



Università degli Studi di Roma “La Sapienza”

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze
Endocrinologiche, Metaboliche ed Andrologiche

XXVI Ciclo

Dipartimento di Medicina Sperimentale
Direttore: Ch.mo Prof. Andrea Lenzi

TESI DI DOTTORATO

RUOLO DELL'HPV NELL'INFERTILITA' MASCHILE

**Tutor: Ch.ma Prof.ssa Loredana Gandini
Ch.mo Prof. Carlo Foresta**

Dottorando: Dott. Damiano Pizzol

Anno Accademico 2013

"Per aspera
sic itur
ad astra"

Indice

1	RIASSUNTO	1
2	INTRODUZIONE.....	5
2.1	L'INFERTILITA' MASCHILE	5
2.2	INFEZIONI ED INFERTILITA'	9
2.3	VIRUS E INFERTILITA' (HBV, HCV, HIV, HSV, HCMV, AAV)	10
2.4	PAPILLOMAVIRUS (HPV) ED INFERTILITA'	13
2.4.1	CARATTERISTICHE ED EPIDEMIOLOGIA DELL' HPV	13
2.4.2	CLINICA ASSOCIATA E FATTORI DI RISCHIO	18
2.4.3	HPV E LIQUIDO SEMINALE	22
2.4.4	LAVAGGI TRADIZIONALI E HPV	32
2.4.5	HPV E SANGUE PERIFERICO.....	32
3	SCOPO DELLA RICERCA.....	35
4	MATERIALI E METODI.....	37
4.1	PAZIENTI.....	37
4.2	PROCESSAZIONE DEL LIQUIDO SEMINALE	38
4.3	TUNEL TEST.....	40
4.4	FISH PER HPV	41
4.5	FISH ANEUPLOIDIE.....	42
4.6	INCUBAZIONE DI SPERMATOZOI CON CON HPV 16-L1.....	43
4.7	CITOFUORIMETRIA PER HPV 16-L1	44
4.8	SWIM-UP.....	44
4.9	SWIM-UP CON EPARINASI.....	45
4.10	MAR TEST.....	45
4.11	INNUNOFLUORESCENZA	46
4.11.1	STUDIO HPV E ANTICORPI ANTISPERMATOZOO CON DETERMINAZIONE IMMUNOGLOBULINE.....	46
4.12	PROCESSAZIONE SANGUE PERIFERICO ED ISOLAMENTO MONONUCLEATI.....	47
4.13	PCR PER HPV SU SANGUE.....	48
4.14	RICERCA DELL'HPV MEDIANTE INNO-LiPA	48
4.15	COUNSELING.....	49
4.16	STATISTICA	50
5	RISULTATI	53
6	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	78
7	BIBLIOGRAFIA	89

1 RIASSUNTO

Introduzione: Le malattie sessualmente trasmesse (MST) rappresentano una nota causa di infertilità maschile. È stata dimostrata l'associazione tra l'infezione da papillomavirus (HPV) ed una significativa alterazione dei parametri seminali, in particolare una riduzione della motilità. Nonostante l'HPV sia stato e sia tutt'ora oggetto di molti studi, è stato considerato prevalentemente il genere femminile e ad oggi restano da chiarire molti aspetti in ambito andrologico, su tutti il ruolo clinico e laboratoristico di questo virus nel liquido seminale, la possibilità di una diffusione nel circolo ematico e le strategie possibili per contrastare ed accelerare la clearance dell'infezione.

Scopo: Gli scopi della ricerca sono stati quelli di valutare l'efficacia di una tecnica di swim-up modificata per la rimozione dell'HPV da campioni di liquido seminale infettati, di indagare la possibile associazione tra la presenza dell'HPV e di anticorpi anti-spermatozoo e determinarne la clearance dell'infezione dal liquido seminale, caratterizzare le cellule rotonde infette nel liquido seminale e valutare la presenza del virus in cellule circolanti e valutare il ruolo del counseling nel decorso clinico dell'infezione nelle coppie eterosessuali positive.

Materiali e metodi: Per raggiungere gli scopi prefissati, le metodiche utilizzate nelle varie categorie di pazienti arruolati nelle diverse fasi della ricerca sono: analisi del liquido seminale, TUNEL test, FISH per HPV e FISH per la valutazione di aneuploidie,

citofluorimetria, swim-up e swim-up con eparinasi III, spermMar test, immunofluorescenza, PCR per HPV e INNO-LiPA.

Risultati: Il trattamento enzimatico dei campioni infetti si è dimostrato efficace nella rimozione completa del virus e non ha comportato danni significativi alla qualità degli spermatozoi trattati. Nei soggetti infetti, la presenza dell'HPV non solo si associa ad una riduzione della motilità ma anche ad un incremento degli anticorpi antispermatozoo (ASA) che si riducono e scompaiono al progredire della clearance virale. Nel liquido seminale il virus è presente oltre che negli spermatozoi e nelle cellule di sfaldamento anche nei linfociti B e nelle natural killer (NK), cellule queste osservate positive anche in circolo in un piccolo gruppo di pazienti. Nel follow-up di coppie positive all'HPV si è osservato inoltre che un counseling mirato è efficace nel velocizzare il tempo di risoluzione dell'infezione che appare doppio nell'uomo rispetto alla donna.

Conclusioni: È sempre più evidente il ruolo dell'HPV nell'infertilità maschile e la necessità di avere linee guida efficaci per prendersi cura dei soggetti e delle coppie HPV positive. I risultati di questa ricerca, nonostante necessitino di ulteriori conferme ci forniscono utili risultati e spunti di riflessione interessanti per sviluppi futuri. Innanzitutto il trattamento enzimatico dei campioni infetti si è rivelato efficace e sicuro nel rimuovere l'infezione e dovrebbe essere tenuto in considerazione soprattutto per i soggetti che si sottopongono a tecniche di fecondazione assistita. La forte associazione tra HPV e ASA suggerisce inoltre di valutare la presenza dell'infezione in soggetti affetti da infertilità idiopatica che risultino positivi allo spermMar test. Inoltre nei soggetti e nelle coppie positive è consigliato un counseling mirato e un follow-up

preciso che valuti non solo i siti genitali ma anche il cavo orale per permettere e velocizzare l'eradicazione dell'infezione. Futuri sviluppi di ricerca sono inoltre stimolati dal riscontro di cellule circolanti positive all'HPV che rendono d'obbligo il chiarire quale sia il significato clinico e laboratoristico di questo dato, e se e quali implicazioni possa avere per il paziente.

2 INTRODUZIONE

2.1 L'INFERTILITA' MASCHILE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) considera una coppia infertile quando non è in grado di concepire e di avere un bambino dopo 1-2 anni di rapporti sessuali regolari e non protetti (1). L'infertilità di coppia rappresenta un importante problema sociale e sanitario che coinvolge il 15-20% delle coppie in età fertile nei paesi industrializzati (2,3). La possibilità di non avere figli rappresenta per la coppia una minaccia per l'autostima, non solo per l'uomo ma anche per la donna, e la ricerca esasperata di una gravidanza rischia di trasformarsi in un meccanismo a tempo, con rapporti esclusivi e mirati nel giorno e nell'ora dell'ovulazione, o nella medicalizzazione, con l'affidamento esclusivo alle tecniche di riproduzione assistita. Nonostante per definizione il problema dell'infertilità riguardi la coppia, molto spesso viene trattato come un problema di genere, e quello femminile è sempre stato quello più seguito e studiato. Studi epidemiologici hanno messo in evidenza che in circa il 30% dei casi l'infertilità è da attribuire all'uomo e un altro 20% a fattori ascrivibili ad entrambi i partner, ed il maschio si trova così coinvolto nel 50% dei casi di infertilità (L'infertilità maschile rappresenta una problematica complessa che può essere manifestazione di patologie pre-testicolari (mancata o ridotta produzione spermatica da inadeguata secrezione gonadotropica), testicolare (patologie primitive testicolari) o post-testicolare (da ostacolato flusso spermatico lungo le vie escrettrici, da disturbi eiaculatori o da fattore immunologico).

Tabella 1) (4).

L'infertilità maschile rappresenta una problematica complessa che può essere manifestazione di patologie pre-testicolari (mancata o ridotta produzione spermatica da inadeguata secrezione gonodotropica), testicolare (patologie primitive testicolari) o post-testicolare (da ostacolato flusso spermatico lungo le vie escrettrici, da disturbi eiaculatori o da fattore immunologico).

Tabella 1. Fattori d'infertilità

30% Fattore maschile	
- Cause pre-testicolari	(10%)
- Cause testicolari	(75%)
- Cause post-testicolari	(15%)
35% Fattore femminile	
- Fattore tubarico	(13.3%)
- Infertilità endocrino-ovulatoria	(4.7%)
- Endometriosi	(5.9%)
- Ridotta riserva ovarica	(4.5%)
- Fattore multiplo femminile	(5.8%)
- Poliabortività	(1.1%)
20% Fattore misto	
15% Infertilità idiopatica	

L'infertilità maschile rappresenta una problematica complessa che può essere manifestazione di patologie pre-testicolari (mancata o ridotta produzione spermatica da inadeguata secrezione gonodotropica), testicolare (patologie primitive testicolari) o post-testicolare (da ostacolato flusso spermatico lungo le vie escrettrici, da disturbi eiaculatori o da fattore immunologico).

Recenti evidenze hanno sottolineato che 1 giovane su 3 in Italia è a rischio di infertilità e numerosi studi hanno considerato i diversi fattori di rischio, individuando per alcuni di

essi solide evidenze scientifiche di correlazioni, e per altri evidenze più limitate (Tabella 2 e Tabella 3).

Tabella 2. Principali fattori di rischio di infertilità maschile

- CRIPTORCHIDISMO
- IPOTROFIA TESTICOLARE
- VARICOCELE
- TUMORI DEL TESTICOLO
- FATTORI GENETICI
- TRAUMI TESTICOLARI
- INFEZIONI DEL TRATTO RIPRODUTTOVO
- CAUSE IATROGENE
- MALATTIE SISTEMICHE e/o ENDOCRINE
- TORSIONE FUNICOLO SPERMATICO

Tabella 3. Fattori di rischio con evidenze limitate

- ESPOSIZIONE A FATTORI TOSSICI
- STILI DI VITA
- FUMO
- TEMPERATURA SCROTALE
- ETA'
- FAMILIARITA' PER INFERTILITA' E POLIABORTIVITA'
- POLIMORFISMI GENETICI

I Tumori possono incidere negativamente sulla fertilità sia direttamente (tumore del testicolo) sia per le terapie utilizzate per la cura (7). Il tumore del testicolo rappresenta nel giovane la neoplasia solida più diffusa, è la più comune causa di morte per cancro tra i 20 e 34 anni di età e da studi epidemiologici è emersa un'incidenza in aumento nei paesi industrializzati. Ancora, cattivi stili di vita e abitudini alimentari non corrette possono essere fattori di rischio per infertilità attraverso vari meccanismi, per esempio l'obesità determina uno squilibrio ormonale con riduzione del principale ormone

maschile, il testosterone; e un aumento degli ormoni “femminili” gli estrogeni (8-10). In particolar modo, se tale squilibrio si verifica nelle fasi dello sviluppo, lo scheletro potrebbe sviluppare proporzioni eunucoide, rappresentate principalmente da un aumento dell’apertura braccia (superiore alla statura) e da una diminuzione del rapporto tra il segmento superiore/inferiore, a causa dell’aumentata lunghezza delle gambe e si potrebbe verificare inoltre la riduzione del volume testicolare e delle dimensioni del pene (11). In tale contesto, un ruolo fondamentale lo gioca anche l’abuso di alcol, droghe e sostanze dopanti, mode molto diffuse tra i giovani che nella maggior parte dei casi non sono adeguatamente informati sulle drammatiche conseguenze anche sulla fertilità (12). A questi fattori di rischio si aggiungono fattori genetici e familiarità per infertilità, traumi testicolari e torsioni del funicolo spermatico, malattie sistemiche e/o endocrine e fattori ambientali, su tutti l’aumento della temperatura scrotale. Infatti, per un corretto funzionamento i testicoli necessitano di una temperatura scrotale inferiore di circa 2°C rispetto a quella addominale e tutte le cause che ne provocano un aumento, come l’utilizzo del pc sulle gambe ed una frequentazione assidua delle saune, rappresentano fattori di rischio per la fertilità (13, 14). Capito a sé meritano le malattie sessualmente trasmesse (MST) che si ripercuotono sulla fertilità sia perché possono interessare direttamente gli organi riproduttivi con infezioni localizzate (testicoli, epididimi, prostata) sia perché possono causare malattie sistemiche che indeboliscono l’efficienza del sistema riproduttivo (15).

2.2 INFEZIONI ED INFERTILITA'

Le malattie sessualmente trasmissibili rappresentano un importante problema sanitario, sociale ed economico in tutto il mondo. Nonostante la scoperta di antibiotici, vaccini e lo sviluppo di programmi di prevenzione e controllo delle malattie, MST continuano ad essere una causa importante di patologie acute e croniche potendo determinare anche complicazioni durante la gravidanza ed infertilità (16). Esistono diverse vie attraverso cui gli agenti infettivi danneggiano la fertilità: danno d'organo, danno cellulare dovuto ai mediatori dell'infiammazione, ostruzione e legame con gli spermatozoi (17). Quest'ultimo aspetto è sempre più considerato dal momento che la maggior parte delle infezioni del tratto genitale maschile porta ad infertilità e diversi studi hanno riportato che il 15-20% dei soggetti infertili sono affetti da infezioni seminali (16).

Sulla base di differenti siti di infezione, meccanismi patogenetici diversi sono stati descritti: a) infezioni sistemiche acute o croniche possono provocare infertilità temporanea o permanente alterando lo stato ormonale, la funzione testicolare e la spermatogenesi (18); b) il coinvolgimento testicolare da orchite danneggia direttamente la produzione di spermatozoi (17); c) le infezioni dell'uretra e delle ghiandole accessorie del tratto genitale maschile (epididimo, prostata e vescicole seminali) sono state identificate come un fattore negativo nella funzione riproduttiva maschile e sulla fertilità potendo causare ostruzione o sub-ostruzione, alterata funzione secretoria e rilascio di mediatori infiammatori (18). La presenza di DNA di agenti patogeni nel liquido seminale è generalmente associato con un peggioramento dei parametri

seminali, su tutti la motilità, la concentrazione e la conta spermatica (19). Per quanto riguarda le infezioni batteriche, dati epidemiologici mettono in luce un'associazione tra *C. trachomatis* e ridotta fertilità sia nell'uomo che nella donna (20) così come sembra evidente un ruolo dei Mycoplasmi come causa di infertilità in entrambi i generi (21). Per quanto riguarda i Protozoi, il *Trichomonas vaginalis* è il principale agente patogeno studiato, e nonostante sia ancora oggetto di discussione, è riscontrato maggiormente in pazienti infertili piuttosto che in soggetti di controllo (22). Le infezioni virali saranno discusse nei capitoli successivi.

2.3 VIRUS E INFERTILITA' (HBV, HCV, HIV, HSV, HCMV, AAV)

Mentre le infezioni virali acute, per la quasi assenza di sintomi e la loro natura transiente non sono considerate un grave problema per la salute generale e la fertilità, quelle croniche sono invece considerate un fattore di rischio importante per la fertilità maschile e di coppia. I principali virus studiati e per i quali è stato dimostrato un ruolo nel ridurre la qualità del liquido seminale e di conseguenza una ridotta fertilità sono il virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), dell'immunodeficienza (HIV), l'herpesvirus (HSV), il citomegalovirus (HCMV), l'adenovirus (AAV) ed il papilloma virus (HPV). Durante l'infezione da HBV, il virus può essere trovato in molte secrezioni, liquido seminale e altri tessuti oltre fegato e sangue. HBV non è solo in grado di passare attraverso la barriera emato-testicolare e penetrare all'interno delle cellule germinali maschili ma anche integrarsi nel loro genoma. E' ben noto che l'infezione da HBV può essere una causa di infertilità maschile provocando danno sugli

spermatozoi. Lorusso e coll. hanno evidenziato che la concentrazione, la motilità, la morfologia e la vitalità degli spermatozoi erano significativamente compromesse nei pazienti HBV-sieropositivi (23). La contaminazione dei pazienti durante cicli di procreazione medicalmente assistita (PMA) è stata descritta per HBV negli ultimi venti anni (24). I dati a disposizione suggeriscono che le cellule spermatiche umane possono integrare il DNA-HBV, agendo da vettori per la trasmissione di geni di HBV durante le procedure di fecondazione in vitro (IVF) (25). Pochissimi studi con risultati contraddittori sono stati condotti per valutare la presenza di HCV-RNA nel liquido seminale e negli spermatozoi. Debono e coll non sono stati in grado di rilevare HCV-RNA nel liquido seminale di maschi infetti con alta carica virale ematica, sia con metodo PCR che da DNA ramificato o da ibridazione in situ (26). In contrasto, Levy e coll. hanno dimostrato che l'HCV-RNA può essere rilevato nel liquido seminale di maschi infetti quando gli inibitori della Taq sono stati soppressi attraverso diluizioni (27). Gli stessi Autori hanno dimostrato alterazioni seminali nel 30% dei maschi infetti da HCV prima del trattamento antivirale per l'alta viremia (27). Anche se è stato segnalato solo un limitato rischio di infezione virale attraverso il liquido seminale, la trasmissione di HCV durante le procedure di PMA è possibile: quando il partner maschile è infetto, il lavaggio del liquido seminale può ridurre la carica virale e quindi il rischio di trasmissione (27). La trasmissione sessuale ha un ruolo importante nella diffusione del virus HIV-1. Lo sperma degli uomini infetti può contenere alti livelli di HIV-1, e il virus può essere recuperato da cellule seminali (insieme di spermatozoi, precursori di cellule germinali, linfociti T, monociti, macrofagi e cellule epiteliali) o

liquido seminale (28). In uomini asintomatici HIV-positivi i parametri seminali sono nel range di normalità, mentre la morfologia e la motilità degli spermatozoi sono compromesse con la progressione della malattia (29). In pazienti affetti da sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), sono state segnalate gravi alterazioni seminali e leucocitospermia (29). Durante i cicli di PMA lo sperma deve essere lavato con la tecnica del gradiente e il successo di questa procedura deve essere controllata prima dell'utilizzo del seme (30). I dati sulla prevalenza dell'infezione da HSV nel liquido seminale è variabile tra i diversi studi (31). Il DNA del virus herpes simplex 1 (HSV-1) e il virus herpes simplex 2 (HSV-2) sono stati rilevati nel liquido seminale dal 2-4% al 50% degli uomini, senza differenza significativa tra soggetti fertili e non fertili (31). La presenza di HSV-DNA nel liquido seminale è stata associata ad una diminuzione della concentrazione di spermatozoi e della motilità ed è stata considerata responsabile di alcuni casi di infertilità maschile (31). Durante i cicli di PMA, se in presenza di riattivazione del virus o infezione acuta il campione è raccolto dal testicolo, vi è un rischio aumentato che gli spermatozoi vengano a contatto con elevate concentrazioni locali di HSV-2 dovuti alla contaminazione da sangue o tessuti interstiziali. In questo caso, le procedure di lavaggio potrebbero non eliminare completamente le particelle virali (32). E' stato riportato che la prevalenza di DNA dell'HCMV nel tratto genitale e nel liquido seminale di uomini fertili e non fertili HCMV sieropositivi varia notevolmente dall'8% al 65% in diverse serie (33, 34), ma gli studi basati su colture cellulari di HCMV hanno rilevato che il recupero di virus infettante è basso e in meno del 5% dei donatori sieropositivi (35). E' stato riportato che la presenza di HCMV nel

liquido seminale non altera in modo significativo la qualità del seme, compresa la capacità funzionale degli spermatozoi, la presenza di anticorpi anti-spermatozoo o di leucociti seminali (33). Le procedure di lavaggio utilizzate per le tecniche di PMA sono eseguite per eliminare particelle virali o ridurre il carico virale, ma il rischio di trasmissione di virus non può essere completamente esclusa, soprattutto nei casi di ICSI (32). Il virus a DNA AAV è stato localizzato per la prima volta nel liquido seminale da Rohde e coll. nel 1999 (36). E' stato riportato che la presenza di DNA-AAV in campioni seminali di uomini infertili è significativamente più alta rispetto a campioni seminali di uomini fertili (20-40% vs 0-5%, rispettivamente) (36). Non ci sono dati in letteratura sugli effetti dell'infezione seminale da AAV nei risultati della PMA, mentre diversi studi che hanno rilevato la presenza di AAV nel liquido amniotico e in materiale abortivo indicano che l'infezione da AAV potrebbe essere associata ad esiti avversi quali aborto spontaneo, malattia trofoblastica gestazionale, parto spontaneo pretermine e grave pre-eclampsia (37, 38).

2.4 PAPILOMAVIRUS (HPV) ED INFERTILITA'

2.4.1 CARATTERISTICHE ED EPIDEMIOLOGIA DELL' HPV

Il Papillomavirus umano (HPV) appartiene alla famiglia dei Papillomaviridae. Il virione è privo di rivestimento esterno, ha un diametro di 50-55 nm, un capsido icosaedrico di 72 capsomeri e un genoma a DNA circolare a doppio filamento di circa 7900bp (Figure 1 e 2).

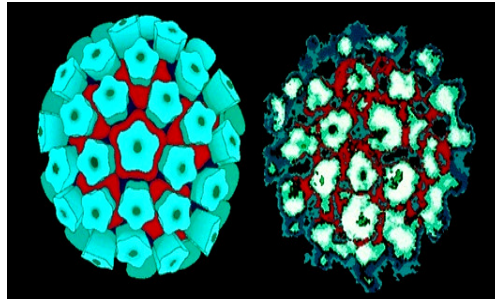


Figura 1. Rappresentazione del capsid di HPV

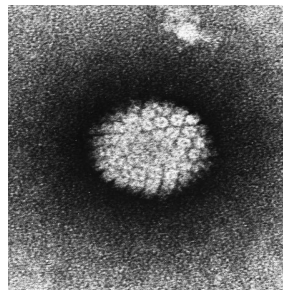


Figura 2. Immagine del virus HPV osservato alla microscopia elettronica

Ad oggi sono noti più di 100 genotipi di HPV che oltre ad essere ospite-specifici sono tessuto-specifici e possono completare un ciclo riproduttivo solo in presenza di un epitelio squamoso cheratinizzato completamente differenziato (39). Sulla base del loro tropismo epiteliale, possono essere identificati due gruppi: uno che infetta la pelle e le superfici cutanee esterne (sottotipi β , γ , μ , ν) e uno che infetta le membrane umido-squamose delle mucose interne (α) (40). All'interno del gruppo Alpha i vari genotipi possono essere ulteriormente caratterizzati in alto e basso rischio sulla base della loro oncogenicità. E' opportuno segnalare che le classificazioni in genotipi ad alto e basso rischio sono continuamente revisionate alla luce delle nuove conoscenze sul campo, e pertanto non è possibile dare indicazioni definitive a tale riguardo. Quando gli agenti virali trovano accesso allo strato basale epiteliale mitoticamente attivo, attraverso

microlesioni o accessi naturalmente facilitati come la base del follicolo pilifero o la linea d'unione tra le cellule colonnari e stratificate dell'epitelio, e dopo essersi integrati con le cellule dell'ospite, danno inizio al loro ciclo vitale. La proliferazione che avviene nello strato epiteliale basale e la migrazione che procede verso la superficie sono regolate principalmente dalle proteine virali E7 ed E6. Tali proteine sono implicate anche nella patogenesi delle neoplasie indotte da HPV, poiché sono in grado di interagire rispettivamente con i geni Rb e p53 dell'ospite. Le proteine virali L1 e L2 costituiscono il capsido del virione. L1 è il costituente principale del capsido, mentre L2 facilita il trasporto di L1 al nucleo (40) giocando un ruolo chiave nell'assemblamento del DNA virale (Figura 3).

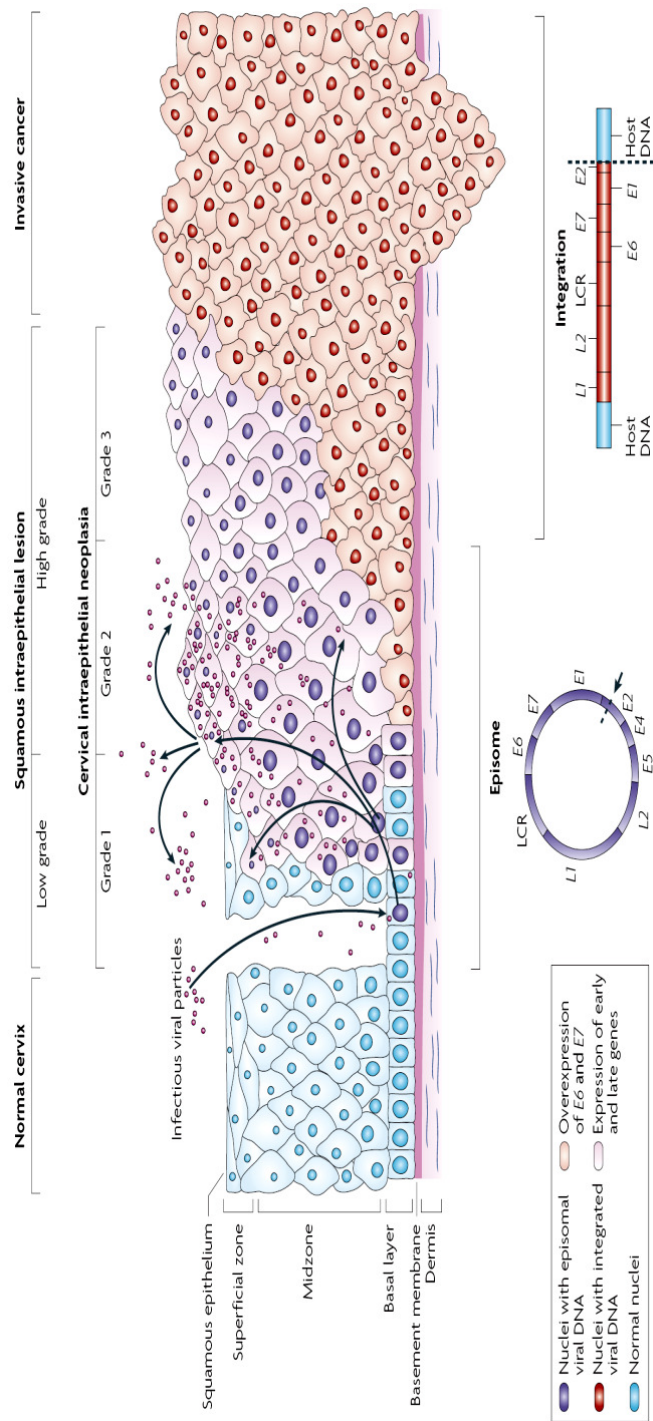


Figura 3. Ciclo riproduttivo dell'HPV

L'infezione da HPV è una malattia sessualmente trasmessa molto diffusa in uomini e donne in tutto il mondo in varie zone geografiche e diverse aree socio-economiche (41-43). La trasmissione dell'infezione può avvenire per via orizzontale mediante contatti genitali-genitali, manuale-genitali, orali-genitali o verticale dalla madre al feto. I fattori di rischio per l'infezione da HPV sono rappresentati dall'inizio precoce dell'attività sessuale, dalla promiscuità sessuale, dall'uso prolungato di contraccettivi orali, dai rapporti sessuali non protetti dall'alto livello di parità, dalla mancanza di circoncisione, dal fumo, dall'immunosoppressione e dalla co-infezione con il virus dell'HIV o con altre infezioni sessualmente trasmesse (42,44-47). Nonostante l'infezione da HPV abbia un'incidenza molto elevata in entrambi i sessi, si stima, infatti, che il virus sia presente in oltre il 40% delle coppie eterosessuali sessualmente attive (48), ad oggi non sono disponibili trattamenti efficaci e strategie di controllo dell'infezione nel maschio, e scarsa attenzione è stata riservata a questo aspetto. Al contrario vi sono numerosi studi che dimostrano l'associazione tra l'infezione da HPV ed il cancro della cervice uterina, la cui prevalenza è risultata essere quasi del 100% (49,50). Una recente review ha preso in considerazione numerosi studi sull'epidemiologia dell'infezione da HPV nel tratto urogenitale maschile, riportando una prevalenza molto variabile che andava dall'.3% al 72.9% (51). Altri studi eseguiti su prelievi uro-genitali di soggetti di età compresa fra i 18 e i 40 anni hanno riscontrato prevalenze variabili come riportato in Tabella 4.

Tabella 4. Prevalenza dell'infezione da HPV nella popolazione maschile

AUTORE STUDIO, ANNO	N	FASCIA D'ETÀ (ANNI)	PREVALENZA HPV (%)
Nielson, 2007 ⁽⁵²⁾	463*	18-40	65,5
Baldwin, 2004 ⁽⁵³⁾	393*	18-24	34
Weaver, 2004 ⁽⁵⁴⁾	317**	18-25	33
Svare, 2002 ⁽⁵⁵⁾	44*	18-24	48
Shin, 2004 ⁽⁵⁶⁾	381**	Mediana = 22	9
Foresta, 2009 ⁽⁵⁷⁾	200	18-20	20

* pazienti afferenti a cliniche per MST, ** studenti asintomatici

.L'estrema variabilità dei risultati, emersa da questi studi, sembra dipendere dalla differenza delle coorti analizzate.

2.4.2 CLINICA ASSOCIATA E FATTORI DI RISCHIO

Nella maggior parte dei casi l'infezione da HPV è asintomatica e transitoria, tuttavia essa può essere associata a diverse manifestazioni cliniche. Infatti, a seconda del tipo di HPV si distinguono ceppi ad alto medio e basso rischio. Nella Tabella 5 sono riportati i genotipi di HPV del genere Alfa suddivisi per classi di rischio.

Tabella 5. Classi di rischio e genotipi di HPV

CLASSI DI RISCHIO	GENOTIPI
ALTO RISCHIO	16 - 18 - 26 - 31 - 33 - 34 - 35 - 39 - 45 - 51 - 52 - 53 - 56 - 58 - 59 - 66 - 68 -70- 73 - 82
BASSO RISCHIO	6 - 11 - 13 - 32 - 42 - 43 - 44 - 54 - 55 - 61 - 71 - 72 - 74 - 81 - 83 - 84

I tipi a basso rischio sono responsabili di condilomi acuminati, verruche cutanee e papule. L'incidenza dei condilomi nella popolazione generale maschile è stimata essere di 1,1 casi ogni mille soggetti, con un picco d'incidenza nella fascia d'età 25-29 anni che arriva quasi a 3 casi per mille. La spesa per trattare ogni episodio di condilomatosi è molto elevata e di conseguenza il costo per la cura di tali lesioni incide fortemente in maniera negativa nel bilancio del Sistema Sanitario Nazionale (58). I ceppi ad alto rischio sono implicati oltre che nella formazione di condilomi, nel processo di cancerogenesi che porta in entrambi i sessi alla formazione di neoplasie intraepiteliali e carcinomi in situ. Clinicamente le lesioni cancerose indotte dall'HPV appaiono come papule iperpigmentate e spesso sono piatte. La coilocitosi è l'aspetto istologico e citologico patognomonico dell'infezione da HPV. Il coilocita presenta generalmente un ingrandimento del nucleo, cromatina densa e talvolta grossolanamente granulare, irregolarità della membrana nucleare e, soprattutto, condensazione periferica del citoplasma con produzione del caratteristico alone perinucleare (59).

Nel maschio l' HPV è stato riconosciuto come un importante fattore di rischio per il cancro del pene (60), anale, orofaringeo, congiuntivale (61) e per altri tumori a carico della testa e del collo (62).

L'associazione tra il carcinoma penieno e anale e l'infezione da HPV è ben documentata, e nelle Tabella 6 e Tabella 7 sono riportati i dati relativi agli studi su questo argomento.

Tabella 6. Prevalenza dell'HPV in serie di pazienti con cancro penieno

Autore (Anno)	Area geografica	Numerosità campionaria	Prevalenza HPV (%)
Rubin (2001)	USA e Sud America	106 SCC cheratinizzati 5 SCC verrucosi 15 SCC basaloidi	34,9 % 100 % 80 %
Tornesello (2008)	Italia	41	46,3 %
Carter (2001)	USA	33	81,8 %
Heideman (2007)	Olanda	83	55 %
Picconi (2000)	Argentina	34	52,9 %
Bezerra (2001)	Brasile	11 carcinomi verrucosi 60 SCC	45,5 % 26,7 %
Prose (2007)	UK	26 SCC	54 %

Tabella 7. Prevalenza dell'infezione da HPV in serie di soggetti con cancro anale

Autore (Anno)	Area geografica	Numero di casi	Prevalenza HPV (%)
Carter (2001)	USA	64	93,8 %
Frisch (1999)	Danimarca e Svezia	331	83,7 % 4%
Daling (2004)	USA	81 SCC 6 basaloidi 8 adenocarcinoma	92,6 % 100 % 25 %
Poletti (1998)	Svizzera	33	39,4 %
Roka (2007)	Austria	555	58,6%
Laytragoon (2007)	Svezia	72	90,%

Stiamo assistendo, soprattutto negli ultimi anni, ad un netto incremento delle patologie dell'apparato riproduttivo ed in particolare del cancro del testicolo (63). Questa patologia è principalmente riscontrata nei soggetti di età compresa tra 15 e 40 anni (64, 65) e nonostante rappresenti oggi una malattia curabile e con una buona prognosi è un fattore di rischio importante di infertilità (66). Infatti, i pazienti affetti non solo presentano spesso una concomitante alterazione della spermatogenesi, ma devono anche

sottoporsi a cicli di chemio e radioterapia che hanno un ulteriore impatto negativo sulla fertilità (67, 68). Molte ipotesi sono state formulate sull'eziologia del tumore del testicolo come l'esposizione a distruttori endocrini in età fetale e prepuberale, la predisposizione genetica e l'influenza ambientale. Nonostante sia ben noto il ruolo di alcune infezioni virali nello sviluppo di molti tumori, tale associazione non è stata dimostrata per la patologia testicolare. Recenti evidenze hanno messo in luce un aumento significativo dell'infezione da HPV nel liquido seminale dei soggetti orchiettomizzati rispetto ai controlli, anche se non è chiaro se ci sia un ruolo di causa o effetto (69). A suggerire che l'infezione non sia una causa ma piuttosto una conseguenza di un'aumentata suscettibilità ci viene dall'evidenza che aumenta il numero di spermatozoi infetti nei soggetti che si sottopongono a radio e chemioterapia (69). Questi dati preliminari suggeriscono che l'infezione da HPV è più frequente nei pazienti affetti rispetto ai controlli e che non sembri essere causa di cancro, ma piuttosto l'effetto di uno stato di maggiore vulnerabilità indotta da tumore. Inoltre, i trattamenti frequentemente utilizzati dopo orchietomia, in particolare la chemioterapia, sono in grado di aumentare fortemente la prevalenza dell'infezione da HPV nel liquido seminale, probabilmente attraverso la loro azione immunosoppressiva (69).

Nonostante l'infezione da HPV abbia un'incidenza molto elevata in entrambi i sessi e si stima che il virus sia presente in oltre il 40% delle coppie eterosessuali sessualmente attive (48), ad oggi non sono disponibili trattamenti efficaci e strategie di controllo dell'infezione nel maschio. Spesso l'infezione da HPV nel sesso maschile è trascurata perché ritenuta transitoria e di scarsa rilevanza clinica, tuttavia il tempo di clearance del

virus e le manifestazioni cliniche ad esso correlate sono ancora scarsamente conosciute. Nei maschi l'infezione da HPV è stata riscontrata a carico delle regioni anale, perineale, scrotale, uretrale, sul glande, sull'asta e anche nel liquido seminale (70). Inoltre la persistenza del virus in questi siti di infezione è stata messa in relazione sia all'infertilità da fattore maschile (71, 72) che allo sviluppo di neoplasie a carico di aree genitali e non genitali (60-62). Studiando la prevalenza dell'infezione da HPV nel liquido seminale la sua localizzazione in pazienti infertili e in soggetti con fattori di rischio abbiamo osservato una prevalenza molto elevata dell'infezione a carico del liquido seminale nei pazienti con condilomi genitali ed nei soggetti con partner affetta da HPV. I pazienti infertili avevano una prevalenza inferiore (10.2%) che tuttavia era significativamente più elevate rispetto ai soggetti fertili di controllo, rafforzando l'ipotesi che la presenza dell'HPV nel liquido seminale possa rappresentare un fattore di rischio per l'infertilità maschile. Inoltre è emerso che ciascun gruppo di soggetti mostra una preferenziale localizzazione del virus a carico di un tipo cellulare: i pazienti infertili prevalentemente sugli spermatozoi mentre negli altri gruppi più frequentemente sulle cellule di sfaldamento (73). La conoscenza di questi aspetti potrebbe essere utile soprattutto nel follow-up clinico dei soggetti con infezione seminale ed in particolare in quei pazienti infertili candidati a tecniche di procreazione medicalmente assistita.

2.4.3 HPV E LIQUIDO SEMINALE

Numerosi studi hanno dimostrato la presenza dell'HPV nel liquido seminale (74-76). Sebbene con risultati contrastanti, tale infezione è stata spesso associata ad una alterazione dei parametri seminali, come ad esempio il volume, la viscosità, il pH, la

concentrazione, la motilità e la vitalità spermatiche (71,72). Nostri recenti dati mostravano una prevalenza del 10% dell'infezione da HPV nel liquido seminale dei soggetti sessualmente attivi (57). Nei campioni seminali infetti, solo una parte (una media del 25%) della popolazione cellulare risultava infetta ed era presente una significativa riduzione della motilità spermatica rispetto ai soggetti non infetti e mediante ibridazione fluorescente in situ (FISH) abbiamo individuato la presenza del virus sugli spermatozoi ed in particolare la positività è risultata a carico della testa (Figura 4).

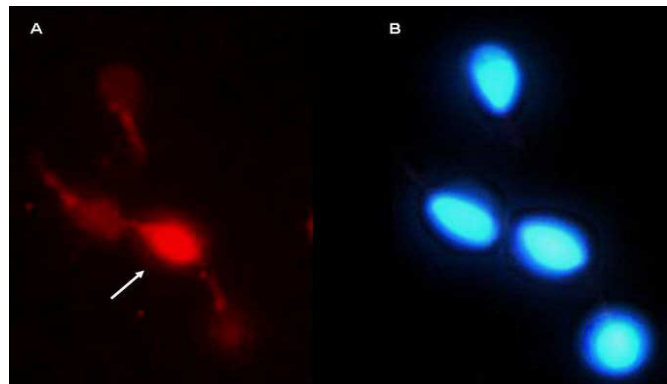


Figura 4. Ibridazione in situ fluorescente eseguita su campioni seminali con positività per l'HPV all'indagine PCR.

A) Pannello con la sonda positiva (texas red). La freccia indica uno spermatozoo HPV positivo tra spermatozoi negativi.

B) Pannello per la colorazione nucleare (DAPI)

Il legame tra spermatozoi e HPV è già stato dimostrato e risulta evidente mediante FISH con una sonda per HPV DNA contenente biotina e visualizzati attraverso un microscopio a fluorescenza (Fig.5a) (77). Un segnale chiaro è stato riscontrabile negli spermatozoi e la fluorescenza è evidente sulla testa degli spermatozoi. E' stata poi compresa la precisa localizzazione del virus a livello della testa degli spermatozoi

mediante l'immunofluorescenza utilizzando un anticorpo contro la proteina L1 del capsidone in spermatozoi intatti e in spermatozoi che avevano subito la reazione acrosomiale (Fig.5b). Appare evidente come il segnale per L1 sia localizzato esclusivamente nella testa degli spermatozoi, in particolare nella regione equatoriale. Dopo reazione acrosomiale il segnale persiste in tale regione, escludendo perciò la presenza dell'HPV nell'acrosoma, e suggerendo una localizzazione preferenziale dell'HPV nella regione equatoriale. Mediante PCR per il gene L1 è stata confermata l'infezione da HPV negli spermatozoi (Fig. 5c).

L'ingresso dell'HPV nella cellula è mediato inizialmente da legami tra componenti virali e recettori della superficie cellulare, prerequisito questo per la successiva interazione con il recettore per l'assorbimento, l'internalizzazione ed il trasferimento del materiale genetico al nucleo della cellula bersaglio (78-81). Il legame iniziale con la superficie cellulare è mediato da L1 che interagisce con gli eparan solfati proteoglicani (HSPG), seguito da cambiamenti conformazionali e dal clivaggio proteolitico di L2 che è essenziale affinché l'infezione abbia buon esito (78, 81). Tra gli HSPG, il Syndecan-1 sembra rappresentare il principale recettore di legame (78, 81, 82-86). Il Syndecan-1 è un proteoglicano ampiamente espresso legato alla membrana, ritrovato principalmente nelle cellule epiteliali (87), ma non sono disponibili dati sulla possibile presenza di questa molecola sugli spermatozoi.

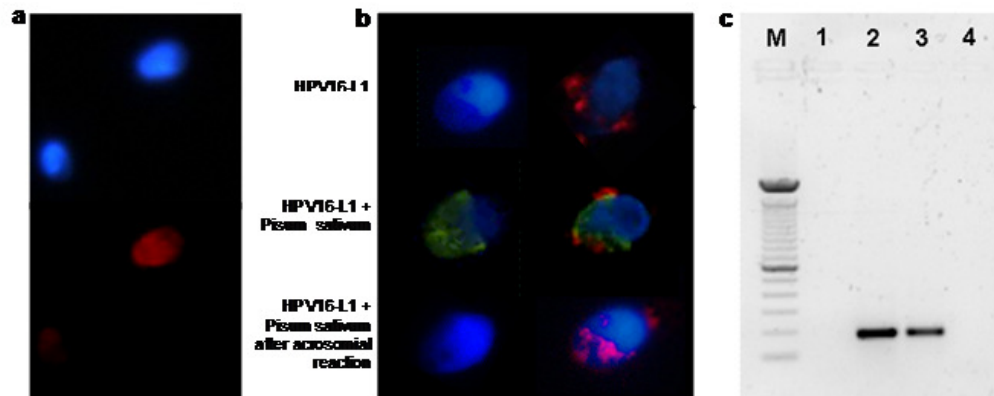


Figura 5. Rilevamento e localizzazione dell'HPV negli spermatozoi.

a. FISH per HPV DNA su spermatozoi di un paziente positivo per HPV16 nel liquido seminale. Si possono notare gli spermatozoi infetti e no. Rosso: HPV DNA (Texas red); blue: colorazione dei nuclei (DAPI).

b. Immunofluorescenza (microscopio confocale a fluorescenza) per la proteina L1 del capside di HPV16 in un controllo (sinistra) e in un campione positivo (destra). Pannello superiore, anticorpi anti-L1, pannello centrale anticorpi anti-L1 e Pisum Sativum (acrosoma), pannello inferiore anticorpi anti-L1 e Pisum Sativum dopo reazione acrosomiale. Rosso: HPV16 L1; verde: Pisum Sativum; blue: colorazione nucleare(DAPI).

c. PCR per il gene HPV E7 da DNA di spermatozoi. Corsia M: marker per DNA (100 bp); 1:controllo negative; 2: controllo positivo (spermatozoi transfettati con plasmide ricombinante pIRES2-AcGFP1-E6E7); 3:spermatozoi di un paziente positivo per HPV16 nel liquido seminale; 4: spermatozoi da paziente di controllo.

La conferma dell'ipotesi che l'HPV infetti gli spermatozoi legandosi al Syndecan-1, è stata ottenuta eseguendo la citometria a flusso e l'immunofluorescenza su spermatozoi e su spermatozoi incubati col capside dell'HPV 16 (Fig.6).

Queste analisi hanno messo in luce che gli spermatozoi esprimono il Syndecan-1 quasi esclusivamente nella regione equatoriale della testa degli spermatozoi (Fig. 6b) e sia la citometria a flusso che l'immunofluorescenza erano bloccate mediante l'uso dell'eparinasi III (Fig. 6a e 6b), confermando la specificità della reazione.

Dopo incubazione con la proteina capsidicaL1 e trattamento con eparinasi III per la valutazione dell'interazione tra HPV e Syndecan-1, la citofluorimetria e

l'immunofluorescenza hanno dimostrato che il trattamento con l'eparinasi III sopprime il legame dell'HPV con gli spermatozoi (Fig. 6c e 6d). Inoltre l'immunofluorescenza ha messo in luce che la proteina L1 dell'HPV 16 e il Syndecan-1 si localizzano entrambi nella regione equatoriale della testa degli spermatozoi, e che il legame è completamente soppresso dal trattamento degli spermatozoi con l'eparinasi III (Fig. 6e).

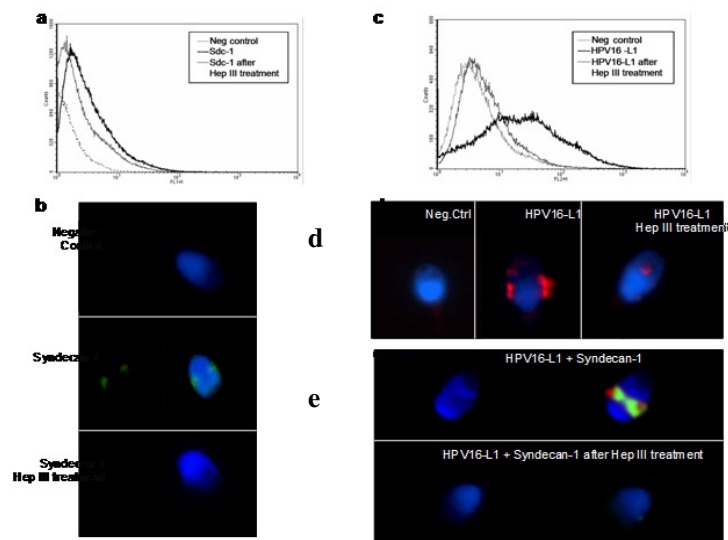


Figura 6. L'HPV interagisce col Syndecan-1 presente sugli spermatozoi.

a. Analisi citofluorimetrica con anticorpi di topo anti-CD138 (Syndecan-1), coniugati con FITC negli spermatozoi prima e dopo trattamento con Eparinasi-III. I campioni senza anti-CD138 sono stati utilizzati come controlli negativi.

b. Immunofluorescenza per il Syndecan-1 (CD138 coniugati con FITC negli spermatozoi prima e dopo trattamento con Eparinasi-III. Pannello superiore controllo negativo (assenza di CD138); pannello centrale: Syndecan-1; pannello inferiore: Syndecan-1 dopo trattamento con Eparinasi-III.

c. Analisi citofluorimetrica di spermatozoi incubati con HPV16-L1, trattati o meno con Eparinasi-III e analizzati con anticorpo monoclonale murino anti-HPV16-L1. I campioni incubati esclusivamente con anticorpo secondario anti-topo sono stati utilizzati come controlli negativi.

d. Immunofluorescenza per HPV L1 (microscopio confocale a fluorescenza) su spermatozoi incubati con HPV16-L1 trattati o meno con Eparinasi-III e analizzati con anticorpo monoclonale di topo anti-HPV16-L1 e DAPI

e. Analisi per valutare la colocalizzazione di HPV L1 e Syndecan-1 mediante immunofluorescenza su spermatozoi incubati con HPV16-L1 trattati o meno con Eparinasi-III e analizzati con anticorpo monoclonale di topo anti-CD138 (Syndecan-1), coniugati con FITC e anticorpo monoclonale di topo anti-HPV16-L1 e DAPI.

La capacità di fecondazione degli spermatozoi infettati con l'HPV e la possibile internalizzazione del virus negli ovociti è stata recentemente dimostrata utilizzando il test di penetrazione degli spermatozoi umani negli ovociti di hamster (HEPT), con spermatozoi transfettati con un plasmide contenente i geni E6/E7 dell'HPV legati alla GFP, e spermatozoi incubati con la proteina L1 del capsido virale. I geni E6/E7 sono stati amplificati dal plasmide p1321 HPV-16 E6/E7 e sottoclonati nei plasmidi pIRES-AcGFP1 al fine di costruire il plasmide ricombinante pIRES-AcGFP1-E6/E7 (Fig. 7a), utilizzato per transfettare gli spermatozoi. Dopo la conferma del successo della transfezione, l'HEPT ha dimostrato che gli spermatozoi transfettati con i geni E6/E7 dell'HPV sono in grado di penetrare negli ovociti di hamster, anche se il numero di spermatozoi penetrati per ovocita era più basso rispetto a quello ottenuto con gli spermatozoi di controllo (Fig. 7c) La colorazione SYBR green specifica per il DNA, ha confermato il successo della penetrazione degli spermatozoi transfettati negli ovociti (Fig. 7d).

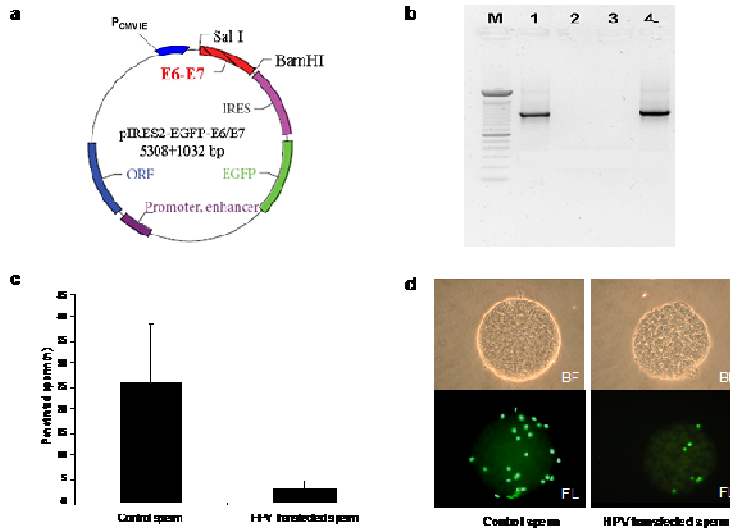


Figura 7. Penetrazione degli ovociti da parte di spermatozoi transfettati con plasmide E6/E7.
a. Schema del plasmide ricombinante pIRES2-AcGFP1-E6E7. I geni E6/E7 sono stati amplificati (1032 bp) dal plasmide p1321 HPV-16 E6/E7 mediante PCR e sub clonati nel plasmide pIRES2-AcGFP1 tra i siti di restrizione SalI and BamHI.
b. PCR per i geni HPV E6/E7 su spermatozoi transfettati. Corsia M: marker per DNA (100 bp); 1: spermatozoi transfettati con plasmide ricombinante E6/E7; 2: controlli negativi; 3: spermatozoi transfettati solo con Lipofectamina 2000; 4: controllo positivo (plasmide pIRES2-AcGFP1-E6E7).
c. Il numero medio di spermatozoi penetrati per ovocita nei controlli e nei campioni con spermatozoi transfettati con plasmide HPV 16-E6/E7
d. Ovociti di Hamster penetrati da spermatozoi di controllo e spermatozoi transfettati con plasmide HPV 16-E6/E7 in campo chiaro(BF, pannello superiore) e in fluorescenza (FL, pannello inferiore) utilizzando SYBR Green DNA Stain.

Il successo della penetrazione è stato inoltre confermato dall'analisi mediante PCR del gene E6 eseguita per ogni singolo ovocita (Fig. 8a). Dal momento che nel plasmide i geni erano legati alle GFP, gli ovociti fertilizzati con gli spermatozoi transfettati che mostrano una fluorescenza verde sono quelli in cui i geni E6/E7 sono trascritti. Quest'analisi ha mostrato che gli ovociti fertilizzati con gli spermatozoi transfettati esprimono la GFP (Fig. 8c), suggerendo una trascrizione attiva dei geni E6/E7 da parte

dell'ovocita. Questi dati sono stati confermati dalla RT-PCR per il gene E6 eseguita nel singolo ovocita con la fluorescenza verde (Fig. 8d).

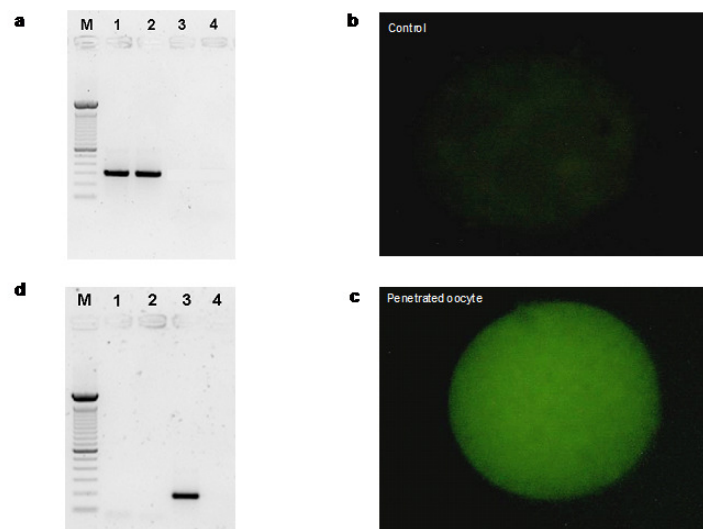


Figura 8. Gli ovociti penetrati da spermatozoi transfettati con plasmide HPV 16-E6/E7 esprimono i geni E6/E7. **a.** PCR per il gene E6 eseguita su singolo ovocita penetrato da spermatozoi transfettati. Corsia M: marker per DNA (100 bp); 1: controllo positivo (plasmide pIRES2-AcGFP1-E6E7); 2: singolo ovocita penetrato da spermatozoo transfettato con plasmide ricombinante; 3: controllo negativo; 4: singolo ovocita penetrato da spermatozoi transfettati solo con Lipofectamina 2000. **b.** Espressione di GFP-E6 in ovociti penetrati da spermatozoi di controllo. **c.** Espressione di GFP-E6 in ovociti penetrati da spermatozoi transfettati. **d.** RT-PCR per il gene E6 su singolo ovocita penetrato da spermatozoi transfettati. Corsia M: marker per DNA (100 bp); 1: controllo negativo (per trascrittasi inversa); 2: controllo negativo (per PCR); 3 fluorescenza verde su singolo ovocita penetrato da spermatozoi transfettati; 4: assenza di fluorescenza verde su singolo ovocita penetrato da spermatozoi di controllo.

Le evidenze appena descritte dimostrano che gli spermatozoi transfettati con i geni E6/E7 sono in grado di penetrare nell'ovocita, introdurre il genoma dell'HPV nell'ovocita e che i geni dell'HPV sono trascritti dagli ovociti fertilizzati. Tuttavia questi dati potrebbero non essere confermati in vivo, in quanto l'utilizzo di spermatozoi transfettati è ovviamente una condizione artificiale. Tuttavia eseguendo l'HEPT con

spermatozoi incubati con la proteina L1 del capsido dell'HPV è emerso che gli spermatozoi sono in grado di veicolare la proteina L1 all'interno dell'ovocita (Fig. 9).

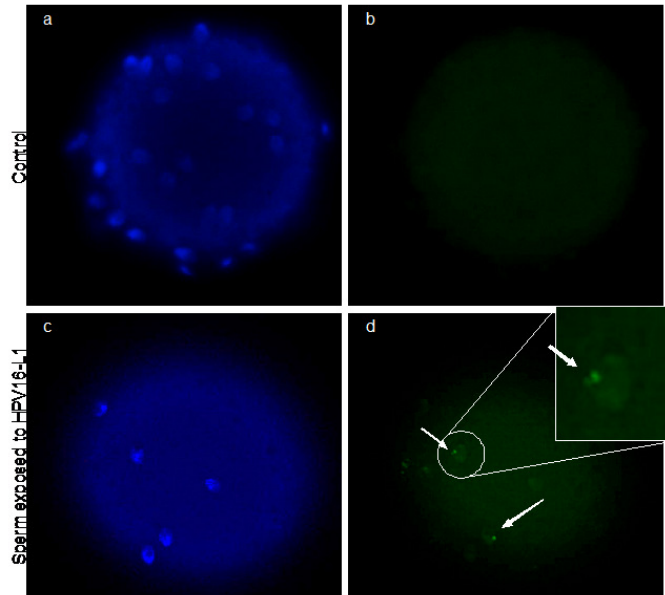


Figura 9. Trasferimento della proteina HPV L1 dagli spermatozoi agli ovociti. Immunofluorescenza (microscopio confocale fluorescente) per HPV 16 L1 su ovociti di hamster penetrati da spermatozoi incubati con HPV L1. Pannello superiore: ovociti penetrati da spermatozoi di controllo; pannello inferiore: ovociti penetrati da spermatozoi incubati con L1. Sinistra: colorazione dei nuclei con DAPI (blue); destra: anticorpo anti-HPV L1 (verde).

Considerando i dati ottenuti dal presente studio, si osserva che gli spermatozoi possono essere infettati dall'HPV e che il meccanismo di legame del virus allo spermatozoo è mediato dall'interazione fra la proteina L1 del capsido virale e il Syndecan-1 che è localizzato principalmente nella regione equatoriale della testa dello spermatozoo (77). Inoltre, sia gli spermatozoi transfettati con i geni E6/E7, sia quelli incubati con la proteina L1 dell'HPV, sono in grado di penetrare nell'ovocita, anche se questo processo di fertilizzazione sembra essere compromesso. In ogni caso, gli spermatozoi

possono fungere da vettori per l'ingresso dell'HPV nell'ovocita, dal momento che sia la proteina L1 sia i geni transfettati E6/E7 sono veicolati all'interno dell'ovocita. Quando i geni E6/E7 si trovano nel citoplasma dell'ovocita, sono attivati e trascritti. Non è noto se ci siano rischi per la partner di un maschio infetto da HPV o per l'embrione fecondato da spermatozoi infetti, tuttavia tali dati suggeriscono che gli spermatozoi infettati da HPV abbiano una ridotta capacità di fecondare, e sono da prendere in esame soprattutto quando si considerano le tecniche di riproduzione medicalmente assistita. Inoltre, i pazienti affetti da patologie neoplastiche vengono solitamente inviati alla crioconservazione degli spermatozoi prima di iniziare qualsiasi trattamento chemio/radioterapico, poiché è stato dimostrato che la fertilità può essere profondamente compromessa per effetto di queste terapie (88), ed è riportata un'alta prevalenza di aneuploidie spermatiche a seguito di tali cure (89). In precedenza abbiamo dimostrato la presenza dell'HPV in campioni seminali precedentemente crioconservati di pazienti affetti da neoplasia testicolare, osservando una prevalenza del 6.1% di spermatozoi infetti con una percentuale di cellule positive variabile dal 12 al 23%. Questi dati dimostrano una non trascurabile presenza del virus in campioni seminali crioconservati, campioni che, in accordo con le Linee Guida Internazionali (90) erano stati raccolti dopo negatività dello screening per HBV, HIV e HCV. Gli spermatozoi crioconservati sono frequentemente utilizzati per tecniche di procreazione medicalmente assistita come ad esempio la ICSI. Pochi dati sono presenti in letteratura per quanto concerne la possibilità che spermatozoi infettati da HPV se iniettati nel citoplasma dell'ovocita mediante ICSI possano interferire con il corretto sviluppo dell'embrione.

Nonostante sia ancora dibattuto se gli spermatozoi con HPV siano capaci di contaminare altre paillettes crioconservate nelle banche del seme, la ricerca dell'HPV nei campione seminali candidati alla crioconservazione e quindi a tecniche di PMA dovrebbe essere considerato un problema emergente.

2.4.4 LAVAGGI TRADIZIONALI E HPV

Considerando l'influenza dell'HPV nei parametri seminali e nei processi di fertilizzazione, si è posta la questione sulla sicurezza delle tecniche di fecondazione assistita (IVF) a cui si sottopongono i pazienti infetti. Inoltre in relazione alla tenacità di legame tra HPV e spermatozoi, e su esempio di altre infezioni, sono state suggerite tecniche di selezione e lavaggio dei campioni di liquido seminale infetto. In precedenza abbiamo valutato l'efficacia delle tecniche tradizionali (91). In particolare abbiamo valutato il lavaggio mediante centrifugazione, mediante Ficoll e swim-up, osservando con le ultime due metodiche una riduzione della percentuale di cellule infette, mentre mediante centrifuga la percentuale di cellule infette rimaneva costante. Sia l'elevata persistenza dell'infezione sia il peggioramento dei parametri seminali indotto dall'infezione ci ha spinto quindi a cercare possibili soluzioni per un lavaggio sicuro ed efficace dei campioni destinati alla PMA.

2.4.5 HPV E SANGUE PERIFERICO

Recenti evidenze dal nostro laboratorio hanno mostrato, in campioni di liquido seminale di soggetti con HPV 16, la positività per la FISH per HPV in cellule con fenotipo rotondeggiante non ascrivibili morfologicamente né alla popolazione di spermatozoi, né a quella delle cellule di sfaldamento. Una successiva analisi citologica di colorazione

con May Grunwald-Giemsa ha suggerito l'appartenenza di queste cellule alla linea mieloide, e ulteriori indagini hanno confermato essere leucociti CD45 positivi. Nonostante non sia stato dimostrato un chiaro tropismo dell'HPV per i leucociti circolanti, le nostre osservazioni confermano precedenti studi che mostravano la presenza del DNA virale in queste cellule sia in modelli animali che in umani (92-94). In particolare, molti studi condotti su pazienti con cancro della cervice hanno messo in luce la possibile presenza del virus nel sangue periferico, in cellule mononucleate, nel siero nel plasma e nel sangue del cordone ombelicale (95, 96). In questi studi gli autori ipotizzavano che il ritrovamento dell'HPV nel sangue periferico di tali pazienti rappresentasse il rilascio in circolo di cellule metastatiche nelle fasi tardive della patologia. Inoltre il DNA virale è stato riscontrato in circolo anche in donatori asintomatici, suggerendo ulteriori meccanismi patogenetici di diffusione dell'infezione nel sangue periferico (93).

3 SCOPO DELLA RICERCA

Gli scopi della ricerca sono stati quelli di valutare l'efficacia di una tecnica di swim-up modificata per la rimozione del DNA dell'HPV da campioni di liquido seminale infettato naturalmente ed artificialmente, di indagare la possibile associazione tra la presenza dell'HPV e di anticorpi anti-spermatozoo e determinarne la clearance dell'infezione dal liquido seminale, caratterizzare le cellule rotonde infette nel liquido seminale e valutare la presenza del virus in cellule circolanti e valutare il ruolo del counseling nel decorso clinico dell'infezione nelle coppie eterosessuali positive. Per raggiungere tali obiettivi, e per una maggiore chiarezza, la ricerca è stata suddivisa in quattro studi che saranno discussi nei capitoli successivi: trattamento con eparinasi, HPV e anticorpi antispermatozoo, HPV e sangue periferico e ruolo del counseling nelle coppie HPV positive.

4 MATERIALI E METODI

4.1 PAZIENTI

Per lo studio sull'associazione tra l'infezione e la presenza di anticorpi antispermatozoi, abbiamo arruolato 61 pazienti infertili con la presenza del DNA virale nel liquido seminale e 104 infertili senza infezioni. Per infertili abbiamo considerato i soggetti con parametri seminali alterati, almeno due anni di rapporti non protetti senza concepimento e partner normale (senza anomalie tubariche, uterine e cervicali e senza alterazioni ovulatorie). Un'anamnesi accurata comprendeva anche circoncisione, fumo e abitudini sessuali. Criteri di esclusione erano: criptorchidismo, traumi testicolari, orchiti, varicocele e ulteriori infezioni. Come controlli sono stati selezionati 92 soggetti fertili. Sui campioni del liquido seminale di tutti i soggetti sono state eseguite le analisi standard, lo spermMar test e la FISH per la ricerca delle aneuploidie spermatiche. Sui campioni dei soggetti positivi è stata inoltre eseguita la FISH per HPV. Sui campioni positivi per l'HPV 16 e allo spermMar test abbiamo eseguito l'immunofluorescenza per la proteina HPV 16-L1 e per la determinazione delle immunoglobuline. I soggetti positivi hanno ripetuto la FISH per HPV e la determinazione anticorpale a 12 e 24 mesi. Sedici maschi (media età 38.8 ± 9.8) con la presenza di HPV 16 nel liquido seminale riscontrato mediante FISH e tipizzato mediante INNO LiPA sono stati invece selezionati per studiare la possibile diffusione del virus in circolo. Criteri di esclusione erano: criptorchidismo, traumi testicolari, orchiti, varicocele e ulteriori infezioni. Come controlli abbiamo arruolato 16 maschi (media età 37.5 ± 5.9) partner di coppie infertili, negativi per HPV. Ad ogni soggetto è stato inoltre eseguito un prelievo di

sangue per valutare la presenza del virus in circolo come descritto in seguito. Per valutare l'efficacia del counseling nella clearance virale abbiamo considerato 74 coppie, afferenti al nostro centro, nelle quali la donna era HPV positiva. Un'accurata anamnesi comprendente le abitudini voluttuarie, il comportamento sessuale e per i maschi l'eventuale circoncisione, è stata raccolta per ogni paziente. All'arruolamento, tutti i maschi sono stati testati per l'HPV, la cui ricerca è stata eseguita nell'uretra, nel solco balano-prepuziale e nel liquido seminale. I campioni di liquido seminale positivi sono stati ulteriormente analizzati mediante ibridazione in situ fluorescente (FISH) per HPV. Alle pazienti è stato effettuato il Pap test e l'HPV test cervicale. Inoltre a tutti i partecipanti allo studio è stata eseguita la ricerca dell'HPV a livello orofaringeo. Per questo studio abbiamo arruolato 56 coppie con entrambi i partner positivi per HPV almeno in un sito di quelli considerati. Tutti i pazienti hanno ripetuto le stesse indagini per la ricerca dell'HPV a 6, 12, 18 e 24 mesi. Le coppie sono state quindi assegnate in maniera randomizzata in due gruppi: 28 sono state seguite esclusivamente in follow-up (gruppo A) mentre 28 hanno ricevuto anche un counseling (gruppo B).

4.2 PROCESSAZIONE DEL LIQUIDO SEMINALE

I campioni seminali per lo studio sulla selezione enzimatica sono stati ottenuti per ipsazione dopo 2-5 giorni di astinenza sessuale da 22 pazienti positivi per HPV e da 13 soggetti normozoospermici utilizzati come controlli. La presenza o assenza dell'HPV nel liquido seminale è stata valutata mediante PCR. Dopo liquefazione a temperatura ambiente e in accordo con le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità

sono stati valutati i seguenti parametri: volume seminale, pH, concentrazione spermatica, vitalità, motilità e morfologia. Un pool di spermatozoi, preparati utilizzando un'aliquota di liquido seminale di ogni soggetto di controllo, è stato artificialmente infettato mediante incubazione con HPV16-L1 e utilizzato per le ulteriori analisi. I tre gruppi (pazienti infetti, controlli e campioni incubati con L1), sono stati poi analizzati mediante TUNEL test, FISH per HPV (pazienti infetti e controlli) e IHC per HPV (spermatozoi incubati e controlli) prima e dopo swim-up diretto e modificato. Il pool di spermatozoi, è stato analizzato anche mediante citofluorimetria per HPV per confermare l'infezione acquisita artificialmente ed è stato rivalutato dopo l'incubazione con HPV 16-L1 incubazione prima e dopo swim-up modificato. I parametri seminali sono stati rivalutati nei tre gruppi dopo swim-up diretto e modificato. Nello studio per la valutazione degli ASA in presenza di HPV campioni seminali sono stati ottenuti per ipsazione dopo 2-5 giorni di astinenza sessuale .Dopo liquefazione a temperatura ambiente e in accordo con le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità sono stati valutati i seguenti parametri: volume seminale, pH, concentrazione spermatica, vitalità, motilità e morfologia. La presenza di anticorpi antispermatozoo è stata rilevata mediante spermMar test utilizzando il kit (FertiPro) come descritto in seguito. I campioni sono stati quindi lavati tre volte in PBS e i pellet così ottenuti utilizzati per le ulteriori indagini.

Infine per la ricerca riguardante l'HPV associato alle cellule dell'immunità, i campioni seminali sono stati ottenuti per ipsazione dopo 2-5 giorni di astinenza sessuale .Dopo liquefazione a temperatura ambiente e in accordo con le linee guida dell'Organizzazione

Mondiale della Sanità sono stati valutati i seguenti parametri: volume seminale, pH, concentrazione spermatica, vitalità, motilità e morfologia. La presenza di anticorpi antispermatozoo è stata rilevata mediante spermMar test utilizzando il kit (FertiPro). Per ogni soggetto, l'isolamento delle cellule rotonde è stato eseguito mediante centrifuga a gradiente di densità utilizzando un kit di separazione spermatica (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). Dopo centrifuga sono state selezionate le cellule dello strato superiore, lavate in PBS, centrifugate a 300g per 10 minuti, fissate in paraformaldeide al 4%, strisciate su vetrino e lasciate ad asciugare prima di staccarle a 20°.

4.3 TUNEL TEST

I campioni seminali sono stati centrifugati (600 g per 4 minuti), lavati in Sperm Washing Medium (SWM, Irvine Scientific, California) e fissati in paraformaldeide al 2% per 15 minuti. Dopo la fissazione, gli spermatozoi sono stati centrifugati (600 g per 4 minuti) e lavati in PBS. Sono quindi stati risospesi in 100 µL di soluzione permeabilizzante (10 mg sodio citrato, 10 µL Triton X-100 in 10 mL H₂O) ed incubati per 2 minuti a 4° C. Gli spermatozoi sono quindi stati centrifugati (600 g per 4 minuti), i pellet lavati in PBS ed incubati in PBS con EDTA al 2% per 45 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state nuovamente centrifugate (600 g per 4 minuti) e i pellet lavati in PBS. I campioni utilizzati come controlli positivi sono stati trattati con 100 µL di DNAsi I (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) (1 mg/ mL) addizionati con 10 µL di MgSO₄ (100 mM) per 1 ora a temperatura ambiente. Il TUNEL test è stato

eseguito con il kit In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics) seguendo le istruzioni del marchio. Gli spermatozoi sono quindi stati lavati due volte in PBS, diluiti fino ad ottenere un volume di 300 μ L in PBS e messi al buio per l'analisi al citofluorimetro.

4.4 FISH PER HPV

I campioni, contenenti almeno 2 milioni di spermatozoi eiaculati, sono stati strisciati su vetrino e fissati in soluzione metacetica per almeno un'ora a -20°C . Per ottenere la permeabilizzazione, I campioni sono stati digeriti con pepsina diluita 1:25000 in 0,01 mol/L-1 HCl preriscaldato, per 10 minutes a 37°C . La permeabilizzazione dei campioni è stata arrestata con un lavaggio in PBS 1X per 3-5 minuti; successivamente i campioni sono stati disidratati mediante passaggi in etanolo 70%, 80% e assoluto per 2 minuti e infine lasciati asciugare all'aria. I vetrini sono stati poi ricoperti con 20 μ L di soluzione ibridante (Pan Path, Amsterdam, The Netherlands), contenente biotina (BIO)-marcata con una sonda per HPV DNA (miscela di vari genomi contenente la regioni di HPV conservate). Ciascun campione è stato ricoperto con un vetrino coprioggetto ed I margini sono stati sigillati con smalto per unghie per evitare perdita di materiale durante i processi di denaturazione ed ibridazione. Dopo denaturazione del DNA cellulare e delle sonde di HPV DNA su piastra riscaldante per 5 minuti a 95°C , i campioni sono stati ibridati mediante incubazione overnight a 37°C in camera umida. Successivamente i vetrini coprioggetto sono stati rimossi con cautela e i campioni sono stati lavati in PBS 1X per 10 minutes. Dopo incubazione per 15 minuti a 37°C con il

reagente di differenziazione (Pan Path, Amsterdam, The Netherlands) i vetrini sono stati lavati tre volte in PBS 1X. Il controllo negativo è stato processato allo stesso modo omettendo la sonda virale. La sonda dell'HPV marcata con biotina è stata identificata mediante incubazione con streptavidina texas red 1:200 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) per 40 minuti a temperatura ambiente. Successivamente i vetrini sono stati lavati per due volte in PBS 1X/0,01% Triton e poi due volte in PBS 1X e montati con una soluzione contenente 4',6-diamidino-2phenylindole (DAPI) e anti-fade (BioBlue, BioView Ltd. Nes Ziona, Israel). I campioni sono stati analizzati usando un microscopio a fluorescenza (Nikon, Eclipse E600) equipaggiato con un set di filtri a tripla banda (FITC, TRITC, DAPI). Per ciascun vetrino sono stati analizzati almeno 200 spermatozoi e 200 cellule di sfaldamento. La valutazione dei segnali di ibridazione nucleare è stata effettuata in cieco da tre operatori. Quando i nuclei cellulari erano completamente ed omogeneamente colorati e/o quando erano presenti numerosi piccoli spot o singoli segnali di ampie dimensioni, le cellule erano classificate come positive. Il metodo è stato testato su vetrini di controllo contenenti cellule CaSki (una linea cellulare di carcinoma di cervice uterina umana contenente genoma di HPV stabilmente integrato e trascrizionalmente attivo) che sono serviti come controllo per le sonde specifiche.

4.5 FISH ANEUPLOIDIE

Lo studio delle aneuploidie spermatiche è stato eseguito mediante FISH multicolor. L'ibridazione del DNA è stata ottenuta con un mix di sonde satelliti specifiche per i

cromosomi X, Y e 18 (Kreatech Diagnostics, The Netherlands). Le sonde per il cromosoma X erano marcate col fluorocromo PlatinumBright495 emettendo un segnale verde, quelle per il cromosoma Y erano marcate con fluorocromo PlatinumBright550 emettendo un segnale rosso mentre quelle per il cromosoma 18 marcate con PlatinumBright415 emettevano un segnale blu. La denaturazione del DNA, l'incubazione, il lavaggio post ibridazione e la colorazione del nucleo sono state eseguite seguendo il protocollo Kreatech. Dopo la preparazione, i vetrini sono stati visionati utilizzando il microscopio a fluorescenza (Nikon, Eclipse E600, Melville, NY, USA) dotato di un filtro a tripla banda (FITC, TRITC e DAPI). Per ogni paziente sono state visionate almeno 2500 cellule.

4.6 INCUBAZIONE DI SPERMATOZOI CON CON HPV 16-L1

Un pool di spermatozoi di soggetti non infetti normozoospermici è stato lavato due volte in SWM e suddiviso in due aliquote incubate per 1 ora a 37°C in SWM con e senza l'aggiunta di HPV16-L1 (Gardasil, Sanofi Pasteur MSD, Lyon, France). Per l'immunofluorescenza, 10 µl di campione di liquido seminale sono stati strisciati su vetrini puliti non lubrificati, essiccati all'aria e fissati in PBS/paraformaldeide al 4% per 15 minuti. I vetrini sono stati quindi lavati tre volte in PBS per 5 minuti a temperatura ambiente e quindi utilizzati per individuare il capsido dell'HPV. Per l'identificazione dell'HPV16-L1 gli spermatozoi sono stati incubati con anticorpi murini monoclonali anti-HPV16-L1 (CAMVIR-1) (0.8 µg/mL, 1:250, Santacruz, Santa Cruz, CA) per 120 minuti a temperatura ambiente, e poi lavati in Tween-PBS al 0.2% per 5 minuti. La

reazione immunologica è stata rilevata mediante incubazione sequenziale con anticorpi anti-topo secondari biotinilati di capra (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA) e Streptavidina Texas red (1:400, Vector Laboratories, Burlingame, CA) entrambe per 60 minuti a temperatura ambiente. Dopo ciò, i vetrini sono stati lavati due volte in PBS. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI 5mg/mL e i vetrini coperti con buffer anti-dissolvenza e coprioggetti 24x24 mm. L'immunostaining è stata valutato con il video microscopio confocale Nikon ViCo.

4.7 CITOFUORIMETRIA PER HPV 16-L1

La citometria a flusso è stata eseguita come segue: gli spermatozoi sono stati incubati con anticorpo di topo monoclonale HPV16-L1 (CAMVIR-1) (1 µg/mL) in ghiaccio per 45 minuti al buio. Per l'individuazione dell'HPV16-L1, è stato aggiunto un secondo strato di ficoeritrina con anticorpo anti-topo (PE, 10 µM, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) e l'incubazione in ghiaccio è durata 45 minuti. I campioni incubati solo con l'anticorpo secondario sono stati utilizzati come controllo per l'HPV16-L1. Il pellet è stato analizzato mediante FACScalibur (Becton Dickinson, Oxford, UK) e i dati sono stati acquisiti e analizzati con Cellquest.

4.8 SWIM-UP

Lo swim-up è stato eseguito centrifugando 1 mL di liquido seminale a 300g per 10 minuti; il surnatante è stato eliminato ed il pellet di spermatozoi è stato risospeso in 0.3 mL di SWM. 1 mL di SWM è stato stratificato sul pellet, la provetta è stata inclinata di

45° e incubata per un'ora a 37°C in un incubatore al 5% di CO₂. La provetta è stata quindi raddrizzata, sono stati selezionati gli spermatozoi presente negli 0.8 mL superiori ed utilizzati per le analisi successive.

4.9 SWIM-UP CON EPARINASI

Lo swim-up è stato modificato come segue: 1 mL di liquido seminale è stato centrifugato a 300g per 10 minuti; il surnatante è stato eliminato ed il pellet di spermatozoi è stato risospeso in 0.3 mL di SWM addizionato con eparinasi III. Un mL di SWM con eparinasi III è stato stratificato sul pellet, la provetta è stata inclinata di 45° e incubata per un'ora a 37°C in un incubatore al 5% di CO₂. La provetta è stata quindi raddrizzata, sono stati selezionati gli spermatozoi presente negli 0.8 mL superiori ed utilizzati per le analisi successive.

4.10 MAR TEST

La ricerca degli anticorpi antispermatozoo è stata eseguita utilizzando il kit per IgG e IgA (FertiPro N. V., Sint-Martens-Latem, Belgium). I campioni di liquido seminale sono stati processati seguendo le istruzioni del kit. Il test è stato considerato positivo quando gli spermatozoi erano ricoperti in toto o parzialmente dalle particelle in lattice. La reattività del test era confermata dall'ulteriore formazione di crescenti agglutinazioni delle particelle tra di loro. Viceversa, gli spermatozoi mobili privi di particelle erano considerati negativi.

4.11 INNUNOFLUORESCENZA

4.11.1 STUDIO HPV E ANTICORPI ANTISPERMATOZOO CON DETERMINAZIONE IMMUNOGLOBULINE

Per l'immunofluorescenza e la determinazione delle immunoglobuline nello studio su HPV e ASA, 10 µl di campione di liquido seminale sono stati strisciati su vetrini puliti non lubrificati, essiccati all'aria e fissati in PBS/paraformaldeide al 4% per 15 minuti. I vetrini sono stati quindi lavati tre volte in PBS per 5 minuti a temperatura ambiente e quindi utilizzati per individuare il capsido dell'HPV e l'acrosoma (Pisum Pativum). Per l'identificazione dell'HPV16-L1 e delle immunoglobuline, gli spermatozoi sono stati incubati con anticorpi murini monoclonali anti-HPV16-L1 (CAMVIR-1) (0.8 µg/mL, 1:250, Santacruz, Santa Cruz, CA) e con anticorpi policlonali anti IgM IgG e IgA umani, coniugati con biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La reazione immunologica è stata rilevata mediante incubazione sequenziale con anticorpi anti-topo secondari, biotinilati di capra e Streptavidina Texas Red (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA). I nuclei sono stati controcolorati con DAPI 5mg/mL e i vetrini coperti con buffer anti-dissolvenza e coprioggetti 24x24 mm. L'immunostaining è stata valutato con il video microscopio confocale Nikon ViCo. Nello studio sull'HPV e sangue periferico invece le round cells del liquido seminale e i mononucleati del sangue periferico sono stati analizzati come segue. I campioni sono stati trattati per 10 minuti con Tiron X-100 al 1% (Sigma Aldrich, Milano) e saturati con BSA al 5% e Normal Donkey Serum/PBS al 5% per 30 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati quindi incubati tutta la notte a 4° C con anticorpi anti-HPV 16 L1 e anti-HPV 16 E6 (2

µg/mL) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) e anticorpi anti CD45, CD15 CD4, CD8, CD20 o CD56 (0.4 µg/mL) (BD Biosciences). Per i controlli negativi sono stati omessi gli anticorpi primari. La reazione immunologica è stata rilevata mediante incubazione sequenziale con anticorpi anti-topo secondari biotinilati di capra (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA) e Streptavidina Texas red (1:400, Vector Laboratories, Burlingame, CA) entrambe per 60 minuti a temperatura ambiente. In seguito i vetrini sono stati lavati due volte in PBS. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI 5mg/mL e i vetrini coperti con buffer anti-dissolvenza e coprioggetti 24x24 mm. L'immunostaining è stata valutato con il video microscopio confocale Nikon ViCo.

4.12 PROCESSAZIONE SANGUE PERIFERICO ED ISOLAMENTO MONONUCLEATI

I campioni di sangue dei soggetti con infezione da HPV 16 e dei controlli sono stati prelevati dalla vena antero cubitale e stoccati con un volume di almeno 3 ml in provette Vacutainer-EDTA (BD Biosciences, Milano, Italia). Per ogni soggetto sono state isolate le cellule mononucleate mediante centrifuga a gradiente di densità su Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, Milano, Italia) lavate due volte in PBS e centrifugate a 300 g per 10 min a temperatura ambiente e il pellet è stato diviso in due campioni uguali che sono stati processati per le ulteriori analisi. Un campione è stato conservato a - 20° C ed utilizzato per un'ulteriore PCR del DNA, mentre l'altro è stato fissato in paraformaldeide 4% / PBS per 15 minuti a temperatura ambiente, strisciato su vetrini

SuperFrost ® Plus, asciugati all'aria e infine conservati a -20 ° C fino alle analisi successive.

4.13 PCR PER HPV SU SANGUE

Le cellule mononucleate isolate dal sangue periferico sono state sottoposte estrazione del DNA mediante l'uso del kit QIAamp DNA (Qiagen, Milano, Italia). La lisi del campione è stato ottenuto dopo digestione con proteinasi K a 56 ° C per 10 min, ed i campioni lisati sono stati poi caricati sulle colonne QIAamp. Dopo due lavaggi, il DNA è stato diluito con 200 µl di soluzione tampone. Il DNA estratto è stato mantenuto a -80 ° C fino all'analisi. Il rilevamento dell' HPV-DNA è stato effettuata utilizzando il kit Ampliquality HPV-TYPE express® (AB Analitica, Padova, Italia). Il limite di rilevamento dichiarato del saggio era ≤ 500 copie virali/reazione e la sensibilità diagnostica è stata del 97,8%.

4.14 RICERCA DELL'HPV MEDIANTE INNO-LiPA

Due campioni di cellule di esfoliazione sono stati ottenuti dal pene, uno dalla superficie del solco balano prepuziale e uno dall'uretra, utilizzando tamponi standard con punta di cotone. Anche i campioni di cellule dalla cervice e dalla cavità orale sono stati ottenuti con tamponi con punta di cotone. I tamponi sono stati posti in soluzione salina, spremuto e ruotato contro il lato del tubo di raccolta per rilasciare quanto più liquido possibile. I campioni seminali sono stati ottenuti mediante masturbazione dopo 3 giorni di astinenza sessuale. La ricerca e la tipizzazione dell'HPV è stata effettuata mediante il

saggio INNO-LiPA HPV Genotyping Extra assay (Innogenetics, Gent, Belgium) seguendo il protocollo di utilizzo. Tale saggio è in grado di individuare i seguenti genotipi: HPV-6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69/71, 70, 73, 74 e 82. Per tale analisi, il DNA è stato isolato da 200 µL dell'altra STM aliquota di campione utilizzando i reagenti Qiagen DNA del Qiagen 3604 BioRobot (Qiagen) e diluiti in 100 µl d'acqua. Ogni corsa di estrazione del DNA conteneva un controllo positivo e uno negativo per valutare l'appropriatezza delle procedure di isolamento. Cinque microlitri di soluzione sono state utilizzate per l'amplificazione con PCR utilizzando il saggio INNO-LiPA HPV Genotyping Extra.

I prodotti biotinilati della PCR sono stati genotipizzati mediante ibridazione con sonde oligonucleotidiche specifiche legate ad una membrana di nitrocellulosa e rilevati mediante reazione colorimetrica utilizzando lo strumento Auto-LiPA 48 seguendo le procedure del protocollo. Dopo la colorazione, le bande sono state valutate mediante il software Line Reader and Analysis Software (Innogenetics) per determinare il genotipo. Tutti i risultati sono stati validati mediante conferma visiva. Un campione era considerato positivo se almeno una delle bande tipo-specifiche o una delle linee di controllo risultavano positive.

4.15 COUNSELING

Il counseling alle coppie consisteva principalmente nell'informazione sui possibili fattori di rischio dell'infezione da HPV. Di conseguenza è stato consigliato loro di prestare particolare attenzione all'igiene genitale e delle mani, di evitare rapporti orali

ed anali, l'uso promiscuo di biancheria intima e asciugamani, di ridurre o eliminare il fumo, di avere rapporti protetti e, in caso di lesioni HPV correlate, di trattarle e monitorarle.

4.16 STATISTICA

Per quanto riguarda l'analisi statistica nello studio di selezione enzimatica, i valori mostrati sono la media di almeno tre valutazioni effettuate da operatori diversi. I dati sono stati presentati come media \pm DS. Le differenze tra i dati sono state determinate dal t-test di Student a due code, dopo l'accettazione della distribuzione normale con il test di Kolmogorov-Smirnov. I valori P (a due code) $<.05$ sono stati considerati statisticamente significativi. Nello studio sugli ASA e l'HPV i valori riportati sono la media di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. Le differenze tra i dati sono stati determinati dai test Fisher Exact e Welch Two Sample t-test. I valori di P sono stati corretti attraverso il metodo Holm e i valori inferiore a 0.01 sono stati considerati statisticamente significativi. Nello studio HPV e sangue le differenze dei parametri seminali tra pazienti e controlli sono state valutate mediante il test t di Student a due code. I confronti tra frequenze sono state eseguite usando il test χ^2 . Le differenze sono state considerate significative con $p <.05$. Le variabili sono presentate come media \pm SD. Infine, nello studio sul counseling il log-rank test non parametrico è stato utilizzato per confrontare tra i due gruppi il tempo di eliminazione dell'infezione da HPV nei maschi e nelle femmine (tabella 15) e l'infezione nel liquido seminale (tabella 17). Per confrontare il numero di siti infetti (tabella 16) e la percentuale di spermatozoi

infetti (tabella 17) ad ogni momento del follow-up è stato utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon-Mann-Whitney. In entrambi i casi, la prima volta di una differenza significativa tra i due gruppi è stata individuata con il metodo di prova ordinato (97). I valori di p sono stati ordinati a partire dalla fine e sono stati messi in maniera da non essere in ordine decrescente. I valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

5 RISULTATI

Nello studio della selezione spermatica mediante swim-up con eparinasi pazienti positivi per l'HPV nel liquido seminale avevano un'età media di $36,7 \pm 3,8$ anni, non significativamente diversa dai soggetti normozoospermici. La Tabella 8 riporta le medie dei parametri seminali, della FISH e/o IHC per HPV e del TUNEL test eseguiti sui campioni di liquido seminale dei pazienti infetti e dei soggetti normozoospermici prima (controlli) e dopo pooling ed incubazione con HPV16-L1 (liquido seminale incubato con L1).

Tabella 8. Parametri seminali, TUNEL test e positività per l'HPV dei campioni di liquido seminale nei pazienti infetti, nei soggetti di controllo e nei campioni incubati con HPV 16-L1

	<i>Volume (mL)</i>	<i>pH</i>	<i>Conc. Sperm. (mill./mL)</i>	<i>Conta Sperm. totale (mill.)</i>	<i>Motilità progressiva (%)</i>	<i>Morfologia (%)</i>	<i>Vitalità (%)</i>	<i>TUNEL (%)</i>	<i>FISH/IHC (%)</i>
Pazienti HPV positivi (n=22)	3.1±0.9	7.6±0.2	29.0±10.3	87.7±36.3	29.6±14.2*	19.0±6.3	81.3±6.3	84.5±4.7	18.6±6.2
Soggetti controllo (n=13)	3.3±1.0	7.5±0.3	30.5±9.8	98.8±46.7	42.4±22.7	21.1±7.5	83.8 ±8.3	86.3±3.4	0.0/0.0
Sperm. Incubati L1 (pool)[§]	-	-	-	-	22.6±8.7**	20.9±6.5	2.8 ±8.7	85.9±5.0	82.4±7.3

[§] Volume seminale, pH, concentrazione e conta spermatica non sono riportati a causa del processo di pooling

* p<0.05 vs soggetti di controllo

** p<0.01 vs soggetti di controllo

Volume, pH, conta spermatica, morfologia e vitalità non erano diversi nei campioni di liquido seminale dei soggetti HPV infetti e dei non infetti. Una riduzione significativa della media della motilità progressiva degli spermatozoi è stato ritrovato nei campioni di liquido seminale dei pazienti infetti ($29,6 \pm 14,2$ p <0,05) rispetto ai controlli e questa riduzione era ancora più evidente nel pool degli spermatozoi incubati con HPV 16-L1 ($22,6 \pm 8,7$ p <0,01). Il TUNEL test, effettuato per valutare la frammentazione del DNA degli spermatozoi, non ha mostrato alcuna differenza significativa tra i pazienti infetti, i controlli e il pool di spermatozoi incubati con HPV16-L1. L'analisi FISH per HPV è risultata positiva in tutti i campioni dei pazienti infetti, con una percentuale media di positività del $18,6 \pm 6,2\%$ (da 6 a 31%). I campioni di liquido seminale dei soggetti di controllo sono serviti come controlli negativi per la stessa analisi. L'IHC per L1, utilizzata per verificare la presenza della proteina capsidica dell'HPV sugli spermatozoi incubati, ha mostrato una positività dell' $82,4 \pm 7,3\%$ (dal 67 al 93%), mentre i controlli sono risultati negativi. Confrontando i campioni ottenuti con swim-up diretto e modificato (con l'aggiunta di eparinasi III), non abbiamo osservato differenze significative in termini di motilità, vitalità e di frammentazione del DNA (Tabella 9).

Tabella 9. Parametri seminali e TUNEL test osservati nel liquido seminale dei pazienti infetti, dei soggetti di controllo e dei campioni incubati con HPV 16-L1 prima e dopo swim-up diretto e modificato

	<i>Vitalità (%)</i>			<i>Sperm. Motilità Progress. (milioni)</i>			<i>TUNEL test (%)</i>		
	Basale	Swim-up	Swim-up + Ep-III	Basale	Swim-up	Swim-up +Ep-III	Basale	Swim-up	Swim-up +Ep-III
Pazienti HPV positivi	81.3±6.3	90.5±4.1	88.3±5.0	25.2±6.3	9.8±2.1	8.5±2.0	84.5±4.7	87.8±5.5	85.8±6.9
Soggetti controllo	83.8±8.3	94.5±3.1	92.8±2.2	29.7±8.9	10.5±2.3	9.2±2.2	86.3±3.4	88.4±4.6	87.5±5.1
Sperm. Incubati L1	82.8±8.7	92.1±3.5	89.6±54.6	22.1±7.8	6.5±1.4	5.5±2.1	85.9±5.0	88.8±3.7	86.2±6.6

Non sono state osservate differenze significative.

Nonostante fosse presente un trend peggiore nei campioni trattati con eparinasi III, la vitalità e la frammentazione del DNA sono risultate migliori rispetto ai campioni pre-trattamento. La Tabella 10 riporta la percentuale media di spermatozoi HPV positivi rilevati dalla FISH e/o dall'IHC nei tre gruppi prima e dopo lo swim-up diretto e modificato.

Tabella 10. Positività all'HPV dei campioni di liquido seminale dei pazienti infetti, dei soggetti di controllo e degli spermatozoi incubati con HPV 16-L1 prima e dopo swim-up diretto e modificato

FISH/IHC (%)			
	Basale	Swim-up	Swim-up +Ep-III
Pazienti HPV positivi	18.6±6.2	4.5±1.5**	0.0
Soggetti di controllo	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
Sperm. Incubati L1	82.4±7.3	19.8±6.8**	0.0

** p<0.01 vs campioni basali e campioni post swim-up.

Mentre i controlli sono sempre risultati negativi sia per la FISH che per l'IHC, i campioni dei pazienti positivi e gli spermatozoi incubati con HPV-16 L1 hanno mostrato una positività sia prima che dopo swim-up (18,6 ± 6,2% basale vs 4,5 ± 1,5% post swim-up p <0,01 e 82,4 ± 7,3% basale vs 19,8 ± 6,8% post swim-up p <0,01, rispettivamente). Dopo il trattamento con eparinasi-III, sia i campioni dei pazienti infetti che quelli ottenuti dal pool post incubazione, sono risultate negativi sia alla FISH che

all'IHC. In figura 10 è riportata l'analisi di citometria a flusso eseguita nel pool di spermatozoi, prima e dopo incubazione con HPV 16-L1 e dopo il trattamento con eparinasi III.

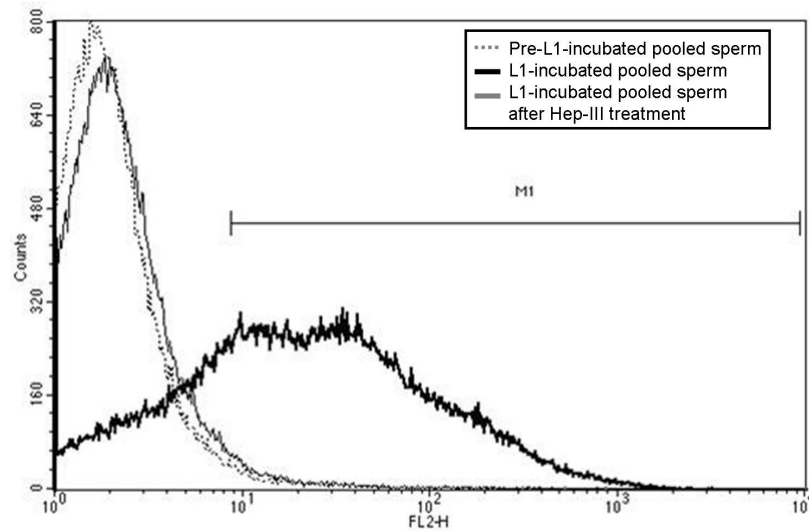


Figura 10. Citometria a flusso per HPV eseguita sugli spermatozoi del pool (linea tratteggiata) e sugli spermatozoi incubati con L1 prima (linea nera) e dopo (linea grigia) trattamento con eparinasi-III.

La figura 11 mostra le immagini ottenute mediante FISH e IHC eseguite sui campioni di liquido seminale dei pazienti positivi, dei soggetti di controllo e sugli spermatozoi incubati con L1, prima e dopo swim-up diretto e modificato.

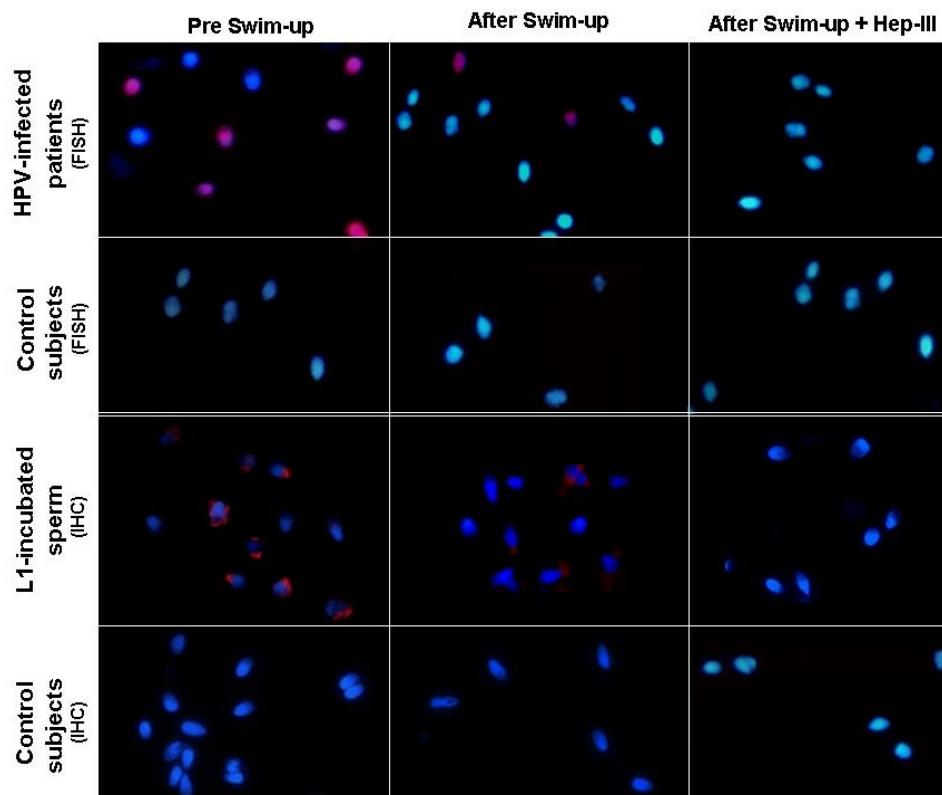


Figura 11. Rilevamento della positività all'HPV dei campioni di liquido seminale dei pazienti infetti, dei soggetti di controllo e degli spermatozoi incubati con HPV 16-L1 prima e dopo swim-up diretto e modificato.

Per effettuare lo studio su ASA e HPV abbiamo arruolato tre gruppi di pazienti: 61 infertili con infezione da HPV nel liquido seminale (età 35,3 + 4,7), 104 infertili senza infezione (età 34,2 + 3,8) e 92 soggetti fertili di controllo (età 35,5 + 4,2). La presenza dell'HPV è stata rilevata mediante PCR col primer SPF10 e la genotipizzazione è stata eseguita col saggio INNO-LiPA HPV Extra (Innogenetics, Gent, Belgio), in grado di identificare i seguenti genotipi: HPV - 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69/71, 70, 73, 74 e 82. Ciascuno dei

61 campioni positivi è stato ulteriormente valutato mediante FISH per HPV per determinare la percentuale di spermatozoi infetti. Come riportato in precedenza, solo una parte di cellule era legata all'HPV (Figura 12).

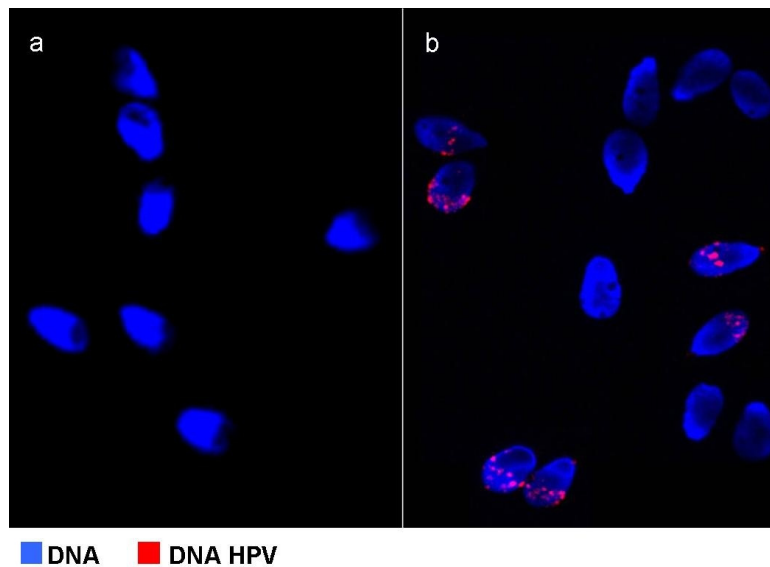


Figura 12. Un esempio di FISH per HPV eseguita su campioni di liquido seminale di pazienti infertili. A campioni non infetti, B campioni infetti.

In particolare, abbiamo osservato una percentuale media di spermatozoi infetti del $24,7 \pm 4,8$. i campioni di liquido seminale di ogni gruppo sono stati ulteriormente analizzati per la valutazione dei parametri seminali, le aneuploidie spermatiche e la presenza di anticorpi antispermatozoo (Tabella 11).

Tabella 11. Parametri seminali, FISH per aneuploidie spermatiche e SpermMar test rilevati nei tre gruppi di pazienti

	<i>Sperm conc.</i> (mill./mL)	<i>Sperm tot.</i> (mill.)	<i>Motilità</i> (%)	<i>Morfologia</i> (%)	<i>Vitalità</i> (%)	<i>FISH</i> <i>Aneuploidie</i> (%)	<i>Sperm-Mar</i> <i>test</i> <i>p.ts n (%)</i>
Infertili HPV+ (n=61)	32.0 ± 11.2	94.2 ± 36.5	29.0 ± 11.4	18.8 ± 6.2	80.0 ± 7.1	1.2 ± 0.6	26 (42.6%)
Infertili HPV- (n=104)	34.6 ± 9.8*	108.8 ± 44.5	47.8 ± 11.0	18.5 ± 4.3	83.2 ± 5.1	1.3 ± 0.4	12 (11.5%)*
Controlli (n=92)	51.3 ± 8.4*	156.0 ± 42.9	53.4 ± 11.4	21.3 ± 4.7	83.6 ± 5.1	0.9 ± 0.3	2 (2.2%)*

* $p < 0.01$

Il volume seminale, il pH (dati non riportati), il numero di spermatozoi, le forme normali e la vitalità non erano differenti nei pazienti infetti e in quelli non infetti, nonostante una significativa riduzione del numero di spermatozoi rispetto ai controlli. Una significativa riduzione della motilità progressiva degli spermatozoi è stata trovata nei campioni dei pazienti infetti, sia rispetto ai controlli che ai pazienti infertili non infetti ($p < 0,01$ e $< 0,01$ rispettivamente). La percentuale di aneuploidie non era significativamente diversa nei tre gruppi mentre la presenza di ASA era più frequente nei soggetti infertili. È stato interessante notare che questa frequenza era significativamente maggiore nei pazienti infertili infetti rispetto a quelli non infetti ($p < 0,01$). La figura 13 mostra un esempio di spermMar positivo .

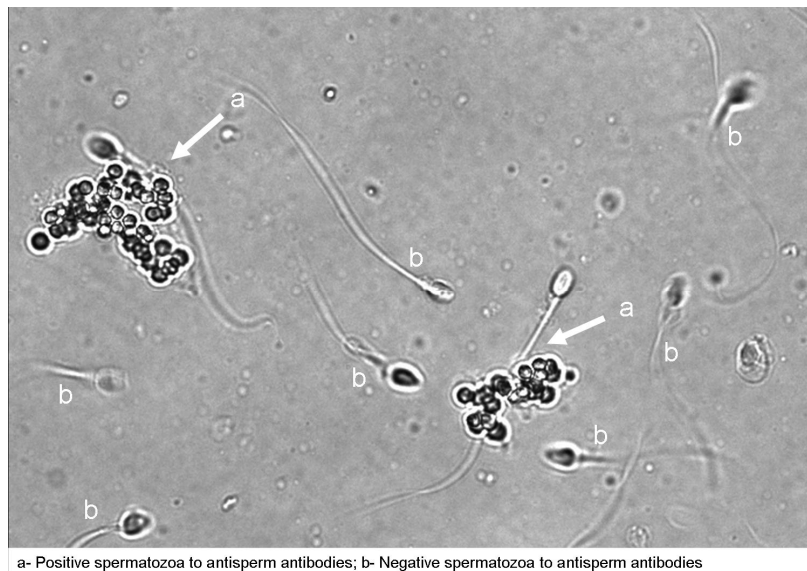


Figura 13. Esempio di spermMar positivo ottenuto da un campione di liquido seminale infetto

Anche la percentuale media di ASA era significativamente più alta nei pazienti infetti rispetto a quelli non infetti (percentuale media $34,7 \pm 19,8$ e $15,8 \pm 9,6$ rispettivamente).

Nessuna associazione è stata riscontrata tra i genotipi ad alto e basso rischio dell'HPV e parametri seminali, aneuploidie o presenza di ASA. Tra i campioni infetti, 5 avevano l'HPV 16 e due di questi avevano uno spermMar positivo. In questi campioni abbiamo testato la presenza delle diverse immunoglobuline (IgA, IgG e IgM) . Nei due campioni con ASA abbiamo osservato la co-presenza di HPV-16 L1 sia con IgA e IgG, ma non con IgM (Figura 14a). Nessuna colorazione per qualsiasi Ig è stata trovata negli altri tre campioni (Figura 14b).

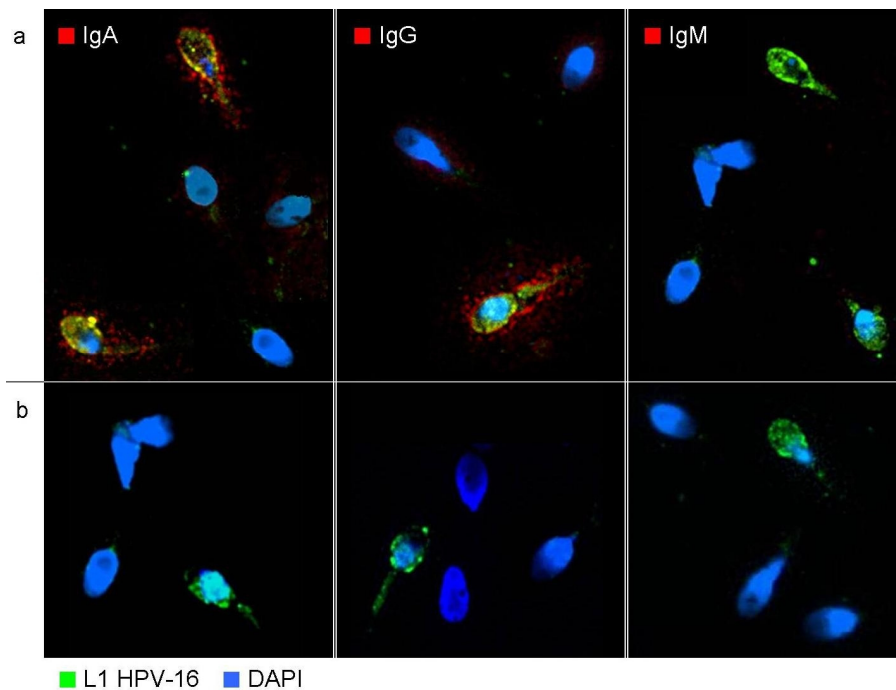


Figura 14. Analisi al microscopio confocale per l'HPV-16 L1 e immunoglobuline. Riga (a) mostra la co-colorazione di IgA e IgG con le proteine HPV in campioni infetti ASA positivi. Riga (b) mostra l'assenza di immunoglobuline in campioni infetti ASA negativi.

Abbiamo seguito i 61 pazienti infetti mediante FISH per HPV e spermMar test ed i risultati sono riportati in figura 15.

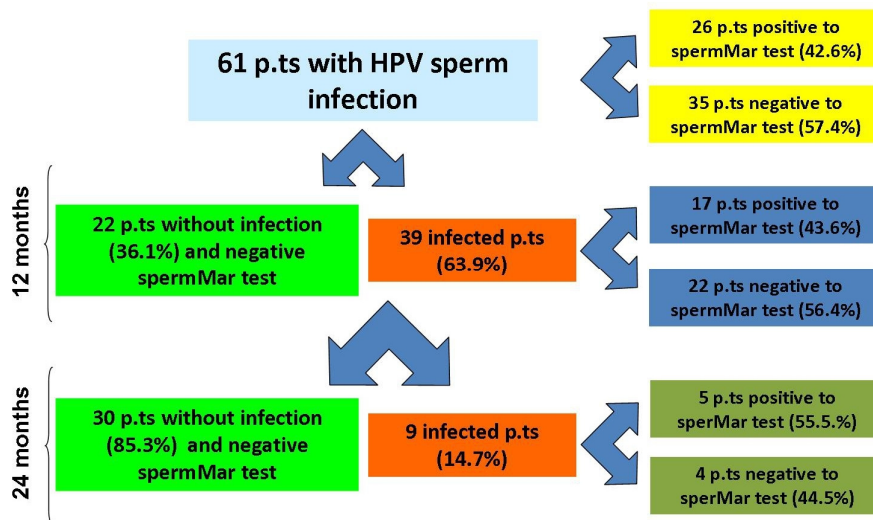


Figura 15. Follow up di 61 pazienti infertili con infezione da HPV nel liquido seminale. È indicata la prevalenza e l'eliminazione sia dell'infezione che degli ASA a 0, 12 e 24 mesi.

In 24 mesi i pazienti infetti (tra i quali 26 avevano uno spermMar test positivo) sono stati esortati ad avere rapporti sessuali protetti, ad evitare di fumare e a rivolgersi alla nostra unità in caso di sviluppo di condilomi. Dopo 12 mesi, 39 su 61 (63,9 %) sono risultati ancora positivi per l'HPV e 17 di loro (43,6%) anche allo SpermMar test, mentre i 22 (36,1%) che avevano eliminato l'infezione risultati negativi anche allo SpermMar test. Dopo ulteriori 12 mesi, 9 pazienti (14,7 %) erano ancora HPV positivi e 5 (55,5 %) avevano ASA nel liquido seminale, mentre gli altri 30 sono risultati negativi sia per l'infezione che per ASA. La Tabella 12 riporta i valori medi della motilità spermatica osservati durante il periodo di follow-up nei pazienti infertili infetti con e senza anticorpi antispermatozoi.

Tabella 12. Numero di pazienti infetti e motilità spermatica all'arruolamento e durante il follow-up (12 e 24 mesi)

	T 0		T 12 mesi		T 24 mesi	
	N p.ts	Motilità (%)	N p.ts	Motilità (%)	N p.ts	Motilità (%)
Infertili HPV+ totale	61	29.0 ± 11.4	39	30.1 ± 8.1	9	31.1 ± 6.3
Infertili HPV+ SpermMar +	26	27.2±12.7	17	28.4 ± 5.4	5	28.0 ± 2.7
Infertili HPV+ SpermMar -	35	30.5±10.3	22	31.4 ± 9.6	4	35.0 ± 7.7
Infertili HPV- (negativizzati)	/	/	22	46.8 ± 13.0	30	47.1 ± 12.1

Anche se non vi era alcuna differenza significativa nella motilità spermatica tra i pazienti con spermMar test positivo o negativo, il primo gruppo ha mostrato una ridotta motilità bassa durante tutto il follow-up. I pazienti che avevano eliminato l'infezione a 12 e 24 mesi hanno mostrato una motilità spermatica media non significativamente diversa da quella dei pazienti infertili non infetti (46,8±13,0% e 47,1±12,1 %, rispettivamente, vs 53,4±11,4 %).

Nello studio su HPV e sangue i parametri seminali dei pazienti con infezione da HPV16 e dei soggetti di controllo sono riportati in Tabella 13.

Tabella 13. Parametri seminali e percentuale media di cellule positive riscontrate nel liquido seminale di soggetti positivi per HPV 16 e dei controlli

	Vitalità (%)	Morfologia (%)	Conc. (10^6 /ml)	Numero tot. (10^6)	Motilità (%)	SperMar positive samples (%)	Media % Sperm. HPV 16+	Media % non-sperm. HPV 16+
HPV-16 + (n=16)	79.2 ± 11.2	19.8 ± 5.8	44.2 ± 15.8	108.9 ± 85.9	28.3 ± 14.3 *	37.5 *	26.2 ± 5.9*	19.3 ± 8.4*
Controlli (n=16)	83.1 ± 7.5	19.1 ± 8.0	37.1 ± 9.1	115.1 ± 44.8	40.4 ± 16.8	6.3	0	0

p<0.01 vs controlli

Abbiamo osservato una ridotta motilità spermatica e un'aumentata frequenza di positività allo SperMar test nei campioni HPV16 positivi. Altre differenze significative tra i parametri seminali dei due gruppi non sono state osservate. La FISH per l'HPV ha mostrato una media del $26,2 \pm 5,9\%$ di spermatozoi infetti. Tra le altre cellule presenti nel liquido seminale abbiamo osservato una media del $19,3 \pm 8,4\%$ di positività per l'HPV. Le caratteristiche morfologiche di queste cellule erano chiaramente visibili al microscopio e variavano da cellule grandi e di forma irregolare con margini nucleari frastagliati di probabile origine epiteliale, a cellule nucleate di forma rotonda e regolare con citoplasma limitato, simili a quelle della linea mieloide (Figura 16A I e II). Nessun tipo cellulare è risultato infetto nei campioni seminali dei controlli.

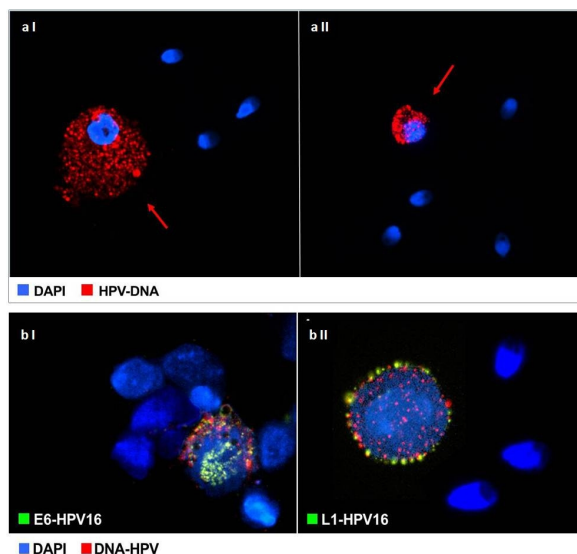


Figura 16.
a: FISH per HPV in cellule (non spermatozoi) in campioni di liquido seminale. a I cellule epiteliali e a II cellule non epiteliali.
b: FISH e immunofluorescenza dell'espressione HPV16 E6 o L1. b I HPV16-E6 e b II HPV16-L1 espresse nelle cellule rotonde.

Non era presente alcuna differenza tra il numero di cellule rotonde tra i due gruppi ($0,003 \pm 0,002$ e $0,002 \pm 0,001$ nei campioni infetti ed in quelli non infetti rispettivamente $p > 0,05$; Tabella 14).

Tabella 14. Concentrazione delle cellule rotonde nel liquido seminale e valutazione molecolare dell'HPV DNA nel liquido seminale e nei mononucleati circolanti ottenuti da campioni di soggetti infetti e soggetti di controllo

Campione	Liquido seminale		Sangue		
	Cellule rotonde ($\times 10^6/\text{ml}$)	Cellule rotonde FISH (+/-)	PBMC FISH (+/-)	PBMC HPV (+/-)	
Campioni HPV 16 positivi	1	0,002	+	-	-
	2	0,002	+	-	-
	3	0,001	+	-	-
	4	0,001	+	-	-
	5	0,002	+	-	-
	6	0,003	+	+	+
	7	0,001	+	-	-
	8	0,001	+	+	+
	9	0,005	+	-	-
	10	0,005	+	+	+
	11	0,004	+	-	-
	12	0,003	+	-	-
	13	0,003	+	-	-
	14	0,001	+	+	-
	15	0,003	+	-	-
	16	0,004	+	-	-
Media	0,003\pm0,001				
Controlli	1	0,001	-	-	-
	2	0,002	-	-	-
	3	0,005	-	-	-
	4	0,001	-	-	-
	5	0,002	-	-	-
	6	0,004	-	-	-
	7	0,003	-	-	-
	8	0,001	-	-	-
	9	0,001	-	-	-
	10	0,003	-	-	-
	11	0,001	-	-	-
	12	0,000	-	-	-
	13	0,003	-	-	-
	14	0,003	-	-	-
	15	0,002	-	-	-
	16	0,001	-	-	-
Media	0,002 \pm 0,001				

PBMC: Cellule mononucleate del sangue periferico

Per determinare il fenotipo molecolare delle cellule positive per l'HPV, abbiamo effettuato una centrifuga con gradiente di densità. Il numero di cellule rotonde recuperato dal liquido seminale non era significativamente diverso tra i campioni dei soggetti infetti e non infetti. La FISH eseguita sulle cellule rotonde ha rilevato il DNA dell'HPV in tutti i campioni infetti ma non nei controlli. Il numero di cellule rotonde infettate variava dal 10 al 40 %. Il DNA virale era localizzato principalmente nel citoplasma e meno frequentemente a livello del nucleo (figura 16b I- II). Inoltre, in quasi tutte le cellule rotonde positive, è stato rilevato un segnale sia per E6 che per L1. anche tali proteine erano localizzate prevalentemente a livello citoplasmatico. L'immunofluorescenza per CD45 ed E6 eseguita sugli stessi campioni (figura 17a) ha messo in evidenza che la maggior parte (> 95%) di cellule rotonde infette non erano leucociti mononucleari mieloidi (98). Ulteriori test di immunofluorescenza (figura 17b I- II) su cellule mononucleate HPV positive, che esprimevano la proteina E6, mostravano raramente una colorazione per i marcatori dei CD4 o CD8. d'altra parte, la colorazione specifica per i marcatori dei CD20 o CD56 marcatori è stata riscontrata nel 20% e nel 70% rispettivamente delle cellule positive per E6.

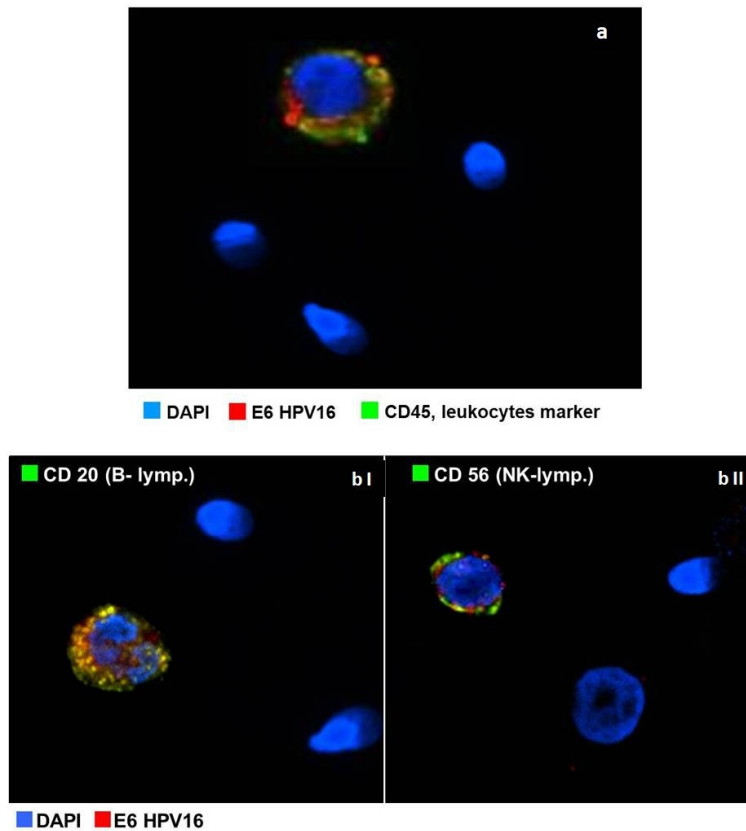


Figura 17.
a: immunofluorescenza per l'espressione di E6 e CD45 sulle cellule rotonde del liquido seminale.
b: immunofluorescenza di E6 e CD20 o CD56 su leucociti nel liquido seminale.

La presenza dell'HPV nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) è stata inizialmente valutata mediante FISH. Come riportato in tabella 13, 4 pazienti (25%) positivi per l'HPV16 nel liquido seminale, mostravano una specifica positività per l'HPV in una popolazione molto ristretta di PBMC che andava dallo 0,1 allo 0,6% (figura 18a). Nei soggetti di controllo non è stata rilevata alcuna presenza di PBMC infetti. In parallelo, la presenza di HPV DNA nelle cellule mononucleari del sangue periferico è stata valutata mediante PCR. Tale indagine ha mostrato la presenza del

DNA virale in 3 su 4 campioni di PBMC infetti rilevati dalla FISH (Figura 18b).

Nessuno dei controlli è risultato positivo.

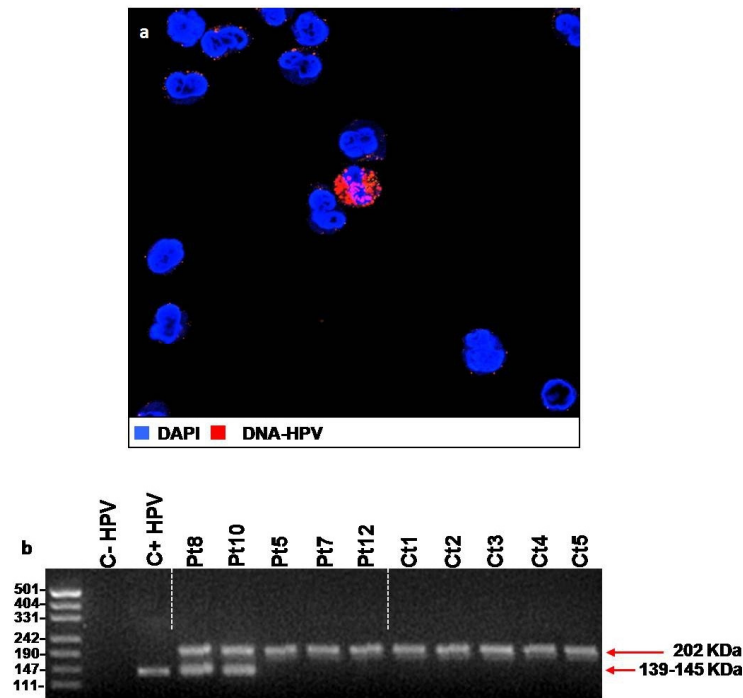


Figura 18. a: FISH per HPV nelle cellule mononucleate del sangue periferico.

b: PCR per HPV DNA in cellule mononucleate del sangue periferico nei pazienti e nei controlli. Un esempio di prodotto di HPV DNA (139-145 kDa) rilevabile nei pazienti 8 e 10 (Pt8 e Pt10, rispettivamente), e non rilevabile nei pazienti 5, 7 e 12, nonché in tutti i soggetti di controllo (Pt5, Pt7, Pt12 e Ct1-5 rispettivamente). Una banda di tiosolfato sulfotransferasi (TST) a 202 kDa è stata utilizzata come controllo interno.

Ulteriore analisi di immunofluorescenza hanno evidenziato che il DNA virale era localizzato nel citoplasma delle cellule positive e co-localizzava con E6 ed L1 in quasi tutte le cellule positive (Figura 19a I- II). Infine, è stato studiato il fenotipo molecolare dei PBMC infetti presenti nel sangue periferico. Le cellule positive per E6 esprimevano principalmente CD20 o CD56 (35% e 60% rispettivamente) (figura 19b I- II) . Nessuno

dei campioni che esprimeva E6 presentava una co-espressione di CD4, mentre un 5% di quelle cellule esprimeva CD8 (dati non mostrati)

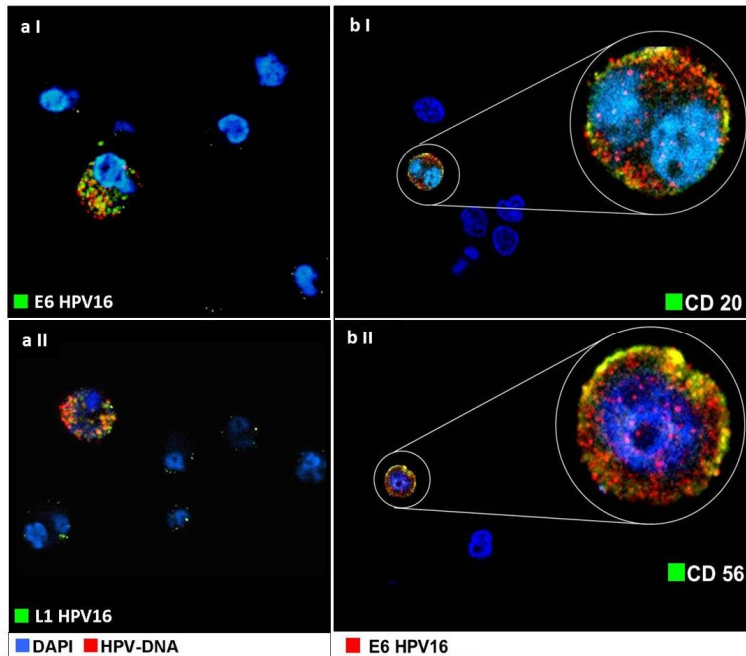


Figura 19. a: immunofluorescenza per HPV16 E6 ed L1 sulle cellule mononucleate del sangue periferico. a I HPV16 E6 e a II HPV16 L1 riscontrate su PBMC positivi. b: immunofluorescenza per HPV16 E6 e CD20 o CD56 su PBMC. PBMC positivi b I esprimenti HPV16 E6 e CD20. b II esprimenti HPV16 E6 e CD56

Infine, nello studio sul counseling abbiamo considerato 74 maschi, partner di donne HPV positive, e di questi abbiamo osservato un'infezione in 56 (75.7%). Le 56 coppie positive per almeno un sito genitale analizzato, sono state seguite per 24 mesi. Durante il follow-up sono uscite dallo studio tre coppie del gruppo A e quattro del B e pertanto i dati sono riferiti alle 49 coppie rimanenti. L'età media all'arruolamento era di 33.4 ± 4.7 anni per le donne e di 37.6 ± 5.2 per i maschi. In Tabella 15 è riportata la prevalenza

dell'infezione da HPV nei vari siti genitali maschili e femminili osservata al momento dell'arruolamento.

Tabella 15. Prevalenza dell'infezione da HPV nei differenti siti genitali nei maschi e femmine delle 49 coppie infette eterosessuali arruolate nello studio

	1 sito n = 6 (12.3%)			2 siti n = 15 (30.6%)			3 siti n = 28 (57.1%)		
Maschi	<i>C</i>	<i>U</i>	<i>S</i>	<i>C+U</i>	<i>C+S</i>	<i>U+S</i>	<i>C+U+S</i>	Totale	
n.	4	0	2	8	5	2	28	49	
(%)	(8.2)		(4.1)	(16.3)	(10.2)	(4.1)	(57.1)	(100)	
Femmine	<i>Cx</i>	<i>Cx+CIN 1</i>		<i>Cx+CIN 2</i>		Totale			
n.	16	28		5		49			
(%)	(32.7)	(57.1)		(10.2)		(100)			

C = Solco balano prepuziale, U = Uretra, S = Liquido seminale, Cx = Cervice, CIN 1 = neoplasia cervicale intraepiteliale di grado 1, CIN 2 = neoplasia cervicale intraepiteliale di grado 2

Nella popolazione maschile, la ricerca del papilloma virus nel solco balano-prepuziale, nell'uretra e nel liquido seminale, ha messo in luce che il 57.1% aveva l'infezione in tutti i siti, il 30.6% in due e il 12.2% solo in uno. Il sito maggiormente coinvolto era il solco con il 91.8% di prevalenza. Undici maschi su 49 (22.4%) presentava verruche che sono state rimosse mediante laser terapia al momento dell'arruolamento e in caso di ricomparsa durante il follow-up. Nelle donne la diagnosi di infezione è stata fatta mediante tampone cervicale, e tra queste il 67.3% era positivo anche al Pap test. In particolare, il 57.1% presentava neoplasia cervicale intraepiteliale di grado 1 e il 10.2% di grado 2 (CIN 1 e CIN 2 rispettivamente). Tra le pazienti con CIN 2, 3 (1 del gruppo A e 2 del gruppo B) sono state trattate mediante escissione diatermica o conizzazione, mentre le altre (1 del gruppo A e 2 del gruppo B) sono state semplicemente monitorate.

In questo studio abbiamo riscontrato i seguenti genotipi: HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 44, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 69/71, 70, 73 e 74. Sia nei maschi che nelle femmine, le verruche erano più frequentemente associate all'HPV 6, HPV 11 e HPV 16. Nel 38.8% degli uomini e nel 40.8% delle donne abbiamo osservato una confezione ed è stata riscontrata una concordanza di genotipi tra i partner nel 69.4% dei casi. La ricerca dell'infezione nella cavità orale, ha riportato una positività solo nelle coppie che avevano dichiarato di praticare sesso orale, e tra queste 22 coppie il 22.7% era positivo. La prevalenza era maggiore nelle femmine (18.2%) rispetto ai maschi (4.5%) e i genotipi virali riscontrati sono stati i seguenti: 6, 16, 18, 33 and 74 (Figura 20).

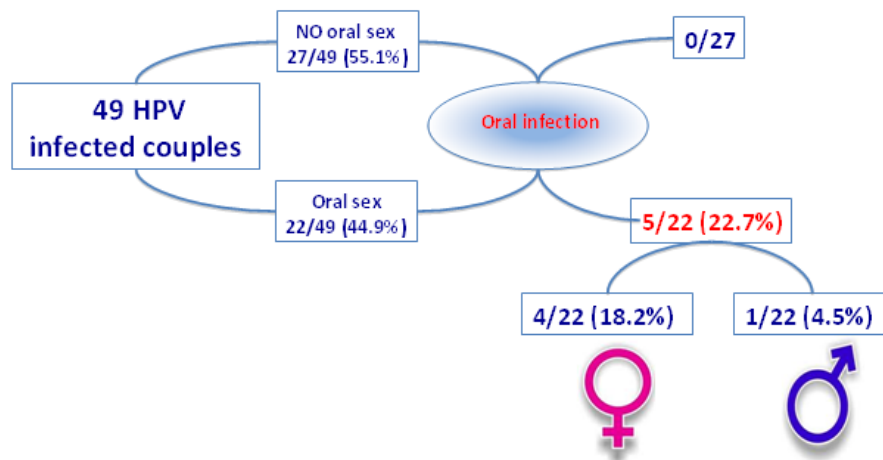


Figura 18. Prevalenza dell'infezione orale da HPV osservata al momento dell'arruolamento in 49 coppie eterosessuali che hanno riferito, o no, di praticare sesso orale.

Nessun paziente presentava lesioni orali e tutti sono risultati negativi dopo 12 mesi di follow-up. Dopo l'assegnazione randomizzata delle coppie in due gruppi A (con

counseling) e B (senza counseling), i soggetti sono stati seguiti in follow-up a 6, 12, 18 e 24 mesi. La

Tabella 16 riporta il trend dell'infezione maschile e femminile dei gruppi A e B durante il follow-up.

Tabella 16. Trend dell'infezione da HPV nella popolazione maschile e femminile dei gruppi A e B durante il follow-up

<i>Tempo</i>	Femmine n. (%)		Maschi n. (%)	
	Gruppo A n. (%)	Gruppo B n. (%)	Gruppo A n. (%)	Gruppo B n. (%)
<i>Basale</i>	24 (100)	25 (100)	24 (100)	25 (100)
<i>6 mesi</i>	17 (70.8)	10 (40)	23 (95.8)	20 (80)
<i>12 mesi</i>	13 (54.2)	1 (4)	19 (79.2)	14 (56)
<i>18 mesi</i>	6 (25)	0	11 (45.8)	3 (12)
<i>24 mesi</i>	2 (8.3)	0	5 (20.8)	0

Risulta evidente che i soggetti del gruppo B avevano una media del tempo di eliminazione del virus significativamente maggiore rispetto al gruppo A (femmine $p<0.001$, maschi $p<0.01$). Inoltre, a 12 mesi solo una donna del gruppo B (con Pap test negativo) e 13 del gruppo A (sette con CIN 1 e una con CIN 2) sono risultate ancora infette. Dopo 24 mesi tutti i soggetti del gruppo B risultavano negativi, mentre nel gruppo A, l'infezione persisteva nell'8.3% delle donne e nel 20.8% dei maschi.

Durante il follow –up abbiamo osservato nella popolazione maschile del gruppo B non solo una più rapida eliminazione del virus, ma anche una maggiore riduzione dei siti coinvolti (Tabella 17).

Tabella 17. Numero di siti infetti nei maschi dei gruppi A e B durante il follow-up

<i>Tempo</i>	1 sito		2 siti		3 siti	
	Gruppo A n. (%)	Gruppo B n. (%)	Gruppo A n. (%)	Gruppo B n. (%)	Gruppo A n. (%)	Gruppo B n. (%)
<i>Basale</i>	3 (12.5)	3 (12)	8 (33.3)	7 (28)	13 (54.2)	15 (60)
<i>6 mesi*</i>	5 (20.8)	11 (44)	11 (45.8)	6 (24)	7 (29.2)	3 (12)
<i>12 mesi</i>	9 (37.5)	9 (36)	9 (37.5)	5 (20)	1 (4.2)	0
<i>18 mesi**</i>	8 (33.3)	3 (12)	2 (8.3)	0	1 (4.2)	0
<i>24 mesi</i>	4 (16.6)	0	1 (4.2)	0	0	0

* p < 0.05

**p = 0.01

Tale differenza era già presente dopo sei mesi, e a 18 nessun paziente del gruppo B aveva più di un sito coinvolto contro il 12.5% del gruppo A. Considerando la prevalenza dell'infezione nel liquido seminale, non abbiamo osservato differenze significative tra i due gruppi. Tuttavia era evidente un trend di eliminazione dell'infezione più rapida nel gruppo B, e nessun paziente di tale gruppo a 18 mesi presentava l'infezione a livello seminale. Considerando la popolazione di spermatozoi infetti (Tabella 18), la percentuale era significativamente più bassa nel gruppo B a partire dal sesto mese.

Tabella 18. Andamento dell'infezione e percentuale di spermatozoi infetti nel liquido seminale nei maschi dei gruppi A e B durante il follow-up

<i>Tempo</i>	Infezione seminale		% spermatozoi infetti	
	Gruppo A n. (%)	Gruppo B n. (%)	Gruppo A %	Gruppo B %
<i>basale</i>	19 (79.2)	18 (72)	32.9 ± 10.5	33.5 ± 7.8
<i>6 mesi</i>	13 (54.2)	8 (32)	24.4 ± 7.8	17.1 ± 4.9*
<i>12 mesi</i>	6 (25)	3 (12)	15.7 ± 5.6	5.3 ± 2.1
<i>18 mesi</i>	2 (8.3)	0	9.5 ± 3.5	0
<i>24 mesi</i>	1 (4.2)	0	4.0	0

*p< 0,05; Gruppo B vs Gruppo A

Considerando le coppie, la media del tempo di eliminazione dell'infezione era più bassa nel gruppo B (p<0.05). Al termine del follow-up tutte le coppie del gruppo B risultarono negative, mentre il 20.8% delle coppie del gruppo A presentava ancora l'infezione.

6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le malattie sessualmente trasmissibili (MST) possono influire sulla salute e la fertilità sia dei maschi che delle femmine. L'HPV è l'agente di una delle più comuni infezioni a trasmissione prevalentemente sessuale che può essere asintomatica o causare condilomi e neoplasie (99-104). Un'elevata incidenza di tale infezione è stata riscontrata nel liquido seminale di soggetti sessualmente attivi con e senza fattori di rischio quali l'elevato numero di partner sessuali, il mancato utilizzo del preservativo e il fumo (42, 44, 52). Recenti studi suggeriscono un'associazione tra l'alterazione dei parametri seminali e l'infezione da HPV, e la motilità sembra essere il parametro principalmente coinvolto (71-73). Inoltre, un'alta prevalenza dell'infezione da HPV è stata segnalata in pazienti infertili e nei campioni di liquido seminale crioconservati da parte di soggetti che ricercano gravidanze mediante tecniche di fecondazione in vitro (IVF), i quali hanno preventivamente crioconservato il seme ai fini di preservare la fertilità (105, 106). Studi in vitro hanno dimostrato che gli spermatozoi infettati artificialmente sono in grado di penetrare l'ovocita, trasferire il genoma dell'HPV all'ovocita, e che i geni HPV sono poi attivamente trascritti dall'ovocita fertilizzato (77). Inoltre, l'esposizione di due cellule di embrione di topo a frammenti di DNA di HPV, ha evidenziato effetti fase-specifici sull'embrione da parte dell'HPV-16 e HPV-18, che consiste in una diminuzione della formazione della blastocisti e in un ridotto processo di attecchimento (107). Uno studio condotto da Hermonat et al. ha messo in evidenza che l'infezione da HPV è più frequentemente riscontrata in campioni provenienti da aborti spontanei rispetto a campioni provenienti da aborti elettivi, suggerendo un importante ruolo di

questo virus nell'infertilità e nell'aborto.(108). Inoltre, recenti scoperte hanno dimostrato che le coppie positive per HPV che si sottopongono a tecniche di riproduzione assistita (ART), registrano un aumentato rischio di interruzioni di gravidanza rispetto a quelle non infette. In particolare, questo studio ha dimostrato che l'infezione nel liquido seminale è il parametro predittivo maggiore di aborto spontaneo (109). Molti tentativi sono stati eseguiti per eliminare l'HPV dal liquido seminale di pazienti infetti. Utilizzando tre tecniche classiche di selezione spermatica (lavaggio, gradiente di densità e swim-up) avevamo precedentemente osservato solo una riduzione degli spermatozoi positivi per HPV, ma solo in pochi casi trattati con swim-up, siamo stati in grado di eliminare l'infezione da HPV (91). Alla luce di queste osservazioni, possiamo concludere che la tenacia del legame tra l'HPV e gli spermatozoi è molto forte. Pertanto, risulta di fondamentale importanza l'identificare di nuovi protocolli di selezione degli spermatozoi, in grado di rimuovere l'infezione da HPV dalle cellule del liquido seminale prima del loro utilizzo mediante ART. Alle coppie sierodiscordanti HIV positive che si sottopongono ad ART, è stato proposto con successo un trattamento enzimatico del liquido seminale infetto al fine di ottenere una gravidanza sicura (28). Nel presente studio, abbiamo testato una versione modificata di swim-up addizionato con eparinasi-III con lo scopo di eliminare l'HPV dai campioni di liquido seminale infetto. Il razionale di questo trattamento è stato quello di scindere il legame tra l'HPV e il suo ligando putativo Syndecan-I, localizzato sulla superficie degli spermatozoi. Abbiamo confermato che gli spermatozoi positivi per l'HPV presentano una riduzione significativa della loro motilità progressiva, e lo stesso dato è stato osservato negli

spermatozoi infettati artificialmente, ottenuti mediante l'incubazione degli spermatozoi con la proteina del capsido virale. Questo dato sostiene l'ipotesi che l'HPV rivesta un ruolo importante come fattore di rischio per l'infertilità maschile, anche se gli altri parametri spermatici e l'integrità del DNA degli spermatozoi infettati risultavano inalterati. Inoltre, eseguendo la FISH, abbiamo riscontrato che i pazienti positivi per l'HPV nel liquido seminale presentano un'alta prevalenza (circa il 20%) di spermatozoi infetti. La tenacia di legame tra l'HPV e gli spermatozoi è stata dimostrata essere molto forte, e lo swim-up non è efficace nell'eliminazione degli spermatozoi positivi dal liquido seminale. L'applicazione dello swim-up modificato, ha mostrato un peggioramento della vitalità, della motilità e della frammentazione del DNA che potrebbe sollevare preoccupazioni circa l'utilizzo clinico di questa tecnica. Tuttavia, le differenze tra swim-up diretto e modificato non sono statisticamente significative. Una scoperta importante di questo studio riguarda la percentuale di spermatozoi infetti osservati prima e dopo il trattamento con eparinasi-III. Anche se una significativa riduzione della percentuale di spermatozoi infetti è stata osservata dopo swim-up diretto, è interessante notare come lo swim-up modificato sia in grado di eliminare completamente l'HPV DNA dagli spermatozoi. Questo è il primo studio che dimostra l'efficacia di una tecnica di swim-up modificata nella selezione di spermatozoi non infetti da campioni di liquido seminale positivi per l'HPV. Inoltre, abbiamo dimostrato che il trattamento con l'eparinasi-III a tali concentrazioni non influenza significativamente la qualità degli spermatozoi e l'integrità del DNA degli stessi. Ad oggi gli studi che hanno preso in considerazione l'impatto negativo delle infezioni virali

sulla fertilità maschile, hanno individuato tre diversi aspetti: a) le infezioni inducono un decadimento della salute generale e di conseguenza della fertilità, b) spesso i pazienti sono sottoposti a terapie antiretrovirali che possono provocare danni testicolari ed azoospermia, c) il virus può avere un effetto negativo diretto sugli spermatozoi. In questo studio abbiamo valutato un nuovo possibile meccanismo di infertilità maschile correlato all'HPV. Dalle analisi effettuate è emerso non solo che un maggior numero di soggetti infetti era coinvolta nel processo immunitario (42.6%) rispetto ai soggetti infertili e di controllo (11.5% e 2.2% rispettivamente), ma anche che una maggior percentuale di cellule era coinvolta in tali campioni. Questi dati, considerando anche l'esclusione di tutte le altre cause note di ASA, suggeriscono che la presenza dell'HPV sulla superficie spermatica potrebbe rappresentare uno stimolo antigenico per la produzione di anticorpi antispermatozoo. Per dare ulteriore forza all'ipotesi di un ruolo del virus nella produzione di anticorpi, nei campioni risultati positivi allo spermMar test abbiamo documentato la contemporanea presenza della proteina capsidica virale e delle immunoglobuline. In particolare, abbiamo osservato che ad una positività per la proteina HPV 16-L1 corrispondeva una positività anche per le IgA e le IgG. Inoltre, valutando il tempo di eliminazione dell'infezione, abbiamo osservato che una significativa clearance dell'HPV è ottenuta dopo 24 mesi, e la scomparsa degli ASA è strettamente correlata e va di pari passo con quella del virus e con un miglioramento della motilità spermatica. Inoltre abbiamo identificato per la prima volta la presenza dell' HPV in leucociti CD45 nel liquido seminale dei pazienti infetti. Il virus è stato rilevato anche in una sottopopolazione molto limitata di leucociti circolanti. Sebbene sia

noto un tropismo quasi esclusivo di questo virus per le cellule epiteliali (110), alcuni autori hanno descritto una diffusione in circolo sia da tumori che da siti infetti (92,111). Pao et al., 1991, per primi hanno riportato la presenza di diversi tipi di HPV (6,11,16 e 18) in cellule mononucleate di sangue periferico in pazienti donne affette da infezione da HPV nel tratto genitourinario (111). Inoltre in un recente studio condotto su pazienti HIV positivi, 11 dei 57 campioni di sangue raccolti erano positivi per il DNA virale (95). Questi autori hanno ipotizzato che il genoma dell'HPV rilevato nei campioni positivi sia in forma episomale, anche se era presente un ridotto numero di copie di DNA. In un altro studio che ha considerato un gruppo sano di donatori di sangue australiani, la presenza del DNA virale nei leucociti periferici è stata riscontrata in circa l'8 % dei soggetti (93). Una spiegazione alla presenza dell'HPV in circolo può essere data dalla risposta immunitaria. Infatti, le infezioni virali locali e sistemiche sono controllati da meccanismi dell'immunità innata e adattativa, mediante attivazione sia della risposta umorale, che impedisce la ricomparsa della malattia (112), sia di quella cellulo-mediata. In particolare durante la risposta cellulo-mediata, le cellule NK e le cellule NK-T CD1d -limitate (cellule iNKT) rappresentano le principali popolazioni di cellule del sistema immunitario innato responsabili dell'eliminazione dell'infezione. Le cellule NK esprimono costitutivamente IFN γ , granzima e perforina. Questi sono "innescati" per attivare una risposta immunitaria rilevando una diminuita espressione di MHC -I sulle cellule infettate. Nel caso dell'HPV tale riduzione d'espressione è causata dall'oncoproteina virale E7 che si lega a siti specifici di presentazione e della via di presentazione dell'MHC-I.(113). Parallelamente, l'attivazione delle cellule presentanti

l'antigene (APC) e la successiva presentazione dell'antigene nei linfonodi drenanti è necessaria per l'attivazione di una risposta adattativa primaria ad un agente infettante. Per quanto riguarda l'HPV, le APC locali competenti sono le cellule del Langherhans dell'epidermide, le cellule dendritiche presenti nel derma, e occasionalmente i linfociti B CD20 (114-116). Dati ottenuti da modelli animali suggeriscono che le APC legano le VLP virali mediante il recettore Fc γ RIII (117), degradano l'antigene grazie al proteosoma e lo ingloba nelle MHC II presenti sulla superficie cellulare. Successivamente, le APC innescano una risposta adattativa mediata dalle cellule T CD4 e CD8 (117, 118), in parte mediante il rilascio di una serie di citochine infiammatorie come l'interleuchina 1 β , interleuchina 12, TNF α , e interleuchina6 (119). In questo studio abbiamo documentato la presenza di markers dell'HPV in una sottopopolazione di leucociti nel liquido seminale di soggetti infetti. Oltre al DNA abbiamo rilevato anche la presenza delle proteine virali L1 ed E6. In particolare, le cellule positive erano linfociti B CD20 e NK CD56, due popolazioni di leucociti solitamente reclutati durante la risposta all'infezione virale. Inoltre, nel sangue periferico del 25% di pazienti è stata riscontrata la presenza di cellule HPV positive, dato questo ulteriormente confermato mediante PCR. In accordo con i risultati osservati nel liquido seminale, il DNA e le proteine virali nel sangue sono stati principalmente associati alle cellule CD20 e CD56. E' plausibile che il ritrovamento del DNA e della proteina L1 sia dovuto alla captazione endocitica dei virioni, dato che essi sono per lo più osservati in modo puntiforme nel citoplasma. Tuttavia, se fosse solo un fenomeno di endocitosi del virione, non si spiegherebbe la rilevazione della proteina E6, ed è altamente improbabile che il segnale osservato di E6

sia un artefatto dal momento che si è riscontrato solo nelle cellule positive al DNA virale. Queste evidenze suggeriscono che le NK e i linfociti B rappresentano possibili bersagli dell'HPV, come riportato in studi precedenti (119-121). Infatti, da un lato Renoux et al. (120) da studi in vitro hanno dimostrato che l'attività citotossica e la produzione di citochine da parte di cellule NK sembrano connesse alla rapida entrata delle VLP in queste cellule mediante macropinosi. Poiché il blocco dei CD16 inibisce questo processo, gli autori hanno concluso che i CD16 siano necessari per l'internalizzazione delle VLP (119), anche se non è ancora stato dimostrato un ruolo dei CD16 come recettori primari nell'infezione da HPV. Dall'altro lato, l'abilità dei linfociti B nella captazione dell'HPV è stata dimostrata da altri autori (121). Inoltre questa osservazione è supportata dal fatto che i proteoglicani, noti per rappresentare il recettore primario dell'HPV, sono espresse dai linfociti B e sono un requisito per la maturazione, la differenziazione ed il funzionamento normale delle cellule (121). È chiaro questo aspetto deve essere chiarito da ulteriori studi. È stato ipotizzato che l'HPV nelle cellule polimorfo nucleate possa essere coinvolto nella trasmissione verticale del virus, a seguito del riscontro del DNA virale in cellule riproduttive e placentari, nonché in soggetti vergini, infanti e bambini (122, 123). Poiché è stato rilevato il DNA nel liquido amniotico (123), nella placenta e nel cordone ombelicale (30), è stata ipotizzata una via ematica di diffusione dell'infezione al tessuto corionico e placentare e successivamente alle cellule amniotiche con possibile ingestione da parte del feto (122, 123). Dal momento che sporadiche malformazioni cerebrali fetali (es. displasie) possono essere rilevate già a 24 settimane di gestazione (124), gli autori hanno ipotizzato una

diffusione transplacentare dell'HPV 16 come meccanismo d'ingresso nel cervello durante lo sviluppo corticale fetale iniziale, anche in assenza di un'infezione clinica conclamata. È interessante notare che l'espressione di proteine virali dell'HPV16 è stata molto recentemente riportata in pazienti affetti da displasia focale corticale di tipo IIB (FCDIIB)(125) . In particolare la proteina E6 è stata fortemente espressa in campioni di corteccia cerebrale di tutti i pazienti FCDIIB esaminati, ed in particolare era localizzata nel citoplasma delle cellule a “palloncino” (BC). La stessa proteina non è stata rilevata in regioni senza BC o in campioni di tessuto di controllo. Inoltre, l'espressione di E6 nelle BC ha mostrato una forte associazione con le componenti del bersaglio del complesso 1 della via di segnalazione della rapamicina nei mammiferi, la cui anomala attivazione è legata all'eziologia delFCDIIB (126). Queste osservazioni pongono la questione su quale sia il significato dei markers dell'HPV presenti nei leucociti circolanti, e non è chiaro se rappresentino il risultato dell'immunità cellulo-mediata o un processo di diffusione del virale. Oltre al basso numero di pazienti arruolati, il punto di debolezza principale di questo studio è rappresentato dalla percentuale estremamente bassa di leucociti positivi recuperati nel liquido seminale e nel sangue. Questo limita la nostra capacità di isolare i leucociti infetti e di valutare ulteriormente la loro infettività. Il meccanismo mediante cui il virus infetta i leucociti circolanti rimane una questione aperta. Inoltre, la ricerca del DNA virale sul sangue periferico eseguita mediante INNO LiPA non era in grado di confermare i risultati ottenuti con la FISH e la PCR. Una possibile spiegazione di questa discrepanza potrebbe risiedere nella differente sensibilità delle metodologie. Considerando tutte le problematiche affrontate appare

evidente come quest'infezione rappresenti un problema di coppia e come tale abbiamo voluto affrontarlo in questa ultima sezione. Abbiamo preso in considerazione coppie eterosessuali con entrambi i partner positivi per HPV a livello genitale al fine di fare luce sui siti d'infezione più colpiti nell'uomo, sulla concordanza di genotipi tra i partner e sulla prevalenza dell'HPV nel cavo orale. Il principale sito d'infezione genitale nel maschio da noi riscontrato è il solco balano-prepuziale, dato questo che è in accordo con precedenti studi (127) che riportano che il ritrovamento in tale sito nei maschi infetti supera il 90%. Indipendentemente dal sito, i genotipi più frequentemente riscontrati sono stati l'HPV 6, HPV 11 e HPV16. Inoltre l'HPV 6 e l'HPV 11 erano i genotipi più frequentemente associati a lesioni condiloma tose. Nel nostro studio, la concordanza dei genotipi tra i partner era del 69.4%, più alta rispetto ad altri studi che riportano una concordanza variabile dal 31.8% al 65% (127). Una possibile spiegazione che potrebbe in parte giustificare i nostri diversi risultati è data dal fatto che tutti i campioni dei maschi e delle donne sono stati trattati nello stesso modo e testati nelle medesime condizioni. D'altra parte, per l'incompleta concordanza sono state formulate varie ipotesi (127, 128): diversa suscettibilità al virus e condizione immunitaria, variabile controllo ed espressione dell'infezione, fattori igienici, abitudini sessuali e diverse condizioni di campionamento penieno e cervicale. Molti studi hanno stabilito una relazione casuale tra l'infezione da HPV e lo sviluppo del cancro orofaringeo (129). Circa il 20% di questi tumori sono correlati all'HPV e recenti indagini hanno messo in luce un drammatico incremento di tali neoplasie negli ultimi 20 anni (130), perciò abbiamo preso in considerazione anche questo aspetto. Un recente studio

epidemiologico (131) ha riportato una prevalenza del 6.9% dell'infezione orale da HPV tra maschi e femmine tra i 14 e i 69 anni negli Stati Uniti, e una prevalenza minore (1.2%) è stata documentata a livello della mucosa orale nella popolazione del nord Italia (132). Nel presente studio abbiamo riscontrato il 22.7% d'infezione orale nelle coppie che hanno dichiarato di praticare sesso orale con una maggior prevalenza nelle donne rispetto ai maschi. Ad oggi non è presente alcun trattamento efficace per trattare l'infezione da HPV ed è stato suggerito che alcuni siti anatomici possano agire come serbatoio per il virus, in grado di favorire la persistenza a lungo termine dell'HPV (133). In questo studio, abbiamo confrontato il trend d'infezione genitale da HPV in 24 mesi di follow-up in coppie senza counseling e in coppie alle quali erano stati illustrati i fattori di rischio e forniti suggerimenti sull'evitare condizioni predisponenti o favorenti l'infezione. E' emerso che femmine e maschi che avevano ricevuto il counseling, andassero incontro ad una più rapida eliminazione dell'infezione e anche il numero dei siti infetti risultava significativamente più basso in quel gruppo di pazienti. Infatti, dopo 12 mesi nessuna donna presentava un Pap test positivo, e nessun uomo aveva più di due siti infetti. Inoltre, nei maschi di quel gruppo l'eliminazione del virus dal liquido seminale è risultata più veloce e la percentuale di spermatozoi infetti si è ridotta maggiormente durante il periodo di osservazione. Infine, al termine del follow-up, abbiamo osservato una completa eliminazione dell'infezione solo nel gruppo che aveva ricevuto il counseling. Questo studio ha confermato l'elevata prevalenza dell'infezione da HPV nei maschi con partner positiva e una significativa presenza dell'HPV nella cavità orale. Inoltre, i nostri dati dimostrano per la prima volta che un counseling mirato

rivolto ai soggetti che presentano l'infezione è in grado di modificare in modo significativo il corso e la velocità di eliminazione del virus. Sebbene ulteriori studi e casistiche più ampie siano necessari per confermare i nostri risultati, noi suggeriamo fortemente di ricercare l'infezione nei partner di donne positive all'HPV, di ricercare il virus a livello orofaringeo e di fornire un counseling quanto più mirato alle coppie infette per favorire la guarigione. Inoltre questi risultati suggeriscono la ricerca dell'infezione non solo nelle categorie a rischio ma anche in soggetti asintomatici che presentano una positività idiopatica agli anticorpi antispermatozoo e, qualora l'infezione sia presente in campioni di liquido seminale di soggetti che si sottopongono a procedure di procreazione medicalmente assistita, se non è possibile attendere la clearance di tale infezione dovrebbe essere preso in considerazione un trattamento enzimatico dei campioni al fine di eliminare il virus e agire in sicurezza. Un capitolo a parte lo merita la presenza dell'HPV nei leucociti circolanti, soprattutto per individuare il significato sperimentale e clinico di tale scoperta.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Centola GM. Determination of male infertility: is the 2010 WHO reference range helpful or confusing? *Fertil Steril*. 2012 Dec;98(6):1416-7.
2. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Evidence-based Clinical Guidelines. Guideline Summary No. 2: The initial investigation and management of the infertile couple. *BJU Int*. 1999;83:636–640.
3. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod*. 1991;6:811-816.
4. De Kretser DM. Male infertility. *Lancet*. 1997;349:787–790.
5. Main KM, Skakkebaek NE, Toppari J. Cryptorchidism as part of the testicular dysgenesis syndrome: the environmental connection. *Endocr Dev*. 2009;14:167-73.
6. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2006 May;12(5):630-3.
7. Jacobs LA, Vaughn DJ. Hypogonadism and infertility in testicular cancer survivors. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012 Apr;10(4):558-63.
8. Meldrum DR, Gambone JC, Morris MA, Esposito K, Giugliano D, Ignarro LJ. Lifestyle and metabolic approaches to maximizing erectile and vascular health. *Int J Impot Res*. 2012 Mar-Apr;24(2):61-8.
9. Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Favareto AP, Nascimento AF, Cicogna AC, Kempinas WD. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011 Mar 11;9:32.
10. Homan G, Litt J, Norman RJ. The FAST study: Fertility ASsessment and advice Targeting lifestyle choices and behaviours: a pilot study. *Hum Reprod*. 2012 Aug;27(8):2396-404.

11. Foresta C, Garolla A, Frigo AC, Carraro U, Isidori AM, Lenzi A, Ferlin A. Anthropometric, penile and testis measures in post-pubertal Italian males. *J Endocrinol Invest.* 2013 ;36(5):287-92.
12. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013 Jul 16;11:66.
13. Mawyer JD, Cavinder CA, Vogelsang MM, Sigler DH, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Arnold CE, Teague S, Gordon RK. Thermoregulation of the testicle in response to exercise and subsequent effects on semen characteristics of stallions. *J Anim Sci.* 2012 ;90:2532-9.
14. Thundathil JC, Rajamanickam GD, Kastelic JP, Newton LD. The effects of increased testicular temperature on testis-specific isoform of Na⁺/K⁺ -ATPase in sperm and its role in spermatogenesis and sperm function. *Reprod Domest Anim.* 2012 Aug;47 Suppl 4:170-7.
15. Weidner W, Pilatz A, Diemer T, Schuppe HC, Ruzs A, Wagenlehner F. Male urogenital infections: impact of infection and inflammation on ejaculate parameters. *World J Urol.* 2013 Aug;31(4):717-23.
16. Ochsendorf F.R. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia* 2008 40, 72-75.
17. Weidner W. *et al.* Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum. Reprod. Update.* 1999 5, 421-432.
18. La Vignera S. *et al.* Male accessory gland infection and sperm parameters (review). *Int. J. Androl.* 2011 34, e330-347.
19. Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril.* 2007 May;87(5):1087-97.
20. Karinen L, Pouta A, Hartikainen AL, Bloigu A, Paldanius M, Leinonen M, Saikku P, Järvelin MR. Association between Chlamydia trachomatis antibodies and subfertility

in the Northern Finland Birth Cohort 1966 (NFBC 1966), at the age of 31 years. *Epidemiol Infect.* 2004 Oct;132(5):977-84.

21. Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2003 Oct;18(10):2103-9.

22. Soper D. Trichomoniasis: under control or undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Jan;190(1):281-90.

23. Lorusso F., *et al.* Impact of chronic viral diseases on semen parameters. *Andrologia* 2010 42, 121-126.

24. Englert Y., *et al.* Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases. *Hum. Reprod. Update.* 2004 10, 149-162.

25. Ali B.A., *et al.* Expression of hepatitis B virus genes in early embryonic cells originated from hamster ova and human spermatozoa transfected with the complete viral genome. *Asian J. Androl.* 2006 8, 273-279.

26. Debono E, *et al.* Absence of hepatitis C genome in semen of infected men by polymerase chain reaction, branched DNA and in situ hybridization. *Liver.* 2000 20, 257-61.

27. Levy R., *et al.* Pregnancy after safe IVF with hepatitis C virus RNA-positive sperm. *Hum. Reprod.* 2002 17, 2650-2653.

28. Ceballos A, *et al.* Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells. *J Exp Med.* 2009 206, 2717-2133.

29. Dondero F, *et al.* Semen analysis in HIV seropositive men and in subjects at high risk for HIV infection. *Hum Reprod.* 1996 11, 765-768.

30. Melo MA, *et al.* Human immunodeficiency type-1 virus (HIV-1) infection in serodiscordant couples (SDCs) does not have an impact on embryo quality or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome. *Fertil Steril.* 2008 89, 141-150.

31. Neofytou E, *et al.* Prevalence of human herpes virus types 1-7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. *Fertil Steril.* 2009 91, 2487-2494.

32. Pallier C, *et al.* Herpesvirus, cytomegalovirus, human sperm and assisted fertilization. *Hum Reprod.* 2002 17, 1281-1287.
33. Eggert-Kruse W, *et al.* Cytomegalovirus (CMV) infection--related to male and/or female infertility factors? *Fertil Steril.* 2009 91, 67-82.
34. Bresson JL, *et al.* Risk of cytomegalovirus transmission by cryopreserved semen: A study of 635 semen samples from 231 donors. *Hum Reprod.* 2003 18, 1881-1886.
35. Naumenko VA, *et al.* Detection of human cytomegalovirus in motile spermatozoa and spermatogenic cells in testis organotypic culture. *Herpesviridae.* 2011 2, 7.
36. Rohde V., *et al.* Detection of adeno-associated virus in human semen: does viral infection play a role in the pathogenesis of male infertility? *Fertil. Steril.* 1999 72, 814–816.
37. Tobiasch E., *et al.* Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J. Med. Virol.* 1994 44, 215–22.
38. Arechavaleta-Velasco F., *et al.* Adeno-associated virus-2 (AAV-2) causes trophoblast dysfunction, and placental AAV-2 infection is associated with preeclampsia. *Am J Pathol* 2006;168:1951–9.
39. M. Stanley, Prophylactic HPV vaccines: prospects for eliminating ano-genital cancer. *British Journal of Cancer* 2007;96:1320-1323
40. J. Doorbar, Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Diseases Markers* 2007;23:297-314
41. Nyitray A. Anal cancer and human papillomaviruses in heterosexual men. *Curr Oncol* 2008;15:204-5.
42. Partridge JM, Hughes JP, Feng Q, Winer RL, Weaver BA, Xi LF, Stern ME, Lee SK, O'Reilly SF, Hawes SE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection in men: incidence and risk factors in a cohort of university students. *J Infect Dis.* 2007 Oct 15;196(8):1128-36.
43. Oh JK, Franceschi S, Kim BK, Kim JY, Ju YH, Hong EK, Chang YC, Rha SH, Kim HH, Kim JH, Kim CY, Shin HR. Prevalence of human papillomavirus and Chlamydia

trachomatis infection among women attending cervical cancer screening in the Republic of Korea. *Eur J Cancer Prev.* 2009 Feb;18(1):56-61.

44. Nielson CM, Harris RB, Dunne EF, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Flores R, Markowitz LE, Giuliano AR. Risk factors for anogenital human papillomavirus infection in men. *J Infect Dis.* 2007 Oct 15;196(8):1137-45.

45. Sanclemente G, Herrera S, Tyring SK, Rady PL, Zuleta JJ, Correa LA, He Q, Wolff JC. Human papillomavirus (HPV) viral load and HPV type in the clinical outcome of HIV-positive patients treated with imiquimod for anogenital warts and anal intraepithelial neoplasia. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007 Sep;21(8):1054-60.

46. Giraldo PC, Eleutério J Jr, Cavalcante DI, Gonçalves AK, Romão JA, Eleutério RM. The role of high-risk HPV-DNA testing in the male sexual partners of women with HPV-induced lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008 Mar;137(1):88-91.

47. A.-B. Moscicki, HPV infections in adolescents. *Disease Markers* 2007;23:229-234

48. Mbulawa ZZ, Coetzee D, Marais DJ, Kamupira M, Zwane E, Allan B, Constant D, Moodley JR, Hoffman M, Williamson AL. Genital human papillomavirus prevalence and human papillomavirus concordance in heterosexual couples are positively associated with human immunodeficiency virus coinfection. *J Infect Dis.* 2009 May 15;199(10):1514-24.

49. D. Jenkins, Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Disease Markers* 2007;23:199-212.

50. Bosch FX, de Sanjosé S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers.* 2007;23(4):213-27.

51. Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *J Infect Dis.* 2006 Oct 15;194(8):1044-57.

52. Nielson CM, Flores R, Harris RB, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, Markowitz LE, Giuliano AR. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Jun;16(6):1107-14.

53. Baldwin SB, Wallace DR, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Vaught LC, Giuliano AR. Condom use and other factors affecting penile human papillomavirus detection in men attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis.* 2004 Oct;31(10):601-7.
54. Weaver BA, Feng Q, Holmes KK, Kiviat N, Lee SK, Meyer C, Stern M, Koutsky LA. Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human papillomavirus DNA in men. *J Infect Dis.* 2004 Feb 15;189(4):677-85.
55. Svare EI, Kjaer SK, Worm AM, Osterlind A, Meijer CJ, van den Brule AJ. Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. *Sex Transm Infect.* 2002 Jun;78(3):215-8.
56. Shin HR, Franceschi S, Vaccarella S, Roh JW, Ju YH, Oh JK, Kong HJ, Rha SH, Jung SI, Kim JI, Jung KY, van Doorn LJ, Quint W. Prevalence and determinants of genital infection with papillomavirus, in female and male university students in Busan, South Korea. *J Infect Dis.* 2004 Aug 1;190(3):468-76.
57. Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril.* 2010 Feb;93(3):802-6.
58. Hoy T, Singhal PK, Willey VJ, Insinga RP. Assessing incidence and economic burden of genital warts with data from a US commercially insured population. *Curr Med Res Opin.* 2009 Oct;25(10):2343-51.
59. Kruse AJ, Baak JP, Helliesen T, Kjellevoid KH, Robboy SJ. Prognostic value and reproducibility of koilocytosis in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 2003 Jul;22(3):236-9.
60. Palefsky JM. HPV infection in men. *Dis Markers* 2007;23:261-72.
61. Sen S, Sharma A, Panda A. Immunohistochemical localization of human papilloma virus in conjunctival neoplasias: a retrospective study. *Indian J Ophthalmol* 2007;55; 361-3.

62. Shah KV, Westra WH. Genital HPVs in the aerodigestive tract: etiologic association with a subset of oropharyngeal/tonsillar cancers and with recurrent respiratory papillomatosis. *Dis Markers* 2007;23:235-45.
63. Richardson LC, Neri AJ, Tai E, Glenn JD. (2012) Testicular cancer: a narrative review of the role of socioeconomic position from risk to survivorship. *Urol Oncol*. 30, 95-101.
64. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2012) Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 62, 10-29.
65. Viatori M. (2012) Testicular cancer. *Semin Oncol Nurs*. 28, 180-9.
66. Jacobs LA, Vaughn DJ.(2012) Hypogonadism and infertility in testicular cancer survivors. *J Natl Compr Canc Netw*. 10, 558-63.
67. Bieber AM, Marcon L, Hales BF, Robaire B. (2006) Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *J Androl*. 27, 189-200.
68. Schrader M, Heicappell R, Müller M, Straub B, Miller K. (2001) Impact of chemotherapy on male fertility. *Onkologie*. 24, 326-30.
69. Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, Ghezzi M, Carraro U, Ferlin A, Foresta C. Testicular cancer and HPV semen infection. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012 Dec 21;3:172.
70. Flores R, Beibei L, Nielson C *et al*. Correlates of human papillomavirus viral load with infection site in asymptomatic men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3573-6.
71. Rintala MA, Grénman SE, Pöllänen PP *et al*. Detection of high-risk HPV DNA in semen and its association with the quality of semen. *Int J STD AIDS* 2004;15:740-3.
72. Lai YM, Lee JF, Huang HY *et al*. The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility. *Fertil Steril* 1997;67:1152.
73. Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G, Garolla A. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1723-7.

74. Connelly DA, Chan PJ, Patton WC, King A. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 May;184(6):1068-70.
75. Olatunbosun O, Deneer H, Pierson R. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol.* 2001 Mar;97(3):357-60.
76. Lai YM, Yang FP, Pao CC. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fertil Steril.* 1996 May;65(5):1026-30.
77. Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, Ferlin A. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One.* 2011 Mar 7;6(3):e15036.
78. Horvath CAJ, Boulet GAV, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JPJ (2010) Mechanism of cell entry by human papillomavirus: an overview. *Virology J* 7: 11-17.
79. Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32S: S7-S15.
80. Sapp M, Bienkowska-Haba M (2009) Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J* 276: 7206-7216.
81. Letian T, Tianyu Z (2010) Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. *Virology J* 7: 2-8.
82. Joyce JG, et al (1999) The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274: 5810-5822.
83. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M (2001) Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75: 1565-1570.
84. Combata AL, et al (2001) Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol Lett* 204: 183-188.
85. Drobni P, Mistry N, McMillan N, Evander M (2003) Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester labelled papillomavirus virus-like particles fluoresce after

- internalization and interact with heparan sulphate for binding and entry. *Virology* 310: 163-172.
86. Shaft-Keramat S, et al (2003) Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomavirus. *J Virol* 77: 13125-13135.
87. Liu J, Thorp SC (2002) Cell surface heparan sulfate and its role in assisting viral infections. *Med Res Rev* 22: 1-25.
88. Gandini L *et al.* Effect of chemo- or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. *Human Reproduction* 2006; 21: 2882-2889.
89. De Mas P *et al.* Increased aneuploidy in spermatozoa from testicular tumour patients after chemotherapy with cisplatin, etoposide and bleomycin. *Human Reproduction* 2001; 16: 1204-1208.
90. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology Guidelines for gamete and embryo donation: a Practice Committee report. *Fertility and Sterility* 2008; 90: 30-44.
91. Foresta C, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Garolla A. Semen washing procedures do not eliminate human papilloma virus sperm infection in infertile patients. *Fertil Steril.* 2011 Nov;96(5):1077-82.
92. Kay P, Allan B, Denny L, Hoffman M, Williamson AL: Detection of HPV 16 and HPV 18 DNA in the blood of patients with cervical cancer. *J Med Virol* 2005,75:435-439.
93. Chen AC, Keleher A, Kedda MA, Spurdle AB, McMillan NA, Antonsson A: Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors. *J Med Virol* 2009,81:1792-1796.
94. Roperto S, Comazzi S, Ciusani E, Paolini F, Borzacchiello G, Esposito I, Lucà R, Russo V, Urraro C, Venuti A, Roperto F: PBMCs are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. *J Gen Virol* 2011,92:1787-1794.
95. Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM: Could human papillomaviruses be spread through blood? *J Clin Microbiol* 2005,43:5428-5434.

96. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP: Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virol J* 2009,6:83.
97. Hommel G, Bretz F, Maurer W. Multiple hypotheses testing based on ordered p values--a historical survey with applications to medical research. *J Biopharm Stat.* 2011;21: 595-609.
98. Saunders AE, Johnson P: Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell Signal* 2010,22:339-348.
99. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7: 11-22.
100. Boulet G, Horvath C, Broeck Vanden D, Saheball S, Bogers J (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogens. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 2006-2011.
101. Centre for Disease Control and Prevention (2006) STD-prevention counseling practices and human papillomavirus opinions among clinicians with adolescent patients – United States. *Morb Mortal Wkly Rep* 55: 1118-1120.
102. Lowy D, Kirnbauer R, Schiller J. Genital human papillomavirus infection (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2436-2440.
103. Koutsky L (1997) Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 102:3-8
104. Giuliano AR, et al (2008) Epidemiology of Human Papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine* 26S: K17-K28.
105. Kaspersen MD, Larsen PB, Ingerslev HJ, Fedder J, Petersen GB, Bonde J, Höllsberg P. Identification of Multiple HPV Types on Spermatozoa from Human Sperm Donors. *PLoS One.* 2011 Mar 29;6(3).
106. Foresta C, Ferlin A, Bertoldo A, Patassini C, Zuccarello D, Garolla A. Human papilloma virus in the sperm cryobank: an emerging problem? *Int J Androl.* 2010 May 31.
107. Henneberg AA, Patton WC, Jacobson JD, Chan PJ. Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific. *J Assist Reprod Genet.* 2006 Jun;23(6):255-9.

108. Hermonat PL, Han L, Wendel PJ, Quirk JG, Stern S, Lowery CL, Rechlin TM. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes*. 1997;14(1):13-7.
109. Perino A, Giovannelli L, Schillaci R et al. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril*. 2011 Apr95(5):1845-8.
110. Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R: Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* 2003,77:13125-13135.
111. Pao CC, Lin SS, Lin CY, Maa JS, Lai CH, Hsieh TT. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Pathol*. 1991,95:540-546.
112. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA: Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 2000,181:1911-1919.
113. Li H, Ou X, Xiong J, Wang T: HPV16E7 mediates HADC chromatin repression and downregulation of MHC class I genes in HPV16 tumorigenic cells through interaction with an MHC class I promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:1315-21.
114. Foster CA, Yokozeki H, Rappersberger K, Koning F, Volc-Platzer B, Rieger A, Coligan JE, Wolff K, Stingl G: Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *J Exp Med* 1990,171:997-1013.
115. Zentz C, Wiesner M, Man S, Frankenberger B, Wollenberg B, Hillemanns P, Zeidler R, Hammerschmidt W, Moosmann A: Activated B cells mediate efficient expansion of rare antigen-specific T cells. *Hum Immunol* 2007,68:75-85.
116. Da Silva DM, Fausch SC, Verbeek JS, Kast WM: Uptake of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells is mediated by Fc gamma receptors and contributes to acquisition of T cell immunity. *J Immunol* 2007,178:7587-7597.

117. Nicholls PK, Moore PF, Anderson DM, Moore RA, Parry NR: Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Virology* 2001,283:31-39.
118. Wilgenburg BJ, Budgeon LR, Lang CM, Griffith JW, Christensen ND: Characterization of immune responses during regression of rabbit oral papillomavirus infections. *Comp Med* 2005,55: 431-439.
119. Lenz P, Thompson CD, Day PM, Bacot SM, Lowy DR, Schiller JT: Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells. *Clin Immunol* 2003,106:231-237.
120. Renoux VM, Bisig B, Langers I, Dortu E, Clémenceau B, Thiry M, Deroanne C, Colige A, Boniver J, Delvenne P, Jacobs N: Human papillomavirus entry into NK cells requires CD16 expression and triggers cytotoxic activity and cytokine secretion. *Eur J Immunol* 2011,41:3240-3252.
121. Reijmers RM, Spaargaren M, Pals ST: Heparan sulfate proteoglycans in the control of B cell development and the pathogenesis of multiple myeloma. *FEBS J* 2013,280:2180-2193.
122. Syrjanen S: Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS* 2010,118:494-450.
123. Armbruster-Moraes E, Ioshimoto LM, Leão E, Zugaib M: Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. *Gynecol Oncol* 1994,54:152–158.
124. Righini A, Parazzini C, Doneda C, Avagliano L, Arrigoni F, Rustico M, Consonni D, Re TJ, Bulfamante G, Triulzi F: Early formative stage of human focal cortical gyration anomalies: fetal MRI. *AJR Am J Roentgenol* 2012,198:439–447.
125. Chen J, Tsai V, Parker WE, Aronica E, Baybis M, Crino PB: Detection of human papillomavirus in human focal cortical dysplasia type IIB. *Ann Neurol* 2012,72:881-892.
126. Crino PB: mTOR: a pathogenic signaling pathway in developmental brain malformations. *Trends Mol Med* 2011,17:734–742.

127. Castellsagué X, et al. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *J Infect Dis.* 1997;176: 353-61.
128. Widdice LE, et al. Human papillomavirus concordance in heterosexual couples. *J Adolesc Health.* 2010;47: 151-9.
129. Gillison ML, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92: 709-20.
130. Chaturvedi AK. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol.* 2012;6 Suppl 1:S16-24.
131. Gillison ML, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA.* 2012;307: 693-703.
132. Migaldi M, et al. Low prevalence of human papilloma virus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. *J Oral Pathol Med.* 2012;41: 16-20.
133. Koliopoulos G, et al. Predictors and Clinical Implications of HPV Reservoir Districts for Genital Tract Disease. *Curr Pharm Des.* 2012;Epub ahead of print.