

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Prevalencia del virus del Papiloma Humano (VPH)  
en el semen de pacientes de una clínica de fertilidad  
en Guatemala y su efecto en la fragmentación del  
ADN espermático**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
María José Méndez Bustamante  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala  
2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Prevalencia del virus del Papiloma Humano (VPH)  
en el semen de pacientes de una clínica de fertilidad  
en Guatemala y su efecto en la fragmentación del  
ADN espermático**

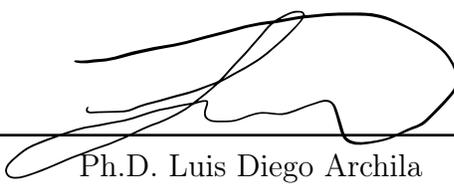
Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
María José Méndez Bustamante  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y  
Microbiología

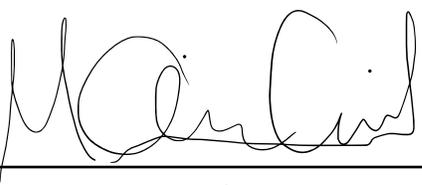
Guatemala  
2022

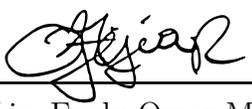
Vo.Bo.:

(f)   
Ph.D. Luis Diego Archila

Tribunal Examinador:

(f)   
Ph.D. Luis Diego Archila

(f)   
Licda. María Cristina Bolaños

(f)   
Lic. Fredy Omar Mejía

Fecha de aprobación: Guatemala, 05 de diciembre del 2022.

En primer lugar, quisiera agradecer al equipo de Centro Procrea® ya que sin ustedes, la realización de este trabajo de graduación no hubiera sido posible. Al conjunto de enfermeras, gracias por su apoyo durante el reclutamiento de los participantes del estudio; al equipo de laboratorio por su constante apoyo, asesoría y motivación; y a los doctores por su apoyo y aprobación.

En segundo lugar, quiero agradecerle al Dr. Juan Carlos Franco de la Clínica de Enfermedades Venéreas Guatemala por el aporte de los controles positivos de VPH, sin los cuales la parte de la experimentación no se hubiera llevado a cabo.

Finalmente, quisiera agradecerle a los colaboradores de la Universidad del Valle de Guatemala, en especial a Ph. D. Diego Archila por su apoyo y asesoría, así como a mis compañeros y familia por sus ánimos durante la realización de este estudio.

<b>Prefacio</b>	<b>III</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>2</b>
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
<b>3. Justificación</b>	<b>3</b>
<b>4. Marco teórico</b>	<b>4</b>
4.1. Virus del Papiloma Humano (VPH)	4
4.1.1. Partículas virales, genoma y organización	4
4.1.2. Infección y ciclo de vida	5
4.1.3. Tipos de VPH	6
4.1.4. Epidemiología	6
4.2. Antecedentes de VPH en Guatemala	7
4.3. Repercusiones de VPH en la salud masculina	8
4.3.1. Infertilidad masculina	8
4.3.2. VPH y semen	9
4.4. Otras consecuencias de la presencia de VPH en el semen	10
4.4.1. Fragmentación del ADN espermático	10
4.4.2. VPH y fragmentación de ADN	12
4.5. Efectos del VPH en las técnicas de reproducción asistida	12
4.5.1. Inseminación artificial	13
4.5.2. Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	13
4.5.3. Criopreservación	14
4.5.4. Lavado de semen para la remoción de VPH	14

<b>5. Marco metodológico</b>	<b>16</b>
5.1. Variables	17
5.2. Hipótesis	18
5.3. Bioética	18
5.3.1. Aprobación por Comité de Ética	18
5.3.2. Reclutamiento y obtención de muestras	18
5.3.3. Proceso de reclutamiento	19
5.3.4. Tipo y tamaño de muestra	19
5.3.5. Riesgos y beneficios	20
5.4. Materiales y métodos	20
5.4.1. Prueba <i>SCD</i> para la determinación del índice de fragmentación del ADN espermático ( <i>SDFI</i> ) en muestras de semen	20
5.4.2. Extracción de ADN viral en muestras de semen	21
5.4.3. Detección molecular del VPH en las muestras de semen por PCR punto final	21
5.4.4. Revelación de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa	22
5.4.5. Análisis de datos	22
<b>6. Resultados</b>	<b>23</b>
6.1. Extracción de ADN viral en semen	23
6.2. Optimización del PCR punto final para la detección de VPH en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala	24
6.3. Prevalencia del VPH en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala	26
6.4. Efecto de la presencia del VPH en el semen sobre la fragmentación del ADN espermático	27
<b>7. Análisis de resultados</b>	<b>28</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>31</b>
<b>9. Recomendaciones</b>	<b>32</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>33</b>
<b>11. Anexos</b>	<b>38</b>
A. Consentimiento informado	38
B. Documento adicional No. 1	42
C. Documento adicional No. 2	44
D. Dictamen de aprobación del Comité de Ética de FCCHH de la UVG	46
E. SOP No. 1: Prueba <i>SCD</i> para la determinación del <i>SDFI</i> en semen.	49
F. SOP No. 2: Extracción de ADN viral en muestras de semen.	54
G. SOP No. 3: Detección molecular del VPH en las muestras de semen por PCR punto final.	57
H. Cuantificación de ADN extraído en muestras de semen.	63
I. Presencia de VPH y <i>SDFI</i> en las muestras de semen.	72

---

Lista de figuras

---

4.1. Micrografía electrónica de partículas del VPH teñidas negativamente. . . . .	5
4.2. Organización y ciclo de vida del VPH. . . . .	6
4.3. Patrones de dispersión de la cromatina en espermatozoides mediante <i>SCD</i> . . . . .	11
4.4. Lavado de semen con hialuronidasa para la remoción de VPH. . . . .	15
5.1. Diagrama de flujo de la metodología para lleva a cabo este estudio. . . . .	16
5.2. Patrones de dispersión de la cromatina en espermatozoides esperados tras la realización de la prueba <i>SCD</i> . (A) Espermatozoides con halo grande, (B) espermatozoides con halo mediano, (C) espermatozoides con halo pequeño y (D) espermatozoides sin halo. . . . .	20
6.1. Concentración de ADN extraído de semen en función de la concentración espermática en el eyaculado. . . . .	24
6.2. Optimización del PCR punto final para la detección de VPH en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala. A) Optimización 1: muestras de semen (P01-P05), 2 pares de cebadores, T° alineamiento 57°C, 35 ciclos, gel de agarosa al 0.8 %, 75V, 60 min; B) Optimización 2: muestras de semen (P01-P04), 2 pares de cebadores, T° alineamiento 45°C, 35 ciclos, gel de agarosa al 2.0 %, 75V, 90 min; C) Optimización 3: controles positivos de VPH (+1, +2), 2 pares de cebadores (+1., +2.), 1 par de cebador VPH (+1-, +2-), T° alineamiento 40°C (+1., +1-, +2., +2-), T° alineamiento 51°C (+1 ), 45 ciclos, gel de agarosa al 2.0 %, 150V, 40 min, condiciones frías; D) Optimización 4: controles positivos de VPH (+1), T° alineamiento 42°C (+1, 42), T° alineamiento 44°C (+1, 44), T° alineamiento 46°C (+1, 46), 40 ciclos, gel de agarosa al 2.0 %, 150V, 40 min, condiciones frías. . . . .	26
6.3. Presencia del VPH en el semen de pacientes de una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala. . . . .	27
6.4. Histograma del <i>SDFI</i> según la presencia del VPH en las muestras de semen. El grupo positivo para VPH se representa con el color azul y el grupo negativo con color gris. Las medias de cada grupo se representan con líneas verticales punteadas. . . . .	27
I.1. Detección de VPH en muestras P-01 a P-20 de semen por medio de PCR punto final. A)P-01 a P-05, B) P-06 a P-10, C) P-11 a P-15 y D) P-16 a P-20. . . . .	74
I.2. Detección de VPH en muestras P-21 a P-40 de semen por medio de PCR punto final. A)P-21 a P-25, B) P-26 a P-30, C) P-31 a P-35 y D) P-36 a P-40. . . . .	75
I.3. Detección de VPH en muestras P-41 a P-55 de semen por medio de PCR punto final. A)P-41 a P-45, B) P-46 a P-50, C) P-51 a P-55, D) P-56 a P-60 y E) P-61 a P-62. . . . .	76

I.4. <i>SDFI</i> y presencia de VPH en función de A) Concentración espermática (millones/mL),	
B) Espermatozoides móviles progresivos (%), C) Formas normales y D) Índice de te- ratozoospermia (ITZ).	77

---

Lista de cuadros

---

5.1. Variables para la determinación de la fragmentación de ADN espermático en semen de pacientes que visitan una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.	17
5.2. Variable para la extracción de ADN viral en el semen de pacientes que visitan una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.	17
5.3. Variable para la detección molecular de VPH por PCR punto final en semen de pacientes que visitan una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.	17
5.4. Secuencia de cebadores utilizados para la detección de VPH en semen.	21
5.5. Programa de termociclado utilizado para la detección de VPH en semen por PCR en EdvoCycler® Jr. PCR.	21
6.1. Estadística descriptiva de la concentración y las razones de pureza para ADN extraído de muestras de semen de pacientes de una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.	23
H.1. Concentración y valores de pureza del ADN extraído de las muestras de semen.	64
H.2. Promedio de la concentración y valores de pureza del ADN extraído de las muestras de semen.	68
H.3. Parámetros seminales importantes de las muestras de semen.	70
I.1. Presencia de VPH y <i>SDFI</i> en las muestras de semen.	73

El virus del Papiloma Humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más común que existe. A pesar de que la infección en mujeres ha sido ampliamente estudiada, el riesgo en los hombres se ha subestimado ya que se creía que la mayoría de las infecciones eran benignas. Añadido al cáncer del aparato genital masculino, la infertilidad ha sido uno de los efectos negativos de la infección del VPH y el impacto del virus en diversos aspectos como los parámetros seminales, los resultados de las técnicas de reproducción asistida (*ART*, por sus siglas en inglés) y la fragmentación del ADN espermático ha sido un tema controversial. Además, la prevalencia del VPH en el semen suele variar entre el 10 y 30% en la población masculina. Por eso se implementó un protocolo de extracción de ADN viral en semen y se optimizó un PCR punto final para la detección del VPH en el semen. Se determinó que la prevalencia del VPH en el semen de pacientes de una clínica de fertilidad en la ciudad de Guatemala es del 71.0%; lo que comprueba la necesidad de eliminar el concepto errado de que la infección y la vacunación del VPH son exclusivamente del sexo femenino. Para este estudio, fue posible afirmar que el VPH no produce un efecto sobre la fragmentación del ADN espermático ni sobre otros parámetros seminales importantes como la concentración espermática, la movilidad progresiva y la morfología. Se recomienda realizar la tipificación de los tipos de VPH para determinar la prevalencia de los tipos de VPH de alto riesgo y bajo riesgo, con lo cual se podría evaluar el riesgo de desarrollo de cáncer en la población masculina guatemalteca.

El virus del Papiloma Humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual (ETS) más común que existe, tanto en mujeres como en hombres. Según la Organización Mundial de la Salud -OMS- (2020), el VPH es uno de los factores causales más importantes asociados con el cáncer de cérvix en las mujeres de todo el mundo, con más de 150 genotipos descritos. En cuanto a la infección masculina, se asumía que era benigna, causante únicamente de verrugas genitales, y que no tenía tendencia a desarrollar un cuadro clínico maligno. No obstante, nuevos descubrimientos han demostrado que causa cáncer de pene, ano, recto y del tracto orofaríngeo, los cuales, sin un tratamiento adecuado, pueden desencadenar la metástasis y posteriormente la muerte. Añadido a esto, se ha observado que la infección puede afectar severamente la fertilidad masculina (Bossi *et.al.*, 2019; Elder *et.al.*, 2005; Moreira *et.al.*, 2014; Nasser *et.al.*, 2015).

La presencia del VPH en el semen hace que la asociación entre una infección por VPH y la infertilidad masculina sea factible y la prevalencia suele ser de 2 a 31 % en la población masculina, habiendo variaciones según el país de estudio (Moghimi *et.al.*, 2019). Sin embargo, la asociación entre este virus y los parámetros seminales es controversial ya que ciertos estudios demuestran que no existe una correlación significativa entre una infección por VPH y los parámetros anormales, mientras que otros demuestran que sí posee efectos negativos, especialmente en la concentración y movilidad espermática. De igual forma, sigue siendo debatible si la presencia del VPH puede inducir la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) espermático y, en general, afectar los resultados de las técnicas de reproducción asistida (*ART*, por sus siglas en inglés) mediante tasas reducidas de fertilización y tasas incrementadas de abortos (Behboudi *et.al.*, 2018; Kato *et.al.*, 2021; Bossi *et.al.*, 2019; Depuydt *et.al.*, 2021; Tangal *et.al.*, 2019; Boeri *et.al.*, 2019; Connelly *et.al.*, 2001; Lee *et.al.*, 2002; Kaspersen *et.al.*, 2013; Zacharis *et.al.*, 2018).

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es determinar la prevalencia del VPH en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala mediante la detección molecular por reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés) punto final e identificar el efecto que causa en la fragmentación del ADN espermático por medio de una prueba de dispersión de la cromatina espermática (*SCD*, por sus siglas en inglés). Junto con la implementación de un protocolo de extracción de ADN viral en el semen que facilite la detección molecular del VPH, se podrá establecer un precedente sobre la prevalencia de la infección del VPH en hombres de Guatemala y contribuir a la evidencia que relaciona al VPH y la infertilidad masculina.

### 2.1. Objetivo general

Determinar la prevalencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala e identificar el efecto que causa en la fragmentación del ADN espermático.

### 2.2. Objetivos específicos

- Implementar un protocolo de extracción de ADN viral en semen.
- Determinar la prevalencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala mediante la detección molecular por PCR punto final.
- Identificar el efecto de la presencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala sobre la fragmentación del ADN espermático por medio de una prueba de dispersión de la cromatina espermática (*SCD*).

La prevalencia del VPH en el semen suele ser de 2 a 31 % en la población masculina en general (Moghimi *et.al.*, 2019), aunque a nivel nacional sigue siendo desconocida. A pesar de que el impacto de una infección por este virus en mujeres ha sido ampliamente estudiado, el riesgo en los hombres se ha subestimado ya que se creía que la mayoría de las infecciones eran benignas. Añadido al cáncer del aparato genital masculino, la infertilidad ha sido uno de los efectos negativos de la infección del VPH y el impacto del virus en diversos aspectos como los parámetros seminales, los resultados de las *ART* y la fragmentación del ADN espermático ha sido un tema controversial.

A través de la detección molecular por PCR, se pretende determinar la prevalencia del VPH en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala; estos resultados son de gran valor para la salud pública del país ya que proveerán una pauta de la prevalencia del virus en el sexo masculino y, a la vez, demostrarán la importancia de eliminar el concepto errado de que la infección del VPH y la vacunación son exclusivamente de mujeres. Identificar el efecto de la presencia de VPH en el semen sobre la fragmentación del ADN espermático, por medio de la prueba *SCD*, contribuiría al conjunto de evidencia que relaciona al VPH y la fertilidad masculina. Una vez la evidencia disponible sea unánime y de ser esta relación negativa, la prueba del VPH podría incluirse dentro del panel de pruebas infecciosas como parte de las pruebas complementarias para la detección de la infertilidad masculina en las clínicas de fertilidad.

Así pues, la extracción de ADN viral en semen representa un reto para la detección molecular ya que el semen posee inhibidores de PCR que podrían inhibir la amplificación del ADN objetivo; siendo esta una de las razones por las cuales actualmente no se lleva a cabo de forma rutinaria en los laboratorios. Las enzimas del fluido seminal, la lactoferrina y los residuos de zinc producidos por la próstata para la protección de la condensación de cromatina de los espermatozoides inhiben la acción de la Taq polimerasa (Abou-Setta, 2004; Manuja *et.al.*, 2010). Los polisacáridos como glucógeno interrumpen el proceso enzimático imitando la estructura de los ácidos nucleicos y los iones de calcio inhiben la actividad de la polimerasa al competir con los co-factores de la enzima (Acharya *et.al.*, 2017). Por lo tanto, la implementación de un protocolo para la extracción de ADN viral en semen facilitaría la detección molecular del VPH.

## 4.1. Virus del Papiloma Humano (VPH)

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) se caracterizan por ser una de las patologías más frecuentes en el mundo y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una de cada 100 personas acude a consulta por lo menos una vez al año debido a una infección de transmisión sexual. El principal problema de estas infecciones radica en la falta de diagnóstico, lo cual se debe a que la mayoría de los portadores desconocen su existencia (Hernández *et.al.*, 2016). Así pues, la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) se clasifica como una ITS y se estima que alrededor del 75 % de la población mundial es VPH positiva (Fenizia *et.al.*, 2020).

### 4.1.1. Partículas virales, genoma y organización

Los Virus del Papiloma Humano (VPH) son un grupo de virus de ADN sin envoltura pertenecientes a la familia Papillomaviridae. Las partículas virales consisten en una cápside icosaédrica que rodea a una molécula de ADN circular de doble hebra de aproximadamente 8,000 pares de bases de las cuales una hebra, que contiene tres regiones genómicas, es utilizada como molde para la transcripción. Dichas regiones son la temprana (E, por su nombre *early* en inglés), que codifica las siete proteínas necesarias para la replicación viral, la tardía (L, por su nombre *late* en inglés) que codifica las dos proteínas de la cápside viral y la tercera región conocida como larga de control (LCR, por su nombre *long control* en inglés) que comprende las secuencias de control para la replicación y transcripción viral (Harden y Munger, 2016).

Las proteínas de la replicación incluyen la E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8. La E1 codifica para una helicasa viral de ADN dependiente de ATP y la E2 desempeña funciones tanto en la transcripción como en la replicación. La E4 interrumpe la estructura de los filamentos de citoqueratina mediante su unión y juega un papel importante en el escape viral de las capas epiteliales cornificadas. La E5 es una proteína pequeña transmembranal que cumple un rol específico en la apoptosis y la evasión de la respuesta inmune. En cuanto a la E6 y E7, ambas dirigen la entrada del ciclo celular para la amplificación genómica en capas epiteliales superiores y poseen actividades oncogénicas. Por último, las proteínas codificadas por la región L son la proteína de la cápside mayor, L1, y la menor, L2; siendo las cápsides conformadas en un 95 % por la L1 y en un 5 % por la L2 (Harden y Munger, 2016).

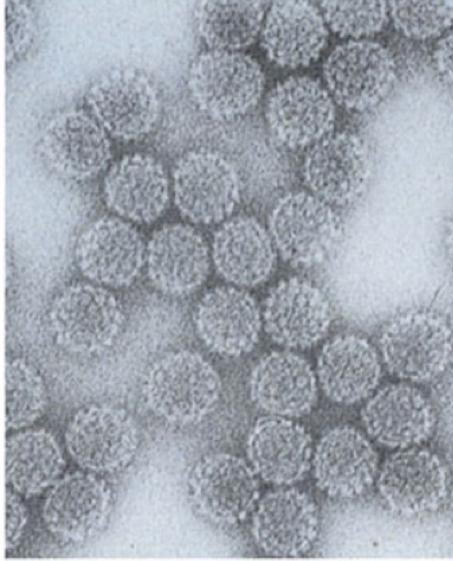


Figura 4.1: Micrografía electrónica de partículas del VPH teñidas negativamente.

(Doorbar *et.al.*, 2016).

#### 4.1.2. Infección y ciclo de vida

Para establecer una infección persistente, el VPH infecta específicamente las células basales dado que son las únicas células en el epitelio escamoso capaces de sostener la división celular. Sin embargo, las células basales se encuentran protegidas por varias capas de células diferenciadas que dificultan el acceso del virus y restringen a que la infección se de a través de micro heridas que expongan las capas epiteliales inferiores o en las células más vulnerables y accesibles como las localizadas en la zona de transformación escamo-columnar en el cérvix y el ano (Harden y Munger, 2016).

Para la unión del virus, los proteoglicanos de heparán sulfato (*HSPGs*, por sus siglas en inglés) sirven como los receptores de unión en las células basales e inducen cambios conformacionales en la cápside viral para su unión a un receptor de entrada. Luego, el virus es endocitado mediante un mecanismo parecido a la macropinocitosis y los viriones son transportados por el sistema endosomal, en donde sufren cambios estructurales que llevan a la disociación de la L1. El movimiento del virus del citoplasma hacia el núcleo es mediado por microtúbulos formados por la interacción de vesículas asociadas a la L2 y proteínas motoras y la entrada del genoma viral al núcleo es un proceso mediado por la L2 (Harden y Munger, 2016; Doorbar *et.al.*, 2016).

Después de la infección y antes del mantenimiento del genoma viral en el núcleo, ocurre una amplificación inicial del genoma en donde la E1 y E2 son necesarias para alcanzar entre 50 a 100 copias virales. El genoma viral se replica una vez por cada ciclo celular durante la fase S, asegurando una infección persistente en las células basales por años a décadas hasta que, en cierto punto, hay un cambio de un mantenimiento del genoma a una replicación de ADN vegetativa, la cual propicia el empaquetamiento del genoma en viriones. En este tipo de replicación, añadido al rol de la E1 y la E2, el VPH activa la maquinaria celular de replicación de ADN y permite la síntesis vegetativa de ADN viral por medio de la E6 y E7. Para completar el ciclo de vida, ocurre la entrada de la L1 y L2 al núcleo a través de moléculas transportadoras y, posteriormente, el ensamblaje de la L1 que, junto con la ayuda de la L2 y la acumulación de enlaces disulfuro entre las proteínas, generan la condensación de la cápside y el aumento en la estabilidad y resistencia. Dado que los VPH no son líticos, la liberación viral ocurre por la pérdida de la integridad estructural de la célula y la

unión a filamentos específicos; siendo ambos procesos promovidos por la E4 (Harden y Munger, 2016; Doorbar *et.al.*, 2016).

El periodo de incubación del VPH varía entre tres semanas a ocho meses y el ciclo de infección tiende a ser completado entre dos a tres semanas. La mayoría de las infecciones por este virus son subclínicas y pueden ser asintomáticas o presentar síntomas muy leves. Aproximadamente el 10 al 30% de las mujeres poseen una regresión espontánea de infección en tres meses, pero el 90% son capaces de eliminar la infección en dos años, principalmente por el desarrollo de una inmunidad celular caracterizada por la producción anticuerpos contra la L1. Además, el 10 al 15% de mujeres no desarrollan una respuesta inmune suficiente y permanecen infectadas de forma persistente, siendo este grupo el que posee mayor riesgo de desarrollar una enfermedad de alto riesgo y cáncer. En cambio, en hombres, no se cuenta con una cifra exacta respecto a esto. Por eso, desde una perspectiva biológica, el VPH es un patógeno muy exitoso; es decir, puede inducir infecciones crónicas sin ningún síntoma sistémico, lo que permite que el huésped transmita grandes cantidades de partículas virales a individuos sanos (Pereira *et.al.*, 2015).

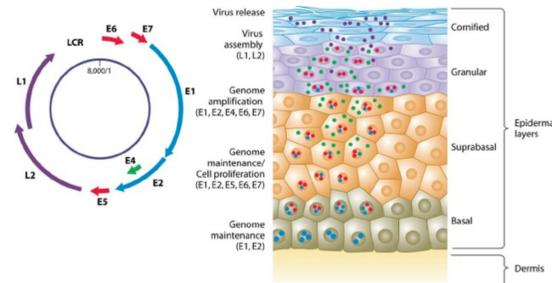


Figura 4.2: Organización y ciclo de vida del VPH.

(Lazarczyck *et.al.*, 2009).

#### 4.1.3. Tipos de VPH

Los VPH pueden infectar células epiteliales basales de la piel o del revestimiento interno de los tejidos. Debido a esta característica pueden clasificarse como cutáneos, los cuales son epidermotróficos e infectan la piel de manos y pies, o mucosos, que infectan el revestimiento de la garganta, la boca, el tracto respiratorio o el epitelio anogenital. Además, según su asociación con el cáncer y lesiones precursoras, los VPH pueden ser clasificados en alto y bajo riesgo. Los de alto riesgo incluyen al tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 66, 68, 73 y 82 y están asociados con cáncer orofaríngeo y anogenital como cervical, vulvar, vaginal, anal y de pene. Entre estos, el genotipo 16 es el más carcinogénico y, junto con el tipo 18, son los responsables de aproximadamente el 70% del cáncer cervical. Dentro de los de bajo riesgo se encuentran el tipo 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 y 72 y están asociados a verrugas cutáneas y genitales, siendo el genotipo 6 y 11 los más comunes y los responsables del 90% de las lesiones genitales (Burd, 2003; Braaten y Laufer, 2008; Wang y Palefsky, 2015).

#### 4.1.4. Epidemiología

Mundialmente, el VPH es una prioridad de salud pública por los numerosos casos de infección y por ser la causa primaria de cáncer entre las mujeres. La prevalencia por continente es variable, pero se estima que supera el 30% en cada región, a excepción de Asia, y tiende a ser mayor en países

en desarrollo en donde alcanza un 42 % mientras que en los desarrollados es de un 22 % (Manini y Montomoli, 2018; Kombe *et.al.*, 2021).

Según estudios, la prevalencia del VPH en mujeres es mayor en regiones específicas como África Oriental y Latinoamérica, mientras que en países europeos la prevalencia es relativamente baja. En hombres, tanto la prevalencia global como la tasa de transmisión es muy similar a la de las mujeres dado que el VPH anogenital es, en su mayoría, transmitido sexualmente. Los homosexuales y los VIH-positivos poseen un mayor riesgo de infección, con una alta incidencia de infección anal de VPH mayor al 90 % en comparación con los hombres heterosexuales, en quienes el número de parejas sexuales determina el riesgo de contraer una infección. Además, la tasa de infección en hombres jóvenes y adultos tiende a ser igual de alta mientras que, en mujeres, aquellas menores a 25 años son las más infectadas (Kombe *et.al.*, 2021; Bogale *et.al.*, 2020).

Por lo tanto, se ha determinado que la pobreza, junto con la falta de protección durante relaciones sexuales y un alto número de parejas sexuales, son las principales causas de transmisión del VPH. La mayoría de las mujeres comienza a tener relaciones sexuales a una edad temprana, razón por la cual existe una prevalencia más alta del VPH mucoso en mujeres jóvenes, especialmente en países de bajos recursos. Así mismo, costumbres culturales como matrimonios tempranos y los altos índices de divorcio son factores determinantes en el aumento de transmisión viral. No obstante, la mayoría de las mujeres son capaces de eliminar la infección rápidamente por su inmunidad competente, lo cual concuerda con las tasas decrecientes de infección en mujeres mayores a 25 años. En hombres, la prevalencia invariable por la edad se debe a que la mayoría de estos tiene relaciones sexuales con mujeres jóvenes infectadas y a que, en comparación con las mujeres, poseen un bajo potencial para desarrollar inmunidad, incluso después de varias exposiciones. Esto sugiere que los hombres son reservorios o vectores del VPH para mujeres y cualquier carácter sexual es un método potencial de transmisión (Kombe *et.al.*, 2021).

## 4.2. Antecedentes de VPH en Guatemala

El primer reporte de VPH en Guatemala se registró en 1992 en un estudio prospectivo con niños de la calle de la Ciudad de Guatemala abusados sexualmente, en donde se encontró que 39 de 143 eran VPH positivos. En el año 2005, con dos grupos de mujeres del departamento de Escuintla, uno de alto riesgo conformado por sexoservidoras y otro de bajo riesgo por mujeres que asistieron al centro de salud, se encontró la presencia de VPH en el 25 % de la población de alto riesgo y un 7 % en la población de bajo riesgo. Para el 2011, el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) reportaba anualmente 4,000 muertes por cáncer, siendo el cáncer cervical la tercera causa de muerte relacionada con cáncer en mujeres mayores de 30 años. Asimismo, el Ministerio de Salud indicaba que el 87 % de los casos de cáncer cervical afectaban a mujeres entre 30 y 69 años, mientras que el 73 % de los casos afectaban a mujeres entre 30 y 50 años. En el mismo año, un estudio reportó una prevalencia del 26 % de VPH en 291 mujeres guatemaltecas que asistían a la Asociación Pro Bienestar de la Familia (APROFAM; Torres, 2011).

Según el Observatorio Global del Cáncer (*GCO*, por sus siglas en inglés), en el 2020 se registraron 1,555 nuevos casos y 872 muertes, siendo el cáncer cervical la segunda causa principal de fallecimientos por cáncer en mujeres. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó a Guatemala cumplir para el 2030 con el 90 % de cobertura de vacunación, el 70 % de cobertura de tamizaje y el 90 % de cobertura en tratamiento con el fin de eliminar el cáncer cérvico uterino para 2085. En Guatemala se administran las vacunas Gardasil®<sup>®</sup>, para los tipos 6, 11, 16 y 18 del VPH, y Cervarix®<sup>®</sup>, para los tipos 16 y 18 del VPH, a niñas entre 10 y 14 años, a quienes se aplica un esquema de vacunación con un intervalo mínimo de 180 días, y aunque la vacuna es aplicable a niños, el Estado se enfoca actualmente en completar el esquema de las niñas. Por lo tanto, la vacuna puede ser administrada a niños en laboratorios o centros privados pero su costo oscila entre Q750 y Q1,500, siendo estos precios poco accesibles para una gran parte de la población. A esta falta de

vacunación en hombres se le suma el concepto errado que se tiene del VPH ya que se piensa que una infección por VPH y, por ende, la vacunación, es exclusivamente de mujeres (Sazo, 2021).

Así pues, en los cuatro años que lleva la campaña de vacunación, se han aplicado 1,193,675 dosis a niñas y jóvenes. Para la cobertura completa se necesitan al menos 2,792,880 vacunas, por lo que se necesita aplicar alrededor de 1,599,205 inyecciones en Guatemala (Sazo, 2021).

### 4.3. Repercusiones de VPH en la salud masculina

Se ha determinado que, además del cáncer de cérvix, la infección por VPH en mujeres causa otras afecciones en la salud como el cáncer vulvar, vaginal, anal, de boca, de garganta, verrugas en la vulva, vagina, perineo, cérvix, ano y recto. Aunque el impacto de una infección por este virus en mujeres ha sido ampliamente estudiado, el riesgo en los hombres se ha subestimado ya que se creía que la mayoría de las infecciones eran benignas, es decir que únicamente causaban verrugas genitales, y que no tenían tendencia a desarrollar afecciones malignas. A través de los años, se ha demostrado que una infección por algún tipo de VPH de bajo riesgo causa verrugas genitales en varias partes del cuerpo como el frenillo y eje de pene, el surco coronal del glande, la uretra, el escroto, el ano, el recto, el muslo y la mucosa oral. En cuanto a los VPH de alto riesgo se ha reportado que estos causan cáncer de pene, ano, recto y del tracto orofaríngeo; los cuales, sin un tratamiento temprano, pueden causar cuadros más adversos como la metástasis y posteriormente la muerte. Así pues, nuevos estudios han demostrado que esta infección puede tener un gran impacto en la fertilidad masculina, afectando severamente la calidad y función espermática (Elder *et.al.*, 2005; Moreira *et.al.*, 2014; Tommasino, 2013).

#### 4.3.1. Infertilidad masculina

Según la OMS (2021), la infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo masculino o femenino que consiste en la imposibilidad de conseguir un embarazo después de 12 meses o más de relaciones sexuales habituales sin protección. Aproximadamente, el 15-20 % de las parejas son infértiles y la infertilidad masculina contribuye en un 40-50 % en todos los casos, siendo las causas más comunes la criptorquidia, el varicocele, el hipogonadismo, los anticuerpos antiespermáticos, los tumores testiculares y los trastornos genéticos. A pesar de los métodos diagnósticos avanzados, el 20-35 % de los hombres poseen una infertilidad de origen desconocido y entre el 6-10 % de la infertilidad masculina se debe a infecciones del tracto genital. Tanto las infecciones virales como las bacterianas se han considerado factores destructores que afectan la fertilidad masculina ya sea por los efectos tóxicos directos sobre las células del tracto genital masculino o por los efectos indirectos como las reacciones inmunológicas que pueden alterar los procesos reproductivos incluyendo la espermatogénesis, la función espermática y su transporte (Palma y Vantman, 2021; Moghimi *et.al.*, 2019; Behboudi *et.al.*, 2018).

La evaluación de la infertilidad en hombres consiste en un examen físico y un espermograma, en el cual se analizan parámetros macroscópicos como el volumen y el pH del semen y parámetros microscópicos siendo estos la concentración, movilidad y morfología espermática. Generalmente, estos parámetros no son suficientes para determinar la causa de infertilidad masculina por lo que nuevas pruebas se han implementado, entre ellas el estrés oxidativo, la integridad acrosomal, la fragmentación de ADN y los análisis genéticos. Añadidas a estas pruebas complementarias, se encuentran las pruebas para enfermedades infecciosas y se incluyen a *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, el virus del herpes simple (VHS), citomegalovirus (CMV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B y C; patógenos de los cuales existe una extensa evidencia que alteran los parámetros seminales y la fertilidad. Sin embargo, el VPH no se incluye dentro de este panel de pruebas infecciosas por la

discrepancia que se tiene hasta la fecha sobre sus efectos en la fertilidad (Khatun *et.al.*, 2018; Bossi *et.al.*, 2019; Moghimi *et.al.*, 2019).

### 4.3.2. VPH y semen

En varios estudios se ha reportado la presencia de ADN y ARN del VPH en la región anal, perineal, la glándula, el eje del pene, la uretra, los testículos, el escroto, el epidídimo y los conductos deferentes (Nasseri *et.al.*, 2015). Por lo tanto, la existencia de VPH en estos tejidos, especialmente en los hombres infértiles, hace que la asociación entre una infección por VPH y la alteración de los parámetros seminales sea factible (Behboudi *et.al.*, 2018). Además, un porcentaje variable de hombres asintomáticos muestran un reservorio para VPH en el prepucio del pene, lo que convierte al semen en una muestra de alto valor diagnóstico para la evaluación de la infección por VPH en hombres infértiles (Foresta *et.al.*, 2015).

En el semen, el ADN del VPH se origina únicamente a partir de viriones infecciosos y se encuentra limitado en el tiempo. Esto se debe a que los viriones del VPH sólo pueden ser producidos en células que no se dividen y tienen una vida útil limitada de cuatro semanas, por lo que la producción de viriones y su liberación de las células descamadas una vez alcanzan la parte superior del epitelio suele estar limitada en el tiempo (Depuydt *et.al.*, 2021). Estudios previos han demostrado que existe relación entre una infección de VPH en el epitelio del pene y la presencia de VPH en el semen, lo que sugiere que la presencia de este virus en el semen puede ser resultado de la exfoliación de los queratinocitos del pene infectados. Por lo tanto, la presencia de ADN del VPH en el semen indica que el virus puede estar localizado en el interior de las células espermáticas, en la superficie de los espermatozoides, en células epiteliales exfoliadas del tracto genital o en el fluido prostático (Kato *et.al.*, 2021).

Así pues, el modelo patogénico principal que une la detección del VPH en el semen y la infertilidad recae en la adhesión de los viriones de VPH a la superficie de los espermatozoides, lo cual se ha demostrado que ocurre en dos sitios específicos a lo largo del ecuador de la cabeza. La superficie de los espermatozoides se encuentra densamente cubierta por restos de carbohidratos estructuralmente relacionados, el glucocáliz, pertenecientes a la familia de glucoproteínas de membrana, los glucosaminoglucanos (GAGs). Estos dominios glucosilados son conocidos por proporcionar sitios de unión a los viriones del VPH similares a los que se encuentran en las superficies de las células epiteliales y, en específico, el sindecano-1 es uno de los principales GAGs en la cabeza de los espermatozoides capaces de interactuar con la proteína de la cápsida L1 del virión del VPH (De Toni *et.al.*, 2020).

Como consecuencia de esta unión, ciertos estudios han demostrado que los parámetros seminales se ven severamente afectados; siendo la movilidad espermática el más perjudicado. Algunos metaanálisis recientes también indican que el VPH está presente en el semen con frecuencia y que tiene efectos negativos en la concentración, la movilidad y la morfología espermática. No obstante, otros estudios demuestran que no existe una correlación significativa entre una infección seminal de VPH y parámetros seminales anormales. Por lo tanto, el efecto de la infección por VPH en la calidad espermática y la infertilidad masculina sigue siendo un punto de discusión (Kato *et.al.*, 2021; Bossi *et.al.*, 2019; Depuydt *et.al.*, 2021; Moghimi *et.al.*, 2019).

En cuanto a la prevalencia de la infección de VPH en el semen, se ha reportado que suele ser de 2 a 31 % en la población masculina en general y de 10 a 35 % en hombres que poseen infertilidad de origen desconocido (Moghimi *et.al.*, 2019). Por eso se estima que, en pacientes que visitan clínicas de fertilidad, varía entre un rango entre 7.8 a 28.6 % y que esta prevalencia depende del país de estudio (Golob *et.al.*, 2014; Bossi *et.al.*, 2019).

## 4.4. Otras consecuencias de la presencia de VPH en el semen

Añadido a la consecuencia sobre los parámetros seminales, la presencia de VPH en el semen puede inducir la fragmentación del ADN espermático, interrumpir la habilidad de los espermatozoides para unir y penetrar el óvulo, perjudicar el desarrollo embrionario y la implantación de blastocisto e incrementar la tasa de aborto espontáneo (Bossi *et.al.*, 2019).

### 4.4.1. Fragmentación del ADN espermático

La composición genética de un recién nacido es el resultado de la información de ADN del óvulo y el espermatozoide, la cual debe estar intacta para propiciar un mayor desarrollo embrionario y fetal. Por eso, cualquier tipo de daño presente en el ADN del gameto masculino o femenino puede interrumpir el proceso reproductivo (García-Ferreira, 2015).

La fragmentación del ADN espermático se considera una de las causas más frecuentes de transmisión de anomalías genéticas del ADN paterno a la progenie y tiende a encontrarse en un alto porcentaje de espermatozoides provenientes de hombres subfértiles e infértiles (García-Ferreira, 2015). Esta puede deberse a factores extrínsecos como fumar, la exposición al calor, los contaminantes ambientales o agentes quimioterapéuticos, y a factores intrínsecos, entre ellos la maduración defectiva de células germinales, la apoptosis abortiva y el estrés oxidativo; siendo el último uno de los factores más influyentes en la infertilidad masculina (Agarwal *et.al.*, 2020).

La espermatogénesis es un proceso continuo y controlado que involucra cambios celulares, genéticos y de cromatina extremadamente marcados que dan lugar a la generación de células espermáticas altamente especializadas. En un inicio, las células madre espermatogoniales se replican y diferencian en espermatocitos primarios que se someten a una recombinación genética para dar lugar a espermátidas redondas haploides, que posteriormente pasan por un proceso de diferenciación llamado espermiogénesis en el que se produce una remodelación celular, epigenética y de la cromatina para formar espermatozoides. Dentro de los cambios de la cromatina, los nucleosomas se disocian y las histonas son removidas y reemplazadas por protaminas, proteínas que permiten una compactación del ADN seis veces mayor que las histonas. Dicho proceso es llevado a cabo por una nucleasa topoisomerasa II endógena que crea rupturas en el ADN para reducir la tensión de torsión por la disociación de las histonas y el empaquetamiento de la cromatina. Si estas rupturas no son reparadas por los mecanismos propios de la célula, ocurre un deterioro en el proceso de empaquetamiento de la cromatina que puede resultar en una maduración defectiva y la aparición de espermatozoides con una fragmentación de ADN aumentada (García-Ferreira, 2015; Agarwal *et.al.*, 2020).

Además, durante la espermatogénesis, la apoptosis abortiva garantiza que ninguna célula germinal defectiva se diferencie a espermatozoide, pero un fallo en este proceso resulta en la acumulación de células espermáticas que expresan marcadores apoptóticos en el semen eyaculado. En cuanto al estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno (*ROS*, por sus siglas en inglés) son vitales para varios procesos fisiológicos como la apoptosis y capacitación espermática, pero una sobreproducción puede llevar a varias consecuencias perjudiciales entre ellas la fragmentación del ADN (Agarwal *et.al.*, 2020).

Dentro de los tipos de daño en el ADN se incluye el mal apareamiento, la pérdida y las modificaciones de base, los dímeros de pirimidinas, las rupturas de hebra simple (*SSB*, por sus siglas en inglés) y las rupturas de doble hebra (*DSB*, por sus siglas en inglés). Las *DSB* tienden a ser menos reparadas que las *SSB* y por eso poseen un mayor impacto en la calidad y desarrollo embrionario; siendo este tipo de ruptura relacionado específicamente con las bajas tasas de implantación y abortos recurrentes (Agarwal *et.al.*, 2020).

Así pues, la relación entre el daño de ADN y la disminución de resultados reproductivos ha llevado a la introducción de pruebas de integridad del ADN espermático en la evaluación clínica de la

infertilidad masculina. Aunque la fragmentación de ADN ha sido trabajada por muchos científicos, se ha considerado como un tema muy controversial y la implementación de técnicas en el área clínica ha sido muy lenta (Depuydt *et.al.*, 2021). Actualmente existen pruebas directas para evaluar la fragmentación del ADN espermático como la técnica de TUNEL y el ensayo COMET con pH neutro; y pruebas indirectas siendo estas el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (*SCSA*, por sus siglas en inglés), el ensayo COMET con pH alcalino y el ensayo de dispersión de la cromatina espermática (*SCD*, por sus siglas en inglés). A diferencia de los métodos directos, los indirectos requieren de un paso previo de desnaturalización, a pH ácido o alcalino, para detectar la lesión del ADN. De esta forma, los métodos directos determinan el “daño real”, mientras que los indirectos el “daño potencial” del ADN. Aunque estas técnicas muestran correlación entre sí, se han establecido puntos de corte para distinguir a los hombres fértiles de los infértiles, pues determinan distintos aspectos del daño en el ADN espermático (Portella-Ruiz y Gonzales, 2016).

El *SCD*, también conocido como la prueba del halo, se basa en dos fundamentos: el primero recae en que las hebras de ADN que contienen rupturas o muescas son más fáciles de desnaturalizar, dado que los extremos de las rupturas se comportan como los orígenes de la desnaturalización; y el segundo indica que la remoción parcial de las proteínas de la cromatina resulta en un patrón peculiar de bucles de ADN que se extienden alrededor de un nucleóide de ADN que permanece unido a los residuos de proteínas, siendo estos los halos característicos del ensayo (Zini y Agarwal, 2011).

Así pues, la prueba se ha adaptado al núcleo de los espermatozoides humanos y la metodología incluye tres pasos principales: la inmersión de las células espermáticas en un gel inerte de agarosa y su colocación en un portaobjetos, la incubación de la muestra con un tratamiento ácido o alcalino para la desnaturalización del ADN, y la aplicación de una solución de lisis para la eliminación controlada de proteínas nucleares y un paso final de tinción. Por lo tanto, si el ADN espermático se encuentra intacto, un halo de bucles de ADN se formará alrededor de su núcleo central denso. En cambio, si el núcleo del espermatozoide contiene ADN fragmentado, los halos estarán ausentes o serán muy pequeños. De esta forma, se utilizan cinco categorías para definir los halos: 1) halo grande, cuando el tamaño del halo es semejante o mayor al núcleo, 2) halo mediano, cuando el tamaño del halo se encuentra entre el grande y el pequeño, 3) halo pequeño, cuando su tamaño es igual o menor a un tercio del diámetro menor del núcleo, 4) células sin halo y 5) degradadas, cuando las células no fueron teñidas; tal como se observa en la figura 1 (Zini y Agarwal, 2011; Remohí *et.al.*, 2013).

Finalmente, el *SCD* ha sido ampliamente utilizado debido a que es un procedimiento simple y resulta en una prueba fiable y de bajo costo que determina la susceptibilidad del ADN del espermatozoide a la desnaturalización (Remohí *et.al.*, 2013).

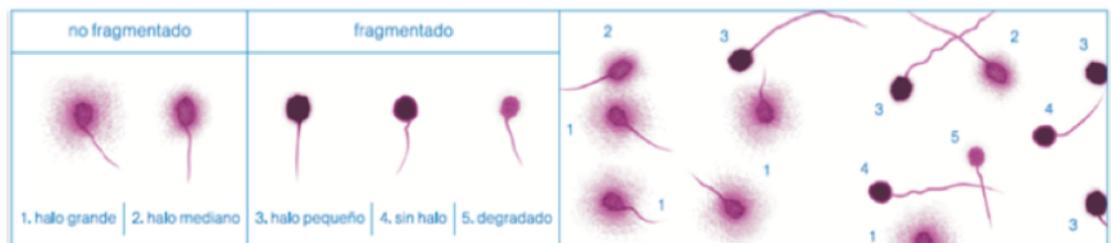


Figura 4.3: Patrones de dispersión de la cromatina en espermatozoides mediante *SCD*.

(Halotech® DNA, 2015).

#### 4.4.2. VPH y fragmentación de ADN

Las infecciones genitourinarias incrementan la producción de *ROS* y, por ende, tienden a aumentar el índice de fragmentación de ADN espermático (Agarwal *et.al.*, 2020). La inflamación es una de las respuestas de los tejidos hacia la infección de VPH para promover la eliminación viral y, el estado oxidativo resultante, causa la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos que, a su vez, desencadenan varios procesos como la apoptosis, necrosis y el desarrollo de cáncer. El VPH, en especial los de alto riesgo, y el estrés oxidativo se encuentran estrictamente relacionados por dos razones. La primera recae en que las proteínas virales de replicación E1, E2 y E4-E7 están involucradas en la modulación del estado oxidativo de las células, especialmente con el incremento de la concentración de *ROS*, y la segunda en que las proteínas virales tardías L1 y L2 necesitan de un ambiente oxidativo para que ocurra el ensamblaje del capsómero y se pueda completar el ciclo de vida del virus (Pellavio *et.al.*, 2020).

El mecanismo sobre cómo la infección de VPH daña la integridad del ADN no ha sido del todo comprendido. Sin embargo, se ha demostrado que las proteínas del VPH modulan la concentración de *ROS* en las células hospederas, pasando de una condición de estrés a una de distrés. El estrés oxidativo se deriva de un desbalance entre los sistemas oxidantes y antioxidantes y, el flujo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la membrana plasmática al fluido extracelular, se ha considerado como un sistema *scavenger* o eliminador de *ROS*. Las acuaporinas (*AQPs*, por sus siglas en inglés), que son canales de agua involucrados en el transporte de agua y moléculas pequeñas, han sido reconocidos por permitir la difusión transmembranal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y, por esta razón, son llamadas peroxiporinas (Pellavio *et.al.*, 2020).

Los espermatozoides expresan dos tipos de peroxiporinas, siendo estas la AQP3 y la AQP8. La primera se encuentra localizada en la membrana de la cola espermática y en algunos gránulos en la cabeza y pieza media mientras que, la segunda, se encuentra localizada únicamente en la pieza media. Además, las células espermáticas expresan AQP7 en la membrana plasmática de la cabeza y AQP11 en la cola. Funcionalmente, todas estas *AQPs* están involucradas en la regulación del volumen espermático y en la eliminación de *ROS*. Por lo tanto, una infección de VPH daña la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> llevada a cabo por *AQPs* ya que su unión y la internalización del virus dentro de la cabeza influye, mediante una inhibición, en el funcionamiento de las *AQPs*; lo que genera una gran cantidad de espermatozoides sensitivos al estrés oxidativo y con altas probabilidades de sufrir daño en su material genético. Aunque lo mencionado anteriormente ha sido determinado como el mecanismo causante de fragmentación de ADN inducida por el VPH, cabe recalcar que la fragmentación de ADN espermática es multifactorial y que puede ser causada por otros factores ajenos al VPH (Pellavio *et.al.*, 2020; Depuydt *et.al.*, 2021).

En la actualidad, pocos estudios han evaluado la relación entre el VPH y la fragmentación de ADN. Unos demuestran que hay un incremento de fragmentación de ADN en espermatozoides infectados con VPH mientras otros no han encontrado ningún cambio en la fragmentación de ADN en las células espermáticas infectadas. Por consiguiente, el efecto de una infección de VPH en la fragmentación de ADN espermático sigue siendo controversial (Tangal *et.al.*, 2019; Boeri *et.al.*, 2019; Connelly *et.al.*, 2001; Lee *et.al.*, 2002; Kaspersen *et.al.*, 2013).

#### 4.5. Efectos del VPH en las técnicas de reproducción asistida

En los ciclos de las técnicas de reproducción asistida (*ART*, por sus siglas en inglés), las consecuencias de una infección de VPH en el hombre suelen ser más graves debido a la utilización de semen que contiene partículas de VPH (Caglar y Garrido, 2018). Se asume que, durante las *ART*, el VPH puede intervenir en varios mecanismos como la reacción acrosómica de los espermatozoides, la interacción y fusión de la célula espermática y el óvulo; generando tasas reducidas de fertilización y tasas incrementadas de abortos (Zacharis *et.al.*, 2018).

#### 4.5.1. Inseminación artificial

Diversos estudios han investigado el impacto de una infección de VPH durante una inseminación intrauterina (*IUI*, por sus siglas en inglés) en parejas infértiles. Según Depuydt *et.al* (2016), las mujeres positivas para VPH que se someten a una *IUI* poseen menos probabilidades de alcanzar un embarazo. Dicha conclusión fue obtenida de un estudio en el que de 590 mujeres que se sometieron a 1,529 ciclos de *IUI*, aquellas que sufrían de una infección por VPH tenían seis veces menos posibilidades de embarzarse en comparación con las mujeres no infectadas. En otro estudio, de 226 parejas infértiles que recibieron una *IUI*, se logró un embarazo en el 20 % de las parejas no infectadas mientras que, en las parejas infectadas con VPH, se logró en un 9.5% (Garolla *et.al.*, 2012). Además, se ha demostrado que mujeres inseminadas con espermatozoides que contienen ADN del VPH presentaron una disminución de cuatro veces respecto a los embarazos clínicos en comparación a las mujeres inseminadas con espermatozoides negativos para VPH (Depuydt *et.al.*, 2019; Chen *et.al.*, 2021).

Se ha evidenciado que, tras recibir una *IUI* con espermatozoides positivos para VPH, es altamente probable que el tracto genital femenino sea sitio de infección para el VPH. Así pues, la detección de VPH en el tejido placentario sugiere que el VPH puede ser transmitido verticalmente. En un estudio, dicha transmisión fue notada cuando un bebé nacía a través de un cuello uterino infectado. Sin embargo, la ausencia de una infección por VPH en todos los bebés a los 6 meses sugiere una inoculación temporal en lugar de una infección vertical. A pesar de la detección transitoria de ADN del VPH, se especula que el virus tiene un rol importante en la obtención de resultados adversos del embarazo, principalmente con rupturas prematuras de membrana y partos prematuros espontáneos (Pereira *et.al.*, 2015).

Así pues, la inseminación heteróloga o con semen de donante puede utilizarse por mujeres cuyas parejas poseen un semen inadecuado, para lograr un embarazo sin pareja masculina o cuando un rasgo genético o una enfermedad infecciosa hace que sea más seguro evitar una inseminación de su pareja masculina. El mayor riesgo de este tipo de inseminación es la contaminación con un agente infeccioso. Por esta razón, organizaciones profesionales y cuerpos gubernamentales regulatorios han presentado pautas estrictas que exigen que los donantes de esperma se sometan a pruebas para hepatitis B y C, CMV, virus linfotrópico humano, VIH, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Treponema pallidum*. Aunque es un patógeno que se encuentra con frecuencia y que tiene un impacto clínico potencialmente significativo, la prueba del VPH no forma parte de las pruebas de rutina para los donantes de esperma; por lo que las mujeres que reciben este tipo de inseminación se encuentran en alto riesgo de contraer una infección por VPH (Laprise *et.al.*, 2013).

#### 4.5.2. Fertilización *in vitro* (FIV)

Se ha demostrado que los espermatozoides infectados con VPH son capaces de transferir los genes E6, E7 y la proteína de la cápside L1 dentro del óvulo. Numerosos estudios han indicado que, en las parejas con hombres infectados de VPH, existe un potencial de fertilidad reducido ya que el impacto negativo de la infección se puede observar en varias etapas del desarrollo embrionario. En el desarrollo temprano de embriones infectados, los efectos negativos del VPH dependen de la expresión del genoma viral en los blastocistos y trofoblastos y pueden ser una inhibición del desarrollo embrionario en la etapa de 2 células, una reducción en la formación de blastocisto, una placentación anormal y una pérdida temprana del embarazo; siendo la apoptosis en células embrionarias a través de la fragmentación una de las causas más probables de la pérdida de embarazo. Además, entre otros efectos se encuentran la adhesión anormal de células trofoblásticas al endometrio, la reducción en el número y la disminución en la invasividad de las células trofoblásticas (Caglar y Garrido, 2018).

En un estudio, las parejas con las cuales se llevaría a cabo una inyección intracitoplasmática de espermatozoides (*ICSI*, por sus siglas en inglés) se dividieron en dos grupos dependiendo de la

presencia del VPH en el semen. Entre las parejas sanas, se alcanzó un embarazo clínico en el 40.8 % de ellos mientras que, en las parejas con semen positivo para VPH, sólo un 18.2 % lo alcanzó. Además, se demostró que la proporción de formación de blastocisto era significativamente menor en el grupo infectado con VPH en comparación con el grupo sano. Así pues, otros estudios han demostrado que en los ciclos de *ICSI*, las tasas acumulativas de embarazo son significativamente más bajas en parejas infectadas con VPH y que, en general, las parejas infectadas que se someten a las *ART* tienen una tasa de menor que las sanas. Sin embargo, otros estudios indican que no existe relación entre una infección por VPH y los efectos adversos en el embarazo y que las tasas de embarazo clínico y los abortos son independientes del VPH. Por lo tanto, se requiere de más evidencia para poder dar una conclusión sólida sobre el impacto de una infección de VPH en los resultados de reproducción asistida (Zacharis *et.al.*, 2018).

### 4.5.3. Criopreservación

La prevalencia de un semen positivo para VPH entre donantes y pacientes que congelan sus espermatozoides por condiciones médicas y otros factores es alta. Un estudio que comparaba la presencia de VPH en el semen criopreservado de pacientes oncológicos y sanos encontró un porcentaje significativamente mayor de células espermáticas positivas en el grupo de los pacientes oncológicos. Actualmente, se desconoce si el semen infectado es capaz de contaminar el resto de crioviales en un tanque de nitrógeno líquido y perjudicar los resultados de las *ART*, pero estudios como el mencionado anteriormente demuestran que el VPH puede retener su integridad genómica en condiciones de ultraenfriamiento. Por lo tanto, se ha recomendado realizar una prueba de detección de VPH en todas las muestras de semen antes de ser criopreservadas ya que los donantes de esperma generalmente se reclutan del grupo de edad con la mayor prevalencia de VPH. Y, dado que la contaminación es una posibilidad, se sugiere criopreservar las muestras positivas para VPH en un tanque distinto al de las muestras sanas (Fenzia *et.al.*, 2020; Laprise *et.al.*, 2013; Zacharis *et.al.*, 2018).

### 4.5.4. Lavado de semen para la remoción de VPH

Debido a que existe literatura suficiente que demuestra que los resultados de *ART* se ven comprometidos al usar semen positivo para VPH, la identificación de protocolos para el lavado y selección de semen capaces de remover los viriones de VPH de la superficie de los espermatozoides antes de uso en las *ART* es un tema de interés. Las técnicas de lavado de semen rutinarias no eliminan el VPH de las muestras, por lo que se desarrolló un lavado modificado con heparinasa III. La heparina es un polisacárido sulfatado que se asemeja a los GAGs en cuanto a estructura química y por eso puede unirse directamente a las cápsidas del virus y bloquear su asociación con la superficie de los espermatozoides; lo que resulta en un protocolo prometedor para la eliminación del virus en el semen. Desafortunadamente, la heparinasa III es un reactivo no autorizado para la reproducción asistida en humanos (Caglar y Garrido, 2018; De Toni *et.al.*, 2020).

Por otro lado, la hialuronidasa está aprobada para su uso en laboratorios FIV. Esta enzima fue estudiada por primera vez en ovocitos humanos para la remoción de células de granulosa en su alrededor previo a la realización de un *ICSI*. En el proceso natural de fertilización, la hialuronidasa reside en el acrosoma del espermatozoide y su liberación durante la reacción acrosómica es responsable de la digestión del ácido hialurónico intercalado entre las células de cúmulo del ovocito. Acorde al mecanismo enzimático de las hialuronidasas, se conoce que estas enzimas son capaces de romper los enlaces entre N-acetilglucosamina y glucoronato y por eso, en los lavados de semen, permite la ruptura de los enlaces entre el VPH y las moléculas del sindecano-1 en la superficie espermática. Hasta el momento, el lavado de semen con hialuronidasa ha demostrado ser muy efectivo para tratar muestras infectadas con VPH (De Toni *et.al.*, 2020).

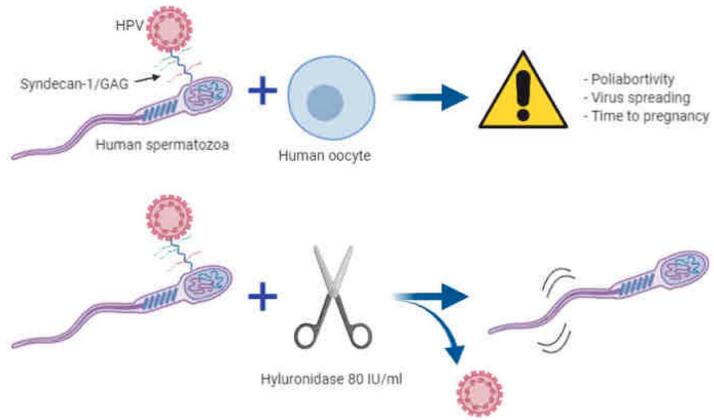


Figura 4.4: Lavado de semen con hialuronidasa para la remoción de VPH.

(De Toni *et.al.*, 2020).

## Marco metodológico

La metodología que se planea utilizar en este estudio se resume en cinco pasos: 1) la recepción de las muestras de semen, 2) la realización de la prueba *SCD* para la determinación de la fragmentación del ADN espermático, 3) la extracción de ADN viral del semen, 4) la detección molecular del VPH por PCR punto final y 5) el análisis de resultados.

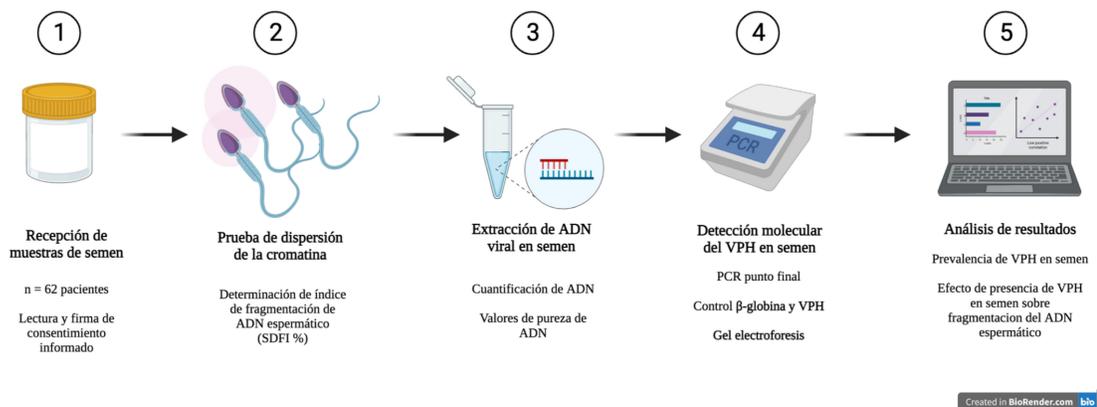


Figura 5.1: Diagrama de flujo de la metodología para llevar a cabo este estudio.

(Imagen de elaboración propia utilizando BioRender.com, versión 2022).

Para desarrollar el presente estudio se contó con la autorización de la clínica Centro Procrea® para realizar la extracción de ADN del VPH en el semen, la fragmentación del ADN espermático y la detección molecular por PCR punto final en las instalaciones del laboratorio de andrología, y de la Universidad del Valle de Guatemala para llevar a cabo parte de la detección molecular en el laboratorio Makerspace B-Hive.

## 5.1. Variables

A continuación se muestran las variables a controlar durante la experimentación. Para la determinación del índice de fragmentación del ADN espermático (*SDFI*, por sus siglas en inglés), se consideró que el tiempo de licuefacción del semen post-eyaculado fuera entre 15-30 minutos dado que este tiempo permite una evaluación correcta de la concentración espermática; lo cual es necesario para preparar la dilución inicial de la muestra en PBS para realizar la prueba *SCD*. Además, se controló que la temperatura de enfriamiento de la agarosa fundida fuera menor a 37°C ya que, al mezclar la agarosa con la dilución de la muestra de semen, una temperatura mayor afecta negativamente los espermatozoides; lo que podría alterar los resultados de la fragmentación de ADN espermático (Cuadro 5.1).

Para la extracción del ADN viral en el semen y la detección molecular de VPH por PCR punto final, se controló que la temperatura de congelación de almacenamiento de las muestras tanto de semen como de los productos de PCR fuera -20°C, la cual es una temperatura que permite mantener la integridad del ADN (Cuadro 5.2 y 5.3).

Cuadro 5.1: Variables para la determinación de la fragmentación de ADN espermático en semen de pacientes que visitan una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Tiempo de licuefacción	Tiempo de licuefacción de semen post-eyaculado	Cuantitativo	Minutos
Temperatura de enfriamiento	Temperatura de enfriamiento de agarosa fundida	Cuantitativo	°C

Cuadro 5.2: Variable para la extracción de ADN viral en el semen de pacientes que visitan una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Temperatura de congelación	Temperatura de congelación de semen para extracción de ADN	Cuantitativo	°C

Cuadro 5.3: Variable para la detección molecular de VPH por PCR punto final en semen de pacientes que visitan una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Temperatura de congelación	Temperatura de congelación de productos de PCR	Cuantitativo	°C

## 5.2. Hipótesis

H1:

- H1i: La prevalencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala se encuentra entre el 10 al 30 %.
- H1o: La prevalencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala no se encuentra entre el 10 al 30 %.

H2:

- H2i: La presencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen aumenta la fragmentación del ADN espermático.
- H2o: La presencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen no afecta la fragmentación del ADN espermático.

## 5.3. Bioética

### 5.3.1. Aprobación por Comité de Ética

El protocolo de investigación, el consentimiento informado (Anexo A) y los documentos adicionales (Anexo B y C) proporcionados a los pacientes reclutados del presente estudio fueron previamente revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la Universidad del Valle de Guatemala. Dicha autorización fue solicitada debido a que se trabajan con muestras de sujetos humanos, cuyo permiso de uso de la muestra de semen para el análisis era fundamental dado que los resultados proveen información sensible e identificable para la persona. El dictamen de aprobación se recibió el 04 de abril del 2022 (BM-001-2022-18054, Anexo D).

### 5.3.2. Reclutamiento y obtención de muestras

Los sujetos de estudio fueron pacientes masculinos mayores a 18 años que asistían a la clínica Centro Procrea® como pareja de mujeres que se sometían a *ART* o donantes de semen y se les realizaba un espermograma como prueba de rutina. El método de reclutamiento utilizado fue verbal en un área privada dentro de las instalaciones de Centro Procrea®. Este consistió en un proceso en el que al participante se le invitó a escuchar respecto al estudio, se revisó el cumplimiento de los criterios de inclusión y se proporcionó el documento del consentimiento informado; el cual la persona fue invitado a leer y a resolver cualquier duda antes de firmarlo.

Las muestras de semen fueron obtenidas por medio de masturbación en un cuarto privado dentro de la clínica Centro Procrea®, ubicada en la 6a Avenida 7-39 zona 10 Edificio Las Brisas Oficina 501, Ciudad de Guatemala, Guatemala.

### 5.3.3. Proceso de reclutamiento

#### Criterios de inclusión

En este estudio, se incluyeron a hombres que 1) forman parte de una pareja que visita la clínica por la incapacidad de lograr un embarazo tras un año de tener relaciones sexuales sin protección, 2) son donantes de semen, 3) se les realizará un espermograma como prueba de rutina, 4) proporcionaron la muestra de semen por masturbación, 5) son mayores de 18 años.

Se incluyeron a hombres que forman parte de una pareja que visita la clínica por la incapacidad de lograr un embarazo tras un año de tener relaciones sexuales sin protección o que son donantes de semen, sean solteros o no, ya que son los pacientes que proveen una muestra de semen como parte de los servicios solicitados a la clínica; la cual, con la debida aprobación, fue analizada posteriormente para el estudio. Además, los participantes de esta investigación fueron únicamente guatemaltecos ya que, con los resultados obtenidos, se pretende tener una pauta de la prevalencia del virus en el sexo masculino del país.

#### Criterios de exclusión

Se excluyeron a los pacientes 1) azoospermicos, 2) criptozoospermicos, 3) cuya muestra fue obtenida de una biopsia testicular, 4) con criptorquidia, 5) trauma testicular, 6) varicocele, 7) leucocitospermia, 8) orquitis, 9) con evidencia de infecciones genitales, 10) aquellos catalogados como fumadores pesados (>20 cigarros/día) y 11) que consumieron alcohol o drogas un día antes de la toma de muestra; debido a que estos factores pueden dificultar la detección del VPH en el semen y tener un impacto en la fragmentación de ADN espermático.

### 5.3.4. Tipo y tamaño de muestra

El tipo de muestra a analizar durante el estudio fue el semen de pacientes que asisten a la clínica Centro Procrea®<sup>®</sup>, el cual fue obtenido por masturbación en un cuarto privado dentro de las instalaciones del Centro Procrea®<sup>®</sup> y depositado en un frasco de orina estéril. Cabe recalcar que las muestras fueron recolectadas para realizar un espermograma como prueba de rutina, lo cual es parte de la consulta del paciente y los servicios solicitados por su persona.

Previo al análisis, a cada muestra se le asignó un código para su identificación y con el cual se trabajó durante la investigación (ejemplo: P-01). Junto con los consentimientos informados, los datos fueron almacenados en una gaveta bajo llave del escritorio de la oficina de la licenciada Bolaños durante el periodo de tiempo de realización de la investigación; siendo la licenciada María Cristina Bolaños (embriólogo de Centro Procrea®<sup>®</sup>) y el licenciado Fredy Mejía (director de laboratorio de Centro Procrea®<sup>®</sup>) las únicas personas con acceso al mismo. En cuanto al análisis, a todas las muestras se les realizó la prueba *SCD* para determinar la fragmentación del ADN espermático y luego se llevó a cabo la extracción del ADN viral y la detección molecular del VPH.

Asumiendo una prevalencia del VPH en el semen de pacientes que asisten a la clínica Centro Procrea®<sup>®</sup> del 20 %, el estudio requirió de un tamaño de muestra de 62 para estimar la proporción esperada con el 10 % de precisión y un intervalo de confianza del 95 %. Dicha prevalencia fue estimada según lo reportado en la literatura y en estudios similares realizados en clínicas de fertilidad de otros países (Moghimi *et.al.*, 2019; Golob *et.al.*, 2014; Nasser *et.al.*, 2015; Laprise *et.al.*, 2013; Bossi *et.al.*, 2019; Kato *et.al.*, 2021; Boeri *et.al.*, 2019) y fue calculada utilizando la calculadora de estudios de prevalencia *Sample size for a prevalence survey, with finite population correction* de Sampsiz Project®<sup>®</sup>.

### 5.3.5. Riesgos y beneficios

En cuanto a los riesgos, el presente estudio no involucra riesgos físicos para los sujetos de estudio. Sin embargo, un resultado positivo para VPH puede generar sentimientos de angustia, miedo, preocupación o culpabilidad. Por lo tanto, la comunicación de este tipo de resultados será brindada por personal capacitado de forma clara, tranquilizadora y con una explicación de los pasos a seguir para tratar la infección.

En cuanto a los beneficios, el conocimiento de los resultados positivos para VPH en el semen les permitirá a los sujetos de estudio, de forma personal, tomar medidas futuras para combatir la infección tales como la programación de una cita con un infectólogo, la realización de pruebas confirmatorias, el tamizaje para la detección de tipos de VPH e incluso la realización de pruebas para sus parejas sexuales; con el fin de prevenir efectos graves de la infección como el cáncer.

## 5.4. Materiales y métodos

### 5.4.1. Prueba *SCD* para la determinación del índice de fragmentación del ADN espermático (*SDFI*) en muestras de semen

Posteriormente a la realización del espermograma como prueba de rutina, se procedió a realizar la prueba *SCD* según el protocolo *Ensayo de la dispersión de la cromatina espermática y fragmentación del ADN espermático*, utilizando el *Sperm DNA Kit* de OBI BIOTEK®. Brevemente, se prepararon capas de agarosa fundida mezclada con la muestra de semen sobre un portaobjetos pretratado y se expusieron a una serie de soluciones siendo estas HCl, lisis, agua destilada, etanol 70 %, etanol 95 %, colorante Wright y buffer Wright, por diversos tiempos establecidos; lo cual daba como resultado la formación de halos. El conteo, a través del microscopio, de halos clasificados según el tamaño (Figura 5.2) permitió calcular el *SDFI* en la muestra.

Para la prueba *SCD*, fue necesario preparar soluciones de agarosa, alcohol, HCl y láminas pretratadas con agarosa. Tanto el protocolo de la prueba *SCD* como el de las soluciones y láminas se presentan en el SOP No. 1, Anexo E.

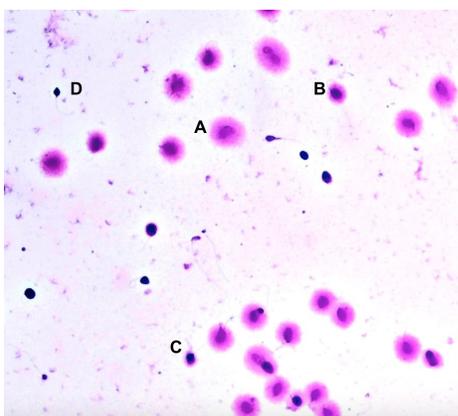


Figura 5.2: Patrones de dispersión de la cromatina en espermatozoides esperados tras la realización de la prueba *SCD*. (A) Espermatozoides con halo grande, (B) espermatozoides con halo mediano, (C) espermatozoides con halo pequeño y (D) espermatozoides sin halo.

(Imagen de elaboración propia, versión 2022).

### 5.4.2. Extracción de ADN viral en muestras de semen

Una vez realizada la prueba *SCD* para determinar la fragmentación del ADN espermático, se procedió a la extracción de ADN viral en la muestra de semen según el protocolo *DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)*, utilizando el *QIAGEN® QIAamp® Blood Mini Kit*. La única modificación realizada al protocolo fue centrifugar a 8,000 rpm por 5 min, en lugar de 14,000 rpm por 3 min, después de la adición del *QIAGEN® Buffer AW2*. La concentración y los valores de pureza del ADN extraído fueron obtenidos mediante la medición de los ácidos nucleicos eluidos en un espectrofotómetro *NanoDrop OneC Thermo Scientific®*. El protocolo se presenta en el SOP No. 2, Anexo F.

### 5.4.3. Detección molecular del VPH en las muestras de semen por PCR punto final

Por cada muestra de ADN extraído se realizó una reacción de PCR para detectar el VPH según el protocolo *Amplification of microsatellite loci or small amplicons (up to 0.5 kb) using multiplex PCR* del *QIAGEN® Multiplex PCR Kit*. Se utilizó el par de cebadores GP5+/GP6+ específicos para VPH y cada reacción generó un fragmento de material genético de interés, de 150 pares de bases (pb) de longitud, en caso de haber presencia de VPH en el semen. Como control interno, se realizó la amplificación de la  $\beta$ -globina, utilizando el par de cebadores PC03/PC04 para un fragmento de 110 pb. La secuencia de los cebadores utilizados se muestra en el Cuadro 5.4, el programa de termociclado en el Cuadro 5.5 y el protocolo se presenta en el SOP No. 3, Anexo G.

Cuadro 5.4: Secuencia de cebadores utilizados para la detección de VPH en semen.

Cebador	Secuencia 5'-3'
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC
PC03	ACACAACCTGTGTTCACTAGC
PC04	CAACTTCATCCACGTTCCACC

Cuadro 5.5: Programa de termociclado utilizado para la detección de VPH en semen por PCR en *EdvoCycler® Jr. PCR*.

Etapa	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	15 minutos
<b>Ciclado de 3 pasos:</b>		
Desnaturalización	94°C	1 minuto
Alineamiento	46°C	2 minutos
Elongación	72°C	1.5 minutos
Número de ciclos	40	
<b>Extensión final</b>	72°C	4 minutos
<b>Hold</b>	14°C	-

#### 5.4.4. Revelación de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2 %, en condiciones frías, a 150 voltios por 40 minutos en la cámara de electroforesis Edvotek® 5061. Los fragmentos de ADN amplificados fueron visualizados con bromuro de etidio y revelados con un transiluminador UV-Vis a 254 nm. En cada gel de 8 carriles, el primer carril corresponde a la escalera DirectLoad PCR 100 pb Low Ladder Sigma Aldrich® utilizada para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados, el segundo carril a la  $\beta$ -globina usada como control interno, el tercer carril al control positivo de VPH y los siguientes cinco carriles a los productos de PCR de las muestras de semen. El protocolo se presenta en el SOP No. 3, Anexo G.

#### 5.4.5. Análisis de datos

En cuanto a la extracción de ADN viral en el semen, se realizó estadística descriptiva para los valores de la concentración y pureza del ADN extraído. La prevalencia se determinó con el 10 % de precisión y un intervalo de confianza del 95 %, a partir de la ecuación 5.1. Para determinar si la presencia del VPH afectaba significativamente la fragmentación del ADN espermático, se realizaron análisis estadísticos de comparación de medias.

$$P(\%) = \frac{C}{N} \times 100 \quad (5.1)$$

■ Donde:

- P es la prevalencia del VPH en el semen de pacientes que visitan una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.
- C es el número de individuos con presencia de VPH en el semen.
- N es el número total de individuos analizados.

## 6.1. Extracción de ADN viral en semen

La implementación del protocolo de extracción de ADN viral en semen fue realizada utilizando el kit comercial *QIAGEN® QIAamp® Blood Mini*. Su eficacia fue comprobada a través de la cuantificación y la determinación de la pureza del ADN extraído de cada muestra por medio de espectrofotometría, utilizando el NanoDrop OneC Thermo Scientific®. Las lecturas en triplicado y el promedio de la concentración y las razones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 de las muestras se presentan en los cuadros H.1 y H.2 en Anexos.

En el Cuadro 6.1 se presenta la media, la desviación estándar, el valor mínimo y máximo del ADN extraído de las 62 muestras de semen de los pacientes de una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.

Cuadro 6.1: Estadística descriptiva de la concentración y las razones de pureza para ADN extraído de muestras de semen de pacientes de una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.

	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A260/A280	A260/A230
Media	6.94	2.12	0.49
Desviación estándar	5.56	0.57	0.25
Valor mínimo	0.97	1.39	0.18
Valor máximo	33.60	4.39	1.31

Según la estadística descriptiva de la concentración del ADN extraído, se puede observar que, en promedio, se lograron obtener concentraciones cercanas a 10 ng/ $\mu$ L. Sin embargo, según los valores mínimos y máximos, ciertas muestras presentaron valores por debajo de 1 ng/ $\mu$ L y otras por arriba de 10 ng/ $\mu$ L; razón por la cual se obtuvo una desviación estándar alta. Una posible explicación para esta variación en los datos recae en la concentración espermática de la muestra. Para evaluar si este parámetro tenía un efecto en la concentración del ADN extraído, se elaboró la Figura 6.1, en la cual se observa que aquellas muestras con concentraciones espermáticas arriba de 120 millones/mL tienden a tener una concentración de ADN extraído mayor a 10 ng/ $\mu$ L; lo que indica que la extracción de ADN se da mayoritariamente de las células espermáticas del eyaculado. Por eso, la diferencia del

valor de este parámetro en las muestras seminales (Cuadro H.3 en Anexos) da origen a la variación en los datos de la concentración del ADN extraído.

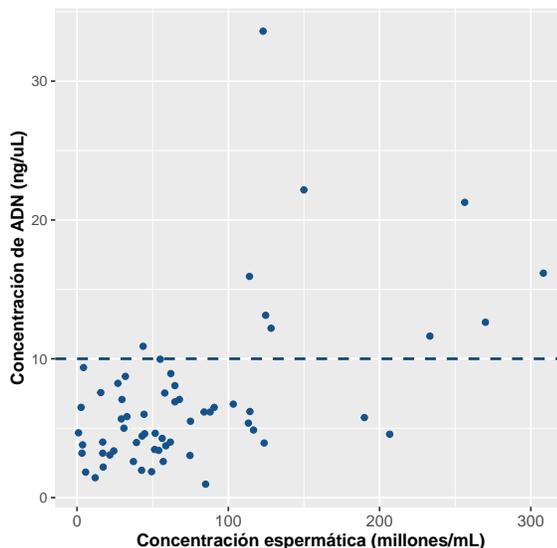


Figura 6.1: Concentración de ADN extraído de semen en función de la concentración espermática en el eyaculado.

En cuanto a las razones A260/280 y A260/A230, en promedio, estas se encuentran fuera de los rangos óptimos de pureza (Thermo Fisher Scientific®, 2017); las cuales se ven afectadas por la naturaleza del semen.

## 6.2. Optimización del PCR punto final para la detección de VPH en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala

Previo a realizar la detección molecular del VPH en las muestras de semen, se optimizó tanto el programa de termociclado como las condiciones de la electroforesis en gel de agarosa para la revelación de los productos de PCR.

En primer lugar, tal como se muestra en la parte A de la Figura 6.2, en la reacción de PCR se utilizaron los 2 pares de cebadores, uno correspondiente a la  $\beta$ -globina (PC03/PC04), el control interno, y el otro específico para VPH (GP5+/GP6+). El programa de PCR se caracterizó por una temperatura de alineamiento de 57°C con 35 ciclos y las condiciones de la electroforesis eran un gel de agarosa al 0.8%, corriendo a 75 voltios por 60 minutos. Como resultado, en las muestras de semen (P01-P05) se amplificó únicamente un fragmento, de 110 pb, correspondiente al control interno, cuyo peso molecular fue difícil de determinar dado a la falta de separación de las bandas de la escalera. Por lo tanto, se procedió a cambiar la temperatura de alineamiento por la del par de cebadores GP5+/GP6+, 45°C, para lograr la amplificación de los dos fragmentos de interés, el de 110 y 150 pb pero, una vez más, se obtuvo únicamente el fragmento de 110 pb. En cuanto a la electroforesis, se aumentó el porcentaje de agarosa al 2.0% y el tiempo de corrida a 90 minutos; con lo cual se logró una mejor separación de la escalera. Además, se comprobó que tanto un volumen de 2 uL como de 3 uL de escalera eran suficientes para lograr una buena visualización de las bandas de referencia (parte B, Figura 6.2).

Con el fin de evaluar si la amplificación del control interno suprimía la del VPH, se procedió a utilizar únicamente el par de cebadores GP5+/GP6, una temperatura de alineamiento más baja, 40°C, y un mayor número de ciclos, 45, utilizando controles positivos de VPH. En la parte C de la Figura 6.2 se puede observar la amplificación de un fragmento de 110 pb en el 2do y 4to carril, los cuales corresponden a la reacción de PCR con los 2 pares de cebadores. En cambio, en el 3er y 5to carril que concierne a la reacción de PCR únicamente con el par de cebadores GP5+/GP6+, se amplificó el fragmento de interés de 150 pb. En cuanto al 6to carril, este corresponde a una reacción de PCR con los 2 pares de cebadores y una temperatura de alineamiento de 51°C, la cual es una temperatura media entre la de alineamiento de los 2 pares de cebadores. Sin embargo, sólo se obtuvo la amplificación del fragmento de 110 pb. Por lo tanto, se decidió retirar el par de cebadores del control interno de la reacción de PCR y trabajar únicamente con el par de cebadores GP5+/GP6+ dado que la alta eficiencia de amplificación de la  $\beta$ -globina suprimía la del VPH. En cuanto a las condiciones de electroforesis, se utilizaron condiciones frías y una corrida a 150 voltios por 40 minutos; lo que resultó en una separación ideal de las bandas de la escalera.

Finalmente, para reducir las bandas inespecíficas durante la amplificación del fragmento de VPH de interés, se comprobaron tres temperaturas de alineamiento cercanas a la temperatura de alineamiento del par de cebadores GP5+/GP6+ junto con un menor número de ciclos, siendo este 40, y utilizando controles positivos de VPH. El 2do carril mostrado en la parte D de la Figura 6.2, que corresponde a una temperatura de 42°C, y el 3er carril, que representa la temperatura de 44°C, presentaron bandas inespecíficas mientras que en el 4to carril, que concierne a una temperatura de 46°C, se obtuvo únicamente el fragmento de interés de 150 pb. Es por eso que la temperatura de alineamiento utilizada en el programa del termociclado para la detección del VPH en muestras de semen es de 46°C, con un total de 40 ciclos, y las condiciones de electroforesis fueron frías, con un gel de agarosa al 2% y una corrida a 150 voltios por 40 minutos; aunque dicha temperatura de alineamiento no permitió eliminar por completo las bandas inespecíficas al analizar las muestras de semen.

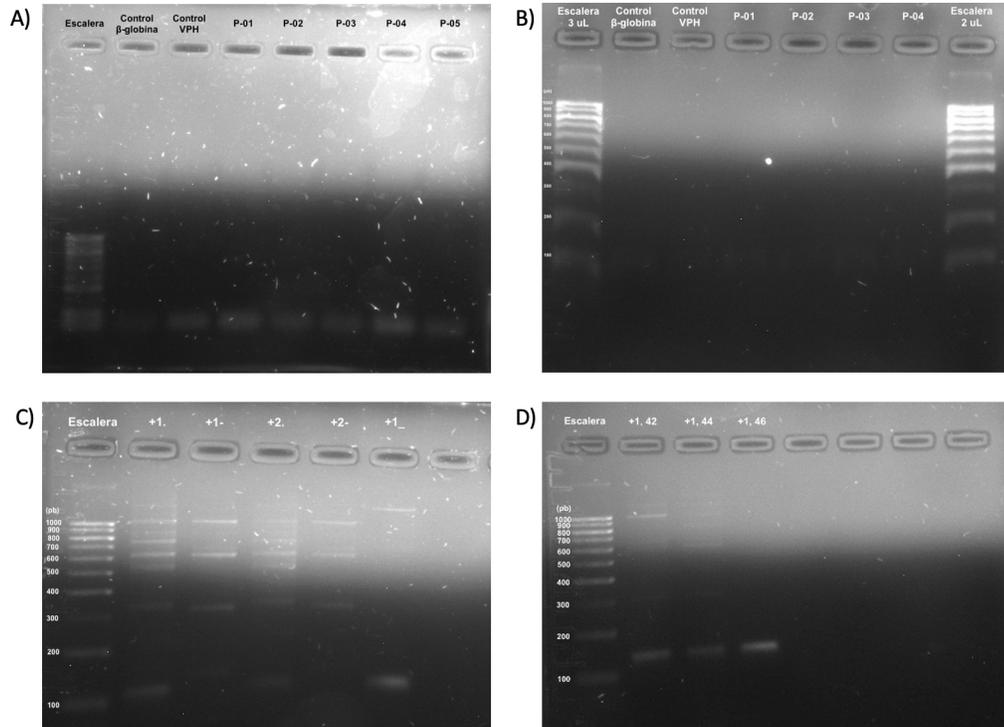


Figura 6.2: Optimización del PCR punto final para la detección de VPH en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala. A) Optimización 1: muestras de semen (P01-P05), 2 pares de cebadores, T° alineamiento 57°C, 35 ciclos, gel de agarosa al 0.8 %, 75V, 60 min; B) Optimización 2: muestras de semen (P01-P04), 2 pares de cebadores, T° alineamiento 45°C, 35 ciclos, gel de agarosa al 2.0 %, 75V, 90 min; C) Optimización 3: controles positivos de VPH (+1, +2), 2 pares de cebadores (+1., +2.), 1 par de cebador VPH (+1-, +2-), T° alineamiento 40°C (+1., +1-, +2., +2-), T° alineamiento 51°C (+1\_ ), 45 ciclos, gel de agarosa al 2.0 %, 150V, 40 min, condiciones frías; D) Optimización 4: controles positivos de VPH (+1), T° alineamiento 42°C (+1, 42), T° alineamiento 44°C (+1, 44), T° alineamiento 46°C (+1, 46), 40 ciclos, gel de agarosa al 2.0 %, 150V, 40 min, condiciones frías.

### 6.3. Prevalencia del VPH en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala

A través de la detección molecular por PCR punto final, una vez optimizado el programa de termociclado, se determinó que 44 pacientes obtuvieron un resultado positivo para la presencia de VPH en el semen mientras que 18 pacientes presentaron un resultado negativo (Figura 6.3; Cuadro I.1, Figura I.1, Figura I.2, Figura I.3 en Anexos). Por lo tanto, la prevalencia del VPH en el semen de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala es del 71.0%. Dicho valor supera la prevalencia hipotetizada, entre el 10-30 %, la cual fue estimada según lo reportado en la literatura y en estudios similares realizados en clínicas de fertilidad de otros países (Moghimi *et.al.*, 2019; Golob *et.al.*, 2014; Nasserri *et.al.*, 2015; Laprise *et.al.*, 2013; Bossi *et.al.*, 2019; Kato *et.al.*, 2021; Boeri *et.al.*, 2019).

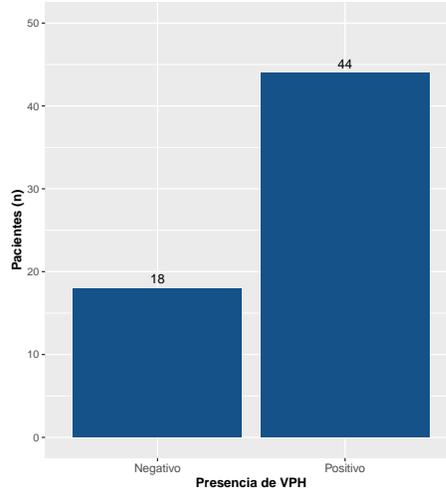


Figura 6.3: Presencia del VPH en el semen de pacientes de una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala.

#### 6.4. Efecto de la presencia del VPH en el semen sobre la fragmentación del ADN espermático

Para evaluar el efecto de la presencia del VPH en las muestras de semen, se elaboró un histograma (Figura 6.4) comparando los datos del *SDFI* del grupo positivo para VPH (color azul) y el grupo negativo para VPH (color gris). Tal como se puede observar en la figura, no existe diferencia significativa entre las medias del *SDFI* de ambos grupos y, en cuanto a la distribución de los datos entre los grupos, esta es bastante similar. Por lo tanto, para este estudio, se puede afirmar que la presencia del VPH en el semen no produce algún efecto en la fragmentación de ADN espermático.

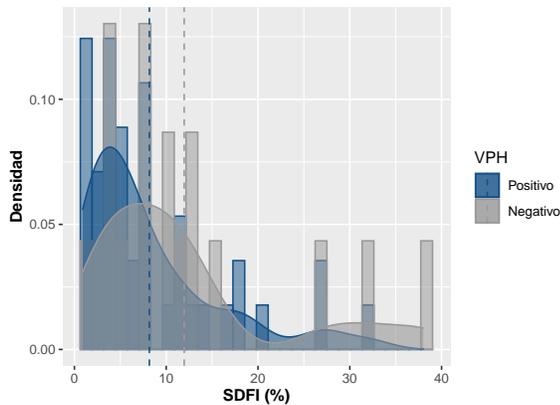


Figura 6.4: Histograma del *SDFI* según la presencia del VPH en las muestras de semen. El grupo positivo para VPH se representa con el color azul y el grupo negativo con color gris. Las medias de cada grupo se representan con líneas verticales punteadas.

---

## Análisis de resultados

---

Previo a la detección molecular del VPH en el semen de pacientes de una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala, se realizó la extracción de ADN de las muestras. El kit utilizado para realizar dicho proceso fue el *QIAGEN® QIAamp® Blood Mini Kit*, el cual fue seleccionado por su versatilidad y disponibilidad de recursos. Es decir, el kit posee la ventaja que permite la purificación de ADN total incluyendo ADN viral, el cual es el de interés en este estudio, de una variedad de muestras como sangre, plasma, suero, médula ósea, tejidos, especímenes forenses y otros fluidos corporales (QIAGEN, 2016). Es dentro de estos últimos donde se agrupa al semen, lo que hace posible que las muestras de semen sean procesadas con este kit. En cuanto a la disponibilidad de recursos, este kit es utilizado actualmente en Centro Procrea® para la detección de microdelecciones del cromosoma Y en sangre como prueba complementaria para la detección de la infertilidad masculina. Con el fin de darle un segundo uso al kit para reducir costos, se decidió utilizarlo para la detección del VPH en el semen.

Con respecto a la concentración de ADN extraído, en promedio, se obtuvieron concentraciones cercanas a 10 ng/ $\mu$ L pero el conjunto de datos presentó una desviación estándar alta, tal como se muestra en el Cuadro 6.1. Las posibles fuentes de ADN en el semen son las células epiteliales del tracto urinario, las células espermáticas y las células redondas, incluyendo leucocitos (Fedder, 2006). En la Figura 6.1 se observa que las muestras con concentraciones espermáticas mayores a 120 millones/mL tienden a tener una concentración de ADN extraído mayor a 10 ng/ $\mu$ L. Por lo tanto, la diferencia en los valores de este parámetro seminal en las muestras da origen a la variación en los datos de la concentración de ADN extraído. Además se observa un patrón que, a medida que la concentración espermática aumenta, una mayor cantidad de ADN es extraído; lo que demuestra que la extracción de ADN se da mayoritariamente de las células espermáticas presentes en el eyaculado. Esto mejora la detección del virus ya que, según la literatura, el VPH en el semen puede estar localizado principalmente en el interior de las células espermáticas y en la superficie de los espermatozoides, y en su minoría, dentro de las células epiteliales exfoliadas del tracto genital (Kato *et.al.*, 2021); por lo que tener como blanco a las células espermáticas en el eyaculado para la extracción de ADN facilita la detección del VPH.

En general, durante la extracción de ADN de las muestras de semen, se experimentaron ciertas dificultades que han sido previamente reportadas en estudios similares. En primer lugar, las concentraciones de ADN extraído fueron bajas, aunque suficientes para llevar a cabo la reacción de PCR,

debido a las características físicas y químicas de la compactación del núcleo de los espermatozoides. En lugar de histonas, los espermatozoides se caracterizan por tener protaminas, las cuales compactan seis veces más a la cromatina que las histonas en las células somáticas; lo que dificulta la llegada y función de los agentes químicos usados para la extracción del ADN (Alarcón-Zúñiga *et.al.*, 2016; Griffin, 2012). En segundo lugar, el acrosoma de los espermatozoides contiene la enzima hialuronidasa encargada de degradar las células del cúmulo que rodean al óvulo para llegar a este y fertilizarlo. Durante la extracción de ADN se provoca la ruptura de las membranas, lo que conlleva a que la hialuronidasa sea liberada del acrosoma y pueda degradar el ADN, afectando su concentración final (Alarcón-Zúñiga *et.al.*, 2016).

En tercer lugar, aparte de las células mencionadas anteriormente, el eyaculado está compuesto de fluido o plasma seminal que es importante para la sobrevivencia de los espermatozoides por sus altos niveles de fructosa y diversas proteínas. Sin embargo, estos compuestos pueden disminuir la pureza y calidad del ADN extraído, lo cual fue observado en este estudio ya que las razones de pureza A260/A280 y A260/230 obtenidas en la mayoría de las muestras se encontraban fuera de los rangos óptimos (1.8-2.0 y  $>2.0$  respectivamente; Weyrich, 2012). En la literatura se ha reportado que incluso al utilizar otros kits de extracción, como el *Zymo's® Quick-gDNA MiniPrep Kit*, se obtienen razones de pureza bajas. Por lo tanto, se ha propuesto agregar un paso de lavado con etanol o utilizar tris(2-carboxietil)fosfina (*TCEP*, por sus siglas en inglés) como agente reductor durante la extracción para eliminar los remanentes de proteínas y compuestos que afectan la pureza del ADN extraído (Wu *et.al.*, 2015; Weyrich, 2012). A pesar de estas dificultades, se logró extraer la concentración necesaria para la detección molecular del VPH y por ende, implementar un protocolo de extracción de ADN viral en semen.

La optimización del PCR punto final para la detección del VPH en el semen culminó con la exclusión del par de cebadores PC03/PC04 de la reacción de PCR. Inicialmente, estos cebadores se agregaron en la reacción ya que, al ser la  $\beta$ -globina un gen constitutivo, cumplían con el rol de ser un control de amplificación indicando si el ADN extraído estaba disponible para la detección del VPH, en otras palabras, si la extracción de ADN del semen fue eficiente (Tafvizi, Fard y Assareh, 2015). No obstante, al utilizar este par de cebadores en simultáneo con el par de cebadores del VPH, GP5+/GP6+, el único fragmento amplificado fue el de la  $\beta$ -globina (parte A y B de la figura 6.2). Los controles internos, como la  $\beta$ -globina, tienen la ventaja de una amplificación simultánea de VPH y ADN genómico pero, también pueden disminuir la sensibilidad analítica del PCR del VPH. Esta disminución se debe a la amplificación altamente eficiente de la  $\beta$ -globina, que compite por la ADN polimerasa y los nucleótidos libres, y a que exhibe una mayor sensibilidad que el par de cebadores del VPH. Es por eso que la mayoría de los PCRs para VPH carecen de un control interno (Schmitt *et.al.*, 2008). En este estudio, los PCR de las muestras se llevaron a cabo únicamente con el par de cebadores GP5+/GP6+ pero, por la importancia del uso de un control interno, por cada grupo de 10 muestras se seleccionó una al azar y se corrió un PCR del control interno para confirmar la eficiencia de la extracción del ADN y detectar posibles fallos en el PCR.

Además, como parte de la optimización, se redujo la temperatura de alineamiento a 46°C para lograr la amplificación del fragmento del VPH de interés. Al comprobar dicha temperatura con los controles positivos de VPH (parte D de la Figura 6.2), los cuales provenían de verrugas en piel, no se obtuvieron bandas inespecíficas como ocurrió con las muestras de semen (figuras I.1, I.2 y I.3 en Anexos). Esto ocurrió debido a dos razones, la primera recae en que la temperatura de alineamiento de este par de cebadores es muy baja, lo cual fomenta la aparición de estas bandas inespecíficas (de Roda *et.al.*, 1995). En segundo lugar, el fluido seminal contiene una variedad de minerales, como zinc, cobre, magnesio, fósforo, potasio y calcio, que se originan de la próstata y cuyos remanentes tras la extracción de ADN pueden interferir el PCR, dando como resultado una amplificación inespecífica (Alarcón-Zúñiga *et.al.*, 2016). No obstante, el tener la presencia de estas bandas inespecíficas en alguna de las muestras no dificultó la observación del fragmento de interés del VPH, por lo que no fue necesario continuar con la optimización de la reacción.

Así pues, mediante la detección molecular, se determinó que la prevalencia del VPH en el semen

de pacientes que asisten a una clínica de fertilidad privada en la ciudad de Guatemala es del 71.0%; valor que supera la prevalencia hipotetizada entre el 10 al 30%. Dicha prevalencia fue estimada según lo reportado en la literatura en donde se indica que la prevalencia del VPH a nivel seminal en pacientes de clínicas de fertilidad generalmente varía entre el 7.8% y 28.6%, presentando un valor de 29.4% en países de Europa y, en algunos países de latinoamérica como Brasil, un 28% (Golob *et.al.*, 2014; Bossi *et.al.*, 2019; Laprise *et.al.*, 2013). La prevalencia reportada en el presente estudio es alarmante y de gran importancia para la salud pública del país ya que, aunque sólo se da una pauta de la prevalencia del virus en el sexo masculino al seleccionar una parte de la población, el alto valor refleja que puede existir un nivel elevado de infección en toda la población guatemalteca masculina; principalmente al no haber un sesgo en edad o estrato económico entre los participantes del estudio. Por lo tanto, mediante este dato, se comprueba la necesidad de eliminar el concepto errado de que la infección y la vacunación del VPH son exclusivamente del sexo femenino.

De las 62 muestras analizadas, 8 correspondían a donantes de semen y de estas, el 75% (6 muestras) presentó un resultado positivo para VPH. En las clínicas de fertilidad, uno de los usos que se le dan a estas muestras es la inseminación heteróloga o con semen de donante para aquellos casos en donde no se puede o se evita una inseminación de la pareja masculina ya sea por un semen de mala calidad, un rasgo genético, una enfermedad infecciosa o porque la mujer quiere lograr un embarazo sin pareja masculina (Laprise *et.al.*, 2013). Sin embargo se ha evidenciado que, tras recibir una inseminación con espermatozoides positivos para VPH, es altamente probable que el tracto genital femenino sea sitio de infección para el VPH, lo que convierte a la contaminación con un agente infeccioso en el mayor riesgo de este tipo de inseminación (Pereira *et.al.*, 2015). Por ende, la alta prevalencia del VPH entre los donantes incluidos en este estudio demuestra la importancia de aplicar técnicas de lavado de semen, por ejemplo con hialuronidasa, durante el procesamiento de este tipo de muestras para garantizar la remoción del VPH, así como de incluir al VPH dentro del panel de pruebas infecciosas realizado durante el proceso de selección de donantes, con el fin de minimizar el riesgo de infección en la mujer.

En cuanto a la relación de la presencia del VPH en el semen con la fragmentación del ADN espermático, para este estudio, se puede afirmar que el virus no produce efecto sobre este parámetro seminal. Dicho resultado concuerda con el estudio de Kaspersen *et.al.* (2013), quienes no encontraron un cambio en la fragmentación del ADN espermático en las células espermáticas infectadas con VPH. Sin embargo, otros estudios han demostrado que hay un incremento en la fragmentación del ADN espermático en espermatozoides infectados con VPH (Tangal *et.al.*, 2019; Boeri *et.al.*, 2019; Connelly *et.al.*, 2001; Lee *et.al.*, 2002). Por lo tanto, para hallar una concordancia sobre esta relación, es necesario realizar estudios con poblaciones más grandes y diversas. Además de este, se evaluó el efecto sobre otros parámetros seminales tales como la concentración espermática, la movilidad progresiva y la morfología (Figura I.4 en Anexos); con los cuales, de igual forma, no se encontró una correlación entre la presencia del VPH y los parámetros seminales importantes. Dado que la fragmentación del ADN espermático y los parámetros evaluados en el espermograma no proporcionan indicios de la presencia del VPH en el semen, las pruebas moleculares representan la única alternativa viable para la detección de este virus en muestras seminales.

Una limitación del estudio recae en que únicamente se realizó la detección molecular del VPH y no la tipificación debido a que los costos que requiere la tipificación de cepas superaban el presupuesto otorgado para el estudio. Dado que existen tipos de VPH de alto riesgo como el 16, 18 y 33 asociados al cáncer anogenital en hombres, sería útil realizar un estudio en el que se incluya la tipificación para determinar no sólo la prevalencia del VPH sino que también la prevalencia de los tipos de VPH de alto y bajo riesgo, con lo cual se podría evaluar el riesgo de desarrollo de cáncer en la población. Además, el ADN del VPH se origina únicamente a partir de viriones infecciosos, por lo que su producción y liberación suele estar limitada en el tiempo (Depuydt *et.al.*, 2021); lo que hace que la detección molecular del VPH también se encuentre limitada por el tiempo y pueda variar si las pruebas se hacen en distintos periodos de tiempo. Por último, se podrían evaluar los resultados después de un tratamiento de fertilización *in vitro* en el que se utilizó una muestra seminal positiva de VPH para determinar si la presencia de VPH afecta negativamente los resultados de las *ART*.

---

### Conclusiones

---

1. Se implementó un protocolo de extracción de ADN viral en semen que permite extraer la concentración necesaria para la detección molecular del VPH.
2. Se optimizó el PCR punto final para la detección del VPH en el semen con el par de cebadores GP5+/GP6+ específicos para VPH.
3. Se determinó que la prevalencia del VPH en el semen de pacientes de una clínica de fertilidad en la ciudad de Guatemala es del 71.0 %; lo que comprueba la necesidad de eliminar el concepto errado de que la infección y la vacunación del VPH son exclusivamente del sexo femenino.
4. La alta prevalencia del VPH entre los donantes de semen incluidos en este estudio demuestra la importancia de aplicar técnicas de lavado de semen durante el procesamiento de las muestras y la necesidad de incluir al VPH dentro del panel de pruebas infecciosas que forma parte del proceso de selección de donantes de semen en clínicas de fertilidad.
5. Para este estudio fue posible afirmar que el VPH no produce un efecto sobre la fragmentación del ADN espermático ni sobre otros parámetros seminales importantes como la concentración espermática, la movilidad progresiva y la morfología.

---

### Recomendaciones

---

1. Durante la extracción del ADN del semen, se recomienda agregar un paso de lavado con etanol o utilizar *TCEP* como agente reductor para eliminar los remanentes de proteínas y compuestos y mejorar la calidad del ADN extraído.
2. Se recomienda realizar la tipificación de los tipos de VPH para determinar la prevalencia de los tipos de VPH de alto riesgo y bajo riesgo, con lo cual se podría evaluar el riesgo de desarrollo de cáncer en la población masculina guatemalteca.
3. Para determinar si la presencia del VPH en el semen afecta negativamente los resultados de las *ART*, se recomienda evaluar los resultados después de un tratamiento de fertilización *in vitro* en el que se utilizó una muestra seminal positiva para VPH.

- Abou-Setta, A. (2004). Transmission risk of hepatitis C virus via semen during assisted reproduction: how real is it? *Human Reproduction*, 19(12): 2711-2717.
- Acharya, K., Dhand, N., Whittington, R. y Plain, K. (2017). PCR Inhibition of a Quantitative PCR for Detection of Mycobacterium avium Subspecies Paratuberculosis DNA in Feces: Diagnostic Implications and Potential Solutions. *Frontiers in Microbiology*, 8(115): 1-13.
- Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Selvam, M., Cho, C., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosie, C., Parekh, N., Alves, M., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., Robert, K., Iovine, C., Durairajanayagam, D., Jindal, S. y Shah, R. (2020). Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *The World Journal of Mens's Health*, 38(4): 412-471.
- Alarcón-Zúñiga, B., Zepeda-Batista, J., Ruíz-Flores, A., Gómez-Meza, J., García-Muñiz, J., Núñez-Domínguez, R., Ramírez-Valverde, R. y Villegas-Velásquez, I. (2016). Modificación del método de tiocianato de guanidina para extraer ADN de semen para análisis genómico en mamíferos. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 7(4): 405-413.
- Behboudi, E., Mokhtari-Azad, T., Yavarian, J., Ghavami, N., Khorrami, S., Rezaei, F., Charostad, J., Malekshahi, S. y Shafiei-Jandaghi, N. (2018). Molecular detection of HHV1-5, AAV and HPV in semen specimens and their impact on male fertility. *Human Fertility*: 1-6.
- Braaten, K. y Laufer, M. (2008). Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Reviews in Obstetrics Gynecology*, 1(1): 2-10.
- Boeri, L., Capogrosso, P., Ventimiglia, E., Pederzoli, F., Cazzaniga, W., Chierigo, F., Pozzi, E., Clementi, M., Viganò, P., Montanari, E., Montorsi, F. y Salonia, A. (2019). High-risk human papillomavirus in semen is associated with poor sperm progressive motility and a high sperm DNA fragmentation index in infertile men. *Human Reproduction*, 34(2): 209-217.
- Bogale, A., Belay, N., Medhin, G. y Ali, J. (2020). Molecular epidemiology of human papillomavirus among HIV infected women in developing countries: system review and meta-analysis. *Virology Journal*, 17(179): 1-15.

- Bossi, R., Valadares, J., Del Puerto, H., Rocha, M., Braga, L., Sampaio, M., Franca, P., Alvarenga, D. y Geber, S. (2019). Prevalence of human papillomavirus (HPV) in the semen of patients submitted to assisted reproductive technology treatment in a private clinic in Brazil. *JBRA Assisted Reproduction*, 23(3): 205-209.
- Burd, E. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1): 1-17.
- Caglar, G. y Garrido, N. (2018). The implications of male human papilloma virus infection in couples seeking assisted reproduction technologies. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*, 19: 48-52.
- Chen, T., Belladelli, F., Giudice, F. y Eisenberg, M. (2021). Male fertility as a marker for health. *RBMO*, 00(0): 1-14.
- Connelly, D., Chan, P., Patton, W. y King, A. (2001). Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 184: 1068-1070.
- Depuydt, C., Donders, G., Verstraete, L., Beert, J., Salembier, G., Bosmans, E., Dhont, N., Kerkhofs, C. y Ombelet, W. (2021). Negative Impact of Elevated DNA Fragmentation and Human Papillomavirus (HPV) Presence in Sperm on the Outcome of Intra-Uterine Insemination (IUI). *Journal of Clinical Medicine*, 10(717): 1-13.
- Depuydt, C., Donders, G., Vestraete, L., Broeck, D., Beert, J., Salembier, G., Bosmans, E. y Ombelet, W. (2019). Infectious human papillomavirus virions in semen reduce clinical pregnancy rates in women undergoing intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*, 111: 1135-1144.
- Depuydt, C., Verstraete, L., Berth, M., Beert, J., Bogers, J., Salembier, G., Vereecken, A. y Bosmans, E. (2016). Human papillomavirus positivity in women undergoing intrauterine insemination has a negative effect on pregnancy rates. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 81(1): 41-46.
- De Roda, A., Walboomers, J., van de Brule, A., Meijer, C. y Snijders, P. (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 76: 1057-1062.
- De Toni, L., Cosci, I., Carosso, A., Barzon, L., Engl, B., Foresta, C. y Garolla, A. (2020). Hyaluronidase-based swim-up for semen selection in patients with HPV semen infection. *Biology of Reproduction*, 104(1): 1-31.
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. y Murakami, I. (2016). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, 25: 2-23.
- Elder, K., Baker, D. y Ribes, J. (2005). *Infections, Infertility and Assisted Reproduction*. Cambridge University Press.
- Evans, M., Adamson, C., Simmons-Arnold, L. y Cooper, K. (2005). Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. *BMC Clinical Pathology*, 5(10): 1-14.
- Fedder, J. (2006). Nonsperm Cells in Human Semen: With Special Reference to Seminar Leukocytes and their Possible Influence on Fertility. *Archives of Andrology*, 36(1): 41-65,
- Fenzia, C., Vittori, C., Oneta, M., Parrilla, B., Granata, A., Ibba, S., Biasin, M., Clerici, M., Trabattoni, D. y Savasi, V. (2020). Human papillomavirus in spermatozoa is efficiently removed by washing: a suitable approach for assisted reproduction. *RBMO*, 40(5): 693-699.
- Foresta, C., Garolla, A., Parisi, S., Ghezzi, M., Bertoldo, A., Di Nisio, A. y De Toni, L. (2015). HPV

- Prophylactic Vaccination in Males Improves the Clearance of Semen Infection. *EBioMedicine*, 2: 1487-1493.
- García-Ferreira, J. (2015). *Sperm DNA Fragmentation and Its Relation with Fertility. New Discoveries in Embryology*. IntechOpen.
- Garolla, A., Lenzi, A., Palú, G., Pizzol, D., Bertoldo, A., de Toni, L. y Foresta, C. (2012). Human papillomavirus sperm infection and assisted reproduction: A dangerous hazard with a possible safe solution. *Human Reproduction*, 27(4): 967-973.
- Golob, B., Poljak, M., Verdenik, I., Simoniti, M., Bokal, E. y Zorn, B. (2014). High HPV Infection Prevalence in Men from Infertile Couples and Lack of Relationship between Seminal HPV Infection and Sperm Quality. *BioMed Research International*, 2014(956901): 1-9.
- Griffin, J. (2012). Methods of Sperm DNA Extraction for Genetic and Epigenetic Studies. *Spermatogenesis*: 379-384.
- Halotech® DNA. (2015). *Halosperm® Versatile, easy and cost effective*. Halotech DNA SL.
- Harden, M. y Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research. Reviews in mutation research*, 772: 3-12.
- Hernández, T., González, V., Ozal, N. y González, M. (2016). Infección genital por el virus de papiloma humano: Grado de información que poseen las pacientes. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 76(3): 248-259.
- Kaspersen, M., Bungum, M., Fedder, J., Bonde, J., Larsen, P., Ingerslev, H. y Hollsberg, P. (2013). No increased sperm DNA fragmentation index in semen containing human papillomavirus or herpesvirus. *Andrology*, 1(3): 361-364.
- Kato, Y., Shigehara, K., Nakagawa, T., Nakata, H., Iijima, M., Nakashima, K., Kawaguchi, S., Izumi, K., Kadono, Y. y Mizokami, A. (2021). Human papillomavirus detected in sperm of Japanese infertile males affects reproductive parameters. *International Journal of Infectious Diseases*, 112: 294-299.
- Khatun, A., Rahman, S. y Pang, M. (2018). Clinical assessment of the male fertility. *Obstetrics Gynecology Science*, 61(2): 179-191.
- Kombe, A., Li, B., Zahid, A., Mengist, H., Bounda, G. y Jin, T. (2021). Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis and Vaccine Evaluation. *Frontiers in Public Health*, 8, 552028.
- Laprise, C., Trottier, H., Monnier, P., Coutlée, F. y Mayrand, M. (2013). Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 29(4): 640-651.
- Lazarczyck, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y. y Favre, M. (2009). The EVER Proteins as a Natural Barrier against Papillomaviruses: a New Insight into the Pathogenesis of Human Papillomavirus Infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2): 348-370.
- Lee, C., Huang, C., King, A. y Chan, P. (2002). Differential effects of human papillomavirus DNA types on p53 tumor-suppressor gene apoptosis in sperm. *Gynecologic Oncology*, 85: 511-516.
- Manini, I. y Montomoli, E. (2018). Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. *Annali di igiene*, 30(1): 28-32.
- Manuja, A., Manchanda, S., Kumar, B., Khanna, S. y Sethi, R. (2010). Evaluation of different methods of DNA extraction from semen of buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Buffalo Bulletin*,

29(2): 109-128.

- Moghimi, M., Zabihi-Mahmoodabadi, S., Kheirkhah-Vakilabad, A. y Kargar, Z. (2019). Significant Correlation between High-Risk HPV DNA in Semen and Impairment of Sperm Quality in Infertile Men. *International Journal of Fertility and Sterility*, 12(4): 306-309.
- Moradi, M., Moochani, S., Yamini, N., Javanmard, D., Marjani, A., Tabibzadeh, A., Tavakoli, A. y Monavari, S. (2021). Molecular Detection of Human Cytomegalovirus in Semen of infertile Men in Tehran. *International Journal of Medical Laboratory*, 8(1): 55-61.
- Moreira, E., Giuliano, A., Palefsky, J., Flores, C., Goldstone, S., Ferris, D., Hillman, R., Moi, H., Stoler, M., Marshall, B., Vuocolo, S., Guris, D. y Haupt, R. (2014). Incidence, Clearance, and Disease Progression of Genital Human Papillomavirus Infection in Heterosexual Men. *The Journal of Infectious Diseases*, 210: 192-199.
- Nasseri, S., Monavari, S., Keyvani, H., Nikkhoo, B., Roudsari, R. y Khazeni, M. (2015). The prevalence of Human Papilloma Virus (HPV) infection in the oligospermic and azoospermic men. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 29(272): 1-7.
- Nirmala, J. y Narendhirakannan, R. (2011). Detection and Genotyping of High-Risk HPV and Evaluation of Anti-Oxidant Status in Cervical Carcinoma Patients in Tamil Nadu State, India-a Case Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12: 2689-2695.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (11 de noviembre del 2020). Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Recuperado desde: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer).
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (02 de mayo del 2021). Infertilidad. Recuperado desde: <https://www.who.int/es/health-topics/infertilitytab=tab1>.
- Palma, C. y Vantman, D. (2021). Infertilidad masculina: causas y diagnóstico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(2): 180-188.
- Pellavio, G., Todaro, F., Alberizzi, P., Scotti, C., Gastaldi, G., Lolicato, M., Omes, C., Calìogna, L., Nappi, R. y Laforenza, U. (2020). HPV Infection Affects Human Sperm Functionality by Inhibition of Aquaporin-8. *Cells*, 9(1241): 1-15.
- Pereira, N., Kucharczyk, K., Estes, J., Gerber, R., Lekovich, J., Elias, R. y Spandorfer, S. (2015). Human Papillomavirus Infection, Infertility, and Assisted Reproductive Outcomes. *Journal of Pathogens*, 578423: 1-8.
- Portella-Ruiz, J. y Gonzales, G. (2016). Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Ginecología y Obstetricia de México*, 84(7): 462-473.
- Pratap, H., Hottigoudar, S., Nichanahalli, K. y Chand, P. (2017). Assessment of sperm deoxyribose nucleic acid fragmentation using sperm chromatin dispersion assay. *Journal of Pharmacology Pharmacotherapeutics*, 8(2): 45-49.
- QIAGEN. (2016). *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Sample and Assay Technologies.
- QIAGEN. (2016). *QIAGEN® Multiplex PCR Kit*. Sample and Assay Technologies.
- Remohí, J., Cobo, A., Prados, N., Romero, J. y Pellicer, A. (2013). *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana: laboratorio de reproducción asistida*. Editorial Médica Panamericana.
- Sazo, D. (2021). Vacunación contra el VPH: baja cobertura y dosis próximas a vencer, otro fallo del Estado a las niñas guatemaltecas. Recuperado desde: <https://www.plazapublica.com.gt/content/vacunacion-contra-el-vph-baja-cobertura-y-dosis-proximas-vencer-otro-fallo-del-estado-las>.

- Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T. y Pawlita, M. (2008). Homogeneous Amplification of Genital Human Alpha Papillomaviruses by PCR Using Novel Broad-Spectrum GP5+ and GP6+ Primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3): 1050-1059.
- Tafvizi, F., Fard, Z. y Assareh, R. (2015). Epstein-Barr virus DNA in colorectal carcinoma in Iranian patients. *Polish Journal of Pathology*, 66(2): 154-160.
- Tangal, S., Tasci, Y., Pabuccu, E., Caglar, G., Haliloglu, A. y Yararbas, K. (2019). DNA fragmentation index and human papiloma virus in males with previous assisted reproductive technology failures. *Turkish Journal of Urology*, 45(1): 12-16.
- Thermo Fisher Scientific®. (2017). *NanoDrop One. User Guide*. Thermo Fisher Scientific Inc.
- Tommasino, M. (2013). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 26: 13-21.
- Torres, O. (2011). *Factores de riesgo para cáncer cervical en Guatemala: epidemiología de los Virus de Papiloma Humano en la población general*. FONACYT.
- Wang, C. y Palefsky, J. (2015). Human Papillomavirus (HPV) Infections and the Importance of HPV Vaccination. *Current epidemiology reports*, 2(2): 101-109.
- Weyrich, A. (2012). Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm. *Curren Protocols in Molecular Biology*, 98(1): 2.13.1-2.13.3.
- Wu, H., de Gannes, M., Luchetti, G. y Pilsner, J. (2015). Rapid method for the isolation of mammalian sperm DNA. *Biotechniques*, 58(6): 293-300.
- Zacharis, K., Messini, C., Anifandis, G., Koukoulis, G., Satra, M. y Daponte, A. (2018). Human Papilloma Virus (HPV) and Fertilization: A Mini Review. *Medicina*, 54(50): 1-7.
- Zini, A. y Agarwal, A. (2011). *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. Springer.

## CAPÍTULO 11 ANEXO A

---

Consentimiento informado

---

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de investigación: Prevalencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen de pacientes de una clínica de fertilidad en Guatemala y su efecto en la fragmentación de ADN espermático.

La presente investigación y el consentimiento informado han sido previamente aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la Universidad del Valle de Guatemala. Cualquier consulta relacionada con los aspectos éticos, se puede comunicar con el presidente del comité, Dr. Elfeño Rolando López García, al siguiente correo: erolando@uvg.edu.gt.

Mi nombre es María Jose Méndez Bustamante y soy estudiante de 5to año de la licenciatura en Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. Este estudio es parte de mi trabajo de graduación el cual realizo en conjunto con Centro Procrea, una clínica privada de fertilidad y embarazo asistido en la ciudad de Guatemala.

### ¿Qué es el estudio y por qué se quiere llevar a cabo?

El virus del Papiloma Humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más común que existe, causante de cáncer de cérvix en mujeres de todo el mundo. En hombres, se creía que no era una infección grave, pero se ha asociado con cáncer de pene, ano, recto y del tracto orofaríngeo; los cuales, sin un tratamiento adecuado, pueden desencadenar la metástasis y posteriormente la muerte.

El propósito de esta investigación es determinar la prevalencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen de pacientes que asisten a la clínica Centro Procrea e identificar el efecto que causa en la fragmentación del ADN espermático; los cuales son daños en el material genético del espermatozoide que reducen las tasas de fertilización y embarazo.

Para llevarla a cabo, se realizará una prueba de dispersión de la cromatina a la muestra de semen para determinar los daños del material genético, posteriormente se hará una extracción de ADN viral en semen y mediante una técnica de biología molecular, PCR, se determinará la presencia o ausencia del virus.

Los resultados obtenidos de este estudio serán de gran valor para la salud pública del país ya que proveerán una pauta de la prevalencia de virus en el sexo masculino, y a la vez, demostrarán la importancia de eliminar el concepto errado de que la infección del VPH y la vacunación son exclusivamente de mujeres. Además, el identificar el efecto de la presencia del VPH en el semen sobre la fragmentación del ADN espermático contribuiría al conjunto de evidencia que relaciona al virus y la fertilidad masculina; la cual podría permitir la inclusión de la prueba del VPH dentro del panel de pruebas infecciosas como parte de las pruebas complementarias para la detección de la infertilidad masculina en las clínicas de fertilidad.

### ¿Cuántas personas participarán en este estudio?

Para llevar a cabo este estudio, se requiere la participación de 62 individuos masculinos, mayores a 18 años y que sean pacientes que visitan la clínica Centro Procrea. Por lo tanto, usted está siendo invitado a participar en este estudio de manera libre, completamente voluntaria y anónima. Previo a brindar su consentimiento, es importante que usted conozca que para participar en este estudio debe ser guatemalteco y no debe tener azoospermia (ausencia de espermatozoides en el semen), criptoospermia (poca cantidad de espermatozoides en el semen), criptorquidia (testículo no descendido), lesiones testiculares, varicocele (agrandamiento de las venas del escroto), leucocitospermia (presencia de gran cantidad de leucocitos en el semen), orquitis (inflamación de testículos), evidencia de infecciones genitales, haber proporcionado la muestra por biopsia testicular, fumar más de 20 cigarrillos al día o haber consumido alcohol o drogas un día antes de la toma de muestra; debido a que estos factores pueden dificultar la detección del VPH en el semen y un aumentar los daños en el ADN espermático.

### ¿Qué implica mi participación en este estudio?

Su participación no requiere de una muestra de semen adicional, sino que se utilizará la que usted proporcionó para realizar el espermograma como prueba de rutina a su consulta o servicios solicitados en la clínica Centro Procrea. Aunque su participación en este estudio es muy valiosa para nosotros, no será remunerada económicamente para evitar su coacción.

Así pues, su participación en el estudio consistirá en el proceso de reclutamiento en el que se le invitará a escuchar respecto al estudio, la revisión del cumplimiento de los criterios de inclusión, la entrega y firma de este documento de consentimiento informado y el tiempo que usted haya tardado en dar la muestra de semen. Para completar este proceso, se estima entre 45 minutos y 1 hora. En general, su participación en el estudio durará 8 meses, el cual es el tiempo calculado de experimentación y análisis de resultados. Una vez terminado el estudio, serán contactados vía telefónica o correo electrónico para comunicarles sus resultados y su participación en el mismo habrá finalizado.

#### ¿Cuáles son los beneficios y riesgos de participar en este estudio?

Asimismo, es posible que no exista un beneficio directo de este estudio para usted. Por lo tanto, luego de dos meses de haber finalizado el proyecto se le brindarán sus resultados. De ser positivo para VPH en el semen, estará recibiendo una llamada telefónica por parte de la Licda. María Cristina Bolaños (embrióloga del Centro Procrea) o el Lic. Fredy Mejía (director de laboratorio del Centro Procrea) en la que se le comunicará su resultado, se le explicará nuevamente que es el VPH y sus efectos en la salud y se le sugerirán los pasos a seguir, los cuales hará de forma personal, para combatir la infección; siendo estos programar una cita con alguno de los infectólogos sugeridos (se proveerá una lista de infectólogos de Guatemala; **Documento Adicional No. 1**) y realizarse una prueba confirmatoria en laboratorios acreditados para la detección de VPH (se proveerá una lista de los laboratorios acreditados para la detección de VPH en Guatemala; **Documento Adicional No. 2**) con el fin de poder establecer un tratamiento adecuado para su persona. De ser negativo para VPH, su resultado se le informará por correo electrónico o llamada telefónica, según lo desee. El presente estudio no involucrará riesgos físicos para usted, pero un resultado positivo para VPH puede generarle sentimientos de angustia, preocupación o culpabilidad. No obstante, el conocimiento de los resultados positivos para VPH en el semen le permitirá tomar medidas futuras para combatir la infección.

#### ¿De qué forma se mantendrá mi información privada y a quién puedo contactar si tengo dudas?

Su aporte a este estudio es completamente anónimo, por lo que a su muestra se le asignará un código de identificación único y se destruirá al concluir la investigación; la cual culminará ocho meses después de dar inicio. Este código será utilizado para archivar su consentimiento informado en un gabinete establecido bajo llave dentro del Centro Procrea y para relacionar su información de contacto registrada en el formulario en línea; cuyo acceso estará restringido a los investigadores de este proyecto, con quienes también puede comunicarse para resolver dudas: Licda. María Cristina Bolaños (laboratorio@centroprocrea.com), M.Sc. Andrea Gómez (avgomez@uvg.edu.gt), Lic. Fredy Mejía (fmejia@centroprocrea.com) y Maria Jose Méndez (men18054@uvg.edu.gt). Así pues, los datos y resultados generados durante el estudio resguardarán su identidad, por lo que serán publicados bajo el código asignado, y se encontrarán en un archivo digital almacenado en una computadora resguardada por usuario y contraseña, a la cual únicamente tendrán acceso los investigadores del estudio. En cuanto al informe final del trabajo de graduación, este se encontrará disponible a partir de mayo del 2023 en la biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala (18 Av. 11-95 zona 15 Vista Hermosa III), por si desea consultarlo.

#### ¿Cuáles son mis derechos como participante del estudio?

Al firmar este consentimiento usted no se encuentra comprometido a terminar todas las etapas del estudio y tiene total libertad de revocar su autorización, sin necesidad de explicación. Se le garantiza que no habrá castigo alguno, falta de beneficios médicos o consecuencias negativas para su persona y solamente se le solicita informar su decisión para poder entregarle los resultados obtenidos hasta ese momento, excluirle de los resultados finales y destruir su muestra.

La firma del consentimiento informado no implica la pérdida de los derechos individuales de acuerdo con las leyes de Guatemala.

\_\_\_\_\_  
Nombre del donante

\_\_\_\_\_  
DPI

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Número de teléfono

\_\_\_\_\_  
Correo electrónico

\_\_\_\_\_  
Nombre del investigador

\_\_\_\_\_  
DPI

\_\_\_\_\_  
Firma

Guatemala, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2022

En caso de que el donante sea analfabeto, se requiere la firma de un testigo.

He leído la descripción de este estudio y doy fe que los procedimientos, riesgos y posibles beneficios fueron explicados de manera detallada al donante. A la vez declaro que no trabajo con el investigador principal y las demás personas que trabajen con él. Por lo tanto, confirmo que el donante ha accedido de manera completamente voluntaria a participar en este estudio y que puede retirarse en cualquier momento que lo desee, sin brindar explicación ni verse expuesto a consecuencias negativas.

_____ Nombre del donante	_____ DPI	_____ Firma	Huella digital
_____ Nombre del testigo	_____ DPI	_____ Firma	
_____ Nombre del investigador	_____ DPI	_____ Firma	

-----  
\*El presente es una copia para el participante del estudio.

Guatemala, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2022

Código de identificación: \_\_\_\_\_

#### Declaración del Consentimiento Informado

He sido invitado a participar en la investigación titulada "Prevalencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen de pacientes de una clínica de fertilidad en Guatemala y su efecto en la fragmentación de ADN espermático". He leído y se me ha informado sobre el estudio, los riesgos y beneficios del mismo. He tenido la oportunidad de realizar preguntas acerca de la investigación y estas se me han contestado satisfactoriamente. He accedido voluntariamente a que se utilice mi muestra de semen, estoy consciente que no recibiré una remuneración por mi participación y que, en caso de obtener un resultado positivo para VPH, por vía telefónica recibiré sugerencias de los pasos a seguir para combatir la infección, los cuales haré de forma personal. Por lo tanto, consiento voluntariamente participar en este estudio y entiendo que tengo el derecho de revocar mi autorización en cualquier momento y sin consecuencias negativas para mi persona.



Escanee el código QR para acceder al formulario de registro de información de contacto

_____ Nombre del donante	_____ DPI	_____ Firma
_____ Nombre del testigo	_____ DPI	_____ Firma
_____ Nombre del investigador	_____ DPI	_____ Firma

#### Información de coinvestigadores

**Licenciada María Cristina Bolaños**  
Embrióloga Centro Procrea  
Correo electrónico: laboratorio@centroprocrea.com

**María Jose Méndez Bustamante**  
Estudiante de Bioquímica y Microbiología UVG  
Correo electrónico: men18054@uvg.edu.gt

## CAPÍTULO 11 ANEXO B

---

Documento adicional No. 1

---

**DOCUMENTO ADICIONAL NO. 1**  
Listado infectólogos en Guatemala

A continuación, se le provee una lista de algunos infectólogos en Guatemala, así como su número de teléfono y su dirección, con los cuales usted podría acudir para darle continuidad a los resultados del estudio que le fueron comunicados. Es importante recordarle que, para determinar que usted posee una infección por VPH, es necesaria una prueba confirmatoria en laboratorios acreditados para la detección del VPH (Documento Adicional No. 2).

- Dr. Julio César Argueta Reyes
  - Teléfono: 2366-1189
  - Dirección: 10 Calle 2-45, Zona 14 Clínicas Las Américas, 8 Nivel
  
- Dr. Luis Pedro Villanueva Mirón
  - Teléfono: 2278-9241
  - Dirección: 6 Avenida 9-18, Zona 10 Sixtino II, Ala 2, 8 Nivel
  
- Dra. Hilda M. Palacios Rivera
  - Teléfono: 2385-1109
  - Dirección: 2 Avenida 2-20, Zona 10 Centro Clínico Medipro, Ci
  
- Dra. Claudia María Consenza Muralles
  - Teléfono: 2366-1101
  - Dirección: 10 calle 2-45, Clínicas Médicas de las Américas, clínica 603
  
- Dr. Jorge Laynez Chay
  - Teléfono: 5667-4817
  - Dirección: 10 Calle 2-45, Zona 14 Clínicas Las Américas, 9 Nivel
  
- Dr. Eduardo Arathoon
  - Teléfono: 2385-7609/10
  - Dirección: 2da. Calle 25-19, Zona 15 Vista Hermosa I, Nivel 9
  
- Dr. Estuardo Tercero Muxi
  - Teléfono: 5050-5558
  - Dirección: Arco 47, Jardines de la Asunción, Zona 5, Casa 11
  
- Dra. Karyn Girón de Santa Cruz
  - Teléfono: 2362-8681
  - Dirección: Clínicas Herrera Llerandi Ala Sur, 2 Nivel, clínica 6
  
- Dr. César Leonel González Camargo
  - Teléfono: 2368-5581
  - Dirección: 27 Avenida 17-59, Jardines de San Isidro, Zona 16
  
- Dr. Hugo Eduardo Pezzarossi Zalaya
  - Teléfono: 2385-7642
  - Dirección: Blvd. Vista Hermosa 25-19, Zona 15 Multimédica, 10

CAPÍTULO 11 ANEXO C

---

Documento adicional No. 2

---

**DOCUMENTO ADICIONAL NO. 2**  
Listado laboratorios acreditados para la detección de VPH en Guatemala

A continuación, se le provee una lista de los laboratorios acreditados para la detección de VPH en Guatemala, junto con su número de teléfono y sedes/dirección, a los cuales podría acudir para realizarse la prueba confirmatoria de VPH.

- TecniScan®
  - Teléfono: 1723
  - Sedes: Multimédica z.15, Carretera a El Salvador, Zona 9, Cayalá, Majadas, SanKris Mall, Amatitlán, Escuintla y Cobán.
  
- Biotest®
  - Teléfono: 2245-9191
  - Sedes: C.C. Plaza Florida, Calz. San Juan, Arboreto San Nicolás, Centro Histórico, Carr. Atlántico, Atlantis Z.10, Calzada Roosevelt y Zona Médica.
  
- Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas de la Universidad Mariano Gálvez
  - Teléfono: 2288-9372
  - Dirección: 3A Avenida, 8A calle, zona 2, Interior Finca El Zapote, Edificio CS-1, Universidad Mariano Gálvez.
  
- Laboratorio Clínica Hospital Herrera Llerandi
  - Teléfono: 2384-6065
  - Sedes: Zona 10, Plaza Varietá-Cayalá, Pasaje Naranja, Plaza Décima.
  
- Blue Medical®
  - Teléfono: 1750
  - Sedes: Avenida Las Américas, Boulevard El Frutal, San Cristóbal, Condado Concepción, Clínica Portales, Majadas, Arboreto, Vista Hermosa, Centro Diagnóstico Zona Portales, Antigua Guatemala, C.C. Parque Las Américas, C.C. San Juan, Sancris Mix, C.C. Pradera Vistares, Santa Amelia, Pradera Xela y Esquina Miraflores.

## CAPÍTULO 11 ANEXO D

---

Dictamen de aprobación del Comité de Ética de FCCHH de la UVG

---



COMITÉ DE ETICA  
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
RESULTADOS EVALUACION DE PROYECTO

BM-001-2022-18054

**A:** M.Sc. Andrea Gómez, Investigador Principal  
María José Méndez Bustamante, Co-Investigador Principal

**DE:** Comité de Ética  
Facultad de Ciencias y Humanidades  
Universidad del Valle de Guatemala

**FECHA:** 04 de mes de abril, 2022

**ASUNTO:** Prevalencia del virus del Papiloma Humano (VPH) en el semen de pacientes de una clínica de fertilidad en Guatemala y su efecto en la fragmentación del ADN espermático.

---

**VEREDICTO:** Aprobado.

**Recomendación**

Se sugiere que se tome en cuenta que participantes que tienen pareja y que son guatemaltecos son rasgos que describe la población (describe el "universo" del estudio). **Estas características no deberían formar parte formal de los criterios de inclusión.**

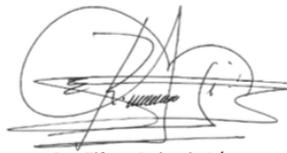
El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la UVG ha revisado y aprobado el protocolo arriba indicado. Se le recuerda que el comité debe revisar y aprobar todos los protocolos de investigación que utilicen la experimentación biomédica en seres humanos, en intervalos apropiados y de acuerdo al nivel de riesgo, por lo menos una vez al año. Si el proyecto dura más de un año, es responsabilidad del investigador, enviar al comité el protocolo de investigación para revisión y solicitud de aprobación de continuación del estudio.

Archive esta notificación como prueba de la aprobación. Para evitar atrasos en la aprobación de su investigación y la posible suspensión del estudio, por favor envíe su solicitud de continuación, por lo menos seis semanas antes de cumplirse seis meses después de haber sido autorizado por este comité.

Cualquier problema o evento serio relacionado con el estudio, deberá ser notificado inmediatamente al Comité.

Cualquier modificación al protocolo debe ser enviada al Comité para su aprobación antes de ser implementada.

Si tiene alguna duda o pregunta, por favor contactar a la Sra. Ana Lorena Ortíz, al teléfono 25071500, extensión 21448 o al correo electrónico [facchh@uvg.edu.gt](mailto:facchh@uvg.edu.gt).



Dr. Eifego Rolando López  
Presidente, Comité de Ética  
Facultad de Ciencias y Humanidades  
Universidad del Valle de Guatemala

ERLG/alo  
c.c. Dirección de Departamento  
expediente estudiante  
archivo.

---

## CAPÍTULO 11 ANEXO E

---

SOP No. 1: Prueba *SCD* para la determinación del *SDFI* en semen.

---

	<u>SOP No. 1:</u>	<b>Versión: 1</b>
	<b>Prueba SCD para la determinación del índice de fragmentación del ADN espermático (SDFI, por sus siglas en inglés) en semen.</b>	<b>Fecha de elaboración:</b> 06 de octubre del 2022
		<b>Elaborado por:</b> María José Méndez Bustamante
<p><b>OBJETIVO:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar el índice de fragmentación del ADN espermático (SDFI) en una muestra de semen.</li> </ul>		
<p><b>MATERIALES Y CRISTALERÍA:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Espátula</li> <li>Papel encerado</li> <li>Papel toalla</li> <li>Puntas P100, P1000</li> <li>Tubos cónicos 15 mL</li> <li>Tubos eppendorf</li> <li>Tubo de fondo redondo 15 mL</li> <li>Caja Petri</li> <li>Piseta</li> <li>Aguja 18 mm</li> <li>Probeta 100, 1000 mL</li> <li>Portaobjetos esmerilados</li> <li>Cubreobjetos</li> <li>Beaker 500 mL</li> </ul> <p><b>REACTIVOS:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Agarosa low EEO</li> <li>Agarosa de bajo punto de fusión</li> <li>PBS</li> <li>Etanol absoluto</li> <li>Agua destilada</li> <li>HCl</li> <li>Jabón neutro</li> <li>Solución de lisis del Sperm DNA Kit OBI BIOTEK®</li> <li>Colorante Wright del Sperm DNA Kit OBI BIOTEK®</li> <li>Buffer Wright del Sperm DNA Kit OBI BIOTEK®</li> </ul>		

**EQUIPO:**

- Balanza analítica
- Pipetas P100, P1000
- Microondas
- Refrigeradora
- Plancha térmica
- Baño María
- Microscopio

**PROCEDIMIENTO:**

- **Preparación de soluciones y láminas para prueba SCD:**
- Agarosa de punto de fusión normal (NMA, por sus siglas en inglés)
  1. Disolver 0.041 g de agarosa low EEO en 6.5 mL de PBS.
  2. Calentar en microondas por 5-10 s con poder bajo.
  3. Almacenar en frío, a 20°C, para reutilizar.
- Agarosa de bajo punto de fusión (LMA, por sus siglas en inglés)
  1. Disolver 0.03 g de agarosa de LMA en 6.25 mL de PBS.
  2. Calentar en microondas por 7-10 s con poder bajo.
  3. Distribuir la solución colocando 80 µL de LMA en un tubo eppendorf.
  4. Almacenar los tubos eppendorf en frío, a 20°C, para utilizar.
- Soluciones de alcohol
  1. Para la solución de etanol al 50 %, mezclar 50 mL de etanol absoluto con 50mL de agua destilada.
  2. Para la solución de etanol al 70 %, mezclar 70 mL de etanol absoluto con 30mL de agua destilada.
- Solución desnaturalizante HCl al 37 %
  1. En un tubo cónico de 15 mL, colocar 10 mL de agua destilada y 80 µL de HCl.
  2. Mezclar suavemente la solución.
  3. Almacenar a T° ambiente.

- Láminas pretratadas con NMA

1. Limpiar un portaobjetos remojándolo 5 min en agua destilada con jabón neutro y haciendo tres lavados con etanol al 70 %.
2. Dejar secar a T° ambiente.
3. En un extremo opuesto del portaobjetos, colocar 180 µL de NMA y, con una aguja de 18 mm, esparcir sin levantar.
4. Colocar en una superficie a T° ambiente por 1 min y luego en una plancha térmica a 65°C para que se sequen por completo.
5. Almacenar las láminas pretratadas con NMA a T° ambiente.

- **Prueba SCD:**

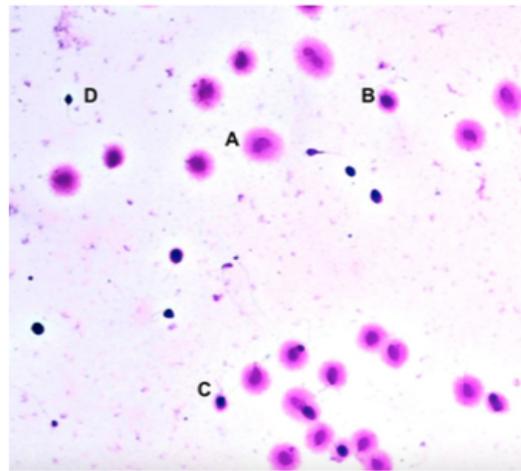
1. Atemperar la solución de lisis.
2. Colocar el tubo eppendorf con LMA en un baño maría a punto de ebullición (90-100°C) durante 5 min.
3. Una vez diluida la agarosa, añadir 40 µL de la muestra de semen (previamente diluida, si es necesario, con PBS para alcanzar una concentración espermática de 8 millones/mL) y mezclar con la agarosa fundida.
4. Colocar 2 gotas de 25 µL de esta mezcla en cada extremo de la lámina pretratada con NMA y cubrir cada gota con un cubreobjetos.
5. Colocar la lámina en una cámara húmeda, la cual se crea colocando un pedazo de papel toalla remojado en agua destilada en el fondo de una caja Petri y colocando la lámina pretratada por encima.
6. Colocar a 4°C por 30 min hasta gelificar.
7. Una vez solidificadas las capas, cuidadosamente retirar los cubreobjetos deslizándolos hacia las orillas, dejando la capa de agarosa intacta.
8. Sumergir la lámina en la solución desnaturalizante HCl al 37 % por 7 min.
9. Retirar la lámina de la solución desnaturalizante y cambiarla a la solución de lisis por 5 min.
10. Retirar la lámina de la solución de lisis y sumergirla en agua destilada durante 5 min.
11. Retirar la lámina del agua destilada y continuar con las inmersiones en soluciones de etanol al 70% y 95%, cada uno por 2 min.
12. Dejar secar la lámina.
13. Una vez seca, colocar 20 gotas del colorante Wright sobre la lámina sin que se derrame por los bordes y dejarlo reposar por 5 min.
14. Posteriormente, añadir 30 gotas del buffer Wright y dejar reposar durante 7 min hasta que aparezca una capa verde metálica brillante en la superficie de la mezcla.
15. Enjuagar la lámina con agua destilada durante 30 s y dejar secar.
16. Observar al microscopio a 40X, contar un mínimo de 200 espermatozoides y clasificarlos como espermatozoides con halo grande, halo mediano, halo pequeño o sin halo tal como se muestra en la figura 2. Aquellos con halo pequeño o ausente son considerados con daño de ADN y los que poseen halo mediano o grande son los espermatozoides sin daño de ADN.

17. A partir del conteo anterior, calcular el SDFI con la siguiente fórmula:

$$SDFI (\%) = \frac{EHP + ESH}{TEC} \times 100$$

donde:

- SDFI es el índice de fragmentación del ADN espermático.
- EHP es el número de espermatozoides con halo pequeño.
- ESH es el número de espermatozoides sin halo.
- TEC es el total de espermatozoides cuantificados.



**Figura 1.** Patrones de dispersión de la cromatina en espermatozoides esperados tras la realización de la prueba SCD. (A) Espermatozoides con halo grande, (B) espermatozoides con halo mediano, (C) espermatozoides con halo pequeño y (D) espermatozoides sin halo (Imagen de elaboración propia).

#### REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA:

Pratap, H., Hottigoudar, S., Nichanahalli, K. y Chand, P. (2017). Assessment of sperm deoxyribose nucleic acid fragmentation using sperm chromatin dispersion assay. *Journal of Pharmacology Pharmacotherapeutics*, 8(2): 45-49.

OBI BIOTEK®. (2019). *Ensayo de la dispersión de la cromatina espermática y fragmentación del ADN espermático. Sperm DNA Kit*. OBI BIOTEK®.

## CAPÍTULO 11 ANEXO F

---

SOP No. 2: Extracción de ADN viral en muestras de semen.

---

	<u>SOP No. 2:</u> <b>Extracción de ADN viral en muestras de semen</b>	<b>Versión: 1</b>
		<b>Fecha de elaboración:</b> 06 de octubre del 2022
		<b>Elaborado por:</b> María José Méndez Bustamante
<b>OBJETIVO:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extraer ADN viral en muestras de semen.</li> </ul>		
<b>MATERIALES Y CRISTALERÍA:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Puntas P10, P20, P1000</li> <li>• Tubos eppendorf 1.5 mL</li> <li>• QIAGEN® QIAamp Mini Spin Column</li> <li>• QIAGEN® Tubo de colección 2 mL</li> <li>• Kimwipes®</li> </ul> <b>REACTIVOS:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• QIAGEN® Protease</li> <li>• QIAGEN® Buffer AL</li> <li>• Etanol 100%</li> <li>• QIAGEN® Buffer AW1</li> <li>• QIAGEN® Buffer AW2</li> <li>• QIAGEN® Buffer AE</li> </ul> <b>EQUIPO:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetas P10, P20, P1000</li> <li>• Centrifuga</li> <li>• Vórtex</li> <li>• Refrigeradora/Congelador</li> <li>• Baño María</li> <li>• NanoDrop Thermo Scientific®</li> </ul>		
<b>PROCEDIMIENTO:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Extracción de ADN viral en muestras de semen:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Descongelar la muestra de semen, la cual fue previamente almacenada a -20°C.</li> </ol> </li> </ul>		

2. Pipetear 20  $\mu\text{L}$  de QIAGEN® Protease en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
3. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de la muestra de semen.
4. Añadir 200  $\mu\text{L}$  de QIAGEN® Buffer AL y mezclar la solución vigorosamente.
5. Incubar la solución a 56°C por 10 min y luego centrifugar brevemente para remover las gotas de la tapadera del tubo.
6. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 100 %, mezclar vigorosamente la solución y centrifugar brevemente para remover las gotas de la tapadera del tubo.
7. Transferir la solución a una QIAGEN® QIAamp Mini Spin Column (en un QIAGEN® Tubo de colección de 2 mL), centrifugar a 8,000 rpm por 1 min y descartar el tubo de colección y el fluido restante.
8. Colocar la columna en un nuevo QIAGEN® Tubo de colección de 2 mL y agregar 500  $\mu\text{L}$  de QIAGEN® Buffer AW1.
9. Centrifugar a 8,000 rpm por 1 min y descartar el QIAGEN® Tubo de colección y el fluido restante.
10. Colocar la columna en un nuevo QIAGEN® Tubo de colección de 2 mL y añadir 500  $\mu\text{L}$  de QIAGEN® Buffer AW2.
11. Centrifugar a 8,000 rpm por 5 min y descartar el QIAGEN® Tubo de colección de 2 mL y el fluido restante.
12. Colocar la columna en un nuevo QIAGEN® Tubo de colección de 2 mL y centrifugar a máxima velocidad por 1 min para eliminar los restos del QIAGEN® Buffer AW2.
13. Colocar la columna en tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL, agregar 200  $\mu\text{L}$  de QIAGEN® Buffer AE o agua destilada, incubar a T°C ambiente (15-25°C) por 1 min y centrifugar a 8,000 rpm por 1 min para eluir el ADN.
14. Descartar la columna y almacenar el tubo eppendorf con la suspensión de ADN a -20°C.

**- Cuantificación de ADN extraído:**

1. Colocar 2  $\mu\text{L}$  de la muestra de ADN en el centro del agujero del pedestal del NanoDrop Thermo Scientific®.
2. Leer y registrar la concentración del ADN (ng/ $\mu\text{L}$ ).
3. Leer y registrar los valores de absorbancia de A260/A280 y A260/A230 para determinar la pureza del ADN extraído.
4. Realizar lecturas de cada muestra en triplicado.

**REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA:**

QIAGEN. (2016). *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Sample and Assay Technologies.

## CAPÍTULO 11 ANEXO G

---

SOP No. 3: Detección molecular del VPH en las muestras de semen por  
PCR punto final.

---

	<u>SOP No. 3:</u>  <b>Detección molecular del VPH en las muestras de semen por PCR punto final</b>	<b>Versión: 1</b>
		<b>Fecha de elaboración:</b> 08 de octubre del 2022
		<b>Elaborado por:</b> María José Méndez Bustamante
<b>OBJETIVO:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Detectar el VPH en muestras de semen mediante PCR punto final.</li> </ul>		
<b>MATERIALES Y CRISTALERÍA:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Puntas P10, P20, P1000</li> <li>• Tubos eppendorf 1.5 mL</li> <li>• Tubos PCR</li> <li>• Erlenmeyer</li> <li>• Probeta</li> <li>• Molde de gel</li> <li>• Peine de 8 pocillos</li> <li>• Papel encerado</li> </ul>		
<b>REACTIVOS:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• QIAGEN® Multiplex PCR Master Mix</li> <li>• QIAGEN® RNase-free water</li> <li>• ADN extraído</li> <li>• Buffer TE</li> <li>• Primer GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3', 100 μM)</li> <li>• Primer GP6+ (5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3', 100 μM)</li> <li>• Primer PC03 (5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3', 100 μM)</li> <li>• Primer PC04 (5'-CAACTT-CATC CACGTTACC-3', 100 μM)</li> <li>• Agarosa</li> <li>• Buffer TBE 1X</li> <li>• Bromuro de etidio</li> <li>• DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder Sigma Aldrich®</li> <li>• Loading dye Sigma Aldrich®</li> <li>• Hielo</li> </ul>		
<b>EQUIPO:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetas P10, P20, P1000</li> <li>• Centrifuga</li> </ul>		

- Vórtex
- Refrigeradora/Congelador
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Microondas
- Balanza analítica

**PROCEDIMIENTO:**

- **Preparación de Primer Mix VPH 10X (GP5+/GP6+):**

1. Colocar 480 µL de buffer TE en un tubo eppendorf 1.5 mL.
2. Añadir 10 µL de primer GP5+ 100 µM.
3. Agregar 10 µL de primer GP6+ 100 µM.
4. Mezclar bien y almacenar a -20°C.

- **Preparación de Primer Mix β-Globina 10X (PC03/PCC04):**

1. Colocar 480 µL de buffer TE en un tubo eppendorf 1.5 mL.
2. Añadir 10 µL de primer PC03 100 µM.
3. Agregar 10 µL de primer PC04 100 µM.
4. Mezclar bien y almacenar a -20°C.

- **Detección del VPH en muestras de semen mediante PCR punto final:**

1. Descongelar el QIAGEN® Multiplex PCR Master Mix, QIAGEN® RNase-free water, Primer Mix VPH 10X y el ADN extraído de las muestras de semen y mezclar cada tubo en el vórtex antes de usarlos.
2. Preparar la reacción según el cuadro No. 1, tomando en cuenta un 10% de volumen mayor al requerido para el total de número de reacciones a realizar.
3. Mezclar la reacción suavemente mediante pipeteo y dispensar el volumen apropiado en tubos de PCR.
4. Agregar el ADN extraído de las muestras de semen a los tubos de PCR individuales con la reacción.
5. Programar el termociclador según las condiciones mostradas en el cuadro No. 2.
6. Colocar los tubos de PCR dentro del termociclador e iniciar el programa.
7. Una vez finalizado el programa, almacenar los productos de PCR a -20°C.
8. Repetir la reacción con una muestra positiva de VPH para tener un control positivo y con el Primer Mix β-Globina 10X para tener un control interno.

- **Gel electroforesis para visualización de productos de PCR:**

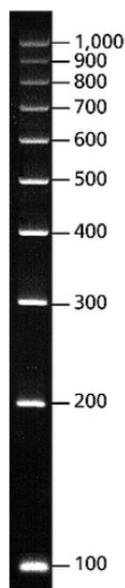
1. Preparar un gel de agarosa al 2% colocando 0.6 g de agarosa y 30 mL de buffer TBE 1X en un Erlenmeyer.
2. Colocar la solución en el microondas y calentar por intervalos de 5-10 s por 1 min para derretir la agarosa.
3. Agregar 0.6 µL de bromuro de etidio a la solución y mezclar.
4. Colocar la solución en el molde, colocar el peine de 8 pocillos y dejar solidificar por 30 min.
5. Preparar la cámara de electroforesis colocándola en un baño de hielo y descongelar los productos de PCR.
6. Colocar el gel solidificado dentro de la cámara de electroforesis y añadir 350 µL de buffer TBE 1X hasta cubrir el gel.
7. Cargar el gel colocando 2 µL de escalera (DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder Sigma Aldrich®) en el primer carril, 3 µL del producto de PCR del control interno (β-Globina) en el segundo carril, 2 µL del control positivo de VPH en el tercer carril y 4 µL de los productos de PCR de las muestras de semen, previamente mezcladas con 0.5 µL de loading dye Sigma Aldrich® en los siguientes cinco carriles.
8. Dejar correr la electroforesis a 150V por 40 min.
9. Visualizar el gel en un transiluminador UV/Vis a 254 nm.

**Cuadro No. 1.** Preparación de reacción para PCR.

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
<b>Reacción</b>		
QIAGEN® Multiplex PCR Master Mix	25 µL	1X
Primer Mix VPH 10X	5 µL	0.2 µM de cada primer
QIAGEN® RNase-free water	Variable	-
<b>ADN extraído</b>	Variable	≤1 µg ADN/reacción
<b>Volumen final de reacción</b>	50 µL	-

**Cuadro No. 2.** Programa de termociclado para la detección de VPH en muestras de semen.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	15 minutos
<b>Ciclado de 3 pasos:</b>		
Desnaturalización	94°C	1 minuto
Alineamiento	46°C	2 minutos
Elongación	72°C	1.5 minutos
Número de ciclos	40	
<b>Extensión final</b>	72°C	4 minutos
<b>Hold</b>	14°C	-



**Figura 1.** DirectLoad™ PCR 100 bp  
Low Ladder Sigma Aldrich®

#### **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA:**

Bossi, R., Valadares, J., Del Puerto, H., Rocha, M., Braga, L., Sampaio, M., Franca, P., Alvarenga, D. y Geber, S. (2019). Prevalence of human papillomavirus (HPV) in the semen of patients submitted to assisted reproductive technology treatment in a private clinic in Brazil. *JBRA Assisted Reproduction*, 23(3): 205-209.

Evans, M., Adamson, C., Simmons-Arnold, L. y Cooper, K. (2005). Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. *BMC Clinical Pathology*, 5(10): 1-14.

Merck. (2022). DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder. Recuperado desde: [https://www.sigmaaldrich.com/GT/es/product/sigma/d3687?gclid=CjwKCAjwsJ6TBhAIEiwAfl4TWMvb6QTLu4jLFioWPO1RNW0AQBbSl6LPIYVphF5PMLIibO-dIydpRoCsdCQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/GT/es/product/sigma/d3687?gclid=CjwKCAjwsJ6TBhAIEiwAfl4TWMvb6QTLu4jLFioWPO1RNW0AQBbSl6LPIYVphF5PMLIibO-dIydpRoCsdCQAvD_BwE).

Moradi, M., Moochani, S., Yamini, N., Javanmard, D., Marjani, A., Tabibzadeh, A., Tavakoli, A. y Monavari, S. (2021). Molecular Detection of Human Cytomegalovirus in Semen of infertile Men in Tehran. *International Journal of Medical Laboratory*, 8(1): 55-61.

Nirmala, J. y Narendhirakannan, R. (2011). Detection and Genotyping of High-Risk HPV and Evaluation of Anti-Oxidant Status in Cervical Carcinoma Patients in Tamil Nadu State, India-a Case Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12: 2689-2695.

QIAGEN. (2016). *QIAGEN® Multiplex PCR Kit*. Sample and Assay Technologies.

## CAPÍTULO 11 ANEXO H

---

Cuantificación de ADN extraído en muestras de semen.

---

Cuadro H.1: Concentración y valores de pureza del ADN extraído de las muestras de semen.

Muestra	Réplica	Concentración (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
P-01	1	3.10	1.49	0.22
	2	3.30	1.48	0.23
	3	2.70	1.62	0.20
P-02	1	3.10	1.76	0.18
	2	3.20	1.86	0.18
	3	2.90	2.78	0.17
P-03	1	6.10	1.72	0.32
	2	6.00	1.70	0.32
	3	5.20	1.95	0.29
P-04	1	3.80	1.98	0.29
	2	3.90	2.20	0.30
	3	3.70	2.16	0.29
P-05	1	4.40	1.59	0.20
	2	4.30	1.55	0.19
	3	4.10	1.82	0.19
P-06	1	11.70	1.77	0.39
	2	11.70	1.81	0.40
	3	11.50	1.75	0.37
P-07	1	3.50	1.95	0.28
	2	3.10	2.06	0.29
	3	3.60	2.28	0.25
P-08	1	15.90	1.99	0.68
	2	16.00	1.96	0.66
	3	15.90	1.94	0.71
P-09	1	4.10	1.85	0.28
	2	3.40	1.72	0.27
	3	2.60	2.34	0.22
P-10	1	21.60	1.85	0.71
	2	21.10	1.88	0.71
	3	21.10	1.89	0.71
P-11	1	5.60	2.14	0.29
	2	6.70	1.89	0.32
	3	6.30	1.99	0.32
P-12	1	7.20	2.26	0.40
	2	7.20	2.34	0.18
	3	6.80	2.32	0.37
P-13	1	4.70	2.06	0.31
	2	4.50	2.07	0.30
	3	4.70	2.38	0.31
P-14	1	12.00	1.74	0.39
	2	12.00	1.80	0.39
	3	12.60	1.69	0.40
P-15	1	4.40	2.12	0.22
	2	4.90	1.96	0.24
	3	5.30	1.74	0.25
P-16	1	7.70	1.85	0.28
	2	8.10	1.82	0.28
	3	8.40	1.79	0.28

Continuación cuadro H.1: Concentración y valores de pureza del ADN extraído de las muestras de semen...

Muestra	Réplica	Concentración (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
P-17	1	6.30	2.14	0.35
	2	6.90	1.99	0.37
	3	7.00	1.74	0.37
P-18	1	3.70	1.75	0.23
	2	3.90	1.70	0.24
	3	3.60	1.51	0.22
P-19	1	7.50	1.97	0.41
	2	7.80	1.74	0.41
	3	7.30	1.89	0.39
P-20	1	1.50	3.03	0.29
	2	2.70	1.50	0.33
	3	3.60	1.40	0.36
P-21	1	12.80	1.61	0.51
	2	12.40	1.64	0.58
	3	12.70	1.73	0.65
P-22	1	4.40	1.57	0.22
	2	4.20	1.70	0.21
	3	5.40	1.45	0.28
P-23	1	15.50	1.67	1.09
	2	16.20	1.68	1.07
	3	16.80	1.61	0.91
P-24	1	6.20	1.89	0.72
	2	6.90	1.56	0.70
	3	6.40	1.69	0.69
P-25	1	4.80	1.42	0.38
	2	4.40	1.58	0.37
	3	4.60	1.50	0.36
P-26	1	5.50	1.68	0.47
	2	5.00	1.82	0.48
	3	6.00	1.78	0.31
P-27	1	6.20	1.74	0.47
	2	7.70	1.90	0.70
	3	6.80	1.67	0.68
P-28	1	5.70	1.81	0.46
	2	4.40	0.96	0.46
	3	6.00	1.74	0.46
P-29	1	3.10	1.45	0.38
	2	3.60	1.28	0.39
	3	2.90	1.44	0.36
P-30	1	3.80	2.31	0.42
	2	3.70	2.36	0.41
	3	4.40	2.18	0.47
P-31	1	7.70	1.91	1.07
	2	6.30	2.49	1.05
	3	10.70	1.49	1.19
P-32	1	5.52	1.52	0.91
	2	5.52	1.57	0.86
	3	4.60	2.05	0.81

Continuación cuadro H.1: Concentración y valores de pureza del ADN extraído de las muestras de semen...

Muestra	Réplica	Concentración (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
P-33	1	32.00	1.83	1.14
	2	33.20	1.84	1.19
	3	35.60	1.88	1.16
P-34	1	3.90	1.88	0.64
	2	5.40	1.71	0.80
	3	4.00	2.05	0.66
P-35	1	20.20	2.13	0.89
	2	22.10	1.98	0.90
	3	24.20	1.79	0.96
P-36	1	9.30	1.71	0.55
	2	9.60	1.69	0.55
	3	9.20	1.72	0.54
P-37	1	3.10	2.70	0.58
	2	4.50	1.51	0.77
	3	4.40	1.46	0.73
P-38	1	6.30	1.47	0.78
	2	6.40	1.55	0.83
	3	6.80	1.47	0.83
P-39	1	1.80	2.81	0.49
	2	1.70	1.64	0.41
	3	2.00	1.81	0.50
P-40	1	4.30	2.31	0.28
	2	3.70	2.91	0.34
	3	3.80	2.74	0.33
P-41	1	8.70	2.48	0.57
	2	8.74	2.46	0.63
	3	9.70	2.26	0.67
P-42	1	6.00	2.77	0.40
	2	6.10	2.86	0.42
	3	6.40	2.67	0.42
P-43	1	5.70	2.83	0.89
	2	5.80	2.99	0.89
	3	6.50	2.22	0.90
P-44	1	13.10	2.20	1.33
	2	13.10	2.40	1.30
	3	13.20	2.09	1.31
P-45	1	1.60	3.91	0.41
	2	0.80	4.55	0.24
	3	0.50	3.80	0.17
P-46	1	6.10	2.30	0.60
	2	5.80	2.38	0.58
	3	5.10	2.38	0.31
P-47	1	4.80	2.59	0.30
	2	4.60	2.07	0.29
	3	4.30	2.74	0.28
P-48	1	2.00	3.71	0.41
	2	2.20	4.49	0.60
	3	2.40	4.97	0.54

Continuación cuadro H.1: Concentración y valores de pureza del ADN extraído de las muestras de semen...

Muestra	Réplica	Concentración (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
P-49	1	6.90	2.10	0.57
	2	6.80	2.30	0.56
	3	7.50	2.13	0.56
P-50	1	3.50	2.59	0.28
	2	3.20	2.49	0.29
	3	3.70	2.46	0.32
P-51	1	1.10	2.07	0.54
	2	1.50	2.58	0.50
	3	1.70	2.03	0.57
P-52	1	1.50	1.90	0.18
	2	1.70	2.73	0.21
	3	2.70	2.59	0.28
P-53	1	3.90	3.35	0.22
	2	4.20	2.74	0.24
	3	3.90	4.06	0.23
P-54	1	7.40	2.86	0.44
	2	7.70	2.91	0.45
	3	7.60	2.62	0.44
P-55	1	6.30	2.20	0.51
	2	5.80	1.96	0.52
	3	5.40	1.89	0.51
P-56	1	2.00	2.55	0.45
	2	1.70	3.00	0.43
	3	1.90	2.51	0.47
P-57	1	8.40	1.94	0.42
	2	12.80	1.88	0.53
	3	8.70	1.87	0.46
P-58	1	5.80	2.13	0.64
	2	5.70	2.29	0.66
	3	7.00	1.91	0.67
P-59	1	2.20	3.34	0.39
	2	2.70	3.83	0.42
	3	2.90	3.05	0.42
P-60	1	8.60	2.33	0.44
	2	9.10	1.91	0.46
	3	8.50	2.11	0.43
P-61	1	11.40	1.89	0.59
	2	9.90	1.82	0.56
	3	11.40	1.79	0.56
P-62	1	3.40	2.05	0.55
	2	3.50	1.99	0.46
	3	2.70	2.33	0.44

Cuadro H.2: Promedio de la concentración y valores de pureza del ADN extraído de las muestras de semen.

Muestra	Concentración (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
P-01	3.03	1.53	0.22
P-02	3.07	2.13	0.18
P-03	5.77	1.79	0.31
P-04	3.80	2.11	0.29
P-05	4.27	1.65	0.19
P-06	11.63	1.78	0.39
P-07	3.40	2.10	0.27
P-08	15.93	1.96	0.68
P-09	3.37	1.97	0.26
P-10	21.27	1.87	0.71
P-11	6.20	2.01	0.31
P-12	7.07	2.31	0.32
P-13	4.63	2.17	0.31
P-14	12.20	1.74	0.39
P-15	4.87	1.94	0.24
P-16	8.07	1.82	0.28
P-17	6.73	1.96	0.36
P-18	3.73	1.65	0.23
P-19	7.53	1.87	0.40
P-20	2.60	1.98	0.33
P-21	12.63	1.66	0.58
P-22	4.67	1.57	0.24
P-23	16.17	1.65	1.02
P-24	6.50	1.71	0.70
P-25	4.60	1.50	0.37
P-26	5.50	1.76	0.42
P-27	6.90	1.77	0.62
P-28	5.37	1.50	0.46
P-29	3.20	1.39	0.38
P-30	3.97	2.28	0.43
P-31	8.23	1.96	1.10
P-32	5.00	1.71	0.86
P-33	33.60	1.85	1.16
P-34	4.43	1.88	0.70
P-35	22.17	1.97	0.92
P-36	9.37	1.71	0.55
P-37	4.00	1.89	0.69
P-38	6.50	1.50	0.81
P-39	1.83	2.09	0.47
P-40	3.93	2.65	0.32
P-41	8.93	2.40	0.62
P-42	6.17	2.77	0.41
P-43	6.00	2.68	0.89
P-44	13.13	2.23	1.31
P-45	0.97	4.09	0.27
P-46	5.67	2.35	0.50
P-47	4.57	2.47	0.29
P-48	2.20	4.39	0.52
P-49	7.07	2.18	0.56
P-50	3.47	2.51	0.30

Continuación cuadro H.2: Promedio de la concentración y valores de pureza del ADN extraído de las muestras de semen...

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (ng/uL)</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
P-51	1.43	2.23	0.54
P-52	1.97	2.41	0.22
P-53	4.00	3.38	0.23
P-54	7.57	2.80	0.44
P-55	5.83	2.02	0.51
P-56	1.87	2.69	0.45
P-57	9.97	1.90	0.47
P-58	6.17	2.11	0.66
P-59	2.60	3.41	0.41
P-60	8.73	2.12	0.44
P-61	10.90	1.83	0.57
P-62	3.20	2.12	0.48

Cuadro H.3: Parámetros seminales importantes de las muestras de semen.

Muestra	Concentración espermática (millones/mL)	Movilidad progresiva (%)	ITZ	Formas normales (%)
P-01	74.7	64.0	1.51	1.0
P-02	21.7	15.0	1.71	1.0
P-03	190.0	68.0	1.57	3.0
P-04	3.7	38.0	1.58	1.0
P-05	56.3	12.0	1.68	1.0
P-06	233.3	74.0	1.67	7.0
P-07	54.0	53.0	1.64	3.0
P-08	114.0	76.0	1.62	2.0
P-09	24.3	31.0	1.87	3.0
P-10	256.3	7.0	1.61	10.0
P-11	114.3	75.0	1.79	1.0
P-12	29.7	48.0	1.65	2.0
P-13	51.7	50.0	1.42	1.0
P-14	128.3	35.0	1.89	0.0
P-15	116.7	79.0	1.63	1.0
P-16	64.7	64.0	1.51	1.0
P-17	103.3	56.0	1.75	0.0
P-18	58.7	64.0	1.56	3.0
P-19	58.0	57.0	1.56	5.0
P-20	57.0	79.0	1.87	5.0
P-21	270.0	78.0	1.53	1.0
P-22	1.0	4.0	-	-
P-23	308.3	41.0	1.87	1.0
P-24	2.7	21.0	1.85	0.0
P-25	44.7	61.0	1.57	4.0
P-26	75.0	79.0	1.74	4.0
P-27	64.7	47.0	1.96	2.0
P-28	113.3	78.0	1.71	4.0
P-29	17.0	60.0	1.69	5.0
P-30	39.3	50.0	1.82	4.0
P-31	27.0	45.0	2.11	5.0
P-32	31.0	55.0	1.75	2.0
P-33	123.0	64.0	1.71	0.0
P-34	43.0	66.0	1.42	2.0
P-35	150.0	67.0	1.44	6.0
P-36	4.3	33.0	1.90	0.0
P-37	61.7	83.0	1.34	2.0
P-38	90.7	73.0	1.55	1.0
P-39	5.7	39.0	1.64	2.0
P-40	123.7	63.0	1.42	1.0
P-41	62.0	2.0	1.41	2.0
P-42	84.0	58.0	1.55	5.0
P-43	44.3	37.0	1.56	6.0
P-44	124.7	71.0	1.50	8.0
P-45	85.0	85.0	1.65	6.0
P-46	29.3	75.0	1.98	0.0
P-47	206.7	65.0	1.90	2.0
P-48	17.3	55.0	1.61	5.0
P-49	67.7	9.0	1.87	0.0

Continuación cuadro H.3: Parámetros seminales importantes de las muestras de semen...

<b>Muestra</b>	<b>Concentración espermática (millones/mL)</b>	<b>Movilidad progresiva (%)</b>	<b>ITZ</b>	<b>Formas normales (%)</b>
P-50	51.3	59.0	1.61	7.0
P-51	12.0	19.0	1.58	1.0
P-52	42.7	41.0	1.94	0.0
P-53	17.0	45.0	1.76	1.0
P-54	15.7	46.0	1.57	3.0
P-55	33.0	39.0	1.60	2.0
P-56	49.3	70.0	1.59	1.0
P-57	55.0	55.0	1.80	4.0
P-58	88.0	29.0	2.03	0.0
P-59	37.3	52.0	1.76	2.0
P-60	32.0	37.0	1.61	3.0
P-61	43.7	56.0	1.82	1.0
P-62	3.3	45.0	1.78	0.0

---

Presencia de VPH y *SDFI* en las muestras de semen.

---

Cuadro I.1: Presencia de VPH y *SDFI* en las muestras de semen.

Muestra	Presencia de VPH	SDFI (%)
P-01	Positivo	5.5
P-02	Negativo	7.8
P-03	Negativo	11.6
P-04	Positivo	27.3
P-05	Negativo	27.4
P-06	Negativo	3.5
P-07	Negativo	38.0
P-08	Negativo	5.5
P-09	Negativo	3.9
P-10	Negativo	9.7
P-11	Positivo	17.1
P-12	Negativo	7.7
P-13	Negativo	12.9
P-14	Negativo	2.2
P-15	Positivo	5.3
P-16	Positivo	4.5
P-17	Positivo	11.5
P-18	Positivo	4.1
P-19	Positivo	5.2
P-20	Negativo	8.2
P-21	Negativo	4.3
P-22	Negativo	9.9
P-23	Negativo	15.4
P-24	Positivo	3.3
P-25	Positivo	2.7
P-26	Negativo	1.9
P-27	Positivo	3.3
P-28	Positivo	0.9
P-29	Positivo	1.2
P-30	Positivo	20.2
P-31	Positivo	7.5
P-32	Negativo	12.9
P-33	Positivo	3.9
P-34	Positivo	6.2
P-35	Positivo	6.3
P-36	Positivo	3.5
P-37	Positivo	1.7
P-38	Positivo	17.4
P-39	Positivo	7.6
P-40	Positivo	7.5
P-41	Positivo	8.0
P-42	Positivo	7.6
P-43	Positivo	26.6
P-44	Positivo	11.2
P-45	Positivo	11.0
P-46	Positivo	4.8
P-47	Positivo	1.4
P-48	Positivo	4.2

Continuación cuadro I.1: Presencia de VPH y *SDFI* en las muestras de semen...

Muestra	Presencia de VPH	SDFI (%)
P-49	Negativo	32.4
P-50	Positivo	7.6
P-51	Positivo	1.4
P-52	Positivo	14.2
P-53	Positivo	12.6
P-54	Positivo	2.0
P-55	Positivo	1.6
P-56	Positivo	1.5
P-57	Positivo	10.4
P-58	Positivo	32.0
P-59	Positivo	2.3
P-60	Positivo	2.6
P-61	Positivo	18.1
P-62	Positivo	4.2

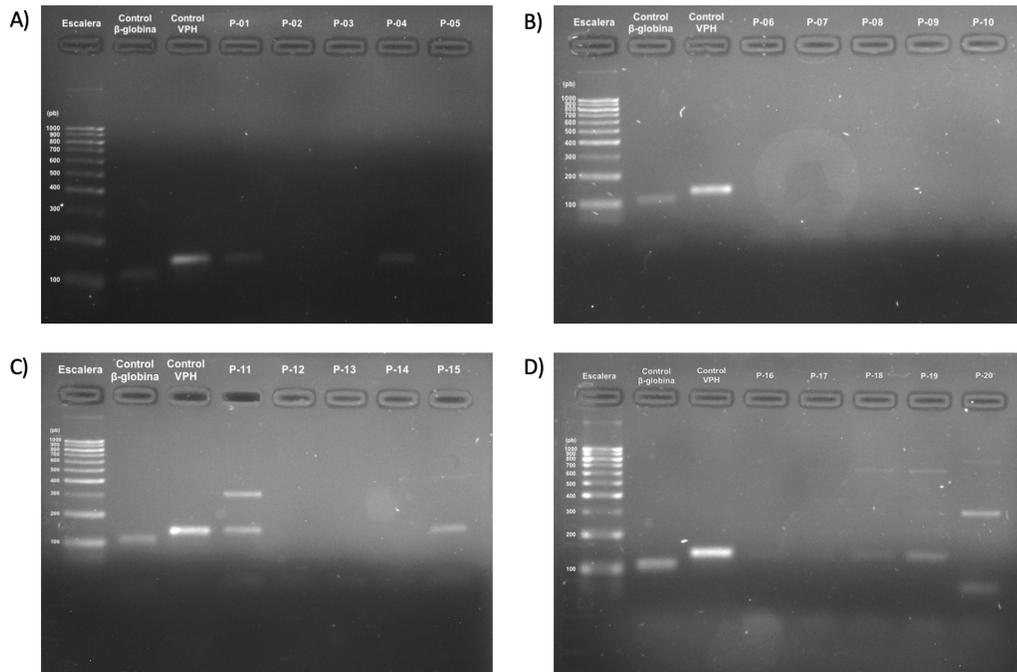


Figura I.1: Detección de VPH en muestras P-01 a P-20 de semen por medio de PCR punto final.

A) P-01 a P-05, B) P-06 a P-10, C) P-11 a P-15 y D) P-16 a P-20.

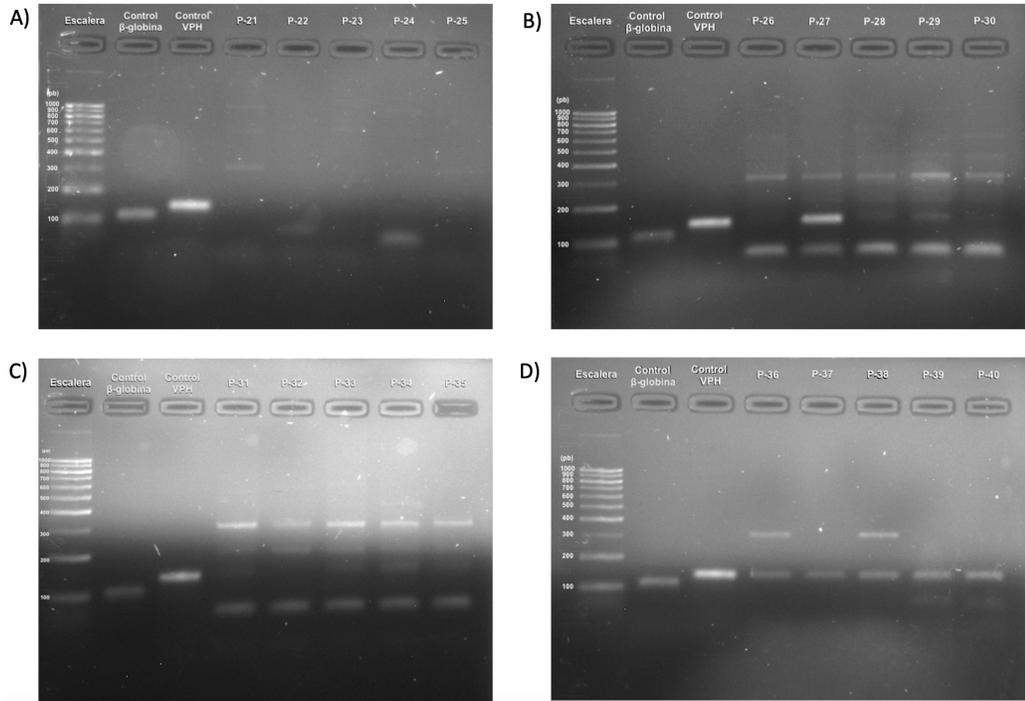


Figura I.2: Detección de VPH en muestras P-21 a P-40 de semen por medio de PCR punto final.  
 A) P-21 a P-25, B) P-26 a P-30, C) P-31 a P-35 y D) P-36 a P-40.

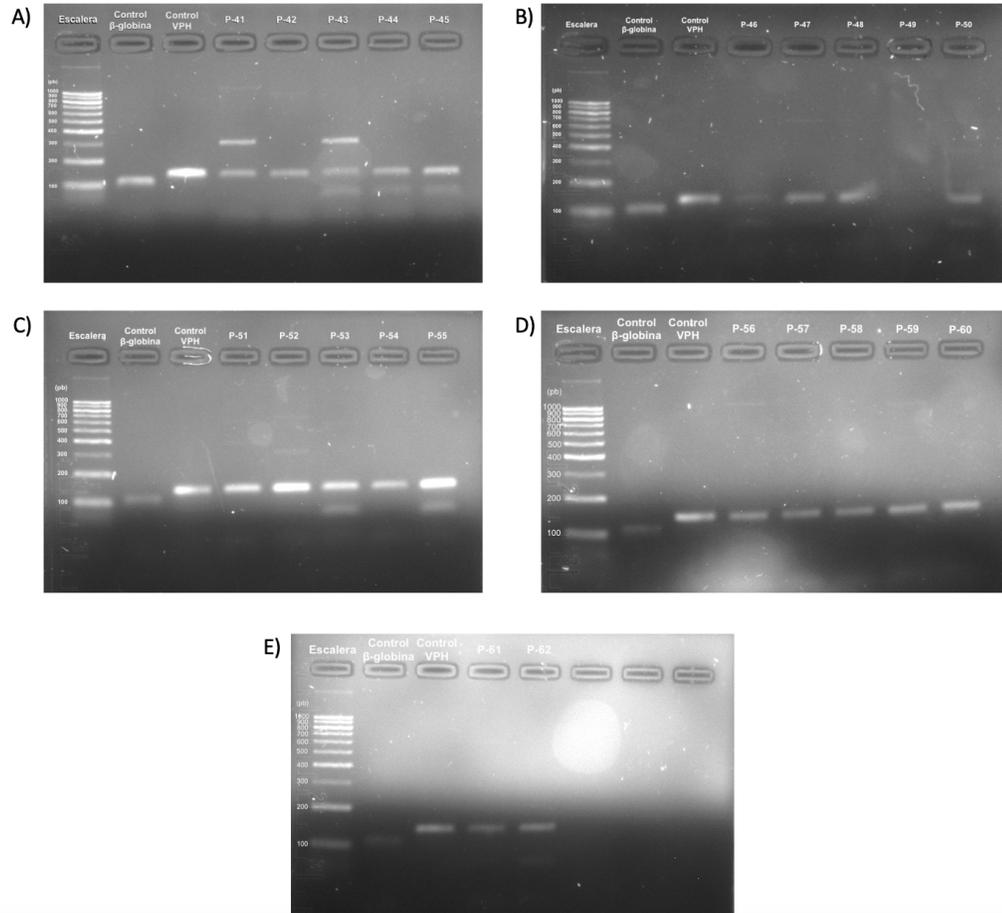


Figura I.3: Detección de VPH en muestras P-41 a P-55 de semen por medio de PCR punto final.  
 A) P-41 a P-45, B) P-46 a P-50, C) P-51 a P-55, D) P-56 a P-60 y E) P-61 a P-62.

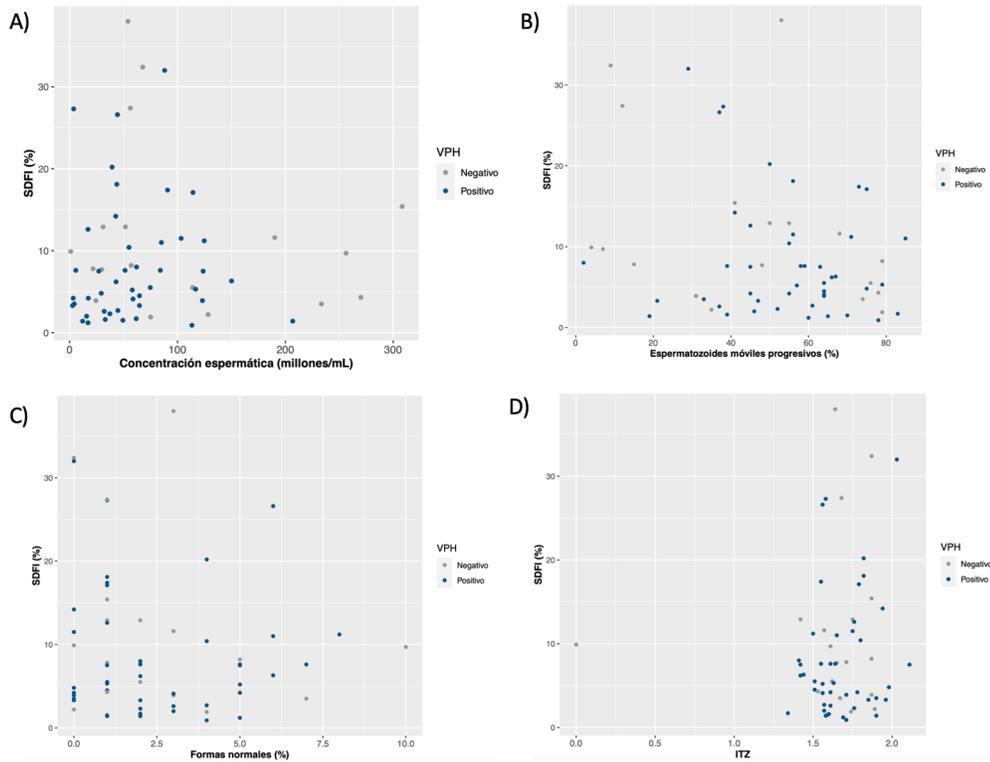


Figura I.4: *SDFI* y presencia de VPH en función de A) Concentración espermática (millones/mL), B) Espermatozoides móviles progresivos (%), C) Formas normales y D) Índice de teratozoospermia (ITZ).