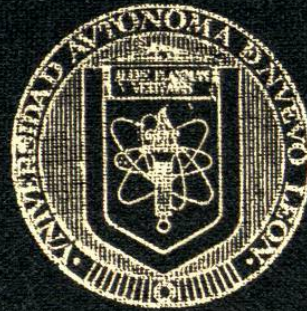


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA SEMINAL Y  
DE LOS PARAMETROS SEMINOLOGICOS, EN  
PACIENTES INFERTILES CON PCR POSITIVO  
PARA *UREAPLASMA UREALYTICUM*

POR  
OCTAVIO GUADALUPE DIAZ GUTIERREZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADÓ DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

MAYO, 1999

TM

RC8889

D5

1999

c.1



1080052375

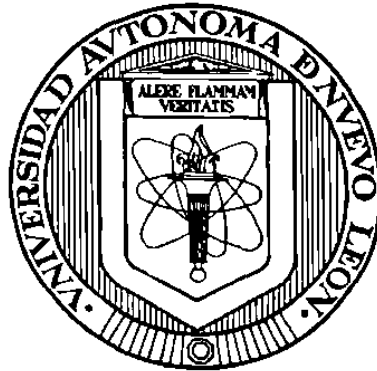
 **BMJ RAUL RANGEL FRIAS  
U.A.N.L.**

**2 0 MAYO 1999**

**RECIBIDO**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA SEMINAL Y DE LOS  
PARAMETROS SEMINOLOGICOS, EN PACIENTES INFERTILES CON  
PCR POSITIVO PARA *Ureaplasma urealyticum***

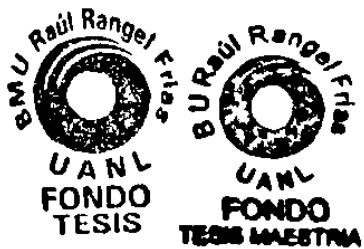
**Por**

**OCTAVIO GUADALUPE DIAZ GUTIERREZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Morfología**

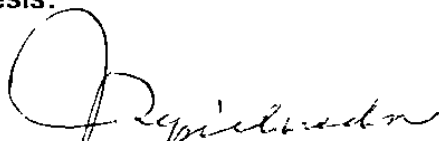
**Mayo, 1999**

TM  
RC889  
D5  
1999



ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA SEMINAL Y DE LOS PARAMETROS SEMINOLOGICOS EN PACIENTES INFERTILES CON PCR POSITIVOS A *Ureaplasma urealyticum*

Aprobación de la Tesis:




---

**DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA**  
Presidente



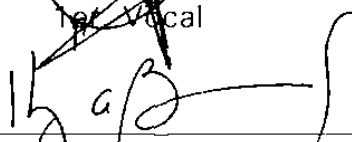
---

**DR. FRANCISCO BOSQUES PADILLA**  
Secretario



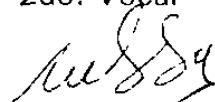
---

**DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA**  
1er. Vocal



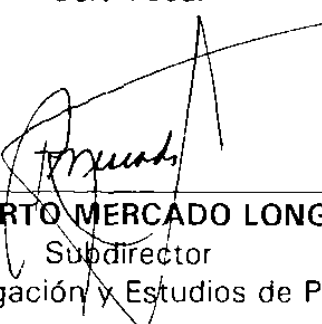
---

**DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA**  
2do. Vocal



---

**DRA. MA. GUADALUPE GALLEGOS DE LERMA**  
3er. Vocal



---

**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

**El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Andrología de la Sección de Biología Celular del Departamento de Patología, y en el Laboratorio de Medicina Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Asesoría de la M. C. Guadalupe Gallegos de Lerma y la Coasesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y del Dr. Francisco Bosques Padilla.**



## **DEDICATORIA**

A mi esposa Roous Laura González Delgado que siempre con amor, cariño y comprensión me apoyó en todo momento.

A mi pequeña y amada hija Andrea Carolina, que es el regalo más grande que Dios me ha dado.

A mis padres Cristina Gutiérrez Narvárez y Armando Díaz Salazar, que aunque lejos me han dado parte de su vida, su ejemplo y cariño.

A mis hermanos María Elena, Armando y Arturo que con su amor y amistad me animan cada día a ser mejor. A mi sobrinita Amayrani que aunque no la conozco la amo.

A la Dra. Guadalupe Gallegos Avila. Gracias por su amistad, paciencia y buena voluntad para conmigo.

A todos mis grandes amigos y amigas "Los hijos de Mine" con quien he pasado tan grantos momentos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Guadalupe Gallegos Avila, asesor de mi Tesis por su ejemplo, guía, enseñanza y sobre todo por su invaluable amistad que me alentó y ayudó en todo momento para la realización y culminación de esta Tesis.

Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña y al Dr. Francisco Bosques Padilla por sus muy valiosos consejos y asesoría en el desarrollo de mi trabajo de Investigación.

A la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética (ULIEG), al Laboratorio de Microscopía Electrónica y al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A todos mis compañeros del Departamento de Patología (profesores, instructores, estudiantes, secretarías, técnicas de laboratorio, personal de intendencia, etc.) por sus enseñanzas y su ayuda.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de éste trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION .....	1
1.1 Infección Genitourinaria e Infertilidad .....	1
1.2 Infecciones Micoplásmicas en el Tracto Urogenital .....	2
1.3 Características del género <i>Mycoplasma</i> .....	4
1.4 Métodos de Identificación de <i>Ureaplasma</i> <i>urealyticum</i> .....	5
1.5 Planteamiento del Problema. ....	6
2. HIPOTESIS .....	8
3. OBJETIVO GENERAL .....	9
4. MATERIAL Y METODOS .....	10
4.1 Diseño Experimental .....	10
4.2 Métodos de Estudio .....	11
4.2.1 Elaboración de Registro de Pacientes e Historia Clínica de Reproducción .....	11
4.2.2 Análisis Seminal. ....	12
4.2.2.1 Examen Macroscópico Inicial .....	12
4.2.2.2 Examen Microscópico .....	13
4.2.3 Cultivo Microbiológico. ....	16
4.2.3.1 Procedimiento del Cultivo. ....	16
4.2.4 Estudio Ultraestructural. ....	18
4.2.5 Detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i> por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. ....	19
4.2.5.1 Extracción de DNA. ....	19
4.2.5.2 Espectrofotometría. ....	21
4.2.5.3 Electroforesis en Gel de Agarosa .....	21
4.2.5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	22
4.3 Métodos Estadísticos .....	24
5. RESULTADOS .....	26
5.1 Características de los Pacientes Estudiados .....	26



## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Identificación del Cambio de Color en el Medio de Cultivo Urea-arginina . . . . .	17
II.	Oligonucleótidos iniciadores utilizados en la amplificación de la región A del Gen Ureasa . . . . .	23
III.	Características de los Pacientes Estudiados. . . . .	35
IV.	Parámetros Seminales. . . . .	36
V.	Alteraciones en la Ultraestructura Espermática. . . . .	37
VI.	Hallazgos Adicionales en la Citomorfología Seminal. . . . .	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i> por PCR en Semen de Pacientes Infértiles. ....	27
2. Parámetros Seminales con Diferencia Estadística entre los Grupos de Pacientes con Diagnóstico Positivo y Negativo de <i>U. urealyticum</i> .....	29
3. Diferencia entre los Hallazgos de la Citomorfología Seminal En Pacientes con Diagnóstico de <i>U. urealyticum</i> Positivo y Negativo. ....	30
4. Micrografía Electrónica de Transmisión de Semen de Pacientes Infértiles <i>U. urealyticum</i> positivo .....	32
5. Micrografía Electrónica de Transmisión de Semen de Pacientes Infectados con <i>Ureaplasma urealyticum</i> .....	33
6. Micrografía Electrónica de Transmisión de Semen de Pacientes Infectados con <i>U. urealyticum</i> . ....	34

## NOMENCLATURA

cols	Colaboradores
DNA	Acido desoxirribonucleico
DO <sub>260</sub>	Densidad óptica a 260 nm.
DO <sub>280</sub>	Densidad óptica a 280 nm.
EA 65	Colorante: Verde brillante (0.45 gr/l), pardo de Bismark (0.27 gr/l), Eosina Y (2.14 gr/l)
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
HCl	Acido clorhídrico
IGU	Infecciones genitourinarias
mg	miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm <sup>2</sup>	Milímetros al cuadrado
mM	Milimolar
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto

<b>seg</b>	<b>Segundos</b>
<b>SD</b>	<b>Desviación estandar</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil sulfato sódico</b>
<b>TE</b>	<b>Buffer Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8</b>
<b>V</b>	<b>Volts</b>
<b>X</b>	<b>Veces o aumentos</b>



## RESUMEN

Octavio Guadalupe Díaz Gutiérrez

Fecha de Graduación: Mayo de 1999

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

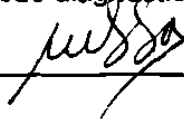
**Título del Estudio:** ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA SEMINAL Y DE LOS PARAMETROS SEMINOLÓGICOS EN PACIENTES INFERTILES CON PCR POSITIVO PARA *Ureaplasma urealyticum*

**Area de Estudio:** Andrología

**Propósito y Método del Estudio:** Las infecciones genitourinarias (IGU) y sobre todo las inespecíficas, no se han considerado como una fuente potencial de infertilidad ya que generalmente pasan desapercibidas por ser asintomáticas y los métodos de diagnóstico habituales son insuficientes o poco accesibles. Sin embargo existen evidencias que involucran a las IGU con la infertilidad, además de que en el 20% de los casos de pacientes infértiles se identifica algún tipo de IGU. Actualmente existe poca evidencia de la adherencia de *U. urealyticum* en la superficie del espermatozoide y de sus efectos sobre los parámetros seminológicos. El objetivo del presente trabajo fue describir las alteraciones seminales y ultraestructurales del eyaculado de pacientes infértiles con infección de *Ureaplasma urealyticum* demostrada por PCR. Para ello se desarrolló un estudio transversal, descriptivo y prospectivo, con pacientes con infertilidad conyugal de causa no conocida. Se eligieron pacientes con sospecha de infección genitourinaria y se excluyeron los que presentarían oligozoospermia, azoospermia y volumen testicular bajo. Se conformaron 2 grupos de estudio, uno con PCR positivo a *U. urealyticum* y el otro con PCR negativo. Se realizaron análisis seminológicos y estudios de microscopía electrónica para evaluar los parámetros seminológicos y la ultraestructura seminal y así determinar la participación o no del germen como factor de infertilidad.

**Contribuciones y Conclusiones:** En este estudio se estudiaron 50 pacientes. Catorce de ellos resultaron con PCR positivos a *U. urealyticum* y 36 fueron negativos, con estos datos se constituyeron los 2 grupos de estudio. El volumen, la motilidad y la morfología espermática fueron los parámetros seminológicos que resultaron más alterados en los pacientes con PCR positivo. El análisis ultraestructural reveló que la infección por *U. urealyticum* se acompaña de alteraciones nucleares y autólisis espermática. Además fue evidente la presencia de células micoplásmicas adheridas a espermatozoides en el 43% de los pacientes infectados. La presencia de células fagocíticas y fagocitosis espermática acompañó estas observaciones. La infección por *U. urealyticum* del tracto genitourinario contribuye de manera importante a la alteración de los parámetros seminológicos. La infección por éste germen puede pasar desapercibida si no se emplea un método diagnóstico altamente específico y sensible.

FIRMA DEL ASESOR



# **CAPITULO 1**

## **INTRODUCCION**

### **1.1 Infección Genitourinaria e Infertilidad.**

La infertilidad es un problema importante que se presenta frecuentemente en parejas que intentan tanto el embarazo por primera vez, como después de haber concebido anteriormente. Según las estadísticas más recientes, la infertilidad se manifiesta en aproximadamente un 15% de las parejas que intentan su primer embarazo; en un 60% la causa identificada se relaciona con alguna alteración del factor femenino y en el 40% restante, la causa radica en el factor masculino<sup>1</sup>. La infertilidad es la mayoría de las veces, un problema multifactorial en el cual coinciden una serie de padecimientos que traen como consecuencia la infertilidad en la pareja.

Las infecciones genitourinarias (IGU) y sobre todo las inespecíficas, no se han considerado como una fuente potencial de infertilidad, ya que generalmente pasan desapercibidas por ser asintomáticas y porque los métodos de diagnóstico habituales son insuficientes o poco accesibles. Sin embargo, existen investigaciones que consideran a las IGU como causantes de infertilidad. En el 20% de los casos de pacientes infértiles se identifica algún

tipo de IGU<sup>1</sup>. De acuerdo a algunos estudios, la bacteriospermia altera la calidad del eyaculado por disminución de la motilidad y del recuento espermático, incrementa la teratozoospermia, disminuye la penetración espermática en el moco cervical y está relacionada con la obstrucción inflamatoria de los conductos seminales en el hombre<sup>2,3</sup>. En contraste, otros estudios indican que no hay una diferencia estadística entre la calidad del semen y la presencia o no de bacteriospermia<sup>4</sup>. En 1984, Fowler propuso que las bacterias en semen pueden ser un contaminante secundario del protocolo de colección de la muestra<sup>5</sup>.

En las últimas décadas, se ha registrado un incremento en las infecciones del tracto genital femenino por *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum* (Mycoplasma-T), gérmenes responsables de casi el 60% de las uretritis no gonocócicas<sup>6</sup>. De ahí que se estén realizando una gran cantidad de estudios encaminados a responder si estos gérmenes son o no, parte de las causas etiológicas de infertilidad tanto de origen femenino como masculino.

## 1.2 Infecciones Micoplásmicas en el Tracto Urogenital.

Desde que fue reportada la presencia de micoplasmas en el tracto genital humano en 1937 por Dienes y Edsall<sup>7</sup>, se generó un gran interés en torno a estos microorganismos. Aunque han sido aislados en semen de hombres fértiles y aparentemente sanos, también se les ha implicado en uretritis no gonocócicas, infecciones puerperales, abortos sépticos, bajo peso al nacimiento y prostatitis<sup>29</sup>. Durante la década pasada, también se han asociado a partos prematuros e infertilidad conyugal, pero su papel en estas enfermedades es todavía incierto<sup>8</sup>. La infertilidad asociada a *Ureaplasma*

*urealyticum* fue reportada por primera vez por Kundsín en 1970, quien encontró *Ureaplasma urealyticum* en el tracto genital de una pareja infértil. El tratamiento con tetraciclina permitió erradicar la infección seguida por la concepción y embarazo<sup>9</sup>.

Gnarpe y Friberg (1972), encontraron que el 85% de los cultivos de semen de hombres infértiles fueron positivos para *U. urealyticum*, en comparación con un 23% de positividad en hombres fértiles<sup>10, 11</sup>. Estos mismos autores en 1973, en un estudio realizado en parejas infértiles con infección comprobada y tratadas con doxicilina, notaron que un 29% de mujeres concibieron después de varios meses de erradicar los ureaplasmas<sup>12</sup>. Fowlkes y cols. en un estudio de 625 hombres infértiles, correlacionaron la presencia de *U. urealyticum* con alteraciones en los parámetros seminales, específicamente motilidad y cuenta espermática. Encontraron en el 40% de los pacientes, un aumento en el volumen del eyaculado, baja cuenta espermática, incremento en el número de núcleos de espermatozoides con forma alargada y presencia espermátides. En cuanto a la motilidad se observó también una disminución, ya que 18% de los pacientes con cultivo positivo mostraron motilidad menor al 40%, que sólo estuvo presente en 10% de los pacientes con cultivo negativo<sup>13</sup>. Busolo y cols. en 1984, demostraron la presencia de micoplasmas adheridos a espermatozoides en pacientes infértiles de etiología desconocida, por medio de microscopía de luz, y microscopía electrónica de transmisión y de barrido<sup>14</sup>. Audring y cols. (1988), aplicaron la microscopía electrónica al estudio de biopsias de tejido testicular de ratas expuestas a *U. urealyticum* serotipo 3, y reportaron la inducción de degeneración del epitelio germinal, hipoplasia de las células de Leydig y formación de células gigantes<sup>15</sup>.

A la par de las investigaciones mencionadas anteriormente, existe una serie de estudios que rechazan la asociación de *U. urealyticum* con infertilidad masculina, De Louvois y Cols., en un estudio realizado en 1974, reportaron que

no hay diferencia estadística en la frecuencia de cultivos de semen positivos a *U. urealyticum* entre hombres fértiles e infértiles<sup>16</sup>. Estos resultados fueron secundados por Mathews y cols. en 1975<sup>17</sup>. Gump y cols. en 1984, en un estudio con parejas infértiles e infección micoplásmica comprobada, no encontraron relación entre micoplasmas e inflamación cervical, número y motilidad espermática, pruebas postcoitales y piospermia<sup>18</sup>. Jong y cols. (1990) realizaron una investigación en 569 hombres con infertilidad de etiología desconocida y en más de 75 donadores de semen, ellos encontraron infección por *U. urealyticum* en semen de 40 hombres infértiles(7%) y en 4 donadores fértiles(5.3%). No se encontró diferencias significativas entre los dos grupos, concluyendo que *U. urealyticum* se encuentra de manera frecuente tanto en hombres fértiles como en hombres infértiles<sup>19</sup>. Talkington, y cols. (1991), investigaron los efectos de la incubación de 3 serotipos de *U. urealyticum* en la motilidad y penetración *in vitro* de los espermatozoides. Usando un microscopio con vídeo, estos autores no encontraron evidencias de que la infección con *U. urealyticum* produjera daño en la motilidad espermática o en la penetración en gel en su sistema experimental<sup>20</sup>.

Actualmente existe poca evidencia de la adherencia de *Ureaplasma urealyticum* en la superficie del espermatozoide humano<sup>21</sup>, por lo que es importante demostrarla en pacientes infértiles de causa no conocida y con evidencias de algún tipo de infección.

### 1.3 Características del género Mycoplasma.

Existen aproximadamente 60 especies de Mycoplasma en la clase Mollicutes. Son los organismos más pequeños que pueden vivir libres en la naturaleza y así mismo crecer en medios de laboratorio. Tienen un tamaño de

125 a 250 nm., son microorganismos pleomórficos porque carecen de pared celular rígida, y más bien están limitados por una unidad de membrana. Pueden reproducirse en medios libres de células y dependen de la disponibilidad de esteroides para su crecimiento; los mycoplasmas no vuelven a formas bacterianas originales, ni se originan de ellas<sup>36</sup>.

Se ha descrito que la mayoría de los mycoplasmas son esféricos, aunque pueden presentar diversas formas como filamentos o aspecto estrellado, pero resulta difícil estudiarlos por medio de los métodos bacteriológicos ordinarios a causa del tamaño pequeño de sus colonias, la plasticidad y la delicadeza de sus células individuales.

Los mycoplasmas que pueden encontrarse en vías genitourinarias como son *M. hominis* y *U. urealyticum*, pueden distinguirse por sus diferencias en la morfología colonial, sus características metabólicas y la susceptibilidad a antibióticos<sup>23</sup>. De los dos microorganismos, *Ureaplasma urealyticum* es el germen considerado como factor de riesgo en la fertilidad tanto masculina como femenina.

#### 1.4 Métodos de Identificación de *Ureaplasma urealyticum*.

La forma más común de aislamiento e identificación de *Ureaplasma urealyticum* es el cultivo específico, que consiste en la inoculación de una pequeña cantidad de semen en medio de crecimiento líquido y sólido, los cuales contienen un indicador de pH<sup>24, 30</sup>. Con los medios de cultivo utilizados en el laboratorio se presentan problemas al intentar valorar los resultados, entre ellos encontramos falta de reproducibilidad, falsos negativos, y cambios inespecíficos con el indicador de pH; de ahí la importancia de implementar un

método de diagnóstico específico y preciso que permita la identificación del microorganismo eficaz y de manera reproducible.

En la última década, el auge alcanzado por las técnicas de Biología Molecular ha implicado su utilización en áreas de difícil diagnóstico, entre ellas la microbiológica. Las técnicas de PCR se vienen aplicando desde hace algunos años al diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*, y gérmenes similares. Recientemente Teng y cols. (1994) reportaron la aplicación de la prueba de PCR a la detección de *Ureaplasma urealyticum* en pacientes con infecciones urogenitales, para su comparación con técnicas de cultivo específico<sup>26</sup>. De 50 especímenes estudiados la detección del microorganismo se verificó mediante cultivo en 5 casos confirmados también por PCR y se reportaron 4 casos de cultivo con resultado dudoso. La técnica de PCR pudo confirmar éstos 4 casos y detectó otros 3 más que no habían sido sospechados por cultivo. Estos autores proponen la utilización de la prueba de PCR como instrumento de detección de *U. urealyticum*, por ser altamente sensible y específica, argumentando además que el tiempo requerido para su realización es mucho menor que el de los cultivos específicos. La técnica de PCR se ha utilizado como medio de diagnóstico en la detección de *U. urealyticum* en líquido amniótico y tracto respiratorio, obteniéndose más resultados positivos que las pruebas de cultivo realizadas en los mismos especímenes<sup>27</sup>.

### 1.5 Planteamiento del Problema.

De acuerdo a los antecedentes ya referidos, podemos concluir que:

- a).- Existe una necesidad de definir la participación etiológica de *U. urealyticum* en la infertilidad masculina y su repercusión sobre la calidad del semen.

- b).- No se conoce un patrón de alteraciones seminológicas y citomorfológicas que se correlacionen con la presencia de la infección genitourinaria.
- c).- En el laboratorio hay una dificultad en la detección precisa de *U. urealyticum* en infecciones genitourinarias.
- d).- Los métodos de cultivo presentan insuficiente sensibilidad y especificidad para identificar adecuadamente el germen, además hay dificultad diagnóstica de los métodos microscópicos por la dimensión del germen y su pleomorfismo.

Tomando en cuenta lo establecido anteriormente, se formuló la siguiente hipótesis.



## **CAPITULO 2**

### **HIPOTESIS**

La infección de vías genitourinarias de hombres infértiles ocasionada por *Ureaplasma urealyticum*, se asocia a alteraciones de los parámetros seminológicos y de la citomorfología del eyaculado, identificables a microscopía de luz y microscopía electrónica.

Para la verificación de la Hipótesis se planteó el siguiente Objetivo general.

## **CAPITULO 3**

### **OBJETIVO GENERAL**

**Describir las alteraciones seminales y de la citomorfología del eyaculado en los casos donde se demuestre la presencia de *U. urealyticum*, mediante la técnica de PCR y/o cultivo específico.**

## **CAPITULO 4**

### **MATERIAL Y METODOS**

Para poner a prueba nuestra Hipótesis y cumplir nuestro objetivo se desarrolló la siguiente estrategia experimental.

#### **4.1 Diseño Experimental.**

Considerando como universo de estudio a los pacientes que acudieron al Laboratorio de Andrología del Departamento de Patología de esta Institución, se llevo a cabo un estudio descriptivo, transversal y prospectivo, seleccionando los pacientes con infertilidad conyugal ya fuera primaria ó secundaria y de causa no conocida. Otro criterio de inclusión fue la sospecha clínica de infección genitourinaria, siendo ésta por antecedentes ó sintomatología, independientemente de tratamiento previo. Fueron excluidos de nuestro estudio los pacientes con azoospermia, oligozoospermia severa y volumen testicular bajo que implicarían alteraciones seminales por falla testicular. También se descartaron los pacientes con alteraciones hormonales representativas de infertilidad de origen pretesticular.

El grupo de estudio quedó así constituido por pacientes con infertilidad primaria ó secundaria de origen posttesticular y causa específica no conocida independientemente de tratamientos previamente recibidos.

De acuerdo al diagnóstico de la presencia de *Ureaplasma urealyticum* en el material seminal de los pacientes en estudio se conformaron:

- a) El grupo problema correspondiente a pacientes en los que se demostró la presencia de *Ureaplasma urealyticum*.
- b) El grupo control constituido por pacientes en los que no se demostró la presencia de *Ureaplasma urealyticum* por ninguno de los métodos aplicados.

#### 4.2 Métodos de Estudio.

En cada uno de los pacientes seleccionados para éste estudio se procedió a lo siguiente.

4.2.1 Elaboración de registro de pacientes e historia clínica de reproducción.

Conforme se fueron presentando los pacientes se creó un registro confidencial de cada uno de ellos con la fecha, nombre, edad, ocupación, domicilio, institución de referencia, y nombre, edad y diagnóstico ginecológico de la pareja sexual. Mediante anamnesis clínica se investigaron los antecedentes clínicos y factores de riesgo reproductor consignándolos en el formato especial (ver anexo).

Una vez que se confirmó el cumplimiento de los criterios de inclusión se

informó al paciente sobre los objetivos y alcance del proyecto solicitando autorización para el estudio de su(s) muestra(s) seminal(es) bajo este protocolo de investigación.

#### 4.2.2 Análisis seminal.

Tanto para la selección de los casos como para su evaluación en éste protocolo, se practicó a todos los pacientes un estudio seminológico siguiendo las recomendaciones básicas de la OMS<sup>28</sup>: abstinencia sexual de 3 a 7 días, obtención de las muestras por masturbación y su traslado rápido al laboratorio en un lapso menor de una hora.

Después de la licuefacción total del eyaculado se inició el estudio, cuidando de que la muestra no sufriera cambios bruscos de temperatura (debe mantenerse a 37°C), para lo cual se pasó a un tubo cónico graduado y se colocó en un baño de agua a la temperatura indicada. El procedimiento de estudio se describe a continuación:

##### 4.2.2.1 Examen Macroscópico Inicial.

El examen macroscópico inicial que incluye aspectos físico-químicos se centró en los siguientes parámetros:

**Licuefacción:** El tiempo de licuefacción se registró desde que fue tomada la muestra hasta la completa disolución del coágulo seminal, la cual debió de completarse en un tiempo de 30 a 40 minutos.

**Aspecto:** Se examinó inmediatamente después de la licuefacción

colocando un capilar en el interior del tubo cónico graduado y se observó a contra luz, valorándolo de la siguiente manera:

- a).- Opaco: no se observa el capilar en ningún punto.
- b).- Semitraslúcido: Se puede ver el capilar solamente en la punta del tubo cónico graduado.
- c).- Traslúcido: El capilar se observa en su totalidad.

Color: En la apreciación *sui generis*, del color se tomó como normal el gris opalescente ó aperlado.

Volumen: El volumen del eyaculado que normalmente es de 2 a 5 ml, se midió en el tubo cónico graduado de 15 ml, anotándose el mismo en mililitros.

Viscosidad: Se estimó tomando una alícuota de semen con una pipeta pasteur, permitiendo su goteo para observar la formación de hilos y la longitud de éstos. Las muestras normales formaron gotas discretas, mientras que las de viscosidad anormal aumentada formaron hilos de más de 2 centímetros de longitud, ó las muestras de viscosidad disminuida presentaron un goteo demasiado rápido.

Grado de alcalinidad: El pH se midió con un papel indicador tomando como normal un valor de 7.2 a 7.8.

#### 4.2.2.2 Examen Microscópico.

El examen microscópico se enfocó a la estimación de la concentración espermática, presencia de otros tipos celulares y de aglutinación espermática. También se dirigió al análisis de la motilidad, recuento, viabilidad y morfología espermática.

**Examen en fresco:** Se colocó una gota del eyaculado una vez que este se licuó para observarlo con microscopio de contraste de fases a un aumento de 400 X, se analizaron por lo menos 10 campos microscópicos distintos, anotando la concentración espermática, presencia de células epiteliales, células inmaduras, leucocitos, eritrocitos y cristales. También se tomó en cuenta la presencia de aglutinación espermática espontánea ya sea entre espermatozoides ó entre espermatozoides y células epiteliales, eritrocitos ó cristales. Para valorar la concentración espermática se realizó una cuenta apreciativa del número de espermatozoides por campo y registrando como baja un número menor de 5 espermatozoides; media, de 6 a 20 espermatozoides; buena, de 21 a 80 espermatozoides; y muy buena un número mayor a 80 espermatozoides por campo.

La motilidad se analizó en una preparación en fresco cada hora durante 2 horas iniciando inmediatamente después de la licuefacción. Se identificaron los siguientes grados de motilidad:

Grado 0= Porcentaje de espermatozoides inmóviles.

Grado I= Motilidad escasa o lenta, *in situ*.

Grado II= Motilidad amplia pero no vigorosa, progresión lenta y/o rectilínea.

Grado III= Motilidad progresiva rectilínea y rápida.

La cuenta espermática se llevó al cabo en una cámara de Neubauer, realizando una dilución de la muestra en estudio de 1:20, usando como diluyente eosina amarillenta al 1% en agua. Se tomaron 50  $\mu$ l de semen, los cuales se diluyeron en 950  $\mu$ l del colorante ya mencionado. Luego se colocó un cubre objetos sobre la cámara limpia y seca. Se agitó la dilución y con un capilar se depositó sobre la cámara hasta que cubrió el área de conteo. Después de dejar reposar durante 1 minuto para que los espermatozoides se

depositaran en el fondo, se procedió al recuento en el cuadrante central del cuadrulado (cuadrante de cuenta de glóbulos rojos), contando los espermatozoides en las cuatro esquinas y en el cuadro del centro. El recuento se realizó en el microscopio a un aumento de 400 X.

La fórmula general utilizada para calcular el número de espermatozoides por ml. fue:

$$\text{Núm. de esp/ml} = \frac{1\ 000 \times \# \text{ de esp. contados} \times \text{dilución} \times 10}{\text{Núm. de mm}^2 \text{ contados (1/5 mm}^2\text{)}}$$

O bien si el número de cuadros contados es de 5:

$$\text{Núm. de esp/ ml} = \# \text{ de espermatozoides contados} \times 1\ 000\ 000.$$

La prueba de viabilidad se realizó con el colorante eosina Y al 0.5% en buffer de fosfatos 0.15 M y pH de 7.4. Se tomaron 100  $\mu$ l de semen y 100  $\mu$ l del colorante y se colocaron en un tubo de ensayo de 13X100. Después de 1 a 2 minutos, una gota de la mezcla se colocó en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos para observarse al microscopio a 400 X. La valoración se realizó contando 100 espermatozoides, de los cuales se registraron como espermatozoides muertos aquellos que tomaron el colorante supravital y como espermatozoides vivos aquellos que no tomaron el colorante supravital. Se consideró como valor normal 60% de espermatozoides vivos a la hora.

La evaluación morfológica por microscopía de luz se realizó mediante una extensión o frotis del semen en un portaobjetos y su posterior tinción por la técnica de Papanicolaou (ver Apéndice A).

El conteo diferencial se realizó registrando 200 células, reportando el porcentaje de células normales y anormales así como también la presencia de



otros tipos celulares. Para el porcentaje de células anormales se tomaron en cuenta alteraciones cefálicas (entre ellas de su forma y tamaño, defectos nucleares y acrosomales), de la pieza de conexión y flagelares.

#### 4.2.3 Cultivo Microbiológico.

De una segunda muestra de estudio, se tomó de manera estéril la cantidad necesaria para cultivo de *U. urealyticum*. El cual se procesó según las indicaciones del kit de cultivo Mycoplasma IST (BioMerieux).

##### 4.2.3.1 Procedimiento del Cultivo.

Se tomaron 200  $\mu$ l de semen los cuales se agregaron a un vial llamado R1 (Solución de restitución que contiene nutrientes como peptonas y sales). Después de mezclado, se dispensaron 3 ml de la solución R1 en un vial de medio de crecimiento R2 (urea-arginina). Se agitó vigorosamente para asegurar que la pastilla del liofilizado estuviera completamente disuelto. Se dispensaron 50  $\mu$ l del medio R2 urea-arginina en cada uno de los 16 pocillos del panel de inoculación y entonces se agregaron 2 gotas de aceite mineral estéril a cada uno de los pocillos. Posteriormente se colocó la cubierta en el panel y se incubó durante 1 a 3 días a 37°C.

Después de la incubación se leyó el cambio de color tanto en el frasco con el medio de cultivo urea-arginina (R2), como en el panel de identificación según se describe en la tabla I.

TABLA I

Identificación del cambio de color en el medio de cultivo urea-arginina

	<i>U. urealyticum</i>	<i>M. hominis</i>
Intensidad del cambio de color y correspondientes características bioquímicas	naranja urea +	rojo arginina +

El panel de inoculación se leyó según se describe a continuación:

Después de incubar el panel de identificación se realizó la lectura tomando en cuenta los pocillos 1, 2, y 3; de los cuales el pocillo 1 es un testigo positivo de crecimiento tanto de *U. urealyticum* como de *M. hominis*; el pocillo 2 es el específico para identificación de *U. urealyticum*; el pocillo 3 es el específico para identificación de *M. hominis*; del pocillo 4 al 5 se puede leer el título de crecimiento en Unidades Cambiantes de Color (CCU). En los pocillos 6 al 16 que el kit incluye se realizó la lectura de susceptibilidad a antibióticos entre los cuales figuran: Doxiciclina (4 y 8 mg/l), Josamicina (2 y 8 mg/l), Ofloxacina (1 y 4 mg/l), Eritromicina (1 y 4 mg/l), Tetraciclina (4 y 8 mg/l), y Pristinamicina (2 mg/l). Todos lo pocillos se registraron de acuerdo al cambio de color del indicador, tomando como positivo un cambio del indicador observando un color rojo a anaranjado y como negativo la permanencia de color amarillo del indicador rojo fenol.

#### 4.2.4 Estudio Ultraestructural.

El centrifugado de una tercera muestra de semen se procesó por el método habitual de inclusión en epoxiresina (ver Apéndice B). Practicándose primero un seccionamiento a 0.5  $\mu$ m. para cortes semifinos para descripción citomorfológica con microscopio de luz y selección de áreas de seccionamiento fino para el estudio citomorfológico a nivel de microscopía electrónica, realizando cortes finos de entre 60 y 90 nm. Los cortes tanto semifinos como los finos, se realizaron en un Ultramicrotomo MT-1 marca SORVALL.

Los cortes semifinos se montaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina al 1% en agua destilada más 5 gramos de Bórax, colocando la laminilla sobre una placa de calentamiento hasta que los bordes del colorante tomaron un color verde amarillento. Se procedió posteriormente a la observación por microscopía de luz visible. Después de escoger las zonas de corte, se procedió a la realización de los cortes finos y su posterior montaje en rejillas metálicas de cobre de 3 mm. de diámetro. Se tiñeron con acetato de uranilo al 1% y se registraron para su observación al microscopio electrónico de transmisión. El registro de imágenes se realizó con una película AGFAPAN APX25 120 y se imprimieron en papel fotográfico Kodabrome II RC.

Las observaciones se realizaron en el Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss EM 109, utilizando aumentos para registro de las imágenes de 3000 X, 4 400 X, 7 000 X, y 12 000 X. Las imágenes obtenidas de estas observaciones se utilizaron para evaluar la citomorfológica espermática, la presencia de células inflamatorias, fagocitosis espermática, presencia y localización de células mycoplasmáticas, bacterias y otros hallazgos de importancia.

#### 4.2.5 Detección de *U. urealyticum* por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés).

La PCR es un proceso bioquímico *in vitro* mediante el cual, las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por la enzima DNA polimerasa en cada uno de los ciclos que integran la reacción (30 ciclos), al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico sometido al proceso. Esta técnica ha permitido desarrollar nuevas alternativas en el diagnóstico microbiológico propiciando así una tecnología más avanzada para la búsqueda de microorganismos en las infecciones humanas.

##### 4.2.5.1 Extracción de DNA.

En este estudio se utilizó como base el método de extracción descrito por Teng y cols. (1994)<sup>26</sup>. Esta técnica fue descrita para obtención de DNA mycoplásmico en exudado uretral, nosotros la tuvimos que modificar para poder obtener DNA micoplásmico en semen. La técnica resultante consistió en lo siguiente:

La muestra de semen se colocó en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml, se agregó agua ultrapura hasta completar 5 ml, centrifugándose posteriormente 30 minutos 10 000 r.p.m. y a 4°C.

Se descartó el sobrenadante, obteniéndose una pastilla de material seminal, la cual se sometió a lavado y lisis celular resuspendiéndose en 400  $\mu$ l de buffer de lisis STE (NaCl 0.1 M, Tris-HCl 0.05 M, EDTA 1 mM), y 25  $\mu$ l de SDS al 10%

(Dodecil sulfato sódico); después de agitación en Vortex hasta la disolución completa de la pastilla, se agregaron 60  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml), se mezcló por agitación vigorosa y se incubó a 50°C durante 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se realizó una extracción por el método de Fenol-Sevag que consiste en la mezcla del lisado seminal con 400  $\mu$ l de Fenol saturado, agitando suavemente por inversión durante 15 minutos; luego se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante 8 minutos a 4°C. Con una puntilla despuntada (de 1 ml) para evitar la fricción del DNA y provocar su rompimiento, se recuperó la fase acuosa procurando evitar la aspiración de la interface. En el siguiente paso se agregó medio volumen de Fenol (200  $\mu$ l) y medio volumen de Sevag (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1), se mezcló en una plataforma agitadora vertical durante 15 minutos centrifugándose después a 12 000 r.p.m., durante 8 minutos y a 4°C, se recuperó la fase acuosa. Finalmente a la fase acuosa se le realizó una última extracción con 400  $\mu$ l de Sevag realizando nuevamente el procedimiento antes descrito.

La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml, se agregaron 1.5 ml de Etanol al 100% y se mezcló suavemente por inversión para lograr la precipitación del DNA. Para incrementar y asegurar la completa precipitación, el tubo fue colocado a -20°C durante 2 horas y se procedió a centrifugar por 8 minutos a 14 000 r.p.m., decantándose después el etanol. Los tubos se dejaron abiertos durante una hora cerca de la flama de un mechero para la evaporación total del etanol. El DNA purificado se resuspendió con 60  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) mediante agitación en una plataforma vertical durante 1 hora, para posteriormente determinar su concentración y calidad.

#### 4.2.5.2 Espectrofotometría.

La concentración de DNA se determinó por la medición espectrofotométrica de la cantidad de radiación UV absorbida por las bases a 260 nm.

Se colocó 1 ml de TE en una celda de cuarzo para UV, se calibró el espectrofotómetro a cero de absorbancia y se añadió 1  $\mu$ l de la muestra, se mezcló bien por inversión y se tomaron lecturas a 260 nm y 280 nm. La concentración del DNA se determinó utilizando la siguiente fórmula:

Conc. de DNA ng/ $\mu$ l= (50) (factor de dilución) (lectura a 260 nm)

Factor de dilución=  $\frac{\text{volumen total después de la dilución}}{\text{volumen tomado de la muestra}}$

Una unidad de densidad óptica corresponde a aproximadamente 50  $\mu$ g/ml de DNA de doble cadena. La calidad de DNA se obtuvo mediante la relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm ( $DO_{260} DO_{280}$ ), la cual nos da una estimación de la pureza del ácido nucleico. Una preparación de alta pureza de DNA tiene una relación  $DO_{260} DO_{280}$  entre 1.8 y 2.0. Al haber contaminación con proteínas o fenol, esta relación puede disminuir e incluso la cuantificación no es precisa.

#### 4.2.5.3 Electroforesis en Gel de Agarosa.

Para estimar la cantidad de DNA obtenido a partir del procedimiento de extracción, se sometió nuestra muestra a un campo electroforético utilizando la fluorescencia emitida por las moléculas de bromuro de etidio intercaladas entre

las bases del DNA e inducida por la radiación UV, comparándola con la fluorescencia de una serie de estándares. De igual manera se evaluó la integridad del DNA en base a su perfil electroforético, ya que la presencia de un barrido que se proyecte desde la banda de DNA hacia el extremo inferior del gel demuestra su degradación.

La electroforesis se realizó con un gel de agarosa al 1% en buffer de TBE (Tris-Borato al 0.089 M, ácido bórico al 0.089 M), que fue colocado en una cámara de electroforesis con la suficiente cantidad de Buffer para cubrirlo. Posteriormente se mezcló 1 $\mu$ l de la solución problema con 5  $\mu$ l de TE y 1 $\mu$ l de jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25%, Xilencianol al 0.25% y glicerol al 30%). A la vez se prepararon estándares con diferentes concentraciones de DNA. Tanto las muestras como los estándares se colocaron en los correspondientes carriles del gel y se corrió la electroforesis al inicio a 50 V para internar el colorante el gel y después a 90-100 V durante una hora.

Al término del tiempo, el gel se retiró de la cámara de electroforesis y se colocó en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 2  $\mu$ g/ml durante 5 minutos y se lavó varias veces en agua corriente para eliminar el exceso de bromuro de etidio. El gel ya teñido se observó en un transiluminador de luz Ultra-violeta, en el cual se determinó la concentración del DNA por comparación con los estándares y la integridad del mismo al descartar la presencia de barrido a partir de la banda de DNA.

#### 4.2.5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Haciendo uso de la técnica de PCR, la cual mediante un proceso enzimático cíclico controlado, produce la amplificación en millones de copias de un segmento o gen específico de DNA, se puede lograr la identificación de

un microorganismo cualquiera, el cual esté produciendo una infección clínica o subclínica en cualquier área del cuerpo, logrando así una identificación y diagnóstico más exacto y preciso que el alcanzado por las técnicas de cultivo convencionales.

Para éste trabajo de investigación se buscó una secuencia útil para el diagnóstico de *U. urealyticum* la cual fuera específica para este microorganismo. La secuencia elegida fue la región A del gen Ureasa (GenBank DNA sequences), se escogió un segmento a amplificar de 461 nucleótidos. El par de oligonucleótidos iniciadores utilizados en la amplificación (ver Tabla III), se tomaron del artículo de Tenk y cols. (1994)<sup>26</sup>. Las secuencias se modificaron para lograr un 100% de apareamiento entre el oligonucleótido y el DNA del gen Ureasa (ver Tabla II).

**TABLA II**  
**Oligonucleótidos iniciadores utilizados en la**  
**amplificación de la región A del Gen Ureasa**

---

Secuencia de oligonucleótidos original:

5'-CTC CTA ATC TAA CGC TAT CAC C-3'

5'-CCA GGA AAA GTA GTA CCA GGA GC-3'

Secuencia de oligonucleótidos utilizada:

5'-tCT CCT AAT CTA ACG CTA TCA CC-3'

5'- CCA GGt AAA tTA GTA CCA GGA GC-3'

---

**Nota:** Las bases cambiadas o agregadas están escritas y resaltadas con letras negritas y en minúsculas.



Para la reacción de amplificación del gen Ureasa de *U. urealyticum* se utilizó un esquema de reacción y un programa de amplificación que llevó el nombre de UUR (ver Apéndice C).

El producto de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando 6  $\mu$ l del producto amplificado mas 1  $\mu$ l de jugo azul, el producto amplificado se corrió junto a un marcador molecular para verificar que la longitud de nuestro segmento amplificado sea el esperado (461 pares de bases).

Tanto las pruebas microbiológicas como la PCR incluyeron controles técnicos positivos y negativos. En el primer caso correspondieron a los incluidos en el kit por el fabricante; para la PCR el control negativo fue agua ultrapura y el control positivo se tomó de un medio de cultivo líquido positivo a *Ureaplasma urealyticum*. En el caso de la descripción morfológica de las células mycoplásmicas en el semen de los pacientes con infección detectada, las observaciones fueron comparadas con las que se hicieron a partir del material obtenido de un cultivo líquido positivo para *Ureaplasma urealyticum* y procesadas para microscopia electrónica.

#### 4.3 Métodos Estadísticos.

El total de pacientes incluidos en el estudio (50) se dividió en 2 grupos según el resultado del diagnóstico microbiológico. Mediante comparaciones con prueba t de student para variables independientes y asumiendo que los datos correspondían a poblaciones Gaussianas con igual SD, se procedió a la comparación de los parámetros seminales (volumen, recuento, motilidad, morfología, vitalidad, recuento de leucocitos y macrófagos), y citomorfología

ultraestructural (alteraciones del segmento cefálico y flagelares). Se tomo como significativa una diferencia estadística con una  $p < 0.05$ .

El análisis estadístico se llevo a cabo con el programa INSTAT/PC en una computadora IBM PS/1.

## **CAPITULO V**

### **RESULTADOS**

#### **5.1 Características de los Pacientes Estudiados**

En este estudio se evaluaron 50 pacientes con problemas de fertilidad cuyas edades fluctuaron entre los 25 y 55 años. Cuarenta y tres pacientes (86%) acudieron por infertilidad primaria; 4 (8%) por infertilidad secundaria; y 3 (6%) por abortos de repetición (ver Tabla III).

#### **5.2 Cultivo Especifico de *U. urealyticum***

Tanto el cultivo específico como la reacción en cadena de la polimerasa se realizaron para poder separar los pacientes en los dos grupos de que consta el estudio, los resultados fueron comparados esperando obtener la misma cantidad de identificaciones positivas de *U. urealyticum* con las dos técnicas diagnósticas.

Por medio del cultivo específico se logró identificar 12 casos de infección causada por *U. urealyticum*. Sin embargo, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa se logró identificar a 14 pacientes con *U. urealyticum* positivo (ver Figura 1), con estos resultados se constituyeron los dos grupos de estudio a evaluar. El grupo con identificación negativa de *U. Urealyticum* (grupo control) constó de 36 pacientes y el grupo con identificación positiva de *Ureaplasma urealyticum* constó de 14 pacientes.

El análisis estadístico realizado en el presente estudio, mostró una diferencia significativa entre los valores obtenidos para volumen, movilidad y morfología (ver tabla 3 y Figura 2). Los medios de los valores del volumen para pacientes infectados con *U. urealyticum* fueron de 1.12, 1.12, y 3.2 ml (+/- 1.12, y 3.2 ml +/- 1.12 respectivamente, con un valor de  $t = 10.1$  ( $p < 0.001$ ); La movilidad (grupo  $t = 10$ , resultado de  $t = 10.1$ ), y el valor de  $t = 10.1$  para el grupo control y 10.1%, +/- 23.5, con un valor de  $t = 2.20$  ( $p < 0.05$ ). Papanicolaou se utilizó para el estudio de la morfología espermática según los resultados obtenidos de este estudio morfológicamente normales con una prueba de PCR positiva y 39.39%, +/- 18.0, resultando una diferencia significativa con los parámetros de viabilidad y recuento espermáticos significativas, aunque los pacientes con PCR positivas dieron valores más alterados que los pacientes con PCR negativo (ver Tabla M).

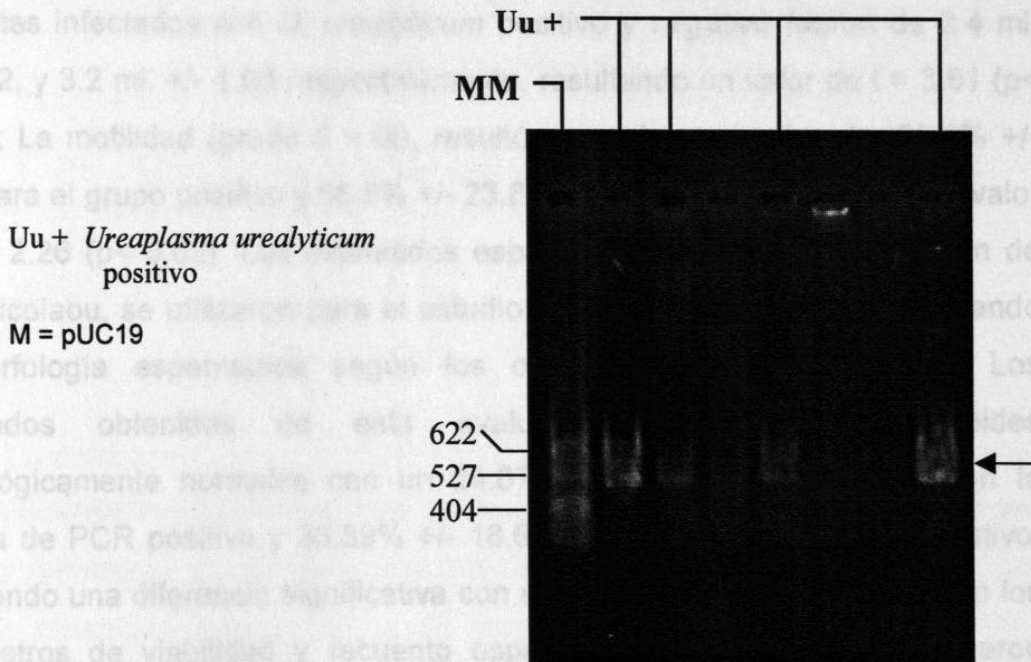


Figura 1. Detección de *Ureaplasma urealyticum* por PCR en semen de pacientes infértiles. La posición de la banda de 461 pares de bases correspondiente al germen se indica con una flecha.

### 5.3 Parámetros Seminológicos.

Para valorar si existían diferencias significativas en los parámetros seminológicos entre los pacientes con PCR positivo y negativo, se llevó a cabo la prueba de t student, tomando como aceptable una  $p < 0.05$  (ver Tabla IV).

El análisis estadístico realizado en el seminograma estándar, mostró una diferencia significativa entre los valores obtenidos para volumen, motilidad y morfología (ver tabla IV, Figura 2). Las medias de los valores del volumen para pacientes infectados con *U. urealyticum* positivo y negativo fueron de 2.4 ml. +/- 1.12, y 3.2 ml. +/- 1.09 respectivamente, resultando un valor de  $t = 3.61$  ( $p < 0.001$ ); La motilidad (grado II + III), resultó con valores medios de: 25.6% +/- 21.5 para el grupo positivo y 35.9% +/- 23.8 para el grupo negativo con un valor de  $t = 2.26$  ( $p < 0.02$ ). Los extendidos espermáticos teñidos con la tinción de Papanicolaou, se utilizaron para el estudio citomorfológico seminal, evaluando la morfología espermática según los criterios estrictos de Kruger. Los resultados obtenidos de esta evaluación fueron: Espermatozoides morfológicamente normales con un 24.07% +/- 21.33 en pacientes con la prueba de PCR positivo y 33.89% +/- 18.62 en pacientes del grupo negativo, resultando una diferencia significativa con un valor de  $t = 2.57$  ( $p < 0.01$ ). En los parámetros de viabilidad y recuento espermático las diferencias no fueron significativas, aunque los pacientes con PCR positivos dieron valores mas alterados que los pacientes con PCR negativo (ver Tabla IV).

En los aspectos de color, tiempo de licuefacción, viscosidad, pH, y aglutinación espermática no se observó ninguna diferencia entre los dos grupos de pacientes estudiados.

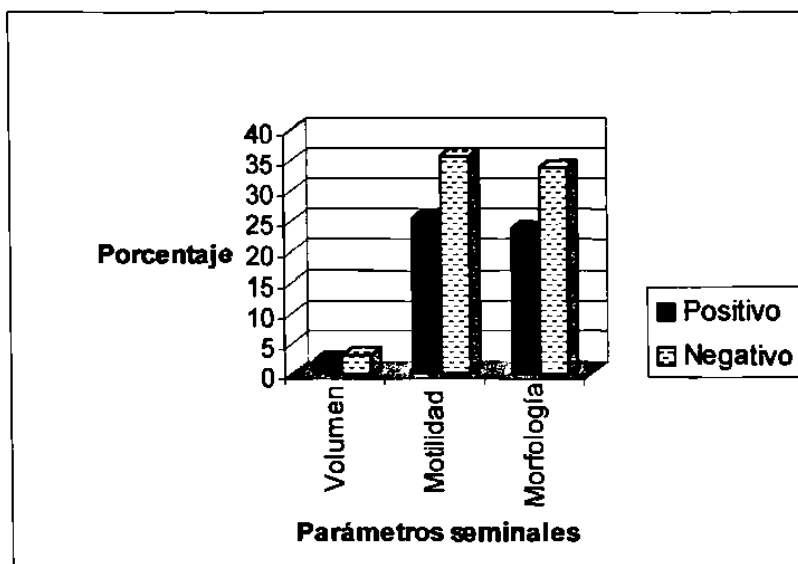


Figura 2. Parámetros seminales con diferencia estadística entre los grupos de pacientes con diagnóstico positivo y negativo de *Ureaplasma urealyticum*.

La comparación por la prueba t para determinar si hay diferencias entre los grupos de estudio en la cuenta de leucocitos y macrófagos en semen, mostró diferencia significativa únicamente en la cuenta de leucocitos. Las medias obtenidas fueron:  $160 \times 10^3$  leucocitos/ml para el grupo negativo y  $533 \times 10^3$  leucocitos/ml para el grupo positivo, con un valor de  $t = 2.93$  ( $p < 0.005$ ). En lo que respecta a la cuenta de macrófagos en semen, resultó que no hay diferencia significativa entre el grupo positivo y el grupo negativo; las medias obtenidas respectivamente fueron:  $55 \times 10^3$  macrófagos/ml y  $57 \times 10^3$  macrófagos/ml con un valor de  $t = 0.08$  ( $p < 0.93$ ) (ver Figura 3).

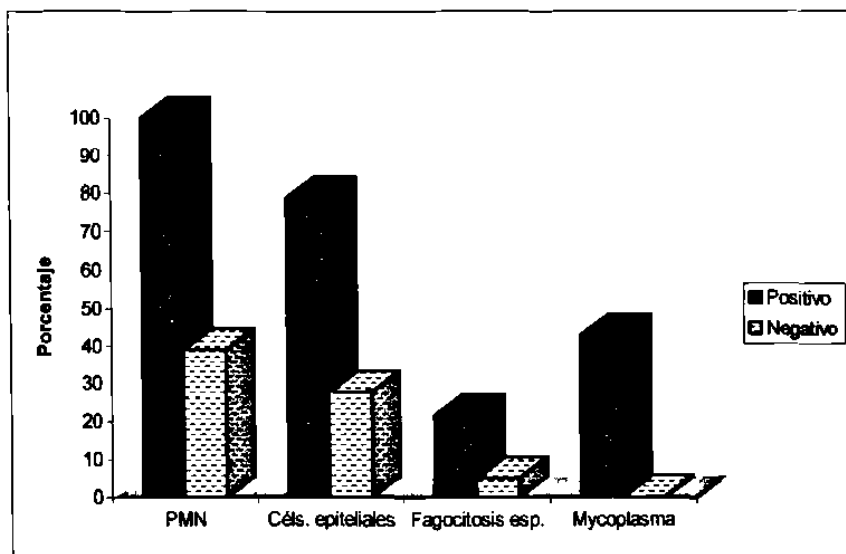


Figura 3. Diferencia entre los hallazgos de la citología seminal en pacientes con diagnóstico de infección con *U. urealyticum* positivo y negativo encontrados por microscopía electrónica de transmisión.

#### 5.4 Evaluación de las Observaciones Ultraestructurales.

Al analizar ultraestructuralmente la morfología seminal de los pacientes estudiados, se apreció que tanto los pacientes con cultivo negativo como positivo, presentaban alteraciones de la estructura fina del núcleo, acrosoma, y pieza intermedia; observándose éstas en mayor cantidad en los pacientes con cultivo positivo, tal y como se demuestra con la prueba t de Student. El grupo PCR positivo presentó un promedio de 77.32% de segmentos anormales, mientras que el grupo PCR negativo presentó un promedio 66.78% de segmentos anormales. El análisis estadístico mostró que si hay una diferencia significativa entre los dos grupos evidenciado por el valor de  $t = 3.97$  ( $p <$

0.001). Como se mencionó anteriormente, los dos grupos de pacientes presentaron alteraciones morfológicas considerables, siendo éstas más evidentes en los pacientes con diagnóstico positivo. De los segmentos alterados se pudo comprobar que el núcleo fue el más afectado ( $p < 0.005$ ), seguido por la presencia de autólisis espermática ( $p < 0.01$ ) (ver Tabla V, Figura 4 a y b). El segmento flagelar, aunque resultó más alterado en el grupo PCR positivo, no presentó una diferencia estadísticamente significativa.

Los hallazgos adicionales observados en el estudio ultraestructural (ver Tabla VI, Figura 3), fueron la presencia de células epiteliales descamadas abundantes del tracto urogenital lo cual se encontró en el 100% de los pacientes PCR positivo, abundantes polimorfonucleares que en un tercio de los casos presentaron fagocitosis espermática (ver Figura 5). El hallazgo más importante fue la presencia de células micoplásmicas correspondientes a *U. urealyticum* en el 43% de los pacientes con PCR positivo. Estas células se observaron como estructuras electrodensas rodeadas de una membrana única trilaminar y de contenido granular homogéneo, esféricas y de contorno regular. Se localizaron tanto en el plasma seminal como adheridas a células epiteliales y a células espermáticas sobre todo a los espermatozoides que presentaban signos de autólisis o alteraciones morfológicas (ver Figura 6). El segmento espermático de unión más frecuente es el flagelar a la altura de la pieza intermedia. Los hallazgos fueron consistentes con los resultados de PCR positivo.



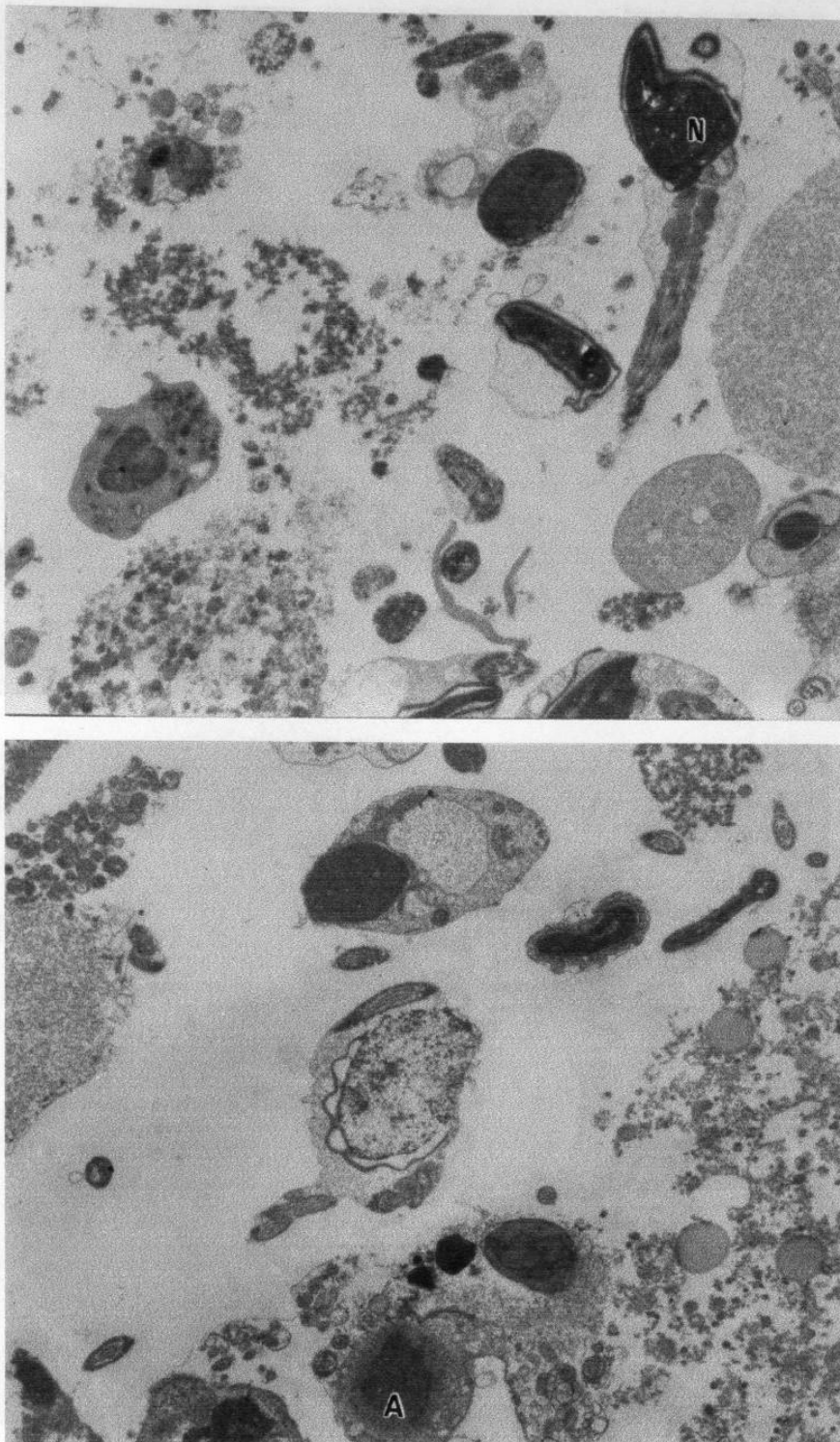


Figura 4. (a,b) Micrografías electrónicas de transmisión de semen de pacientes infértiles *U. urealyticum* positivo con alteraciones nucleares (N) y autólisis (A) evidentes (3000 X).

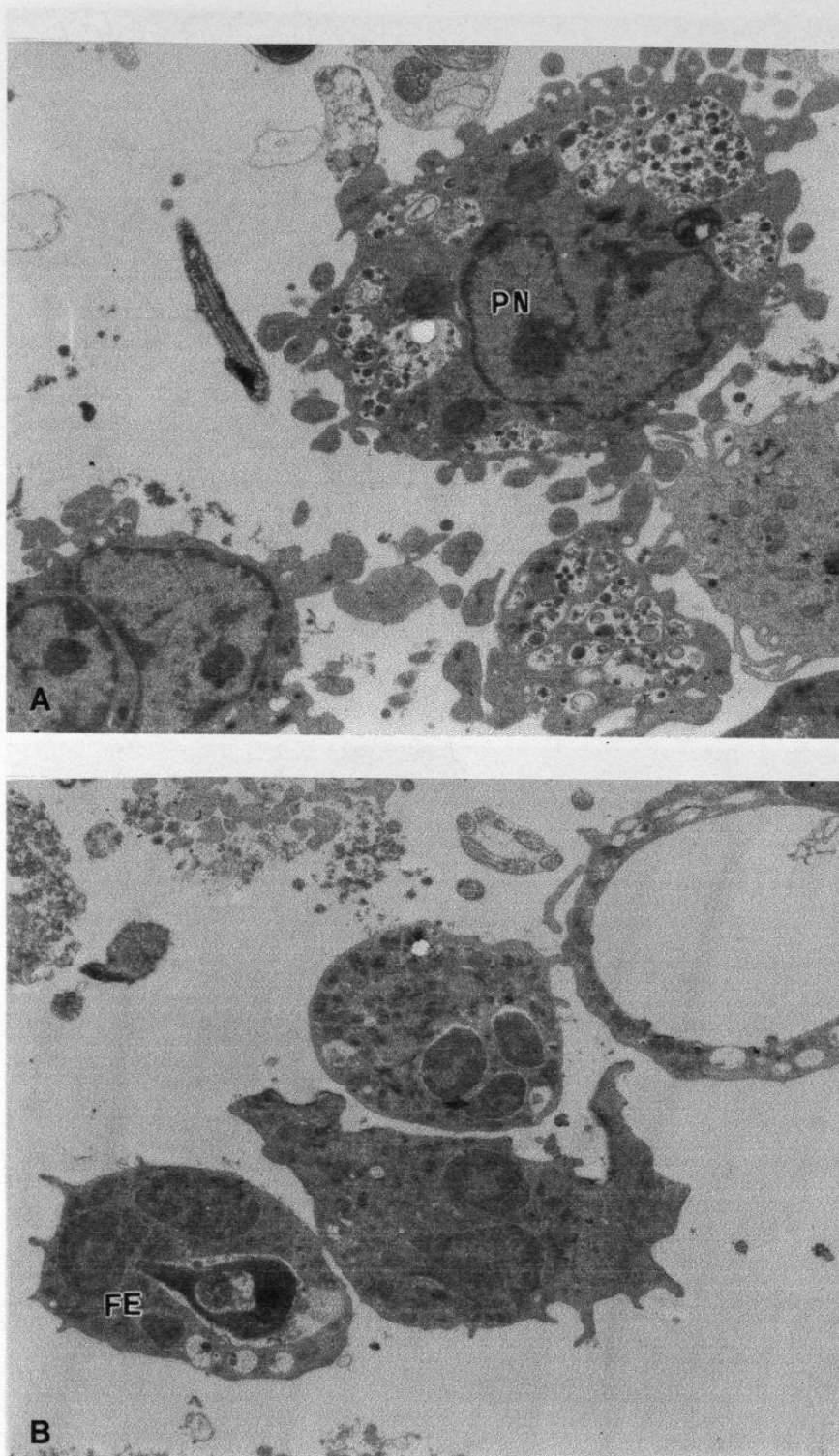


Figura 5. (a, b) Micrografías electrónicas de semen de pacientes infectados con *U. urealyticum*. Se observan polimorfonucleares activos (PN) y fagocitosis espermática (FE). (3000 X).

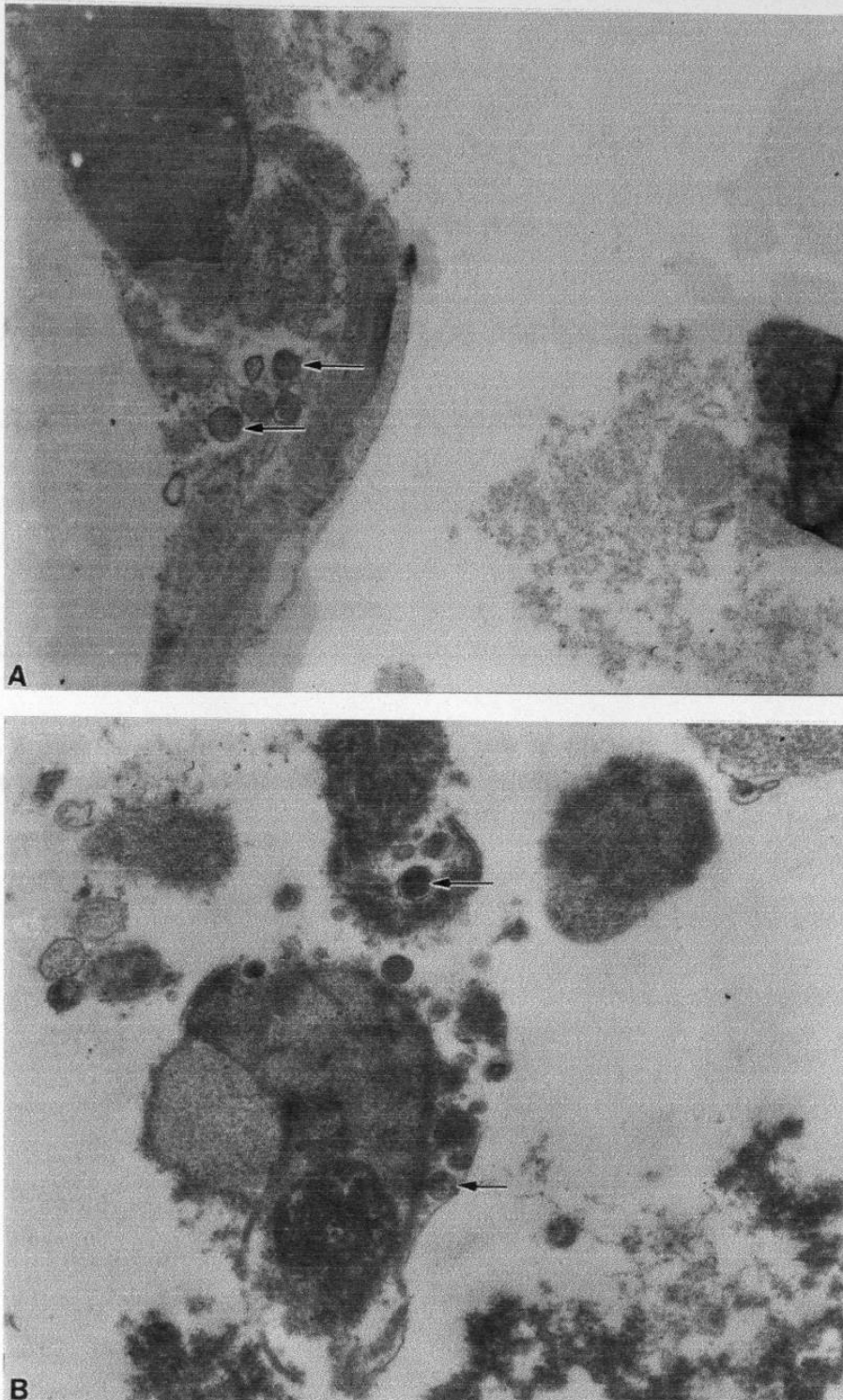


Figura 6. (a y b) Micrografías electrónicas de semen de pacientes infectados con *U. urealyticum*. Las células mycoplásmicas (flechas) se observan adheridas al flagelo espermático y a espermatozoides autolizados (12 000 X).

**TABLA III****CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS**

Número de Pacientes	50
Edades	25-55 años
* Infertilidad Primaria	43 (86)
* Infertilidad Secundaria	4 (8)
* Abortos de Repetición	3 (6)

\* Se presenta el número de pacientes con el tipo de infertilidad o problema y entre paréntesis el porcentaje del total que representan.

TABLA IV

## PARAMETROS SEMINALES

Parámetro	Uu (+)	Uu (-)	
Volumen	2.4 ml +/- 1-12	3.2 ml +/- 1.09	t = 3.61 p < 0.001
Motilidad (grado II + III)	25.6 % +/- 21.5	35.9 % +/- 23.8	t = 2.26 p < 0.02
Morfología normal	24.07 % +/- 21.33	33.89 % +/- 18.62	t = 2.57 p < 0.01
Viabilidad	64.31 % +/- 21.94	60.00 % +/- 17.93	t = 0.63 p < 0.53
Recuento espermático	48.5x10 <sup>6</sup> esp/ml +/- 30.8 X10 <sup>6</sup>	45.8x10 <sup>6</sup> esp/ml +/- 45.1x10 <sup>6</sup>	t = 0.86 p < 0.55
Cuenta de leucocitos	533X10 <sup>3</sup> leu/ml	160X10 <sup>3</sup> leu/ml	t = 2.93 p < 0.005
Cuenta de macrófagos	57X10 <sup>3</sup> macr/ml	55X10 <sup>3</sup> macr/ml	t = 0.08 p < 0.93

Uu (+) Grupo de pacientes *Ureaplasma urealyticum* positivo; Uu (-) Grupo de pacientes *Ureaplasma urealyticum* negativo; esp/ml, espermatozoides por mililitro; leu/ml, leucocitos por mililitro; macr/ml, macrófagos por mililitro.

**TABLA V**  
**ALTERACIONES EN LA ULTRAESTRUCTURA**  
**ESPERMATICA**

Parámetros	Uu (+)	Uu (-)	
Segmentos espermáticos	77.32 % +/- 15.1	66.78 % +/- 7.6	t = 3.97 p < 0.001
Núcleos	59.29 % +/- 12.4	51.81 % +/- 13.7	t = 2.85 p < 0.05
Autólisis	12.01 % +/- 6.25	9.9 % +/- 6.4	t = 2.58 p < 0.01
Descondensación cromatinica	9.1 % +/- 2.0	8.9% +/- 4.5	t = 0.28 p < 0.77
Acrosoma	6.07 % +/- 3.56	5.33% +/- 3.41	t = 1.08 p < 0.28
Flagelos	11.11% +/- 6.16	9.7% +/- 5.07	t = 1.32 p < 0.19
Pieza intermedia	7.42 % +/- 3.42	6.97% +/- 3.64	t = 0.64 p < 0.52
Pieza principal	3.67% +/- 1.34	2.72% +/- 3.38	t = 1.34 p < 0.18

Uu (+) Grupo de pacientes *Ureaplasma urealyticum* positivo

Uu (-) Grupo de pacientes *Ureaplasma urealyticum* negativo

TABLA VI

**HALLAZGOS ADICIONALES EN LA CITOMORFOLOGIA SEMINAL**

	Uu (+)	Uu (-)
Células epiteliales descamadas	100 %	27.7 %
Células fagocíticas	100 %	38.8 %
Fagocitosis espermática	21.47 %	5.5 %+
Presencia de células mycoplasmicas	42.86 %	0

Comparación de la presencia de otras células en el semen de los pacientes estudiados observados por microscopía electrónica de transmisión.

Uu (+) Grupo de pacientes positivos a *Ureaplasma urealyticum*

Uu (-) Grupo de pacientes negativos a *Ureaplasma urealyticum*

## CAPITULO VI

### DISCUSION

En los últimos años cada vez se reconoce más la importancia que tienen las infecciones urogenitales en la reproducción humana. *Ureaplasma urealyticum* es un microorganismo de difícil aislamiento ya que su tamaño, estructura celular (carece de pared celular) y pleomorfismo le permiten pasar inadvertido a los estudios microbiológicos utilizados comúnmente. La infección causada por este germen en las vías urogenitales es del tipo inespecífico ya que no ocasiona un cuadro clínico característico, por lo que su presencia puede pasar inadvertida por mucho tiempo, con el consecuente riesgo de irreversibilidad del daño que ocasiona. Este microorganismo ha sido implicado en patología del tracto reproductor como infertilidad y aborto espontáneo; también como causa de prematurez, bajo peso al nacimiento, incremento de la morbilidad y mortalidad perinatal<sup>8, 32, 33, 34</sup>. Aún falta evidencia fehaciente de que el germen *Ureaplasma urealyticum* sea causa potencial de alteraciones seminológicas e infertilidad en el varón (Cassel y cols. 1993)<sup>8</sup>.

En este estudio evaluamos las alteraciones seminológicas y ultraestructurales en pacientes con infertilidad de causa no conocida, en los cuales se pudo comprobar mediante PCR la infección por *U. urealyticum*.



Se identificaron más casos de infección por *U. urealyticum* por PCR que por cultivo específico, resultados similares a los obtenidos por Teng y cols.<sup>26</sup>. La menor detección por medio del cultivo puede ser atribuida al menos en parte a las dificultades ya conocidas en el aislamiento de *U. urealyticum*<sup>31</sup>. La diferencia puede también estar relacionada a posibles efectos del ambiente como cambios de temperatura durante la recolección o incubación de la muestra, la presencia de otros microorganismos o las características bioquímicas del espécimen.

Los medios de cultivo no pueden detectar microorganismos que mueren antes de la incubación, mientras que el DNA de microorganismos muertos puede ser muy bien detectado por PCR. Debido a su gran sensibilidad y a su menor dependencia de un cuidadoso manejo de las muestras entre la colección y la incubación, la PCR tiene la ventaja de la rápida obtención de resultados. El tiempo de ensayo se reduce de 2 a 3 días por cultivo a 1 o 2 días por PCR. Considerando estos argumentos y los resultados obtenidos en esta Tesis podemos afirmar que la PCR ofrece un rápido y más específico diagnóstico de la infección por *U. urealyticum* que el cultivo.

Consideramos relevante el diagnóstico molecular de *U. urealyticum* en semen humano realizado en este trabajo, como una contribución a la investigación microbiológica de las IGU. Hasta ahora en esos casos la detección de *U. urealyticum* por PCR se ha realizado en especímenes como orina<sup>41</sup> y exudado uretral<sup>26</sup>, pero el estudio en el líquido seminal en el varón infértil puede resultar de mayor utilidad por ser el sitio donde el germen afectaría de manera directa a la fertilidad.

Para evaluar el impacto de la presencia de infección por *U. urealyticum* en el tracto genital masculino, nosotros estudiamos la calidad del eyaculado de pacientes con y sin infección comprobada de éste germen. Los pacientes con

infección presentaron una disminución significativa en el volumen seminal, motilidad, y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Otros parámetros como viabilidad y recuento espermático también resultaron disminuidos aunque no con la significancia requerida para este estudio ( $p < 0.05$ ). Nuestros resultados confirman los obtenidos por otros investigadores como Fowlkes (1975)<sup>13</sup>, y MacLeod y Gold (1951)<sup>35</sup>. Los cambios provocados sobre la calidad del semen pueden deberse a la permanencia latente e indetectable del germen en el tracto reproductor. Es posible que los mycoplasmas puedan contribuir a la infertilidad masculina por un efecto directo en la motilidad espermática, resultante de la adherencia de estos organismos al espermatozoide (Xu, 1997)<sup>29,39</sup>. La asociación física del *Ureaplasma* con el espermatozoide fue confirmada en esta Tesis y es respaldada por investigadores como Gnarpe y Friberg<sup>37</sup>; Fowlkes y cols.<sup>21</sup>; Busolo y cols.<sup>14</sup>; Svenson y O'Leary<sup>38</sup>; así como Xu y cols.<sup>39</sup> Estos últimos evaluaron también los efectos del germen en el tejido testicular observando la formación de células gigantes multinucleadas, exfoliación de células germinales e inducción de fagocitosis espermática. Engel y Baumann en 1979<sup>40</sup>, aislaron *Ureaplasma urealyticum* de tejido testicular humano evidenciando que la infección puede ascender hasta el tracto genital superior.

En el análisis de ultraestructura de la pastilla seminal pudimos confirmar la asociación física de los mycoplasmas y el espermatozoide humano en el 43% de los pacientes con diagnóstico positivo. Nuestra descripción ultraestructural de *U. urealyticum* concuerda con las realizadas anteriormente por otros investigadores<sup>14,21</sup>. Adicionalmente nosotros logramos su caracterización, comparándola con micoplásmas obtenidos de un medio de cultivo positivo y procesado para microscopía electrónica de transmisión. El hallazgo de células fagocíticas fue una constante en todos los pacientes con infección por ureaplasma, y se comprobó fagocitosis espermática en el 21% de ellos; esta fagocitosis se produce principalmente en células con alteraciones

morfológicas (en nuestro caso las alteraciones más importantes fueron del núcleo y autólisis espermática), y espermatozoides con mycoplasmas adheridos.

La asociación física entre estos gérmenes y el espermatozoide humano puede afectar la capacidad reproductora por varias razones. Uno de esos aspectos es la motilidad espermática, ya que en los pacientes con la infección se observó un deterioro mayor de la misma que en los que no se demostró infección. Es posible que los mycoplasmas interfirieran con el metabolismo normal del espermatozoide y/o que su adhesión a la superficie de ellos produzca un lastre hidrodinámico.

Por otra parte la adhesión física del ureaplasma al espermatozoide facilita su transferencia al tracto reproductor femenino<sup>21</sup>. Donde (Horne y cols.)<sup>42</sup> se ha demostrado la reacción inflamatoria del endometrio en asociación a cultivos de cervix positivos a *U. Urealyticum*.

Otros mecanismos a nivel molecular también se han argumentado para explicar la patogenicidad del ureaplasma en pacientes infértiles. De Silva y Quinn<sup>43</sup> reportaron la actividad de fosfolipasas A y C en la membrana de *U. Urealyticum*, enzimas que pueden actuar como componentes tóxicos en el progreso de la infección. Gnarpe y Friberg<sup>10</sup>, reportaron que *U. Urealyticum* puede producir una sustancia semejante a neuraminidasa y puede interferir en la fertilización.

Aunque en este estudio no se analizó la concurrencia de otros gérmenes pudiera tener un potencial adyuvante para el deterioro de la calidad del semen y la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

## CAPITULO VII

### CONCLUSIONES

En base a lo anteriormente expuesto, podemos concluir lo siguiente:

- 1.- Se demostró por PCR la presencia de *U. urealyticum* en el 28% de los casos estudiados, dos de los cuales fueron negativos en el cultivo específico. También se evidenciaron las ventajas de especificidad y tiempo de la técnica de PCR para el diagnóstico de *Ureaplasma urealyticum*, sobre los métodos habituales de cultivo
- 2.- Las infección por *U. urealyticum*, puede pasar desapercibida si no se emplea un método diagnóstico altamente específico y sensible.
- 3.- La infección por *U. urealyticum* del tracto genitourinario contribuye de manera importante a la alteración de ciertos parámetros seminológicos, principalmente de la motilidad, recuento y morfología espermática. Además provocan la presencia en el semen de células epiteliales abundantes, fagocitos en semen, y fagocitosis espermática. Estos hechos vienen a comprobar nuestra hipótesis de investigación.

- 4.- La falta de una clara asociación entre la presencia de *U. urealyticum* y algunos de los parámetros seminales pudiera aclararse incrementando el número de sujetos estudiados y descartando la concurrencia de otros gérmenes asociados.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Infertility: Medical and Social Choices. Oficina de Evaluación de Tecnología. Reporte Breve. Washington. DC. US Government Printing Office. Mayo (1988).
- 2.- Toth, A., Lesser, M. L., Labriola, D. The development of infections of the genitourinary tract in the wives of infertile males and the possible role of spermatozoa in development of salpingitis. Surg. Gynecol. Obstet. 159: 565 (1984).
- 3.- Moberg, P., Enerth, P. Bacterial flora in semen before and after doxycycline treatment of infertile couples. Int. J. Androl. 3: 45 (1980).
- 4.- Comhaire, E., Verschdeagen G. Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. J. Androl. 3: 32 (1980).
- 5.- Fowler, E. Jr., Kessler, R. Genital tract infection. In Lipschultz L1 Howards ss (Eds). Infertility in the male. New York. Churchill Livingstone. 288.289 (1984).
- 6.- Villegas, H., Piñon, M. Electron microscopy of Chlamydia trachomatis infections of the male genital tract. Arch. of Androl. 27: 117-126 (1991).

- 7.- Dienes, L., Edsall, J. Observations on the L-organism of Kleineberger. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 36: 740 (1937).
- 8.- Cassel, G. H., Waites, K. B., Watson, H. L., Crouse, D. T., Harasawa, R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: Role in prematurity and disease in newborns. Clin. Microbiol. Rev. 6: 69-87 (1993).
- 9.- Kundsinn, R. B. Mycoplasmas in genitourinary tract infection and reproductive failure. In: Progress in Gynecology. Sturgis, S. H., Taymor, M. L. (Eds.) New York, Grune & Stratton, pp 275 (1970).
- 10.- Gnarpe, H., Friberg, J. Mycoplasma and human reproductive failure I: The occurrence of different mycoplasma in couples with reproductive failure. Am. J. Obst. Gynecol. 114: 727 (1972).
- 11.- Friberg, J., Gnarpe, H. Mycoplasmas in semen from fertile and infertile men. Andrologia. 6: 45 (1974).
- 12.- Friberg, J., Gnarpe, H. Mycoplasma and human reproductive failure III: Pregnancies in infertile couples treated with doxycycline for T-mycoplasmas. Am. J. Obst. Gynecol. 116: 23 (1973).
- 13.- Fowlkes, D., McLeod J. T-mycoplasmas and human infertility: Correlation of infection with alterations in seminal parameters. Fertil. Steril. 26: 1212 (1975).
- 14.- Busolo, F., Zanchetta, R. Mycoplasmic localization patterns on spermatozoa from infertile men. Fertil. Steril. 43: 110-114 (1984).
- 15.- Audring, H., Klug, G., Bollmann, R. Sokolowska-Köhler, W., Engel, S.

- Ureaplasma urealyticum* and male infertility: an animal model II. Morphologic changes of testicular tissue at light microscopic level and electron microscopic findings. *Andrologia* 21: 66-75 (1989).
- 16.- De Louvois, J., Beader, M. Frequency of mycoplasma in fertile and infertile couples. *Lancet*. 1: 1073 (1974).
- 17.- Matthews, C. D., Elmslie, R. G., Clapp, K. H., Svigos, J. M. The frequency of genital mycoplasma infection in human fertility. *Fertil. Steril.* 26(10): 988-990 (1975).
- 18.- Gump, D., Gibson M., Ashikaga, T. Lack of association between genital mycoplasmas and infertility. *N. Engl. J. Med.* 12;310(15): 937:941 (1984).
- 19.- Jong, Z. De, Pontonnier, F., Plante, P., Perie N., Talazac, N., Mansat, A., Chabanon, G. Comparison of the incidence of *Ureaplasma urealyticum* in infertile men and in donors of semen. *Eur. Urol.* 18(2): 127-131 (1990).
- 20.- Talkington, D. F., Davis, J. K., Canupp, K. C., Garret, B. K., Waites K. B., Huster, G. A., Cassel, G. H. The effects of three serotypes of *Ureaplasma urealyticum* on spermatozoal motility and penetration in vitro. *Fertil. Steril.* 55(1): 170-176 (1991).
- 21.- Fowlkes, D. M., Doohar, G. B., O'Leary, W. M. Evidence by scanning electron microscopy for an association between spermatozoa and T-mycoplasmas in men of infertile marriage. *Fertil. Steril.* 26: 1203-1211 (1975).
- 23.- Fiacco, V., Miller, M. J., Carney, E., Martin, W. J. Comparison of media for isolation of *Ureaplasma urealyticum* and genital Mycoplasma species. *J*



- Clin. Microbiol. 20(5): 862-865 (1984).
- 24.- Bebear, C., de Barbeyrac, B., Bernet, C., Renaudin, H. Methods of studying mycoplasma infections. Ann. Biol. Clin. 47(7): 415-420 (1989).
- 26.- Teng, K., Li, M., Yu, W., Li, H., Shen, D., Liu, D. Comparison of PCR with culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* in clinical samples from patients with urogenital infections. J. Clin. Microbiol. 32(9):2232-2234 (1994).
- 27.- Blanchard, A., Hentschel, J., Duffy, L., Baldus, K. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. Clin. Infect. Dis. 17 (suppl. 1): S148-S153 (1993).
- 28.- World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press. Cambridge (1987).
- 29.- Taylor-Robinson, D. T-mycoplasmas and infertility. Nature 248-267 (1974).
- 30.- Wood, J. C., Lu, R. M., Peterson, E. M., De La Maza, L. M. Evaluation of mycotrim-GU for isolation of *Mycoplasma* species and *Ureaplasma urealyticum*. J. Clin. Microbiol. 22(5): 789-792 (1985).
- 31.- Lee, A. L., Ramanuian, T., Ware, P., Edelstein, P. H. Molecular diagnosis of *Ureaplasma urealyticum* septic arthritis in a patient with hypogammaglobulinemia. Arthr. Rheum. 34:443-448 (1992).
- 32.- Cassell, G. H., Waites, K. B., Crouse, D. T. Perinatal mycoplasmal

- infections. Clin. Perinatol. 18:241-262 (1991).
- 33.- Cassell, G. H., Waites, K. B., Crouse, D. T. Association of *Ureaplasma urealyticum* infection in the lower respiratory tract with chronic lung disease and death in very-low-birth-weight infants. Lancet. 2:240-245 (1988).
- 34.- Waites, K. B., Duffy, L. B., Crouse, D. T. Mycoplasmal infection of the cerebrospinal fluid in newborn infants from a community hospital population. Pediatr. Infect. Dis. 9:241-245 (1990).
- 35.- MacLeod, J., Gold, R. Z. The male factor in fertility and infertility. VI. Semen quality and in 100 cases of infertile marriage. J. of Urol. 66:436 (1951).
- 36.- Friberg, J. Mycoplasmas and ureaplasmas in reproductive failure. Contemporary OB/GYN. 281-271 (May 1983).
- 37.- Gnarpe, H., Friberg, J. T-mycoplasmas on spermatozoa and infertility. Nature. 245:97 (1973).
- 38.- Swenson, C. E., O'Leary, W. M. Examination of human semen infected with *Ureaplasma urealyticum* by fluorescence microscopy. Arch. of Androl. 5:373-377 (1980).
- 39.- Xu, C., Sun, G. F., Zhu, Y. F., Wang, Y. F. The correlation of ureaplasma urealyticum infection with infertility. Andrologia. 29:219-226 (1997).
- 40.- Engel, S. Baumann, B. Das Vorkommen von Mykoplasma im Hodengewebe. Derm Muschr. 165: 583-597 (1979).

- 41.- Teng, L. J., Ho, S. W., Ho, H. N., Liaw, S. J., Lai, H. C., Luh K. T. Rapid detection and biovar differentiation of *Ureaplasma urealyticum* in clinical specimens by PCR. J. Formos Med. Assoc. 94:396-400 (1995).
- 42.- Horne, H. W., Hertig, A. T., Kundsinn, R. B., Kosasa, T. S. Sub-clinical endometrial inflammation and T-mycoplasma. International J. Fertil. 18:126 (1973).
- 43.- De Silva, N. S., Quinn, P. A. Localization of endogenous activity of phospholipase A and C in *Ureaplasma urealyticum*. J. Clin. Microbiol. 29:1498-1503.

## **APENDICES**

## **APENDICE A**

### **TINCION DEL FROTIS SEMINAL**

## APENDICE A

### TINCION DEL FROTIS SEMINAL (PAPANICOLAOU)

La extensión se realizó colocando una gota de semen en un extremo de un portaobjetos. Posteriormente se extendió con un cubreobjetos, se secó al aire y se fijó en etanol al 96% durante un mínimo de 30 minutos. La tinción se llevó a cabo de la siguiente manera:

Alcohol absoluto y Eter 1:1	30 minutos**
Alcohol 80%	10 inmersiones
Alcohol 70%	10 inmersiones
Alcohol 50%	10 inmersiones
Agua	10 inmersiones
Hematoxilina de Harris	5 minutos
Agua	10 inmersiones
Alcohol acidulado (HCl al 0.5% en alcohol 50%)	1 inmersión
Alcohol al 50% en agua	10 inmersiones
Alcohol al 70% en agua	10 inmersiones
Alcohol al 80% en agua	10 inmersiones
Alcohol al 96% en agua	10 inmersiones
Colorante Orange G 6	10 minutos
Alcohol 96% en agua	10 inmersiones (3 veces)
EA 65	2-5 minutos

Alcohol 96% en agua	10 inmersiones
Alcohol 96% en agua	10 inmersiones
Alcohol absoluto	10 inmersiones
Alcohol absoluto-Xilol 1:1	10 inmersiones
Xilol	10 inmersiones (2 veces)

Para el montaje, la preparación se cubrió con un cubreobjetos usando resina Entellan (MERCK) para el sellado. Se dejó secar y se analizó al microscopio a 1000 X.

## **APENDICE B**

### **PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA**



## APENDICE B

### PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA

- Posterior a la licuefacción, el semen se colocó en un tubo cónico graduado de vidrio 15 ml se lavó con 10 ml de buffer de fosfatos 0.2 M, pH 7.4, mezclando de manera suave y se centrifugó durante 15 minutos a 1 200 r.p.m.; en muestras hiperviscosas, este lavado se realizó 3 veces.
- La pastilla seminal obtenida se colocó en 10 ml de glutaraldehído al 2.5% y se incubó 3 horas a 4°C, después de lo cual se substituyó el fijador por buffer de fosfatos, recambiándolo dos veces más.
- La pastilla se transfirió a un vial de vidrio de 5 ml y se agregó tetraóxido de osmio 1% en buffer de fosfatos de nuevo a 4°C durante 1 hora para la posfijación; después de esto se reemplazó el fijador por buffer de fosfatos, que se recambió nuevamente dos veces.
- Una vez fijada la pastilla seminal, se realizó la deshidratación con acetona (acuosa) al 50%, 60%, 70%, 80%, y 90% durante 5 a 10 minutos cada uno. Para después cambiar a acetona absoluta realizando 2 o 3 cambios de 5 a 10 minutos.
- Para la infiltración se realizaron 2 cambios de 1 hora cada uno con acetona-resina 1:1 a temperatura ambiente. Después de ese tiempo la pastilla se pasó a Epon 812 (mezcla de resinas, tabla II) durante una hora en una

estufa a 60°C. Por último se realizó otro cambio para su inclusión con resina pura incubándose en una estufa a 60°C durante 24 horas. La mezcla empleada para obtener la resina de inclusión fue la siguiente:

RESINAS	CANTIDAD
Epon	16 mililitros
DDSA	10 mililitros
NMA	9 mililitros
DMP 30 1%	4-5 gotas

DDSA: Dodecenylsuccinic Anhidride

NMA : Nadic Methyl Anhidride

DMP 30: Tri(dimethylaminomethyl)phenol

## **APENDICE C**

### **ESQUEMA DE REACCION Y PROGRAMA DE AMPLIFICACION PARA LA PCR**

## APENDICE C

### ESQUEMA DE REACCION Y PROGRAMA DE AMPLIFICACION PARA LA PCR

Esquema de reacción utilizado para obtener la mezcla de reactivos optimos en la amplificación del DNA.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
Buffer Taq 10 X	5.0
Iniciador I $5\mu$ M	5.0
Iniciador II $5\mu$ M	5.0
DNTP's 10 mM	1.0
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.5
Taq Polimerasa 5 U/ $\mu$ l	1.0
H <sub>2</sub> O ultrapura	17.5
Muestra (DNA blanco)	13.0

\* El volumen total de reacción es de 50  $\mu$ l.

\*\* El volumen de muestra es el calculado para obtener 250 ng de DNA

El Programa de amplificación de nombre UUR que se utilizó en este estudio es el siguiente:

Acción	Temperatura(°C)	Tiempo
1- Desnaturalización prolongada	94	5 minutos
2- Desnaturalización	94	30 segundos
3- Apareamiento	54	30 segundos
4- Extensión	72	1 min. 30 segundos
5- 30 veces al 2		
6- Extensión prolongada	68	5 minutos

## **ANEXO**

# HISTORIA MEDICA-INFERTILIDAD CONYUGAL

## DATOS DE IDENTIFICACION

Fecha: \_\_\_\_\_ 61

Nombre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
 Nombre de la pareja: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
 Dirección: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_  
 Médico que lo refiere: \_\_\_\_\_ Institución: \_\_\_\_\_  
 Ginecólogo: \_\_\_\_\_ Dx.Ginecólogo: \_\_\_\_\_  
 Duración de la relación: \_\_\_\_\_ Fecha de suspensión del tx anticonceptivo: \_\_\_\_\_  
 Duración de la infertilidad: \_\_\_\_\_ Edad del último hijo: \_\_\_\_\_

### PACIENTE MASCULINO

Describa su empleo actual: puesto(s), ubicación, descripción breve de actividad, antigüedad:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

¿Está usted o ha estado expuesto a uno de los siguientes fenómenos durante su empleo o servicio militar?

- |                                      |  |  |  |
|--------------------------------------|--|--|--|
| <input type="checkbox"/> Calor       | <input type="checkbox"/> Solventes             | <input type="checkbox"/> Humos tóxicos | <input type="checkbox"/> Pinturas                  |
| <input type="checkbox"/> Anestésicos | <input type="checkbox"/> Gasolina              | <input type="checkbox"/> Radiaciones   | <input type="checkbox"/> Pesticidas ó insecticidas |
| <input type="checkbox"/> Estrés      | <input type="checkbox"/> Otros. Precise: _____ |  |  |

Especifique: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES MEDICOS:

Peso _____	Estatura _____	¿Perdió mas de 10 kgs. el año pasado? ..	SI	NO
			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Tiene hábitos especiales de nutrición? .....			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Precise cuáles: \_\_\_\_\_

¿Practica alguna clase de ejercicio? (Describir):

Ejercicio: \_\_\_\_\_ Horas/Semana: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
 Ejercicio: \_\_\_\_\_ Horas/Semana: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

¿Acostumbra ir al sauna o tomar baños de vapor? .....

¿Se le ha practicado alguna operación quirúrgica en la pelvis? .....

Precise la fecha y el tipo de operación: \_\_\_\_\_

¿Tiene o ha tenido usted...? (marque los cuadros correspondientes):

- |   |  |   |  |
|---|--|---|--|
| <input type="checkbox"/> Alergia            | <input type="checkbox"/> Enf. cardíaca             | <input type="checkbox"/> Hipertensión Arterial    | <input type="checkbox"/> Prostatitis             |
| <input type="checkbox"/> Anemia             | <input type="checkbox"/> Epilepsia                 | <input type="checkbox"/> Infección parasitaria    | <input type="checkbox"/> Rubeóla                 |
| <input type="checkbox"/> Amigdalitis        | <input type="checkbox"/> Fibrosis quística         | <input type="checkbox"/> Infección urinaria       | <input type="checkbox"/> Sarampión               |
| <input type="checkbox"/> Artritis           | <input type="checkbox"/> Fiebre escarlatina        | <input type="checkbox"/> Infección venérea        | <input type="checkbox"/> Sífilis                 |
| <input type="checkbox"/> Bronquitis crónica | <input type="checkbox"/> Fiebre reumática          | <input type="checkbox"/> Lesión testicular        | <input type="checkbox"/> Sinusitis               |
| <input type="checkbox"/> Cáncer             | <input type="checkbox"/> Flujo de leche por pechos | <input type="checkbox"/> Neumonía                 | <input type="checkbox"/> Traumatism.genital      |
| <input type="checkbox"/> Cefaleas crónicas  | <input type="checkbox"/> Gastritis                 | <input type="checkbox"/> Parotiditis              | <input type="checkbox"/> Tuberculosis            |
| <input type="checkbox"/> Colitis            | <input type="checkbox"/> Gonorrea                  | <input type="checkbox"/> Parotiditis con orquitis | <input type="checkbox"/> Tumor testicular        |
| <input type="checkbox"/> Diabetes           | <input type="checkbox"/> Hepatitis                 | <input type="checkbox"/> Problemas neurológicos   | <input type="checkbox"/> Úlcera gástrica         |
| <input type="checkbox"/> Dolor en pechos    | <input type="checkbox"/> Herpes                    | <input type="checkbox"/> Problemas tiroideos      | <input type="checkbox"/> Varicela                |
| Otros: _____                                |  |   | <input type="checkbox"/> Uretritis no gonocócica |

Especifique: \_\_\_\_\_

## **RESUMEN AUTOBIOGRAFICO**

**Octavio Guadalupe Díaz Gutiérrez**

**Candidato para el Grado de**

**Maestro en Ciencias con Especialidad en Morfología**

**Tesis: ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA SEMINAL Y DE LOS  
PARAMETROS SEMINOLOGICOS, EN PACIENTES INFERTILES  
CON PCR POSITIVO PARA *Ureaplasma urealyticum***

**Campo de Estudio: Ciencias de la Salud**

**Biografía:**

**Datos Personales: Nacido en San Cristobal de las Casas, Chiapas, el  
28 de Mayo de 1969, hijo de Armando Díaz Salazar y Cristina  
Guadalupe Gutiérrez Narvéez.**

**Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el  
grado de Químico Clínico Biólogo en 1993 con Mención Honorífica.  
Becario de PLACIRH (Programa Latinoamericano de Capacitación e  
investigación en Reproducción Humana) por un año en la Universidad  
de Chile.**

**Experiencia Profesional: Químico del Laboratorio de Patología Clínica del  
Hospital Universitario "José Eleuterio González" de 1996 a 1997.  
Profesional no docente en el Departamento de Patología de la Facultad  
de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.**

