο και προωθεί τη διαρκή μετάβαση του κυττάρου στη φάση της μίτωσης, παρέχοντας στα μολυσμένα κύτταρα ένα ισχυρό αναπτυξιακό πλεονέκτημα (91). Ο συνεχής πολλαπλασιασμός των προσβεβλημένων κυττάρων προκαλεί τη συσσώρευση γενετικών λαθών και την

αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος του ξενιστή, οδηγώντας τελικά στην εμφάνιση ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων και καρκίνου (92).



Εικόνα 8: Το ιικό γονιδίωμα.

1.2.1.2. Ίικές Ογκοπρωτεΐνες E6 και E7

Η ιϊκή ογκοπρωτεΐνη E6 αποτελείται από 150 αμινοξέα με μοριακό βάρος 16-18 kDa και περιλαμβάνει τέσσερις περιοχές επαφής του ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Το συγκεκριμένο συντηρημένο χαρακτηριστικό σχετίζεται με το μετασχηματισμό των κυττάρων. Η πρωτεΐνη E6 των τύπων HPV υψηλού κινδύνου, περιέχει στο C-τελικό άκρο της ένα τομέα πρόσδεσης PSD-95/Dlg/ZO1 (PDZ), ο οποίος συμμετέχει στη σύνδεσή της με τις κυτταρικές πρωτεΐνες (93), (94).

Η ιϊκή πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με την πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη p53, η οποία ελέγχει την έκφραση παραγόντων, εμπλεκόμενων στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Σε περίπτωση βλάβης του DNA του κυττάρου, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 διεγείρεται και επάγει την έκφραση του αναστολέα της κινάσης της κυκλίνης p21, ο οποίος καταστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, κατευθύνοντας το κύτταρο, είτε στην επιδιόρθωση, είτε στην απόπτωση. Σε ό,τι αφορά τον ιό HPV, η πρωτεΐνη E6 προσδέεται μαζί με την ουβικουιτινική λιγάση E6AP στην πρωτεΐνη p53 και ο σχηματισμός του καθορισμένου συμπλόκου οδηγεί στην ουβικουιτινίωση και στην αποδόμηση της πρωτεΐνης p53 στο πρωτεάσωμα 26S. Η πρωτεΐνη E6 συνδέεται και με το συνενεργοποιητή p300/CBP της πρωτεΐνης p53, παρεμποδίζοντας τη δράση της (95). Η λειτουργία της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 επηρεάζεται, τόσο από υψηλού, όσο και από χαμηλού κινδύνου τύπους HPV, ωστόσο μονάχα οι τύποι υψηλού κινδύνου επιφέρουν τη συνολική αποικοδόμησή της (96), (97), (98).

Η ιϊκή πρωτεΐνη E6 παρεμβαίνει στη δημιουργία αθάνατων κυττάρων, κινητοποιώντας συνδυαστικά μέσω του γονιδίου c-myc και του μεταγραφικού παράγοντα Sp1, την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hTERT. Η πρωτεΐνη E6 προωθεί τη συνεχή, εκτεταμένη έκφραση της τελομεράσης hTERT, συμβάλλοντας στη διατήρηση ενισχυμένων τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση και συντελώντας συνεπώς στην αποτροπή της κυτταρικής γήρανσης και στην αθανатоποίηση των κυττάρων (99).

Η ιϊκή ογκοπρωτεΐνη E7 αποτελείται από 100 αμινοξέα και περιλαμβάνει τις διατηρημένες περιοχές CR1, CR2 και CR3, οι οποίες σχετίζονται με την ιϊκή παθογένεια και την αθανатоποίηση των κυττάρων. Η CR1 περιέχει το N-τελικό άκρο, το οποίο συμμετέχει στον κυτταρικό μετασχηματισμό και στην αποδόμηση της πρωτεΐνης pRB, η CR2 διαθέτει ένα συντηρημένο μοτίβο LXCXE και μία θέση φωσφορυλίωσης της κινάσης καζεΐνης CKII και η CR3 περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, συμβάλλει στο διμερισμό της πρωτεΐνης E7 και συντελεί στη σύνδεσή της με την πρωτεΐνη pRb και τις κυτταρικές πρωτεΐνες (100). Η πρωτεΐνη E7 των τύπων HPV υψηλού κινδύνου συμμετέχει στην ενίσχυση των κεντρομερών στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου, συντελώντας καθοριστικά στην πρόκληση γενωμικής αστάθειας (101), (102).

Η ιϊκή πρωτεΐνη E7 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRb, η οποία συντονίζει την πορεία του κυτταρικού κύκλου (103), (104). Η αποφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη pRb συμπλοκοποιείται με το μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος επιδρά στην έκφραση γονιδίων σχετικών με την προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S και με την προαγωγή του κυττάρου στην απόπτωση. Κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S, η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη pRb αποσπάται από το μεταγραφικό παράγοντα E2F, επιφέροντας τη μεταγραφή γονιδίων εμπλεκόμενων στην αντιγραφή του DNA. Σε ό,τι αφορά τον ιό HPV, η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με την πρωτεΐνη pRb, οδηγώντας στην αποικοδόμηση της μέσω του μονοπατιού του ουβικουιτινικού πρωτεασώματος (105), (106). Η πρόσδεση της πρωτεΐνης E7 στην πρωτεΐνη pRb απορρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

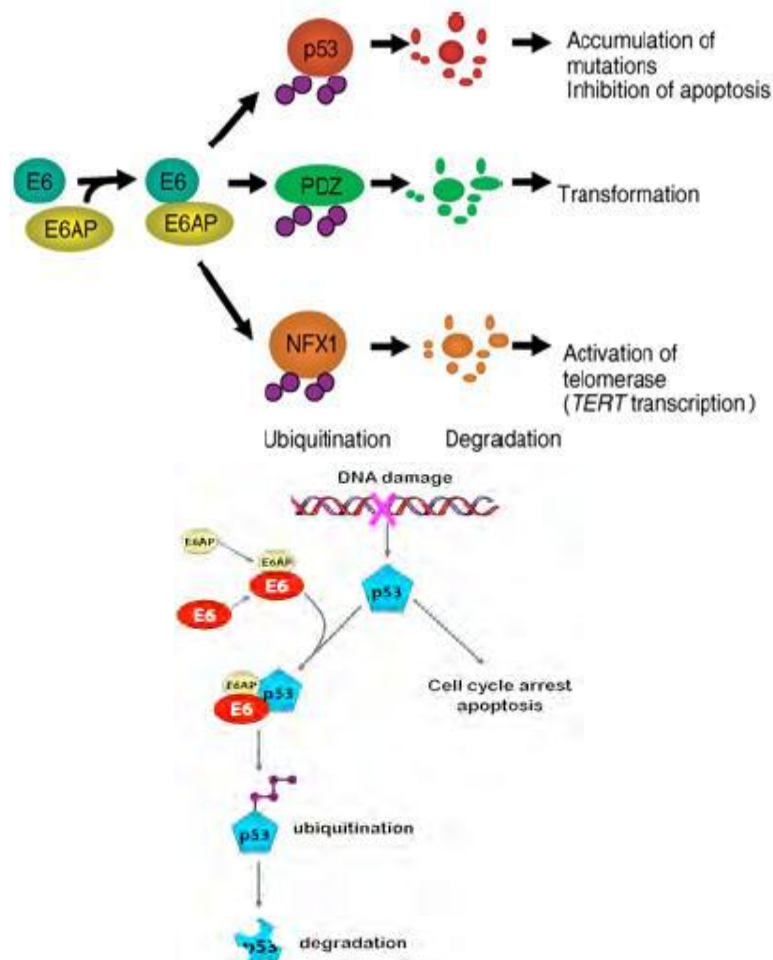
Η πρωτεΐνη E7 προσδένεται στις κυκλίνες A και E και στους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21 και p27. Ενισχύει τα επίπεδα των κυκλινών A και E και μπλοκάρει τη δράση των κινασών p21 και p27, επάγοντας τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb και κατ' επέκταση την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (107), (108).

Η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις απακετυλάσες των ιστονών HDACs, οι οποίες εκφράζονται σε όλους τους ιστούς, μετακινώντας τις ακετυλομάδες από τις ιστόνες.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη pRb προσεγγίζει τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές E2F. Η πρωτεΐνη E7 παρεμποδίζει τη δημιουργία του συμπλόκου pRb-HDACs, παρεμβαίνει στην απακετυλίωση του υποκινητή E2F και διακόπτει τη δράση του, απορυθμίζοντας τον έλεγχο σύνθεσης των HDACs και πυροδοτώντας εκτεταμένη αντιγραφή του ιού HPV (109).

Οι ιϊκές ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 δεν επικουρούν ουσιαστικά τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, αλλά διεγείρουν διαρκώς τον κύκλο των κυττάρων της μεσαίας επιθηλιακής στοιβάδας, ενισχύοντας έτσι το γονιδίωμα του ιού HPV.

Τα ογκογονίδια E6 και E7 προωθούνται από την πρωτεΐνη E5, εντείνοντας την αθανατοποίηση (110) και προάγοντας την ικανότητα διήθησης των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων (111), (112).



Εικόνα 9: Ο ρόλος της ιϊκής ογκοπρωτεΐνης E6 του ιού HPV.

1.2.2. Κύκλος Ζωής του Ιού HPV

Ο κύκλος ζωής του ιού HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή.

Τα ιϊκά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς λόγω μικροτραυματισμών. Ο ιός HPV συνδέεται με τον υποδοχέα θειϊκής ηπαρίνης και εισβάλλει στα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στοιβάδας (113). Η θειϊκή ηπαρίνη αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών και εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο. Ο ιός HPV προσδένεται και στον υποδοχέα A6-ιντεγκρίνης (114). Η λαμινίνη-5 λειτουργεί επίσης ως υποδοχέας του ιού στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (115).

Ο ιός HPV εισέρχεται στο κύτταρο ξενιστή με ενδοκυττάρωση σε κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης (116). Τα ιϊκά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα και στα λυσοσώματα. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 μεταφέρει το ιϊκό DNA στον πυρήνα, ενώ η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 αποδομείται (117), (118).

Ο ιός HPV αντιγράφει το γονιδίωμά του σε ξεχωριστές περιόδους κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του. Η πρώτη φάση διεξάγεται στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας. Το ιϊκό γονιδίωμα ενισχύεται εκτεταμένα παράγοντας περίπου 200 ιϊκά αντίγραφα ανά κύτταρο (119), ενώ παραμένει στον πυρήνα ως επίσωμα. Ο πολλαπλασιασμός του ιϊκού γονιδιώματος εκτελείται κατά τη διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στη φάση S. Το ιϊκό DNA αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα, ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Το ιϊκό γονιδίωμα σταθεροποιείται (120), (121), (122). Η τελευταία φάση διεξάγεται στα προσβεβλημένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Η παρατεταμένη έξαρση της αντιγραφικής δραστηριότητας οδηγεί στη σύνθεση του ιϊκού DNA των νέων μολυσματικών ιϊκών σωματίων (123).

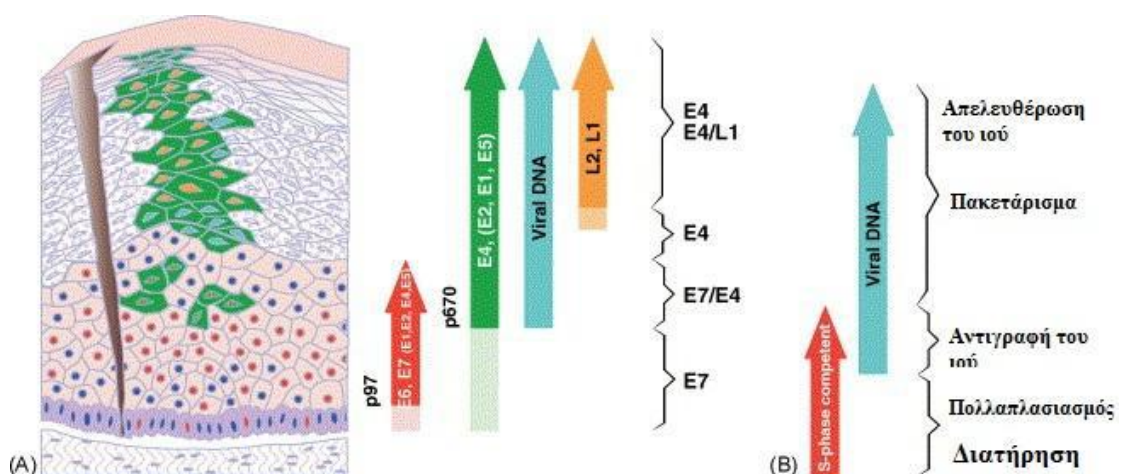
Στα αδιαφοροποίητα ή ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, ο πρώιμος μεταγραφικός υποκινητής p97 ρυθμίζει την έκφραση των έξι ρυθμιστικών γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6 και E7, εγκαθιδρύοντας τη μόλυνση και εδραιώνοντας την αντιγραφή του DNA κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο (20).

Στα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, ο όψιμος μεταγραφικός υποκινητής p670 ελέγχεται από τους κυτταρικούς παράγοντες ή από τα διαφορετικά επίπεδα της μεθυλίωσης της ρυθμιστικής περιοχής LCR και συντονίζει την έκφραση των γονιδίων E1 και E2, ενισχύοντας το DNA του ιού HPV στη φάση της διαφοροποίησης των κυττάρων (23). Ο όψιμος μεταγραφικός υποκινητής ρυθμίζει την έκφραση των δύο δομικών γονιδίων L1 και L2, συμμετέχοντας στο σχηματισμό του ιϊκού καψιδίου και στο πακετάρισμα του ιϊκού γονιδιώματος στα νέα ιϊκά σωματίδια κατά την έξοδο του ιού από το κύτταρο (124).

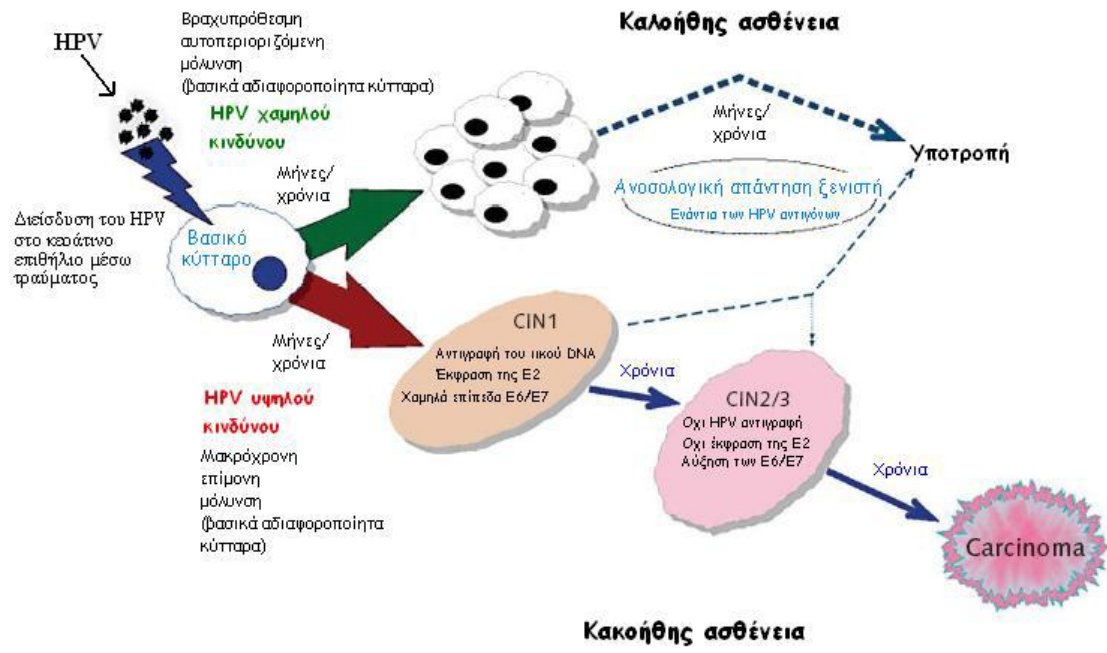
Η τοποθέτηση των αντιγράφων του ιϊκού γονιδιώματος στα νεοσχηματιζόμενα καψίδια υλοποιείται με τη συμβολή της πρωτεΐνης E2. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιϊκών σωματίων πραγματοποιείται με τη συνεισφορά των πρωτεϊνών L1 και L2, ενώ η ωρίμανσή τους εκτελείται καθώς τα μολυσμένα κύτταρα ανέρχονται στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα.

Τα νέα ιϊκά σωματίδια απελευθερώνονται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα της κυτταρικής επιφάνειας. Η πρωτεΐνη E1^{E4}, η οποία συντίθεται στις ανώτερες επιθηλιακές στοιβάδες κατά την όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού HPV (125), αλληλεπιδρά με το δίκτυο των ινιδίων κερατίνης στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, επάγοντας την καταστροφή του (126), (127).

Ο ιός HPV εξέρχεται από το κύτταρο ξενιστή, ενώ δεν προκαλεί λύση των προσβεβλημένων κερατινοκυττάρων (128).



Εικόνα 10: Η πορεία του κύκλου ζωής του ιού HPV.



1.3. Επιδημιολογία

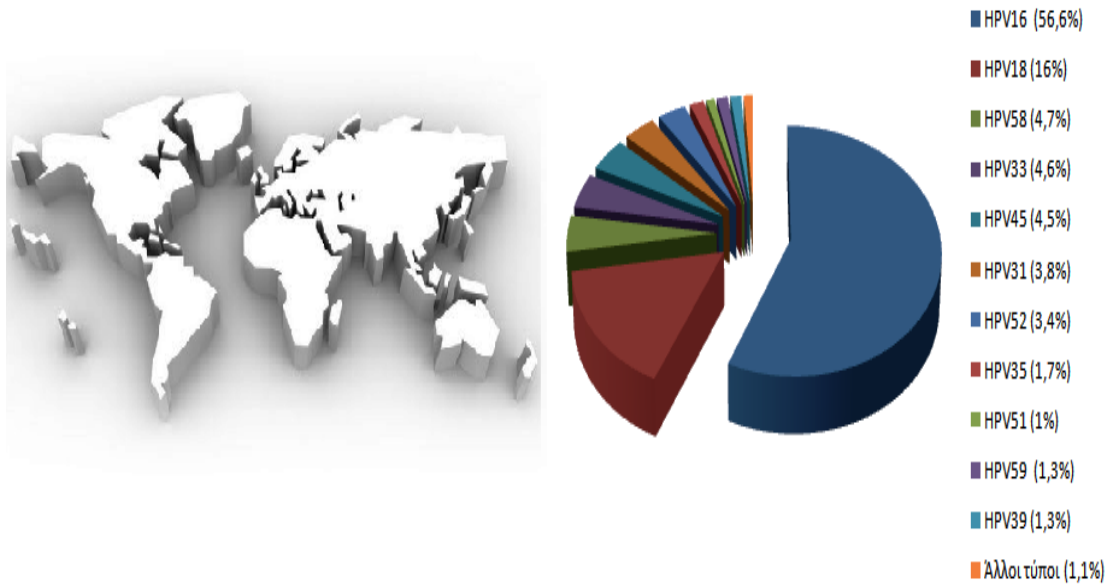
Ο επιπολασμός του ιού HPV παγκοσμίως τοποθετείται σε αξιοσημείωτο ποσοστό, παρά την αδειοδότηση των HPV εμβολίων σε αρκετές χώρες του κόσμου (129), (130). Η συνεχιζόμενη επικράτηση του ιού αποδίδεται συχνά και στους ασυνεπείς ρυθμούς του εμβολιασμού (131), (132).

Ο ιός HPV μεταδίδεται κυρίως μολύνοντας τα επιθηλιακά κύτταρα στο βλεννογόνο του γεννητικού συστήματος ή το δέρμα (133), (134) και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου (135). Αν και η συμμετοχή των ιών HPV υψηλού κινδύνου στην κακοήθη εξέλιξη της νόσου του τραχήλου της μήτρας είναι ευρέως γνωστή εδώ και χρόνια (136), πλέον (137) οι ιοί HPV υψηλού κινδύνου σχετίζονται επίσης με καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου (138), (139) του στοματοφάρυγγα, (140), του πνεύμονα (141), (142) και της ουροδόχου κύστης (143). Οι σεξουαλικά ενεργοί ενήλικες προσβάλλονται από τον ιό στη διάρκεια της ζωής τους (144), σε οποιαδήποτε ηλικία (145).

Στην Ευρώπη, ο επιπολασμός της HPV λοίμωξης στο γυναικείο πληθυσμό υπολογίζεται γύρω στο 8,8%. Τα ποσοστά κορυφώνονται στις γυναίκες ηλικίας κάτω των 30 ετών, καθώς και στις γυναίκες ηλικίας 55 έως 64 ετών (146), ενώ ο κίνδυνος προσβολής από τον ιό ενισχύεται αναλογικά με τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων (147), (148). Στις γυναίκες, τα δεδομένα σχετικά με την κάθαρση των ιών HPV υψηλού κινδύνου, επισημαίνουν πως περίπου το 50% των ασθενών δεν παρουσιάζουν πλέον στοιχεία μόλυνσης σε 6 μήνες, ενώ το ποσοστό προσεγγίζει το 90% σε 3 χρόνια (149).

Η HPV λοίμωξη στους άνδρες σχετίζεται με τα γεννητικά κονδυλώματα, τους καρκίνους του πρωκτού και του πέους, τα καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου και την υποτροπιάζουσα αναπνευστική θηλωμάτωση. Υψηλός επιπολασμός του ιού HPV, κυμαινόμενος μεταξύ 50 και 70%, περιγράφεται στο πέος, στο σπέρμα, καθώς και σε περιοχές του πρωκτού. Ο επιπολασμός της μόλυνσης στους άνδρες δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ηλικιακών ομάδων,

όπως συμβαίνει στις γυναίκες, η πιθανότητα απόκτησης ιών HPV χαμηλού κινδύνου φαίνεται παραπλήσια της πιθανότητας απόκτησης ιών HPV υψηλού κινδύνου (47,9% για HR έναντι 46,6% για LR) και η μέση κάθαρση εκτιμάται σε 5,9 μήνες (95% CI: 5,7-6,1) (150).



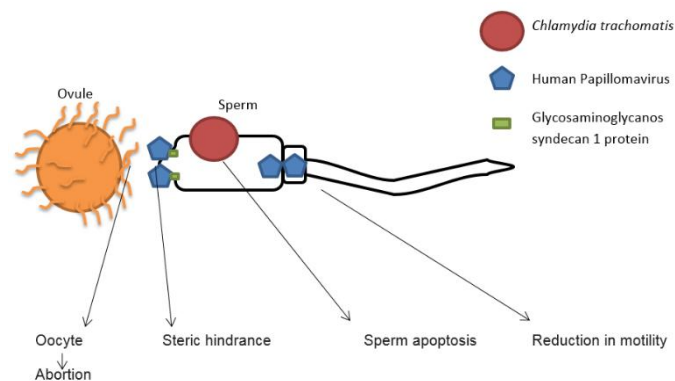
Εικόνα 11: Η κατανομή των στελεχών HPV στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως.

1.4. Ιός HPV και Υπογονιμότητα

Οι σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις, οι οποίες προκαλούνται από μικρόβια ή βακτήρια, οδηγούν συχνά σε μεταβολές της γονιμότητας ή ακόμη και σε υπογονιμότητα (151). Οι αναπαραγωγικές αλλαγές συνδέονται και με τους σεξουαλικά μεταδιδόμενους ιούς, συμπεριλαμβανομένου του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας HIV, του κυτταρομεγαλοϊού CMV και του ιού του απλού έρπητα HSV 1, HSV 2 (152), (153). Πρόσφατα, ο ιός του ανθρώπινου θηλώματος HPV προτείνεται επίσης ως παράγοντας τροποποίησης της γονιμότητας (154). Η HPV λοίμωξη επάγει κυρίως δύο διαφορετικά μονοπάτια: μία μολυσματική οδό παραγωγής ιοσωματίων, η οποία εμπλέκεται πιθανώς στη μεταβολή της γονιμότητας (155) και μία μη μολυσματική οδό πρόκλησης καρκίνου. Ωστόσο, ο ρόλος του ιού HPV ως άμεση αιτία υπογονιμότητας παραμένει ακόμη αβέβαιος (156).

1.5. Ιός HPV και Σπερματοζώαριο

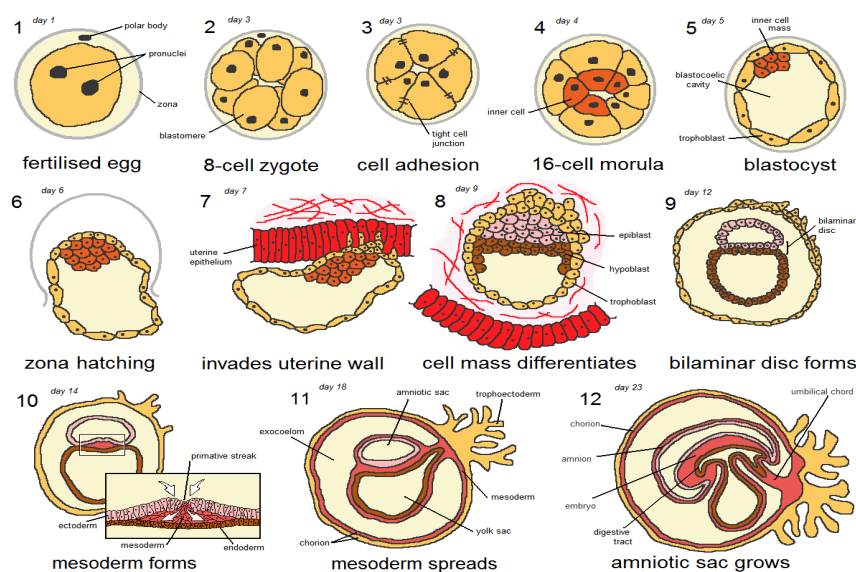
Στους άνδρες, οι HPV λοιμώξεις προκαλούν συχνά τη μόλυνση του σπέρματος (157), (158), (159). Η παρουσία του DNA και του RNA του ιού HPV εντοπίζεται στο πέος, στην ουρήθρα, στην επιδιδυμίδα και στους όρχεις (160), (161). Σε άνδρες, με γυναίκες συντρόφους προσβεβλημένες από τον ιό HPV, το DNA του ιού HPV ανιχνεύθηκε στο σπέρμα του 23,4% των ανδρών (162). Ο ιός HPV δεσμεύεται πιθανώς σε δύο διαφορετικές θέσεις στην ισημερινή περιοχή της κεφαλής του σπερματοζωαρίου (163), (164). Η παρουσία των γλυκοζαμινογλυκανών ή άλλων διαλυτών παραγόντων στην επιφάνεια του σπερματοζωαρίου μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση και στη σύνδεση ανάμεσα στον ιό και στα κύτταρα του σπέρματος (165), ενώ η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 του ιού HPV και η συνδεκάνη-1 της γλυκοζαμινογλυκάνης συσσωματώνονται ενδεχομένως στην ισημερινή περιοχή της κεφαλής του σπερματοζωαρίου (166).



Εικόνα 12: Ο εντοπισμός του ιού HPV στο σπερματοζώαριο.

1.6. Ιός HPV και Εμβρυογένεση

Το σπέρμα μεταφέρει το εξωγενές DNA του ιού HPV και δρα ενδεχομένως ως φορέας μετάδοσης του ιού HPV στους σεξουαλικούς συντρόφους και στο έμβρυο μέσω των γονιμοποιημένων ωοκυττάρων (167), (168), (169), (170). Σε μοντέλα ποντικών, το HPV προσβεβλημένο σπέρμα γονιμοποιεί επιτυχώς τα ωοκύτταρα (171), ενώ ακολουθεί η γονιδιακή έκφρασή του ιού HPV στην εσωτερική κυτταρική μάζα και στο τροφοεξώδερμα των πρώιμων βλαστοκύστεων (172). Η δοκιμασία διείσδυσης HEPT (hamster egg penetration test), αποδεικνύει παρομοίως πως το ανθρώπινο σπέρμα μεταφέρει στα ωοκύτταρα τη μεγάλη καψιδιακή πρωτεΐνη L1 και τα γονίδια E6/E7, τα οποία εκφράζονται στις αναπτυσσόμενες βλαστοκύστες. Ακολούθως, σημειώνεται ενισχυμένος κατακερματισμός του DNA και τροφοβλαστικός θάνατος στις βλαστοκύστες (173), (174), (175). Τα ευρήματα αφορούν κυρίως το στέλεχος HPV 16 (174), (175). Το ποσοστό της HPV σχετιζόμενης τροφοβλαστικής απόπτωσης συνδέεται πιθανώς με την ανάπτυξη του εμβρύου, καθώς, το ποσοστό απόπτωσης θεωρείται 3 φορές και 5,8 φορές υψηλότερο σε τρεις και σε δώδεκα ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, αντίστοιχα (176). Φυσικά, τα προαναφερθέντα ευρήματα βασίζονται κυρίως σε *in vitro* πειράματα σε μοντέλα ποντικού και δεν αντανakλούν απαραίτητως *in vivo* καταστάσεις σε ανθρώπους.



Εικόνα 13: Η διαδικασία της εμβρυογένεσης.

1.7. Ιός HPV και Κύηση

Ο ιός HPV, εκτός από την τροφοβλαστική ανάπτυξη, περιορίζει και την ενδομήτρια εμφύτευση των τροφοβλαστικών κυττάρων, ενισχύοντας έτσι τον κίνδυνο αποβολής (177), (178), (179). Σε ασθενείς με αποβολές, το DNA των ιών HPV 16 και 18 ανιχνεύθηκε στο 7,4% των ελεγχθέντων εμβρύων (180). Συγκρίνοντας πρώιμες αποβολές με εκούσιους τερματισμούς της κύησης, οι αλληλουχίες E6/E7 του ιού HPV ανιχνεύθηκαν στο 60% σε σύγκριση με το 20%, αντίστοιχα (181). Το DNA του ιού HPV εντοπίζεται πιο συχνά στις αυθόρμητες αποβολές σε σχέση με τις εκούσιες αμβλώσεις, οδηγώντας στην άποψη πως ίσως ο ιός HPV εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της πρώιμης απώλειας της κύησης (181). Στην εγκυμοσύνη, η έκθεση στους ιούς HPV 6, 11, 16 ή 18 σχετίζεται με 2,2% εμφάνιση γενετικών ανωμαλιών και με 1,5% κίνδυνο εμβρυικού θανάτου (179). Τα ευρήματα ωστόσο, προκύπτουν από αναδρομικές ή συγχρονικές μελέτες με μικρά μεγέθη δείγματος, ενώ από αναδρομικές μελέτες μεγαλύτερων ομάδων καταδεικνύεται πως η HPV λοίμωξη στην εγκυμοσύνη δε συνεπάγεται απαραίτητα υψηλότερο κίνδυνο αποβολής (182), (183).

Σκοπός

Η λοίμωξη του γεννητικού συστήματος των γυναικών και των ανδρών από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων HPV αποτελεί τη συχνότερη σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσο ιογενούς αιτιολογίας στον κόσμο. Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη του ιού HPV ως παράγοντα υπογονιμότητας και συγκεκριμένα, η διερεύνηση της ενσωμάτωσης των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων σε σπερματοζωάρια μύος και της μεταφοράς τους σε έμβρυα μύος μέσω *in vitro* γονιμοποίησης.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Στην παρούσα μελέτη, η πειραματική πορεία περιελάμβανε:

1. τη διαμόλυνση των σπερματοζωαρίων με τους πλασμιδιακούς φορείς που έφεραν κλωνοποιημένο το πλήρες γένωμα των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων

Η μεταφορά εξωγενών μορίων DNA μέσω των σπερματοζωαρίων αποτελεί ευρέως εφαρμοζόμενη τεχνική στην παραγωγή διαγονιδιακών οργανισμών, λόγω της ικανότητας των σπερματοζωαρίων να προσδένουν και να μεταφέρουν στο εσωτερικό τους εξωγενή μόρια DNA, αυθόρμητα, γρήγορα και χωρίς τη χρήση ειδικών χημικών αντιδραστηρίων ή σύνθετων τεχνικών διαμόλυνσης.

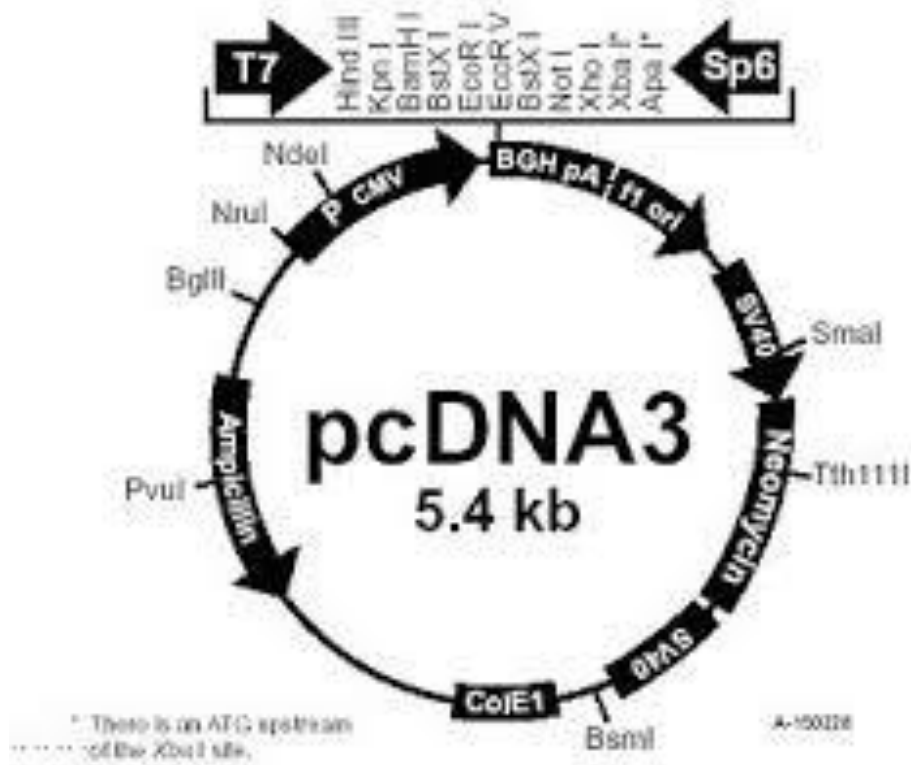
Στο πείραμα, εφαρμόσθηκε η τεχνική της μεταφοράς εξωγενούς DNA μέσω των σπερματοζωαρίων, κατά την οποία τα σπερματοζωάρια: α. απομονώθηκαν από την επιδιδυμίδα ώριμων και γόνιμων αρσενικών μυών του στελέχους FVB/N, β. επιλέχθηκαν εκείνα με τη μεγαλύτερη κινητικότητα, γ. διαμολύνθηκαν με τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 του ιού και δ. χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα *in vitro* γονιμοποίησης.

Το πλήρες γένωμα των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων βρισκόταν ενσωματωμένο σε πλασμιδιακούς φορείς (GFP-HPV16, GFP-HPV18 - ευγενική προσφορά του Vincent C. Lombardi, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Nevada, USA) και ήταν σημασμένο με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP. Με τα υπό μελέτη πλασμίδια, επομολύνθηκαν βακτηριακές κυτταρικές καλλιέργειες και απομονώθηκε επαρκής ποσότητα πλασμιδιακού φορέα.

2. την *in vitro* γονιμοποίηση των ωαρίων από τα διαμολυσμένα σπερματοζωάρια και τον έλεγχο της προεμφυτευτικής ανάπτυξης των εμβρύων

Για το πείραμα *in vitro* γονιμοποίησης, απομονώθηκε ικανοποιητικός αριθμός ώριμων ωαρίων από θηλυκές μύες του στελέχους FVB/N, μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση των ορμονών FSH (ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη) και hCG (ωχρινοτρόπος ορμόνη). Μετά το πέρας του πρωτοκόλλου διέγερσης, τα ωάρια συλλέχθηκαν από τον ωαγωγό των θηλυκών

μυών και την ίδια ημέρα τοποθετήθηκαν για γονιμοποίηση με τα διαμολυσμένα σπερματοζώαρια. Η *in vitro* γονιμοποίηση πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο και σε ιδανικές τιμές θερμοκρασίας, CO₂ και pH. Τα ποσοστά επιτυχούς γονιμοποίησης των ωαρίων εκτιμήθηκαν με την παρουσία του δεύτερου πολικού σωματίου και των δύο προπυρήνων. Η πορεία της *in vitro* προεμφυτευτικής ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων καταγραφόταν καθημερινά μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, για τον προσδιορισμό των εμβρύων καλής ή μη ποιότητας, βάσει συγκεκριμένου συστήματος βαθμολόγησης που περιέγραφε τον αριθμό των βλαστομεριδίων, τη δομή τους (συμμετρικά ή μη-συμμετρικά βλαστομερίδια) και το ποσοστό των κυτταροπλασματικών θραυσμάτων. Στα υπό μελέτη έμβρυα εξετάσθηκε η μεταφορά των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού από τα σπερματοζώαρια στα γονιμοποιημένα ωάρια μέσω της επιβεβαίωσης της έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, έπειτα από παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο.



Εικόνα 14: Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.

2.1. Πειραματόζωα

Στη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματόζωα αρσενικοί και θηλυκοί μύες του στελέχους FVB/N. Η προμήθεια των πειραματόζωων έγινε από το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Συνοδευτικά, εστάλη έντυπο αναφοράς της κατάστασης υγείας των πειραματόζωων, το οποίο βεβαίωνε πως διέθεταν πιστοποιητικό υγείας από το An Lab LTD και δεν ήταν μολυσματικά. Οι συνεχείς αναπαραγωγές του στελέχους υλοποιήθηκαν στην εγκατάσταση εκτροφής του τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο σχεδιασμός του πειράματος πληρούσε απαρέγκλιτα όλες τις προβλεπόμενες προϋποθέσεις αναφορικά με την ευζωία των πειραματόζωων, ενώ για την πραγματοποίησή του είχε χορηγηθεί έγκριση από τη Γενική Διεύθυνση Περιφερειακής Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Ηπείρου. Οι μύες είχαν ελεύθερη πρόσβαση στο νερό και ακολουθούσαν συγκεκριμένο πρότυπο διατροφής. Στο χώρο φύλαξης των μυών η φωτοπερίοδος διαρκούσε 12 ώρες. Οι αρσενικοί μύες χρησιμοποιήθηκαν σε ηλικία 10-12 εβδομάδων και οι θηλυκοί μύες σε ηλικία 6-8 εβδομάδων. Η θανάτωση των μυών εκτελούνταν με αυχενική εξάρθρωση.

2.2. Απομόνωση Σπερματοζωαρίων από Αρσενικούς Μύες

Η απομόνωση των σπερματοζωαρίων από τους γόνιμους αρσενικούς μύες πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα 3 έως 7 ημερών μετά την απομάκρυνσή τους από το χώρο του ζευγαρώματος με τις θηλυκές μύες. Από κάθε μυ αφαιρέθηκαν οι δύο επιδιδυμίδες των όρχεων και τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο (Sydney IVF Sperm Medium, COOK, Limerick, Ireland), το οποίο ήταν καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland). Ακολούθησε η διάτρηση του σημείου της ουράς της κάθε επιδιδυμίδας με σύριγγα ινσουλίνης και κατόπιν οι επιδιδυμίδες τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας, ώστε να απελευθερωθούν τα σπερματοζωάρια στο

καλλιεργητικό μέσο. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν τα καλύτερα κινητά σπερματοζωάρια με τη μέθοδο Swim Up και υπολογίσθηκε η συγκέντρωσή τους σε πλάκα Neubauer. Τα σπερματοζωάρια χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα in vitro γονιμοποίησης για τη μελέτη της παρουσίας του ιού στην πρώιμη ανάπτυξη των εμβρύων του μυός.

2.3. Υπολογισμός Συγκέντρωσης Σπερματοζωαρίων

Στη διαδικασία υπολογισμού της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων με την πλάκα Neubauer, χρησιμοποιήθηκε πρωτίστως μια μικρή ποσότητα σπέρματος (~6 μl) για τον προσδιορισμό του αριθμού των σπερματοζωαρίων ανά οπτικό πεδίο και για την αξιολόγηση της κατάλληλης αραιώσης. Στη συνέχεια, αφού εντοπίσθηκε η ιδανική αραιώση, το δείγμα αναδεύθηκε για περίπου 10 δευτερόλεπτα και σε κάθε θάλαμο της πλάκας Neubauer προστέθηκαν περίπου 10 μl από το δείγμα σπέρματος. Κατόπιν, η πλάκα αφέθηκε σε υγρό περιβάλλον για 10-15 λεπτά, ώστε τα σπερματοζωάρια να κατακαθίσουν στο πλέγμα του θαλάμου μέτρησης και αφού ορίσθηκε ο αριθμός των τετραγώνων προς μέτρηση, οι μετρήσεις και των δύο θαλάμων προστέθηκαν και διαιρέθηκαν με τον κατάλληλο συντελεστή. Υπολογίσθηκε επομένως η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων/ml και τελικά πολλαπλασιάσθηκε με τον ολικό όγκο του σπέρματος ώστε να προσδιορισθεί ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων στο δείγμα.

2.4. Επεξεργασία Σπέρματος

για την Ενσωμάτωση του Ιού στα Σπερματοζωάρια

Μετά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του σπέρματος, τα σπερματοζωάρια επώασθηκαν σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό (Sydney IVF Sperm Medium, COOK, Limerick, Ireland) με τους πλασμιδιακούς φορείς που έφεραν το πλήρες γένωμα των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων. Οι πλασμιδιακοί

φορείς επώασθηκαν με τα σπερματοζωάρια σε συγκέντρωση $50 \text{ ngr}/10^6$ σπερματοζωάρια για 5 ώρες σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37°C , $5\% \text{ CO}_2$). Ως ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκε η ομάδα των σπερματοζωαρίων όπου δεν επώασθηκαν με τα πλασμίδια. Ο έλεγχος της ενσωμάτωσης των στελεχών του ιού στα σπερματοζωάρια, πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής (FACS analysis).

για την In Vitro Γονιμοποίηση

Τα δείγματα σπέρματος που χρησιμοποιήθηκαν στην in vitro γονιμοποίηση χωρίσθηκαν σε επιμέρους μέρη ώστε να σχηματισθούν οι εξής ομάδες μελέτης: α. ομάδα ελέγχου β. ομάδα σπερματοζωαρίων επωασμένων με πλασμιδιακούς φορείς που έφεραν τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 του ιού. Τα σπερματοζωάρια μεταφέρθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο γονιμοποίησης (Sydney IVF Fertilization Medium, COOK, Limerick, Ireland), καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland) και τοποθετήθηκαν για 1 ώρα σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37°C , $5\% \text{ CO}_2$), ώστε να αποκτήσουν την ικανότητα γονιμοποίησης. Κατόπιν, οι πλασμιδιακοί φορείς προστέθηκαν στο καλλιεργητικό μέσο, σε συγκέντρωση $50 \text{ ngr}/10^6$ σπερματοζωάρια και επώασθηκαν με τα σπερματοζωάρια για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, τα σπερματοζωάρια τοποθετήθηκαν στα τρυβλία γονιμοποίησης (καλλιεργητικό μέσο Sydney IVF Fertilization Medium, COOK, Limerick, Ireland, καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland), σε συγκέντρωση 200 σπερματοζωάρια/μl. Τα τρυβλία προετοιμάσθηκαν και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο υγρής καλλιέργειας 14-16 ώρες πριν τη χρήση τους.

2.5. Απομόνωση Ωαρίων από Θηλυκές Μύες μετά από Πρόκληση Πολλαπλής Ωοθυλακιορρηξίας

Για την πολλαπλή ανάπτυξη των ωαρίων στις θηλυκές μύες χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη FSH (rec-FSH, Gonal-F, Merck Serono,

London, UK), σε ποσότητα 8IU. Για την ωρίμανση και την απελευθέρωση των ωαρίων χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 48 ώρες μετά την FSH, η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη hCG (hCG, Pregnyl, N.V. Organon, Oss, The Netherlands), σε ποσότητα 5IU. Τα ωάρια απομονώθηκαν από τον ωαγωγό των θηλυκών μυών 13 ώρες μετά τη χορήγηση της hCG σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο (Sydney IVF Follicle Flush Buffer & Fertilization Medium, COOK, Limerick, Ireland), το οποίο ήταν καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland).

2.6. In Vitro Γονιμοποίηση

Τα ωάρια τοποθετήθηκαν στα τρυβλία γονιμοποίησης και επώασθηκαν με τα σπερματοζωάρια σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο (Sydney IVF Fertilization Medium, COOK, Limerick, Ireland), καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland) σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37°C, 5% CO₂). 5 ώρες αργότερα, τα ωάρια καθαρίστηκαν σε κατάλληλο μέσο (Sydney IVF Fertilization Medium, COOK, Limerick, Ireland) για την απομάκρυνση της περίσσειας του σπέρματος και τοποθετήθηκαν σε νέο καλλιεργητικό μέσο ανάπτυξης, καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Cleavage Medium & Sydney IVF Blastocyst Medium, COOK, Limerick, Ireland, Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland), έως το στάδιο της βλαστοκύστης σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37 °C, 5% CO₂). Η επιτυχία της γονιμοποίησης ελέγχθηκε με την παρουσία του δεύτερου πολικού σωματίου και το σχηματισμό των δύο προπυρήνων. Η in vitro προεμφυτευτική ανάπτυξη των εμβρύων του μυός καταγραφόταν σε καθημερινή βάση. Τα τρυβλία προετοιμάσθηκαν και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο υγρής καλλιέργειας 14-16 ώρες πριν τη χρήση τους.



Εικόνα 15: Η διαδικασία της in vitro γονιμοποίησης.

2.7. Κυτταρομετρία Ροής

Τα σπερματοζωάρια, αφού επώασθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς, καθαρίστηκαν με PBS και αναλύθηκαν με ποσοτική κυτταρομετρία ροής. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10.000 σπερματοζωάρια ανά δείγμα σπέρματος και η ανάλυση των δεδομένων εκτελέστηκε με τη χρήση του λογισμικού CellQuest v.3.1. Ο προσδιορισμός του ποσοστού των θετικών στον ιό κυττάρων διενεργήθηκε με τη χρήση των κατανομών του φθορισμού, οι οποίες χαρακτηριζόταν από συγκεκριμένα όρια έντασης φθορισμού για τη διάκριση του θετικού από το αρνητικό σήμα. Σε κάθε ανάλυση, με βάση την κατανομή της έντασης του φθορισμού του δείγματος ελέγχου, τα όρια του φθορισμού τοποθετήθηκαν έτσι, ώστε το 99,6% των κυττάρων να συνιστά αρνητικές τιμές και το 0,4% ψευδώς θετικές τιμές. Η μετατόπιση της κατανομής του φθορισμού στα υπό μελέτη δείγματα πέρα από το όριο του 0,4% συνιστούσε θετικές τιμές. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων υπολογίστηκε με την αφαίρεση του ποσοστού των ψευδώς θετικών τιμών από το ποσοστό των θετικών τιμών, μετά από επικάλυψη των καμπυλών κατανομής του υπό μελέτη δείγματος και του δείγματος ελέγχου.

2.8. Συνεστιακή Μικροσκοπία

Τα σπερματοζωάρια, αφού επώασθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς, καθαρίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα ώστε να παρατηρηθεί η έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Στα έμβρυα, η παρατήρηση της έκφρασης της GFP πραγματοποιήθηκε μετά την παύση της προεμφυτευτικής τους πορείας στο καλλιεργητικό μέσο ανάπτυξης. Η παρατήρηση διενεργήθηκε με Leica TCS SP5 ομοεστιακό μικροσκόπιο, το οποίο ήταν εξοπλισμένο με λέιζερ αργού (διέγερση στα 488nm), ακτίνα λέιζερ στερεάς κατάστασης 561 και λέιζερ ηλίου-νέον (διέγερση στα 633nm). Για την εύρεση του στόχου χρησιμοποιήθηκε Leica X10 και οι εικόνες αποκτήθηκαν με τη χρήση του LASAF Software. Τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα, καθώς οι

παρατηρήσεις στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες επώασης με τους πλασμιδιακούς φορείς είχαν ληφθεί με τις ίδιες ρυθμίσεις έντασης φθορισμού (Excitation 488, Detection 500–630, Argon 30%, Lazer Power 15%, Smart Gain 852v).

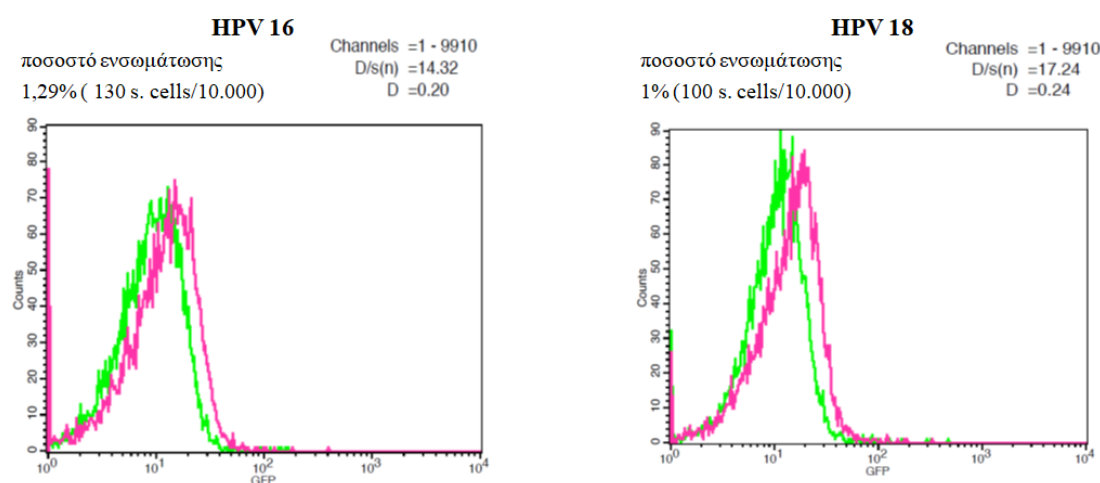
3. Αποτελέσματα

3.1. Ανίχνευση Ενσωμάτωσης των Ιών HPV 16 και HPV 18 σε Σπερματοζωάρια Μυός με Κυτταρομετρία Ροής

Για τη μελέτη της μεταφοράς των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στα σπερματοζωάρια του μυός, τα σπερματοζωάρια επώασθησαν με πλασμιδιακούς φορείς, οι οποίοι έφεραν ενσωματωμένο το πλήρες γένωμα των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων μαζί με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP. Σε κάθε δείγμα σπέρματος, τα σπερματοζωάρια επώασθησαν με τους πλασμιδιακούς φορείς σε συγκέντρωση 50 ngr ανά 10^6 σπερματοζωάρια για 5 ώρες σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37°C, 5% CO₂)

Ο έλεγχος της ενσωμάτωσης των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στα σπερματοζωάρια του μυός, πραγματοποιήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Συνολικά μελετήθηκαν 25 δείγματα σπέρματος εκ των οποίων τα 12 (48,0%) ήταν θετικά.



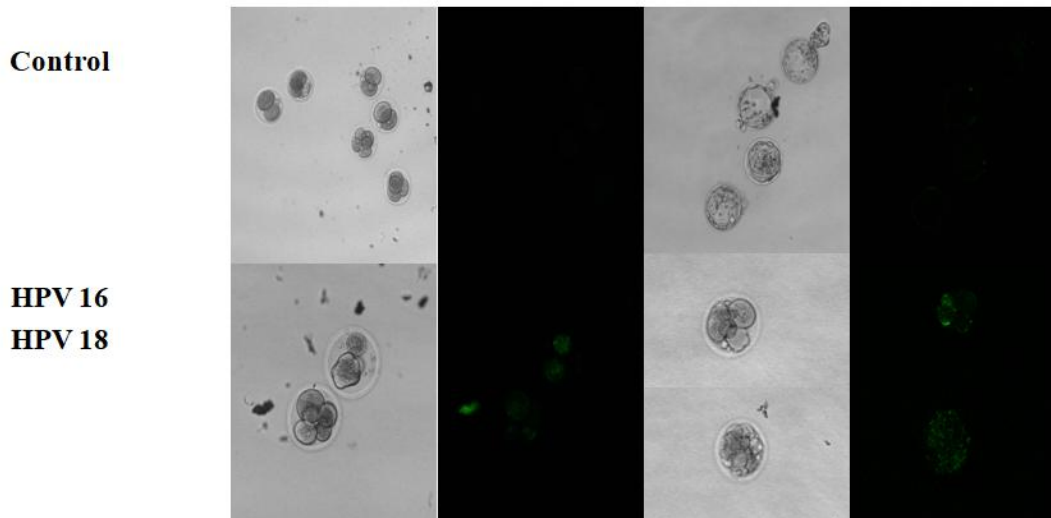
Εικόνα 16: Η ενσωμάτωση των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στα σπερματοζωάρια του μυός με κυτταρομετρία ροής. Το ποσοστό της ενσωμάτωσης ήταν 1,29% στην περίπτωση του στελέχους HPV 16 και 1% στην περίπτωση του στελέχους HPV 18.

3.2. Ανίχνευση Μεταφοράς των Ιών HPV 16 και HPV 18 σε Έμβρυα Μυός με Συνεστιακή Μικροσκοπία

Για τη μελέτη της μεταφοράς των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στα έμβρυα του μυός, αφού τα σπερματοζωάρια απομονώθηκαν από τους αρσενικούς μύες και επεξεργάστηκαν, τα ωάρια απομονώθηκαν από τις θηλυκές μύες μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* γονιμοποίησης. Έτσι, τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 μέσω του πλασμιδιακού φορέα μεταφέρθηκαν από τα σπερματοζωάρια στα έμβρυα, με *in vitro* γονιμοποίηση των ωαρίων από τα επωασμένα σπερματοζωάρια.

Συνολικά μελετήθηκαν δύο ομάδες εμβρύων, η ομάδα ελέγχου (control), όπου τα σπερματοζωάρια δεν επώασθηκαν με κανένα πλασμιδιακό φορέα πριν τη γονιμοποίηση και η ομάδα HPV 16, HPV 18, όπου τα σπερματοζωάρια επώασθηκαν πριν τη γονιμοποίηση για 30 λεπτά με τους πλασμιδιακούς φορείς που έφεραν ενσωματωμένο το πλήρες γένωμα των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού, σε συγκέντρωση $50 \text{ ngr}/10^6$ σπερματοζωάρια. Η πορεία της *in vitro* προεμφυτευτικής ανάπτυξης των εμβρύων ελέγχονταν καθημερινά σε οπτικό μικροσκόπιο. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με συνεστιακό μικροσκόπιο για την ανίχνευση της έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP.

Στην ομάδα ελέγχου (control) μελετήθηκαν συνολικά 77 έμβρυα και στην ομάδα HPV 16, HPV 18 60 έμβρυα, εκ των οποίων τα 25 (41,7%) ήταν θετικά.



Εικόνα 17: Η μεταφορά των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στα έμβρυα του μυός με συνεστιακή μικροσκοπία. Έμβρυα της ομάδας ελέγχου και έμβρυα της ομάδας HPV 16, HPV 18 θετικά στον ιό, μετά την ανίχνευση της έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP.

4. Συζήτηση

Ο ιός του ανθρώπινου θηλώματος HPV αποτελεί το συνηθέστερο σεξουαλικά μεταδιδόμενο παθογόνο στις γυναίκες και στους άνδρες παγκοσμίως (184). Οι ιοί HPV συνιστούν μια ευρεία και ετερογενή κατηγορία DNA ιών, αριθμώντας περίπου 150 στελέχη, εκ των οποίων τουλάχιστον 50 προσβάλλουν το επιθήλιο της πρωκτογεννητικής περιοχής. Ορισμένοι συσχετίζονται με καλοήθεις βλάβες ή δερματικές αλλοιώσεις, ενώ άλλοι ευθύνονται για την εμφάνιση προκαρκινικών δυσπλασιών ή κακοηθειών και κυρίως για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι ιοί HPV υψηλού κινδύνου ορίζονται ως ογκογόνοι λόγω της συσχέτισής τους με διάφορα νεοπλάσματα, ενώ οι ιοί HPV χαμηλού κινδύνου σχετίζονται σπάνια με κακοήθειες και προκαλούν υποκλινικές λοιμώξεις ή καλοήθη θηλώματα, τα οποία εμμένουν, ώσπου να αντιμετωπισθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (185). Ο HPV αποτελεί σχετικά επιτυχημένο παθογόνο, το οποίο προκαλεί χρόνιες μολύνσεις χωρίς συστηματικά συμπτώματα, επιτρέποντας έτσι στον ξενιστή την περιοδική απελευθέρωση ποσοτήτων μεταδοτικού ιού (186). Η διαφυγή του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα εξαρτάται κυρίως από τη διαφοροποίηση των κυτταρικών στοιβάδων στο βλεννογονοδερματικό επιθήλιο (186). Οι HPV λοιμώξεις χαρακτηρίζονται συνήθως υποκλινικές, παρουσιάζοντας μη παρατηρήσιμα ή ήπια συμπτώματα. Η περίοδος επώασης του ιού κυμαίνεται από τρεις εβδομάδες έως οκτώ μήνες (187). Η HPV λοίμωξη υποχωρεί αυθόρμητα σε τρεις μήνες στο 10-30% των γυναικών (187), ενώ απομακρύνεται μέσα σε δύο έτη στο 90% των γυναικών (188), καθώς η κάθαρση των συγκεκριμένων λοιμώξεων συντελείται λόγω της ανάπτυξης κυτταρομεσολαβούμενης ανοσίας (187). Ένα ποσοστό γυναικών (10-15%) εμφανίζει αποτυχημένη κυτταρομεσολαβούμενη ανοσιακή απόκριση και παραμένει μολυσμένο (189), αντιμετωπίζοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης νόσου υψηλού βαθμού και πιθανώς καρκίνου (190).

Η προσβολή από τον ιό αφορά και τα δύο φύλα, με την πιθανότητα μόλυνσης ενός ατόμου στη διάρκεια της ζωής του να τοποθετείται μεταξύ 50-80%. Συνολικά στους άνδρες και στις γυναίκες, ο επιπολασμός της HPV λοίμωξης κυμαίνεται περίπου στο 40% του γενικού πληθυσμού, με παραλλαγές που βασίζονται στο στέλεχος του ιού HPV και στην ανατομική θέση της λοίμωξης (184).

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, η σημαντικότερη κλινική συνέπεια της λοίμωξης από τους ιούς HPV υψηλού κινδύνου, αποτελεί μία από τις κύριες, σχετιζόμενες με τον καρκίνο, αιτίες θνησιμότητας των γυναικών στον κόσμο. Συνεπώς, τα τελευταία χρόνια διεξήχθησαν αρκετές προσπάθειες ώστε να κατανοηθεί η παθογένεια και οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την HPV λοίμωξη και την καρκινική πρόοδο, ενώ αναπτύχθηκαν τόσο προγράμματα διαλογής, όπως το τεστ Παπανικολάου και το HPV DNA τεστ, όσο και παρεμβάσεις, όπως ο HPV εμβολιασμός, για τον περιορισμό της εξάπλωσης του ιού στις γυναίκες (191), (192), (193), (194).

Όσον αφορά τον ανδρικό πληθυσμό, εκτιμάται ότι οι σχετιζόμενοι με τον HPV καρκίνοι στο πέος και στον πρωκτό σπανίζουν στους άνδρες, εμφανιζόμενοι περίπου σε 1-6/100.000 στο γενικό πληθυσμό (195).

Στους άνδρες ωστόσο, διερευνάται η δυνατότητα μόλυνσης του σπέρματος από τον ιό HPV και η μεταφορά του ιικού DNA στη σπερματική κεφαλή, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Εξετάζεται ακόμη πειραματικά, η μεταφορά του εξωγενούς γενετικού υλικού στο γονιμοποιημένο ωάριο και η παρουσία του έως και το στάδιο της βλαστοκύστης. Αν και ο HPV αποτελεί ευρέως διαδεδομένο παράγοντα νοσηρότητας και για τα δύο φύλα, με πλήρως τεκμηριωμένο ρόλο στην ογκογένεση των καρκίνων της πρωκτογεννητικής περιοχής, η συνεισφορά του ως παράγοντα υπογονιμότητας και η ικανότητα ενσωμάτωσής του στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ήδη από το προεμφυτευτικό στάδιο, δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί.

Φυσικά, λόγω του σημαντικού επιπολασμού των HPV λοιμώξεων, η αλληλεπίδρασή τους με τα ανθρώπινα γεννητικά κύτταρα και η πιθανότητα επιρροής της ανθρώπινης γονιμότητας απασχόλησαν από νωρίς την έρευνα. Το 1993, οι Chan et al., με μια σειρά πειραματικών μελετών κατάφεραν να τεκμηριώσουν την επιμόλυνση του ανθρώπινου σπέρματος με DNA του ιού HPV, εντοπίζοντας το στην κεφαλή των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων. Παράλληλα, οι Francolini et al., παρουσίασαν ενδείξεις για την ενσωμάτωση του HPV DNA στο DNA των σπερματοζωαρίων θηλαστικών. Αργότερα, οι Foresta et al., ασχολήθηκαν με τη

μελέτη της ποιότητας του επιμολυσμένου με HPV DNA σπέρματος και με το ενδεχόμενο απώλειας της γονιμοποιητικής του ικανότητας.

4.1. Ενσωμάτωση των Ιών HPV 16 και HPV 18 σε Σπερματοζωάρια Μυός

Η πειραματική πορεία αναφορικά με την ενσωμάτωση των ιών HPV 16 και HPV 18 σε σπερματοζωάρια μυός, περιελάμβανε τη διαμόλυνση σπερματοζωαρίων μυός με πλασμιδιακούς φορείς που έφεραν κλωνοποιημένο το πλήρες γένωμα των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.

Στο πείραμα, εφαρμόσθηκε η τεχνική της μεταφοράς εξωγενούς DNA μέσω των σπερματοζωαρίων, κατά την οποία τα σπερματοζωάρια απομονώθηκαν από την επιδιδυμίδα ώριμων και γόνιμων αρσενικών μυών του στελέχους FVB/N, επιλέχθηκαν εκείνα με τη μεγαλύτερη κινητικότητα, διαμολύνθηκαν με τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 του ιού και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα *in vitro* γονιμοποίησης. Το πλήρες γένωμα των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων βρισκόταν ενσωματωμένο σε πλασμιδιακούς φορείς και ήταν σημασμένο με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP.

Ο έλεγχος της ενσωμάτωσης των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στα σπερματοζωάρια του μυός, πραγματοποιήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Συνολικά μελετήθηκαν 25 δείγματα σπέρματος εκ των οποίων τα 12 (48,0%) ήταν θετικά, καταλήγοντας πως τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων μπορούν να ενσωματώνονται στα σπερματοζωάρια του μυός.

4.2. Μεταφορά των Ιών HPV 16 και HPV 18 σε Έμβρυα Μυός

Η πειραματική πορεία αναφορικά με τη μεταφορά των ιών HPV 16 και HPV 18 σε έμβρυα μυός, περιελάμβανε την *in vitro* γονιμοποίηση των ωαρίων από τα διαμολυσμένα σπερματοζωάρια και τον έλεγχο της προεμφυτευτικής ανάπτυξης των εμβρύων.

Για το πείραμα *in vitro* γονιμοποίησης, απομονώθηκε ικανοποιητικός αριθμός ώριμων ωαρίων από θηλυκές μύες του στελέχους FVB/N, μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ορμονών. Κατόπιν, τα ωάρια συλλέχθηκαν από τον ωαγωγό των θηλυκών μυών και τοποθετήθηκαν για γονιμοποίηση με τα διαμολυσμένα σπερματοζωάρια. Η *in vitro* γονιμοποίηση πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο και σε ιδανικές τιμές θερμοκρασίας, CO₂ και pH. Τα ποσοστά επιτυχούς γονιμοποίησης των ωαρίων εκτιμήθηκαν με την παρουσία του δεύτερου πολικού σωματίου και των δύο προπυρήνων, ενώ η πορεία της *in vitro* προεμφυτευτικής ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων καταγραφόταν καθημερινά. Στα υπό μελέτη έμβρυα εξετάστηκε η μεταφορά των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού από τα σπερματοζωάρια στα γονιμοποιημένα ωάρια μέσω της επιβεβαίωσης της έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP.

Συνολικά μελετήθηκαν δύο ομάδες εμβρύων, η ομάδα ελέγχου (control), όπου τα σπερματοζωάρια δεν επώασθηκαν με κανένα πλασμιδιακό φορέα πριν τη γονιμοποίηση και η ομάδα HPV 16, HPV 18, όπου τα σπερματοζωάρια επώασθηκαν πριν τη γονιμοποίηση για 30 λεπτά με τους πλασμιδιακούς φορείς που έφεραν ενσωματωμένο το πλήρες γένωμα των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού.

Στην ομάδα ελέγχου (control) μελετήθηκαν συνολικά 77 έμβρυα και στην ομάδα HPV 16, HPV 18 60 έμβρυα. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με συνεστιακό μικροσκόπιο για την ανίχνευση της έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, καταλήγοντας πως τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 μπορούν να μεταφέρονται, μέσω *in vitro* γονιμοποίησης, από τα σπερματοζωάρια στα έμβρυα του μυός.

Τελικά, αποδεικνύεται πως τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων ενσωματώνονται στα σπερματοζωάρια του μυός, ενώ μεταφέρονται και στα προεμφυτευτικά έμβρυα του μυός μέσω in vitro γονιμοποίησης των ωαρίων από τα διαμολυσμένα σπερματοζωάρια.

Καθώς οι πληροφορίες για την πιθανή μετάδοση και διατήρηση του ιού HPV κατά την εμβρυογένεση και την οργανογένεση είναι περιορισμένες και με δεδομένη τη διφορούμενη αντίληψη αναφορικά με την πιθανή επίδραση του ιού επί της γονιμοποιητικής ικανότητας, τίθενται μελλοντικά προς ανάλυση περαιτέρω ζητήματα που αφορούν την προκύπτουσα επιμόλυνση του ζυγωτού και της εν συνεχεία βλαστοκύστης ως αίτιο της περιορισμένης ικανότητας εμφύτευσης, την τροποποίηση του αναπτυξιακού δυναμικού των κυήσεων, την αναπτυξιακή κατανομή του ιού HPV στα έμβρυα καθώς και τη διατήρηση της παρουσίας του ιού HPV κατά την κύηση. Η διερεύνησή τους, θα λειτουργήσει προσφέροντας σημαντική γνώση ως προς την παθοφυσιολογία του ιού HPV, την πιθανή επίπτωσή του στη γονιμότητα και στην ανάπτυξη, μα και πυροδοτώντας ενδεχομένως αλλαγές στην εφαρμογή των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος διαμόλυνσης των εμβρύων.

5. Συμπεράσματα

Τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων ενσωματώνονται στα σπερματοζώαρια του μυός.

Τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων μεταφέρονται στα έμβρυα του μυός μέσω *in vitro* γονιμοποίησης.

Περίληψη

Η λοίμωξη του γεννητικού συστήματος των γυναικών και των ανδρών από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων αποτελεί τη συχνότερη σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσο ιογενούς αιτιολογίας στον κόσμο. Η επίδραση της λοίμωξης από τον ιό HPV έχει μελετηθεί ενδελεχώς όσον αφορά την ογκογένεση, ωστόσο η γνώση σχετικά με την επίπτωσή της στη γονιμότητα και στην εμβρυική ανάπτυξη είναι περιορισμένη. Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη του ιού HPV ως παράγοντα υπογονιμότητας και συγκεκριμένα, η διερεύνηση της ενσωμάτωσης των στελεχών HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων σε σπερματοζώαρια μυός και της μεταφοράς τους σε έμβρυα μυός μέσω *in vitro* γονιμοποίησης. Τελικά, αποδείχθηκε πως τα στελέχη HPV 16 και HPV 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων ενσωματώνονται στα σπερματοζώαρια του μυός, ενώ μεταφέρονται και στα προεμφυτευτικά έμβρυα του μυός μέσω *in vitro* γονιμοποίησης των ωαρίων από τα διαμολυσμένα σπερματοζώαρια.

Abstract

Genital infection with human papillomavirus virus is the most common sexually transmitted disease of viral etiology in women and men worldwide. The effect of HPV infection has been thoroughly studied in terms of oncogenesis, but knowledge of its impact on fertility and embryo development is limited. The purpose of this thesis was to study HPV virus as infertility factor and to investigate the integration of 16 and 18 human papillomavirus types into mouse sperm and their transfer to mouse embryos through in vitro fertilization. Finally, it has been shown that HPV 16 and HPV 18 types are incorporated into mouse sperm, and are also transferred to pre-implantation mouse embryos through oocytes' in vitro fertilization from infected spermatozoa.

6. Βιβλιογραφία

- (1) Vander A. SJ, Luciano D., Τσακόπουλος Μ. Human Physiology The Mechanisms of Body Function 2001.
- (2) Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*. 1992;131(3):1458-66.
- (3) Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology*. 2007;80(2):84-97.
- (4) Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod*. 1982;27(2):327-39.
- (5) Ramos SD, Lee JM, Peuler JD. An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. *J Appl Physiol* (1985). 2001;91(2):667-70.
- (6) Achiraman S, Archunan G, Sankarganesh D, Rajagopal T, Rengarajan RL, Kokilavani P, et al. Biochemical analysis of female mice urine with reference to endocrine function: a key tool for estrus detection. *Zoolog Sci*. 2011;28(8):600-5.
- (7) Champlin AK, Dorr DL, Gates AH. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod*. 1973;8(4):491-4.
- (8) Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2009;Appendix 4:Appendix 4I.
- (9) Jonge CJD. *The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration* 2006.
- (10) Ho HC, Suarez SS. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biology of reproduction*. 2003;68(5):1590-6. 138

- (11) Dacheux JL, Dacheux F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2014;147(2):R27-42.
- (12) Vigil P, Orellana RF, Cortes ME. Modulation of spermatozoon acrosome reaction. *Biological research*. 2011;44(2):151-9.
- (13) Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2001;122(4):519-26.
- (14) Yao Y, Ho P, Yeung WS. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertility and sterility*. 2000;73(4):680-6.
- (15) Suarez SS, Osman RA. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biology of reproduction*. 1987;36(5):1191-8.
- (16) White DR, Aitken RJ. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete research*. 1989;22(2):163-77.
- (17) Aoki F, Sakai S, Kohmoto K. Regulation of flagellar bending by cAMP and Ca²⁺ in hamster sperm. *Molecular reproduction and development*. 1999;53(1):77-83.
- (18) Neill JM, Olds-Clarke P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete research*. 1987;18(2):121-40.
- (19) Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(17):9699-705.
- (20) Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, et al. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science (New York, NY)*. 2000;289(5479):625-8.

- (21) Ziomek CA, Johnson MH. Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell*. 1980;21(3):935-42.
- (22) Tarkowski AK, Wroblewska J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1967;18(1):155-80. 139
- (23) Johnson MH, Ziomek CA. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*. 1981;24(1):71-80.
- (24) Bowman P, McLaren A. Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1970;24(1):203-7.
- (25) Merz EA, Brinster RL, Brunner S, Chen HY. Protein degradation during preimplantation development of the mouse. *Journal of reproduction and fertility*. 1981;61(2):415-8.
- (26) Clegg KB, Piko L. Poly(A) length, cytoplasmic adenylation and synthesis of poly(A)+ RNA in early mouse embryos. *Developmental biology*. 1983;95(2):331-41.
- (27) De Leon V, Johnson A, Bachvarova R. Half-lives and relative amounts of stored and polysomal ribosomes and poly(A) + RNA in mouse oocytes. *Developmental biology*. 1983;98(2):400-8.
- (28) Carter MG, Hamatani T, Sharov AA, Carmack CE, Qian Y, Aiba K, et al. In situ synthesized novel microarray optimized for mouse stem cell and early developmental expression profiling. *Genome research*. 2003;13(5):1011-21.
- (29) Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic L, Scott MP, Davis RW, et al. A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental cell*. 2004;6(1):133-44.
- (30) Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental cell*. 2004;6(1):117-31.

(31) Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(2):353-7.

(32) Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*. 1989;57(5):717-23.

(33) Camaioni A, Russo MA, Odorisio T, Gandolfi F, Fazio VM, Siracusa G. Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads. *Journal of reproduction and fertility*. 1992;96(1):203-12.

(34) Lavitrano M, French D, Zani M, Frati L, Spadafora C. The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Molecular reproduction and development*. 1992;31(3):161-9.

(35) Zani M, Lavitrano M, French D, Lulli V, Maione B, Sperandio S, et al. The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. *Experimental cell research*. 1995;217(1):57-64.

(36) Lavitrano M, Maione B, Forte E, Francolini M, Sperandio S, Testi R, et al. The interaction of sperm cells with exogenous DNA: a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. *Experimental cell research*. 1997;233(1):56-62.

(37) Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA and cell biology*. 1997;16(9):1087-97.

(38) Francolini M, Lavitrano M, Lamia CL, French D, Frati L, Cotelli F, et al. Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells. *Molecular reproduction and development*. 1993;34(2):133-9.

(39) Zoraqi G, Spadafora C. Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. *DNA and cell biology*. 1997;16(3):291-300. 157

- (40) Pittoggi C, Zaccagnini G, Giordano R, Magnano AR, Baccetti B, Lorenzini R, et al. Nucleosomal domains of mouse spermatozoa chromatin as potential sites for retroposition and foreign DNA integration. *Molecular reproduction and development*. 2000;56(2Suppl):248-51.
- (41) Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science (New York, NY)*. 1999;284(5417):1180-3.
- (42) Moreira PN, Giraldo P, Cozar P, Pozueta J, Jimenez A, Montoliu L, et al. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biology of reproduction*. 2004;71(6):1943-7.
- (43) Kroll KL, Amaya E. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development (Cambridge, England)*. 1996;122(10):3173-83.
- (44) L'Hostis-Guidet A, Recher G, Guillet B, Al-Mohammad A, Coumilleau P, Tiaho F, et al. Generation of stable *Xenopus laevis* transgenic lines expressing a transgene controlled by weak promoters. *Transgenic research*. 2009;18(5):815-27.
- (45) Shemesh M, Gurevich M, Harel-Markowitz E, Benvenisti L, Shore LS, Stram Y. Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. *Molecular reproduction and development*. 2000;56(2 Suppl):306-8.
- (46) Chang K, Qian J, Jiang M, Liu YH, Wu MC, Chen CD, et al. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC biotechnology*. 2002;2:5. 158
- (47) zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Oct 9;1288(2):F55-78.
- (48) Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010 May 25;401(1):70-9.

- (49) Yang R, Wheeler CM, Chen X, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Pastrana DV, Viscidi RP, Roden RB. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J Virol*. 2005 Jun;79(11):6741-50.
- (50) Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of heparin sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol*. 2009 Mar;83(5):2067-74.
- (51) Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*. 2003 Apr;77(8):4818-26.
- (52) Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Sep 28;101(39):14252-7.
- (53) Day PM, Gambhira R, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by L2 cross-neutralizing and L1 type-specific antibodies. *J Virol*. 2008 May;82(9):4638-46.
- (54) Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol*. 2004 Jan;78(2):751-7.
- (55) Bossis I, Roden RB, Gambhira R, Yang R, Tagaya M, Howley PM, Meneses PI. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J Virol*. 2005 Jun;79(11):6723-31.
- (56) Kämper N, Day PM, Nowak T, Selinka HC, Florin L, Bolscher J, Hilbig L, Schiller JT, Sapp M. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol*. 2006 Jan;80(2):759-68.
- (57) Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jan 31;103(5):1522-7.
- (58) Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Dec 15;89(24):12180-4.

- (59) Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*. 2002 Sep 16;21(18):4754-62.
- (60) Bishop B, Dasgupta J, Klein M, Garcea RL, Christensen ND, Zhao R, Chen XS. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem*. 2007 Oct 26;282(43):31803-11.
- (61) Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 2006 Sep 1;11:2286-302.
- (62) Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J*. 1982;1(2):231-6.
- (63) Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 2006 Mar-Apr;16(2):83-97.
- (64) Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of humanpapillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol*. 1996 Apr;70(4):2339-49.
- (65) Hummel M, Hudson JB, Laimins LA. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol*. 1992 Oct;66(10):6070-80.
- (66) Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70.
- (67) Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3878-84.

- (68) Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Eienkel J, Hoeckel M, von Knebel Doeberitz M. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene*. 2003 Jun 19;22(25):3977-84.
- (69) Chen CM, Shyu MP, Au LC, Chu HW, Cheng WT, Choo KB. Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *J Med Virol*. 1994 Oct;44(2):206-11.
- (70) Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol*. 1998 Apr;17(2):146-53.
- (71) Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Emerich J, Wójcikowski C. Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2003 Feb;41(2):608-12.
- (72) Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol*. 2006 May;44(5):1755-62.
- (73) Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods*. 2009 Jun;158(1-2):180-3.
- (74) Li H, Yang Y, Zhang R, Cai Y, Yang X, Wang Z, Li Y, Cheng X, Ye X, Xiang Y, Zhu B. Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. *J Clin Virol*. 2013 Apr;56(4):342-7.
- (75) Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Dürst M, Schwarz E. Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS One*. 2013 Jun 18;8(6):e66693.
- (76) Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, Rocco JW, Teknos TN, Kumar B, Wangsa D, He D, Ried T, Symer DE, Gillison ML. Genome-wide analysis of

HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Res.* 2014 Feb;24(2):185-99.

(77) Hamid NA, Brown C, Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2009 May;66(10):1700-17.

(78) Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M. Papillomavirus DNA replication- from initiation to genomic instability. *Virology.* 2009 Feb 20;384(2):360-8.

(79) Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology.* 2009 Feb 20;384(2):375-9.

(80) Huang LW, Chao SL, Lee BH. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervicalcar cinogenesis. *J Clin Pathol.* 2008 May;61(5):627-31.

(81) Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, Syrjänen KJ, Johansson BC. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol.* 2006 May;59(5):513-7.

(82) Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, Galuppo J, Alonio LV, Teysie AR. Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol.* 2001 May;21(2):129-34.

(83) Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer.* 2005 Jun 20;92(12):2195-200.

(84) Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 7;103(10):3822-7.

- (85) Cheung JL, Lo KW, Cheung TH, Tang JW, Chan PK. Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *J Infect Dis*. 2006 Dec 15;194(12):1706-12.
- (86) De Marco L, Gillio-Tos A, Bonello L, Ghisetti V, Ronco G, Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *J Clin Virol*. 2007 Jan;38(1):7-13.
- (87) Briolat J, Dalstein V, Saunier M, Joseph K, Caudroy S, Prétet JL, Birembaut P, Clavel C. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int J Cancer*. 2007 Nov 15;121(10):2198-204.
- (88) Li W, Wang W, Si M, Han L, Gao Q, Luo A, Li Y, Lu Y, Wang S, Ma D. The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Dec;134(12):1355-61.
- (89) Matovina M, Sabol I, Grubisić G, Gasperov NM, Grce M. Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol*. 2009 Apr;113(1):120-7.
- (90) Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunoury S, Labib A, Orth G. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J Virol*. 1991 Aug;65(8):4534-8.
- (91) Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol*. 1995 May;69(5):2989-97.
- (92) Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*. 2004 Mar 20;109(2):157-62.
- (93) Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckère F, Sibling AP, Desplancq D, Atkinson RA, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B, Travé G. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell*. 2006 Mar 3;21(5):665-78.

- (94) Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(11):2006-11.
- (95) Demarest SJ, Martinez-Yamout M, Chung J, Chen H, Xu W, Dyson HJ, Evans RM, Wright PE. Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature.* 2002 Jan 31;415(6871):549-53.
- (96) Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS.* 2010 Jun;118(6-7):471-93.
- (97) Fu L, Van Doorslaer K, Chen Z, Ristriani T, Masson M, Travé G, Burk RD. Degradation of p53 by human Alphapapillomavirus E6 proteins shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity. *PLoS One.* 2010 Sep 17;5(9). pii: e12816.
- (98) Zanier K,ould M'hamed ould Sidi A, Boulade-Ladame C, Rybin V, Chappelle A, Atkinson A, Kieffer B, Travé G. Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. *Structure.* 2012 Apr 4;20(4):604-17.
- (99) Artandi SE, Attardi LD. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 10;331(3):881-90.
- (100) Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004 Nov;78(21):11451-60.
- (101) Duensing A, Spardy N, Chatterjee P, Zheng L, Parry J, Cuevas R, Korzeniewski N, Duensing S. Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins. *Environ Mol Mutagen.* 2009 Oct;50(8):741-7.
- (102) Korzeniewski N, Treat B, Duensing S. The HPV-16 E7 oncoprotein induces centriole multiplication through deregulation of Polo-like kinase 4 expression. *Mol Cancer.* 2011 May 24;10:61.

- (103) Roman A. The human papillomavirus E7 protein shines a spotlight on the pRB family member, p130. *Cell Cycle*. 2006 Mar;5(6):567-8.
- (104) Barrow-Laing L, Chen W, Roman A. Low- and high-risk human papillomavirus E7 proteins regulate p130 differently. *Virology*. 2010 May 10;400(2):233-9.
- (105) Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ*. 1997 Dec;8(12):1277-86.
- (106) Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene*. 2001 Aug 2;20(34):4740-9.
- (107) Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997 Aug 15;11(16):2090-100.
- (108) Nguyen CL, Münger K. Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. *Virology*. 2008 Oct 10;380(1):21-5.
- (109) Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2):362-72.
- (110) Stöppler MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology*. 1996 Sep 1;223(1):251-4.
- (111) Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene*. 2008 Apr 17;27(18):2532-41.
- (112) Barbaresi S, Cortese MS, Quinn J, Ashrafi GH, Graham SV, Campo MS. Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. *J Gen Virol*. 2010 Feb;91(Pt 2):521-30.

- (113) Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparin sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol*. 2003 Dec;77(24):13125-35.
- (114) Surviladze Z, Dziduszko A, Ozbun MA. Essential roles for soluble virion-associated heparin sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS Pathog*. 2012 Feb;8(2):e1002519.
- (115) Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol*. 2006 Sep;80(18):8940-50.
- (116) Bousarghin L, Touzé A, Sizaret PY, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol*. 2003 Mar;77(6):3846-50.
- (117) Bergant Marušič M, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP, Banks L. Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic*. 2012 Mar;13(3):455-67.
- (118) Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day PM, Schiller JT, Helenius A. Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002657.
- (119) Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*. 2011 Jun 5;414(2):153-63.
- (120) McBride AA. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res*. 2008;72:155-205.
- (121) Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog*. 2009 Feb;5(2):e1000318.

- (122) Parish JL, Bean AM, Park RB, Androphy EJ. ChIR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Mol Cell*. 2006 Dec 28;24(6):867-76.
- (123) Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol*. 2006 May;80(9):4431-9.
- (124) Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):80-98.
- (125) Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 2003 Oct;77(19):10186-201.
- (126) McIntosh PB, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J. E1-E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci*. 2010 Aug 15;123(Pt 16):2810-22.
- (127) Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol*. 1997 May;71(5):3554-62.
- (128) Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D. Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol*. 2004 Mar;72(3):478-83.
- (129) Markowitz LE, Tsu V, Deeks SL, Cubie H, Wang SA, Vicari AS, Brotherton JM. Human papillomavirus vaccine introduction-the first five years. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F139-48.
- (130) Noronha AS, Markowitz LE, Dunne EF. Systematic review of human papillomavirus vaccine coadministration. *Vaccine*. 2014 May 13;32(23):2670-4.

(131) Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, Markowitz LE, Kohler B, Ehemann C, Saraiya M, Bandi P, Saslow D, Cronin KA, Watson M, Schiffman M, Henley SJ, Schymura MJ, Anderson RN, Yankey D, Edwards BK. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Feb 6;105(3):175-201.

(132) Jeudin P, Liveright E, Del Carmen MG, Perkins RB. Race, ethnicity, and income factors impacting human papillomavirus vaccination rates. *Clin Ther.* 2014 Jan 1;36(1):24-37.

(133) Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008 Sep;110(3 Suppl 2):S4-7.

(134) Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR, Meijer CL. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Feb;10(2):101-6.

(135) Cobos C, Figueroa JA, Mirandola L, Colombo M, Summers G, Figueroa A, Aulakh A, Konala V, Verma R, Riaz J, Wade R, Saadeh C, Rahman RL, Pandey A, Radhi S, Nguyen DD, Jenkins M, Chiriva-Internati M, Cobos E. The role of human papilloma virus (HPV) infection in non-anogenital cancer and the promise of immunotherapy: a review. *Int Rev Immunol.* 2014 Oct;33(5):383-401.

(136) Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, Cullen KJ. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *CA Cancer J Clin.* 2013 Jan;63(1):57-81.

(137) Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb 20;100(4):261-9.

(138) Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007 Oct 15;121(8):1813-20.

(139) Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 1;363(1):24-35.

(140) Srinivasan M, Taioli E, Ragin CC. Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers-a meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2009 Oct;30(10):1722-8.

(141) Ciotti M, Giuliani L, Ambrogi V, Ronci C, Benedetto A, Mineo TC, Syrjänen K, Favalli C. Detection and expression of human papillomavirus oncogenes in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2006 Jul;16(1):183-9.

(142) Aglianò AM, Gradilone A, Gazzaniga P, Napolitano M, Vercillo R, Albonici L, Naso G, Manzari V, Frati L, Vecchione A. High frequency of human papillomavirus detection in urinary bladder cancer. *Urol Int*. 1994;53(3):125-9.

(143) Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil Steril*. 2003 Jun;79 Suppl 3:1566-70.

(144) Dunne EF, Markowitz LE, Saraiya M, Stokley S, Middleman A, Unger ER, Williams A, Iskander J; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC grand rounds: Reducing the burden of HPV-associated cancer and disease. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014 Jan 31;63(4):69-72.

(145) Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2509-14.

(146) Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, Meijer C, Muñoz A; Instituto Nacional de Cancerología HPV Study Group. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of

Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis.* 2004 Dec 15;190(12):2077-87.

(147) Vaccarella S, Herrero R, Dai M, Snijders PJ, Meijer CJ, Thomas JO, Hoang Anh PT, Ferreccio C, Matos E, Posso H, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Lazcano-Ponce E, Ronco G, Rajkumar R, Qiao YL, Muñoz N, Franceschi S. Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Nov;15(11):2148-53.

(148) Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol.* 2010 May;117(2 Suppl):S5-10.

(149) Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M, Cuzick J, Castle PE, Schiller JT, Markowitz LE, Fisher WA, Canfell K, Denny LA, Franco EL, Steben M, Kane MA, Schiffman M, Meijer CJ, Sankaranarayanan R, Castellsagué X, Kim JJ, Brotons M, Alemany L, Albero G, Diaz M, de Sanjosé S. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine.* 2013 Dec 29;31 Suppl 5:F1-31.

(150) Lenzi A, Mirone V, Gentile V, Bartoletti R, Ficarra V, Foresta C, Mariani L, Mazzoli S, Parisi SG, Perino A, Picardo M, Zotti CM. Rome Consensus Conference-statement; human papilloma virus diseases in males. *BMC Public Health.* 2013 Feb 7;13:117.

(151) Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil Steril.* 2003 Jun;79 Suppl 3:1566-70.

(152) Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS One.* 2015 May 18;10(5):e0126936.

(153) Bachir BG, Jarvi K. Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility. *Urol Clin North Am.* 2014 Feb;41(1):67-81.

- (154) Gizzo S, Ferrari B, Noventa M, Ferrari E, Patrelli TS, Gangemi M, Nardelli GB. Male and couple fertility impairment due to HPV-DNA sperm infection: update on molecular mechanism and clinical impact-systematic review. *Biomed Res Int.* 2014;2014:230263.
- (155) Depuydt CE, Criel AM, Benoy IH, Arbyn M, Vereecken AJ, Bogers JJ. Changes in type-specific human papillomavirus load predict progression to cervical cancer. *J Cell Mol Med.* 2012 Dec;16(12):3096-104.
- (156) Schillaci R, Capra G, Bellavia C, Ruvolo G, Scazzone C, Venezia R, Perino A. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil Steril.* 2013 Nov;100(5):1236-40.
- (157) Lai YM, Yang FP, Pao CC. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fertil Steril.* 1996 May;65(5):1026-30.
- (158) Olatunbosun O, Deneer H, Pierson R. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol.* 2001 Mar;97(3):357-60.
- (159) Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril.* 2007 May;87(5):1087-97.
- (160) Nielson CM, Flores R, Harris RB, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, Markowitz LE, Giuliano AR. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Jun;16(6):1107-14.
- (161) 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 Apr;18(4):1077-83.

- (162) Aynaud O, Poveda JD, Huynh B, Guillemotonia A, Barrasso R. Frequency of herpes simplex virus, cytomegalovirus and human papillomavirus DNA in semen. *Int J STD AIDS*. 2002 Aug;13(8):547-50.
- (163) Pérez-Andino J, Buck CB, Ribbeck K. Adsorption of human papillomavirus 16 to live human sperm. *PLoS One*. 2009 Jun 9;4(6):e5847.
- (164) Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril*. 2010 Feb;93(3):802-6.
- (165) Garolla A, Pizzol D, Foresta C. The role of human papillomavirus on sperm function. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2011 Aug;23(4):232-7.
- (166) Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, Ferlin A. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One*. 2011 Mar 7;6(3):e15036.
- (167) Lai YM, Lee JF, Huang HY, Soong YK, Yang FP, Pao CC. The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility. *Fertil Steril*. 1997 Jun;67(6):1152-5.
- (168) Chan PJ, Su BC, Kalugdan T, Seraj IM, Tredway DR, King A. Human papillomavirus gene sequences in washed human sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril*. 1994 May;61(5):982-5.
- (169) Chan PJ, Kalugdan T, Su BC, Whitney EA, Perrott W, Tredway DR, King A. Sperm as a noninvasive gene delivery system for preimplantation embryos. *Fertil Steril*. 1995 May;63(5):1121-4.
- (170) Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Virology*. 2008 Sep 25;5:106.
- (171) Chan PJ, Su BC, Tredway DR, Seraj M, Seraj IM, King A. Uptake of exogenous human papilloma virus L1 DNA by oocytes and detection by the polymerase chain reaction. *J Assist Reprod Genet*. 1992 Dec;9(6):531-3.

(172) Cabrera M, Chan PJ, Kalugdan TH, King A. Transfection of the inner cell mass and lack of a unique DNA sequence affecting the uptake of exogenous DNA by sperm as shown by dideoxy sequencing analogues. *J Assist Reprod Genet.* 1997 Feb;14(2):120-4.

(173) You H, Liu Y, Carey MJ, Lowery CL, Hermonat PL. Defective 3A trophoblast-endometrial cell adhesion and altered 3A growth and survival by human papillomavirus type 16 oncogenes. *Mol Cancer Res.* 2002 Nov;1(1):25-31.

(174) Calinisan JH, Chan SR, King A, Chan PJ. Human papillomavirus and blastocyst apoptosis. *J Assist Reprod Genet.* 2002 Mar;19(3):132-6.

(175) Henneberg AA, Patton WC, Jacobson JD, Chan PJ. Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific. *J Assist Reprod Genet.* 2006 Jun;23(6):255-9.

(176) Gomez LM, Ma Y, Ho C, McGrath CM, Nelson DB, Parry S. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. *Hum Reprod.* 2008 Mar;23(3):709-15.

(177) Noventa M, Andrisani A, Gizzo S, Nardelli GB, Ambrosini G. Is it time to shift the attention on early stages embryo development to avoid inconclusive evidence on HPV-related infertility: debate and proposal. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014 May 31;12:48.

(178) Eppel W, Worda C, Frigo P, Ulm M, Kucera E, Czerwenka K. Human papillomavirus in the cervix and placenta. *Obstet Gynecol.* 2000 Sep;96(3):337-41.

(179) Matovina M, Husnjak K, Milutin N, Ciglar S, Grce M. Possible role of bacterial and viral infections in miscarriages. *Fertil Steril.* 2004 Mar;81(3):662-9.

(180) Hong LJ, Oshiro BT, Chan PJ. HPV-16 exposed mouse embryos: a potential model for pregnancy wastage. *Arch Gynecol Obstet.* 2013 Jun;287(6):1093-7.

(181) Hermonat PL, Han L, Wendel PJ, Quirk JG, Stern S, Lowery CL, Rehtin TM. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted

products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes*. 1997;14(1):13-7.

(182) Skoczyński M, Goździcka-Józefiak A, Kwaśniewska A. Prevalence of human papillomavirus in spontaneously aborted products of conception. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011 Dec;90(12):1402-5.

(183) Conde-Ferrález L, Chan May Ade A, Carrillo-Martínez JR, Ayora-Talavera G, González-Losa Mdel R. Human papillomavirus infection and spontaneous abortion: a case-control study performed in Mexico. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Oct;170(2):468-73.

(184) Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M, Cuzick J, Castle PE, Schiller JT, Markowitz LE, Fisher WA, Canfell K, Denny LA, Franco EL, Steben M, Kane MA, Schiffman M, Meijer CJ, Sankaranarayanan R, Castellsagué X, Kim JJ, Brotons M, Alemany L, Albero G, Diaz M, de Sanjosé S. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 2013 Dec 29;31 Suppl 5:F1-31.

(185) Cid Arregui A, Gariglio P, Kanda T, Doorbar J. ONCOGENIC HUMAN PAPILOMAVIRUSES: High-Risk Human Papillomaviruses: Towards a Better Understanding of the Mechanisms of Viral Transformation, Latency and Immune-Escape. *Open Virol J*. 2012;6:160-2.

(186) Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol*. 2008 May;109(2 Suppl):S15-21.

(187) Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. 2010 May;117(2 Suppl):S5-10.

(188) Garcia-Chacon R, Velasco-Ramirez SF, Flores-Romo L, Daneri-Navarro A. Immunobiology of HPV Infection. *Arch Med Res*. 2009 Aug;40(6):443-8.

(189) Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Gilkison G, Arends MJ, Graham C, McGoogan E. Persistent high risk HPV infection associated with development of

cervical neoplasia in a prospective population study. *J Clin Pathol.* 2005 Sep;58(9):946-50.

(190) Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Glass AG, Anderson SM, Schiffman M. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis.* 2001 Jan 1;183(1):8-15.

(191) Barzon L, Militello V, Pagni S, Franchin E, Dal Bello F, Mengoli C, Palù G. Distribution of human papillomavirus types in the anogenital tract of females and males. *J Med Virol.* 2010 Aug;82(8):1424-30.

(192) Boone JD, Erickson BK, Huh WK. New insights into cervical cancer screening. *J Gynecol Oncol.* 2012 Oct;23(4):282-7.

(193) Gizzo S, Noventa M, Nardelli GB. Gardasil administration to hr-HPV-positive women and their partners. *Trends Pharmacol Sci.* 2013 Sep;34(9):479-80.

(194) Saccardi C, Gizzo S, Noventa M, Anis O, Di Gangi S, Patrelli TS, D'Antona D, Nardelli GB. High-risk human papillomavirus DNA test: could it be useful in low-grade cervical lesion triage? Five-year follow-up. *Reprod Sci.* 2014 Feb;21(2):198-203.

(195) Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Goodman MT, Sudenga SL, Monson J, Franceschi S. EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer.* 2015 Jun 15;136(12):2752-60.