

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN
LÍQUIDO SEMINAL DE HOMBRES INFÉRTILES CON
INFECCIÓN GENITAL POR *Chlamydia trachomatis* Y
MICOPLASMAS GENITALES Y SU CORRELACIÓN CON EL
DAÑO EN EL ADN Y LA APOPTOSIS ESPERMÁTICA”**

Por

Q.C.B. SALOMÓN ALVAREZ CUEVAS

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS con orientación terminal en Morfología**

NOVIEMBRE 2007

**“VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN
LÍQUIDO SEMINAL DE HOMBRES INFÉRTILES CON
INFECCIÓN GENITAL POR *Chlamydia trachomatis* Y
MICOPLASMAS GENITALES Y SU CORRELACIÓN CON EL
DAÑO EN EL ADN Y LA APOPTOSIS ESPERMÁTICA”**

Aprobación de Tesis:

Dra. Med Ma. Guadalupe Gallegos Ávila
Director de Tesis

Dr. C. Ricardo Salazar Aranda
Co-Director de Tesis

Dr. Med Jesús Ancer Rodríguez
Co-Director de Tesis

Dr. Med Dionicio Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Posgrado

“VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN LÍQUIDO SEMINAL DE HOMBRES INFÉRTILES CON INFECCIÓN GENITAL POR *Chlamydia trachomatis* Y MICOPLASMAS GENITALES Y SU CORRELACIÓN CON EL DAÑO EN EL ADN Y LA APOPTOSIS ESPERMÁTICA”

Presentado por:

Q.C.B. Salomón Alvarez Cuevas

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Patología en colaboración con el Departamento de Química Analítica y el Departamento de Microbiología pertenecientes a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Doctora en medicina María Guadalupe Gallegos Ávila y la codirección del Doctor en Ciencias Ricardo Salazar Aranda y el Doctor en medicina Jesús Ancer Rodríguez.

Directora

Dra. Med. María Guadalupe Gallegos Ávila

Co- Directores

Dr. C. Ricardo Salazar Aranda

Dr. Med. Jesús Ancer Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

*A la **Dra. Med. Ma Guadalupe Gallegos Ávila**, por todas sus enseñanzas y consejos para la realización de este proyecto, por la motivación que me brindo para buscar siempre la superación; y vamos por el doctorado!!!!*

*A l **Dr. C. Ricardo Salazar Aranda** por formar parte de este trabajo y por su asesoría para la buena culminación del mismo.*

*Al **Dr. Med Jesús Ancer Rodríguez** por ser parte de la asesoría en la realización de este trabajo y por abrirme las puertas del departamento a su cargo; Pato que es mi segunda casa.*

*A **Claudia, Benito y Silvia**, gracias por su apoyo, pero principalmente gracias por la amistad brindada.*

*A **Nuria, Brenda, Daniela, Celia, Yessica y Oscar**, por acompañarme en el camino y por que sé que siempre seremos amigos. Sinceramente mil gracias.*

*Al **PAICyT** por el apoyo económico para la realización de este trabajo.*

*Al **CONACyT** por la beca proporcionada para continuar mis estudios de posgrado.*

DEDICATORIA

A mis padres:

Juan y Dolores, por ser las personas más importantes en mi vida y ser forjadores de lo que soy.

A mis hermanos:

Maribel, Esmeralda, Javier, Juan, Elda, Judith, Mayre y Jorge, con mucho cariño, gracias por el apoyo brindado; esto es para ustedes.

A Dios por ser mi Fe y mi Esperanza.

RESUMEN

Q.C.B. Salomón Alvarez Cuevas

Fecha de Graduación: Diciembre, 2007

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título: Valoración de los niveles de lipoperoxidación en líquido seminal de hombres infértiles con infección genital por *Chlamydia trachomatis* y micoplasmas genitales y su correlación con el daño en el ADN y la apoptosis espermática

Numero de paginas: 76

Candidato para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con Orientación Termina en Morfología

Área de estudio: Patología de la Reproducción

Propósito y Método de Estudio: La asociación de gérmenes más observada en infecciones genitales es entre *Chlamydia trachomatis* (Ct) y Micoplasmas genitales (MY), particularmente *Ureaplasma urealyticum*.

Esta documentado que un incremento en el número de espermatozoides que entran en proceso apoptótico durante la inflamación del tracto genital masculino, puede estar asociado con los niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS). El daño en el DNA espermático se ha asociado a la presencia de agentes infecciosos; la estructura de la cromatina espermática y la integridad del DNA tienen una influencia crucial en el proceso de fertilización. Saleh(2002), Zini(2002), Virro(2004).

Fueron estudiados 37 pacientes con prueba de IFD positiva para Ct (*MicroTrack, Trinity Biotech, Wicklow, Irlanda*) y/o positivos para MY (*Mycoplasma IST; Biomerieux, Lyon, Francia*), se agruparon de acuerdo a los resultados microbiológicos MY(+), Ct (+), Ct y MY (+); también fueron estudiados 11 individuos sanos normozoospermicos y con pruebas microbiológicas negativas; a todos los individuos se les realizó un seminograma completo de acuerdo a lo estipulado por la OMS, además de la determinación del grado de apoptosis espermática valorando la translocación de la FS (*APOAC, AnnexinV-Cy3, Sigma, St Louis, USA*) y la determinación del grado de fragmentación del DNA espermático (*SCD; INDAS, Madrid, España*).

Contribuciones y Conclusiones: Los porcentajes promedio de células con DNA fragmentado en el grupo MY+ fue de 14.500 ±6.364%, en el grupo Ct+ se observó un valor de 23.145 ±10.463%, mientras que en el grupo Ct+ y MY + se presentó un valor promedio de 27.408 ±11.187%, estos dos últimos grupos presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al compararlos con el grupo control ya que en los individuos sanos el valor fue de 18.364±7.553, los valores de MDA formado por la lipoperoxidación celular al comparar con el grupo control no presentaron diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los grupos, los porcentajes promedio de células apoptóticas fueron en el grupo MY+ 25.000 ±2.828%, en el grupo de Ch+ fue de 20.091 ±3.590%, mientras que en el grupo Ch+ y MY+ fue de 22.500 ±5.611%, en los tres grupos se presentó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al comparar con el grupo control sano que presento un porcentaje promedio de 13.364 ±3.931%.

Los niveles altos de rupturas en el ADN se asociaron a la presencia de *Chlamydia trachomatis* y micoplasmas genitales que en combinación tuvieron un efecto sinérgico como inductores de Daño en la estructura del ADN. La composición molecular de la membrana de los géneros bacterianos *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.*, podrían ser inductores directos de la apoptosis espermática, comprobamos que estos géneros bacterianos si aumentan el grado de apoptosis en los pacientes estudiado. Existe una asociación entre los niveles altos de apoptosis espermática con la infección seminal por *Chlamydia trachomatis* y micoplasmas genitales.

Firma del Director de Tesis

Dra. Med María Guadalupe Gallegos Ávila

TABLA DE CONTENIDO

	Página
TABLA DE CONTENIDO-----	i
ÍNDICE DE TABLAS-----	ii
ÍNDICE DE FIGURAS-----	iii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS-----	iv
1.- INTRODUCCION -----	1
1.1 Infertilidad masculina e infección genitourinaria-----	1
1.2 Infertilidad Masculina e Infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> -----	5
1.3 Infertilidad Masculina e Infección por Micoplasmas genitales-----	7
1.4 Infertilidad Masculina y Presencia de Daño en el ADN espermático---	8
1.5 Infertilidad Masculina y Apoptosis Espermática-----	11
1.6 Infertilidad Masculina y Especies Reactivas de Oxígeno-----	14
1.7 Antecedentes-----	15
1.8 Justificación-----	18
1.9 Hipótesis-----	19
1.10 Objetivos-----	20
1.10.1 Objetivo general-----	20
1.10.2 Objetivos específicos-----	20
2.- MATERIALES Y MÉTODOS -----	21
2.1 Diseño experimental-----	21
2.2 Estrategia general-----	22
2.3 Material, Equipos y Reactivos-----	23
2.3.1 Material biológico-----	23

2.3.2 Material de laboratorio-----	23
2.3.3 Equipos-----	24
2.3.4 Reactivos-----	24
2.3.5 Kits de diagnóstico-----	25
2.4 Métodos-----	26
2.4.1 Determinaciones microbiológicas-----	26
2.4.1.1 Identificación del género bacteriano Chlamydia-----	26
2.4.1.2 Identificación de micoplasmas genitales-----	27
2.4.1.2.1 Composición y Reconstitución de los reactivos	27
2.4.1.2.2 Procedimiento de la técnica-----	28
2.4.2 Determinación de Daño en el ADN espermático-----	29
2.4.2.1 Preparación de reactivos-----	29
2.4.2.2 Inclusión de la muestra en microgel de agarosa-----	29
2.4.2.3 Procesamiento de la muestra-----	30
2.4.2.4 Tinción de la muestra-----	31
2.4.2.5 Observación bajo el microscopio (Análisis Visual----- Directo	31
2.4.3 Medición de Sustancias Reactivas con el Acido Tiobarbitúrico--	33
2.4.3.1 Preparación de reactivos-----	33
2.4.3.2 Preparación de la curva de calibración-----	34
2.4.3.3 Preparación de la muestra y realización de la técnica----	35
2.4.3.4 Medición fluorométrica-----	35
2.4.4 Determinación del grado de apoptosis espermática-----	36
2.4.4.1 Preparación de reactivos-----	37

2.4.4.2 Procesamiento de la muestra y realización de la técnica-	38
2.4.5 Análisis Estadístico-----	40
2.4.5.1 Estadística descriptiva-----	40
2.4.5.2 Estadística Inferencial-----	40
3.- RESULTADOS-----	41
3.1 Muestra obtenida para el estudio-----	41
3.2 Estudio de <i>Chlamydia trachomatis</i> por Inmunofluorescencia Directa--	42
3.3 Estudio de Micoplasmas genitales (MY) mediante cultivo selectivo----	44
3.4 Fragmentación del ADN espermático-----	45
3.5 Lipoperoxidación (producción de MDA valorado con la técnica de ---- TBARS	48
3.6 Apoptosis espermática-----	53
4.- DISCUSIÓN-----	56
5.- CONCLUSIONES-----	68
6.- PERSPECTIVAS-----	69
7.- BIBLIOGRAFÍA-----	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1	Preparación de la curva de calibración de MDA-----	34
Tabla 2	Grupos formados de acuerdo a los resultados microbiológicos obtenidos-----	42
Tabla 3	Porcentajes de células con ADN fragmentado en los grupos estudiados-----	47
Tabla 4	Curva de calibración de MDA por fluorescencia-----	49
Tabla 5	Intensidades de fluorescencia y concentración de MDA en nmol/mL/10 ⁶ espermatozoides obtenidas en el grupo control y el grupo de pacientes-----	50 y 51
Tabla 6	Promedios de MDA en nmol/mL/10 ⁶ espermatozoides -----	52
Tabla 8	Porcentajes promedios de espermatozoides apoptoticos en los grupos estudiados-----	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Fig. 1	Nucleoide formado por la desproteínización del espermatozoide--	31
Fig. 2	Nucleoides teñidos con el Método de Wright-----	32
Fig. 3	Translocación de la fosfatidilserina en la membrana plasmática---	37
Fig. 4	IFD del grupo control y de los pacientes infértiles y con infección seminal por <i>C. trachomatis</i> -----	43
Fig. 5	Resultado de los cultivos específicos para la identificación de Mycoplasmas genitales-----	44
Fig. 6	Fragmentación de la cromatina espermática-----	46
Fig. 7	Porcentaje de células con ADN fragmentado -----	48
Fig. 8	Curva de calibración de MDA-----	49
Fig. 9	Valores promedio (nmol/mL/10 ⁶ espermatozoides) de MDA en los grupos estudiados-----	53
Fig. 13	Porcentaje promedio de espermatozoides apoptóticos en los grupos estudiados-----	55

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

WHO	World Health Organization
CDC	Center for Disease Control
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
RB	Cuerpo Reticular
EB	Cuerpo Elemental
LPS	Lipopolisacáridos
ADN	Ácido desoxiribonucleico
FAK	Kinasa de Adhesión Focal
ROS	Reactive Oxygen Species
spp.	Especies
μ	Micra
TBARS	Especies Reactivas con el ácido tiobarbitúrico
MDA	Malonaldehído
IFD	Inmunofluorescencia Directa
IGU	Infección genitourinaria
mm	Milimetro
®	Marca registrada
mL	Mililitro
μL	Microlitro
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grado Celsius
pH	Potencial de hidrógeno
R1	Reactivo 1
R2	Reactivo 2
R3	Reactivo 3
PX	Paciente
SD	Desviación estándar
≤	Menor o igual que
mg	Miligramo
cm	Centímetro
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
MY	Micoplasmas genitales
CH	Chlamydia
Mg-ATP	Dependiente de ATP y magnesio
FS	Fosfatidilserina
nm	Nanómetros
+	Positivo
-	Negativo
No	Número

–	
±	Mas y menos
PBS	Buffer de fosfato salino
HCl	Ácido clorhídrico
Fig.	Figura
TBA	Ácido tiobarbitúrico
g	Gramo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
nmol	Nanomol
mmol	Milimol
μmol	Micromol
V	Voltios
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
6-CFDA	Diacetato de 6-Carboxifluoresceina
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
M	Moles
%	Por ciento
λ	Longitud de onda

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Infertilidad masculina e infección genitourinaria

La infertilidad conyugal es un problema de magnitud creciente, en el que un alto porcentaje de casos permanecen sin resolverse a pesar de los grandes avances médicos y tecnológicos aplicados a la biología de la reproducción.

El CDC menciona que del 20 al 35% de las parejas que desean procrear su primer hijo no pueden lograrlo y se estima que el factor masculino es responsable de un 30 a un 50% de esos casos (Center for Disease Control: CDC, 2000).

En muchos de los casos el origen de la infertilidad masculina no está identificado.

Existen una gran cantidad de factores nocivos para la función espermatogénica y de las glándulas anexas del aparato reproductor masculino que pueden estar presentes simultáneamente agravando el cuadro de alteraciones seminológicas. Dentro de las alteraciones que se han descrito como causa de problemas reproductivos en el varón se

encuentran los defectos genéticos o congénitos como la agenesia del conducto deferente asociada al gen de la fibrosis quística, las cromosopatías y la criptorquidia.

Los estudios poblacionales de parejas que presentan problemas de infertilidad o esterilidad, han revelado notables variaciones en la frecuencia de anomalías cromosómicas. Esto se puede deber a los criterios de selección para el estudio citogenéticos o al mayor o menor grado en el control que se tenga en cada población sobre variables ambientales tales como las infecciones, capaces de ocasionar infertilidad o esterilidad.

Torres y colaboradores estudiaron 258 pacientes infértiles de los cuales el 42 % presentaron alteraciones cromosómicas, principalmente variaciones numéricas. (Torres et al, 2002).

La exposición a calor, plomo, agropesticidas, anestésicos, quimioterápicos y radiación, ya sea por hábitos y costumbres o como contaminantes en el ambiente, van asociados a lesión gonadal con atrofia testicular y conducen a infertilidad.

Algunas entidades clínicas como el varicocele, la orquitis y la epididimitis son condiciones que con frecuencia están presentes en varones que se evalúan clínicamente por infertilidad, estas condiciones se asocian muy constantemente a infecciones de tipo inespecíficas de la vía seminífera (Van der Ven et al, 1998; Hauser et al, 2005; Biase et al, 1992; Torres et al, 2002).

Una de las causas potenciales de infertilidad masculina es la infección sintomática o asintomática del tracto urogenital.

Las infecciones del tracto urinario (uretritis, epididimitis, orquitis, prostatitis) y de las glándulas accesorias masculinas, está relacionada con alteraciones en el potencial fértil del varón (WHO, 1999).

En muchas ocasiones la leucocitospermia no es una constante que ilustre el grado de infección o lesiones inflamatorias presentes, por lo que aún se duda que las infecciones de la vía seminífera tenga un impacto negativo sobre la fertilidad del hombre.

La investigación del daño molecular asociado a la producción de moléculas nocivas, ha permitido confirmar que la presencia de leucocitos se asocia a daños subcelulares que interfieren con la capacidad fecundante del espermatozoide.

En las últimas décadas se ha registrado un incremento en las infecciones del tracto genital femenino y masculino por *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum*, gérmenes inespecíficos transmitidos por contacto sexual y responsables de casi el 60% de las uretritis no gonocócicas (Hellstrom et al, 1992; Wang et al 2003).

Las infecciones del tracto genitourinario generalmente son de tipo ascendente por lo que inician como una uretritis, la cual no se relaciona directamente con problemas de infertilidad, pero al complicarse puede extenderse hacia órganos tan importantes como la próstata y las vesículas seminales provocando una prostatovesiculitis.

La prostatovesiculitis esta asociada directamente con alteraciones espermáticas tales como la motilidad y vitalidad del espermatozoide, en algunos casos el proceso infeccioso puede evolucionar hasta invadir epidídimo y/o testículos causando una epididimoorquitis entidad clínica que causa importantes alteraciones morfológicas y funcionales del espermatozoide.

Weidner y colaboradores en una revisión bibliográfica publicada en 1999 mencionan que *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Neisseria*

gonorrhoeae se encuentran entre las causas microbiológicas mas frecuentes de uretritis.

Cuando está presente un cuadro infeccioso e inflamatorio, principalmente de tipo crónico afectando la próstata se observan alteraciones en la calidad espermática a nivel de la concentración y motilidad de esta célula, estas alteraciones son ocasionadas por la presencia de microorganismos en el líquido seminal y la leucocitospermia (Weidner et al, 1999).

Chlamydia trachomatis es una causa importante de epididimoorquitis de tipo aguda principalmente, como complicaciones se puede producir una estenosis del conducto epididimal, reducción de la concentración espermática y en un grado mayor de la infección se puede causar la azoospermia.

La orquitis es una lesión inflamatoria del testículo asociada con un exudado en el cual predomina la presencia de leucocitos, la clasificación de la orquitis esta dada por el agente etiológico que la produce.

Chlamydia trachomatis es el agente causal de la orquitis bacteriana aguda, esta patología puede ocasionar alteraciones en el proceso normal de la espermatogénesis y además de alteraciones en el número y la calidad del espermatozoide, esto es causado por los cambios morfofuncionales de los túbulos seminíferos testiculares ocasionados por el proceso inflamatorio crónico (Weidner et al, 1999).

Las infecciones del tracto genitourinario masculino que generalmente se asocian a problemas de infertilidad son aquellos problemas infecciosos crónicos, mal diagnosticados o tratados insuficientemente; esto se viene confirmando en la consulta clínica diaria, la cual expone que dentro de los procesos infecciosos mas comunes se

encuentran aquellos generados por gérmenes atípicos y de diagnóstico complicado por técnicas de uso común en el laboratorio clínico.

1.2 Infertilidad Masculina e Infección por *Chlamydia trachomatis*

Desde fines de la década de los años ochenta, *C. trachomatis*, es reconocida como el reto más grande para la reproducción humana y el microorganismo sexualmente transmitido de mayor frecuencia en países industrializados (Paavonen et al, 1989, Paaven et al, 1999; Westrom et al 1990).

La Clamidiosis es un problema infeccioso que aun en estos días, puede pasar desapercibida, no se cuenta con el conocimiento y el entrenamiento adecuado para su diagnóstico y medicar la terapéutica adecuada, por la falta de conocimiento que existe puede ser que este problema infeccioso se considere como un serio problema de salud pública.

La infección por *Chlamydia* es la principal causa de subfertilidad en mujeres y en varones. Se cree que el mecanismo por el cual esto ocurre es la vía de la reacción inflamatoria asociada con la infección.

En el varón, la infección por *Chlamydia* se asocia con epididimitis y/o prostatitis que puede llevar a estenosis del sistema de conductos, orquitis o una función inapropiada de las glándulas accesorias (Purvis et al, 1995).

Por otro lado, se ha reportado que la Clamidiosis es la enfermedad de transmisión sexual mas frecuente en mujeres jóvenes también se ha mencionado en

algunos reportes de los años 80's que *C. trachomatis* estaba presente en el 71% de los casos de infertilidad masculina (Ostaszewska et al, 1998).

Actualmente *Chlamydia trachomatis* esta reconocida como causa importante de infecciones del tracto genitourinario. Dentro de las alteraciones con las que se asocia a esta bacteria se encuentran las invasiones uretrales, infecciones en epidídimo y/o próstata, y cuando la infección se complica puede afectar testículo, todo esto tiene como consecuencias alteraciones significativas en la función normal del tracto reproductivo y sus glándulas sexuales accesorias, alteraciones que comúnmente disminuyen la capacidad reproductiva del varón.

Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos etiopatogénicos por los que este germen deteriora la fertilidad del hombre al infectar el tracto urogenital, se ha reportado su adherencia y penetración al citoplasma del espermatozoide (Custo et al, 1989; Wolner-Hanssen et al, 1984), condición que podría ser un factor para que se presenten disminuciones en la capacidad fecundante de la célula espermática.

El cuadro característico de las infecciones genitales causadas por *C. trachomatis* es que son inespecíficas, son poco sintomáticas por lo que generalmente pasan desapercibidas. La infección se mantiene oculta por mucho tiempo provocando una patología inflamatoria crónica de los órganos del aparato reproductor que puede traer como consecuencia infertilidad (Erbengi, 1993; Westrom, 1998; Greendale 1993).

Chlamydia trachomatis existe en dos estadios: la fase infecciosa es extracelular pero metabólicamente inactiva, éste es llamado cuerpo elemental (EB) el cual se alterna con la fase intracelular reproductiva y metabólicamente activa, esta

fase es llamada cuerpo reticular (RB), en esta fase la bacteria utiliza la maquinaria intracelular de la célula huésped para reproducirse.

Se han realizado una variedad de estudios en los cuales la co-incubación de *Chlamydia trachomatis* con células espermáticas induce en un grado alto la disminución en la motilidad espermática además de inducir una muerte prematura de estas células (Hosseinzadeh et al, 2001).

Otros estudios se han enfocado en la co-incubación de espermatozoides con ciertas moléculas que forman parte de la bacteria, entre ellas se encuentran los lipopolisacaridos (LPS), esto trajo como resultado conocer que estas moléculas de la membrana bacteriana inducen la muerte de los espermatozoides (Hosseinzadeh et al, 2003).

1.3 Infertilidad Masculina e Infección por Micoplasmas Genitales

Sin duda, la asociación de gérmenes más observada en infecciones genitales es entre *Chlamydia trachomatis* y bacterias de la familia Mycoplasmataceae, particularmente *Ureaplasma urealyticum*.

Aunque han sido aislados en semen de hombres fértiles y aparentemente sanos, especies de los micoplasmas genitales se ha asociado a la piospermia, las uretritis no gonocócicas y la prostatitis (Kjaergaard et al, 1997).

Un genero que se encuentra dentro de la familia de estos gérmenes corresponde al *Ureaplasma urealyticum* el cual es encontrado comúnmente en

diferentes regiones del aparato genitourinario, siendo causa con alta frecuencia de alteraciones en órganos como la uretra, próstata y epidídimo.

En investigaciones clásicas de hace varias décadas se hace mención de la presencia de estos gérmenes y su relación con la infertilidad, por ejemplo, está documentados que en los años 70's se reportó por primera vez la presencia de *Ureaplasma urealyticum* en el tracto genital de una pareja infértil (Kundsin , 1970).

En estudios posteriores realizados por Gnarpe y Friberg observaron una alta frecuencia de cultivos positivos en semen de pacientes infértiles (Gnarpe y Friberg, 1972). En investigaciones subsiguientes este mismo grupo de investigadores demostraron por microscopía electrónica de barrido, que los Micoplasmas se adhieren a las membranas de los espermatozoides.

Recientemente un gran numero de autores han referido encontrar agregados de partículas correspondientes a *Ureaplasma urealyticum* que se encuentran adheridos a los espermatozoides o incluidos en su citoplasma (Fowlkes y cols., 1975; Busolo y Zanchetta, 1984; Grossgebauer, 1984; Xu, 1997; Nunez-Colonge, 1998 ; Díaz y Gallegos, 1999, Agarwal, A; Tamer, 2003).

1.4 Infertilidad Masculina y Presencia de Daño en el ADN espermático

La integridad del genoma paterno es de vital importancia para el inicio y mantenimiento de un embarazo a término, la presencia en el embrión de ciertas modificaciones como la fragmentación del ADN procedentes del complemento

genómico paterno es incompatible con el desarrollo embrionario y fetal normal (Sociedad Española de Fertilidad).

La estructura de la cromatina espermática y la integridad del ADN tienen una influencia crucial en el proceso de fertilización.

La fragmentación del ADN espermático es reconocida como una causa importante de infertilidad. Probablemente la causa de infertilidad en varones con parámetros seminales normales se podría relacionar con la presencia de un ADN anormal en el espermatozoide.

Al indagar las causas de infertilidad en pacientes con parámetros seminales normales, se ha reportado que este grupo de hombres tienen una alta fracción de espermatozoides con defectos en la cromatina y rupturas en el ADN, comparándolos con hombres control fértiles (Erenpreiss et al, 2006).

Se ha tratado de dilucidar el origen de la fragmentación del ADN espermático y su impacto en los aspectos reproductivos del varón. Diferentes grupos de investigadores han realizado estudios en los que se ha encontrado correlación entre los valores alterados de la motilidad espermática y la presencia de daño en el ADN del espermatozoide (Lopes et al, 1998b). También se ha mencionado que entre los mecanismos de daño en el ADN espermático se encuentra la alteración en el proceso de la espermatogénesis.

Las modificaciones en el proceso normal de generación de los espermatozoides, podría resultar en defectos en el remodelado de la cromatina y fragmentación del ADN espermático (Alvarez, 2003)

La presencia de roturas en el ADN podría ser indicativa de maduración incompleta durante la espermiogénesis. Para que se produzca el empaquetamiento de

la cromatina del espermatozoide, es necesaria la actividad de nucleasas endógenas que corten y ligen el ADN durante su protaminación, alteraciones en el control de este proceso podrían resultar en roturas de ADN no reparadas (McPherson y Longo, 1992, 1993, 1993b).

También se puede producir la inducción de daño del ADN en los espermatozoides diferenciados maduros por espermatozoides inmaduros que producen niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este daño se produciría después de la espermiación durante la migración de espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos al epidídimo (Ollero et al, 2001). Dado que los espermatozoides se encuentran en íntimo contacto en los túbulos seminíferos y el epidídimo, y que la vida media de los ROS es del orden de nano o microsegundos, esto facilitaría el daño que los ROS podrían ejercer, ya sea directa o indirectamente (activación de endonucleasas) en el ADN de los espermatozoides.

Otro de los mecanismos por el cual se pueden generar las rupturas en el ADN del espermatozoide es la activación de caspasas y endonucleasas en espermatozoides diferenciados, debido a factores físico-químicos.

En estudios realizados *in vitro* en los cuales la exposición de espermatozoides de ratón a altas temperaturas (40°C) provoca un aumento significativo en el grado de fragmentación del ADN (Sailer et al, 1997).

Irvine y colaboradores demostraron que existe inducción de la fragmentación del ADN en espermatozoides de ratón *in vivo* tras haber sido expuestos los testículos a una temperatura de 40°C (Irvine et al, 2000). Estos investigadores concluyeron que el daño observado podría haberse producido en espermatozoides diferenciados por un mecanismo abortivo similar a la apoptosis.

Se ha detectado que la dificultad para concebir se presenta en varones que tienen una frecuencia de daño en el ADN espermático entre el 20 y el 40%.

Aunque el análisis del semen constituye un pilar esencial para la evaluación de la esterilidad, en muchos casos no permite detectar la presencia de alteraciones finas en el espermatozoide. Es posible que la medición de los parámetros seminales de rutina no siempre sean indicativos de la calidad del ADN del espermatozoide (Agarwall y Allamaneci, 2005).

1.5 Infertilidad Masculina y Apoptosis Espermática

La muerte por apoptosis, es una muerte fisiológica que se puede presentar porque el organismo requiere la muerte en particular de esa célula para su desarrollo, o bien porque sufrió un daño irreparable por lo que muere en beneficio del organismo. En este caso la célula muere por la activación de una serie de mecanismos que provocan que no pierda la integridad de su membrana, y solo va a presentar pérdida de dicha integridad hacia el final del proceso (Evan y Littlewood, 1998).

La apoptosis espermática descontrolada es un proceso que se suscita cuando hay una descompensación de los componentes celulares y del ambiente celular circundante, este mecanismo de muerte celular descontrolado se ha relacionado con problemas de infertilidad masculina.

Convencionalmente, toda la muerte de los espermatozoides eyaculados es considerada como resultado de la necrosis (Blanc-L B et al, 2000). Sin embargo, es aceptado que la apoptosis es el mecanismo principal en la regulación de la

espermatogénesis y que en varones con parámetros seminales anormales, la presencia de espermatozoides marcados para Fas en el eyaculado es indicativo que está teniendo lugar una “apoptosis abortiva” (Sakkas et al, 1999).

El incremento en el número de espermatozoides que entran en proceso apoptótico durante la inflamación del tracto genital masculino, puede estar asociado con los niveles elevados de ROS (Wang et al, 2003).

Dentro de los mecanismos de inducción de apoptosis, la composición molecular de microorganismos (presencia de porinas y lipopolisacáridos) como *Mycoplasma spp* y *Chlamydia spp*; influye en los procesos apoptóticos del espermatozoide, el factor que estimula la apoptosis puede ser el contacto directo con la bacteria o sus productos, aún en ausencia de ROS (Georga et al, 2001; Satta et al, 2005).

Una de las características que tiene la muerte por apoptosis en un organismo, es que las células son fagocitadas para evitar la presencia de necrosis secundaria, por lo que muchas veces se vuelve difícil detectar la presencia de apoptosis in vivo, a menos que se busquen eventos que ocurren al inicio del proceso de muerte celular, los cuales podrían ser considerados como marcadores tempranos (Strange et al, 1992).

Uno de los acontecimientos característicos de la apoptosis es que en los estadios tempranos se presenta pérdida de la asimetría de la membrana citoplasmática.

Es bien sabido que la apoptosis es un proceso de muerte en el que la integridad de la membrana se mantiene, lo cual significa que la característica de ser semipermeable está presente, sin embargo se presentan cambios en su asimetría, tal es el caso de la distribución de la fosfatidilseína.

La fosfatidilserina (FS) es una molécula fosfolipídica que en condiciones normales se encuentra orientada hacia la cara interna de la membrana celular (Van Engeland et al, 1996).

Cuando una célula entra en proceso de muerte por apoptosis, uno de los eventos tempranos es la exposición de fosfatidilserina hacia el exterior de la membrana celular.

Debido al cambio en la asimetría de la membrana de células apoptóticas se han desarrollado métodos que permiten detectar la presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular.

La *Anexina V*, es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana, y tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, por lo que es muy frecuente la utilización de *Anexina V* unida a diversos fluorocromos, para marcar e identificar aquellas células que se encuentran en apoptosis.

Se ha utilizado como inductor de apoptosis la estaurosporina el cual es un alcaloide microbiano. El mecanismo por el que este fármaco induce apoptosis no está totalmente entendido, se refiere que este agente puede actuar por medio de la ruta independiente de caspasas. (Kabir et al 2002).

La estaurosporina se ha utilizado como un inductor de apoptosis en diversas líneas celulares a concentraciones de entre 1 μmol y 1mmol. Se han reportado resultados que oscilaron entre el 35% y 50% de células apoptóticas, los máximos niveles se observaron al utilizar el agente en concentración es de 1 mmol (Eley et al 2005).

1.6 Infertilidad Masculina y Especies Reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas que se producen normalmente en células aeróbicas. Se caracterizan por tener un electrón desapareado y participan en reacciones de sustracción de hidrógeno, ruptura de uniones y adición de radicales. Son capaces de oxidar lípidos de membranas celulares, proteínas e hidratos de carbono, dañar ácidos nucleicos y despolimerizar al ácido hialurónico pudiendo llegar a producir la muerte celular (Fridovich I, 1976).

La producción no controlada de estos intermediarios, así como la deficiencia de los sistemas de defensa antioxidante tienen, en diversos sistemas biológicos, un papel crítico en la regulación de la muerte celular programada o apoptosis.

Si bien altas concentraciones de ROS han demostrado ser deletéreas para diversas funciones del espermatozoide, a bajas concentraciones estas moléculas altamente reactivas han sido asociadas al proceso de capacitación del espermatozoide (Aitken R; 1995 y Sikka S; 2001).

Las bacterias del género *Mycoplasma* son productoras de especies reactivas de oxígeno, particularmente del ion superóxido y de peróxido de hidrógeno.

Se ha reportado que los procesos infecciosos por *Chlamydia trachomatis* y bacterias del género *Mycoplasma* están implicados en la generación de Especies Reactivas de Oxígeno por mecanismos que aún no se encuentran bien dilucidados. Además, las infecciones por estos patógenos están relacionadas con la inducción descontrolada de apoptosis espermática.

Por otro lado, se han observado niveles elevados de ROS en pacientes infértiles con varicocele. (Agarwal A. y Said T; 2004)

El varicocele es una patología andrológica de gran incidencia en la población general (hasta un 15%) y es comúnmente diagnosticado en pacientes con problemas de infertilidad. En pacientes con esta patología testicular se observa alteraciones que van desde oligoastenoteratozoospermia o azoospermia.

El varicocele se presenta cuando se dilatan las venas que van a lo largo del cordón espermático, el cual mantiene suspendidos los testículos en el escroto. Ha sido implicado como una causa importante de infertilidad.

Existen numerosas técnicas para la cuantificación de radicales libres de oxígeno así como la medición indirecta al analizar los productos de reacción. Una de las técnicas más utilizadas para el análisis de la acción de los radicales libres de oxígeno, es la determinación del grado de lipoperoxidación, a través de las sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico. La sensibilidad de este ensayo lo ha convertido en un buen indicador del estrés oxidativo (Yagi, 1998; Armstrong et al, 1994; Lefevre, 1998).

1.7 Antecedentes

Se presentan serias dificultades en la clínica andrológica para la configuración de un cuadro clínico claramente asociable a la infección de los órganos de la vía reproductiva, sobre todo tratándose de patología crónica.

Las lesiones ocasionadas por una patología infecciosa crónica generalmente se presentan con signos y síntomas vagos e inespecíficos y con mucha frecuencia son del todo asintomático, por lo que su relación con la infertilidad conyugal no fue fácil de descubrir (Gallegos-Ávila MG, 2003).

En el laboratorio de andrología del departamento de patología de la Facultad de Medicina de la UANL se sigue una línea de investigación la cual esta diseñada para tratar de dilucidar el comportamiento de los parámetros seminales y microbiológicos en pacientes con problemas reproductivos e infecciosos.

En uno de los trabajos de investigación se estudió un grupo de individuos infértiles y con procesos infecciosos en glándulas accesorias causados por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp*; en el que se valoró la asociación existente entre la alteración de los parámetros seminales entre los que se encontraban aspectos fisicoquímicos, morfología, vitalidad y motilidad espermática y su correlación con los niveles de fructosa y citrato seminal, en este estudio se encontraron hallazgos que indican la asociación entre los niveles alterados de fructosa seminal y alteraciones en los porcentajes de motilidad espermática, parámetro que se ha mencionado esta relacionado con problemas de infertilidad (Alvarez-Cuevas S, 2006).

Además de esto, en colaboración con la Universidad Autónoma de Madrid, se ha estudiado líquido seminal de pacientes infértiles con técnicas como microscopía electrónica de transmisión y se han analizado cortes semifinos bajo microscopía de campo claro observando patrones de alteración característicos en los espermatozoides, además de la presencia de bacterias correspondientes morfológicamente a *Chlamydia spp* y *Mycoplasma spp* (Gallegos, 2005).

En cooperación con el Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo de la Coruña España y la Universidad Autónoma de Madrid también se ha abordado la problemática de la infertilidad masculina desde la perspectiva del daño molecular e el ADN espermático, estudios realizados por este grupo de investigadores han concluido que la valoración de la fragmentación del ADN en el espermatozoide es mas eficiente

que los parámetros seminológicos clásicos en pacientes con infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.* (Gallegos et al, In press).

1.8 Justificación

Desde hace tiempo se ha reconocido el impacto que las infecciones de tracto genital masculino tienen sobre la infertilidad.

Existen clara evidencia de la asociación entre la presencia de los especies bacterianas *Chlamydia trachomatis* y micoplasmas genitales con los procesos infecciosos de la vía seminífera.

Hasta ahora pareciera que la presencia de partículas bacterianas adheridas e incorporadas al citoplasma de espermatozoides y otras células presentes en el líquido seminal, representarían mecanismos de daño a nivel subcelular en relación con las alteraciones seminológicas y espermáticas que acompañan a la Infección Genitourinaria (IGU) por esos gérmenes. Sin embargo a la fecha no se cuenta con suficiente evidencia de los mecanismos moleculares asociados a alteraciones de la calidad del espermatozoide y su capacidad fecundante.

Por lo que consideramos importante realizar estudios para evaluar ciertos cambios moleculares relacionados con la presencia de infección causada por *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales.

1.9 Hipótesis

Las infecciones seminales por *Mycoplasmas* genitales y *Chlamydia trachomatis* implican cambios moleculares como la generación de lipoperoxidación, el incremento en la fragmentación de ADN espermático y un mayor grado de apoptosis en el espermatozoide.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo General

Correlacionar los cambios moleculares presentes en el líquido seminal de pacientes infértiles asociados a la patología infecciosa del tracto seminífero causada por *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales.

1.10.2 Objetivos Específicos

Objetivo 1.- Evaluar el grado de fragmentación en el ADN espermático en pacientes infértiles con IGU causada por *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales.

Objetivo 2.- Cuantificar los niveles de malonaldehído como indicador de lipoperoxidación en Líquido Seminal de pacientes infértiles con IGU causada por *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales.

Objetivo 3.- Determinar la presencia de procesos apoptóticos en espermatozoides de pacientes infértiles con IGU causada por *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales.

Objetivo 4.- Determinar la correlación entre los parámetros analizados

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

Considerando como objeto de estudio la población de pacientes que se presentaron a un centro especializado de evaluación y consulta clínica andrológica y al laboratorio de andrología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se llevo acabo un estudio Experimental, Longitudinal, Prospectivo y Controlado.

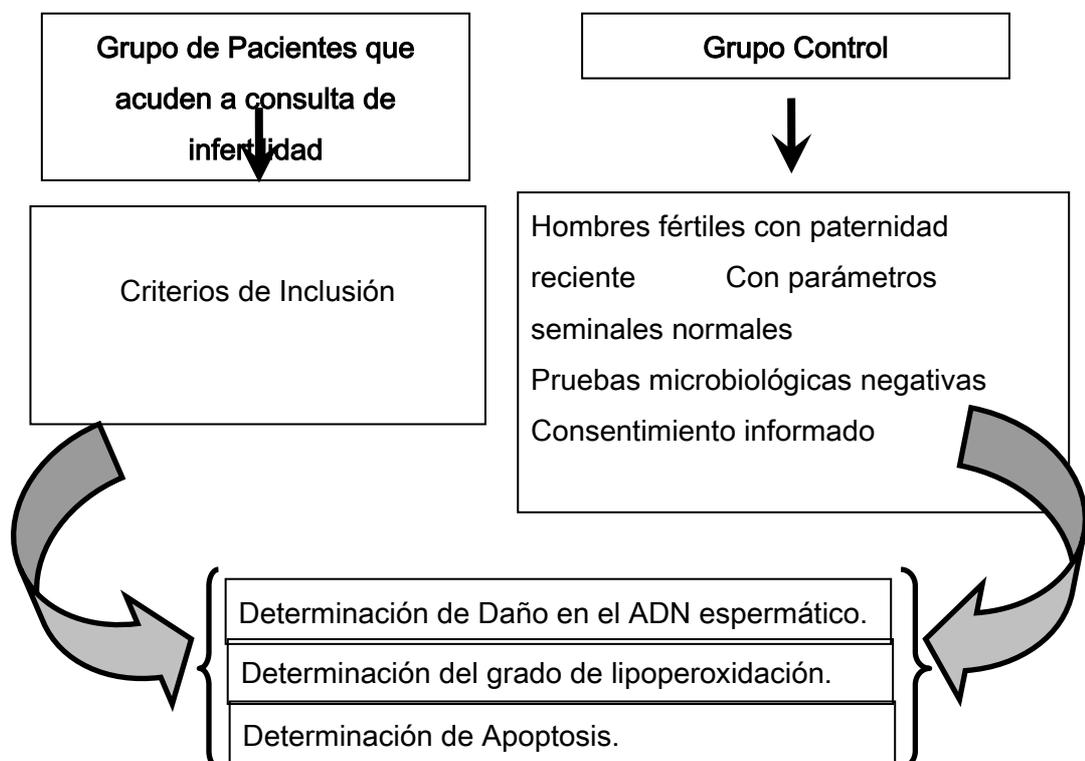
El grupo experimental se constituyó por pacientes que de acuerdo a la evaluación andrológica estuvieran diagnosticados como individuos infértiles. Además se consideró para la selección de los pacientes que presentaran compatibilidad con infección genitourinaria (IGU) de acuerdo al historial clínico y a la posterior corroboración con estudios de laboratorio, los pacientes seleccionados presentaron positividad para *Chlamydia trachomatis* diagnosticada mediante la prueba de Inmunofluorescencia Directa (*IFD, MicroTrack, Trinity Biotech, Wicklow, Irlanda*) y positividad para Micoplasmas genitales diagnosticado mediante la realización de cultivo en medio selectivo para este género bacteriano (Biomérieux,

Lyon; Francia). Todos los pacientes incluidos en este trabajo aceptaron entrar en el mismo firmando la carta de consentimiento informado para el uso del espécimen.

Fueron descartados de este trabajo los individuos azoospermicos, aquellos que presentaran volúmenes bajos de líquido seminal (que fuera insuficiente para la realización de todas las pruebas y parámetros evaluados), además se descartaron los pacientes con infección seminal por gérmenes distintos a *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales, los pacientes que tuvieran signos de varicocele fueron excluidos de este trabajo de investigación así como aquellos que no aceptaron entrar en el protocolo

El grupo control constituido por voluntarios sanos fértiles y con paternidad comprobada, con pruebas seminológicas normales y pruebas microbiológicas negativas, para el uso del espécimen se contó con su consentimiento informado.

2.2 Estrategia general



2.3 Material, equipos y reactivos

2.3.1 Material biológico

- ✓ Líquido seminal

2.3.2 Material de laboratorio

- ✓ Portaobjetos de vidrio 26 X 76 mm
- ✓ Cubreobjetos de vidrio 22 X 22 mm
- ✓ Papel parafilm; PARAFILM M
- ✓ Aplicadores de madera
- ✓ Papel filtro; Whatman ®
- ✓ Vasos de precipitado de 50, 100, 600 mL
- ✓ Pipetas automáticas de 10-50, 100, 250 y 1000 µL
- ✓ Putillas de 1-200 y 100-1000 µL
- ✓ Tubo ependorf de 600 µL y 2 mL
- ✓ Tubos falcon 15 mL
- ✓ Gasas
- ✓ Gradillas de metal
- ✓ Tubos de ensaye de 13 X100
- ✓ Canicas de vidrio
- ✓ Hielera de unicel
- ✓ Hielo
- ✓ Guantes de latex

2.3.3 Equipo

- ✓ Incubadora, Boekel modelo 13 2000
- ✓ Agitador vórtex, Baxter
- ✓ Agitador IKA, MS1 Minishaker
- ✓ Balanza analítica, AND GR120
- ✓ Espectrofluorómetro LS45, Perkin Elmer
- ✓ Microscopio de Campo Claro, Axiostar Carl Zeiss
- ✓ Microscopio de Fluorescencia Axiostar, Carl Zeiss
- ✓ Microcentrífuga Eppendorf 5415
- ✓ Placa de calentamiento Corning
- ✓ Centrífuga Centra CL3R, Thermo IEC
- ✓ Refrigerador Maytag
- ✓ Horno Shel lab
- ✓ Contador de células Baxter
- ✓ Tanque para nitrógeno líquido Taylor-Whartan
- ✓ Sonicador Bronson 3510

2.3.4 Reactivos

- ✓ Acido clorhídrico, Merck
- ✓ Colorante de Wright, Merck
- ✓ Nitrógeno líquido, Infra
- ✓ Buffer de fosfatos, Jalmek
- ✓ Etanol Analytyca
- ✓ Acetona, Merck

✓ Agua desionizada

✓ Agua destilada

Kits de diagnóstico:

✓ Apoptosis Detection Kit, Annexin V-CY3, APOAC ® ; SIGMA

✓ SCD, Halosperm ®; INDAS

✓ TBARS Assay Kit; OXItec, ZeptoMetrix

2.4 Métodos

2.4.1 Determinaciones microbiológicas

Las evaluaciones microbiológicas de cada uno de los casos seleccionados se realizaron de acuerdo a las necesidades de cada prueba.

2.4.1.1 Identificación del género bacteriano *Chlamydia*

En el grupo de pacientes y en el grupo control sano se procedió a la identificación del género bacteriano *Chlamydia* especie *trachomatis*. En el método utilizado se emplean anticuerpos monoclonales anti-*Chlamydia trachomatis* marcados con fluoresceína (MicroTrack, Trinity Biotech, Wicklow, Irlanda) y se realizó la observación bajo microscopía de fluorescencia.

La muestra de líquido seminal de cada uno de los pacientes y controles sanos fueron homogenizadas y llevadas a centrifugación (Eppendorf Centrifuge 5415, Brinkmann) durante 10 minutos a una velocidad de 7000 rpm. Se recuperó el centrifugado rico en células espermáticas y se resuspendió en un pequeño volumen de plasma seminal, Se realizaron extendidos en portaobjetos adecuadamente identificados colocando de 10 a 20 μL de la muestra en una área central aproximada de un centímetro de diámetro.

Se fijó la preparación a temperatura ambiente; el extendido de espermatozoides se incubó con el anticuerpo monoclonal fluorescente anti-*C. trachomatis* (MicroTrack, Trinity Biotech, Wicklow, Irlanda) durante 30 minutos a 37°C. Se realizaron lavados con buffer para retirar el exceso de reactivo y se colocó el cubreobjetos sellado con una gota de glicerol (20 μL). Las muestras se observaron bajo microscopía de fluorescencia (Axiostar, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania),

empleando objetivos de 63X y ocular de 10X y una cifra de campo de 18. Para cada determinación se utilizaron laminillas de control negativo y una de control positivo para verificar la calidad del reactivo y evaluar la confiabilidad de la determinación. De acuerdo al fabricante. Se consideró positivo el resultado de esta prueba cuando se observaron más de 10 cuerpos elementales fluorescentes por campo microscópico.

2.4.1.2 Identificación de micoplasmas genitales

Para la identificación del género bacteriano *Mycoplasma* se utilizó el kit de diagnóstico *Mycoplasma* IST (Biomerieux, Lyon, Francia), esta prueba es utilizada para realizar la identificación y diagnóstico de micoplasmas urogenitales, consiste en un caldo de cultivo selectivo que contiene los sustratos específicos para el crecimiento y la identificación de varias especies de micoplasma genitales: urea para *Ureaplasma urealyticum* y para *Mycoplasma fermentans* y arginina para *Mycoplasma hominis*,

Contiene también el indicador rojo fenol que permite, en caso de los cultivos positivos, visualizar un cambio de color del caldo el cual esta asociado a cambios en el pH del medio. El medio tiene 3 antibióticos y antifúngicos los cuales aportan selectividad respecto a la flora de contaminación que eventualmente puede estar presente durante la toma de la muestra.

2.4.1.2.1 Composición y Reconstitución de los reactivos:

R1= Caldo con elementos nutritivos estables, para preparar la muestra. Asegura la selectividad respecto a las principales bacterias Gram (+) y Gram (-) y permite la reconstitución del reactivo R2.

R2= Caldo Urea-Arginina en forma liofilizada, substratos específicos para el crecimiento de diferentes géneros de micoplasmas genitales.

R3= Galería, compuesta por 22 pruebas, dividida en 3 partes:

Identificación: Capsulas No 1-3

Recuento indicativo: Capsulas No 4 y 5

Pruebas de sensibilidad: Capsula No 6-22

2.4.1.2.2 Procedimiento de la técnica

- ✓ La muestra se colocó en el caldo nutritivo (R1) necesario para la reconstitución del reactivo 2 (R2).
- ✓ Se homogenizó el R1 sembrado y se transfirieron 3 mL al R2.
- ✓ Posteriormente se agitó en vórtex hasta la disolución completa del liofilizado.
- ✓ Inmediatamente se repartió el caldo en las 22 capsulas de la galería (R3) a razón de 55 µL por cápsula.
- ✓ Se añadieron 2 gotas de aceite mineral estéril a cada capsula y se colocó la tapa de la galería.
- ✓ Las muestras fueron incubadas en la galería de 24-48 horas a 36°C ±2°C.
- ✓ Las lecturas se empezaron a realizar pasadas 24 horas de incubación. Al cabo de 48 horas las muestras que no registraran viraje en el color del indicador fueron reportadas como negativas.

2.4.2 Determinación de Daño en el ADN espermático

La prueba de determinación de los niveles de fragmentación del ADN en espermatozoides (Prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática, SCD; Indas, Madrid, España) se fundamenta en la respuesta diferencial que ofrecen los núcleos de los espermatozoides con ADN fragmentado frente a los que conservan su ADN intacto. La desnaturalización controlada del ADN seguida de la extracción de las proteínas nucleares, da lugar a nucleoides parcialmente desproteinizados donde los bucles de ADN se expanden formando halos de dispersión de la cromatina. Sin embargo, los nucleoides de espermatozoides cuyo ADN se encuentra fragmentado no desarrollan halos de dispersión o este es mínimo.

2.4.2.1 Preparación de reactivos:

Entre los reactivos necesarios para la realización de esta técnica se encuentran:

Agarosa de alto punto de fusión

Agarosa de bajo punto de fusión

Solución desnaturalizante: Ácido clorhídrico concentrado

Solución de lisis: Dithiothreitol y Triton X-100.

Etanol: 70%, 80% y 100%

Agua destilada

Los pasos generales para la realización de la técnica son:

2.4.2.2 Inclusión de la muestra en microgel de agarosa:

- ✓ Se diluyó la muestra de semen en buffer de fosfatos (PBS), a una concentración de 5-10 millones de espermatozoides por mililitro.
- ✓ Se colocó un tubo con agarosa en un flotador en un baño de agua hirviendo (90-100°C) por 5 minutos o hasta que la agarosa se encontrara totalmente fundida.

-
- ✓ Se retiró el tubo con agarosa del agua hirviendo y se colocó en un baño termostático a 37°C por 5 minutos hasta equilibrar la temperatura.
 - ✓ Se añadieron 60 µL de semen previamente diluido y mezclar totalmente al tubo de agarosa fundida.
 - ✓ En un portaobjetos tratado con una capa de agarosa y previamente enfriado (4°C aproximadamente), se colocó una gota de la suspensión de células sobre la cara tratada con al agarosa, se cubrió con un cubreobjetos de cristal (evitando formar burbujas de aire)
- Nota:** Se mantuvo el portaobjetos siempre en posición horizontal
- ✓ Se introdujo la lamina fría a refrigeración a 4°C dejando gelificar la muestra durante 5 minutos

2.4.2.3 Procesamiento de la muestra:

- ✓ Para preparar la solución desnaturizante, se añadieron 80 µL de HCl concentrado en 10 mL de agua destilada, mezclando perfectamente y se colocó en una de las cajas de procesamiento.
- ✓ Inicialmente se retiró el cubreobjetos de la muestra incluida en el microgel, deslizándolo con suavidad e introduciendo inmediatamente el portaobjetos en posición horizontal en la solución desnaturizante. Se dejó incubando durante 7 minutos.
- ✓ Se levantó el portaobjetos con una lanceta, usando guantes. Se colocó en posición horizontal en otra de las cajas de procesamiento que contenía 10 mL de solución de lisis. Se dejó incubar durante 27 minutos.
- ✓ Se retiró el portaobjetos y se introdujo horizontalmente en una caja con abundante agua destilada para lavar la solución de lisis. Se Dejó incubando durante 5 minutos.

- ✓ Se retiró el portaobjetos con la muestra y se llevó en posición horizontal a una caja con etanol al 70% (2 minutos), luego a etanol al 80% (2 minutos) y finalmente a etanol al 100% (2 minutos)
- ✓ Se dejó secar al aire.

2.4.2.4 Tinción de la muestra

- ✓ Para este propósito se colocó una capa de colorante de Wright (Merck; Darmstadt, Alemania) que cubrió perfectamente el microgel seco. Se dejó tiñendo durante 5-10 minutos, soplando encima ocasionalmente. Se decantó y lavó suavemente con agua corriente y se dejó secar.

2.4.2.5 Observación bajo el microscopio (Análisis visual directo)

Para realizar el análisis, visualizar y clasificar los nucleoides se utilizó un microscopio de campo claro (Axiostar, Carl Zeiss), utilizando un objetivo de 100X y ocular 10X con cifra de campo de 18.

- ✓ El nucleoide que corresponde al núcleo masivamente desproteínizado del espermatozoide, se compone de dos partes: silueta del núcleo del espermatozoide, denominado *core*, en posición central, y un halo periférico de dispersión de la cromatina/ADN (Fig. 1).

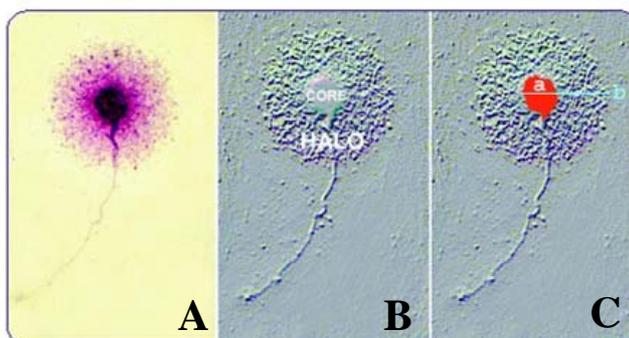


Fig. 1. Nucleoide formado por la desproteínización del espermatozoide

En la figura 1 se presenta el resultado característico esperado de la técnica de SCD. En la figura 1A observamos el **Nucleoide** que corresponde al núcleo masivamente desproteinizado del espermatozoide. En la figura 1B se observa el **Core** que corresponde a la silueta del núcleo. En la figura 1C se presenta el **Halo de dispersión** que es la cromatina/DNA altamente desenrollado.

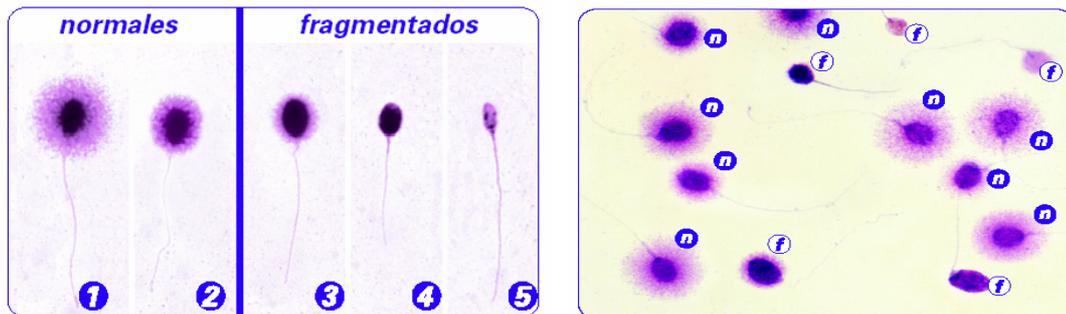


Fig. 2. Nucleoides teñidos con el Método de Wright

En la figura 2 se presentan ejemplos de nucleoides teñidos con el método de Wright en la que se observa la clasificación de los nucleoides de acuerdo al tamaño del halo de dispersión de la cromatina.

ESPERMATOZOIDES SIN ADN FRAGMENTADO

- ✓ Halo grande (1)
- ✓ Halo mediano (2)

ESPERMATOZOIDES CON ADN FRAGMENTADO

- ✓ Halo pequeño (3)
- ✓ Sin halo (4)
- ✓ Degradados (5)

ESPERMATOZOIDES NORMALES (n)

ESPERMATOZOIDES CON ADN FRAGMENTADO (f)

Se realizó el conteo de 500 células, clasificando y expresando los resultados en porcentaje de Normales y Anormales

2.4.3 Medición de Sustancias Reactivas del Acido Tiobarbitúrico (Valoración de la lipoperoxidación)

La peroxidación lipídica o lipoperoxidación es el proceso químico donde distintas reacciones ocurren sobre ácidos grasos insaturados. Es un mecanismo bien conocido el cual produce daño en las células eucariotas.

Tras la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas biológicas a causa de la presencia de ROS se generan, entre otros compuestos, malonaldehído (MDA) y 4-hidroxiacetaldehído (4-HNE), como productos finales de reacción.

El MDA forma un aducto con el ácido tiobarbitúrico en proporción 1:2 el cual puede ser medido por fluorimetría o espectrofotometría.

Esta reacción es mucho más sensible cuando se mide por fluorimetría. Las muestras biológicas contienen una mezcla de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico, incluyen hidroperóxidos lipídicos y aldehídos, los cuales se incrementan como resultado del estrés oxidativo.

2.4.3.1 Preparación de reactivos:

Entre los reactivos necesarios para la realización de esta técnica se encuentran:

Ácido tiobarbitúrico (TBA): 0.53 g de ácido tiobarbitúrico

Diluyente TBA 1: 50 mL de ácido acético

Diluyente TBA 2: 50 mL de hidróxido de sodio

Solución SDS: 30 mL de Dodecil Sulfato de Sodio

Estándar MDA: 20 mL de MDA Bis (Dimetilacetal) a una concentración de 100 nmol/mL.

Diluyente MDA: 100 mL de agua desionizada estéril.

Canicas

Para la preparación de los reactivos se realizó el siguiente procedimiento:

Se mezcló una botella de diluyente 1 TBARS (50mL) y una botella de diluyente 2 TBARS (50mL), además de un vial de ácido tiobarbitúrico TBA (0.53g) en el siguiente orden:

- ✓ Se agregó el TBA a un vaso de mezclado realizando lavados con el diluyente 1 TBARS.
- ✓ Inmediatamente después se agregó la botella completa de diluyente 2 TBARS.
- ✓ Se mezcló hasta que el TBA estuvo completamente disuelto. En algunos casos fue necesario calentar suavemente para disolver completamente.

2.4.3.2 Preparación de Curva de calibración:

Se realizó una dilución 1:10 del estándar MDA mezclando 1.8 mL de diluyente MDA y 0.2 mL del estándar MDA. A partir de esta solución de MDA 1:10 se prepararon una serie de estándares en diluyente MDA para la realización de la curva de calibración.

Tabla 1. Preparación de la Curva de Calibración de MDA.

Estándar No.	MDA (nmol/mL)	Vol. MDA st. 1:10 (μ L)	Vol. MDA dil. (μ L)
BCO	0	0	1000
1	0.05	5	995
2	0.1	10	990
3	0.5	50	950
4	1.0	100	900
5	1.5	150	850
6	2.0	200	800

2.4.3.3 Preparación de la muestra y realización de la técnica

- ✓ Se lavó la muestra en PBS para retirar el criopreservador.
- ✓ Se concentró la muestra de líquido seminal a 10×10^6 espermatozoides/mL en PBS
- ✓ La muestra fue sonicada por 15 segundos a 40V.
- ✓ Se agregaron 100 μ L de la muestra o estándar a cada uno de los tubos.

Nota 1: Por cada 100 μ L de muestra había una concentración de 1 millón de espermatozoides, en los casos en los que la señal no fue detectada por el equipo se aumentó la concentración celular.

Nota 2: En cada una de las determinaciones se utilizó un blanco.

- ✓ Se agregaron a cada uno de los tubos de reacción 100 μ L de solución SDS y se mezcló perfectamente.
- ✓ Se agregaron 2.5 mL de reactivo TBA/Buffer.
- ✓ Se cubrió cada uno de los tubos de reacción con una canica de vidrio y se incubaron a 95°C por 60 minutos.
- ✓ Se retiraron los tubos de la incubación y se colocaron en un baño de hielo por 10 minutos.
- ✓ Se centrifugaron las muestras a 3000 rpm por 15 minutos.
- ✓ Se removió el sobrenadante de la muestra para el análisis fluorométrico.

2.4.3.4 Medición fluorométrica

- ✓ Se midió la intensidad de fluorescencia en el sobrenadante a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm.
- ✓ Se registraron los resultados para la realización de los gráficos necesarios y el cálculo de los resultados.

Nota: Cada uno de las mediciones se realizó por triplicado realizado el calculo de los promedios y de las desviaciones estándar.

2.4.4 Determinación del Grado de Apoptosis Espermática (Evaluación Citoplásmica para la Translocación de la Fosfatidilserina)

En células vivas, la fosfatidilserina (FS) es transportada a la membrana interna por la enzima aminofosfolípido translocasa dependiente de Mg-ATP. Este fosfolípido de membrana en condiciones normales se localiza en la cara interna de la membrana plasmática. Sin embargo, dentro de los cambios celulares que están envueltos en el proceso apoptótico se encuentran la pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de membrana durante estadios tempranos del proceso, por lo que la fosfatidilserina es expuesta a la cara externa de la membrana celular (cara extracelular).

Las anexinas son un grupo de proteínas homologas de unión a fosfolípidos en presencia de calcio. La *Anexina V* es parte de este grupo de proteínas que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina (FS).

La anexina V conjugada con el fluorocromo Cy3 18 (AnnCy3) se une a la fosfatidilserina que esta presente en la cara externa de la membrana celular de las células que han iniciado el proceso de apoptosis. La unión es observada como fluorescencia de color rojo.

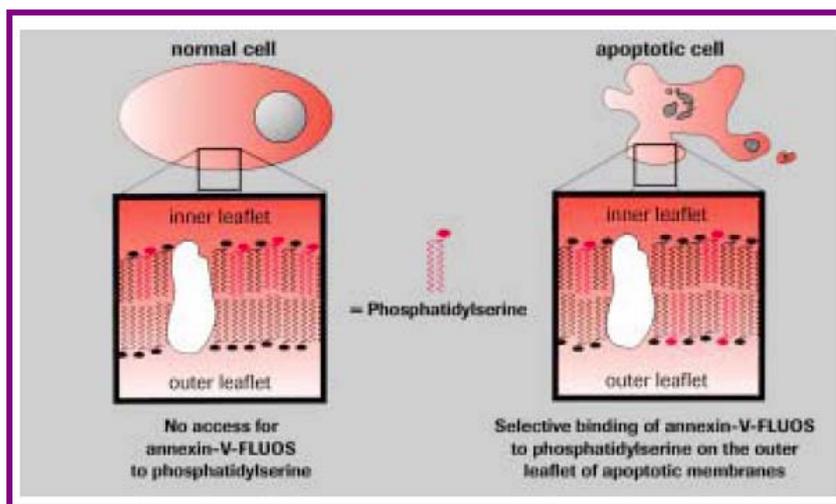


Fig. 3. Translocación de la fosfatidilserina en la membrana plasmática

2.4.4.1 Preparación de reactivos:

Entre los reactivos necesarios para la realización de esta técnica se encuentran:

Anexina V-Cy3. 18: 10 μg de proteína en solución a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disuelta en Tris HCl 50 mM, pH 7.5 con 100 mM de NaCl.

6-CFDA: 10 mg de Diacetato de 6-Carboxifluoresceína.

Binding buffer 10X: 10 mM de HEPES/NaOH, pH 7.5, con 1.4 M de NaCl y 25 mM de CaCl_2 .

PBS: Buffer salino de fosfatos pH 7.2

Agua destilada

Agua desionizada

Acetona: acetona concentrada.

Para la preparación de los reactivos se realizó el siguiente procedimiento:

- ✓ Para preparar el buffer de unión (binding buffer) 1X: a partir de binding buffer 10X se realizó una dilución 1:10 en agua desionizada.
- ✓ Para preparar el 6-CFDA (50mM) en acetona: Por cada 2.32 mg de 6-CFDA se agregaron 0.1 mL de acetona.

Nota: Este reactivo se mantuvo protegido de la luz y almacenado a -20°C .

-
- ✓ Preparación de la solución de doble marcaje: La solución de doble marcaje contiene 1µg/mL de AnnCy3 y 500 µM de 6-CFDA en binding buffer 1X. Para ello se agregaron 20µL de la solución de AnnCy3 (100µg/mL), además de 20 µL de 6-CFDA 50mM en acetona (preparado previamente), se agregaron posteriormente 200 µL de binding buffer 10X y finalmente se colocaron a la mezcla 1.76 mL de agua desionizada.

Nota: Se mezcló perfectamente y se mantuvo en refrigeración a 4°C protegido de la luz.

2.4.4.2 Procesamiento de la muestra y realización de la técnica (tinción fluorescente para apoptosis)

- ✓ Se llevaron las células espermáticas a una concentración de 5×10^6 espermatozoides/mL utilizando PBS.
- ✓ Se colocaron dos círculos de 1 cm de diámetro aproximadamente en un portaobjetos nuevo en la parte posterior a la que fue utilizado (esto ayudara a localizar la gota colocada en el portaobjetos).
- ✓ Se colocaron 50 µL de la suspensión de células espermáticas en cada círculo y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, esto permitió que las células se adhirieran al portaobjetos.
- ✓ Se removió el exceso de líquido utilizando un papel filtro, tocando por un extremo de la gota, se hizo con la precaución de no tocar en la parte superior de la muestra para no dañar las células que se han adherido al portaobjetos.
- ✓ Se lavaron las células con tres alícuotas de 50 µL de Binding Buffer 1X y se eliminó el exceso de líquido utilizando papel filtro.

- ✓ Se colocaron 50 μ L de la solución de doble marcaje (AnnCy3-6-CFDA) en cada círculo y se cubrió con una caja petri con papel aluminio.
- ✓ Las laminillas portaobjetos con la muestra teñida se llevaron a incubar por 10 minutos a 37°C. Después de la tinción se lavó cada círculo con cinco alícuotas de 50 μ L de Binding Buffer 1X como se mencionó previamente.
Nota: Esto removerá el exceso de marcaje de las células.
- ✓ Se colocaron 35 μ L de Binding Buffer 1X en cada círculo y se cubrió el portaobjetos con un cubreobjetos 24 x 50 mm.
- ✓ Las muestras se observaron bajo el microscopio de fluorescencia.

NOTA 1: La solución de doble marcaje permitió diferenciar las células apoptóticas de las necróticas.

Nota 2: Los filtros utilizados en este trabajo fueron el filtro FITC para fluoresceína y el filtro para Cy3.

Se contaron 200 células expresando los resultados en porcentajes de células normales o apoptóticas.

Para la identificación se observaron células con las siguientes características vistas a microscopio de fluorescencia.

Normales: 6-CFDA + (Verde)

Apoptosis Temprana: AnnCy3+ (Naranja-Rojo) y 6-CFDA+ (Verde)

Necróticas: AnnCy3+ (Naranja-Rojo)

2.4.5 Análisis Estadístico

El modelo de investigación utilizado en el presente trabajo se caracteriza por ser un estudio prospectivo, controlado y no aleatorizado.

Los datos microbiológicos y los resultados de los parámetros medidos fueron incluidos en una base de datos diseñada para tal efecto utilizando el programa informático Excel. Los análisis estadísticos efectuados se realizaron con el paquete SPSS versión 12.5.

2.4.5.1 Estadística Descriptiva:

Para resumir las variables de tipo cuantitativo se calculará la media como medida de tendencia central y la desviación típica como medidas de dispersión.

2.4.5.2. Estadística Inferencial:

Prueba de Hipótesis: Comparación o Diferencia de Proporciones

Prueba de Hipótesis: Comparación de Diferencia de Medias

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Muestra obtenida para el estudio

Para este trabajo se recolectaron muestras de líquido seminal de individuos infértiles y con IGU causada por *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales e individuos sanos en el periodo comprendido de enero a agosto del 2007.

Para este trabajo se incluyeron 37 pacientes, los cuales presentaron positividad para los gérmenes *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales. También se logro completar un grupo de 11 individuos normozoospermicos, fértiles y con pruebas microbiológicas negativas, los cuales fueron utilizados como grupo control sano.

De acuerdo a los resultados de los estudios microbiológicos, los sujetos de estudio fueron conjuntados en 4 grupos.

El conjunto de pacientes quedo conformado en tres grupos: pacientes positivos para Micoplasmas genitales (N=2), pacientes positivos para *Chlamydia trachomatis*

(N=11) y pacientes positivos para Micoplasmas genitales y *Chlamydia trachomatis* (N=24). Además, un grupo control constituido por individuos fértiles y sin infección (N=11). Los resultados se presentan en la tabla 2.

Grupos		N
Pacientes		37
	Micoplasmas genitales (+)	2
	<i>Chlamydia trachomatis</i> (+)	11
	Micoplasmas genitales y <i>Chlamydia trachomatis</i> (+)	24
Controles	Negativos	11

Tabla 2. Grupos formados de acuerdo a los resultados microbiológicos obtenidos.

3.2 Estudio de *Chlamydia trachomatis* por Inmunofluorescencia Directa (IFD)

De los 37 muestras de los pacientes incluidos en el estudio, 35 presentaron positividad para *Chlamydia trachomatis* por IFD, 24 de ellos presentaron la infección por *C. trachomatis* combinada con la infección por Micoplasmas genitales y 11 presentaron infección solo por *C. trachomatis*.

El grupo control sano presentó pruebas de IFD negativa para *Chlamydia trachomatis* (Fig.4A, B, C y D).

En la figura 4E, F, G, y H se muestran los resultados comúnmente observados en las muestras de los pacientes infértiles incluidos en este estudio. La presencia de cuerpos elementales (flechas) fueron una constante en las muestras de los pacientes, incluso en ocasiones se observó la presencia de cuerpos reticulares (cabeza de flecha) en algunas muestras de los pacientes.

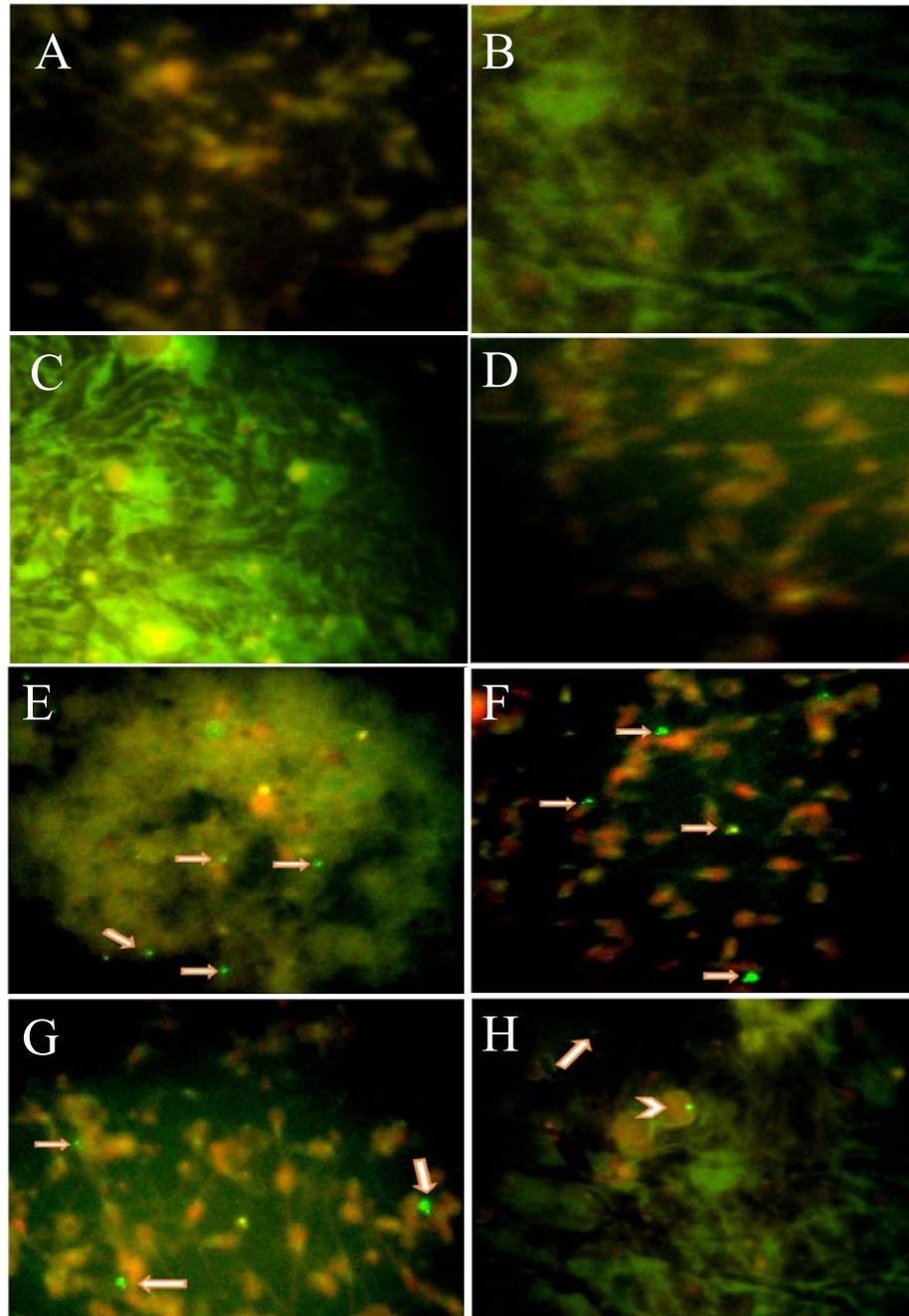


Fig. 4. IFD del grupo control (A, B, C y D) y de los paciente infértil y con infección seminal por *C. trachomatis* (E, F. G y H). (Aumento 63X).

3.3 Estudio de Micoplasmas genitales (MY) mediante cultivo selectivo

26 muestras presentaron pruebas positiva para MY, de este total, 24 presentaron la infección en combinación con *Chlamydia trachomatis* y en 2 de estos casos se

observó que la infección fue solo por MY. En el grupo control conformado por individuos fértiles, normozoospermicos se observaron las pruebas para Micoplasmas genitales negativas.

En la figura 5A se presenta el resultado de uno de los cultivos para la identificación de Micoplasmas genitales en el grupo control constituido por individuos sanos, estos resultados evidencian el resultado negativo en la identificación de estos microorganismos.

En la figura 5B podemos evidenciar el resultado del cultivo positivo de Micoplasmas genitales observado en la mayoría de los pacientes incluidos en el estudio.

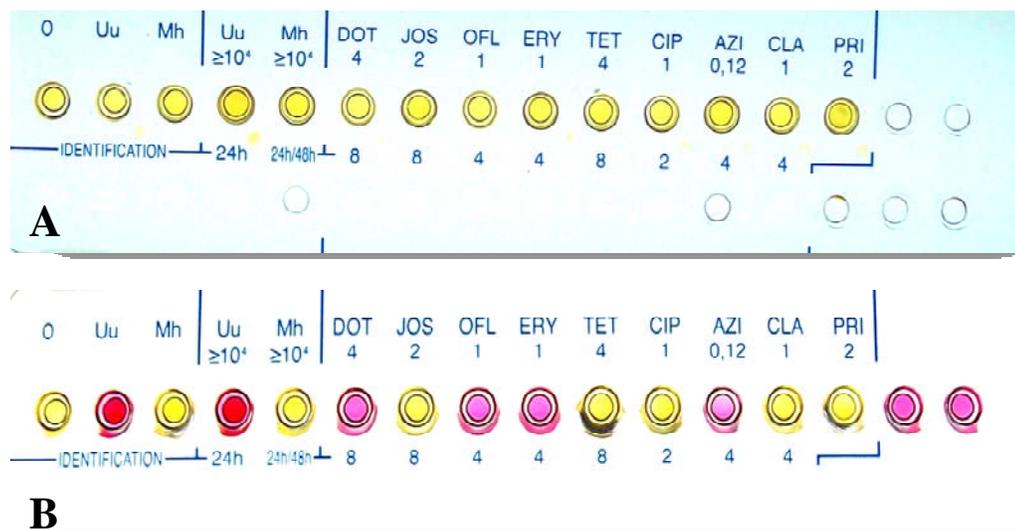


Fig. 6. Resultado de los cultivos específicos para la identificación de Micoplasmas genitales.

3.4 Fragmentación del ADN espermático

La valoración del grado de fragmentación del ADN espermático se evaluó utilizando el Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD-Test). Se contaron 500 células de cada muestra.

En el grupo control se observaron espermatozoides que presentaron halo de dispersión de la cromatina entre mediano y grande, lo que indica el bajo grado de fragmentación del ADN espermático en estos individuos, en la figura 6A, B y C se presentan micrografías de la prueba de SCD en hombres del grupo control.

En la figura 6A observamos predominio de espermatozoides con halo de dispersión de la cromatina mediano y grande (★). En este grupo se presentan un número bajo de espermatozoides que no presentaron halo de dispersión de la cromatina lo que indica bajos niveles de fragmentación del ADN espermático en este grupo de individuos. (Panorámico)

En la figura 6B y C observamos a mayor aumento, espermatozoides con halo de dispersión de la cromatina mediano y grande (★), lo que indica niveles bajos de fragmentación del ADN espermático. (40X)

En el grupo de pacientes se observó un gran número de espermatozoides sin halo de dispersión. En la figura 6D se señalan con flechas los espermatozoides que no presentaron halo de dispersión de la cromatina, lo que indica la presencia de rupturas en el ADN espermático. (Panorámico)

A mayor aumento, señalado con flechas, se evidencia la presencia de espermatozoides con ADN fragmentado (disminución del tamaño o ausencia de halo de dispersión de la cromatina). Aumento 40X

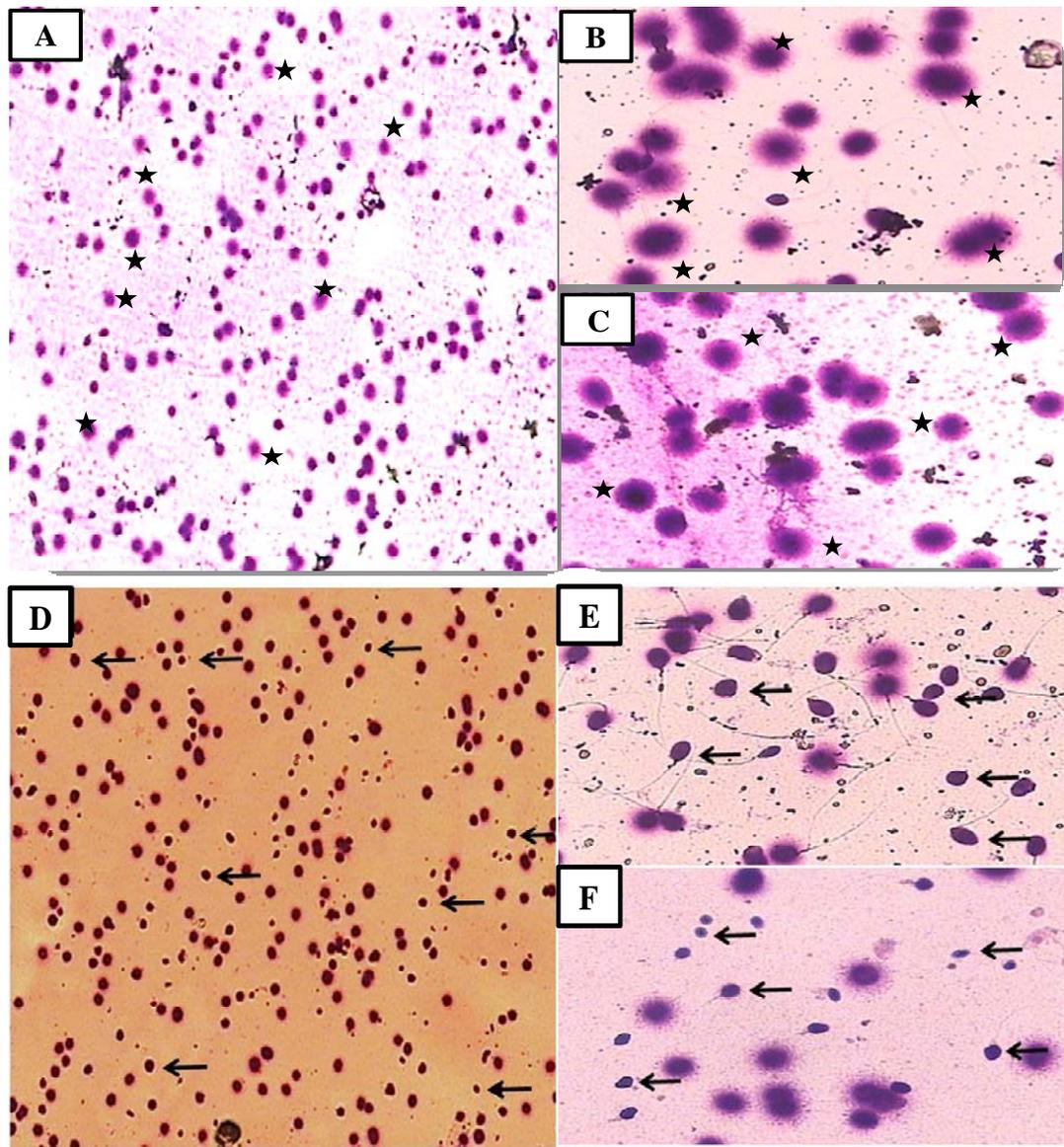


Fig. 6. Fragmentación de la cromatina espermática.

El porcentaje de células con ADN fragmentado (anormales) y su desviación estándar se muestran en la tabla 3 y la figura 7.

El grupo de pacientes *Chlamydia trachomatis* positivo (CH+) presentó un porcentaje de células con ADN fragmentado de 23.145 con una desviación estándar de ± 10.463 , en el grupo de Micoplasmas genitales positivo (MY+) se presentó un porcentaje de 27.408 con desviación estándar de ± 11.187 , en ambos grupos se observó diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) al realizar la comparación con el grupo control, el cual presentó un porcentaje promedio de células con ADN fragmentado de 18.364 y una desviación estándar de ± 7.553 , esto fue aplicando la prueba de hipótesis: diferencia entre las proporciones de dos poblaciones,

Grupo	Porcentaje Promedio de Células Anormales	SD
MY+	14.500	6.364
CH+	23.145	10.463
MY+ y CH+	27.408	11.187
CONTROLES	18.364	7.553

Tabla 3. Porcentajes de células con ADN fragmentado en los grupos estudiados.

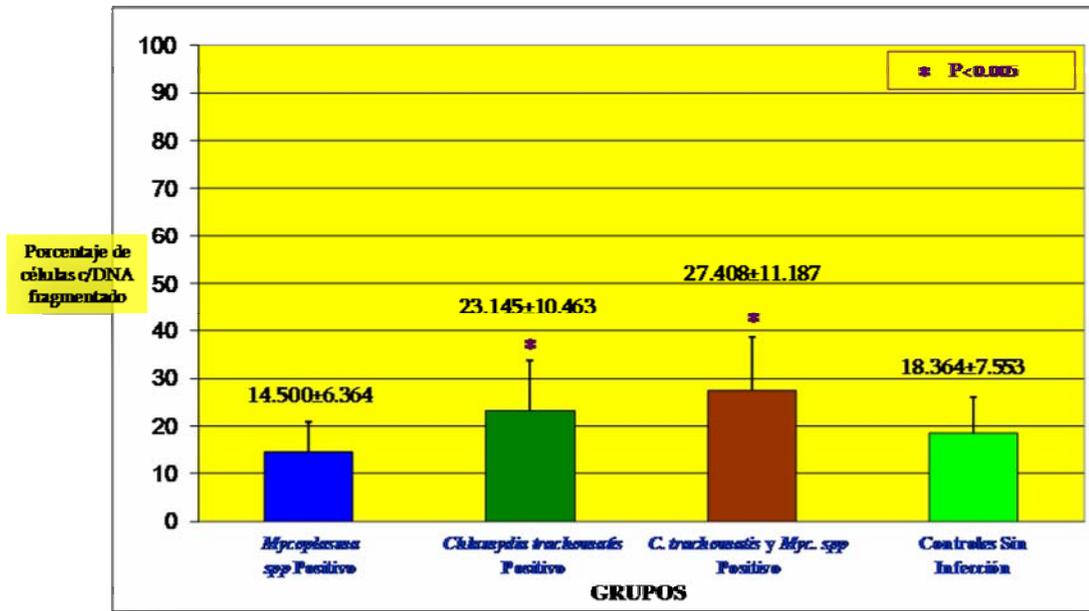


Fig. 7. Porcentaje de células con ADN fragmentado.

3.5 Lipoperoxidación (Producción de MDA valorado con la técnica de TBARS)

Para valorar el grado de lipoperoxidación celular se midieron los niveles de producción de malonaldehído (MDA) utilizando la técnica de TBARS.

Se calculó la concentración de MDA en el líquido seminal, utilizando una curva de calibración realizada con estándares de concentración conocida. La medición de la intensidad de fluorescencia de estos estándares se realizó por triplicado.

En la tabla 4 se presentan los resultados de la intensidad de fluorescencia de cada uno de los estándares utilizados. Se realizaron tres curvas de calibración en tres días diferentes.

Estándar nmol/mL	Intensidad de Fluorescencia				
	1ª lectura	2ª lectura	3ª lectura	Promedio	SD
0.05	19.795	14.933	9.448	14.725	5.17662499
0.1	36.291	34.019	36.911	35.740	1.52261004
0.5	183.907	199.49	185.451	189.616	8.58591236
1	352.051	397.088	388.429	379.189	23.8979376
1.5	546.77	591.17	552.637	563.525	24.1197491
2	707.711	761.648	731.59	733.649	27.0274243

Tabla 4.- Curva de calibración de MDA por fluorescencia.

Con los resultados de la intensidad de fluorescencia de los estándares se construyó una curva de calibración.

Se calculó la ecuación de la recta con la que se realizaron los cálculos de la concentración de MDA en las muestras de los pacientes y controles de este estudio.

En la figura 8 se presenta la curva de calibración utilizada para tal efecto.

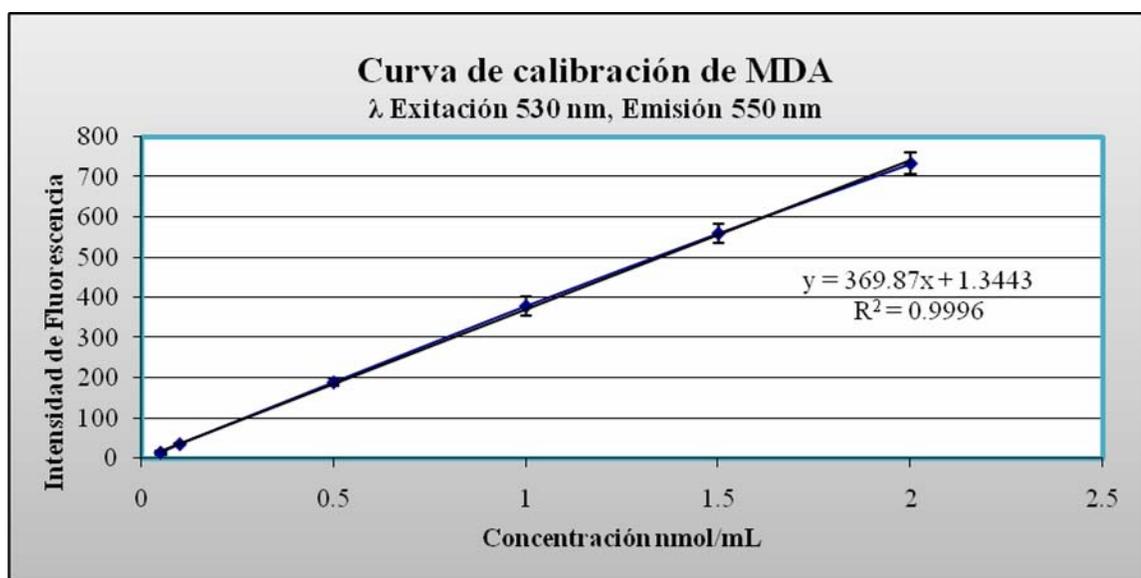


Fig. 8. Curva de calibración de MDA

Cada una de las muestras de los pacientes y controles sanos fueron procesadas para la medición fluorométrica de los niveles de MDA. La cuantificación se realizó por triplicado, se calculó la concentración de MDA utilizando la curva de calibración realizada para tal efecto.

En la tabla 5 se presentan los resultados de la intensidad de fluorescencia del grupo control y el grupo de pacientes, así como la concentración de MDA en nmol/mL en 1×10^6 espermatozoides.

Tabla 5. Intensidades de fluorescencia y concentración de MDA en nmol/mL/ 10^6 espermatozoides obtenidas en el grupo control y grupo de pacientes.

Grupo		Intensidad de fluorescencia	MDA nmol/mL/ 10^6 espermatozoides
Control	CTRL 1	304.927	0.4888
Control	CTRL 2	145.975	0.2533
Control	CTRL 3	303.444	0.3480
Control	CTRL 4	417.220	0.5080
Control	CTRL 5	511.925	0.6400
Control	CTRL 6	280.001	0.3153
Control	CTRL 7	483.137	0.2823
Control	CTRL 8	300.743	0.0110
Control	CTRL 9	291.430	0.2895
Control	CTRL 10	109.616	0.1263
Control	CTRL 11	472.598	0.6388
CH+	PX 1	537.327	1.3513
MY+ y CH+	PX 2	437.457	0.5367
CH+	PX 3	216.725	0.2260
MY+ y CH+	PX 4	174.788	1.6550
MY+ y CH+	PX 5	298.074	3.3925
CH+	PX 6	454.152	0.5105
MY+ y CH+	PX 7	365.552	4.3565
MY+ y CH+	PX 8	138.878	0.1167
MY+ y CH+	PX 9	389.658	4.6803
MY+ y CH+	PX 10	143.093	1.2278
MY+ y CH+	PX 11	486.758	0.6058
MY+ y CH+	PX 12	185.059	0.1815
MY+ y CH+	PX 13	155.717	0.1250

MY+ y CH+	PX 14	713.154	0.8122
CH+	PX 15	293.681	0.2923
MY+ y CH+	PX 16	359.559	0.3788
MY+ y CH+	PX 17	160.409	0.1264
MY+ y CH+	PX 18	173.753	0.1474
CH+	PX 19	135.659	0.0956
MY+ y CH+	PX 20	116.837	0.0721
CH+	PX 21	137.969	0.0984
MY+ y CH+	PX 22	81.928	0.0573
MY+	PX 23	81.746	0.0569
MY+ y CH+	PX 24	78.164	0.0568
CH+	PX 25	105.651	0.0582
MY+ y CH+	PX 26	94.493	0.0445
MY+ y CH+	PX 27	226.096	3.0534
CH+	PX 28	527.636	0.7133
CH+	PX 29	659.112	4.4558
MY+ y CH+	PX 30	676.998	4.5768
MY+	PX 31	400.330	0.5411
MY+ y CH+	PX 32	531.774	0.7189
MY+ y CH+	PX 33	432.573	2.9234
MY+ y CH+	PX 34	157.411	0.2124
MY+ y CH+	PX 35	257.409	0.3477
CH+	PX 36	410.251	1.1090
CH+	PX 37	216.428	0.2923

Tabla 5. Intensidades de fluorescencia y concentración de MDA en nmol/mL/10⁶ espermatozoides obtenidas en el grupo control y grupo de pacientes. (Continuación)

Como ya se mencionó, la medición de los niveles de MDA en cada una de las muestras se realizó por triplicado. Utilizando la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, se calcularon los niveles de MDA de cada una de las tres mediciones, posteriormente se obtuvo el promedio de los valores de MDA obtenidos.

Los promedios de MDA obtenidos de cada uno de los grupos fueron comparados con los promedios de MDA obtenidos del grupo control sano (CONTROL).

Grupo	Promedio MDA (nmol/mL/10⁶ espermatozoides)	SD
MY+	0.299	0.342
CH+	0.837	1.274
MY+ y CH+	1.267	1.604
CONTROLES	0.355	0.199

Tabla 6. Promedios de MDA en nmol/mL/10⁶ espermatozoides.

En la tabla 6 y en la figura 9 se presentan los resultados de MDA obtenidos en cada uno de los grupos estudiados.

El grupo MY+ presentó la concentración mas baja de MDA (0.299 nmol/mL/10⁶ espermatozoides) aun por debajo del grupo control, el grupo CH+ presentó una concentración de MDA de 0.837 nmol/mL/10⁶ espermatozoides, también observamos que el grupo MY+ y CH+ presentó los valores de MDA mas altos (1.267 nmol/mL/10⁶ espermatozoides), el grupo control presentó una concentraciones de MDA de 0.355 nmol/mL/10⁶ espermatozoides.

Al comparar los grupos de pacientes con el grupo control sano y aplicar la prueba de hipótesis diferencia entre medias de dos poblaciones ninguno de los grupos presentó diferencia estadísticamente significativa.

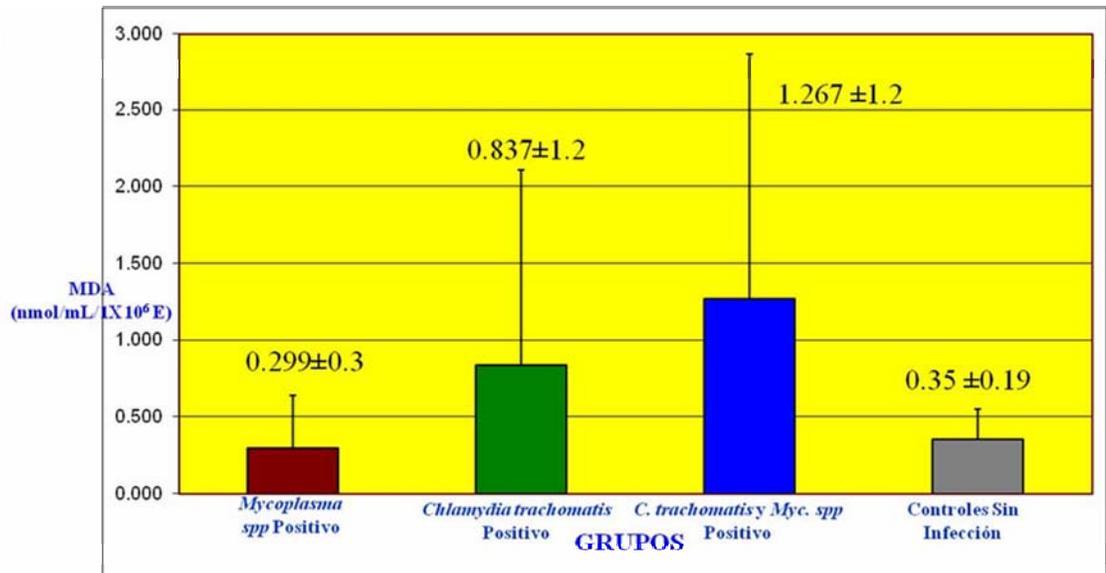


Fig. 9. Valores promedio (nmol/mL/10⁶espermatozoides) de MDA en los grupos estudiados.

3.6 Apoptosis espermática

Para valorar el grado de apoptosis espermática se utilizó el test de la Evaluación Citoplásmica para la Translocación de la Fosfatidilserina, se contaron 200 células en cada una de las muestras de pacientes y controles sanos.

Para el análisis de los resultados se formaron 4 grupos de pacientes y controles sanos de acuerdo a los resultados microbiológicos. En la tabla 7 se presentan los resultados de la medición del grado de apoptosis espermática.

Grupo	Procentaje Promedio Células Apoptoticas	SD
MY+	25.000	2.828
CH+	20.091	3.590
MY+ y CH+	22.500	5.611
CONTROLES	13.364	3.931

Tabla 7. Porcentajes promedios de espermatozoides apoptoticos en los grupos estudiados

Los 3 grupos de pacientes presentan porcentajes promedios de células apoptóticas considerablemente mayores al comparar con el grupo de individuos control sanos. Cabe destacar que en el grupo MY+ se presentó un porcentaje de células apoptóticas de 25.000 ± 2.828 , el grupo CH+ presentó un porcentaje de 20.091 ± 3.590 , el grupo de ambos gérmenes positivos (MY+ y CH+) presentó un valor de 22.500 ± 5.611 , el grupo control presentó un valor promedio de 13.364 ± 3.931 .

En la figura 10 se evidencia que los tres grupos de pacientes presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) al comparar con el grupo control sano, esto al aplicar la prueba de hipótesis comparación de proporciones de dos poblaciones.

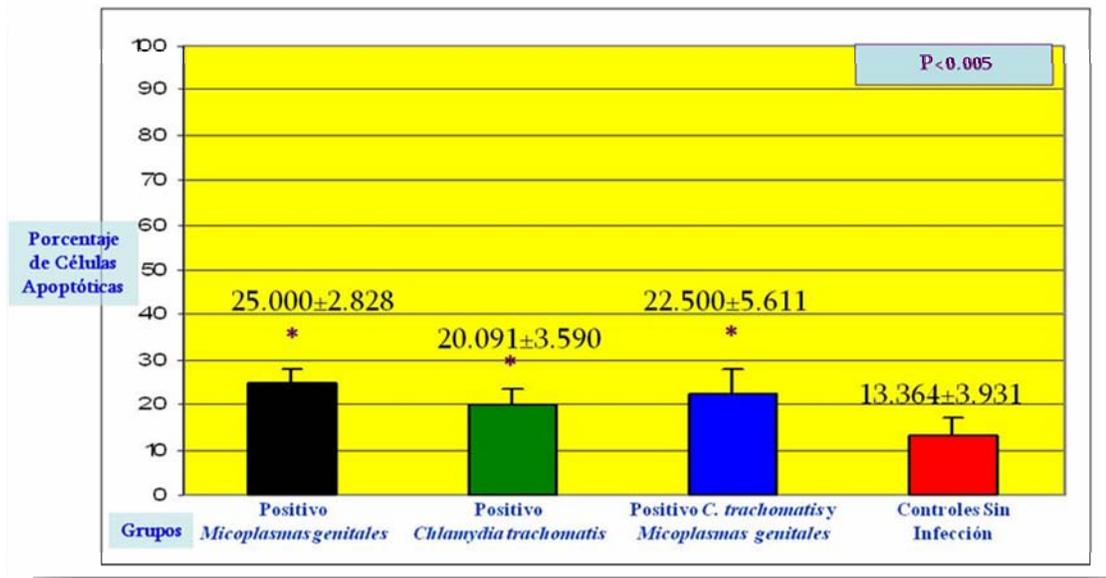


Fig. 10. Porcentaje promedio de espermatozoides apoptóticos en los grupos estudiados.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

Las infecciones genitourinarias son de las patologías que comúnmente afectan al hombre en alguna etapa de la vida, principalmente en la época de actividad reproductiva. Diversos gérmenes se encuentran asociados a la etiología de las infecciones que afectan el tracto genitourinario, la severidad con la que el proceso infeccioso afectara al individuo esta relacionada con el agente causal y también con el estado general del huésped, de acuerdo a estos factores, las infecciones se presentan como sintomáticas o asintomáticas y ambas pueden ser un factor que se relaciona con los problemas de infertilidad; entre las infecciones genitourinarias se encuentran la uretritis, la epididimitis, la orquitis y la prostatitis, además de las infecciones que afectan las glándulas accesorias masculinas. (WHO, 1993).

A pesar de las muchas investigaciones que se han emprendido, todavía se pone en tela de juicio la acción deletérea que las infecciones genitourinarias (IGU) tienen sobre la capacidad fecundante, principalmente los cuadros infecciosos causados por gérmenes inespecíficos. Desde hace tiempo se han relacionado con los problemas de infertilidad la presencia de procesos infecciosos causados por gérmenes como *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales (Kundsin, 1970;

Rehewy et al, 1978; Hosseinzadeh et al, 2001). La valoración de los daños moleculares presentes en los pacientes con estas infecciones podría aclarar el camino acerca de la participación o no en las alteraciones reproductivas de la pareja.

Los problemas de infertilidad afectan a un 15-20% de las parejas y se estima que aproximadamente en el 50% de los casos el defecto es de origen masculino (Agarwal A. et al, 2005). La etiología de la infertilidad masculina es difícil de conocer, diversos factores pueden estar contribuyendo para la presencia de este problema, es por este motivo que los problemas reproductivos son de origen multifactorial.

Es común que se presenten procesos infecciosos en la economía del aparato genitourinario, de acuerdo a la localización de la infección serán las manifestaciones que presentara el paciente. La presencia de gérmenes correspondientes al género de los micoplasmas, se asocian frecuentemente con alteraciones en la motilidad espermática (Liu et al, 2002; Gnarpe et al, 1972), cabe destacar sin embargo, que no se conocen los mecanismos por medio de los cuales estos microorganismos provocan la disminución de la capacidad motil del espermatozoide.

Un gran número de investigadores concuerdan en que la infección en la vía genitourinaria es la principal causa de esterilidad en el mundo, esta patología infecciosa puede afectar al conjunto de conductos espermáticos, así como a los órganos que conforman el tracto genital (Vigil et al, 2002; Mardh et al 2002; Peipert, 2003; González et al, 2004), por la alta frecuencia de estos procesos y por su importante relación con los problemas reproductivos, es importante indagar sobre las alteraciones moleculares que directa o indirectamente son provocados por los procesos infecciosos y/o inflamatorios. Se sabe que el análisis seminal de rutina, es una herramienta importante para el diagnósticos y seguimiento de pacientes con

alteraciones seminales y espermáticas, sin embargo, a pesar de la utilidad de esta prueba de laboratorio, en muchos casos la información que ofrece dificulta discernir la etiología de la esterilidad, mas aún, el análisis seminal rutinario puede esconder alteraciones subcelulares y/o moleculares que podrían ser las causas de la patología reproductiva.

El análisis del semen por su fácil implementación, sigue siendo la prueba clínica de laboratorio más importante con la que se dispone para la evaluación del factor masculino. Los parámetros medidos por el análisis seminal ofrecen gran información en cuanto a las características de motilidad, vitalidad, morfología, número y concentración de los espermatozoides, factores muy importantes para que se pueda llevar con éxito la procreación; sin embargo, en muchas ocasiones no permite discernir las alteraciones sutiles que se presentan en los espermatozoides. Se ha reportado que alrededor del 15 % de los pacientes con problemas de fertilidad presentan seminogramas dentro de los parámetros normales (Guzick et al, 1998), es aquí cuando se pone en tela de juicio la realización de sólo el análisis seminológico rutinario.

Entre las alteraciones que no son detectadas por el estudio del semen de manera rutinaria se encuentran; las alteraciones en el ADN espermático, es posible que pacientes que tienen seminogramas normales sigan siendo estériles, la causa de la infertilidad puede deberse a un ADN del espermatozoide anómalo, factor que no se mide de forma rutinaria en el laboratorio andrológico. Diversas técnicas han surgido para el estudio de las alteraciones en el ADN de la célula espermática, técnicas referidas desde hace algunas décadas como la técnica del Análisis de la Estructura de la Cromatina Espermática (SCSA, por sus siglas en ingles), COMET Assay, TUNES Assay, In Situ Nick Translation Assay, el Test de Naranja de

Acridina, prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD), todas estas técnicas tienen como finalidad, indagar la presencia de alteraciones moleculares que podría presentarse en el ADN espermático y que podrían estar íntimamente relacionadas con la merma en la capacidad fértil del varón.

Aplicar la prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática ha generado información valiosa en la evaluación del hombre infértil y sub-fértil, al evaluar la presencia de rupturas en el ADN espermático de 143 pacientes infértiles y con procesos infecciosos por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.*, se evidenció la correlación que existe entre el proceso infeccioso por estos gérmenes y las rupturas en el ADN del espermatozoide (Gallegos et al, 2007). Sería de gran importancia ampliar el estudio de los pacientes con procesos infecciosos causados por gérmenes inespecíficos, así como complementar el estudio molecular de este grupo.

Otro de los parámetros moleculares con los que con frecuencia se relacionan los procesos infecciosos causados por gérmenes inespecíficos es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). La generación de especies reactivas de oxígeno es un proceso que ocurre normalmente en las células durante la actividad aerobia. Hay un mecanismo homeostático que genera un balance entre la producción de ROS y el sistema antioxidante, en condiciones en las que la generación de ROS supera la capacidad antioxidante se provoca un sin número de alteraciones celulares que al final terminan por disminuir las capacidades celulares.

El estrés oxidativo generado por la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno, ha sido asociado con la función anómala del espermatozoide y con problemas de infertilidad (Wang et al, 2003). La producción excesiva y descontrolada de especies reactivas se ha asociado con alteraciones en los lípidos, proteínas y ADN celular. Al estudiar a 38 pacientes infértiles y valorar la producción

anormal de ROS, Wang y colaboradores concluyeron que este grupo de pacientes infértiles presentó niveles altos de ROS al compararlo con un grupo de 8 donadores sanos.

Las especies reactivas de oxígeno pueden ser generadas por el espermatozoide, pero en gran medida también son producidas por los leucocitos presentes en el semen. En este campo es bien sabido que la respuesta inflamatoria contra agentes infecciosos que invaden el tracto genitourinario podría tener un efecto deletéreo por la producción de ROS por las células inflamatorias y las citocinas proinflamatorias tal como la IL-8, que es quimiotáctica para los leucocitos, los que producen ROS (Quintero et al, 2000).

Las infecciones generadas por *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales no siempre se acompañan con una respuesta inflamatoria evidente, sin embargo Eley y colaboradores mencionan que las infecciones por *Chlamydia trachomatis* son la mayor causa de subfertilidad en el hombre y en la mujer, el mecanismo por el cual ocurre esto puede ser vía la reacción inflamatoria aguda asociada a la infección (Eley et al. 2005) por lo que sería de gran utilidad la evaluación de la producción de ROS en líquido seminal de pacientes que presentan estos procesos infecciosos.

Uno de los daños moleculares que es difícil discernir con el análisis seminal de rutina, es la presencia de procesos apoptóticos en la célula espermática. Se ha relacionado con mucha frecuencia la generación de especies reactivas de oxígeno y el daño en la estructura del ADN espermático, también estas alteraciones son frecuentemente relacionados con procesos de muerte celular por mecanismo de apoptosis.

Si tomamos en cuenta que la generación de ROS esta íntimamente relacionado al proceso inflamatorio, cabria suponer que la infección genitourinaria terminaría por inducir una casada de alteraciones que provocarían el daño en la molécula de ADN espermático y que en ultima instancia provocarían la muerte de la célula espermática.

En las infecciones genitourinarias (IGU) la presencia de más de un microorganismo patógeno de transmisión sexual es muy frecuente, en el caso particular de *Chlamydia trachomatis* y especies de Micoplasmas genitales, es muy frecuente encontrar asociaciones con virus, *Treponema pallidum* y VPH (Zvulunov et al, 2000; Loustarinen et al, 2004). La asociación de gérmenes mas frecuentemente observada es entre *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum* (genero perteneciente a los Micoplasmas genitales).

En la serie de pacientes estudiados en este trabajo, 24 de los 37 individuos (64.8%) presentaron positividad para *C. trachomatis* por la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD) y positividad para Micoplasmas genitales mediante la identificación por cultivo selectivo, estos resultados concuerdan con lo que se ha publicado por diversos grupos de investigadores acerca de la frecuente asociación entre estos gérmenes de transmisión sexual.

También se confirma que *Chlamydia trachomatis* es un patogeno que con alta frecuencia se encuentra asociado a procesos infecciosos en pacientes infértiles o subfértiles (Purvis et al, 1995). En nuestros resultados 35 de los 37 pacientes (94.5%) presentaron positividad para *C. trachomatis*, lo que indica la alta incidencia de este microorganismo en la asociación con los procesos de subfertilidad.

Los micoplasmas genitales son microorganismos que se han aislado constantemente en parejas que presentan problemas de infertilidad o subfertilidad

(Diaz et al, 1999), entre los hallazgos obtenidos pudimos observar la alta frecuencia con la que los Micoplasmas genitales se encontraron en el grupo de pacientes infértiles que fue estudiado, se observó positividad en 26 de los pacientes estudiados lo que corresponde al 70.2% de los casos.

Los procesos infecciosos generalmente traen como consecuencia una respuesta inflamatoria que en grados variables, provocara la presencia de células inmunitarias y moléculas citotóxicas. Diversos mecanismos han sido propuestos para tratar de explicar como las infecciones del tracto genitourinario están relacionadas con los problemas de infertilidad en el varón. Sin embargo muchas de estas aseveraciones no se han logrado confirmar y son causa importante de debate entre los grupos de investigadores (Egger-Kruce et al, 1998; Michelmann, 1998; Wolff, 1998; Hales et al, 1999).

Entre los mecanismos que se han propuesto como causas posibles de daño en los espermatozoides durante las IGU se encuentra, el daño a la membrana de los espermatozoides, causados por diversas condiciones como la generación de ROS (Agarwal y Saleh, 2002).

Además del daño que es generado a las membranas celulares, los radicales libres de oxígeno son un factor muy importante para que se presente daño en la molécula de ADN (Lopes et al, 1998; Twigg et al, 1998; Wang et al, 2003; Sanocka et al, 2004).

Sanocka y colaboradores mencionan que los ROS son causantes potenciales de daño a la estructura molecular de la célula; los lípidos, proteínas y al ADN son el blanco frecuente de estas moléculas altamente reactivas (Sanocka et al. 2004).

En nuestros resultados observamos que el grupo de pacientes infértiles con infección por *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales presentaron un alto grado de espermatozoides con ADN fragmentado.

El grupo de pacientes positivos para *Chlamydia trachomatis* presentó una fragmentación de DNA mayor comparándolo con el grupo control, esto concuerda con lo mencionado por Lopes y colaboradores, 1998; Twigg y colaboradores, 1998; Wang y colaboradores, 2003; Sanocka y colaboradores, 2004, acerca de que los procesos infecciosos traen como consecuencia alteraciones moleculares como la presencia de rupturas en la molécula de ADN.

Del mismo modo el grupo de pacientes que tenían la infección por ambos microorganismo (*Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales) presentó daño en la estructura del ADN con significancia estadística comparándolo con el grupo de individuos fértiles y sin infección, el grado de afectación fue mayor en este grupo. Esta comprobado que el mecanismo la presencia de más de un microorganismo es un factor que induce un mayor grado de alteraciones en la estructura del espermatozoide.

Diversos investigadores han mencionado que el daño a los espermatozoides puede ser causado por el contacto directo de la bacteria con esta célula (Gorga et al, 2001; Satta et al, 2005), por lo tanto se puede presumir que la concentración bacteriana es un indicativo del grado de daño que se presentara en los espermatozoides del individuo con infección, quizá esto explica, porque el grupo de individuos que presentaba proceso infecciosos por los dos microorganismos presentaron una frecuencia mayor de daño celular.

El grupo de pacientes que solo tenía la infección por Micoplasmas genitales no tuvo diferencia estadísticamente significativa comparado con el grupo control,

cabe hacer mención que este grupo estuvo constituido solamente por dos individuos lo que limita en gran medida hacer inferencia sobre los resultados, se podría suponer que para que este resultado fuese mas confiable se requeriría ampliar la muestra estudiada. Sin embargo, también es cierto que el resultado que se presentó de daño molecular sin significancia podría ser debido a condiciones propias de la bacteria ya que es ampliamente conocido que este género bacteriano no es necesariamente una bacteria intracelular, en algunas etapas de su ciclo biológico se podría localizar fuera de la célula, lo que induciría un daño menor a nivel de la estructura celular.

Los radicales libres de oxígeno son moléculas altamente reactivas, son derivados del oxígeno y tienen una alta tendencia a reaccionar con otras moléculas de su entorno a las que modifican oxidándolas primero, para posteriormente provocar la pérdida de su función biológica (Cuquerella et al, 2003).

A pesar de que los ROS pueden ser moléculas altamente nocivas cuando son generados en forma descontrolada, también es cierto que en condiciones normales son moléculas muy importantes para mecanismos que lleva a cabo el espermatozoide como condiciones fisiológicas necesarias para su funcionamiento: la capacitación espermática, la reacción acrosomal, la unión del espermatozoide con la zona pelúcida y la fusión con el ovocito, son condiciones esenciales en las que intervienen las moléculas reactivas de oxígeno como una condición fisiológica normal (Fernández et al, 1995a, 1995b; Agarwal et al, 2003).

Ya se ha mencionado que los ROS son productos generados por el espermatozoide como causa del daño generado a la célula o también, pueden ser generados por las células responsables de la defensa. Las células inmunitarias como parte de su mecanismo de defensa implican la liberación de moléculas altamente nocivas para el medio circundante, las monocinas, las linfocinas y los ROS son

moléculas liberadas por las células inflamatorias que implican alteraciones espermáticas a causa del daño generado a los componentes moleculares (Hill et al, 1998; Kohn et al, 1998), esta podría ser la relación existente con las causas de infertilidad y los radicales libres de oxígeno.

Han surgido diversas técnicas aplicables a la determinación de radicales libres en el líquido seminal (Pérez-y Pérez, 2000), algunas de estas técnicas se basan en la determinación directa de los ROS mediante técnicas de quimioluminiscencia, además de estas existen técnicas de determinación indirecta, que se fundamentan en la medición de productos de reacción que son generados por la acción de los radicales libres sobre algunos componentes celulares (Twigg et al, 1998). Entre las técnicas de determinación indirecta de los radicales libres de oxígeno se encuentra la técnica de TBARS, esta es una prueba que se basa en la medición de MDA formado a partir de los lípidos insaturados, principalmente de las membranas biológicas.

Para nuestro estudio se aplicó la técnica de TBARS para valorar la presencia de MDA en el líquido seminal total.

Esta comprobado que bacterias del género Chlamydia y Micoplasmas están relacionados con la producción de radicales libres de oxígeno, Aitken y colaboradores es un estudio de 1995 concluyeron que el genero Mycoplasma es productor de radical superóxido (Aitken et al, 1995), el radical superóxido es un agente altamente oxidante que actúa contra componentes de la célula que son muy propensos a sufrir modificaciones, tal es el caso de las proteínas y lípidos de membrana.

Sin embargo en los resultados de los distintos grupos estudiados no logramos observar diferencia estadísticamente significativa al comparar con el grupo de individuos sanos. Las desviaciones estándar de todos los grupos fueron muy amplias,

lo que quiere decir variaciones muy grandes en los resultados de todos los pacientes, es ampliamente conocido que esta técnica se basa en la determinación de un producto de reacción de todas las membranas biológicas y en general de todos los lípidos insaturados presentes en el medio, por lo que la presencia de contaminantes celulares sería una influencia en los resultados, probablemente no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pacientes y el grupo control ya que no se controló la presencia de restos celulares, carga bacteriana y presencia de otras células, en el medio en el cual se realizó la determinación, esto podría ser la causa de las grandes variaciones que se observaron en los resultados.

Sería importante realizar la determinación de ROS por esta técnica, posteriormente a la purificación y aislamiento de los espermatozoides del medio del líquido seminal en el que se encuentran, con esto se retirarían las células inflamatorias presentes como respuesta al proceso infeccioso, células de esfacelo y detritus celulares que comúnmente se observan en pacientes con procesos infecciosos causados por *Chlamydia trachomatis* y Micoplasmas genitales, el aislar al espermatozoide de contaminantes traería como consecuencia la determinación específica de MDA en la célula espermática.

La apoptosis ocurre de forma normal en espermatogonias, espermatocitos y espermátides como un mecanismo normal de regulación de la espermatogénesis (Rodríguez et al, 1997; Ricci et al, 2002; Fiedrich et al, 2003; Soumalainen et al, 2004). Sin embargo en los procesos infecciosos ocurre liberación de citocinas que provocan daño a la célula; el daño también puede ser provocado a causa del contacto de la célula espermática con las moléculas que forman parte de la estructura del agente infeccioso, tal es el caso de algunos componentes de la membrana de los microorganismos

Gorga y colaboradores en el 2001 y Satta y colaboradores en el 2005 concluyeron que la composición molecular de la membrana de los géneros bacterianos *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.*, podrían ser inductores directos de la apoptosis espermática, en las membranas celulares de estos gérmenes se encuentran moléculas como las porinas y los lipopolisacáridos que se ha visto son agentes que provocan la entrada en apoptosis de los espermatozoides cuando son expuestos a estas moléculas nocivas (Gorga et al, 2001; Satta et al, 2005).

En nuestros resultados comprobamos que estos géneros bacterianos si aumentan el grado de apoptosis en los pacientes estudiados, ya que en los tres grupos se observó un grado mayor de apoptosis comparado con el grupo control.

Se ha documentado por gran número de investigadores la adherencia de *Chlamydia trachomatis* y géneros de Micoplasmas genitales a la célula espermática (Custo et al, 1989, Agarwal et al, 2003; Gallegos-Ávila, 2003), de acuerdo a nuestros resultados, en los que observamos un número alto de pacientes con el proceso infeccioso por ambos microorganismos, esta podría ser una de las explicaciones del daño producido por estas bacterias en el grupo de pacientes estudiados.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Primera.- En el grupo de pacientes estudiados, los niveles altos de rupturas en el ADN se asociaron a la presencia de *Chlamydia trachomatis* y micoplasmas genitales que en combinación tuvieron un mayor efecto inductor de Daño en la estructura del ADN.

Segunda.- El grado de lipoperoxidación evaluado por la técnica de TBARS en liquido seminal total, no puede ser utilizado como un indicador específico de daño espermático asociable al proceso infeccioso causado por *Chlamydia trachomatis* y/o por micoplasmas genitales.

Tercera.- Existe una asociación entre los niveles altos de apoptosis espermática con la infección seminal por *Chlamydia trachomatis* y micoplasmas genitales.

Cuarta.- La infección seminal por Micoplasmas genitales y *Chlamydia trachomatis* si implican cambios moleculares entre los que se encuentran el incremento en la fragmentación del ADN espermático y un mayor grado de apoptosis

CAPITULO 6

PERSPECTIVAS

Primera.- Estudios citogenéticos podrán determinar si existen alteraciones cromosómicas y si fueran o no características de daño inducido por *Chlamydia trachomatis* y micoplasmas genitales.

Segunda.- El grado de Lipoperoxidación evaluado en líquido seminal total, deberá ser analizado considerando la presencia de otras fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno, tales como células inflamatorias, restos celulares y la cantidad de bacterias presentes.

Tercera.- Constituir un grupo de pruebas que detecten daño molecular de impacto deletéreo será de valor pronóstico y permitiría determinar el tipo y duración del tratamiento de éstos procesos.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

Agarwal A., Allamaneni S.R. Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad. *Rev Int Androl.* 2005; 3(1): 31-37

Agarwal A., Said T. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 2004; 95: 503-507

Aitken R. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 659-668

Alfaro-Moreno E., García-Cuellar C., Dueñas-González A. Metodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Cancerología* 2000; 46: 275-280

Alvarez-Cuevas S. Descripción de los parámetros seminales y su correlación con los niveles de fructosa y citrato seminal en pacientes con infertilidad e infección genitourinaria. *Tesis maestría* 2006

Alvarez, JG. Subpoblaciones espermáticas. *2o Congreso de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción* 2003

Armstrong D., Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free Radicals in Diagnostic Medicine* 1994; 366: 43-58

Baseviciene I, Labanauskas L, Vysniauskaite N. Early diagnosis of genital Chlamydia trachomatis infection among adolescent girls. *Medicina (Kaunas)* 2003; 39: 138-143.

Biase, Joseph N., Nagler, Harris M. The Varicocele: current concepts and controversies. *Current Opinion in Urology* 1992; 2: 463-466.

Blanc-L B., Bringuier A., Guillot R., Feldmann G. Morphological and Biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cellul Mol Biol* 2000; 46: 187-197

CDC. Center for Disease Control. www.cdc.gov 2000

Cuquerella M., Peinado I., Ruiz I., Mohand W., Mayoral S., Romeu A. Influencia de los factores ambientales en la generación de especies reactivas de oxígeno. Papel en la infertilidad humana. *Revista Iberoamericana de Infertilidad* 2003; 20(6): 369-376

Custo GM., Lauro V., Saitto C., Frongillo RF. Chlamydial infection and male infertility: an epidemiological study. *Arch Androl* 1989; 23: 243-248

Eggert W., Rohr G., Probst S., Rusu R., Hund M., Demiracka T., Aufenanger J., Runnebaum., Petzoldt D. Antisperm antibodies and microorganism in genital secretions a clinically significant relationship? *Andrologia* 1998; 30: 61-71

Eley A., Hosseinzadeh S., Hakimi H., Pacey A.A. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Hum Reprod* 2005; 20: 2601-2607

Erenpreiss J., Bungum M., Spano M., Orbidans J., Giwercman A. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men for infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod.* 2006; 21: 2061-2064

Erbengi T. Ultraestructural observations on the entry of *Chlamydia trachomatis* into human spermatozoa. *Hum Rep* 1993; 8: 416-421

Evan G., Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1322

Fridovich I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. *Free Radic Biol Med* 1976; 1: 239-247

Friedrich A., Schulze W., Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 107-122

Gallegos-Avila MG. Infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma* spp. Su relación con la infertilidad conyugal. *Colegio Mexicano de Urología* 2003; 18 (3): 106-112

Gallegos G., Ramos B., Santiso R., Goyanes V., Gosálvez J., Fernandez JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Micoplasma* spp. *Fertil Steril* In Press

Greendale GA., Haas ST., Holbrook K., Walsh B., Schachter J., Phillips RS. The relationship of *Chlamydia trachomatis* infection and male infertility. *Am J Public Health* 1993; 83: 996-1011

Gnarpe H, Friberg J. Mycoplasma and human reproductive failure I: The occurrence of different Mycoplasma in couples with reproductive failure. *Am J Gynecol Obstet* 1972; 114: 127.

Gorga F., Galdiero M., Buommino E., Galdiero E. Porins and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa *Clin Diagnos Lab Immunol* 2001; 8(1); 206-208

Guzick D., Sullivan M., Adamson G., Cedars M., Falk R., Peterson E. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 1998; 70: 207-213

Hales D., Diemer T., Hales K. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine* 1999; 10: 201-217

Hauser, R., Williams, P., Altshul, L., Calafat AM. Evidence of Interaction between Polychlorinated Biphenyls and Phthalates in Relation to Human Sperm Motility *Environmental Health Perspectives* 2005, 113 (4): 138-134

Henkel R., Schill W. Sperm separation in patients with urogenital infection. *Andrologia* 1998;30:91-97

Hill J., Cohen J., Anderson D. The effects of lymphokine and monokines on sperm fertilizing ability in the zone-free hamster egg penetration test. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160: 1154-1159

Hosseinzadeh S., Brewis IA., Eley A., Pacey AA. Co-incubation of human spermatozoa with Chlamydia trachomatis serovar E causes premature sperm death. *Hum Reprod* 2001; 16: 293-299

Hosseinzadeh S., Pacey AA., Eley A. Chlamydia trachomatis induced death of human spermatozoa is caused primarily by lipopolysaccharide. *J Med Microbiol* 2003; 52: 193-200

Hellstrom WJG, Neal DE Jr. Diagnosis and therapy of male genital tract infections. *Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America* 1992; 3: 399-427.

Irvine DS., Twigg JP., Gordon EL., Fulton N., Milne PA., Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000; 21: 33-44.

Kabir J., Lobo M., Zachary I. Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem J* 2002; 367: 145-155

Kjaergaard N, Kristensen B, Hansen ES, Farholt S, Schonheyder HC, Ulbjerg N, Madsen H. Microbiology of semen specimens from males attending a fertility clinic. *APMIS* 1997; 105: 566-570.

Kundsinn RB. Mycoplasmas in genitourinary tract infection and reproductive failure. In: Progress in Gynecology. *Sturgis, S. H., Taymor, M. L. (Eds.) New York, Grune&Stratton* 1970; 275.

Loustarinen T., Lehtinen M., Bjorge T., Abeler V., Hakama M., Hallman G., Jellum E., Koskela P., Lenner P., Lie A., Paavonen J., Pukkala E., Saikku P., Sigstad E., Thoresen S., Youngman L., Dillner J., Hakulinen. Joint effects of different human papillomaviruses and *Chlamydia trachomatis* infections on risk of squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1058-1065

Lefevre G. Evaluation of lipids peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Annals de biologie clinique.* 1998; 56(3): 305-319

Liu J., Li H., Cao Z., Duan Y., Li Y., Ye Z. Influence of several uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters *in vitro*. *Asian J Androl* 2002; 4: 179-182.

Lopes S., Sun JG, Jurisicova A., Meriano J., Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998b; 69: 528-532.

McPherson SMG., Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993; 37: 109-128.

McPherson SMG., Longo FJ. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod.* 1992; 31: 268-279.

McPherson SMG., Longo FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Devel Biol* 1993; 158: 122-130.

Michelmann H. Influence of bacteria and leukocytes on the outcome of *in vitro* fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Andrologia* 1998; 30: 99-101

Moller BR, Mardh PA. Pathogenic role of Chlamydia in urogenital infections. *Nord Med* 1980; 95: 128-132.

Nunez-Troconis JT. Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in different gynecologic diseases. *Invest Clin* 1999; 40: 9-24.

Ollero M., Gil-Guzman E., Lopez MC., Sharma RK., Agarwal A., Larson K., Evenson D., Thomas AJ Jr., Alvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod.* 2001; 16: 1912-21.

-
- Ostaszewska I, Zdrodowska-Stefanow B, Badyda J, Pucilo K, Trybula J, Bulhak.** Chlamydia trachomatis: probable cause of prostatitis. *Int J STD & AIDS* 1998; 9: 350-353.
- Paavonen J, Eggert-Kruse W.** Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Hum Rep Update* 1999; 5: 433-47.
- Paavonen J, Wolner-Hanssen P.** Chlamydia trachomatis: a major treat to reproduction. *Hum Reprod* 1989; 111-124.
- Perez P., Perez JL.** Métodos para medir el daño oxidativo *Rev Cubana Med Milit* 2000; 29(3)192-198
- Purvis K., Christiansen E.** The impact of infection on sperm quality. *J Br Fertil Soc* 1995; 1: 31-45
- Quintero W., MaellenL., Machado A., Llopiz N., Cespedes E., Monzon G., Yepes S.** Efecto del estrés oxidativo sobre la calidad del semen de pacientes infértiles con leucocitospermia *Rev Cubana Invest Biomed* 2000; 19(3); 183.185
- Rehewy M.S., Thomas A.J., Hafez E.S., Brown W.J., Moghissi K.S., Jaszczak S.** *Ureaplasma urealyticum* (T-mycoplasma) in seminal plasma and spermatozoa from infertile and fertile volunteers. *Eurp J Obstet Gynec Reprod Biol* 1978; 8: 247-251.
- Ricci G., Perticarari S., Fragonas E., Giolo E., Canova S., Pozzobon C., Guaschino S., Presani G.** Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leucocytes. *Hum Reprod* 2002; 17(10); 2665-2672
- Rodriguez I., Ody Ch., Araki K., Garcia I., Vassalli P.** An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 1997; 16(9): 2262-2270
- Sailer BL., Sarkar LJ., Bjordahl JA., Jost LK., Evenson DP.** Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997; 18: 294-301.
- Sakkas D., Mariethoz E., St John JC.** Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas- mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 251: 350-355
- Sanocka D., Kurpisz M.** Reactive oxygen species and sperm cell. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 12-18
- Satta A., Stivala A., Garozzo A., Morello A., Perdichizzi A., Vicario E., Salmeri M., Calogero A.** Experimental *Chlamydia trachomatis* infection causes apoptosis in human sperm. *Hum Reprod* 2005;

Sikka S. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001; 8: 851-862

Sociedad Española de Fertilidad. Utilidad del estudio de la estructura de la cromatina espermática en el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad. *Boletín* 3; Año 10: Vol. 3
Strange R., Feng L., Saurer S., Burkhardt A., Friis R. Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development* 1992; 115: 49-58
Suomalainen L., Dunkel L., Ketola I., Eriksson M., Erikkilä K., Oksjoki., Taari K., Heikinheimo M., Pentikäinen V. Activator protein-1 in human male germ cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(10): 743-753

Torres E., Ascurra M., Rodríguez S. Prevalence of chromosomal anomalies in couples with adverse reproductive outcomes. *IICS Memories*. 2002; 1 (1)

Twigg J., Fulton N., Gomez E., D.Stewart I., Aitken R., Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998; 13(6) 1429-1436

Villegas J., Schulz M., Soto L., Sanchez R. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis* 2005; 10(1); 105-110

Van der Ven K., Peschka B., Montagl M., Lange R., Schwanitz G., Van der Ven H. Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13(1): 48-54

Wang, X., Sharma, RK., Sikka, SC., Thomas, AJ., Falcone, T., Agarwal, A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 80(3): 531-535

Weidner W., Krause W., Ludwig M. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Rep Update* 1999; 5(5):421-432

Westrom LV. *Chlamydia trachomatis*-clinical significance and strategies of intervention. *Andrologia* 1998; 30(1): 35-39

Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen *Fertil Steril* 1995; 63: 1143-1157

Wolner-Hanssen P., Mardh PA. In vitro test of the adherence of *Chlamydia trachomatis* to human spermatozoa. *Fertil Steril* 1984; 42: 102-107

Van Engeland M., Ramaekers FCS., Schutte B., Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996; 24: 131-139

Yagi K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free Radicals and Antioxidant Protocols*. 1998; 108: 101-106

Zvulunov A., Medvedovsky E., Biton A., Horowitz S., Vardy D. Association of *Ureaplasma urealyticum* colonization in male urethra and *Candyloma acuminatum*. *Isr Med Assoc J* 2000; 2: 580-582