



## Detección del virus del papiloma humano tipos 16 y 18 en muestras de semen de pacientes de un programa de reproducción asistida\*

Ignacio Flores-Sánchez,\* José Gutiérrez-Salinas,\*\* Evangelina Enriquez-Alvarado,\*\*\* Sergio Hernández Rodríguez,\*\* Claudia Ramos-Barragán,\*\*\*\* Alejandra Salamanca-Ceciliano,\*\*\*\* Leticia Cruz Tovar,\*\* Sigrít Suástegui-Domínguez\*\*

Nivel de evidencia: II-1

### RESUMEN

**Antecedentes:** la infección por el virus del papiloma humano es un problema mundial de salud asociado con el cáncer cervicouterino, sobre todo con la infección de cepas de alto riesgo (tipos 16 y 18). La infección genital por este tipo de virus suele pasar inadvertida por el hombre, que puede infectar a su pareja sexual.

**Objetivo:** detectar VPH-16 y VPH-18 en el semen de pacientes de un protocolo de reproducción asistida.

**Material y método:** estudio retrospectivo efectuado con base en el reporte de muestras de semen de 149 pacientes de un protocolo de reproducción asistida de nuestra institución. Las muestras se analizaron siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud para detectar VPH-16 y VPH-18 con PCR en tiempo real y equipos comerciales. También se analizaron con técnicas histológicas convencionales, para evaluar la forma de los espermatozoides y la cantidad de leucocitos.

**Resultados:** se analizaron 149 muestras de semen de pacientes con edad promedio de 37.27 años (límites 22 y 56 años). El 56.18% tuvo oligozoospermia y 59.73% resultaron positivos para VPH-16 (29.56%), VPH-18 (16.11%) o ambos (14.09%). La infección con VPH-16 fue más frecuente en los pacientes con oligozoospermia y normozoospermicos. Estos últimos tuvieron menor cantidad de espermatozoides anormales y de leucocitos en comparación con los oligozoospermicos.

**Conclusiones:** existe un porcentaje importante de hombres asintomáticos con positividad seminal para papilomavirus de alto riesgo para su pareja sexual por lo que representan un problema de salud pública que debe atenderse.

**Palabras clave:** análisis de semen, normozoospermia, oligozoospermia, PCR, virus del papiloma humano.

### ABSTRACT

**Background:** The infection with human papillomavirus (HPV) represents a serious health problem in the world. This is because are associated with cervical cancer development in when HPV of high-risk type 16 and 18 are involved. A genital infection by these virus types are normally asymptomatic in the male and an infection to sexual partner is possible.

**Objective:** The objective of the present is the detection of HPV-16 and HPV-18 in semen samples from patients included in an assisted reproduction protocol.

**Material and method:** Semen samples were obtained from 149 patients that are included in an assisted reproduction protocol in our institution. Semen was examined according with WHO criteria and detection of HPV-16 and HPV-18 was realized with real time PCR protocol with commercial kits. Also, conventional histology techniques were used to assess spermatozoo morphology and leukocyte count.

**Results:** 149 semen samples were analyzed from patients with an age average 37.27 (22-56 age). The 56.18% present oligozoospermic and take into account all patients, 59.73% was positive for HPV-16 (29.56%), HPV-18 (16.11%) or both (14.09%). The infection with HPV-16 was more frequent in both oligozoospermic and normozoospermic patients. In this latter, a minus abnormal spermatid cells and leukocytes were found in regard to oligozoospermic patients.

**Conclusions:** There is an important percentage off human asymptomatic male subjects that present in your semen a positive result for high risk papillomavirus. This is very important for the sexual partner because this represent a problem for public health that most be in attention.

**Key words:** semen analysis, normozoospermic, oligozoospermic, PCR, human papillomavirus.

## RÉSUMÉ

**Antécédents:** l'infection par le virus du papillome humain est un problème mondial de santé associé avec le cancer du col utérin, surtout avec l'infection de cèpes haut risque (types 16 et 18). L'infection génitale par ce type de virus d'habitude passe inaperçue par l'homme, qui peut infecter son couple sexuel.

**Objectif:** détecter VPH-16 et VPH-18 dans le sperme de patients d'un protocole de reproduction assistée.

**Matériel et méthode:** étude rétrospective basée sur le rapport d'échantillons de sperme auprès de 149 patients d'un protocole de reproduction assistée de notre institution. Les échantillons ont été analysés en suivant les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé pour détecter VPH-16 et VPH-18 avec PCR en temps réel et équipes commerciaux. On les a analysés aussi avec des techniques histologiques conventionnelles, afin d'évaluer la forme des spermatozoïdes et la quantité de leucocytes.

**Résultats:** On a analysé 149 échantillons de sperme de patients avec une moyenne d'âge de 37.27 ans (limites 22 et 56 ans). Le 56% a eu oligozoospermie et 59.73% a résulté positif pour VPH-16 (29.56%), VPH-18 (16.11%) ou les deux (14.09%). L'infection avec VPH-16 a été plus fréquente chez les patients avec oligozoospermie et normozoospermiques. Ces derniers ont eu une moindre quantité de spermatozoïdes anormaux et de leucocytes en comparaison avec les oligozoospermiques.

**Conclusions:** il existe un pourcentage important d'hommes asymptomatiques avec positivité séminale pour papillomavirus de haut risque pour son couple sexuel, pour cela ils représentent un problème de santé publique qui doit être traité.

**Mots-clés:** analyse du sperme, normozoospermie, oligozoospermie, PCR, virus du papillome humain.

## RESUMO

**Antecedentes:** A infecção pelo vírus HPV é um problema mundial de saúde associado com o câncer cérvico-uterino, sobre tudo com a infecção de cepas alto risco (tipos 16 e 18). A infecção genital por este tipo de vírus pode passar inadvertida pelo homem, que pode infectar a sua companheira sexual.

**Objetivo:** Detectar HPV-16 e HPV-18 no sêmen de um protocolo de reprodução assistida.

**Material e método:** Estudo retrospectivo efetuado com base no comunicado de amostras de sêmen a 149 pacientes de um protocolo de reprodução assistida de nossa instituição. As amostras foram analisadas seguindo os critérios da Organização Mundial de Saúde para detectar HPV-16 e HPV-18 com PCR em tempo real e equipes comerciais. Também foram analisadas com técnicas histológicas convencionais, para avaliar a forma dos espermatozoides e a quantidade de leucócitos.

**Resultados:** Foram analisadas 149 amostras de sêmen de pacientes com idade média de 37,27 anos (limites 22 e 56 anos). Em 56,18% tiveram oligozoospermia e 59,73% resultaram positivos para HPV-16 (29,56%), HPV-18 (16,11%) ou ambos (14,09%). A infecção HPV-16 foi mais frequente nos espermatozoides anormais e de leucócitos em comparação com os oligozoospermicos.

**Conclusões:** Existe uma porcentagem importante de homens assintomáticos com positividade seminal para o vírus do papiloma de alto risco para a companheira sexual o qual representam um problema de saúde pública que se deve atender.

**Palavras-chave:** análise de sêmen, normozoospermia, oligozoospermia, PCR, vírus do papiloma humano.

- 
- \* Médico adscrito, Biología de la Reproducción Humana.
  - \*\* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica.
  - \*\*\* Laboratorio de Pruebas Especiales, Sección Hormonas.
  - \*\*\*\* Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica, Departamento de Vigilancia Epidemiológica.  
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, DF.

Correspondencia: Dr. Ignacio Flores Sánchez. Av. San Lorenzo 501, primer piso, colonia Del Valle, México 03100, DF. Correo electrónico: drignacioflores@yahoo.com.mx

Recibido: agosto, 2010. Aprobado: octubre, 2010.

\* Artículo premiado con el primer lugar al trabajo científico Dr. Luis Castelazo Ayala presentado en el LXI Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia 2010, que se celebró en la ciudad de Chihuahua los pasados 26 al 30 de octubre.

Este artículo debe citarse como: Flores-Sánchez I, Gutiérrez-Salinas J, Enriquez-Alvarado E, Hernández-Rodríguez S y col. Detección del virus del papiloma humano tipos 16 y 18 en muestras de semen de pacientes de un programa de reproducción asistida. Ginecol Obstet Mex 2010;78(12):645-651.

El virus del papiloma humano (VPH) es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes en el mundo. Se estima que al menos 50% de los adultos sexualmente activos han padecido VPH genital.<sup>1</sup> La frecuencia es diversa, quizá debido a verdaderas diferencias poblacionales o a los enfoques y estrategias utilizados para detectar el VPH. Así, en un estudio multicéntrico mundial, mediante ADN viral, se encontró que 87 a 94.7% fueron positivos a cualquier tipo de VPH y para el tipo 16 se detectaron 34.7 a 59.6% y del tipo 18 de 4.1 a 15.1%.<sup>2</sup>

Las manifestaciones clínicas varían según el sitio, huésped y tipo de virus, aunque casi todas son asintomáticas, situación que dificulta su detección por estudios clínicos rutinarios; por eso se identifican con técnicas moleculares.

A partir del decenio de 1980, la interacción de estudios epidemiológicos y moleculares demostró que la infección cervical persistente con VPH oncogénicos causaba la

neoplasia intraepitelial cervical y el cáncer cervicouterino. Así, Walboomers y colaboradores<sup>3</sup> reportaron que el cáncer cervicouterino invasor se asocia con VPH en 99.7%. Las variantes 16, 18, 31,33, 35, 39, 45,51, 52, 56, 58, 59 y 68 se consideran de alto riesgo porque se asocian con cáncer cervicouterino en más de 95% de los casos.<sup>4,5,6</sup>

En la actualidad, el conocimiento de la interacción de los factores del huésped y del virus en la patogénesis del cáncer cervicouterino permite entender la persistencia de la infección, su carcinogénesis y la progresión tumoral. Así, se ha descrito que las mujeres con infección por VPH tienen una probabilidad 11 veces mayor de llegar a padecer una neoplasia intraepitelial cervical que quienes no la tienen.<sup>7</sup>

La edad a la primera relación sexual y el número de parejas sexuales (seis o más parejas) son factores indicadores de riesgo de infección por el VPH. Así, el inicio de relaciones sexuales (también conocido como inicio de la vida sexual) a los 17 años tiene un riesgo cinco veces mayor que en varones con inicio de la vida sexual a los 23 años y en mujeres con más de tres compañeros sexuales tiene tres veces más riesgo de adquirir el VPH.<sup>8,9</sup>

Debido a la estrecha relación del VPH con el cáncer cervicouterino, la información sobre detección del virus y su patogénesis se ha dirigido, fundamentalmente, a las mujeres, aunque el hombre desempeña un papel muy importante como transmisor de virus oncogénicos y no está exento de alguna lesión premaligna o maligna de pene o en la región anogenital.

Su frecuencia también es variable y su repercusión en la salud general y salud reproductiva aún no es cuantificable. En un reporte de muestras de uretra y prepucio obtenidas de estudiantes y trabajadores mexicanos sexualmente activos se encontró 42.7% de positividad para el VPH<sup>10</sup> mientras que en otro estudio, el VPH tipo 16 se identificó en 17% de biopsias de tumores de vejiga en varones y el tipo 18 en 14% del total de mujeres y varones y ambos tipos se han encontrado en 71% de las biopsias de pacientes con carcinoma de células escamosas en el pene.<sup>11,12</sup> Asimismo, en varones con alta prevalencia de uretritis, verrugas genitales, herpes genital e infecciones por *Chlamydia* se han aislado varios tipos de virus en muestras de piel del pene, como los tipos oncogénicos 16, 52, 59 y no oncogénicos 6, 53, 84, entre otros.<sup>13</sup>

Puesto que los tipos VPH 16 y 18 revisten gran importancia en la salud, el propósito de este trabajo es observar

la prevalencia de estos virus en muestras de semen de varones que están en un protocolo de la pareja infértil que acuden al servicio de Biología de la Reproducción Humana del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE y valorar su posible repercusión en la cuenta espermática, evaluada mediante una espermatobioscopia directa, de acuerdo con parámetros de la Organización Mundial de la Salud.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se incluyeron 149 pacientes masculinos provenientes de la consulta de Biología de la Reproducción de nuestra institución que están en un protocolo de estudio con fines de reproducción asistida. El protocolo incluye la toma de muestra de semen para estudio de espermatobioscopia directa de acuerdo con los parámetros de la OMS que registran: volumen total, cantidad de espermatozoides, pH y movilidad.<sup>14</sup> A todos los pacientes se les realizó su historia clínica completa y estudios generales de laboratorio. En todos los casos estudiados, la exploración física no reveló ningún signo de lesión genital compatible con lesiones causadas por el virus del papiloma humano.

Después del estudio de espermatobioscopia directa, el semen restante se usó para la determinación de ADN viral correspondiente al VPH-16 y VPH-18 y para la detección de leucocitos y morfología de los espermatozoides. Todos los procedimientos se apegaron a las normas institucionales para atención y tratamiento de los pacientes y las muestras biológicas de acuerdo con la normatividad vigente.

### Análisis de PCR para detectar VPH-16 y VPH-18

La detección de ADN viral de las muestras de semen con VPH-16 y VPH-18 se hizo con PCR en tiempo real (PCR-rt, por sus siglas en inglés), previa extracción del ADN de las muestras y utilizando equipos comerciales y, posteriormente, haciendo la tipificación correspondiente.

La extracción y purificación del ADN total de las muestras de semen se realizó con un equipo comercial (DNA-isolation kit, Roche-Applied-Science, USA) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En síntesis, se realizó lo siguiente: se agregó una muestra de semen total (100 µL) a un volumen (500 mL) de solución amortiguadora de lisis y luego proteinasa K y se incubaron a 56°C durante tres horas. El ADN se extrajo

con el método de columnas y soluciones caotrópicas. El ADN resultante se diluyó con agua desionizada y se cuantificó por espectroscopia y se revisó su integridad mediante una corrida en gel de agarosa (1%) teñido con bromuro de etidio.<sup>15</sup> Luego de extraer y purificar el ADN total, se realizó una amplificación genómica con iniciadores-consenso mediante PCR en tiempo real (PCR-rt) con sondas específicas de hibridización incluidas en equipos comerciales (HPV-16 y HPV-18 Primer-Design kit, Ltd, USA) siguiendo las instrucciones incluidas en el equipo y haciendo la ampliación-detección en un termociclador tipo Light Cycler 1.5 (Roche Instruments, EUA) tal como se describió previamente y que tiene un rango dinámico de detección mayor de 98% y detecta menos de 100 copias por muestra.<sup>16</sup>

Se realizó una primera amplificación de sitios consenso de la región L1 para VPH con 5 µg de ADN total por cada muestra. Se agregan 45 µL de mezcla de reacción de PCR-rt (PrimerDesign 2x Precisión MasterMix) y la mezcla se colocó en el Light Cycler con programa integrado de ciclos de amplificación, según las instrucciones para cada equipo. Los resultados se reportan como positivos o negativos dependiendo de las respectivas curvas de amplificación y tomando en cuenta los estándares internos que se incluyen en cada equipo, que asegura la correcta tipificación de los virus.<sup>17,18</sup>

#### **Análisis de la estructura de los espermatozoides, detección y conteo de leucocitos**

Para analizar la estructura de los espermatozoides y el conteo de los leucocitos en cada muestra, se prepararon frotis de semen total de la siguiente manera: en un portaobjetos se colocó una alícuota de semen (25 µL) y se realizó el frotis, tal como se procede para un frotis de sangre. La muestra se esparció a lo largo del portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se realizaron las técnicas histológicas de azul de toluidina para analizar la estructura de los espermatozoides.<sup>19</sup> Las laminillas se fijan en 96% de etanol-acetona (1:1) durante 30 minutos. Inmediatamente se sumergen en 0.1 N de HCl durante cinco minutos y se lavan dos veces con agua bidestilada por espacio de cinco minutos cada vez. Las muestras se sumergen en una solución de azul de toluidina (0.05% en solución amortiguadora de citratos tipo McIlvain, pH 3.5) durante diez minutos y se lavan una vez por inmersión en agua bidestilada dejándose

secar a temperatura ambiente para finalmente colocar un cubreobjetos permanente.

Las muestras se evalúan con un microscopio óptico (Hund-Wetzlar V300, Germany) con un objetivo 40x. Para analizar la estructura de los espermatozoides se tomaron en cuenta las alteraciones en cola, forma general o de cabeza con auxilio de un contador manual de nueve canales y el resultado se reportó en cantidad de células anormales o normales por campo.<sup>19-22</sup>

Para detectar y cuantificar a los leucocitos en los frotis de semen se usó el protocolo histológico reportado por Sánchez y sus colaboradores<sup>22</sup> que detecta a los leucocitos por su reacción a la peroxidasa. Los leucocitos se cuantificaron en al menos tres campos por muestra con objetivo 40x. Los resultados se reportan como cantidad total de leucocitos por campo por muestra.<sup>21,22</sup>

#### **Análisis estadístico**

Los resultados se presentan en cuadros o gráficas con números absolutos o porcentajes, según corresponda. Los datos se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism V- 4 (GraphPad Software, San Diego Cal, USA), con una hoja de cálculo del programa Excel (Microsoft Corporation, USA). Los resultados cualitativos se analizaron con tablas de contingencia para  $\chi^2$  o Fisher, según correspondió. Los datos cuantitativos se analizaron con la t de Student para datos no pareados de dos colas con posttest de rangos de Wilcoxon o corrección de Welch, según correspondió. Para todos los casos se consideró una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.

## **RESULTADOS**

En el Cuadro 1 se enlistan las características físicas generales de la población en estudio ( $n = 149$ ). El promedio de edad de los sujetos incluidos en el estudio fue de  $37.27 \pm 7.27$  años con límites de 22 y 56 años. En general, los sujetos tenían sobrepeso porque su IMC promedio fue de  $28.24 \pm 3.55$  kg/m<sup>2</sup>.

En relación con el comportamiento sexual, el promedio de edad de inicio de la vida sexual fue a los  $17.73 \pm 2.17$  años con límites de 12 y 26 años; además, se obtuvo un promedio de  $5.92 \pm 3.7$  parejas sexuales con límites de 2 y 30 compañeras sexuales.

En relación con la condición clínica por la que la mujer estaba atendándose, el mayor porcentaje fue diagnóstico

**Cuadro 1.** Características generales de todos los sujetos incluidos en el estudio (n = 149)

Variable	Promedio ± DE (rango)*
Edad (años)	37.27 ± 7.27 (22-56)
Estatura (m)	1.68 ± 0.49 (1.49-1.84)
Peso (kg)	80.52 ± 12.13 (47-119)
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	28.24 ± 3.55 (19.88-40.22)
Años de infertilidad	6.45 ± 3.7 (1-18)
Inicio de vida sexual	17.73 ± 2.17 (12-26)
Parejas sexuales	5.92 ± 3.7 (2-30)
Condición de la pareja	(%)
Infertilidad primaria	66.66
Infertilidad secundaria	29.03
Pérdida gestacional recurrente	4.31

\* Cuando corresponde.

de infertilidad primaria con 66.66% de casos, seguido de infertilidad secundaria (29.03%) y pérdida gestacional recurrente con 4.31% de los casos.

Los resultados generales de la espermatobioscopia directa se muestran en el Cuadro 2 en donde se observa que el pH, la movilidad y la viabilidad estaban dentro de los parámetros establecidos por la OMS. Sin embargo, tomando en cuenta la cantidad de espermatozoides se encontró que una parte de la población tenía normozoospermia (48.16 ± 11.13 x10<sup>6</sup> células/mL) y otra oligozoospermia (12.72 ± 5.31 x10<sup>6</sup> células/mL) (Cuadro 2).

El análisis de PCR para detectar VPH-16 y VPH-18 en las muestras de semen de los sujetos de estudio mostró que 40.26% (n= 60) tuvo resultado negativo para cualquiera de esos virus. El 59.73% (n= 89) de los pacientes tuvo un resultado positivo para VPH de los que 44 (49.44%) fueron positivos exclusivamente para VPH-

**Cuadro 2.** Características generales de los estudios de espermatobioscopia directa en todos los sujetos incluidos en el estudio (n = 149)

Variable	Promedio ± DE (rango)*
pH	7.89 ± 0.27 (7-8.5)
Espermatozoides (1x10 <sup>6</sup> /mL)	
Normozoospermicos	48.16 ± 11.13 (23-262)
Oligozoospermicos	12.72 ± 5.31 (1-18)
Movilidad (%)	53 (1-70)
Viabilidad (%)	69 (1-90)

\* Cuando corresponde.

16; 24 sujetos (26.96%) fueron positivos para VPH-18 y 21 sujetos (23.59%) fueron positivos para VPH-16 y VPH-18 (Cuadro 3).

Además, tomando en cuenta el total de los sujetos incluidos en el estudio (n= 149), se observa que el VPH-16 sigue siendo el más detectado porque representa 29.56% de la población, hecho que contrasta con el menor porcentaje para VPH-18 (16.11%) o cuando ambos tipos de virus se encuentran en el mismo sujeto (14.09%) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Resultado del análisis de PCR para detectar la presencia exclusiva del VPH-16, VPH-18 o ambos en los sujetos de estudio

Variable	n	%*	%**
<b>Generales</b>			
Negativos	60	40.26	-
Positivos	89	59.73	-
Total	149	100	-
<b>Por tipo de virus</b>			
VPH-16	44	29.56 <sup>a</sup>	49.44 <sup>a</sup>
VPH-18	24	16.11	26.96
VPH-16 + VPH-18	21	14.09	23.59
Total	89	59.73	100

\* Porcentaje con respecto al total de sujetos (n = 149).

\*\* Porcentaje con respecto al total de sujetos positivos al VPH (n = 89).

<sup>a</sup> p < 0.05 vs grupo VPH-18 y grupo VPH-16 + VPH-18.

Tomando en cuenta la concentración de espermatozoides de los sujetos positivos para VPH, éstos se clasificaron en normozoospermicos (concentración de espermatozoides > 20 x 10<sup>6</sup>/mL) y oligozoospermicos (concentración de espermatozoides < 20 x 10<sup>6</sup>/mL). Así, 56.18% (n= 50) de los pacientes positivos para VPH fueron oligozoospermicos, mientras que 43.8% (n= 39) fueron normozoospermicos (Cuadro 4).

De acuerdo con el tipo de virus, los sujetos oligozoospermicos y normozoospermicos tuvieron mayor porcentaje de positividad para VPH-16 que para VPH-18 o cuando coexisten ambos tipos de virus (Cuadro 4). En los pacientes normozoospermicos se encontró el mayor porcentaje de positivos a VPH-16 (28.08%), en comparación con todos los grupos descritos en el Cuadro 4.

El examen de las muestras de semen a través de la preparación de las laminillas y observadas con un objetivo 40x en cada uno de los pacientes, permitió evaluar la morfología de los espermatozoides y detectar leucocitos.

**Cuadro 4.** Distribución de los pacientes VPH positivos (n = 89) de acuerdo con la cantidad de espermatozoides en su muestra y el tipo de virus detectado

Variable	Oligozoospermicos n (%*)	Normozoospermicos n (%*)	Totales n (%*)
VPH-16	19 (21.35)	25 (28.08) <sup>a,b</sup>	44 (49.44)
VPH-18	17 (19.10)	7 (7.86) <sup>b</sup>	24 (26.96)
VPH-16 + VPH-18	14 (15.73)	7 (7.86) <sup>b</sup>	21 (23.59)
Total	50 (56.18)	39 (43.8)	89 (100)

\* Porcentaje con respecto al total de sujetos positivos (n = 89).

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs grupo VPH-18 y grupo VPH-16 + VPH-18 en su grupo.

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs grupos de oligozoospermicos.

En términos generales, la cantidad y las formas anormales de espermatozoides están dentro de los parámetros que indica la OMS. Sin embargo, se observa que el grupo de pacientes con oligozoospermia positivos para VPH-16 y VPH-18 tienen un promedio mayor de leucocitos en comparación con los que se encuentran en el grupo de normozoospermicos (VPH-16= 2.72 y VPH-18= 2.31 para oligozoospermicos vs 1.14 y 1.21 para los del grupo normozoospermicos;  $p < 0.05$ ; respectivamente); sin embargo, ese promedio de leucocitos es semejante en oligozoospermicos y normozoospermicos, cuando son positivos para ambos tipos de virus (2.03 vs 2.05, respectivamente).

Cuando los pacientes son positivos para VPH-16 y tienen oligozoospermia, el promedio de espermatozoides anormales es mayor en comparación con los positivos al mismo virus pero que son normozoospermicos ( $26.8 \pm 15.6$  vs  $9.72 \pm 12.23$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente). Cuando ambos tipos de virus se encuentran en pacientes oligozoospermicos y normozoospermicos no se observa esa diferencia en los promedios de espermatozoides anormales ( $19.94 \pm 7.2$  vs  $19.74 \pm 8.4$ , respectivamente).

## DISCUSIÓN

Con base en los resultados, puede afirmarse que un porcentaje importante de los pacientes que acuden al servicio de Biología de la Reproducción de nuestra institución tiene una infección provocada por VPH 16, VPH 18 o ambos, que se detecta en las muestras de semen que normalmente sirven para realizar la espermatobioscopia directa, que es un análisis rutinario del protocolo de estudio de la pareja infértil.

Nuestros resultados señalan que la edad promedio de los pacientes es de 37.27 años, con inicio de vida sexual en la

adolescencia, que es el periodo en que hombres y mujeres tienen contacto con diversas clases de microorganismos que originan infecciones de transmisión sexual<sup>8,9</sup> y otros factores de riesgo, como el número de parejas sexuales que, en promedio, fue de seis con límites de 2 y 30.

Al igual que en otros reportes, la infección por VPH fue asintomática y se reconoció al sexo masculino como vector. Existen reportes en donde el VPH se considera un factor de riesgo importante para cáncer de pene y ano, además de localizarse en la orofaringe y conjuntivas y en biopsias de tumores de cabeza y cuello en hombres.<sup>23,24,25</sup>

Por lo que se refiere al aparato genitourinario masculino, el VPH se ha detectado en el cuerpo del pene, glándula, uretra, conductos deferentes, epidídimo, los testículos<sup>26-28</sup> y cabeza del espermatozoide,<sup>29,30,31</sup> junto con reportes que señalan que se ha detectado incluso en 6.1% en espermias de semen descongelado.<sup>32</sup>

Nuestro trabajo consistió en identificar VPH 16 y 18 en semen, porque son los que más se asocian con cáncer cervicouterino en México. La frecuencia fue de 59.7%, con predominio de VPH 16 en 29.5%.

De acuerdo con los parámetros de la OMS se encontró que existe mayor porcentaje de pacientes oligozoospermicos (57.04%), lo que en parte puede explicar el problema de infertilidad. No se observaron otras alteraciones en la cuenta espermática, a diferencia de otros autores que demuestran que hay una alteración en la motilidad.<sup>30,31</sup>

También observamos que los pacientes positivos para VPH tuvieron mayor concentración de leucocitos, sobre todo en el grupo de pacientes con oligozoospermia, independientemente del virus que los infecta y que la presencia de uno o ambos virus en el semen se asocia con mayor cantidad de espermatozoides anormales, quizá por el VPH adherido a los espermatozoides, como ya se había

sugerido; sin embargo, se encontraron acordes con los parámetros que marca la OMS.<sup>14</sup>

En conclusión, puede afirmarse que este trabajo es el primero de esta naturaleza en nuestro país, en donde se señala que la frecuencia en el semen de VPH 16, VPH 18, o ambos, es elevada en varones que se encuentran en protocolo de la pareja infértil y que, junto con otros reportes, es necesario que se implante este tipo de estudio en la detección de VPH en pacientes en protocolo de la pareja infértil, en donadores de semen y en muestras que se almacenan en un banco de semen.

## REFERENCIAS

- Lazcano PE, Alonso P, Ruiz MJ, Hernández MA. Recommendations for cervical cancer screening programs in developing countries. The need for equity and technological development. *Salud Publica Mex* 2003;45 (supl 3):S388-398.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, et al. Prevalence of human papilloma virus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Can Inst* 1995;87(11):796-801.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12-19.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a metaanalysis. *Br J Cancer* 2003;88:63-73.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-527.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-428.
- Hompling ER. Cáncer de cérvix invasor. En: Piver MS, ed. *Diagnostico y Tratamiento en Oncología Ginecológica*. 2ª ed. Madrid: Marban, 2000;p:111-140.
- Murthy N S, Mathew A. Risk factors for pre-cancerous lesions of the cervix. *Eur J Cancer Prev* 2000;9(1):5-14.
- Disaia PJ, Creasman TW. Preinvasive and invasive cervical cancer. In: Disaia PJ, Creasman TW, editors. *Clinical gynecologic oncology*. 6th ed. St Louis: Mosby, 2002.
- Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Hernández-Ávila M, Salmerón J, Leyva A, et al. High prevalence of human papillomavirus infection in Mexican male. *Sex Transm Dis* 2001;28:277-288.
- Gazzaniga P, Vercillo R, Gradilone A, Silvestri I, et al. Prevalence of papillomavirus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 2 in urinary bladder cancer. *J Med Virol* 1998;55:262-267.
- Picconi MA, Eiján AM, Distéfano AL, Pueyo S, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas in Argentina: analysis of primary tumors and lymph nodes. *J Med Virol* 2000;61:65-69.
- Baldwin SB, Wallace DR, Papenfuss MR, Abrahamsen M, et al. Human papillomavirus in men attending a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis* 2003;187:1064-1070.
- World Health Organization. WHO. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- Manual for DNA-isolation kit, Roche-Applied-Science, USA.
- Fontaine J, Gravit P, Duh LM. High level of correlation of human papillomavirus-16 DNA viral load estimates generated by three real-time PCR assays applied on genital specimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:200-2207.
- Detection of human papillomavirus 16-type. Primer Design manual. Primer Design LTD, USA.
- Detection of human papillomavirus 18-type. Primer Design manual. Primer Design LTD, USA.
- Erenpreisa J, Freivalds T, Slaidina M. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry* 2003;52:19-27.
- Keel B, Webster B. The standard semen analysis. En: Webster E (ed.) *CRC. Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. Boca Ratón FL, CRC Press, 1990;p:27-69.
- Barratt CLR, Matson PL, Holt W. British Andrology Society guidelines for the screening of semen donors for donor insemination. *Hum Rep* 1993;8:1521-1523.
- Sánchez GR, Villegas JG, Peña P, Miska W, Schill WB. Determinación de células peroxidasa positivas en líquido seminal. Es un parámetro confiable para el diagnóstico de infección genital asintomática? *Rev Med Chile* 2003;131:53-62.
- Palefsky JM. HPV infection in men. *Dis Markers* 2007;23:261-272.
- Sen S, Sharma A, Panda A. Immunohistochemical localization of human papilloma virus in conjunctival neoplasias: a retrospective study. *Indian J Ophthalmol* 2007;55:361-363.
- Shah KV, Westra WH. Genital HPVs in the aerodigestive tract: etiologic association with a subset of oropharyngeal/tonsillar cancers and with recurrent respiratory papillomatosis. *Dis Markers* 2007;23:235-245.
- Nielson CM, Flores R, Harris RB, Abrahamsen M, et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1107-1114.
- Svec A, Mikyskov AI, Hes O, Tachezy R. Human papillomavirus infection of the epididymis and ductus deferens: an evaluation by nested polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1471-1474.
- Martorell M, Gil-Salom M, Perez-Valles A, Garcia JA, et al. Presence of human papillomavirus DNA in testicular biopsies from nonobstructive azoospermic men. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:1132-1136.
- Perez-Andino J, Buck CB, Ribbeck K. Adsorption of Human Papillomavirus 16 to Live Human Sperm. *PLoS ONE* 2009;4(6):e5847.
- Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, et al. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril* 2010;93:802-806.
- Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, et al. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril* 2010;94:1723-1727.
- Foresta C, Ferlin A, Bertoldo A, Patassini C, et al. Human papillomavirus in the sperm cryobank: an emergin problem? *J Std AIDS* 2004;15:740-743.