



Master di II livello in “Drug Design and Synthesis”

## **HPV ED INFERTILITA' MASCHILE:**

**Rilevazione delle infezioni da HPV ad alto rischio su liquido seminale tramite PCR real-time e correlazione con astenozoospermia e oligoastenozoospermia**

Relatore  
Prof.ssa Elena Dreassi

Candidata  
Alice Di Domenico

Correlatore  
Dott. Michele Calcinari

---

Anno Accademico 2018-2019

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
1.1 Aspetti generali	5
1.2 Epidemiologia	7
1.3 Classificazione, morfologia, genoma e ciclo replicativo del Papillomavirus umano	10
1.3.1 Classificazione	10
1.3.2 Morfologia e genoma	13
1.3.3 Ciclo replicativo, geni virali e patogenesi	16
1.4 Manifestazioni cliniche	19
1.4.1 Manifestazioni cliniche comuni	19
1.4.2 Problemi di infertilità : HPV ed infertilità maschile	22
1.5 Diagnosi dell' infezione da HPV	25
1.5.1 Indagine citologica e microscopica	25
1.5.2 Indagine biomolecolare	26
1.6 Terapia e prevenzione dell' HPV e delle malattia ad esso correlate	28
1.6.1 Terapia delle lesioni	28
1.6.2 Prevenzione dell' infezione	29
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>35</b>
3.1 Pazienti arruolati nello studio	36
3.2 Campioni	36
3.3 Estrazione e purificazione del DNA: kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione con il sistema QIASymphony SP (QIAGEN)	37
3.3.1 Estrazione e purificazione del DNA	38
3.4 Allestimento delle reazioni di amplificazione (Real-time PCR) tramite un funzionamento integrato del sistema QIASymphony SP/AS	40
3.4.1 GeneNav™ HPV One qPCR Kit (GenomeMe- CANADA)	41
3.4.1.1 Specificità, sensibilità e riproducibilità del Kit	42
3.5 Amplificazione del genoma virale di HPV tramite Real-time PCR (Rotor-Gene Q Mdx 5plex HRM)	43
3.6 Analisi dei risultati dell' amplificazione	43
<b>4. RISULTATI</b>	<b>44</b>

<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>50</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>55</b>

# **1. INTRODUZIONE**

## 1.1 Aspetti generali

Il Papilloma virus umano (HPV) è un' infezione a trasmissione sessuale comune tra uomini e donne in età riproduttiva in tutto il mondo (Dadashi M. et al., 2017). Attualmente sono stati identificati circa 170 differenti genotipi, che sono stati classificati, a seconda del potenziale oncogenico, a basso rischio o ad alto rischio (Elmi A.A. et al., 2017; Doosti M. et al., 2016). Quelli a basso rischio sono associati a lesioni epiteliali (ad esempio verruche) e, solitamente non causano neoplasie (Doosti M. et al., 2014), mentre quelli ad alto rischio sono strettamente correlati all' insorgenza di gravi tumori sia nelle donne che negli uomini (McBride A.A., 2017).

L' HPV è responsabile di 630.000 casi di tumore l'anno in tutto il mondo: l' 8,6% nelle donne e lo 0,8% negli uomini (De Martel C. et al., 2017).

Le infezioni da HPV hanno mostrato una certa correlazione con diversi effetti avversi nelle funzioni riproduttive (Souho T. et al., 2015; Schiller J.T. et al., 2012). Infatti, studi recenti hanno suggerito che queste infezioni potrebbero andare ad interferire con la fertilità.

I problemi di infertilità sono molto comuni in tutto il mondo e colpiscono circa il 10%-30% delle coppie in età riproduttiva (Datta J. Et al.,2016; Polis C.B. et al., 2017). Una delle cause più comuni sono le malattie sessualmente trasmesse.

Negli ultimi anni, la ricerca sta cercando di determinare il significato dell'HPV come agente eziologico di aborti e infertilità maschile. La letteratura scientifica mostra come le infezioni da HPV sono tre volte più comuni negli aborti spontanei piuttosto che in quelli selettivi (Perino A., 2011). In uno studio clinico, le donne con infezione da HPV cervicale hanno riportato un numero di gravidanze inferiori rispetto alle donne che sono risultate essere negative all' infezione di HPV (Spandorfer S.D. et al., 2006); in un altro studio effettuato da Zacharis K. et al.(2018), si è visto che le infezioni da HPV sono significativamente correlate a problemi di infertilità maschile: hanno un effetto negativo sulla qualità dello sperma (solitamente astenospermia) e, aumentano i livelli di anticorpi antisperma. Inoltre, la presenza del virus nello sperma, si pensa che possa influire sulla reazione acrosomiale e possa ridurre la funzionalità e la capacità dell' acrosoma. Per questo motivo, recentemente, si è posto maggiore interesse sulla prevalenza di HPV tra gli uomini. Studi recenti, effettuati da Foresta C. et al. (2011), hanno riportato che i virioni dell' HPV possono legare la testa degli spermatozoi andandone ad alterare la loro motilità. Questo risultato ha evidenziato una possibile relazione tra l' infezione

da HPV nello sperma e l' astenospermia idiopatica (Foresta C. et al., 2011; Garolla A. et al., 2013; Foresta C. et al., 2015; Caglar G.S. et al., 2018).

Inoltre, sono state evidenziate anche correlazioni tra infezioni da HPV del liquido seminale e una bassa conta spermica (Bezold G. et al., 2007).

Grazie all' elevato numero di studi, effettuati recentemente, è stato possibile considerare l' HPV come un fattore di rischio per l'infertilità maschile (Moghimi M. et al., 2019), sebbene ancora non siano chiari i meccanismi alla base di tale patologia.

## 1.2 Epidemiologia

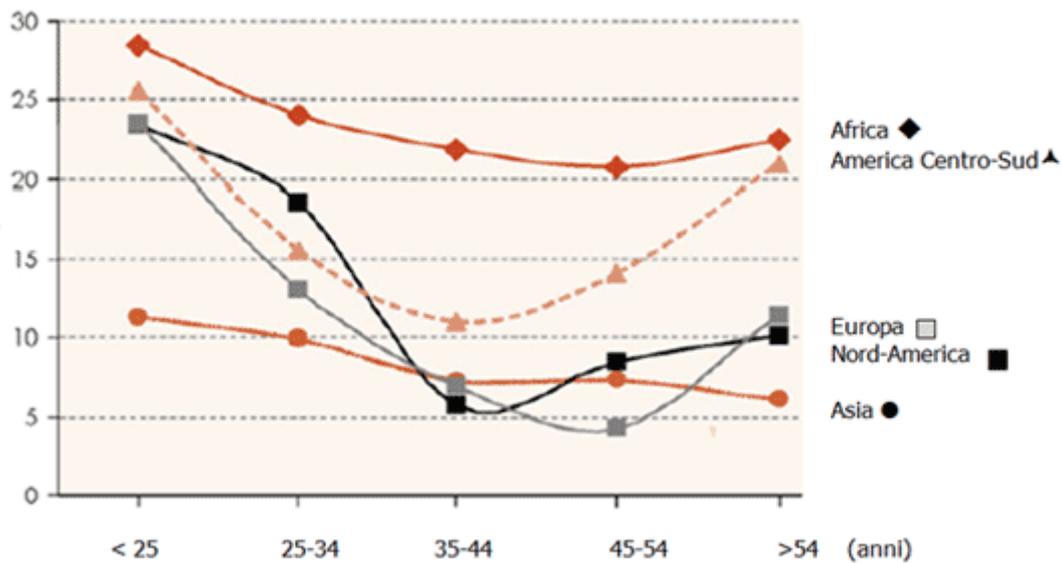
Il Papilloma virus umano (HPV) è una delle infezioni più comuni al mondo trasmesse per via sessuale. Colpisce sia donne che uomini (Bosch et al., 2013).

Considerando entrambi i sessi, la prevalenza dell' infezione è di circa il 40% nella popolazione generale, con alcune variazioni a seconda del genotipo e del sito anatomico d'infezione (Bosch et al., 2013). La conseguenza clinica maggiore di questa infezione è il tumore alla cervice uterina, che rimane uno delle principali cause di morte per tumore sia in giovani donne che in quelle in età avanzata. Bosch et al. (2013) ha segnalato che tra i 12,7 milioni di nuovi tumori stimati nelle donne di tutto il mondo nel 2008, 700.000 sono tumori in siti anatomici associati all' HPV e di questi, 610.000 sono causati dall' HPV. A livello mondiale, gli autori di una meta-analisi, che ha incluso 78 studi pubblicati tra il 1995 e il 2005, hanno stimato una prevalenza dell' HPV in donne con citologia normale pari al 10,4% con prevalenza maggiore nei paesi meno sviluppati. In particolare: in Africa 22%, in America centrale e messico 20%, in America del Nord 11%, in Europa e Asia 8% (De Sanjosè S. et al., 2007). La prevalenza dell' HPV varia con l'età: come mostra la figura 1, in donne con citologia normale, la prevalenza di HPV è maggiore nelle donne con meno di 25 anni (in media 16,9%); oltre questa età, la prevalenza diminuisce. Un secondo picco si ha nella fascia di età 35-44 o 45-54 anni in tutti i continenti eccetto in Asia in cui il tasso di prevalenza diminuisce progressivamente con l' età (Bosch F.X. et al., 2008). Questo secondo picco è stato rilevato anche da studi italiani (Giorgi R.P. et al., 2012).

La prevalenza dell' infezione da HPV nel periodo pre-menopausale non è ancora chiara; alla base di questo andamento potrebbero esserci tre possibili motivazioni:

- nuove infezioni da HPV, dovute a modifiche dello stile di vita;
- riattivazione di infezioni latenti in seguito all'invecchiamento del sistema immunitario;
- un effetto di coorte.

Inoltre, la prevalenza dell' infezione da HPV è maggiore nelle donne con anomalie citologiche ed è più elevata nei casi di cervicocarcinoma e nelle HG-SIL (lesioni di alto grado delle cellule intraepiteliali squamose) rispetto alle LG-SIL (lesioni di basso grado delle cellule intraepiteliali squamose) per cui si registra l' 87%, l' 85% e il 71% rispettivamente (Sanjosè S. et al., 2007).



**Figura 1.** Prevalenza dell' infezione HPV in donne con citologia normale, per età e nazione (Bosch F.X. et al., 2008).

Per quanto riguarda l'infezione da HPV maschile, sono disponibili pochi dati, sebbene negli ultimi anni il problema sia stato notevolmente approfondito. In genere l'infezione maschile da HPV è stata associata a verruche ano-genitali, tumori anali e del pene, carcinomi della testa e del collo e papillomatosi respiratoria ricorrente (Lenzi et al., 2013). Lenzi et al. (2013) ha descritto un'alta prevalenza di HPV, che oscilla tra il 50 e il 70%, nel "corpo" del pene maschile, nel glande / nel solco coronale, nello sperma e nelle regioni scrotali, perianali e anali. Ciò suggerisce un possibile ruolo per i maschi come serbatoi di infezione da HPV. In particolare, gli autori hanno sottolineato il fatto che la prevalenza dell'infezione maschile non differisce in modo significativo tra i gruppi di età come nelle femmine, e la probabilità di acquisire LR-HPV sembra essere molto vicina alla probabilità di contrarre HR-HPV (47,9% per HR vs. 46,6% per LR)(Lenzi et al., 2013). Recentemente, un grande interesse è stato attirato dal rilevamento dell'HPV nel seme maschile, in cui il virus è stato trovato sia nelle cellule esfoliate che negli spermatozoi. Un recente lavoro di Laprise et al. (2014) ha stimato la prevalenza di HPV nello sperma a circa il 10% negli uomini di popolazione generale e persino al 16% negli uomini affetti da infertilità inspiegabile (Laprise et al., 2014). In effetti, recenti evidenze hanno dimostrato una possibile correlazione tra l'infezione da HPV degli spermatozoi e casi di astenozoospermia idiopatica ed infertilità maschile inspiegabile (Chan et al., 1994; Lai et al., 1997; Brossfield et al., 1999; Connelly et al., 2001; Lee et al., 2002; Rintala et al., 2004; Foresta et al., 2010a,b; Foresta et al.,

2011a, b; Gizzo et al., 2014; Garolla et al., 2013, 2012a,b; Schillaci et al., 2013). Dare una stima precisa e puntuale dell'incidenza e della prevalenza dell'infezione nel maschio è abbastanza difficile data la scarsità di studi epidemiologici condotti sugli uomini. Attualmente si stima che fino al 65-70% dei soggetti di sesso maschile contrae un'infezione da uno o più ceppi di HPV (oncogeni e non) durante l'arco della vita con un andamento particolare e non sovrapponibile a quello riportato per il sesso femminile (figura 2)(Pierce Campbell C.M. et al., 2013).

		
Prevalenza globale	Percentualmente più bassa (↓)	Percentualmente più elevata (↑)
Influenza dell'età	Andamento bimodale. <sup>3</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Picco sino ai 25-30 anni</li> <li>• Declino sino all'epoca perimenopausale in cui si osserva un secondo picco</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manca una sostanziale tendenza al declino con l'età</li> <li>• Manca un picco nelle età più giovani</li> </ul>
Acquisizione ceppi oncogeni	Maggiore probabilità per i ceppi oncogeni	Analoga probabilità di contrarre un ceppo oncogeno o non oncogeno
Durata dell'infezione ceppi oncogeni vs. non oncogeni	Maggior durata per i ceppi oncogeni	Analoga durata
Clearance dell'infezione	Più lenta	Rapida

**Figura 2.** Differenze dell' infezione tra HPV tra i sessi (Zuccotti G.V. & Mameli C., Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica, 2013).

## 1.3 Classificazione, morfologia, genoma e ciclo replicativo del Papillomavirus umano

### 1.3.1 Classificazione

I Papillomaviridae rappresentano un ampio gruppo di virus a tropismo epiteliale capaci di infettare mammiferi ed uccelli. Essi sono virus molto diversi tra loro sia per ospite che per tipo e sede di lesione cui sono correlati; per questo motivo la loro classificazione ha richiesto anni di studio e di dibattiti.

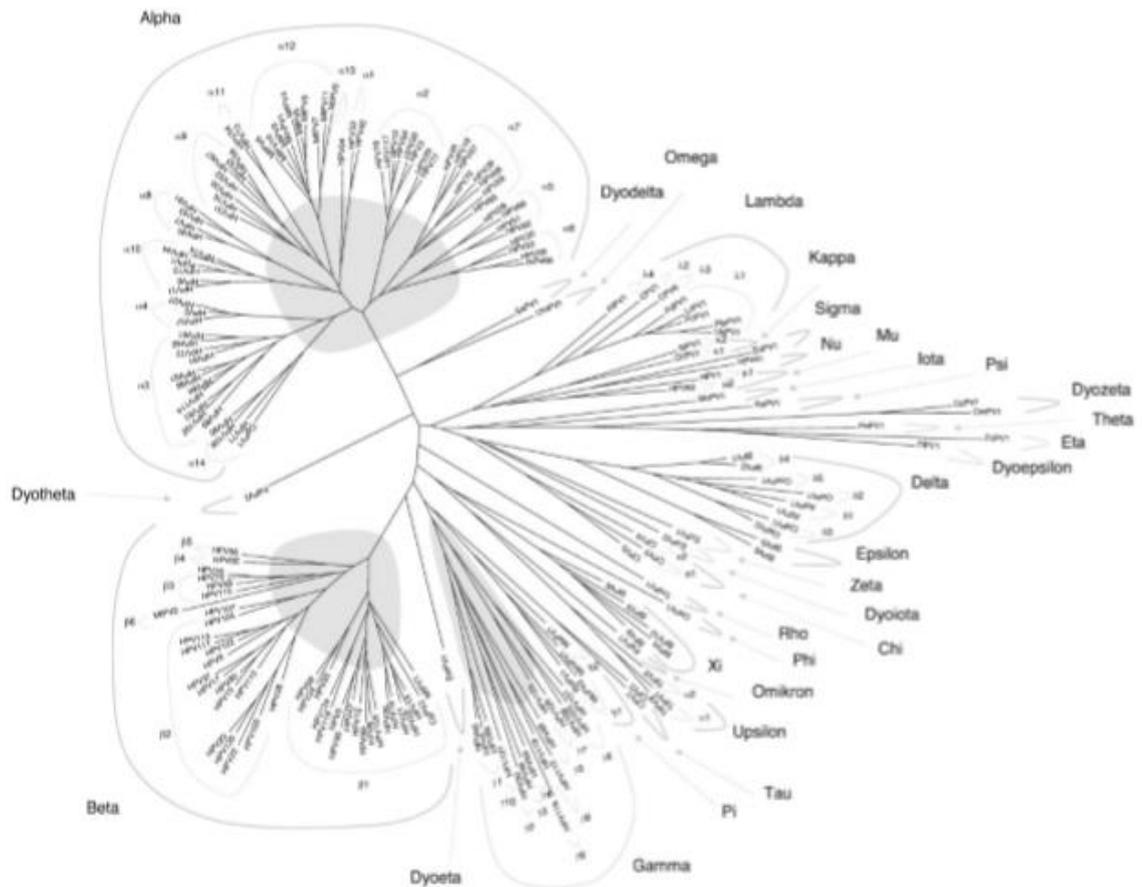
Studi filogenetici attribuiscono a questi virus un'origine molto antica, parallela a quella delle prime specie di vertebrati. Infatti, sembrano aver infettato l'uomo sin dall'origine evolvendosi con esso (Bernard Hu, 1994).

I papillomavirus isolati vengono classificati come "tipi"; la loro classificazione, oltre a basarsi sulla specie da cui è stato isolato il tipo virale, tiene conto soprattutto dell'estensione e del grado di omologia tra i genomi virali. Quest'ultimo viene valutato comparando la sequenza nucleotidica di regioni specifiche del genoma particolarmente conservate tra i vari membri della famiglia; in particolar modo, la classificazione è basata sull'identità della sequenza L1 ORF.

Ogni genere è suddiviso in diverse specie che raggruppano sequenze con una similarità compresa tra il 60% e il 70%; all'interno di ogni specie si trovano i genotipi (o tipi) con una similarità di sequenza tra di loro compresa tra il 71% e l'89%. Si distinguono, fra questi ultimi, i sottotipi, con similarità del 90-98%, e le varianti, che differiscono solo per l'1-2% a livello della sequenza genomica L1 (De Villiers E.M. et al., 2004).

Secondo i criteri adottati dal *Papillomavirus Nomenclature Committe*, per definire un nuovo tipo virale, l'omologia di sequenza dei suoi geni virali deve essere inferiore al 90% rispetto a quelli dei tipi noti; gradi di omologia superiori individuano invece una variante di un tipo noto o di un suo sottotipo (International Papillomavirus Workshop, Quebec 1995).

L'utilizzo di algoritmi filogenetici in grado di comparare sequenze genomiche multiple, ha permesso la suddivisione dei tipi di Papillomavirus in 29 generi (figura 3): dall'*Alphapapillomavirus* al *DyoyotaPapillomavirus*; di questi generi, 5 sono appartenenti ai papillomavirus umani: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*.



**Figura 3.** Albero filogenetico dei 189 tipi di Papillomavirus in base alla comparazione della sequenza L1 ORF (Bernard et al., Virology 2010, 70-79).

I Papillomavirus umani possono essere divisi a loro volta in genotipi che hanno un tropismo per l'epitelio cheratinizzato e, in genotipi che infettano l'epitelio mucosale del tratto ano-genitale, del tratto urinario, della cavità orale e del tratto respiratorio (Feng Q. et al., 2003).

Ufficialmente, sono stati disegnati e completamente sequenziati 170 Papilloma virus umani (De Villiers et al., 2013; <http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>).

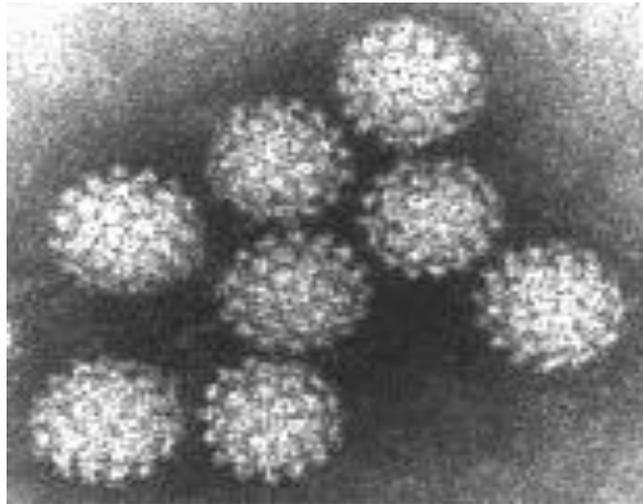
Inoltre, recentemente i papillomavirus umani sono stati classificati dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) in base al loro potenziale oncogenico (Bouvard et al., 2009; Schiffman et al., 2009) (Figura 4).

<b>Alpha-papillomavirus</b>		
Gruppo IARC	Tipo di HPV	
1	16	Il tipo di HPV più potente come agente cancerogeno, riconosciuto come causa di carcinoma in diverse sedi
1	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Sufficienti evidenze di associazione causale con il carcinoma cervicale
2°	68	Limitate evidenze nell'uomo e forti evidenze meccanicistiche di associazione causale con il carcinoma cervicale
2B	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	Limitate evidenze nell'uomo di associazione causale con il carcinoma cervicale
2B	30, 34, 69, 85, 97	Classificati con possibili agenti cancerogeni per analogia filogenetica con tipi HPV con sufficienti o limitate evidenze di cancerogenicità nell'uomo
3	6, 11	Inadeguate evidenze epidemiologiche e assenza di potenziale carcinogenico in studi meccanicistici
<b>Beta-papillomavirus</b>		
2B	5, 8	Limitate evidenze di associazione causale con il carcinoma cutaneo in EV
3	Altri tipi dei generi beta e gamma	Inadeguate evidenze epidemiologiche e assenza dipotenziale carcinogenico in studi meccanicistici

**Figura 4.** Classificazione del Papillomavirus umano effettuata dallo IARC (Bouvard et al., 2009).

### 1.3.2 Morfologia e genoma

Il Papillomavirus umano (figura 5) è un virus di piccole dimensioni (circa 52-55 nm di diametro) a DNA circolare a doppio filamento (circa 8000 bp) privo di envelope. La particella virale è rivestita da un capsidico proteico icosaedrico, formato dall'alternarsi di due proteine strutturali: L1 (proteina maggiore del capsidico, 360 copie) e L2 (proteina minore del capsidico, 12 copie).



**Figura 5.** Particelle virali di HPV al microscopio elettronico (<https://virology online.com/viruses/Papillomaviruses.htm>).

Il genoma virale si suddivide essenzialmente in tre regioni (figura 6 e figura 7):

- la regione di controllo chiamata LCR (*Long Region Control*) che rappresenta circa il 5% del DNA virale e contiene elementi regolatori per la trascrizione e la replicazione virale (Chong T. et al., 1991; Munger K. et al., 2004);
- la regione precoce detta "*Early*" che rappresenta il 45% del DNA virale ed è costituita da 6 *open reading frame* (ORFs) codificanti per 6 proteine funzionali (*E1, E2, E4, E5, E6, E7*), coinvolte nella fase replicativa, nella trascrizione e nella trasformazione cellulare ed espresse durante la fase non produttiva del virus;
- la regione tardiva detta "*Late*" che corrisponde al 40% del DNA e contiene 2 ORFs codificanti per le proteine capsidiche L1 e L2, espresse nella fase produttiva dell'infezione (Doorban J. et al., 1991; Bekkers R.L. et al., 2004).

Ogni proteina virale ha una particolare funzione durante il ciclo replicativo del virus.

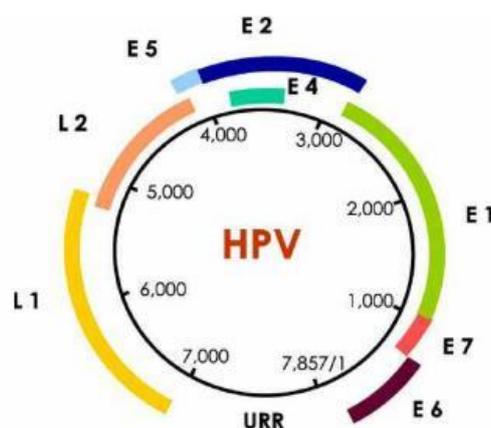
Le proteine strutturali L1 e L2, prodotte dalla regione “Late”, partecipano insieme all’incapsidazione del genoma virale; le L1 si autoassemblano in 72 pentameri, mentre le L2 si intercalano tra le L1.

Le proteine prodotte dalla regione “Early” sono tutte funzionali; E1 ed E2 sono coinvolte nella replicazione virale, mentre E4, E5, E6 ed E7 contribuiscono alla destabilizzazione proliferativa e differenziativa iniziale della cellula ospite (Bravo I.G. et al., 2007). La proteina E1 presenta un’attività elicastica ATP-dipendente importante per il riconoscimento e la sintesi del DNA e svolge un ruolo importante nella fase iniziale della replicazione virale. La E2 interviene nelle fasi regolatorie della replicazione e della trascrizione virale, in particolar modo regola la trascrizione dei geni precoci: a bassi livelli attiva i promotori precoci promuovendone la trascrizione, mentre ad alti livelli, il legame dei fattori di trascrizione viene bloccato e la trascrizione è repressa. Questo ruolo di repressore risulta essere molto importante nella regolazione dei livelli di espressione delle due principali oncoproteine E6 ed E7.

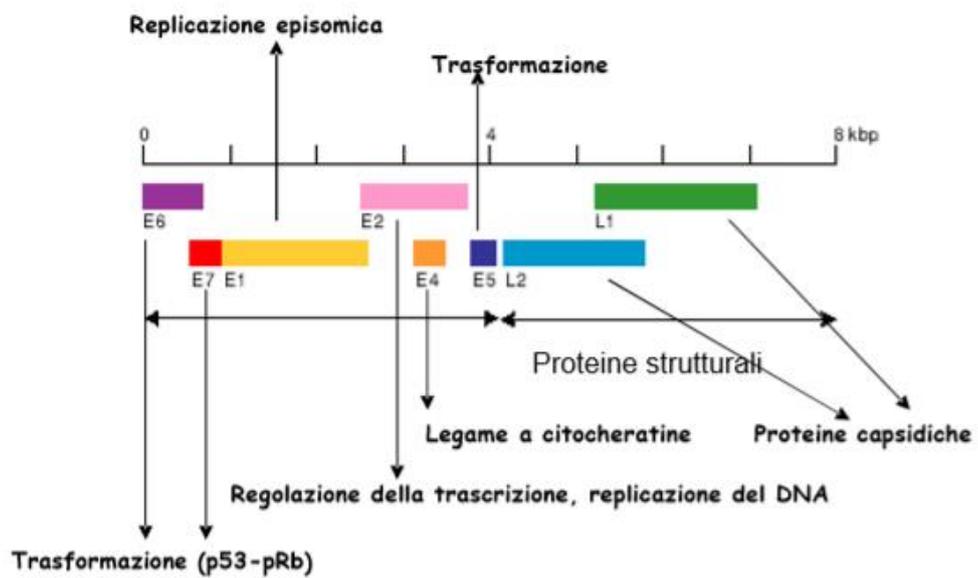
La proteina E4 viene espressa solamente nella fase tardiva dell’ infezione; il suo ruolo sembra essere legato all’ infezione produttiva, in quanto facilita il rilascio di virioni maturi dalla cellula epiteliale.

La E5 partecipa, insieme alle precedenti, alla replicazione virale anche se il suo ruolo è ancora poco sconosciuto.

Le proteine E6 ed E7 sono delle oncoproteine, ovvero delle proteine responsabili della trasformazione cellulare e della progressione maligna del cancro cervicale. Il loro ruolo principale è quello di andare ad inattivare rispettivamente due proteine oncosoppressorie: p53 e la proteina del retinoblastoma Rb.



**Figura 6. Rappresentazione schematica del genoma di HPV.** Il genoma virale è suddiviso in tre regioni: la regione “Early” che codifica per le proteine E1, E2, E4, E5, E6 ed E7; la regione “Late” che codifica per le proteine virali del capsido L1 ed L2, e la regione URR (upstream regulatory region) (Muñoz N. et al., 2006).



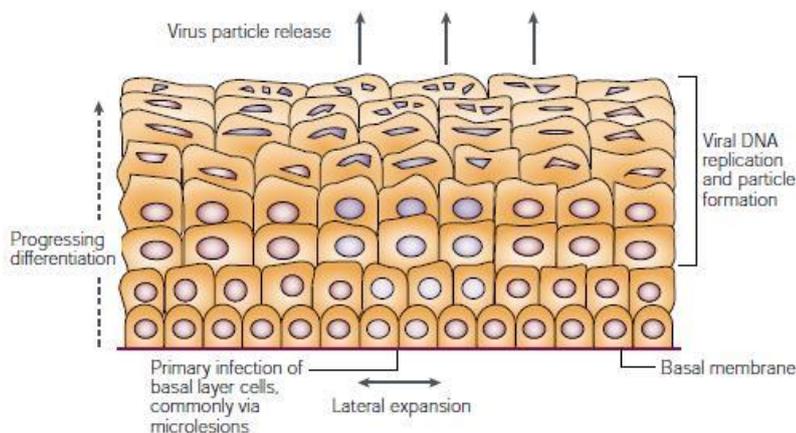
**Figura 7.** Mappa lineare del genoma di HPV

### 1.3.3 Ciclo replicativo, geni virali e patogenesi

Il Papillomavirus umano ha un particolare tropismo per le cellule epiteliali in continuo differenziamento della cute e delle mucose. Infatti, gli HPV sono parassiti intracellulari obbligati, il cui ciclo vitale è correlato con lo stadio di differenziamento delle cellule dello strato spinoso degli epitelii (Chow et al., 1997).

L'infezione inizia con l'ingresso per endocitosi delle particelle virali nelle cellule basali degli epitelii, dotate di una particolare attività proliferativa. Sull'ingresso di queste particelle virali, ci sono diversi pareri contrastanti: alcuni autori affermano che il loro ingresso sia mediato da una particolare proteina presente sulla superficie cellulare: l'integrina  $\alpha 4 \beta 6$ ; altri autori invece, hanno constatato che questo legame non sia strettamente necessario in quanto, anche altre cellule che non esprimono questa proteina possono essere infettate (Sibbet G. et al., 2000) e che, il processo di internalizzazione delle particelle virali sia un processo lento che può verificarsi per endocitosi di vescicole rivestite di clatrina (Culp T.D. et al., 2006).

In figura 8 è schematizzato il ciclo replicativo di un HPV.



**Figura 8.** Ciclo replicativo di un HPV in cellule epiteliali (Zur Hausen H., "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer. 2002).

Nella prima fase del ciclo replicativo, il virus, dopo essere entrato nella cellula, perde il proprio involucro proteico e, viene trasportato tramite un sistema di vescicole endocitiche verso il nucleo, dove mantiene il proprio genoma in forma episomiale. In questo stadio, si ha l'attivazione dell'espressione di alcuni geni virali precoci (E1 ed E2) e, il DNA virale si replica come un plasmide nucleare a copie multiple (da 20 a 100 copie per cellula). Questa replicazione

avviene una sola volta per ogni ciclo, durante la fase S della divisione cellulare in sincronia con i cromosomi della cellula ospite e, questo genoma virale viene ripartito tra le cellule figlie.

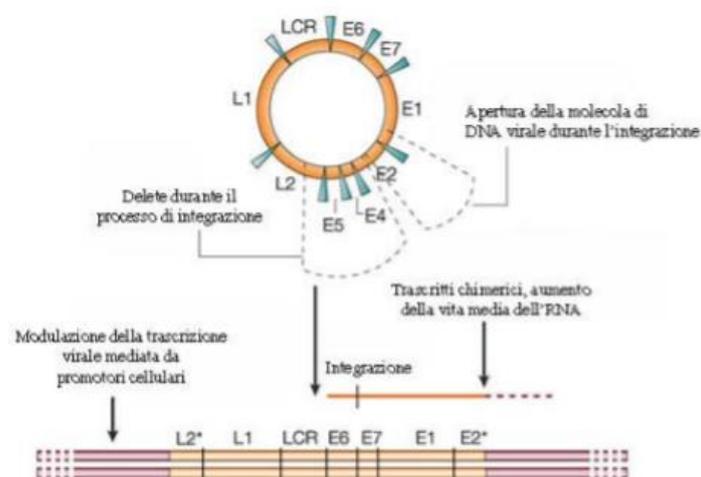
Questi processi iniziali del ciclo replicativo sono responsabili di un' infezione latente e persistente delle cellule basali (Lillo F.B., 2006; Gilbert D. M. et al., 1987) ed è tipica di lesioni causate da HPV a basso/medio rischio.

Terminata questa fase, inizia quella durante la quale si verifica un' infezione produttiva, caratteristica invece di neoplasie causate da HPV ad alto rischio. Le cellule epiteliali basali iniziano il loro differenziamento, si spostano nello strato spinoso dell' epitelio e vengono espressi tutti i geni precoci restanti (E5, E6 ed E7). L' espressione di questi geni portano ad un aumento della proliferazione delle cellule infette e, alla loro espansione laterale (figura 8a). Per la produzione dei virioni, l' HPV deve amplificare il proprio genoma; la replicazione del DNA virale avviene nelle cellule dello strato granuloso, anche se qui la sintesi del DNA cellulare viene inibita (Broccolo F., 2009; Howley P. M. et al., 2001; Stanley M.A. et al., 2007; Lillo F. B., 2006). A questo punto, il numero di copie del genoma virale aumenta fino a migliaia di copie per cellula.

Terminata l' amplificazione del genoma virale, negli strati più superficiali del tessuto infettato, si ha la trascrizione dei geni tardivi L1 e L2 con la successiva produzione delle proteine strutturali, necessarie per il completamento del virione. Perciò, nelle cellule completamente differenziate, i genomi virali vengono incapsidati a formare le particelle virali infettive che vengono poi rilasciate all' esterno tramite la desquamazione dello strato corneo; i virioni così rilasciati possono iniziare una nuova infezione (Frazer I. H. et al., 2004).

La trascrizione dei geni virali sopra citati avviene in diverse fasi del ciclo replicativo del virus ed è associata ai differenti stadi di differenziamento delle cellule epiteliali. Essa è regolata da diversi promotori che intervengono in momenti differenti del differenziamento cellulare; l' espressione dei geni E1, E2, E5, E6 ed E7 è regolata dal promotore P<sub>97</sub>, attivo nella fase precoce del ciclo replicativo e quindi in cellule indifferenziate dello strato basale, mentre l' espressione dei geni E4, L1 e L2 è controllata sia dal promotore tardivo P<sub>742</sub>, attivo esclusivamente in cellule differenziate (Klumpp D.J. et al., 1999) che a livello post-trascrizionale nella regione 3'-UTR (Untranslated region). Inoltre, nel genoma virale è presente anche una specifica regione regolatrice (LCR), che presenta degli elementi chiamati "enhancer" che sono responsivi ai fattori virali e che fungono quindi da attivatori o repressori trascrizionali (specificatamente dei geni precoci E1, E2, E5, E6 ed E7).

Il ciclo replicativo completo del virus porta ad una produzione della progenie virale matura tipica delle lesioni da HPV a basso rischio oncogeno; in questo caso il genoma virale rimane in forma episomiale e si attivano dei processi che vanno ad alterare la normale funzionalità cellulare, portando all'insorgenza di patologie quali verruche a livello della cute o delle mucose e lesioni pre-neoplastiche a livello dell'area ano-genitale (Howley P.M. et al., 2001). Nelle infezioni da HPV ad alto rischio invece, la progenie virale matura non viene completata in quanto il DNA virale si integra con il genoma della cellula ospite e attiva dei meccanismi di trasformazione ed immortalizzazione cellulare. L'integrazione genomica (figura 9) si verifica a livello della regione ORF E2; questo porta alla perdita dell'espressione del gene E2 e di conseguenza alla perdita della sua azione repressiva sulle onco-proteine virali E6 ed E7 che svolgono un ruolo fondamentale nella trasformazione neoplastica (Longworth M.S., 2004). Perciò, nei tumori indotti da HPV ad alto rischio, i geni E1, E6 ed E7 sono integrati nel genoma della cellula ospite e, risultano quindi funzionali, mentre i geni E2, E4, ed E5 vengono persi oppure non sono trascritti. La capacità oncogena delle proteine E6 ed E7 si basa sulla loro capacità di inattivare rispettivamente due oncosoppressori fondamentali per la proliferazione cellulare: p53 e pRb. Il legame di queste due proteine virali, E6 ed E7, ai due oncosoppressori p53 e pRb, inibisce le loro funzioni oncosoppressive, inducendo la cellula alla trasformazione neoplastica.



**Figura 9.** Sito di internalizzazione del genoma virale nel DNA della cellula ospite (Zur Hausen H. "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.", 2002 Nat Rev Cancer).

## 1.4 Manifestazioni cliniche

### 1.4.1 Manifestazioni cliniche comuni

Il Papillomavirus umano essendo una malattia trasmessa per via sessuale, colpisce la maggior parte degli adulti (donne e uomini) sessualmente attivi nell' arco della loro vita. Nella maggior parte dei casi, il virus è asintomatico e viene debellato spontaneamente grazie alle difese immunitarie di chi lo contrae, in un lasso di tempo che può andare da qualche settimana a un paio di anni. Se il sistema immunitario non riuscisse a debellare il virus, nei casi migliori si manifestano verruche cutanee o delle mucose oppure condillomi, mentre nei casi peggiori possono manifestarsi neoplasie. Il cancro alla cervice uterina è quello più comune causato dal virus ed è il quarto tumore più diffuso al mondo che colpisce il genere femminile (Wakeham K. et al., 2014).

Le manifestazioni cliniche del virus possono essere:

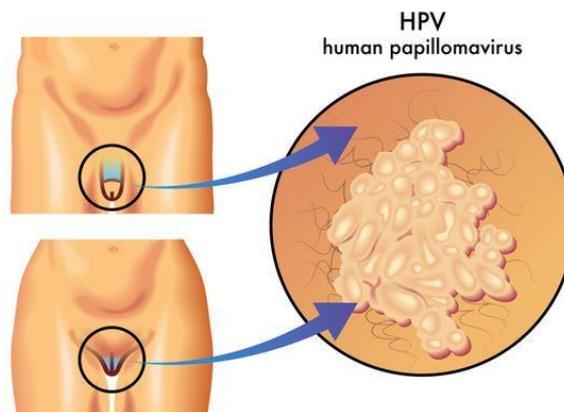
- lesioni cutanee;
- lesioni delle mucose benigne;
- lesioni delle mucose maligne.

Le lesioni cutanee generalmente sono associate alle comuni verruche piatte (figura ) che si manifestano come papule bianche/grigiastre o brune sulle mani e sulla pianta dei piedi e sono trasmesse di solito tramite contatto diretto con persone e/o oggetti infetti. I genotipi riscontrati in questa tipologia di lesioni sono HPV a basso rischio, precisamente i tipi 1, 2, 3, 4, 7. Altre lesioni cutanee sono rappresentate da forme più gravi quali l' epidermodisplasia verruciforme (figura 10b) e dalla sua degenerazione (meno frequente) in carcinoma a cellule squamose; queste due patologie sono causate dai genotipi a basso rischio 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 47, 49.

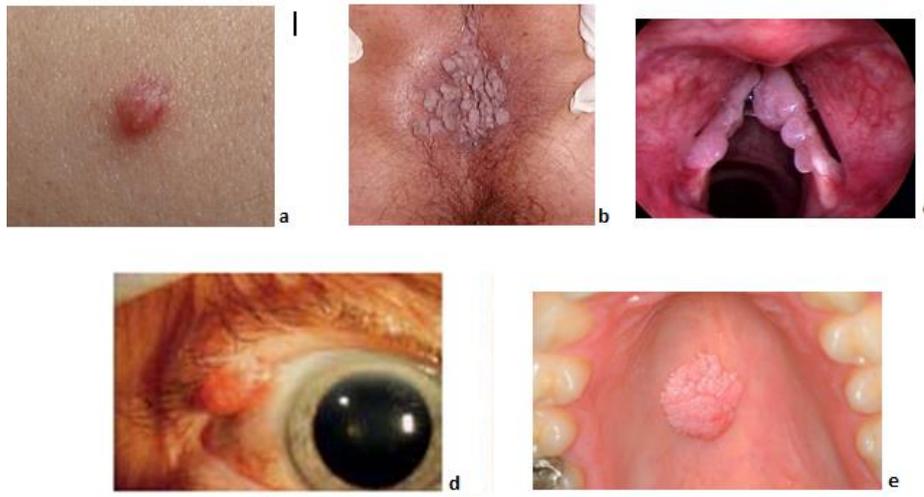


**Figura 10.** Lesioni cutanee: (a) verruche comuni a mani e piedi; (b) epidermidisplasia verruciforme (Bruna Maria C.C. et al., 2013)

Le lesioni mucose benigne sono rappresentate prevalentemente da condilomi acuminati e piani (figura 11), trasmessi per via sessuale a livello dei genitali maschili e femminili, dell' uretra, della zona perianale e dell' ano. Sono delle masse esofitiche verrucose di consistenza molle nei condilomi piani (figura 12a), mentre modestamente rilevate nei condilomi acuminati (figura 12b); queste generalmente sono causate dai genotipi a basso rischio (HPV-6 e HPV-11) e, sono lesioni che si risolvono spontaneamente nel giro di 3/4 mesi. Queste lesioni benigne sono tutte di tipo papillomatoso e possono verificarsi anche in altre sedi mucose come ad esempio a livello respiratorio (figura12c), congiuntivale (figura12d) e orale (figura 12e).



**Figura 11.** HPV e condilomi nei genitali maschili e femminili



**Figura 12.** Manifestazioni cliniche di HPV in diverse mucose : a) condiloma piano genitale; b) condiloma acuminato anale; c) papillomatosi respiratoria ricorrente; d) papillomatosi congiuntivale; e) papillomatosi orale.

Le lesioni delle mucose maligne sono caratterizzate da lesioni intraepiteliali [Squamous Intraepithelial Lesions (SIL)] che si verificano generalmente a livello ano-genitale, ma raramente possono manifestarsi anche a livello naso-orofaringeo (Laura S. L. et al., 2019). Le lesioni intraepiteliali si suddividono in lesioni di basso grado [low-grade (LG-SIL)] e lesioni di alto grado [high-grade (HG-SIL)] a seconda de loro potenziale oncogenico; possono progredire in neoplasie intraepiteliali (-IN) a livello cervicale (CIN), della vagina (VaIN), della vulva (VIN), del pene (PeIN), dell' ano (AIN) e nelle regioni perianali (PAIN) (Darragh T.M. et al., 2012).

In figura 13 (Laura S. L. et al., 2019), i genotipi di HPV, che infettano le regioni anogenitali dell' uomo sono suddivisi a seconda del potenziale oncogenico. Gli HPV 6 e 11 sono quelli a basso rischio che generalmente vengono rilevati nella maggior parte delle LG-SIL (Pimenoff V. N. et al., 2015), mentre i genotipi ad alto rischio vengono riscontrati nelle HG-SIL (Palefsky J., 2008); in particolar modo, i genotipi 16 e 18 sono i più comuni nel carcinoma alla cervice uterina e a quello delle cellule squamose anali.

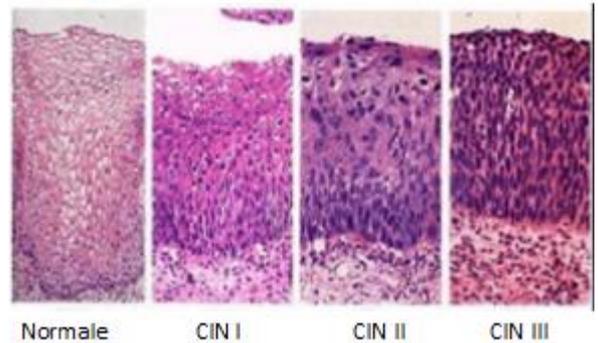
Risk	HPV subtypes
High (Hr- HPV)	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68
Probably high	26,53,66,73,82
Low (lr-HPV)	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81, CP6108

Abbreviation: HPV, human papilloma virus.

**Figura 13.** Classificazione dei genotipi di HPV secondo il rischio oncogenico (Laura S.L. et al., 2019)

Le lesioni delle mucose maggiormente note e riscontrate sono le CIN (figura 14) che, a livello istologico viene classificata in :

- CIN1 (lesione lieve che coinvolge il terzo basale dell' epitelio, LG-SIL);
- CIN2 (moderata, che coinvolge i 2/3 dell' epitelio, HG-SIL) e
- CIN3 (grave, che coinvolge l' intero epitelio senza superamento della membrana basale, HG-SIL).



**Figura 14.** Confronto epitelio normale con le diverse CIN

#### **1.4.2 Problemi di infertilità : HPV ed infertilità maschile**

Come descritto sopra, le manifestazioni cliniche evidenti associate all'infezione da HPV, che possono verificarsi sia nell'uomo che nella donna, sono: verruche a mani e piedi e condilomi nell'area ano-genitale; quest'ultimi, a seconda del genotipo virale responsabile dell'infezione, possono progredire a neoplasia, più frequentemente nelle donne (tumore alla vagina, alla vulva, all'ano e quello più comune alla cervice uterina) e raramente negli uomini (tumore al pene e all'ano).

Fino ad oggi, la maggior parte dell'attenzione riguardo l'infezione da HPV è stata posta al genere femminile, essendo quello maggiormente colpito; ma, recentemente, un numero crescente di test effettuati sullo sperma, ha consentito di identificare una possibile correlazione tra l'infezione da HPV e l'infertilità maschile (Foresta C. et al., 2015b; Souho T. et al., 2015).

L'infertilità è un problema mondiale che colpisce circa il 10-30% delle coppie in età riproduttiva (Datta J. et al., 2016; Polis C.B. et al., 2017); tra queste, il fattore maschile è quello che contribuisce maggiormente, all'incirca nel 50% dei casi (Agarwal A. et al., 2015).

Per l'infertilità maschile, sono stati proposti diversi fattori di rischio: disfunzione sessuale, varicocele, displasia congenita, disturbi endocrini, fattori immunitari ed infezioni a trasmissione sessuale (STI) (Krausz C., 2011). Tuttavia, in circa il 50% degli uomini infertili, l'eziologia rimane sconosciuta e, l'infertilità definita idiopatica, evidenziando forme di oligospermia, astenospermia, teratozoospermia e altre anomalie dello sperma.

Recentemente, diverse evidenze hanno mostrato come l'infezione da HPV nel liquido seminale possa essere implicata nell'infertilità maschile e, quindi come il virus possa giocare un ruolo importante in questa patologia (Proshin S.N. et al., 2013), sebbene ancora non sia ben chiaro il meccanismo implicato (Schuppe H.C. et al., 2017).

Ad oggi, è stato ben riconosciuto il percorso che porta alla trasformazione clonale che generalmente causa i tumori ma, le conseguenze sulla salute correlate alla presenza dei virioni infettanti nella cellula ospite sono notevolmente sottostimate. I virioni di HPV, assemblati esclusivamente in cellule che non dividono, possono indurre sia la trasformazione clonale che la produzione di altri virioni infettanti; per questo motivo, Depuydt C.E. et al. (2016)., considerando che il liquido seminale (spermatozoi e plasma seminale) non contiene cellule in divisione, hanno ipotizzato che la presenza dei virioni potrebbe contribuire alle problematiche dell'infertilità. Così, sono andati a rilevare il DNA dell' HPV in campioni di liquido seminale e, hanno effettivamente confermato sia la sua provenienza dai virioni infettanti che la particolare contagiosità.

I virioni generalmente si trovano nella regione perianale e nei genitali esterni (nel prepuzio del pene, nello scroto e nel glande), ma possono trovarsi anche nell'uretra, nel dotto deferente, nell'epididimo e nel testicolo (Dunne E.F. et al., 2006).

La corretta localizzazione dell' HPV nelle varie componenti del liquido seminale così come il ruolo degli spermatozoi infetti come vettori dell' infezione ancora non sono noti; evidenze biologiche hanno rivelato che generalmente il DNA di HPV è situato sulla superficie dello sperma mediante il legame a due siti presenti lungo la regione equatoriale della testa dello spermatozoo (Schillaci R. et al., 2013). Il legame del virus allo spermatozoo va ad alterare la qualità dello sperma ed i suoi parametri (Martorell M. et al., 2005); difatti, l'adesione del virus allo spermatozoo va a ridurre significativamente la sua motilità (Moghimi M. et al., 2019). Inoltre, si pensa che, se il liquido seminale sia infettato da HPV, il virus possa influire nella reazione acrosomiale andando a ridurre sia la capacità che la funzionalità dell' acrosoma (Jrsoviene V. et al., 2019).

Anche, per quanto riguarda la fecondazione assistita, l'infezione maschile da HPV rappresenta un fattore di rischio che ne provoca l' insuccesso (Garolla A. et al., 2011; Garolla A. et al., 2013). La prevalenza dell'infezione da HPV nel genere maschile varia dall' 1.3% al 72.9% con in picco del 65.4% tra gli uomini con età compresa tra i 18 ed i 40anni (Capra G. et al., 2015).

Inoltre, Lyu et al. (2017) in una recente analisi sistematica hanno determinato che l' HPV 16 è il genotipo più comune nelle infezioni seminali e che la prevalenza di HPV nello sperma è di circa l'11% negli uomini appartenenti alla popolazione generale e del 20% negli uomini con problemi di infertilità.

Tuttavia, ancora non si riesce a comprendere quale meccanismo sia alla base della correlazione tra HPV ed infertilità maschile; sono necessari studi prospettici a coorte ed esperimenti funzionali che permettano di aumentare le conoscenze riguardo l'implicazione dell'infezione virale sulla salute riproduttiva maschile.

Ad oggi, lo stato riguardante l' HPV e l'infertilità maschile indica che:

- esiste una maggiore prevalenza di infezione da seme di HPV negli uomini affetti da infertilità idiopatica rispetto alla popolazione generale, indipendentemente dal genotipo di HPV rilevato;
- nei pazienti infertili infetti, l'HPV è localizzato principalmente sulla superficie dello sperma, in particolare lungo la regione equatoriale;
- esiste una relazione significativa tra l'astenozoospermia e l'infezione da spermatozoi HPV;
- il rilevamento dell'HPV-DNA sulla superficie dello sperma è associato più frequentemente al rilevamento dell'ASA (anti-sperm antibodies) e questa condizione è caratterizzata da un'ulteriore riduzione della motilità degli spermatozoi;
- prove in vitro mostrano che, quando l'HPV è legato agli spermatozoi, è probabilmente trasferito agli ovociti fecondati portando a una compromissione dello sviluppo dell'embrione in blastocisti e cellule trofoblasto;
- prove recenti hanno riportato un possibile ruolo del rilevamento dello sperma di HPV nel fallimento della riproduzione assistita e negli esiti avversi della gravidanza (Hermonat P.L. et al., 1997; Perino A. et al., 2011; Foresta C. et al., 2015; Depuydt T. et al., 2016).

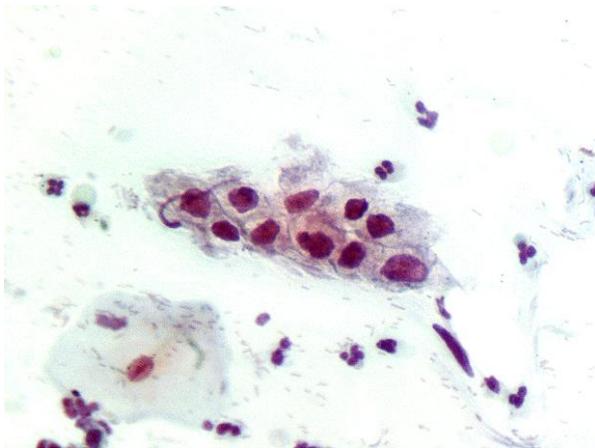
## 1.5 Diagnosi dell' infezione da HPV

La diagnosi dell' infezione da HPV comprende diverse tipologie di esami : evidenza clinica, indagine citologica e microscopica ed indagini biomolecolari.

L' evidenza clinica rappresenta un approccio altamente aspecifico, che permette di rilevare solamente alcune tipologie di infezioni da HPV quali condilomi e verruche. Per le lesioni intraepiteliali squamose che progrediscono a neoplasia, è necessaria un' indagine più approfondita: indagine citologica e coloscopica (Schiffman M. et al., 2007; Feng Q. et al., 2003).

### 1.5.1 Indagine citologica e microscopica

Generalmente, questa tipologia di esame viene utilizzato per la rilevazione di anomalie citologiche a livello anale e genitale. L' indagine consiste nel prelevamento di cellule esfoliate dell' epitelio squamoso (Lowy D.R. et al., 2001) tramite una spatola; queste poi, vengono strisciate su di un vetrino, colorate con un opportuno colorante e osservate al microscopio ottico (Feng Q. et al., 2003).



**Figura 15.** Cellule infettate da HPV risultate da un Pap-Test. Le cellule risultano atipiche con diversi cambiamenti morfologici (ipercromasia del nucleo, aumento di densità del citoplasma) (<https://www.novolabs.it/index.php/esami/pap-test>).

L' indagine citologica, mostrata in figura 15, è stata effettuata su cellule esfoliate dell' epitelio squamoso della cervice uterina ed è nota con il nome di Pap-Test (Test di Papanicolau). Il Pap-Test tradizionale (cellule fissate sul vetrino) oltre a presentare un elevato tasso di falsi negativi (circa il 20%), non raggiunge elevati valori di sensibilità e specificità; infatti una meta-analisi condotta su 62 studi ha dimostrato che la sensibilità raggiunge il 58% (range 11- 99%) e, la specificità il 68% (range 14-97%) (Nanda K., et al., 2000). Per questo motivo, per risolvere

questa problematica, sono stati introdotti recentemente metodi citologici in fase liquida (citologia su strato sottile). Tra questi, il più diffuso è il ThinPrep®, dove le cellule esfoliate vengono sospese in una soluzione liquida conservante. Questa metodica permette il processamento del campione tramite un sistema automatizzato che assicura l'ottenimento di un campione rappresentativo, privo di elementi oscuranti e quindi un vetrino chiaro, uniforme e riproducibile (Moris B.J. et al., 2007).

Studi clinici hanno mostrato quanto siano più soddisfacenti i risultati ottenuti con quest'ultimo metodo: aumento del 50% e del 18% nella rilevazione, rispettivamente, delle LG-SIL e HG-SIL in confronto al PapTest tradizionale (Ronco G. et al., 2006; Lymaye A. et al., 2003).

Le indagini citologiche permettono di rilevare l'entità delle lesioni intraepiteliali ma, per poter rilevare il genotipo responsabile dell'infezione, bisogna effettuare un'indagine biomolecolare.

### 1.5.2 Indagine biomolecolare

Le indagini biomolecolari sono metodiche che permettono di rilevare la presenza del DNA virale e di definire il genotipo responsabile dell'infezione nell'ospite (HPV ad alto rischio o HPV a basso rischio). Le tecniche utilizzate sono tre:

- Ibridazione diretta;
- Ibridazione in soluzione (**Hybrid Capture II**);
- Test di amplificazione genica (**PCR**).

Il principio dell'ibridazione diretta consiste nell'utilizzare sonde marcate che legano in maniera specifica sequenze omologhe presenti nel campione da analizzare.

Le tecniche che sfruttano questo principio sono l'ibridazione Southern blot e l'ibridazione in situ. Il Southern blot, sebbene sia altamente specifico e sensibile, è un saggio troppo laborioso che richiede una grande quantità di materiale e l'utilizzo di materiale radioattivo (Molijn A., 2005); l'ibridazione in situ permette la rilevazione diretta del DNA virale [anche l'identificazione di diversi tipi virali (Carozzi F. et al., 2001; Hubbard R.A., 2003)] nel materiale cellulare integro, la correlazione con la morfologia e la possibilità di visualizzare anche una sola cellula infettata.

Il saggio dell'ibridazione in soluzione (**Hybrid Capture II**) è un saggio sufficientemente sensibile (identifica 1 pg di HPV-DNA/ml), che consiste nell'ibridazione in soluzione tra il DNA virale e sonde a RNA specifici per alcuni tipi di HPV: 13 HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) e 5 HPV a basso rischio (6, 11, 42, 43, 44); i due tipi di HPV sono differenziati

grazie all'amplificazione del segnale in chemiluminescenza (Carozzi F. et al., 2001; Schiffman M. et al., 2000).

Il test di amplificazione genica (**PCR**) viene ampiamente utilizzato per la rilevazione e la determinazione di HPV, in quanto mostra un'elevata sensibilità e specificità nella diagnosi (rileva dalle 10 alle 100 copie di DNA virale), richiede solamente una piccola quantità di campione ed è in grado di amplificare un ampio numero di tipi di HPV in una singola reazione di amplificazione (Harwood C.A. et al, 1999; Snijders P.J. et al., 1990). Questo saggio consiste nell'amplificazione di sequenze altamente conservate (regione L1) del genoma virale; la reazione di amplificazione è caratterizzata da una serie di cicli a diverse temperature. Ogni ciclo è diviso in tre step : *denaturazione del DNA, annealing dei primers alla sequenza complementare, estensione del filamento*. Alla fine della reazione l'amplificato si è accumulato in maniera esponenziale e, l'avvenuta amplificazione indica o meno la presenza del DNA virale. Questo test generalmente rappresenta la base per tutti i metodi di genotipizzazione (identificazione tipo-specifica), che sono rappresentati dai seguenti saggi: RFLP (restriction fragment length polymorphism), Lipa (line probe assay) ed il sequenziamento (Lowy D.R. et al., 2001; Feng Q. et al., 2003).

Ad oggi, dalla PCR tradizionale si è passati alla PCR Real-time che permette anche di determinare la carica virale; quest'ultima è un importante fattore di rischio per la persistenza dell'infezione ed il conseguente rischio di poter sviluppare una displasia (Van Duin M. et al., 2002; Schlecht N.F. et al., 2003).

In ambito clinico, i test molecolari sono utilizzati nei pazienti che ne fanno richiesta e alle donne che hanno un risultato citologico di ASCUS, per chiarire la tipologia dell'infezione virale (ad alto rischio o basso rischio oncogeno)(Schlecht N.F. et al., 2003; Manos M.M. et al., 1999).

Anche per la rilevazione del DNA virale nel liquido seminale, vengono utilizzate le stesse indagini biomolecolari.

## 1.6 Terapia e prevenzione dell' HPV e delle malattie ad esso correlate

### 1.6.1 Terapia delle lesioni

Le terapie delle lesioni da HPV dipendono dal tipo di HPV, dalla sede e dalle dimensioni delle lesioni (Lacey C.J.N., 2005). Le terapie possono essere sia chirurgiche che farmacologiche (generalmente ad uso topico) ed entrambe hanno l'obiettivo di andare a distruggere in maniera locale il tessuto infettato (Bacelieri R. et al., 2005; Rivera A. et al., 2004).

Le terapie chirurgiche comprendono:

- **la crioterapia** (Mohanty K.C. et al., 1990), che consiste in un abbassamento repentino della temperatura della lesione;
- **l'elettrocoagulazione** che utilizza corrente ad alta frequenza per bruciare la lesione;
- **il laser a CO<sub>2</sub>** (Frega A. et al., 1992) che utilizza l'emissione di una luce intensa per vaporizzare la lesione;
- **l'escissione** della lesione che consente di effettuare anche un esame istologico.

Le terapie farmacologiche comprendono invece:

- gli **agenti cheratolitici** quali acido salicilico, acido lattico e acido retinoico che riducono la dimensione della lesione fino a farla scomparire;
- gli **antineoplastici** quali bleomicina (Vanhootehem O. et al., 2001) e 5-fluorouracile (Beutner K.R. et al., 1997), che interferiscono con la formazione e/o l'utilizzo di un normale metabolita presente all'interno della cellula;
- gli **agenti citotossici** quali sono podofillotossina, podofillina, acido tricloroacetico (Bacelieri R. et al., 2005), che inducono danni alle cellule.

Altre terapie effettuate nelle lesioni da HPV sono rappresentate dall'utilizzo dell'interferone alfa (Sen E. et al., 2005) o di immunomodulatori (Richwald G.A., 1999); inoltre, negli ultimi anni, è risultato molto efficace, soprattutto negli immunocompromessi, l'utilizzo di un farmaco antivirale: il Cidofovir (Snoeck R. et al., 2001).

Tuttavia, questi trattamenti, sebbene portino ad una guarigione delle lesioni, non garantiscono la completa eliminazione del virus, soprattutto nelle lesioni più importanti che prevedono

trattamenti più aggressivi; perciò, la presenza latente del virus può portare alla comparsa di recidive anche dopo un breve periodo di tempo.

Recentemente, è stato esplorato anche un ulteriore potenziale metodo terapeutico per trattare ed eliminare le infezioni da HPV: i vaccini terapeutici. Questi, a differenza dei vaccini preventivi, dovrebbero essere utilizzati per stimolare una risposta immunitaria cellula-mediata per colpire ed uccidere le cellule infette. In diversi studi pre-clinici e clinici, sono stati sviluppati e testati diversi vaccini terapeutici, tra i quali i vaccini basati su vettori vivi, vettori batterici, vettori proteici o peptidici, vaccini ad acido nucleico e vaccini a base cellulare (Yang A. et al., 2016). La maggior parte di questi prende di mira le oncoproteine HPV E6 ed E7 con l'obiettivo di fornire antigeni E6 ed E7 in varie forme alle cellule che presentano l'antigene (APC), al fine di attivare cellule T citotossiche CD8 + specifiche dell'antigene HPV o cellule T helper CD4 +, rispettivamente. Yang A. et al. (2016), che hanno posto la loro attenzione sullo sviluppo di questi vaccini, ritengono che questa tipologia di vaccini diventeranno clinicamente disponibili in un prossimo futuro e saranno offerti insieme ad altre terapie per il controllo delle lesioni associate all' HPV.

## **1.6.2 Prevenzione dell' infezione**

Ad oggi, per diminuire l' insorgenza di tumori e di malattie associate ad un patogeno virale, è possibile intervenire in maniera preventiva.

La prevenzione è l' insieme di azioni finalizzate ad impedire o ridurre il rischio, ossia la probabilità che si verifichino eventi non desiderati. In particolar modo, la prevenzione contro l' HPV consiste nell' insieme di azioni in grado di ridurre il tasso d' incidenza delle infezioni genitali e, di conseguenza, delle lesioni e delle neoplasie associate ad esse (Ronco G. et al., 2006). Proprio per questo motivo, la prevenzione risulta essere molto importante.

Le strategie di prevenzione delle infezioni si suddividono in:

- PREVENZIONE PRIMARIA;
- PREVENZIONE SECONDARIA.

La prevenzione primaria generalmente è costituita da un insieme di azioni, che possono essere effettuate dal singolo individuo, e da interventi promossi dalla Sanità Pubblica (Kjaer S.K. et al., 2000).

Innanzitutto, la Sanità Pubblica come ente pubblico ha il compito di promuovere l' incremento di test di screening tra le donne (le più colpite) ma anche tra gli uomini, dal momento che la presenza di HPV nel liquido seminale può portare a problemi all' apparato riproduttivo; inoltre, deve promuovere la vaccinazione anti-HPV e continuare le ricerche epidemiologiche e di laboratorio sulle infezioni genitali da HPV.

Della prevenzione primaria, fanno parte anche i comportamenti individuali di una persona e, dal momento che il contatto sessuale rappresenta un fattore di rischio nell' infezione genitale da HPV, per diminuire la trasmissione del virus, è consigliabile di: evitare il contatto diretto con le infezioni genitali, limitare il numero di partners sessuali e di far uso del preservativo, sebbene quest' ultimo in realtà conferisce solamente una protezione parziale (Lymaye A. et al., 2003).

Per quanto riguarda la prevenzione secondaria, essa è rappresentata dalla strategia vaccinale. Di questa, fanno parte i vaccini preventivi, che sono dei preparati biologici costituiti da microrganismi uccisi o attenuati, oppure da alcuni loro antigeni, o da sostanze prodotte dai microrganismi e rese sicure o, da proteine ottenute con tecniche di ingegneria genetica, che hanno la funzione di andare a stimolare la produzione di anticorpi neutralizzanti specifici per il microorganismo. . I vaccini contro l' HPV sono costituiti da proteine purificate da alcuni tipi di HPV, che formano le Virus Like Particles (VLPs), ovvero particelle virus-simili senza la capacità infettante; infatti, le VLPs mimano il capsido virale, ma non contengono il materiale genetico del virus, pertanto, senza provocare infezioni, sono in grado di indurre una risposta anticorpale specifica (Kirnbauer R. et al.,1992). Esse sono composte generalmente dalla proteina L1, prodotta in cellule di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) attraverso la tecnologia del DNA ricombinante (Stanley M. et al., 2006).

Questa tipologia di vaccini induce una forte risposta immunitaria tipo-specifica; infatti, per generare una protezione verso più genotipi del virus, le formulazioni prodotte devono essere polivalenti (Stanley M. et al., 2006; Kirnbauer R. et al.,1992).

Lo scopo iniziale di questi vaccini è stato quello di andare a prevenire le lesioni pre-cancerose correlate alla presenza del virus nella donna.

Nel 2006 e nel 2007, in Europa, sono stati autorizzati due vaccini: uno quadrivalente (studiato prima nella popolazione femminile, poi in quella maschile), il Gardasil®(Sanofi Pasteur MSD) e uno bivalente, il Cervarix®(GlaxoSmithKline); entrambi proteggono dai genotipi ad alto rischio (HPV 16 e HPV 18), responsabili della maggior parte dei tumori al collo dell' utero. Il Gardasil®

inoltre, protegge anche per i genotipi a basso rischio (HPV 6 e HPV11), responsabili dei condilomi genitali (Markowitz L.E. et al., 2007; The FUTURE II Study Group, 2007).

Nel 2015, è stato autorizzato in Europa un nuovo vaccino 9-valente (non ancora in commercio) che oltre ai genotipi precedenti, protegge anche contro altri 5 (HPV 1, 33, 45, 52 e 58).

Entrambi i vaccini si sono dimostrati altamente immunogeni, inducendo una risposta immune in oltre il 90% dei vaccinati.

L' elevata efficacia dei vaccini (vicina al 100%), valutata in donne tra i 16 e 45 anni e oltre, è subito emersa nella prevenzione delle lesioni precancerose (correlate ai genotipi contenuti nel vaccino) in donne, che hanno rispettato il protocollo vaccinale e che non erano state infettate dai tipi di HPV presenti nel vaccino stesso (Harper D.M. et al., 2006). In donne già infettate con almeno uno dei tipi di HPV, e quelle che non avevano completato il ciclo vaccinale, l' efficacia si riduce a circa il 50% (WHO, 2009).

Sulla base dei dati clinici di entrambi i vaccini, l' OMS, al fine di garantire la massima efficacia, ha raccomandato di eseguire la vaccinazione prima del debutto sessuale (WHO, 2006), proponendo come target primario bambine di età compresa tra 9 e 12 anni.

Entrambi i vaccini vengono somministrati per via intramuscolare attraverso 2 dosi fino a 14 anni e 3 dosi oltre tale età. Nei trial clinici di entrambi i vaccini per HPV 16 e HPV 18, si osserva che i titoli anticorpali presentano un picco 4 settimane dopo la 3 dose e che, questo picco subisce un brusco calo dopo due anni dalla vaccinazione; sebbene questa diminuzione, gli anticorpi persistono nel soggetto per circa 9 anni (Naud P.S. et al., 2004; Ferris D. et al., 2004). Ovviamente, la durata della protezione è nota solo per il tempo di osservazione disponibile negli studi clinici.

E' importante sottolineare che, essendo presenti solamente vaccini diretti contro alcuni genotipi di HPV, la vaccinazione non sostituisce le analisi di screening, quali pap-test e/o l'HPV-test.

Il vaccino quadrivalente è stato studiato anche nella popolazione maschile, mostrando un buon profilo di sicurezza ed immunogenicità. Addirittura, i livelli anticorpali sono risultati più alti nei maschi che nelle femmine.

Inoltre, diversi studi clinici hanno dimostrato l' efficacia del vaccino sia nella prevenzione dei condilomi genitali che delle lesioni anali pre-cancerose. Infatti, sulla base di questi dati, da giugno 2014, la campagna vaccinale è stata estesa anche per la prevenzione delle lesioni anali pre-cancerose e del cancro anale nei maschi.

La vaccinazione preventiva anti-HPV quindi, si è dimostrata altamente efficace nel prevenire patologie correlate all'HPV in entrambi i sessi: lesioni alla cervice uterina, lesioni vulvo-vaginali e condilomi nelle donne (Harper D.M. et al., 2006; Wheeler C.M. et al., 2012; Paavonen J. et al., 2009; Malagòn T. et al., 2012; Apter D. et al., 2015; Pils S. et al., 2015; Schiller J.T. et al., 2012; Brotherton J.M. et al., 2015), e lesioni pre-cancerose anali, lesioni genitali esterne nei maschi (Palefsky J.M. et al., 2011; D'Souza G. et al., 2007; Chaturvedi A.K. et al., 2011). Tuttavia, sebbene l' infezione genitale da HPV sia molto diffusa anche nei maschi, la copertura vaccinale risulta essere inferiore all' 11% (Han J.J. et al., 2017).

Recentemente, Garolla A. et al. (2018) hanno descritto che la vaccinazione anti-HPV nei maschi con rilevazione di HPV nel liquido seminale, porta sia ad una significativa riduzione della prevalenza dell' infezione da HPV nel liquido seminale che ad un miglioramento dei parametri dello sperma (aumento della motilità e riduzione di anticorpi anti-sperma (ASA)), attraverso una probabile stimolazione dell' immunità umorale (Foresta C. et al., 2015).

Per questo motivo, Garolla A. et al. (2018), dopo diversi studi effettuati su coppie con problemi di infertilità, propongono la vaccinazione anti-HPV come una strategia adatta per migliorare la fertilità assistita e persino naturale, dal momento che migliora la guarigione dall' infezione da HPV nelle cellule dello sperma.

La disponibilità del vaccino anti-HPV rappresenta un' opportunità rilevante per l' intera comunità, oltre che un' occasione di prevenzione individuale.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Le infezioni sessualmente trasmesse (IST) rappresentano al giorno d'oggi uno dei più seri problemi di Sanità Pubblica a livello mondiale, sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo. Tra queste, quelle che hanno suscitato un particolare interesse sono associate al Papilloma virus umano (HPV - Human Papillomavirus), che infetta sia l'uomo che la donna ed è la causa della maggior parte dei casi di tumori alla cervice uterina nella donna.

Fino a poco tempo fa, l'attenzione per le infezioni causate da questo virus era rivolta principalmente al genere femminile, essendo quello maggiormente colpito e con gravi conseguenze. Recentemente però, sebbene nel genere maschile il virus non causi gravi conseguenze (se non in rari casi rappresentati dal tumore anale o al pene), diversi ricercatori hanno rivolto la loro attenzione alla presenza del virus nel maschio, andandone a studiare una possibile correlazione con l'infertilità maschile idiopatica.

Difatti, l' HPV è stato rilevato nel liquido seminale (fino al 10% in uomini asintomatici sessualmente attivi) ed è stato dimostrato come esso sia potenzialmente in grado di ridurre la fertilità maschile, andandosi a legare agli spermatozoi e alterandone i diversi parametri (motilità, conta, morfologia) (Nasseri S. et al., 2015). Nel 2018, Moghimi M. et al. hanno dimostrato che effettivamente c'è una prevalenza maggiore di HPV ad alto rischio in uomini con problemi di fertilità piuttosto che in quelli fertili e che quindi, l' HPV potrebbe rappresentare un probabile fattore di rischio per la fertilità maschile.

L' importanza di studiare la prevalenza della presenza del virus nel maschio e la correlazione con la sua fertilità è quella di poter innanzitutto, determinare un fattore di rischio/causa di quelle infertilità idiopatiche e poi, visto il numero elevato di donne positive all'HPV, di capire se lo spermatozoo possa rappresentare un possibile "vettore" del virus per la donna.

Tuttavia ad oggi, i dati presenti in letteratura scientifica sono scarsi e, sarebbero necessari ulteriori studi per una migliore e più certa identificazione dei meccanismi anatomofisiologici.

Per questo motivo, lo scopo di questa tesi è stato quello di andare a rilevare tramite indagini biomolecolari, la presenza e la prevalenza di HPV ad alto rischio in liquidi seminali di pazienti con problemi di infertilità e non, pervenuti in laboratorio e, di valutare una possibile correlazione tra l'infezione di HPV nel liquido seminale e le problematiche di astenozoospermia e oligoastenozoospermia.

### **3. MATERIALI E METODI**

### 3.1 Pazienti arruolati nello studio

Nel periodo compreso tra settembre 2019 e febbraio 2020, presso il laboratorio *Biolab* di Montecchio (PU), è stata ricercata la presenza dello *Human Papillomavirus* (HPV) in 54 campioni di liquido seminale di pazienti, che facevano richiesta di uno spermogramma e che hanno firmato un consenso informato per le successive indagini molecolari.

Nello studio, sono stati presi in considerazione 20 pazienti sani e 34 pazienti con problematiche riguardanti la fertilità (20 con astenozoospermia e 14 con oligoastenozoospermia) con un'età compresa tra 18 e 56 anni .

### 3.2 Campioni

I campioni di liquido seminale sono stati prodotti dal paziente presso il laboratorio Biolab, secondo i criteri stabiliti dalla **WHO** (*World Health Organization – Organizzazione Mondiale della Sanità*) e riportati nel “Manuale di laboratorio WHO per l' esame del liquido seminale” del 2010.

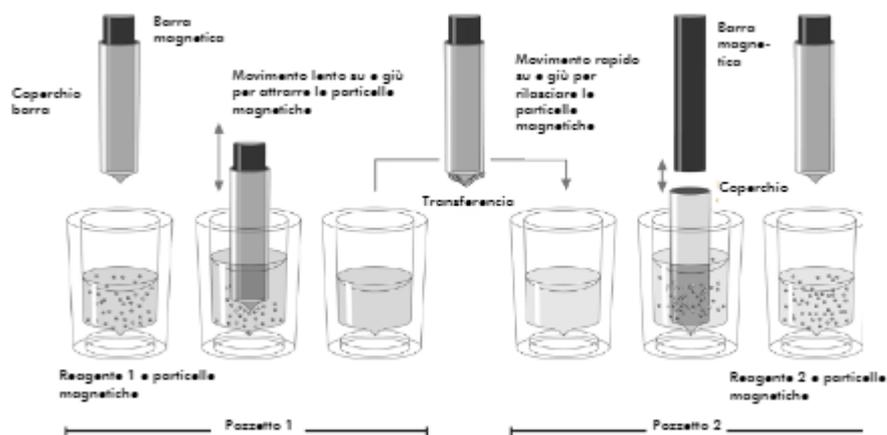
Sui campioni raccolti è stata effettuata l'analisi del liquido seminale secondo il “Manuale di laboratorio WHO per l' esame del liquido seminale” del 2010, affiancata da altri test che hanno valutato la vitalità degli spermatozoi (LIFE TEST), la presenza di alterazioni immunologiche (SPERMAR TEST), la funzionalità prostatica (acido citrico) e delle vescicole seminali (fruttosio).

In tutti i campioni sono stati prelevati 3 ml di liquido seminale, conservati in un apposito contenitore per l'analisi molecolare a -20°C fino alle successive analisi di estrazione.

### 3.3 Estrazione e purificazione del DNA: kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione con il sistema QIASymphony SP (QIAGEN)

L' estrazione e la purificazione del DNA dei campioni di liquido seminale sono state eseguite con il kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione con il sistema QIASymphony SP. Questo sistema esegue tutte le fasi della procedura di purificazione garantendo una processazione sicura e riproducibile dei campioni potenzialmente infettati. La purificazione degli acidi nucleici è eseguita in maniera automatizzata, utilizzando la tecnologia delle particelle magnetiche.

In figura 16, è rappresentato il principio di funzionamento dello strumento.



**Figura 166. Principio di funzionamento del sistema QIASymphony.** Il sistema QIASymphony SP processa un campione contenente particelle magnetiche con la seguente procedura: una barra magnetica protetta da un coperchio entra in un pozzetto contenente il campione e attrae le particelle magnetiche. La barra magnetica con coperchio viene posiziona sopra un altro pozzetto e le particelle magnetiche vengono rilasciate. Il sistema QIASymphony SP utilizza una testa magnetica contenente una serie di 24 barre magnetiche, quindi può processare contemporaneamente fino a 24 campioni. Le fasi 1 e 2 vengono ripetute più volte durante la processazione dei campioni.

### 3.3.1 Estrazione e purificazione del DNA

Per l' estrazione e la purificazione del DNA da campioni di liquido seminale è stato utilizzato il kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione con il sistema QIASymphony SP (QIAGEN). Il procedimento è completamente automatizzato.

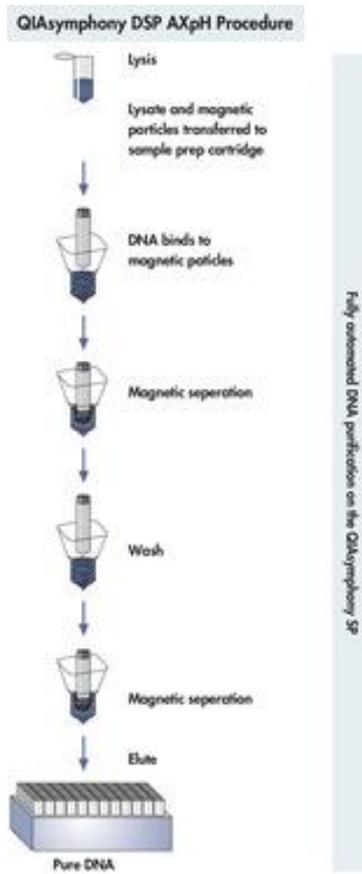
Il kit contiene materiali e reagenti presenti in figura 17.

<b>Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen</b>			<b>Mini</b>	<b>Midi</b>
<b>N° di catalogo</b>			<b>937036</b>	<b>937055</b>
<b>Numero di preparazioni*</b>			<b>192</b>	<b>96</b>
RC	Cartuccia reagenti <sup>†</sup>	<b>REAG</b> <b>CART</b>	2	2
ER	Rack per enzima		2	2
PL	Coperchio perforante		2	2
AVE	Tampone AVE (20 ml) <sup>‡</sup>	<b>ELU</b> <b>BUF</b>	2	2
AVE	Tampone AVE (2 ml) <sup>‡</sup>	<b>ELU</b> <b>BUF</b>	2	2
CARRIER	Carrier RNA	<b>CAR</b> <b>RNA</b>	2 x 1.350 µg	2 x 1.350 µg
RSS	Set sigillante riutilizzabile <sup>§</sup>		2	2
	Istruzioni per l'uso (manuale)		1	1

**Figura 17. Contenuto del kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen**

Come da manuale "Istruzioni per l'uso (manuale) del kit QIASymphony® DSP Virus/Pathogen ", tutti i campioni, i reagenti forniti nelle speciali cartucce ed i materiali di consumo sono stati caricati e posizionati su rack nel corrispondente cassetto ed è stato avviato il protocollo di processazione.

In figura 18 è schematizzato il processo di purificazione eseguito dallo strumento.



**Figura 18. Procedimento di purificazione eseguito dal sistema QIASymphony DSP Virus/pathogen.** La procedura di purificazione comprende 4 fasi: lisi, legame, lavaggio ed eluizione. Precisamente, i campioni vengono lisati nella stazione di lisi, poi gli acidi nucleici si legano alla superficie delle particelle magnetiche e vengono lavati per rimuovere i contaminanti. Infine l'acido nucleico purificato viene eluito.

### 3.4 Allestimento delle reazioni di amplificazione (Real-time PCR) tramite un funzionamento integrato del sistema QIASymphony SP/AS

Le reazioni di amplificazioni sono state allestite in maniera automatica tramite il sistema integrato QIASymphony SP/AS.

I campioni purificati con QIASymphony SP sono stati trasferiti automaticamente attraverso il modulo di trasferimento al QIASymphony AS; sono stati impostati i valori necessari per l'allestimento delle reazioni di Real-time PCR (figura 19).

Tutti i reagenti necessari, contenuti nel GeneNav™ HPV One qPCR Kit (GenomeMe-CANADA), sono stati caricati negli appositi contenitori dello strumento. Terminato il processo, le reazioni sono state scaricate dallo strumento e caricate nello strumento per la Real-time PCR (Rotor Gene Q).

Reazione qPCR/campione	
	µl
Diagnostic 2X qPCR Master Mix-No Dye (E-1S)	10
GeneNav™ HPV Primers (E114-A)	1
GeneNav™ HPV Probes (E114-B)	1
Nuclease-free water (E0)	6
Campione o NTC	2
Totale	20

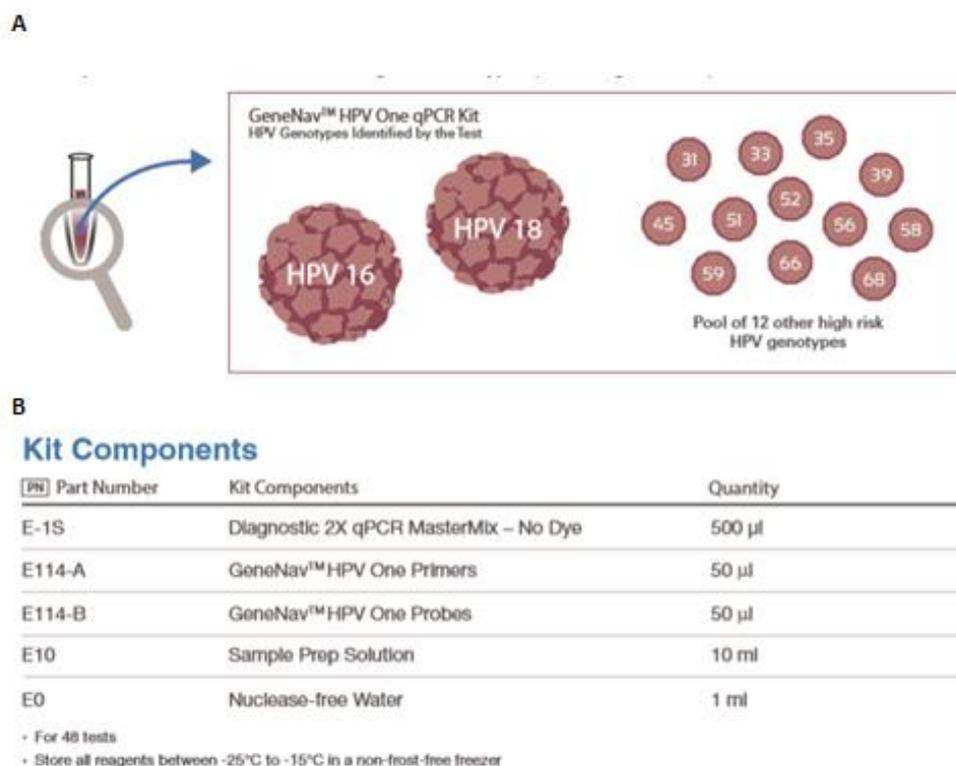
Figura 19. Allestimento reazioni qPCR.

### 3.4.1 GeneNav™ HPV One qPCR Kit (GenomeMe- CANADA)

Il kit utilizzato per l'analisi biomolecolare è rappresentato dal kit GeneNav™ HPV One qPCR Kit (GenomeMe- CANADA). Esso viene utilizzato in combinazione con il kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi attraverso l' utilizzo del modulo QIASymphony SP per la purificazione ed estrazione del DNA, con il modulo QIASymphony AS per l' impostazione del dosaggio di PCR ed infine per mezzo dell' utilizzo del Rotor-Gene Q è possibile eseguire l' amplificazione e quindi il rilevare il DNA di agenti patogeni.

Questo kit diagnostico in vitro è progettato per uno screening iniziale rapido degli individui per la presenza di 14 genotipi di HPV ad alto rischio; in particolar modo, consente il rilevamento e la discriminazione specifica tra HPV 16, HPV 18 e il rilevamento in pool non specifico degli altri 12 genotipi di HPV ad alto rischio (HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 58, HPV 59, HPV 66 e HPV 68)(figura 20(A)). Nel kit GeneNav™ HPV One qPCR viene utilizzato anche un controllo interno della  $\beta$ -Actina per valutare la qualità di estrazione dei campioni e garantire l'affidabilità dei risultati di rilevamento dell'HPV.

I reagenti contenuti nel kit sono riportati in figura 20 (B).



**Figura 170. GeneNav™ HPV One qPCR Kit-HPV . A) Genotipi rilevati ed identificati dal test; B) Reagenti del Kit.**

Il kit GeneNav™ HPV One qPCR utilizza la tecnologia qPCR basata su sonda per rilevare HPV con elevata specificità. Ogni sonda sequenza-specifica contiene un fluoroforo 5' e un quencer al 3'. I 14 tipi di HPV ad alto rischio ed il controllo interno della  $\beta$ -actina umana sono rilevati ed identificati utilizzando 4 canali di fluorescenza in una singola provetta: FAM, HEX, ROX e Cy5 (figur21). I primer utilizzati nell' amplificazione sono oligonucleotidi universali disegnati sulla regione genomica codificante le proteine E6/E7 (Dictor M. et al., 2011).

Canali	Eccitazione (nm)	Rilevazione (nm)	Fluorofori qPCR	Genotipi rilevati
Verde	470 ± 10	510 ± 5	<b>FAM</b> (Fluoresceina)	HPV: 31,33,35,39,45, 51,52,56,58,59, 66,68
Giallo	530 ± 5	557 ± 5	<b>HEX</b> (Esaclorofluoresceina)	HPV 16
Arancione	585 ± 5	610 ± 5	<b>ROX</b> (X-Rodamina)	HPV 18
Rosso	625 ± 5	660 ± 10	<b>Cy5</b> (Cianina 5)	B-ACTINA UMANA

Figura 21. I 4 canali di fluorescenza e i relativi fluorofori utilizzati dal kit.

### 3.4.1.1 Specificità, sensibilità e riproducibilità del Kit

Tutte le caratteristiche performanti, presenti nel datasheet, sono riportate in figura 22.

Caratteristiche performanti del kit	
Sensibilità analitica	130 copie/reazione per tutti i 14 tipi di HPV
Specificità analitica	non sono state osservate reazioni incrociate con altri patogeni testati *
Riproducibilità	coefficiente di variazione (CV) (tra diversi lotti ed operatori) <5%

\* Patogeni testati con il kit: *Candida Albicans*, *Proteus vulgaris*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mitis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus pyogenes*, *Herpes simplex virus, type 1 and 2 (HSV-1 and 2)*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1 pol and env regions)*, and *Mycoplasma hominis*

Figura 22. Caratteristiche performanti del kit.

### 3.5 Amplificazione del genoma virale di HPV tramite Real-time PCR (Rotor-Gene Q Mdx 5plex HRM)

Dopo aver allestito le reazioni di amplificazione tramite il sistema integrato QIASymphony SP/AS, le provette sono state caricate nel Rotor-Gene QMdx 5plex HRM (QIAGEN) per l'amplificazione del genoma virale tramite Real-time PCR. Le condizioni di amplificazioni sono mostrate in figura 23.

gradi (°C)	Tempo	Cicli di amplificazione
95°C	10 min	1
95°C	15 sec	40
61°C	60 sec	

Figura 23. Condizioni di amplificazione impostate nel Rotor-Gene Q.

### 3.6 Analisi dei risultati dell' amplificazione

La verifica dell' amplificazione dei campioni è stata possibile grazie alla presenza del controllo interno della  $\beta$ -actina umana, indicatore anche della qualità del DNA estratto.

I risultati sono stati analizzati secondo i seguenti criteri:

1. Se il controllo interno della  $\beta$ -actina umana (Cy5) mostra un valore di Ct > 37, il saggio di amplificazione non viene ritenuto valido a causa della poca o scarsa qualità del DNA estratto;
2. Se il controllo interno della  $\beta$ -actina umana (Cy5) mostra un valore di Ct < 37 e, i genotipi di HPV (FAM, HEX e ROX) hanno un Ct > 37, i campioni risultano negativi per i 14 HPV rilevati dal kit;
3. Se il controllo interno della  $\beta$ -actina umana (Cy5) mostra un valore di Ct <37 e, uno o più genotipi mostrano un Ct < 37, il campione o i campioni risultano positivi ai relativi HPV rilevati.

## **4. RISULTATI**

Le analisi svolte in questo studio sono state effettuate su un totale di 54 persone con età media di  $37,31 \pm 8,10$  anni. Le analisi dei liquidi seminali pervenuti in laboratorio, hanno permesso la seguente classificazione dei pazienti:

- 20 pazienti con normospermia;
- 20 pazienti con astenozoospermia;
- 14 pazienti con oligoastenozoospermia.

Nella tabella 1 sono riportati i valori medi delle caratteristiche/parametri ottenuti dall'anamnesi del paziente e dall'analisi del liquido seminale effettuata secondo il "Manuale di laboratorio WHO per l'esame del liquido seminale" del 2010.

Dai dati presenti in tabella 1, è evidente come i pazienti affetti da oligoastenozoospermia rispetto ai pazienti con normospermia abbiano valori inferiori sia nella conta che nella motilità spermatica progressiva; questa differenza è risultata essere statisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

Anche i pazienti affetti da astenozoospermia hanno una motilità spermatica progressiva inferiore statisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) rispetto a quelli con normospermia.

**Tabella 1. Caratteristiche dei partecipanti e parametri dell'analisi del liquido seminale della popolazione in studio.** In tabella sono riportati le caratteristiche dei pazienti ed i valori medi ottenuti dallo spermioγραμμα; in rosso, è stato evidenziato lo P value che indica le significatività statistiche ottenute tramite l'analisi statistica (t-test) effettuata su GraphPad.

Caratteristiche/parametri	Pazienti con normospermia (n=20)	Pazienti con Astenozoospermia (n=20)	Pazienti con oligoastenozoospermia (n=14)
Età media (Anni + SD*)	33,25 ± 6,93	39,95 ± 8,02	39,35 ± 7,91
Fumatori (n)	9	9	5
Varicocele accertato (n)	3	3	3
Idrocele (n)	0	1	0
Altro (es. lavoro a rischio, infezioni urinarie ecc...) (n)	8	5	5
Conta spermatica (milioni/ml)	83,45 ± 46,14	71,1 ± 52,26	<u>6,05 ± 4,48**</u> <u>(p &lt; 0,0001)</u>
Motilità spermatica totale (%)	67,87 ± 10	43,2 ± 11,52	44,21 ± 10,95
Motilità spermatica progressiva (%)	51,83 ± 9,21	<u>21,25 ± 6,26**</u> <u>(p &lt; 0,0001)</u>	<u>23,5 ± 5,74**</u> <u>(p &lt; 0,0001)</u>
Morfologia normale (%)	27,66 ± 6,76	22,6 ± 8,63	14,74 ± 5,79

SD\* = standard deviation

\*\* = valore al di sotto del minimo di riferimento (conta: => 15 milioni/ml; motilità spermatica progressiva: => 32%)

P = P value

Dopo aver raccolto e raggruppato i liquidi seminali dei 3 gruppi di pazienti, sono state eseguite le analisi di estrazione del DNA e di rilevazione di HPV, rispettivamente tramite il kit diagnostico QIASymphony DSP Virus/Pathogen e GeneNav™ HPV One qPCR Kit (GenomeMe- CANADA).

Nella tabella 2, sono riportati tutti i campioni analizzati, con le relative diagnosi degli spermogrammi ed i risultati della rilevazione di HPV.

Tutti i campioni sono risultati negativi alla presenza di uno dei 14 genotipi di HPV ad alto rischio (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,59,66 e 68) rilevati dal kit utilizzato.

**Tabella 2. Risultati ottenuti tramite Real-time PCR utilizzando il GeneNav™ HPV One qPCR Kit (GenomeMe- CANADA).** In tabella sono riportate le diagnosi degli spermogrammi dei pazienti ed il risultato della rilevazione di HPV; le reazioni di amplificazione per la rilevazione del virus sono state allestite in maniera automatica tramite un funzionamento integrato del sistema QIASymphony SP/AS. Lo strumento è stato impostato per allestire reazioni in un volume totale di 20 µl: 10 µl di Diagnostic 2X qPCR Master-mix no Dye, 1 µl di GeneNav™ Primers, 1 µl di GeneNav™ Probes, 6 µl di Nuclease-free water e 2 µl di DNA o NTC.

Campioni clinici (ID)	Diagnosi spermogramma	HPV-test (GeneNav™ HPV One qPCR Kit)
ID 1	Astenozoospermia	-
ID 2	Oligoastenozoospermia	-
ID 3	Astenozoospermia	-
ID 4	Oligoastenozoospermia	-
ID 5	Astenozoospermia	-
ID 6	Oligoastenozoospermia	-
ID 7	Astenozoospermia	-
ID 8	Oligoastenozoospermia	-
ID 9	Oligoastenozoospermia	-
ID 10	Oligoastenozoospermia	-

ID 11	Oligoastenozoospermia	-
ID 12	Oligoastenozoospermia	-
ID 13	Astenozoospermia	-
ID 14	Astenozoospermia	-
ID 15	Astenozoospermia	-
ID 16	Astenozoospermia	-
ID 17	Oligoastenozoospermia	-
ID 18	Oligoastenozoospermia	-
ID 19	Astenozoospermia	-
ID 20	Astenozoospermia	-
ID 21	Astenozoospermia	-
ID 22	Oligoastenozoospermia	-
ID 23	Astenozoospermia	-
ID 24	Astenozoospermia	-
ID 25	Astenozoospermia	-
ID 26	Astenozoospermia	-
ID 27	Astenozoospermia	-
ID 28	Astenozoospermia	-
ID 29	Astenozoospermia	-
ID 30	Oligoastenozoospermia	-
ID 31	Astenozoospermia	-

ID 32	Oligoastenozoospermia	-
ID 33	Normospermia	-
ID 34	Normospermia	-
ID 35	Normospermia	-
ID 36	Normospermia	-
ID 37	Normospermia	-
ID 38	Astenozoospermia	-
ID 39	Normospermia	-
ID 40	Normospermia	-
ID 41	Normospermia	-
ID 42	Normospermia	-
ID 43	Normospermia	-
ID 44	Oligoastenozoospermia	-
ID 45	Normospermia	-
ID 46	Normospermia	-
ID 47	Normospermia	-
ID 48	Normospermia	-
ID 49	Normospermia	-
ID 50	Normospermia	-
ID 51	Normospermia	-
ID 52	Normospermia	-

ID 53	Normospermia	-
ID 54	Normospermia	-

## **5. DISCUSSIONE**

Il Papilloma virus umano (HPV) è un' infezione virale a trasmissione sessuale molto comune nel mondo (Dadashi M. et al., 2017), caratterizzata da diverse manifestazioni cliniche sia nella donna che nell' uomo.

Sebbene sia un'infezione comune in entrambi i sessi, nella donna è stata maggiormente studiata ed analizzata, in quanto legata all' insorgenza del tumore alla cervice uterina; per quanto riguarda il genere maschile, essendo legato a manifestazioni cliniche di lieve entità (ad eccezioni di rari casi, come spiegato nei capitoli precedenti), ha destato poco interesse.

Proprio per questo motivo, data la scarsità degli studi epidemiologici presenti sugli uomini, la mancanza di un test diagnostico come "gold standard" nella rilevazione di infezioni sub-cliniche da HPV, è molto difficile dare una stima precisa e puntuale dell' incidenza e della prevalenza dell'infezione da HPV nel maschio (Nasseri S. et al., 2015) tuttavia, si stima che circa il 65-70% degli uomini contraggano un'infezione da uno o più genotipi di HPV durante l'arco della propria vita, con un andamento differente da quello riportato per il genere femminile (Smith J.S. et al., 2011; Giuliano A.R. et al., 2008).

Un argomento di recente interesse da parte di coloro che si occupano delle patologie da HPV nel maschio, è quello riguardante il legame tra l'HPV e la fertilità maschile. Infatti, studi recenti hanno mostrato che, l'HPV (rilevato nel liquido seminale in circa il 10% di uomini asintomatici sessualmente attivi) è in grado di legarsi agli spermatozoi, andando a ridurre in maniera significativa la loro motilità (Nasseri S. et al., 2015) e, qualora questi fossero in grado di fecondare l'ovocita, di interferire con lo sviluppo dell'embrione, riducendone le possibilità di sopravvivenza tramite l'infezione dell'ovocita (studi effettuati in fecondazione assistita) (Garolla A. et al., 2013; Garolla A. et al., 2011).

Nasseri S. et al. (2015) in un loro studio su pazienti Iranian, oltre a dimostrare l'alterazione dei parametri principali degli spermatozoi, hanno rilevato una significativa relazione tra le infezioni da HPV e pazienti con oligospermia e azoospermia, rispettivamente con una frequenza del 30% e del 40%. Nello stesso studio, è stata indicata anche la distribuzione dei 26 genotipi di HPV analizzati e, tra i pazienti risultati HPV+, i genotipi a basso rischio oncogeno HPV 6,11 e 42 sono stati quelli più frequenti rispetto agli altri.

Anche Moghimi M. et al. (2019), in uno studio effettuato recentemente su uomini Iranian infertili, hanno dimostrato che l'HPV, andando ad alterare la motilità, la conta e la morfologia degli spermatozoi, rappresenta un potenziale fattore di rischio per l'infertilità maschile; inoltre,

hanno rilevato anche una prevalenza di HPV ad alto rischio in uomini infertili (11.43%) significativamente più elevata rispetto a quella in uomini fertili.

Per questo motivo, sulla base di pochi dati presenti in letteratura e dei lavori sopracitati, vista l'importanza dell'infezione da HPV nel maschio ed i problemi relativi alla sua fertilità, in questo lavoro siamo andati a ricercare un'eventuale presenza di HPV ad alto rischio in uomini con problematiche di astenozoospermia (problemi riguardanti la motilità spermatica progressiva) e oligoastenozoospermia (problemi riguardanti la conta spermatica e la motilità progressiva), andando poi a valutare, qualora fosse stato possibile, una possibile correlazione tra le due patologie e l'infezione da HPV.

La prima parte della ricerca si è basata sulla raccolta dei liquidi seminali e sulla loro analisi secondo il "Manuale di laboratorio WHO per l' esame del liquido seminale" del 2010. Nella raccolta dei campioni, non ci sono state limitazioni particolari e stringenti per cui, sono stati presi in considerazione tutti i campioni pervenuti in laboratorio che avessero avuto una diagnosi di astenozoospermia e oligoastenozoospermia.

Successivamente, sono stati analizzati attraverso analisi biomolecolari, grazie all'utilizzo di due strumenti: il sistema QIASymphony SP/AS (QIAGEN) e il Rotor Gene Q. Il sistema QIASymphony SP/AS è uno strumento formato da due moduli integrati, che hanno permesso di effettuare automaticamente sia l'estrazione del DNA che l'allestimento delle reazioni per la successiva amplificazione. Questo ha permesso di analizzare numerosi campioni, ottenendo dei risultati più accurati e privi di eventuali contaminazioni. Per le analisi di amplificazione è stato utilizzato il kit GeneNav<sup>TM</sup> HPV One qPCR (GenomeMe- CANADA) generalmente utilizzato per le analisi di tamponi cervicali, ma che comunque, sebbene la matrice biologica differente, ha permesso una corretta amplificazione dei nostri campioni.

I campioni analizzati sono risultati tutti negativi alla presenza dei genotipi di HPV ad alto rischio (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66,68), rilevati dal kit. Dal momento che , il controllo della  $\beta$ -actina umana presente in ogni campione, è stato amplificato correttamente, presentando in tutti i campioni un  $C_t < 37$  (necessario per la buon riuscita del saggio di amplificazione), i risultati negativi hanno portato alle seguenti riflessioni:

- Innanzitutto, è bene considerare che le patologie legate all'infertilità maschile sono causate da numerosi fattori di rischio e che, l'infezione da HPV potrebbe rappresentare solamente uno di essi. Quindi, non è detto che tutti i pazienti affetti da astenozoospermia e/o oligoastenozoospermia siano associati ad un'infezione da HPV. In questo lavoro sono stati

considerati tutti i pazienti con entrambe le problematiche, indipendentemente dalla loro storia clinica. Infatti, tra quelli arruolati nello studio, 6 hanno problemi di varicocele (dilatazione ed incontinenza delle vene testicolari) e 1 ha problemi di idrocele (accumulo anomalo di liquido trasparente presente nello scroto, tutt'attorno ai testicoli); in questi casi, le patologie potrebbero essere determinate dalla presenza di altri fattori e, non dall'infezione da HPV.

- Il saggio utilizzato in questo studio presenta delle limitazioni.

Una di queste, è rappresentata dalla considerazione esclusivamente dei genotipi di HPV ad alto rischio rilevati dal kit utilizzato; perciò, il risultato negativo per la presenza di HPV ad alto rischio, non esclude la positività agli altri genotipi a basso rischio non identificati dal nostro saggio. A tal proposito, un lavoro di Nasser S. et al. (2015) ha messo in evidenza che, nei liquidi seminali, si rileva con maggiore frequenza infezioni da HPV a basso rischio rispetto a quelle ad alto rischio e questo, in parte, potrebbe spiegare il fatto che nel nostro studio non siano state rilevate infezioni da HPV ad alto rischio. Tuttavia, in un lavoro sopra citato, è stata comunque rilevata un certa prevalenza (11,43%) di HPV ad alto rischio in uomini infertili (Moghimi M. et al., 2019).

- Un'altra limitazione è rappresentata dal numero di campioni utilizzati nel saggio. Difatti, considerando gli altri lavori presenti in letteratura scientifica, dove il numero totale dei campioni considerati è stato minimo 100 (ogni gruppo di studio costituito da un minimo di 20 ad un massimo di 70 pazienti), in questo lavoro sono stati considerati solamente 54 campioni totali: 20 per i pazienti con normospermia, utilizzati per effettuare un'eventuale correlazione e 34 per i pazienti con astenozoospermia (20) e oligoastenozoospermia (14).

Tenendo in considerazione le limitazioni sopra citate, i risultati ottenuti non hanno mostrato nessuna prevalenza e correlazione delle infezioni da HPV ad alto rischio con i problemi di astenozoospermia e oligoastenozoospermia. Tuttavia, questi risultati hanno messo in evidenza una grande problematica presente nella diagnosi di HPV. Infatti, nella diagnostica molecolare di laboratorio, tutti i test di screening utilizzati, non potendo testare ed identificare tutti gli oltre 170 genotipi di HPV scientificamente isolati, si concentrano sulla ricerca di HPV ad alto rischio più comuni tra la popolazione (in particolar modo, nel genere femminile); questo però, porterebbe ad escludere tutte quelle infezioni causate da HPV a basso rischio, che potrebbero essere importanti nel maschio per la sua fertilità. Dal momento che l'HPV sembra associarsi ad

alterazioni della qualità del liquido seminale, dovrebbe essere data una maggiore attenzione a tale infezione, soprattutto negli uomini con diagnosi di infertilità idiopatica.

Ad oggi, nessun trattamento effettivo né strategie di controllo sono disponibili per la cura dell'HPV, anche se nella maggior parte dei casi l'infezione va incontro ad una risoluzione spontanea nell'arco di qualche anno; tuttavia, in alcune persone, l'infezione molte volte risulta essere del tutto asintomatica. Per questi motivi, la mancanza di programmi di screening mirati alle patologie HPV-correlate nell'uomo può determinare l'instaurarsi di un serbatoio dell'infezione attivo, con alto rischio di trasmissibilità al partner. Per questo motivo, anche se tale infezione non può essere considerata mortale nel maschio, la presenza del virus dovrebbe essere diagnosticata, in quanto può essere considerata un fattore di rischio non solo per l'infertilità maschile, ma anche per la donna (soggetto più a rischio per l'insorgenza del tumore alla cervice uterina).

In conclusione, visto che, ad oggi sono presenti ancora pochi dati relativi alle infezioni da HPV nel maschio, bisognerebbe effettuare altri studi che vadano sia a rilevare la presenza e la prevalenza dei diversi genotipi di HPV nel maschio, ma anche ad identificare i meccanismi anatomofisiologici che si celano dietro questa infezione. Questi potrebbero rappresentare un nuovo traguardo sia per lo sviluppo di nuovi test di screening che per un eventuale trattamento non invasivo per la cura dell' HPV.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR., 2015. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*; 13:37.
- Apter, D. et al. (2015); Efficacy of human papillomavirus 16 and 18 (HPV-16/18) AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer in young women: final event-driven analysis of the randomized, double-blind PATRICIA trial. *Clin Vaccine Immunol.*, 22, c 361–673.
- Bacelieri R, Johnson SM, 2005. Cutaneous Warts: An Evidence-Based Approach to Therapy. *Am Fam Physician*; 72: 647-52.
- Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J et al., 2004. Epidemiological and clinical aspect of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol.*; 14: 95-105.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al., 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*; 401(1): 7079.
- Bernard Hu, 1994. Coevolution of papillomaviruses with human population. *Trends Microbiol*; 2: 140-43.
- Beutner KR, Tying S, 1997. Human papillomavirus and human disease. *Am J Med*; 102: 9-15.
- Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ, 2007. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril*; 87(5): 1087-1097.
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M et al., 2008. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*; 26S:K1-16.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V, 2009. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. "A review of human carcinogens - Part B: biological agents." *Lancet Oncol*; 10:321.
- Bravo IG, Alonso A, 2007. Phylogeny and evolution of papillomaviruses based on the E1 and E2 proteins. *Virus Genes*; 34: 249-262.
- Broccolo Francesco, 2008. Carcinoma della cervice uterina. *Eziopatogenesi e profilassi*. Springer Science e Business Media.
- Brossfield JE, Chan PJ, Patton WC & King A, 1999. Tenacity of exogenous human papillomavirus DNA in sperm washing. *J Assist Reprod Genet*; 16, 325–328.

- Brotherton, JM & Ogilvie GS, 2015. Current status of human papillomavirus vaccination. *Curr Opin Oncol*; 27, 399–404.
- Bruna Maria Cinel Correa , Ana Paula Munhoz Bolgue, Ana Paola Piloto de Oliveira, Jairo Aparecido Ayres, Bianca Sakamoto Ribeiro Paiva, 2013. Student Experience in Providing Care to a Patient With Epidermodysplasia Verruciformis. *Rev Bras Enferm*; 66 (4), 615-8.
- Capra G et al.,2015. Analysis of persistence of human papillomavirus infection in men evaluated by sampling multiple genital sites. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*; 19, 4153–4163.
- Carozzi F, Confortini M, Cecchini S, et al., 2001. HPV testing for cervical neoplasia. *Acta Cytol*; 45: 659-61.
- Chan PJ, Su BC, Kalugdan T, Seraj IM, Tredway DR & King A, 1994. Human papillomavirus gene sequences in washed human sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril*; 61, 982–985.
- Chaturvedi, A. K. et al., 2011. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*; 29, 4294–4301.
- Chong T, Apt D, Gloss B, 1991. The enhancer of human papillomavirus type 16: Binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1 and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol*; 65: 5933-43.
- Chow L.T. and Broker TR, 1997. Small DNA tumor viruses. In: *Viral Pathogenesis Eds: Nathanson N., Ahmed R., Gonzalez-Scarano F., Griffin D.E., Holmes K.V., Murphy F.A. and Robinson L., Rippincott-Raven; Philadelphia: 267-301.*
- Connelly DA, Chan PJ, Patton WC & King A, 2001. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol*; 184, 1068–1070.
- Culp TD, Budgeon LR, Christensen ND, 2006. Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. *Virology*; 347 (1): 147-59.
- D'Souza, G. et al., 2007. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*; 356, 1944–1956.
- Dadashi M., Vaezjalali M., Fallah F., Goudarzi H., Nasiri M.J., Owlia P., et al., 2017. Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infection among Iranian women identified with cervical infections: a systematic review and meta-analysis of national data. *IEM*; 3(2): 68-72.
- Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, et al., 2012. Members of LAST Project Work Groups. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American

Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med*; 136(10):1266–1297

- Datta J, Palmer MJ, Tanton C, Gibson LJ, Jones KG, Macdowall W, Glasier A, Sonnenberg P, Field N, Mercer CH et al., 2016. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Hum. Reprod*; 31, 2108–2118.
- De Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S, 2017. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*; 141(4): 664-670.
- De Sanjosè S, Diaz M, Castellsagué X et al., 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*; 7:453-9.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H, 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*; 324:17–27.
- Depuydt CE, Beert J, Bosmans E, Salembier G, 2016. Human Papillomavirus (HPV) virion induced cancer and subfertility, two sides of the same coin. *Facts, views & vision in ObGyn*; 8(4):211–22
- Dictor M. & Warenholt J, 2011. Single- tube multiplex PCR using type-specific E6/E7 primers and capillary electrophoresis genotypes 21 human papillomaviruses in neoplasia.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L, 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*; 352 (6338): 824-7.
- Doosti M, Bakhshesh M, Hatami A, Taghipour-Zahir S, Moghimi M, Shayestehpour M, 2014. The relationship of low-risk (6, 11) and high-risk types (16, 18) of papilloma virus and human breast cancer in women. *Journal of Isfahan Medical School*; 32(279): 368-387. 5.
- Doosti M, Bakhshesh M, Zahir ST, Shayestehpour M, Karimi-Zarchi M, 2016. Lack of evidence for a relationship between high risk human papillomaviruses and breast cancer in Iranian patients. *Asian Pac J Cancer Prev*; 17(9): 4357-4361
- Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR, 2006. Prevalence of HPV infection among men: a systematic review of the literature. *J Infect Dis*; 194(8):1044–57.
- Elmi AA, Bansal D, Acharya A, Skariah S, Dargham SR, AbuRaddad LJ, et al., 2017. Human papillomavirus (HPV) infection: molecular epidemiology, genotyping, seroprevalence and associated risk factors among Arab women in Qatar. *PLoS One*; 12(1): e0169197
- Feng Q, Kiviat NB. 2003. Human Papillomavirus. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*, 8a ed., ASM Press, Washington; 1512-23

- Ferris D, Samakoses R, Block SL, Lazcano-Ponce E, Restrepo JA, Reisinger KS, et al., 2014. Long-term Study of a Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine. *Pediatrics*; 134(3):e657–65.
- Foresta C, Ferlin A, Bertoldo A, Patassini C, Zuccarello D & Garolla A, 2011°. Human papilloma virus in the sperm cryobank: an emerging problem?. *Int J Androl*; 34, 242–246.
- Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, Moretti A, Barzon L & Palu G, 2010a. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril*; 93, 802–806.
- Foresta C, Noventa M, De Toni L, Gizzo S, Garolla A, 2015b. HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systematic literature review to a possible clinical management proposal. *Andrology*; 3:163-73.
- Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L & Ferlin A, 2011b. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS ONE*; 6, e15036.
- Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, et al., 2011. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One*; 6(3): e15036.
- Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palu G & Garolla A, 2010b. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril*; 94, 1723–1727.
- Foresta, C. et al., 2015. HPV prophylactic vaccination in males improves the clearance of semen infection. *EBioMedicine*; 2, 1487–93 82015.
- Frazer Ian H, 2004. Prevention of cervical Cancer through Papillomavirus Vaccination. *Nature Reviews Immunology*; 4 (1):46-54.
- Frega A, Di Renzi F, Palazzetti PL, et al., 1992. Laser CO<sub>2</sub>: results of treatment of HPV lesions in male the partner. *Minerva Ginecol*; 44(6): 297-9.
- Garolla A, Lenzi A, Palu G, Pizzol D, Bertoldo A, De Toni L & Foresta C, 2012a. Human papillomavirus sperm infection and assisted reproduction: a dangerous hazard with a possible safe solution. *Hum Reprod*; 27, 967–973.
- Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, De Toni L, Barzon L & Foresta C, 2013. Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertil Steril*; 99, 125–131.
- Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, Ghezzi M, Carraro U, Ferlin A & Foresta C, 2012b. Testicular cancer and HPV semen infection. *Front Endocrinol*; 3, 172.

- Garolla A, Pizzol D, Foresta C, 2011. The role of human papillomavirus on sperm function. *Curr Opin Obstet Gynecol*; 23:232-7.
- Gilbert DM, Cohen SN, 1987. Bovine papillomavirus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell*; 50: 59-68.
- Giorgi Rossi P, Chini F, Borgia P, et al., 2012. Epidemiologia del Papillomavirus umano (HPV), incidenza del cancro della cervice uterina e diffusione dello screening: differenze fra macroaree in Italia. *Epidemiol Prev*; 36(2):108-119
- Gizzo S, Ferrari B, Noventa M, Ferrari E, Patrelli TS, Gangemi M & Nardelli GB, 2014. Male and couple fertility impairment due to HPV DNA sperm infection: update on molecular mechanism and clinical impact—systematic review. *Biomed Res Int*, Article; ID 230263.
- Han JJ, Beltran TH, Song JW, Klaric J & Choi YS, 2017. Prevalence of Genital Human Papillomavirus Infection and Human Papillomavirus Vaccination Rates Among US Adult Men: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) *JAMA Oncol*; 20132014.
- Harper DM, Franco EL, Wheller CM, et al., 2006. Sustained efficacy up to 4.5 years of bivalent L1 virus-like particle vaccine against a human papillomavirus type 16 and 18: follow-up from a randomised trial. *Lancet*; 367: 1247-55.
- Harper DM et al., 2006. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*; 367, 1247–1255.
- Harwood CA, Spink PJ, Suretheran T, et al., 1999. Degenerate and nested PCR: A highly sensitive and specific method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *J Clin Microbiol*; 37: 3545-55. 135.
- Hermonat PL et al., 1997. Human papillomavirus in more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus genes*; 14, 13-17.
- Howley PM, Lowy DR, 2001. Papillomaviruses and their replication. In *Fields: Knipe BN, Howley DM, Fields PM. Virology 4a ed., Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia; 2197-29.*
- Hubbard RA, 2003. Human Papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med*; 127: 940-5.
- Kjaer SK, Svare EI, Worm AM, et al., 2001. Human papillomavirus infection in Danish female sex workers. Decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. *Sex Transm Dis*; 27(8): 438-45.
- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N et al., 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Prot Nat Acad Sci USA*; 89:12180-84.

- Klumpp DJ, Laimins LA, 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology*; 257: 239-46.
- Krausz C, 2011. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; 25(2):271–85.
- Lacey CJN, 2005. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *J Clin Virol*; 32S: S82-S90.
- Lai YM, Lee JF, Huang HY, Soong YK, Yang FP & Pao CC, 1997. The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility. *Fertil Steril*; 67, 1152–1155.
- Laprise C, Trottier H, Monnier P, Coutlee F & Mayrand MH, 2014. Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*; 29, 640–651.
- Laura Svidler López, Luciana La Rosa, 2019. Human Papilloma Virus Infection and Anal Squamous Intraepithelial Lesions. *Clin Colon Rectal Surg*; 32:347–357.
- Lee CA, Huang CT, King A & Chan PJ, 2002. Differential effects of human papillomavirus DNA types on p53 tumor-suppressor gene apoptosis in sperm. *Gynecol Oncol*; 85, 511–516.
- Lenzi A, Mirone V, Gentile V, Bartoletti R, Ficarra V, Foresta C, Mariani L, Mazzoli S, Parisi SG, Perino A, Picardo M & Zotti CM, 2013. Rome Consensus Conference – statement; human papilloma virus diseases in males. *BMC Public Health*; 13, 117.
- Lillo FB, 2006. Il virus HPV: caratteristiche virologiche, ciclo replicativo, patogenesi e risposta immune. *STD news*; 26: 4-6.
- Longworth MS, Laimins LA, 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*; 78 (7): 3533-41.
- Lowy DR, Howley PM, 2011. Papillomaviruses. In Fields Knipe BN, Howley DM, Fields PM. *Virology*, 4a ed., Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia; 2231-64.
- Lymaye A, Connor AJ, Huang X, Luff R, 2003. Comparative analysis of conventional Papanicolaou tests and a fluid-based thin-layer method. *Arch Pathol Lab Med*; 127: 200-4.
- Lyu Z et al., 2017. Human papillomavirus in semen and the risk for male infertility: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*; 17, 714.
- Malagón T et al. 2012. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*; 12, 781–789.

- Manos MM, Kinney LB, Hurley LB et al., 1999. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA*; 281: 1605-10.
- Markowitz LE, Dunne WF, Siraiya M, et al., 2007. Quadrivalent Human papillomavirus Vaccine, Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR*; 56(RR-2): 1-24.
- Martorell M, Gil-Salom M, Perez-Valles A, Garcia JA, Rausell N, Senpere A, 2005. Presence of human papillomavirus DNA in testicular biopsies from nonobstructive azoospermic men. *Arch Pathol Lab Med*; 129(9):1132-6.
- McBride AA, 2017. Oncogenic human papillomaviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 372(1732).
- Moghimi M, Zabihi Mahmoodabadi S, Kheirkhah Wakilabad A, Kargar Z, 2019. Significant correlation between high-risk HPV DNA in semen and impairment of sperm quality in infertile men. *Int J Fertil Steril*; 12, 306–309.
- Mohanty KC, Lowe JM, 1990. Cryotherapy in the management of histologically diagnosed subclinical human papillomavirus (HPV) infection of the cervix. *Br Clin Pract*; 44(12): 574-7.
- Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ, 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*; 32 Suppl 1: S43-51.
- Morris BJ, Rose BR, 2007. Cervical screening in the 21st century: the case for human papillomavirus testing of self-collected specimens. *Clin Chem Lab Med*; 45(5): 577-91.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, et al., 2004 Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virol*; 78(21): 11451-60.
- Muñoz N., Xavier Castellsagué, Amy Berrington de González, Lutz Gissmann, 2006. Chapter 1: HPV in the Etiology of Human Cancer. *Vaccine*; 24 Suppl 3, S3/1-10.
- Nanda K, McCrocy DC, Myers ER, et al., 2000. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med*; 132: 810-19.
- Naud PS, Roteli-Martins CM, De Carvalho NS, Teixeira JC, de Borba PC, Sanchez N, et al., 2014. Sustained efficacy, immunogenicity, and safety of the Hpv-16/18 AS04-adjuvanted vaccine. *Hum Vaccin Immunother*; 10(8):2147–62
- Paavonen, J. et al., 2009. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*; 374, 301–314.
- Palefsky J, 2008. Human papillomavirus and anal neoplasia. *Curr HIV/ AIDS Rep*; 5(02):78–85.

- Palefsky, J. M. et al., 2011. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med*; 365, 1576–1585.
- Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, Ruvolo G, Fiorentino FP, Alimondi P, Cefalù E, Ammatuna P, 2011. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: Impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril*; 95, 1845–1848.
- Pils S & Joura EA, 2015. From the monovalent to the nine-valent HPV vaccine. *Clin Microbiol Infect*; 21, 827–833.
- Pimenoff VN, Féllez-Sánchez M, Tous S, et al., 2015. Disagreement in high-grade/low-grade intraepithelial neoplasia and high-risk/ low-risk HPV infection: clinical implications for anal cancer precursor lesions in HIV-positive and HIV-negative MSM. *Clin Microbiol Infect*; 21(06):605.e11–605.
- Polis CB, Cox CM, TuncMcLain AC, Thoma ME, 2017. Estimating infertility prevalence in low-to-middle-income countries: An application of a current duration approach to Demographic and Health Survey data. *Hum Reprod*; 32,1064–1074.
- Proshin SN, Glushakov RI, Semenova IV, Vorobtsova IN, Saikovskaia LA, Tapil'skaia NI, 2013. Clinical and immunological efficiency of sodium nucleospermate in treating chronic endometritis and infertility complicated by HPV infection. *Eksp Klin Farmakol*; 76(3):27-30.
- Richwald GA, 1999. Imiquimod. *Drugs Today (Barc)*; 35(7): 497-511.
- Rintala MA, Pöllänen PP, Nikkanen VP, Grenman SE & Syrjanen SM, 2002. Human papillomavirus DNA is found in the vas deferens. *J Infect Dis*; 185, 1664–1667
- Rivera A, Tyring SK, 2004. Therapy of human papillomavirus of infections. *Dermatol Ther*; 17(6): 441-8.
- Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, et al., 2006. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controller trial. *Lancet Oncol*; 7: 547-55.
- Schiffman M, Adriansa ME, 2000. ASCUS-LSIL Triage Study. Design, methods and characteristics of trial participants. *Acta Gytol*; 44: 726-42.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, et al., 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*; 370(9590): 890-907.
- Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM, 2009. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer*; 4:8.
- Schillaci R, Capra G, Bellavia C, Ruvolo G, Scazzone C, Venezia R & Perino A, 2013. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil Steril*; 100, 1236–1240.

- Schiller, JT, Castellsagué X & Garland, SM, 2012. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine*; 30(Suppl 5), F123–138.
- Schiller JT, Lowy DR, 2012. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol*; 10, 681–692.
- Schlecht NF, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2003; 103(4): 519-24.
- Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, et al., 2003. Clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol*; 201(1): 1-6.
- Schneider V, Henry MR, Jimenez-Ayala M, et al., 2001. Cervical cancer screening, screening errors and reporting. *Acta Cytol*; 45(4): 493-8.
- Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W, 2017. Urogenital infection as a risk factor for male infertility. *Dtsch Arztebl Int*; 114(19): 339-346.
- Sen E, McLaughlin-Drubin M, Meyers C, 2005. Efficacy of two commercial preparations of interferon-alpha on human papillomavirus replication. *Anticancer Res*; 25(2A): 1091-100.
- Sibbet G, Romero-Graillet C, Meneguzzi G, 2000. Alpha6 Integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *J Gen Virol*; 81: 327-34.
- Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, et al., 1990. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol*; 71: 173-81.
- Snoeck R, Andrei G, De Clercq E, 2001. Cidofovir in the treatment of HPV-associated lesion. *Verh K Acad Geneesk Belg*; 63(2): 93-120.
- Souho T, Benlemlih M, Bennani B, 2015. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS One*; 10:e0126936.
- Spandorfer SD, Bongiovanni AM, Fasioulotis S, Rosenwaks Z, Ledger WJ, Witkin SS, 2006. Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertil Steril*; 86, 765–767.
- Stanley M, Lowy DR, Frazer I, 2006. Prophylactic vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine*; 24: S106-S113
- Stanley MA, Pett MR, Coleman N, 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans*; 35: 1456-60.
- The FUTURE II Study Group, 2007. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Lesions. *N Engl J Med*; 356: 1915-27.

- Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, Forslund O, Haga T, McBride AA, Villa LL, Burk RD, 2018. Profilo di tassonomia dei virus ICTV: Papillomaviridae. Il Journal of General Virology; 99 (8): 989–990.
- Van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, et al., 2002. Human papillomavirus 16 load and abnormal cervical scrapes: an indicator of CINII/III and viral clearance. Int J Cancer; 98: 250-59.
- Vanhooteghem O, Richert B, de la Brassinne M, 2001. Raynaud phenomenon after treatment of verruca vulgaris of the sole with intralesional injection of bleomycin. Pediatr Dermatol; 18: 249-51.
- Jeršovienė V, Gudlevičien Z, Rimienė J & Butkauskas D, 2019. Human Papillomavirus and Infertility. Medicina; 55(7), 377.
- Wakeham K, Kavanagh K, 2014. The burden of HPV-associated anogenital cancers. Curr Oncol Rep; 16(9):402.
- Wheeler CM et al., 2012. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. Lancet Oncol; 13, 100–110.
- WHO, 2006. Preparing for the introduction of Hpv vaccines: policy and programme guidance for countries
- WHO, 2009. Position Paper. Human papillomavirus vaccines. Weekly epidemiological record; 15(84):117-132.
- Yang A, Jeang J, Cheng K, Cheng T, Yang B, Wu TC, Hung CF, 2016. Current state in the development of candidate therapeutic HPV vaccines. Expert Rev Vaccines; 15(8):989-1007;
- Zacharis K, Messini CI, Anifandis G, Koukoulis G, Satra M, Daponte A, 2018. Human papilloma virus (HPV) and fertilization: A mini review. Medicina; 54, 50.
- Zuccotti GV & Mameli C, 2013. L' infezione da HPV nel maschio. Rivista di immunologia e allergologia pediatrica.
- Zur Hausen H, 2002. "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer; 2(5):342–350.