



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias de la Conducta

Doctorado en Ciencias de la Salud

“Asociación de la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) sobre la calidad espermática y la respuesta inmunitaria seminal en una población de militares mexicanos”

TESIS

Para Obtener el Grado de:

Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C. Elvia Pérez Soto

Comité Tutorial:

Dr. Rigoberto Oros Pantoja
Tutor Académico

Dr. Miguel Ángel Camacho López
Tutor Interno

Dra. Virginia Sánchez Monroy
Tutor Externo



Toluca, Estado de México, noviembre de 2021.

Este trabajo se realizó en el

Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de
Sanidad de la Secretaría de la Defensa Nacional,

Laboratorio de Biomedicina Molecular I de la Escuela Nacional de Medicina
y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional,

Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología de la Facultad de Medicina,
Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca,

Laboratorio de Química Medicinal y Farmacología Reproductiva
perteneiente al Centro de Investigación en la Biología de la Reproducción
(CIBIOR) del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSA) de la Universidad
Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), Pachuca, Hidalgo

y

Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología de la Secretaría
de la Defensa Nacional (SEDENA), Ciudad de México

.

Agradecimientos Institucionales

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo
con la Beca Nacional (2018-000068-02NACF-24430)**

y

**por el otorgamiento de la Beca de Estancia Nacional
(2019-000017-01NACF-02280)**

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
1.1. Infertilidad masculina.....	2
1.3. Infecciones de transmisión sexual (ITS) como factores de riesgo en infertilidad masculina.....	4
1.4. Virus del Papiloma Humano (VPH) en la infertilidad masculina.....	5
1.5. Genotipos de la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) en la infertilidad masculina.....	7
1.6. <i>Chlamydia trachomatis</i> en la infertilidad masculina.....	8
1.7. Relación entre infertilidad, infección y respuesta inmunitaria: Participación de citocinas pro-inflamatorias.....	10
1.8. Antecedentes.....	14
2. Planteamiento del problema.....	17
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis.....	19
4.1. Hipótesis nula.....	19
4.2. Hipótesis alterna.....	19
4. Objetivos.....	20
6. Diseño metodológico.....	21
6.1. Diseño del estudio.....	21
6.2. Universo y muestra.....	21
6.3. Criterios de inclusión y exclusión.....	21
6.4. Variables de estudio.....	22
6.5. Operacionalización de las variables.....	23
6.6. Instrumentos.....	26
6.7. Procedimiento.....	26
6.7.1 Obtención de semen para el análisis de los parámetros de la calidad espermática.....	27
6.7.2. Extracción del DNA.....	27
6.7.3. Análisis de la integridad del DNA.....	28
6.7.4. Detección de VPH y CT.....	28
6.7.5. Genotipificación de VPH mediante PCR multiplex.....	30
6.7.6. Determinación de citocinas mediante un ELISA.....	30
6.8. Recolección de datos.....	31
6.9. Análisis de datos.....	31

6.10. Aspectos éticos	31
7. Resultados.....	32
7.1. Artículo 1 aceptado.....	32
7.2. Artículo 2 aceptado.....	49
7. Resultados adicionales.....	68
8. Discusión general	70
9. Conclusiones.....	76
10. Bibliografía utilizada	77
11. Anexos.....	86

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Porcentaje de infertilidad por región debido al factor masculino (Agarwal et al., 2015). 2	
Figura 2. Etiología multifactorial en la infertilidad masculina. (Pérez Soto et al., 2019)	4
Figura 3. Estructura del Virus del Papiloma Humano (VPH16) (Adaptada de Nakahara and Kiyono, 2016; https://www.visual-science.com/projects/human-papillomavirus/3d-model/). 6	
Figura 4. Participación del proceso inflamatorio e infeccioso en la infertilidad masculina. Elaboración propia a partir de Depuydt <i>et al.</i> (2016)	11
Figura 5. Estructura de los primers universales L1, MY y GP.....	28
Tabla 1. Prevalencia de la infección seminal por <i>Chlamydia trachomatis</i> en hombres infértiles (Adaptada de Samplaski et al., 2014).....	9
Tabla 2. Principales citocinas utilizadas como biomarcadores para infección/inflamación en el semen de pacientes infértiles. Fuente: Elaboración propia a partir de la búsqueda bibliográfica en Pubmed con las palabras clave: cytokines, semen and infertility	13

Resumen

Introducción: Las infecciones de transmisión sexual por Virus del Papiloma Humano (VPH) y *Chlamydia trachomatis* (CT), la inflamación y el estrés oxidativo (EO) juegan un papel importante en la infertilidad masculina, sin embargo, su asociación aún no se ha explorado en conjunto. **Objetivo:** Analizar el efecto de la infección por VPH (genotipos) y CT sobre la calidad espermática y la respuesta inmunitaria seminal en pacientes militares mexicanos que derivan de un estudio de pareja infértil. **Material y método:** El estudio incluyó 104 muestras de semen a las que se les realizó espermatobioscopia, detección de la infección por CT, VPH y los genotipos de bajo riesgo (BR-VPH:6, 11) y alto riesgo (AR-VPH:16, 18, 31, 33, 52 y 58) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La cuantificación de citocinas seminales (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-8,) se realizó mediante ELISA y los marcadores de EO: Capacidad antioxidante total (TAC), lipoperoxidación (LPO), 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) se evaluaron por espectrofotometría. Se llevó a cabo un análisis estadístico para la asociación entre la presencia de los patógenos, citocinas y marcadores de EO, a través de pruebas no paramétricas de U-Mann Whitney y Kruskal Wallis ($p \leq 0.05$), utilizando el programa estadístico SPSSv23. **Resultados:** Se encontró una alta prevalencia de genotipos de AR-VPH (96.3%, 78/81), predominando la infección múltiple (IM) en comparación a la infección simple con genotipos AR-VPH (63% VS 37%). Además, se detectó una alta prevalencia de patógenos de 96.4% (81/84), donde la infección por VPH fue de 68% (55/81), CT de 13.5% (11/81) y la coinfección por VPH+CT de 18.5% (15/81). Referente a los parámetros seminales, la infección por VPH y coinfección VPH+CT modificaron el pH a alcalino y disminuyeron el porcentaje de morfología normal de espermatozoides de acuerdo con los criterios normales establecidos por la OMS. Se cuantificaron niveles más altos de IFN- γ e IL-6 en los grupos infectados, particularmente se encontró una concentración más alta y significativa de IL- β en el grupo de coinfección por VPH+CT. Además, VPH y la coinfección por VPH+CT incrementaron niveles de LPO y 8-OHdG, y bajos niveles de TAC en todos los grupos de estudio, demostrando que la IM de AR-VPH promovió mayor incremento significativo de LPO. **Conclusión:** La alta infección por VPH o coinfección promueven un pH alcalino, así como un ambiente pro-inflamatorio y oxidativo perjudicial para los espermatozoides que puede contribuir a la teratozoospermia.

Introducción

1.1. Infertilidad masculina

La infertilidad es un importante problema mundial de salud reproductiva. De acuerdo con el Comité Internacional para el Monitoreo de la Tecnología de Reproducción Asistida (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad se define como la inhabilidad para concebir en pareja y producir descendencia después de 12 meses consecutivos de relaciones sexuales sin protección (World Health Organization, 2010). En 2010, la OMS estimó que aproximadamente 48,5 millones de parejas (8-12% de parejas) presentan el padecimiento de infertilidad a nivel mundial ('News Focus', 1956; Wang et al., 2018; World Health Organization, 2010). Además, la infertilidad afecta el 15 % de las parejas que han estado desprotegidas durante una relación sexual y que se encuentran en edad reproductiva (H. C. Schuppe et al., 2017; Sharlip et al., 2002), representando al menos la mitad de los casos por infertilidad en el hombre a nivel mundial y (Sharlip et al., 2002) que está relacionado con la mala calidad espermática (Figura 1).

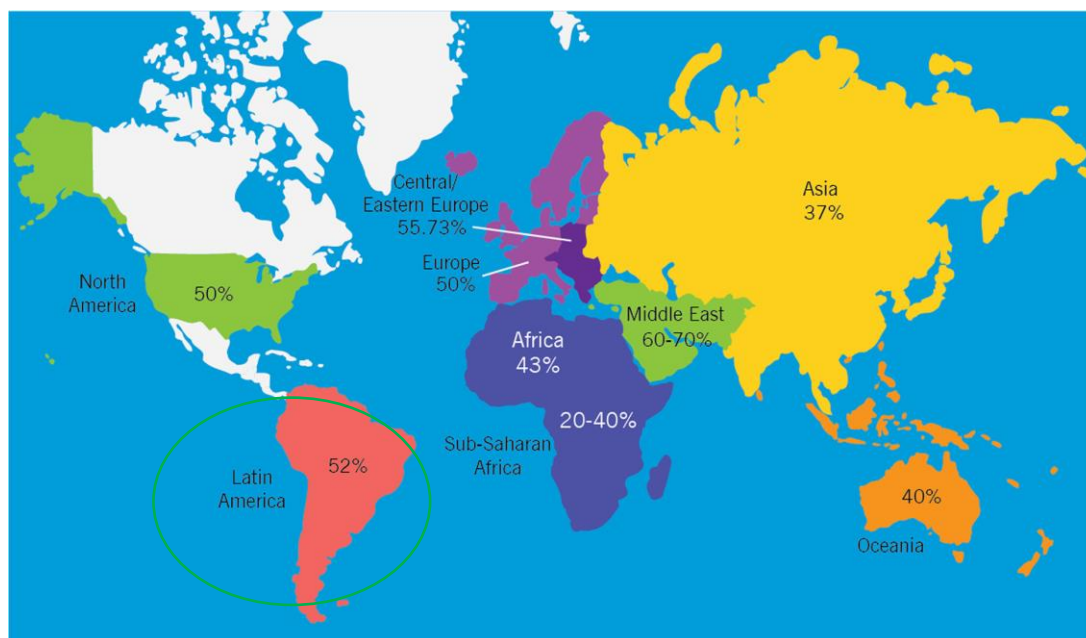


Figura 1. Porcentaje de infertilidad por región debido al factor masculino (Agarwal et al., 2015).

En México, el 20% de las parejas mexicanas sufren infertilidad (OMS, 2017). De acuerdo con el INEGI, existen 2.6 millones de casos de infertilidad, de los cuales el 40% se debe al factor masculino (<https://mexicofertil.com/infertilidad-causas-y-tratamientos>).

En principio, el médico evalúa de forma clínica la fertilidad masculina con un examen físico, revisión de la historia clínica y posteriormente se realiza un análisis de semen, el cual se colecta normalmente en un envase estéril por medio de la masturbación, dicho análisis brinda información importante acerca de la cantidad y calidad espermática. Si el recuento de espermatozoides es normal y los espermatozoides presentan una forma y una movilidad normales, es probable que la fertilidad del hombre sea normal. Si los resultados son anormales, se deben examinar con más detalle los espermatozoides (OMS, 2010). Además, se ha observado que puede haber una disminución en la calidad del semen a lo largo de los años debido a diferentes factores de riesgo que pueden provocar pérdida de funciones a nivel reproductivo y/o desencadenar procesos fisiopatológicos que aún no se entienden completamente que incluyen la infertilidad (Lyu *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2018).

1.2. Calidad espermática y factores de riesgo que conllevan a la infertilidad masculina

En 2010, la Organización Mundial de la Salud definió los límites de referencia de los parámetros de calidad de semen más bajos en hombres cuyas parejas tuvieron un embarazo en menos o igual a 12 meses. Los criterios estrictos de calidad espermática son el volumen del semen mayor de 1.5 mililitro (mL), la cuenta espermática de 15 millones por mL, el conteo total de espermatozoides mayor a 39 millones por mL; el porcentaje de motilidad progresiva y no progresiva mayor a $> 40\%$; la movilidad progresiva a + b ($> 32\%$), el porcentaje de morfología normal mayor al 4% y el conteo de leucocitos de 1 millón por mL (World Health Organization, 2010). La disminución en la referencia de la calidad de semen de la población ha sido reportada en varios estudios (Meklend, 2010). Los factores de riesgo que repercuten en la fertilidad son los genéticos, los trastornos hormonales (hipotiroidismo, hiperprolactinemia), los problemas físicos (varicocele, conductos de esperma dañados), los problemas de estilo de vida (fumar, alcohol o abuso de drogas, obesidad), causas ambientales (radiación) e infecciones previas de origen bacteriano o de origen viral (Figura 2), que detonan en reacciones inflamatorias (Schuppe *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

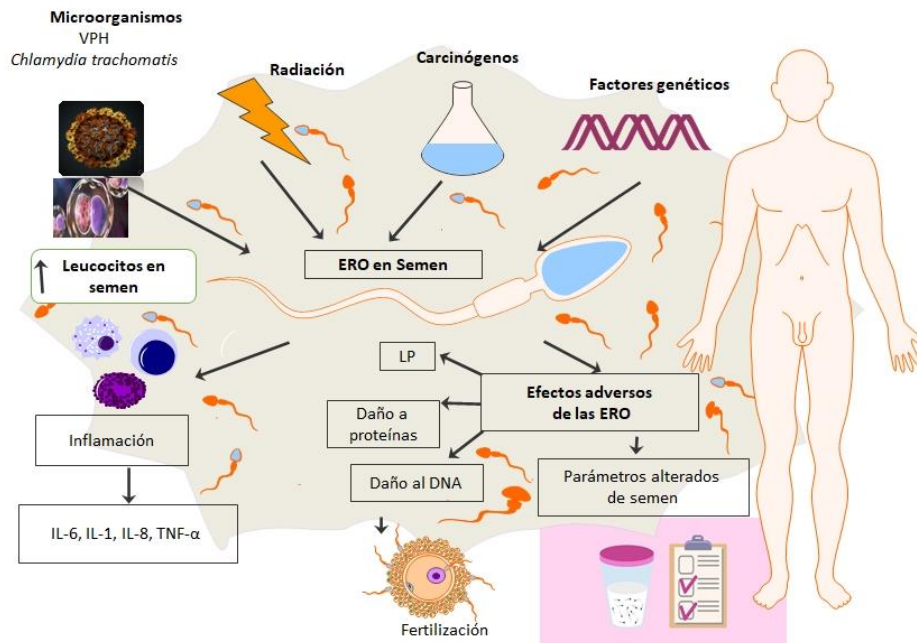


Figura 2. Etiología multifactorial en la infertilidad masculina (Pérez Soto et al., 2019).

Es importante mencionar que, la fertilidad de un hombre se mejora mediante la adopción de un estilo de vida saludable, mantener un peso ideal, una dieta rica en antioxidantes y multivitaminas que puede mejorar la calidad de los espermatozoides, así también, al reducir el estrés y controlar las enfermedades crónicas, tales como la presión arterial alta y la diabetes y obesidad, que también pueden mejorar las probabilidades de que un hombre fecunde a su pareja ((Vander & Wyns, 2018; <https://www.reproductivefacts.org/>).

1.3. Infecciones de transmisión sexual (ITS) como factores de riesgo en infertilidad masculina.

Las ITS tienen efectos en la salud sexual y reproductiva en todo el mundo y se transmiten de una persona a otra a través del contacto sexual. Entre estas ITS, se encuentran las de origen bacteriano (*Escherichia coli*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*), micótica (*Candida albicans* y *Trichomonas vaginalis*) y/o viral (Virus del Papiloma Humano o VPH, Citomegalovirus, Herpes simplex virus) y han sido relacionadas con la infertilidad masculina (Hou et al., 2013).

1.4. Virus del Papiloma Humano (VPH) en la infertilidad masculina.

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es el agente infeccioso de transmisión sexual más común en mujeres y hombres (Wang et al., 2010; Weidner et al., 1999). El papel de VPH en el desarrollo de cáncer cervicouterino en mujeres está ampliamente investigado, incluso en la evasión de la respuesta inmunitaria, mientras que, el estudio de la infección por VPH en los hombres es escasamente conocido, aún más en hombres infértiles. En parte se debe a que la infección es asintomática y por esa razón los hombres no son revisados de forma rutinaria para VPH, resultando en un posible reservorio de infección con un alto riesgo de transmisión a la pareja y con consecuencias a la salud del hombre como es la infertilidad (Garolla et al., 2011).

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae y al género *Papillomavirus*, presenta un genoma de ADN circular de doble cadena con 7.900 pares de bases y se encuentra asociado con histonas formando un complejo similar a la cromatina, no posee envoltura y presenta una cápside icosaédrica que está compuesta por 72 capsómeros.

El genoma presenta un promedio de ocho marcos de lectura abierta (ORF) importantes que son expresados a través de ARNm policistrónicos, transcritos de una sola cadena de ADN. El material genético se divide en 3 regiones principales, una región de control (LCR, long control región); una región temprana E (Early), que dan origen a proteínas no estructurales y una región tardía L (Late) que contiene los genes que dan origen a dos proteínas estructurales (Figura 3). La región LCR contiene un centro promotor llamado p97 (en VPH 16) o p105 (en VPH 18) que permite potenciar o silenciar secuencias que regulan la replicación del ADN mediante el control de la transcripción de los ORF; además, esta región contiene la mayor variación genética entre un tipo viral y otro. Las proteínas E1 y E2 transcritas a partir de la región temprana son responsables de la replicación viral y expresión génica. La región tardía codifica para las proteínas L1 y L2, componentes de 95 y 5%, respectivamente, de la cápside viral. Las proteínas E6 y E7, productos de la región temprana, son las encargadas de immortalizar la célula hospedera y del proceso carcinogénico (Silva et al., 2013).

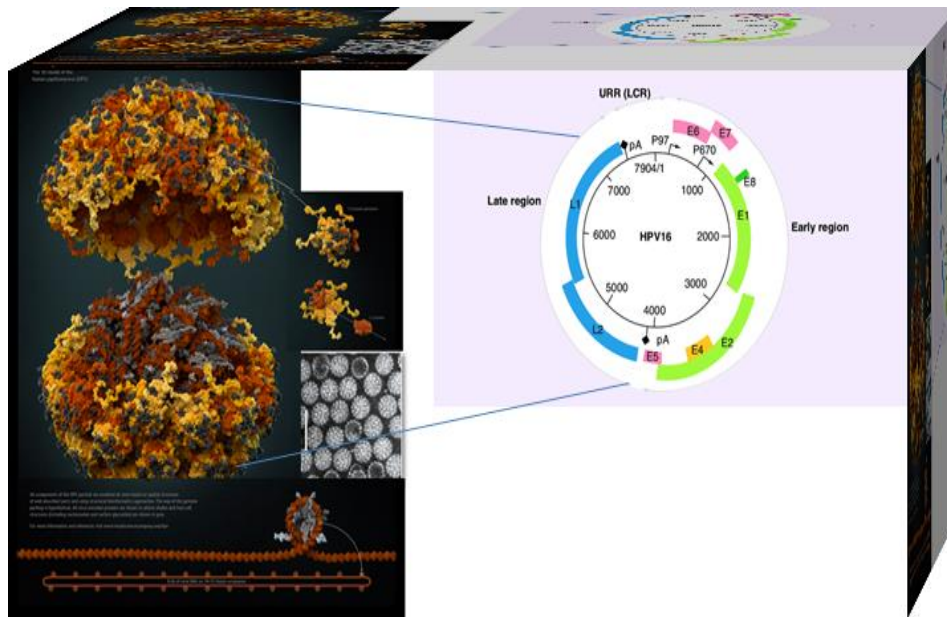


Figura 3. Estructura del Virus del Papiloma Humano (VPH16) (Adaptada de Nakahara and Kiyono, 2016; <https://www.visual-science.com/projects/human-papillomavirus/3d-model/>).

Por otro lado, la prevalencia del VPH parece ser menor en hombres que en mujeres (Giuliano et al. 2011). Los reportes de prevalencia del virus en muestras de semen muestran datos muy variables, que van desde el 2% en semen de hombres fértiles hasta 85% en semen de pacientes que se atienden en clínicas de fertilidad (Damke et al., 2017; Flores-Sánchez et al., 2010; Foresta et al., 2015; Garolla et al., 2012; Golob et al., 2014; Green et al., 1991; Nasserri et al., 2015; Schillaci et al., 2013). En México se han reportado prevalencias del 27% y 59% en hombres que se encuentran en programas de reproducción asistida (Cortés-Gutiérrez et al., 2016; Flores-Sánchez et al., 2010).

Respecto a la duración de la infección con VPH en mujeres es de 9.8 meses, sin embargo, en hombres es de 6.9 meses (Giuliano et al., 2011). La infección en el hombre puede durar hasta 24 meses y el promedio para aclarar el VPH es de 5.9 meses en comparación de las mujeres que es de 28 meses (Comhaire et al., 1999; Depuydt et al., 2016). Sí no se logra aclarar la infección, los viriones libres provocan efectos dañinos a los espermatozoides, pudiendo unirse a la cabeza de los mismos y directamente reducir la movilidad espermática (Garolla et al., 2013), lo cual se ha evidenciado en un 70% de los reportes en los que se observa alteración de la calidad espermática por la infección VPH (Bezold Guntram, Politch

Joseph A., Kiviat B. Nancy, Kuypers Jane M., Wolff Hans, 2007; Cai et al., 2014; Foresta et al., 2010b; Garolla et al., 2012; Lai, 1997; Moghimi et al., 2019; Nasserri et al., 2015; Rohde et al., 1999; Vignera et al., 2015; Yang et al., 2013). Otro 25% de reportes en los que se observa alteración de la calidad espermática han descrito en pacientes infértiles iraníes, brasileños, italianos y chinos hay asociación de la disminución del número espermático (Bezold Guntram, Politch Joseph A., Kiviat B. Nancy, Kuypers Jane M., Wolff Hans, 2007; Damke et al., 2017; Foresta et al., 2015; Garolla et al., 2012; Nasserri et al., 2015; Vignera et al., 2015; Yang et al., 2013); un menor número de reportes también describe el incremento en el pH (Damke et al., 2017), un incremento del número de leucocitos (Damke et al., 2017) y anormalidades en la morfología (Cai et al., 2014; Yang et al., 2013) que se incrementa al encontrarse a patógenos como *Chlamydia trachomatis* en coinfección (Cai et al., 2014). Mientras que otros reportes han indicado que el virus fragmenta el DNA en espermatozoides expuestos a proteínas oncogénicas de E6/E7 (Connelly et al., 2001; Depuydt et al., 2016) e induce daño al DNA espermático (Garolla et al., 2011).

1.5. Genotipos de la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) en la infertilidad masculina.

En relación a los genotipos del virus se han identificado aproximadamente 200, de los cuales 30 tipos son responsables de infecciones anogenitales. Su clasificación se basa en la patogenicidad y la virulencia, encontrándose los genotipos de alto riesgo de malignidad (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82); tres tipos como de probable alto riesgo (26, 53 y 66) y 12 como de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) (Santos-López et al., 2015). Como podemos observar, hay algunos genotipos VPH que son más oncogénicos que otros, por lo que el daño sobre la calidad espermática no puede ser descartada, aún más sobre la infertilidad que en ocasiones es inexplicable. Se sabe que la infección múltiple puede estar presente (Depuydt et al., 2016), algunos grupos han descrito presencia del 16% para infección múltiple en contraste con infección simple en el 6% (Damke et al., 2017) pero es posible que sólo un patógeno sea detectado mediante técnicas poco sensibles por lo que hay falta de información para dar un diagnóstico concreto relacionado a la infertilidad.

Los genotipos detectados con más frecuencia en hombres infértiles en orden decreciente de acuerdo a un reciente metaanálisis son 45, 16, 52, 18/59 y 33 (Xiong et al., 2018). En México los genotipos detectados en este tipo de población con mayor frecuencia son el 6 y el 11, seguidos de 16, 18, 45, 51, 52 y 66 (Cortés-Gutiérrez E. I., Dávila-Rodríguez I., Fernández J. L., de la O-Pérez L. O., Garza-Flores M. E., Eguren-Garza R., Gosálvez, 2016).

Por otro lado, se ha descrito que VPH puede adaptarse al huésped y completar su ciclo viral y mantenerse latente en la población sin causar alguna aparente enfermedad (Depuydt et al., 2016; Ekström et al., 2011), es decir hay una interacción armónica entre VPH y el huésped, entre los procesos de replicación viral y la tolerancia inmune que puede provocar una sobre activación inmunitaria y un subsecuente estado inflamatorio silencioso, que también se relaciona con un mayor riesgo de coinfecciones tanto bacterianas como virales y procesos inflamatorios crónicos que podrían representar riesgos para la fertilidad masculina (Woolhouse and Gaunt, 2007).

Como podemos observar, hay algunos genotipos VPH que son más oncogénicos que otros, por lo que el daño sobre la calidad espermática no puede ser descartada, aún más sobre la infertilidad que en ocasiones es inexplicable.

Se sabe que la infección múltiple puede estar presente (Depuydt et al., 2016) pero es posible que sólo un patógeno sea detectado mediante técnicas poco sensibles por lo que hay falta de información para dar un diagnóstico concreto relacionado a la infertilidad.

1.6. *Chlamydia trachomatis* en la infertilidad masculina.

Chlamydia trachomatis (CT) es una bacteria intracelular obligada, que posee una membrana interna y externa similar a las bacterias Gram-negativas y un lipopolisacárido, pero no tiene una capa de peptidoglucano. Es un patógeno con tropismo para el tracto urogenital y conjuntivas. Se sabe que es la causa más prevalente de infertilidad masculina, aunque también podría causar uretritis, prostatitis y síndrome de Reiter en hombres (Ahmadi et al., 2016; Mackern-oberti et al., 2013; Redgrove & McLaughlin, 2014). Entre los hombres infértiles, existe una variabilidad considerable en la tasa de infección por CT (Tabla 1), que oscila entre 0.3 al 62.9%, cuya detección es a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en general la prevalencia es baja en los países desarrollados (Samplaski et al., 2014).

Tabla 1. Prevalencia de la infección seminal por *Chlamydia trachomatis* en hombres infértiles (Adaptada de Samplaski et al., 2014).

Autor	Año	Estudio	País	Frecuencia de CT en hombres infértiles
Levy <i>et al.</i>	1999	Prospectivo	Francia	10.9 % (10/92)
Ochsendorf <i>et al.</i>	1999	Prospectivo	Alemania	1.6 % (2/125)
Gdoura <i>et al.</i>	2001	Clínico	Tunisia	16.3 % (15/92)
Hamdad-Daoudi <i>et al.</i>	2004	Clínico	Francia	2.7% (3/111)
Hosseinzadeh <i>et al.</i>	2004	Clínico	Reino Unido	4.9% (31/642)
de Barbeyrac <i>et al.</i>	2006	Prospectivo	Francia	0.3% (1/260)
Bezold <i>et al.</i>	2007	Retrospectivo, controlado	Alemania	2.55 % (6/240)
Gdoura <i>et al.</i>	2008	Clínico	Tunisia	42.3% (44/104)
Kokab <i>et al.</i>	2010	Cohorte	Canada	6.3% (16/255)
Al-Sweih <i>et al.</i>	2012	Casos-controles		3.9 % (4/127)
Domes <i>et al.</i>	2012	Cohorte	Canada	0.30%
Okoror and Agbonlahor <i>et al.</i>	2012	Casos-controles	Nigeria	62.6 % (417/666)
Liu <i>et al.</i>	2014	Casos-controles	China	2.58 % (16/621)
Al-Marzoqi <i>et al.</i>	2014	Prospectivo	Iraq	23.38 % (18/77)
Ouzounova-Raykova <i>et al.</i>	2015	Casos-controles	Bulgaria	13.9 % (39/281)
López-Hurtado <i>et al.</i>	2017	Transversal	México	31.9% (37/116)
Pérez-Soto <i>et al.</i>	2021	Transversal	México	31.7 % (33/104)

La secuencia genómica completa de *CT* consiste en un cromosoma de aproximadamente 1.0 Mbp y un plásmido extracromosómico de aproximadamente 7.5 kbp, con un total de aproximadamente 900 genes codificadores de proteínas.

1.7. Relación entre infertilidad, infección y respuesta inmunitaria: Participación de citocinas pro-inflamatorias.

La infección/inflamación de la glándula accesoria masculina (MAGI) es un acrónimo genérico que indica un conjunto de enfermedades inflamatorias de las glándulas sexuales accesorias masculinas, las cuales se han encontrado en hombres infértiles con una frecuencia de entre 2 al 18 %, lo cual se encuentra pobremente diagnosticado debido a que solo toman en cuenta los leucocitos en el eyaculado, sin embargo, las cifras aumentarían después del masaje prostático como lo indican algunos reportes (Vignera et al., 2015, 2014; Wang et al., 2010; Weidner et al., 2013; Xiao et al., 2013).

Los patógenos infecciosos pueden afectar la fertilidad masculina de diferente manera, provocando daño celular a través de mediadores de la inflamación, creando una obstrucción o unirse a los espermatozoides (Vander Borgh and Wyns, 2018). La calidad y cantidad del semen son medidas de fertilidad, cuando los parámetros se encuentran alterados se pueden clasificar como astenozoospermia, oligoastenozoospermia, oligoastenozoospermia grave y azoospermia (World Health Organization, 2010).

En el hombre infértil se han evidenciado los efectos tanto de la infección como la inflamación de las glándulas accesorias (MAGI) debido al tipo de patógeno, el curso de la enfermedad (aguda o crónica) y los órganos afectados (Depuydt et al., 2003; Maegawa et al., 2002). En principio, para establecer el diagnóstico de un paciente infértil, se debe analizar el estado de salud, factores de riesgo como son los patógenos relacionados con las enfermedades de transmisión sexual y la calidad espermática definida por los criterios de la OMS, 2010, principalmente (Depuydt et al., 2016).

Los mecanismos a través de los cuales MAGI perjudica la fertilización al alterar la calidad espermática se conocen ampliamente, como se aprecia en la figura 4.

En principio, hay un daño causado por el desequilibrio de las concentraciones de citocinas, los factores de crecimiento y las especies reactivas a oxígeno (ROS) que alteran la membrana espermática y el ADN de los espermatozoides (Depuydt et al., 2016). Asimismo, la OMS menciona que el diagnóstico de MAGI como causa de infertilidad está relacionada si el paciente presenta la morfología anormal y ciertos criterios en la toma de historia clínica, el examen físico, el análisis de orina y/o eyaculación (World Health Organization, 2010).

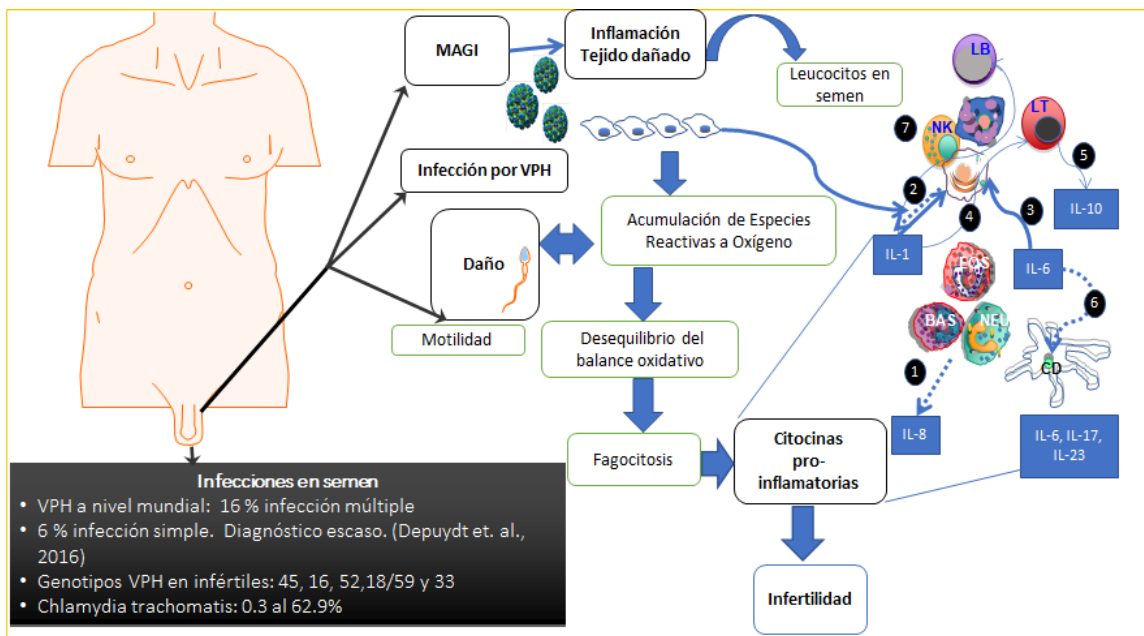


Figura 4. Participación del proceso inflamatorio e infeccioso en la infertilidad masculina. Elaboración propia a partir de Depuydt *et al.* (2016).

Desafortunadamente, muchas de las anomalías funcionales no son evidentes en el análisis de semen de rutina, explicando por qué algunos autores no pueden vincular la infección de las glándulas sexuales accesorias a la infertilidad o MAGI (Comhaire et al., 1999). Es importante aclarar que MAGI, no se refiere a la enfermedad en un órgano específico, no distingue entre la enfermedad aguda y la infección crónica, entre infección e inflamación, y entre enfermedades específicas de órganos tales como prostatitis y epididimitis (Depuydt et al., 2016). Además, el semen humano contiene un repertorio de citocinas, es decir, proteínas solubles de bajo peso molecular que participan en la activación de la inmunidad innata, celular y en el proceso de inflamación, también tienen funciones como la regulación del crecimiento, diferenciación de células germinales, funciones neuroendocrinas y funciones testiculares de los tejidos de órganos genitales y tienen la capacidad de unirse a receptores de células blancas y estimular señales de transducción intracelular (Maksymyuk et al., 2015). Estas moléculas son secretadas por células inmunológicas de los testículos, células intersticiales, células de Sertoli y la espermatogonia, las cuales tienen diferente actividad inmunológica (Maksymyuk et al., 2015).

Las citocinas son consideradas como mediadores inflamatorios que son secretadas por leucocitos, macrófagos y células inmunocompetentes en el semen en respuesta a antígenos extraños, patógenos y también en la inflamación crónica. Los niveles y los tipos de citocinas tienen un efecto crucial en la iniciación, progresión, magnitud o resolución de un proceso inflamatorio (Weidner et al., 2013).

Además, las citocinas son producidas por macrófagos, células Natural Killer (NK) y células espermáticas en respuesta a antígenos extraños y son liberadas como señales entre células que participan en la inmunidad innata. Al respecto, en la tabla 2 se muestran las principales citocinas utilizadas como biomarcadores para infección e inflamación en el semen de pacientes infértiles en orden de relevancia por los reportes publicados al realizar la búsqueda bibliográfica en pubmed con las palabras clave: *cytokines*, *semen* y *infertility* (Aghazarian et al., 2013; Aghazarian et al., 2015; Camejo, Segnini y Proverbio, 2009; Jach et al., 2018; Collodel et al., 2010; Dehghan et al., 2016; Duan et al., 2014; Eid y Younan, 2014; Fathy et al., 2014; Foresta et al., 2010a; Furuya et al., 2009; Hagan et al., 2015; Haidl et al., 2015; Havrylyuk et al., 2015; Kokab et al., 2010; Liu et al., 2012; Lotti et al., 2011; Lyu et al., 2017; Maleki y Tartibian, 2017a, 2017b; Martínez y Camejo, 2010; Matalliotakis et al., 1998; Moretti et al., 2008; Moretti et al., 2014; Qian et al., 2011, 2014; Naz y Evans, 1998; Sabbaghi et al., 2014; Sakamoto et al., 2008; Seshadri et al., 2009; Shi et al., 2018; Tumpey et al., 2001; Ulcova et al., 2009; La Vignera et al., 2008; Wang et al., 2014; Wang et al., 2018; Xie et al., 2009; Zauli et al., 2013).

Dentro de las citocinas proinflamatorias se encuentran el interferón gamma (IFN- γ), la interleucina 1 beta (IL-1 β), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 8 (IL-8) y el Factor de Necrosis Tumoral Alpha (TNF- α), que tienen una estrecha correlación con el número de leucocitos seminales y que participan en la respuesta inmunitaria en el semen de hombres con o sin alteraciones de parámetros del espermatograma (Maegawa et al., 2002; Weidner et al., 2013). Por otro lado, la interleucina 10 (IL-10), es una citocina anti-inflamatoria que es secretada por linfocitos Th₂, dicha molécula junto con la interleucina 4 (IL-4), son capaces de activar y soportar la respuesta inmune e inflamatoria e inhibir la IL-6, manteniendo el balance entre la protección y el proceso patológico (Maksymyuk et al., 2015).

Tabla 2. Principales citocinas utilizadas como biomarcadores para infección/inflamación en el semen de pacientes infértiles. Fuente: Elaboración propia a partir de la búsqueda bibliográfica en Pubmed con las palabras clave: cytokines, semen and infertility.

Citocina # Publicaciones	Correlación significativa con:		
	Parámetros inflamatorios clásicos	Citocinas y quimiocinas	Parámetros de la calidad espermática
Interleucina 6 IL-6 (32 reportes)	***↑ Leucocitos, *↑ macrófagos, *↑ iNKT, *↑ TLR-2, *↑ TLR-4, *↑ COX-2 (29), *↑ NRF-2, marcadores de DO: ***↑ ROS, ↑ MDA, ↑ 8-isoprostano, *↑ ON, *↓ capacidad antioxidante total, *↓ SOD, ↓ catalasa.	***↑ IL-8, **↑ IL-1β, ***↑ TNF-α, ***↑ IFN-γ, *↑ IL-16, *↑ IL-5, *↑ IL-7, *↑ MCP-2, *↑ TGF-β1, *↑ CXCL5, *↑ MCP2, *↑ CCL22, *↑ CCL20, *↑ CXCL16, *↑ IL-10, *↑ CSF3, *↑ CCL3, *↑ CCL4, *↑ IL-17.	***↑ conteo leucocitario, **↓ volumen seminal, **↓ % motilidad, **↓ # de espermatozoides, *↓ % de conteo de cabeza normal, *↓ integridad del DNA del esperma, *↑ anomalías en la transición de la histona espermática cuando hay ROS, ↑ defectos en la espermatogénesis, *↓ tasa de embarazo, *↓ función epididimal y maduración del esperma.
Interleucina 8 IL-8 (17 reportes)	***↑ Leucocitos, ↑ TLR-2, ↑ TLR-4, ↑ COX-2 (29), ↑ NRF-2, marcadores de DO: ***↑ ROS, ↑ MDA, ↑ 8-isoprostano, ↑ ON, ↓ capacidad antioxidante total, ↓ SOD, ↓ catalasa	***IL-6, **↑ IL-1β, ***↑ TNF-α, ↑ IFN-γ, ↑ IL-16, ↑ IL-5, ↑ IL-7, ↑ CCL22, ↑ CCL20, ↑ CXCL16, ↑ IL-10, ↑ CSF3, ↑ CCL3, ↑ CCL4, ↑ IL-17, ↑ IL-23	***↑ conteo leucocitario, **↓ volumen seminal, *↓ # de espermatozoides, *↓ % motilidad, % de conteo de cabeza normal, *↓ integridad del DNA del esperma, *↑ anomalías en la transición de la histona espermática cuando hay ROS, *↑ defectos en la espermatogénesis, *↓ tasa de embarazo, *↓ función epididimal y maduración del esperma.
Factor de Necrosis Tumoral α TNF-α (16 reportes)	***↑ Leucocitos, ↑ TLR-2, ↑ TLR-4, ↑ COX-2 (29), ↑ NRF-2, marcadores de DO: ***↑ ROS, ↑ MDA, ↑ 8-isoprostano, ↑ ON, ↓ capacidad antioxidante total, ↓ SOD, ↓ catalasa	**↑ IL-6, ***↑ IL-1β, *↑ IFN-γ, ↑ IL-16, ↑ IL-5, *↑ IL-7, ↑ CCL22, ↑ CCL20, ↑ CXCL16, *↑ IL-10, *↑ CSF3, *↑ CCL3, *↑ CCL4, *↑ IL-17, ↑ IL-23, *↑ TRAIL con varicocele.	**↓ % de conteo de cabeza normal, ***↑ conteo leucocitario, *↓ # de espermatozoides, *↓ # de espermatozoides, *↓ integridad del DNA, *↑ anomalías en la transición de la histona espermática cuando hay ROS, *↑ defectos en la espermatogénesis, *↓ tasa de embarazo.
Interleucina 1 β IL-1 β (7 reportes)	**↑ Leucocitos, ↑ TLR-2, ↑ TLR-4, ↑ COX-2 (29), ↑ NRF-2, marcadores de DO: **↑ ROS, ↑ MDA, ↑ 8-isoprostano, ↑ ON, ↓ capacidad antioxidante total, ↓ SOD, ↓ catalasa	↑ IL-6, ↑ IL-1β, ↑ TNF-α, ↑ IFN-γ, ↑ IL-16, ↑ IL-5, ↑ IL-7, ↑ CCL22, ↑ CCL20, ↑ CXCL16, ↑ IL-10, ↑ CSF3, ↑ CCL3, ↑ CCL4, ↑ IL-17	**↑ conteo leucocitario, *↓ % morfología, *↓ % de conteo de cabeza normal, ↓ # de espermatozoides, *↓ integridad del DNA
Interferón γ IFN-γ 7	**↑ Leucocitos, *↑ células iNKT, *↑ TLR-2, *↑ TLR-4, *↑ COX-2 (29), *↑ NRF-2, marcadores de DO: **ROS, ↑ MDA, *↑ 8-isoprostano, *↑ ON, *↓ capacidad antioxidante total, *↓ SOD, *↓ catalasa	*↑ IL-6, *↑ IL-1β, *↑ TNF-α, *↑ IL-18, *↑ IL-16, *↑ IL-5, *↑ IL-10, *↑ IL-17	**↑ conteo leucocitario, *↓ # de espermatozoides, *↓ % motilidad

Nomenclatura: *Reportes < 3; **Reportes < 6; ***Reportes < 12; ↑ Incremento; ↓ Decremento; IL, Interleucina; TNF-α, Factor de Necrosis Tumoral alpha; TGF-β, Factor de Crecimiento Transformante beta; CXCL-4, Ligando de quimiocina 4, C-C; CXCL-16, Ligando de quimiocina 16; TRAIL, Miembro 10 de la superfamilia de TNF; TLR, Receptor tipo Toll; NRF-2, Factor nuclear tipo 2; DO, Daño Oxidativo; MDA, Malondialdehído; ROS, Especies Reactivas a Oxígeno; ON, Óxido Nítrico; CPA, Capacidad Antioxidante Total, COX-1, ciclooxigenasa; SOD, Superóxido dismutasa; iNKT, células T asesinas naturales invariantes.

Se sabe que los patógenos como *Chlamydia* y VPH transmitidos sexualmente son los causantes de la activación de la respuesta inmunitaria e inflamatoria (Depuydt et al., 2016). No obstante, la presencia única de microorganismos en el semen es un criterio insuficiente para diagnosticar la infección del tracto genital masculino e infertilidad, por lo que se debe incluir la presencia de la alta proporción de espermatozoides anormales, toxinas químicas y ambientales, desregulación de marcadores de estrés oxidativo, lo cual pudiera ayudar a establecer la participación de los agentes infecciosos virales y sus efectos en la respuesta inmunitaria desregulada, inflamación crónica y conllevar a la infertilidad a través de los efectos de las citocinas como las interleucinas y factores de crecimiento (Maksymyuk et al., 2015).

1.8. Antecedentes

A pesar de que la infección por VPH en el hombre fue considerada como un problema menor de salud y de escasa relevancia, estudios recientes han demostrado su importancia en el desarrollo de la prostatitis (Cai et al., 2014), la hiperplasia benigna prostática, el cáncer de próstata (Medel-Flores et al., 2018) y en pacientes con infección en glándulas accesorias o MAGI, en inglés (La Vignera et al., 2015), así como en la salud reproductiva o infertilidad en hombres (Foresta et al., 2010a; Souho et al., 2015), incluyendo la leucocitospermia (Bezold et al., 2007).

La alta incidencia de la infección por VPH se ha reportado no solo en individuos con factores de riesgo sino también en hombres sanos fértiles asintomáticos, además, se ha demostrado la presencia de VPH en el tracto genital como es el pene, el glande y la uretra, así como en el ducto deferente, epidídimo, testículos y en el semen de pacientes asintomáticos fértiles e infértiles (Foresta et al., 2015; Souho et al., 2015; Wang et al., 2010). Los hallazgos indican que la infección por VPH provoca efectos dañinos sobre los parámetros de calidad espermática (Foresta et al., 2010b, 2010a; Garolla et al., 2011).

Laprise y colaboradores en el 2014 realizaron un meta-análisis, donde se identificaron 27 estudios clínicos con reportes de prevalencia de VPH en 4029 muestras de semen con resultados que varían de 0 a 100 %.

Además, se detectó la prevalencia de VPH en 16 % de los 7 estudios en pacientes con infertilidad debida a la alteración de parámetros de la calidad espermática (Foresta et al., 2015; Laprise C, Trottier H, Monnier P, Coutlée F, 2014).

Foresta y colaboradores en el 2010, evidenciaron que el 25 % de la infección por VPH se localiza en la cabeza del espermatozoide, lo que repercute en la disminución de la movilidad espermática de hombres infectados (Foresta et al., 2010a). Garolla y colaboradores en 2011, encontraron la alteración de la movilidad espermática de manera significativa en muestras de semen de hombres infectados con VPH en comparación con los hombres no infectados, no obstante, no hubo alteración de los demás parámetros de calidad del semen (volumen seminal, viscosidad, pH, conteo, viabilidad y morfología normal) (Garolla et al., 2011). Existe un estudio clínico referente a la infección de VPH localizada en la cabeza espermática en muestras de pacientes jóvenes adultos detectado mediante hibridación fluorescente *in situ* (Foresta et al., 2010b). Sumado a ello, en un estudio *in vitro*, se detectó que VPH infecta a espermatozoides por el accesorio primario sindecano-1 en la región ecuatorial de la cabeza en muestras de semen infectados nativos e infectados con la cápside de VPH 16 (Foresta et al., 2011). El mismo grupo de trabajo, determinó que VPH se localiza en otras partes de los espermatozoides, en células exfoliadas o en ambos sitios, siendo más prevalente la infección con VPH en el espermatozoide de pacientes infértiles con el parámetro de movilidad reducida que es independiente del genotipo viral (Foresta et al., 2010a).

Por otro lado, Schuppe y colaboradores en el 2015 realizaron una revisión referente a la infección urogenital (*Chlamydia*, *E coli* e infecciones virales) como un factor de riesgo para la infertilidad, así como la consecuente inflamación crónica en hombres asintomáticos.

Los reportes sugieren el establecimiento de parámetros de la calidad espermática y su alteración en enfermedades inflamatorias crónicas en el tracto genital masculino, es decir, la alteración en la concentración espermática, la movilidad progresiva (< 32 %), la morfología normal (<4 %) con disminución de la integridad de la membrana flagelar; la reacción del acrosoma anormal, un incremento de la fragmentación del DNA, la apoptosis, la cuenta leucocitaria mayor a $1 \times 10^6/\text{mL}$ y los altos niveles de citocinas pro-inflamatorias como son IL-6 (> a 30 pg/mL) e IL-8 (7000 pg/mL) a causa de las infecciones crónicas inflamatorias (Maksymyuk et al., 2015; H. C. Schuppe et al., 2017).

Las citocinas son producidas por macrófagos en respuesta a antígenos extraños y son liberadas como señales entre células que participan en la inmunidad innata. La IL-6 es una citocina multifuncional que es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda, es secretada por células de Sertoli y la IL-8 es una citocina que participa en la activación de neutrófilos (Maksymyuk et al., 2015).

Se ha determinado que el incremento de la IL-6 e IL-8 están asociadas con el desarrollo del proceso inflamatorio en el tracto genital del hombre (H. C. Schuppe et al., 2017), y el incremento de IL-6 afecta a la espermatogenesis (Legue et al. 2002) y se ha asociado en pacientes infértiles (Maksymyuk et al., 2015). La IL-1 β tiene correlación con IL-8, activando a los neutrófilos dentro del plasma seminal, incluso se ha encontrado un incremento de TNF- α en pacientes con leucocitospermia. Los resultados sugieren que las citocinas proinflamatorias detectadas en el plasma seminal están asociadas con la patogénesis de leucocitospermia pero la causa de la función anormal del esperma es desconocida (Maegawa et al., 2002).

Finalmente, se sabe que la detección y genotipificación de VPH en muestras de semen puede ser de gran valor en el diagnóstico de infertilidad (Souho et al., 2015). Sin embargo, pocos países utilizan dicha herramienta en el diagnóstico de la infertilidad, siendo de gran interés elucidar los posibles mecanismos relacionados con los efectos de las infecciones por VPH y/o sus genotipos virales, así como la participación de *Chlamydia trachomatis* sobre la calidad espermática, la respuesta inmunitaria en donde participan las citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo y que pudieran estar asociadas con la infertilidad masculina.

2. Planteamiento del problema

Debido a la elevada tasa de morbimortalidad asociada al VPH y *Chlamydia trachomatis*, estos procesos infecciosos se consideran un serio problema de salud reproductiva a nivel global. Aunque se incluye dentro de las enfermedades de transmisión sexual, en la actualidad se subestiman los riesgos que podrían representar ambos patógenos. Al momento, el VPH comprende cerca de 200 genotipos que incluyen variedades tanto de bajo como de alto riesgo. En relación con las patologías genitourinarias que son propias en el hombre, existen muy pocos estudios que vinculan la infección por VPH y/o *Chlamydia trachomatis* con procesos inflamatorios crónicos como son la hipertrofia prostática benigna o maligna, prostatitis para el caso del primer patógeno y/o el desarrollo de uretritis, cistitis, vesiculitis, epididimitis, orquitis, pielonefritis para ambos patógenos. De manera aislada o en conjunto, estas alteraciones también podrían tener un trasfondo sobre la capacidad reproductiva en el varón, ya que, en esta población de riesgo, la infección puede pasar desapercibida en la mayor parte de los casos y a su vez, los individuos pueden permanecer solo como portadores asintomáticos.

Considerando que la infección por VPH de alto riesgo puede provocar una sobreactivación inmunitaria y un subsecuente estado inflamatorio silencioso, también se relaciona con un mayor riesgo de coinfecciones tanto bacterianas como virales. Por tal motivo, estos procesos inflamatorios crónicos, podrían representar riesgos para la fertilidad masculina. En este contexto, al momento no existen estudios que vinculen el perfil de genotipos de VPH y/o las coinfecciones (VPH+*Chlamydia trachomatis*) con los parámetros del semen, la respuesta inmunitaria e inflamatoria y su relación como posible factor etiológico de infertilidad en pacientes militares mexicanos.

3. Justificación

La infertilidad es un importante problema mundial de salud reproductiva. En el hombre está relacionada con la mala calidad espermática ocasionada por diversos factores de riesgo como son los genéticos, los trastornos hormonales, los problemas de estilo de vida, las causas ambientales, las ITS encontrándose al VPH y CT, estos microorganismos desencadenan reacciones inflamatorias resultantes del tracto genital masculino, en donde participan las glándulas accesorias del aparato reproductor masculino, el sistema inmunitario, contemplando las células y sus productos solubles o citocinas.

Una de las ITS más frecuente en mujeres y hombres es el VPH y sus genotipos virales (alto riesgo de malignidad como son los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59; bajo riesgo como son los genotipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108). Estos juegan un papel importante en diversas patologías en la mujer; sin embargo, se conoce escasamente la participación de los genotipos VPH en la patogénesis en el hombre, como es la prostatitis, la Hiperplasia Benigna Prostática, el cáncer de próstata y particularmente de interés en este trabajo, en la infertilidad masculina. Sumado a ello, al momento no existen estudios que vinculen la infección y/o coinfección con diferentes genotipos virales, incluso con *Chlamydia* y la inflamación crónica relacionados con la infertilidad masculina. A pesar de la alta prevalencia de la infección por VPH y su repercusión en la mala calidad espermática en hombres fértiles e infértiles asintomáticos, en México se desconoce el impacto sobre los parámetros seminales, marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo provocados por la o las infecciones virales y/o bacterianas que pudieran participar en el desarrollo de la infertilidad masculina.

El presente trabajo tiene impacto en la salud sexual y reproductiva del hombre, particularmente en prevención de ITS, así como evitar el desarrollo de procesos inflamatorios y de estrés oxidativo que impacten sobre la calidad espermática y conlleven a la infertilidad masculina, e incluso el desarrollo de otras patologías.

4. Hipótesis

4.1. Hipótesis nula

Sí no hay prevalencia de la infección seminal por VPH, entonces no se alterará la calidad espermática y la respuesta inmunitaria e inflamatoria en muestras de semen de hombres militares que derivan de un estudio de pareja infértil.

4.2. Hipótesis alterna

Sí hay una alta prevalencia de la infección seminal por VPH, entonces se alterará alguno de los parámetros de calidad espermática y la respuesta inmunitaria e inflamatoria en muestras de semen de hombres militares que derivan de un estudio de pareja infértil.

4. Objetivos

Objetivo general: Evaluar el efecto de la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) sobre la calidad espermática y la respuesta inmunitaria seminal en hombres militares que derivan de un estudio de pareja infértil.

Objetivos específicos:

1. Detectar la infección por VPH en el semen de hombres militares que derivan de un estudio de pareja infértil.
2. Explorar los genotipos VPH en el semen de hombres militares que derivan de un estudio de pareja infértil.
3. Determinar la secreción de citocinas de respuesta inmunitaria de tipo Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-4 e IL-10) en el semen de hombres militares que derivan de un estudio de pareja infértil.
4. Cuantificar la expresión de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) en el semen de hombres militares que derivan de un estudio de pareja infértil.
5. Analizar el efecto de la infección por VPH y sus genotipos sobre la calidad espermática y la respuesta inmunitaria de pacientes mexicanos.
6. Detectar la infección por *Chlamydia trachomatis* en el semen de hombres militares que derivan de un estudio de pareja infértil.

6. Diseño metodológico

6.1. Diseño del estudio

El presente estudio deriva de un estudio observacional, descriptivo transversal y retrospectivo (ver Anexo A).

6.2. Universo y muestra

En el presente estudio se consideró una población de hombres militares mexicanos (108 pacientes) que acudieron con su pareja a la consulta externa de Biología de la Reproducción en el Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología en el periodo comprendido de enero a noviembre de 2016 y de enero a noviembre de 2018.

La población comprende de 104 militares mexicanos hombres que acudieron a la consulta externa durante el periodo de estudio, a quienes se les realizó con su pareja el consentimiento informado para el anonimato, confidencialidad y buen manejo de la información por parte de los ginecólogos, el Mayor Médico Cirujano Juan Manuel Carbonell Campos y el Mayor Médico José Cruz Miranda-Covarrubias del Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología.

Se utilizó la base de datos de los pacientes que derivan de un estudio de pareja infértil, los resultados del análisis clínico de la espermatobioscopia y la muestra de semen conservada a -80° C para su posterior análisis.

6.3. Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión fueron pacientes militares mexicanos hombres que derivan de un estudio de pareja infértil que acudieron a la consulta externa de Biología de la Reproducción en el Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología (HMEMN) durante el periodo que duró el estudio de pareja infértil.

Los criterios de eliminación fueron pacientes militares mexicanos hombres que no cuenten con el análisis de laboratorio de espermatobioscopia.

6.4. Variables de estudio

La variable independiente fue la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) y/o *Chlamydia trachomatis*.

Las variables dependientes fueron:

- A. Edad
- B. Volumen
- C. pH
- D. Concentración espermática
- E. Número total de espermatozoides
- F. Motilidad
- G. Porcentaje de morfología normal y morfología anormal de espermatozoides
- H. Leucocitos
- I. Citocina TNF- α
- J. Citocina IL-1 β
- K. Citocina IL-6
- L. Citocina IFN- γ
- M. Citocina IL-10
- N. Citocina IL-4

6.5. Operacionalización de las variables.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Escala de medición
Edad	Tiempo en que ha vivido una persona	Se determina la edad promedio en el grupo de estudio.	15 a 19 20 a 25 30 a 35 35 a 40	Cuantitativa discreta
Volumen	Cantidad en mililitros de una muestra de semen	Se determina la cantidad en mililitros que se obtiene en cada muestra de semen.	1.5 a 2 mL 3 a 5 mL >5mL	Cuantitativa continua
pH	Expresa la alcalinidad o acidez de una sustancia	Se determina el grado de alcalinidad o acidez en la muestra de semen obtenida.	< a 7.2 7.2 a 7.5 7.5 a 8.0	Cuantitativa continua
Concentración espermática	Número de espermatozoides presentes en un mililitro de una muestra de semen.	Se determina la cantidad de espermatozoides en millones por mililitro de la muestra obtenida-	<15 millones por mL >15 millones por mL	Cuantitativa continua
Número total de espermatozoides	Número de espermatozoides presentes en la totalidad de una muestra de semen.	Se determina la cantidad de espermatozoides en millones en la	<39 millones >39 millones	Cuantitativa continua

		totalidad de una muestra de semen.		
Motilidad	Porcentaje de movimiento que expresa un espermatozoide en los primeros 60 minutos después de la eyaculación.	Se determina el porcentaje de movimiento de un espermatozoide posterior a la obtención de la muestra en los primeros 60 minutos.	40 % o menos de motilidad A+B o más de 32% de motilidad de A	Cuantitativa discreta
Morfología	Porcentaje de espermatozoides normales en su forma	Se determina la cantidad de espermatozoides en porcentaje de morfología normal.	> 4 % 5 a 14% 15 a 30%	Ordinal
Leucocitos	Cantidad de leucocitos presentes en la muestra analizada	Se determina la cantidad de leucocitos presentes en una muestra de semen	Menos de 1 millón por mililitro	Cuantitativa continua
TNF- α	Citocina pro-inflamatoria	Se determina la concentración de TNF- α en plasma seminal.	0-2000 pg/mL	Cuantitativa continua
IL-1 β	Citocina pro-inflamatoria	Se determina la concentración de IL-1 β en plasma seminal.	0-1000 pg/mL	Cuantitativa continua

IL-6	Citocina pro-inflamatoria	Se determina la concentración de IL-6 en plasma seminal.	0-1500 pg/mL	Cuantitativa continua
IFN- γ	Citocina pro-inflamatoria y de respuesta Th1	Se determina la concentración de IFN- γ en plasma seminal.	0-3000 pg/mL	Cuantitativa continua
IL-10	Citocina de respuesta Th2	Se determina la concentración de IL-10 en plasma seminal.	0-3000 pg/mL	Cuantitativa continua
IL-4	Citocina de respuesta Th2	Se determina la concentración de IL-4 en plasma seminal.	0 -1000 pg/mL	Cuantitativa continua
LPO (Peroxidación lipídica)	Es un marcador de daño oxidativo o de peroxidación lipídica que se cuantifica por el producto de malondialdehído (MDA).	Se cuantifica LPO mediante la cuantificación de MDA/mg de proteína en plasma seminal.	0-12 (nmol MDA/mg proteína)	Cuantitativa continua
8-OHdG	Marcador de estrés oxidativo que detecta daño al ADN.	Se detecta el daño a través de la cuantificación de 8-OHdG en el semen.	0-20 ng/mL	Cuantitativa continua

Capacidad antioxidante Total	Técnica bioquímica que cuantifica la capacidad antioxidante total mediante la habilidad de reducción en el plasma seminal.	Cuantificación de la reducción del ión férrico a ión ferroso.	0-1500 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$	Cuantitativa continua
------------------------------	--	---	--	-----------------------

6.6. Instrumentos

Al momento de la consulta externa de Biología de la Reproducción del Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología (H. M. E. M. N.) se aplicó un cuestionario referente a los factores de riesgo y asociados a las ITS (Anexo 1).

6.7. Procedimiento

Se llevó a cabo el análisis de los resultados de la detección de la infección por genotipos, VPH y *Chlamydia trachomatis* y su impacto sobre la calidad espermática y citocinas involucradas en la respuesta inmunitaria en muestras de semen de hombres militares mexicanos, en el Laboratorio de Biomedicina molecular de la ENMH-IPN, en el periodo comprendido de agosto de 2018 a diciembre de 2020.

Además, se llevó a cabo una estancia de investigación a nivel nacional aprobada por parte de CONACyT (2019-000017-01NACF-02280) denominada “Asociación de la infección por VPH sobre biomarcadores relacionados con estrés oxidativo en pacientes infértiles mexicanos”. Se llevaron a cabo técnicas espectrofotométricas en el Laboratorio de Química Medicinal y Farmacología perteneciente al Centro de Investigación en la Biología de la Reproducción (CIBIOR) del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSA), de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). Se contó con la asesoría y colaboración del Dr. Eduardo Fernández Martínez (Profesor investigador Titular, Líder del Cuerpo Académico de Biología de la Reproducción).

6.7.1 Obtención de semen para el análisis de los parámetros de la calidad espermática.

Las muestras se recogieron en un recipiente estéril de boca ancha, no tóxico y se procesaron en el Departamento de Laboratorio Clínico del Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología (HMEMN) dentro de 1 h posterior a la eyaculación. Las muestras no se expusieron a temperaturas extremas y no entraron en contacto con lubricantes o productos de látex. Los especialistas hicieron entrega del consentimiento informado de cada paciente, un reporte de resultados, la muestra de semen que fue almacenada a -80 °C para llevar a cabo la detección molecular y la Base de Datos (BD) de los pacientes comprendidos en este estudio con los siguientes datos: Nombre, Edad, Volumen (mL), Aspecto, Licuefacción, Viscosidad, Aglutinación, pH, No. de espermatozoides en millones, Movilidad (%), Migración A (%), Migración B (%), Migración C (%), Migración D (%), Leucocitos, Espermatozoides Morfológicamente anormales (%), Espermatozoides Morfológicamente normales (%), Defectos de Cola (%), Defectos de Cabeza (%) y Defectos de Pieza Intermedia (%).

6.7.2. Extracción del DNA.

La extracción de DNA se realizará en muestra de semen, empleando el kit DNeasy blood & tissues (QIAGEN), el cual se basa en el uso de columnas de afinidad, a base de sílice con tecnología microspin. Las muestras se lisan primero usando proteinasa K (50 µg/mL), el DNA se adsorbe a la membrana DNeasy en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas que eliminan el agua a partir de moléculas hidratadas en solución y los buffers permiten la eliminación óptima de contaminantes e inhibidores de enzimas para la obtención de un DNA puro y de alta calidad.

6.7.3. Análisis de la integridad del DNA.

Después de realizar la extracción de DNA, se determinará la concentración (ng/ μ L) y pureza del material mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Una vez determinados estos parámetros se evalúa la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1 X teñido con bromuro de etidio.

6.7.4. Detección de VPH y CT.

Para la detección de los patógenos, se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) mediante la amplificación del gen L1 en 3 regiones distintas de VPH, empleando 3 pares de primers consenso universales y degenerados: L1 con un tamaño de 244 pares de bases (pb), MY de 450 pb y GP5-GP6 de 250 pb de las muestras de semen, a fin de determinar la presencia del VPH (Manos et al., 1989).

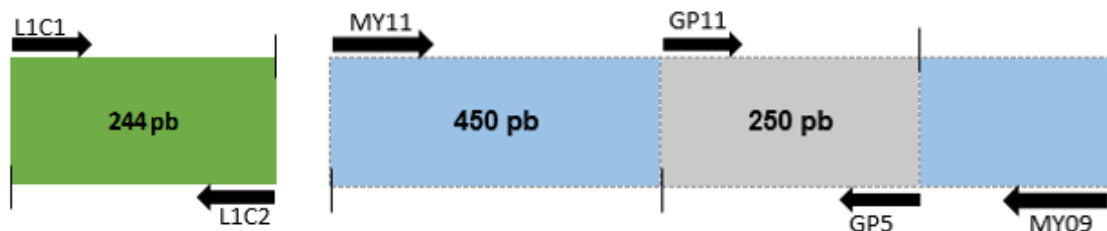


Figura 5. Estructura de los primers universales L1, MY y GP.

Para la primera amplificación se utilizaron los primers L1 y MY, posteriormente se realizó una PCR anidada, utilizando el producto de la amplificación de la región MY, como la muestra a amplificar. Las condiciones de la PCR fueron la solución Buffer MgCl₂ (2.5 μ L), primer Forward (2.5 μ L), primer Reverse (2.5 μ L), dNTPs (2.5 μ L), cloruro de magnesio (3 μ L), enzima Taq (0.5 μ L), agua bidestilada libre de nucleasas, ADN (muestra o producto de PCR), a un volumen final de 25 μ L.

Para la detección de *Chlamydia trachomatis* se amplificó un fragmento de 241 pb del plásmido críptico, a través de la PCR punto final. Al momento de llevar a cabo la amplificación, se amplificó un control positivo de ADN de *Chlamydia trachomatis* proporcionada por el departamento de Bacteriología Medica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Además, como control interno se llevó a cabo la amplificación del gen endógeno β -globina para determinar la calidad del material genético y los reactivos para la PCR.

Para la amplificación de *Chlamydia trachomatis* se usaron iniciadores consenso, previamente publicados por Mahony (1993). A continuación, se muestran las secuencias utilizadas para la amplificación:

Secuencia de los iniciadores utilizados en este estudio
Iniciadores para <i>C. trachomatis</i>
KL1: 5'-TCCGGAGCGAGTTACGAAGA-3'
KL2: 5'-AATCAATGCCCGGGATTGGT-3'
Iniciadores para beta globina humana
GH20: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'
PC04: 5'-CAACTTCATCCACGTTTCACC-3'

Se usaron las condiciones estándar siguientes para amplificar de acuerdo a trabajos previos:

Reactivo	Concentración del stock	Volumen requerido para 25μl	Concentración final
Amortiguador de la polimerasa	10X	2.5 μ l	1X
dNTP's	2Mm	2.5 μ l	0.2mM
Iniciador sentido	10 μ M	2.5 μ l	1Mm
Iniciador antisentido	10 μ M	2.5 μ l	1Mm
MgCl₂	50mM	3 μ l	6Mm
Agua bidestilada	----	11.95 μ l	----
Taq DNA polimerasa platinum (Invitrogen®)	5U/ μ l	0.05 μ l	0.01U/ μ l

A continuación, se muestran las condiciones de la mezcla de reacción para la amplificación en el termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystem 9700:

Desnaturalización → 96° → 5 minutos	} 30 ciclos de reacción
Desnaturalización → 96° → 30 segundos	
Alineamiento → 62° → 30 segundos	
Extensión → 72° → 30 segundos	
Extensión → 72° → 5 minutos	

Los tamaños de los productos amplificados para cada región se visualizaron en geles de agarosa al 3% (3 g de agarosa en 100 mL de solución TBE 0.5X), teñidos con bromuro de etidio, para poder observar el producto de la amplificación de cada muestra corrida en un transiluminador con luz UV.

6.7.5. Genotipificación de VPH mediante PCR multiplex.

La genotipificación se llevó mediante PCR multiplex, utilizando el kit MPCR Kit para el VPH, Set 2 (Maxim Biotech, Inc.) que permite la amplificación simultánea de distintas secuencias específicas en una sola reacción, en este caso particularmente para la amplificación de regiones específicas del gen E6 para 8 de los distintos genotipos de VPH, el 6, 11, 16, 18, 31, 33, 52 y 58.

6.7.6. Determinación de citocinas mediante un ELISA

Se cuantificaron citocinas involucradas en la respuesta inmunitaria seminal, como son citocinas de respuesta Th1 y Th2, respectivamente (IFN- γ ; IL-10 e IL-4), citocinas pro-inflamatorias como es TNF- α , IL-1 β e IL-6, mediante el método de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima o ELISA, (por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), tipo sándwich.

Se siguió la técnica descrita por el proveedor (Peprotech, USA). Para cada molécula se realizó una curva estándar y se correlaciono con los valores obtenidos en las muestras problema para calcular la concentración de las muestras problema de las citocinas. Cada placa se leyó en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, BioTek), a una longitud de onda de 540 nm.

Posteriormente, se realizó una regresión lineal con los datos de la curva estándar para cada una de las citocinas y se extrapolaron los datos obtenidos de las muestras de los pacientes sanos en estudio.

6.8. Recolección de datos

Historial clínico. Ver anexo 1.

6.9. Análisis de datos

La coinfección seminal por VPH, CT y VPH+TC se describe como frecuencia (%). Los métodos estadísticos incluyeron la media y la desviación estándar (DE) para la distribución normal y la mediana (percentil 25-75) para la distribución anormal. Específicamente, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos y el análisis de varianza de un factor (ANOVA) con Tukey post hoc o el ANOVA unidireccional de Kruskal-Wallis se utilizó para comparaciones de más de dos grupos. El valor de $p \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron utilizando el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (versión 24; SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.) y Microsoft Excel (Windows 10).

6.10. Aspectos éticos

El estudio fue sometido ante el Comité de Ética de la Universidad del Ejército y de la Fuerza Aérea y el Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología, siguiendo los parámetros bioéticos establecidos en la declaración de la declaración de Helsinki, además del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, título 2°.

NOM-012-SSA3-2012 que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos, con grado de riesgo mínimo.

7. Resultados

7.1. Artículo 1 aceptado

7.1.1 Título del artículo aceptado

El primer artículo se denomina: “Seminal pro-inflammatory cytokines and pH are affected by Chlamydia infection in asymptomatic patients with teratozoospermia”. Fue enviado el 10 de octubre de 2019 y aceptado el 24 de enero de 2020 por la revista *Central European Journal of Immunology*, que se encuentra dentro de la lista de Journal Cytation of Reports.

7.1.2 Como citar el artículo

Pérez-Soto, E., Oros-Pantoja, R., Fernández-Martínez, E., Manuel Carbonell-Campos, J., & Sánchez Monroy, V. (2021). Seminal pro-inflammatory cytokines and pH are affected by Chlamydia infection in asymptomatic patients with teratozoospermia. *Central European Journal of Immunology*, 46(1), 76-81. <https://doi.org/10.5114/ceji.2021.105247>

7.1.3 Página frontal del manuscrito

Seminal pro-inflammatory cytokines and pH are affected by *Chlamydia* infection in asymptomatic patients with teratozoospermia

ELVIA PÉREZ-SOTO^{1,2}, RIGOBERTO OROS-PANTOJA¹, EDUARDO FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ³, JUAN MANUEL CARBONELL-CAMPOS⁴, VIRGINIA SÁNCHEZ MONROY⁵

¹Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico

²Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Mexico

³Laboratory of Medicinal Chemistry and Pharmacology, Centro de Investigación en Biología de la Reproducción,

Área Académica de Medicina, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mexico

⁴Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología de la Secretaría de la Defensa Nacional, Mexico

⁵Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México

Abstract

Introduction: Infection and inflammation of the reproductive tract by *Chlamydia trachomatis* (CT) are recognized as significant risk factors for male infertility. This study aimed to evaluate CT infection and its effects on seminal parameters and cytokines in asymptomatic patients with teratozoospermia.

Material and methods: Semen samples from one hundred four male patients were collected, and CT detection was performed by polymerase chain reaction (PCR). The quality (volume, sperm concentration, pH, motility, morphology, and leucocytes) of the semen was measured by standard procedures recommended by the World Health Organization (WHO). Pro-inflammatory cytokines [interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor α (TNF- α), and interferon γ (IFN- γ)], as well as anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10), were determined by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The frequency of CT infection was expressed as a percentage. Descriptive statistics were used for comparison of cytokines from infertile men, and then the Mann-Whitney U test was applied for the contrast of seminal parameters and cytokines from CT-infected versus non-CT infected men.

Results: A ratio of 33/104 (31.7%) patients were positive for CT infection. The ejaculate of positive CT infection was found to have increased pH (pH = 7.65 in non-CT infected vs. 7.94 CT-infected men; $p = 0.026$). High levels of pro-inflammatory cytokines were found in the population studied; however, infected males were noted to have high levels of IL-1 β [184.66 (0-3985.33 pg/ml), $p = 0.001$] and IL-6 [87.8 (0-1042.8 pg/ml), $p = 0.001$].

Conclusions: CT infection increased seminal pH, as well as IL-1 β and IL-6 cytokines, suggesting a potential role of infection and inflammation in asymptomatic patients with teratozoospermia.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, inflammation, male infertility, teratozoospermia, cytokines, semen.

(Cent Eur J Immunol 2021; 46 (1): 76-81)

Introduction

Infertility is a major global problem of reproductive health. It is defined as the inability of sexually active couples to achieve pregnancy after 12 consecutive months of unprotected sex [1, 2]. Unfortunately, in many countries, infertility is under-diagnosed. It is estimated that 15% of all couples are infertile, and it is identified that a male factor plays a role in about half of the cases [3].

Furthermore, about 70% of cases of male infertility are idiopathic [2], and multiple factors are associated with the rest, such as genetic, hormonal, inadequate lifestyle, psychological stress, pro-inflammatory cytokines, as well as sexually transmitted infections (STIs), including *Chlamydia*

trachomatis (CT) [4, 5]. CT is an intracellular Gram-negative bacterium that causes infertility, although it may also cause urethritis and prostatitis in men [6, 7]. In male infertility, there is considerable variability in the rate of CT infection, ranging from 0 to 90.3%, and, in general, its prevalence is high in developing countries, such as Mexico [7].

Infections impair male fertility by different mechanisms including damaging spermatogenesis and loss of sperm function [5], and induce immunological responses where pro-inflammatory cytokines and other immunoregulatory molecules are involved by interacting with cell types [8, 9], causing chronic inflammation and damage to spermatozoa [6, 8]. There are few reports concerning the relationship between CT infection, alteration in seminal

7.1.3 Carta de aceptación

CEJI-01386-2019-02

Central European Journal of

IMMUNOLOGY

Authors:

Elvia Pérez-Soto, Rigoberto Oros-Pantoja, Eduardo Fernández-Martínez, Juan Manuel Carbonell-Campos, Virginia Sánchez Monroy

Decision letter:

January 24, 2020

CEJI-01386-2019-02

Seminal pro-inflammatory cytokines and pH are affected by Chlamydia infection in asymptomatic patients with teratozoospermia

Dear Virginia Sánchez Monroy,

I am pleased to inform you that your manuscript, entitled: Seminal pro-inflammatory cytokines and pH are affected by Chlamydia infection in asymptomatic patients with teratozoospermia, has been finally accepted for publication in our journal.

We would like to inform that your paper will be published after receiving publishing fee. In order to receive the invoice, please complete the form including data for invoicing, which is available in the payment bookmark. Failure to complete this form means that you choose not to obtain the invoice.

Please log in to your account:

<https://www.editorialsystem.com/ceji/article/180381/view/#payment>

to proceed with the payment.

In case of any problems or questions please do not hesitate to contact the technical editor at: eshelp@termedia.pl. We would appreciate if you could confirm payment within 14 days.

Thank you for submitting your work to us.

Kindest regards,

Anna Stelmaszczyk-Emmel, PhD

Associated Editor

Central European Journal of Immunology

Review 1:

The manuscript is now suitable for publication.



Central European Journal of Immunology

eISSN: 1644-4124
ISSN: 1426-3912

<p>Current issue</p> <hr/> <p>Archive</p> <hr/> <p>Manuscripts accepted</p> <hr/> <p>About the journal</p> <hr/> <p>Editorial board</p> <hr/> <p>Abstracting and indexing</p> <hr/> <p>Subscription</p> <hr/> <p>Contact</p> <hr/> <p>Instructions for authors</p> <hr/> <p>Ethical standards and procedures</p> <hr/> <p>Editorial System Submit your Manuscript</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="background-color: red; color: white; padding: 5px;">IMPACT FACTOR</td> <td style="background-color: gray; color: white; padding: 5px;">MEIN</td> <td style="background-color: gray; color: white; padding: 5px;">INDEX COPERNICUS</td> <td style="background-color: gray; color: white; padding: 5px;">GOOGLE H5</td> <td style="background-color: gray; color: white; padding: 5px;">JCI</td> <td style="background-color: blue; color: white; padding: 5px;">CiteScore 2020</td> </tr> <tr> <td style="background-color: red; color: white; padding: 5px;">2.085</td> <td style="background-color: gray; color: white; padding: 5px;">40</td> <td style="background-color: gray; color: white; padding: 5px;">158.30</td> <td style="background-color: gray; color: white; padding: 5px;">23</td> <td style="background-color: gray; color: white; padding: 5px;">2.085</td> <td style="background-color: blue; color: white; padding: 5px;">2.7</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="color: blue; text-decoration: underline;">VIEW ARTICLES</td> <td style="font-size: small;">Journal Citation Indicator</td> <td></td> </tr> </table> <div style="background-color: yellow; padding: 5px; text-align: center; margin-top: 10px;"> <p>NEW Guidelines for Authors!</p> </div> <p>Official journal of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology</p> <p>Central European Journal of Immunology is published under patronage Committee for Immunology and Etiology of Human Infections, Polish Academy of Sciences.</p> <div style="border: 2px solid red; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>Now in PubMed http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/2700/.</p> </div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; margin-top: 10px; text-align: center;"> <p>1/2021 vol. 46</p> </div>	IMPACT FACTOR	MEIN	INDEX COPERNICUS	GOOGLE H5	JCI	CiteScore 2020	2.085	40	158.30	23	2.085	2.7				VIEW ARTICLES	Journal Citation Indicator		
IMPACT FACTOR	MEIN	INDEX COPERNICUS	GOOGLE H5	JCI	CiteScore 2020															
2.085	40	158.30	23	2.085	2.7															
			VIEW ARTICLES	Journal Citation Indicator																

7.1.4 Resumen

Abstract: Introduction: Infection and inflammation of the reproductive tract by *Chlamydia trachomatis* (CT) are recognized as significant risk factors of male infertility. This study aimed to evaluate the CT infection and its effects on seminal parameters and cytokines in asymptomatic patients with teratozoospermia.

Material and methods: Semen samples from one hundred four men patients were collected out, and CT detection was performed by PCR. The quality of the semen was measured by standard procedures recommended by WHO (volume, sperm concentration, pH, motility, morphology, and leucocytes). Pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , and IFN- γ), as well as anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10), were determined by using ELISA. The frequency of CT was expressed as a percentage. Descriptive statistics were used for comparison of cytokines from infertile men, and then a Mann-Whitney U test was applied for the contrast of seminal parameters and cytokines from CT-infected vs. non-infected men.

Results: A ratio of 33/104 (31.7%) patients were positive for CT infection, and it was related to the increased pH of ejaculate (pH = 7.65 in non-infected vs. 7.94 CT-infected men; $p=0.026$). High levels of pro-inflammatory cytokines were found in all the population studied; however, the infection was related to high levels of IL-1 β [184.66 (0-3985.33 pg/mL), $p=0.001$] and IL-6 [87.8 (0-1042.8 pg/mL), $p=0.001$].

Conclusions: CT infection increased seminal pH, also IL-1 β and IL-6 cytokines suggesting a potential role of infection and inflammation in male infertility, particularly in teratozoospermia.

Key words: Prevalence, *Chlamydia trachomatis*, inflammation, male infertility, teratozoospermia, cytokines, semen

7.1.5 Apartados del artículo

Introducción (Introduction)

Infertility is a major global problem of reproductive health. It is defined as the inability of sexually active couples to achieve pregnancy after 12 consecutive months of unprotected sex [1, 2]. Unfortunately, in many countries, the diagnosis is deficient. It is estimated that 15% of all couples are infertile, and it is identified that a male factor plays a role in about half of the cases (H. Schuppe et al., 2017).

Furthermore, about 70% of cases of male infertility are idiopathic (Vander Borgh and Wyns, 2018), and multiple factors associate the rest, as genetic, hormonal, inadequate lifestyle, psychological stress, pro-inflammatory cytokines, as well as sexually transmitted infections (STIs), including *Chlamydia trachomatis* (CT) [4, 5]. In particular, CT is an intracellular Gram-negative bacteria that cause infertility, although this may also cause urethritis and prostatitis in men [6, 7]. In male infertility, there is considerable variability in the rate of CT infection, ranging from 0 to 90.3%, and, in general, its prevalence is high in developing countries, such as Mexico (López-Hurtado et al., 2017).

Infections impair male fertility by different mechanisms including damaging spermatogenesis, loss of sperm function (Al-Ezzy, 2016), and induce immunological responses where pro-inflammatory cytokines and other immunoregulatory molecules are involved by interacting with cell types [8, 9], causing chronic inflammation and damage to spermatozoa [6, 8]. There are few reports concerning the relationship between the CT infection, alteration in seminal parameters (Feodorova et al., 2018), and the elevated levels of pro-inflammatory cytokines as causes of male infertility (Al-Marzoqi Ali Hussein et al., 2014).

For this reason, this study aims to investigate the CT infection and its effects on seminal parameters and inflammatory markers in asymptomatic patients with teratozoospermia.

Método

Study Design and Population. The present study was conducted at the “Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología,” SEDENA in Mexico City.

The Institutional Human Research Ethical Committee approved the protocol and the informed consent forms. All experiments were examined and approved by the appropriate ethics committee and therefore were performed in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki, and the official Mexican Standard NOM-012-SSA3-2012.

One hundred four semen samples were obtained between January and November 2016 from military men aged 22 to 49 years old. Men were eligible for participation if they 1) were male partners from couples attending the clinic for inability to conceive within at least one year of unprotected regular sexual intercourse, 2) underwent sperm parameters analysis, and 3) provided semen by masturbation. Additionally, a clinical examination was done.

Semen analysis and criteria.

Specimens were allowed to liquefy at room temperature for 30 minutes; then, their macroscopic and microscopic examinations were performed according to the World Health Organization (WHO) [1]. The men were considered to have teratozoospermia if the percentage of

spermatozoa with normal morphology was $\leq 4\%$.

Detection of *Chlamydia trachomatis* by PCR

Semen samples were collected, and DNA extraction was performed using the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN®Ltd., U.K.), according to the manufacturer's instructions. The amplification was carried out using specific primers KL1 and KL2 of CT (Mahony et al., 1992). The β -globin gene was used as a positive control for DNA extraction and PCR methods.

Cytokines in seminal plasma.

Cytokine determinations were performed on seminal plasma (dilution 1:1) per duplicate, using sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for the pro-inflammatory cytokines IL-1 β (range: 8-1000 pg/mL), IL-6 (range: 24-1500 pg/mL), IL-8 (range: 16-1000 pg/mL), TNF- α (range: 31-2000 pg/mL) and IFN- γ (range: 8-3000 pg/mL), as well as for the anti-inflammatory cytokines IL-4 (range: 16-1000 pg/mL), and IL-10 (range: 23-3000 pg/mL) (PeproTech, USA). Standard curves were developed for each cytokine according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

The frequency of CT was expressed as a percentage. Descriptive statistics were used for comparison of cytokines from infertile men. For continuous data, the nonparametric statistical test Mann-Whitney U was applied for the contrast of seminal parameters and cytokines from CT-infected vs. non-infected men. Data was analyzed by SPSS program version 24 (SPSS Inc., USA) and Microsoft Excel for Windows 2010. In all cases, a statistical significance was assumed when $p < 0.05$.

Resultados (Results)

In this study, a ratio of 33/104 (31.7%) asymptomatic teratozoospermic patients were positive for CT infection. Table 1 summarizes seminal parameters in non-CT-infected and CT-infected asymptomatic patients with teratozoospermia. Interestingly, CT-infected men showed an increased pH in semen. The concentrations of seminal cytokines were high in the population studied (Table 2).

Table 1. Seminal parameters in the population studied.

Parameter	Non CT-infected (n=71)	CT-Infected (n=33)	Significance	Normal parameters
Volume (mL)	3.56 ± 1.44	3.1 ± 0.84	<i>p</i> = 0.761	1.5-5 mL
Total sperm number (10 ⁶ /ejaculate)	67.58 ± 55.03	75.99 ± 51.48	<i>p</i> = 0.426	>40 million
Sperm concentration (millions/mL)	21.36 ± 17.92	29.21 ± 25.16	<i>p</i> = 0.371	>20 million/mL
pH	7.65 ± 0.61	7.94 ± 0.60	<i>p</i> = 0.026	7.2-7.8
Progressive motility (% A+B)	39.88 ± 20.93	48.11 ± 16.92	<i>p</i> = 0.123	≥32%
Normal morphology (%)	1.85 ± 1.17	2.58 ± 1.5	<i>p</i> = 0.055	≤ 4 %
Leucocytes (10 ⁶)	1.32 ± 1.71	0.78 ± 0.72	<i>p</i> = 0.189	≤ 1 million

Values are media ± SD. Significance refers to Mann-Whitney test for difference between both groups, the significance level is $p \leq 0.05$. The normal parameters are those considered in the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Handbook, fifth edition, WHO 2010.

Table 2. Descriptive statistics of seminal pro-inflammatory cytokines in the population studied.

Cytokine (pg/mL)	Mean (SD)	Median (Range)	Percentil (25-75)	Fertile men	Infertile men
IFN- γ	731.92 \pm 1279.12	180.25 (0-7406)	0-951.5	0 (0-130) ^a	593(192-1665) ^d
IL-1 β	327.42 \pm 736.88	28 (0-3985.33)	0-198.41	0.70 (0.01-9) ^b	5.66 (0.1-334.8) ^b
IL-6	224.23 \pm 500.77	31.8 (0-2994.8)	0-205.8	11.98 (2.5-102) ^b	48.91 (6.9-2634) ^b
TNF- α	0.9457 \pm 6.63	0 (0-43.5)	0-0	2.76 (0.55- 10.3) ^b	18.42 (0.8-360) ^b
IL-8	1477.61 \pm 5087.01	336.64 (0-31950)	199.12-336.64	441.84 (215.4- 767) ^b	1975.34 (186.9- 6754) ^b
IL-4	43.88 \pm 52.63	27.5 (0-212.5)	7.18-71.87	12.6 \pm 3.8 ^c	8.4 \pm 3.9 ^c
IL-10	16.06 \pm 92.34	0(0-617)	0-0	2.81 ^e	5.2 (2.7-7.7) ^f

Concentration of cytokines reported by ^aPolitch et al 2007, ^bMoretti et al., 2008, ^cOmu et al., 1999, ^dSeshadri et al., 2009, ^eJiang et al. 2016, ^fMartínez-Prado and Camejo 2009 for comparison. IFN- γ : interferon- γ ; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; IL-4: interleukin-4; IL-1 β : interleukin-1 β ; IL-6: interleukin-6; IL-8: interleukin-8. Values are median (range) in pg/mL in all results, except the value of Omu et al., 1999 which is media \pm SD.

The levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 in the CT-infected group were higher than in the non CT-infected group (Table 3).

Table 3. Levels of seminal pro-inflammatory cytokines in non CT-infected and CT-infected patients.

Cytokine (pg/mL)	Non CT-infected (n=71)	CT-infected (n=33)	Significance
IFN- γ	494 (0-3394)	154 (0-7406)	$p = 0.320$
IL-4	33.75 (0-212.5)	26.25 (0-91.25)	$p = 0.052$
IL-1 β	0 (0-1304)	184.66 (0-3985.33)	$p = \mathbf{0.001}$
IL-6	0 (0-2994)	87.8 (0-1042.8)	$p = \mathbf{0.001}$
TNF- α	0 (0-108.5)	0 (0-43.5)	$p = 0.687$
IL-8	342.35 (0-31950)	364.85 (0-14817.1)	$p = 0.724$
IL-10	0 (0-1177)	0	$p = 0.202$

IFN- γ : interferon- γ ; IL-4: interleukin-4; IL-1 β : interleukin-1 β ; IL-6: interleukin-6; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; IL-8: interleukin-8. Values are the median (range). Significance refers to Mann-Whitney U test for difference between both groups, the significance level is $p \leq 0.05$.

Discusión (Discussion)

Recently, infection and inflammation of the male reproductive tract have been recognized as severe risk factors of male infertility, where CT infection is among the most prevalent sexually transmitted disease in the world [12-14]. This study examined the relationship between CT infection and its effects on seminal parameters and inflammatory markers.

Firstly, a CT infection was found in 31.7% of the semen samples from asymptomatic teratozoospermic men. This prevalence rate is very similar to other reports from Mexico and Latin America, which demonstrated a prevalence of 31.9% [7], and 38.6% [15] in infertile

patients, respectively; while in a specific population with teratozoospermia the prevalence was reported to be 35% [7].

In terms of sperm quality, according to the WHO criteria [1], the population herein studied was similar to other reports [10, 16, 17] because they also presented a higher pH value related to the CT infection (pH = 7.65 vs. 7.94). Recent findings suggest that CT infection may influence a change in pH to alkaline values in the female reproductive tract [18]. It has been observed that an alkaline pH favors a shift in the seminal microbiota, such as *Lactobacillus*, in healthy men [19]. Microbial imbalance harms semen parameters, including sperm motility and morphology, and the host becomes susceptible to other infections and diseases [19]. Concerning the immunological response, the results are consistent with other studies that have reported the presence of high levels of diverse cytokines in seminal plasma from infertile men, such as the pro-inflammatory cytokines IL-6 [20-23], TNF- α [18, 19, 21, 22, 25], IL-8 [19, 25, 26], IL-1 β [20, 25], and IFN- γ [29], as well as the anti-inflammatory cytokines IL-4 [24] and IL-10 [30], among others [29, 30]. As in the case of most infections, the immune system is a crucial element in the body's attempts to eradicate pathogens such as *Chlamydia trachomatis*, which infect the epithelial cells and produce tissue damage. CT infection is characterized by clinical manifestations from subclinical disease to a robust inflammatory response; unfortunately, 50% of men are asymptomatic which may lead to repeated transmission [6, 14]. Chronic inflammation by infections can lead to urethritis, epididymitis, epididymo-orchitis, and potentially prostatitis and infertility in men [6, 8, 31]; nevertheless, this process has been poorly studied. Interestingly, the activation of immunological responses due to infection was evidenced in this study, as well as others. Other authors have suggested that the CT infection often causes tissue lesions that stimulate

IL-1, which in turn activates polymorphonuclear cells (PMN) and macrophages, and subsequently, the production of IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , and IFN- γ is induced [8].

The IL-6 level in the seminal plasma has also been observed to be higher in infertile men [17, 33], compared to fertile men [34, 35]; however, the results found herein are the highest so far reported. Other authors have suggested that IL-6 is involved in lipid peroxidation (LP). This conclusion was confirmed due to the detection of a byproduct (malondialdehyde, MDA) added to IL-6, simultaneously [36]. These reactions activate oxidative stress, which contributes to male infertility [8]. It is essential to consider that the population studied here consisted of infertile military men, whose condition contributes to presence of several neurochemical, endocrinological, and immunological alterations due to stress, as reported by other authors in military communities [36, 37]. This may also have contributed to modulated inflammatory cytokine levels. For example, studies on hypercortisolemia in military trainees suggest that this hormone also contributes to infertility due to decreases of testosterone by the repetition of psychological stress [37], and more in socially dominant subjects [38]. In addition, cortisol has been found to increase IgE synthesis in response to IL-4, which suppresses the TNF- α production by monocytes [37]. The CT infection probably is chronic and accompanied by other pathogens in semen which are responsible for altered pro-inflammatory cytokine levels and an inadequate response of Th2 cytokines such as IL-10 and IL-4.

Furthermore, both low and non-significant levels of IFN- γ and TNF- α were found. This suggests that most of these patients were suffering from chronic infection with CT, as reported by Feodorova et al. [10].

It is proposed that IFN- γ participates in the activation of the innate immune response at the beginning of the infection [6, 38]. CT infection exerted its effect on motility at high concentrations, as reported by other authors [39]; hence, it may be assumed that this cytokine is no longer protecting against the chronic CT infection.

Taken together, the results suggest a strong pro-inflammatory response and a possible chronic CT infection, which can cause effects on the health of men and lead to pathologies such as chronic prostatitis with subfertility [40].

Conclusions (conclusion)

In conclusion, CT infection causes immunological responses because it increases IL-1 β and IL-6, also increasing seminal pH (see Fig. 1), suggesting a potential role of infection and inflammation in asymptomatic patients with teratozoospermia.

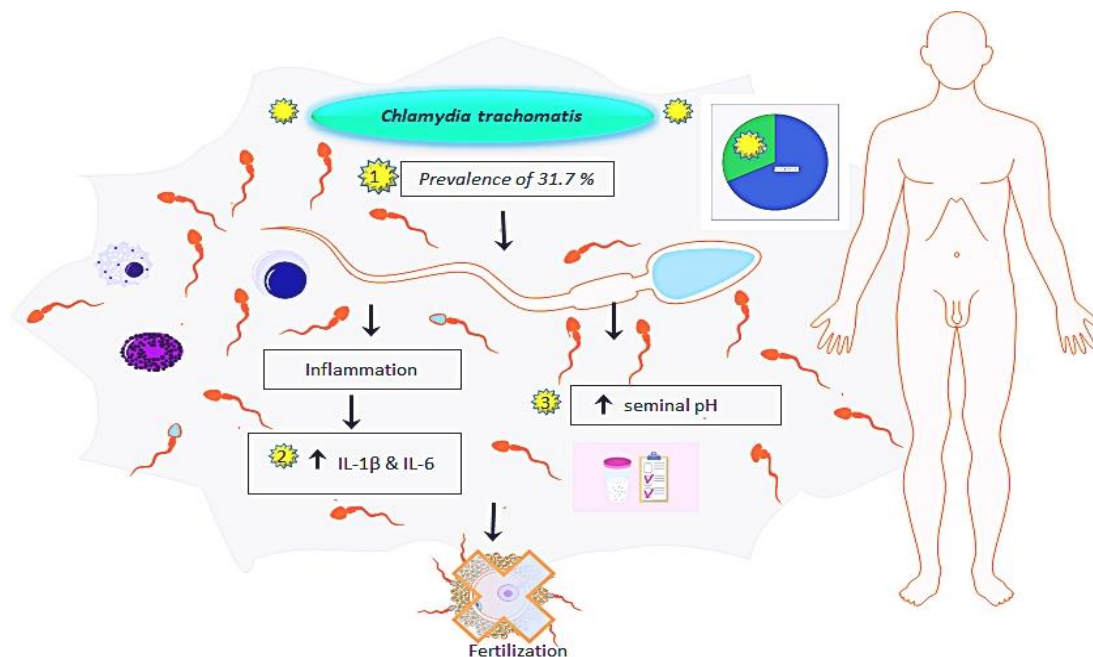


Fig. 1. *Chlamydia trachomatis* infection increases seminal pH, also interleukin (IL)-1 β and IL-6 pro-inflammatory cytokines in asymptomatic patients with teratozoospermia. Image modified from Motifolio Toolkit licence (<http://www.motifolio.com>)

Acknowledgments

The authors are grateful for the availability of patients attending at the Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología.

Funding: This work has been funded by the transdisciplinary SIP research project of the Instituto Politécnico Nacional. SIP number 20190296 and the CONACYT scholarship number 2018-000068-02NACF-24430 for doctoral studies of Elvia Pérez-Soto.

Competing financial interests

All authors declare no competing financial interests.

Referencias (References)

1. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research (2010): WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. WHO Press, Switzerland.
2. Vander BM, Wyns C (2018): Fertility and infertility: definition and epidemiology. *Clin Biochem* 62: 2-10.
3. Schuppe H, Pilatz A, Hossain H, et al. (2017): Urogenital infection as a risk factor for male infertility. *Dtsch Arzteblatt* 114: 339-346.
4. Hou D, Zhou X, Zhong X, et al. (2013): Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril* 100:1261-1269.
5. Al-Ezzy AIA (2016): Effect of torch agents and Chlamydia trachomatis on reproductive parameters and fertility hormones of Iraqi infertile males. *Asian J Pharm Clin Res* 9: 47-56.
6. Redgrove KA, McLaughlin EA (2014): The role of the immune response in Chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: A double-edged sword. *Front Immunol* 5:1-22.
7. López-Hurtado M, Velazco-Fernández M, Pedraza-Sánchez MJE, et al. (2017): Molecular detection of Chlamydia trachomatis and semen quality of sexual partners of infertile women. *Andrologia* e12812: 1-6.
8. Agarwal A, Rana M, Qiu E, et al. (2018): Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. *Andrologia* 50: 1-13.
9. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, et al. (1992): Confirmatory polymerase chain reaction testing for Chlamydia trachomatis in first-void urine from asymptomatic and symptomatic men. *J Clin Microbiol* 30: 2241-2245.
10. Feodorova V, Sultanakhmedov E, Saltykov Y, et al. (2018): First detection of Chlamydia trachomatis “Swedish” variant (nvCT) in a Russian couple with infertility. *Open Microbiol J* 12: 343-352.

11. Al-Marzoqi AH, Al-tae ZM, Ahmed KN (2014): Profiles among asthenospermic men with Chlamydia trachomatis infections: concentrations and significance of multiplex seminal fluid cytokine and other immunologic factors. *Int J Sci Nat* 5: 103-108.
12. Loveland KL, Klein B, Poeschl D, et al. (2017): Cytokines in male fertility and reproductive pathologies: Immunoregulation and beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 1-16.
13. Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, et al. (2008): Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl* 29: 198- 206.
14. Samplaski MK, Domes T, Jarvi KA (2014): Chlamydial infection and its role in male infertility. *Adv Androl* 2014: 1-11.
15. Vigil P, Morales P, Tapia A, et al. (2002): Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrologia* 34: 155-161.
16. Kokab A, Akhondi MM, Sadeghi RM, et al. (2010): Raised inflammatory markers in semen from men with asymptomatic Chlamydial infection. *J Androl* 31: 114-120.
17. Marvast Dehghan L, Aflatoonian A, Talebi A, et al. (2016): Semen inflammatory markers and Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples. *Andrologia* 48:729-736.
18. Ziklo N, Huston WM, Hocking JS, et al. (2016): Chlamydia trachomatis genital tract infections: when host immune response and the microbiome collide. *Trends Microbiol* 24:750-765.
19. Baud D, Pattaroni C, Vulliemoz N, et al. (2019): Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Front Microbiol* 10: 1-9.
20. Moretti E, Cosci I, Spreafico A, et al. (2009): Semen characteristics and inflammatory mediators in infertile men with different clinical diagnoses. *Int J Andrology* 6: 637-646.
21. Shukla KK, Agnihotri S, Gupta A, et al. (2013): Significant association of TNF α and IL-6 gene with male infertility – an explorative study in Indian populations of Uttar Pradesh. *Immunol Lett* 156: 30-37.
22. Aghazarian A, Stancik I, Pflüger H, Lackner J (2013): Influence of pathogens and moderate leukocytes on seminal interleukin (IL)-6, IL-8, and sperm parameters. *Int Urol Nephrol* 45: 359-365.
23. Hærvig KK, Kierkegaard L, Lund R, et al. (2018): Is male factor infertility associated with midlife low-grade inflammation? A population based study. *Hum Fertil* 21: 146-154.
24. Omu AE, Al-Qattan F, Al-Abdul-Hadi FM, et al. (1999): Seminal immune response in infertile men with leukocytospermia: Effect on antioxidant activity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 86: 195-202.
25. Paradisi R, Capelli M, Mandini M, et al. (1996): Increased levels of interferon-gamma in seminal plasma of infertile men. *Andrologia* 28: 157-161.

26. Eldamnhoury EM, Elatrash GA, Rashwan HM, et al. (2018): Association between leukocytospermia and semen interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in infertile men. *Andrology* 6: 775-780.
27. Eggert-Kruse W, Kiefer I, Beck C, et al. (2007): Role for tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 1-beta (IL-1 β) determination in seminal plasma during infertility investigation. *Fertil Steril* 4: 810-823.
28. Seshadri S, Bates M, Vince G, et al (2009): The Role of Cytokine Expression in Different Subgroups of Subfertile Men. *Am J Reprod Immunol* 62: 275–282.
29. Havrylyuk A, Chopyak V, Boyko Y, et al. (2015): Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Cent Eur J Immunol* 40: 337-344.
30. Martínez-Prado E, Camejo Bermúdez MI (2010): Expression of IL-6, IL-8, TNF alpha, IL-10, HSP60, anti-HSP-60 antibodies, and anti-sperm antibodies, in semen of men with leukocytes and/or bacteria. *Am J Reprod Immunol* 63: 233-243.
31. Jiang L, Zheng T, Huang J, et al. (2016): Association of semen cytokines with reactive oxygen species and histone transition abnormalities. *J Assist Reprod Genet* 9: 1239-1246.
32. Ahmadi MH, Mirsalehian A, Bahador A (2016): Association of Chlamydia trachomatis with infertility and clinical manifestations: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Infect Dis (Auckl)* 48: 517-523.
33. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, et al. (2007): Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod* 22:2928-2935.
34. Koçak I, Yenisey Ç, DüNDAR M, et al. (2002): Relationship between seminal plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor α levels with semen parameters in fertile and infertile men. *Urol Res* 30: 263-267.
35. Moretti E, Cosci I, Spreafico A, et al. (2009): Semen characteristics and inflammatory mediators in infertile men with different clinical diagnoses. *Int J Andrology* 6: 637-646.
36. Camejo MI, Segnini A, Proverbio F (2001): Interleukin-6 (IL-6) in seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm. *Arch Androl* 47: 97-101.
37. Bernton E, Hoover D, Galloway R (2006): Adaptation to chronic stress in military trainees. *Ann N Y Acad Sci* 774:217-231.
38. Helmunt HD, Buchtal J, Gutberlet I, et al. (1997): Social hierarchy and adrenocortical stress reactivity in men. *Psychoneuroendocrinology* 22: 643-650.
39. Carrasquel G, Camejo MI, Michelangeli F, et al. (2014): IFN-gamma alters the human sperm membrane permeability to Ca²⁺. *Syst Biol Reprod Med* 60: 21-27.
40. Cai T, Wagenlehner FME, Mondaini N, et al. (2014): Effect of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis co-infection on sperm quality in young heterosexual men with chronic prostatitis-related symptoms. *BJU* 14: 281-287.

7.2. Artículo 2 aceptado

7.2.1 Título del artículo

El segundo artículo se denomina: Proinflammatory and Oxidative Stress States Induced by Human Papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* Coinfection Affect Sperm Quality in Asymptomatic Infertile Men. Fue enviado el 9 de julio del 2021 y aceptado el 20 de Agosto del 2021, por la revista *Medicina*, que se encuentra dentro de la lista de Journal Cytation of Reports.

7.2.2 Carta de envío y/o recepción del artículo



7.2.3 Resumen

Abstract: *Background and Objectives:* To investigate the effect of infection with human papillomavirus (HPV) or *Chlamydia trachomatis* (CT) and HPV + CT coinfection on sperm quality, inflammation, and the state of oxidative stress (OS) in asymptomatic infertile men. *Materials and Methods:* Semen samples from 84 asymptomatic military infertile men were studied. The polymerase chain reaction (PCR) was used for the molecular detection of HPV and CT. Semen parameters were analyzed according to the World Health Organization guidelines. Inflammation was evaluated by an IL-1 β , IL-6, and IFN- γ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and OS by the quantification of lipid peroxidation (LPO), 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), and total antioxidant capacity (TAC). *Results:* A total of 81 of the 84 (96.4%) samples were positives for the pathogens, with 55/81 (68%) being positive for HPV, 11/81 (13.5%) for CT, and 15/81 (18.5%) for HPV+CT coinfection. Seminal parameters were affected in the infected groups, including pH increases above the normal range in all groups. An abnormal sperm morphology was observed in the HPV and HPV + CT groups. Higher cytokine levels were detected in the HPV group and the highest IL-1 β level was found in the HPV + CT group. No cytokines were detected in the CT group. High LPO and 8-OHdG levels were found in all groups with a lower TAC. Comparisons between groups showed the highest OS state was observed in the HPV group. *Conclusions:* High HPV infection or coinfection (HVP + CT) in these infertile men suggest compromising male fertility by inducing a proinflammatory state and OS. Infection with CT suggests an alteration of the state of OS by promoting an alkaline pH.

Keywords: human papillomavirus; *Chlamydia trachomatis*; sperm quality; oxidative stress; inflammation; cytokines; male infertility

7.2.4 Apartados del artículo

Introducción (Introduction)

Infections with human papillomavirus (HPV) and *Chlamydia trachomatis* (CT) are the most common sexually transmitted infections (STIs) worldwide [1–3], which cause considerable morbidity and socioeconomic problems [4] and may lead to death [1]. Both pathogens can present asymptomatic phases, a fact that makes the early diagnosis of male infertility challenging [1,3]. Notably, HPV infection can reduce the sperm motility [1,5] and concentration [2] and can alter normal sperm morphology [4,6]; however, the mechanisms associated with these changes have not been fully described yet. Infection with CT can cause direct damage to sperm, reducing the sperm concentration, motility [3], and vitality [1], and can increase pH [7], lipid peroxidation (LPO) [8], and even proinflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6 in semen of infertile men [7].

Human semen contains cytokines that exert pleiotropic and redundant effects during the activation of innate, cellular, and inflammatory responses; in addition, the growth and differentiation of germ cells and functions of genital organs are regulated by proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , and IFN- γ . Cytokines induced by infections, inflammation, and oxidative stress (OS) disrupt the male accessory gland function, ejaculate parameters, and sperm performance [9]. Moreover, the imbalance between reactive oxygen and nitrogen species (RONS) and antioxidants induces OS in the male reproductive tract and semen, worsening male infertility [10]. Spermatozoa are susceptible to OS-induced damage because their plasma membranes contain high concentrations of polyunsaturated fatty acids prone to LPO, generating malondialdehyde (MDA) and DNA damage and compromising fertilization [11,12].

Sperm cells are naturally protected from oxidative damage by endogenous enzymatic antioxidants in seminal plasma. Moreover, a wide variety of endogenous non-enzymatic antioxidants such as pyruvate, glutathione, carnitine, and vitamins C and E capture free radicals or RONS, which can be quantified by the total antioxidant capacity (TAC) assay [11,12]. The detection of infectious agents, inflammatory markers, and OS is necessary for the comprehensive diagnosis of male infertility [9]. The study aims to investigate the effect of HPV, CT, and HPV+CT coinfection on sperm quality, proinflammatory cytokines, and the OS state in the semen of asymptomatic military infertile men.

7.2.5. Método (Materials and methods)

Research Design and Population

This cross-sectional study included 84 male military service members with a mean age of 31.81 ± 5.71 years; this population was selected during infertility consultation between January and November 2019 in the “Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología” of the National Defense Ministry, México City. Inclusion criteria were men attending the hospital for conjugal infertility investigation who failed to conceive after one year of unprotected intercourse and who agreed to be subjected to sperm parameter analysis. Men under drug therapy and those with undescended testes, varicocele, and other structural abnormalities were excluded.

Semen Analysis

Before semen collection and analysis, the men were asked to refrain from sexual intercourse for 3–5 days. Immediately after collection, the samples were liquefied at room temperature for up to 30 min; then, semen analysis was performed according to World Health

Organization guidelines [13]. The semen samples were centrifuged at 3000× g for 10 min to isolate seminal plasma and cell pellets were separated and stored at −20 °C until the time of analysis.

Detection of HPV and Chlamydia trachomatis by PCR

Detection of HPV and Chlamydia trachomatis. DNA was extracted from the semen samples using the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, MAN, UK).

The HPV genome was detected by PCR using universal primers (MY09/11, GP5+/6+ and L1C1/C2) [14]. Amplification of CT DNA was carried out using the CT-specific primers KL1 and KL2 [15]. The beta-globin gene was used as a positive control for DNA extraction and PCR methods.

Cytokines in the Seminal Plasma

The seminal content of proinflammatory cytokines such as IFN- γ (range: 8–3000 pg/mL), IL-1 β (range: 8–1000 pg/mL), and IL-6 (range: 24–1500 pg/mL) was determined using a quantitative sandwich ELISA method. Standard curves were constructed for each cytokine according to the manufacturer's instructions (PeproTech, NJ, USA). Seminal cytokine concentrations are expressed as pg/mL of seminal plasma.

Assessment of Lipid Peroxidation in the Seminal Plasma

LPO was estimated in the semen samples by the measurement of malondialdehyde (MDA) using the thiobarbituric acid (TBA) method, with minor modifications [16]. Briefly, 250 μ L of seminal plasma (supernatant) was added to 750 μ L of 150 mM Tris-HCl, pH 7.4, in a glass tube and was incubated for 30 min at 37 °C; next, 2 mL of TBA reagent (15%

trichloroacetic acid in 0.375% TBA, 1:1 v/v) was added. The final mixture was then heated for 30 min at 95 °C. After cooling to room temperature, the mixture was centrifuged at 3000× g for 10 min and absorbance of the supernatant was read in a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) at 532 nm. The results were expressed as nanomoles of MDA per milligram of protein. The protein levels were quantified by the Bradford protein assay using bovine serum albumin as standard.

8-Hydroxydeoxyguanosine Assay in the Seminal Plasma

DNA oxidation was evaluated by the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), a ubiquitous marker of OS. The levels of 8-OHdG in 100 µL of seminal plasma were measured using the OxiSelect Oxidative DNA Damage ELISA Kit (Cell Biolabs Inc., CA, USA). The absorbance of each sample was determined in a microplate reader (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) at a wavelength of 450 nm and the levels of 8-OHdG were calculated from a standard curve. The minimum detectable concentration of 8-OHdG was 20 ng/mL and the maximum detectable concentration was 100 ng/mL.

Quantification of Total Antioxidant Capacity

The non-enzymatic TAC of seminal plasma was measured by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method [16,17], with minor modifications. The FRAP working solution was prepared by mixing 10 volumes of 300 mmol/L acetate buffer, pH 3.6, with 1 volume of 10 mmol/L 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ) in 40 mmol/L HCl and with 1 volume of 20 mmol/L FeCl₃.6H₂O, and was warmed to 37 °C. Next, 30 µL of seminal plasma, 90 µL of distilled water, and 30 µL of each standard solution (FeSO₄.7H₂O; 1000, 750, 500, 250, 100 µM) were transferred to an Eppendorf tube (2 mL) and 900 µL of the FRAP working solution

was added. The mixture was heated to 37 °C for 10 min. Finally, the absorbance values of blank, standard solutions, and samples were read in a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) at 593 nm. The results were corrected for dilution and are expressed as $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$. All solutions were freshly prepared and immediately used. Measurements were performed in triplicate.

Statistical Analysis

Seminal HPV, CT, and HPV+CT coinfection are described as frequency (%). Statistical methods included mean and standard deviation (SD) for normal distribution and median (25th–75th percentile) for abnormal distribution. Specifically, the Mann–Whitney U test was used for comparison of two groups and one-factor analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey or the Kruskal–Wallis one-way ANOVA was used for comparisons of more than two groups. A p value < 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (version 24; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Microsoft Excel (Windows 10).

Ethics Statement

The study protocol was approved by the institutional review board of The “Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología” of the National Defense Ministry, México City (CONBIOÉTICA-09-CEI-015-20180924) and informed consent was obtained from all participants. All procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and with the Official Mexican Standard (NOM-012-SSA3-2012).

Resultados (Results)

The results of the molecular assay demonstrated that 81 of the 84 samples (96.4%) were positives for the pathogens, with 55/81 (68%) being positive for HPV and 11/81 (13.5%) for CT and coinfection being detected in 15/81 (18.5%) as Figure 1.

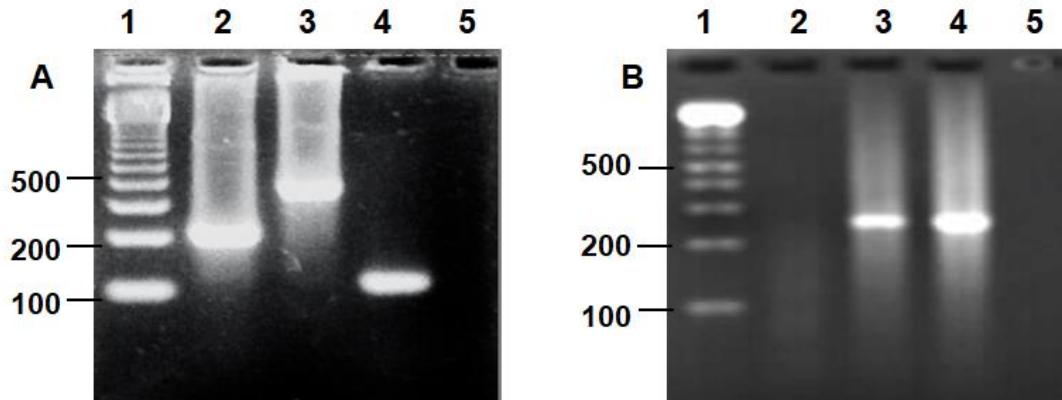


Figure 1. Pathogens detected in this study. Electrophoresis of PCR products from representative samples. (A) HPV detection. Lane 1: molecular marker 100 bp; lanes 2, 3, 4, 5: representative samples of beta-globin gene (human control), MY, GP, and L1 (L1 HPV genome), respectively (markers MY and GP PCR positive, marker L1 PCR negative). (B) *Chlamydia trachomatis* detection. Lane 1: molecular marker 100 bp; lanes 2, 3, 4, 5: representative PCR-positive (3,4) and PCR-negative (2,5) samples.

Seminal parameters, cytokines, and OS biomarkers were analyzed and compared between the infected groups: HPV, CT, and HPV + CT (Tables 1 and 2). An analysis of the infected groups showed that the pathogens affected seminal parameters, with the observation of pH increasing above the normal range in all groups. Abnormal sperm morphology was detected in the HPV and HPV + CT groups.

The highest cytokine levels were observed in the HPV group; however, IL-1 β levels were higher in the coinfecting group than in the HPV group and no cytokines were found in the CT-infected group. LPO and 8-OHdG levels were detected in all groups, in accordance with the lower TAC levels; nevertheless, the highest state of OS was found in the HPV group.

Table 1. Evaluation of seminal parameters according to infection with HPV, CT, or HPV+CT coinfection.

Parameter	HPV ¹	CT ²	HPV + CT ³	<i>p</i>	Normal Range
N (frequency)	55/81 (68%)	11/81 (13.5%)	15/81 (18.5%)		
Age (years) †	31.40 ± 5.84	30.27 ± 4.07	33.38 ± 4.13	>0.05	
Volume (mL) †	3.29 ± 1.34 ^a	2.19 ± 1.35	3.22 ± 0.96	<0.05	(1.5–5 mL)
pH ‡	8 (7.00–8.00)	8 (7.5–8.00)	8.00 (8.00–8.00)		(7.2–7.8)
Total sperm number (million/ejaculate) ‡	93.00 (46.00–156.00)	56.00 (32.80–148.00)	77.00 (49.00–134.00)	>0.05	(>39)
Sperm count per mL (million/mL) ‡	24 (15.00–52.00)	44.00 (15.30–97.00)	25.00 (16.00–48.00)	>0.05	(>15 million/mL)
Normal sperm morphology (%) †	2.27 ± 1.42 ^a	5.64 ± 2.87	2.67 ± 2.58 ^c	<0.05	(≥4%)
Abnormal sperm morphology (%) †	97.73 ± 1.42 ^a	94.36 ± 2.87	97.33 ± 2.58 ^c	<0.05	
Head defects (%) †	41.95 ± 8.70	43.82 ± 12.40	47.33 ± 13.71	>0.05	
Midpiece defects (%) †	25.82 ± 8.34	24.00 ± 13.19	23.27 ± 4.49	>0.05	
Tail defects (%) †	30.00 ± 12.19	26.27 ± 19.12	23.20 ± 14.30	>0.05	
Total progressive motility (% A + B) †	43.87 ± 20.00	45.00 ± 22.50	47.33 ± 18.45	>0.05	(≥32%)
Fast progressive motility (% A) †	5.96 ± 14.84	34.17 ± 28.29	2.00 ± 1.34 ^c	<0.05	
Low progressive motility (% B) †	38 ± 18.61 ^a	10.83 ± 23.22	45.33 ± 17.44 ^c	<0.05	
Leukocytes (million) ‡	0.8 (0.350–1.70)	0.42 (0.110–1.48)	0.700 (0.300–1.070)	>0.05	(≤1 million)

¹ Infertile men with human papillomavirus infection. ² Infertile men with *Chlamydia trachomatis* infection. ³ Infertile men coinfecting with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. All data are expressed as mean ± SD or median (25th–75th percentile). † ANOVA with post hoc Tukey; ‡ Kruskal–Wallis test. ^a HPV vs. CT group (*p* < 0.05); ^c CT vs. HPV + CT group (*p* < 0.05).

Table 2. Levels of seminal proinflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers in the groups.

Variable	HPV ¹	CT ²	HPV + CT ³	<i>p</i>
IFN- γ (pg/mL) ‡	524.25 (226.45–764.62) ^a	ND	141.50 (39.00–911.90) ^c	<0.05
IL-1 β (pg/mL) ‡	141.33 (0–337.68) ^a	0.000 (0–1.33)	328.00 (141.33–1303.00) ^{b,c}	<0.05
IL-6 (pg/mL) ‡	203.30 (0.400–203.33) ^a	ND	190.80 (36.8–271.80) ^c	<0.05
LPO (nmol MDA/mg protein) ‡	9.00 (7.04–12.23) ^a	4.21 (2.42–4.34)	7.45 (4.91–10.70) ^c	<0.05
8-OHdG (ng/mL) *	8.29 (8.04–8.68) ^a	1.9 (1.85–5.05)	8.20 (7.85–8.92)	<0.05
TAC (μ mol/L) †	590.05 \pm 401.11 ^a	1086.91 \pm 273.57	713.44 \pm 481.11 ^c	<0.05

¹ Infertile men with human papillomavirus infection. ² Infertile men with *Chlamydia trachomatis* infection. ³ Infertile men coinfecting with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. Not detected, ND; interferon gamma, IFN- γ ; interleukin-1 beta, IL-1 β ; interleukin-6, IL-6; lipid peroxidation, LPO; malondialdehyde, MDA; 8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG; total antioxidant capacity, TAC. All data are expressed as mean \pm SD or median (25th–75th percentile). * Mann–Whitney U; † ANOVA with post hoc Tukey; ‡ Kruskal–Wallis test. ^a HPV vs. CT group ($p < 0.05$); ^b HPV vs. HPV + CT group ($p < 0.05$); ^c CT vs. HPV + CT group ($p < 0.05$).

Discusión (Discussion)

The relevance of STIs such as those caused by HPV and CT as an etiological factor of male infertility remains controversial. Most studies report that these pathogens affect semen quality in asymptomatic infertile men [1,2,18]. Some reports suggest that sperm quality is compromised by the inflammatory processes and oxidative damage caused by CT in the male tract [1,7,8], while the role of HPV infection is still unknown. The purpose of this study was to investigate the effect of HPV, CT, and HPV+CT coinfection on sperm quality, inflammation, and the OS state in the semen of asymptomatic sexually active young men.

A high prevalence of seminal HPV infection has been demonstrated by nested PCR in oligospermic and azoospermic men (30% and 40%, respectively) [18].

This study highlighted the high prevalence of HPV infection (68%) and HPV+CT coinfection (18.5%), which is probably attributable to the specific population of military asymptomatic infertile patients analyzed who may be affected by other STIs. Other authors studying the Mexican army population found a high prevalence of seminal HPV in healthy soldiers (49%) and concluded that a risky sexual behavior, a large number of sexual partners, and anal intercourse increase the risk of acquiring and transmitting an STI [19]. Additionally, the military status contributes to the development of several psychological, endocrinological, and immunological alterations due to stress, as reported in military communities [7,20]. Such conditions can increase the susceptibility to infection. Gimenes et al. detected seven sexually transmitted agents simultaneously in men with conjugal infertility; the most prevalent STI was HPV (38.5%), followed by *Trichomonas vaginalis*, CT and HSV-1/-2 (9.6% each),

highlighting that HPV + CT coinfection in the semen samples (7.1%) of asymptomatic sexually active young men (31.81 ± 5.71 years) can influence their reproductive health [21]. In this work, CT infection and CT + HPV coinfection were found in 13.5% and 18.5% of men, respectively, and the data were similar to other reports of men studied for infertility [3,21]. However, a higher prevalence (41.4%) in respect to this study was reported in young heterosexual males with chronic prostatitis-related symptoms attributable to CT + HPV coinfection [4]. Then, the early detection of pathogens such as HPV and CT may prevent the development of other diseases such as prostatitis or even prostate cancer [22].

The results suggest that semen quality was altered by the pathogens, as demonstrated by a pH increase. Recent studies suggest that infection with CT [7] and HPV [2] may cause a pH change to alkaline in the semen of infertile men, as well as shifts in the seminal microbiota, such as a decrease in *Lactobacillus* in healthy men [23]. Lactobacilli have a positive effect on sperm motility and viability [23]. The imbalance in the seminal microbiota may increase the susceptibility of patients to other infections or diseases.

According to Damke et al., HPV semen infection may modify the semen volume decrease or increase) and augment pH (≥ 7.8), indicating altered proportions of the fluid secreted by the major sexual accessory glands (prostate and seminal vesicles) [2]. Changes in prostate markers of glandular dysfunction may influence fertility; furthermore, HPV infection and HPV + CT coinfection altered normal sperm morphology, similar to other reports [4,6]. In addition, there is evidence that HPV infection is correlated with teratozoospermia [21].

The negative impact of HPV or CT infection on sperm morphology is not well understood. It is hypothesized that morphological disturbances may result from the ability of the virus to bind to the spermatozoa head (through interactions between HPV capsid protein L1 and

syndecan-1), as reported for HPV infection [5]. Accordingly, all infected groups studied here exhibited an almost two-fold higher percentage of head defects compared to defects in the midpiece and tail; however, comparisons with an uninfected group are necessary to confirm this evidence.

Pathogens can induce the secretion of proinflammatory cytokines and OS in the semen of asymptomatic infertile men. Cytokines play a central role in physiological and pathological processes in the male reproductive tract, innate and cellular immune responses, inflammation, growth regulation, germ cell differentiation, and intracellular signal transduction [24]. Fraczek et al. hypothesized that the high concentration of proinflammatory cytokines, released during semen inflammation/infection, might modulate the activity of the pro- and antioxidative systems, provoking permanent OS in spermatozoa and reducing the fertilizing potential [24]. These bioactive substances may constitute an essential link between inflammation and male infertility [24]. The high prevalence of HPV infection or coinfection with CT in these men could have an effect of an increase in proinflammatory cytokines such as IFN- γ , IL-1 β , and IL-6, with HPV mainly inducing IFN- γ and IL-6 as a proinflammatory response, probably due to the L1 protein or E6/E7 “transforming” genes found in spermatozoa [24]. HPV+CT coinfection caused a more significant proinflammatory response by the release of IL-1 β ; perhaps, the sum of viral proteins and CT lipopolysaccharide activate macrophages, increase RONS [24], or even cause defective spermatozoa [10].

The overproduction of RONS or reactive oxygen species (ROS) impairs sperm function [11,25]. Possibly, multiple risk factors increase the generation of ROS in sperm mitochondria [10]. Moreover, IL-1 β and IL-6 might negatively influence sperm motility

[25], LPO, and oxidative DNA damage by the increase in 8-OHdG [10,11,26] as the results found herein in the HPV and CT+HPV groups, reducing male fertility. Infection only with CT may generate fewer RONS, which also induces less LPO probably because antioxidant systems are still active, increasing TAC levels. However, these levels are similar to those found in other infertile populations [27] but without seminal HPV, CT, or coinfection, then other factors such as lifestyle choices (tobacco and alcohol consumption) and environmental factors trigger testicular sources of RONS [11,26], which could stimulate OS in CT infection. Moreover, seminal TAC levels were significantly lower in HPV infection or CT coinfection, resembling other infertile male populations [27], which may decrease the percentage of motile A and non-progressive motility (% motile A + B). Gholinezhad et al. found a lower percentage of motility in infertile men compared to fertile men, although with typical values of this sperm parameter according to the WHO [27].

The results suggest that infection with CT contributed to OS characterized by augmented LPO and diminished TAC levels, as reported previously [8,28]. HPV infection contributed to increased proinflammatory cytokines and the intensity of OS, which may have harmful consequences for spermatozoa, triggering alterations in sperm morphology, increasing pH, and indirectly affecting their redox profile and milieu due to the production of RONS and/or IL-1 β . These molecules seem to affect the motility because fast progressive motility A was decreased, while there was a high percentage of head and tail defects in all groups; defective human sperm has been shown to spontaneously generate mitochondrial RONS to an extent that can affect sperm motility [10]. Compared to fertile men, asthenozoospermic males have reduced mitochondrial aconitase (ACO2) in spermatozoa, compromising the tricarboxylic acid cycle and, consequently, reducing the ATP synthesis and motility [29].

Conclusiones (Conclusion)

The high prevalence of HPV infection and HPV + CT coinfection detected in this study of infertile men, suggests a significant negative impact on male fertility, which could contribute to induce a proinflammatory state (increase in IFN- γ , IL-1 β and IL-6), particularly an increase in IL-1 β in HPV + CT coinfection. HPV or HPV + CT could induce OS by an increase in LPO and 8-OHdG and a decrease in non-enzymatic antioxidant systems, promoting an alkaline pH, alterations in sperm morphology, and decreased sperm motility A of military asymptomatic infertile men.

The results suggest that CT infection contributed to OS characterized by an increased LPO, decreased TAC levels, and increased seminal pH as seen in Figure 2. A comprehensive diagnosis is necessary for better treatment of male infertility and to prevent other infections or diseases in men.

The main limitation of this study included its cross-sectional design, due to it being a study of men attending the hospital for conjugal infertility investigation, and the small sample size. Thus, a case–control study involving a more significant number of participants is required (fertile and infertile men). Studies in progress that involve healthy fertile controls of general populations and military communities could confirm the evidence obtained here. The repetition of HPV screening in semen after 12 months would be necessary to determine the clearance or persistence of seminal HPV infection. The results highlight IFN- γ , IL-1 β , IL-6, LPO, 8-OHdG, and TAC evaluation in seminal plasma for a comprehensive state of male infertility to improve therapeutic intervention in male partners of infertile couples and to prevent infections or diseases.

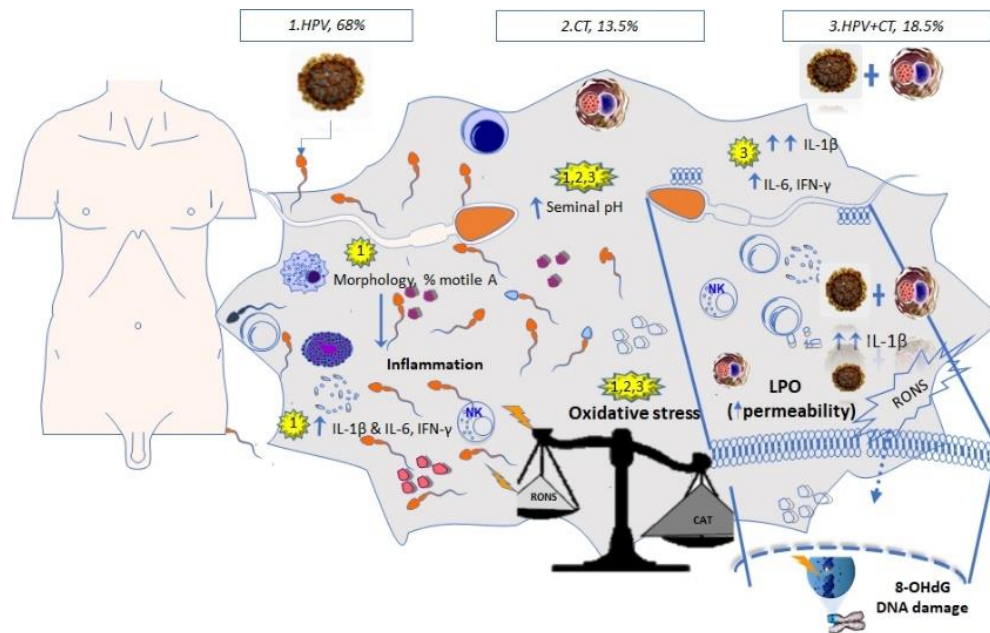


Figure 2. HPV infection and HPV+CT coinfection have a significant negative impact on male fertility. Pathogens induce a high proinflammatory state and oxidative stress, particularly an increase in IL-1 β in HPV + CT coinfection. CT infection causes oxidative stress characterized by increased lipid peroxidation, decreased TAC levels, and increased seminal pH.

Referencias

1. Goulart, A.C.X.; Farnezi, H.C.M.; Medeiros, F.J.P.B.; Dos Santos, A.; Ramos, M.G.; Penna, M.L.F. HIV, HPV and Chlamydia trachomatis: Impacts on male fertility. *JBRA Assist. Reprod.* **2020**, *24*, 492–497, doi:[10.5935/1518-0557.20200020](https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200020).
2. Damke, E.; Kurscheidt, F.A.; Balani, V.A.; Takeda, K.I.; Irie, M.M.T.; Gimenes, F.; Consolaro, M.E.L. Male Partners of Infertile Couples with Seminal Infections of Human Papillomavirus Have Impaired Fertility Parameters. *Biomed. Res. Int.* **2017**, 4684629, doi:[10.1155/2017/4684629](https://doi.org/10.1155/2017/4684629).
3. Moazenchi, M.; Totonchi, M.; Salman, Y.R.; Hratian, K.; Mohseni, M.M.A.; Ahmadi, P.M.; Chehrazi, M.; Monseni, M.A. The impact of Chlamydia trachomatis infection on sperm parameters and male fertility: A comprehensive study. *Int. J. STD AIDS* **2017**, *29*, 466–473, doi:[10.1177/0956462417735245](https://doi.org/10.1177/0956462417735245).

4. Cai, T.; Wagenlehner, F.M.E.; Mondaini, N.; Elia, C.D.; Meacci, F.; Migno, S.; Malossini, G.; Bartoletti, R. Effect of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis co-infection on sperm quality in young heterosexual men with chronic prostatitis-related symptoms. *BJU Int.* **2014**, *113*, 281–287, doi:[10.1111/bju.12244](https://doi.org/10.1111/bju.12244).
5. 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**, *6*, e15036, doi:[10.1371/journal.pone.0015036](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015036).
6. Yang, Y.; Jia, C.W.; Ma, Y.M.; Zhou, L.Y.; Wang, S.Y. Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian J. Androl.* **2013**, *15*, 529–532, doi:[10.1038/aja.2013.36](https://doi.org/10.1038/aja.2013.36).
7. Pérez-Soto, E.; Oros-Pantoja, R.; Fernández-Martínez, E.; Carbonell-Campos, J.M.; Sánchez-Monroy, V. Seminal pro-inflammatory cytokines and pH are affected by Chlamydia infection in asymptomatic patients with teratozoospermia. *Cent Eur. J. Immunol.* **2021**, *46*, 76–81, doi:[10.5114/ceji.2021.105247](https://doi.org/10.5114/ceji.2021.105247).
8. Segnini, A.; Camejo, M.I.; Proverbio, F. Chlamydia trachomatis and sperm lipid peroxidation in infertile men. *Asian J. Androl.* **2003**, *5*, 47–49.
9. Weidner, W.; Pilatz, A.; Schuppe, H.C.; Rusz, A.; Wagenlehner, F. Male urogenital infections: Impact of infection and inflammation on ejaculate parameters. *World J. Urol.* **2013**, *31*, 717–723, doi:[10.1007/s00345-013-1082-7](https://doi.org/10.1007/s00345-013-1082-7).
10. Agarwal, A.; Rana, M.; Qiu, E.; AlBunni, H.; Bui, A.D.; Henkel, R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. *Andrologia* **2018**, *50*, e13126, doi:[10.1111/and.13126](https://doi.org/10.1111/and.13126).
11. Wagner, H.; Cheng, J.W.; Ko, E.Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab. J. Urol.* **2017**, *16*, 35–43, doi:[10.1016/j.aju.2017.11.001](https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.001).
12. Agarwal, A.; Parekh, N.; Selvam, M.K.P.; Henkel, R.; Shah, R.; Homa, S.T.; Ramasamy, R.; Edmund, K.; Tremellen, K.; Esteves, S.; et al. Male oxidative stress infertility (MOSI): Proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. *World J. Men's Health* **2019**, *37*, 296–312, doi:[10.5534/wjmh.190055](https://doi.org/10.5534/wjmh.190055).

13. World Health Organization. *Who Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. V.; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2010.
14. Manos, M.M.; Ting, Y.; Wright, D.K.; Lewis, A.J.; Broker, T.R.; Wolinsky, S.M. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* **1989**, *7*, 209–214.
15. Mahony, J.B.; Luinstra, K.E.; Sellors, J.W.; Jang, D.; Chernesky, M.A. Confirmatory polymerase chain reaction testing for Chlamydia trachomatis in first-void urine from asymptomatic and symptomatic men. *J. Clin. Microbiol.* **1992**, *30*, 2241–2245, doi:[10.1128/jcm.30.9.2241-2245.1992](https://doi.org/10.1128/jcm.30.9.2241-2245.1992).
16. Layali, I.; Tahmasbpour, E.; Joulaei, M.; Jorsaraei, S.G.; Farzanegi, P. Total antioxidant capacity and lipid peroxidation in semen of patient with hyperviscosity. *Cell J.* **2015**, *16*, 554–559, doi:[10.22074/cellj.2015.500](https://doi.org/10.22074/cellj.2015.500).
17. Benzie, I.F. An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin. Biochem.* **1996**, *29*, 111–116, doi:[10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6).
18. Nasserri, S.; Monavari, S.H.; Keyvani, H.; Nikkhoo, B.; Roudsari, R.V.; Khazeni, M. The prevalence of Human Papilloma Virus (HPV) infection in the oligospermic and azoospermic men. *Med. J. Islamic Repub. Iran* **2015**, *29*, 272.
19. Lajous, M.; Mueller, N.; Cruz-Valdéz, A.; Aguilar, L.V.; Franceschi, S.; Hernández-Ávila, M.; Lazcano-Ponce, E. Determinants of prevalence, acquisition, and persistence of human papillomavirus in healthy Mexican military men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* **2005**, *14*, 1710–1716, doi:[10.1158/1055-9965.EPI-04-0926](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0926).
20. Reed-Maldonado, A.B.; Madden, K.C. Infertility and the Military Male. In *Seminars in Reproductive Medicine*; Thieme Medical Publishers: New York, NY, USA, 2019; Volume 37, pp. 5–11, doi:[10.1055/s-0039-1694027](https://doi.org/10.1055/s-0039-1694027).
21. Gimenes, F.; Medina, F.S.; De Abreu, A.L.P.; Irie, M.M.T.; Esquicati, I.B.; Malagutti, N.; Vasconcellos, V.R.B.; Discacciati, M.G.; Bonini, M.G.; Maria-Engler, S.S.; et al. Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98862, doi:[10.1371/journal.pone.0098862](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098862).

22. Medel-Flores, O.; Valenzuela-Rodríguez, V.A.; Ocadiz-Delgado, R.; Castro-Muñoz, L.J.; Hernández-Leyva, S.; Lara-Hernández, G.; Silva-Escobedo, J.G.; Gariglio-Vidal, P.; Sánchez-Monroy, V. Association between HPV infection and prostate cancer in a Mexican population. *Genet. Mol. Biol.* **2018**, *41*, 781–789, doi:[10.1590/1678-4685-GMB-2017-0331](https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0331).
23. Baud, D.; Pattaroni, C.; Vulliemoz, N.; Castella, V.; Marsland, B.J.; Stojanov, M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 234, doi:[10.3389/fmicb.2019.00234](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00234).
24. Fraczek, M.; Kurpisz, M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J. Reprod. Immunol.* **2015**, *108*, 98–104, doi:[10.1016/j.jri.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.02.001).
25. Papadimas, J.; Goulis, D.G.; Sotiriades, A.; Daniilidis, M.; Fleva, A.; Bontis, J.N.; Tourkantonis, A. Interleukin-1 Beta and Tumor Necrosis Factor-alpha in normal/infertile men. *J. Reprod. Syst.* **2009**, *48*, 107–113, doi:[10.1080/014850102317267418](https://doi.org/10.1080/014850102317267418).
26. Hosen, M.B.; Islam, M.R.; Begum, F.; Kabir, Y.; Howlader, M.Z.H. Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility. *Iran. J. Reprod. Med.* **2015**, *13*, 525–532.
27. Gholinezhad, M.; Aliarab, A.; Abbaszadeh-Goudarzi, G.; Yousefnia-Pasha, Y.; Samadaian, N.; Rasolpour-Roshan, K.; Aghagolzadeh-Haji, H.; Mohammadoo-Khorasani, M. Nitric oxide, 8-hydroxydeoxyguanosine, and total antioxidant capacity in human seminal plasma of infertile men and their relationship with sperm parameters. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **2020**, *47*, 54–60, doi:[10.5653/cerm.2020.00423](https://doi.org/10.5653/cerm.2020.00423).
28. Ahmadi, M.H.; Mirsalehian, A.; Sadighi, G.M.A.; Bahador, A.; Afraz, K. Association of asymptomatic Chlamydia trachomatis infection with male infertility and the effect of antibiotic therapy in improvement of semen quality in infected infertile men. *Andrologia* **2018**, *50*, e12944, doi:[10.1111/and.12944](https://doi.org/10.1111/and.12944).
29. Tang, M.; Liu, B.J.; Wang, S.Q.; Xu, Y.; Han, P.; Li, P.C.; Wang, Z.J.; Song, N.H.; Zhang, W.; Yin CJ. The role of mitochondrial aconitate (ACO2) in human sperm motility. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **2014**, *60*, 251–256, doi:[10.3109/19396368.2014.915360](https://doi.org/10.3109/19396368.2014.915360).

6. Resultados adicionales

Los resultados respecto a la prevalencia de genotipos VPH de bajo riesgo y alto riesgo en la población de estudio se describe a continuación. Se analizaron 101 muestras de semen, encontrando una alta prevalencia de la infección por VPH (80.2%, 81/101). Se detectó que la infección con múltiples genotipos fue prevalente, así como con genotipos de alto riesgo. En la tabla 3.

Tabla 3. Presencia de la infección por VPH en el semen de hombres militares que derivan de un estudio de pareja infértil (n=101).

Presencia de la infección por VPH en semen	Frecuencia	Porcentaje (%)
ADN del VPH	81/101	80.2
Infección simple por VPH (SI)	30/81	37.0
Infección simple por VPH con exclusivamente genotipos de alto riesgo (AR-VPH).	27/81	33.3
Infección simple por VPH con exclusivamente genotipos de bajo riesgo (BR-VPH).	3/81	3.7
Infección múltiple por VPH (MI)	51/81	63.0
Infección múltiple por VPH con exclusivamente genotipos AR-VPH.	29/81 or 29/51	35.8
Infección múltiple por VPH con genotipos AR-VPH y BR-VPH detectados simultáneamente.	22/81 or 22/51	27.1
Exclusivamente genotipos AR-VPH (SI and MI)	56/81	69.0
Exclusivamente genotipos BR-VPH y AR-VPH (SI and MI)	25/81	30.8
SI y MI con genotipos AR-VPH.	78/81	96.3

Nota:El porcentaje no suma a la frecuencia total debido al análisis de genotipos realizado por la virulencia o patogenicidad.

En la tabla 4 se muestra la frecuencia y porcentaje de genotipos virales AR-VPH detectados en la población de estudio, ya sea en infección simple o múltiple. La infección simple con genotipos AR-VPH fue mayor que la infección simple con genotipos BR-VPH (33,3% *versus* 3,7%). El genotipo 52 fue el más frecuente (18.5%, 15/81), seguido del genotipo AR-VPH-33 (11.1%, 9/81) y la combinación más frecuente de genotipos detectados fue AR-VPH-33, 52 (11,1 %, 9/81), seguido por HPV 18,31 (6,2%, 5/81).

Finalmente, la IM con genotipos de AR-VPH indujeron mayor incremento significativo de LPO en comparación de los demás grupos infectados por genotipos de AR-VPH (Datos aún no publicados).

Tabla 4. Genotipos VPH detectados en el semen de hombres militares que derivan de un estudio de pareja infértil.

Subgrupos	Genotipos VPH	n	Porcentaje (%)
Infección simple (SI-AR-VPH)	VPH-6	2	2.5
	VPH-11	1	1.2
	VPH-16	1	1.2
	VPH-31	2	2.5
	VPH-33	9	11.1
	VPH-52	15	18.5
		30	37%
Infección múltiple (Todos con genotipos AR-VPH) (MI-AR-VPH)	VPH-16,18	1	11.2
	VPH-16,31	1	1.2
	VPH-18,31	5	6.2
	VPH-18,33	1	1.2
	VPH-18,52	1	1.2
	VPH-18,58	1	1.2
	VPH-33,51	1	1.2
	VPH-33,52	9	11.1
	VPH-31,52	2	2.5
	VPH-16,18,33	1	1.2
	VPH-16,33,52	1	1.2
	VPH-16,31,52	1	1.2
	VPH-33,52,58	1	1.2
	VPH-16,31,33,52	3	3.7
	VPH-18,6	6	7.4
	VPH-6,52	3	3.7
	VPH-6,11, 16	1	1.2
	VPH-11, 33	2	2.5
	VPH-11,16	2	2.5
	VPH-6,18,52	2	2.5
	VPH-6,11,52	2	2.5
	VPH-11,16,58	1	1.2
	VPH-11,16,52	1	1.2
	VPH-11,33,52	1	1.2
VPH-6,11,16, 18, 58	1	1.2	
		51	63%

Muestras positivas para la infección por VPH, n= 81: indica las frecuencias incluidas en presencia de ambas infecciones simples y múltiples.

7. Discusión general

La relevancia de las ITS causadas por VPH y CT como un factor etiológico en la infertilidad masculina es controversial (Goulart et al., 2020). La mayoría de los estudios informan que estos patógenos afectan la calidad seminal en hombres infértiles asintomáticos (Damke et al., 2017; Goulart et al., 2020; Laprise et al., 2014).

Respecto a la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* (CT), los hallazgos obtenidos en el presente estudio confirman la alta prevalencia de infección bacteriana en hombres que derivan de un estudio de pareja infértil en México (López-Hurtado et al., 2017). Respecto a la detección de coinfección entre VPH y CT, éste es el primer estudio llevado a cabo en nuestro país. Es importante mencionar que la prevalencia de la infección por VPH (68%) y la coinfección entre VPH+CT (18.5%) fue alta en comparación con otros estudios realizados anteriormente en hombres que derivan de un estudio de pareja infértil (Gimenes et al., 2014) y en hombres con prostatitis e infertilidad (Cai et al., 2014). Cuando se analizó la presencia de VPH en 101 muestras de semen, se encontró una alta prevalencia de la infección de 80,2% (81/101), predominando los genotipos de AR-VPH, como lo reportado anteriormente, en hombres infértiles (Goulart et al., 2020; Laprise et al., 2014). Estos resultados son alarmantes, la infección en hombres militares mexicanos será la más alta reportada, debido a que en un metaanálisis realizado por Laprise y colaboradores (2014), se describió un 16% en poblaciones de hombres infértiles (Laprise et al., 2014), similar a lo reportado por Damke y colaboradores en 2017 (16.6%). Otro estudio realizado por Foresta y colaboradores (2015) reportaron un 35.7% en hombres con infertilidad idiopática (Foresta et al., 2015).

Una explicación de esta alta prevalencia de la infección viral es atribuible a la población específica de militares, ya que incluso en soldados mexicanos sanos, se encontró una prevalencia de 49%, esto puede estar relacionado con el comportamiento sexual de riesgo, una gran cantidad de parejas, el coito anal que aumentan el riesgo de contraer ITS (Lajous et al., 2005), incluso otras ITS a las investigadas en el presente trabajo. Los resultados mostraron que la infección por VPH en el semen es bastante común en parejas masculinas jóvenes militares, seguida de *Chlamydia trachomatis*.

En el trabajo se encontró que los genotipos de alto riesgo más comunes fueron, en orden decreciente, VPH-52 (15/81), VPH-33 (9/81) en muestras de semen infectadas por un único genotipo viral o por múltiples infecciones en hombres infértiles, lo cual concuerda con Yang et al. (2013) (Yang et al., 2013). En 2017, Cortés-Gutiérrez y colaboradores (2017), quienes llevaron a cabo un estudio en pacientes que derivan de un estudio de pareja infértil, encontraron que el 27.27% (6/22) de los hombres infértiles presentaron la infección por VPH, de los cuales se detectaron los genotipos de AR-VPH (VPH-18, -45, -51 y -54) (Cortés-Gutiérrez et al., 2016). Relevantemente, el presente estudio será el primero en reportar la alta prevalencia de los genotipos de AR-VPH en una población de pacientes infértiles militares.

Referente a la calidad espermática, estudios recientes indican que la infección por CT (Pérez-Soto et al., 2021b) y VPH (Damke et al., 2017) modifican el pH a alcalino en hombres infértiles, lo que probablemente altera la microbiota seminal, por ejemplo *Lactobacillus*. En un reciente estudio se encontró que *Lactobacillus* tiene un efecto positivo sobre la motilidad y viabilidad (Baud et al., 2019).

Sí bien, de acuerdo a los criterios de la OMS, del manual de la quinta edición, estos parámetros se encuentran dentro de los límites normales, el grupo infectado por VPH (y/o genotipos), además presento disminución en la motilidad A, incremento del pH (> 7.8), que son criterios clínicos para diagnosticar infección/inflamación en glándulas accesorias (MAGI, en inglés) (Calogero et al., 2017), lo que indica proporciones alteradas del líquido secretado por las principales glándulas accesorias sexuales, como es la próstata y vesículas seminales (Damke et al., 2017). Esto además puede conllevar a un desbalance del microbiota seminal normal y puede incrementar la susceptibilidad a contraer otras ITS o enfermedades y repercutir en la fertilidad.

Referente a la alteración de los parámetros seminales, se encontró que hubo una disminución del porcentaje de la morfología de los espermatozoides debido a la infección por VPH (Yang et al., 2013), así como al estar en coinfección con CT (Cai et al., 2014), similar a otros estudios realizados anteriormente (Cai et al., 2014; Yang et al., 2013), induciendo la teratozoospermia, como en este trabajo. En 2014, Gimenes y colaboradores (2014), encontraron que la infección por VPH correlaciona con la teratozoospermia en hombres infértiles que derivan investigaciones de infertilidad conyugal (Gimenes et al., 2014); recientemente, Tavakolian y colaboradores (2021) encontraron la misma relación, ya que en 9 pacientes con la infección por VPH, el porcentaje de morfología fue disminuido significativamente con respecto al grupo control negativo con normospermia (6.3 ± 0.7 versus 2.3 ± 0.6 ; $p=.023$) (Tavakolian et al., 2021).

En el análisis estadístico realizado entre los grupos no infectado, infectado con un solo genotipo de AR-VPH y el grupo de infectados con múltiples genotipos de AR-VPH (datos no publicados), se pudo comprobar que ambos grupos infectados con genotipos de AR-VPH (SI-AR-VPH y MI-AR-VPH) son los responsables de la disminución significativa de la morfología normal espermática, donde además presentan mayor porcentaje de defectos en cabeza, aunque no es significativo con respecto al grupo no infectado, probablemente, por la presencia de otros patógenos no detectados en este estudio y que inducen un mismo efecto en la morfología espermática, como es la infección herpes virus tipo 1 (HSV-1) en población infértil (Tavakolian et al., 2021). En ese mismo estudio, se pudo evidenciar que sí bien algunos pacientes presentaban infección por VPH (VPH-8, VPH-18 y -33), en 3 muestras con VPH-18 después del lavado se pudo eliminar la infección por VPH-18, sin embargo se requiere más estudios al respecto (Tavakolian et al., 2021). Lo que nos sugiere que al tratar a los pacientes infectados se puede eliminar la infección viral.

No obstante, se desconoce el mecanismo por el que la infección viral persiste y/o aclara en el hombre; Foresta y colaboradores (2010) encontraron mediante el análisis de hibridación fluorescente in situ (FISH, en inglés) que el 25% de los espermatozoides tenían el ADN viral en la cabeza, no obstante, la integración del VPH en el núcleo no fue clara (Foresta et al., 2010a). Un año más tarde (2011), los mismos autores localizaron la proteína viral L1 del genotipo VPH-16 unida al sindecano 1 (SDC-1) ubicada en la membrana plasmática de los espermatozoides (Foresta et al., 2011). Esta molécula es un glucosaminoglicano con una o más cadenas de proteoglicanos y heparán sulfato que se unen a citocinas, factores de crecimiento y generan gradientes que participan en procesos de desarrollo, respuesta inmunitaria, inflamación y angiogénesis (Gopal, 2020; Gougoula et al., 2019).

Recientemente, Yuki y colaboradores (2021) analizaron que en el 6.9% (15/216) de las muestras positivas para los genotipos AR-VPH (VPH-16, -18, -33, 35, 39, -45, -33, -51, -52, -58, 68); la infección viral de alto riesgo (todos los genotipos detectados) se localizó en la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de los hombres infértiles japoneses (Yuki et al., 2021). Ambos autores mencionan que se requieren más estudios para clarificar el mecanismo de infección en las regiones específicas de los espermatozoides.

Por otro lado, en este trabajo se pudo comprobar el efecto de la infección viral y/o coinfección CT+VPH sobre las citocinas proinflamatorias (incremento de IFN- γ , IL-1 β , IL-6), así como el incremento de LPO, 8-OHdG y la disminución de la Capacidad antioxidante total, lo que indica un desbalance en moléculas pro y anti-oxidantes en el semen de pacientes infértiles (Pérez-Soto et al., 2021a). Por otro lado, la infección múltiple con genotipos AR-VPH indujo mayor LPO que el grupo infectado con un solo genotipo de AR-VPH (Datos no publicados). En el presente trabajo se hipotetiza que los genotipos AR-VPH (MI) probablemente se unen al SDC-1 (ubicada en la cabeza de los espermatozoides), la cual probablemente está incrementada debido a la LPO en el plasma seminal, lo que facilita aún más su unión. En un estudio anterior se encontró una mayor expresión de SDC-1 cuando hay LPO en hombres con parámetros seminales normales (Intasqui et al., 2015). Por lo que en este estudio, con este tipo de hombres militares infértiles, probablemente, la unión VPH-SDC-1 facilita la activación de la respuesta inmunitaria y pro-inflamatoria, la cual es persistente y probablemente crónica, incrementando citocinas como es la IL-1 β e IL-6 y dañando la morfología de los espermatozoides, debido además por la alteración de la espermatogénesis por el incremento de esas moléculas (IL-6, IL-1 β), e incluso SDC-1.

Previos estudios han mostrado que algunos patógenos utilizan las cadenas de glucosaminoglucanos de los sindecanos para infectar la célula huésped, encontrándose el VPH a través de la proteína viral L1 unida a la superficie celular del grupo tiol del SDC-1, que conduce a la activación de la entrada viral mediada por L2, otra proteína viral (Aquino and Park, 2016; Gopal, 2020).

Los genotipos VPH no disminuyeron la motilidad de acuerdo al parámetro normal de la OMS (5ta. Edición), sin embargo, la motilidad A progresiva se encontró disminuida en todos los grupos de estudio, lo que se puede inferir que, a pesar del incremento de los espermatozoides anormales, aún el estado del citocromo b y las mitocondrias no se vieron comprometidas energéticamente, al menos en la vía de fosforilación oxidativa debido a que se encuentran distribuidas en la célula espermática (Lau et al., 2014), aunque probablemente hubo una reducción de la aconitasa, una enzima mitocondrial que participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y consecuentemente reduce la síntesis de ATP y motilidad (Tang et al., 2014).

8. Conclusiones

- Hay una alta prevalencia de las infecciones por *CT* y VPH de 96.4% (81/84), de los cuales el 68% (55/81) fue debido a la infección por VPH, el 13.5% (11/81) por *CT* y el 18.5% por la co-infección de *CT*+VPH en pacientes infértiles asintomáticos.
- La infección por VPH y la co-infección de *CT*+VPH impacto negativamente la morfología normal de los espermatozoides de los pacientes que derivan de un estudio de pareja infértil, diagnosticándolos como pacientes con teratozoospermia. La infección bacteriana no provoco esa disminución de la morfología normal espermática. No obstante, en el grupo infectado con *CT*, VPH o la coinfección *CT*+VPH se encontró un alto porcentaje de defectos, particularmente en la cabeza de los espermatozoides.
- En presencia de la infección por VPH, *CT* o la coinfección por *CT*+VPH se encontró un pH alcalino alterando el ambiente seminal proinflamatorio y oxidativo.
- La infección por VPH o la coinfección altero el microambiente seminal proinflamatorio y oxidativo debido al incremento significativo de IFN- γ , IL-1 β , IL-6 y LPO, además disminuyo la capacidad antioxidante total seminal con respecto a la infección por *CT*. Relevantemente, la coinfección provocó una mayor respuesta pro-inflamatoria seminal por los altos niveles de IL-1 β , en comparación a la infección por un solo patógeno en los pacientes infértiles asintomáticos militares mexicanos.
- La infección por VPH causo daño al DNA, ya que hubo un incremento de 8-OHdG en comparación con la infección por *CT*.
- Hay una alta prevalencia de VPH y sus genotipos de 80.2% (81/101), detectando una mayor prevalencia de la infección múltiple por genotipos AR-VPH en comparación de la infección simple AR-VPH (63% vs 37%). La infección simple AR-VPH fue más alta que la infección múltiple BR-VPH (33.3% vs 3.7%), el genotipo VPH-52 fue el más prevalente, seguido del genotipo VPH-33 (11.1%) y la combinación más frecuente de genotipos fue de VPH-33, -52 (11.1%), seguido de VPH-18,31 (6.2%).
- La IM-AR-VPH causo mayor LPO que la SI-AR-VPH en los pacientes infértiles asintomáticos militares.

9. Bibliografía utilizada

- Agarwal, A., Rana, M., Qiu, E., AlBunni, H., Bui, A.D., Henkel, R., 2018. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. *Andrologia* 50, 1–13. <https://doi.org/10.1111/and.13126>
- Al-Ezzy, A.I.A., 2016. Effect of torch agents and Chlamydia trachomatis on reproductive parameters and fertility hormones of Iraqi infertile males. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 9, 47–56.
- Al-Marzoqi Ali Hussein, A.H., Al-tae, Z.M., Ahmed, N.K., 2014. Cytokine Profiles Among Asthenospermic Men With Chlamydia Trachomatis Infections : Concentrations and Significance of Multiplex Seminal Fluid Cytokine and other immunologic factors. *Int. J. Sci. Nat.* 5, 103–108.
- Aquino, R.S., Park, P.W., 2016. Glycosaminoglycans and infection. *Front. Biosci. - Landmark* 21, 1260–1277. <https://doi.org/10.2741/4455>
- Baud, D., Pattaroni, C., Vulliemoz, N., Castella, V., 2019. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front. Microbiol.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00234>
- Bezold Guntram, Politch Joseph A., Kiviat B. Nancy, Kuypers Jane M., Wolff Hans, A.D.J., 2007. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil. Steril.* 87, 1087–1097. <https://doi.org/10.1038/nm.1929.Effector>
- Cai, T., Wagenlehner, F.M.E., Mondaini, N., Elia, C.D., 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, 281–287. <https://doi.org/10.1111/bju.12244>
- Calogero, A.E., Duca, Y., Condorelli, R.A., La Vignera, S., 2017. Male accessory gland inflammation, infertility, and sexual dysfunctions: a practical approach to diagnosis and therapy. *Andrology* 5, 1064–1072. <https://doi.org/10.1111/andr.12427>
- Comhaire, F., Mahmoud, A., Depuydt, C., Zalata, A., Christophe, A., 1999. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential:

- the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Updat.* 5, 393–398.
- Connelly, D.A., Chan, P.J., Patton, W.C., King, A., 2001. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184, 1068–1070. <https://doi.org/10.1067/mob.2001.115226>
- Cortés-Gutiérrez E. I., Dávila-Rodríguez I., Fernández J. L., de la O-Pérez L. O., Garza-Flores M. E., Eguren-Garza R., Gosálvez, J., 2016. The presence of human papillomavirus in semen does not affect the integrity of sperm DNA 1–5. <https://doi.org/10.1111/and.12774>
- Damke, E., Kurscheidt, F.A., Balani, V.A., Takeda, K.I., Irie, M.M.T., Gimenes, F., Consolaro, M.E.L., 2017. Male Partners of Infertile Couples with Seminal Infections of Human Papillomavirus Have Impaired Fertility Parameters. *Biomed Res. Int.* 2017, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2017/4684629>
- Depuydt, C., Mahmoud, A., Everaert, K., 2003. II . 2 . 3 Infection / Inflammation of the Male Genital Tract as Cause of Abnormal Spermatozoa 322–327.
- Depuydt, C.E., Beert, J., Bosmans, E., Salembier, G., 2016. Human Papillomavirus (HPV) virion induced cancer and subfertility, two sides of the same coin. *Facts, views Vis. ObGyn* 8, 211–222.
- Ekström, J., Bzhalava, D., Svenback, D., Forslund, O., Dillner, J., 2011. High throughput sequencing reveals diversity of Human Papillomaviruses in cutaneous lesions. *Int. J. Cancer* 129, 2643–2650. <https://doi.org/10.1002/ijc.26204>
- Feodorova, V., Sultanakhmedov, E., Saltykov, Y., Zaitsev, S., Utz, S., Corbel, M., Gaydos, C., Quinn, T., Motin, V., 2018. First Detection of *Chlamydia trachomatis* 'Swedish' Variant (nvCT) in a Russian Couple with Infertility. *Open Microbiol. J.* 12, 343–352. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010343>
- Flores-Sánchez, I., Gutiérrez-Salinas, J., Enriquez-Alvarado, E., Rodríguez, S.H., Ramos-Barragán, C., Salamanca-Ceciliano, A., Tovar, L.C., Suástegui-Domínguez, S., 2010. 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.* 78, 645–651.
- Foresta, C., Garolla, A., Zuccarello, D., Pizzol, D., Moretti, A., Barzon, L., Palù, G., 2010a. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the

- progressive motility. *Fertil. Steril.* 93, 802–806.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.050>
- Foresta, C., Noventa, M., De Toni, L., Gizzo, S., Garolla, A., 2015. HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systematic literature review to a possible clinical management proposal. *Andrology* 3, 163–173. <https://doi.org/10.1111/andr.284>
- Foresta, C., Patassini, C., Bertoldo, A., Menegazzo, M., Francavilla, F., Barzon, L., Ferlin, A., 2011. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One* 6, 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015036>
- Foresta, C., Pizzol, D., Moretti, A., Barzon, L., Pal, G., Garolla, A., 2010b. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil. Steril.* 94, 1723–1727.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.11.012>
- Garolla, A., Pizzol, D., Bertoldo, A., Ghezzi, M., Carraro, U., Ferlin, A., Foresta, C., 2012. Testicular cancer and HPV semen infection 3, 1–5.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00172>
- Garolla, A., Pizzol, D., Bertoldo, A., Menegazzo, M., Barzon, L., Foresta, C., 2013. Sperm viral infection and male infertility : focus on HBV , HCV , HIV ,. *J. Reprod. Immunol.* 100, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.03.004>
- Garolla, A., Pizzol, D., Foresta, C., 2011. The role of human papillomavirus on sperm function. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 23, 232–237.
<https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e328348a3a4>
- Gimenes, F., Medina, F.S., De Abreu, A.L.P., Irie, M.M.T., Esquicati, I.B., Malagutti, N., Vasconcellos, V.R.B., Discacciati, M.G., Bonini, M.G., Maria-Engler, S.S., Consolaro, M.E.L., 2014. Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in Semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. *PLoS One* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098862>
- Giuliano, A., Lee, J., Fulp, W., Villa, L., 2011. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet* 377, 932–940.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62342-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62342-2)
- Golob, B., Poljak, M., Verdenik, I., Simoniti, M.K., Vrta, E., Bokal, I., Zorn, B., 2014.

- High HPV Infection Prevalence in Men from Infertile Couples and Lack of Relationship between Seminal HPV Infection and Sperm Quality. *Biomed Res. Int.* 2014.
- Gopal, S., 2020. Syndecans in Inflammation at a Glance. *Front. Immunol.* 11, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00227>
- Gougoula, C., Bielfeld, A.P., Pour, S.J., Krüssel, J.S., Götte, M., Benten, W.P.M., Baston-Büst, D.M., 2019. Physiological and anatomical aspects of the reproduction of mice with reduced Syndecan-1 expression. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 17, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0470-2>
- Goulart, A.C.X., Farnezi, H.C.M., Medeiros França, J.P.B., Dos Santos, A., Ramos, M.G., Penna, M.L.F., 2020. HIV, HPV and Chlamydia trachomatis: impacts on male fertility. *J. Bras. Reprod. Assist.* 24, 492–497. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200020>
- Green, J., Monteiro, E., Bolton, V.N., Sanders, P., Gibson, P.E., 1991. Detection of human papillomavirus DNA by PCR in semen from patients with and without penile warts 207–210.
- Hou, D., Zhou, X., Zhong, X., Settles, M.L., Herring, J., Wang, L., Abdo, Z., Forney, L.J., Xu, C., 2013. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil. Steril.* 100, 1261–1269.
- Intasqui, P., Antoniassi, M.P., Camargo, M., Nichi, M., Carvalho, V.M., Cardozo, K.H.M., Zylbersztejn, D.S., Bertolla, R.P., 2015. Differences in the seminal plasma proteome are associated with oxidative stress levels in men with normal semen parameters. *Fertil. Steril.* 104, 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.037>
- La Vignera, S., Vicari, E., Condorelli, R.A., Franchina, C., Scalia, G., Morgia, G., Perino, A., Schillaci, R., Calogero, A.E., 2015. Prevalence of human papilloma virus infection in patients with male accessory gland infection. *Reprod. Biomed. Online* 30, 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.12.016>
- Lai, Y.M., 1997. The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility * 67.
- Lajous, M., Mueller, N., Cruz-Valdéz, A., Aguilar, L.V., Franceschi, S., Hernández-Ávila, M., Lazcano-Ponce, E., 2005. Determinants of prevalence, acquisition, and persistence of human papillomavirus in healthy Mexican military men. *Cancer*

Epidemiol. Biomarkers Prev. 14, 1710–1716. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0926>

- Laprise C, Trottier H, Monnier P, Coutlée F, M.M., 2014. Prevalence of human papillomaviruses in semen : a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 29, 640–651. <https://doi.org/10.1093/humrep/det453>
- Lau, K., Stecher, A., Zech, N., 2014. Raman imaging of normal and abnormal human spermatozoa revealing their cytochrome c redox state and differences in mitochondrial distribution 2–3.
- López-Hurtado, M., Velazco-Fernández, M., Pedraza-Sánchez, M.J.E., Flores-Salazar, V.R., Villagrana Zesati, R., Guerra-Infante, F.M., 2017. Molecular detection of *Chlamydia trachomatis* and semen quality of sexual partners of infertile women. *Andrologia* 1–6. <https://doi.org/10.1111/and.12812>
- Lyu, Z., Feng, X., Li, N., Zhao, W., Wei, L., Chen, Y., Yang, W., Ma, H., Yao, B., Zhang, K., Hu, Z., Shen, H., Hang, D., Dai, M., 2017. Human papillomavirus in semen and the risk for male infertility : a systematic review and meta-analysis 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2812-z>
- Maegawa, M., Kamada, M., Irahara, M., Yamamoto, S., Yoshikawa, S., Kasai, Y., Ohmoto, Y., Gima, H., Thaler, C.J., Aono, T., 2002. A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.* 54, 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(01\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(01)00063-8)
- Mahony, J.B., Luinstra, K.E., Sellors, J.W., Jang, D., Chernesky, M.A., 1992. Confirmatory polymerase chain reaction testing for *Chlamydia trachomatis* in first-void urine from asymptomatic and symptomatic men. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2241–5.
- Maksymyuk, H., Vorobets, Z., Maksymyuk, V., 2015. The Level of Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines in Sperm Plasma of Fertile and Infertile Men. *Heal. Probl. Civiliz.* 9, 21–25.
- Medel-Flores, O., Valenzuela-Rodríguez, V.A., Ocadiz-Delgado, R., Castro-Muñoz, L.J., Hernández-Leyva, S., Lara-Hernández, G., Silva-Escobedo, J.G., Vidal, P.G., Sánchez-Monroy, V., 2018. Association between HPV infection and prostate cancer in a Mexican population. *Genet. Mol. Biol.* 41, 781–789. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0331>

- Moghimi, M., Zabihi-mahmoodabadi, S., Kheirkhah-vakilabad, A., 2019. Significant Correlation between High-Risk HPV DNA in Semen and Impairment of Sperm Quality in Infertile Men 12, 306–309.
<https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5421.Introduction>
- Nakahara, T., Kiyono, T., 2016. Interplay between NF- κ B/interferon signaling and the genome replication of HPV. *Future Virol.* 11, 141–155.
<https://doi.org/10.2217/fvl.16.2>
- Nasseri, S., Monavari, S.H., Keyvani, H., Nik-, B., 2015. The prevalence of Human Papilloma Virus (HPV) infection in the oligospermic and azospermic men. *Med. J. Islam. Repub. Iran* 29, 1–7.
- News Focus, 1956. . *Chem. Eng. News* 34, 5482. <https://doi.org/10.1021/cen-v034n045.p5482>
- Pérez-Soto, E., Fernández-Martínez, E., Oros-Pantoja, R., Medel-Flores, O., Miranda-Covarrubias, J.C., Sánchez-Monroy, V., 2021a. Proinflammatory and Oxidative Stress States Induced by Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis Coinfection Affect Sperm Quality in Asymptomatic Infertile Men. *Medicina (B. Aires)*. 57, 862.
<https://doi.org/10.3390/medicina57090862>
- Pérez-Soto, E., Oros-Pantoja, R., Fernández-Martínez, E., Carbonell-Campos, J.M., Sánchez-Monroy, V.S., 2021b. Seminal pro-inflammatory cytokines and pH are affected by Chlamydia infection in asymptomatic patients with teratozoospermia. *Cent. Eur. J. Immunol.* 46, 76–81.
- Pérez-Soto, E., Virginia, S.M., Vázquez, D., Izaremy, V., Pantoja, O., 2019. Perspectivas Terapéuticas en la Infertilidad Masculina Causada por VPH y Estrés Oxidativo. *Front. Biotecnológica* 19–26.
- Redgrove, K.A., McLaughlin, E.A., 2014. The role of the immune response in chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: A double-edged sword. *Front. Immunol.* 5, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00534>
- Rohde, V., Erles, K., Sattler, H.P., Derouet, H., Wullich, B., Schlehofer, R., 1999. Detection of adeno-associated virus in human semen : does viral infection play a role in the pathogenesis of male infertility ? 72, 814–816.
- Samplaski, M.K., Domes, T., Jarvi, K.A., 2014. Chlamydial Infection and Its Role in Male

- Infertility. *Adv. Androl.* 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/307950>
- Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., Vallejo-Ruiz, V., 2015. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Gen. Asp. Struct. Classif. replication Hum. papillomavirus.* 53, S166–S171.
- Schillaci, R., Capra, G., Bellavia, C., Ruvolo, G., 2013. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil. Steril.* 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.06.042>
- Schuppe, H., Pilatz, A., Hossain, H., Diemer, T., Wagenlehner, F., Weidner, W., 2017. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch. Aertzblatt Online* 114, 339–46. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0339>
- Schuppe, H.C., Pilatz, A., Hossain, H., Diemer, T., Wagenlehner, F., Weidner, W., 2017. Urogenitale Infektionen als Risiko für männliche Infertilität. *Dtsch. Arztebl. Int.* 114, 339–346. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0339>
- Sharlip, I.D., Jarow, J.P., Belker, A.M., Lipshultz, L.I., Sigman, M., Thomas, A.J., Schlegel, P.N., Howards, S.S., Nehra, A., Damewood, M.D., Overstreet, J.W., Sadovsky, R., 2002. Best practice policies for male infertility. *Fertil. Steril.* 77, 873–882. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03105-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03105-9)
- Silva, R., León, D., Brebi, P., Ili, C., Roa, J.C., Sánchez, R., 2013. [Detection of human papilloma virus infection in men]. *Rev. Chil. infectología órgano Of. la Soc. Chil. Infectología* 30, 186–92. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000200009>
- Souho, T., Benlemlih, M., Bennani, B., 2015. Human papillomavirus infection and fertility alteration: A systematic review. *PLoS One* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126936>
- Tang, M., Liu, B., Wang, S., Xu, Y., Han, P., Li, P., Wang, Z., Song, N., Zhang, W., Yin, C., 2014. The role of mitochondrial aconitate (ACO2) in human sperm motility. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60, 251–256. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.915360>
- Tavakolian, S., Goudarzi, H., Nazarian, H., Raee, P., Niakan, S., Faghihloo, E., 2021. The evaluation of Human papilloma virus and human herpes viruses (EBV, CMV, VZV HSV-1 and HSV-2) in semen samples. *Andrologia* 53, 1–8.

<https://doi.org/10.1111/and.14051>

- Vander Borgh, M., Wyns, C., 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin. Biochem.* 62, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- Vignera, S. La, Condorelli, R.A., Vicari, E., Salmeri, M., Morgia, G., Favilla, V., Cimino, S., Calogero, A.E., 2014. Microbiological investigation in male infertility : a practical overview 1–14. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.062968-0>
- Vignera, S. La, Vicari, E., Condorelli, R.A., Franchina, C., Scalia, G., 2015. Prevalence of human papilloma virus infection in patients with male accessory. *Reprod. Biomed. Online* 30, 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.12.016>
- Wang, Shu-Chiu, Wang, Shu-Chen, Li, C.-J., Lin, C.-H., Huang, H.-L., Tsai, L.-M., Chang, C.-H., 2018. The Therapeutic Effects of Traditional Chinese Medicine for Poor Semen Quality in Infertile Males. *J. Clin. Med.* 7, 239. <https://doi.org/10.3390/jcm7090239>
- Wang, X., Zhuang, J., Wu, K., Xu, R., Li, M., Lu, Y., 2010. Human semen: The biological basis of sexual behaviour to promote human papillomavirus infection and cervical cancer. *Med. Hypotheses* 74, 1015–1016. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2010.01.009>
- Weidner, W., Krause, W., Ludwig, M., 1999. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum. Reprod. Update* 5, 421–432. <https://doi.org/10.1093/humupd/5.5.421>
- Weidner, W., Pilatz, A., Schuppe, H.C., Rusz, A., Wagenlehner, F., 2013. Male urogenital infections: impact of infection and inflammation on ejaculate parameters. *World J. Urol.* 31, 717–723.
- Woolhouse, M., Gaunt, E., 2007. Ecological origins of novel human pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* 33, 231–242. <https://doi.org/10.1080/10408410701647560>
- World Health Organization, 2010. *Who laboratory manual for the Examination and processing of human semen*, V. ed, WHO. WHO Press, Switzerland. <https://doi.org/10.1038/aja.2008.57>
- Xiao Jiaquan, Ren Ligang, Lv Houxiang, Ding Qing, Lou Shuixin, Zhang Wei, D.Z., 2013. Atypical Microorganisms in Expressed Prostatic Secretion from Patients with Chronic Prostatitis / Chronic Pelvic Pain Syndrome : Microbiological Results from a Case-Control Study. *Urol. Int.* 91, 410–416. <https://doi.org/10.1159/000350934>

- Xiong, Y.Q., Chen, Y.X., Cheng, M.J., He, W.Q., Chen, Q., 2018. The risk of human papillomavirus infection for male fertility abnormality : a meta - analysis 493–497. <https://doi.org/10.4103/aja.aja>
- Yang, Y., Jia, C., Ma, Y., Zhou, L., Wang, S., 2013. Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian J. Androl.* 15, 529–532. <https://doi.org/10.1038/aja.2013.36>
- Yuki, K., Kazuyoshi, S., Tomomi, N., Hiroki, N., Masashi, I., Kazufumi, N., Shohei, K., Kouji, I., Yoshifumi, K., Atsushi, M., 2021. Human papillomavirus detected in sperm of Japanese infertile males affects reproductive parameters. *Int. J. Infect. Dis.* 112, 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.09.029>

10. ANEXOS

Anexo A

UNIVERSIDAD DEL EJERCITO Y DEL LA FUERZA AREA
HOSPITAL MILITAR DE ESPECIALIDADES DE LA MUJER Y NEONATOLOGIA
POSGRADO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DETECCION DE CHLAMYDIA
TRACHOMATIS y VPH MEDIANTE TECNICA DE PCR EN MUESTRAS DE
ESPERMATOBIOSCOPIA DIRECTA.
INVESTIGADOR: MYR. M.C JUAN MANUEL CARBONELL CAMPOS

Por medio de la presente, yo
_____ con fecha de
nacimiento: _____ de _____ años, permito la incorporación de los resultados
de mis exámenes paraclínicos así como la realización de la detección de *Chlamydia trachomatis*
mediante técnica de PCR en una muestra de espermatobioscopia directa, necesaria para la
realización del proyecto de investigación

_____, explicándole de manera verbal y escrita los procedimientos de la siguiente
manera:

Este estudio tendrá la finalidad de evaluar la presencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* y VPH mediante la realización de técnica de PCR.

Es decisión del paciente participar o no en este estudio.

La primera parte del estudio se realizará en las instalaciones del Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología para la toma de muestra de espermatobioscopia directa y su análisis en el Laboratorio de dicho nosocomio, la segunda parte del estudio será

realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Para la toma de la espermato-bioscopia directa se indicara con anticipación la abstinencia de relaciones sexuales a las parejas de mujeres infértiles por un periodo de 72 horas; al acudir al área de consulta externa de Biología de la Reproducción se conducirán al área designada como masturbatorio a fin de que se obtenga la muestra para el estudio y análisis de líquido seminal y posteriormente la muestra restante se colectara y se trasladara al Departamento de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad para la detección de la infección por *Chlamydia trachomatis* mediante la realización de técnica de PCR.

Se realizará la anotaciones en la hoja de registro.

AUTORIZACION

1. Por este medio autorizo (a la) Dr.(a)._____ y/o al (a los) médico(s) asociado(s) y/o asistentes que este(a) haya seleccionado, para que me sometan al (a los) siguiente(s) procedimiento(s), de toma de espermato-bioscopia directa y detección de *Chlamydia trachomatis* y VPH mediante técnica de PCR, cuyo carácter el médico me ha explicado, incluyendo sus posibles beneficios y riesgos, así como las probabilidades de alcanzar los objetivos de la atención, el tratamiento, los servicios o los procedimientos, propuestos, en términos que entiendo perfectamente.
2. El médico me ha informado plenamente, en términos que entiendo, acerca de los procedimientos, así como de los beneficios de este estudio de investigación.
3. El médico me ha informado plenamente, en términos comprensibles para mí, los riesgos y consecuencias relacionados con el (los) procedimiento(s) descrito(s) anteriormente.

4. Se me ha informado que tengo la opción de negarme a someterme al procedimiento.
 7. En caso de que surgiera alguna situación imprevista durante el estudio, por este medio solicito y autorizo al médico y/o a sus médicos asociados, para que tomen las medidas necesarias y lleven a cabo cual(es) quiere(a) procedimiento(s) que consideren conveniente(s), los cuales pudieran ser adicionales o diferentes a los ya planeados.
 8. No se espera sintomatología alguna durante la realización del estudio de investigación.
 9. Doy mi consentimiento para que el hospital elimine de forma adecuada cualquier tipo de tejido y otros materiales biológicos que pudieran haberse extraído durante el (los) procedimiento(s).
 10. Este formulario es para uso de médicos privados, con vistas a documentar mi consentimiento informado para someterme al procedimiento que se llevará a cabo el hospital Militar de Especialidades de la mujer y Neonatología.
- He leído los párrafos anteriores y entiendo lo que el médico me ha explicado en términos comprensibles y satisfactorios. no tengo ninguna otra pregunta con respecto al (a los) procedimiento(s) en este momento. entiendo el (los) procedimiento(s) al (a los) que seré sometido, así como los riesgos asociados con dicho(s) procedimiento(s).

FIRMA DEL PACIENTE

FIRMA DEL MEDICO

INVESTIGADOR

ANEXO B

UNIVERSIDAD DEL EJERCITO Y DEL LA FUERZA AREA
HOSPITAL MILITAR DE ESPECIALIDADES DE LA MUJER Y NEONATOLOGIA
POSGRADO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA
INVESTIGADOR: MYR. M.C JUAN MANUEL CARBONELL CAMPOS
“DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE
TÉCNICA DE PCR EN PAREJAS DE MUJERES INFÉRTILES Y SU RELACIÓN CON
ALTERACIÓN DE LA ESPERMATOBIOSCOPIA EN EL HOSPITAL MILITAR DE
ESPECIALIDADES DE LA MUJER Y NEONATOLOGÍA.”

CUESTIONARIO SOBRE FACTORES DE RIESGO Y ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR CHLAMYDIA TRACHOMATIS y VPH

NOMBRE: _____

MATRICULA: _____ EDAD: _____

OCUPACIÓN O EMPLEO: _____ FECHA DE

NACIMIENTO _____

1.- ¿Cuánto tiempo ha transcurrido desde el deseo de concepción hasta la actualidad?

- a) 1 año
- b) 2 años
- c) > de 2 años

2.- ¿Cuenta con algún antecedente de trauma en la región genital, de forma reciente o en el pasado?

- a) Si
- b) No

3.- ¿Cuenta con antecedente de cirugías en la región genital?

- a) Si

b) No

4.- ¿Cuenta con antecedente de haber padecido alguna infección de transmisión sexual (I.T.S.)?

a) Si

b) No

5.- Mencione el número de parejas sexuales en toda su vida:

a) 1 pareja sexual

b) 2 parejas sexuales

c) 3 parejas sexuales

d) > de 3 parejas sexuales

6.- ¿Cuenta con algún estudio de espermatobioscopia directa de rutina, previo a su estudio de infertilidad?

a) Si

b) No

7.- ¿Ha presentado cuadros de dolor pélvico, sensibilidad o aumento de volumen testicular de forma reciente o recurrente?

a) Si

b) No

8.- ¿En el último año ha presentado secreción uretral o sintomatología urinaria irritativa baja?

a) Si

b) No

9.- ¿Tiene hijos con su pareja actual o con otra pareja?

a) Si

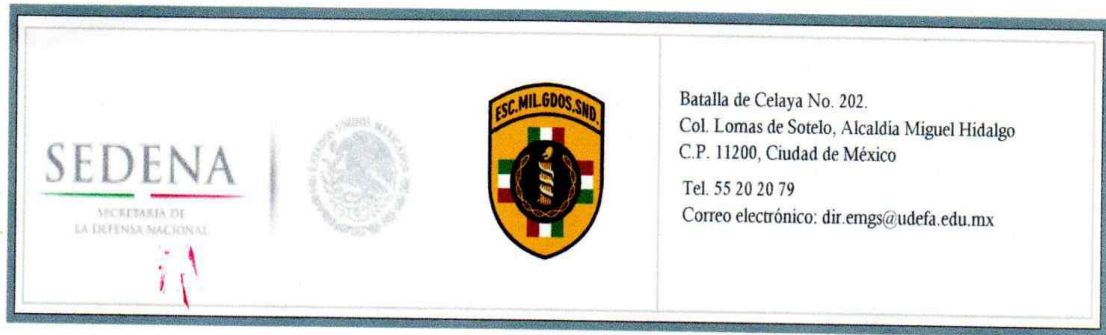
b) No

10.- ¿Ha recibido tratamiento antibiótico para alguna I.T.S. en las 2 últimas semanas?

a) Si

b) No

Anexo C.



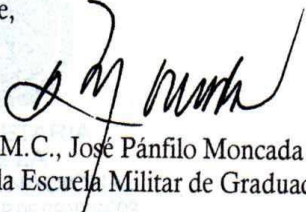
A quien corresponda

Ciudad de México, a 25 de octubre de 2018.

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que el Comité de Investigación de este plantel educativo, en el ciclo lectivo 2016-2017, autorizó el protocolo titulado: « Diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* y Virus del Papiloma Humano mediante PCR en parejas de mujeres infértiles y su relación con alteración de la espermatobioscopia », investigación que desarrolló el Myr. M.C. Juan Manuel Carbonell Campos bajo la Dirección de la Cap. 1/o. Q.B. Ret. Virginia Sánchez Monroy.

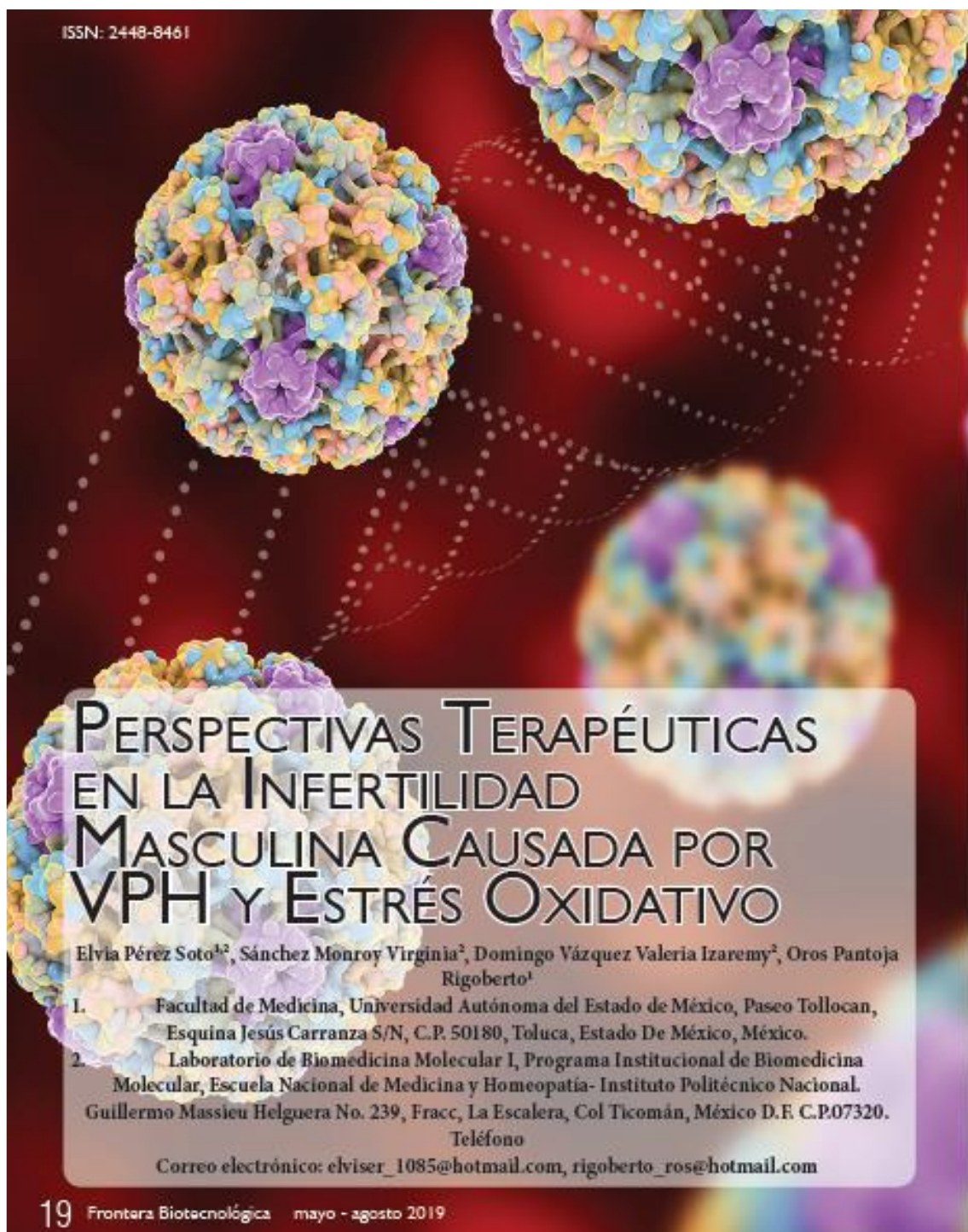
Se extiende la presente para los fines que al interesado(a) convengan.

Atentamente,


Gral. Bgda. M.C., José Pánfilo Moncada Campos
Director de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad

ESCUELA MILITAR DE GRADUADOS
DE SANIDAD
DIRECCIÓN

Anexo D. Artículo de divulgación institucional.



ISSN: 2448-8461

PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS EN LA INFERTILIDAD MASCULINA CAUSADA POR VPH Y ESTRÉS OXIDATIVO

Elvia Pérez Soto^{1,2}, Sánchez Monroy Virginia², Domingo Vázquez Valeria Izaremy², Oros Pantoja Rigoberto¹

1. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan, Esquina Jesús Carranza S/N, C.P. 50180, Toluca, Estado De México, México.
2. Laboratorio de Biomedicina Molecular I, Programa Institucional de Biomedicina Molecular, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía- Instituto Politécnico Nacional. Guillermo Massieu Helguera No. 239, Fracc, La Escalera, Col Ticomán, México D.F. C.P.07320. Teléfono

Correo electrónico: elviser_1085@hotmail.com, rigoberto_rose@hotmail.com

19 Frontera Biotecnológica mayo - agosto 2019

Anexo E. Capítulo de libro nacional.



Si desea publicar un libro o un artículo de investigación contáctenos.

Pompeya N° 2705 Col. Providencia
C.P. 44630 Guadalajara, Jalisco, México
Teléfono: 01 (33) 1061 8187
ww.cenid.org.mx
redesdeproduccioncenid@cenid.org

Edición y Diagramación:
Orlanda Patricia Santillán Castillo

Coordinador:
Francisco Santillán Campos

© Editorial Centro de Estudios e Investigaciones para el Desarrollo Docente. CENID AC
Pompeya N° 2705 Col. Providencia
C.P. 44630 Guadalajara, Jalisco, México
Registro definitivo Reniecyc No.1700205 a cargo de Conacyt.

LA INVESTIGACIÓN EN INSTITUCIONES DE EDUCACIÓN SUPERIOR EN MÉXICO

Derechos de autor:
© 2018, Ma. De los Ángeles Martínez Ortega, Martha Jiménez García, Minerva Martínez Ortega, et al.

ISBN: 978-607-8435-60-9

DOI: <https://doi.org/10.23913/9786078435609>

Primera edición 2018

Miembro de la Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana Socio #3758

Cenid y su símbolo identificador son una marca comercial registrada. Queda prohibida la reproducción o transmisión total o parcial del contenido de la presente obra mediante algún método, sea electrónico o mecánico (INCLUYENDO EL FOTOCOPIADO, la grabación o cualquier sistema de recuperación o almacenamiento de información), sin el consentimiento por escrito del editor.

Impreso en México / Printed in Mexico

**ASOCIACIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA
Y LA RESPUESTA INMUNITARIA SEMINAL**

Elvia Pérez Soto

elviser_1085@hotmail.com

Rigoberto Oros Pantoja

rigoberto_ros@hotmail.com

Olivia Medel Flores

medelflores@yahoo.com

Virginia Sánchez Monroy

vickysm17@hotmail.com

RESUMEN

La infertilidad es un problema mundial de salud reproductiva. Si bien los factores de riesgo son variados las infecciones bacterianas, virales y el proceso inflamatorio juegan un rol importante en el caso de la infertilidad masculina.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este artículo se emprende una revisión de la infección por el virus del papiloma humano (VPH) y la alteración en la calidad espermática asociada a la infertilidad. Asimismo, se aborda la participación de las citocinas proinflamatorias que conducen a una respuesta inmunitaria y celular, con la subsecuente activación de los mecanismos que perjudican la calidad espermática, lo que conlleva a la disminución de la tasa de embarazos.

Palabras clave: calidad espermática, citocinas, infertilidad, inflamación, papilomavirus.

Anexo F. Participación en Congreso Nacional de Bioquímica.



MEMBER DIRECTOR 2017 - 2018

MEMBER

DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

VICEPRESIDENTE

DR. SANDO REYES ROMERO CAMARONA

SECRETARIO GENERAL

DR. JESÚS LUIS PÉREZ MALLOL

SECRETARIA TESORERA

DRA. MARÍA SOLEDAD PÉREZ ARDÉLLIZ

SOCCOS FUNDADORES

Dr. Benjamín Aragón Lázaro

Dr. Edmundo Cabra Cuatrecasas

Dr. Guillermo Carvajal Sánchez (†)

Dr. Joaquín Cavazos (†)

Dr. Carlos del Río Estrada (†)

Dr. Gustavo Frenk Freund

Dr. Mario Barrón Hernández (†)

Dr. Jesús Guzmán García (†)

Dr. Jesús Benavente Rodríguez

Dr. José Laguna García (†)

Dr. Guillermo Masdeu Heigueras (†)

Dr. Raúl Oñativia Vicuña

Dr. Efraín S. Pardo Castro

Dr. Guillermo Esteban Acevedo

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Elvia Pérez Soto

Quien asistió y presentó el trabajo:

High HPV prevalence and its effects on pro-inflammatory cytokine expression in semen of Mexican patients

Por: Elvia Pérez Soto, Olivia Medel Flores, Oros Pantoja Rigoberto, Mariano Gómez Santana, Sánchez Monroy Virginia

En la modalidad de cartel durante el
XXXII Congreso Nacional de Bioquímica
4 - 9 de noviembre de 2018 en Ixtapa, Zihuatanejo, Gro.

Atentamente
Por el Comité Organizador



Dra. Irene B. Castaño Navarro
Presidente

Anexo G. Participación en Congreso Nacional de Inmunología.



Los genotipos VPH promueven un ambiente pro-inflamatorio y oxidativo en el semen de pacientes con teratozoospermia

Pérez-Soto E^{1,2*}, Fernández-Martínez TE³, Medel-Flores MO¹, Oros-Pantoja R², Miranda Covarrubias JC⁴, Sánchez-Monroy V^{5*}.

¹Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

²Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México.

³Centro de Investigación en Biología de la Reproducción, Área Académica de Medicina del Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto, México.

⁴Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología de la Secretaría de la Defensa Nacional, Ciudad de México, México.

⁵Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México. Salvador Díaz Mirón esq. Plan de San Luis S/N, Miguel Hidalgo, Casco de Santo Tomas 11340, Ciudad de México, México.

*E-mail: vickysm17@hotmail.com, vsanchezm@ipn.mx

La infección del Virus del Papiloma Humano (VPH) en hombres infértiles ya se ha descrito, sin embargo, su asociación con inflamación crónica y estrés oxidativo aún no se ha explorado. El objetivo del trabajo fue analizar el efecto de la infección por VPH (genotipos) sobre la calidad espermática, citocinas pro y anti-inflamatorias, así como marcadores de estrés oxidativo en pacientes militares con teratozoospermia. El estudio incluyó 101 muestras de semen, y se les realizó espermatozoides, detección VPH y los genotipos bajo riesgo (BR)-VPH:6, 11, alto riesgo (AR)-VPH:16, 18, 31, 33, 52 y 58) que se determinaron por PCR; cuantificación de citocinas seminales (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α) por ELISA; marcadores de estrés oxidativo: Capacidad antioxidante total (TAC), lipoperoxidación (LPO), 8 hidroxiguanosina

(8-OhdG), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) que se evaluaron por espectrofotometría. El análisis estadístico se evaluó con U-Mann Whitney y Kruskal Wallis ($p \leq 0.05$). Los resultados indicaron alta prevalencia de la infección por VPH (80.2 %, 81/101). Predominó la infección con múltiples genotipos, así como la infección con genotipos de alto riesgo. La infección viral se asoció a la disminución de la morfología normal de los espermatozoides ($p=0.009$). La infección simple y la infección múltiple con genotipos AR-VPH se asociaron a un incremento de IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, LPO y una disminución de la TAC, CAT y SOD ($p < 0.05$). Los resultados demuestran que VPH participa en la generación de un ambiente pro-inflamatorio y oxidativo perjudicial para los espermatozoides que puede contribuir a la teratozoospermia.



Cite this paper/Como citar este artículo: Pérez-Soto E, Fernández-Martínez TE, Medel-Flores MO, Oros-Pantoja R, Miranda Covarrubias JC, Sánchez-Monroy V. (2021). Los genotipos VPH promueven un ambiente pro-inflamatorio y oxidativo en el semen de pacientes con teratozoospermia. Revista Bio Ciencias 8: (Suppl) Memorias de XXIV Congreso Nacional de Inmunología, Sociedad Mexicana de Inmunología. e1172. <https://doi.org/10.15741/revbio.08.Suppl.e1172>

Anexo H. Participación en Congreso Nacional de Inmunología.



Revista Bio Ciencias

<https://revistabiociencias.uan.edu.mx>
ISSN 2007-3380I

Memorias del XXIV Congreso Nacional de Inmunología Monterrey 2021

Sociedad Mexicana de Inmunología

23 - 28 Abril



La co-infección por Citomegalovirus y *Chlamydia trachomatis* induce una respuesta pro-inflamatoria seminal en hombres con teratozoospermia

Pérez-Soto E^{1,3}, Medel-Flores MO¹, Carbonell-Campos JM², Oros-Pantoja R³, Sánchez-Monroy V^{4*}.

¹Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México. ²Hospital de Especialidades de la Mujer y Neonatología, Secretaría de la Defensa Nacional, Ciudad de México. ³Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México. ⁴Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México. Salvador Díaz Mirón esq. Plan de San Luis S/N, Miguel Hidalgo, Casco de Santo Tomas 11340, Ciudad de México, México.

*E-mail: vickysm17@hotmail.com , vsanchezm@ipn.mx

Las infecciones de transmisión sexual y el proceso inflamatorio juegan un papel importante en la infertilidad masculina. Por ello, en el presente trabajo se exploró la presencia de patógenos, así como su relación con los niveles de citocinas pro-inflamatorias en hombres militares con teratozoospermia que acudieron a la clínica de fertilidad. Se colectaron 104 muestras de semen, a las que se detectó por PCR Citomegalovirus (CMV) y *Chlamydia trachomatis* (CT), la cuantificación de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α) se realizó por ELISA y la asociación de citocinas con la presencia de los patógenos se analizó con pruebas no paramétricas de U-Mann Whitney y Kruskal Wallis ($p \leq 0.05$). Los resultados indicaron prevalencia de CMV de 3.8 % (4/104), CT de 23.1 % (24/104) y coinfección por CMV+CT de 8.7 % (9/104). La infección por

CMV mostró un ligero incremento de IFN- γ sin diferencia significativa ($p=0.312$) y la infección por CT se asoció a un incremento de IL-1 β ($p=0.001$) e IL-6 ($p=0.001$). Interesantemente, el grupo coinfectado por CMV+CT se asoció a un incremento de IL-1 β ($p=0.016$) e IFN- γ ($p=0.007$). Los resultados sugieren que la coinfección por CMV+CT incrementan IL-1 β e IFN- γ en el semen, contribuyendo a un ambiente pro-inflamatorio crónico perjudicial para las células espermáticas, lo que influye en la infertilidad masculina. Se recomienda incrementar la muestra para confirmar los hallazgos obtenidos en el presente trabajo, y con la finalidad de evitar el desarrollo de enfermedades en el hombre, como es la prostatitis, hiperplasia benigna prostática y el cáncer.



Cite this paper/Como citar este artículo: Pérez-Soto E, Medel-Flores MO, Carbonell-Campos JM, Oros-Pantoja R, Sánchez-Monroy V. (2021). La co-infección por Citomegalovirus y *Chlamydia trachomatis* induce una respuesta pro-inflamatoria seminal en hombres con teratozoospermia. Revista Bio Ciencias 8: (Suppl) Memorias de XXIV Congreso Nacional de Inmunología, Sociedad Mexicana de Inmunología. e1172. <https://doi.org/10.15741/revbio.08.Suppl.e1172>