

18
11204



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E.



**Correlación entre el número de colonias bacterianas en
espermocultivos con las alteraciones en los índices del análisis
seminal**

Tesis que para obtener el diploma de sub-especialista en:
Biología de la Reproducción Humana

Maria de los Angeles Terriquez Fimbres
Médico Especialista en Ginecología y obstetricia

Dr. Juan Antonio González Barrios
Director de Tesis

Ciudad de México, D. F.; Octubre, 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

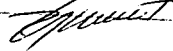
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**

Autoriza a la Dirección General de Docencia de UNAM a difundir en formato electrónico el contenido de mi trabajo de tesis.


NOMBRE: MARIA DE LOS ANGELES TERRIQUEZ FIMBRES

FECHA: 14 OCTUBRE 2003

FIRMA: 

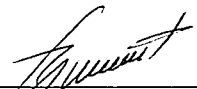
Firmas autorizadas


Dr. Mauricio Di-Silvio López
Sub-Director de Enseñanza e Investigación.


Dr. Francisco Luciano Saucedo González
Profesor titular del curso de Subespecialización en:
Biología de la Reproducción Humana.


Dr. Juan Antonio González Barrios
Director de Tesis


Dr. Rosario Tapia Serrano
Asesor de tesis.


Maria de los Angeles Terriquez Fimbres
Médico Ginecobstetra, RII Biología de la Reproducción Humana.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dedicatoria

A Dios:

Por su creación.

A mi esposo:

Salvador, por apoyarme siempre en todo.

A mis hijos:

Rafael, Darien y Samantha por su comprensión, apoyo y paciencia durante éste tiempo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos

Dr. Juan Antonio González Barrios:

Por su tiempo dedicación y paciencia para llevar a cabo éste valioso trabajo.

Dra. Rosario Tapia Serrano:

Por su ejemplo a seguir como médico y como mujer.

Dr. Francisco Javier Alvarado Gay:

Por la oportunidad que me brindó para terminar lo iniciado tiempo atrás.

Dr. Aquiles Rafael Ayala Ruiz:

Por sus enseñanzas, por ser un gran maestro y un hombre generoso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla de Contenido

Antecedentes	9
Hipótesis:	13
Objetivos	13
Objetivo General	13
Objetivo Particulares	13
Material y Métodos:	14
Toma de Muestras	14
Siembra Directa	14
Identificación del patógeno	15
Análisis matemático de resultados	16
Resultados	17
Discusión	21
Conclusiones	23
Perspectivas	23
Bibliografía	24

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla de Figuras

Figura 1 Modificación de la vitalidad espermática de acorde al número de colonias bacterianas reportadas.....	18
Figura 2 Modificación de la Motilidad espermática (a+b) con respecto al número de colonias bacterianas reportadas.....	19
Figura 3 Índice de Correlación de la vitalidad espermática con respecto al número de colonias reportadas en el espermocultivo.....	20
Figura 4 Índice de Correlación de la motilidad espermática (a+b) con respecto al número de colonias reportadas en el espermocultivo.	21

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Correlación entre el número de colonias bacterianas en espermocultivos con las alteraciones en los índices del análisis seminal

Resumen

La infertilidad no es únicamente un problema de origen femenino sino de pareja, en el 15% de las parejas el origen de la infertilidad es atribuible a ambos, el factor de infertilidad masculino ocupa un 30-50% de los casos, caracterizándose por alteraciones en el volumen, la concentración, la motilidad o la morfología espermática. En este trabajo se determinó si la presencia de diferentes tipos de colonias de microorganismos en el líquido seminal de pacientes infértiles se encuentra relacionada con alteraciones en los parámetros seminales. Se revisaron 303 expedientes de parejas infértiles que acudieron al Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E y se analizaron 277 espermotobioscopias y cultivos seminales, en el 27.5% se reportó espermocultivo negativo, en el 72.4% se reportó desarrollo bacteriano de 1-4 colonias. Las especies de microorganismos que se reportaron en los espermocultivos en el 40.09% fueron bacterias gram (+), 40.95 % de enterobacterias, 12.07% de mycoplasma y en el 4.7% Chlamydia. El 10.94% de los pacientes en los que no hubo crecimiento bacteriano se observó vitalidad espermática anormal. 42.86% de los pacientes que presentaron desarrollo de 4 tipos de bacterias en los espermocultivos la vitalidad espermática disminuyó a menos del 50%. El 42.2% de pacientes con espermocultivo negativo presento algún grado de astenozoospermia, el desarrollo de 3 ó 4 colonias de diferentes microorganismos en el espermocultivo incrementó el grado de astenozoospermia en 57.1% de los pacientes. Las infecciones múltiples son uno de los factores desencadenante de infertilidad masculina porque disminuyen la motilidad (a+b) y la vitalidad espermática.

Palabras Clave: Vitalidad, Motilidad, Líquido seminal, Infecciones múltiples, Esperma.

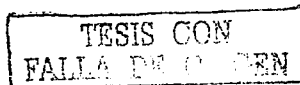
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Correlation in the colonies number of pathogens present in sperm culture with alteration in quality of the seminal liquid

Summary

The seminal liquid infection disease has been consider a powerful condition to alter the seminal parameters like motility and viability in the spermatozoa, the main microorganism found in seminal culture is a *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*, in multiples reports has showed normal quality of seminal parameters with other asymptomatic infections, in this work we determine the correlation index into spermatic viability and motility with respect to multiple asymptomatic seminal infection in patients infertile. 303 patients attends in the reproduction biology department of "20 November" National Medical Centre, ISSSTE, 277 samples of seminal liquid were studied with seminal analysis and seminal culture, in 27.5% of infertile patient the sperm culture were negative, 72.4% were positive to 1-4 different colonies of pathogens microorganism, the mains infectious agent were in 40.09% *Gram (+) agents*, 40.95% *Enterobacteriae*, 12.07% *Mycoplasma* and 4.7% *Chlamydia*. In the 10.94% of the patients without infections in the seminal liquid the sperm vitality was abnormal, 42.86% of all patients with seminal liquid infection with 3-4 types of microorganisms the sperm vitality decrease at least 50%. In the 42.2% of infertile patients without seminal liquid infection showed astenozoosperm, in the 57.1% of patients with seminal liquid asymptomatic multiple-infections (3-4 agents) showed astenozoosperm. The multiple-infections in the seminal liquid are a main factor to development male infertility because decrease (a+b) motility and vitality of the spermatozoid.

Keyword: Vitality, Motility, Seminal Liquid, Multiple-infections, Sperm.

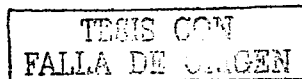


Antecedentes.

La infertilidad no es únicamente un problema de origen femenino sino de pareja, se ha reportado que el 15 % de las parejas presentan factor de infertilidad atribuible a ambos [Barten et al., 1998; Hales et al., 1999]. Se estima que el factor masculino ocupa un 30-50% de los casos, caracterizándose por la presencia de alteraciones en el volumen, la concentración, la motilidad o la morfología espermática, estos factores pueden encontrarse en forma aislada o combinada [Brugh et al., 2003]. Dentro de los factores biológicos que pueden propiciar infertilidad masculina se encuentran las causas infecciosas, siendo la infección del aparato genitourinario la que aporta el $41.45 \pm 28.55\%$ (SEM) del total de las causas de infertilidad masculina [Ravolamanana et al., 2001; Barten et al., 1998]. Las infecciones bacterianas y virales del tracto genital masculino son un factor etiológico importante en la infertilidad masculina, ya que afectan sitios anatómicos relacionados con el aparato reproductor masculino (testículo, epidídimo, glándulas accesorias y conductos eyaculadores), pudiendo conducir al deterioro de los diferentes estadios de la espermatogénesis, afectando la producción del semen [Huwe et al., 1998; Diemer et al., 2000; Hales et al., 1999]. Por otra parte la interacción directa de la bacteria con el espermatozoide puede representar una potencial fuente de daño estructural del gameto [Huwe et al., 1998]. Las alteraciones bioquímicas generadas por la infección de las glándulas accesoria producen un medio ambiente poco propicio para el espermatozoide, pudiendo alterar sus funciones de fertilización [Kohn et al., 1998]. La bacteriospermia en el varón infértil sigue siendo incierta ya que estos pacientes cursan asintomáticos, la presencia de agentes bacterianos en el semen no necesariamente implican infección activa pudiendo traducir colonización o contaminación, manifestándose con cultivos seminales positivos, este tipo de reportes debe de considerarse ya que los microorganismos pudiesen

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

ser producto de una contaminación del semen a su paso por la uretra [Granouillet et al., 1982]. Entre los patógenos que se reportan con mayor frecuencia en los cultivos seminales está la *Chlamydia tracomatis*, como agente causal de epididimitis aguda, esta afecta principalmente a hombres menores de 35 años, siendo con frecuencia asintomática y considerada como una infección de transmisión sexual [De-Jong et al., 1988; Hoosen et al., 1993; Hawkins et al., 1986], la lesión radica en cambios histológicos compatibles con inflamación periductal e intraepitelial, el proceso infamatorio se acompaña de destrucción mínima del epitelio [Hori S et al., 1995]. En múltiples estudios se ha reportado la correlación entre la respuesta humoral y la respuesta autoinmune del espermatozoide *in situ* [Witkin et al., 1995]. Se ha demostrado que la *Chlamydia tracomatis* se adhiere e incluso penetra al espermatozoide causando alteraciones en la morfología [Wolner-Hanssen et al., 1984; Erbenji et al., 1993]. En otros estudios se reporta la presencia de *Chlamydia tracomatis* en un 38.6% en pacientes infértiles sin presentarse alteraciones en la concentración, motilidad y morfología, sugiriendo que el espermatozoide es utilizado como vehículo para su diseminación en el tracto genital femenino [Vigil et al., 2002]. *Ureaplasma urealiticum* es un microorganismo comensal de la región genital causante del 15% de las uretritis no específicas, tiene la capacidad de adherirse al epitelio urogenital fibroblastos y espermatozoides [Smith et al., 1994], aun no se ha logrado dilucidar el efecto sobre la motilidad o la capacidad de la fertilización en el espermatozoide [Talkington et al., 1998; O'Leary et al., 1975; Cortesse et al., 1987; Busolo et al., 1985] aunque se ha demostrado que el *Ureaplasma urealiticum* altera la concentración espermática, los patrones de motilidad y la velocidad, de igual forma se ha evidenciado que la infección por *Ureaplasma urealiticum* incrementa la producción de radical superoxido el cual disminuye la capacidad de fertilización del espermatozoide [Rose et al., 1994].



Ureaplasma urealiticum y Mycoplasma hominis infectan el tracto genital masculino en 10-40% de los hombres infértiles [Keck et al., 1998]. Y en un porcentaje bajo es causal de uretritis no gonocócica que generalmente cursa asintomático [Rojas et al., 2001]. En México se ha reportado la presencia de Mycoplasma hominis en el 24.2% de los pacientes infértiles, esta se asocia a disminución de 87.5% en la motilidad espermática y con 98.8% de alteraciones morfológicas [Rojas et al., 2001]. Se ha descrito la correlación entre la presencia de Ureaplasma urealiticum con alteración moderada en la motilidad progresiva [Carrera et al., 1998]. Reportes previos mencionan a Escherichia coli. [Weidner et al., 1991] como agente causal importante en las infecciones urogenitales, la cual es aislada de líquido seminal y prostático de pacientes con epididimitis y prostatitis, así como, en pacientes infértiles sin sintomatología de infecciones genitourinarias, el mecanismo por el cual la interacción bacteria-espermatozoide provoca alteración en la motilidad del espermatozoide permanece sin identificar [Schirren & Zander 1966]. Se ha descrito que existe una inmovilización ocasionada por el numero de bacterias, así como por incremento en la densidad del liquido seminal, dando como resultado aglutinación de los espermatozoides [Diemer et al., 1996]. Por otra parte en años recientes se ha demostrado que la interacción de la E. coli con el espermatozoide provoca cambios estructurales en el acrosoma que conllevan a la desintegración del mismo con lo que se altera el mecanismo de fecundación [Diemer et al., 2000]. Dentro de las infecciones bacterianas mas comúnmente aisladas en México se encuentran las bacterias gram (+), de los cultivos positivos el Staphylococcus epidermidis se presento en el 63% siendo el mas frecuente, seguido de Streptococcus viridans en un 28% y Escherichia coli en un 9%, la presencia de estos microorganismos en el líquido seminal afecta la vitalidad espermática por medio de mecanismos directos que afectan la calidad del semen teniendo consecuencias negativas

sobre la fertilidad [Merino et al., 1995]. Existen reportes en los que se asocia la presencia de *Streptococcus faecalis* y alteración en la concentración y morfología espermática en pacientes infértiles. [Metha et al., 2002].

Las especies reactivas al oxígeno (ROS) son un grupo de moléculas iónicas, compuestas en su mayoría por $O^{\cdot -}$, tienen la propiedad de reaccionar con una velocidad de microsegundos y oxidar a lípidos estructurales de membrana, proteínas y carbohidratos de superficie. Los principales ROS se generan en procesos de daño isquémico e inflamatorio los que producen mayor daño a las membranas celulares son: el anión superóxido ($-O^{\cdot 2}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), Oxido nítrico (NO^{\cdot}), peroxinitrito (NOO^{\cdot}) y el radical hipoclorito ($\cdot OH-Cl$). En condiciones normales los organismos aeróbicos utilizan el oxígeno molecular procedente del metabolismo celular y es en éste proceso de reducción de Oxígeno que se generan los ROS. Las fuentes principales de producción de ROS son los espermatozoides y los leucocitos, capaces de incrementar la concentración de estos en forma considerable [Aitken et al., 1991]. Se han descrito que los ROS producidos en altas concentraciones inducen cariorrexis, siendo el NO^{\cdot} al que se le confiere esta propiedad con lo que se altera la información genética portada por el espermatozoide [Sharma et al., 1998]. La producción elevada de ROS se evidencia en forma clínica por la modificación tanto en la integridad de la función espermática como en la membrana del espermatozoide dando como resultados alteración en concentración, motilidad y morfología espermática [Sharma et al., 1996; De-Lamirande et al., 1995; Hendin et al., 1999]

En el 40% de pacientes infértiles y con oligozoospermia se han evidenciado niveles anormalmente altos de ROS [Aitken RJ et al., 1994; Splitz et al., 2000] este tipo de radicales se han implicado en la infertilidad de origen desconocida [Aitken et al., 1992], así como cuando es generada por varicocele, lesión medular e infertilidad de origen

inmunológico [Lenzi et al., 1993; Mazzilli et al., 1994; De-Lamirande et al., 1995; Zalata et al., 1995].

Hipótesis:

La presencia de infecciones múltiples asintomáticas en el tracto genito urinario reduce la motilidad y la vitalidad espermática en forma directamente proporcional al tipo y número de microorganismos presentes en el líquido seminal de pacientes infértiles.

Objetivos

Objetivo General

Determinar si la presencia de diferentes tipos de colonias de microorganismos en el líquido seminal de pacientes infértiles se encuentra relacionada con alteraciones en los parámetros seminales.

Objetivo Particulares

1. Determinar si existe asociación entre el número de colonias bacterias de diferentes microorganismos con la vitalidad y la motilidad espermática.
2. Determinar el índice de correlación entre el número de colonias y la motilidad espermática.
3. Determinar el índice de correlación entre el número de colonias y la vitalidad espermática.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Material y Métodos:

Se revisaron 303 expedientes de mujeres que acudieron a la consulta externa del Servicio de Biología de la Reproducción Humana del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del I.S.S.S.T.E en un periodo comprendido de 4 años (1^a de marzo de 1999 al 1^a de marzo del 2003) tomando datos como: edad del varón, antecedentes de paternidad, primer análisis seminal, y cultivo de inicio. Tomando los siguientes parámetros del análisis y cultivo seminal: volumen, cantidad por mL, motilidad (a+b) y vitalidad, así como el número de diversas colonias desarrolladas. La morfología fue excluida ya que se utilizaron en algunos análisis seminales los criterios estrictos de Kruger y los parámetros de la O.M.S. no pudiendo unificar los criterios para su análisis en el estudio.

Todos los estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio de pruebas especiales y laboratorio de hormonas del C.M.N. "20 de Noviembre"

Toma de Muestras.

Estas fueron obtenidas en el laboratorio del C.M.N "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E a través de masturbación entre 3 y 5 días de abstinencia sexual, la colección de la muestra se realizó en un recipiente de plástico estéril de boca ancha y fue analizado dentro de los primeros 45 minutos a 2 horas de tomada la muestra.

Siembra Directa.

Una vez obtenidas la muestras se realizó la siembra en los medios apropiados para bacterias y hongos por dificultades técnico-económicas no se realizó cultivo viral. los medios de cultivo fueron inoculados utilizando técnica de dilución con asa, bajo condiciones de esterilidad, los medios fueron incubados a 37 °C durante un periodo de 24

TESIS CON
FALLA DE COPIEN

hrs, al final de este periodo se realizó análisis macroscópico y microscópico en búsqueda de desarrollo bacteriano los cultivos positivos fueron analizados mediante pruebas bioquímicas para la identificación del patógeno.

Para el cultivo especial de Chlamydia se realizó con estuche Chlamydia Direct IF (anticuerpos monoclonales) del laboratorio (Bio-Mérieux / Francia). La lectura se realizó a las 24 h tomando como resultado positivo la presencia de por lo menos 10 cuerpos Clamidiales característicos, para la identificación de Mycoplasmas se utilizó el estuche Mycoplasma Lyo-Bio Mérieux/Francia. para identificación y recuento de mycoplasma y Ureaplasma tomándose la muestra e incubando a 37° y realizándose la lectura a las 48 h. Siendo positivo para Mycoplasma la imagen de "huevo estrellado" y la forma de "erizo" para el ureaplasma.

Identificación del patógeno.

La identificación de los gérmenes desarrollados a partir de las muestras de líquido seminal se realizó por métodos bioquímicos convencionales en laboratorio de microbiología de pruebas especiales del CMN "20 de Noviembre" perteneciente al I.S.S.S.T.E. utilizando los siguientes ensayos: Agar sangre, Agar chocolate, Mckonkey, Agar manitol, en donde permanecen durante 24 h a 37 °C, con excepción de la muestra sembrada en Agar chocolate la cual se proceso a las 48 h. post inoculación. La clasificación de los microorganismos se realizó mediante la tinción de gram, procediéndose a la identificación de los gérmenes mediante métodos de bioquímica convencionales, el cultivo de Chlamydia se realizó con Chlamydia Direct IF (anticuerpos monoclonales) comercializado por el laboratorio (Bio-Mérieux/Francia). La lectura se realizó a las 24 h tomando como resultado positivo la presencia de por lo menos 10 cuerpos clamidiales característicos, la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

identificación de Mycoplasmas se utilizó (*Mycoplasma* Lyo-Bio Mérieux/Francia), la identificación y el recuento de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* realizó a las 48 hrs de incubación a 37° Siendo positivo para Mycoplasma la imagen de "huevo estrellado" y la forma de "erizo" para el ureaplasma.

Análisis del líquido seminal.

Las muestras fueron colectadas en un recipiente de plástico estéril, después de un periodo de abstinencia sexual de 3-7 días se le solicitó al paciente la recolección de la muestra por masturbación. Las muestras fueron procesadas entre 45 minutos a 2 h, el análisis visual se realizó en un microscopio óptico, los espermatozoides fueron contados en una cámara de Neubauer, se analizaron los siguientes parámetros seminales: volumen, viscosidad, pH, motilidad (a+b), elementos celulares diferentes de los espermatozoides, vitalidad espermática y morfología (los parámetros estudiados fueron clasificados de acuerdo a los criterios del Manual de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud para el examen del semen Humano, 1999) los resultados fueron expresados en porcentaje simple con respecto a la totalidad de los componentes del semen, los estudios fueron realizados por el laboratorio de hormonas del C.M.N "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E.

Análisis matemático de resultados.

El análisis de los datos se realizó por medio de índices de frecuencia, medidas de tendencia central, la comparación estadística se realizó con la pruebas de T de student y anova seguida de un análisis comparativo a través de pruebas paridas del tipo de Newman-Kellys tomándose con diferencia estadística significativa una $p < 0.05$ en los diferentes análisis matemáticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados

Se realizó un estudio retrospectivo y transversal de un solo cohorte, en el cual se revisaron 277 expedientes de pacientes atendidos en la consulta externa del servicio de biología de la reproducción humana, del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", perteneciente al I.S.S.S.T.E., 45 expedientes en los que se reportó azoospermia fueron excluidos, en total se incluyeron 232 expedientes de pacientes que contaran con el reporte de primera vez del análisis seminal y espermocultivo.

En el 27.5% de los expedientes incluidos se reporto espermocultivo negativo, en el 72.4% se reportó desarrollo bacteriano de 1-4 colonias, 1 colonia (35.1%), 2 colonias (38.7%), 3 colonias (22.0%) y 4 colonias (4.2%). El 40.1% de los espermocultivos positivos desarrollaron crecimiento bacteriano de tipo gram (+), el 40.1% fue positivo para enterobacterias, el 12.1% cuenta con reporte positivo a Micoplasma y el 4.7% de los espermocultivos fueron positivos a *Chlamydia trachomatis*, la distribución de los microorganismos de acorde a la especie y genero se muestra en la Tabla I

Tabla I Frecuencia de microorganismos reportados en los espermocultivos.

Tipo	Género	Frecuencia			
		1 Col. *	2 Col. *	3 Col. *	4 Col. *
Gram (+)	<i>Staphylococcus coagulasa neg.</i>	9	4	1	2
	<i>Klebsiella</i>	4	3	3	-----
	<i>Streptococcus viridans</i>	1	6	2	-----
	<i>Corynebacterium sp</i>	15	12	5	-----
Enterobacterias	<i>Streptococcus gpo D</i>	7	6	2	1
	<i>Enterococcus faecalis</i>	5	9	7	-----
	<i>Escherichia coli</i>	2	4	6	-----
	<i>Mycoplasma hominis</i>	11	4	1	3
Mycoplasmas	<i>Ureaplasma urealiticum</i>	11	-----	1	-----
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	4	2	-----	-----

* Tipos de colonias bacterianas desarrolladas a las 24 h post-inoculación.

Fuente: Laboratorio de microbiología del CMN "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En los pacientes en que se reportaron espermocultivos negativos, el 10.94% presento vitalidad espermática anormal, mientras que en los positivos a 1 colonia este porcentaje aumento al 21.42%, una tendencia similar se observó cuando desarrollaron 2 tipos diferentes de colonias bacterianas afectando esta la vitalidad espermática reportándose anormal en el 34.43%, en contra de de los esperado solamente el 27.03% de los espermocultivos positivos a 3 microorganismos diferentes fué catalogado con vitalidad anormal, finalmente se observa que la presencia de 4 tipos de bacterias presentes en los espermocultivos afectaron la vitalidad espermática, reportándose anormal en el 42.86% de los pacientes (Figura. 1)

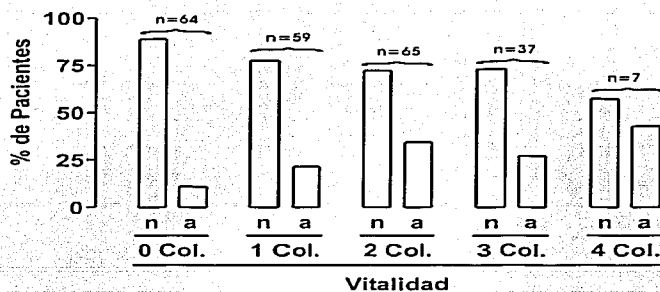


Figura 1 Modificación de la vitalidad espermática de acorde al número de colonias bacterianas reportadas. Todos los espermocultivos fueron realizados bajo las normas de calidad estipuladas por el laboratorio del CMN "20 de Noviembre", el desarrollo bacteriano fue analizado a las 24 h post inoculación. n) normal (vitalidad espermática mayor al 60%), a) anormal (vitalidad espermática menor al 60%).

De los 64 pacientes en los que se reportó espermocultivo negativo el 42.2% presentó algún grado de astenozoospermia siendo de 17.18%, 15.6% y 9.4% para los grados leve moderada y severa respectivamente, el 52.5% de los 59 pacientes que presentaron desarrollo bacteriano de 1 colonia bacteriana en el espermocultivo, los espermatozoides

presentaron astenozoospermia en diferente grado, leve (16.9%), moderada (27.1%) y severa (8.5%), los análisis seminales que coincidían con desarrollo microbiológico de 2 agentes, la motilidad fué disminuida considerablemente en el 57.1% de 65 pacientes, los grados de astenozoospermia para este grupo fué de 22.2%, 22.2% y 12.7% para leve moderada y severa respectivamente, la presencia de 3 o 4 especies de bacteria presentes en el espermocultivo no difieren significativamente en su afección sobre la motilidad espermática observándose que el incremento de agentes bacterianos presentes en el espermatozoos afecta la motilidad espermática en el 62.2% y 57.1% de los pacientes con el desarrollo de 3 y 4 colonias diferentes en el espermocultivo presentaron astenozoospermia en diferente grado leve (18.9 y 14.3%), moderada (27.0 y 14.3%) y severa (16.2 y 28.6%) respectivamente para 3 y 4 colonias (Figura 2).

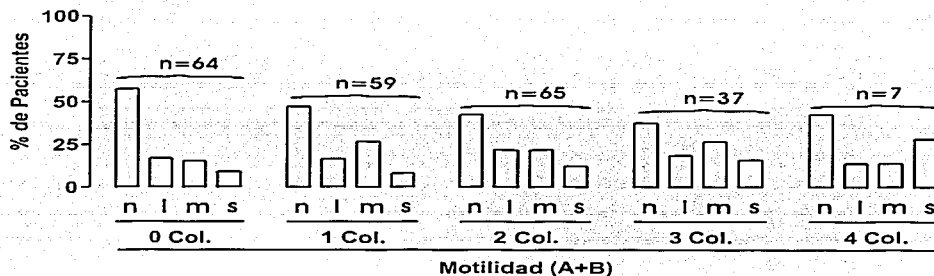


Figura 2 Modificación de la Motilidad espermática (A+B) con respecto al número de colonias bacterianas reportadas. Todos los análisis seminales fueron realizados por el laboratorio del CMN "20 de Noviembre". n) normal (motilidad mayor al 50%), la astenozoospermia se reporto como l) leve (49-40%), m) moderada (39-21%), s) severa (menor del 20%).

TESIS CON
FALLA LEI CIEGEN

El análisis de correlación entre el número de colonias y la vitalidad reportó un índice de correlación de [$r^2 = 0.8851$], con una pendiente negativa de [$m -4.322 \pm 0.8992$ SEM] y una diferencia estadística significativa solamente cuando existía desarrollo bacteriano de 4 colonias de diferentes microorganismos [$p = 0.0171$] (Figura 3). La correlación entre la motilidad (a+b) con respecto al número de colonias reportadas fué de [$r^2 = 0.95$] con una pendiente [$m -3.484 \pm 0.4615$ SEM] y con diferencia estadística significativa con respecto al grupo control (0 colonias) cuando se presentaron desarrollo de 2, 3 y 4 tipos de colonias diferentes [$p < 0.005$] (Figura 4).

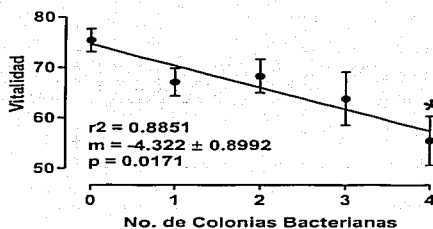


Figura 3 Índice de Correlación de la vitalidad espermiática con respecto al número de colonias reportadas en el espermo cultivo. El análisis de correlación se realizó con el software Prism 4.5, utilizando un intervalo de seguridad de 95%, * diferencia estadística < 0.05 .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

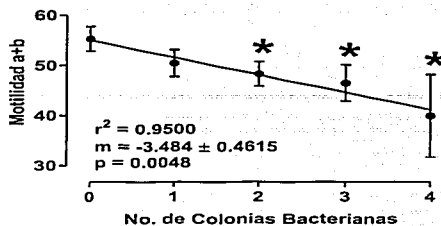


Figura 4 Índice de Correlación de la motilidad espermática (a + b) con respecto al número de colonias reportadas en el espermocultivo. El análisis de correlación se realizó con el software Prism 4.5, utilizando un intervalo de seguridad de 95%. * diferencia estadística < 0.05.

Discusión

La presencia de infecciones múltiples correlaciona de forma inversamente proporcional con los parámetros de motilidad y viabilidad espermática. En nuestro estudio se encontró que la presencia de infecciones múltiples principalmente cuando *Chlamydia trachomatis* se encuentra presente, produce disminución en los parámetros de estudio la motilidad y la viabilidad espermática [Merino et al. 1995, Maciejewski et al., 1989, Gdoura et al., 2001], estos datos están en concordancia con reportes previos en los que el principal factor que altera los parámetros espermáticos es el desarrollo de infecciones asintomáticas por diferentes microorganismos dentro de los que se reportan con mayor frecuencia en los espermocultivos (*Ureaplasma urealiticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* y *Escherichia coli*) [Huwé et al., 1998], la presencia tanto de *Ureaplasma urealiticum* y/o *Chlamydia trachomatis* por sí sola es capaz de disminuir en forma considerable la motilidad espermática [Diemer et al., 2000], cuando se presenta en combinación con otros microorganismos gram negativos, este efecto se ve potenciado en forma directa con el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

número y tipo de microorganismos presentes en el líquido seminal [Metha et al., 2002]. este tipo de asociación no se ha reportado previamente, aunque se ha dicho que existe efecto sinérgico de infecciones primarias con dos o mas tipos diferentes de microorganismos que conducen a la problemas de fertilización, condición por la cual los pacientes acuden a la clínica de fertilidad, las infecciones del líquido seminal aún siendo asintomáticas, son capaces de inducir alteraciones en la viscosidad y de la densidad del líquido espermático produciendo inmovilización secundaria del espermatozoide [Kohn et al., 1998]. el grado de correlación observado entre los diferentes microorganismos que desarrollan en el líquido seminal hace pensar que las infecciones múltiples producen alteraciones directas sobre el espermatozoide y de tipo indirecta sobre las propiedades fisicoquímicas le líquido seminal [Kohn et al., 1998, Hales et al., 1999]. En reportes previos se ha observado que la producción de radicales libres de oxígeno en las infecciones del tracto genito-urinario masculino producen depleción del contenido energético mediante el bloqueo de enzimas mitocondriales necesaria en el ciclo de Krebs, los cual conlleva a hipo-motilidad espermática por deficiencia de ATP, se ha reportados que el exceso de ROT en es capaz de inducir cariorrexis y condensación de la cromatina en el espermatozoide, de igual forma la peroxidación de lípidos secundaria al exceso de ROT bloque los mecanismos de acrodistales de penetración y fecundación espermática manifestándose como infertilidad masculina [Atkien et al., 1991, Sharma et al., 1998]; en casos raros. se ha descrito, que la presencia de antígenos bacterianos sobre la membrana celular del espermatozoide inducen reacción inmunogénica hacia los componentes de membrana espermática por parte del sistema inmunológico de la mucosa vaginal induciendo infertilidad secundaria a astenozoospermia [Witkin et al., 1995, Vigil et al., 1992]. la presencia de infecciones múltiples incrementa el grado de astenozoospermia desviándola

TESIS CON
FALLA DE CALLEN

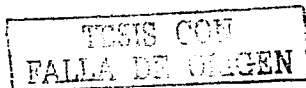
hacia la izquierda de la curva de correlación concordando con un mayor número de pacientes que presentan astenozoospermia severa, estos datos están en concordancia con lo reportado previamente en estudios realizados en población abierta [Metha et al., 2002], de igual forma la vitalidad espermática se ve inversamente correlacionado con el número y tipo de microorganismos presentes en el líquido seminal. Nuestros resultados indican que la presencia de más de tres microorganismos altera la vitalidad espermática en 30% de los pacientes que acuden a la clínica de fertilidad, mientras que la infección múltiple de 4 microorganismos disminuye la vitalidad espermática por debajo del 60% de los espermatozoides.

Conclusiones

1. Las infecciones múltiples son factores condicionantes para infertilidad masculina.
2. La infertilidad masculina secundaria a infección de *Chlamydia trachomatis* y/o *Ureaplasma urealyticum* es potenciada en forma directa por la presencia de algunos microorganismos gram negativos.
3. La disminución de la motilidad y vitalidad espermática esta directamente relacionada con infecciones múltiples.

Perspectivas

1. Realizar protocolos para determinar la presencia de óxido nítrico a través de sus metabolitos (nitritos) que puedan generar alteraciones cromosómicas o geonómicas en el espermatozoide.
2. Realizar investigación de la depleción energética en el espermatozoide secundaria a las exotoxinas liberadas por los agentes microbianos.



3. Realizar estudios de viabilidad y motilidad ex vivo en presencia de lipopolisacárido (LPS).
4. Desarrollar estudios encaminados a descubrir si las infecciones bacterianas por Chlamydia trachomatis y Ureaplasma urealyticum son capaces de inducir mutaciones en el conglomerado genómico del espermatozoide.

Bibliografía

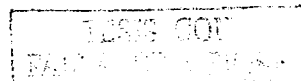
- [1]. Aaron Spitz .Edward D. Kim. Larry I. Lipshultz: Contemporary Approach to the male infertility evaluation: Obstetrics and Gynaecology Clinics. 2000; (27) 3 :235-41.
- [2]. Aitken JR, Irvine DS, Wu FC: Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility: Am J Obstet Gynecol, 1991; (64):542-551.
- [3]. Aitken RJ, Buckingham D, West K, et al: Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors: J Reprod Fertil. 1992; (94):451-462.
- [4]. Aitken RJ, West K, Buckingham D: Leukocyte infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function: J Androl. 1994; (15):343-352.
- [5]. Barten J: Screening for infertility in Indonesia. Results of examination of 863 infertile couples: Bull World Health Organ, 1998; 76(2): 183-7.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- [6]. **Busolo F, Zanchetta R:** The effect of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* on hamster egg *in vitro* penetration by human spermatozoa: *Fertil Steril*, 1985;(43):110-118.
- [7]. **Carrera, A.; Castillo, J.; Ospina, M. A.; Pineda, J. R.; Zarate, M.; Vadillo, F:** Impact of *Ureaplasma Urealyticum* Infection on Sperm Motility: Fertility and Sterility. 1998; 70(1S) Supplement 1 203S-204S.
- [8]. **Cortesse A, Auroux M, Jacques L, Auer J, Feneux D, Le Duc A:** Anomalies de la mobilite des spermatozoides apres infection du sperm humain *in vitro*. Role d'*Ureaplasma urealyticum*: *Presse Med*, 1987; (16):1375-7.
- [9]. **De Jong Z, Pontonnier F, Plante P:** The frequency of *Chlamydia trachomatis* in acute epididymitis: *Br J Urol*. 1988; (62): 76-8.
- [10]. **De-Lamirande E, Gagnon C:** Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects: *Hum Reprod*, 1995; (10):15-21.
- [11]. **De-Lamirande F, Leduc BE, Iwasaki A:** Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury: *Fertil Steril*, 1995; (63): 637-642.
- [12]. **Diemer, T., Weidner, W., Michelmann, H. W., Schiefer, H. G., Rován, E. & Mayer, F:** (1996) Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*: *International Journal of Andrology*, 1996; (19): 271-277.
- [13]. **Diemer, T; Huwe, P; Michelmann, H. W; Mayer, F. §; Schiefer, H. G.; Weidner, W.** *Escherichia coli*-induced alterations of human spermatozoa. An

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- electron microscopy analysis: International Journal of Andrology, 2000; 23(3): 178-186.
- [14]. **Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Buchanan Halles V, Weidner W:** Influence of urogenital infection on sperm function: Current opinion in urology, 2000; (10)1: 39-44.
- [15]. **Erbengi T:** Ultrastructural observations on the entry of *Chlamydia trachomatis* into human spermatozoa: Hum Reprod, 1993; (8):416-421.
- [16]. **Gdoura R, Keskes-Ammar L, Bouzid F, Eb F, Hammami A, Orfila J:** Chlamydia trachomatis and male infertility in Tunisia: Eur J Contracept Reprod Health Care. 2001;(6)2:102-7.
- [17]. **Granouillet R, Gaudin OG, Laurent JC, Rousset H, Moulin A:** Study of the spermatic bacterial flora in infertile males: Pathol Biol, 1982; (30):22-6.
- [18]. **Hales DB, Diemer T, Hales KH:** Role of cytokines in testicular function. Endocrine, 1999; (10):201-217.
- [19]. **Hawkins DA, Taylor-Robinson D, Thomas BJ, Harris JRW:** Microbiological survey of acute epididymitis: Genitourin Med. 1986; (62): 342-4.
- [20]. **Hendin B, Kolettis P, Sharma RK:** Varicocele is associated with elevated spermatozoa reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity: J Urol, 1999; (161):1831-4.
- [21]. **Hill, A. C., Tucker, M. J., Whittingham, D. G. & Craft, I:** Mycoplasmas and *in vitro* fertilization: Fertility and Sterility, 1987; (47): 652-655.
- [22]. **Hori S, Tsutsumi Y.** Histological differentiation between chlamydial and bacterial epididymitis. Hum Pathol, 1995; (26): 402-7.

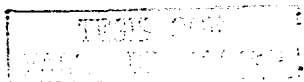


- [23]. **Hoosen AA, O'Farrell N, van de Ende J:** Microbiology of acute epididymitis in a developing community: *Genitourin Med*, 1993; (69): 361-3.
- [24]. **Huwe P, Diemer T, Ludwig M, Liu J, Schiefer HG, Weidner W:** Influence of different uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters in an in vitro experiment: *Andrologia*, 1998; 30 (Suppl 1):55-59.
- [25]. **Keck C, Gerber-Schafer C, Clad A, Wilhelm C, Breeckwoldt M:** Seminal infections: impact on male fertility and treatment options: *Hum Reprod Update*, 1998; (4); 891-903.
- [26]. **Kohn FM, Erdmann I, Oeda T, el Mulla KF, Schiefer HG, Schill WB:** Influence of urogenital infections on sperm functions: *Andrologia*, 1998; (30) (Suppl 1): 73-80.
- [27]. **Lenzi A, Culasso F, Gardini L, et al:** Placebo-controlled double blind cross-over trial of glutathione therapy in male infertility: *Hum Reprod*, 1993; (8):1657-1662.
- [28]. **Maciejewski,H Dziecielski, W Swierczynski and G Semmeler:** Morfological semen changes in Chlamydia trachomatis infection: *Ginekol Pol*, 1989; (60)6: 314-7.
- [29]. **Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M:** Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects: *Fertil Steril*, 1994; (62):862-868.
- [30]. **Merino G.Carranza-Lira S. Murrieta S.Rodríguez L.Cuevas E. Moran C:** Bacterial infection and semen characteristics in infertile men: *Arch Androl*, 1995; (35):43-7.
- [31]. **Morrison, R. P., K. Feilzer, and D. B. Tumas:** Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class II-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- restricted responses in Chlamydia trachomatis genital tract infection: Infect. Immun, 1995; (63):4661-4668.
- [32]. **O'Leary WM, Frick J:** The correlation of human male infertility with the presence of mycoplasma T-strains. *Andrologia*, 1975;(7): 309-11.
- [33]. **Ravolamanana Ralisata L, Randaoharison PG, Ralaivavy HA, Debry JM, Randrian jafisamin drakotroka NS:** Etiologic approach in infertile couples in Mahajanga: Arch Inst Pasteur Madagascar, 2001; (67):68-73.
- [34]. **Rojas-Retiz J,C.Bravo,R Salas, J, Moreno, R. Tapia:** Genital Mycoplasmas and Its impact on sperm sample in infertile men Proceedings of the VIIIth International Congress of Andrology Montreal Québec, Canada Medimond Medical Publications, 2001:491-493.
- [35]. **Rose, B. I. & Scott, B. B. S:** (1994) Sperm motility, morphology, hyperactivation, and ionophore-induced acrosome reactions after overnight incubation with mycoplasmas: *Fertility and Sterility*, 1994; (61): 341-348.
- [36]. **Schaeffer AJ:** Aetiopathology and pathogenesis of urogenital infections. *Andrologia*, 1998; 30 (Suppl 1):3-6.
- [37]. **Schirren, C. & Zander, H. A:** (1966) Genitalinfektionen des Mannes und ihre Auswirkungen auf die Spermatozoenmotilität: *Medizinische Welt*, 1996; (45): 45-47.
- [38]. **Sharma RK, Agarwal A:** Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 1996; (48):835-50.
- [39]. **Sharma RK, Pasqualotto F, Nelson D:** The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxydative stress to predict male infertility. *Human Reprod*, 1999; (14): 2801-2807.

- [40]. **Smith DG, Russell WC, Thirkell D:** Adherence of *Ureaplasma urealyticum* to human epithelial cells: *Microbiology*, 1994; (140):2893-8.
- [41]. **Talkington DF, Davis JK, Canupp JC:** The effects of three serotypes of *Ureaplasma urealyticum* on spermatozoal motility and penetration in vitro. *Fertil Steril*, 1991; (55):170-6.
- [42]. **Victor M. Brugh H. Merrill Matschke, Larry I. Lipshultz:** Male factor infertility: *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 2003; (32) 3: 74-77.
- [43]. **Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM:** Chlamydia tracomatis infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function :*Andrologia*, 2002;(34): 155-61.
- [44]. **Weidner W, Krause W, Ludwig M:** Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis: *Hum Reprod Update*, 1999; 5.
- [45]. **Weidner, W., Jantos, C., Schiefer, H. G., Haidl, G. & Friedrich, H. J:** Semen parameters in men with and without proven chronic prostatitis. *Archives of Andrology* , 1991;(26): 173-183
- [46]. **Weidner, W., Ludwig, M., Brahler, E. & Schiefer, H. G:** Outcome of antibiotic therapy with ciprofloxacin in chronic bacterial prostatitis: *Drugs*, 1999; 58 (Suppl. 2), 103-106.
- [47]. **Weström, L.V:** Sexually transmitted diseases and infertility. *Sexual Transmitted Diseases*, 1994; 21 (Suppl. 1), 32-37.
- [48]. **Witkin SS, Kligman I, Grifo JA, Rosenwaks Z:** *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* detected by the polymerase chain reaction in the cervixes



of women undergoing in vitro fertilisation: prevalence and consequences. *J Assist Reprod Genet.* 1995; (12):610-14.

- [49]. **Witkin, S. S., Jeremias, J., Grifo, J. A. & Ledger, W. J.** Detection of *Chlamydia trachomatis* in semen by the polymerase chain reaction in male members of infertile couples. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1993; (168): 1457-1462.
- [50]. **Wolner-Hanssen, P. & Mardh, P:** *In vitro* tests of the adherence of *Chlamydia trachomatis* to human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 1984; (42): 102-107.
- [51]. **Zalata A, Hafez T, Comhaire F:** Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility: *Hum Reprod*, 1995; (10):1444-1451.

TESIS CON
FALLA DE QUIEN