

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Efecto *in vitro* de *Escherichia coli*
uropatógena en la calidad espermática
humana**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en
Biología

Emilio Martin Dueñas Villacorta

Lima, Perú

2018

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mis padres Carlos e Inés por su apoyo incondicional y consejos para salir adelante, también dedico este proyecto a mis amigos Mauricio Gonzales, José Llanos y Yatsen Wong, todos ellos depositaron su entera confianza para motivarme en mi proyecto y capacidades personales, a mi esposa Gisella por su amor, comprensión y apoyo emocional, por siempre mi corazón y mi agradecimiento, por todos los esfuerzos que han hecho a lo largo de este tiempo para que pueda finalizar esta etapa de mi vida, a ellos les dedico esta tesis.

Emilio Martin Dueñas Villacorta

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de alguna manera han participado en la elaboración de esta tesis especialmente a mi asesor Mag. Blgo. Mauricio Gonzales Molfino. A todas las personas que de una manera u otra influyeron en mí dándome un consejo y apoyo para culminar esta tesis, especialmente al profesor Blgo. Juan Carlos Gorbeña, por su corrección y paciencia sin las cuales no hubiera podido terminar la tesis. A José Llanos, Yatsen Wong, les agradezco los consejos y la confianza para culminar esta tesis. Este trabajo se ha realizado con financiamiento de recursos propios y las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

Emilio Martin Dueñas Villacorta

RESUMEN

El espermatozoide es una célula altamente especializada encargada de llevar el material genético paterno hasta el tracto reproductivo femenino en búsqueda del oocito, sin embargo durante su desplazamiento puede interactuar con microorganismos que puede transportar desencadenando procesos infecciosos que alteran el éxito reproductivo. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto *in vitro* de *Escherichia coli* uropatógena en el parámetro de motilidad, vitalidad, aglutinación y el impacto en la fragmentación de ADN espermático humano. Se evaluaron 40 muestras de semen provenientes de jóvenes con edades comprendidas entre 20 y 25 años. Se obtuvo la cepa microbiana ATCC *E.coli* 25922 por medio de compra marca Microbiologics®, y se evaluó el efecto de *E.coli* en la calidad espermática en humano, se incubó 1ml de semen con buffer Flushing (Origio®) con la cepa de *E. coli*, se utilizó cuatro concentraciones diferentes, para obtener una relación de *E. coli* a espermatozoides de 0,5:9,5 1:9, 3:7, y 5:5. Como resultado se observa que disminuye los valores de vitalidad (t1) a 77,36% +/-4,50, el segundo tratamiento (t2) disminuye a 72,93% +/-5,29, el tercer tratamiento (t3) a 67,84% +/-7,16, y el cuarto tratamiento (t4) a 59,35% +/-5,43. Motilidad (t1) 42,69% +/-27,66, el segundo tratamiento 37,77% +/-29,51, el tercer tratamiento (t3) 26,27% +/-35,89 y el cuarto tratamiento (t4) disminuye a 17,79% +/-24,61. Es evidente que la presencia de la cepa microbiana ATCC *E.coli* 25922 causa un efecto patógeno de aglutinación de espermatozoides en todos los tratamientos ($p < 0,05$) en el primer tratamiento (t1) 60,02% +/-25,96, el segundo tratamiento (t2) 65,03% +/- 24,15, en el tercer tratamiento (t3) 68,61% +/-22,29 y el cuarto tratamiento (t4) 72,95% +/-21,08, se demuestra que a medida que aumenta la concentración de *E.coli* aumenta la fragmentación de ADN espermático.

Palabras clave: Espermatozoides humanos, *Escherichia coli* uropatógena, motilidad, vitalidad, aglutinación, fragmentación de ADN.

ABSTRACT

The spermatozoon is a highly specialized cell responsible for carrying the paternal genetic material to the female reproductive tract in search of the oocyte, however during its displacement it can interact with microorganisms that can transport triggering infectious processes that alter reproductive success. The objective of this study was to determine the in vitro effect of uropathogenic *Escherichia coli* on the motility, vitality, agglutination parameter and the impact on fragmentation of human sperm DNA. We evaluated 40 semen samples from young people aged between 20 and 25 years. The ATCC *E. coli* 25922 microbial strain was obtained through the purchase of Microbiologics® brand, and the effect of *E. coli* on sperm quality in human was evaluated, 1ml of semen was incubated with Flushing buffer (Origio®) with the strain of *E. coli*, four different concentrations were used, to obtain a ratio of *E. coli* to spermatozoa of 0.5: 9.5 1: 9, 3: 7, and 5: 5. As a result it is observed that it diminishes the values of vitality (t1) to 77.36% +/- 4.50, the second treatment (t2) decreases to 72.93% +/- 5.29, the third treatment (t3) to 67.84% +/- 7.16, and the fourth treatment (t4) to 59.35% +/- 5.43. Motility (t1) 42.69% +/- 27.66, the second treatment 37, 77% +/- 29.51, the third treatment (t3) 26.27% +/- 35.89 and the fourth treatment (t4) decreases to 17.79% +/- 24.61. It is evident that the presence of the ATCC *E. coli* 25922 microbial strain causes a pathogenic effect of sperm agglutination in all treatments ($p < 0.05$) in the first treatment (t1) 60.02% +/- 25.96, the second treatment (t2) 65.03% +/- 24.15, in the third treatment (t3) 68.61% +/- 22.29 and the fourth treatment (t4) 72.95% +/- 21.08, it is demonstrated that as the concentration of *E. coli* increases, the fragmentation of sperm DNA increases.

Key words: Human spermatozoa, uropathogenic *Escherichia coli*, motility, vitality, agglutination, DNA fragmentation.

INDICE

AGRADECIMIENTO	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INDICE	6
INDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
1.2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	11
1.3. OBJETIVO GENERAL:.....	11
1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	12
II. MARCO TEORICO	13
2.1. Escherichia coli Uropatogènica:	13
2.2. Fisiología de la función Testicular	13
2.3. Transporte de espermatozoides y maduración en el epidídimo .	15
2.4. Calidad y análisis seminal.....	16
2.5. Infecciones genitourinarias	17
2.5.1. Infecciones genitourinarias en el hombre	17
2.6. Infecciones en el semen por <i>Escherichia coli</i>	18
2.7. Infertilidad	19
2.8. Integridad del ADN espermático: Implicancias en la infertilidad .	19
III. ANTECEDENTES.....	21
IV. HIPÓTESIS	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1. Lugar de ejecución	26
5.2. Tipo y diseño de investigación.....	26
5.3. Variables	26
5.4. Operacionalizacion de las Variables	27
5.5. Muestreo	27

5.6.	Metodología y Análisis de datos	27
5.7.	Evaluación microscópica de las muestras seminales:	28
5.8.	Método de recuento por diseminación en superficie de agar	31
5.9.	Análisis estadístico	32
5.10.	Aspecto ético	33
VI.	RESULTADOS	34
6.1.	Resultados del análisis seminal en parámetros microscópicos ..	34
6.2.	Efecto de <i>E.coli</i> en la Aglutinación espermática.....	35
6.3.	Efecto de <i>E.coli</i> en la Fragmentación de ADN	35
VII.	DISCUSIÓN.....	36
VIII.	CONCLUSIONES	38
IX.	RECOMENDACIONES.....	39
	REFERENCIAS CITADAS	40
	ANEXOS.....	47

INDICE DE FIGURAS

<i>Fig. 1</i>	47
<i>Fig. 2</i>	49
<i>Fig. 3</i>	50
<i>Fig. 4</i>	51
<i>Fig. 01 Diluciones seriadas</i>	51
<i>Fig. 02 Recuento de colonias</i>	52
<i>Fig. 03 Fragmentación de ADN</i>	52
<i>Fig. 04 Aglutinación de Espermatozoides (Izq. T0.5-9.5 Der. T</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 01 Efecto de E.coli con la vitalidad del esperma</i>	47
<i>Tabla 02 Efecto de E.coli con la Motilidad Progresiva espermática</i>	48
<i>Tabla 03 Efecto de E.coli con la Motilidad in situ espermática</i>	48
<i>Tabla 04 Efecto de E.coli con la No Motilidad espermática</i>	48
<i>Tabla 05 Efecto de E.coli en la Aglutinación espermática</i>	49
<i>Tabla 06 Efecto de E.coli en la Fragmentación de ADN</i>	50
<i>Tabla 07 Valores normales de los parametros en la calidad espermática humana según OMS (2010)</i>	56
<i>Tabla 08 Parámetros para medir la concentración de semen en humano</i>	56

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento. Las infecciones del tracto genitourinario masculino representan un importante problema de salud y representan casi el 15% de los casos de infertilidad masculina. Un estudio de la Organización mundial de la salud en el centro de África reportó un 50% de casos de infertilidad masculina. Las infecciones pueden afectar diferentes sitios del tracto reproductivo masculino, tales como el testículo, el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias masculinas. Las infecciones por bacterias presentes en las muestras de semen pueden influir en la calidad de los espermatozoides, principalmente, mediante la inducción de apoptosis y necrosis, siendo en parte responsables de la reducción de la motilidad espermática. Pueden afectar en diferentes puntos de su desarrollo y maduración que compromete la espermatogénesis reduciendo su calidad y cantidad. Las infecciones genitourinarias también están asociadas con cambios biológicos y bioquímicos en el plasma seminal que pueden afectar la función y el potencial de fertilidad de los espermatozoides. Si los resultados del espermatograma reflejan la presencia de leucocitos en la muestra, alteraciones en el pH, motilidad y vitalidad espermática, se podrían aplicar estudios microbiológicos, para la búsqueda de bacterias pertenecientes al género *Escherichia*, entre otros. Las concentraciones bacterianas utilizadas en experimentos *in vitro* son mucho mayores de las que serían recuperables del eyaculado. Existen discrepancias observadas entre estudios *in vitro* y estudios *in vivo* para la inductividad de la reacción acrosómica en muestras de semen inducidas y fisiológicamente infectadas. El análisis seminal constituye la primera etapa biopatológica en la exploración de la fertilidad masculina, que permite orientar hacia una participación masculina en la hipofertilidad de pareja o bien para confirmarla. Aunque se han descrito correlaciones positivas entre

azoospermia, presencia de microorganismos y mala calidad y cantidad de semen en pacientes masculinos, la interacción entre la contaminación bacteriana del semen y la infertilidad masculina sigue siendo objeto de controversia, la presencia de bacterias en muestras de semen de hombres infértiles tiene una prevalencia similar a la observada en hombres fértiles.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Escherichia coli es el microorganismo aislado con mayor frecuencia en pacientes con infecciones del tracto genital masculino, la cual se le atribuye efectos negativos ya que produce alteraciones en la morfología, ruptura de membrana plasmática y daño acrosomal en los espermatozoides. Se ha demostrado que la *E. coli* se adhiere a los espermatozoides generando aglutinaciones ocasionando disminución tanto en motilidad como vitalidad, lo que genera un problema de infertilidad masculina.

1.2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las infecciones en el tracto urogenital masculino de *E.coli*, pueden contribuir a la infertilidad masculina, sin embargo existe la controversia si las infecciones de *E. coli* tienen el mismo efecto en todos los pacientes. En nuestro país, la infertilidad no es considerada como problema de salud pública prioritario; sin embargo, la demanda de atención por esta patología se incrementa y la oferta de servicios todavía es limitada.

1.3. OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar el efecto *in vitro* de *Escherichia coli* uropatógena sobre la calidad espermática humana.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar el efecto *in vitro* de *E.coli* uropatógena en el parámetro seminal de motilidad, vitalidad y aglutinación.
- Estimar el impacto *in vitro* de *E.coli* uropatógena en la fragmentación de ADN espermático humano.

II. MARCO TEORICO

2.1. *Escherichia coli* Uropatogènica:

Escherichia coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae, el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos. Habitante común de la flora microbiana normal del tubo digestivo, es un microorganismo comensal, pero al adquirir ciertos genes de virulencia presentes en plásmidos y en bacteriófagos pueden convertirse en patógenos importantes. (Murray, 2006).

La mayoría de los patógenos responsables de las infecciones urinarias son bacilos entéricos Gram negativos, siendo *Escherichia coli* el microorganismo más frecuente, causando entre el 70% y el 90% de las infecciones urinarias. (Gupta y col., 2001). El subconjunto de *E.coli* que causa complicaciones como cistitis y pielonefritis aguda es distinta de las cepas comensales de *E.coli* que comprenden la mayoría de los *E.coli* que habitan en el colon de los seres humanos. Un número de serogrupos O tienen fenotipos que están epidemiológicamente asociadas con cistitis y pielonefritis aguda en el tracto urinario normal. (Kaper, 2004)

2.2. Fisiología de la función Testicular

El aparato reproductor masculino está constituido por órganos externos (pene y escroto), órganos internos (testículos, vías espermáticas y vesícula seminal) y órganos anexos como glándulas bulbouretrales y próstata, encargados de suministrar al eyaculado su composición química y más del 90 % del volumen total de semen (Tanagho y col., 2005). Estos tejidos accesorios producen sustancias de gran importancia biológica, ya que protegen al tracto urinario de agresiones patológicas que invaden la uretra, mediante la secreción de metales como el zinc y proteasas como lisozimas

e inmunoglobulinas secretoras; el mecanismo de lavado de la uretra por estas secreciones establece un medio hostil a los agentes invasores (Sanz y col., 1999)

En el testículo humano el compartimiento tubular representa el 60-80% del volumen testicular, donde se da lugar la espermatogénesis y el 10-20% restante está ocupado por las células de Leydig. En el compartimiento intersticial de los testículos humanos se encuentran aproximadamente 200×10^6 células de Leydig que producen testosterona. Así mismo, contiene células del sistema inmune como macrófagos y linfocitos; por cada 10-50 células de Leydig se encuentra un macrófago, los cuales ayudan en la proliferación y producción de estas células. En el compartimiento tubular toma lugar la espermatogénesis, donde contiene células germinales y dos tipos de células somáticas; peritubulares y células de Sertoli. Las células peritubulares ayudan al transporte de los espermatozoides maduros mediante la salida por los túbulos seminíferos gracias a una concentración de estas células y otros reguladores de contracción (Nieschlag, y col., 2010)

La diferenciación del testículo ocurre entre la 6ª y 8ª semana de vida intrauterina, y depende tanto de la presencia de un inductor en el brazo corto del cromosoma Y, como de las células de Sertoli de los túbulos seminíferos que producen la hormona inhibidora de Müller (MIH) que inhibe la formación de trompas de Falopio, útero y porción superior de la vagina. Las células de Leydig secretan testosterona que permiten la diferenciación del conducto de Wolff en epidídimo, conducto deferente y vesículas seminales (Decimo segunda semana). La testosterona por acción de la 5 alfa – reductasa se convierte en dihidro – testosterona (DHT). La DHT favorece la formación del glande, del cuerpo del pene, de los escrotos y de la próstata. (Dohle, 2010)

2.3. Transporte de espermatozoides y maduración en el epidídimo

El transporte del espermatozoide desde que es liberado a la luz tubular hasta que está listo para salir en la eyaculación dura 7–10 días. En el espermatozoide testicular ocurren cambios anatómicos, bioquímicos funcionales conforme pasa por el epidídimo. El epidídimo es un túbulo simple, enrollado sobre sí mismo, que tiene una longitud de 4–5 metros divididos en cabeza, cuerpo y cola. En el epidídimo, las contracciones regulares de la pared del conducto parecen proveer la fuerza necesaria para movilizar los espermatozoides. Aunque es reconocido que los espermatozoides del epidídimo (cabeza) carecen de capacidad fertilizante, los recientes estudios de fertilización in vitro han demostrado que esto es incorrecto; lo que sucede es que la capacidad fertilizante aumenta a medida que los espermatozoides progresan de la cabeza a la cola. (Gonzales, 1992)

En el epidídimo los espermatozoides maduran y pueden ser almacenados. La maduración implica una serie de cambios estructurales que conllevan a la adquisición de la motilidad, disminución de la gota citoplasmática en la pieza intermedia, cambios eléctricos en la superficie de la membrana, aumento en el contenido de AMPc (Adenosin monofosfatocíclico), modificación de la forma del acrosoma y adquisición de proteínas de superficie que se creen son factores descapacitantes. (Dohle, 2010)

La actividad contráctil de las células peritubulares, presentes en el compartimiento intersticial de los testículos, es responsable de la contracción de los túbulos seminíferos para el transporte de espermatozoides y fluido testicular, y por lo menos parcialmente, para la liberación de espermatozoides durante la espermiación (Virtanen, 1986). En esta función participan en forma sincronizada las células de Sertoli y las células peritubulares, donde el estimulante de la contracción de dichas células en el túbulo seminífero es el péptido endotelina (ET), que es un

potente vasoconstrictor de origen epitelial secretado por las células de Sertoli (Fantoni, 1993).

2.4. Calidad y análisis seminal

El análisis del semen convencional, conocido como espermograma, seminograma o espermiograma, continúa siendo el método comúnmente aceptado para estudiar al factor masculino, ya que es rápido, sencillo y muy económico. El propósito fundamental de este análisis radica en evaluar los parámetros descriptivos clásicos tales como los aspectos macroscópicos y microscópicos del eyaculado, producido por masturbación. Las características a analizar son aspecto, olor, licuefacción, viscosidad, pH, volumen, concentración espermática, motilidad, vitalidad y morfología del espermatozoide, presencia de detritos, leucocitos, células epiteliales extruidas y otros elementos celulares del semen, así como la aglutinación entre espermatozoides y agregación (Remohi y col., 2001). Sin embargo, su valor se ve afectado por la variabilidad y/o heterogeneidad de la calidad del semen en muestras repetidas de un mismo individuo, variando el resultado incluso cuando es procesado por el mismo investigador, por lo tanto, el hecho de encontrar alteraciones en el análisis seminal, no significa que se haya encontrado la causa de la infertilidad en los varones (Barja y Berrios, 2003).

Los parámetros macroscópicos (volumen, pH, aspecto, consistencia, olor y licuefacción) indican principalmente la función y el estado de salud de las glándulas accesorias como la próstata, vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales. En cambio, los parámetros microscópicos (concentración, motilidad, vitalidad y morfología) radican en la función testicular, producción de espermatozoides, viabilidad de los conductos excretores y la funcionalidad del epidídimo, órgano encargado de la maduración final y movilidad de los espermatozoides (Tapia, 2003; OMS, 2010)

Según la OMS, el término calidad espermática se refiere a la investigación de los parámetros espermáticos de un individuo, para verificar si los mismos están dentro de los que se consideran valores referenciales. Dicha calidad va a depender de una serie de factores relacionados con el estilo de vida de cada persona.

2.5. Infecciones genitourinarias

Las infecciones del aparato genitourinario en el hombre aportan el 41,45 +/- 28,55% del total de las causas de infertilidad (Barten, 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), conduciendo al deterioro de los diferentes estadios de la espermatogénesis, afectando la producción y la calidad del semen (Huwe., 1998; Hales, 1999)

2.5.1. Infecciones genitourinarias en el hombre

Las infecciones genitourinarias (IGU) en el hombre representan un porcentaje alto en la etiología de la infertilidad debido a que de alguna forma alteran la calidad seminal y afectan principalmente la cantidad y movilidad de los espermatozoides, que al adherirse a la pieza media de la cola, ya sea por aglutinación de estos o por sustancias que se secretan al medio extracelular logran inmovilizarlos. Las infecciones del tracto genital, causadas por ITS provocan inflamación de las glándulas sexuales accesorias y del epidídimo, por lo que se recomienda la identificación de los gérmenes implicados mediante un espermocultivo (Sanocka, 2005).

2.6. Infecciones en el semen por *Escherichia coli*

Infecciones del tracto genitourinario masculino cuenta con capacidad para 15% de los casos de infertilidad masculina. Las infecciones agudas y crónicas y la consiguiente inflamación en el sistema reproductivo masculino pueden comprometer la función de las células de espermatozoides y todo el proceso de espermatogénesis, causando alteraciones espermáticas cualitativas y cuantitativas. Estudios recientes han demostrado que la simple presencia de bacterias en muestras de semen puede comprometer la calidad del espermatozoide. Las bacterias responsables de las contaminaciones de semen generalmente se originan en el tracto urinario de los pacientes o se pueden transmitir por la pareja a través de las relaciones sexuales. (Sánchez y col., 1989).

Escherichia coli es el microorganismo aislado con mayor frecuencia en pacientes con infecciones del tracto genital masculino (ITGM), además, se adhiere rápidamente a espermatozoides *in vitro*, resultado en una disminución de la movilidad y aglutinación de los mismos (Sánchez y col., 1989). Los espermatozoides por *E.coli* son capaces de atravesar el mucus cervical y transportar la bacteria hasta el tracto genital femenino (Sánchez y col., 1989, Diemer y col., 2003). La presencia de *E.coli* en semen induce a una baja motilidad de espermatozoides dependiendo de la relación semen-bacteria que se encuentre presente. La unión de *E.coli* al espermatozoide es a través de residuos de azúcar, especialmente manosa, receptores que también son cruciales para la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito (Sánchez y col., 1989, Auroux y col., 1991). La influencia de las bacterias Gram-positivas uropatógenas sobre la morfología y la función de los espermatozoides ha sido poco investigado hasta ahora.

2.7. Infertilidad

La infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo definida como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas. (OMS, 2010). La infertilidad masculina es una alteración que afecta aproximadamente al 15% de las parejas cada año. En el 30% de estas, la infertilidad solo se debe al factor masculino y un 20% a una combinación de ambos, esto significa que el factor masculino está involucrado en alrededor del 50% de las parejas infértiles. Es aceptado que una de las causas potenciales de infertilidad masculina son las infecciones del tracto urogenital, ya sean asintomáticas o sintomáticas. Las infecciones genitourinarias en el hombre representan un porcentaje importante en la infertilidad y aunque no están claros los mecanismos patogénicos implicados a nivel celular, de alguna forma alteran la calidad espermática y afectan, principalmente, la cantidad y movilidad de los espermatozoides. (Nuñez, y col. 2007)

2.8. Integridad del ADN espermático: Implicancias en la infertilidad

Si tomamos en cuenta que la calidad seminal es el resultado de la interacción de multifactores como se ha explicado anteriormente y este puede ser medido solo con los parámetros establecidos por la OMS (motilidad, vitalidad, morfología y concentración) estamos siendo bastante sesgados ya que estamos dejando de lado la variable responsable de la transmisión de la herencia, la integridad del ADN. El daño que se produce en el ADN de las células germinales es el responsable tanto de la no progresión de los embriones, abortos y malformaciones congénitas como la hidrocefalia e inclusive recientes estudios llegan a relacionarlo a una predisposición a cáncer infantil (Borini y col., 2006) (Simon & Lewis, 2011). La literatura sugiere la importancia del monitoreo de la integridad del ADN espermático como nuevo marcador de la calidad seminal y además como

una variable a tomar en cuenta en los tratamientos de reproducción asistida ya que se ha corroborado que el potencial fértil de espermatozoide disminuye tanto *in vitro* (Sun y col, 1997). Bajo estas razones se realiza una pequeña revisión para entender los factores envueltos en el daño a la integridad de ADN y su importancia en los tratamientos de reproducción asistida.

III. ANTECEDENTES

La motilidad y vitalidad del espermatozoide disminuyen en pacientes con infección del tracto genital (Diemer y col., 1996, Huwe y col., 1998). Se aisló *Escherichia coli* de la secreción prostática en el 65-80% de los casos de prostatitis bacteriana crónica (Weidner y col., 1991). En una serie de aislamientos de *E. coli* de hombres con prostatitis, se encontró que los serogrupos predominantes fueron O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 y O75 (Terai y col., 1997). En el caso de *E. coli* aislada de semen de hombres sometidos a un estudio de infertilidad, los serogrupos más comunes fueron O1, O2, O4 y O6 (Bartoov y col., 1991). Estos serogrupos también se encuentran entre los uropatógenos *E. coli* (Johnson y col., 1994), que determina que *E. coli* induce la pérdida de la función espermática, y esto se ha demostrado a través de experimentos in vitro en la incubación de espermatozoides con *E. coli*. La disminución de la motilidad espermática por *E. coli* se ha atribuido a aglutinación de espermatozoides (Wolff y col., 1993; Monga & Roberts, 1994; Diemer y col., 1996), al plasma (Fraczek y col., 2012) y rupturas de membrana acrosomal (Diemer y col., 2000) la disminución del potencial de la membrana mitocondrial del espermatozoide (Schulz y col., 2010). Aunque estos estudios se han realizado con *E. coli* aislados de diferentes pacientes, en la mayoría de efectos observados se han generalizado a todas las bacterias la misma cepa. (Fraczek y col., 2012) reportó que *E. coli* uropatogénica ha disminuido el potencial de la membrana mitocondrial de espermatozoides e induce la codificación de lípidos.

Las toxinas de *E. coli*, tales como lipopolisacárido y porinas, se ha encontrado que inducen la muerte celular en espermatozoides. Además, los lipopolisacárido induce fragmentación de ADN (ácido desoxirribonucleico) en espermatozoides humanos (Gorga, 2001). Se reporta recientemente que los serogrupos no son relevantes para predecir

la patogenicidad de *E. coli* en espermatozoides humanos *in vitro* (Boguen, 2014). Las infecciones pueden afectar a diferentes partes del sistema reproductor masculino como el testículo, el epidídimo y las glándulas accesorias masculinas. Los espermatozoides posteriormente pueden verse afectados por infecciones de diferentes puntos de su desarrollo y maduración. (Hales y col, 1999) El efecto inhibitorio directo de *E.coli* sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides depende de la concentración de las bacterias, se observa un efecto inhibitorio distinto a concentración de 10^{-6} y aglutinación con 10^{-7} ufc/ml (Diemer y col, 1996). Un estudio demostró el mecanismo de inmovilización de espermatozoides por *E. coli* mediante la mezcla con espermatozoides humanos a diferentes concentraciones (100-1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$), los resultados demostraron que la inmovilización completa de los espermatozoides podría ser observada a una concentración mínima de 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ después de 30 minutos de incubación, mientras que 800 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de sí fueron necesaria para causar la inmovilización completa de los espermatozoides inmediatamente (20s). A una concentración de 2,1 mg / ml , el mecanismo de inmovilización de espermatozoides no solo causó la inmovilización sino tuvo un efecto espermicida. (Prabha y col; 2010).

Boguen y col. (2013) En el presente estudio se comparó el efecto *in vitro* de diferentes cepas de *E.coli* en la calidad espermática, se aislaron de nueve pacientes con infección urinaria, después de 1 h de incubación se evaluó la motilidad espermática, vitalidad y el potencial mitocondrial de la membrana, la motilidad espermática se redujo en cinco de nueve *E.coli* aislados, dos fueron identificados como cepas O6 y no disminuyeron la motilidad del esperma, ninguno afectó la vitalidad o el potencial mitocondrial.

La pérdida de la motilidad del esperma se asocia con toxicidad por endotoxinas como LPS de una cepa *E.coli* K12, este estudio examina la acción de los componentes de la pared celular de las enterobacterias sobre la vitalidad de los espermatozoides humanos, los lipopolisacárido extraídos

de *E.coli* K12 causaron una mortalidad de aproximadamente el 80% de los espermatozoides a una concentración de 50 µg/ml. (Galdiero y col, 1988).

Cano y col, 2015 En esta investigación tuvieron como objetivo el contacto de los espermatozoides con algunas especies bacterianas y sus factores solubles tienen un efecto negativo en la calidad seminal, alterando la función reproductiva del hombre, los resultados demuestran que las cepas de *E.coli* y los factores solubles alteran la movilidad espermática y algunos de los parámetros funcionales evaluados luego de 3 h de incubación con los espermatozoides humanos, sin que estos cambios sean estadísticamente significativos.

Un estudio determinó que la exposición de *E.coli* reduce no solo la función de motilidad en el espermatozoide sino también en la reacción del acrosoma, lo cual es otra función muy importante, la reacción del acrosoma es esencial durante el proceso de fertilización ya que se activa cuando los espermatozoides penetran en la zona pelúcida y se fusionan con la membrana del ovocito. (El-Mulla y col, 1996, Kala y col 2011) demostró en su investigación que *E. coli* afecta la motilidad y la vitalidad del espermatozoide humano. *E.coli* aislada del semen de pacientes infértiles producen una profunda depresión de la motilidad por aglutinación *in vitro*.

Villegas y col, 2005, reporta que *E.coli* induce a la apoptosis en el espermatozoide humano con dos posibles mecanismos: una actividad citotóxica directa de toxinas bacterianas y el contacto con pili y flagelos. *E.coli* en particular inicia el proceso de apoptosis mediante la activación de varias caspasas y proteasas responsables de los cambios mitocondriales, alteración en la simetría de la membrana y la fragmentación del ADN y la producción de toxinas y productos metabólicos procedentes de la proliferación bacteriana.

Por otro lado, un estudio publicado en 1992, demostró que la cantidad de espermatozoides presentes en el semen de hombres de 21 países había disminuido en un 50% entre 1940 y 1990 (Carlsen y col, 1992), lo cual se ratifica y se confirma en los últimos años; y según Catanzariti (2013)

algunos cambios en la evaluación de la calidad seminal de acuerdo a los criterios del manual OMS 1999 han sido modificados en el actual manual OMS 2010, donde los rangos de valores normales en los parámetros de motilidad y morfología se han reducido en 16.35% y 10.46% respectivamente, lo que implica que las evaluaciones se vuelven más drásticas al momento de calificar a las muestras como normales o anormales.

IV. HIPÓTESIS

Existe efecto *in vitro* a diferentes concentraciones de *Escherichia coli* uropatógena sobre la morfología, funcionalidad y fragmentación de ADN en la calidad espermática humana.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de ejecución

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

5.2. Tipo y diseño de investigación

Se realizó un estudio experimental longitudinal y observacional ya que se analizaron los efectos de *E.coli* a través del tiempo en esperma humano.

5.3. Variables

Variable dependiente

Calidad espermática humana.

Variable independiente

Efecto de las concentraciones de *Escherichia coli*

Tiempo

5.4. Operacionalización de las Variables

Variables	Indicadores	Valor Final	Tipo de Variable
Motilidad	Microscopio y Cámara Mackler	Progresivos No Progresivos Inmóviles	Cualitativa Discreta
Concentración	Microscopio y Cámara Mackler	Millones ($\times 10^6$)	Cualitativa continua
Vitalidad	Microscopio y Eosina	Porcentaje	Cualitativa discreta
Fragmentación de ADN	Halos grandes, medianos, pequeños y sin halo	Porcentaje	Cualitativa discreta
Tiempo	Horas	Efecto negativo Sin efecto	Cuantitativa discreta

5.5. Muestreo

Se evaluaron 40 muestras de semen provenientes de jóvenes con edades comprendidas entre 20 y 25 años, a cada individuo se le indicó mediante un instructivo, las normas para la toma de muestra de semen, y se le entregó un recolector de boca ancha para la misma, así como también un consentimiento escrito de inclusión en el estudio (Anexo N°01) y una encuesta referente para los datos del estudio (Anexo N°02)

5.6. Metodología y Análisis de datos

a) Obtención de datos

Se obtuvo la cepa microbiana ATCC *E.coli* 25922 por medio de compra marca Microbiologics®, y se evaluó el efecto de *E.coli* en la calidad espermática en humano, se incubó 1ml de semen con buffer Flushing (Origio®) con la cepa de *E. coli*, se utilizó cuatro concentraciones diferentes, para obtener una relación de *E. coli* a espermatozoides de

0,5:9,5 1:9, 3:7, y 5:5. Como control basal, los espermatozoides se incubaron sin *E.coli* solo con el buffer Flushing (Origio®) suplementado con antibióticos. (una relación de esperma a *E.coli* de 1:0). Posteriormente, para el análisis se extrajo alícuotas de suspensión de esperma de cada grupo y el control basal para evaluar la motilidad progresiva, vitalidad, aglutinación de espermatozoides y fragmentación de ADN.

b) Análisis del líquido seminal

Características macroscópicas: Tiempo de Licuefacción, Consistencia, pH del semen y Volumen. La evaluación macroscópica se realizó a temperatura ambiente, siguiendo las pautas OMS.

Tiempo de Licuefacción: se anotó el tiempo, el cual se determinó luego de un período entre 30 y 45 minutos.

Todas las evaluaciones seminales realizadas a continuación se basaron en el esquema establecido por la Organización Mundial de la Salud del 2010. (Tabla 01 Anexo)

5.7. Evaluación microscópica de las muestras seminales:

Motilidad

Para la evaluación seminal se utilizó un Microscopio LEICA de contraste de fases con platina térmica a 37°C, los cubreobjetos y portaobjetos fueron sometidos al calor previamente en una plancha caliente a 37°C.

La muestra se homogenizó aspirando 10 veces con una pipeta de plástico estéril 1,5 mm de diámetro luego, se realizó en una primera observación a

100x, usando un ocular 10x y objetivo 10x. Para evaluar agregaciones, las aglutinaciones y células no espermáticas, posteriormente se colocó el objetivo en 40x y se realizó la observación a 400x lo que permitió realizar la estimación de la dilución necesaria para calcular la concentración espermática, y la motilidad.

Para evaluar la motilidad se colocó una alícuota 10ul de la muestra seminal en una lámina portaobjeto temperada a 37°C y una lámina cubre objeto por duplicado, lo que permite que se obtenga una profundidad de campo de 20 micras para que no se obstaculice el libre movimiento de los espermatozoides. Se dejó reposar por 1 minuto para su evaluación.

Primero se contaron los espermatozoides con motilidad progresiva, luego los espermatozoides con motilidad no progresiva y por último los inmóviles. Se realizó un doble contaje y se evaluaron 3 campos de 200 espermatozoides respectivamente.

Vitalidad

Se tomó un frotis del eyaculado y se procedió a realizar la coloración supravital, se mezcló una alícuota de 5ul de semen con 5ul de solución de eosina preparada al 0.5%, en un portaobjeto y se cubrió con un cubreobjetos se dejó en reposo por 30 segundos y se observó a 400x. Se realizó un contaje de 200 espermatozoides por campo bajo un microscopio de fase de contraste.

Concentración

Se siguió el mismo esquema efectuado para la evaluación motilidad, se procedió a montar el portaobjeto con 10ul de muestra seminal y se cubrió con el cubreobjetos. Se dejó en reposo 1 minuto a 37°C y se colocó en el microscopio.

Según el número de espermatozoides que se contaron se realizó una determinada dilución. Se cargó ambas sub-cámaras de la cámara de Neubauer, con 10ul de semen diluido previamente y se analizó bajo un microscopio de fase de contraste a 400x, se evaluó la muestra luego de 5 minutos de reposo contando 200 espermatozoides. Los resultados fueron evaluados calculando la suma y diferencia de los dos contajes. Se tomó en cuenta aquellos espermatozoides que se encuentren en el interior del cuadrado, una vez que se obtuvo la cantidad de espermatozoides contados, se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Concentración} = \frac{N^{\circ} \text{ spz}}{N^{\circ} \text{ filas}} \times \frac{1 \text{ fila}}{20 \text{ nl}} \times \text{Factor Dilución} = C \times 10^6 \text{ spz/ml}$$

Fragmentación de ADN

Test de dispersión de la cromatina espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersion Test)

Se usó una alícuota de 50 µl de cada muestra, la cual fue diluida hasta obtener una dilución de 10 millones de espermatozoides por mililitros 25 µl de dilución, fueron mezcladas con 75 µl de agarosa semisólida de bajo punto de fusión al 1% provista por el kit. Esta suspensión se vertió a placas pre tratadas con agarosa solidificada provistas por el kit al 0.65% y se cubrió cuidadosamente con el cubreobjetos hasta la solidificación de la mezcla a 4 grados centígrados para luego retirar el cubreobjeto. La laminilla se incubó por 7 minutos en una solución acida de denaturación a oscuridad provista por el fabricante para luego incubarla en la solución de neutralización por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas en buffer de lavado por 2 minutos para luego las laminillas ser deshidratadas en baños secuenciales de 70%, 90% y 100% de etanol de un minuto respectivamente. Las láminas fueron teñidas con tinción DiffQuik según las instrucciones del fabricante.

Medición de la fragmentación:

Las unidades de valoración arbitrarias fueron el índice de fragmentación se contaron 100 células por muestra a un aumento de 40x, la clasificación a usar fue la siguiente:

Halo Grande =Tamaño del halo debe ser superior al diámetro de core celular, indicando esto una integridad en su ADN

Halo Mediano= Tamaño del halo debe ser igual al diámetro de core celular, indicando esto una integridad en su ADN

Halo Pequeño=Tamaño del halo menor al core celular ,indicando esto un daño en la integridad de su ADN

Sin Halo= Ausencia de halo, indicando esto un daño en la integridad del ADN

Degradado= Sin halo y core difuso y degradado, indica daño en la integridad del ADN.

5.8. Método de recuento por diseminación en superficie de agar

Obtención de diluciones seriadas

Según el número de microorganismos esperado y sobre la base de la dilución inicial de 1 g en 9 ml (dilución 10^{-1}), se preparó diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , usando pipetas estériles para cada dilución, tomando 1 ml de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada. Se mezcló mecánicamente o manualmente cada dilución agitándola 25 veces en 7 segundos con movimientos ascendentes y descendentes formando un ángulo de abertura aproximado de 60° entre brazo y antebrazo.

Siembra de las placas por extensión en superficie

Se transfirió con una pipeta estéril 0,1 ml de cada dilución de la muestra a 2 placas de Petri con el medio de cultivo ya solidificado y seco. Se extendió cuidadosamente el inóculo sobre la superficie con la ayuda de una varilla de vidrio acodada y estéril (asa de Driglasky). Se esperó 5 minutos a que se seque el inóculo en la superficie del agar.

Incubación

Se incubo las placas a 37°C por 24hrs.

Recuento de las colonias

Pasado el tiempo de incubación se examinó las placas. Las colonias aparecieron en la masa del agar Mc Conkey. Cada colonia representa los descendientes de la bacteria *Escherichia coli* o de una unidad formadora de colonia (UFC).

Se eligió de entre todas las placas las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 30 y 300 colonias /placa (esto proporcionó una precisión estadística suficiente). El recuento de microorganismos se expresó en UFC /ml.

5.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS versión 23 con un 95% de confiabilidad. Los datos de edad de los donantes y los diferentes diagnósticos fueron expresados en media y desviación estándar. Se realizó una tabla de frecuencias para obtener gráficos en excel

indicando la prevalencia e incidencias de las alteraciones en los espermogramas realizados.

5.10. Aspecto ético

Dentro de las consideraciones éticas para la ejecución de esta investigación se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, y con la autorización de los donantes para uso exclusivo de datos de los mencionados donantes.

VI. RESULTADOS

Se evaluaron 40 muestras de donantes jóvenes en edades comprendidas entre 20 y 25 años.

6.1. Resultados del análisis seminal en parámetros microscópicos

Efecto de *E.coli* con la vitalidad del esperma

La vitalidad espermática disminuyó en todas las concentraciones de los tratamientos con la cepa ATCC *E.coli* 25922 en comparación con el grupo control sin bacterias ($P < 0,05$), de 87.2% +/- 5.49% a 77% +/- 4.5% en t1, a 72,94% +/-5,29% en t2, a 67,84% +/- 7,16% en t3 y 59,35% +/- 5,43% en t4.

Efecto de *E.coli* con la Motilidad Progresiva espermática

La motilidad progresiva espermática disminuyó en cada tratamiento con la cepa ATCC *E.coli* 25922 en el grupo control con un valor de 71,94% +/- 13,55% a 42,69% +/-27,66% en t1, en t2 a 37,77% +/- 29,51% en t3 a 26,27% +/- 35,89% y en t4 a 17,80% +/- 24,61%.

Efecto de *E.coli* con la Motilidad in situ espermática

La motilidad in situ espermática tuvo una variación significativa en cada tratamiento con la cepa ATCC *E.coli* 25922 en el grupo control con un valor de 15,39% +/- 11,02% a 43,72% +/-26,14% en t1, en t2 a 42,60% +/- 26,96%, en t3 a 55,63% +/- 30,55% y en t4 a 57,96% +/- 23,03%.

Efecto de *E.coli* con la No Motilidad espermática

La no motilidad espermática aumentó en cada tratamiento con la cepa ATCC *E.coli* 25922 en el grupo control con un valor de 12,73% +/- 8,33% a 13,23% +/-7,83% en t1, en t2 a 19,00% +/- 15,47% en t3 a 20,43% +/- 20,98% y en t4 a 27,01% +/- 21,70%.

6.2. Efecto de *E.coli* en la Aglutinación espermática

- La aglutinación espermática aumentó con la concentración de los tratamientos en t1 (9,5µl de semen -0,5 µl de *E.coli*) 60,02% +/- 25,96%, t2 (9µl de semen -1µl de *E.coli*) 65,03% +/-24,15%, t3 (7 µl de semen – 3 µl de *E.coli*) 68,60% +/-22,30%, t4 (5 µl de semen - 5 µl de *E.coli*) 72,95% +/-21,08%.
- El resto de espermatozoides observados tuvieron motilidad progresiva al minuto de observación en t1 y t2, en t3 y t4 se observó motilidad progresiva in situ y no motilidad.

6.3. Efecto de *E.coli* en la Fragmentación de ADN

La mayor frecuencia en el efecto de *E.coli* en la fragmentación de ADN fue en el t4 (5µl de semen - 5µl de *E.coli*) con 24,83% +/-4,12% de los 40 casos, la menor alteración tuvo una media de 5,4% +/- 1,89% para el grupo control sin presencia de *E.coli*, en el t1 (9,5µl de semen – 0,5µl de *E.coli*) fue de 9,03% +/-2,36%, en el t2 (9µl de semen – 1µl de *E.coli*) fue de 14,6% +/- 2,84%, en el t3 (7µl de semen – 3µl de *E.coli*) fue de 21,4% +/- 4,34% de los casos.

VII. DISCUSIÓN

Las infecciones por bacterias presentes en las muestras de semen pueden influir en la calidad de espermatozoides, pueden afectar en diferentes puntos de su desarrollo y maduración que compromete la espermatogénesis reduciendo su calidad y cantidad.

En el presente estudio se evaluó el efecto *in vitro* de *Escherichia coli* uropatógena en la calidad espermática humana, los resultados demuestran que la cepa ATCC 25922 altera todas las variables espermáticas aplicadas en este estudio. Otros investigadores han demostrado que la pérdida de la motilidad espermática por *E.coli* se ha atribuido a un mecanismo de aglutinación dependiente de manosa (Wolff y col., 1993). La pérdida de motilidad del espermatozoide también se ha asociado con toxicidad por endotoxinas tales como LPS de *E. coli* (Galdiero y col., 1988).

Asimismo en el presente estudio se trabajó a una concentración de 10^{-6} (32×10^8 ufc/ml) lo cual disminuyó la motilidad progresiva de 71,94% a 42,69% y vitalidad de 87,28% a 77,37% de los espermatozoides. Otros estudios como (Diemer y col, 1996) obtuvieron un efecto inhibitorio directo de *E.coli* sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides distintos a concentración de 10^{-6} y aglutinación con 10^{-7} ufc/ml. Otro estudio demostró el mecanismo de inmovilización de espermatozoides por *E. coli* mediante la mezcla con espermatozoides humanos a diferentes concentraciones (100-1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$), los resultados demostraron que la inmovilización completa de los espermatozoides podría ser observada a una concentración mínima de 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ después de 30 minutos de incubación, mientras que 800 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de sí fueron necesaria para causar la inmovilización completa de los espermatozoides inmediatamente (20s). A una concentración de 2,1 mg / ml, el mecanismo de inmovilización de

espermatozoides no solo causo la inmovilización sino tuvo un efecto espermicida. (Prabha y col; 2010).

Estudios realizados determinan que *E.coli* induce la pérdida de la función espermática, y esto se ha demostrado a través de experimentos in vitro en la incubación de espermatozoides con *E.coli* como lo sostiene (Johnson y col., 1994), En este trabajo los resultados han sido obtenidos, observándose una disminución en los principales parámetros espermáticos (motilidad y vitalidad espermática) así como también la fragmentación del ADN espermático, otros estudios como (Villegas y col, 2005) reporta que *E.coli* induce a la apoptosis mediante la activación de proteasas responsables de los cambios mitocondriales y la fragmentación del ADN. Otros investigadores como (Gorga, 2001) menciona que las toxinas de *E.coli*, tales como lipopolisacárido y porinas induce a la fragmentación de ADN en espermatozoides. En el presente trabajo la fragmentación de ADN aumentó de 5,4% del grupo control a 9,03% en el primer tratamiento (9,5µl – 0,5µl) de los espermatozoides.

Otra alteración más frecuente observada fue la aglutinación espermática, que al diluir con la cepa ATCC 25922 a una concentración de 10^{-6} ufc/ml aumenta el porcentaje en cada uno de los tratamientos de 60,02% en el primer tratamiento a 72,95% de aglutinación en el cuarto tratamiento. (El-Mulla y col, 1996, Kala y col 2011) demostró en su investigación que *E. coli* afecta la motilidad y la vitalidad del esperma humano. *E.coli* aislada del semen de pacientes infértiles producen una profunda depresión de la motilidad por aglutinación *in vitro*.

VIII.CONCLUSIONES

- La concentración alta de *E.coli in vitro* afecta los parámetros de motilidad, vitalidad y fragmentación de ADN en la calidad espermática en humanos.
- Se determinó que el efecto patógeno durante el parámetro de la motilidad progresiva están por debajo de los valores de referencia.
- Se comprueba que a medida que aumenta la concentración de *E.coli*, aumenta la fragmentación de ADN espermático.
- Los tratamientos, en presencia de *E.coli* causa un efecto patógeno de aglutinación en semen humano.

IX. RECOMENDACIONES

- El análisis de semen en humanos debe ser procesada en menos de 1 hora para evitar el cambio de temperaturas, colectada en un frasco adecuado y conservarlo en una estufa a 37°C.
- Continuar la complementación de un diagnóstico seminal con un test de fragmentación de ADN que permita contribuir en los tratamientos de las parejas con problemas de fertilidad y promover el estudio bacteriológico del semen en humanos.
- Desarrollar nuevas investigaciones con otros agentes patógenos que afecten la calidad seminal en humanos y ocasionen problemas de infertilidad.
- Es importante implementar el estudio cromosómico de espermatozoides en los laboratorios clínicos, como complemento de otros estudios y poder evidenciar un daño al ADN genómico, ya que estos resultados pueden ser de gran ayuda al médico para identificar las causas de la infertilidad masculina y orientar de mejor manera a las parejas para lograr un embarazo a término.

REFERENCIAS CITADAS

- AUROUX, M.R.; JACQUES, L.; MATHIEU, D. & AUER, J. (1991). Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in-vitro study in man with *Escherichia coli*. Int. J. Androl., 14:264-70.
- BARJA, L.; BERRIOS, L. (2003). Alteraciones de espermatogramas en varones que acudieron por infertilidad de pareja a la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Edgardo Rebagliati Martins. Tesis para optar el título profesional especialista en Gineco – Obstetricia. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 22pp.
- BARTEN, J. (1998). Screening for infertility in Indonesia. Results of examination of 863 infertile couples. Bull World Health Organ., 76(2): 183-7.
- BARTOOV, B.; OZBONFIL, D.; MAYAN, MC.; OHAD, E.; NITZAN, Y.; (1991). Virulence characteristics of male genital tract *Escherichia coli* isolated from semen of suspected infertile men. Andrología 23:387-394.
- BOGUEN, R.; TREULEN, F.; URIBE, P.; VILLEGAS, J. (2013). Distinct isolates of uropathogenic *Escherichia coli* differentially affect human sperm parameters in vitro. Journal of Andrology, Vol. 46(8): 943-947.
- BOGUEN, R.; TREULEN, F.; URIBE, P.; VILLEGAS, J. (2014). Ability of *Escherichia coli* to produce hemolysis leads to a greater pathogenic effect on human sperm. Fertility and Sterility, Vol. 103(5): 1155-61

- BORINI, A.; TAROZZI, N.; BIZARRO, D.; BONU, M.; FAVA, L.; FLAMIGNI, C. (2006). Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post - implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*, 21(11), 2876-2881
- CANO, A.; GALARZO, S.; PUERTA, J.; GIRALDO, M.; CADAVID, A.; Y CARDONA, W. (2015). Efecto de las bacterias uropatógenas y de los factores solubles de su metabolismo sobre la calidad espermática: *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. *Clin Invest Gin Obst*.
- CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal* Vol. 305:609-613.
- CATANZARITI, F., CANTORO, U., LACETERA, V., MUZZONIGRO, G., POLITO, M. (2013). Comparison between WHO (World Health Organization) 2010 and WHO 1999 parameters for semen analysis –interpretation of 529 consecutive samples. *Arch Ital Urol Androl*.
- DIEMER, T.; WEIDNER, W.; MICHELMANN, H.; SCHIEFER, H.; ROVAN, E.; MAYER, F (1996). Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *Int J Androl* 19:271-277.
- DIEMER, T.; HUWE, P.; MICHELMAN, H.; MAYER, F.; SCHIEFER, H. & WEIDNER, W. (2000). *Escherichia coli* induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *International Journal Andrology* Vol. 23: 178–86.
- DIEMER, T.; HUWE, P.; LUDWIG, M.; SCHROEDER-PRINTZEN, I.; MICHELMANN, H. & SCHIEFER H. (2003). Influence of autogenous leucocytes and *Escherichia coli* on sperm motility parameters in vitro. *Andrology* Vol. 35: 100–5.

- DOHLE, G.R.; DIEMER T.; GIWERCMAN, A.; JUNGWIRTH, A.; KOPA, Z., Y KRAUSZ C. (2010). Guía clínica sobre la infertilidad masculina, European Association of Urology.
- EL-MULLA, K.; KOHN, F.; DANDAL, M.; BEHEIRY, A.; SCHIEFER, H.; WEIDNER, W. Y SCHILL, W. (1996). *In vitro* effect of *Escherichia coli* on human sperm acrosome reaction. Arch. Androl 37(2):73-8.
- FANTONI, G., MORRIS, L., FORTI, G., VANNELLI, G., ORLANDO, C., BARNI, T., SESTINI, R., DANZA, G., AND MAGGI. M. (1993). Endothelin-1: a new autocrine/paracrine factor in rat testis. Am.J.Physiol 265 (2 Pt1):E267-E274.
- FRACZEK, M.; PIASECKA, M.; GACZARZEWICZ, D.; SZUMALA - KAKOL, A.; KAZIENKO, A.; LENART, S.; LASZCZYNSKA, M.; KURPISZ, M.; (2012). Membrane stability and mitochondrial activity of human ejaculated spermatozoa during in vitro experimental infection with *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Bacteroides ureolyticus*. Andrología 44:315-329.
- GALDIERO, F.; GORGA, F.; BENTIVOGLIO, C.; MANCUSO, R. (1988) The action of LPS porins and peptidoglycan fragments on human spermatozoa. Infection 16:349-353.
- GONZALES. G.F. (1992). Andrología: Fertilidad e Infertilidad. Ediciones Instituto de Investigaciones de la Altura. U.P.C.H. Lima, Perú. 317pp.
- GORGA, F.; GALDIERO, M.; BUOMMINO, E. (2001). Porins and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa. Clinica Diagnostic Lab Immunology 8:206-8.
- GUPTA, K.; HOOTON, T.; STAMM, W. (2001) Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated

community – acquired urinary tract infection. *Ann Intern Med*; 135(1):41-50.

- HALES, D.; DIEMER, T.; Y HALES, H. (1999). Role of cytokines in testicular function, endocrine, vol. 10 (3):201-217.
- HUWE, P.; DIEMER, T.; LUDWIG, M.; LIU, J.; SCHIEFER, H. WEIDNER, W. (1998). Influence of different uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameter in an in vitro experiment. *Andrología*, 30(1):55-59.
- JOHNSON, J.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; GOULLET, P.; PICARD, B.; MOSELEY, S.; ROBERTS, P.; STAMM, W. (1994). O, K and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *Escherichia coli* strains causing urosepsis. *J Infect Dis* 169:119-126.
- KALA, S.; SINGH, A.; PRABHA, V.; SINGH, R.; SHARMA, P. (2011). *Escherichia coli* attaches to human spermatozoa: affecting sperm parameters.
- KAPER, J.; NATARO, J.; MOBLEY, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli* *Nature Reviews Microbiology*. Vol.2:123-140.
- MONGA M, Y ROBERTS J. (1994). Spermagglutination by bacteria: receptor-specific interactions. *J. Androl.*15:151-156.
- MORETTI, E.; CAPITANI, S.; FIGURA, N.; PAMMOLLI, A.; FEDERICO, M.; GIANNERINI, V. & COLLODEL, G. (2009). The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *Journal Assit Reprod Genet*. Vol. 26: 47-56.
- MURRAY, P. (2006). *Microbiología médica* 5ta.Ed. Madrid: Elsevier España.

- NUÑEZ, R.; CORTÉS, S.; GAGO, M.; PUEYO, A. PERAMO, B. & CABALLERO, P. (2007). Análisis microbiológico del semen de los varones en estudio de infertilidad. Revista Internacional de Andrología Vol. 5(3): 206-211. España.
- NIESCHLAG, E.; BEHRE, H.; NIESCHLAG, S.; (2010). Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction 3rd, completely revised and updated edition. Editorial Springer.
- PRABHA, V.; SANDHU, R.; KAUR, S.; KAUR, K.; SARWAL, A.; RAVIMOHAN, S. Y KUMAR, S. (2010). Mechanism of sperm immobilization by *Escherichia coli*. Advances in Urology Vol 2010, Article ID 240268, 6pp
- REMOHI, J.; ROMERO, J.; PELLICER, A.; SIMÓN, C. y J. NAVARRO. (2001). Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- SÁNCHEZ R.; VILLAGRÁN, E.; CONCHA, M.; CORNEJO, R. (1989) Ultrastructural analysis of the attachment sites of *Escherichia coli* to the human espermatozoo after in vitro migration through estrogenic cervical mucus. Int J. Fertil., 34:363-7.
- SANOCKA MD, CIUPINSKA D, KURPISZ M. (2005). Bacterial infection and semen quality. J Reprod Immunol.67: 51-6.
- SANZ, E.; ÁVILA, L.; GAITÁN, P.; ESCOBAR, M.; SANTOS, A.; FERNÁNDEZ, A.; RUÍZ, J. Y MADERO, J. (1999). Células redondas. Medicina Reproductiva, 2(2):17-25.
- SCHULZ, M.; SANCHEZ, R.; SOTO, L.; RISOPATRON, J.; VILLEGAS, J (2010) Effect of *Escherichia coli* and its soluble factor on mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine translocation, viability, and motility of human spermatozoa. Fertil Steril 94:619-623.

- SIMON, L., LEWIS, S. (2011). Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 57:133-138.
- SUN, J.; JURISICOVA, A.; CASPER, R. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 56(3), 602-7.
- TANAGHO, E.; ALLEN, S. Y MCANINCH, J. (2005). *Urología general de Smith. Décima tercera edición. Editorial Manual Moderno.*
- TAPIA, SR., ROJAS, RJ. (2003). *Semiología del análisis de semen. El colegio Mexicano de Urología A.C.; 17 (2): 48-52.*
- TERAIT, A.; YAMAMOTO, S.; MITSUMORI, K.; OKADA, Y.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O.; (1997). *Escherichia coli* virulence factors and serotypes in acute bacterial prostatitis. *Int J Urol* 4:289-294.
- VILLEGAS, V.; SCHULZ, M.; SOTO, L.; SANCHEZ, R. (2005) Las bacterias inducen la expresión de la apoptosis en los espermatozoides humanos. *Apoptosis*, 10 105-110.
- VIRTANEN, I., KALLAJOKI, O. NARVANEN, J. PARANKO, L. E. THORNELL, M. MIETTINEN, AND LEHTO, V. (1986). Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments. *Anat.Rec.* 215 (1):10-20.
- WEIDNER, W.; JANTOS, C.; SCHIEFER, H.; HAIDL, G.; FRIEDRICH, H. (1991) Semen parameters in men with and without proven chronic prostatitis. *Arch Androl* 26:173-183.

- WEIDNER, W.; SCHIEFER, H.; KRAUSS, H. JANTOS, C.; FRIEDRICH, H.; ALTMANNBERGER, M. (1991). Chronic prostatitis: a thorough search for etiologically involved microorganism in 1461 patients. *Infection* Suppl 3:119-25.
- WOLFF, H.; PANHANS, A.; STOLZ, W.; MEURER, M.; (1993). Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. *Fertil Steril* 60:154-158.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO (2010). Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 5th end. Cambridge: Cambridge University Press.

ANEXOS

Tabla 01 Efecto de *E.coli* con la vitalidad del esperma

Tabla 01 Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
control	40	76,25	96,87	87,2813	5,49095
t1	40	71,13	88,57	77,3690	4,50280
t2	40	54,54	81,06	72,9393	5,29589
t3	40	50,07	79,16	67,8473	7,16525
t4	40	50,26	68,42	59,3533	5,43328
N válido (según lista)	40				

Fig. 1

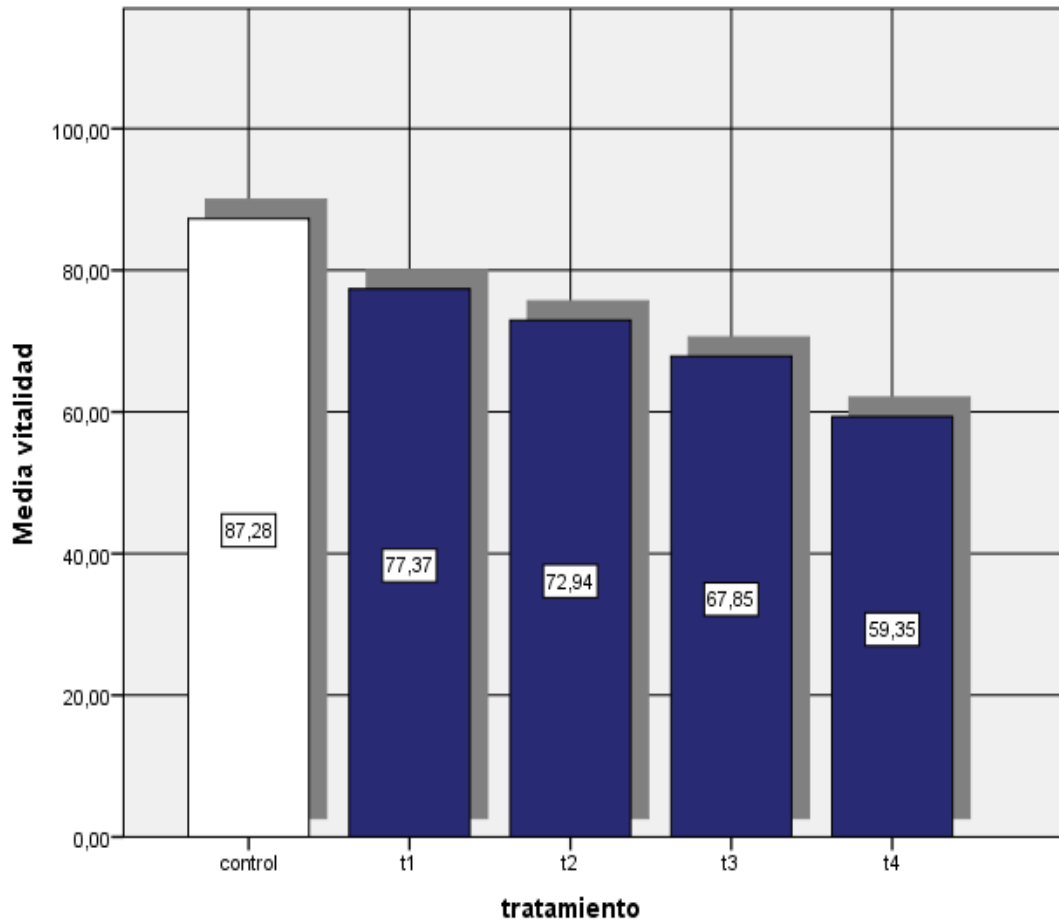


Tabla 02 Efecto de *E.coli* con la Motilidad Progresiva espermática

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Tip.
Control	40	49,36	98,76	71,94	13,55
T1	40	0,62	90,56	42,69	27,66
T2	40	0,62	91,66	37,77	29,51
T3	40	0,42	136	26,27	35,89
T4	40	0,81	77,41	17,80	24,61

Tabla 03 Efecto de *E.coli* con la Motilidad in situ espermática

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Tip.
Control	40	0,62	41,27	15,39	11,02
T1	40	3,77	89,30	43,72	26,14
T2	40	1,07	89,30	42,60	26,96
T3	40	3,22	98,64	55,63	30,55
T4	40	14,28	94,44	57,96	23,03

Tabla 04 Efecto de *E.coli* con la No Motilidad espermática

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Tip.
Control	40	0,10	31,25	12,73	8,33
T1	40	4,32	32,20	13,23	7,83
T2	40	1,12	50,00	19,00	15,47
T3	40	0,67	92,85	20,43	20,98
T4	40	1,66	90,90	27,01	21,70

Fig. 2

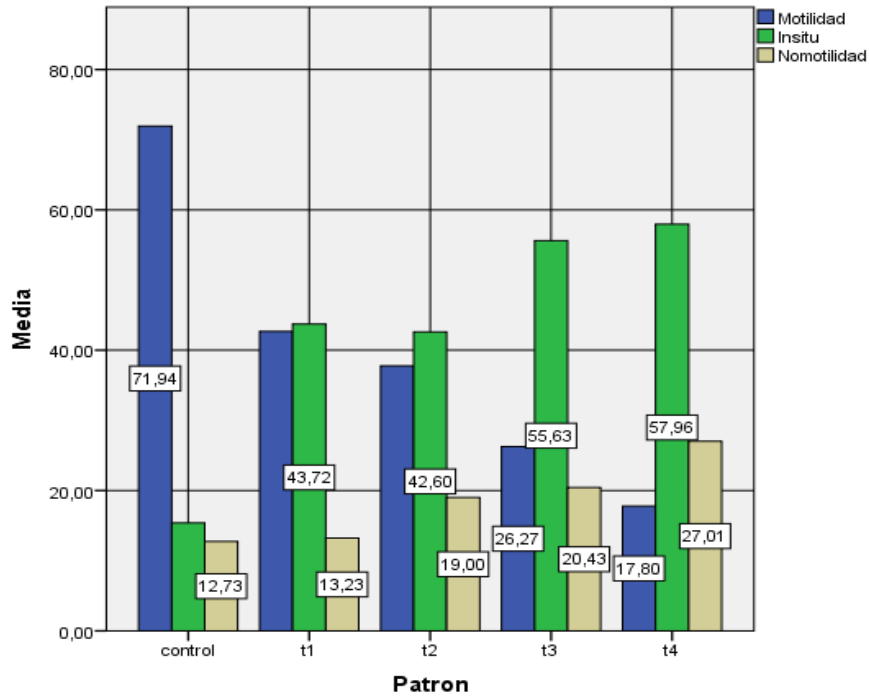


Tabla 05 Efecto de *E.coli* en la Aglutinación espermática

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
(t1) 9,5-0,5	40	13,33	93,61	60,0185	25,96102
(t2) 9-1	40	9,60	97,89	65,0298	24,15273
(t3) 7-3	40	18,18	97,94	68,6060	22,29661
(t4) 5-5	40	16,21	100,00	72,9533	21,08268
N válido (según lista)	40				

Fig. 3

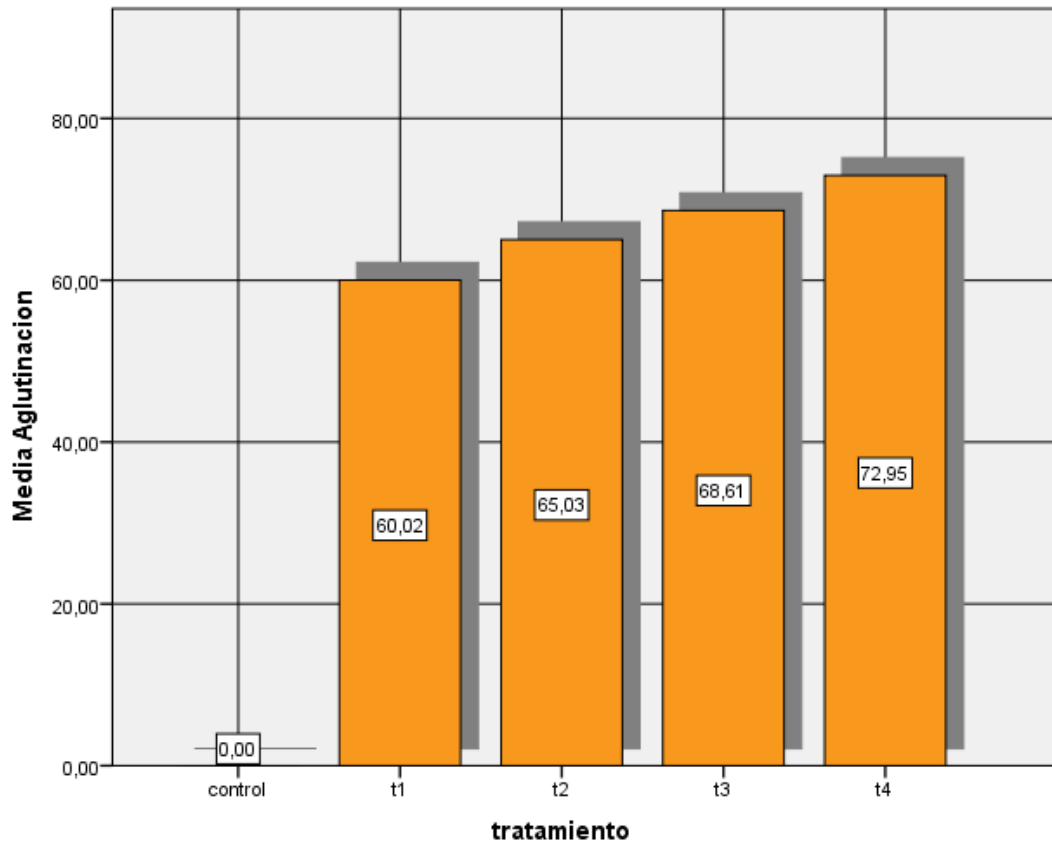


Tabla 06 Efecto de E.coli en la Fragmentación de ADN

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	40	2,00	8,00	5,4000	1,89195
t1	40	5,00	18,00	9,0250	2,35870
t2	40	10,00	19,00	14,6000	2,84470
t3	40	16,00	31,00	21,4000	4,34889
t4	40	17,00	31,00	24,8250	4,12551
N válido (según lista)	40				

Fig. 4

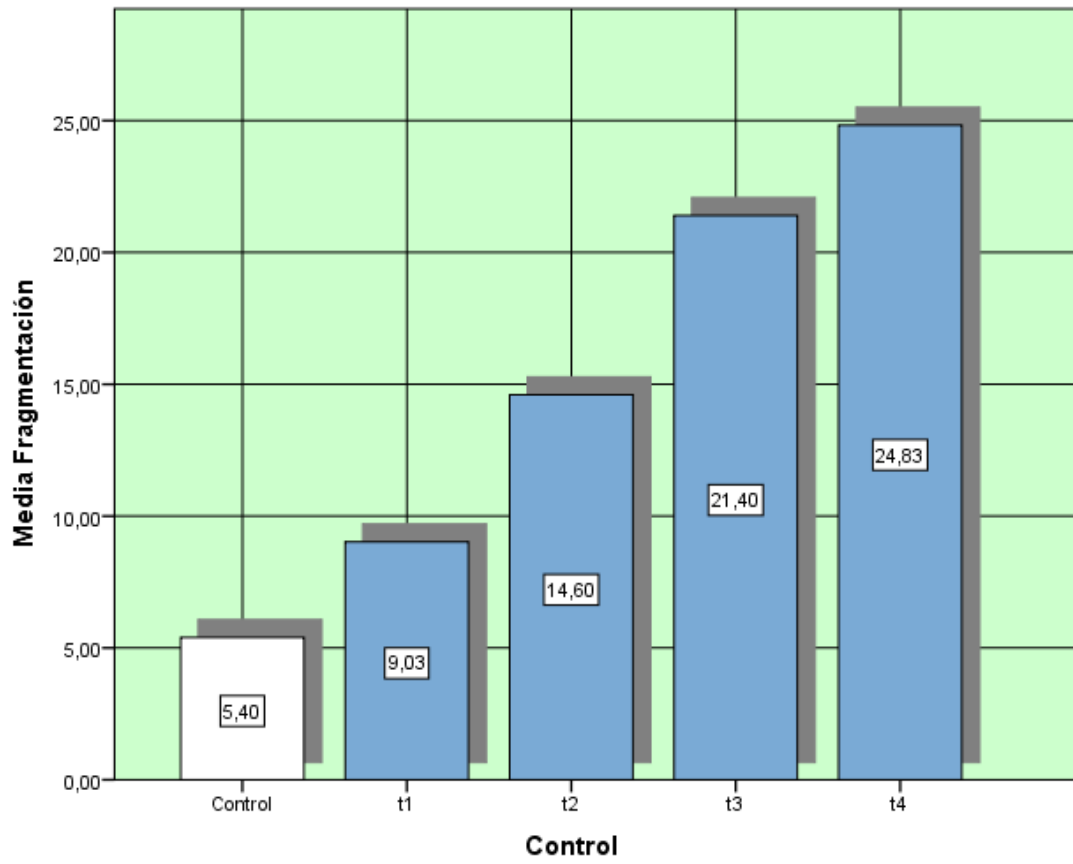


Fig. 01 Diluciones seriadas

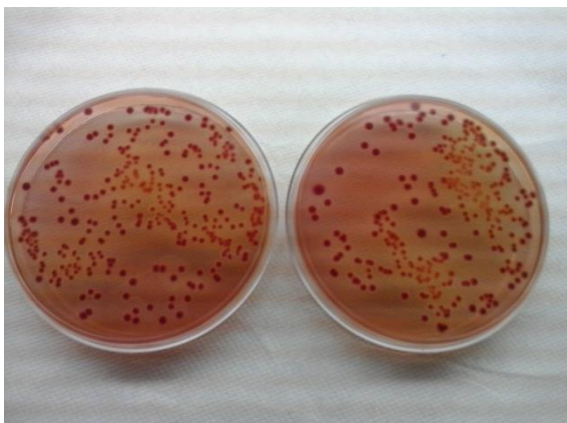


Fig. 02 Recuento de colonias

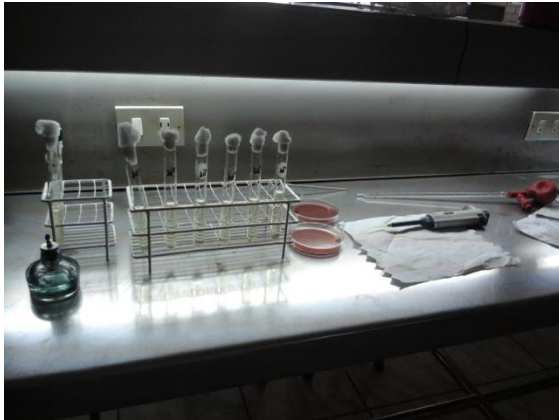


Fig. 03 Fragmentación de ADN

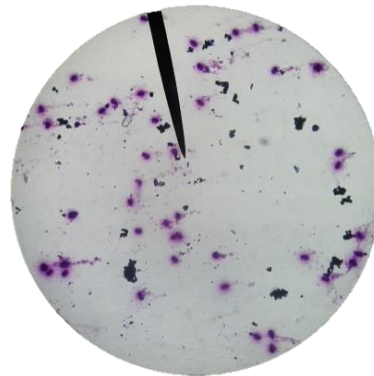
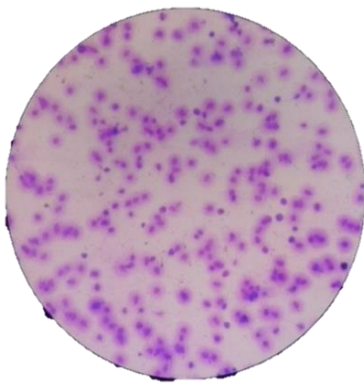
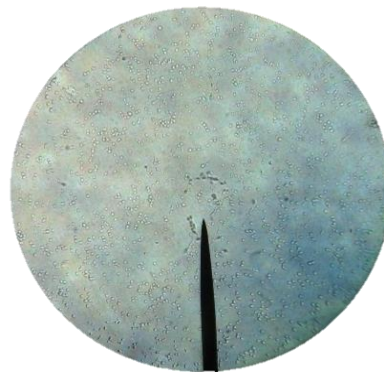
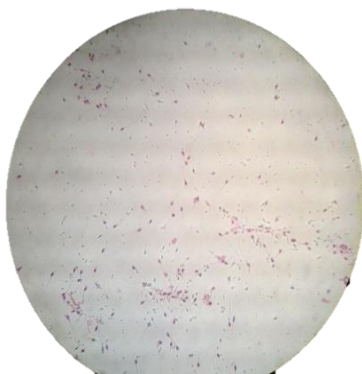


Fig. 04 Aglutinación de Espermatozoides (Izq. T0.5-9.5 Der.T



1. Carta de Consentimiento informado para los jóvenes

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presentado por:

Bachiller Emilio Dueñas Villacorta

Asesor: Prof. Mauricio Gonzales Molfino, Blgo, MSc.

Soy Emilio Martín Dueñas Villacorta y estoy haciendo una investigación sobre la infertilidad masculina que es muy común en nuestro país y ha ido creciendo en los últimos años. Lo invito a participar voluntariamente a esta investigación. Antes de decidir, puede hablar con alguien que se sienta cómodo sobre la investigación.

El propósito de la investigación es para determinar el efecto de bacterias y las causas que puedan originar la infertilidad en varones.

Esta investigación incluye un análisis de espermograma y espermocultivo, como parte de la rutina de evaluación de fertilidad, se le indicara lo necesario para el procedimiento de la toma de muestra. Nosotros no compartiremos la identidad de aquellos que participen en la investigación. La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial. El conocimiento que obtenga por realizar esta investigación se compartirá con usted antes de que se haga con el público.

Esto es una reconfirmación de que la participación es voluntaria e incluye el derecho a retirarse.

He leído la información necesaria. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como

participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que se me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

Nombre del participante

Firma del participante

Fecha

Día/mes/año

2. FORMATO DE RECEPCIÓN DE MUESTRA

DONANTE			Edad	
FECHA		Hora de Emisión		
DÍAS DE ABSTINENCIA		Hora de Evaluación		
VOLUMEN		CONCENTRACIÓN N x 10 ⁶ /ml		
COLOR		Nº TOTAL DE ESP x 10 ⁶ /ml		
LICUEFACCIÓN				
pH		MOTILIDAD	(P) Progresiva Móvil	
ASPECTO			(NP) No ProgresivMov	
VISCOSIDAD			(I) Inmóvil	
ERITROCITOS		MORFOLOGÍA	Normal	
LEUCOCITOS			Anormal	
CÉLULAS REDONDAS			Cabeza	
AGLUTINACIÓN			Pieza Intermedia	
AGREGACIONES			Cola	
Observaciones			Inmaduro	
Conclusiones			Ind. Terato	

Tabla 07 Valores normales de los parametros en la calidad espermática humana según OMS (2010)

Tiempo de Licuefacción	< 60 min
Consistencia o viscosidad	Normal
pH	> 7.2
Volumen	> 1.5ml
Concentración de Esperm/ml	>15x10 ⁶ /ml
Concentración de Esperm/eyaculado	> 39x10 ⁶ /eyac.
Motilidad Progresiva	>32% espermatozoides progresivos
Total de Motilidad	>40% de Esp. Progresivos y no progresivos
Vitalidad Espermática	>58%
Esp. Con morfología Normal	>4%

Tabla 08 Parámetros para medir la concentración de semen en humano

Espermatozoides por campo de 400x	Dilución (semen + diluyente)
<15	1:5 (1+4) $\left(\frac{10\text{ul}}{\text{semen}} + \frac{40\text{ul}}{\text{dilutor}} \right)$
15 - 40	1:10(1+9) $\left(\frac{10\text{ul}}{\text{semen}} + \frac{90\text{ul}}{\text{dilutor}} \right)$
40 - 200	1:20 (1+19) $\left(\frac{5\text{ul}}{\text{semen}} + \frac{95\text{ul}}{\text{dilutor}} \right)$
> 200	1:50 (1+49) $\left(\frac{5\text{ul}}{\text{semen}} + \frac{245\text{ul}}{\text{dilutor}} \right)$