



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Determinación de la coinfección entre el Virus del Papiloma Humano y *Chlamydia trachomatis* en muestras de semen en pacientes mexicanos con problemas de fertilidad.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

KARINA YARENI CRUZ MONTOYA

ASESORA:

Dra. MARÍA OLIVIA MEDEL FLORES

COASESORA:

Dra. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Determinación de la coinfección entre el Virus del Papiloma Humano y Chlamydia trachomatis en muestras de semen en pacientes mexicanos con problemas de fertilidad.**

Que presenta la pasante: **Karina Yareni Cruz Montoya**  
Con número de cuenta: **313022184** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de octubre de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

J.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Determinación de la coinfección entre el Virus del Papiloma Humano y Chlamydia trachomatis en muestras de semen en pacientes mexicanos con problemas de fertilidad.**

Que presenta la pasante: **Karina Yareni Cruz Montoya**

Con número de cuenta: **313022184** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de octubre de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	_____
<b>VOCAL</b>	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	_____
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.  
ALUMNOS DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA**  
**Jefa del Departamento de Titulación**  
**de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Determinación de la coinfección entre el Virus del Papiloma Humano y Chlamydia trachomatis en muestras de semen en pacientes mexicanos con problemas de fertilidad.**

Que presenta la pasante: **Karina Yareni Cruz Montoya**  
Con número de cuenta: **313022184** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de octubre de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	_____
<b>VOCAL</b>	<u>M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado</u>	_____
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>M. en C. María Guadalupe Avilés Robles</u>	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Q.F.B. David Ladislao Sánchez</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA**  
**Jefa del Departamento de Titulación**  
**de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Determinación de la coinfección entre el Virus del Papiloma Humano y Chlamydia trachomatis en muestras de semen en pacientes mexicanos con problemas de fertilidad.**

Que presenta la pasante: **Karina Yareni Cruz Montoya**  
Con número de cuenta: **313022184** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de octubre de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	_____
<b>VOCAL</b>	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	_____
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVANZADA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

UNIVERSIDAD NACIONAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA**  
**Jefa del Departamento de Titulación**  
**de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Determinación de la coinfección entre el Virus del Papiloma Humano y Chlamydia trachomatis en muestras de semen en pacientes mexicanos con problemas de fertilidad.**

Que presenta la pasante: **Karina Yareni Cruz Montoya**  
Con número de cuenta: **313022184** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de octubre de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	_____
<b>VOCAL</b>	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	_____
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

## DEDICATORIAS

A mis padres, Irma Montoya y Rogelio Cruz por su infinito amor, apoyo incondicional y motivación en todo momento, por toda su paciencia y por siempre creer en mí. Gracias por todo lo que me han enseñado, recuerden que este logro también es de ustedes y siempre voy a valorar todo lo que me han dado; todos los días que me han tolerado, en los buenos y en los malos, por ayudarme a seguir mis sueños y por corregirme cuando ha sido necesario, siempre serán mi gran ejemplo a seguir. Por educarme en valores que siempre me acompañarán y que han formado mi carácter y personalidad. Los amo.

A mis hermanas Anahí Cruz y Ximena Cruz espero que este trabajo las inspire y logren todas sus metas, recuerden que las cosas no llegan fácil, que el ser constantes nos llevan a grandes cosas. Estoy muy orgullosa por lo que han logrado. Las amo.

*A Alan...*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesoras, a la Dra. Maritere Domínguez por creer en mí, por todo su apoyo, cariño y por su constante motivación para terminar esta etapa tan importante, a la Dra. Olivia Medel por su atención durante mi estancia en el laboratorio, por su paciencia y consejos para lograr este proyecto y finalmente a la Dra. Virginia Sánchez por todo lo que me brindó en el laboratorio, les agradezco infinitamente que valorarán todos mis logros porque eso me ayudó a confiar en mí misma, muchas gracias a las tres porque no solo me han enseñado a crecer en el ámbito académico que me ayudará en lo laboral, sino por enseñarme que se tiene que trabajar más para lograr lo que queremos, que si bien no sale todo al primer intento, la perseverancia es la clave, mi respeto y admiración para ustedes.

A mis sinodales por su tiempo invertido en la revisión de este trabajo, por sus consejos y grandes enseñanzas a lo largo de toda la carrera.

A mis amigos de la FES, a Brenda, Kelly, Karen y Oscar por su amistad, cariño y amor durante cuatro años, así como su apoyo y ayuda durante toda la carrera, por hacer todos estos años más divertidos, nunca olvidaré todos los momentos que pasamos juntos, espero que logren todo lo que se propongan. Los quiero mucho.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar y por permitirme lograr mis metas en sus aulas, por los maestros que me han inspirado y ayudado, gracias por darme las herramientas necesarias durante toda mi estancia en esta institución que no solo me ha brindado conocimiento, sino que me ha dado amigos y momentos que nunca voy a olvidar.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS .....	12
ÍNDICE DE TABLAS .....	13
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	15
RESUMEN .....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
MARCO TEÓRICO.....	19
Capítulo 1. Virus del Papiloma Humano.....	19
1.1 Generalidades. ....	19
1.2 Material genético y replicación.....	20
1.3 Genotipos frecuentes.....	23
1.4 Genotipos oncogénicos; mecanismo. ....	23
1.5 Alteraciones a nivel celular causadas por VPH en hombres. ....	24
1.6 Importancia y método de detección.....	24
Capítulo 2. <i>Chlamydia trachomatis</i> . ....	28
2.1 Generalidades. ....	28
2.2 Material Genético y replicación. ....	28
2.3 Alteraciones a nivel celular causadas por CT en hombres.....	30
2.4 Importancia y método de detección.....	30
Capítulo 3. Coinfección entre el virus del Papiloma Humano y <i>Chlamydia trachomatis</i> en hombres. ....	31
3.1 Relación entre VPH y CT en la alteración del espermatozoide. ....	31
3.2 Mecanismo de acción de ambos patógenos para la carcinogénesis. ....	32
Capítulo 4. Infertilidad masculina y análisis espermático.....	32
4.1 Infertilidad masculina.....	32
4.2 Análisis espermático.....	33
JUSTIFICACIÓN .....	35
OBJETIVOS .....	36
DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL .....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38

Materiales: .....	38
Métodos: .....	39
• Población.....	39
• Extracción de Material Genético.....	39
• Cuantificación de DNA.....	39
• Valoración cualitativa del DNA.....	40
• Evaluación de la viabilidad del material genético:.....	40
• Identificación del virus de VPH por medio de los primers: LC1, LC2, MY09, MY11 y GP05, GP06. ....	41
• PCR multiplex para detección de genotipos del Virus del Papiloma Humano:.....	43
• Detección de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	44
RESULTADOS .....	47
• Integridad del DNA.....	47
• Determinación de la viabilidad del material genético por amplificación del gen de $\beta$ globina. ....	47
• Identificación del virus. ....	48
• Genotipos.....	53
• Identificación de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	55
DISCUSIÓN.....	65
CONCLUSIONES .....	69
REFERENCIAS.....	70
ANEXO .....	75

## ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	<b>(DNA)</b>	Infección por el Virus del Papiloma Humano con genotipos de alto riesgo e infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(VPH (AR)/CT+)</b>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(CT)</b>		
Control negativo	<b>(C-)</b>	Infección por el Virus del Papiloma Humano con genotipos de bajo riesgo e infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(VPH (BR)/CT+)</b>
Control positivo	<b>(C+)</b>		
Cuerpo Elemental de <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(CE)</b>		
Cuerpo Reticular de <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(CR)</b>	Infección por el Virus del Papiloma Humano con genotipos de alto y bajo riesgo e infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(VPH (AR/BR) /CT+)</b>
Desoxirribonucleótidos trifosfatados	<b>(dNTP's)</b>		
Genes early del Virus del Papiloma Humano	<b>(E)</b>	Infección por el Virus del Papiloma Humano sin genotipos identificados e infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(VPH+ (SG) /CT+)</b>
Genes late del Virus del Papiloma Humano	<b>(L)</b>		
Infección de transmisión sexual	<b>(ITS)</b>	Infección por el Virus del Papiloma Humano con genotipos de alto riesgo sin infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(VPH (AR)/CT-)</b>
Long Control Region	<b>(LCR)</b>		
Marcador de peso molecular	<b>(MPM)</b>	Infección por el Virus del Papiloma Humano con genotipos de bajo riesgo sin infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(VPH (BR)/CT-)</b>
Proteína del retinoblastoma	<b>(pRB)</b>		
Proteína principal de la membrana externa de <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(MOMP)</b>	Infección por el Virus del Papiloma Humano con genotipos de alto y bajo riesgo sin infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(VPH (AR/BR) /CT-)</b>
Reacción en Cadena de la Polimerasa	<b>(PCR)</b>		
Temperatura de alineamiento	<b>(Tm)</b>	Infección por el Virus del Papiloma Humano sin genotipos identificados e infección negativa por <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(VPH+ (SG) /CT-)</b>
Upper Regulatory Region	<b>(URR)</b>		
Valor de referencia	<b>(VR)</b>		
Virus del Papiloma Humano	<b>(VPH)</b>	Infección negativa por el Virus del Papiloma Humano e infección positiva por <i>Chlamydia trachomatis</i>	<b>(VPH-/CT+)</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del virión de VPH.....	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b> Conformación estructural del DNA genómico de VPH.....	<b>15</b>
<b>Figura 3.</b> Técnica de PCR.....	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b> Regiones amplificadas de VPH por los primers universales.....	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b> Genotipos de VPH y características.....	<b>21</b>
<b>Figura 6.</b> Ciclo de desarrollo de CT.....	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Localización de los microorganismos en el espermatozoide.....	<b>25</b>
<b>Figura 8.</b> Visualización de cada genotipo en electroforesis.....	<b>38</b>
<b>Figura 9.</b> Integridad de las muestras de DNA.....	<b>40</b>
<b>Figura 10.</b> Electroforesis del gen de $\beta$ Globina.....	<b>41</b>
<b>Figura 11.</b> Estandarización de $MgCl_2$ para el par de primers MY09/MY11.....	<b>41</b>
<b>Figura 12.</b> Resultados de la identificación del virus con MY09/MY11.....	<b>42</b>
<b>Figura 13.</b> Estandarización de la $T_m$ para L1C1/L2C2.....	<b>42</b>
<b>Figura 14.</b> Resultados de la identificación del virus con L1C1/L2C2.....	<b>43</b>
<b>Figura 15.</b> Estandarización de $MgCl_2$ para el par de primers Gp5/Gp6.....	<b>43</b>
<b>Figura 16.</b> Resultados de la identificación del virus con Gp5/Gp6.....	<b>44</b>
<b>Figura 17.</b> Genotipificación de las muestras 140-145.....	<b>47</b>
<b>Figura 18.</b> Estandarización de $MgCl_2$ para el par de primers KL1/KL2.....	<b>48</b>
<b>Figura 19.</b> Estandarización de $MgCl_2$ para la reamplificación de CT.....	<b>48</b>
<b>Figura 20.</b> Resultados de la identificación de CT.....	<b>49</b>
<b>Figura 21.</b> Resultados de la reamplificación de CT.....	<b>49</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación del VPH.....	<b>14</b>
<b>Tabla 2.</b> Subtipos, genotipos y lesiones provocadas por VPH.....	<b>14</b>
<b>Tabla 3.</b> Proteínas del virus y sus funciones.....	<b>16</b>
<b>Tabla 4.</b> Serogrupos de CT y patologías que produce.....	<b>22</b>
<b>Tabla 5.</b> Causas de la infertilidad masculina.....	<b>27</b>
<b>Tabla 6.</b> Características de los primers de $\beta$ Globina.....	<b>34</b>
<b>Tabla 7.</b> Características de los reactivos para la PCR del gen de $\beta$ Globina.....	<b>34</b>
<b>Tabla 8.</b> Condiciones de la reacción en el termociclador para amplificar el gen de $\beta$ Globina.....	<b>34</b>
<b>Tabla 9.</b> Características de los primers L1/C1/L2C2.....	<b>35</b>
<b>Tabla 10.</b> Características de los reactivos para la identificación del virus por PCR con L1/C1/L2C2.....	<b>35</b>
<b>Tabla 11.</b> Condiciones de la reacción en el termociclador para llevar a cabo la identificación del virus con L1/C1/L2C2.....	<b>35</b>
<b>Tabla 12.</b> Características de los primers MY09/MY11 para la identificación del virus.....	<b>35</b>
<b>Tabla 13.</b> Características de los reactivos para la identificación del virus por PCR con MY09/MY11.....	<b>36</b>
<b>Tabla 14.</b> Condiciones de la reacción en el termociclador para llevar a cabo la identificación del virus con MY09/MY11.....	<b>36</b>
<b>Tabla 15.</b> Características de los primers Gp5/Gp6 para la identificación del virus.....	<b>36</b>
<b>Tabla 16.</b> Características de los reactivos para la identificación del virus por PCR con Gp5/Gp6.....	<b>36</b>
<b>Tabla 17.</b> Condiciones de la reacción en el termociclador para llevar a cabo la identificación del virus con Gp5/Gp6.....	<b>37</b>
<b>Tabla 18.</b> Características de los reactivos para llevar a cabo la genotipificación por PCR multiplex.....	<b>37</b>
<b>Tabla 19.</b> Condiciones de la reacción en el termociclador para la genotipificación.....	<b>37</b>
<b>Tabla 20.</b> Características de los primers KL1/KL2 para identificar CT en las muestras.....	<b>38</b>

<b>Tabla 21.</b> Características de los reactivos para la identificación de la bacteria por PCR con KL1/KL2.....	<b>38</b>
<b>Tabla 22.</b> Condiciones de la reacción en el termociclador para llevar a cabo la identificación de la bacteria con KL1/KL2.....	<b>39</b>
<b>Tabla 23.</b> Características de los reactivos para la reamplificación del producto de PCR de CT.....	<b>39</b>
<b>Tabla 24.</b> Condiciones de la reacción en el termociclador para llevar a cabo la identificación de CT.....	<b>39</b>
<b>Tabla 25.</b> Resultados de VPH.....	<b>44</b>
<b>Tabla 26.</b> Genotipos encontrados de VPH en las muestras de semen.....	<b>45</b>
<b>Tabla 27.</b> Resultados de CT.....	<b>50</b>
<b>Tabla 28.</b> Resultados de la infección en las muestras de semen.....	<b>50</b>
<b>Tabla 29.</b> Resultados de VPH y genotipos, así como los resultados de CT.....	<b>51</b>
<b>Tabla 30.</b> Tipos de infección encontradas en las muestras entre VPH y CT.....	<b>53</b>
<b>Tabla 31.</b> Alteraciones espermáticas en muestras coinfectadas.....	<b>54</b>
<b>Tabla 32.</b> Alteraciones espermáticas en muestras infectadas únicamente por VPH.....	<b>56</b>
<b>Tabla 33.</b> Alteraciones espermáticas en muestras infectadas únicamente por CT.....	<b>57</b>
<b>Tabla 34.</b> Resumen de mayores alteraciones espermáticas encontradas en los tipos de infección.....	<b>61</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Resultados de la identificación de VPH en muestras de semen.....	<b>44</b>
<b>Gráfica 2.</b> Resultados de genotipificación de VPH en las muestras.....	<b>46</b>
<b>Gráfica 3.</b> Resultados de la infección de CT en muestras de semen.....	<b>50</b>
<b>Gráfica 4.</b> Resultados de la coinfección, así como la presencia de cada microorganismo en las muestras.....	<b>51</b>
<b>Gráfica 5.</b> Tipos de infección en las muestras de semen de VPH y CT.....	<b>54</b>

## RESUMEN

Las infecciones de transmisión sexual han ido aumentando en los últimos años, el Virus del Papiloma Humano (VPH) y *Chlamydia trachomatis* (CT) resultan ser de los microorganismos más frecuentes, sin embargo, la identificación de estos patógenos en hombres es reducida. La infertilidad masculina ha sido considerada como una patología con múltiples factores, entre estos, las infecciones de transmisión sexual representan aproximadamente un 15% de los casos que se puede entender como la incapacidad de concebir por más de un año, sin uso de un método anticonceptivo.

Se ha demostrado que las infecciones en el tracto reproductor masculino tiene implicaciones, que a pesar de que se encuentra en constante renovación epitelial puede causar alteraciones en los parámetros espermáticos, además, dependiendo de la infección por la que cursa el paciente (VPH con genotipos de alto riesgo) no sólo pueden encontrarse estas alteraciones sino una mayor probabilidad de padecer cáncer de próstata, sin embargo, la mayoría de las infecciones producidas por CT suelen ser asintomáticas por lo que el diagnóstico no se lleva a cabo a tiempo.

Ambos microorganismos estudiados en la presente tesis logran ser los causantes de las alteraciones morfológicas del espermatozoide, además de otros parámetros como el pH y la movilidad espermática, anormalidades que se pueden reportar en las espermatobioscopías. El objetivo de este trabajo fue realizar la identificación de estos patógenos, si están en infección simple o coinfectados, así como los genotipos más frecuentes en este tipo de población y definir si hay una mayor alteración en los parámetros espermáticos en muestras coinfectadas que en muestras con infección simple esto mediante técnicas moleculares como PCR de punto final, anidada y multiplex para demostrar que el semen de los pacientes coinfectados es de menor calidad.

Se encontraron 76 muestras infectadas únicamente por VPH, 41 muestras coinfectadas, 22 muestras con CT y 10 negativas, se encontró que hay diferencia en el pH entre muestras infectadas únicamente por VPH y muestras coinfectadas, así como una mayor alteración en la cabeza del espermatozoide en coinfectados, sin embargo, estos resultados no son definitivos ya que el número de muestras para cada tipo de infección difiere. El genotipo más frecuente de VPH fue el 52 que es de alto riesgo.

## INTRODUCCIÓN

Los virus papiloma están ampliamente distribuidos en la naturaleza; infectan piel y mucosas en sus hospederos naturales (hombres, otros mamíferos y aves) produciendo lesiones epiteliales proliferativas (verrugas) que por lo general regresan espontáneamente (Carballal, 2014). La importancia de la detección del Virus del Papiloma Humano (VPH) en hombres radica en disminuir los casos de infección y con esto reducir enfermedades ya descritas como cáncer cervicouterino, pues al reducir la infección en hombres también lo podríamos disminuir en la mujer. El VPH también puede producir verrugas genitales tanto en hombres como en mujeres. Las infecciones por el VPH se transmiten por contacto sexual. (OMS, 2017).

Las pruebas del ácido nucleico constituyen un método sensible para determinar la presencia de una infección activa por VPH de alto riesgo, ya que el virus del papiloma humano es muy difícil de cultivar *in vitro*, y no todos los pacientes infectados presentan un título de anticuerpos detectable (Instituto Nacional de Salud Pública, 2015). El estudio se realizó en pacientes de 22-49 años, en donde se encontraron anomalías en sus espermatobioscopías como el pH, el porcentaje de espermatozoides anormales, así como sus características (de cabeza, pieza intermedia y cola).

Además del Virus del Papiloma Humano, la infección bacteriana por *Chlamydia trachomatis* (CT) es frecuente entre la población, con una prevalencia global de 1.5% para personas menores de los 50 años de edad, sin embargo, en jóvenes de 15-24 años que son sexualmente activos, se reporta una prevalencia del 10% (Huneeus, 2018). Es una bacteria intracelular obligada, es patógena en humanos y pertenece a la familia *Chlamydiaceae*, existen 15 serovariedades, clasificadas con base en la variabilidad antigénica de la proteína principal de la membrana externa (Major outer membrane protein; MOMP) (Lara, 2018).

Un estudio realizado por (Hernanz, 2016) y colaboradores mencionan que la infección por *Chlamydia trachomatis* es más prevalente en pacientes con infección por VPH, numerosos estudios hablan de su papel como cofactor del virus, aumentando el riesgo de contraerlo o favoreciendo su persistencia. La infección por *Chlamydia trachomatis* en hombres, se reportan casos de uretritis, epidídimo-orquitis y prostatitis. La importancia del diagnóstico de esta bacteria no sólo es por la infertilidad en hombres, sino que se menciona en algunos estudios que el espermatozoide como vehículo de infección que puede transmitir el microorganismo a su pareja y ocasionar en ella alteraciones graves en el tracto reproductor femenino (Morales, 2017).

El 70% de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* son asintomáticas en mujeres, mientras que la infección en hombres representa un 40%, al ser asintomática dificulta el diagnóstico en fases tempranas y por lo tanto un tratamiento oportuno, lo que hace aumentar la prevalencia en la población (Rodríguez, 2016).

En México, entre 4 y 5 millones de parejas sufren problemas de fertilidad y cada año se suman más, de acuerdo con información del Instituto Nacional de Estadística y Geografía. La infertilidad afecta a mujeres y hombres por igual. Los especialistas creen que este problema de salud va en aumento por circunstancias como el estrés, el consumo de alcohol y tabaco, la mala alimentación y la postergación de la maternidad, además de factores genéticos y hormonales. (Asociación Mexicana de Medicina de la Reproducción, 2018).

# MARCO TEÓRICO

## Capítulo 1. Virus del Papiloma Humano.

### 1.1 Generalidades.

La infección por el Virus del Papiloma Humano resulta ser de las más importantes en el mundo. El VPH causa infecciones cutáneas, anogenitales o cervicales, su transmisión es vía sexual, conlleva a diferentes enfermedades las cuales pueden ocasionar la muerte. Se considera que todo individuo que mantiene una sexualidad activa puede tener contacto con este patógeno, siendo los jóvenes un grupo importante que puede ser vulnerable debido al inicio de las relaciones sexuales sin algún método de protección.

Los Papillomavirus (Familia *Papillomaviridae*) son virus icosaédricos, pequeños, no envueltos, que poseen una doble cadena circular de DNA, genoma de 8 kb. Si bien la mayoría de las infecciones por papilomavirus humanos siguen siendo subclínicas o solo causan lesiones benignas, las infecciones por un subconjunto de VPH, conocidas como tipos de alto riesgo, pueden provocar cáncer (Ryu, 2016).

Los papilomavirus han desarrollado interacciones viral-huésped altamente específicas para facilitar la replicación del material genético viral. Los estudios se centran en las rutas e interacciones del huésped que el virus manipula y secuestra para replicar en los diferentes entornos celulares (McBride, 2017).

Los VPH preferentemente infectan un tipo de células, que son en las únicas que sobreviven, se habla de células epiteliales escamosas, que se encuentran en la superficie de la piel y en superficies húmedas, esto es en mucosas, que incluyen la vagina, cuello uterino, interior del prepucio, uretra del pene, tracto respiratorio (Society, 2019).

Este virus produce lesiones verrugosas, que pueden clasificarse como benignas o malignas, además puede existir de manera latente, es decir, cuando el VPH se encuentra en las células huésped sin manifestación clínica aparente, se hace mención de que el periodo de incubación puede ser de 2 a 3 meses o incluso de varios años (Bustamante, 2015).

Se puede considerar una clasificación del virus con base en epitelio al que infecta, tal como se muestra en la tabla 1:

**Tabla 1.** Clasificación del Virus del Papiloma Humano (Ryu, 2016)

Género VPH	Genotipo VPH	Tejido	Enfermedad
VPH - $\alpha$ (mucosa)	VPH-6, 11	Mucosa del tracto genital Mucosa del tracto respiratorio	Verrugas genitales Papiloma de laringe
	VPH-16, 18	Mucosa del tracto genital	Carcinoma cervical, Cáncer de orofaringe
VPH- $\beta$ (cutánea)	VPH-5,8	Epitelio de la piel	Cáncer de piel
VPH- $\mu$ (cutánea)	VPH-1	Epitelio de la piel	Verrugas
	VPH-38	Epitelio de la piel	Verrugas, cáncer de piel

Se describe el género de VPH, tejido al que infecta, así como los genotipos involucrados y las enfermedades con las que se relaciona.

Además, se puede clasificar en subtipos de bajo y alto riesgo con base en los genotipos relacionados con el tipo de lesiones que producen, considerando la infección vía sexual, tal como se presenta en la tabla 2.

**Tabla 2.** Subtipos del VPH de transmisión sexual, genotipos y lesiones. (Gross, 2014)

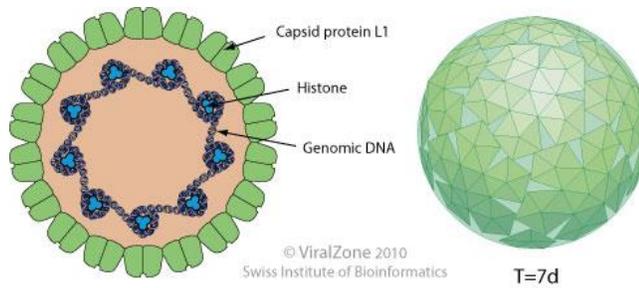
Subtipos	Genotipos	Lesiones
<b>Bajo riesgo</b>	6, 11, 26, 30, 34, 40, 42 - 44, 53,55,57, 61, 62, 63, 69, 70, 72, 73, 77, 79-82	Encontrados en lesiones verrugosas del área genital.
<b>Alto riesgo</b>	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 65, 67, 68	En lesiones con alto grado para displasia, carcinomas in situ y cánceres invasivos del cérvix, útero, vagina, ano, pene, entre otros.

Se presentan los subtipos de VPH que se transmiten vía sexual, así como los genotipos que se tiene en cada subtipo, además de las lesiones en las que están involucrados.

Este virus no genera una respuesta inmunitaria humoral, por lo tanto, no se ha podido clasificar en serotipos, sino que se establece basándose en las secuencias de las proteínas E6, E7 pero sobre todo con la de L1 ya que es una secuencia altamente conservada, se establece un nuevo tipo de virus cuando la secuencia de L1 varía en más de un 10% con respecto a los demás tipos de papilomavirus (Santos, 2015).

## 1.2 Material genético y replicación.

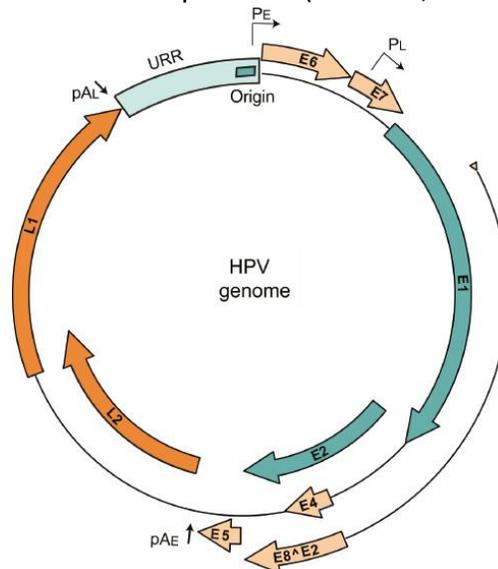
*Estructura del virión:* Son pequeños (60nm), partículas no envueltas, simetría icosaédrica. Proteínas de la cápside mayor y menor son L1 y L2 respectivamente, constituyen las cápsides virales. Dentro de las cápsides virales, el DNA genómico es asociado con histonas. (Ryu, 2016).



**Figura 1.** Estructura del virión de VPH, en donde se representa el DNA con histonas, además de la conformación de la cápside, la cápside icosaédrica está formada por 72 pentámeros (ViralZone, 2010)

*Estructura genómica:* Pertenecen a un grupo con genoma circular y pequeño, dsDNA, se habla de dos tipos de regiones, en los que se codifica aquellos genes en las etapas tempranas, conocidos como genes E (early) y aquellos que son codificados en etapas tardías, conocidas como L (late) (Zavaleta, 2017). De los cuales, cuatro son fundamentales, que pueden estar involucrados en la estructura del virus o en el proceso de replicación. En el primer caso, se reportan a los genes que codifican las proteínas L1 (que conforma un 95% de la cápside) y L2 (que representa 5% de la cápside), mientras que E1 y E2 se relacionan con la replicación viral (McBride, 2017).

Además, tiene una región llamada LCR (long control region), también conocida como URR (upper regulatory region), que no contiene genes, pero sí elementos importantes en procesos de regulación transcripcional, así como de replicación y donde se localizan promotores que inician la replicación (Carreras, 2008).



**Figura 2.** Conformación estructural del DNA genómico de un  $\alpha$ VPH. En azul se representa a las proteínas de replicación: E1 y E2. En color naranja se tiene a las proteínas estructurales: L1 y L2. Se señala la región reguladora (URR) aguas arriba. PL y PE son promotores tardíos y tempranos, pAE y pAL son los sitios de poliadenilación temprana y tardía. (McBride, 2017)

**Tabla 3:** Proteínas del virus y sus funciones (Ryu, 2016)

Proteínas	Funciones
E1	DNA Helicasa, proteína de unión al origen
E2	Transcripción viral/ regulador de la replicación
E4	Esencial para la función de E2
E5	Proteína asociada a la membrana, proliferación celular
E6	Proteína transformadora, P53 unión
E7	Proteína transformadora, pRB unión
L1	Proteína de cápside mayor
L2	Proteína de cápside menor

Principales funciones de las proteínas que codifica del DNA de VPH.

**Replicación:** Para llevar a cabo este proceso de una manera exitosa, el VPH debe llevar a cabo procesos para evadir al sistema inmune del huésped, lo que se basa en el ciclo replicativo del virus.

Los virus Papiloma, aprovechan un mecanismo de autorrenovación celular en los epitelios cutáneos y mucosos estratificados. Al provocarse una lesión, pueden infectar las células basales de manera persistente y en un nivel bajo, el genoma viral se replica extracromosómicamente, con un número de copias baja y una transcripción viral mínima, posteriormente se lleva a cabo la diferenciación celular, en donde se tienen altos niveles de síntesis de DNA viral y expresión génica, y mediante este proceso se evade al sistema inmune ya que las células diferenciadas no están sujetas a revisión por el sistema inmune (Stanley, 2012).

Para infectar a los queratinocitos basales, la proteína L1 del virión interactúa con los receptores heparán – sulfato y sindecano de la superficie celular. El ingreso del virión es mediante endocitosis dependiente de clatrina (Santos, 2015). Acto seguido, se lleva a cabo el desnudamiento viral y liberación del genoma, se mantiene en estado episomal en el núcleo, como ya se mencionó anteriormente, mantiene un número de copias bajas (20-50 copias), esto debido a que las células basales carecen del factor de proliferación celular (PCNA), el cual es necesario como factor de procesamiento de la enzima DNA polimerasa – d, que es de gran importancia en el proceso de replicación del DNA, por lo que la división celular es mínima.

Posteriormente en las células parabasales que, si contienen PCNA, se generan células del estrato espinoso bajo a las que se les transmite el genoma viral. La expresión de las proteínas virales se encuentra limitada en los diferentes estratos, en el estrato basal, parabasal y espinoso, solo se encuentra activa la expresión de las proteínas E, las cuales son indispensables para la replicación viral, mientras que las proteínas L y la producción de viriones se encuentran más activas en las capas celulares más externas, esto es, capas granular y estrato corneo. Se menciona que su ciclo de replicación no es del tipo lítico y los

viriones se eliminan a partir de las células descamativas en el estrato corneo de la epidermis. La replicación del virus y el ensamblaje se llevan a cabo a nivel nuclear (Vargas, 2016).

### 1.3 Genotipos frecuentes.

Los estudios epidemiológicos se centran en cifras de mujeres con cáncer de cuello uterino. En un artículo (López, 2012), reportan que el 99% de las mujeres infectadas por el virus resultaron genotipos de alto riesgo (16 y 18), mientras que solo el 1% corresponde a genotipos de bajo riesgo. Por otra parte, en un estudio realizado en mujeres en Michoacán menciona que el genotipo más frecuente fue el 59, además reportaron infecciones dobles que incluyen: 52-53, 51-59, 61-67, 66-11, 16-62 entre otros, en donde destaca la relación entre un genotipo de alto riesgo y uno de bajo riesgo, estos son: 52-53, 61-67, 16-62 (Jácome, 2017).

Un estudio que se basó en la detección de genotipos en muestras masculinas, realizado en el 2018, reportaron que el genotipo más frecuente fue el 52, representando un 33% de las muestras positivas para el VPH, mientras que el segundo más frecuente fue el 58 con un 17% de las muestras. (Medel, 2018). Otro estudio realizado en hombres, menciona que el genotipo más frecuente en su población con alteraciones espermáticas fue el 52 (Jersoviene, 2019).

### 1.4 Genotipos oncogénicos; mecanismo.

La progresión del cáncer se deriva de algunos factores, los que incluye, una infección persistente con genotipos virales conocidos de alto riesgo, así como la expresión génica desregulada, lo que conlleva a una proliferación celular excesiva, se incluye, además, una baja tasa de reparación del DNA lo que resulta en una acumulación de daños en la célula infectada. Esto puede ser debido a la capacidad de las proteínas E6 de alto riesgo para regular la actividad de la proteína P53, así como la del dominio PDZ y la capacidad de la proteína E7 de dirigirse a las proteínas del retinoblastoma (pRB) (Doorbar, 2012).

La pRB es una proteína que está involucrada en el control del ciclo celular. La forma activa hipofosforilada actúa inhibiendo la duplicación celular al impedir la replicación del DNA, es decir, el paso de la fase G1 a la fase S. La oncoproteína E7 del genotipo 16 se puede unir con la forma activa de pRB por lo que pierde su función reguladora y permite que la célula entre en fase S. Paralelamente, la proteína pRB se une a factores activadores de la transcripción celular, impidiendo que éstos actúen (Carreras, 2008).

La proteína p53 tiene una doble función, por una parte, se tiene una función represora sobre la duplicación celular y por otra una inductora de apoptosis en casos de lesiones graves. La E6 de los genotipos de alto riesgo inhibe su función, a diferencia de otras

oncoproteínas virales, no hay una unión molécula directa entre E6 y p53, la estructura terciaria de E6 desempeña una función importante en esta unión, así como una pequeña proteína, la E6-AP. El complejo E6-p53 facilita la degradación citoplasmática de p53, impidiendo que ésta ejerza su función en el núcleo celular (Carreras, 2008).

### 1.5 Alteraciones a nivel celular causadas por VPH en hombres.

En hombres sexualmente activos se ha demostrado la presencia de VPH reflejado en alteraciones de parámetros espermáticos, siendo el más frecuente, la disminución de la motilidad de los espermatozoides lo que influye directamente con la fertilidad masculina (Garolla, 2012). Se ha encontrado DNA no solo en el eje del pene, glande, uretra sino también, en el conducto deferente, el epidídimo y los testículos. Como se mencionó anteriormente se relaciona con la baja motilidad, pero no es el único parámetro alterado, se habla de modificaciones en el volumen, viscosidad, pH, recuento y viabilidad (Foresta C. G., 2010).

Hay estudios que reportan la infección en el espermatozoide, se menciona que el mecanismo por el cual ocurre esto es a través de la proteína L1 del virus y syndecan-1 que se encuentra principalmente en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (Foresta C. P., 2011).

### 1.6 Importancia y método de detección.

Para el diagnóstico del VPH en muestras cervicales se utiliza la citología, que ha sido la más utilizada, sin embargo, hay evidencia científica para que sea sustituida por otras técnicas, siendo preferibles aquellas que utilizan sistemas automáticos y pruebas aprobadas por la FDA. La mayoría de las técnicas utilizadas en el diagnóstico se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, amplificación de señal o detección de RNA mensajero de las proteínas oncogénicas E6 y E7 (Mateos, 2017).

La detección del virus en hombres y por lo tanto la prevalencia del virus puede ser variable en los estudios, esto depende de las técnicas de diagnóstico, la zona anatómica de donde se obtuvo la muestra, tipo de muestra y las características de la población que se estudia (Silva, 2013).

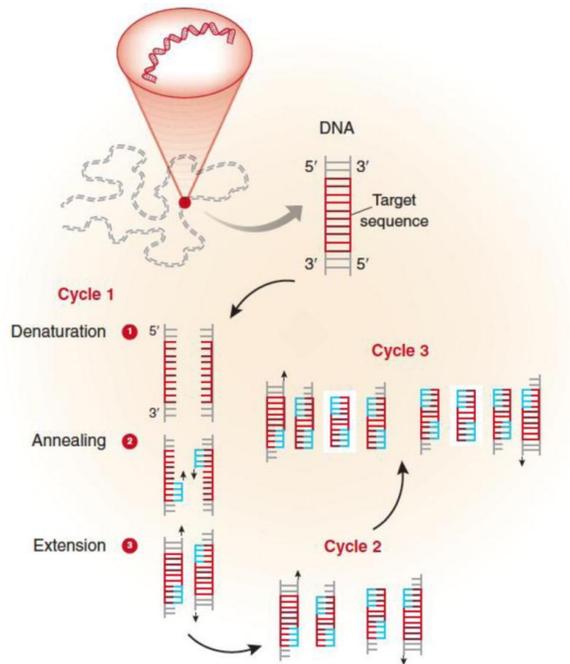
El método de detección que se utilizó en el presente trabajo es la PCR de punto final, además, se utilizaron dos variantes: anidada y multiplex. La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. El elemento principal de la reacción es el DNA, molécula que se compone de un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria

con la base de la otra cadena, su estructura ha sido descrita como doble hélice. Las cadenas están unidas por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre las bases, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del DNA es negativa y está dada por los grupos fosfatos (Tamay, 2013).

Un reactivo importante que se utiliza en la reacción son los primers: son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de DNA. El tamaño oscila entre los 20 y 25 nucleótidos, la base en el extremo 3' debe ser una C o una G, la temperatura de fusión debe estar entre 50-65 °C, el contenido de GC en los primers es considerado un factor determinante para la temperatura de fusión, el cual debe ser entre un 40-60%, la auto complementariedad debe ser evitada con el fin de que no forme estructuras secundarias y dímeros del primer (Cortazar, 2004).

Además de DNA molde y los primers son indispensables otros reactivos como la enzima que llevará a cabo la síntesis, se utiliza la Taq DNA polimerasa, adicionalmente se agrega el ion magnesio, un buffer, agua y desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's: adenina, timina, citosina y guanina). La reacción se lleva a cabo en tres etapas que son desnaturalización, hibridación y extensión, esto en un equipo llamado termociclador. A continuación, se describen brevemente las etapas de la reacción:

- Desnaturalización. Etapa en la que se separan las cadenas del DNA molde, esto sucede a una temperatura de 95°C por 20-30 segundos, esto depende de la secuencia y su contenido de GC, ya que, si es alta, se necesitará de una temperatura mayor.
- Hibridación: Los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria, esto sucede a una temperatura menor que la desnaturalización y depende de la temperatura de fusión de los primers.
- Extensión: En esta etapa actúa la enzima sobre el complejo templado-primer agregando dNTP's complementarios para crear cadenas completas de DNA, la extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del DNA, es decir, 5'-3'. La temperatura a la cual se lleva a cabo esta etapa es la óptima de trabajo de la enzima, esto es a 72°C. Al final del ciclo, se tendrán amplicones de un determinado tamaño en pares de bases (Tamay, 2013).

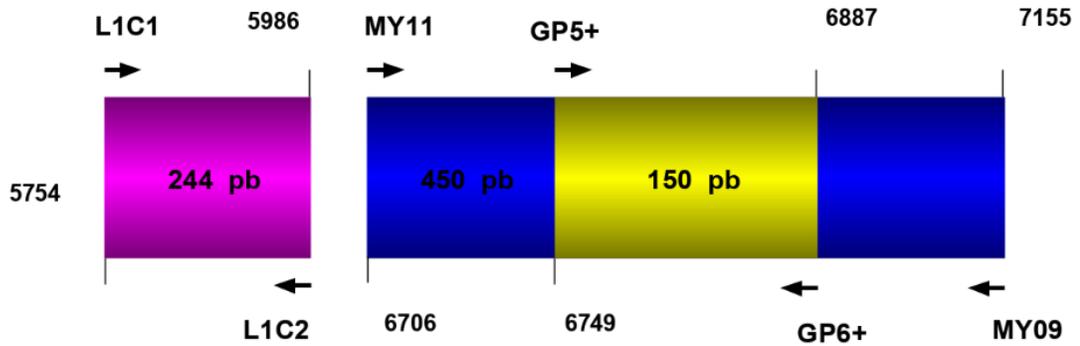


**Figura 3.** Técnica de PCR. (Garibyan, 2013)

Al finalizar la reacción se lleva a cabo otro proceso llamado electroforesis en donde se busca revelar los resultados de la reacción. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE.

En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Finalmente se agrega una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas (Tamay, 2013). Cuando se corre la electroforesis se utiliza un marcador de peso molecular, que se elige basándose en el tamaño del amplicón que se obtiene, para cargar cada muestra se utiliza un buffer de carga, el cual nos ayuda a mantener la muestra dentro del pozo y permita la separación.

Los primers utilizados para el diagnóstico de VPH son universales, amplifican diferentes tamaños de la región L1 del virus, estos son LC1/LC2, MY09/MY11, GP5+/GP6+, que amplifican una secuencia de 244 pb, 450 pb y 150 pb respectivamente. Se utilizó, además, una PCR anidada en las muestras negativas para los primers LC1/LC2 y MY09/MY11; en esta técnica se utilizó el producto de PCR generado por los primers MY09/MY11 con los primers GP5+/GP6+, esto debido a que el producto que se amplifica por este último par de primers se encuentra dentro de la secuencia generada por el par MY09/MY11 (Aedo, 2007) (Carrillo, 2004).



**Figura 4.** Diagrama de las regiones amplificadas por los primers universales, en el primer segmento (de color rosa) se tiene el fragmento amplificado por el par de primers L1C1/L2C2 con un tamaño de 244 pb, en azul se representa el fragmento amplificado por MY09/MY11 que es de un tamaño de 450 pb, mientras que en amarillo se tiene el fragmento amplificado por GP5+/GP6+ con un tamaño de 150 pb.

Las muestras que han resultado positivas se someten a genotipificación, esto se lleva a cabo mediante la PCR multiplex, técnica que nos ayuda a identificar los genotipos más importantes que infectan al ser humano, una de las consideraciones más importante es la temperatura de alineamiento de los primers utilizados para cada genotipo viral, pues no debe tener una gran variación, además, de contar con un control interno que por lo general viene incluido en el kit. En este caso se utilizó el kit MPCR Kit for Human Papilloma Virus Set 2 de Maxim Biotech, Inc.

Product Code	Gene	5'/3' Tm	Amplicon Size	Accession No.
HPV-E06P	Viral HPV-6	66°C/69°C	184 bp	NC_000904
HPV-E11P	Viral HPV-11	67°C/65°C	233 bp	NC_001525
HPV-E16P	Viral HPV-16	72°C/73°C	556 bp	NC_001526
HPV-E18P	Viral HPV-18	69°C/67°C	475 bp	NC_001357
HPV-E31P	Viral HPV-31	72°C/73°C	340 bp	NC_001527
HPV-E33P	Viral HPV-33	72°C/73°C	413 bp	NC_001528
HPV-E52P	Viral HPV-52	70°C/69°C	155 bp	NC_001592
HPV-E58P	Viral HPV-58	70°C/70°C	295 bp	NC_001443

**Figura 5.** Información de los genotipos amplificados en la PCR multiplex, se tiene el número de acceso, así como la temperatura de alineamiento y el tamaño del amplicón que genera cada genotipo del Kit utilizado.

## Capítulo 2. *Chlamydia trachomatis*.

### 2.1 Generalidades.

Es una bacteria intracelular obligada, gramnegativa, aeróbicas, inmóvil que afecta tanto a hombres como mujeres (Viscarra, 2013) (Morales, 2017). Tiene un ciclo de desarrollo bifásico, pertenece a la familia *Chlamydiaceae*, existen 19 serovariedades, que han sido clasificadas con base en la variabilidad antigénica de la proteína principal de la membrana externa (MOMP) (Lara, 2018). Son incapaces de producir su propio ATP, por lo que utiliza las reservas de energía del hospedero. Con tropismo por el epitelio conjuntival y genitourinario. Las especies que pueden causar enfermedades en los humanos son: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* (Franco, 2018). Dentro de las serovariedades, se tiene los serogrupos, tal como se observa en la tabla 4.

**Tabla 4.** Serogrupos de CT que causan patologías (Lara, 2018)

Serogrupos	Enfermedad
A-C	Tracoma
D-K	Infecciones urogenitales
L1, L2, L3	Linfogranuloma venéreo

Se presentan los serogrupos de CT que causan enfermedades

Causa una de las infecciones bacterianas más comunes, sin embargo, el 80% de los casos son asintomáticos. Cuando origina síntomas, puede incluir cuadros de uretritis, proctitis, cervicitis, epididimitis, conjuntivitis y amigdalitis, si la infección se propaga puede generar enfermedad inflamatoria pélvica, linfogranuloma venéreo, perihepatitis y neumonía (Huneus, 2018).

### 2.2 Material Genético y replicación.

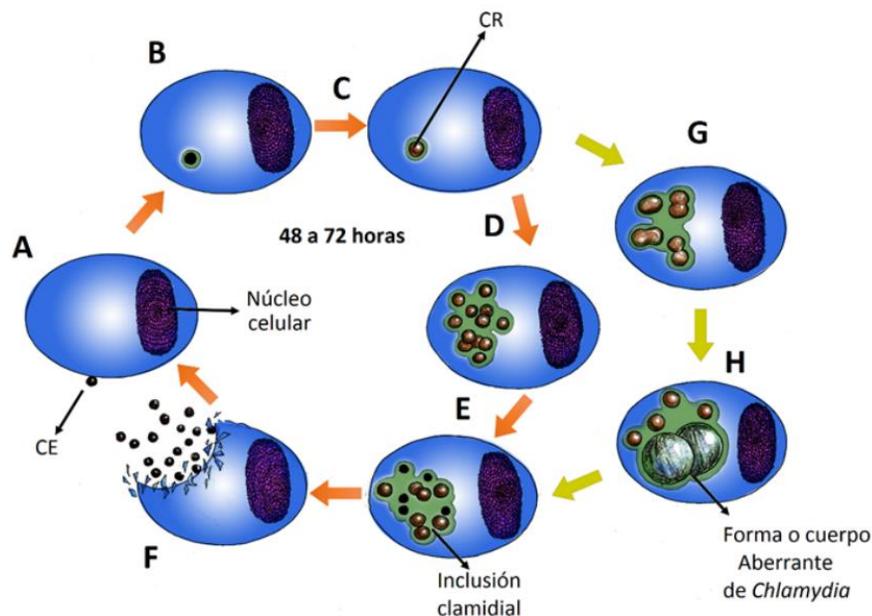
Al tener un ciclo de desarrollo bifásico, tiene dos cuerpos, uno de ellos es el cuerpo elemental (CE), el cual es semejante a una espora, pues es una forma metabólicamente inactiva pero infecciosa, posee una membrana externa que le brinda una resistencia a los factores ambientales, esto se traduce a una estabilidad extracelular (Vromman, 2014).

La vía de entrada al cuerpo del hospedero es mediante las superficies epiteliales húmedas como la conjuntiva, vagina, uretra, siendo el responsable de este proceso el CE; se lleva a cabo mediante la interacción de receptores de la célula blanco (receptores de factor de crecimiento, proteoglicanos heparán sulfato) con las proteínas de la membrana externa de la bacteria, (MOMP, OmcB, PmpD) (Morales, 2017) (Meyer, 2016).

Al ser incluido en el citoplasma de las células eucarióticas forma un fagosoma, después de un periodo de incubación que se encuentra entre los siete y veintidós días se

desplaza hacia el aparato de Golgi mediante un mecanismo dependiente de dineína, se transforma en el cuerpo reticular (CR), que es una forma metabólicamente muy activa pero no infecciosa, también se le conoce como la forma intracelular del microorganismo, se divide mediante fisión binaria dentro de su fagosoma, transformándose nuevamente en CE que son liberados por lisis celular y se diseminan por toda la superficie epitelial húmeda (Lara, 2018) (Viscarra, 2013) (Morales, 2017) (Franco, 2018).

Además, esta bacteria puede generar formas aberrantes, se trata de un estado de persistencia, esto en el área endocervical y por un tiempo prolongado, por lo tanto, CT depende de la viabilidad y funcionalidad de la célula hospedera para efectuar su ciclo de vida, tiene la capacidad de bloquear funciones vitales para la célula como la apoptosis cuando ha sido infectada y la evasión del sistema inmune. La pared celular de CT que es rica en cisteína y lipopolisacáridos realiza una función fundamental que consiste en evitar la acción de enzimas citoplasmáticas y con esto favorecer su replicación (Lara, 2018) (Franco, 2018).



**Figura 6.** Ciclo de desarrollo de CT en la célula hospedera. En la figura A se representa el contacto entre el microorganismo: cuerpo elemental y la célula, en la figura B se observa que se ha formado el fagosoma, en la figura C se ha transformado en cuerpo reticular, mientras que en la D se representa la división mediante fisión binaria, se diferencia nuevamente en CE, esto se observa en la figura E, finalmente, los CE se liberan por lisis celular, se representa en la figura F y así poder infectar a las células vecinas. Sin embargo, CT es capaz de persistir en el huésped por la producción de interferón- $\gamma$  ( $INF \gamma$ ), que mediante la inducción de la enzima indolamina triptófano-degradante 2,3-dioxigenasa (IDO), reduce los niveles intracelulares de triptófano y frena la replicación de CR, esto está representado en la figura G. Estos CR no son infecciosos, pero permanecen viables denominándose Cuerpos Aberrantes (H). Durante este estado, los genes que codifican para proteínas implicadas en la replicación, generación de energía, y producción de componentes estructurales de CT, son inactivados. (Jutinico, 2017)

### 2.3 Alteraciones a nivel celular causadas por CT en hombres.

Se ha reportado la adhesión de la bacteria a la superficie de la cabeza del espermatozoide y que el CE puede penetrarlo, así como adherirse al flagelo. Existe, por lo tanto, una asociación entre la infección y la infertilidad masculina, se refleja en una disminución de la concentración de espermatozoides, movilidad espermática, además de una alta fragmentación de DNA y morfología anormal (Viscarra, 2013).

Otro efecto importante de CT es el de su lipopolisacárido con el aumento de la muerte celular, esto se traduce a necrozoospermia, o pérdida de la vitalidad, esto como respuesta a la interacción de los lipopolisacáridos con el espermatozoide que resultan ser espermicida. Además, se ha propuesto que el espermatozoide es un vector de transmisión, esto es debido a que el epitelio reproductivo del paciente infectado libera periódicamente CE en el trato reproductivo de su pareja (Morales, 2017) (Viscarra, 2013).

### 2.4 Importancia y método de detección.

Las técnicas inmunológicas actualmente constituyen una gran ayuda por su rapidez, bien sea detectando el antígeno, la propia bacteria, o el anticuerpo que ha generado en la persona al tener contacto con la bacteria, *Chlamydia trachomatis* se detecta en el suero por los anticuerpos IgG o IgM o por la inmunocromatografía. Esto debido a que es bastante difícil que crezca en medio de tejido celular e imposible de aislar en medios de cultivo convencionales, sin embargo, también resulta eficiente el diagnóstico de CT con PCR y ELISA (Ordóñez, 2014).

En el presente trabajo se utilizó la técnica de PCR, que ya fue descrita anteriormente, otros aspectos a considerar de esta técnica son sus ventajas: (Garibyan, 2013)

- Es una técnica muy sensible que permite la amplificación rápida de un segmento específico de DNA.
- Produce miles de millones de copias de un fragmento o gen de DNA específico, lo que permite la detección e identificación de secuencias de genes mediante técnicas visuales basadas en el tamaño y la carga.
- Además, se puede obtener el resultado en 24 horas.

Sin embargo, tiene algunas limitaciones, estas son: (Garibyan, 2013)

- La alta sensibilidad de la técnica hace que cualquier forma de contaminación puede alterar los resultados.
- Se debe utilizar los primers adecuados, además, considerar su diseño, pues la especificidad del producto de PCR que se generó puede verse alterada si el diseño no es el adecuado.

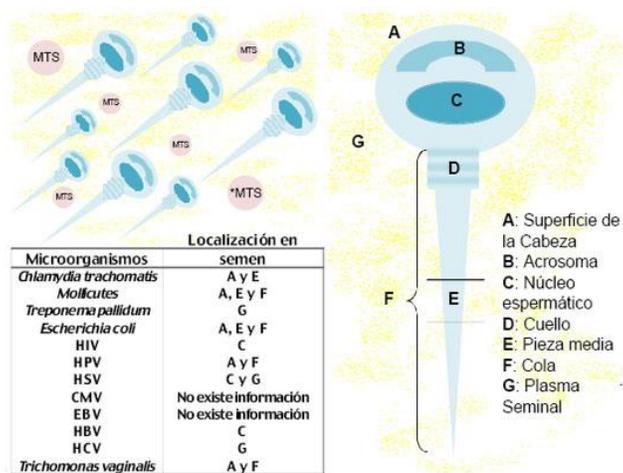
Estudios anteriores llevaron a cabo el diagnóstico de CT mediante la amplificación del plásmido críptico que son moléculas circulares de DNA autorreplicativas encontrados en todos los serotipos de CT. Ahora, no solo se puede diagnosticar por el plásmido sino también mediante la amplificación de la proteína principal de la membrana externa (MOMP) y subunidades ribosomales (Sánchez, 2009). Los primers utilizados son dirigidos a la amplificación del plásmido críptico de la bacteria, estos son KL1/KL2 que generan un fragmento de 240 pb.

### Capítulo 3. Coinfección entre el virus del Papiloma Humano y *Chlamydia trachomatis* en hombres.

#### 3.1 Relación entre VPH y CT en la alteración del espermatozoide.

Existe una gran variedad de enfermedades de transmisión sexual que se propagan por vía seminal, algunos mecanismos pueden ser la adhesión a alguna estructura del espermatozoide, así como su inclusión, además, se describen las capacidades de infectar diversas fracciones del fluido seminal, incluyéndose en este, no solo a los espermatozoides, sino al plasma seminal, leucocitos, entre otros (Viscarra, 2013).

En este caso, ambos microorganismos se adhieren a la cabeza del espermatozoide, además, VPH, se adhiere también al flagelo, alteran, por lo tanto, no solo la morfología sino la movilidad del espermatozoide, así como su vitalidad.



**Figura 7.** Localización de los microorganismos en el semen. En la tabla se tienen diferentes patógenos, se menciona que para CT se encuentra en la superficie de la cabeza, así como en la pieza media, el VPH se encuentra en la superficie de la cabeza y en la cola. Mientras que en el lado derecho se observa un esquema de la estructura del espermatozoide. (Viscarra, 2013)

### 3.2 Mecanismo de acción de ambos patógenos para la carcinogénesis.

La infección de CT se muestra más prevalente en pacientes con VPH y esto puede influir en la progresión de lesiones epiteliales. Algunos estudios mencionan que la infección por si sola de VPH no es suficiente para provocar cáncer, se debe de tomar en cuenta otros factores que promuevan la persistencia del virus o reforzar su oncogenicidad (Hernanz, 2016) (Rosa, 2009).

CT aumenta la susceptibilidad frente al VPH, uno de los mecanismos por lo cual ocurre esto es que la bacteria produce microabrasiones, esto es, un daño en la barrera mucosa, por lo tanto, facilita la entrada del virus y alteraciones en las uniones entre las células epiteliales. En la infección por CT se segregan grandes cantidades de citocinas y produce especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico (que a niveles elevados puede favorecer la persistencia de VPH de alto riesgo) con activación de la cascada inflamatoria y promoción de la angiogénesis, estos mecanismos producen inflamación crónica del tejido (Prozialeck, 2002) (Rahkola, 2011).

La infección de la bacteria también altera la diferenciación celular e inhibe la capacidad apoptótica de las células infectadas, bloquea la liberación del citocromo C mitocondrial y la caspasa 3, esto hace que las células infectadas sean resistentes a la acción de las células Natural Killer CD8, además de una disminución de las células presentadoras de antígeno, la inflamación producida por CT puede favorecer la replicación del VPH o la fragmentación de su DNA, esto facilita la integración del DNA viral en las células epiteliales (Williams, 2011).

## Capítulo 4. Infertilidad masculina y análisis espermático.

### 4.1 Infertilidad masculina.

Se define como la incapacidad de lograr un embarazo después de un periodo (un año) sin la utilización de métodos anticonceptivos. Múltiples patologías pueden influir en esta condición, se habla de pre-testiculares, testiculares y post-testiculares (Palma, 2014). Que involucran una baja producción, anormalidad en su función o en obstrucciones que evitan la liberación de espermatozoides, así mismo, puede deberse a las condiciones de vida del paciente, lesiones y enfermedades crónicas (Clinic, 2019). En la tabla 5 se describen algunas patologías relacionadas con la infertilidad masculina.

**Tabla 5.** Causas de la infertilidad masculina. (Stahl, 2012)

Pre-testiculares	Testiculares	Post-testiculares
Hipogonadismo hipogonadotrópico congénito	Varicocele.	Obstrucción epididimaria congénita, iatrogénica o postinflamatoria.
Patología hipofisaria que incluye tumores, enfermedades infiltrativas e infarto.	Síndrome de Klinefelter.	Obstrucción vascular congénita, iatrogénica o postinfecciosa.
Patología suprarrenal incluyendo tumores e Hiperplasia suprarrenal congénita.	Microdeleciones del cromosoma Y.	Obstrucción del conducto eyaculatorio.
Infecciones sistémicas, incluidas enfermedades Virales y tuberculosis.	Cáncer testicular.	Disfunción eyaculatoria o sexual.
Neoplasias malignas sistémicas.	Tumores de células de Leydig o de células de Sertoli.	
Abuso de esteroides anabólicos.	Insuficiencia testicular idiopática.	
	Orquitis previa.	
	Exposición a gonadotoxinas (radiación quimioterapias, medicamentos, calor)	

Se describen las patologías que están involucradas en la infertilidad masculina, divididas en causas pre- testiculares, testiculares y post-testiculares.

#### 4.2 Análisis espermático.

Hay diferentes tipos de muestra que se utilizan para analizar la fertilidad del paciente, hay un estudio en el que reporta que hay diferencias en el diagnóstico de patógenos en diferentes zonas anatómicas siendo las muestras de uretra y semen las que presentan menor positividad para la detección de VPH (Silva, 2013). Sin embargo, la muestra de semen fue la que se analizó en el presente trabajo.

La Organización Mundial de la Salud en el 2010 publicó un manual en el que describe los parámetros que se estudian en el semen, llamado WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of Human Semen, que es útil en la valoración de la calidad espermática (Flores, 2018).

El estudio de la calidad del semen (espermátobioscopía) puede ser directa o indirecta, en el primer caso, se obtiene la muestra mediante la masturbación, evitando el uso de lubricantes y condón, mientras que, en la indirecta, que también es llamada prueba de Sims Hunner, en la que la muestra es el fluido que se obtiene después de que la pareja mantuvo coito a término. En este caso, las espermátobioscopías fueron directas, que puede dividirse en dos tipos de examen: el macroscópico que evalúan el volumen, pH, licuefacción, viscosidad y color, mientras que el microscópico incluye parámetros como el número de espermatozoides, motilidad, morfología y vitalidad (OMS, 2010).

Los parámetros seminales, por lo tanto, reflejan el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas, nos dan orientación a patologías por las que el paciente está cursando del sistema genital (Matorras, 2008). En el manual publicado por la OMS, menciona que el semen es gris opalescente, el volumen de referencia es de 1.5-7.5 ml, la licuefacción se lleva a cabo en un periodo de 15-60 minutos, se forma un coágulo que se rompe entre 10 y 20 minutos, proceso que se lleva a cabo por la acción de enzimas proteolíticas como la PSA (antígeno prostático específico) que usa como sustrato a la semenogelina y en cuanto a la viscosidad se considera buena si la licuefacción es adecuada (OMS, 2010).

El límite inferior del valor de referencia del pH es de 7.2 y el límite superior es 8.0, la aglutinación y la motilidad son pruebas subjetivas, la aglutinación se puede definir como la presencia de espermatozoides móviles unidos por las cabezas, colas, o cabeza-cola; en cuanto a la movilidad, se registran diferentes tipos: motilidad progresiva (PR), motilidad no progresiva (NP) e inmóviles, el valor de referencia es de 40% (PR+NP) (OMS, 2010).

La concentración de espermatozoides/ml debe ser al menos de 15 millones, esto en un volumen mínimo de 1.5 ml. Y el número total de espermatozoides debe ser mayor a 39 millones. La presencia de otras células en el semen como eritrocitos, leucocitos y bacterias pueden indicar algunas patologías por las que está cursando el paciente, siendo, por lo tanto, muy importante la presencia de estas células.

## JUSTIFICACIÓN

Estudios previos han documentado la importancia de la infertilidad como problema de salud, se estima una frecuencia entre el 15-20% de parejas que en edad reproductiva necesitan alguna forma de reproducción asistida para su concepción, el IMSS atiende aproximadamente a 12 mil parejas al año que no pueden concebir. La infertilidad, se estima a nivel mundial un total de 60-80 millones de parejas infértiles, y al menos 30 millones de hombres son los de la disfunción orgánica, que representan el 15%, con las mayores proporciones en África y Europa Oriental, en México, se estima que aproximadamente el 40% de los casos de infertilidad entre parejas se debe a alteraciones en los hombres.

Sin embargo, no se ha documentado la relación de la infertilidad con las enfermedades de transmisión sexual, éstas han aumentado por falta de información acerca de este tipo de infecciones, así como tener una vida sexual activa sin uso del método anticonceptivo de barrera más importante que es el condón masculino, al no tomar en cuenta esta medida de prevención, la infección tanto por el Virus del Papiloma Humano como de *Chlamydia trachomatis* es más frecuente. El objetivo de este trabajo es demostrar la relación de otro factor que puede influir en la infertilidad masculina: la coinfección entre un virus y una bacteria.

Por lo que el presente trabajo puede dar paso a otras investigaciones en el estudio de las infecciones de transmisión sexual como un factor muy importante en problemas de fertilidad, al demostrar que se alteran los parámetros espermáticos se podrá hacer prioritario el diagnóstico de estos microorganismos en las parejas que presentan problemas para concebir, además, al reportar la frecuencia de estos patógenos en nuestra población así como los genotipos de alto riesgo se pueden tomar medidas que nos ayuden a disminuir estas prevalencias y por lo tanto reducir la probabilidad de padecer otras enfermedades como cáncer de próstata y con esto, de una manera indirecta, el cáncer cervicouterino, pues al bajar la frecuencia de pacientes masculinos infectados podríamos hacerlo en mujeres.

## OBJETIVOS

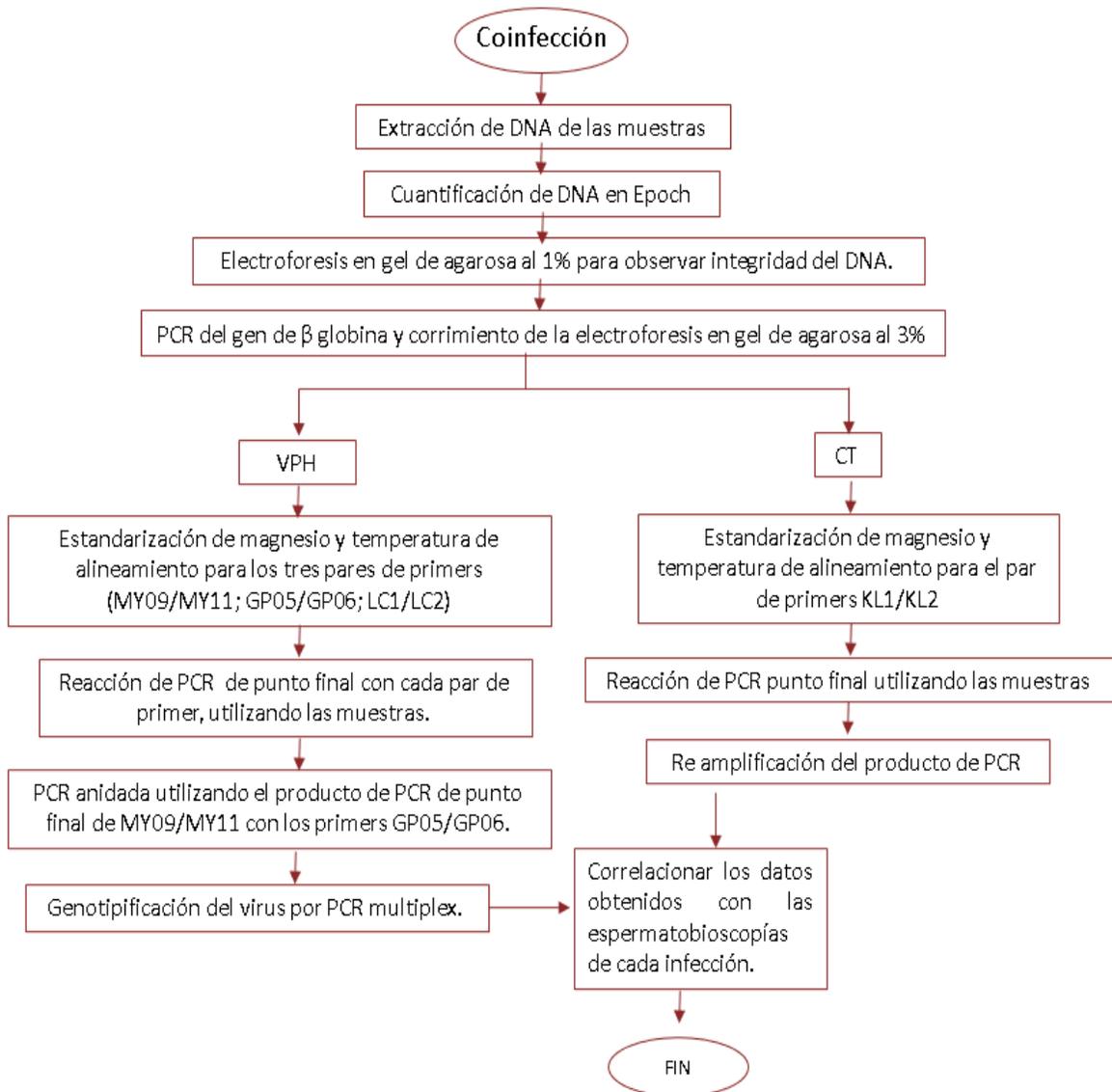
### ❖ General

Determinar la presencia del Virus del Papiloma Humano y de *Chlamydia trachomatis* en muestras de semen por medio de técnicas moleculares para establecer su relación en la infertilidad masculina.

### ❖ Particulares

- ✓ Determinar el genotipo de VPH más frecuente en hombres con problemas de infertilidad.
- ✓ Describir los efectos de la coinfección entre el Virus del Papiloma Humano y *Chlamydia trachomatis* en los criterios espermáticos.
- ✓ Determinar la frecuencia de pacientes que presentan coinfección, así como la frecuencia de pacientes infectados con el Virus del Papiloma Humano y los infectados con *Chlamydia trachomatis*.

## DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales:

- Material biológico:

Muestras de semen de pacientes con problemas de infertilidad.

- Materiales, Equipos y Reactivos:

#### a) Materiales:

Micropipetas de 2  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l y 1000  $\mu$ l.

Puntas para micropipetas estériles.

Tubos de microcentrifuga (Eppendorf).

Tubos de PCR estériles.

#### b) Equipos:

Microcentrifuga.

Termociclador (MiniAmp Plus).

Cámara de electroforesis (Galileo bioscience) y fuente de poder (BIO-RAD).

Transiluminador (UVP).

Epoch (BioTek).

#### c) Reactivos:

Buffer de extracción (EDTA 0.02 M, Tris 0.01 M, SDS 0.5%).

Proteínasa K [50 $\mu$ g/ml].

Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) Invitrogen™.

Isopropanol.

NaCl.

Etanol 70%.

Agua inyectable.

Buffer de carga 10X.

TBE 1X.

Agarosa.

Midori Green Advance (Invitrogen).

Marcador de peso molecular 100 pb (Clever).

Para PCR:

Buffer 10X (Invitrogen).

dNTP's (Invitrogen).

MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen).

Taq Red DNA Polimerasa (Ampliqon III) o Taq DNA Polymerase Platinum® (Invitrogen).

Primers GH20/PC04 (para gen de  $\beta$  Globina).

Primers para la identificación del virus: L1C1/L2C2; MY09/MY11; GP05/GP06.

Primers para identificar CT: KL1/KL2.

MPCR Kit for Human Papillomavirus set 2.

## Métodos:

- Población.

Se estudiaron a 149 muestras de pacientes con problemas de fertilidad del Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología, ubicado en Av. Industria Militar 1057, Lomas de Sotelo, Hipódromo de las Américas, Miguel Hidalgo, 11200, CDMX. Los pacientes sometidos al estudio comprenden un rango de edad de 22-49 años. Las muestras y espermatozoides fueron recolectadas en el periodo 2016-2019. A los pacientes se les habló acerca del estudio y se les otorgó un consentimiento informado a aquellos que aceptaron que se analizará su muestra para este proyecto (Anexo).

- Extracción de Material Genético.

La extracción de DNA de muestras de semen se hizo con base en lo descrito por Sambrook y col. 1989. Se utiliza 100  $\mu$ l de muestra y se le adiciona 400  $\mu$ l de buffer de extracción (EDTA 0.02 M, Tris 0.01 M, SDS 0.5%). Después de mezclar por inversión 5 segundos, se adiciona proteinasa K a una concentración de 50 $\mu$ g/ml (volumen equivalente al volumen de la muestra), se incubó a 20 minutos a 65°C y se adiciona un volumen proporcional al volumen acumulado hasta ahora en el tubo de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico relación 25:24:1.

Después de agitar por inversión por 5 segundos, se centrifuga a 12,000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se recupera la fase acuosa en un nuevo tubo, se adiciona un volumen proporcional a la fase acuosa de isopropanol, se agrega NaCl a una concentración final de 0.2 M. Se centrifuga a 12,000 rpm por 5 minutos, se decanta y se lava el botón con etanol al 70%, utilizando un volumen equivalente al volumen de la muestra utilizada, se repite lavado y por último se deja secar el botón y se resuspende con agua inyectable (de 50  $\mu$ l a 100  $\mu$ l).

- Cuantificación de DNA.

Se evalúa la calidad de la muestra en un equipo espectrofotométrico (Epoch) mediante su densidad óptica a 260 y 280 nm. Se inicia el equipo y se calibra con un blanco (agua), se utiliza 2  $\mu$ l de la muestra de DNA y finalmente se lee la absorbancia que registra el detector (computadora).

- Valoración cualitativa del DNA.

Se determina la integridad del material genético mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se pesa 1 g de agarosa, se adiciona 100 ml de TBE 1X, después se disuelve en microondas por 1 minuto en dos intervalos de 30 segundos. Ya disuelta la agarosa en el TBE se deja reposar unos minutos, se agrega 10 µl de Midori Green Advance<sup>®</sup>. Se deja gelificar en molde, se coloca en cámara de electroforesis, sumergido en TBE 1X.

A continuación, se cargan los pozos con 5 µl de DNA y 1 µl de buffer de carga 10X, además, se coloca 2 µl de marcador de peso molecular de 100 pb y se deja correr la electroforesis a 100 volts por 45 minutos. Por último, los geles se observan utilizando un transiluminador y se toma la evidencia con una cámara fotográfica.

- Evaluación de la viabilidad del material genético:

Este procedimiento se hizo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen de la β-Globina con los primers GH20 y PC04, lo cual se realiza con la finalidad de evaluar la calidad del material genético y descartar muestras negativas a la prueba. Como a continuación de específica:

**Tabla 6.** Características de los primers para la amplificación del gen de β Globina.

PRIMER	SECUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
GH20	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	267 pb
PC04	5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'	

Se tiene el nombre de cada primer, así como su secuencia y el fragmento que resulta después de llevar a cabo la PCR.

**Tabla 7.** Condiciones de los reactivos para llevar a cabo la PCR.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (µl)
Buffer	10X	2.5
dNTP's	100 mM	1
GH20	10 mM	1
PC04	10 mM	1
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5
H <sub>2</sub> O		12.8
TaqRed <sup>®</sup> Polymerase		0.2
DNA		5
Volumen Total	25 µl	

Se mencionan las características de cada reactivo para la reacción, así como el volumen utilizado de cada uno. Para un volumen fina de 25 µl. Se utiliza un volumen de cloruro de magnesio de 1.5 µl.

**Tabla 8.** Condiciones a utilizar en el termociclador para la reacción de PCR.

TEMPERATURA	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95 °C	5 minutos	30
95 °C	30 segundos	
62 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	5 minutos	

Se describen las temperaturas a utilizar, así como el tiempo de cada una. Es importante señalar que para este caso se utiliza una temperatura de alineamiento a 62°C por 30 segundos. Además, se menciona el número de ciclos en la reacción que son 30.

Después de que se obtiene el producto de reacción se lleva a cabo una electroforesis a 100 V por 45 minutos con TBE 1.

- Identificación del virus de VPH por medio de los primers: LC1, LC2, MY09, MY11 y GP05, GP06.

Se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, sin embargo, cada primer necesita condiciones específicas, por lo tanto, se lleva a cabo una reacción para cada par de primers con su respectiva electroforesis. A continuación, se describe el procedimiento, detallando las características de cada reactivo, así como el volumen utilizado de cada uno.

**Tabla 9.** Características de los primers L1C1 y L2C2 para la identificación del virus.

Primer	Secuencia	Fragmento amplificado
L1C1	5'-CGT AAA CGT TTT CCC TAT TTT TTT -3'	244 pb
L2C2	5'- TAC CCT AAA TAC TCT GTA TTG -3'	

Se presentan tanto el nombre de los primers, así como su secuencia y el fragmento que amplifican.

**Tabla 10.** Características de cada reactivo utilizado en la reacción.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (µl)
Buffer	10X	2.5
dNTP's	2 mM	2.5
LC1	10 mM	2.5
LC2	10 mM	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2
H <sub>2</sub> O		7.95
Platinum® Taq Polymerase		0.05
DNA		5
Volumen Total	25 µl	

Se describen las características de cada reactivo, así como el volumen a utilizar en la reacción de PCR para identificar el fragmento amplificado del virus por el par de primers L1C1 y L2C2. Se utilizan 2 µl de cloruro de magnesio para esta reacción.

**Tabla 11.** Características de la reacción de PCR en el termociclador.

TEMPERATURA	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95 °C	5 minutos	30
95 °C	30 segundos	
56 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	5 minutos	

Se describen las condiciones de reacción: temperaturas utilizadas, así como la duración de cada una. Se tiene una temperatura de alineamiento de 56°C por 30 segundos. Además, del número de ciclos que son 30.

**Tabla 12.** Identificación del virus con MY09 y MY11.

Primer	Secuencia	Fragmento amplificado
MY09	5'-CGT CCM AGR GGA WAC TGA TC-3'	450 pb
MY11	5'- GCM CAG GGW CAT AAT AAT GG-3'	

Se tienen los nombres de cada primer, así como su respectiva secuencia y el fragmento que amplifica este par de primers.

**Tabla 13.** Características de cada reactivo utilizado en la reacción de PCR.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (µl)
Buffer	10X	2.5
dNTP's	2 mM	2.5
MY09	10 mM	2.5
MY11	10 mM	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2
H <sub>2</sub> O		7.95
Platinum® Taq Polymerase		0.05
DNA		5
Volumen Total	25 µl	

Se describen las características de cada reactivo utilizado, así como el volumen, para un volumen final de 25 µl. En este caso se utiliza un volumen de 2 µl de cloruro de magnesio.

**Tabla 14.** Especificaciones de reacción para el termociclador.

TEMPERATURA	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95 °C	5 minutos	30
95 °C	30 segundos	
58 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	5 minutos	

Se describen las condiciones de reacción: las temperaturas y la duración de cada una. Se tiene una temperatura de alineamiento de 58°C por 30 segundos.

**Tabla 15.** Identificación del virus con Gp5 y Gp6.

Primer	Secuencia	Fragmento amplificado
GP5	5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACY AC-3'	150 pb
GP6	5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT AYT C-3'	

Se observan los nombres, así como la secuencia de cada uno, además, del tamaño del fragmento que amplifican.

**Tabla 16.** Características de los reactivos utilizado para la PCR.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (µl)
Buffer	10X	2.5
dNTP's	2 mM	2.5
GP5	10 mM	2.5
GP6	10 mM	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.5
H <sub>2</sub> O		7.45
Platinum® Taq Polymerase		0.05
DNA		5
Volumen Total		25 µl

Se describen las condiciones de cada reactivo, así como el volumen que se utiliza. Para un volumen fina de 25 µl. Se utiliza 2.5 µl de cloruro de magnesio en esta reacción.

**Tabla 17.** Características de la reacción de PCR.

TEMPERATURA	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95 °C	5 minutos	30
95 °C	30 segundos	
62 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	5 minutos	

Se describen las condiciones de reacción: la temperatura y el tiempo de duración de cada una. Se tiene que la temperatura de alineamiento es de 62°C.

- PCR multiplex para detección de genotipos del Virus del Papiloma Humano:

Se llevó a cabo mediante un kit para PCR multiplex que contiene primers para identificar los genotipos más importantes en nuestro país. A las condiciones establecidas:

**Tabla 18.** Reactivos de la PCR multiplex.

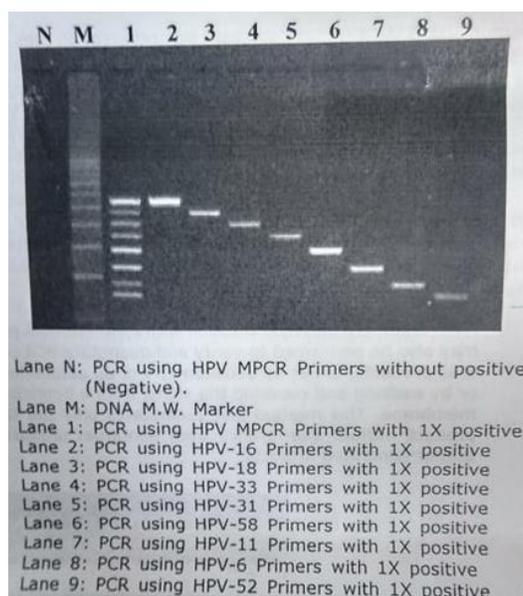
Reactivo	Volumen (µl)
Buffer	12.5
Primers	2.5
Enzima	0.5
Agua	4.5
DNA	5
Volumen total	25

Se tiene el volumen utilizado para cada reacción de cada reactivo, para un volumen total de 25 µl.

**Tabla 19.** Condiciones de reacción en el termociclador para PCR:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C	1 min	2 x
67-68°C	4 min	
94°C	1 min	28-35 x
67-68°C	2 min	
70°C	10 min	1 x
25°C	10 min	

Se describen las condiciones de la reacción en el termociclador: temperaturas utilizadas, así como la duración de cada una y el número de ciclos.



**Figura 8.** Visualización de cada genotipo del virus del papiloma humano en electroforesis. Se tienen los genotipos 16, 18, 33, 31, 58, 11, 6 y 52, además, presenta un marcador de peso molecular en el primer carril, mientras que, en el segundo, un control positivo que contiene todos los genotipos antes mencionados. Finalmente, en cada carril se tiene un genotipo específico.

- *Detección de Chlamydia trachomatis*

Se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el par de primers KL1 y KL2.

**Tabla 20.** Secuencias del par de primers para detectar CT

PRIMER	SECUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
KL1	5'-TCC GGA GCG AGT TAC GAA GA-3'	240 pb
KL2	5'-AAT CAA TGC CCG GGA TTG GT-3'	

Se tiene el nombre del primer, así como su secuencia y el fragmento que amplifican.

**Tabla 21.** Condiciones de los reactivos para llevar a cabo la PCR.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μl)
Buffer	10X	2.5
dNTP's	2 mM	2.5
KL1	10 mM	2.5
KL2	10 mM	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5
H <sub>2</sub> O		8.45
Platinum® Taq Polymerase		0.05
DNA		5
Volumen Total	25 μl	

Se mencionan las características de cada reactivo para la reacción, así como el volumen utilizado de cada uno. Para un volumen fina de 25 μl. Se utiliza un volumen de cloruro de magnesio de 1.5 μl.

**Tabla 22.** Condiciones a utilizar en el termociclador para la reacción de PCR.

TEMPERATURA	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95 °C	5 minutos	30
95 °C	30 segundos	
60 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	5 minutos	

Se describen las temperaturas a utilizar, así como el tiempo de cada una. Es importante señalar que para este caso se utiliza una temperatura de alineamiento a 60°C por 30 segundos. Además, se menciona el número de ciclos en la reacción que son 30.

### Se llevó a cabo una reamplificación del producto obtenido:

**Tabla 23.** Condiciones de los reactivos para llevar a cabo la reamplificación del producto de PCR.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μl)
Buffer	10X	2.5
dNTP's	100 mM	1
KL1	10 mM	1
KL2	10 mM	1
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5
H <sub>2</sub> O		14.8
TaqRed® Polymerase		0.2
DNA (Producto de PCR)		2
Volumen Total	25 μl	

Se mencionan las características de cada reactivo para la reacción, así como el volumen utilizado de cada uno. Para un volumen fina de 25 μl. Se utiliza un volumen de cloruro de magnesio de 1.5 μl.

**Tabla 24.** Condiciones a utilizar en el termociclador para la reacción de PCR.

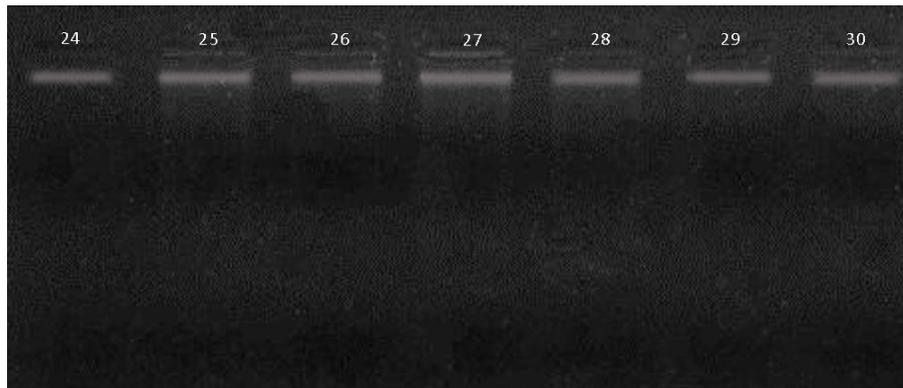
TEMPERATURA	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95 °C	5 minutos	15
95 °C	30 segundos	
60 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	5 minutos	

Se describen las temperaturas a utilizar, así como el tiempo de cada una. Es importante señalar que para este caso se utiliza una temperatura de alineamiento a 60°C por 30 segundos. Además, se menciona el número de ciclos en la reacción que son 15.

## RESULTADOS

- Integridad del DNA.

Con la finalidad de determinar la integridad del DNA, se realizó un gel de agarosa al 1% como se observa en la figura 9. Se muestra una electroforesis representativa, en la que podemos observar que la integridad del DNA es buena, además, las concentraciones del DNA son adecuadas, estas se encuentran como mínimo en 100 ng/μl y con una pureza que oscila entre 1.7 y 1.9 (relación 260/280) que nos indican que se pueden realizar las siguientes determinaciones.



**Figura 9.** Integridad del material genético.

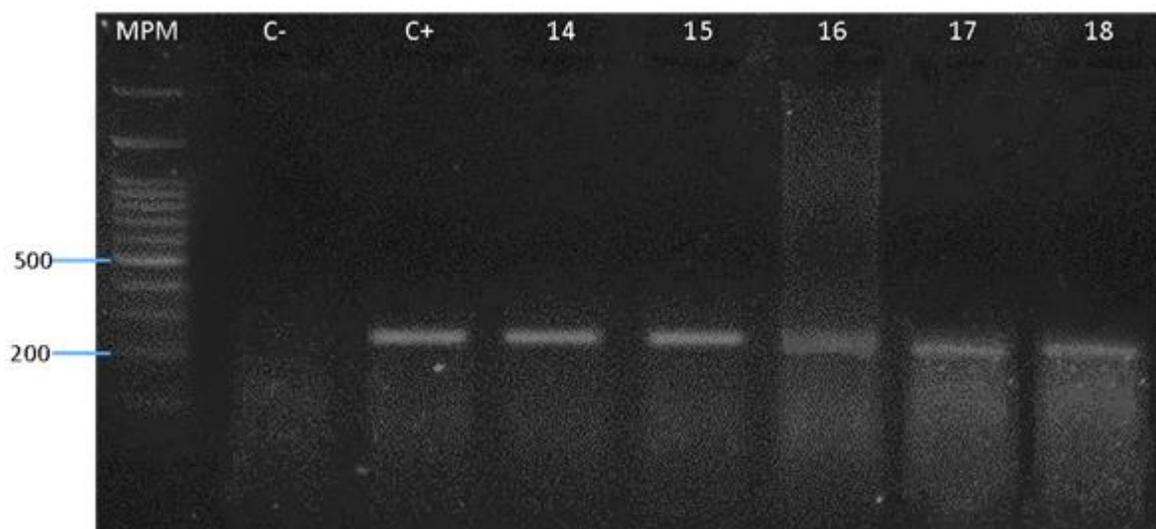
Se llevó a cabo en gel de agarosa al 1%. Se corrieron las muestras 24-30, obteniendo una banda definida en cada muestra.

- Determinación de la viabilidad del material genético por amplificación del gen de β globina.

En segundo lugar, se amplificó el gen de β globina, con la finalidad de evaluar la eficacia del proceso de extracción de DNA de las muestras de semen, así como descartar la presencia de inhibidores que pueden interferir en la identificación de los microorganismos en el DNA de cada muestra. En la figura 10 se observa una electroforesis representativa de este proceso en un gel de agarosa al 3%, se puede observar que las muestras resultan ser adecuadas para los siguientes estudios.

El producto amplificado es de 267 pb que corresponde con el tamaño del producto del gen de beta globina. Las condiciones de trabajo se establecieron, tomando en cuenta la utilización de la Taq red<sup>®</sup>, se utilizó un control negativo (en el que no se le agrega DNA, con el fin de observar si las condiciones de los reactivos son adecuadas) que se señala como C-. Además, es indispensable utilizar un control positivo (C+) en donde se amplifica el gen de

beta globina previamente estandarizado con otras muestras de DNA para comparar las muestras problema con una que ya ha sido probada.



**Figura 10.** Electroforesis del gen de beta globina.

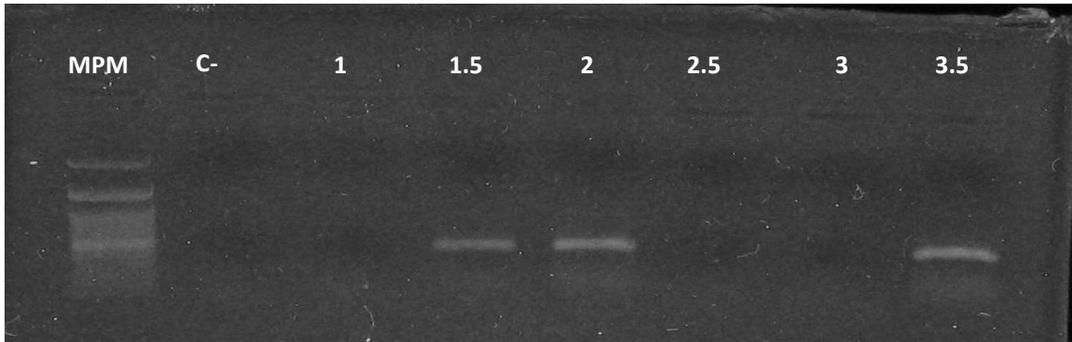
Se tienen los C- y C+ respectivamente, y a continuación, se presentan las muestras 14-18 con una banda definida en cada muestra, el producto amplificado del gen de beta globina es de 267 pb.

- **Identificación del virus.**

Para la identificación del virus en las muestras se realizó PCR de punto final, fue necesario realizar la estandarización de los primers con un control positivo, se ajustaron las concentraciones de cloruro de magnesio, así como la temperatura de alineamiento. El  $MgCl_2$  es un cofactor necesario para la actividad enzimática de las DNA polimerasas, su concentración óptima se establece empíricamente para cada polimerasa, secuencia y par de cebadores, si hay demasiado, poco o mucho, puede reducir la eficiencia de la amplificación o generar productos inespecíficos.

El número de ciclos que se recomienda es de 25-40, en este caso 30 ciclos fueron suficientes para obtener un producto de amplificación, en cuanto a la temperatura de alineamiento se establece a partir del diseño de los primers y con esto ir variando la temperatura, es decir, llevando a cabo un PCR de gradiente, en la estandarización de este par de primers se utilizó una  $T_m$  de  $72^\circ C$ .

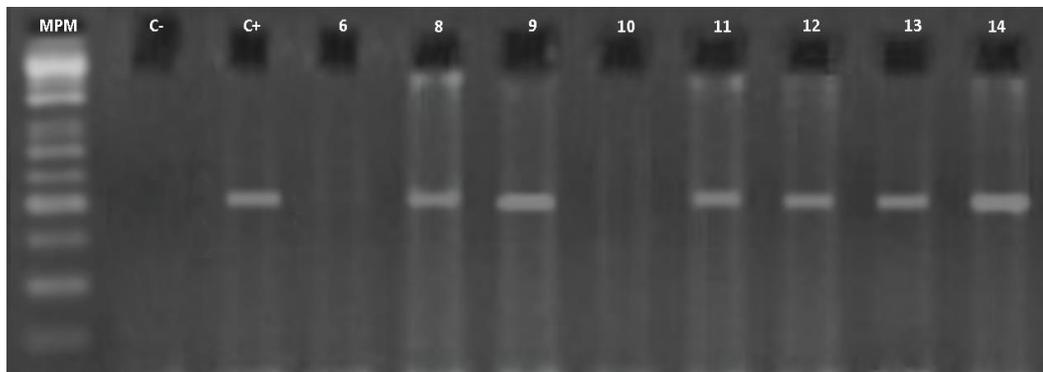
En la figura 11 se tiene la estandarización del par de primers MY09/MY11, en un gel de agarosa al 3%, demostrando que el volumen de magnesio que se puede utilizar son 1.5, 2 y 3.5  $\mu L$ . Los primers que se utilizan para diagnosticar el VPH son universales y están dirigidos a la proteína de la cápside (L1).



**Figura 11.** Estandarización de los primers MY09/ MY11.

En el primer carril se tiene el marcador de peso molecular de 100 pb. En el segundo un C- y en los carriles 3-8 se colocaron la reacción de PCR con un volumen diferente en cada una de  $MgCl_2$ . Se observa que amplifica el gen con 1.5, 2 y 3.5  $\mu l$  de  $MgCl_2$ . 450 pb. Estos cebadores amplifican un segmento del gen L1 de la cápside viral.

Una vez estandarizada la reacción con un control positivo y con el par de primers MY09/MY11, se procedió a llevar a cabo las reacciones de PCR para identificar el virus en todas las muestras que han amplificado el gen de  $\beta$  globina, en la figura 12, se tienen algunos resultados, con este par de primers se obtuvo un fragmento de 450 pb; algunas muestras son positivas, 8, 9, 11, 12, 13, 14, se llevó a cabo en un gel de agarosa al 3%

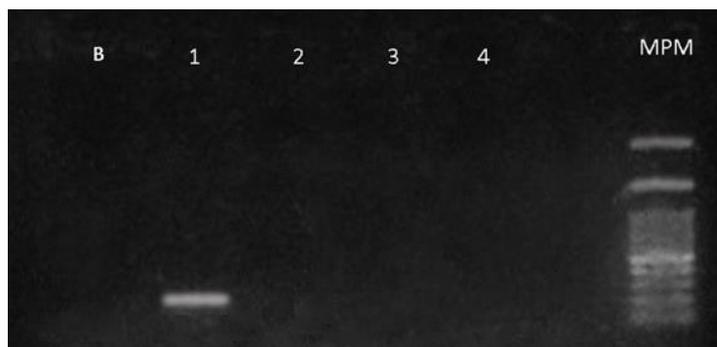


**Figura 12.** Resultados de la identificación del virus en las muestras.

Gel representativo de los resultados de la identificación del virus con MY09/MY11. En el segundo y tercer carril se tiene el control negativo y positivo respectivamente, mientras que en los carriles 4-11 se colocaron las muestras 6, 8-14. Se observa una banda definida en las muestras 8, 9, 11-14.

Anteriormente se mencionó la PCR de gradiente, en la figura 13, se tiene una electroforesis representativa de dicho procedimiento, se llevó a cabo con un control positivo, y se fue variando la temperatura cada dos grados, esto se llevó a cabo con el par de primers L1C1/L2C2, en donde se encontró que la temperatura adecuada fue de 56°C y

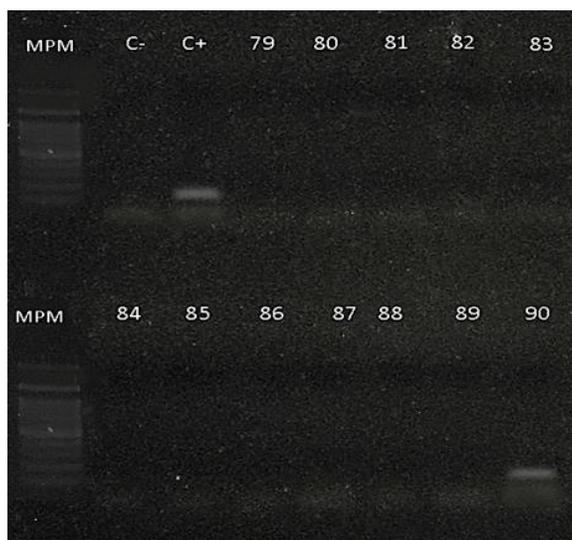
se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ . En donde se espera un producto de 244 pb, se llevó a cabo en un gel de agarosa al 3%



**Figura 13.** Estandarización de la temperatura del par de primers L1C1 y L2C2

Se utilizó 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  a diferentes  $T_m$ . En donde 1: 56°C; 2: 58°C; 3: 60°C; 4: 62°C. Se colocó un control negativo (C-) en el primer carril, mientras que en los carriles 2-5 se colocaron los productos de la reacción de PCR y un marcador de peso molecular de 100 pb (MPM) en el último carril. Los primers utilizados (L1C1/L2C2) están dirigidos a amplificar un segmento de la proteína de cápside mayor (L1).

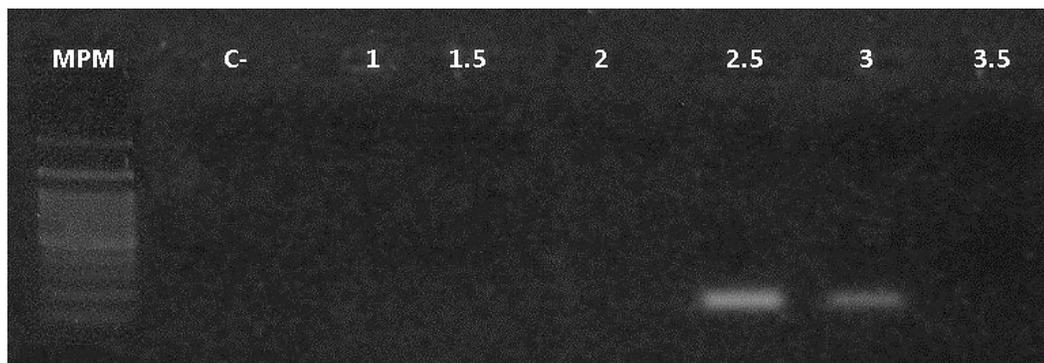
En la figura 14, se observa la identificación del virus en las muestras de DNA con el par de primers L1C1/L2C2, en donde se observa que la muestra 90 es positiva. Se obtiene un producto de 244 pb.



**Figura 14.** Resultados de diagnóstico del VP1 en las muestras de semen con L1C1/L2C2.

Se llevó a cabo en gel de agarosa al 3%, se tiene un control negativo y un control positivo en los carriles 2 y 3 respectivamente, en los carriles 4-8, 10-16 se colocaron las muestras 79-90. Se obtuvo la muestra 90 positiva en la que se observa una banda definida.

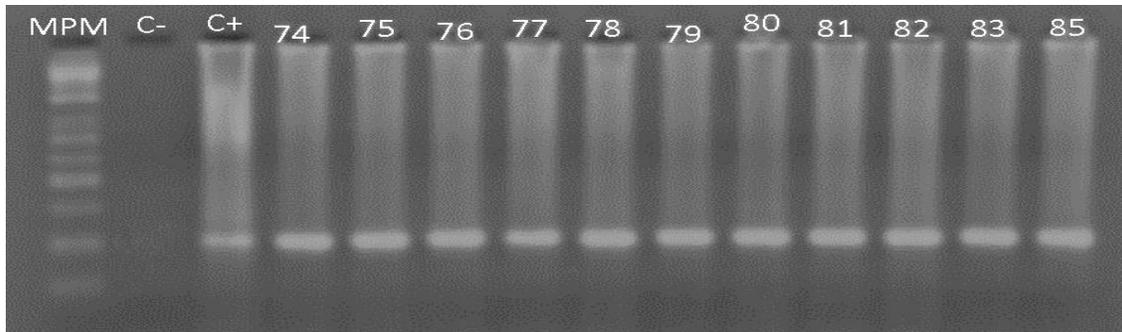
El último par de primers que se utilizó fue Gp5/Gp6, en la figura 15 se observa la estandarización de la reacción con estos primers, y variando el volumen de MgCl<sub>2</sub>, se observa que se pueden utilizar 2.5 o 3 µl, sin embargo, la banda se ve más definida utilizando 2.5, se obtiene un producto de amplificación de 150 pb.



**Figura 15.** Estandarización de MgCl<sub>2</sub> para el par de primers de Gp5 y Gp6.

En gel de agarosa al 3%. Se utilizó un control negativo en el segundo carril y en los carriles 3-8 se colocaron los productos de PCR siendo 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 los volúmenes de MgCl<sub>2</sub>. Se observa un producto de amplificación de 150 pb con 2.5 y 3 µl de MgCl<sub>2</sub>. Primers dirigidos a un segmento de la proteína de cápside mayor (L1) dicha secuencia se encuentra dentro del producto de amplificación de MY09/MY11.

En la figura 16, se observa una electroforesis representativa de muestras positivas, siendo éstas de la 74-85, se obtiene un fragmento de 150 pb, se llevó a cabo en un gel de agarosa al 3%. Esto se llevó a cabo mediante PCR anidada. Se utiliza el producto de amplificación dado por el par de primers MY09/MY11 en esta reacción, se lleva a cabo a 15 ciclos y a la temperatura de alineamiento del par de primers de GP5/GP6, ya que éste último par amplifica un fragmento que se encuentra dentro de la región amplificada por MY09/MY11, como se muestra en la figura 4.



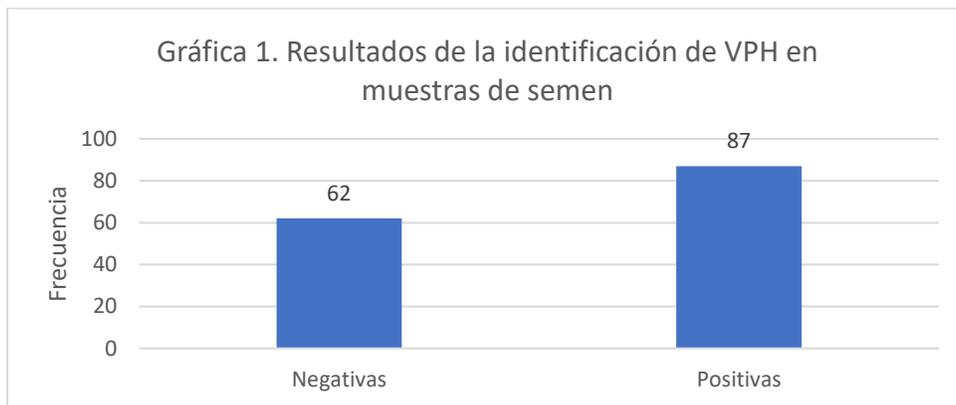
**Figura 16.** Resultados de la identificación del virus en las muestras con PCR anidada con el par de primers Gp5 y Gp6.

En el primer carril se tiene el marcador de peso molecular de 50 pb, en el segundo carril un control negativo y en el tercero un control positivo. En los carriles 3-14 se colocaron las muestras 74-85. Se observa que todas las muestras son positivas que se observa con una banda definida de 150pb.

Después de llevar a cabo la identificación del virus con los primers, se llegaron a los siguientes resultados (Tabla 25 y gráfica 1) en donde se muestra que hay 87 muestras positivas de las 149 muestras analizadas.

**Tabla 25.** Resultados del diagnóstico de VPH

Muestras negativas	Muestras positivas	Total
62	87	149



Se tienen los resultados de la identificación del VPH en las muestras de semen en las 149 muestras analizadas, esto se llevó a cabo mediante la PCR de punto final con cada para de primer y con la PCR anidada, obteniendo 87 muestras positivas y 62 muestras negativas.

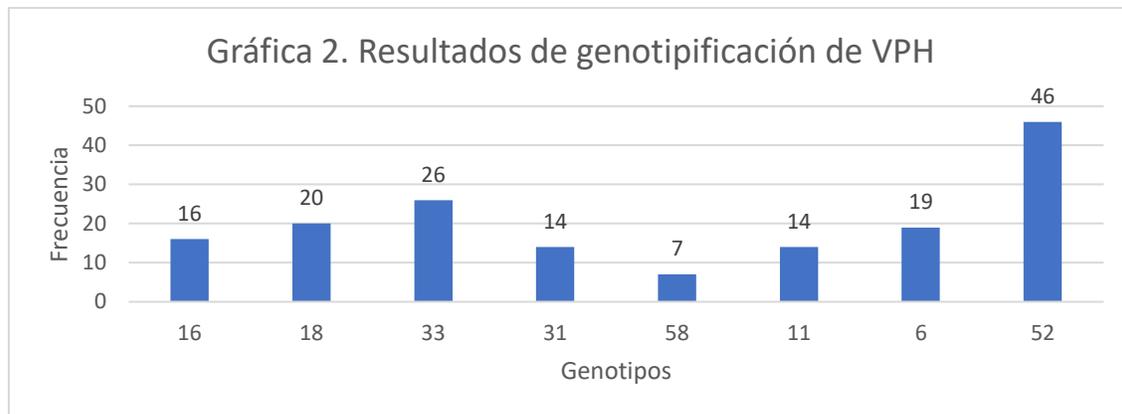
- Genotipos

Por último se llevó a cabo la genotipificación de las muestras, esto se llevó a cabo mediante PCR multiplex, en donde podemos identificar los genotipos con los que se encuentra infectado el paciente, el kit que se utilizó identifica 8 genotipos frecuentes en la población, en la tabla 26, así como en la gráfica 2 se muestran los resultados de este procedimiento, en la tabla se tiene registrado cada genotipo(s) de cada paciente y en la gráfica se representa la frecuencia de cada genotipo encontrados en las 149 muestras analizadas.

**Tabla 26.** Genotipos de VPH en las muestras de semen

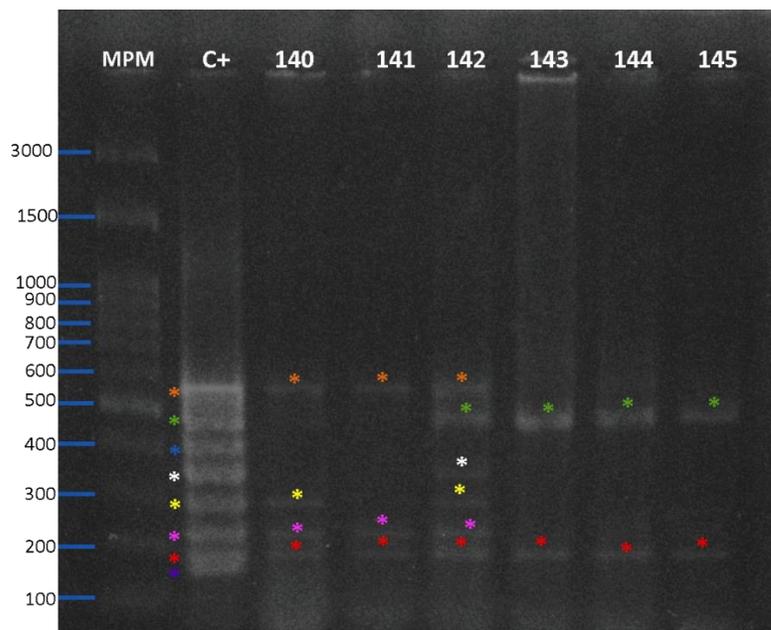
Muestra	Genotipos	Muestra	Genotipos	Muestra	Genotipos	Muestra	Genotipos
1	16,18,33	39	6, 18	77	33, 11	115	Negativo
2	18, 31	40	52, 18	78	33, 11	116	52
3	18, 31	41	52	79	33, 52	117	Negativo
4	Negativo	42	Negativo	80	33	118	Negativo
5	Negativo	43	Negativo	81	33, 52	119	Negativo
6	Negativo	44	Negativo	82	Negativo	120	Negativo
7	18, 31	45	52, 11, 18	83	Negativo	121	52, 6
8	18, 31	46	Negativo	84	33, 52, 58	122	Negativo
9	Negativo	47	52, 58	85	33, 52	123	Negativo
10	Negativo	48	Negativo	86	33, 52	124	Negativo
11	18, 31	49	Negativo	87	33, 52	125	Negativo
12	31	50	52, 58	88	33, 52	126	Negativo
13	18, 33	51	52, 58	89	Negativo	127	Negativo
14	16, 18	52	Negativo	90	Negativo	128	52, 6
15	16	53	Negativo	91	52	129	6
16	16, 31	54	18, 58	92	Negativo	130	52
17	16, 58, 11	55	18, 6, 52	93	33	131	6
18	52	56	18, 6, 52	94	52	132	52, 6
19	16, 11	57	18, 6	95	52	133	Negativo
20	16, 11	58	18, 6	96	52	134	Negativo
21	16, 11, 52	59	33	97	Negativo	135	Negativo
22	16, 33, 31, 52	60	33	98	Negativo	136	Negativo
23	16, 33, 31, 52	61	33	99	Negativo	137	Negativo
24	52	62	16, 33, 52	100	Negativo	138	16, 52, 31
25	52	63	52	101	Negativo	139	52, 31, 16
26	Negativo	64	33	102	Negativo	140	16, 58, 11, 6
27	31, 52	65	33	103	Negativo	141	16, 11, 6
28	31, 52	66	33	104	Negativo	142	16, 18, 31 58, 11, 6
29	52	67	33	105	Negativo	143	18, 6
30	52	68	Negativo	106	Negativo	144	18, 6
31	52, 33	69	Negativo	107	Negativo	145	18, 6
32	52, 33	70	Negativo	108	Negativo	146	Negativo
33	52, 33	71	Negativo	109	52	147	Negativo
34	52, 11, 6	72	Negativo	110	52	148	Negativo
35	52, 11, 6	73	Negativo	111	Negativo	149	Negativo
36	52, 31, 11	74	Negativo	112	52		
37	11	75	Negativo	113	Negativo		
38	6	76	52	114	Negativo		

Se muestra la genotipificación de todas las muestras de semen, obteniendo como resultado 86 muestras positivas con genotipos que se encuentran más frecuentes en la población.



Se observa que el genotipo que más prevalece en las muestras es el 52 en 46 pacientes y el genotipo con menor frecuencia es el 58 que se identificó en 7 pacientes.

Además, en la figura 17 se tiene una electroforesis representativa de la genotipificación de las muestras 140-145, se observa que en estas muestras hay mínimo 2 genotipos en cada una, cabe destacar que la muestra 142 está infectada con 6 genotipos, se llevó a cabo en un gel de agarosa al 3%.

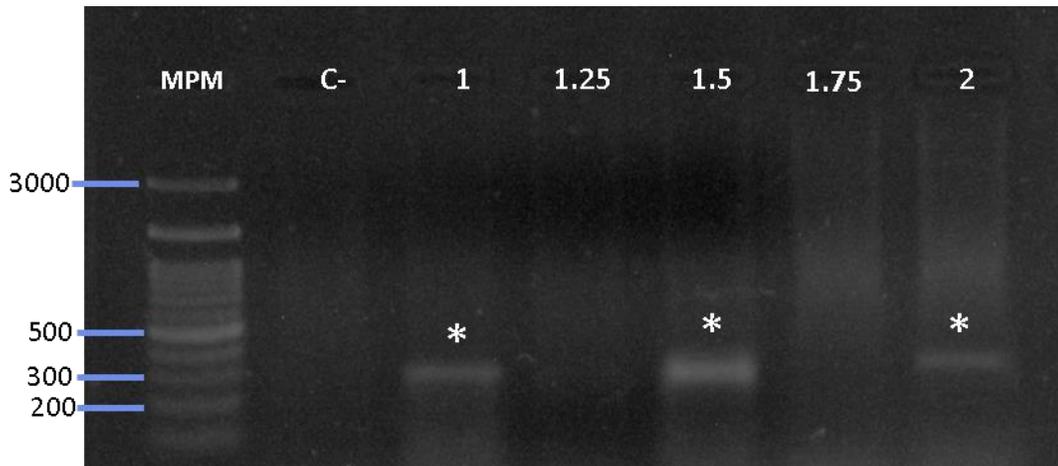


**Figura 17.** Genotipificación de las muestras 140-145.

En el primer carril se tiene el marcador de peso molecular de 100 pb, en el segundo, un control positivo en el que se señala cada genotipo con un color diferente; Naranja: VPH16, Verde: VPH18, Azul 33, Blanco:31, Amarillo: 58, Rosa: 11, Rojo: 6 y Morado 52 y en los carriles 3-8 se colocaron las muestras. Se observa que todas las muestras son positivas para al menos dos genotipos del VPH, además, se observa una muestra presenta una infección por 6 genotipos de VPH.

- Identificación de *Chlamydia trachomatis*

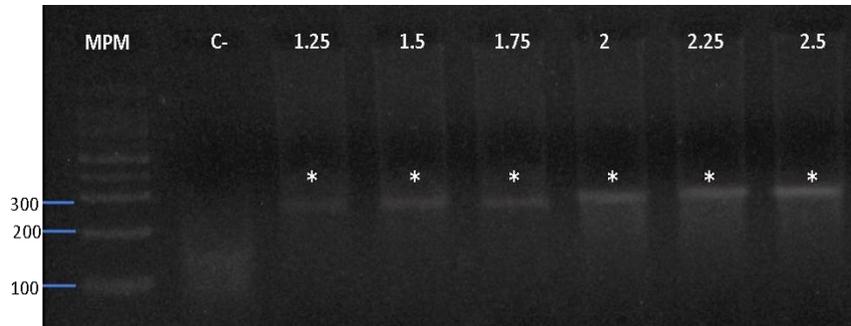
Para identificar esta bacteria se utilizaron los primers KL1/KL2 que van dirigidos para amplificar un fragmento del plásmido críptico, primeramente, se llevó a cabo la estandarización del magnesio, que se ve representado en la figura 18, en un gel de agarosa al 3%, se observa que los volúmenes adecuados de este reactivo son 1, 1.5 y 2  $\mu$ l, se obtiene un producto de amplificación de 240 pb.



**Figura 18.** Estandarización de  $MgCl_2$  para el par de primers KL1 y KL2 para identificación de *Chlamydia trachomatis*.

En el primer carril se tiene un marcador de peso molecular de 100 pb, un control negativo en el segundo y en los carriles 3-7 se colocaron los productos de PCR que contenían diferentes volúmenes de  $MgCl_2$  en cada uno, siendo 1, 1.25, 1.5, 1.75 y  $\mu$ l en cada carril. Se observa un producto de amplificación de 240 pb con un volumen de 1, 1.5 y 2  $\mu$ l de  $MgCl_2$ .

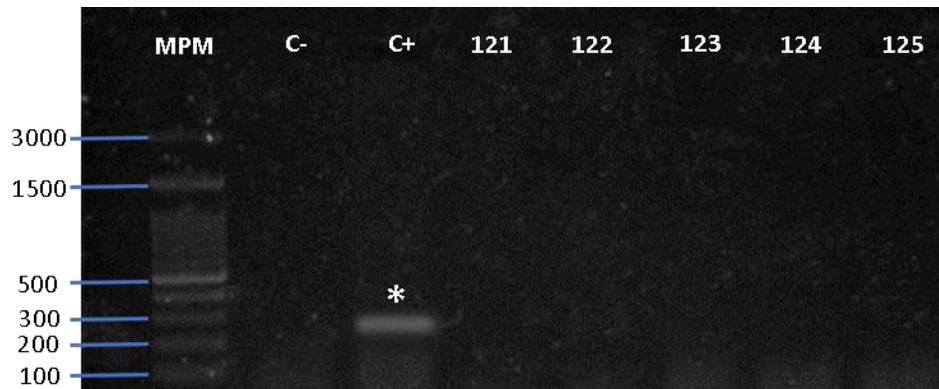
Sin embargo, al correr las muestras no amplificaba más que el control positivo por lo que se decidió realizar reamplificación, es decir, tomar el producto de PCR ya obtenido y volver a llevar a cabo la PCR pero en este caso, solo con 15 ciclos y utilizando únicamente 2  $\mu$ l de este producto, por lo que se estandarizó nuevamente el magnesio que se muestra en la figura 19, se observa que en todas hay un producto amplificado, pero, se observan mejores bandas a partir de 2  $\mu$ l de  $MgCl_2$ , por lo que se utilizó 2.5  $\mu$ l de este reactivo.



**Figura 19.** Estandarización de MgCl<sub>2</sub> para la detección de *Chlamydia trachomatis* mediante reamplificación.

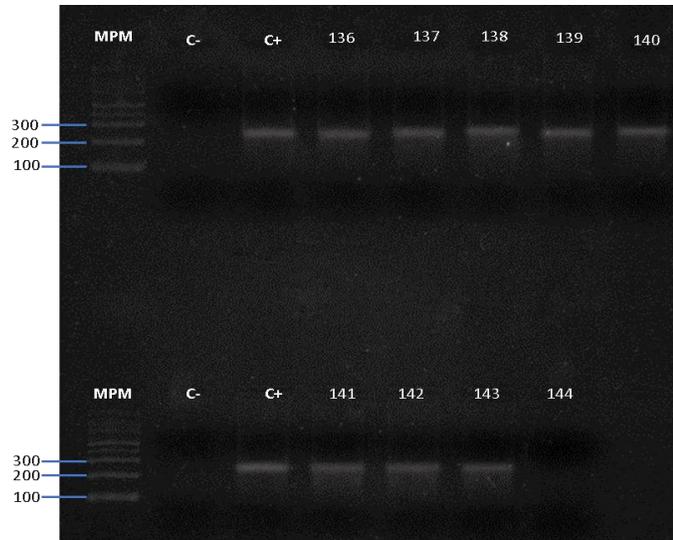
En el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 100 pb, en el segundo un control negativo, en los carriles 3-8 los diferentes volúmenes de MgCl<sub>2</sub> utilizados en cada reacción. Se observa que hay productos de amplificación a partir del tercer carril, sin embargo, con un volumen de 2, 2.5 y 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> se observa una mejor banda. Se llevó a cabo en gel de agarosa al 3%.

A continuación, en las figuras 20 y 21 se tienen los resultados, en la primera, se tiene una electroforesis en donde únicamente se observa el control positivo, esta imagen representa a la reacción con 30 ciclos, mientras que en la figura 21 se tiene una electroforesis representativa de la reamplificación, en donde puede visualizarse que las muestras 136-143 son positivas, mientras que la muestra 144 es negativa.



**Figura 20.** Resultados del diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* en las muestras de semen.

En el primer carril se tiene el marcador de peso molecular de 100 pb, un control negativo y un control positivo en el segundo y tercer carril, en los carriles 4-8 se colocaron las muestras 121-125, sin embargo, no se observan muestras positivas. Se llevó a cabo en gel de agarosa al 3%.



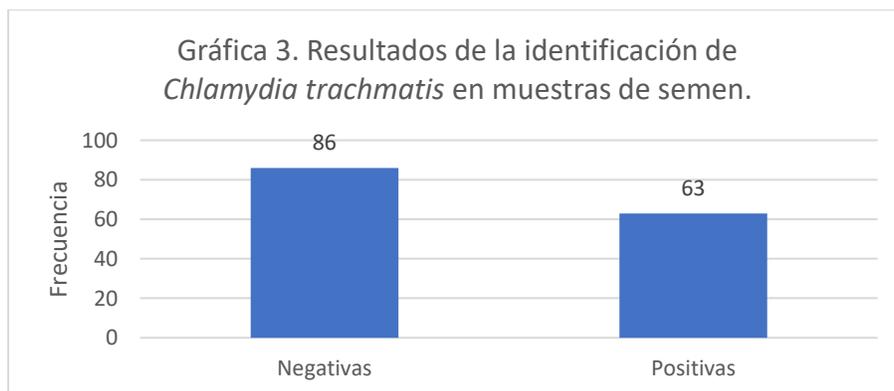
**Figura 21.** Resultados de la reamplificación para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*.

En los primeros carriles se tiene marcadores de peso molecular de 100 pb, además se tienen controles negativos, así como positivos, se observan productos de amplificación en las muestras 136-143, una muestra negativa que es la 144. Se llevó a cabo en gel de agarosa al 3%

Los resultados de la identificación de la bacteria en el DNA de las muestras, se ven reflejados en la tabla 27 y en la gráfica 3, en donde podemos observar que hay 63 muestras positivas y 86 negativas.

**Tabla 27.** Resultados del diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* en muestras de semen.

Muestras negativas	Muestras positivas	Total
86	63	149

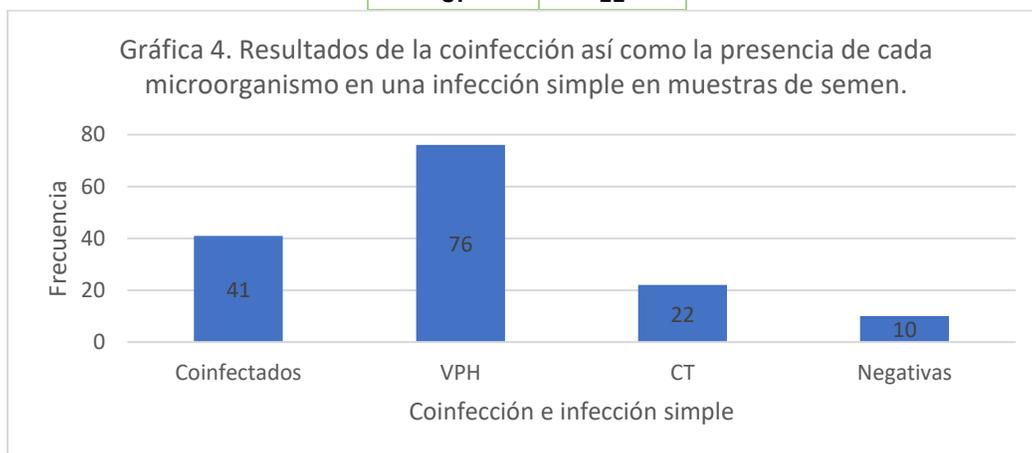


Se presentan los resultados de las muestras de semen infectadas por CT, obteniendo como resultado 63 muestras positivas y 86 muestras negativas.

Al tener identificados a los dos microorganismos en las muestras de DNA, se establecieron aquellas en las que se presentaban ambos microorganismos, en las que solo estaban infectadas por uno u otro patógeno y las muestras negativas. En la tabla 28, así como en la gráfica 4 se observan estos resultados, en donde la mayor frecuencia es para aquellas muestras con VPH, seguido de las muestras coinfectadas, en tercer lugar, las muestras infectadas solo por *Chlamydia trachomatis* y se tienen 10 muestras negativas para ambos microorganismos.

**Tabla 28.** Resultados de la infección en las muestras de semen.

Infección	Frecuencia
Negativas	10
Coinfectadas	41
VPH	76
CT	22



Se muestran los resultados de pacientes con los diferentes tipos de infección, el VPH se identificó en 76 muestras, CT en 22 muestras (esto por infección de únicamente un microorganismo, es decir, muestras que solo presentaron infección por el virus o por la bacteria), 10 muestras negativas y 41 muestras coinfectadas (en donde se identificó a ambos microorganismos).

Otro aspecto a considerar es la prevalencia de cada genotipo de VPH, sobre todo, en aquellas que están coinfectadas por *Chlamydia trachomatis* también, en la tabla 29 se registran cada genotipo o que la muestra resultó positiva para VPH con los primers sin identificar genotipo, las muestras resaltadas en amarillo son las coinfectadas, mientras que las que están resaltadas en azul únicamente están infectadas por VPH.

**Tabla 29.** Genotipos encontrados en las muestras de semen y resultados de CT

Muestra	Genotipos/ Primers VPH	CT	Muestra	Genotipos	CT	Muestra	Genotipos/ Primers VPH	CT
1	16,18,33	-	51	52, 58	+	101	Positivo	+
2	18, 31	-	52	Positivo	+	102	Positivo	+
3	18, 31	-	53	Positivo	+	103	Positivo	+
4	Positivo	-	54	18, 58	-	104	Positivo	+
5	Positivo	-	55	18, 6, 52	-	105	Negativo	+
6	Positivo	-	56	18, 6, 52	-	106	Positivo	+
7	18, 31	-	57	18, 6	-	107	Negativo	+
8	18, 31	-	58	18, 6	-	108	Negativo	+
9	Positivo	-	59	33	-	109	52	-
10	Positivo	+	60	33	-	110	52	-
11	18, 31	-	61	33	-	111	Negativo	-
12	31	-	62	16, 33, 52	-	112	52	-
13	18, 33	-	63	52	-	113	Negativo	+
14	16, 18	-	64	33	-	114	Negativo	-
15	16	-	65	33	-	115	Negativo	+
16	16, 31	-	66	33	-	116	52	+
17	16, 58, 11	-	67	33	-	117	Negativo	+
18	52	-	68	Negativo	-	118	Negativo	+
19	16, 11	-	69	Negativo	-	119	Negativo	+
20	16, 11	-	70	Negativo	-	120	Negativo	+
21	16, 11, 52	-	71	Positivo	-	121	52, 6	-
22	16, 33, 31, 52	-	72	Positivo	-	122	Negativo	-
23	16, 33, 31, 52	-	73	Positivo	-	123	Negativo	-
24	52	-	74	Positivo	-	124	Negativo	+
25	52	-	75	Positivo	+	125	Negativo	+
26	Positivo	-	76	52	+	126	Negativo	+
27	31, 52	-	77	33, 11	+	127	Negativo	+
28	31, 52	-	78	33, 11	+	128	52, 6	+
29	52	-	79	33, 52	+	129	6	+
30	52	-	80	33	-	130	52	-
31	52, 33	-	81	33, 52	-	131	6	+
32	52, 33	-	82	Positivo	-	132	52, 6	-
33	52, 33	-	83	Positivo	-	133	Negativo	+
34	52, 11, 6	-	84	33, 52, 58	-	134	Negativo	+
35	52, 11, 6	-	85	33, 52	-	135	Negativo	+
36	52, 31, 11	-	86	33, 52	-	136	Negativo	+
37	11	-	87	33, 52	+	137	Negativo	+
38	6	+	88	33, 52	+	138	16, 52, 31	+
39	6, 18	+	89	Positivo	+	139	52, 31, 16	+
40	52, 18	-	90	Positivo	+	140	16, 58, 11, 6	+
41	52	-	91	52	+	141	16, 11, 6	+
42	Positivo	-	92	Positivo	+	142	16, 18, 31, 58, 11, 6	+
43	Positivo	+	93	33	+	143	18, 6	+
44	Positivo	+	94	52	+	144	18, 6	-
45	52, 11, 18	-	95	52	+	145	18, 6	-
46	Positivo	-	96	52	+	146	Negativo	-
47	52, 58	-	97	Negativo	+	147	Negativo	-
48	Positivo	-	98	Positivo	+	148	Negativo	+
49	Negativo	-	99	Negativo	+	149	Negativo	+
50	52, 58	+	100	Positivo	+			

Se tienen los resultados de las 149 muestras, resaltando en amarillo las muestras coinfectadas, en azul las muestras infectadas únicamente por VPH. Se colocaron los genotipos, así como las muestras que resultaron positivas con los pares de primers. En el caso de CT se reportó como negativo (-) o positivo (+) y las muestras que son negativas para cada microorganismo.

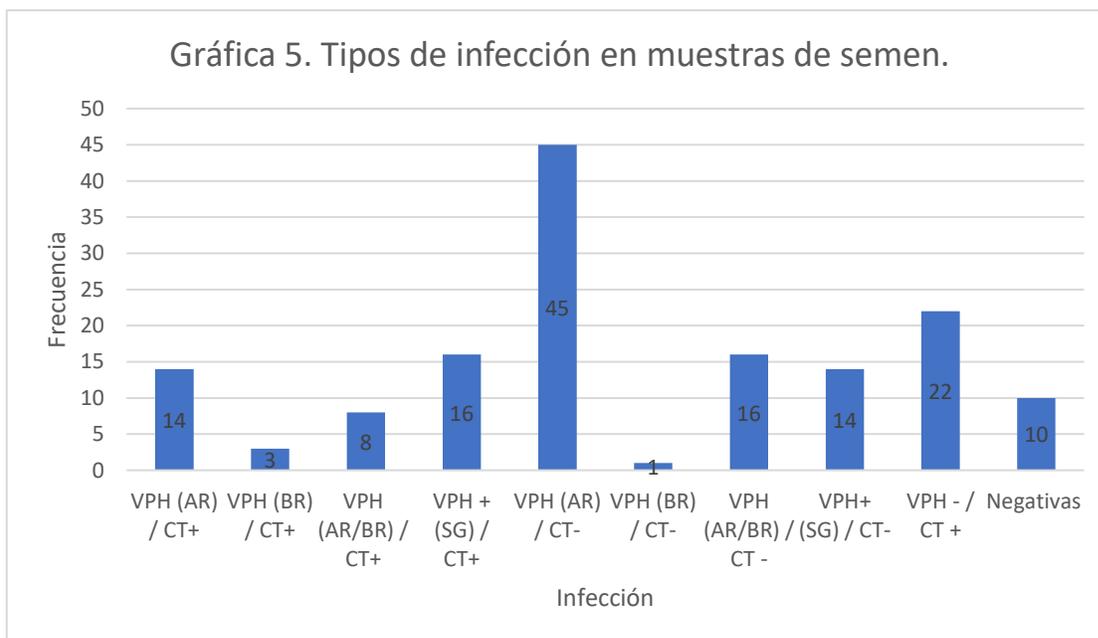
A partir de las muestras coinfectadas se realizó una relación entre la infección de VPH con genotipos de alto riesgo que, además, presentan la infección con CT. En algunas muestras no se detectó el genotipo, esto puede ser debido a que el Kit utilizado identifica los genotipos más frecuentes en la población, siendo éstos solo 8. Como se observa, en la tabla 30, se registra 9 tipos de infecciones.

**Tabla 30.** Tipos de infección entre VPH y CT.

Tipo de infección	Muestras	Interpretación	Total
<b>VPH (AR)/ CT+</b>	50, 51, 76, 79, 87, 88, 91, 93, 94, 95, 96, 116, 138, 139.	Se encontraron 14 muestras en las que únicamente se encontraron genotipos de alto riesgo coinfectados con CT.	41 muestras coinfectadas.
<b>VPH (BR)/ CT+</b>	38, 129, 131.	Se registraron 3 muestras con únicamente genotipos de bajo riesgo coinfectados con CT.	
<b>VPH (AR/BR) / CT+</b>	39, 77, 78, 128, 140, 141, 142, 143.	Se identificaron 8 muestras que presentan una infección por genotipos de alto riesgo y bajo de VPH coinfectados con CT.	
<b>VPH +(SG)/ CT+</b>	10, 43, 44, 52, 53, 75, 89, 90, 92, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 106.	Se encontraron 16 muestras positivas para VPH a las que no se les identificó el genotipo, coinfectadas con CT.	76 muestras que presentan infección por VPH
<b>VPH (AR)/ CT-</b>	1, 2, 3, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 40, 41, 47, 54, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 80, 81, 84, 85, 86, 109, 110, 112, 130.	Se registraron 45 muestras con infección de VPH de genotipos de alto riesgo.	
<b>VPH (BR)/ CT-</b>	37	Se identificó una muestra que posee una infección con un genotipo de bajo riesgo.	
<b>VPH (AR/BR) / CT-</b>	17, 19, 20, 21, 34, 35, 36, 45, 55, 56, 57, 58, 121, 132, 144, 145.	Se encontraron 16 muestras positivas para VPH con genotipos de alto y bajo riesgo.	
<b>VPH + (SG) / CT-</b>	4, 5, 6, 9, 26, 42, 46, 48, 71, 72, 73, 74, 82, 83.	Se registraron 14 muestras positivas para VPH sin genotipo identificado.	
<b>VPH - / CT +</b>	97, 99, 105, 107, 108, 113, 115, 117, 118, 119, 120, 124, 125, 126, 127, 133, 134, 135, 136, 137, 148, 149.	Se diagnosticó CT en 22 muestras, esto sin presentar infección por VPH.	22 muestras con infección de CT
Se tienen 10 muestras negativas para ambos microorganismos.			

En la tabla se registraron los tipos de infección, esto es, el número de pacientes que presentan una infección por genotipos de VPH de alto riesgo y CT positivos (VPH (AR) / CT+), VPH con genotipos de bajo riesgo y CT positiva (VPH (BR) / CT+), VPH con genotipos de alto y bajo riesgo, además de cursar una infección con CT (VPH (AR/BR) / CT+) y VPH sin genotipos identificados con CT positivos (VPH+ (SG) / CT+). Además, se tienen los genotipos de VPH como infección simple, se presentan también, las muestras que resultaron positivas únicamente a CT y las muestras negativas.

En la gráfica 5, se observa la frecuencia de cada tipo de infección encontrada en la población estudiada, es notable que, es mayor la prevalencia de aquellas muestras que están infectadas por VPH con genotipos de alto riesgo, esto sin estar coinfectadas con *Chlamydia trachomatis*, mientras que las muestras coinfectadas se observa mayor prevalencia de aquellas a las que no se les detectó el genotipo, esto es en 16 muestras.



Se observa que la infección más prevalente en las muestras de semen es la de VPH con genotipos de alto riesgo y CT negativos con 45 pacientes, el segundo valor pertenece a la infección causada únicamente por CT con 22 pacientes, el siguiente dato es de la infección producida por VPH sin un genotipo identificado con 16 pacientes con CT positivo y con la misma frecuencia se encuentra el parámetro de VPH con infección por genotipos de alto y bajo riesgo, pero CT negativo.

Se analizaron los parámetros espermáticos de cada muestra, considerando solo tres clasificaciones: muestras coinfectadas, muestras infectadas por VPH y muestras infectadas por CT, en las tablas 31, 32 y 33 se resumen las alteraciones de cada parámetro seminal, que están reportados en las espermatobioscopías.

En la tabla 31, se puede encontrar que las mayores alteraciones, son en el pH, en donde hay 28 muestras que reportan un pH en el límite superior, es decir, en 8, además se encontraron 39 muestras con espermatozoides anormales, en donde hay mayor alteración en la cabeza, de 28 muestras.

**Tabla 31.** Alteraciones espermáticas de las muestras coinfectadas.

Parámetro seminal	Observaciones
<b>Volumen</b> VR: 1.5-7.5	Se encontraron cuatro muestras con un volumen menor a 1.5 ml.
<b>Aspecto</b>	Se reportan dos muestras con un color amarillento y las treinta y nueve restantes como gris opalescente.
<b>Licuefacción</b>	Ocho muestras reportaron una licuefacción incompleta.
<b>Viscosidad</b>	Las ocho muestras que reportaron licuefacción incompleta reportaron una hebra mayor a 2 cm. Las muestras restantes reportan un goteo individual continuo.
<b>Aglutinación</b>	Se identificó nueve muestras con este parámetro positivo.
<b>pH</b> VR: 7.2-8.0	Hay tres muestras que se encuentran dentro del valor de referencia, reportando para éstas un pH de 7.5, veinticuatro muestras con pH de 8 que se encuentran en el límite superior del rango de referencia, nueve que reportan un pH de 7 y cinco muestras con pH de 9, que se encuentra elevado con respecto al valor de referencia.
<b>[espermatozoides/mL]</b> VR: > 15 millones	Se identificaron cuatro muestras que reportan una concentración de espermatozoides menor a 15 millones por ml.
<b>Motilidad</b>	Hay trece muestras en las que la motilidad es menor al 40% y una en la que no se tiene el dato.
<b>Células epiteliales</b> <b>Leucocitos</b> <b>Eritrocitos</b>	En la mayoría de las muestras se observaron leucocitos y células epiteliales, siendo los rangos 0-1, 2-4 que se reportaron en mayor cantidad, mientras que, para los eritrocitos, solo una muestra reportó un valor de 0-2 eritrocitos por campo.
<b>Espermatozoides anormales</b>	Se reportaron 39 muestras con espermatozoides anormales, dos muestras en las que predominan los espermatozoides normales, uno de ellas reporta un 66% de morfología normal y la otra 90% de espermatozoides normales.
<b>Defectos de cola, cabeza y pieza intermedia</b>	Se registraron veintiocho muestras que presentaron en mayor proporción defectos en la cabeza, nueve en la cola y uno en la pieza intermedia, hubo una muestra en la que tanto la alteración de la cabeza como de la cola fueron iguales y dos muestras en las que no se tiene el dato.
<b>Bacterias</b>	Seis muestras reportaron moderadas, mientras que las muestras restantes reportaron escasas.

Se realizaron las observaciones a partir de las espermatozoides de las 41 muestras coinfectadas.

En la tabla 32 se resumen las alteraciones en los parámetros seminales de las muestras infectadas solo por VPH, las mayores alteraciones se encuentran en: 30 muestras positivas para el parámetro de aglutinación, en el pH, en donde se encontraron 39 muestras con un pH de 8 y 32 con pH de 7, también, hay 34 muestras con motilidad menor al 40%, hay 72 muestras con espermatozoides anormales, en 52 muestras prevalece una mayor frecuencia en la alteración en la cabeza del espermatozoide.

**Tabla 32.** Alteraciones espermáticas en muestras infectadas únicamente con VPH

Parámetro seminal	Observaciones
<b>Volumen</b> VR: 1.5-7.5	Se encontraron 7 muestras con un volumen menor a 1.5 ml.
<b>Aspecto</b>	Únicamente se reportó una muestra con aspecto amarillento.
<b>Licuefacción</b>	Se registraron diecisiete muestras con licuefacción incompleta.
<b>Viscosidad</b>	Diecinueve muestras reportaron una hebra mayor a 2 cm, mientras que las muestras restantes un goteo individual continuo.
<b>Agglutinación</b>	Treinta muestras resultaron positivas para este parámetro.
<b>pH</b> VR: 7.2-8.0	Se identificó una muestra con pH de 7.5, cuatro muestras con 9, treinta y dos con pH de 7 y treinta y nueve muestras con pH de 8.
<b>[espermatozoides/mL]</b> VR: > 15 millones	Se registraron 9 muestras que presentan una concentración menor a los 15 millones de espermatozoides por ml.
<b>Motilidad</b>	34 muestras reportan una motilidad menor al 40%
<b>Células epiteliales</b> <b>Leucocitos</b> <b>Eritrocitos</b>	En dos muestras se reportó la presencia de eritrocitos, siendo en una de estas un valor de 2-4 células por campo y la otra es 0-1 célula por campo. En las 76 muestras se registró la presencia de células epiteliales y leucocitos, los rangos reportados son de 0-1 y de 2-4 células por campo.
<b>Espermatozoides anormales</b>	Se reportaron 72 muestras con una alta frecuencia de espermatozoides anormales, 2 muestras normales y 2 muestras en las que no se reportó el dato.
<b>Defectos de cola, cabeza y pieza intermedia</b>	Las anomalías en los espermatozoides se encontraron en mayor frecuencia de la cabeza, siendo 52 muestras las que presentaban mayor alteración en esta parte, 17 muestras que poseen una mayor alteración es en la cola, 3 en la pieza intermedia, una muestra que reportó una misma frecuencia de alteración en cabeza y pieza intermedia y finalmente en tres muestras no se reportó estos parámetros.
<b>Bacterias</b>	En una muestra se reportaron como abundantes, 26 como moderadas y 49 muestras como escasas.

Se realizaron las observaciones de las 76 muestras que resultaron infectadas únicamente por VPH a partir de las espermatobioscopias.

En la tabla 33, se resumen las alteraciones de cada parámetro seminal para las muestras infectadas únicamente por *Chlamydia trachomatis*, hay alteraciones en el pH, en donde hay 10 muestras que reportan un pH de 8, hay 21 muestras con espermatozoides anormales y hay 13 muestras en las que es mayor el porcentaje de alteración en la cabeza del espermatozoide.

**Tabla 33.** Alteraciones espermáticas en las muestras infectadas por CT

Parámetro seminal	Observaciones
<b>Volumen</b> VR: 1.5-7.5	Se encontraron 7 muestras con un volumen menor a 1.5 ml.
<b>Aspecto</b>	Se reportaron 2 muestras con aspecto amarillento y las 20 muestras restantes reportan gris opalescente.
<b>Licuefacción</b>	Se registraron 6 muestras con licuefacción incompleta.
<b>Viscosidad</b>	Seis muestras con hebra mayor a 2 cm, dieciséis con goteo individual continuo.
<b>Aglutinación</b>	Se tienen cuatro muestras positivas.
<b>pH</b> VR: 7.2-8.0	Hay diez muestras que tuvieron un pH de 8, seis muestras con 7.5 y 5 muestras con pH de 7.
<b>[espermatozoides/mL]</b> VR: > 15 millones	Hubo tres muestras que presentaron una concentración menor de espermatozoides.
<b>Motilidad</b>	Hay 8 muestras que presentaron una motilidad menor al 40%
<b>Células epiteliales</b> <b>Leucocitos</b> <b>Eritrocitos</b>	Se reportaron dos muestras en las que se encontraron leucocitos. En todas las muestras se encontraron células epiteliales y leucocitos, reportando valores que incluyen: 0-1, 1-2, 2-4 por campo.
<b>Espermatozoides anormales</b>	En una muestra se encontró un mayor porcentaje de formas normales (53%), las 21 muestras restantes reportaron una mayor frecuencia de espermatozoides anormales.
<b>Defectos de cola, cabeza y pieza intermedia</b>	Hay 13 muestras en las que la alteración en el espermatozoide es mayor en la cabeza, 4 muestras en que la alteración es mayor en la cola y dos en la pieza intermedia, hay una muestra que presenta un mismo porcentaje en la alteración de la cola y cabeza, otra muestra en la que están alteradas en un mismo porcentaje la cabeza y la pieza intermedia y finalmente una muestra en la que no se registró el dato.
<b>Bacterias</b>	Hubo 5 muestras en las que se reportaron como moderadas y en 17 muestras restantes como escasas.

Se realizaron las observaciones de las 22 muestras que resultaron positivas para CT con base en las espermatobioscopías.

**Tabla 34.** Resumen de mayores alteraciones espermáticas encontradas en los tipos de infección.

Parámetros espermáticos	Infección	Coinfectados ( $\bar{x}$ )	VPH ( $\bar{x}$ )	CT ( $\bar{x}$ )
pH		7.86	7.62	7.61
Viscosidad: hebra mayor a 2 cm (%)		19.51	25	27.27
Motilidad (%)		49.9	40.21	46
Espermatozoides anormales (%)		88.87	93.55	88.42
Morfología:				
Defectos de cola (%)		29.97	30.19	28.76
Defectos de cabeza (%)		43.66	43.13	40.33
Defectos de pieza intermedia (%)		22.64	25.36	22.57

Se detallan los parámetros espermáticos que en mayor frecuencia resultaron alterados en cada tipo de infección, en donde el pH de los coinfectados es ligeramente más alcalino que en las otras dos infecciones, la menor motilidad corresponde a los espermatozoides infectados por VPH, la mayor cantidad de espermatozoides anormales fueron los infectados por VPH y en la morfología observamos que hay mayor alteración en la cabeza de los espermatozoides coinfectados, mientras que la cola y pieza intermedia se presenta más alterado en VPH comparado con los otros tipos de infección.

## DISCUSIÓN

Las enfermedades de transmisión sexual se han visto incrementadas en los últimos años, esto debido a factores socioculturales como el número de parejas sexuales (cambio frecuente), la falta de uso de métodos anticonceptivos de barrera, mala cultura de prevención, además, de sincronismo de las infecciones de transmisión sexual que pueden actuar como factores que promueven la aparición de otras infecciones (Aranda, 2015). El semen puede estar infectado por diversos microorganismos, que pueden ser bacterias, virus y protozoos, esto debido a que en el plasma seminal logran encontrar las condiciones adecuadas para su supervivencia (Shim, 2011)

La infección por el VPH no ha sido ampliamente estudiada en hombres, a pesar de que se considera a este como el mayor portador debido al carácter asintomático por el que cursa el paciente (Cardona, 2011), en las muestras analizadas de semen en el presente trabajo se encontraron 87 positivas (gráfica 1) de 149 muestras estudiadas, representando el 58.38%, se estima que la tasa de infección varía entre 1.4 y 25.6% de la población general (teniendo las tasas más altas en África y Sudamérica) esto depende de la región estudiada, además, la prevalencia del virus en el hombre puede variar debido al tipo de técnica utilizada en cada estudio así como la muestra y la población estudiada (Silva, 2013). En México se reporta una prevalencia del 61.9% de hombres infectados (Gallegos, 2017).

La genotipificación arroja una frecuencia mayor del genotipo 52 en las muestras analizadas, esto se ve reflejado en la gráfica 2, con 46 muestras positivas para éste, por otro lado, el genotipo menos frecuente fue el 58, que fue identificado en 7 muestras. En un estudio realizado en el 2019, se reporta al genotipo 52 como el más frecuente en parejas que han sido sometidas a un tratamiento de fertilización *in vitro*, siendo el mayor porcentaje de infectados los hombres con respecto a su pareja, representando un 20% y un 19% respectivamente (Jersoviene, 2019). Otro estudio realizado, arroja evidencia de que los genotipos 52 y 58 pueden verse involucrados en el cáncer de próstata, estos genotipos prevalecieron en un 33 y 17% respectivamente en su población mexicana estudiada (Medel, 2018). En la figura 17, presenta la genotipificación de las muestras 140-145, se observa que hay por lo menos dos genotipos en cada muestra de esta figura, cabe destacar que en la muestra 142 se encontraron 6 genotipos.

Por lo tanto, podemos clasificar las muestras en aquellas que presentan la infección por el virus con un genotipo (32 muestras) y en aquellas que presentan una infección por dos o más genotipos (55 muestras); en el primer caso se destaca al genotipo 52 (17 muestras positivas), mientras que en la infección por dos o más genotipos resalta la infección por los genotipos 52 con el 33 (en 9 muestras), además, cabe señalar que el genotipo 16 se determinó en 15 muestras, presentándose con él, los genotipos restantes del kit: 18, 33, 31, 58, 11, 52, 6. En un estudio realizado entre 2010 y 2012, reportan al genotipo 16 más

frecuente en las muestras obtenidas de hombres, representando un 63.41% de su población, además menciona que se encuentra presente con otros genotipos en las muestras (Gallegos, 2017). Por último, no se identificó el genotipo en 62 muestras, que, en algunas de ellas resultaron positivas con la identificación con los primers, esto puede ser debido al kit utilizado en la genotipificación, pues no amplifica para todos los genotipos del VPH.

Sin embargo, el virus del papiloma humano no es el único microorganismo que se transmite vía sexual, sino que *Chlamydia trachomatis* es considerada uno de los patógenos de transmisión sexual más prevalentes en el mundo, en México, no se conoce con exactitud de la frecuencia de hombres infectados por esta bacteria, debido a que la mayoría de las infecciones son asintomáticas. En el presente trabajo se identificó a la bacteria mediante PCR, se encontraron 63 muestras positivas, en la gráfica 3 se reflejan dichos resultados, además, en la figura 21, se observa una electroforesis representativa de la identificación bacteriana en las muestras 136-144, se tiene únicamente una muestra negativa (muestra 144).

Posteriormente se relacionaron las muestras positivas de ambos microorganismos, en la gráfica 4 se expresan no solo estos resultados, sino que se encontraron muestras que estaban infectadas solo por VPH o por *Chlamydia trachomatis*, así como las muestras negativas para cualquiera de los microorganismos estudiados, siendo estos resultados 41, 76, 22 y 10 respectivamente. Además, se registraron diferentes tipos de infección que se tiene en las muestras analizadas, lo cual se observa en la gráfica 5; de las 41 muestras coinfectadas, la mayor frecuencia fue para aquellas sin genotipo identificado, por lo que no podemos asociar un genotipo de VPH que prevalece en las muestras con CT, mientras que en las muestras infectadas únicamente por VPH son más frecuentes aquellas en donde se registraron genotipos de alto riesgo.

Se encontró un estudio, en donde se habla de la infección de VPH, sus genotipos, así como si se encuentran coinfectadas con CT y otros microorganismos, únicamente menciona que el 24.1% no presentan coinfección, mientras que el 31% si, pero de estas no fue CT la más frecuente, además, mencionan que los genotipos frecuentes en las muestras coinfectadas son de alto riesgo/ riesgo intermedio (Olvera, 2018), sin embargo, tampoco relacionan el genotipo con cada microorganismo que estudiaron, mientras que en este caso se encontraron 27.51% de muestras coinfectadas y 65.77% que no lo estaban.

En cuanto a las alteraciones en los parámetros espermáticos, se encontró lo siguiente: hay dos parámetros en los que difieren según los tipos de infecciones reportadas en este estudio (VPH, Coinfectadas, CT) el pH varía en muestras infectadas por VPH y las coinfectadas, teniendo en ésta última una media de 7.8658, mientras que en las muestras de VPH se tiene una media de 7.625, se llevó a cabo un prueba de hipótesis para dos medias, utilizando un IC del 95%, resultando ser diferentes entre sí, por lo que podemos decir que el pH en muestras coinfectadas tiende a ser ligeramente más alcalino, mientras que para CT

se tiene una media de 7.27, sin embargo, aún se encuentran dentro del valor de referencia para este parámetro que va de 7.2-8.

Las alteraciones en la morfología de los espermatozoides se encuentra en mayor frecuencia en la cabeza en las muestras coinfectadas con respecto a la cola y la pieza intermedia, sin embargo, no hay diferencia significativa entre la alteración de la cabeza de las coinfectadas con las infectadas únicamente por VPH, además, en ésta infección (VPH) se encontraron también las mayores alteraciones en la cola y pieza intermedia del espermatozoide, en cuanto a las muestras infectadas por CT, no se encontró diferencias significativas al compararlas con las demás, sin embargo, esto no es definitivo ya que el número de muestras para cada infección son diferentes, mientras que para VPH se tienen 76 muestras, las coinfectadas son 41 y las infectadas por CT 22. Un estudio realizado en 2010 reporta que encontraron DNA del VPH en la cabeza del espermatozoide que está relacionado con la reducción de la motilidad espermática (Foresta C. G., 2010). Además, podemos decir que se espera que en las muestras coinfectadas se observen una mayor alteración en la cabeza del espermatozoide, esto debido a que ambos microorganismos comparten este sitio para infectar como se puede observar en la Figura 7.

Por otro lado, la motilidad resultó ser reducida en pacientes infectados solo por VPH, pero como se mencionó anteriormente, el número de muestras de cada tipo de infección difiere, para VPH se obtuvo una media de motilidad del 40.08%, para CT 46% y en coinfectados 49.9%. La OMS establece que la motilidad espermática tiene que ser mayor a 40%, por lo que podemos decir que los espermatozoides son móviles.

El volumen del semen y la concentración de espermatozoides no resultaron alterados en gran medida en ningún tipo de infección, además no se logró tener diferencia significativa entre los parámetros seminales de los diferentes genotipos encontrados así como en el porcentaje de espermatozoides anormales, sin embargo, se tienen medias de espermatozoides anormales de 93.55 para VPH, 88.87 para coinfectados y 88.42 para CT, es decir, en los tres tipos de infección se encuentran una alta frecuencia de espermatozoides anormales. En cuanto a la viscosidad se encontró el 25% de muestras con hebra mayor a 2 cm en VPH, 19.51% en coinfectados y 27.27% para CT, una viscosidad anormal puede dificultar la determinación de ciertos parámetros como son el recuento de espermatozoides y la movilidad, una viscosidad aumentada puede señalar una inflamación crónica de la próstata, así como la presencia de anticuerpos anti espermatozoides (Toro, 2009).

Se ha mencionado que los espermatozoides pueden infectarse en el epidídimo, conducto deferente o uretra, los microorganismos no se asocian solo a los espermatozoides sino que también a otras células que pueden estar presentes en el líquido seminal como leucocitos, células epiteliales, esto se ha visto en mayor frecuencia en aquellos pacientes que presentan inflamación o infección en las glándulas sexuales accesorias como la próstata, vesícula seminal o glándula bulbouretral (Dejucq, 2004) cabe destacar que en

todas las muestras seminales se observaron células epiteliales y leucocitos, siendo éstos últimos más frecuentes, llegando a obtener reportes de 8-10 leucocitos por campo, esto fue en cuatro espermabioscopías, en donde hay tres muestras que están infectadas con VPH y una con CT, en cuanto a los genotipos de VPH, se encuentran 52-33; 18-58 y 33, genotipos que son de alto riesgo.

Los resultados sugieren por lo tanto, que los pacientes coinfectados reportan un pH ligeramente más alcalino así como una mayor frecuencia en la alteración en la cabeza del espermatozoide sin embargo, debemos tener en cuenta que la eliminación de las infecciones en el hombre se observa potenciada, esto comparado con la eliminación de las infecciones en las mujeres, debido a que hay un contacto más frecuente del tejido afectado con el medio ambiente y un aumento de la renovación de las células epiteliales (Lajous, 2005), es decir, el hombre puede estar eliminando las infecciones constantemente, por lo tanto su comportamiento sexual influye directamente debido a que si el hombre está en contacto con el foco de infección, ésta persistirá. También, se reporta que la prevalencia del VPH disminuye con la edad, esto debido a un mecanismo que elimina los tipos virales, así como las células infectadas por parte del sistema inmune y no resultan en complicaciones clínicas (Ault, 2006).

## CONCLUSIONES

Se logró identificar el Virus del Papiloma Humano y *Chlamydia trachomatis* en muestras de semen por medio de técnicas moleculares, obteniendo 76 muestras con infección por VPH, 41 coinfectadas, 22 con CT y 10 Negativas. El genotipo más frecuente fue el 52, que se reporta como de alto riesgo, mientras que en muestras coinfectadas se obtuvo en mayor frecuencia aquellas en las que no se identificó el genotipo. En cuanto a los parámetros seminales se encontró únicamente el pH ligeramente más alcalino en muestras coinfectadas, así como una mayor alteración en la cabeza del espermatozoide. Sin embargo, en todas las muestras, independientemente de la infección por la que cursa el paciente, se tiene una alta frecuencia de espermatozoides anormales que repercute directamente en la fertilidad de los hombres.

## REFERENCIAS

- Aedo, S. M. (2007). Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. *Revista Médica de Chile*, 135(2), 167-173. Recuperado el 18 de Abril de 2020, de <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872007000200004>
- Aranda, C. (2015). Infección por el virus del papiloma humano en varones. *Ginecología y Obstetricia de México*, 83(11), 697-706. Recuperado el 15 de Junio de 2020, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2015/gom1511f.pdf>
- Asociación Mexicana de Medicina de la Reproducción. (24 de Agosto de 2018). *Situación de la infertilidad en México*. Obtenido de <https://bit.ly/2JhtdUV>
- Ault, K. (2006). Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2006. doi:10.1155 / IDOG / 2006/40470
- Bajo, J. &. (2009). *Fundamentos de reproducción*. Buenos Aires: Médica Panamericana. Recuperado el 08 de Mayo de 2020, de <https://bit.ly/3fyXnBa>
- Bustamante, G. M. (2015). Conocimiento y prácticas de prevención sobre el virus del papiloma humano (VPH) en universitarios de la Sierra Sur, Oaxaca. *An Fac med.*, 76(4), 369-376.
- Carballal, G. &. (2014). *Virología médica* (Cuarta ed.). Buenos Aires: Curpus Editorial.
- Cardona, J. P. (2011). Prevalencia del virus del papiloma humano y sus factores de riesgo en hombres: revisión sistemática. *Asociación Colombiana de Infectología*, 15(4), 268-276. Recuperado el 24 de Mayo de 2020, de <https://bit.ly/2YtUrPW>
- Carreras, R. X. (2008). *Virus del Papiloma Humano y Cáncer de Cuello de Útero*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Carrillo, A. M. (2004). Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Pública de México*, 46(1), 7-15. Recuperado el 18 de Abril de 2020, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342004000100002](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342004000100002)
- Clinic, M. (Enero de 2019). *Esterilidad masculina*. Recuperado el 08 de Mayo de 2020, de <https://mayocl.in/2A66nNT>
- Cortazar, A. &. (Junio de 2004). *PCR*. Recuperado el 10 de Abril de 2020, de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- Crickx, E. M. (2016). Rectal Lymphogranuloma Venereum in HIV- infected Patients Can Mimic Lymphoma. *Journal of Clinical gastroenterology*, 50(5), 414-416. doi:10.1097/MCG.0000000000000379

- Dejuca, N. &. (2004). Viruses in Semen and Male Genital Tissues--Consequences for the Reproductive System and Therapeutic Perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, 10(5), 557-575. doi:10.2174/1381612043453225
- Doorbar, J. Q. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, 55-70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083.
- Flores, I. (2018). Espermatobioscopia. Organización Mundial de la Salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 23, 99-103. Recuperado el 04 de Mayo de 2020, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2018/rmq182d.pdf>
- Foresta, C. G. (2010). Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertility and sterility*, 93(3), 802-806. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.10.050
- Foresta, C. P. (2011). Mechanism of Human Papillomavirus Binding to Human Spermatozoa and Fertilizing Ability of Infected Spermatozoa. *PLoS One*, 6(3). doi:10.1371/journal.pone.0015036
- Franco, L. S. (2018). *Enfermedades Infecciosas en Ginecología y Obstetricia*. Bogotá: Universidad de los Andes. Recuperado el 13 de Abril de 2020, de <https://bit.ly/2Vtk14C>
- Gallegos, J. R. (2017). High prevalence of co-infection between human papillomavirus (HPV) 51 and 52 in Mexican population. *BMC Cancer*, 17(531). doi: 10.1186/s12885-017-3519-7
- Garibyan, L. &. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4. doi:10.1038/jid.2013.1
- Garolla, A. L. (2012). Human papillomavirus sperm infection and assisted reproduction: a dangerous hazard with a possible safe solution. *Human reproduction*, 27(4), 967-973. doi:10.1093/humrep/des009
- Gross, G. (2014). Genitoanal human papillomavirus infection and associated neoplasias. *Current problems in dermatology*, 45, 98-102. doi:10.1159/000358423
- Hernanz, A. S. (2016). Relación entre la infección por el virus del papiloma humano y Chlamydia trachomatis. *Clínica e investigación en ginecología y obstetricia*, 44(4), 167-173.
- Huneus, A. S. (2018). Chlamydia trachomatis: fundamentos de la importancia del cribado en el sistema público de salud. *Revista Chilena de Infectología*, 35(5), 498-500. Recuperado el 10 de Abril de 2020, de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v35n5/0716-1018-rci-35-05-0498.pdf>
- IMSS. (Noviembre de 2017). *Con medidas preventivas, el IMSS reduce contagio de enfermedades de transmisión sexual*. Obtenido de <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201711/359>
- Instituto Nacional de Salud Pública. (04 de Septiembre de 2015). LADIMOLVPH. Obtenido de Laboratorio de Investigación y Análisis Molecular del Virus del Papiloma Humano.: <https://bit.ly/2JsNICv>
- Instituto Nacional del Cáncer . (s/f). SV40. Obtenido de <https://bit.ly/2XA468R>

- Jácome, I. I. (2017). Prevalence of Human Papillomavirus in Women from the State of Michoacan, Mexico, showed high frequency of unusual virus genotypes. *Revista de investigación clínica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 69(5), 262-269. doi:10.24875/RIC.17002065
- Jersoviene, V. G. (2019). Human Papillomavirus and Infertility. *Medicina*, 55(7), 377. doi:10.3390/medicina55070377
- Juemin Xi, J. C. (2017). Variabilidad genética e implicación funcional de la región de control largo en variantes de VPH-16 en el suroeste de China. *PLoS ONE*, 12(8). Obtenido de <https://bit.ly/2LbN4Ht>
- Jutinico, A. G. (2017). Asociación de HSP60 de Chlamydia trachomatis y desarrollo de cáncer de ovario. *NOVA*, 15(28), 57-68. doi:http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n28/1794-2470-nova-15-28-00057.pdf
- Lajous, M. M. (2005). Determinants of Prevalence, Acquisition, and Persistence of Human Papillomavirus in Healthy Mexican Military Men. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(7), 1710-6. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0926
- Lara, D. &. (2018). Tratamientos alternativos de medicina tradicional para Chlamydia trachomatis, agente causal de una infección asintomática. *NOVA*, 16(30), 65-74.
- López, M. F. (2012). Prevalence of human papillomavirus in women from Mexico City. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. doi:10.1155/2012/384758
- Mateos, M. P. (2017). Diagnóstico microbiológico de la infección por virus del papiloma humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(9), 593-602. doi:10.1016/j.eimc.2016.05.008
- Matorras, R. H. (2008). *Tratado de Reproducción Humana para Enfermería*. Buenos Aires: Médica Panamericana. Recuperado el 07 de Mayo de 2020, de <https://bit.ly/2L60TF4>
- McBride, A. (2017). Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biological Chemistry*, 398(8), 919-927. doi:<https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0113>
- Medel, O. V. (2018). Association between HPV infection and prostate cancer in a Mexican population. *Genetics and Molecular Biology*, 41(4), 781-789. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2017-0331
- Meyer, T. (2016). Diagnostic Procedures to Detect Chlamydia trachomatis Infections. *Microorganisms*, 4(3), 25. doi:10.3390/microorganisms4030025
- Morales, M. E. (2017). Microorganismos patógenos productores de alteraciones seminales relacionadas con infertilidad. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(3), 131-143. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de <https://doi.org/10.1016/j.rprh.2018.01.003>
- Noda, A. R. (2015). Evaluación de una PCR para la confirmación molecular de leptospirosis en fallecidos a partir de tejidos frescos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(3). Recuperado el 24 de Mayo de 2020, de <https://bit.ly/2Npd6Gj>

- Olvera, C. C. (2018). *Prevalencia de la infección por VPH y su efecto sobre la calidad seminal en hombres*. Recuperado el 7 de Julio de 2020, de <https://bit.ly/38BuSj9>
- OMS. (2010). *Laboratory Manual for the examination and processing of human semen*. (Quinta ed.). Suiza. Recuperado el 07 de Mayo de 2020, de <https://bit.ly/2WcGJ2J>
- OMS. (21 de Agosto de 2017). *Inmunización, Vacunas y Productos Biológicos*. Obtenido de <https://bit.ly/2QB8YpQ>
- Ordóñez, M. (2014). *Guías prácticas para los laboratorios de Bacteriología clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Palma, C. &. (2014). Infertilidad masculina. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(1), 122-128. doi:10.1016/S0716-8640(14)70018-5
- Prozialeck, W. F. (2002). Chlamydia trachomatis disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequesters beta-catenin in human cervical epithelial cells. *Infection and Immunity*, 70(5), 2605-13. doi:10.1128 / iai.70.5.2605-2613.2002
- Rahkola, P. V.-T. (2011). Cervical nitric oxide release and persistence of high- risk human papillomavirus in women. *International Journal of Cancer*, 128(12), 2933-7. doi:10.1002 / ijc.25637
- Rodríguez, F. B. (2016). Detección de Chlamydia trachomatis en hombres que tienen sexo con hombres en Bogotá: un estudio piloto. *NOVA*, 13(26), 17-27.
- Rosa, M. M. (2009). Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cuadernos de Saúde Pública*, 25(5), 953-964. Recuperado el 18 de Abril de 2020, de <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009000500002>
- Ryu, W.-S. (2016). *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. ELSEVIER.
- Salud, O. M. (2010). *WHO Laboratory manual for the Examination and processing of Human Semen* (Quinta ed.). Suiza: World Health Organization. Recuperado el 04 de Mayo de 2020
- Sánchez, V. E. (2009). Diagnóstico de infección por Chlamydia trachomatis mediante PCR en pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaría de la Defensa Nacional. *Ginecología y Obstetricia de México*, 77(1), 13-18. Recuperado el 18 de Abril de 2020, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2009/gom091c.pdf>
- Santos, G. M. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 166-171. Recuperado el 03 de Abril de 2020, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/ims152h.pdf>
- Shim, B. (2011). Current Concepts in Bacterial Sexually Transmitted Diseases. *Korean Journal of Urology*, 52(9), 589-597. doi:10.4111/kju.2011.52.9.589

- Silva, R. L. (2013). Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Revista Chilena de Infectología*, 30(2), 186-192. Recuperado el 07 de Abril de 2020, de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v30n2/art09.pdf>
- Society, A. C. (19 de Febrero de 2019). *El VPH y las pruebas del VPH*. Recuperado el 26 de Marzo de 2020, de <https://bit.ly/3bx3HXh>
- Stahl, P. S. (2012). Contemporary Management of Male Infertility. *Annual Review of Medicine*, 63, 525-540. Recuperado el 04 de Mayo de 2020, de <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051810-101036>
- Stanley, A. (2012). Epithelial Cell Responses to Infection whit Human Papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 215-222. doi:10.1128/CMR.05028-11
- Tamay, L. I. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78. Recuperado el 08 de Abril de 2020, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invis/ir-2013/ir132d.pdf>
- Toro, A. (2009). Espernograma. *Medicina & Laboratorio*, 15(3-4), 145-169. Recuperado el 13 de Julio de 2020, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl093-4c.pdf>
- Vargas, M. (2016). *Virología Médica* (Segunda ed.). Bogotá: El Manual Moderno.
- Viscarra, T. B. (2013). Infecciones de Transmisión Sexual en Semen. El Hombre como Vector de Transmisión. *International Journal of Morphology*, 31(1), 245-263. Recuperado el 13 de Abril de 2020, de <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000100041>
- Vromman, F. L. (2014). Quantitative Monitoring of the Chlamydia trachomatis Developmental Cycle Using GFP-Expressing Bacteria, Microscopy and Flow Cytometry. *Plos One*, 9(6). doi:10.1371/journal.pone.0099197
- Williams, V. F. (2011). HPV-DNA integration and carcinogenesis: Putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virology*, 6(1), 45-57. doi:10.2217/fvl.10.73
- Zavaleta, L. (2017). *Virus del Papiloma Humano*. Recuperado el 27 de Marzo de 2020, de Departamento de Microbiología y Parasitología. UNAM: [http://microypara.facmed.unam.mx/?page\\_id=754](http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=754)

## ANEXO

Consentimiento informado que firmaron los pacientes que decidieron someter su muestra al estudio de detección de CT y VPH.

UNIVERSIDAD DEL EJERCITO Y DEL LA FUERZA AREA  
HOSPITAL MILITAR DE ESPECIALIDADES DE LA MUJER Y NEONATOLOGIA  
POSGRADO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA  
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DETECCION DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS  
MEDIANTE TECNICA DE PCR EN MUESTRAS DE ESPERMATOBIOSCOPIA DIRECTA.  
INVESTIGADOR: MYR. M.C JUAN MANUEL CARBONELL CAMPOS  
"DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE TÉCNICA DE  
PCR EN PAREJAS DE MUJERES INFÉRTILES Y SU RELACIÓN CON ALTERACIÓN DE LA  
ESPERMATOBIOSCOPIA EN EL HOSPITAL MILITAR DE ESPECIALIDADES DE LA MUJER Y  
NEONATOLGGIA."

Por medio de la presente yo \_\_\_\_\_ con fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ años, permito la incorporación de los resultados de mis exámenes paraclínicos, así como la realización de la detección de Chlamydia trachomatis mediante técnica de PCR en una muestra de espermatozoides directa, necesaria para la realización del proyecto de tesis titulado "Diagnóstico de infección por Chlamydia trachomatis detectada mediante técnica de PCR en parejas de mujeres infértiles y su relación con alteración de la espermatozoides en el Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología".

Explicándole de manera verbal y escrita los procedimientos de la siguiente manera:

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

Es decisión del paciente participar o no en este estudio.

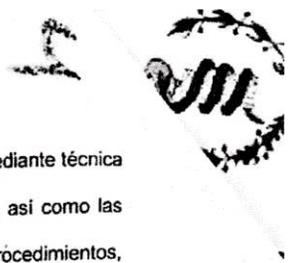
La primera parte del estudio se realizará en las instalaciones del Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología para la toma de muestra de espermatozoides directa y su análisis en el Laboratorio de dicho nosocomio, la segunda parte del estudio será realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

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

Se realizará la anotaciones en la hoja de registro.

### AUTORIZACION

1. Por este medio autorizo (a la) Dr.(a.) \_\_\_\_\_ y/o al (a los) médico(s) asociado(s) y/o asistentes que este(a) haya seleccionado, para que me sometan al (a los) siguiente(s)



procedimiento(s), de toma de espermabioscopia directa y detección de Chlamydia trachomatis mediante técnica de PCR, cuyo carácter el médico me ha explicado, incluyendo sus posibles beneficios y riesgos, así como las probabilidades de alcanzar los objetivos de la atención, el tratamiento, los servicios o los procedimientos, propuestos, en términos que entiendo perfectamente.

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

FIRMA DEL PACIENTE

\_\_\_\_\_

FIRMA DEL MEDICO INVESTIGADOR

\_\_\_\_\_

Espermatobioscopia representativa, se ocultaron datos personales del paciente.



**SECRETARIA DE LA DEFENSA NACIONAL**  
**HOSPITAL MILITAR DE ESPECIALIDADES DE LA MUJER Y NEONATOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE LABORATORIO CLINICO**  
**REPORTE DE RESULTADOS**

---

<b>Paciente:</b> <b>Fecha Nacl.:</b> <b>Matricula:</b> <b>Edad:</b> <b>Sexo:</b> M <b>Situación:</b> Militar Activo <b>Diagnostico:</b> H.M.E.M.Y.N.	<b>No Folio:</b> <b>Procedencia:</b> Urgencias <b>Tipo de paciente:</b> Externo <b>Fecha de Registro:</b> martes 16 de julio c <b>Fecha de Activacion:</b> martes 16 de julio c <b>Turno:</b> 53.Pacientes C <b>Doctor:</b>
--	---

---

<u>Microbiología</u>	RESULTADO	UNIDADES	VALORES DE REFERENCIA
<b>Espermatobioscopia Directa</b>			
<b>Tipo de Muestra: Semen</b>			
Espermatobioscopia Directa			
Hora de Recolección	11:00		
Hora de Lectura	12:00		
Volumen	2.8	mL	>= 1.5 mL
Apariencia	Amarillo		GRIS OPALECENTE
Licuefacción	Completa (15-60 min)		<= 60 Min
Viscosidad	Normal (GOTEO INDV.CONT.)		NORMAL
pH	8.0		7.2 - 8.0
Concentracion	97	M/mL	>= 15 M/mL
Concentracion Total	271.6	M/mL	>= 39 M/mL
Aglutinación	Negativo		
Tipo de Aglutinación	Negativa		
Agregacion	Negativa		
Movilidad Total (Pr+NP)	70	%	40 %
Células Epiteliales	2-4 Por Campo		M/mL
Leucocitos	1-2 Por Campo		< 1.0 M/mL
Eritrocitos	No se Observaron		NO SE OBSERVAN
Formas Normales	5	%	4 %
Formas Anormales	95	%	
Defectos de Cabeza	45	%	
Defectos de Pieza Intermedia	15	%	
Defectos de Flagelo	35	%	
Bacterias	Escasas		NO SE OBSERVAN

Estudios Validados por: **Sid. A. Asist. Labta. IVONNE LEON TRUJILLO**

---

\* VALOR FUERA DE REFERENCIA  
 Fecha y Hora de Impresión: 21 de agosto de 2019 15:39:20  
 Ubicada en Av. Industria Militar s/n esq. Gral. Juan Cabral, Lomas de Soteo D.F. C.P. 11200 Tel. 53 8 7 33 00 ext. 3414 y 3413.  
 No. Licencia Sanitaria: 06 AM 30 034 057  
 HCM-LAB-F-12