

**Prevalencia de la infección por VPH y su efecto sobre la calidad seminal en hombres infértiles de la Ciudad de Córdoba**

Olivera, Carolina<sup>1</sup>; Cuffini, Cecilia<sup>2\*</sup>; Mosmann, Jessica<sup>2</sup>; Rivero, Virginia<sup>1\*</sup>

[colivera@fcq.unc.edu.ar](mailto:colivera@fcq.unc.edu.ar)

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

\*Orientadores Formados.

**RESUMEN:**

En el presente proyecto estudiamos la epidemiología local de la infección por VPH en pacientes masculinos, miembros de una pareja infértil, evaluando los genotipos virales presentes, la presencia de co-infección con agentes bacterianos de transmisión sexual (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma*, *Mycoplasma*) y los posibles efectos sobre la calidad espermática.

La muestra utilizada fue un "pool" de Hisopado uretral (HU) y del "pellet" del Semen (S) de cada paciente. Las metodologías utilizadas para la detección de VPH y genotipificación fueron PCR seguida de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). La calidad seminal fue evaluada siguiendo norma estándar de OMS 2010.

En nuestro estudio, el 49.4% de las muestras de pacientes infértiles fueron positivas para VPH, el 30,4% mostró presencia de un único genotipo de VPH, siendo en la mayoría de los casos genotipos de bajo riesgo, con solo 5 casos de VPH de riesgo Alto/Intermedio. La prevalencia por genotipo fue VPH6 (51.3%), VPH53 (5.1%), VPH31 (2.6%) y VPH18 (2.6%), VPH6/16 (2,6%). El 31% de los pacientes VPH+ presento co-infecciones de *Chlamydia*, *Ureaplasma* y/o *Mycoplasma*, encontrándose en este grupo los 5 casos de VPH de riesgo intermedio/alto.

En cuánto a los parámetros de calidad seminal los pacientes infértiles VPH+ no mostraron alteraciones significativas ni en la concentración de espermatozoides, ni en su viabilidad, morfología o movilidad. Tampoco encontramos presencia de marcadores inflamatorios asociados a la infección por VPH.

**Palabras clave:** VPH, hombres infértiles, co-infección, calidad seminal.

## INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) está conformado por un grupo diverso de virus ADN pertenecientes a la familia de los *Papillomaviridae* y representa una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes (1, 2). Se trata de un virus epidermotrópico, con predilección por piel y mucosas, que puede producir desde lesiones sub-clínicas hasta cáncer de piel y mucosas. Se conocen más de 100 tipos virales en relación con su patogenia oncológica, los cuales han sido clasificados en tipos de alto, intermedio y bajo riesgo. Los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59 y 66 son de alto riesgo carcinogénico para los seres humanos y los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 y 81, son de riesgo bajo/intermedio oncogénico (3). Los genotipos de bajo riesgo son responsables de lesiones benignas tales como verrugas genitales y papilomatosis respiratoria; mientras que los genotipos de alto riesgo causan infecciones persistentes que pueden dar lugar a transformaciones malignas, tanto en el área

ano-genital como en las regiones aerodigestivas (3).

La mayoría de los estudios sobre VPH relacionados a epidemiología, estrategias diagnósticas y consecuencias de la infección están enfocados en la mujer, habiéndose subestimado la importancia del estudio de la infección del tracto genital masculino y sus consecuencias (4). Es importante tener en cuenta que las infecciones por VPH en tracto femenino y masculino son frecuentemente asintomáticas y la mayoría de las veces, las personas desconocen que están infectadas (1-3). En el hombre el ADN de VPH se ha detectado en la mayoría de los sitios genitales estudiados como eje del pene, glándula, surco coronal, escroto, regiones anales-perianales y semen (5). Un Meta-análisis de la prevalencia de VPH en hombres de estudios que incluyen la evaluación de múltiples sitios anatómicos han mostrado datos muy variables, con valores que iban desde 1.3 al 72.9% y más del 50% de estudios mostrando prevalencias mayores al 20% (6,1). En

relación a la prevalencia de VPH en muestras de semen los resultados fueron también muy variables con valores que fueron desde un 0% en hombres menores de 18 años que nunca habían tenido relaciones sexuales a un 100% en hombres con verrugas genitales (6, 7). Tres estudios que incluyeron hombres donantes de esperma mostraron prevalencias de 26.3, 7.5 y 16%, encontrando diversos genotipos de VPH (7, 8, 9).

La infertilidad se define como la incapacidad de una pareja para concebir después de 1 año de relaciones sexuales sin protección (10). Datos bibliográficos indican que aproximadamente del 10 al 20% de las parejas en edad de reproducción tienen problemas de fertilidad y entre ellos el factor masculino contribuye aproximadamente con el 50% de los casos (11). Varios factores de riesgo se han propuesto para la infertilidad masculina, siendo uno de ellos infecciones de transmisión sexual (11). Datos de prevalencia en estudios focalizados en población infértil realizados en otros países reveló que el VPH era más prevalente en hombres infértiles comparado con hombres fértiles (6, 12, 13, 14). Los resultados del meta-análisis estiman una prevalencia mayor para hombres seleccionados en clínicas de fertilidad sometidos a evaluación que la hallada en hombres de población general (6).

En relación a los estudios que evalúan los parámetros seminales en muestras de semen de hombres VPH positivos se han reportado distintos resultados, con estudios que asocian la infección por VPH con reducción de la movilidad y viabilidad espermática, mientras que otros no reportan estas alteraciones (15-18). Se desconoce si los efectos reportados en los casos en los que la calidad seminal se ve afectada son transitorios y/o si una vez eliminado el virus la calidad seminal se podría restaurarse completamente o no. La mayoría de los estudios no analizan la presencia de VPH concomitante con otras infecciones de transmisión sexual asociadas a la infertilidad como son las infecciones por *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Sin embargo, Cai y colaboradores han reportado menores valores de espermatozoides móviles en pacientes con infección por *Chlamydia trachomatis* y VPH (19). Respecto a los estudios en fertilización in vitro (FIV), se ha demostrado que los espermatozoides absorben las partículas virales preferentemente en la región ecuatorial de la cabeza, aunque se postula que esto no afectaría su potencial de fertilización (20), sin embargo, no existen estudios que indiquen si la infección podría afectar pasos posteriores de la fecundación. En contraposición otros autores han revelado

una asociación significativa entre el VPH y fallas en la fertilización in vitro (21).

En lo que respecta a la prevalencia de infecciones por VPH en pacientes masculinos en nuestro país, existen escasos estudios y sólo realizados en poblaciones específicas de alto riesgo (22, 23, 24). En la provincia de Córdoba no hay, hasta el momento, estudios epidemiológicos en una población como la abordada en el presente proyecto.

## **OBJETIVO**

El objetivo del presente proyecto es abordar el estudio de la epidemiología local de la infección del tracto genital por VPH en pacientes masculinos adultos con diagnóstico de infertilidad que acuden al Laboratorio de Andrología y Reproducción, evaluando la distribución de los genotipos virales presentes en esta población, la presencia de co-infección con agentes bacterianos de transmisión sexual (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma*, *Mycoplasma*) y sus efectos sobre la calidad espermática, para así analizar si la infección por VPH se asocia a consecuencias deletéreas en la fertilidad masculina.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Pacientes:** Se analizaron 79 pacientes masculinos; integrantes de una pareja infértil, de edades comprendidas entre 27-63 años que acudieron al Laboratorio de Andrología y Reproducción (LAR) de la Ciudad de Córdoba durante un año. En la historia clínica de cada paciente, se consideró el hábito de consumo de tabaco y alcohol, cirugías previas, antecedentes de criptorquidea, varicocele, hipertensión, fiebre urleana, esterilidad primaria o secundaria y otros factores de riesgo para la infertilidad.

**CRITERIOS DE INCLUSIÓN:** para el análisis epidemiológico del VPH se incluyeron los 79 pacientes del grupo, pero para los análisis estadísticos de los parámetros seminales, se establecieron 4 categorías: 1) Pacientes VPH positivos sin co-infección (VPH+ COINF-), 2) Pacientes negativos para VPH y negativos para co-infección (VPH- COINF-), 3) Pacientes VPH positivos que además presentaban co-infección con *Chlamydia*, *Ureaplasma* y/o *Mycoplasma* (VPH+ COINF+) y 4) Pacientes VPH negativos que presentaban infección por *Chlamydia*, *Ureoplasma* y/o *Mycoplasma* (HPV- COINF+). En todos los grupos analizados para parámetros seminales se incluyó sólo a los pacientes que cumplieron con una abstinencia previa a la recolección de la muestra de 2 a 7 días.

### **Recolección y Análisis de muestras biológicas:**

Las muestras analizadas consistieron en un “*pool*” o mezcla celular obtenido del Hisopado uretral (HU) y del “*pellet*” del Semen (S) de cada paciente. Las muestras de hisopado uretral fueron tomadas por personal médico y las muestras de semen fueron colectadas por masturbación y posteriormente centrifugadas para obtención de pellet celular.

**Detección de VPH:** El diagnóstico de infección por VPH se determinó mediante PCR en el “*pool*” celular obtenido del Hisopado uretral (HU) y del “*pellet*” del Semen (S) de cada paciente. Se procedió a extraer el ADN genómico utilizando kits de extracción comerciales AccuPrep de acuerdo a las instrucciones del fabricante y conservando posteriormente el ADN genómico a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. La epidemiología molecular de cepas locales de VPH se realizó amplificando la región L1 del genoma viral mediante la utilización de los *primers* MY09 y MY11. El gen  $\beta$ globina fue usado como marcador de preservación de ADN y como control de la técnica. En las muestras ADN positivas se realizó RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de acuerdo a lo reportado por Bernard y col. (25). Brevemente,

alícuotas del producto de PCR obtenidas usando los *primers* degenerados MY09-MY11 fueron mezcladas con 7 enzimas de restricción (Bam HI, He III, Dde I, Pst I, Hinf I, Sau III y Rsa I) en reacciones separadas. Los productos de digestión fueron separados en geles de agarosa y el patrón obtenido comparado con datos publicados, para obtener el genotipo de cada muestra positiva (26, 27, 28).

### **Detección de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* y *Mycoplasma*:**

En las muestras de cada paciente se determinó además la presencia de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. La presencia de *Mycoplasma* se detectó con el equipo comercial *Mycoplast Evolution II*, con el mismo método se observó el desarrollo de *U. urealyticum* siguiendo los criterios del proveedor. La presencia de *C. trachomatis* fue analizada por PCR realizando la amplificación del plásmido críptico y el gen *ompA* (29). Para ello se realizó la extracción de ADN utilizando un equipo comercial (Bioneer. AccuPrep Genomic DNA Extraction) y posteriormente el extracto de ADN fue sometido a una Hemi Nested PCR con los primers SeroA1, SeroA2 y pCTM3 dirigidos contra MOMP como se describe en trabajos previos (29, 30).

**Estudios de calidad seminal:** Los parámetros seminales fueron evaluados

según norma estándar de OMS 2010 con algunas modificaciones (31) y la morfología según criterios estrictos Kruger 1986. Se evaluó para cada muestra volumen, pH, concentración de espermatozoides, motilidad, morfología, vitalidad, test hiposmótico, MAR test, madurez nuclear y presencia de leucocitos en semen. La viabilidad espermática se evaluó luego de la tinción con eosina. La concentración y motilidad espermática se evaluó en cámara de Makler según método convencional, en un microscopio con platina termostatizada. Los espermatozoides móviles totales se clasificaron en porcentaje de espermatozoides rápidos y lentos, según su velocidad y trayectoria (evaluación subjetiva por técnicos entrenados). El recuento de células redondas se realizó en la cámara de Makler y su diferenciación con la tinción de peroxidasa, para discriminar células peroxidasa positivas (leucocitos) de otras células.

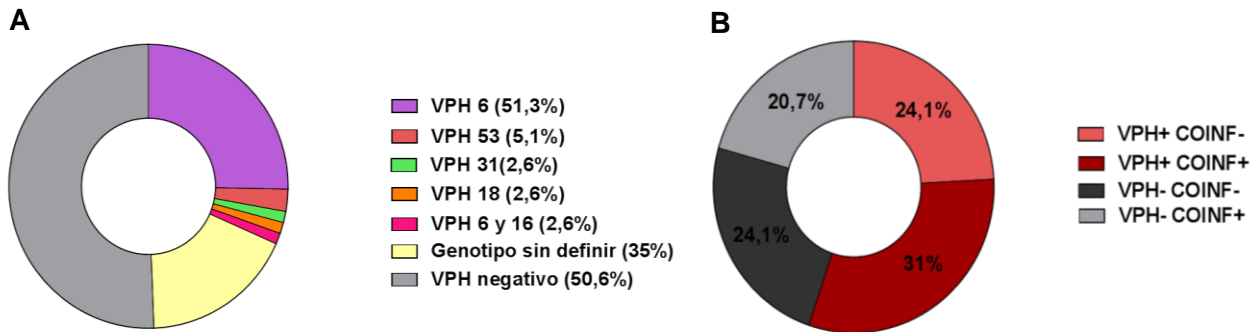
**Análisis estadístico:** Para el análisis estadístico se aplicaron pruebas no paramétricas Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, seguido por test de comparación múltiple de Dunn's en el último caso. Todos

los análisis se realizaron usando el programa GraphPad. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Prevalencia de VPH, genotipos y coinfección en la población de estudio

Un total de 79 pacientes masculinos integrantes de una pareja infértil fueron analizados para determinar la presencia de VPH. La edad media de los pacientes fue de  $37.9 \pm 6.4$  años (un rango entre 28 y 63 años). Se detectó la presencia de VPH en el 49.4% de las muestras, mientras que el 50.6% restante fueron negativas (Figura 1A). De la totalidad de los pacientes el 30.4% mostró una infección simple, es decir la presencia de un único genotipo de VPH, mientras que sólo en una muestra (1.3%) se encontró la presencia de dos genotipos (6/16) (Tabla 1). En cuanto a los genotipos encontrados, el más prevalente fue el VPH-6, presente en el 51.3% de las muestras positivas, seguido por el VPH 53 (5.1%), el VPH 31 (2.6%) y el VPH 18 (2.6%). En el 35% de las muestras positivas no se pudo



**Figura 1:** Prevalencia de VPH en pacientes masculinos integrantes de una pareja infértil. A) Prevalencia de VPH y genotipos encontrados. B) Presencia de VPH y coinfección con *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* y/o *Ureaplasma*.

definir el genotipo por esta metodología (Figura 1A).

Estudios realizados por otros autores en relación a la prevalencia de VPH en pacientes infértiles han arrojado valores menores a los hallados en nuestro estudio. Yang y col. analizaron muestras de semen de pacientes infértiles del Norte de China por la técnica de “*Liquid bead microarray*” (LBMA) y encontraron valores de 17.4% siendo los genotipos más hallados en su estudio y en orden decreciente los VPH-45,-16, -52,-18/59 y 33 (13). Damke y col, por su parte, analizaron el semen de varones de parejas infértiles de Brasil, dónde la incidencia de VPH fue del 16.6% (15). El genotipo más prevalente en su estudio fue el VPH-16 (23.7%), seguido por los genotipos 61 (15.8%), 82 (13.2%) y 58 y 72 (10.5%). Tanto la incidencia, como los genotipos de VPH encontrados en nuestro estudio difieren a los hallados en los antes

citados. Es posible que una de las causas del mayor valor de detección sea debida al tipo de muestra analizada en nuestro estudio (un *pool* de hisopado uretral y semen), la cual nos permitiría ampliar las posibilidades de hallar el VPH. Estudios que han analizado la presencia de VPH en distintos sitios anatómicos del tracto masculino, han demostrado que semen es la muestra que menores valores arroja, mientras que cepillado de pene sería la muestra de mayor posibilidad de detección (5, 32). Es importante notar que el genotipo de mayor prevalencia en nuestro estudio fue el genotipo 6, asociado a verrugas genitales, hallazgo que podría relacionarse a la muestra analizada (hisopado uretral + semen). En concordancia con los resultados de Damke y colaboradores quienes demostraron que los genotipos de VPH de alto riesgo fueron detectados en su mayoría en infecciones múltiples (15), nuestros resultados demostraron que la única

**TABLA 1 :Detección de VPH en las muestras y genotipos encontrados**

| <b>Presencia de HPV en muestras</b>                | <b>n</b>  | <b>porcentaje</b> |
|--|-----------|-------------------|
| ADN VPH positivo                                   | 39        | 49,4              |
| ADN VPH Negativo                                   | 40        | 50,6              |
| Mono infección por VPH(6,53,31,18)                 | 24        | 30,4              |
| Múltiples genotipos de VPH ( 6 y 16)               | 1         | 1,3               |
| Genotipos de riesgo intermedio-alto (53*,31,18,16) | 5         | 6,3               |
| Genotipos de bajo riesgo (6)                       | 20        | 25,3              |
| Genotipo sin definir                               | 14        | 17,7              |
| <b>Muestras totales analizadas</b>                 | <b>79</b> | <b>100,0</b>      |

\*Genotipo 53 encontrado en 2 muestras

muestra con infección múltiple, presentaba el genotipo 16 de alto riesgo. Las diferencias halladas en relación a la distribución de los genotipos en estudios de distintas zonas geográficas, remarca nuevamente la importancia de los estudios locales en la infección por VPH.

Además de analizar la presencia del VPH, nos propusimos investigar si los pacientes presentaban co-infecciones con *Chlamydia Trachomatis*, *Ureaplasma* y *Mycoplasma*, patógenos bacterianos de transmisión sexual frecuentemente encontrados en el tracto genito-urinario masculino de pacientes infértiles (11). Encontramos que el 24.1% de los pacientes VPH+ no presentaban co-infecciones, mientras que el 31% si lo hacían (Figura 1B). Resultados analizados en un meta-análisis de Ye y col

revelaron que *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum* se asociaban con un riesgo significativamente mayor de infección por VPH, y que, a su vez, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma genitalium* estaban fuertemente asociados a infecciones por VPH de alto riesgo (33). En nuestros resultados el 31% de las muestras positivas para VPH también presentaban una co-infección por uno o más de estos patógenos bacterianos, de los cuales el más frecuentemente encontrado fue *Ureaplasma*, seguido por *Mycoplasma*. Como se puede observar en la Tabla 1 en nuestro estudio detectamos 5 casos de VPH de riesgo Alto/Intermedio, llamativamente estos casos positivos para VPH de riesgo intermedio/alto cursaban con alguna co-infección de *Chlamydia*, *Ureaplasma* y/o



*Mycoplasma*. Por otro lado, todos los pacientes pertenecientes al grupo VPH+COINF- presentaban infecciones por VPH genotipo 6 de bajo riesgo y de un único genotipo.

### **Análisis de los parámetros seminales en pacientes con infección por VPH con o sin co-infecciones en la población de estudio**

Además de realizar el estudio de prevalencia, analizamos si la infección por VPH se asociaba a alteraciones en la calidad seminal. Debido a que infecciones bacterianas por *Chlamydia Trachomatis*, *Ureaplasma* y *Mycoplasma* se han asociado a alteraciones de distintos parámetros de calidad seminal, decidimos dividir a los pacientes en 4 grupos. En la Figura 1B se han representado los cuatro grupos de pacientes: individuos VPH+COINF- (n=14),

VPH+COINF+ (n=18), VPH-COINF+ (n=12) y VPH-COINF- (n=14). El análisis de diferentes parámetros seminales se puede observar en la Tabla 2.

Como se puede observar en la Tabla 2 no se encontraron diferencias significativas entre grupos en los valores de pH o volumen seminal. Los valores de volumen seminal mostraron una tendencia a números mayores en el grupo VPH-COINF+ respecto al VPH+COINF- ( $p=0,0504$ ), (Tabla 2, Figura 2A). Debido a que más del 40% del volumen seminal es aportado por las glándulas accesorias (vesículas seminales y próstata), consideramos que sería importante evaluar en el futuro la funcionalidad de estas glándulas mediante las determinaciones bioquímicas de fructuosa y ácido cítrico. En relación a la concentración de espermatozoides y su viabilidad no se encontraron diferencias

**TABLA 2: Parámetros de calidad seminal en pacientes infértiles con infección por VPH**

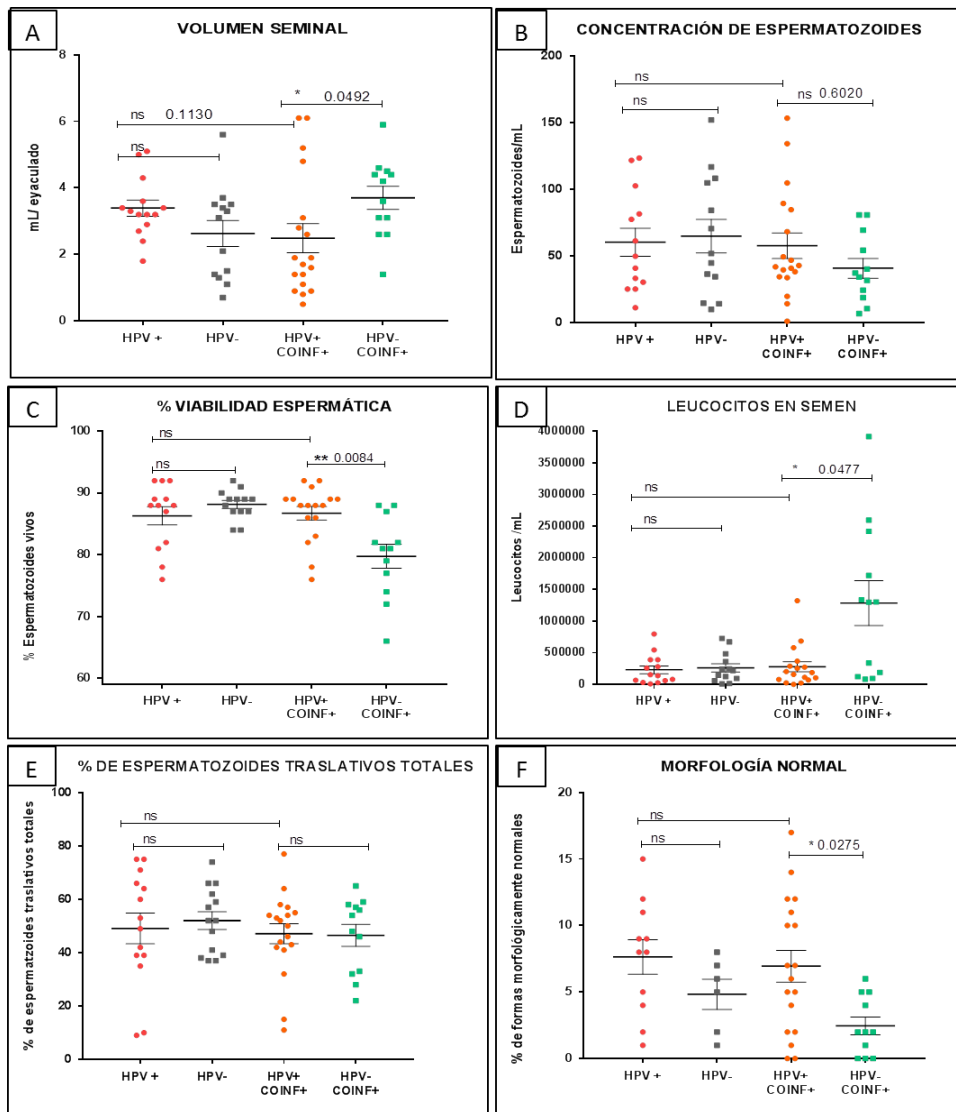
| Parámetros de calidad seminal                           | HPV+                   | HPV-                   | HPV+COINF+             | HPV-COINF+               | p        |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|----------|
|   | media (IC 95%)         | media (IC 95%)         | media (IC 95%)         | media (IC 95%)           |          |
| Volumen (mL)  | 3,393 (2,868-3,917)    | 2,631 (1,782-3,479)    | 2,489 (1,574-3,404)    | 3,7 (2,935-4,465)        | 0,0504   |
| pH  | 7,7 (7,663-7,737)      | 7,696(7,66-7,731)      | 7,619 (7,517-7,721)    | 7,7 (7,649-7,751)        | 0,5503   |
| Concentración de espermatozoides/mL                     | 60,25 (37,33-83,18)    | 64,76 (37,4-92,12)     | 57,58 (37,26-77,9)     | 40,68 (24,46-56,89)      | 0,4468   |
| Porcentaje de viabilidad de espermatozoides             | 86,31(83,08-89,54)     | 88,15(86,72-89,59)     | 86,71(84,37-89,04)     | 79,75 (75,5-84)          | **0,0032 |
| Porcentaje de espermatozoides traslativos totales       | 49,07 (36,61-61,53)    | 52 (44,83-59,17)       | 47,11 (39,23-55)       | 46,5 (37,46-55,54)       | 0,8652   |
| Porcentaje de espermatozoides traslativos rapidos       | 36 (24,47-47,53)       | 37,36 (30,31-44,41)    | 30,39 (23,63-37,14)    | 29,25 (21,79-36,71)      | 0,3706   |
| Porcentaje de espermatozoides traslativos lentos        | 13,07 (10,46-15,68)    | 14,64 (12,38-16,9)     | 16,72 (14,14-19,31)    | 17,25 (14,2-20,3)        | 0,0905   |
| Porcentaje de espermatozoides traslativos "in situ"     | 0,1538 (-0,1814-0,489) | 0,6923(0,1027-1,487)   | 1,333 (0,05692-2,61)   | 3,167 (1,435-4,898)      | **0,0065 |
| Porcentaje de espermatozoides inmóviles                 | 34,79 (25,81-43,76)    | 34,29 (28,45-40,12)    | 37,06 (31,14-42,97)    | 30,08 (21,93-38,24)      | 0,5064   |
| Porcentaje de morfología normal                         | 7,636 (4,75-10,52)     | 4,833 (1,909-7,758)    | 6,944 (4,429-9,46)     | 2,455(0,9716-3,938)      | **0,0211 |
| Concentración de Leucocitos/mL                          | 230357 (96719-363995)  | 261346 (117998-404694) | 278441 (109205-447678) | 1284500 (507870-2061130) | *0,0411  |
| Test Hipoosmotico: % de formas reactivas                | 79 (75,68-82,32)       | 78,4 (66,67-90,13)     | 78,91 (75,75-82,07)    | 77,88 (70,5-85,25)       | 0,9714   |
| Mar Test: % de espermatozoides con anticuerpos tipo IgG | 1,6 (1,231-1,962)      | 1,8 (1,245-2,355)      | 5,373(-2,143-12,89)    | 1,625 (1,192-2,058)      | 0,2317   |
| Porcentaje de núcleos maduros                           | 78,56 (73,5-83,61)     | 72,4 (67,39-77,41)     | 79,45(76,17-82,74)     | 69,75 (62,44-77,06)      | *0,0157  |

significativas en los pacientes VPH+ y VPH-. Se observaron menores valores de concentración y viabilidad de espermatozoides en el grupo VPH-COINF+ sugiriendo que las infecciones por *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Ureaplasma* tienen mayores consecuencias en estos parámetros cuando se compara con la infección por VPH (Tabla 2, Figura 2B y C).

En cuanto a la movilidad de los espermatozoides y el análisis de movilidad total, traslativos rápidos o traslativos lentos los pacientes VPH+ no mostraron diferencias con los individuos VPH-, aunque si se observó un menor porcentaje de movilidad "in situ" de los espermatozoides del grupo VPH+COINF+ respecto al grupo VPH-COINF+. La bibliografía muestra resultados variados en relación a alteraciones en la movilidad de espermatozoides en pacientes VPH+, con estudios que indican alteraciones y otros que no reportan cambios en pacientes VPH+ (13, 14, 15, 16, 20). Foresta y colaboradores (20) demostraron que los espermatozoides absorben las partículas virales preferentemente en la región ecuatorial de la cabeza, mientras que Lai y colaboradores (16) demostraron que la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza fue significativamente menor en las muestras infectadas por el VPH.

Estos resultados podrían explicar parcialmente las alteraciones en la menor movilidad "in situ" observada en nuestro estudio. Sin embargo, un número mayor de pacientes y el análisis de co-infecciones son necesarios para poder conocer con certeza si la infección por VPH conduce a alteraciones seminales significativas.

Al igual que en el análisis de concentración espermática, las mayores alteraciones en movilidad se encontraron en los individuos VPH-COINF+, sugiriendo que las infecciones por *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Ureaplasma* tienen mayores consecuencias en la movilidad espermática que la infección por VPH (Tabla 2, Figura 2 E). Paradójicamente se encontró una tendencia al incremento de formas morfológicamente normales en los pacientes HPV+COINF- respecto a los HPV-COINF- y el mismo efecto, aunque estadísticamente significativo ( $p=0,0275$ ) entre los pacientes HPV+COINF- respecto a HPV-COINF+ (Figura 2 F). Resultados similares fueron hallados en los trabajos de Schillaci y Garolla (18, 21), mientras que otros autores no encontraron afectada la morfología de los espermatozoides por la infección por VPH (14). Finalmente, no se observó aumento en leucocitos en semen asociados a la infección por VPH (Tabla 2, Figura 2D), observándose nuevamente valores



**Figura 2:** Parámetros seminales en pacientes VPH positivos con y sin confesión con *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* y/o *Ureaplasma*. A) Volumen seminal, B) Concentración de espermatozoides, C) Viabilidad espermática, D) Concentración de leucocitos en semen, E) Porcentaje de EspermatozoidesTraslativos totales F) Porcentaje de espermatozoides con Morfología Normal (criterio estricto).

elevados asociados a infecciones por *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. La falta de leucospermia en la infección por VPH también ha sido reportada por Bezold y colaboradores (34).

## CONCLUSIÓN:

En nuestro estudio, el 49.4% de las muestras de pacientes infértiles fueron positivas para VPH. La distribución de los genotipos encontrados fue, en orden decreciente VPH 6 (51.3%), VPH 53 (5.1%), VPH 31 (2.6%) y VPH 18 (2.6%), VPH 6/16

(2,6%). El 31% de los pacientes VPH+ presentó co-infecciones por *Chlamydia*, *Ureaplasma* y/o *Mycoplasma*, encontrándose en este grupo los 5 casos de VPH de riesgo Alto/Intermedio. Al realizar el análisis de diferentes parámetros de calidad seminal los pacientes infértiles VPH+ no mostraron alteraciones significativas ni en la concentración de espermatozoides, ni en su viabilidad, morfología o movilidad. Tampoco encontramos presencia de marcadores inflamatorios asociados a la infección por VPH, lo cual nos permite sugerir que el VPH presente como único agente infeccioso no afectaría significativamente la fertilidad masculina ni induciría una inflamación local importante.

**FINANCIAMIENTO:** Este trabajo ha sido financiado con subsidios de las siguientes Instituciones Secyt-UNC 2016-2017, PODO MINCYT CBA 2017, PICT 2014-1544.

**AGRADECIMIENTOS:** A la memoria de Marina Monetti † quien participó, en su momento, en el procesamiento de las muestras realizando la extracción de ADN. A las Bioquímicas Andrea Tissera y Rosa Molina del Laboratorio de Andrología y Reproducción quienes recolectaron las muestras de los pacientes y aportaron los datos de calidad seminal.

## BIBLIOGRAFIA:

- 1) Dunne E F, Nielson C M, Stone K M . (2006). "Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature". *J Infect Dis* ; 194 (8): 1044-57.
- 2) Doorbar J., Egawa N., Griffin H. (2016) "Human papillomavirus molecular biology and disease association" *Rev. Med. Virol.* 2016; 25.
- 3) Dunne EF, Park IU. (2013) "HPV and HPV-associated diseases". *Infect Dis Clin North Am.* 2013 27: 765–78.
- 4) Palefsky JM. (2010). "Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue". *J Adolesc Health.* 46(4 Suppl):S12-9. Review.
- 5) Giuliano AR, Nielson CM, Flores R, Dunne EF, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Markowitz LE, Smith D, Harris RB. (2007). "The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study". *J Infect Dis.* 196(8):1146-52.
- 6) Laprise C, Trottier H, Monnier P, Coutlée F, Mayrand MH.(2014) "Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-

- analysis". *Hum Reprod.* 29(4):640-51.
- 7) Olatunbosun O, Deneer H, Pierson R. (2001) "Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction". *Obstet Gynecol* ;97:357–360.
  - 8) Kaspersen MD, Larsen PB, Ingerslev HJ, Fedder J, Petersen GB, Bonde J, Hollsberg P. (2011) "Identification of multiple HPV types on spermatozoa from human sperm donors". *PLoS ONE*.
  - 9) Kaspersen MD, Bungum M, Fedder J, Bonde J, Larsen PB, J Ingerslev H, Hollsberg P. (2013) . "No increased sperm DNA fragmentation index in semen containing human papillomavirus or herpes virus". *Andrology*;1:361–364.
  - 10) Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. (2015) "A unique view on male infertility around the globe". *Reprod Biol Endocrinol*.13:37.
  - 11) Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJ, Maria-Engler SS, Bonini MG, Consolaro ME.(2014). "Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat Rev Urol*.; 11(12):672-87.
  - 12) Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, Ruvolo G, Fiorentino FP, Alimondi P, Cefalu E, Ammatuna P.(2011). "Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes." *Fertil Steril* ;95:1845–1848.
  - 13) Yang Y, Jia CW, Ma YM, Zhou LY, Wang SY.(2013) "Correlation between HPV sperm infection and male infertility." *Asian J Androl.*; 15:529–32.
  - 14) Foresta C, Ferlin A, Bertoldo A, Patassini C, Zuccarello D, Garolla A. (2011) "Human papilloma virus in the sperm Cryobank: an emerging problem?". *Int J Androl* 2011;34:242–246.
  - 15) Damke E, Kurscheidt FA, Balani VA, Takeda KI, Irie MMT, Gimenes F, Consolaro MEL. (2017). "Male Partners of Infertile Couples with Seminal Infections of Human Papillomavirus Have Impaired Fertility Parameters." *Biomed Res Int*. 2017:4684629.
  - 16) Lai YM, Lee JF, Huang HY, Soong YK, Yang FP, Pao CC. (1997) "The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility". *Fertil Steril*.;67:1152–5.
  - 17) Luttmer R, Dijkstra MG, Snijders PJ, Hompes PG, Pronk DT, Hubeek I, Berkhof J, Heideman DA, Meijer CJ.

- (2016) "Presence of human papillomavirus in semen in relation to semen quality." *Hum Reprod.* 31(2):280-6.
- 18) Schillaci R, Capra G, Bellavia C, Ruvolo G, Scazzone C, Venezia R, Perino A. (2013) "Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples." *Fertil Steril.*;100(5):1236-40.
- 19) Cai T, Wagenlehner FM, Mondaini N, D'Elia C, Meacci F, Migno S, Malossini G, Mazzoli S, Bartoletti R. (2014). "Effect of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis co-infection on sperm quality in young heterosexual men with chronic prostatitis-related symptoms." *BJU Int.*113(2):281-7.
- 20) Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G. (2010) "Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility." *Fertil Steril.* 93(3):802-6.
- 21) Garolla A, Engl B, Pizzol D, Ghezzi M, Bertoldo A, Bottacin A, Noventa M, Foresta C. (2015) "Spontaneous fertility and in vitro fertilization outcome: new evidence of human papillomavirus sperm infection." *Fertil Steril.* 105(1):65-72.
- 22) Pando MA, Balán IC, Marone R, Dolezal C, Leu CS, Squiquera L, Barreda V, Fermepín MR, Gallo Vaulet L, Rey J, Picconi M, Carballo-Diéguez A, Avila MM.(2012) "HIV and other sexually transmitted infections among men who have sex with men recruited by RDS in Buenos Aires, Argentina: high HIV and HPV infection". *PLoS One.* 7(6):e39834.
- 23) Venezuela F, Kremer LE, Kiguen X, Cuffini C. (2010). "HPV detection and genotyping in males from the city of Córdoba, Argentina." *Rev.Arg. Microbiol.*
- 24) Dos Ramos Farías MS, Picconi MA, Garcia MN, González JV, Basiletti J, et al. (2011) Human Papilloma virus genotype diversity of anal infection among trans (male to female transvestites, transsexuals or transgender) sex workers in Argentina. *J Clin Virol* 51: 96–99.
- 25) Bernard HU, Chan SY, Mannos MM, Ong CK. (1994). "Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by PCR amplification, restriction fragment length polymorphism, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms." *J Infect Dis.* 170: 10077-85.

- 26) Venezuela F, Kiguen X, Frutos MC, Cuffini C.(2012). " Circulation of Human Papilloma Virus (HPV) genotypes in women from Cordoba, Argentine, with squamous intraepithelial lesions." *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 54(1):11-16.
- 27) Venezuela RF, Monetti M, Kiguen AX, Frutos MC, Mosmann JP, Cuffini C. Knowledge of the General Community in Cordoba, Argentina, on Human Papilloma Virus Infection and its Prevention. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016; 17 (5), 2689-2694.
- 28) Venezuela RF, Talavera A, Frutos MC, Kiguen AX, Monetti MS, Sollazo M, Panico R, Ferreyra de Prato R, Cuffini CG. Detection of Human Papillomavirus (Hpv) In Oral Cavity Lesions: Comparison With Conventional Risk Factors. *J. of Microbiol Res* 2013; 3: 3-5.
- 29) Black J., Carolyn M (1997). "Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections." *Clinical Microbiology Reviews.* 10 (1):160-184.
- 30) Warford A, Chernesky M, Peterson E. (1999) "Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections, Cumulative Techniques and procedures in Clinical Microbiology".
- 31) World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 5th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2010
- 32) Luttmmer R, Dijkstra MG, Snijders PJF. (2015) "Presence of human papillomavirus in semen of healthy men is firmly associated with HPV infections of the penile epithelium". *Fertil Steril.* 104(4):838-844.e8.
- 33) Ye H, Song T, Zeng X, Li L, Hou M, Xi M.(2018) "Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis" *Arch Gynecol Obstet.* 297(6):1377-1387.
- 34)Bezold G, PolitchJA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. (2007). "Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia.". *Fertil Steril.* 87(5):1087-97.