



* 5 3 0 9 5 7 7 2 6 1 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TITULO : *Alteraciones espermáticas producidas tras la contaminación "in vitro" de espermatozoos con Ureaplasma urealyticum.*

DIRECTORES DE TESIS: *Prof. D. Juan José Picazo de la Garza, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico de San Carlos, Madrid.*

Prof. D. Fernando Baquero Mochales, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

MEMORIA *presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas*

Rocío NUÑEZ CALONGE,

en el Dpto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, como TESIS DOCTORAL para optar título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, 18 Junio 1.991

R. Núñez Calonge



ARCHIVO



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
28040 MADRID

D. JUAN J. PICAZO DE LA GARZA, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y D. FERNANDO BAQUERO MOCHALES, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

C E R T I F I C A N

Que el presente trabajo titulado "ALTERACIONES ESPERMATICAS PRODUCIDAS TRAS LA CONTAMINACION "in vitro" DE ESPERMATOZOOS CON UREAPLASMA UREALYTICUM" de la Licenciada D^a ROCIO NUÑEZ CALONGE, que ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Este trabajo reúne a nuestro juicio, las condiciones legalmente exigidas para poder ser defendida y juzgada por el tribunal correspondiente, a fin de que la referida licenciada opte al grado académico de Doctor.

Y para que conste, firmamos el presente certificado en Madrid, a diez de Junio de mil novecientos noventa y uno.

Juan J. Picazo de la Garza

Fernando Baquero Mochales

Prof. J.J. Picazo de la Garza

Prof.F. Baquero Mochales

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección de los Profesores D.J. José Picazo de la Garza y D. Fernando Baquero, Jefes de Servicio de Microbiología del Hospital Clínico de San Carlos y del Hospital Ramón y Cajal de Madrid respectivamente, a los cuales agradezco el interés demostrado y su inestimable ayuda sin la cual no habría sido posible la realización de esta Tesis.

Al Dr. Pedro Caballero Peregrín, Jefe del Laboratorio de Andrología del Hospital Ramón y Cajal y Adjunto al Servicio de Ginecología, autor de la idea y "cerebro" del proyecto, sin el cual nunca se hubiera gestado el mismo y a cuyos conocimientos sobre Reproducción debo todo lo que hoy puedo saber.

A la Dra. M. Antonia Meseguer, Médico Adjunto del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, por sus consejos y gran ayuda demostrada en la realización de este proyecto, a la cual agradezco haber conocido a una de las personas más expertas en micoplasmaología.

Al Dr. Martínez Ferrer, del Servicio de Microbiología del citado Hospital que tantos consejos me ha dado.

A la Dra. Isabel Vázquez, por todo lo que me ha enseñado sobre Reproducción Animal, y sobre todo, por lo que ha creído en mí.

A Enrique Pueyo, ATS del Laboratorio de Andrología, el cual ha tenido que soportar los peores momentos de realización de este trabajo, y cuya ayuda me ha permitido finalizarlo.

Al Dr. Angel Pueyo, médico y estadístico de Laboratorios Serono, al que debo el tratamiento estadístico de la Tesis, por sus grandes conocimientos en el tema.

A Juanma, mi marido, que, además de soportarme, me ha ayudado en la realización del diseño, y en toda la parte informática, amén del apoyo moral diario y constante.

... Y a todos los que, de una u otra forma han colaborado o me han apoyado, haciendo posible la presentación de este proyecto.

A mis padres, por supuesto

1.- Introducción	1
2.- Revisión bibliográfica	
2.1.- Caracteres biológicos de lo micoplasmas	7
2.1.1.- Características biológicas de <u>Ureaplasma</u>	9
2.1.2.- Condiciones de recogida, cultivo e identificación	14
2.2.- Epidemiología y problema social	
2.2.1.- Fuentes de aislamiento de ureaplasma y patologías asociadas	15
2.2.2.- Incidencia de colonización por micoplasmas entre la población	23
2.2.3.- Micoplasmas genitales y su relación con la infertilidad entre la población	25
2.3.- Influencia de los ureaplasmas sobre el espermatozoo	30
2.3.1.- Efectos directos	
2.3.1.1.- Efectos sobre la concentración espermática	32
2.3.1.2.- Efectos sobre la movilidad	34
2.3.1.3.- Efectos sobre la morfología	36
2.3.2.- Efectos indirectos	
2.3.2.1.- Efectos sobre la función espermática	38
2.3.2.2.- Efectos inmunológicos	41
2.3.2.3.- Otros efectos indirectos	42
2.3.3.- Microscopía Electrónica de eyaculados ureaplasma positivos	44
2.3.4.- Efecto de <u>U.urealyticum</u> sobre las Técnicas de Reproducción Asistida	46
2.4.- Tratamiento antibiótico	
2.4.1.- Consideraciones generales	49
2.4.2.- Revisión bibliográfica	50
2.4.3.- Resistencia de <u>Ureaplasma</u> a la doxiciclina	52

3.- Material y métodos

3.1.- Muestras de semen	55
3.1.1.- Procedencia de las muestras	55
3.1.2.- Metodología de contrastación	56
3.1.3.- Tratamiento de las muestras	68
3.2.- Material microbiológico	
3.2.1.- Cepas empleadas	70
3.2.2.- Crecimiento del microorganismo	70
3.2.3.- Tratamiento de las muestras	71
3.2.4.- Identificación del crecimiento	72
3.3.- Diseño experimental	74
3.3.1.- Experimento I	
3.3.1.1.- Descripción del experimento	74
3.3.1.2.- Cálculos de ajuste de concentración	75
3.3.1.3.- Variaciones dentro del experimento	76
3.3.2.- Experimento II	79
3.3.3.- Experimento III	80
3.4.- Análisis estadístico	81
3.4.1.- Experimento I	81
3.4.2.- Experimento II	85

4.- Resultados

4.1.- Experimento I	89
4.1.1.- Diferencia entre las cepas	89
4.1.2.- Movilidad espermática	
4.1.2.1.- Línea I	91
4.1.2.2.- Línea II	92
4.1.2.3.- Línea III	93
4.1.2.4.- Línea IV	94
4.1.2.5.- Línea V	95

Indice

4.1.3.- <i>Permeabilidad de la membrana</i>	
4.1.3.1.- <i>Línea I</i>	96
4.1.3.2.- <i>Línea II</i>	97
4.1.3.3.- <i>Línea III</i>	98
4.1.3.4.- <i>Línea IV</i>	100
4.1.3.5.- <i>Línea V</i>	101
4.1.4.- <i>Morfología espermática</i>	102
4.1.5.- <i>Crecimiento bacteriano</i>	103
4.2.- <i>Experimento II</i>	
4.2.1.- <i>Movilidad espermática</i>	
4.2.1.1.- <i>A las 2 horas de incubación</i>	104
4.2.1.2.- <i>A las 4 horas de incubación</i>	105
4.2.2.- <i>Permeabilidad de la membrana</i>	
4.2.2.1.- <i>A las 2 horas de incubación</i>	106
4.2.2.2.- <i>A las 4 horas de incubación</i>	107
4.2.2.3.- <i>A las 24 horas de incubación</i>	107
4.2.3.- <i>Morfología espermática</i>	108
4.2.4.- <i>Crecimiento bacteriano</i>	109
4.3.- <i>Experimento III</i>	110
5.- <i>Discusión</i>	
5.1.- <i>Influencia de los ureaplasmas sobre los parámetros espermáticos</i>	115
5.2.- <i>Experimento II: Efecto de la doxiciclina</i>	124
5.3.- <i>Experimento III: Unión de <u>Ureaplasma</u> y espermatozoo</i>	128
5.4.- <i>Consideraciones finales</i>	130
6.- <i>Conclusiones</i>	132
7.- <i>Bibliografía</i>	134
8.- <i>Apéndices</i>	

ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud

ETS: Enfermedades de Transmisión Sexual

UCC: Unidades Cambiadoras de Color

PPLO: Organismos productores de pleuroneumonía

RNA: Acido ribonucleico

DNA: Acido desoxirribonucleico

NGU: Uretritis no gonocócica

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

SEM: Microscopía Electrónica de Scanning

FIV: Fecundación "in vitro"

CMI: Concentración mínima inhibitoria

1.- INTRODUCCION

1.- Introducción

El líquido seminal transporta una amplia variedad de microorganismos saprófitos procedentes de colonización de distintos tramos del aparato urogenital masculino. En ocasiones, pueden encontrarse entre ellos bacterias potencialmente patógenas e incluso patógenas reconocidas sin manifestaciones clínicas de infección, de manera que podemos hallarnos ante varones infértiles asintomáticos con colonización bacteriana.

El problema de la infección genital masculina y su relación con la infertilidad es un tema controvertido y bastante estudiado hasta el momento actual, aunque siguen sin existir soluciones concretas.

Ureaplasma urealyticum es uno de los microorganismos implicados en esta polémica más frecuentemente aislado de varones asintomáticos infértiles. Su incidencia entre la población, no sólo masculina, sino femenina, ha aumentado de forma alarmante en los últimos años, paralelamente al incremento de los casos de infertilidad.

Según los últimos datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) referentes al año 1990, el número de infecciones debidas a Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS), se eleva a 250 millones, aunque no existe constancia de la proporción debida a ureaplasmas.

Si a este dato añadimos que el 15% de las parejas sufren infertilidad, siendo un gran tanto por ciento de ellas de etiología infecciosa, creemos que el estudio de la infección genital masculina y su relación con la infertilidad masculina justifica esta tesis en la que concretamente se implica a Ureaplasma urealyticum.

Para conocer cual puede ser la influencia de los ureaplasmas en los parámetros espermáticos y por ende, en la infertilidad masculina, hemos diseñado una serie de experiencias basadas en la contaminación "in vitro" de eyaculados normales por concentraciones conocidas de ureaplasmas, valorando las alteraciones producidas en los espermatozoos a distintos tiempos de incubación con el microorganismo.

1.- Introducción

De esta forma, comprobamos en primer lugar variaciones de parámetros espermáticos como consecuencia de la contaminación, teniendo en cuenta, por una parte, el tiempo de contacto entre el espermatozoo y el microorganismo, y por otra la concentración de este último en relación con el número de espermatozoos.

El estudio de la infertilidad masculina, cualquiera que sea su etiología, comienza con un análisis del eyaculado con el fin de evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoos. Y esta capacidad está basada, principalmente, en el análisis de tres parámetros principales: el número de espermatozoos de un eyaculado, el tanto por ciento de los mismos que poseen una movilidad de progresión rectilínea (denominada + + +), y el tanto por ciento de formas morfológicamente normales.

El número de espermatozoos es un parámetro invariable en este trabajo, ya que hemos utilizado concentraciones conocidas para adaptarlas a un número determinado de ureaplasmas (Unidades Cambiadoras de Color o U.C.C). Sin embargo, la movilidad y morfología espermáticas son parámetros que valoramos al contaminar los eyaculados, dada su gran importancia como índice de fertilidad. Por otra parte, hemos introducido un tercer factor indicativo de viabilidad espermática con el test Hipoosmótico o de Endósmosis celular, con el cual se detectan alteraciones en la permeabilidad de la membrana espermática al ser sometidos los espermatozoos a un choque hipoosmótico. Con ello podremos también conocer como se afecta la permeabilidad de la membrana espermática en contacto con los ureaplasmas.

Por consiguiente, los parámetros espermáticos que se valoran tanto en los grupos control de muestras sin contaminar, como en los problema (las mismas muestras con concentraciones conocidas de ureaplasmas) son:

- Movilidad activa*
- Permeabilidad de la membrana*
- Morfología*

I.- Introducción

En segundo lugar, y para comprobar la influencia de los antibióticos en los ureaplasmas y en los espermatozoos, realizamos la experiencia en condiciones similares a las descritas anteriormente, pero incluyendo además otra línea con espermatozoos, ureaplasma y antibiótico.

Por último, la comprobación más evidente de la relación entre ureaplasmas y alteraciones espermáticas sería la unión física entre ambos, para lo cual hemos visualizado a Microscopía Electrónica de Barrido muestras de espermatozoos incubadas durante 24 horas con Ureaplasma urealyticum.

Con este modelo "in vitro" de contaminación de eyaculados hemos intentado aproximarnos al modelo fisiológico de infección por el microorganismo para que, en caso de comprobar alguna alteración espermática, evitar la influencia de cualquier otra circunstancia que pudiera enmascarar la pérdida de viabilidad espermática. El hecho de tener en cuenta el tiempo necesario para producir alteraciones, así como el número de microorganismos por espermatozoo necesario para producirlas, nos podrá orientar acerca de cuales son las condiciones necesarias para la alteración de la viabilidad espermática.

Es necesario tener en cuenta, que cuando valoramos el título de ureaplasmas en una muestra de semen ureaplasma positiva es importante conocer la cantidad de microorganismos en relación con el número de espermatozoos, por lo cual en este trabajo presentamos la concentración bacteriana como número de ureaplasmas por espermatozoo.

Así mismo, si comprobamos algún tipo de alteración espermática debida a los ureaplasmas, así como el efecto que sobre los mismos ejerce el antibiótico de elección "in vitro", es imprescindible el conocimiento de la concentración bacteriana a partir de la cual se producen lesiones espermáticas.

1.- Introducción

En cualquier caso, un mejor conocimiento de la influencia de los ureaplasmas en los espermatozoos, así como la terapia antibiótica de elección en cada caso, repercutirá indudablemente en el sentido económico del tratamiento de la infertilidad de origen infeccioso. Y demosremos o no algún tipo de alteración espermática, cualquier resultado nos ayudará a esclarecer el papel que ejercen estos microorganismos.

El objetivo final de esta tesis es orientarnos acerca de la polémica actuación de los ureaplasmas en la infertilidad masculina.

Actualmente persiste todavía un porcentaje muy elevado de varones con infertilidad de origen desconocido, en los cuales no se ha valorado adecuadamente la influencia de una infección por ureaplasmas ni el grado de afectación, caso de existir tal infección, del título del microorganismo.

La posibilidad de agilizar los trámites y tratamientos en las Consultas de Reproducción conociendo mejor la influencia de este microorganismo en la calidad espermática, es, sin duda, uno de los fines principales de este estudio.

2.- REVISION BIBLIOGRAFICA

2.- Revisión bibliográfica

2.1.- CARACTERIZACION BIOLOGICA DE LOS MICOPLASMAS

El término "micoplasma" se ha empleado fundamentalmente para describir todos los procariontes autorreplicantes con ausencia de pared celular (105). Estos organismos, llamados anteriormente organismos productores de pleuroneumonía (PPLO) (debido a que el tipo original aislado en 1898 causaba pleuroneumonía en la vaca), pertenecen taxonómicamente a la clase de los Mollicutes ("piel blanda") familia Mycoplasmataceae (106).

El género Mycoplasma comprende más de 60 especies, incluyendo todas las especies parásitas humanas, a excepción del género Ureaplasma, que contiene una única especie: Ureaplasma urealyticum, llamado anteriormente como T-mycoplasma, y separado del género Mycoplasma por su capacidad única de hidrolizar la urea. El nombre de micoplasma deriva del aspecto filamentoso, a menudo con estructuras ramificadas parecidas a los hongos, de las colonias (115).

Shepard aisló pequeñas colonias de micoplasmas, morfológicamente distintas de las descritas previamente como PPLO, al examinar los cultivos de agar de exudados uretrales de varones con uretritis no gonocócicas (118).

Todos los micoplasmas poseen las siguientes características en común:

- a) Pueden desarrollarse en cultivos artificiales*
- b) No poseen pared celular*
- c) Dependen de los esteroides para su adecuado crecimiento.*
- d) El crecimiento de los micoplasmas no es inhibido por antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.*

2.- Revisión bibliográfica

Existen dos teorías originales en cuanto al origen de los micoplasmas. En primer lugar se consideraron descendientes directos de bacterias muy primitivas que existían antes del desarrollo de la pared celular, con base en peptidoglucanos o formas degenerativas de eubacterias, siendo así productos relativamente tardíos de la evolución. En segundo lugar, por análisis comparativo de la secuencia de RNA ribosomal, se ha encontrado que los micoplasmas tal vez provienen del grupo *Bacillus-Lactobacillus* de bacterias gram positivas. Sus pequeñas dimensiones tal vez se deban a deleciones de parte del genoma que no eran necesarias para la supervivencia del nicho ecológico (95).

Se han descrito mas de 100 especies de micoplasmas como parasitos de plantas y animales. Sin duda hay mas especies en la naturaleza, pero no se han cultivado porque se conocen poco sus requerimientos de crecimiento. Hay 10 especies de micoplasmas además de *Ureaplasma urealyticum* y *Acholeplasma laidlawii*, relacionadas con seres humanos (20,89) (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Mollicutes hallados en asociacion con humanos.

<u><i>Mycoplasma pneumoniae</i></u>	<u><i>M.primatum</i></u>
<u><i>M.salivarium</i></u>	<u><i>M.fermentans</i></u>
<u><i>M. orale</i></u>	<u><i>M.hominis</i></u>
<u><i>M.buccale</i></u>	<u><i>M.genitalium</i></u>
<u><i>M.faucium</i></u>	<u><i>Acholeplasma laidlawii</i></u>
<u><i>M.lipophilum</i></u>	<u><i>Ureaplasma urealyticum</i></u>

2.- Revisión bibliográfica

Los micoplasmas genitales humanos incluyen principalmente, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma fermentans y U.urealyticum. M.fermentans ha sido aislado del tracto genital demasiado infrecuentemente como para permitir un estudio adecuado de su capacidad como patógeno (109). Un microorganismo idéntico ha sido aislado asociado al HIV recientemente (Casell, Comunicación personal a F.Baquero, 1991). M.genitalium es de relativamente reciente identificación y no ha sido estudiado muy exhaustivamente como para establecer su patogenicidad (94).

Por eso, las principales especies y mejor estudiadas como patógenos genitales humanos han sido M.hominis y Ureaplasma urealyticum.

2.1.1.- CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE U.urealyticum

Los ureaplasmas son los organismos vivos más pequeños que se conocen, capaces de atravesar filtros que retiene bacterias. Se describen como organismos filtrables, una propiedad que comparten con los virus. Muchos micoplasmas atraviesan filtros de membrana con un diámetro medio de poro de 0,22 μ , siempre que se aplique una presión de filtración adecuada. Se cree que esta característica de filtración está relacionada con la plasticidad de la célula, ya que son organismos altamente pleomórficos. Es decir, la presión elevada les "empuja" a atravesar poros muy pequeños (116).

2.- Revisión bibliográfica

Como el resto de los micoplasmas, son organismos que no poseen pared celular como las verdaderas bacterias. El citoplasma está delimitado por una membrana plasmática, la estructura más externa de la célula.

La membrana externa es una membrana citoplásmica trilaminar constituida por proteínas y lípidos.

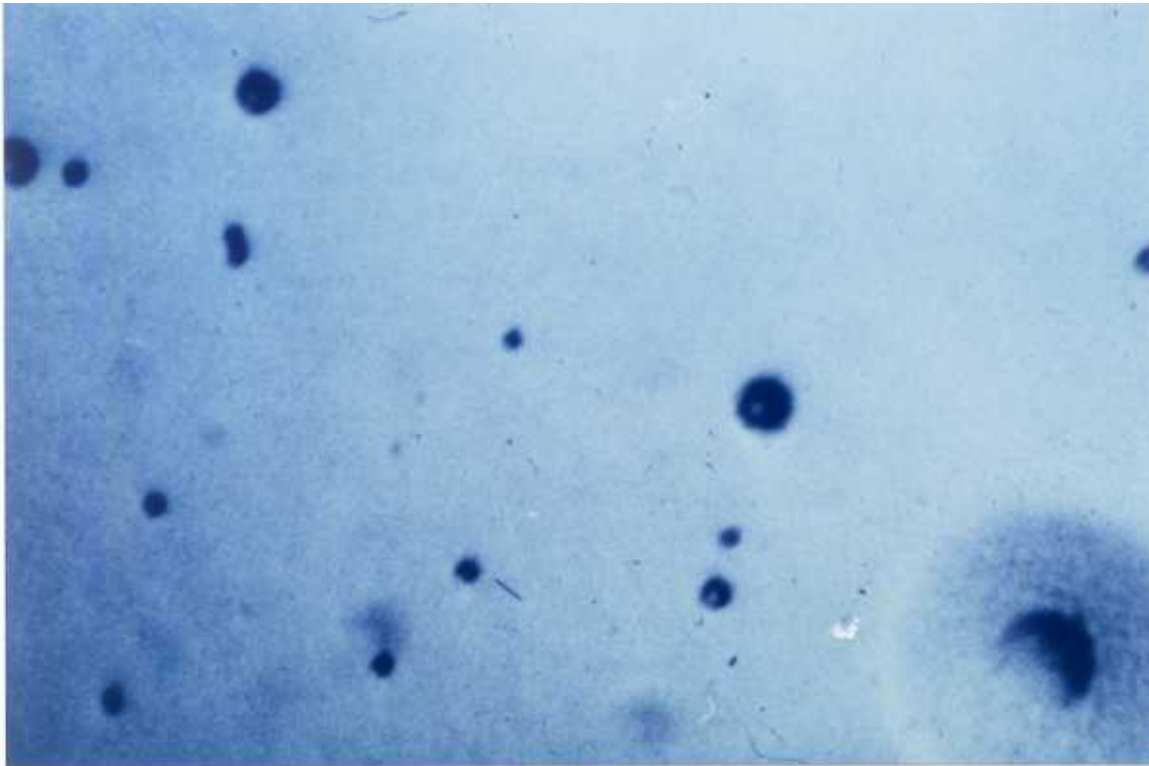
Aparentemente el citoplasma no contiene orgánulos membranosos, aunque los ribosomas están presentes en forma de gránulos citoplasmicos; también contienen RNA mensajero y transferente.

Se consideran que son gram-negativos, aunque se tiñen pobremente o no lo hacen con los procedimientos habituales de tinción.

Ureaplasma urealyticum es un procaríota con un cromosoma circular bicatenario de DNA; el tamaño del genoma es aproximadamente la quinta parte del de Escherichia coli, lo que delimita su capacidad a los procesos metabólicos y sintéticos. El contenido de guanina más citosina (G + C), un reflejo de la cantidad de información que suele portar el genoma, es muy bajo (25 a 34%). Debido a esta simplicidad, el genoma de los micoplasmas codifica sólo de 400 a 500 proteínas diferentes.

La colonia típica de ureaplasmas es pequeña, de 10 a 25 μ de diámetro aproximadamente. Muchas veces tienen una morfología característica, la denominada colonia en forma de "huevo frito", que presenta una zona central densa y una periferia delgada y translúcida. Las células situadas en el centro de la colonia están dentro de la matriz del agar, y crecen hacia el interior del medio. La zona periférica no siempre es visible. Este hecho se observa sobre todo en M.hominis (Fotografía 1).

2.- Revisión bibliográfica

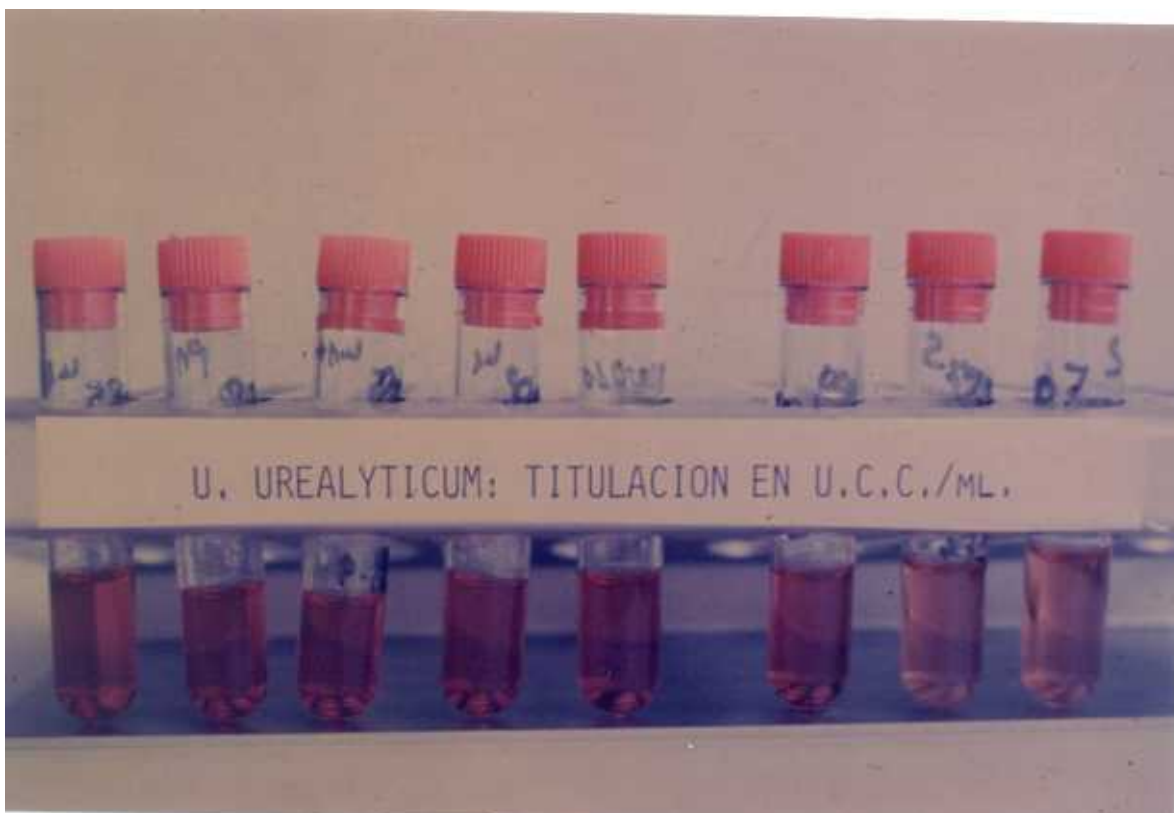


Fotografía 1.- Colonias de Mycoplasma hominis con la típica forma de "huevo frito". (100 x)

2.- Revisión bibliográfica

Ureaplasma no es de metabolismo fermentativo, y necesita colesterol quizás para contribuir a la fluidez de la membrana. Además necesitan un pH de 5,5 a 6,5 y una temperatura de + 37° C para crecer en condiciones óptimas. El crecimiento requiere CO₂. Es el más microaerofílico de todos los micoplasmas.

Ureaplasma urealyticum es el único microorganismo conocido que utiliza urea, un producto terminal del metabolismo en muchos organismos superiores, como fuente de energía. Transforma la urea en amonio, lo cual se detecta con la incorporación de un adecuado detector del cambio de pH al medio. (80,105) (Fotografía 2)



Fotografía 2.- Viales con U.urealyticum en medio líquido (Urease Color Test Broth)

2.- Revisión bibliográfica

Ford y MacDonald (37) estudiaron la influencia de la urea en el crecimiento de los ureaplasmas, estableciendo las concentraciones óptimas de urea que deben ser añadidas a un medio de crecimiento de rutina, e indicaban que tanto el fin de la producción de la hidrólisis de la urea (iones amonio) como la subsecuente alcalinización del medio, inhibían la multiplicación de ureaplasmas y también reducen su viabilidad en el medio.

Por otra parte, el crecimiento de los ureaplasmas está limitado sólo por las más bajas concentraciones de urea presentes en el medio de crecimiento. Incrementando las concentraciones de urea se mejora sólo el número de microorganismos en términos de Unidades Cambiadoras de Color (U.C.C), pero la viabilidad decrece rápidamente (cuando los cultivos alcanzan el pico de crecimiento), debido a la alta producción de iones amonio y a la alcalinización del medio. La urea, por eso, parece ser uno de los factores necesarios para el crecimiento de los ureaplasmas, pero no el único (67).

Se reproducen por fisión binaria, pudiendo crecer en medios libres de células. La resistencia al calor es similar a la mayoría de las bacterias y se destruyen por exposición a +45° C durante 15 minutos.

Dada la limitada cantidad de información genética que portan estos microorganismos, tienen capacidad biosintética muy limitada. Su cultivo "in vitro" requiere por lo tanto medios complejos que proporcionan nutrimentos preformados. El suero es un componente esencial de los medios de cultivo para micoplasma, pues provee ácidos grasos y colesterol.

Ureaplasma urealyticum coloniza superficies celulares del sistema respiratorio y tracto genitourinario y no se introduce en las células del revestimiento epitelial. La capacidad para adherirse estrechamente a las células eucarióticas a través de lugares específicos de unión en la superficie bacteriana es esencial para su parasitismo (122).

El ureaplasma obtiene una ventaja nutricional de los metabolitos que están concentrados en la superficie de la célula huésped; probablemente también puede utilizar los lípidos y el colesterol de las membranas de la célula huésped. De este modo, la colonización y su multiplicación pueden incrementarse por la disponibilidad de nutrientes y metabolitos esenciales.

2.- Revisión bibliográfica

2.1.2.- CONDICIONES DE RECOGIDA, CULTIVO E IDENTIFICACION.

Los micoplasmas requieren unas condiciones especiales de recogida, cultivo e identificación (24), que impiden que todos los Laboratorios de Microbiología se dediquen a su aislamiento. El éxito en los métodos de recogida varían dependiendo el órgano en particular o lugar en el que se obtenga la muestra, y con las condiciones bajo las cuales las muestras son transportadas para el procesamiento en el laboratorio. Las muestras pueden ser inoculadas directamente en medio de crecimiento, pero en la mayoría de los casos se utiliza un transporte especializado en el momento de la recogida. Las muestras de fluidos tales como el semen o la orina, se colocan en medio de transporte o, si el volumen es bastante grande como para que no se produzca la evaporación de la muestra, puede mandarse directamente al laboratorio.

Debe prestarse atención al tipo de torundas utilizadas para la recogida de muestras, ya que algunas pueden contener sustancias que impidan el crecimiento (102). Es obvio que deben mantenerse condiciones de asepsia durante la recogida de las muestras, aunque deben evitarse antisépticos y lubricantes que pudieran afectar adversamente a los cultivos.

Las muestras colocadas en el medio de transporte deben de mantenerse a +4° C si transcurren unas horas antes de inocularse en el medio de cultivo (25).

Los cultivos no conservan la viabilidad más allá de 48 horas en condiciones adecuadas.

Existen un amplio rango de técnicas para serotipar los Mollicutes (104,137). Los trabajos realizados con M.hominis y U.urealyticum han originado la identificación de múltiples serotipos, como mínimo 8 para M.hominis y 14 para U.urealyticum (6,78).

2.- Revisión bibliográfica

2.2.- EPIDEMIOLOGIA Y PROBLEMA SOCIAL

En 1.937, Dienes (32) aisló por primera vez micoplasmas de un absceso de la glándula de Bartholino, y desde entonces se han multiplicado los estudios (14,20,30,63) relacionados con la actuación de estos organismos en el tracto genital masculino y el interés por determinar el papel que juegan en la etiología de la infertilidad del varón, papel que, por otra parte es hoy aún motivo de controversia y no bien establecido.

2.2.1.- FUENTES DE AISLAMIENTO DE Ureaplasma urealyticum Y PATOLOGIAS ASOCIADAS.

Ureaplasma urealyticum se aisló por primera vez en el varón de la secreción uretral de hombres con uretritis no gonocócica en 1954 (112).

Los ureaplasmas pueden aislarse frecuentemente de la orina, surco balano prepucial, meato uretral, próstata y semen en el varón (85,137).

Los primeros estudios realizados, que datan de 1975-78, (61, 101, 114) demostraron la colonización de uretra y próstata por ureaplasmas, sustentando la hipótesis de que los micoplasmas pueden causar uretritis no gonocócica. Hay que distinguir, sin embargo entre colonización y patología, ya que la primera no implica necesariamente la segunda, y podemos encontrar tasas de micoplasmas en el tracto urogenital que, por debajo de 10^3 U.C.C/ml representan parte de la flora urogenital (90).

Sin embargo, la prueba más convincente de la participación de U.urealyticum en esta patología, proviene de un estudio en el que dos investigadores se inocularon ellos mismos cultivos puros de ureaplasmas intrauretralmente (134). Ambos desarrollaron síntomas urogenitales y un aumento de ocho puntos en la titulación de anticuerpos séricos contra Ureaplasma.

2.- Revisión bibliográfica

Cuadro 2.- Fuentes principales de aislamiento de *Ureaplasma urealyticum* en el varón, y patologías asociadas.

LOCALIZACION	PATOLOGIA
Orina _____	Prostatitis, uretritis Pielonefritis
Meato uretral, uretra _____	Uretritis no gonocócica
Próstata _____	Prostatitis
Semen _____	Infertilidad (?)

2.- Revisión bibliográfica

En un estudio elaborado por Toth en 1.981 (142) se aisló Ureaplasma con mayor frecuencia en pacientes con uretritis no específica y/o gonorrea, que de pacientes fértiles o sin historia previa de infección genital. Así mismo, otros autores (61, 83, 101) también encontraron ureaplasmas en cultivos de pacientes con uretritis no específicas.

Sin embargo, la mayoría de los estudios posteriores a 1973 no presentan datos cuantitativos (101, 135), y por tanto constituyen resultados contradictorios en cuanto a la patogenicidad de U.urealyticum.

Si los ureaplasmas participan en el proceso patológico, parece razonable esperar encontrarlos en mayor número que si hubieran tenido sólo una intervención como microorganismos comensales (85).

En este sentido, cuando Bowie et al (9) emplearon técnicas cuantitativas de cultivo de ureaplasmas, encontraron cifras mayores en hombres con uretritis no gonocócica (NGU) negativa para C.trachomatis que en los de un grupo control, grupo asintomático randomizados para experiencias sexuales iguales.

2.- Revisión bibliográfica

Collen y Mardh (27) aislaron M.hominis en el 10% de las muestras uretrales tomadas de 60 varones con prostatitis crónica no bacteriana, pero los resultados fueron totalmente negativos en 20 individuos asintomáticos.

Hofstetter (58) aisló M.hominis de muestras de biopsia prostática obtenidos de individuos con prostatitis crónica. En ningún caso se puede diferenciar inequívocamente entre colonización e infección.

De forma similar para U.urealyticum, Weidner y colaboradores (150) aislaron microorganismos en la primera porción de la orina en el 55% de varones con prostatitis crónica, pero cuando se realizó el estudio en 108 varones sanos sólo se aisló en las mismas condiciones en un 22% de las muestras. Se encontró una cifra 10 veces mayor en la titulación después del masaje prostático en individuos con prostatitis crónica.

Brunner y colaboradores (14) encontraron titulaciones elevadas de U.urealyticum en secreciones prostáticas obtenidas por masaje y en la orina posterior al mismo en 82 de 597 (14%) pacientes con prostatitis crónica. Estos individuos fueron tratados con tetraciclina durante 14 días y el 86% (61 casos) estaban libres de síntomas y con desaparición de los microorganismos entre la primera y la segunda semanas posteriores al final del tratamiento. De los 11 sujetos con síntomas persistentes, siete presentaban obstrucción importante del cuello vesical. Debe enfatizarse el hecho de que este estudio no trató a los compañeros sexuales de los pacientes ni tampoco se investigó Ureaplasma urealyticum en cuanto a la resistencia a tetraciclina que se sabe ocurre en un 10% de los que se aíslan (138). Sin embargo este estudio proporciona las pruebas más convincentes hasta la fecha de que los ureaplasmas participan en la prostatitis crónica.

2.- Revisión bibliográfica

Los puntos de localización de Ureplasma urealyticum en la mujer son generalmente orina, meato uretral (75) , vagina y cervix (86,107).

Sin embargo, también se han aislado micoplasmas de abscesos tuboováricos (12). Las lesiones encontradas en ciertas muestras de biopsia endometrial han sido atribuidas a infección por ureaplasmas (62), así como se han asociado a salpingitis y esterilidad tubárica (46,55,125).

Estos agentes infecciosos también se han implicado en abortos espontáneos (42,103), corioanmionitis (52) y bajo peso del recién nacido (12)

Todavía son mucho más escasas las pruebas de una participación de U.urealyticum en la Enfermedad Inflamatoria Pélvica. Aunque en algunos casos se han encontrado titulaciones elevadas de anticuerpos durante la infección y se ha aislado el microorganismo de: cavidad endometrial, las trompas de Falopio o de ambos sitios, en pacientes con fase aguda. Sin embargo, se desconoce si esto refleja contaminación, colonización de la mucosa de tejidos dañados, o invasión verdadera (128). En su revisión de los estudios sobre implicación de U.urealyticum en la Enfermedad Inflamatoria Pélvica Sweet concluye que no se puede confirmar una participación patógena definitiva .

Parece por otra parte no haber correlación entre colonización del aparato genital en su parte inferior por micoplasmas y pérdida fetal (135). Hay varios tipos de evolución adversa del embarazo vinculados con infección por micoplasma que incluyen aborto habitual, óbito fetal, rotura prematura de membranas y bajo peso al nacer. (11,52,103).

2.- Revisión bibliográfica

Kundsin y colaboradores (71) aislaron por primera vez U.urealyticum de corion, amnios y decidua en una mujer con aborto espontáneo . Posteriormente, estos autores encontraron ureaplasma con mayor frecuencia en membranas fetales de productos de aborto y recién nacidos prematuros que en las de aborto terapéutico o nacimientos a término (72).

En 1984 Kundsin et al. (74) realizaron cultivos de placenta de 801 partos de los que 144 recién nacidos murieron durante el período perinatal, 452 ingresaron en Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales y 205 sirvieron como control. Se aislaron U.urealyticum, M.hominis o ambos en el 21% de las placentas de recién nacidos prematuros y a término, que murieron en el período perinatal, el 25% de los que ingresaron en la Unidad de Cuidados Intensivos, y el 11% de los que fueron usados como control. La edad gestacional y el peso al nacer tenían relación inversa con U.urealyticum y la presencia de corioamnionitis tuvo relación positiva con el aislamiento del agente buscado. (Cuadros 3 y 4)

2.- Revisión bibliográfica

Cuadro 3.- Localizaciones preferentes de los micoplasmas en la mujer.

-Orina, meato uretral

-Vagina

-Cérvix

-Abscesos tuboováricos

-Trompas

-Endometrio

-Coriom, amnios, decidua

2.- Revisión bibliográfica

Cuadro 4.- Patologías materno-fetales asociadas a los micoplasmas.

-Salpingitis

-Esterilidad tubárica

-Aborto espontáneo

-Bajo peso del neonato

-Corioamnionitis

-Enfermedad Inflamatoria Pélvica

-Obito fetal

-Rotura prematura de membranas

2.- Revisión bibliográfica

2.2.2.- INCIDENCIA DE COLONIZACION POR MICOPLASMAS ENTRE LA POBLACION.

Se ha demostrado en ambos sexos una fuerte correlación entre la aparición de actividad sexual, número de parejas e incidencia de ureaplasmas. Individuos sexualmente maduros, sin antecedentes de contacto sexual, raras veces están colonizados, siendo proporcional la tasa de colonización con el número de compañeros sexuales distintos. Hombres vírgenes adultos rara vez transportan ureaplasmas en sus uretras, mientras que más del 50% de varones con múltiples parejas pueden resultar ureaplasma positivo (127).

En un estudio similar (83) se ha relacionado el número de compañeras sexuales por varón con la frecuencia de colonización por micoplasmas. Así, en una población de varones con menos de 10 compañeras sexuales cada uno, el 36% presentaban 0% de aislamiento para M.hominis y 3% para U.urealyticum, mientras que entre 16 varones con más de 14 compañeras sexuales cada uno, presentaron una tasa de 13% para M.hominis y 56% para U.urealyticum.

La población femenina es más susceptible a la colonización asintomática que los hombres. Se ha encontrado que en 47 vírgenes había una tasa de aislamiento de 0% para M.hominis y de 8,5 % para U.urealyticum, mientras que de 71 mujeres con más de seis compañeros sexuales en toda su vida, 31% estaban colonizadas por M.hominis y 77,5% por U.urealyticum. (86). (En ninguno de estos estudios se intentó cuantificar los microorganismos encontrados).

2.- Revisión bibliográfica

Hay factores adicionales que alteran la tasa de colonización por micoplasma. Hombres y mujeres de color presentan tasas de colonización mayores que los individuos de raza blanca (11,75), y ello parece ser independiente de la experiencia sexual (83). Además, las tasas de colonización son mayores en estratos socioeconómicos inferiores (85). En mujeres, las tasas de aislamiento más elevadas se relacionan con períodos de aumento de niveles de estrógenos y progesterona como en el caso de gestación (64). (Cuadro 5).

Cuadro 5.- Factores que inciden sobre la tasa de colonización por micoplasmas entre la población.

-Actividad sexual

-Raza

-Estrato social

-Aumento de estrógenos y progesterona en la mujer

2.- Revisión bibliográfica

Así pues, existen numerosos estudios epidemiológicos tendentes a determinar la incidencia de colonización de micoplasmas genitales en varias poblaciones definidas, dado que el aumento de estas infecciones de transmisión sexual ha venido a sustituir a otras anteriormente más frecuentes como sífilis y gonorrea. Este hecho ocasiona un verdadero problema social, ya que los estudios epidemiológicos demuestran el aumento de infecciones producidas por Ureaplasma urealyticum (20,81,83,84,85,101,127), infecciones que, en gran parte son asintomáticas y sólo se detectan cuando se realizan estudios tendentes a resolver problemas de infertilidad masculina. De aquí la posible implicación de estos microorganismos en alteraciones de la fertilidad, y de ahí también el papel contradictorio que pueden representar, ya que poco conocemos sobre la incidencia de ureaplasmas en poblaciones de varones asintomáticos fértiles.

2.2.3.- MICOPLASMAS GENITALES Y SU RELACION CON LA INFERTILIDAD ENTRE LA POBLACION.

El papel más controvertido y hasta el momento más polémico ha sido la intervención del ureaplasma como responsable de la infertilidad masculina. A pesar de la evidencia de uretritis no gonocócica aguda y prostatitis crónica causada por U.urealyticum, (9,14,20,61,85) no se ha demostrado con total seguridad su relación con la infertilidad.

La infertilidad en el hombre con posible etiología por ureaplasma fue tenida en consideración por vez primera en 1.970 (72), después de la publicación del caso de una pareja infértil con ureaplasma en el tracto genital de ambos.

2.- Revisión bibliográfica

En 1.972 se realizó un estudio sobre la incidencia de micoplasmas en una población identificada como infértil sin causa aparente (40). El resultado fue que las mujeres (91%) y los hombres (85%) de estas parejas tenían una mayor frecuencia de ureaplasmas que los controles de fertilidad conocida. (23% en hombres y 22% en mujeres).

En contrapartida, existe un trabajo en el que se demuestra el aislamiento de ureaplasmas así mismo en 47% de las muestras de varones con fertilidad normal y en 57% de aquellas con fertilidad disminuída (68).

Más recientemente, Kreutner en 1983 encontró también una relación entre U.urealyticum e infertilidad (69).

Por el contrario, en 1974 de Louvois et al. (31) compararon 120 parejas infértiles con un grupo de mujeres embarazadas y sus parejas, no encontrando diferencias significativas en cuanto a la incidencia de ureaplasmas. En este mismo sentido, Mattews (81), no halló diferencias entre el aislamiento de ureaplasmas en parejas fértiles e infértiles. Datos similares se han recopilado por otros autores (50,97). (Cuadro 6)

2.- Revisión bibliográfica

Cuadro 6.- Autores a favor y en contra de la influencia de *Ureaplasma urealyticum* en la fertilidad de varias poblaciones definidas.

<i>A FAVOR</i>	<i>EN CONTRA</i>
<i>Kundsin (70)</i>	<i>de Louvois (74)</i>
<i>Friberg (72)</i>	<i>Mattews (76)</i>
<i>Kreutner (83)</i>	<i>Khatamee (78)</i>

Se encontró que las muestras de semen de 33 varones antes de la vasectomía contenían *Ureaplasma* y *M. hominis*, pero ninguna de las muestras de los vasos deferentes estaba infectada con estos organismos (138). No hay, por el contrario información de esta clase sobre varones infértiles.

Por lo que al factor femenino se refiere, en 1.974, el grupo de Idriss (63) encontró un porcentaje de ureaplasma cervical más alto en mujeres con una infertilidad inexplicable (55%) que entre aquellas con una infertilidad de causa conocida (32%). Similares descubrimientos fueron publicados en comunicaciones posteriores (68, 107), existiendo alguno con diferencias atribuibles a metodología estadística (140)

2.- Revisión bibliográfica

Rehewy y col. (107) hallaron una mayor incidencia de ureaplasma cervical en una población de mujeres infértiles que en un grupo similar de mujeres fértiles. Casell y col (20) clasificaron un gran grupo de pacientes infértiles de acuerdo con el diagnóstico post- laparoscopia, encontrando un aumento significativo en la frecuencia de Ureaplasma cervical comparándolo con el grupo masculino.

Más recientemente, en un estudio realizado por Upadhyaya (146) se encontraron diferencias significativas entre la distribución de ureaplasmas entre mujeres infértiles y gestantes, mientras que Gump y col (50) no encontraron una relación causal entre micoplasmas e infertilidad o subsecuentes embarazos.

Se ha aislado U.urealyticum más frecuentemente de muestras endometriales de mujeres infértiles que de mujeres fértiles (55). Estos descubrimientos son consistentes con los hallazgos de lesiones endometriales granulomatosas de pacientes con historias reproductivas anormales, que estaban colonizadas con micoplasmas (73).

Aunque Stray-Pedersen y sus colegas (125) aislaron ureaplasmas más frecuentemente de aspirados de mujeres infértiles (26%) que de mujeres fértiles (8%), la frecuencia de aislamiento de ureaplasmas en mujeres con infertilidad de causa desconocida es aproximadamente la misma que en mujeres en las cuales se conoce la etiología de la infertilidad, según otro estudio de los mismos autores (126). (Cuadro 7).

2.- Revisión bibliográfica

Cuadro 7.- Autores a favor y en contra de la relación ureaplasma e infertilidad femenina.

<i>A FAVOR</i>	<i>EN CONTRA</i>
<i>Horne (73)</i>	<i>Taymor (78)</i>
<i>Idriss (74)</i>	<i>Gump (84)</i>
<i>Khatamee (78)</i>	<i>Stray Pedersen (85)</i>
<i>Rehewy (78)</i>	
<i>Stray Pedersen (78)</i>	
<i>Henry Suchet (80)</i>	
<i>Casell (81)</i>	
<i>Upadhyaya (83)</i>	

Esta gran variedad de opiniones y resultados sobre la influencia de estos microorganismos en la fertilidad de diversas poblaciones, y, en concreto sobre la fertilidad masculina, por el momento, sólo sirve para generalizar que los micoplasmas genitales pueden jugar un papel potencial en la inducción de la infertilidad masculina y que tal papel debería ser firmemente establecido en el futuro.

2.- Revisión bibliográfica

2.3.- INFLUENCIA DE LOS UREAPLASMAS SOBRE EL ESPERMATOZOO

Las investigaciones que implican a Ureaplasma urealyticum como agente causal de la disminución de calidad del eyaculado se han multiplicado hasta el momento actual. Algunos autores han estudiado las consecuencias del aislamiento de ureaplasmas en semen en términos de la calidad del mismo (23,43,147).

Auroux y colaboradores (4) consideran que la infección por Ureaplasma puede ocasionar dos tipos de cambios en los espermatozoos:

a) Efectos directos, en los que el número de espermatozoos, así como su movilidad y morfología se ven disminuídas. Desde este punto de vista, la conexión entre la concentración bacteriana en relación con la concentración de gametos podría ser importante.

b) Efectos indirectos, en los que la infección "per se" puede cambiar la calidad constituyente del líquido seminal y así originar un efecto secundario en los espermatozoos, como por ejemplo la presencia de gran número de polinucleares o la formación de anticuerpos antiespermatozoos. (Cuadro 7)

Cuadro 7.- Efectos de los ureaplasmas sobre los espermatoos

*a) Efectos directos: Número
Movilidad
Morfología*

b) Efectos indirectos: Sobre la función espermática

2.- Revisión bibliográfica

2.3.1.- EFECTOS DIRECTOS DE U.urealyticum SOBRE EL ESPERMATOZOO.

2.3.1.- Efectos sobre la concentración espermática.

Autores como Fowlkes (43) y Naessens (96), encontraron una correlación entre el número de espermatozoos y el aislamiento de ureaplasmas.

Upadhayya (147) también encontró que la concentración espermática era significativamente más baja con la presencia de ureaplasma que en ausencia de ellos.

Por otra parte, el aislamiento de Ureaplasma urealyticum en biopsias de testículo (34) y de tejido prostático (58), prueba la capacidad invasiva de los ureaplasmas en ciertas circunstancias, y sugiere que ureaplasma puede interferir con la espermatogénesis, encontrándose menos espermatozoos, siendo menos móviles y con mayor número de formas aberrantes, en comparación con las muestras de semen de pacientes ureaplasma negativo.

En un estudio realizado por Busolo y colaboradores (15), en el cual se relaciona concentración de espermatozoos en pacientes ureaplasma positivos y título de ureaplasmas, no se encontró una relación, con lo que se dedujo que U.urealyticum no afecta a la cantidad de espermatozoos producidos en la espermatogénesis. (Cuadro 8)

2.- Revisión bibliográfica

Cuadro 8.- Autores a favor y en contra de la influencia de los ureaplasmas en la concentración espermática.

A FAVOR

EN CONTRA

Fowlkes (75)

Busolo (84)

Hofstteter (78)

Engel (79)

Upadhayaya (83)

Naessens (86)

2.- Revisión bibliográfica

2.4.1.2.- Efectos sobre la movilidad

En general, son varios los estudios que demuestran un descenso de la movilidad espermática en eyaculados ureaplasma positivos, como los de Hoffstetter y O'Leary (59,100), el primero de ellos relacionándolo quizás con un aumento en el consumo de fructosa.

Igualmente, Folwkes y Naessens (43,96) correlacionaron la presencia de ureaplasmas en eyaculados infectados con un descenso de movilidad espermática.

Swenson y colaboradores analizaron cambios en los parámetros del semen entre la visita inicial y las siguientes. Se demostró una gran mejoría en la movilidad cuando se erradicaban los ureaplasmas del semen (129)

Chang y Yun, también comprobaron alteraciones en la movilidad espermática en eyaculados ureaplasma positivos (22,152)

Cortesse y colaboradores comprobaron una modificación del tipo de movilidad espermática en eyaculados ureaplasma positivos. Esta consistía en una disminución de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza espermática, acompañada de un aumento de la frecuencia: los espermatozoos avanzan a pequeños pasos rápidos en lugar de avanzar a grandes pasos (29). Ahora se sabe que el tipo de movimiento puede tener una influencia determinante sobre la progresión de los espermatozoos en el interior del tracto genital femenino. (35) (Cuadro 9)

2.- Revisión bibliográfica

Cuadro 9.- Autores a favor de la influencia de los ureaplasmas en la movilidad espermática.

-O'Leary (75)

-Fowlkes (75)

-Hoffsetter (78)

-Swenson (78)

-Yun (83)

-Chang (84)

-Naessens (86)

-Cortesse (87)

2.- Revisión bibliográfica

2.3.1.3.- Efectos de los ureaplasmas sobre la morfología espermática.

Existen diversos estudios como los de Fowlkes y Toth (43,141) que demuestran alteraciones morfológicas de los espermatozoos en eyaculados ureaplasma positivos. Se habla de morfoanomalías conocidas como "tapering forms" y la aparición de granulosidades a nivel del flagelo, así como distintos tipos de angulación del mismo (143). Estos autores han observado colas enrolladas en preparaciones de semen por la técnica de Papanicolaou y en muestras en fresco, encontrando en áreas localizadas del espermatozoo una fina granulosidad verdosa y finos filamentos entrelazados (31 % de pacientes con Ureaplasma tenían entre un 91 y un 100% de las colas enrolladas, frente a un 18,5% de pacientes Ureaplasma negativos). Esta información la utilizaron para predecir, sin necesidad de cultivos previos, una infección por Ureaplasma urealyticum.

Grossgebauer y Henning mostraron importantes deformaciones de la cabeza que podrían corresponder a la inclusión cefálica de Ureaplasma.(49)

Se han encontrado los mismos patrones de esferas y espermios enrollados en muestras patológicas de pacientes infectados con ureaplasma pero no en espermatozoos normales lavados y contaminados con estos microorganismos. Estos datos podrían indicar que los efectos de Ureaplasma en espermatozoos in vivo son diferentes a los que podemos observar in vitro (17). También y según estos autores, discrepando con el equipo de Toth, no es suficiente un análisis con microscopía óptica para localizar micoplasmas y sustituir así los cultivos.

La polémica surge, sin embargo, con la existencia de trabajos en los cuales no se encuentra relación entre infecciones por ureaplasmas y alteraciones espermáticas.

2.- Revisión bibliográfica

Autores como Lewis y Cintron (23,77) no han encontrado una relación entre la presencia de ureaplasmas y parámetros espermáticos anómalos.

Comhaire comparó dos grupos de pacientes con infertilidad masculina, no detectando diferencias significativas en las características del semen entre el grupo control y el grupo con el microorganismo (28).

Un trabajo realizado por Schoub también demuestra que los varones infectados con ureaplasmas parecen tener semen normal (111) (Cuadro 10).-

Cuadro 10.- Autores a favor y en contra de la relación ureaplasmas y alteraciones morfológicas.

A FAVOR

EN CONTRA

-Fowlkes (75)

-Schoub(76)

-Toth (78)

-Comhaire (80)

-Grossgebauer (84)

-Lewis (81)

-Busolo (84)

-Cintron (81)

2.- Revisión bibliográfica

2.3.2.- EFECTOS INDIRECTOS DE Ureaplasma urealyticum

U.urealyticum puede ejercer efectos indirectos sobre la calidad espermática, como se ha comentado anteriormente (4), que se pueden traducir en reacciones inmunológicas. Sin embargo, los ureaplasmas pueden además afectar también de forma indirecta las funciones espermáticas, como son el transporte hacia el óvulo, y, consecuentemente, alterar la capacidad fecundante del espermatozoo (127).

2.3.2.1.- Efectos sobre la función espermática

Asumiendo que, según algunos autores, los ureaplasmas pueden unirse al espermatozoo (47,44), se puede pensar que el transporte espermático hacia el útero y trompas queda disminuído. Esto no ha sido evaluado sistemáticamente en el varón, pero sí en moco cervical (136).

Algunos investigadores han examinado "in vivo" e "in vitro" la migración espermática en moco cervical, utilizando semen contaminado con ureaplasma (47,52,118). A pesar del descenso de movilidad de los espermatozoos en estos eyaculados, en ningún caso se produjo una disminución en la penetración espermática

2.- Revisión bibliográfica

Por el momento, y según estos estudios sólo se puede aseverar, como lo hacen algunos investigadores (23), que la presencia de Ureaplasma en semen o moco cervical inhibe la movilidad espermática y la viabilidad. Esto incluye un metabolismo espermático anormal, enmascaramiento de la reacción acrosómica implicada en el reconocimiento del oocito por el espermatozoo y empeoramiento de la capacidad de penetración en el gameto femenino, como postulan otros autores (18,40,103,130,134). (Cuadro 11).

Cuadro 11.- Efectos de los ureaplasmas sobre la función espermática.

-
- Transporte hacia el útero disminuído
 - Metabolismo espermático anormal
 - Enmascaramiento de la reacción acrosómica
 - Empeoramiento penetración en el oocito
-

2.- Revisión bibliográfica

Recientemente, se ha estudiado la capacidad de penetración espermática en el oocito con el Test del oocito de hamster. Busolo y Zanchetta (18) informaron que la exposición de muestras de semen a M.hominis y U.urealyticum serotipadas resultaba en una disminución en la capacidad de penetración de los espermatozoos al oocito de hamster. Esto ocurría sin un cambio en la movilidad espermática. Ningún organismo muerto o incubado en presencia de doxiciclina alteraba la penetración espermática. La preincubación de semen con el sobrenadante de cultivos de Ureaplasma descendía el grado de penetración. Este efecto podría ser reversible calentando-inactivando el sobrenadante antes de la exposición espermática.

Estos resultados conducen a los investigadores a la hipótesis de que los micoplasmas genitales producen en la vagina un factor que reduce la función espermática. El grado de inhibición de la penetración varía considerablemente entre U.urealyticum según los distintos serotipos. Serotipo 1 da un grado de penetración similar al de los controles (51%), mientras que serotipo 4 da un grado de penetración muy bajo (6%).

Queda así abierta otra vía de investigación utilizando muestras de Ureaplasma urealyticum serotipadas y analizando las diferentes alteraciones producidas al infectar eyaculados.

Es posible que las alteraciones seminales estén relacionadas con el lugar de la infección o el serotipo de U.urealyticum, pero en realidad existe poca información que pueda sustentar la hipótesis anterior, así como aún es muy bajo el número de estudios comparativos entre semen contaminado y muestras control.

El hecho de haber aislado U.urealyticum en biopsias de endometrio (125), engarza con la hipótesis de Busolo de que los ureaplasmas pueden interferir en la reacción acrosómica del espermatozoo (18).

2.- Revisión bibliográfica

2.3.2.2.- Efectos inmunológicos

Cohen (26) propuso que la presencia de anticuerpos antiespermatozoos debido a infección por micoplasmas podría ser la causa de un transporte espermático disminuído, así como Taylor-Robinson comprobó aglutinación espermática como consecuencia a la presencia de anticuerpos por micoplasmas (132).

Por otra parte, se sabe que la colonización de ureaplasmas en el tracto genital masculino puede inducir una reacción mitogénica y podría producir una respuesta local inmune con la producción de anticuerpos antiespermatozoos (127). Witkin y Toth (151) han encontrado anticuerpos antiespermatozoos más frecuentemente en el semen de transportadores de Ureaplasma que en varones con cultivos negativos. Así, la presencia de estos organismos podría ser uno de los numerosos estímulos no específicos que inducen una forma de infertilidad autoinmune .

En un reciente estudio llevado a cabo por Soffer y colaboradores (119) para estudiar el efecto de Chlamydia trachomatis y micoplasmas en la calidad del semen, se estudiaron 175 varones infértiles sospechosos de infección silente. La infección por micoplasmas era más frecuente en casos con factores orgánicos y/o mecánicos de infertilidad femenina. La infección no estaba relacionada con alteraciones de las glándulas accesorias o espermáticas. No obstante, la actividad de anticuerpos antiespermatozoos estaba incrementada en los casos de cultivos ureaplasma positivos. Estos autores postulan la hipótesis de que el aumento de respuesta local inmune puede reducir significativamente la capacidad de penetración espermática.

2.- Revisión bibliográfica

2.3.2.3.- Otros efectos indirectos de Ureaplasma urealyticum.

U.urealyticum puede causar daño cromosómico que incluye roturas, "gaps" y tetraploidías en cultivos de linfocitos humanos, variando el tipo de alteración con la cepa de Ureaplasma empleada (73). Sin embargo, no se han demostrado anomalías similares en gametos humanos. Así, parece relativamente improbable que el daño cromosómico como resultado de una infección asintomática sea el mecanismo por el cual se produzca una infertilidad.

Los ureaplasmas, por otra parte, se han mostrado como causa de marcada ciliostasis en cultivos de oviducto bovino (121).

La inhibición de la actividad ciliar podría duplicarse añadiendo amonio a los cultivos, lo cual sugiere un medio por el cual estos organismos que hidrolizan la urea podrían causar el daño (122).

Las lesiones como las que se producen en los cultivos de tejidos no se ha demostrado aún que se produzcan in vivo después de la colonización con Ureaplasma, y la ciliostasis por estos organismos no se ha demostrado tampoco en cultivos con el uso de trompas de Falopio humanas. (Cuadro 12)

2.- *Revisión bibliográfica*

Cuadro 12.- Otros efectos de los ureaplasmas

-
- Daño cromosómico en cultivos de linfocitos*
 - Ciliostasis en oviducto bovino*
-

=

2.- Revisión bibliográfica

2.3.3.- ESTUDIOS A MICROSCOPIA ELECTRONICA DE EYACULADOS UREAPLASMA POSITIVOS.

El estudio de espermatozoos procedentes de eyaculados ureaplasma positivos con Microscopía Electrónica (TEM,SEM), han revelado la existencia de unos pequeños engrosamientos a nivel del segmento intermedio, estructuras que, por otra parte, no se han observado en eyaculados ureaplasma negativos (47). Estas partículas esféricas de aproximadamente 200 nm de diámetro se encontraban asociadas a la cabeza o segmento intermedio del espermatozoo, conectándose con material filamentoso. Se pensó que estas formaciones eran colonias de ureaplasmas, existiendo otros trabajos que confirman esta teoría (44). También se ha observado a Microscopía Electrónica un aumento de formas enrolladas.

En un estudio realizado por Busolo y col. (16), el exámen de tres muestras de semen procedentes de pacientes con Ureaplasma por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), se observaron partículas similares a los ureaplasmas en sólo una de las tres muestras estudiadas. No se encontró relación entre estas partículas y los microorganismos, ya que en las tres muestras se observaron las partículas utilizando microscopía de contraste de fases. Esta observación fue confirmada por análisis cuantitativo de ureaplasmas en el semen. En la mayoría de los casos, los ureaplasmas viables estaban presentes en el fluido seminal sólo en muy baja concentración. De hecho, la proporción entre la concentración de U.urealyticum viables y el número de espermatozoos era muy baja, oscilando desde 1:3400 a 1:295. Tal relación era diez veces menor que la manifestada en los trabajos de Taylor Robinson y McCormack.(83,135)

2.- Revisión bibliográfica

Con TEM se ha visto un complejo patrón dentro de la zona hinchada del espermatozoo conteniendo elementos que están rodeados por la típica membrana trilaminar y con textura ribosomal que probablemente requiere un mayor tiempo del habitual al del paso del espermatozoo por la uretra (16). Estos elementos eran muy similares a los encontrados en la morfología de células micoplásmicas por Meloni (89).

No se sabe aún si la unión espermatozoo-ureaplasma ocurre cuando el espermatozoo está almacenado en la región caudal del epidídimo durante la mezcla de células con el fluido de las glándulas accesorias o cuando las células se depositan en el tracto femenino.

2.- Revisión bibliográfica

2.3.4.- INTERFERENCIA CON LAS TECNICAS DE REPRODUCCION ASISTIDA.

Uno de los principales problemas que presentan las Técnicas de Reproducción Asistida y que aún no se han resuelto, es como garantizar la ausencia total de microorganismos potencialmente patógenos en el semen utilizado.

La presencia de un microorganismo patógeno en el semen de un donante puede ocasionar en la mujer receptora cuadros infecciosos similares o incluso más graves que los originados por contacto sexual. Aunque este no es el motivo de esta tesis, si lo es el que la presencia de ureaplasmas en el semen del donante puede también producir fallos en la fertilización del oocito, como se ha notificado por distintos autores (79,123).

Igualmente, en 1984 se notificó (5) la transmisión de U.urealyticum por inseminación artificial con semen de donante.

En un reciente trabajo realizado por nuestro equipo en el Hospital Ramón y Cajal (99), en el que se analizaba el grado de contaminación de las muestras de semen destinadas a Inseminación Intrauterina antes y después del procesamiento de las mismas hemos comprobado que uno de los microorganismos más frecuentemente hallados fue U.urealyticum (en un 18,4% de los casos). Después del procesamiento del eyaculado, el microorganismo más frecuentemente hallado fue también Ureaplasma (20% de los casos). Se encontró una correlación positiva ($p < 0,001$) entre el título de ureaplasmas en semen y los encontrados después de procesar las muestras, ya que sólo en las muestras con un título mayor de 10^5 UCC/ml se recuperaron estos microorganismos.

En un estudio previo similar, Auriol (3) recuperó M.hominis en el 100% de los casos.

2.- Revisión bibliográfica

Jacques y colaboradores (65) demostraron que el semen de pacientes hipofértiles recogido tras micción y desinfección local rigurosas, contenía como bacterias más frecuentes Ureaplasma urealyticum (16,9%) y E.coli (11,2%). Curiosamente, en los eyaculados normales destinados a fecundación In vitro (FIV), se encontraron las mismas distribuciones de ureaplasmas.

Hill y colaboradores (56) estudiaron la influencia de los micoplasmas en el semen para Fecundación In Vitro (FIV), y no encontraron relación entre ureaplasmas y disminución de número y movilidad espermáticas. Los potencialmente patógenos micoplasmas estaban presentes durante la fertilización y pueden por eso colonizar el embrión en desarrollo con posibles efectos adversos.

En un reciente trabajo realizado por Montagut este mismo año (91) en el que se estudia la incidencia de ureaplasma en el semen sobre la FIV e implantación embrionaria, se demostró la presencia de ureaplasmas en el 42% de por lo menos uno de los dos compañeros de 238 parejas incluidas en un programa de FIV. En estas parejas, se observó una disminución significativa en cuanto al porcentaje de embarazo por trasplante de embrión, lo cual convierte a Ureaplasma urealyticum en un factor importante de riesgo que debe ser investigado.

Tanto las infecciones agudas con destrucción de tejidos, como las crónicas con lesiones en órganos genitales masculinos y femeninos, así como las alteraciones del eyaculado por colonización, sugieren que la patogenia del micoplasma produce infertilidad. Sin embargo, con el paso del tiempo, el concepto de Ureaplasma como agente etiológico de la infertilidad, ha sido cuestionado por varios grupos, como ya hemos podido comprobar, los cuales no han podido demostrar las diferencias entre parejas fértiles y aquellas con infertilidad idiopática en lo que respecta al Ureaplasma urealyticum.

2.- Revisión bibliográfica

Los factores que influyen en la variedad de datos y conclusiones obtenidas en estos estudios, pueden ser, entre otros, falta de rigor para la elección de los controles, inadecuada valoración de los pacientes infértiles y el uso de poblaciones relativamente pequeñas en algunos de los análisis llevados a cabo hasta el momento.

Debería realizarse una estadística a gran escala que relacione la colonización de micoplasmas genitales con la infertilidad, conteniendo un número suficiente de observaciones y adecuados detalles que proporcionen la información real en cuanto a la relación de este organismo con la infertilidad masculina.

2.- Revisión bibliográfica

2.4.- TRATAMIENTO ANTIBIOTICO

2.4.1.- CONSIDERACIONES GENERALES

Al tratar el tema del tratamiento antibiótico a elegir en las infecciones por micoplasmas, hay que considerar que los antibióticos tienen una difusión diferente en el aparato genital y en el semen, según su liposolubilidad. Son considerados como muy solubles las quinolonas, los macrólidos, el trimetoprim, la doxiciclina y el metronidazol entre otros. No alcanzan niveles adecuados los betalactámicos, los aminoglicósidos y la polimixina.

Los antibióticos no liposolubles pasan igualmente al semen, pero están menos concentrados que en el plasma, mientras que los liposolubles se concentran en el semen y son por ello en este caso más interesantes.

Por otra parte, puesto que los ureaplasmas carecen de pared celular, los antibióticos que actúan sobre ésta no tienen actividad, lo que incluye a los betalactámicos, vancomicina, fosfomicina y bacitracina. Puesto que los micoplasmas no sintetizan ácido fólico, las sulfamidas y trimetoprim, antagonistas del mismo, carecen de eficacia (76).

En general, los antibióticos que actúan por impedimento de la síntesis de proteínas tienen un máximo potencial de curación de las infecciones por micoplasmas. Sin embargo, la eritromicina es una excepción, pues aunque activa contra U.urealyticum, tiene una concentración inhibitoria mínima (CMI) contra M.hominis de más de 1000 µgr/ml (137). La tetraciclina y sus derivados han constituido la principal forma de tratamiento de las infecciones por M.hominis y U.urealyticum, aunque ocurre resistencia, como se comentará posteriormente (35, 138).

2.- Revisión bibliográfica

El antibiótico de elección frente a las infecciones por U.urealyticum más ampliamente utilizado es la doxiciclina, bacteriostático que actúa impidiendo la biosíntesis de proteínas, y que alcanza unos niveles séricos de 1 a 2 µgr/ml. En general, la susceptibilidad de U.urealyticum a la doxiciclina (CMI) oscila entre 0,005 y 1 microgramo por ml (108).

2.4.2.- REVISION BIBLIOGRAFICA

Swenson analizó los cambios en los parámetros seminales entre la visita inicial de los pacientes infectados con ureaplasmas, y las siguientes post-tratamiento antibiótico, describiendo una notable mejoría en la movilidad espermática cuando se erradicaban los ureaplasmas del semen. (129)

Toth y Lesser (142) demostraron que la terapia antibiótica (sobre todo la doxiciclina frente a la tetraciclina), mejora la calidad del semen (movilidad, número y morfología) cuando se aísla U.urealyticum, y que los cultivos subsiguientes para el organismo deben decidir el punto final de la terapia, ya que pueden aparecer cepas resistentes a doxiciclina y tetraciclina.

No obstante, estos autores no proporcionaron información sobre el efecto de tal terapia en varones que no tenían ureaplasmas, o el efecto de un placebo en varones cuyas muestras de semen contenían ureaplasmas.

Los pacientes cuyos cultivos de líquido seminal permanecen positivos para Ureaplasma después de la terapia antibiótica poseen, según estos autores una peor morfología en términos de incremento de formas espermáticas ovals. Este cambio no debe suceder al paso del semen por la uretra, y se postula un efecto directo en los testículos, o por el ureaplasma resistente o por el antibiótico en sí mismo.

2.- Revisión bibliográfica

En base a sus resultados de aislamiento, Gnarpe y Friberg (48), trataron parejas infértiles con doxiciclina durante la primera parte del ciclo menstrual a lo largo de cinco meses consecutivos. El 29% de las mujeres concibieron a los pocos meses de la erradicación de los ureaplasmas.

Harrison (51), realizó una experiencia a doble ciego, tratando con doxiciclina y realizando posteriores controles a 88 parejas con infertilidad primaria de causa desconocida. Aunque a los 28 días del tratamiento se erradicaban por completo M.hominis y ureaplasmas de las parejas que cursaban esta infección, el grado de concepción (16%) no era mayor en aquellas tratadas con el antibiótico que en las no tratadas. Estos investigadores concluyen que los micoplasmas no están asociados con la infertilidad primaria y que aunque la doxiciclina los erradicaba, no beneficiaba la esterilidad primaria de causa desconocida. Estos datos estaban apoyados en los aportados por Upadhyaya y colaboradores (147).

Busolo y col. (15) dieron doxiciclina durante 30 días a parejas en las cuales el varón transportaba ureaplasmas en el semen y eran infértiles. De 41 parejas tratadas, mejoraba la movilidad espermática y disminuía el número de colas enrolladas en 12 pacientes. La concepción ocurrió en 5 de 19 parejas que eran ureaplasma negativo, pero en ninguna de las restantes 22 parejas que permanecieron ureaplasma positivo.

Según Busolo, la terapéutica antibiótica aplicada a pacientes con infección por ureaplasmas permitirá, no solamente mejorar la movilidad de los gametos, sino obtener que el germen sea eliminado.

En dos últimos estos estudios, la falta de controles adecuados imposibilita la interpretación y la significancia de los resultados, particularmente, en vista del fallo de otros autores para mostrar que la terapia con tetraciclina es efectiva para ayudar en la concepción a parejas infértiles.

2.- Revisión bibliográfica

Brunner y col. (14) encontraron titulaciones elevadas de U.urealyticum en secreciones prostáticas obtenidas por masaje y orina posterior al mismo en 82 de 597 (14%) pacientes con prostatitis crónica. Estos individuos fueron tratados con tetraciclina durante 14 días y 61 (86%) estaban libres de síntomas y con desaparición de los microorganismos 14 días después de terminar el tratamiento. En este estudio no se trató a los compañeros sexuales de los pacientes, ni tampoco se investigó a los ureaplasmas en cuanto a resistencia a tetraciclinas, que se sabe ocurre en casi el 10% de los casos que se aíslan (138).

Por el contrario, Hellstron y colaboradores, opinan que el tratamiento antibiótico no influye sobre la hipofertilidad de los varones examinados, los cuales no presentaban ninguna anomalía de los parámetros espermáticos a pesar de la infección por ureaplasmas (54).

2.4.2.- RESISTENCIA DE UREAPLASMA A LOS ANTIBIOTICOS.

Se conocen cepas de Ureaplasmas resistentes a la terapia antibiótica, sobre todo a eritromicina y tetraciclinas (13, 120).

En un estudio realizado en varones con uretritis no gonocócica que se hizo entre 1973 y 1976, el 10% de las cepas son resistentes a tetraciclina (35). Un estudio similar realizado de 1983 a 1984 no mostró cambios en esta cifra (53).

Para conocer la sensibilidad de las cepas de Ureaplasma urealyticum a los diferentes antibióticos, los investigadores utilizan un número diferente de microorganismos en los test y diferentes períodos de incubación. Aunque se aboga por la estandarización de los métodos, y de hecho se practica, estos factores, y particularmente el último, contribuyen a la variación en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) publicadas para cada antibiótico en particular.

2.- Revisión bibliográfica

La CMI antimicrobiana para cepas de Ureaplasma obtenidas de pacientes después del tratamiento con antibióticos considerados efectivos, como las tetraciclinas, son marcadamente mayores que las CMIs de aquellas cepas aclaradas por el tratamiento(35).

En el Cuadro 13 se muestran las CMIs de los principales antibióticos utilizados frente a Ureaplasma urealyticum según Taylor-Robinson (138).

Cuadro 13.- Susceptibilidad de Ureaplasma urealyticum a varios antimicrobianos

<u>Antimicrobiano</u>	<u>CMI(μg /ml)</u>
Doxiciclina	0,05 - 1
Tetraciclina	0,05 - 0,8
Eritromicina	0,1 - 0,6
Rosaramicina	0,004

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- MUESTRAS DE SEMEN

3.1.1.- PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Este estudio se ha realizado con un grupo de 6 donantes de semen seleccionados al azar de nuestro Banco de Semen del Hospital Ramón y Cajal y del Banco de Semen de la Clínica del Dr. Caballero Peregrín.

Todas las muestras empleadas provienen de donantes sanos, con edades comprendidas entre 20 y 24 años, a los que previamente se les ha sometido a un estudio urológico completo que incluye estudios microbiológicos en semen y orina, así como determinación de presencia de anticuerpos y/o antígenos en suero, con el fin de descartar cualquier tipo de infección o patología uroandrológica.

Las muestras de semen se han obtenido por masturbación utilizando para su recogida recipientes de plástico estériles. El período de abstinencia sexual recomendado oscila entre 3 y 5 días. Previa a la obtención de la muestra, se ha instruido a los donantes para una correcta higiene de manos y genitales, así como en la necesidad de una micción anterior al eyaculado, tratando de reducir de esta forma cualquier tipo de contaminación del semen.

Después de la licuación a temperatura ambiente del eyaculado e inmediatamente después de la misma, se divide la muestra en dos alícuotas: una para efectuar un seminograma y otra para congelación. Para ello utilizamos pipetas estériles de plástico (10 ml) con bulbo (Becton Dickinson and Company, cat.no. 5878) y tubos de plástico estériles (Nunc Centrifuge Tubes, 11 ml y 1 ml, Lab Clinics).

3.- Material y Métodos

3.1.2.- METODOLOGIA DE CONTRASTACION

Todas las observaciones se han realizado por un único observador siguiendo las técnicas de Eliasson (33) de la manera siguiente:

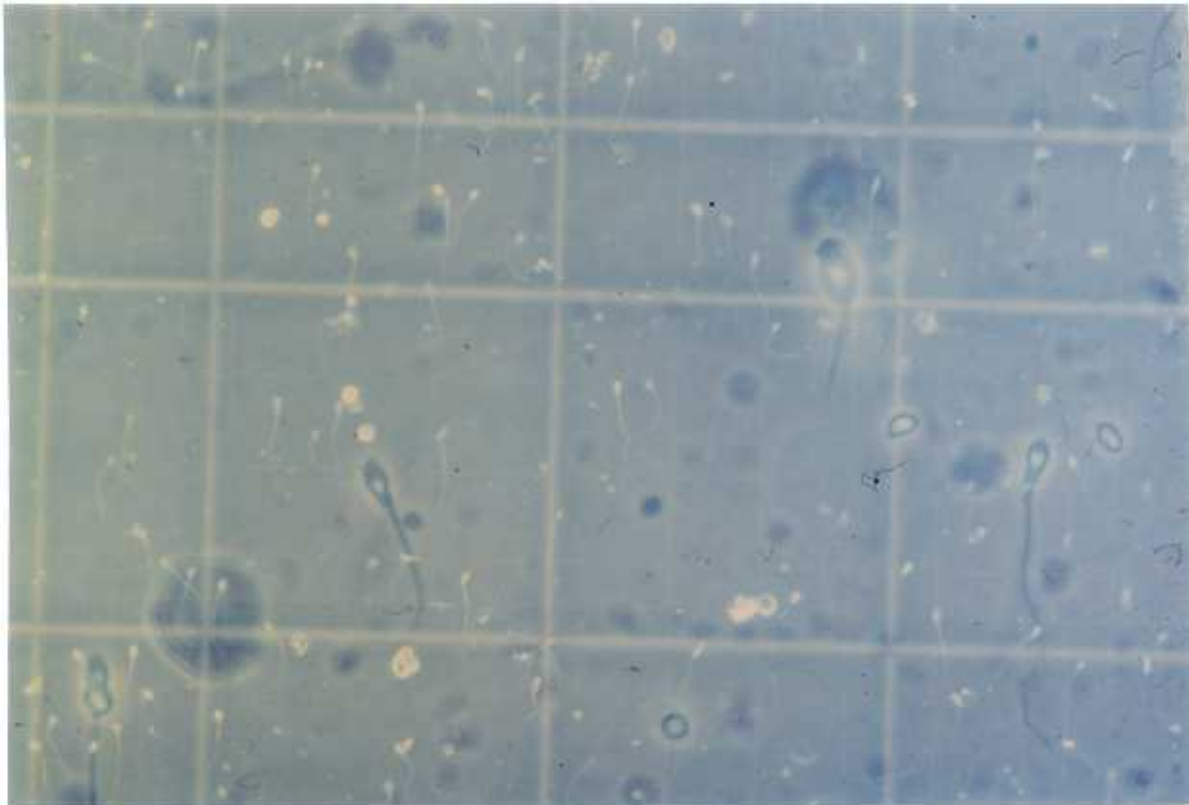
-Inmediatamente después de la licuación determinamos la MOVILIDAD espermática colocando una gota de semen entre porta y cubre, y examinamos al menos 10 campos al microscopio (Optiphot, Nikon) a 400x para comprobar la movilidad activa (+ + +) o de desplazamiento rectilíneo, la movilidad pasiva (+--) o sin progresión rectilínea, y los espermatozoos inmóviles. Los porcentajes se calculan del total de células observadas (45).

-El RECUENTO espermático (millones de espermatozoos por mililitro), se calcula en un hemocitómetro 1:10 y una cámara de Neubauer (ProLaboratorios), utilizando como diluyente la eosina (Sigma Chemical Comany). (Fotografía 3)

-Para determinar MORFOANOMALIAS espermáticas se ha empleado la técnica de Papanicolaou como ha descrito Freund (39). Los espermatozoos se consideran anómalos si presentan cualquiera de las siguientes características:

- .cabeza anormal (grande, pequeña, piriforme, fusiforme, doble, amorfa)*
 - .segmento intermedio engrosado, vacuolado o angulado*
 - .flagelo corto, doble o enrollado*
 - .mixtas (cualquier combinación de las anteriores)*
- (Fotos 4,5,6 y 7 y 8)*

3.- Material y Métodos



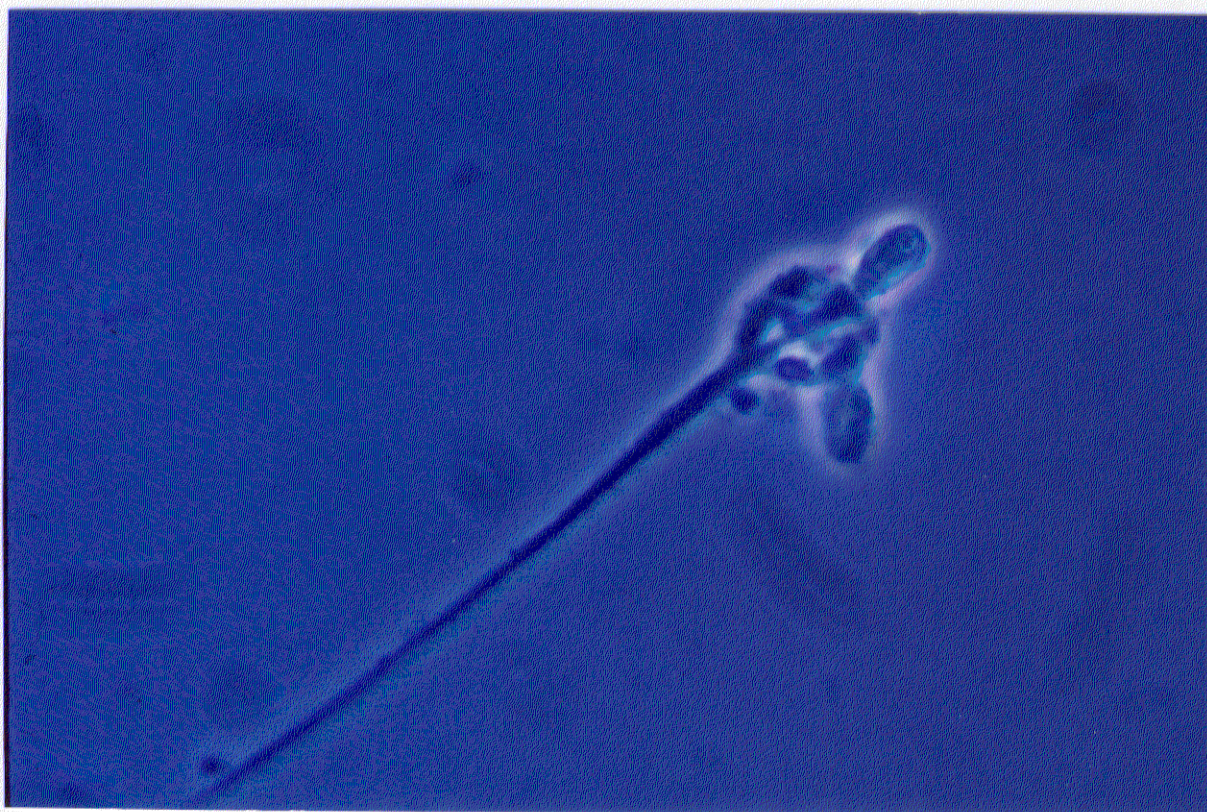
*Fotografía 3.- Cámara de Neubauer para recuento de espermatozoos.
(400 x)*

3.- Material y Métodos



Fotografía 4.- Espermatoozo con morfoanomalía de cabeza (microcéfalo o cabeza asténica) (Tinción de Papanicolaou, 400 x)

3.- *Material y Métodos*



*Fotografía 5.- Espermatozoo con el segmento engrosado
(Microscopio de Interferencia de Nomarski, 1000 x)*

3.- *Material y Métodos*

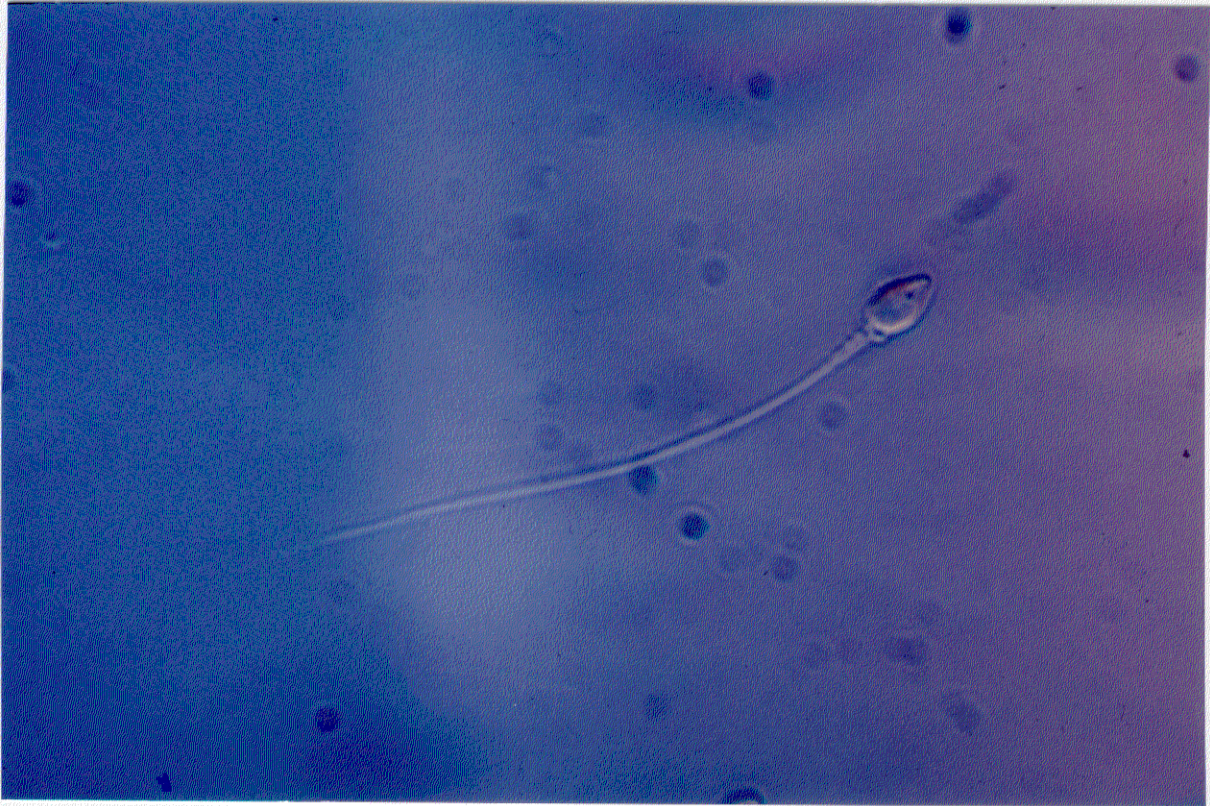


*Fotografía 6.- Espermatozoo con flagelo doble
(Tinción de Papanicolaou, 400 x)*

3.- Material y Métodos

*Fotografía 7.- Espermatozoo con alteración mixta: cabeza y segmento
(Microscopio de Interferencia de Nomarski, 1000 x)*

3.- *Material y Métodos*



*Fotografía 8.- Espermatozoo morfológicamente normal
(M.I.Nomarski, 1000 x)*

3.- Material y Métodos

-El test de PERMEABILIDAD DE MEMBRANA, HOS test o prueba de Endósmosis, que valora la integridad de la membrana espermática en una solución hiposmótica se ha realizado según técnica de Vázquez (149) y Jeyendran (66). Tipificamos los espermatozoos en tres grupos (Figura 1).

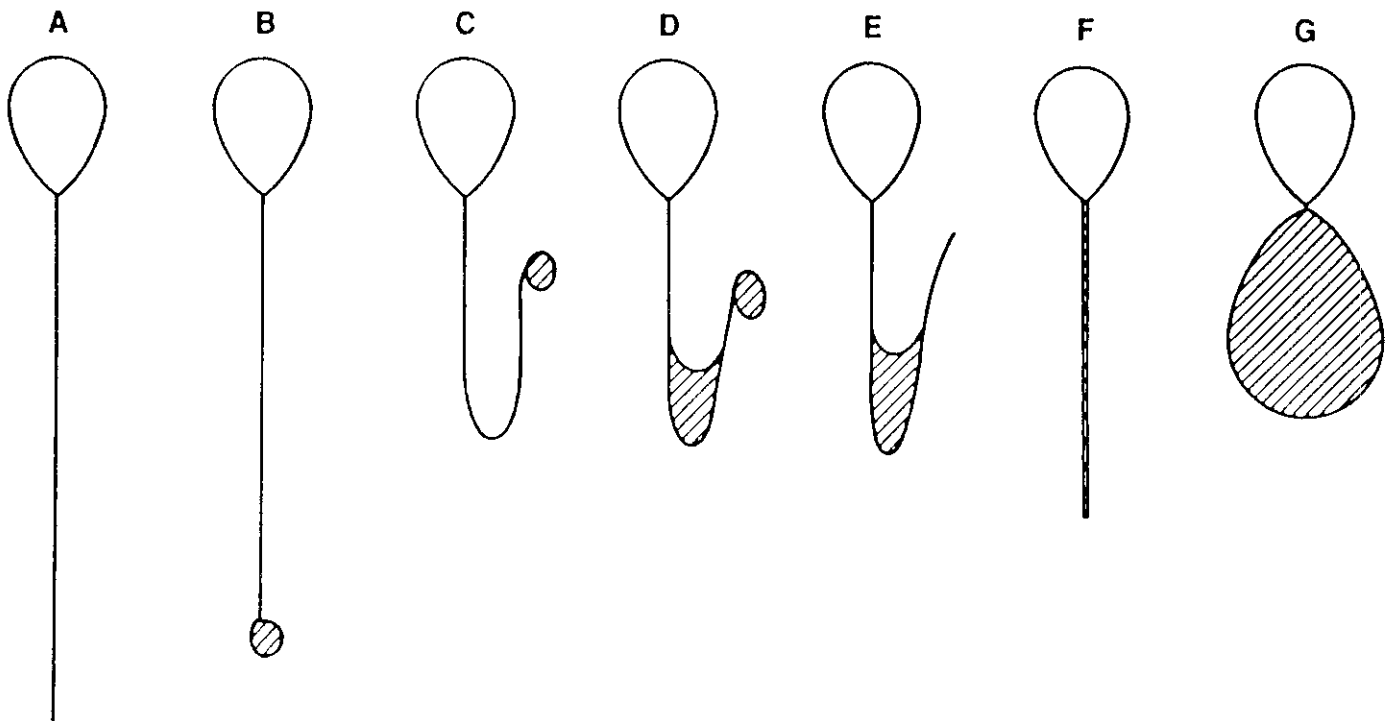
.Espermatozoos con endósmosis negativa (presentan alteraciones en la permeabilidad de la membrana), aparecen con el flagelo en forma convencional (Figura 1- a)

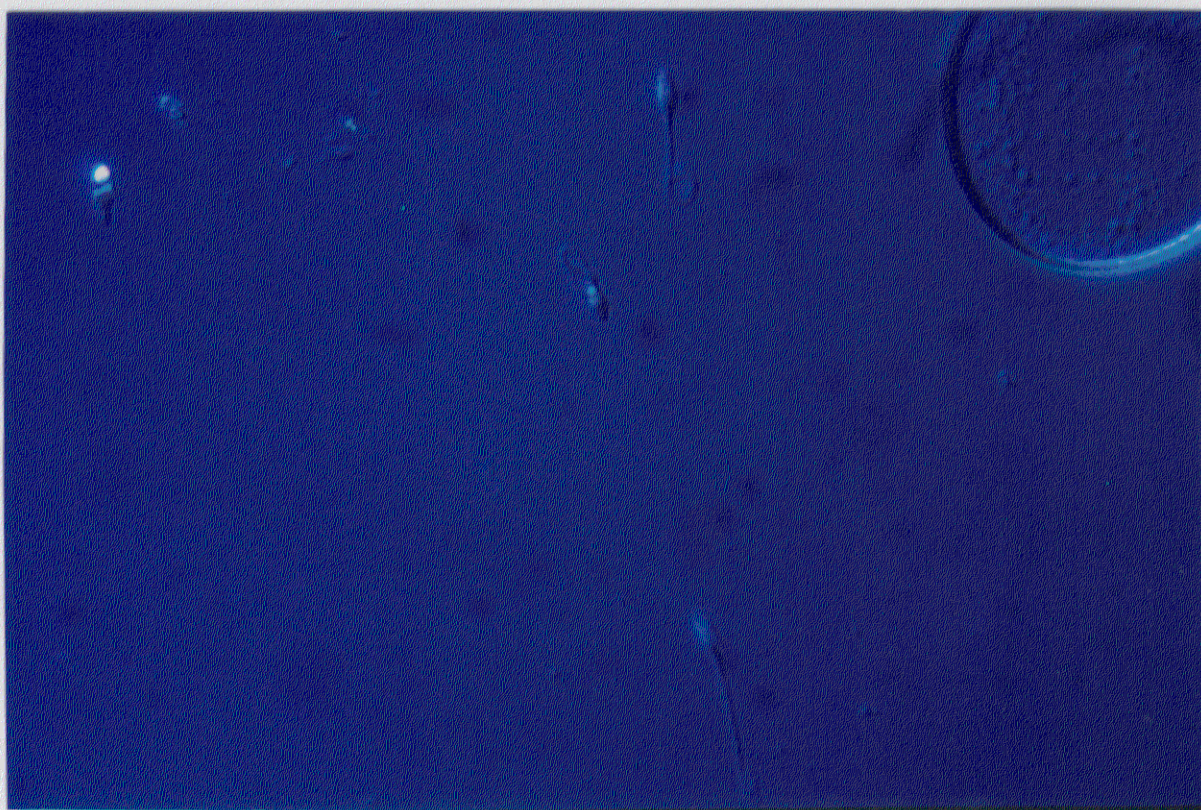
.Espermatozoos con endósmosis positiva (con la permeabilidad de la membrana adecuada). Puede ser parcial (Figura 1-b, 1-c) o total (Figura 1-d, 1-e, 1-f, 1-g), según observemos el flagelo parcial o totalmente doblado.

En esta prueba utilizamos el microscopio de contraste de fases (400 x, pH 3) (Optiphot, Nikon). (Fotografías 9 y 10)

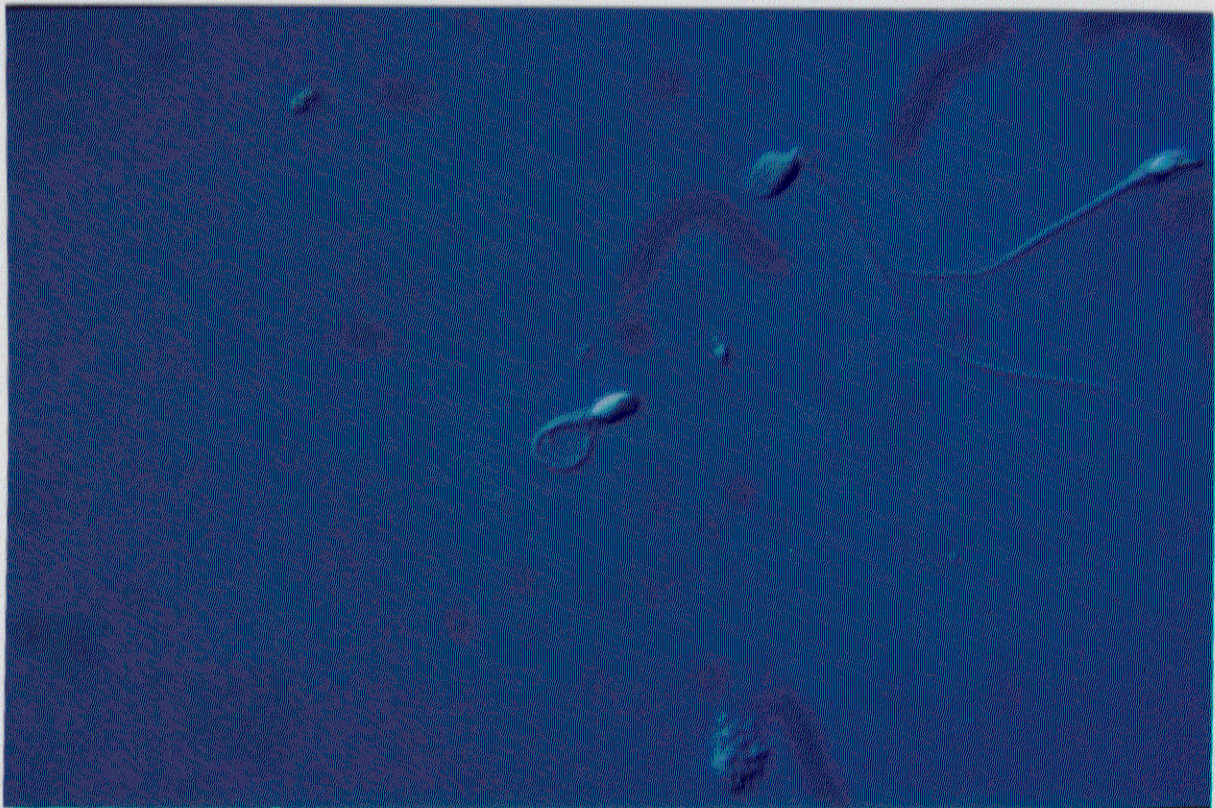
3.- Material y Métodos

FIGURA 1: TEST DE ENDOSMOSIS: CAMBIOS MORFOLOGICOS QUE SUFREN LOS ESPERMATOZOOS SOMETIDOS A UN CHOQUE HIPOOSMOTICO.



3.- Material y Métodos

*Fotografía 9.- Espermatozoos en solución hipoosmótica con endósmosis positiva total y parcial .
(M. Contraste de Fases, pH 3, 400 x)*

3.- Material y Métodos

*Fotografía 10.- Espermatozoos en solución hipoosmótica con endósmosis positiva y negativa.
(M. Contraste de Fases, pH 3, 400 x).*

3.- Material y Métodos

Las muestras de semen aceptadas en este estudio presentan:

- concentración espermática entre 75 y 120 millones/ml*
- movilidad activa entre 60-70%*
- más de 60% de los espermatozoos morfológicamente normales.*
- más del 60% de los espermatozoos con endósmosis positiva*

El resto del eyaculado se diluye a una concentración 1:1 en TesT glicerol - yema de huevo y se congela en nitrógeno líquido a -196 °C según técnica de Sawada y Ackermann (110), durante 2 semanas , tiempo después del cual las muestras destinadas al experimento se descongelaban durante 3 minutos a 37° C al bañomaría, (Heraeus)

3.- Material y Métodos

3.1.3.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El tratamiento empleado en cada una de las experiencias realizadas es el siguiente:

-Utilizamos 1 ml de semen descongelado y diluido al que le añadimos 2 ml de medio Menezo B2 (Biomerieux, Lyon, Francia). Para ello se emplean tubos de plástico estériles de 15 ml (Falcon, Becton Dickinson, Cowley, UK).

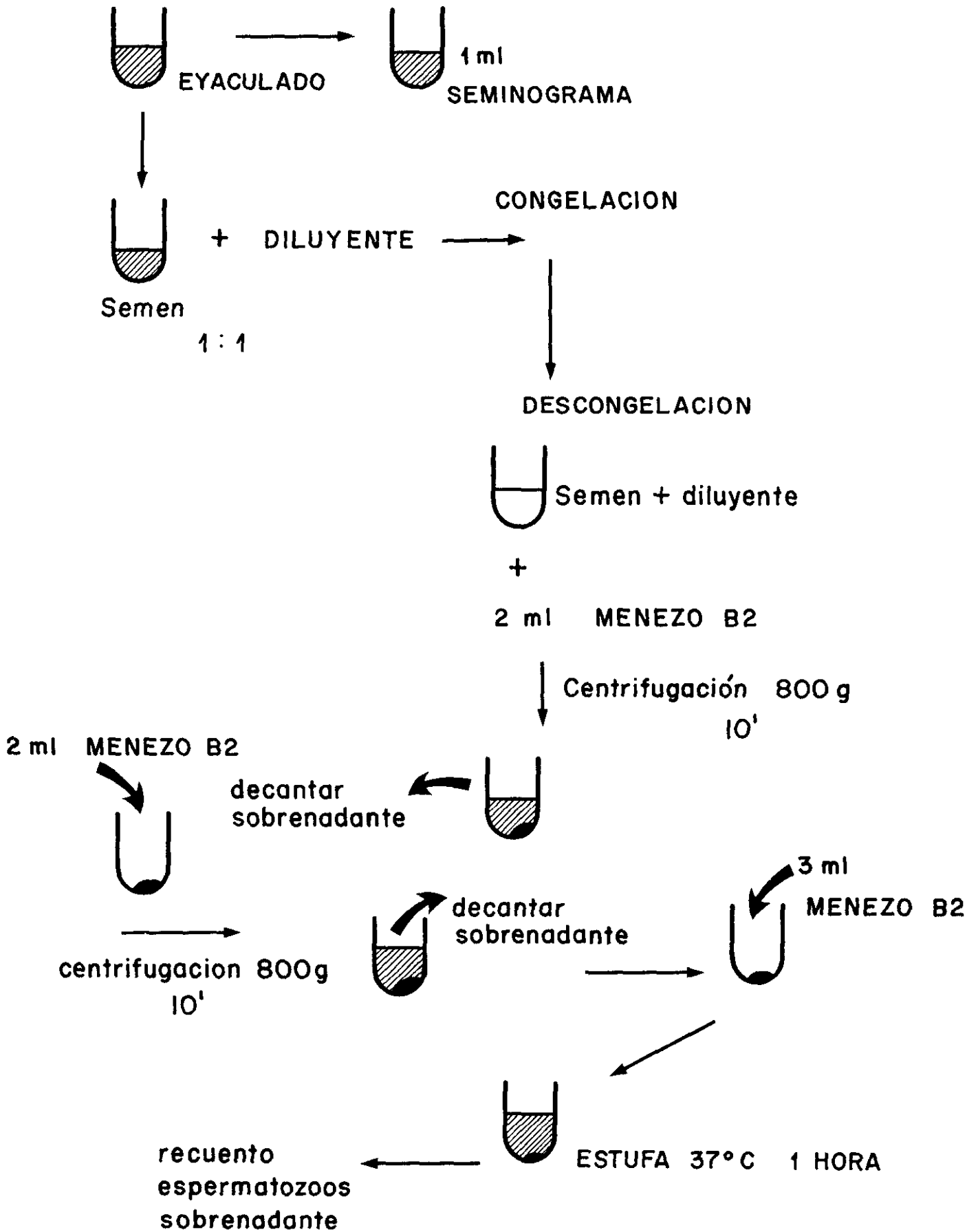
-Centrifugamos las muestras durante 10 minutos a 800 g (Medifuge, Heraeus Sepatech) y decantamos el sobrenadante .

-Se repite el proceso una vez más, para finalmente añadir al sedimento 3 ml de medio Menezo.

-La muestra se lleva a la estufa durante una hora a 37 C (Heraeus).

-Al cabo de este tiempo, realizamos un recuento de los espermatozoos hallados en el sobrenadante, con lo que obtenemos una concentración espermática conocida. (Figura 2)

FIGURA 2: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SEMEN.



3.- Material y Métodos

3.2.- MATERIAL MICROBIOLÓGICO

3.2.1.- CEPAS EMPLEADAS

Utilizamos dos cepas de Ureaplasma urealyticum. La primera de ellas, 1867 PR se ha aislado de muestras de semen de un paciente con prostatitis (90) en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, y la segunda, una cepa de colección, la DKF-4. Ambas cepas, congeladas a -70° C en nevera (Koxka), se descongelan al baño maría durante 10 minutos para su posterior crecimiento.

3.2.2.- CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO:

Todo el proceso de contaminación del semen con los microorganismos se realiza en campana de aislamiento (Captair Química Tipo C, Gruma), para evitar contaminaciones.

El medio de crecimiento empleado (Medio 10-C)(118) es el siguiente:

- Caldo de cultivo sin cristal violeta (PPLO) : 70 ml
(DIFCO, Laboratories, Detroit, MI, USA)
- Extracto de levadura al 25% : 10 ml
- Suero de caballo (Labclinics): 20 ml
- Urea al 10% : 1 ml
- Rojo fenol al 0.1% : 1 ml
- Ampicilina (de 200 mg/ml): 0.5 ml
- Acido clorhídrico: se añaden unas gotas hasta que el pH alcance 6-6,5.
- L cisteína hydrochloride al 2% : 0,3 ml
- CVA enrichment (Gibco): 1 ml
- GHL tripeptide (2 µgr/ml) : 1 ml

3.- Material y Métodos

La mezcla se homogeiniza utilizando una botella Bijou y cuidando que el líquido no roce el tapón.

Para comprobar la esterilidad del medio de cultivo se inocula una gota del mismo en agar sangre y se incuba en estufa a 37°C en condiciones aerobias.

3.2.3.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Utilizamos 4 tubos Falcon de 30 ml con 0,6 ml de la cepa de Ureaplasma urealyticum con un crecimiento de ++-. Los tubos se incuban durante 12 horas, tiempo después del cual se centrifugan durante 15 minutos a 800 x g y 4° C (centrífuga refrigerada Beckman, modelo TJ-6), para concentrar la cepa. Posteriormente, se elimina el sobrenadante y se recogen todos los sedimentos incorporándolos a otro tubo con 1 ml de medio urea. Para todo ello utilizamos pipetas serológicas de 10 ml (VOLAC, Labclinics).

La mezcla se homogeiniza con el Vortex.

A continuación, y de esta mezcla, tomamos 3 alícuotas :

- 1.- Para realizar una titulación por diluciones decimales.*
- 2.- Para inocular en placa agar A7 para detectar crecimiento de micoplasmas.*
- 3.- Para inocular en placa agar sangre y detectar contaminación bacteriana.*

3.- Material y Métodos

Tanto para realizar las titulaciones como para las inoculaciones en placa, utilizamos un asa calibrada de platino (1/400) estéril y una pipeta automática Eppendorf de 0,1 ml. Todo el material se lleva a incubar a la estufa a 37° C en condiciones aerobias excepto la placa de agar A7 que se incuba en un recipiente anaerobio con atmósfera de dióxido de carbono/hidrógeno (Gas PAK, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, USA).

3.2.4.- COMPROBACION DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

A las 24 horas de incubación comprobamos el crecimiento bacteriano. La identificación de Ureaplasma urealyticum está basada en su capacidad para hidrolizar la urea. El indicador, el rojo fenol, detecta el viraje de pH del medio provocando un cambio de color de amarillo en rosa brillante, indicando la acumulación de amonio que resulta de la degradación de la urea. (Fotografía 2, pag. 12)

Si ocurre un cambio de color del medio, replicamos el cultivo con un nuevo vial y una nueva placa de agar A7.

Para controlar el crecimiento de Ureaplasma se vuelven a realizar diluciones decimales.

De nuevo todo el material se incuba a +37° C en estufa.

El medio de agar diferencial A7 contiene sulfato de manganeso el cual detecta los productos de degradación de la urea directamente o en las colonias de Ureaplasma urealyticum. Las colonias de Ureaplasma son de tamaño variable en el agar A7 y aparecen con un color marrón oscuro.

3.- Material y Métodos

Una muestra se considera positiva para Ureaplasma urealyticum cuando ambos viales con el medio de crecimiento viran a color rosa, y el agar A7 demuestra inequívocamente la presencia del microorganismo.

Las placas de agar sangre se examinan a las 48 horas para detectar potenciales contaminantes que pudieran enmascarar las reacciones del cambio de color del medio.

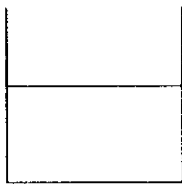
El crecimiento del microorganismo se se controla a distintos tiempos de incubación por diluciones logarítmicas.

Se han obtenido crecimientos desde 10^5 hasta 10^7 U.C.C/ml. Este último es el máximo de colonias que se obtienen de Ureaplasma urealyticum.

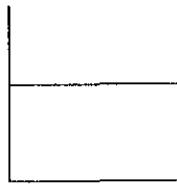
3.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.1.- EXPERIMENTO I

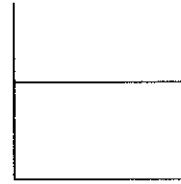
3.3.1.1.- Descripción del experimento



*Tubo 1
Control*



*Tubo 2
Problema*



*Tubo 3
Control ureaplasma*

Preparamos 3 tubos de la siguiente forma:

TUBO 1: *(Control semen): Contiene una alícuota de semen con una concentración conocida de espermatozoos más 3 ml de medio urea.*

TUBO 2: *(Problema): Tiene el mismo volúmen de semen a la misma concentración espermática del tubo control semen, más 3 ml de medio urea con ureaplasmas con un título conocido (U.C.C/ml), con lo cual obtenemos una proporción determinada de ureaplasmas por espermatozoo.*

- **TUBO 3** *(Control microorganismo): Contiene 3 ml de medio urea con ureaplasmas con el mismo título del tubo Problema, más disolución salina para completar el volúmen.*

3.- Material y Métodos

A continuación realizamos un análisis completo de los siguientes parámetros para determinar las condiciones basales:

- .Concentración espermática: Tubo 1
- .Movilidad espermática: Tubos 1 y 2
- .Morfoanomalías: Tubos 1 y 2
- .Test de endósmosis: Tubos 1 y 2
- .Densidad bacteriana por titulaciones decimales:Tubos 2 y 3.

A las 2, 4 y 24 horas de incubación en estufa a 37° C se realiza la determinación de los mismos parámetros, excepto la concentración espermática.

3.3.1.2.- Cálculos de ajuste de concentraciones

Tras la incubación de Ureaplasma urealyticum con medio de crecimiento, las concentraciones de ureaplasmas oscilan desde 10^5 hasta 10^7 U.C.C/ml.

Las muestras de semen lavadas con Menezo B2 nos ofrecen concentraciones de entre 2 y 8 millones de espermatozoos por ml. Las muestras de semen no sometidas al proceso de lavado oscilaban entre 50 y 120 millones de espermatozoos por mililitro.

Para obtener concentraciones conocidas de ureaplasmas/esp. mantenemos constante el volumen de medio urea + ureaplasmas en 3 ml y variabamos el volumen de medio + espermatozoos en función de la proporción de U.u/esp que quisiéramos obtener.

De esta forma conseguimos concentraciones desde 2 U.C.C/esp hasta 50 U.C.C/esp. (2, 3, 4, 5, 10, 25, 30, 40 y 50 U.C.C/esp)

3.3.1.3.- Variaciones dentro del experimento

En las mismas condiciones descritas anteriormente, hemos realizado las siguientes variaciones con el fin de poder comparar los resultados obtenidos:

- . Utilización de las cepas 1867 PR y DKF-4 de Ureaplasma urealyticum*
- . Muestras de semen de distintos donantes o una sólo muestra para todos los experimentos.*
- . Muestras de semen fresco (sin lavar) o congeladas y descongeladas (lavadas con medio de cultivo).*
- . Muestras de semen lavadas con Menezo B2 o con el medio urea de crecimiento bacteriano.*
- . Muestras de semen control solo con espermatozoos (Tubo 1), o con ureaplasmas inactivados más espermatozoos.*

3.- Material y Métodos

De esta forma se han llevado a cabo las líneas de trabajo siguientes:

a) LINEA I

Se han realizado un total de 31 experiencias, 10 con U.urealyticum DKF-4 y 21 con U.urealyticum 1867 PR con las siguientes concentraciones de ureaplasmas por espermatozoo:

2, 3, 4, 5, 10, 25, 30, 40 y 50 U.C.C/esp.

En esta línea se han utilizado muestras de semen congeladas-descongeladas y lavadas con Menezo B2.

Se utiliza una cepa de colección, la DKF-4 y otra aislada del Hospital Ramón y Cajal para conocer si existen diferentes resultados dependiendo de la cepa empleada.

b) LINEA II

Consta de 12 experiencias con U.urealyticum 1867 PR a las mismas concentraciones de U.C.C/esp de la línea I , utilizando un solo eyaculado de un único donante, lavadas con Menezo B2, para conocer la repetitividad de los resultados y descartar variaciones debidas a la utilización de distintos eyaculados.

3.- Material y Métodos

c) LINEA III

Se llevaron a cabo 10 experimentos con U.urealyticum 1867 PR con muestras de semen sin congelar y sin lavar (semen "fresco"), a las mismas concentraciones de las líneas anteriores, con el fin de conocer si se reproducen los resultados en eyaculados no sometidos a congelación -descongelación y al proceso del lavado.

d) LINEA IV

Se han realizado un total de 9 experiencias con Ureaplasma 1867 PR y muestras de semen lavadas con medio urea a las mismas concentraciones de la líneas anteriores, para saber si las muestras lavadas con el medio urea ofrecen el mismo resultado que con el medio Menezo B2.

e) LINEA V

Realizamos 9 experiencias con U.urealyticum 1867 PR y muestras de semen lavadas con Menezo B2 a las mismas concentraciones anteriores, añadiendo un nuevo tubo igual que el Control semen pero al que añadimos el sobrenadante de medio urea + ureaplasmas previamente inactivados por calor a 56° C durante 30 minutos. De esta forma, intentamos conocer si los ureaplasmas previamente inactivados ejercen algún efecto sobre los espermatozoos.

3.- Material y Métodos

3.3.2. EXPERIMENTO II

Además de los tubos empleados en el Experimento I añadimos 2 viales más:

TUBO 4 (Control antibiótico): Contiene una concentración conocida de espermatozoos (la misma que los tubos 1 y 2) más doxiciclina en medio urea (1 $\mu\text{gr/ml}$)

TUBO 5: (Antibiótico problema): Contiene la misma concentración espermática que los tubos anteriores más 3 ml de ureaplasmas en medio urea (con el mismo título de los tubos 2 y 3 más doxiciclina en medio urea (1 $\mu\text{gr/ml}$))

Utilizamos como antibiótico de elección la doxiciclina, ya que ha sido previamente probado en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las dos cepas de ureaplasmas empleadas en este estudio, con una C.M.I de 1 $\mu\text{gr/ml}$ (92).

Se han realizado un total de 12 experiencias, 8 con U.urealyticum 1867 PR y 4 con U.urealyticum DKF-4, todas ellas con muestras de semen lavadas con Menezo B2. Las concentraciones finales de Ureaplasmas/espermatozoos fueron: 10, 30, 40 y 50 U.C.C/esp.

Como en el Experimento I, se realizan determinaciones de los parámetros espermáticos en condiciones basales y a las 2, 4 y 24 horas de incubación en estufa a 37° C.

3.- Material y Métodos

3.3.3.- EXPERIMENTO III

Las muestras Control (Tubo 1) y Problema (Tubo 2), del Experimento I, una vez incubadas durante 24 horas a 37 C se les somete al siguiente tratamiento, según técnica de Fowlkes y Busolo (44,16).

.Centrifugación en Tampón Fosfato 0,1 M , pH 7,2 durante 3 minutos a 600 x g (Medifugue, Heraeus). Este proceso se realiza dos veces.

.Una vez lavadas dos veces las muestras, se fijan en glutaraldehído al 5% (Sigma), durante media hora.

.Centrifugación a 900 x g durante 5 minutos

.Resuspensión en cacodilato sódico 0,1 M., pH 7,2 (Sigma)

.Se realizan dos nuevos lavados a 900 x g durante 3 minutos con cacodilato sódico.

.Las muestras se deshidratan durante 5 días en acetona al 50%, 70%, 90%, 95%, y 100% en estufa a 60°C.

.Se recubren las muestras con oro.

.Aplicamos un potencial negativo al cátodo de oro, el cual está encerrado en la cámara procesadora a una presión de 50 a 5000 mltor.

.Las muestras se observan usando un microscopio Electrónico de Barrido (Jeol, 100 cx), equipado con una apertura de 250 μ m y operando con un voltaje de aceleración de 25 KV.

.Las fotografías se realizaron con una cámara adaptada al microscopio (Polaroid 545 LAND FILM HOLDER).

3.4.- ANALISIS ESTADISTICO

3.4.1.-EXPERIMENTO I

Analizamos en las 71 experiencias realizadas en total, la influencia de las variables que exponemos a continuación en los parámetros espermáticos siguientes:

Variables

- Cepa de Ureaplasma
- Tiempo de incubación
- Concentración bacteriana

Parámetros espermáticos

- Movilidad progresiva
- Permeabilidad de la membrana
- Morfología espermática

Para ello efectuamos un contraste bilateral o comparación de medias utilizando como método estadístico el test de Kolmogorov-Smirnov o prueba de bondad de ajuste a una distribución normal (21).

Este test, compara la distribución esperamental acumulativa con la distribución teórica, también acumulativa. Se determina el punto en que ambas muestran mayor desajuste y se calcula si existe probabilidad de tanta divergencia, y si el azar es capaz de explicarla. Los valores límites para $p = 0,05$ y $p = 0,01$ se encuentran tabulados. Desajustes mayores serán excesivos y harán rechazar la hipótesis nula de que no hay diferencia. Se calcula en valor absoluto, sin atender al signo, la divergencia mayor entre ambas distribuciones, teórica y experimental, en frecuencias relativas acumuladas y se consulta después la tabla.

3.- Material y Métodos

3.4.1.1.-**Contraste bilateral entre las dos cepas**

Analizamos un total de 31 casos (línea I) en los que comparamos las medias entre las dos cepas para los siguientes parámetros:

- Movilidad espermática problema a las 2 y 4 horas de incubación.*
- Endósmosis negativa problema a las 2,4 y 24 horas de incubación.*
- Morfología problema a las 2,4 y 24 horas de incubación.*

3.4.1.2.-**Movilidad espermática en las muestras control y problema.**

Realizamos un contraste bilateral entre las medias de la movilidad control y problema en cada una de las 5 líneas del experimento de dos formas:

1) Comparación entre las medias de movilidad control y problema a las 2 y 4 horas de incubación para comprobar la influencia del tiempo de incubación con el microorganismo en la movilidad espermática.

2) Dividimos en cada línea todas las experiencias realizadas en dos grupos: con menos o igual a 10 U.C.C/espermatozoo y con menos o igual a 50 U.C.C/espermatozoo. Realizamos un contraste bilateral de medias de la forma anterior entre movilidad control y problema a las 2 y 4 horas de incubación con cada uno de estos subgrupos para comprobar la influencia de la concentración de ureaplasmas en la movilidad espermática.

3.- Material y Métodos

3.4.1.3.-Permeabilidad de la membrana espermática en las muestras control y problema.

Realizamos un contraste bilateral entre las medias de la endósmosis negativa control y problema en cada una de las 5 líneas del experimento de dos formas:

1) Comparación de medias de endósmosis negativa entre muestras control y problema a las 2,4 y 24 horas de incubación para comprobar la influencia del tiempo de incubación en la permeabilidad de la membrana espermática.

2) Dividimos en cada línea todas las experiencias realizadas en 2 grupos: uno con menos o igual a 10 U.C.C/espermatozoo y el otro entre 10 y 50 U.C.C/espermatozoo. En cada uno de estos grupos realizamos un contraste bilateral de medias entre endósmosis negativa control y problema a las 2,4 y 24 horas de incubación para comprobar la influencia de la concentración de ureaplasmas en la permeabilidad de la membrana espermática.

3.4.1.4.-Morfología espermática de las muestras control y problema.

Se comparan las medias entre los valores de morfología espermática control y problema en cada una de las líneas del experimento de dos formas:

1) Comparación de medias de formas espermáticas normales a las 2,4 y 24 horas de incubación entre las muestras control y problema, para comprobar la influencia del tiempo de incubación en la morfología espermática.

3.- Material y Métodos

2) Dividimos igualmente en cada línea las experiencias en dos grupos de menos o igual a 10 U.C.C/espermatozoo y menos o igual a 50 U.C.C/espermatozoo y comparamos las medias de formas espermáticas normales en cada subgrupo a las 2,4 y 24 horas de incubación para comprobar la influencia de la concentración de ureaplasmas en la morfología espermática.

3.4.1.5.-Concentraciones bacterianas.

Se calculan las medias de todas las concentraciones bacterianas (U.C.C/ml) en las 5 líneas del experimento en las muestras control y problema, para comprobar el crecimiento de los ureaplasmas a las 0, 1, 2, 3, y 4 horas de incubación.

3.- Material y Métodos

3.4.2.- EXPERIMENTO II.-

Hemos analizado en las 12 experiencias realizadas en total, la influencia del tiempo de contacto ureaplasma- espermatozoo y antibiótico en los mismos parámetros espermáticos del experimento I (movilidad, endósmosis, morfología).

Para ello, y al igual que en el experimento I efectúamos un contraste bilateral utilizando el método estadístico de Kolmogorov-Smirnov.

3.4.2.1.- **Movilidad espermática**

1.- En primer lugar efectúamos un contraste bilateral entre las medias de las movilidades control semen y problema a las 2 y 4 horas de incubación para conocer si existe alteración de la movilidad por efecto del ureaplasma.

2.- Realizamos una comparación de medias entre las medias de las movilidades control semen y control antibiótico a las 2 y 4 horas de incubación, para conocer la influencia del antibiótico sobre los espermatozoos.

3.- Comparamos las medias entre las movilidades control antibiótico y problema antibiótico a las 2 y 4 horas de incubación para conocer las variaciones de movilidad de las muestras problema con ureaplasmas y antibiótico.

4.- Comparamos las medias entre la movilidad de las muestras problema semen y problema antibiótico, para conocer la influencia del antibiótico sobre los ureaplasmas y la movilidad espermática.

3.- Material y Métodos

3.4.2.2.- **Permeabilidad de la membrana espermática.**

1.- *Comparamos las medias entre la endósmosis negativa control semen y problema a las 2, 4 y 24 horas de incubación para comprobar la influencia de los ureaplasmas en la permeabilidad de la membrana espermática .*

2.- *Se compararan las medias entre las endósmosis negativas control semen y control antibiótico a las 2, 4 y 24 horas de incubación, para conocer la influencia del antibiótico en la permeabilidad de la membrana espermática.*

3.- *Realizamos un contraste bilateral entre la endósmosis negativa de las muestras control antibiótico y problema antibiótico a las 2, 4 y 24 horas de incubación, para conocer el grado de afectación de la permeabilidad de la membrana espermática en las muestras con ureaplasmas y antibiótico.*

4.- *Se comparan las medias entre la endósmosis negativa problema y problema antibiótico a las 2, 4 y 24 horas de incubación para comprobar la influencia del tiempo de incubación con antibiótico en la permeabilidad de la membrana espermática frente a las muestras con ureaplasmas y espermatozoos.*

3.4.2.3.- **Morfología espermática.-**

1.- *Comparamos las medias entre las morfologías control y problema a las 2,4 y 24 horas de inubación para comprobar la influencia de los ureaplasmas en la morfología espermática.*

2.- *Comparamos las medias entre las morfologías de las muestras control semen y control antibiótico a las 2, 4 y 24 horas de incubación para conocer la influencia del antibiótico en la morfología espermática.*

3.- Material y Métodos

3.- *Comparamos las medias entre las morfologías de las muestras control antibiótico y antibiótico problema a las 2, 4 y 24 horas de incubación para conocer las alteraciones morfológicas producidas en las muestras con antibiótico y ureaplasmas.*

4.- *Se realiza una comparación entre las medias de las morfologías de las muestras problema semen y problema antibiótico a las 2, 4 y 24 horas de incubación, para conocer la influencia del antibiótico en los ureaplasmas y la morfología espermática.*

3.4.2.4.- **Concentración bacteriana.**

Se determina la concentración bacteriana (U.C.C/ml) de las muestras control microorganismo, problema y antibiótico problema de cada experiencia, a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas de incubación como control del crecimiento del microorganismo.

4.- RESULTADOS

4.- Resultados

4.1.- EXPERIMENTO I

4.1.1.-INFLUENCIA DE LA CEPA EN LOS PARAMETROS ESPERMATICOS.

Se comparan tanto por ciento de espermatozoos móviles, endósmosis negativa y formas morfológicamente normales entre las cepas 1867 PR y DKF-4.

No se han observado diferencias significativas al comparar las siguientes medias en las muestras Problema utilizando las cepas U.urealyticum 1867 PR y DKF-4.

-Porcentaje de espermatozoos móviles a las 2 horas

1867 PR (x: 35,9, DT: 15,5)

DKF-4 (x: 42,2, DT: 14,2) (Tabla I)

-Porcentaje de espermatozoos móviles a las 4 horas

1867 PR (x: 20,0, DT: 15,4)

DKF-4: (x: 24,0, DT: 13,4) (Tabla I)

-Tanto por ciento de endósmosis negativa a las 2 horas

1867 PR (x: 41,74, DT: 7,7)

DKF-4 (x: 38,9, DT: 6,5) (Tabla II)

-Porcentaje de endósmosis negativa a las 4 horas

1867 PR (x: 57,3, DT: 8,8)

DKF-4 (x: 52,8, DT: 8,8) (Tabla II)

4.- Resultados

-Porcentaje de endósmosis negativa a las 24 horas

1867 PR (x: 74,0, DT: 8,2)
DKF-4 (x: 72,3, DT: 10,0) (Tabla II)

-Tanto por ciento de espermatozoos morfológicamente normales a las 2 horas.

1867 PR (x: 62,1, DT: 7,4)
DKF-4 (x: 64,3, DT:6,2) (Tabla III)

-Tanto por ciento de espermatozoos morfológicamente normales a las 4 horas

1867 PR (x: 72,1, DT: 6,8)
DKF-4 (x: 70,8, DT: 7,1) (Tabla III)

-Porcentaje de espermatozoos morfológicamente normales a las 24 horas

1867 PR (x: 52,8, DT: 8,2) (Tabla III)
DKF-4 (x: 61,4, DT: 7,6)

4.1.2.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION Y LA CONCENTRACION DE UREAPLASMAS EN LA MOVILIDAD ESPERMATICA.

Comparando las medias entre el tanto por ciento de formas móviles de las muestras control y problema a las 2 y 4 horas de incubación en las 5 líneas del experimento obtenemos los siguientes resultados:

4.- Resultados

4.1.2.1.- Línea I (Tabla I: Porcentaje de espermatozoos móviles en las muestras control y problema a las 0, 2 y 4 horas de incubación a distintas concentraciones bacterianas).

a) Comparando las medias de todas las movilidades entre las muestras control y problema a las 2 horas de incubación, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$), con una menor movilidad en las muestras problema.

b) Se encontraron diferencias significativas al comparar todas las movilidades entre las muestras control y problema a las 4 horas de incubación ($p < 0,001$) (Significativamente mayor en los controles sin contaminar)

(Gráficos I y II)

c) Comparando las medias de las movilidades entre las muestras control y problema con < 10 U.C.C /esp a las 2 horas de incubación, se encontró una movilidad significativamente mayor en las muestras control sin contaminar ($p < 0,01$).

d) Se encontraron diferencias significativas al comparar las movilidades entre las muestras control y problema con < 10 U.C.C/ esperm. a las 4 horas de incubación, siendo menor en las muestras problema ($p < 0,01$).

(Gráficos III y IV)

e) Hemos encontrado diferencias significativas al comparar la movilidad entre las muestras control y problema a las 2 horas de incubación con > 25 U.C.C/esp, con mayor movilidad en las muestras control sin contaminar ($p < 0,01$).

f) Se han encontrado diferencias significativas, mayores en los controles, al comparar la movilidad entre las muestras control y problema a las 4 horas de incubación con > 25 U.C.C/esp ($p < 0,001$).

(Gráficos V y VI)

4.- Resultados

4.1.2.2.- Línea II (Tabla IV: Porcentaje de espermatozoos móviles en las muestras control y problema a las 0, 2, y 4 horas de incubación utilizando una sólo muestra de semen a distintas concentraciones bacterianas de U.urealyticum 1867 PR).

a) Comparando las medias de todas las movilidades entre las muestras control y problema a las 2 horas de incubación se encontraron mayores movilidades en las muestras control, de forma significativa ($p < 0,01$)

b) Comparando las medias de todas las movilidades entre las muestras control y problema a las 4 horas de incubación se encontraron movilidades significativamente inferiores en las muestras problema ($p < 0,001$)

(Gráficas VII y VIII)

c) No se han encontrado diferencias significativas comparando las medias entre las muestras control y problema con < 10 U.C.C/esp a las 2 horas de incubación.

d) Se han encontrado diferencias significativas al comparar las movilidades entre las muestras control y problema con < 10 U.C.C/esp a las 4 horas de incubación, siendo mayores en los controles sin contaminar ($p < 0,01$).

(Gráficas IX y X)

e) Se han encontrado diferencias significativas al comparar la movilidad entre las muestras control y problema a las 2 horas de incubación con > 25 U.C.C/esp, siendo mayor la movilidad en las muestras control ($p < 0,001$)

f) Hemos encontrado diferencias significativas, con mayor movilidad en los controles sin contaminar, al comparar la movilidad entre las muestras control y problema con > 25 U.C.C/esp a las 4 horas de incubación. ($p < 0,001$).

(Gráficos XI y XII)

4.- Resultados

4.1.2.3.- Línea III (Tabla VII: Porcentaje de espermatozoos móviles en las muestras control y problema a las 0,2,4 y 24 horas de incubación, utilizando muestras de semen fresco, sin lavar, a distintas concentraciones de U. urealyticum 1867 PR)

a) Se han encontrado movilidades significativamente mayores en los controles al comparar las medias entre todas las movilidades control y problema a las 2 horas de incubación ($p < 0.01$)

b) Se han encontrado diferencias significativas al comparar las medias de todas las movilidades entre las muestras control y problema a las 4 y 24 horas de incubación, siendo menor en las muestras problema ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente).

(Gráficas XIII y XIV)

c) Comparando las medias de las movilidades entre las muestras control y problema con < 10 U.C.C/esp a las 2 horas de incubación, se han encontrado diferencias significativas, siendo menor en las muestras problema ($p < 0,01$).

d) Se han encontrado diferencias significativas al comparar las movilidades entre las muestras control y problema con < 10 U.C.C/esp a las 4 y 24 horas de incubación (menor movilidad en las muestras problema) ($p < 0,01$)

(Gráficas XV y XVI)

e) Hemos encontrado movilidades significativamente inferiores en las muestras problema al comparar la movilidad entre las muestras control y problema a las 2 horas de incubación, con > 25 U.C.C/esp ($p < 0,01$)

f) Se han encontrado diferencias significativas al comparar la movilidad entre las muestras control y problema a las 4 y 24 horas de incubación con > 25 U.C.C/esp (mayor en las muestras control) ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente).

(Gráficas XVII y XVIII)

4.- Resultados

4.1.2.4.- Línea IV (Tabla X: Porcentaje de espermatozoos móviles de las muestras control y problema lavadas con medio urea, a distintas concentraciones de U.urealyticum 1867 PR).

a) *La movilidad de las muestras problema se ha encontrado significativamente menor al comparar las medias entre todas las movilidades control y problema a las 2 ($p < 0,01$) y a las 4 horas de incubación ($p < 0,001$).*

(Gráficas XIX y XX)

b) *Comparando las medias de las movilidades entre las muestras control y problema con menos o igual a 10 U.C.C/esp, no se han encontrado diferencias significativas a las 2 horas y significativas ($p < 0,01$) a las 4 horas de incubación.*

(Gráficas XXI y XXII)

c) *Se han encontrado diferencias significativas al comparar las movilidades entre las muestras control y problema a las 2 ($p < 0,01$) y a las 4 horas de incubación con más o igual a 25 U.C.C/esp, siendo menor la movilidad en las muestras problema ($p < 0,001$)*

(Gráficas XXIII y XXIV)

4.- Resultados

4.1.2.5.- Línea V (Tabla XIII: Movilidad espermática activa de las muestras control y control + Ureaplasma inactivado y Problema a distintas concentraciones de U.urealyticum 1867 PR)

a) No se han encontrado diferencias significativas al comparar los controles C1 y C2 a las 2 y 4 horas de incubación.

b) Se han encontrado diferencias significativas al comparar las medias de las movilidades Control 1 y Control 2 frente a la movilidad Problema a las 2 y 4 horas de incubación con $p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente (En todos los casos la movilidad era menor en las muestras problema).

(Gráficas XXV, XXVI y XXVII)

c) Se han encontrado diferencias significativas al comparar todas las medias de las movilidades control 1 y control 2 frente a las movilidades problema a las 2 ($p < 0,01$) y 4 horas de incubación con U.urealyticum menor o igual a 10 U.C.C/esp, siendo menor en las muestras problema ($p < 0,001$).

(Gráficas XXVIII, XXIX y XXX)

d) Se han encontrado diferencias significativas (menor movilidad en las muestras problema), al comparar todas las medias de las movilidades control 1 y control 2 frente a las movilidades problema a las 2 y 4 horas de incubación con U.urealyticum mayor o igual a 25 U.C.C/esp ($p < 0,001$).

(Gráficas XXXI, XXXII y XXXIII)

4.- Resultados

4.1.3.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CONTACTO Y CONCENTRACION DE UREAPLASMAS EN LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMATICA.

Hemos obtenido los siguientes resultados al comparar las medias entre el tanto por ciento de formas con endosmosis negativa de las muestras control y problema a las 2,4 y 24 horas de incubación con distintas concentraciones de ureaplasmas, en las cinco líneas del experimento.

4.1.3.1.-Línea I (Tabla II. Tanto por ciento de endósmosis negativa de las muestras control y problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación a distintas concentraciones bacterianas)

a) Se han encontrado diferencias significativas al comparar las medias de todas las endósmosis negativas (en % de alteraciones de permeabilidad de la membrana) entre las muestras control y problema a las 2 horas de incubación, con mayor porcentaje de endósmosis negativa en las muestras problema ($p < 0,01$)

b) Hemos encontrado diferencias significativas (mayor porcentaje de endósmosis negativa en las muestras problema) comparando las medias de las endósmosis negativas entre las muestras control y problema a las 4 y 24 horas de incubación ($p < 0,001$)

(Gráficas XXXIV y XXXV)

c) Hay diferencias significativas entre las endósmosis negativas de las muestras control y problema a las 2 horas de incubación con concentraciones de ureaplasmas menor o igual a 10 U.C.C/espermatozoo, siendo menor la endosmosis negativa en los controles sin contaminar. ($p < 0.01$)

(Gráficas XXXVI y XXXVII)

4.- Resultados

d) *Se han hallado diferencias significativas entre las endósmosis negativas de las muestras control y problema a las 4 y 24 horas de incubación con concentraciones de ureaplasmas menor o igual a 10 U.C.C/esp, siendo mayor el porcentaje de endósmosis negativa en las muestras problema ($p < 0,001$)*

e) *Se han encontrado diferencias significativas entre las endósmosis negativas de las muestras control y problema (menor en los controles) a las 2, 4 y 24 horas de incubación con concentraciones de ureaplasmas mayor o iguales a 25 U.C.C/esp. ($p < 0,001$)*

(Gráficas XXXVIII y XXXIX)

4.1.3.2.- Línea II (Tabla V.- Tanto por ciento de endósmosis negativa espermática de las muestras control y problema a las 0,2,4 y 24 horas de incubación, utilizando una sola muestra de semen a distintas concentraciones bacterianas.)

a) *Se han encontrado diferencias significativas, con mayor tanto por ciento de endósmosis negativa en las muestras problema, al comparar las medias de todas las endósmosis negativas de las muestras control y problema a las 2 horas de incubación ($p < 0,01$)*

b) *Se han encontrado diferencias significativas al comparar las medias de todas las endósmosis negativas de las muestras control y problema a las 4 y 24 horas de incubación, siendo mayor en los problemas ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente.)*

(Gráficas XL y XLI)

4.- Resultados

c) Se han encontrado diferencias significativas al comparar las medias de las endósmosis negativas entre las muestras control y problema a las 2 horas de incubación con concentraciones de ureaplasmas menor o igual a 10 U.C.C/esp, siendo mayor en las muestras problema ($p < 0,01$)

d) Se han encontrado diferencias significativas (mayor porcentaje de endósmosis negativa en las muestras problema), al comparar las medias de las endósmosis negativas entre las muestras control y problema a las 4 y 24 horas de incubación con concentraciones de ureaplasmas menor o igual a 10 U.C.C/esp ($p < 0,01$)

(Gráficas XLII y XLIII)

e) Empleando concentraciones de ureaplasmas mayor o igual a 25 U.C.C/ml, hemos encontrado diferencias significativas a las 2 y 4 horas de incubación ($p < 0,01$) y a las 24 horas de incubación ($p < 0,001$), comparando las medias de las endósmosis negativas entre las muestras control y problema, siendo en todos los casos mayor en las muestras problema.

(Gráficas XLIV y XLV)

4.1.3.3.-Linea III (Tabla VIII.- Tanto por ciento de endósmosis negativa espermática de las muestras control y problema a las 0,2 y 24 horas de incubación utilizando muestras de semen fresco, sin lavar, a distintas concentraciones de Ureaplasma urealyticum 1867 PR.)

a) Al comparar las medias de las endósmosis negativas de todas las muestras control y problema a las 2 y 4 horas de incubación ($p < 0,01$) y 24 horas ($p < 0,001$) se han encontrado diferencias significativas, siendo mayor el porcentaje de endósmosis negativa en las muestras problema.

4.- Resultados

b) Hemos encontrado un porcentaje de endósmosis negativa significativamente superior en las muestras problema al comparar las medias de las endósmosis negativas de las muestras control y problema a las 2 horas de incubación, empleando concentraciones de ureaplasmas de menos o igual a 10 U.C.C/esp ($p < 0,01$)

(Gráficas XLVI y XLVII)

c) Hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar las medias de las endósmosis negativas de las muestras control y problema a las 4 y 24 horas de incubación utilizando concentraciones bacterianas de menos o igual a 10 U.C.C/esp, siendo mayor el porcentaje de endósmosis negativa en las muestras problema ($p < 0,01$).

(Gráficas XLVIII y XLIX)

d) Hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar las medias de las endósmosis negativas de las muestras control y problema a las 2, 4 y 24 horas de incubación utilizando concentraciones de ureaplasmas de más o igual a 25 U.C.C/esp, con menor porcentaje de endósmosis negativa en las muestras control sin contaminar ($p < 0,001$).

(Gráficas L y LI)

4.- Resultados

4.1.3.4.-Linea IV (Tabla XI.- Tanto por ciento de endósmosis espermática negativa de las muestras control y problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación, utilizando muestras de semen congeladas- descongeladas y lavadas con medio urea a distintas concentraciones de U.urealyticum 1867 PR).

a) Hemos encontrado un porcentaje de endósmosis negativa significativamente mayor en las muestras problema al comparar las medias de las endósmosis negativas de todas las muestras control y problema a las 2, 4 y 24 horas de incubación con ureaplasmas ($p < 0,01$)

(Gráficas LII y LIII)

b) Se han encontrado diferencias significativas al comparar las medias de las endósmosis negativas de las muestras control y problema a las 2 horas de incubación utilizando concentraciones de ureaplasmas de 10 o menos U.C.C/esp, con mayor porcentaje de endósmosis negativa en las muestras problema ($p < 0,01$)

c) Hemos encontrado diferencias significativas (mayor tanto por ciento de endósmosis negativa en los problemas), al comparar las medias de las endósmosis negativas de las muestras control y problema a las 4 y 24 horas de incubación utilizando concentraciones de ureaplasmas de 10 o menos U.C.C/esp ($p < 0,001$)

(Gráficas LIV y LV)

4.- Resultados

d) Se han encontrado diferencias significativas (menor tanto por ciento de endósmosis negativa en las muestras control), comparando las medias de las endósmosis negativas de las muestras control y problema a las 2, 4 y 24 horas de incubación con concentraciones de ureaplasmas de mas o igual a 25 U.C.C/esp ($p < 0,001$).

(Gráficas LVI y LVII)

4.1.3.5.- Línea V (Tabla XIV: Tanto por ciento de endósmosis espermática negativa de las muestras control, control más U.urealyticum inactivado y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación a distintas concentraciones de U.urealyticum 1867 PR.)

a) Se ha encontrado un porcentaje de endósmosis negativa significativamente mayor en las muestras problema, al comparar las medias de todas las movilidades de las muestras control 1 y control 2 frente a la movilidad problema a las 2 horas de incubación ($p < 0,01$)

b) Se han encontrado diferencias significativas (mayor tanto por ciento de endósmosis negativa en los problemas), al comparar las medias de todas las endósmosis negativas de las muestras control 1 y control 2 frente a la movilidad problema a las 4 y 24 horas de incubación ($p < 0,001$)

(Gráficas LVIII, LIX y LX)

c) Se han encontrado diferencias significativas al comparar las medias de las endósmosis negativas de las muestras control 1 y control 2 frente al problema, a las 2 horas de incubación con concentraciones de ureaplasmas menos o igual a 10 U.C.C/esp, siendo en todos los casos mayor en las muestras problema ($p < 0,01$).

4.- Resultados

d) Hemos encontrado diferencias significativas al comparar las medias de las endósmosis negativas de las muestras control 1 y control 2 frente al problema a las 4 y 24 horas de incubación con concentraciones de ureaplasmas menos o igual a 10 U.C.C/esp (mayor en las muestras problema) ($p < 0,001$).

(Gráficas LXI, LXII y LXIII)

e) Hemos encontrado diferencia significativas (mayor tanto por ciento de endósmosis negativa en las muestras problema), al comparar las medias de las endósmosis negativas de las muestras control 1 y control 2 frente al problema a las 2, 4 y 24 horas de incubación con concentraciones de ureaplasmas de 25 o más U.C.C/esp ($p < 0,001$)

(Gráficas LXIV, LXV y LXVI)

4.1.4.- MORFOANOMALIAS ESPERMATICAS

Comparando las medias entre el tanto por ciento de espermatozoos morfológicamente normales de las muestras control y problema a las 2, 4 y 24 horas de incubación, con distintas concentraciones de ureaplasmas y en las cinco líneas del experimento, no se han observado en ningún caso diferencias significativas.
(Tablas III, VI, IX, XII y XV)

4.- Resultados

4.1.5.- CRECIMIENTO BACTERIANO

Tabla XVI: Medias de todas las concentraciones bacterianas (U.C.C/ml) en las muestras control microorganismo y problema (con espermatozoos y ureaplasmas) en las 5 líneas del experimento a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas de incubación.

En todos los casos del experimento, una vez alcanzado el crecimiento del microorganismo hasta 10^6 - 10^7 U.C.C/ml, se realizan titulaciones decimales a los tiempos mencionados para comprobar la presencia de ureaplasmas en ambas muestras, disminuyendo el título hasta una media de 10^2 - 10 U.C.C/ml a las 4 horas de incubación. (Gráfico LXVII)

4.2.- EXPERIMENTO II

4.2.1.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION UREAPLASMA-ESPERMATOZOO Y DOXICICLINA EN LA **MOVILIDAD** ESPERMATICA. (Tabla XVII)

Comparando las medias entre el tanto por ciento de espermatozoos móviles de las muestras control y problema (con y sin doxiciclina), obtenemos los siguientes resultados:

4.2.1.1.- **A las dos horas de incubación:**

a) Comparando las medias del porcentaje de espermatozoos móviles entre las muestras control y problema sin antibiótico, obtenemos una movilidad significativamente mayor en las muestras control sin contaminar ($p < 0,01$) (Gráficos LXVIII y LXX)

b) Al comparar las medias del porcentaje de espermatozoos móviles entre las muestras control semen y control antibiótico, no encontramos diferencias significativas. (Gráficos LXVIII y LXIX)

c) Comparando las medias del tanto por ciento de espermatozoos móviles entre las muestras control antibiótico y problema antibiótico, encontramos una movilidad significativamente mayor en las muestras control ($p < 0,01$). (Gráficos LXIX Y LXX)

4.- Resultados

d) Comparando el porcentaje de espermatozoos móviles entre las muestras problema (con y sin doxiciclina), no encontramos diferencias significativas. (Gráficos LXX y LXXI)

4.2.1.2.- A las cuatro horas de incubación:

a) Se ha encontrado una movilidad espermática significativamente mayor ($p < 0,01$) en las muestras control, al comparar el porcentaje de espermatozoos móviles entre los controles y las muestras problema sin doxiciclina. (Gráficos LXVIII y LXX)

b) Se ha encontrado una mayor movilidad espermática ($p < 0,1$) en las muestras control antibiótico al comparar el porcentaje de espermatozoos móviles de los dos controles (con y sin doxiciclina). (Gráficos LXVIII y LXIX)

c) Comparando el porcentaje de espermatozoos móviles de las muestras control y problema, ambas con doxiciclina, se ha encontrado una movilidad significativamente mayor en los controles ($p < 0,001$), aunque las diferencias son estadísticamente menores ($p < 0,01$) al comparar el problema antibiótico con el control sin doxiciclina. (Gráficos LXIX y LXXI)

d) Se ha encontrado una movilidad mayor en las muestras problema antibiótico ($p < 0,1$) al comparar las muestras problema con y sin antibiótico. (Gráficos LXX y LXXI)

4.- Resultados**4.2.2.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CONTACTO UREAPLASMA-ESPERMATOZOO Y DOXICICLINA EN LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMATICA (Tabla XVIII).**

Comparando el tanto por ciento de espermatozoos con endósmosis negativa (permeabilidad de la membrana alterada) entre las muestras control y problema, con y sin doxiciclina, obtenemos los siguientes resultados:

4.2.2.1.- A las dos horas de incubación:

No se observan diferencias significativas comparando las medias del porcentaje de espermatozoos con endósmosis negativa entre las siguientes muestras:

- a) Control y problema sin antibiótico*
- b) Control y control con doxiciclina*
- c) Control antibiótico y problema antibiótico*
- d) Problema y problema con doxiciclina*

4.- Resultados**4.2.2.2.- A las cuatro horas de incubación:**

a) Comparando las medias del porcentaje de espermatozoos con endósmosis negativa entre las muestras control y problema, obtenemos valores significativamente mayores en las muestras problema con ureaplasmas ($p < 0,01$) (Gráficas LXXII y LXXIV)

b) Al comparar las medias del tanto por ciento de espermatozoos con endósmosis negativa de las muestras control semen y control antibiótico no encontramos diferencias significativas. (Gráficas LXXII y LXXIII)

c) Encontramos un porcentaje de endósmosis negativa significativamente mayor ($p < 0,01$) en las muestras problema al comparar las medias entre control antibiótico y problema antibiótico. (Gráficas LXXIII y LXXV)

d) No se han encontrado diferencias significativas al comparar el porcentaje de endósmosis negativa entre las muestras problema con y sin doxiciclina. (Gráficas LXXIV y LXXV)

4.2.2.3.- A las veinticuatro horas de incubación:

a) Al comparar el porcentaje de endósmosis negativa entre las muestras control y problema sin antibiótico, se ha encontrado un porcentaje significativamente mayor en las muestras problema ($p < 0,001$). (Gráficas LXXII y LXXIV)

4.- Resultados

*b) No se han encontrado diferencias significativa al comparar el tanto por ciento de espermatozoos con endósmosis negativa entre los controles con y sin doxiciclina.
(Gráficas LXXII y LXXIII)*

*c) Comparando el porcentaje de endósmosis negativa entre las muestras control y problema con antibiótico, se ha encontrado un porcentaje de endósmosis negativa significativamente menor en las muestras control sin ureaplasmas ($p < 0,001$)
(Gráficas LXXIII y LXXV)*

*d) No se han encontrado diferencias significativas al comparar el porcentaje de endósmosis negativas entre las muestras problema con y sin antibiótico.
(Gráficas LXXIV y LXXV)*

4.2.3.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION UREAPLASMAS-ESPERMATOZOO Y DOXICICLINA EN LA MORFOLOGIA ESPERMATICA.

No se han observado diferencias significativas al comparar el tanto por ciento de espermatozoos morfológicamente normales entre las siguientes muestras:

- a) Control y problema sin doxiciclina*
- b) Control y control antibiótico*
- c) Control antibiótico y problema antibiótico*
- d) Problema y problema antibiótico*

*4.- Resultados***4.2.4.- CRECIMIENTO BACTERIANO**

Como en el Experimento I, no hay diferencias significativas en las titulaciones obtenidas entre las muestras Control Microorganismo y Problema a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas de incubación. La media de crecimiento bacteriano a las 0 horas fue de 10^6 U.C.C/ml, hasta llegar a 10^3 U.C.C /ml a las 4 horas de incubación.

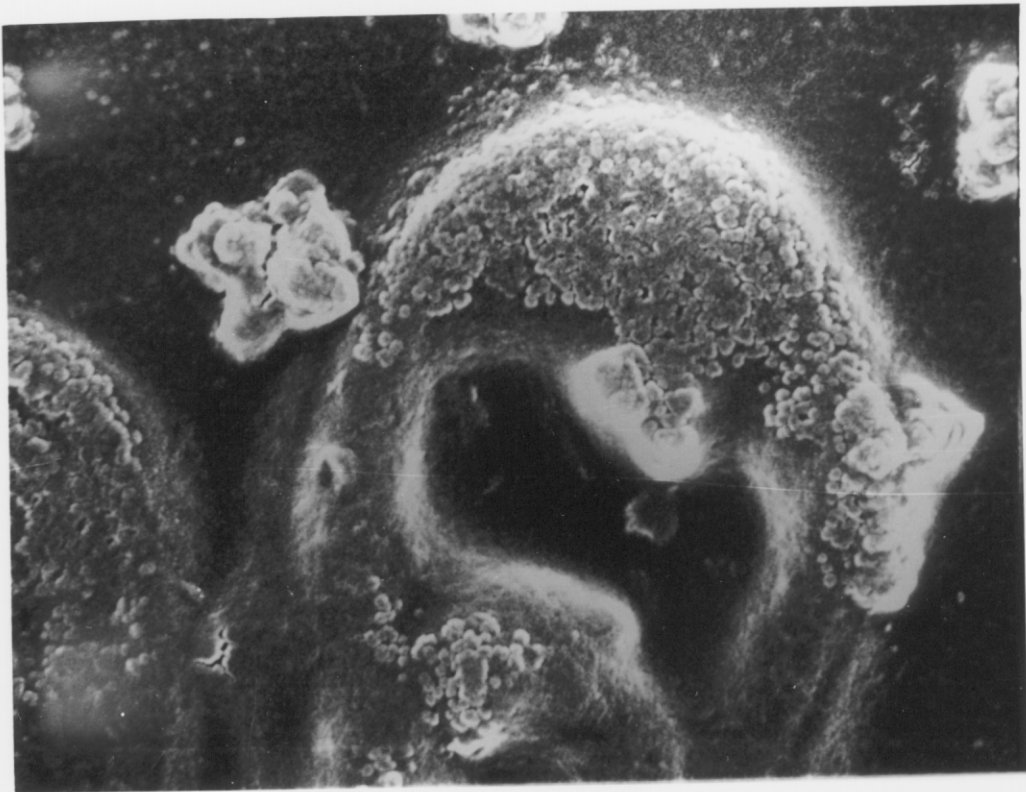
Las muestras incubadas con doxiciclina empezaron a mostrar diferencias significativas respecto al control y problema a las 3 horas de incubación, de forma que a las 4 horas solo había una media de 10 U.C.C/ml.

4.- Resultados



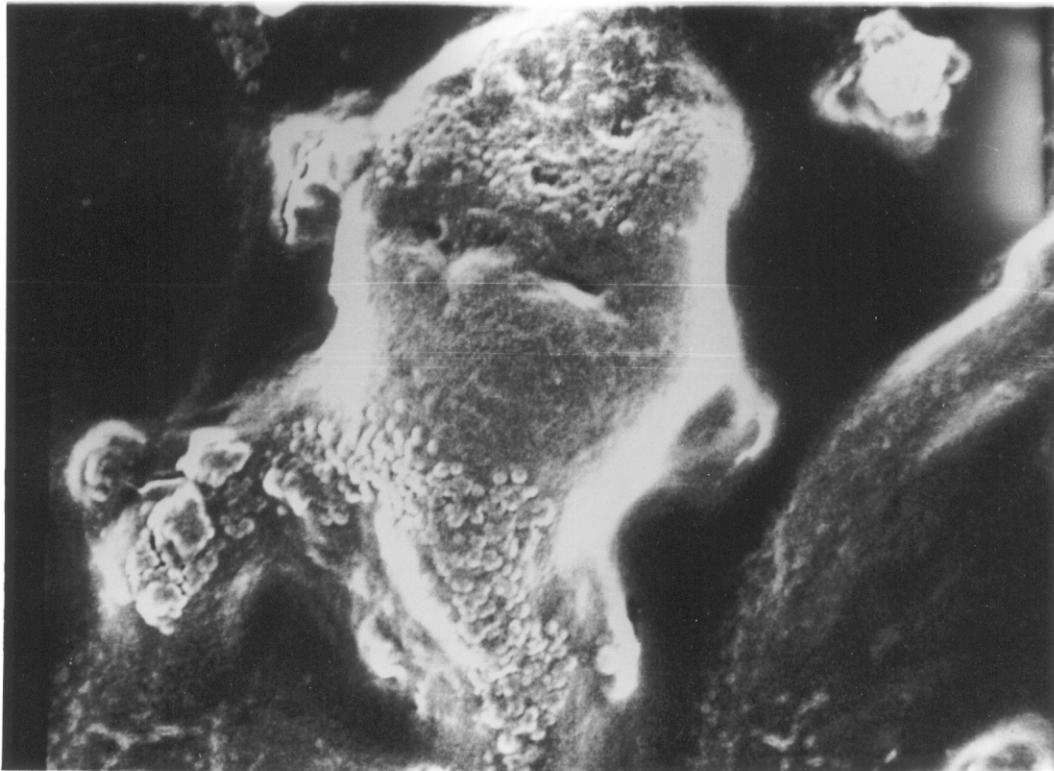
Fotografía 12.- Espermatozoos incubados durante 24 horas con Ureaplasma urealyticum (50 U.C.C/esp) a Microscopía Electrónica de Barrido (x 3000) con colonias de ureaplasmas unidas a la cabeza y flagelo.

4.- Resultados



Fotografía 13: Espermatozoos incubados durante 24 horas con ureaplasmas a Microscopía Electrónica de Barrido (x 6000) .Detalle de la Fotografía 12, donde se observan las colonias de ureaplasmas en el flagelo.

4.- Resultados



Fotografía 14.- Detalle de la fotografía 12, donde se observan ureaplasmas unidos a la cabeza del espermatozoo (x 6000) a M.E. de Barrido, en muestras espermatozoos y ureaplasmas incubadas durante 24 horas.

5.- DISCUSSION

5.- *Discusión*

1.- INFLUENCIA DE LOS UREAPLASMAS SOBRE LOS PARAMETROS ESPERMATICOS

Los estudios epidemiológicos sobre la infección por ureaplasmas (75,83,84,101,127), así como los realizados a nivel del efecto directo de estos organismos en el tracto reproductivo masculino (61,101,114) y femenino (46,55,125) han generado resultados conflictivos, no sólo en cuanto a las patologías que origina, sino, fundamentalmente, sobre el papel que ejercen como causa de infertilidad masculina.

El propósito del primer experimento fue demostrar los posibles efectos negativos de los ureaplasmas en los gametos masculinos. Para ello, incubamos espermatozoos de eyaculados normales con concentraciones conocidas de ureaplasmas, incluyendo diversas variaciones dentro del experimento para comprobar sus posibles influencias en las alteraciones espermáticas.

De esta forma, conocemos con seguridad cuales son los efectos reales y directos de los ureaplasmas sobre los parámetros espermáticos, descartando cualquier tipo de influencia externa.

En primer lugar, comparando los resultados obtenidos al emplear la cepa de colección DKF-4 y la 1867 PR aislada de un paciente con prostatitis, no obtuvimos diferencias significativas entre los dos grupos, con lo que comprobamos que, tanto utilizando una cepa como otra, los resultados eran los mismos.

En estudios preliminares (19) hemos utilizado únicamente la cepa 1867 PR por considerar que de esta forma se reproducen las condiciones fisiológicas más fielmente. Sin embargo, y a efectos de hacer más reproducible el experimento, decidimos emplear la cepa DKF-4.

5.- *Discusión*

Se han realizado diversos estudios en varones infértiles con y sin Ureaplasma urealyticum en semen demostrándose diferencias de calidad en los mismos (22,40,55,141). Sin embargo, en ninguno de los estudios revisados se ha encontrado referencia sobre la utilización de una cepa de Ureaplasma determinada.

Sólamente Busolo (18), que investigó la influencia de distintos serotipos de U.urealyticum sobre la penetración espermática en el oocito de hamster halló diferencias de penetración dependiendo del serotipo empleado.

Serotipo 1 originó un grado de penetración similar al del control (51%), mientras serotipo 4 dió un grado de penetración muy bajo (6%). Este trabajo abre nuevas vías de investigación con el uso de muestras de Ureaplasma urealyticum serotipadas y analizando los distintos resultados obtenidos.

*Con respecto a la **movilidad espermática**, la comparación de los valores medios de movilidad entre los grupos control y problema (espermatozoos más ureaplasmas), nos demostraron que la movilidad desciende en todos los casos a lo largo del tiempo y al aumentar el número de ureaplasmas por espermatozoo. Así, el mayor descenso de movilidad se obtuvo a las 4 horas de incubación con 50 U.C.C/esp, produciéndose un descenso medio de movilidad del 34%.*

Casi todos los estudios coinciden en señalar un descenso en la movilidad espermática como consecuencia de la infección por ureaplasmas (55, 95, 40, 91, 21, 146).

Todos estos trabajos se refieren al análisis de muestras de semen (concentración espermática, movilidad, morfología, etc), en las cuales se relacionaba la presencia o no de Ureaplasma con la afectación de determinados parámetros espermáticos. Estos estudios conllevan una serie de inconvenientes a la hora de evaluar los resultados, tanto en la metodología como en los diferentes procedimientos realizados para aislar los microorganismos.

5.- Discusión

En primer lugar, y refiriéndonos sólomente a la movilidad espermática, este parámetro puede verse afectado por varios factores tanto endógenos como exógenos que deben tomarse en consideración cuando se analizan los efectos de Ureaplasma urealyticum sobre la movilidad.

En segundo lugar, e incluyendo el análisis de todos los parámetros espermáticos, el estudio de los mismos en muestras ya infectadas con el microorganismo nos impide conocer en realidad cual es la influencia del ureaplasma, al carecer de controles negativos llevados a las mismas condiciones que las muestras con los ureaplasmas. Podemos encontrarnos con alteraciones espermáticas debidas , no concretamente a Ureaplasma urealyticum, sino a cualquier otro factor exógeno que afecte a las características espermáticas.

Dada la gran variabilidad de los eyaculados considerados normales, incluso en un mismo individuo (42), quizás sea demasiado aventurado asegurar que determinada alteración sea producida por la infección en ese instante concreto. Aún en el caso de una terapia antibiótica que mejore las características del semen, no tenemos la seguridad de que sea el ureaplasma erradicado el causante de tales alteraciones.

Sólamete Cortesse (34) y Busolo (15), utilizan un modelo experimental de contaminación de eyaculados "in vitro" a fin de conocer el grado de afectación de la movilidad espermática.

Mientras que el grupo de Cortesse comprobó una disminución en la movilidad de los espermatozoos, Busolo no encontró diferencias significativas entre el grado de movilidad espermática en las muestras incubadas con micoplasmas y las muestras control. Cortesse no ofrece datos cuantitativos sobre el grado de disminución de la movilidad, aunque refiere una disminución general de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, acompañado de un aumento de la frecuencia.

5.- Discusión

Por otra parte, en la mayoría de los estudios de este tipo (22,43,96,152) no se ha evaluado sistemáticamente el número de ureaplasmas empleado en relación al número de espermatozoos, cuando es de considerable importancia, ya que un determinado número de colonias de Ureaplasma es diferente según se trate de un semen normal o con oligozoospermia.

Busolo (16) realizó un análisis cuantitativo de ureaplasmas en semen de 116 pacientes de los cuales, 41 positivos con títulos de 10^2 a 10^4 tenían una proporción de U.C.C por espermatozoo entre 1:3400 y 1:295, proporción diez veces menor que la hallada por Taylor Robinson y McCormack (85,136) concluyendo que no existe relación entre la concentración espermática y número de ureaplasmas.

Estos inconvenientes podrían ser, quizás, la causa de la diferencia de resultados obtenidos por distintos grupos de autores.

Para evitar estos problemas en cuanto a la interpretación correcta de los resultados, hemos introducido en el Experimento I las 5 líneas de estudio mencionadas con anterioridad, de manera que, al comprobar los mismos resultados en las 5 líneas conocemos los efectos reales de los ureaplasmas sobre los espermatozoos, descartando cualquier influencia externa o de metodología.

Sólamente se han realizado 10 experiencias controlando la movilidad a las 24 horas de incubación, ya que en este caso el semen utilizado no estaba previamente congelado y no se lavó con el medio Menezo B2. La movilidad media en estas muestras a las 24 horas en los grupos problema respecto al control fue del 12% frente al 0,1% de las muestras incubadas con ureaplasmas.

De esta forma comprobamos que el mayor descenso de movilidad tiene lugar a las 4 horas de incubación, ya que a las 24 horas los espermatozoos de las muestras control han descendido considerablemente su movilidad y la diferencia con respecto al grupo problema es menor.

5.- *Discusión*

En el resto de las experiencias, las muestras congeladas y descongeladas no conservaban la movilidad en ningún caso a las 24 horas.

Para conocer si los resultados obtenidos ofrecían una buena repetibilidad realizamos 14 experiencias utilizando una sólo muestra de semen que, previamente dividida en alicuotas, se congeló y descongeló posteriormente con el fin de realizar el experimento. En todas las experiencias se obtuvo también una menor movilidad de las muestras contaminadas con ureaplasmas a las 4 horas de incubación con 50 U.C.C por espermatozoo, y un descenso de movilidad de las muestras contaminadas respecto al control del 35%.

En el caso de lavar las muestras con medio urea en lugar de utilizar el medio Menezo, también se observó un mayor descenso de movilidad a las 4 horas con más de 25 U.C.C/esp (24%).

Para establecer si sólo los ureaplasmas vivos son capaces de interferir en los parámetros espermáticos, los espermatozooos se preincubaban con Ureaplasma urealyticum inactivados previamente por el calor, al igual que realizó Busolo (18) para comprobar el grado de penetración espermática en el oocito de hamster. El grado de movilidad en los dos controles era similar (sin diferencias estadísticamente significativas), y, al igual que en las restantes experiencias, la movilidad descendía significativamente en las muestras incubadas durante 4 horas con más de 25 U.C.C/esp hallandose un descenso de movilidad del 31% con respecto a las muestras control sin contaminar.

A la vista de estos resultados podemos comprobar en todos los casos un descenso medio de movilidad del 34% como consecuencia del tiempo de incubación entre espermatozooos y ureaplasmas con un título mayor o igual a 25 U.C.C/esp, sin que influyan el medio de lavado espermático empleado, el tipo de muestras de semen empleadas (congeladas o no) o la adición de ureaplasmas inactivados.

5.- *Discusión*

Hemos comentado con anterioridad la importancia del número total de espermatozoos móviles de un eyaculado para la fertilidad. Considerando una movilidad normal (33) la que se encuentra por encima del 50% de espermatozoos con desplazamiento rectilíneo, es posible que un eyaculado normal con una movilidad activa de un 70-80%, el descenso de un 30-35% no afecte a sus caracteres de fertilidad. Sin embargo, hay que considerar el hecho de que eyaculados en los límites de normalidad, con un número total de espermatozoos móviles entre 40 y 50%, un descenso de movilidad de este tipo si puede afectar seriamente su capacidad fertilizadora.

Igualmente, el número de ureaplasmas por espermatozoo es un factor de considerable importancia en este estudio. Hata ahora, las titulaciones obtenidas en cultivos de semen ureaplasma positivo no se relacionaban, en la gran mayoría (22,43,49,141), con el número de espermatozoos. Mas si el estudio es de esterilidad, no sólo es importante el título de ureaplasmas en U.C.C/ml, sino el radio ureaplasmas/espermatozoo, ya que títulos similares pueden afectar de diferente manera dependiendo de la concentración espermática inicial del varón.

Estos datos coinciden con los obtenidos por la mayoría de los investigadores que señalan, de una forma u otra un descenso de movilidad en eyaculados ureaplasma positivos (22,29,43,96,129,152).

Las diferencias con respecto al trabajo de Busolo (18) pueden deberse quizás, al porcentaje de descenso de movilidad que estos autores encontraron en los experimentos, que, como hemos comentado es bastante variable.

El segundo parámetro estudiado es la afectación de la permeabilidad de la membrana espermática.

Los estudios de infertilidad masculina incluyen en el análisis de semen de rutina el Test de Endósmosis (66,149) como prueba de la integridad funcional del espermatozoo, ya que, obviamente, los espermatozoos con la membrana alterada no son fértiles. Para ello, y como se ha descrito anteriormente, se mide el porcentaje de espermatozoos de un eyaculado con la membrana intacta.

5.- *Discusión*

Ninguno de los estudios llevados a cabo hasta el momento actual sobre la influencia de Ureaplasma urealyticum en el eyaculado ha analizado su repercusión sobre la membrana espermática, por lo que no tenemos datos para poder contrastar nuestros resultados con la opinión de otros autores.

Comparando los valores medios del porcentaje de endósmosis negativa (espermatozoos con la permeabilidad de la membrana alterada) entre los grupos control y problema, en todos los casos obtenemos un mayor porcentaje en las muestras contaminadas después de 24 horas de incubación con más de 25 U.C.C/esp, obteniéndose una media de aumento del 30%.

Este aumento se produce tanto al utilizar la cepa 1867 PR como la DKF-4, en muestras congeladas y descongeladas lavadas con medio urea o con Menezo, y en muestras frescas sin congelar. Igualmente se obtiene una buena repetitibilidad al utilizar un sólo eyaculado y realizar 14 experiencias con distintas concentraciones de Ureaplasma urealyticum.

Se obtienen los mismos resultados empleando un control con ureaplasmas inactivados por el calor.

El porqué los ureaplasmas afectan la permeabilidad de la membrana espermática es un tema que desconocemos hasta el momento, que puede ser objeto de un futuro estudio.

Existen trabajos en los cuales se demuestra que los ureaplasmas se unen estrechamente a células epiteliales (121), y Stalheim (122) demostró el hinchamiento de cilios en oviducto bovino tras inoculación con ureaplasmas bovinos. Ya que el espermatozoo se ciñe al patrón de cualquier cilio, se podría pensar en la misma forma de actuación, e incluso en la posibilidad de afectación de los cilios de las trompas humanas.

5.- Discusión

Lo que si es cierto es que el espermatozoo necesita de una membrana morfológica y funcionalmente intacta para poder fertilizar el oocito (17,45), y que cualquier alteración en la misma en un porcentaje suficientemente alto del total de espermatozoos de un eyaculado puede interferir de forma importante con la fertilidad masculina. Aquí de nuevo interviene el factor limitante que supone el número de ureaplasmas con respecto al de espermatozoos, ya que las alteraciones son mayores cuando el rango ureaplasmas/espermatozoos aumenta.

Pensamos en la posibilidad de que existan mayores alteraciones en eyaculados con un número de espermatozoos en los límites o por debajo de la normalidad.

Por otra parte, esta alteración de la membrana espermática por los ureaplasmas puede engarzar con la hipótesis de Busolo (18) que apuntó la posibilidad de que los ureaplasmas pueden influir en la maduración de los espermatozoo por la producción de un factor/s desconocido al ser depositado el semen en la vagina, así como impedir la reacción acrosómica del espermatozoo. Quizás sea la alteración de la membrana espermática lo que dificulte su unión con el oocito y disminuya el porcentaje de fertilización.

Los resultados obtenidos respecto al porcentaje de morfoanomalías espermáticas obtenidas comparando grupos control y muestras contaminadas con ureaplasmas no nos ofrecen diferencias significativas.

Trabajos como los de Fowlkes , Toth, Grossebauer y Busolo (44,143,49,17) sin embargo, demuestran alteraciones morfológicas en eyaculados ureaplasma positivos. Estas anomalías consisten en general, en la aparición de granulosis a nivel del flagelo, así como angulaciones y enrollamientos del mismo. Sin embargo, todos ellos, excepto el equipo de Busolo, estudiaron muestras de semen ureaplasma positivas en las que se analizaban las alteraciones morfológicas de los espermatozoos. Toth indicó que la presencia de estas anomalías espermáticas detectables a microscopía óptica en

5.- *Discusión*

muestras de semen ureaplasma positivas proporcionaban un valor predictivo para la presencia de Ureaplasma urealyticum con un 10% de faltos negativos y un 19% de falsos positivos.

Sólamamente el equipo de Busolo realizó experiencias "in vitro", con espermatozoos lavados y contaminados con ureaplasmas, no encontrando alteraciones morfológicas. Estos autores concluyen diciendo que los efectos de Ureaplasma urealyticum in vivo son diferentes a los que se pueden observar "in vitro".

Por el contrario, autores como Schoub, Comhaire , Lewis y Cintron,(111,28,77,23) estudiando eyaculados ureaplasma positivos no encontraron ningún tipo de morfoanomalía espermática.

A la vista de estos resultados, y ya que no conocemos ningún estudio en el que se contaminen "in vitro" los espermatozoos con ureaplasmas hallándose alteraciones morfológicas, podemos pensar que nuestros resultados coinciden con la mayoría de los autores, y , de la misma forma que para el resto de los parámetros espermáticos analizados, el hallazgo de morfoanomalías espermáticas en muestras de semen infectadas con ureaplasmas puede deberse a la existencia de otros factores no evaluados por la falta de controles negativos.

2.- EXPERIMENTO II: EFECTO DE LA DOXICICLINA

En este Experimento, además de las muestras control y problema del Experimento I, incluimos una muestra con ureaplasmas, espermatozoos y doxiciclina, y otra con espermatozoos y doxiciclina como control, para analizar los mismos parámetros espermáticos.

*Las experiencias realizadas por distintos autores para conocer la influencia de los antibióticos en *Ureaplasma urealyticum* y como consecuencia sobre la fertilidad, han sido sobre todo de tipo epidemiológico, como los de Gnarpe y Friberg (48) y Harrison (51), así como el estudio de la calidad del semen tras la erradicación de ureaplasmas con terapia antibiótica (15, 129, 142).*

Sin embargo, vuelve a surgir la polémica entre los distintos grupos de autores al no existir acuerdo claro entre terapia antibiótica elegida y los resultados de las mismas.

Por otra parte hay que considerar que el efecto beneficioso de una determinada terapia sobre el semen no es una prueba clara de que los ureaplasmas son responsables de ciertos casos de infertilidad masculina.

*La ambigua naturaleza de los resultados obtenidos por distintos investigadores según el tratamiento, así como la presencia de resistencias manifestadas por Taylor-Robinson (138) en el 10% de los casos puede deberse a varios motivos. En primer lugar, pueden existir sinergismos de los ureaplasmas con otras bacterias. Además, no todas las cepas de *Ureaplasma urealyticum* pueden ser patógenas, y responder de igual forma a la terapia antibiótica. El éxito esta, representada en términos de fertilidad como el aumento del índice de embarazos, puede deberse al aclaramiento de otros organismos distintos a los micoplasmas.*

5.- *Discusión*

En este experimento nos decidimos por la doxiciclina como antibiótico de elección, aunque no tenemos constancia de un modelo experimental "in vitro" con antibiótico similar al nuestro, ya que la mayoría de los autores como Toth (142), Gnarpe y Friberg (48), Harrison (51), y Busolo (15) entre otros, utilizaron la doxiciclina con éxito como terapia frente a la infección por ureaplasmas, demostrando, bien una mejoría de los parámetros espermáticos, bien un aumento en el número de embarazos en poblaciones determinadas.

En base a estos estudios, decidimos comprobar, de acuerdo con el modelo anteriormente expuesto, la actuación "in vitro" de la doxiciclina sobre los ureaplasmas y los espermatozoos.

Se demostró previamente que las cepas empleadas en este estudio eran sensibles a la doxiciclina, con una CMI de 1 µgr/ml.

Respecto a la movilidad espermática, comparando las medias de los controles con y sin doxiciclina, encontramos que, como en el Experimento I, la movilidad descendía de forma significativa en las muestras incubadas durante 2 horas con ureaplasmas, con un descenso medio de movilidad de un 20%.

Sin embargo, al comparar las medias de movilidad entre las muestras con ureaplasmas, espermatozoos y doxiciclina frente a las muestras con ureaplasmas y espermatozoos sólo, no encontramos diferencias significativas, por lo cual podemos comprobar que a las 2 horas de incubación con el antibiótico, los ureaplasmas no se ven afectados.

A las 4 horas de incubación, igualmente, la movilidad espermática desciende en las muestras contaminadas con respecto a los controles un 34%, y algo menos, cerca de un 30% en las muestras con doxiciclina respecto a su control.

Comparando las medias de movilidad entre los controles con y sin doxiciclina, comprobamos que la movilidad espermática aumenta en presencia de antibiótico respecto al control con espermatozoos sólo, en un 15%. Por otra parte, la movilidad espermática de las muestras con ureaplasmas, espermatozoos y doxiciclina poseen una movilidad mayor que sin el antibiótico, pero no llega a alcanzar la movilidad de las muestras control.

5.- *Discusión*

Podemos pensar, de acuerdo con los resultados obtenidos por otros investigadores como Swenson (129), que describió una notable mejoría de la movilidad espermática al erradicar los ureaplasmas del semen, que la doxiciclina mejora la movilidad espermática "in vitro" a las 4 horas de incubación de los espermatozoos con ureaplasmas, aunque este efecto puede quizás deberse al antibiótico "per se", más que a la erradicación de ureaplasmas, como lo demuestra el aumento de movilidad espermática de los controles doxiciclina.

Con respecto al estudio de la permeabilidad de la membrana espermática en presencia de doxiciclina, comprobamos que, a las dos horas de incubación, comparando los valores entre muestras control y contaminadas, aumenta la endósmosis negativa en las muestras contaminadas, al igual que el experimento I, y como en el caso de la movilidad, no se ven diferencias significativas entre las muestras con y sin doxiciclina.

A las 4 y 24 horas de incubación, comparando las medias de endosmosis negativa entre muestras contaminadas con y sin doxiciclina, así como entre los controles, no hemos encontrado diferencias significativas, por lo que podemos pensar que el antibiótico no mejora, a pesar de la erradicación de ureaplasmas, la permeabilidad de la membrana espermática una vez que esta se encuentra ya afectada.

Sí, como hemos comprobado en el Experimento I, la membrana espermática se encuentra significativamente afectada a las 4 horas de incubación de los espermatozoos con los ureaplasmas, este efecto, causado por el microorganismo es irreversible aún en presencia del antibiótico.

Ya que se conoce que los ureaplasmas producen amonio durante la hidrólisis de la urea (80,105), la cual, se ha demostrado puede ser tóxica para las células (18), así como este efecto también se ha comprobado por Busolo que no causa daño macroscópico celular, esta hipótesis podría engarzar con los resultados obtenidos en cuanto a la alteración de la permeabilidad de la membranas, quizás debida a la influencia del microorganismo en el metabolismo espermático.

5.- *Discusión*

Así mismo, ya que la urea es un factor limitante para el crecimiento de los ureaplasmas (37), una vez que el número de microorganismos comienza a descender como consecuencia del fin de la hidrólisis de la urea y la subsecuente alcalinización del medio, el efecto de los ureaplasmas sobre los espermatozoos podría estabilizarse.

*Hemos demostrado igualmente, que no existe ninguna influencia de *Ureaplasma urealyticum* sobre la morfología espermática, y por tanto, la doxiciclina no altera esta relación, lo que viene a confirmar la hipótesis de Busolo de que el ureaplasma no produce daño celular "in vitro" (18).*

La doxiciclina, al ser un bacteriostático e inhibe la biosíntesis de proteínas, pudiera impedir la liberación de algún factor del ureaplasma que, como apuntó Busolo (18), afecte la movilidad y metabolismo espermáticos. Como, por otra parte, la doxiciclina parece aumentar la movilidad espermática, esta hipótesis podría explicar los diferentes resultados obtenidos sobre la movilidad y permeabilidad de la membrana espermáticas.

5.- *Discusión***3.- EXPERIMENTO III: UNIÓN DE UREAPLASMA Y ESPERMATOZOOS.**

En esta experiencia comprobamos, tras 24 horas de incubación entre ureaplasmas y espermatozoos, y por análisis de muestras control y contaminadas a Microscopía Electrónica de Barrido, que los ureaplasmas se unen directamente al espermatozoo, siendo sus localizaciones preferentes el flagelo y el segmento intermedio.

Por Microscopía Electrónica de Barrido, igualmente, Gnarpe y Friberg demostraron que Ureaplasma urealyticum se asocia con la cabeza y el segmento intermedio de los espermatozoos. Observaron una cubierta esferoidal de partículas con aproximadamente 200 nm de diámetro en muestras de semen ureaplasma positivas.

Fowlkes observó 2 características de los espermatozoos de eyaculados ureaplasma positivos por M.E. de Barrido: la presencia de conglomerados de pequeñas partículas adheridas a las células, y un gran número de colas enrolladas.

Igualmente, utilizando muestras de semen de pacientes ureaplasma positivos, Busolo (117) encontró por Microscopía Electrónica de Transmisión un patrón compuesto por una zona hinchada en el segmento intermedio del espermatozoo, delimitado por una membrana.

También observaron partículas esferoidales que cubrían el espermatozoo con una fina matriz granular y con un diámetro de partícula de 100 a 300 nm. Estos patrones no se encontraron en muestras ureaplasma negativas.

En todos estos estudios se analizaron muestras de semen ureaplasma positivas, y, aunque las características morfológicas de los espermatozoos observados a Microscopía Electrónica puedan indicar la presencia de ureaplasmas, no hay que descartar la presencia de artefactos que enmascaren tal unión.

En nuestra experiencia, la contaminación se realizó de forma experimental con controles negativos, en los que no se halló ningún tipo de patrón similar.

5.- *Discusión*

Busolo, sin embargo, no encontró estos patrones de espermatozoos enrollados y rodeados de una fina capa en muestras de semen lavadas y contaminadas con ureaplasmas. Este grupo concluyó diciendo que los efectos de Ureaplasma son diferentes "in vivo" e "in vitro". Quizás los diferentes resultados obtenidos con nuestra experiencia puedan deberse al tiempo de incubación y al número de ureaplasmas por espermatozoo empleados, con un rango de 50 U.C.C/esp, aunque no tenemos constancia del tiempo y número de microorganismos empleado por este grupo.

Por otra parte tampoco hay que descartar la utilización de una cepa determinada de U.urealyticum, en nuestro caso la cepa 1867 PR, ya que, quizás, distintas cepas o serotipos de Ureaplasma pueden ofrecernos resultados diferentes, lo cual puede ser motivo de un futuro estudio.

En opinión de Cintron, no se sabe exactamente si la unión de ureaplasmas y espermatozoos ocurre cuando los espermatozoos están almacenados en el epidídimo , durante la mezcla de flúidos en las glándulas accesorias, o después de que los espermatozoosse depositan en los órganos femeninos.

Berger propone que la unión debe realizarse en la uretra, mientras que Busolo opina que se requiere más tiempo al del paso por la uretra del semen, dado el complejo patrón de unión encontrado.

No obstante, dado que en nuestra experiencia hemos demostrado la unión "in vitro" de Ureaplasma y espermatozoos tras la incubación durante 24 horas , pensamos que no es necesario más tiempo para realizarse tal unión, pero consideramos razonable la hipótesis de Busolo, al ser demasiado rápido el paso de semen por la uretra. Quizás debería realizarse un estudio seriado a distintos tiempo de incubación de ambas células para comprobar en que momento se realiza esta.

Aun sea cual sea el lugar de tal unión, la demostración física de este suceso, nos hace pensar en la fácil distribución por los genitales femeninos de este microorganismo, lo que explica su rápida propagación entre la población.

4.- CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados obtenidos en base a estos experimentos, si no prueban definitivamente la participación de Ureaplasma urealyticum como causa de infertilidad masculina, abren nuevas vías de investigación en este campo, con la posible utilización de muestras de Ureaplasma serotipadas, y la realización de estudios de población más amplios y randomizados, que prueben de forma inequívoca su intervención como organismo que altera la fertilidad.

No obstante, quedan demostrados sus efectos sobre el espermatozoo, en cuanto a alteraciones de movilidad y permeabilidad de la membrana, así como la unión ureaplasma-espermatozoo "in vitro", que debe ser investigada más profundamente, utilizando espermatozoo contaminados a distintos tiempos de incubación y a diferentes radios U.u/esp. Estos hechos, no sólo prueban el potencial efecto que ejercen los ureaplasmas en la fertilidad masculina, sino la posible vía de propagación hacia los genitales femeninos, donde su influencia sobre el tracto reproductivo y por ende sobre la fertilidad, conlleva efectos aún más drásticos, ya que, patologías demostradas como la salpingitis ponen en peligro la funcionalidad de las trompas .

Estudios epidemiológicos como los de McCormack y Taylor Robinson (86,139), demuestran la propagación de los ureaplasmas sobre todo desde el hombre hacia la mujer, lo cual se relaciona estrechamente con la unión entre espermatozoo y ureaplasmas.

Por otra parte, y dado que este estudio se refiere concretamente sobre el efecto que ejercen los ureaplasmas en relación con la fertilidad, se puede pensar en su importancia de cara a la utilización de las Técnicas de Reproducción Asistida.

5.- *Discusión*

Partiendo de trabajos como los de Montagut (93) del pasado año, en el que refiere un 42% de casos de parejas incluídas en programas de F.I.V, en las cuales por lo menos uno de los miembros presentaba una infección por Ureaplasma, la incidencia de Ureaplasma en el semen es un factor de riesgo que debe ser investigado. Esto, no sólomente aumentaría la tasa de embarazos con la utilización de estas técnicas, sobre sino que disminuirían los costes que un Programa de Reproducción Asistida conlleva.

Barwin (5), en 1984 refirió un caso de transmisión de Ureaplasma urealyticum por inseminación artificial con semen de donante. Dado que los donantes son siempre sometidos a estudios urológicos y microbiológicos completos, cabe pensar en la infección asintomática de ureaplasmas, y en la necesidad de la realización de cultivos de micoplasmas.

Habría que pensar, sobre todo, en parejas que, integradas o no en programas de Reproducción Asistida y diagnosticadas de infertilidad inexplicable, no se han sometido ninguno de los dos miembros a un sreening de micoplasmas.

Aún a pesar de las dificultades que un estudio de micoplasmas puede suponer, pensamos que las ventajas que de él se derivan, hace recomendable su utilización de cara a un mejor conocimiento de los factores de origen infeccioso que influyen sobre la fertilidad.

6.- CONCLUSIONES

7.- BIBLIOGRAFIA

6.- Conclusiones

1.- La movilidad espermática disminuye en contacto con Ureaplasma urealyticum de forma directamente proporcional al tiempo de contacto ureaplasma-espermatozoo y al número de U.C.C por espermatozoo .

2.- La permeabilidad de la membrana espermática se altera en contacto con Ureaplasma urealyticum de forma directamente proporcional al tiempo de contacto ureaplasma-espermatozoo, y al número de U.C.C por espermatozoo.

3.- Ureaplasma urealyticum no afecta la morfología espermática

4.- Ureaplasma urealyticum se une "in vitro" a los espermatozooos tras 24 horas de incubación, localizándose preferentemente en las zonas del cabeza y flagelo.

5.- La doxiciclina aumenta la movilidad espermática en muestras sin ureaplasmas. a partir de las 4 horas de incubación.

6.- La doxiciclina en presencia de ureaplasmas y espermatozooos, empieza a ejercer su acción impidiendo el descenso de movilidad espermática a partir de las 4 horas de incubación.

7.- La doxiciclina en presencia de ureaplasmas y espermatozooos, no ejerce efecto alguno sobre la permeabilidad de la membrana espermática.

7.- Bibliografia

1.- ANDRE D, Spetjian M, Mikaelian S, Fouillet C. Role des mycoplasmes dans la stérilité: étude de 150 femmes stériles .J Gynecol Obst Biol Reprod (Paris) , 7 :51 - 6 ,1978

2.-APARICIO NJI, Muchini K, Levalle O, Tropea L, Guitelman A, Grinstein S: The effect of treatment with doxycycline on semen of asthenozoospermic patients with T-mycoplasma genital infection. Andrologie 12:521, 1980.

3.- AURIOL C, Tucker M, Whittingham D, Graft I. Mycoplasmas and in vitro fertilization. Fertil Steril 47, 652, 1987.

4.-AUROUX M: Infection urogenitale et fertilité masculine. J Gynecol Obstet Biol Reprod 17, 869-875, 1988.

5.- BARWIN BN: Transmision of Ureaplasma urealyticum by artificial insemination by donor. Fertil Steril, 41:326,1984.

6.-BLACK FT: Serological methos for classification of human T- mycoplasmas. Int Congr Infect Dis 5th Vienna, Austria 1: 407, 1970.

7.-BERGER RE, Smith WD, Critchlow CW, Stenchever MA, Moore DE: Improvement in the sperm penetration (hamster ova) assay (SPA) results after doxycycline treatment of infertile men . J Androl 4: 126, 1983.

7.- Bibliografia

8.- BERSTEIN GS. *Occult genital infection and infertility of "Infertility, contraception and Reproductive Endocrinology"*. Ed. Daniel R, Mishell Jr, Val Davajan. 1.986. p209.

9.- BOWIE WH, Wang SP, Alexander ER. *Etiology of nongonococcal urethritis: Evidence for Chlamydia trachomatis and Ureaplasma urealyticum*. *J Clin Invest* 59:735-742, 1977.

10.-BRAUN P, Klein JO, Kass EH: *Susceptibility of genital mycoplasmas to antimicrobial agents*. *Appl Microbiol* 19: 62, 1970.

11.- BRAUN P, Besdine R: *Tuovoovarian abcess with recovery of T-mycoplasma*. *Am J Obst Gynecol* 117: 86., 1973.

12.- BRAUN P, Lee YK, Klein JO, Marcy SM, Klein TA, Charles D, Levy P, Kass EH. *Birth weight and genital mycoplasmas in pregnancy*. *N Engl J Med* 284: 167, 1971.

13.- BRUNNER H, Weidner W: *Chemotherapy of human Mycoplasma diseases*. *Isr J Med Sci* 17: 656:660. 1981.

14.- BRUNNER H, Weidner W, Schiefer HG: *Studies on the role of Ureaplasma urealyticum and M. hominis in prostatitis*. *J Infect Dis* 147: 807-813, 1983.

15.- BUSOLO F, Zanchetta R, Lanzome E, Cusinato R: *Microbial flora in semen of asymptomatic infertile men*. *Andrologie*, 16: 269-275, 1984.

7.- Bibliografía

16.- BUSOLO F, Zanchetta R, Bertoloni G. Mycoplasmic localization patterns on spermatozoa from infertile men. *Fertil Steril* 42:3, 412-16, 1984.

17.- BUSOLO F, Zanchetta R: Do mycoplasmas inhibit the human sperm fertilizing ability "in vitro" ? *Isr J Med Sci* 20:902, 1984.

18.- BUSOLO F, Zancheta R. The effect of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* on hamster egg "in vitro" penetration by human spermatozoa. *Fertil Steril* 43, 1., 1985

19.- CABALLERO P, Núñez R.: *Micoplasmas y clamidias en infertilidad masculina.*, IV Congreso Nacional de la Asociación Española de Andrología (ASESA)., Zaragoza, 1987

20.- CASELL, GH, Cole BC: *Mycoplasmas as agents of human disease.* *N Engl J Med* 304: 80, 1981.

21.- CARRASCO de la Peña JL. *El método estadístico en la investigación médica.* Editorial Ciencia 3, SA. 4ª Edición, 230-35, 1984.

22.- CHANG MW, Matsuo Y, Yashii Z: Influence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* on the human spermatozoal motility. *Hiros J Med* 33(1), 23., 1984.

23.- CINTRON RD, Wortham JWE, Acosta A: The associattion of semen factors with the recovery of *Ureaplasma urealyticum*. *Fertil Steril* 36:648, 1981.

7.- Bibliografia

24.- CLYDE WA Jr: *Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera. J Immunol 92:958, 1964.*

25.- CLYDE WA Jr, McCormack WH: *Collection and transport of specimens. In Methods in Mycoplasmaology. Vol I. Edited by JC Tully, S.Razin. New York Academic Press, 1983, p103.*

26.- COHEN J, Gregson S: *Antibodies and sperm survival in the female genital tract. In Spermatozoa, Antibodies and Infertility. Edited by J.Cohen, EF Hendry. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1978., p17.*

27.- COLLEEN S, Mardh PA : *Studies on non-acute prostatitis. In Danielsson D, Johlin L, Mardh PA (eds). Genital infections and their complications. Stockholm, Almquist & Wiksell, 1975*

28.- COMHAIRE F, Verschraegen G, Vermeulen L: *Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. Int J Androl 3:32, 1980.*

29.- CORTESE A, Auroux M, Jacques L, Aver J, Feneux D, Le Duc A.: *Anomalies de la mobilité des spermatozoides après infection du sperm humain in vitro. Role d' Ureaplasma urealyticum. Presse Medicale 16: 1375, 1987.*

30.- DESAI S, Cohen MS, Khatamee M, Leither E. *U.urealyticum (T-mycoplasma) infection: does it have a role in male infertility ? J Urol 124:469, 1980.*

7.- Bibliografia

31.- DE LOUVOIS et al. Frequency of mycoplasma in fertile and infertile couples. *Lancet*, 1:1073, 1.974.

32.- DIENES L, Edsall G. Observations on the L-organism of Klieneberger. *Proc Soc Exp Biol Med*, NY,36:740,1.937.

33.- ELIASSON R: Analysis of semen. In *The Testis*, Edited by H.Burger, D de Kretser. New York, Raven Press, p381, 1981.

34.- ENGEL VS, Bauman B: Das Vorkommen von Mykoplasmes im Hodengewebe, *Dermatol Monatsschr* 165: 593, 1979

35.- EVANS RT, Taylor Robinson D: The incidence of tetracycline - resistant strains of *Ureaplasma urealyticum*. *J Antimicrob Chemother* 4:57-63, 1978.

36.- FENEUX D, Serres C, Jouannet P: Sliding spermatozoa: a dyskinesia responsible for human infertility? *Fertil Steril* 44: 508- 511, 1985.

37.- FORD DK, McDonald M: Influence of urea on the growth of T-strain mycoplasmas. *J Bacteriol* 93: 1509-12., 1967.

38.- FOSS GL: Artificial insemination by donor: a review of 12 years experience. *J Biosoc Sci.*, 14,253, 1982.

39.- FREUND M: Standards for the rating of human sperm morphology: - a cooperative study. *Int J Fertil* 11:97, 1966.

7.- Bibliografía

- 40.- FRIBERG J, Gnarpe H. *Mycoplasma and human reproductive failure I. The occurrence of different mycoplasmas couples with reproductive failure.* 114:727, 1972.
- 41.- 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.
- 42.- FRIBERG J. *Mycoplasmas and ureaplasmas in infertility and abortion.* *Fertil Steril* 33-551, 1980.
- 43.- FOWLKES DH, McLeod J, O'Leary WH. *T-mycoplasmas and human infertility: correlation of infection with alterations in seminal parameters.* *Fertil Steril.* 26:1212., 1975
- 44.- FOWLKES DH, Doohar GB, O'Leary WM: *Evidence by scanning electron microscopy for an association between spermatozoa and T-mycoplasmas in men of infertile marriage.* *Fertil Steril* 26: 1203, 1975.
- 45.- GLEZERMAN M and B. Bartow., *Semen analysis.* In *Insler V, Lunenfeld B (eds), Churchill Livingstone, N.York, 1.986.*
- 46.-GNARPE H,Friberg J,: *Mycoplasma and human reproductive failure.1., The occurrence of different mycoplasmas in pregnancy.* *Am J Obst Gynecol* 114: 727, 1972
- 47.-GNARPE H, Friberg J. *T-mycoplasmas on spermatozoa in infertility.* *Nature,* 245:97, 1973

7.- Bibliografía

48.-GNARPE H, Friberg J. *Mycoplasma and human reproductive failure II. Concentrations of doxycycline in serum and seminal fluid and cervical mucus from fertile and infertile women. Wayne State University Annual Report, 1.978, 25.*

49.-GROSSGEBAUER K, Henning A: *Ureaplasma infected human sperm in infertile men . Arch Androl 12 (suppl) 35-41, 1984.*

50.- GUMP DW, Gibson MG, Ashicaga T. *Lack of association between genital mycoplasmas and infertility. N. Eng. J.Med., 310:937.1984.*

51.-HARRISON RF, de Louvois J, Blades M, Hurley R: *Doxycycline treatment and human infertility. Lancet 1: 605: 1975.*

52.-HARRISON RF, Hurley r, de Louvois J. *Genital mycoplasmas and birth weight in offspring of primigravid women. Am J Obst Gynecol., 133: 201-3., 1979.*

53.- HAWKINS DA, Taylor-Robinson D, Evans RT: *Unsuccessfull treatment of non-gonococcal urethritis with rosoxacin provides information on the aetiology of the disease. Genitourin Med 61: 51-55, 1985.*

54.- HELLSTROM WG, Schachter J, Sweet RL. *Is there a role for Chlamydia trachomatis and genital mycoplasma in male infertility? Congress of Urology 81st Meeting of AVA, New York 1986, 18-22 May (Abstract).*

55.- HENRY-SUCHET J, Loffredo V., *Chlamydia and mycoplasma genital infections in salpingitis and tubal sterility., Lancet, 1:539, 1980.*

7.- Bibliografía

56.- HILL A, Tucker M, Wittingham D, Craft I, Mycoplasmas and *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 47:4, 652-6, 1987.

57.-HINTON RA, Egdell LH, Andrews BE, Clarke SKR, Richmond SJ: A double blind cross-over study of the effect of doxycycline on mycoplasma infection and infertility. *Br J Obst Gynaecol* 86: 379, 1979.

58.- HOFSTETTER A: Mycoplasmeinfektionen des urogenital Traktes. *Hautarzt* 28:295, 1977.

59.-HOFSTETTER A, et al. Genitale Mykoplasmenstamme als Ursache der männlichen. Infertilitat. *Helv. Chir. Acta*, 45:329., 1978.

60.-HOLMES MJ, Furr PM, Taylor Robinson D: The persistence of ureaplasmas in the urogenital tract of men in the Antarctic. *J Hyg (Lond)* 72: 355, 1974.

61.-HOLMES KK, et al. Etiology of nongonococcal urethritis. *N. Eng. J. Med.*, 292:1199-1206., 1975

62.-HORNE HW et al., Subclinical endometrial inflammation and T- mycoplasmas: a possible cause of human reproductive failure. *Int. J. Fertil*, 18:266., 1973

63.-IDRISS WH et al., On the etiologic role of *Ureaplasma urealyticum* (T-mycoplasma) infection in infertility, *Fertil Steril*, 30:293, 1978

64.-IWASAKA T, Wada T, Kidera Y: Hormonal status and mycoplasma colonization in the female genital tract. *Obst Gynecol* 68: 263-266, 1986.

7.- Bibliografia

65.-JACQUES L, Auroux M, Mathieu D, Aver J. *Infection et contamination des spermes pour FIV. Contracept Fertil Sexual*, 15, 732: 734, 1987.

66.-JEYENDRAN RS et al., *Development of an assay to asses the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertil.* 70: 219-228.

67.-KENNY GE, Cartwright FD: *Effect of urea concentration on growth of Ureaplasma urealyticum (T-strain Mycoplasmas). J Bacteriol* 132: 144-150, 1977.

68.-KHATAMEE and Decher WH. *Recovery genital mycoplasmaform infertile couples using New York City medium. Infertility*, 1.978, 1: 155.

69.-KREUTNER AK: *Clinical interpretation: Mycoplasma and reproduction. Adv Reprod Med* 2:5, 1983.

70.- KOREN Z, Spigland I. *Irrigation technique for detection of Mycoplasma intrauterine infection in infertile patients. Obst Gynecol*, 52:588-90, 1978.

71.- KUNDSIN RB, Driscoll SG: *Strain of mycoplasmas associated with human reproductive failure. Science* 157: 1573-74. 1967.

72.-KUNDSIN RB. *Mycoplasma in genitourinary tract infection and reproductive failure. Prog Gynecol.* 1.970, 5:275.

7.- Bibliografía

73.-KUNDSIN RB, Ampola M, Streeter S, Neurath P: Chromosomal aberrations induced by T-strain mycoplasmas. *J Med Genet* 8:181, 1971.

74.- KUNDSIN RB, Driscoll SG, Monson RR: Association of *Ureaplasma Urealyticum* in the placenta with perinatal morbidity and mortality. *N Eng J Med.* 310: 941-45, 1984.

75.-LEE YH, Bailey PE, McCormack WM: T-mycoplasmas from urine and vaginal specimens: decreased rates of isolation and growth in the presence of thallium acetate. *J Inf Dis* 125: 318, 1972.

76.- LENNETTE E, Balows A, Hausler WJ: *Manual of Clinical Microbiology*. Third Edition. Washington DC. American Society for Microbiology, 1980.

77.- LEWIS RW, Harrison RM, Domingue GJ: Culture of seminal fluid in a fertility clinic. *Fertil Steril* 35:194, 1981.

78.-LIN JS, Kass EH: Serotypic heterogeneity in isolates of human genital T-mycoplasmas. *Infect Immun* 7:499, 1973.

79.- MASCOLA L, Guinanm M: Screening to reduce transmission of sexually transmitted diseases in semen used for artificial insemination. *New Engl J Med*, 314:21, 1354., 1986.

80.- MASOVER GK, Catlin J, Hayflick L: The effect of growth and urea concentration on ammonia production by urea hydrolising *Mycoplasma (Ureaplasma urealyticum)*. *J Gen Microbiol* 98:587, 1977.

7.- Bibliografía

81.- MATTHEWS CD et al., *The frequency of genital mycoplasmas infection in human infertility. Fertil Steril* 26:988, 1975.

82.-MATTHEWS CD, Clapp KM, Tansing JS, Cox LW: *T-mycoplasma genital infection: The effect of doxycycline therapy on human unexplained infertility. Fertil Steril* 30:1, 1978.

83.-McCORMACK WM, Lee YH, Zinner SH: *Sexual experience with urethral colonization with genital mycoplasmas: a study in normal men. Ann Intern Med* 78: 696, 1973.

84.-McCORMACK WM et al. *The genital mycoplasmas. N. Engl J Med* 288:78, 1973.

85.-McCORMACK WM, Taylor-Robinson D: *The genital mycoplasmas. In Holmes KK et al (eds). Sexually transmitted Diseases. New York, McGrawHill, 1984, p408.*

86.-McCORMACK WM, Rosner B, Alb, Aqlbert S et al: *Vaginal colonization with Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum. Sex Transm Dis* 13:67-70, 1986.

87.- McLEOD J, Gold RZ: *The male factor in fertility and infertility. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. Fertil Steril* 2: 394, 1951.

88.- McLAEOD J: *The significance of deviation in human sperm morphology. In Human Testis, Edited by E. Rosemberg, CA Paulsen, New York, Plenum Publishing, p481, 1970.*

7.- Bibliografía

89.- MELONIGA, Bertononi G, Busolo F, Conventi L: Colony morphology, ultrastructure and morphogenesis in *Mycoplasma hominis*, *A.laidlawii* and *U.urealyticum*. *J Gen Microbiol* 116: 435,1980.

90.- MESEGUER MA, de Rafael L, Martínez Ferrer M, Allona A, Baquero F, and Sanz J. *Ureaplasma urealyticum* counts and other laboratory findings in male urologic disorders. In "Teraphy of Prostatitis. Klinische and experimentelle urologic. Herausgegeben Von W.Weidner, H.Brunner, W. Krause, CF. Rothange, W. Zuckschwerdt Veslag. München, Bern, Wien, San Francisco.pags 110-13, 1984.

91.-MESEGUER MA, de Rafael L, Martínez Ferrer M, Navío S and Sanz J. *Bacteriological councst and other laboratory findings in male urologic disorders*. In "Teraphy of Prostatitis. Klinische and experimentelle urologic. Herausgegeben Von W.Weidner, H.Brunner, W. Krause, CF. Rothange, W. Zuckschwerdt Veslag. München, Bern, Wien, San Francisco.pags 82-85., 1984.

92.- MESEGUER MA., *Differential counts of Ureaplasma urealyticum in male urologic patients*. *J Inf Dis*, 149, 4:657-8, 1984.

93.- MONTAGUT JM., *Incidencia de la presencia de Ureaplasma en el semen sobre la FIV e implantación embrionaria*. *Rev Ib Fert*, 7-1., 1991

94.-MOLLER BR, Taylor Robinson D, Furr PM: *Serologic evidence implicating mycoplasma genitalium in pelvic inflammatory disease*. *Lancet* 1: 1102, 1984.

95.-MUTO A: *The genome structure of M. capricolum*. *Israel J Med Sci* 23: 334-341, 1987.

7.- Bibliografía

96.-NAESSENS A, Foulon W, Debrucker P, Devroey P, Lauwers S, *Recovery of microorganisms in semen and relationship to semen evaluation.*, *Fertil Steril* 45:101-105, 1986

97.-NAGATA YY, Iwasaka T, Wada T. *Mycoplasma infection and infertility.* *Fertil Steril* 31: 392-5, 1979.

98.- NUÑEZ R, Caballero P, M. Meseguer, J. Sanz, M. Martínez, I, Vázquez. *Micoplasmas y clamidias en la infertilidad masculina.* *Rev Iber Am Fert*, 3: 56-58, 1989.

99.-NUÑEZ R, P. Caballero, M. Meseguer, I. Vázquez. *Cultivos microbiológicos de semen pre y post "swim-up"*. XV Congreso Nacional de Sociedad Española de Fertilidad, San Sebastián, Octubre 1990.

100.- O'LEARY WM, Frick J: *The correlation of human male infertility with the presence of mycoplasma T-strains.* *Andrologie* 7:309, 1975

101.- PAAVONEN J : *Examination of men with nongonococcal urethritis and their sexual partners for Chlamydia trachomatis and Ureaplasma urealyticum.* *Sex Transm Dis.* 914- 918, 1978.

102.- POULIN SA, Kundsinn RB, Horne HW: *Survival of Ureaplasma urealyticum on different kinds of swabs.* *J Clin Microb* 10:601, 1979

103.- QUINN PA et al., *Serologic evidence of Ureaplasma urealyticum infection in women with spontaneous pregnancy loss.*, *Am J Obst Gynecol* 145:245, 1983.

7.- Bibliografia

104.- QUINN PA, Arshoff L, Li HCS. Serotyping of Ureaplasma urealyticum by immunoperoxidase assay. *J Clin Microbiol* 13:679, 1981.

105.- RAZIN S : *Mycoplasmas: The smallest pathogenic procaryotes* .Israel J Med Sci 17: 510:515, 1981.

106.- RAZIN s: Characteristics of the mycoplasmas as a group. In *Methods in Mycoplasmaology*. Vol i Edited by JC Tully, S Razin. New York Academic Press, 1983, p3.

107.- REHEWY MSE et al. Ureaplasma urealyticum in vaginal fluid and cervical mucus from fertile and infertile women. Wayne State University Annual Report, 1.978, 25.

108.- ROMANO N, La Licata R, Alesi DR: Energy production in Ureaplasma urealyticum. *Pediatr Infect Dis* 308-12, 5:6, 1986.

109.- SAMRA Z, Borin M, Baikovsky Y, Lipshitz Y, Sampolinski D: Nonoccurrence of *Mycoplasma genitalium* in clinical specimens. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 7:49, 1988.

110.- SAWADA Y, Ackerman D: Use of frozen semen. *Progress in Infertility*. Ed by SJ Sherman an RW Kestner. Boston, Little Brown Company, p731, 1968.

111.- SCHOUB BD et al., The role of mycoplasmas in human infertility. *S. Afr, Med. J.* 50:445.,1976

7.- Bibliografia

112.- SHEPARD MC: *The recovery of pleuro-pneumonia like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. Am J Syph Gonorr Vener Dis* 38: 113-124, 1954.

113.- SHEPARD MC: *Nongonococcal urethritis associated with human strains of "T" mycoplasmas. JAMA* 211:1335, 1970

114.- SHEPARD MC, Lunceford CD: *Urease color test medium U9 for the detection and identification of T-mycoplasmas in clinical material. Appl Microbiol* 20:539, 1970.

115.- SHEPARD MC, Lunceford CD, Ford DK, Purcell RH, Taylor- Robinson D, Razin S, Black ET. *Ureaplasma urealyticum* gen nov, sp. nov: *Proposed nomenclature for the human T (T -strain) mycoplasmas. Int J Syst Bacteriol* 24: 160, 1974

116.- SHEPARD MC: *T-form colonies of pleuropneumonia like organisms. J Bacteriol* 71: 362, 1976.

117.- SHEPARD MC, Lunceford CD. *Differential agar medium (A7) for identification of Ureaplasma urealyticum (human T- mycoplasmas) in primary cultures of clinical material . J Clin Microbiol* 3:613-25 1976.

118.- SHEPARD MC, Lunceford DC. *Serological typing of Ureaplasma urealyticum isolates from urethritis patients by an agar growth inhibition method. J Clin Microbiol* 8:566-74, 1978.

119.- SOFFER Y, Ron-El R, Golan A, Herman A, Caspi E, Samra. *Male genital mycoplasmas and Chlamydia trachomatis culture: its relationship with accessory gland function sperm quality and autoimmunity. Fertil Steril* 53, 2; 331-336, 1990

7.- Bibliografia

120.- SPAEPEN MS, Kundsinn RB, Horne HW: Tetracycline resistant T-mycoplasmas (*Ureaplasma urealyticum*) from patients with a history of reproductive failure. *Antimicrob Agents Chemother* 9: 1012, 1976.

121.- STALHEIM OHV, Gallagher JE: Growth and effects of ureaplasmas (T-mycoplasmas) in bovine oviductal cultures. *Infect Immun* 13:915, 1976.

122.- STALHEIM OHV, Gallagher JE: Ureaplasma epithelial lesions related to ammonia. *Infect Immun* 15: 995, 1977.

123.- STONE SG: Complications and pitfalls of artificial insemination. *Clin Obst Gynecol* 23, 667, 1980.

124.- STRAY PEDERSEN B, Bruu AL, Holne K. Infertility and uterine colonization with *Ureaplasma urealyticum*. *Act Obst Gynecol Scand (in press)*

125.- STRAY-PEDERSEN B et al., 1978. Uterine T-mycoplasma colonization in reproductive failure. *Am. J. Obst. Gynecol.* 130:307.

126.- STRAY PEDERSEN B: Incidence des mycoplasmes sur la fertilité masculine et féminine. *Cpnt Fert Sex* 13:665-670, 1985.

127.- STYLER M, SANDER S, Shapiro, Mollicutes (mycoplasmas) in infertility. *Fertil Steril*, 44:1-13., 1985

7.- Bibliografía

128.-SWEET RL, and Gibbs RS. *Infectious Diseases of the female genital tract. Williams & Wilkins (Eds)., 103-124., 1986*

129.-SWENSON CE, Toth A, O'Leary WM: Ureaplasma urealyticum and human infertility : the effect of antibiotic therapy on semen quality. *Fertil Steril* 31: 660, 1979.

130.-SWENSON CE., Effect of Mycoplasma pulmonis on "in vivo " fertilization in the mouse. *J.Reprod. Fertil.* 66:55, 1982.

131.-TAYLOR PJ, Wilson J, Laycock R: A comparison of freezing and thawing methods for the cryopreservation of human semen. *Fertil Steril* 37:100, 1982.

132.-TAYLOR-ROBINSON D, Mandill RJ: Sperm absorption and sperm agglutination and mycoplasma. *Nature* 215: 484, 1967.

133.- TAYLOR-ROBINSON D, Csonka GW, Prentice MJ: Human intra-urethral inoculation of ureaplasmas. *Q J Med* 46:309, 1977

134.- TAYLOR-ROBINSON D: Infections and infertility in man and animals. In *Infections and Pregnancy. Edited by Cr Coid* New York, Academic Press, 1977

135.- TAYLOR-ROBINSON D, McCormack WM: *Mycoplasma* in human genitourinary infections. In *The Mycoplasmas, Vol II* Edited by JC Tully, RF Wihitcom. New York, Academic Press, 1979

7.- Bibliografia

136.- TAYLOR-ROBINSON D., McCormack WM. *The genital mycoplasmas. N. Engl. J. Med.* 302:1003-1010, 1980

137.- TAYLOR ROBINSON D: *Recovery of mycoplasmas from the genitourinary tract. In Methods in Mycoplasmology, Vol II. Edited by JC Tully , S. Razin, New York, Academic Press, 1983, p19.*

138.- TAYLOR-ROBINSON MD and Furr PM: *Clinical antibiotic resistance of Ureaplasma urealyticum. Pediatr Infect Dis, 5:335-337, 1986.*

139.- TAYLOR-ROBINSON D: *Recovery of mycoplasmas from the genitourinary tract. In Methods in Mycoplasmology, Vol II Edited by JC Tully, S.Razin, New York, Academic Press, 1989*

140.- TAYMOR LM., *Mycoplasma infection in infertility. Edited by M.L. Taymor, New York. Grune and Stratton, 1.978, 126.*

141.- TOTH A, Lesser M., *Asymptomatic bacteriospermie in fertile and infertile men. Fertil Steril 36, 1., 87-91, 1981.*

142.- TOTH A et al., *Light microscopy as an aid in predicting ureaplasma infection in human semen. Fertil Steril, 1.978, 30:586.*

143.- TOTH A, *Evidence for microbial transfer by spermatozoa .Obst Gynecol 59:556, 1982.*

7.- Bibliografía

144.- TOTH A, Lesser LM: Ureaplasma urealyticum and infertility: the effect of different antibiotic regimens on the semen quality. *J Urol* 128: 705, 1982.

145.- TOTH A, Martin LL, Brooks C, Labriola D: Subsequent pregnancies among 161 couples treated for t-mycoplasma genital tract infection. *N Engl J Med* 308:505, 1983.

146.- UPADHYAYA M et al., The role of mycoplasmas in reproduction. *Fertil Steril*, 39:814., 1983.

147.- UPADHAYAYA M, Hibbard M, Walkers R: The effect of Ureaplasma urealyticum on semen characteristics. *Fertil Steril* 41: 2, 304-6, 1984.

148.- VAZQUEZ I., Nuevos métodos de valoración del semen en reproductores ovinos y porcinos. León, 1980. Tesis Doctoral.

149.- VAZQUEZ I, Martínez F, Caballero P, Piedrabuena E y Díaz Yubero C. Endosmosis celular en espermatozoides. XVII Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad, Santiago de Compostela, 1984.

150.- WEIDNER W, Brunner H, Krause W: Quantitative culture of Ureaplasma urealyticum in patient with chronic prostatitis or prostaticitis. *J Urol* 124: 622, 1980.

151.- WITKIN SS, Toth A: Relationship between genital tract infections sperm antibodies in seminal fluid and infertility. *Fertil Steril* 40:805, 1983.

152.- YUN YR and Yung NS. A Study of the effect of sperm motility by mycoplasma. *Korean s urol*, 24, 255, 1983.

RESUMEN

El problema de la infección genital masculina y su relación con la infertilidad es un tema controvertido y bastante estudiado hasta el momento actual, aunque siguen sin existir soluciones concretas.

Ureaplasma urealyticum es uno de los microorganismos implicados en esta polémica más frecuentemente aislado de varones asintomáticos infértiles. Su incidencia entre la población, no sólo masculina, sino femenina, ha aumentado de forma alarmante en los últimos años, paralelamente al incremento de los casos de infertilidad.

Para conocer cual puede ser la influencia de los ureaplasmas en los parámetros espermáticos y por ende, en la infertilidad masculina, hemos diseñado una serie de experiencias basadas en la contaminación "in vitro" de eyaculados normales por concentraciones conocidas de ureaplasmas, valorando las alteraciones producidas en los espermatozoos a distintos tiempos de incubación con el microorganismo.

En este sentido, hemos valorado en primer lugar alteraciones de la movilidad, morfología e integridad de la membrana espermáticas en muestras control y contaminadas con ureaplasmas.

En segundo lugar, y para comprobar la influencia de los antibióticos en los ureaplasmas y los espermatozoos, realizamos la experiencia en condiciones similares a las descritas anteriormente pero incluyendo otra línea con espermatozoos, ureaplasmas y doxiciclina.

Por último, la comprobación más evidente de la relación entre ureaplasmas y alteraciones espermáticas sería la unión física entre ambos, para lo cual hemos visualizado a Microscopía Electrónica de Barrido muestras de espermatozoos incubadas durante 24 horas con Ureaplasma urealyticum.

Con todo ello, hemos comprobado un descenso de movilidad espermática directamente proporcional al tiempo de incubación y número de bacterias, un aumento en el número de espermatozoos con la membrana alterada en los mismos términos, mientras que no se han observado alteraciones morfológicas. Así mismo, no se han observado influencias significativas de la doxiciclina en cuanto a permeabilidad de la membrana y morfología espermáticas, aunque si un aumento de la movilidad espermática en los controles con doxiciclina a partir de las 2 horas de incubación.

Hemos observado por otra parte, a Microscopía Electrónica, la unión de los ureaplasmas a los espermatozoos en la zona de la cabeza y flagelo.

Podemos concluir que Ureaplasma urealyticum influye negativamente en la viabilidad espermática, siendo una posible causa de infertilidad masculina. Finalmente, pensamos en la necesidad de valorar las infecciones por micoplasmas en varones infértiles, haciendo hincapié en el título de microorganismos .

Contamination "in vitro" of semen with Ureaplasma urealyticum

SUMMARY

The relationship of genital infection in men and fertility is controversial. The microorganism Ureaplasma urealyticum is related with sterility and it is frequently isolated from sterile men without clinical sign of infection. Nowadays is being observed an increase of Ureaplasma infections in women in parallel with sterility.

We have tested the effects of Ureaplasma urealyticum on spermatozoa when added to semen cultures collected from healthy men. Alteration in motility, changes in morphology and integrity of spermatozoa membrane were attended.

Loss of spermatozoa motility and damage in the spermatozoa membrane were found along the incubation depending of the number of bacteria added to the culture. No morphological changes of spermatozoa were observed at any time during incubation. The presence in the culture of antibiotic doxycycline did not modify the data indicated above except the motility.

In the mixed cultures of spermatozoa and Ureaplasma urealyticum for 24 hours by Scanning Electron Microscopy was found out that the microorganisms were attached to the tail and the head of the spermatozoa.

We conclude that Ureaplasma urealyticum alter the viability spermatozoa and may be the cause of sterility in men.

8.- APENDICES

Tabla I.- Tanto por ciento de espermatozoos móviles (+ + +) de las muestras Control y Problema a las 0, 2 y 4 horas de incubación a distintas concentraciones bacterianas.

* Cepa	** UCC/esp	Condicón. Basales %	2 Horas		4 Horas	
			Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
1	2	50	25	15	20	5
1	2	50	50	45	40	40
2	2	60	60	60	60	50
1	3	60	60	50	60	40
1	3	50	40	40	40	30
2	4	70	70	70	60	50
1	4	60	60	50	60	40
2	4	50	50	40	30	15
1	5	50	40	40	40	20
2	5	60	60	40	50	30
1	5	70	70	60	60	50
2	10	60	40	25	25	15
2	10	60	60	50	60	40
2	10	70	70	60	60	30
1	10	70	70	60	60	30
1	10	60	60	40	50	25
1	25	60	40	50	50	20
1	25	60	40	30	40	0
1	25	60	30	0	25	0
2	25	70	70	50	60	20
1	30	60	40	25	40	0
1	30	50	50	40	40	20
2	30	60	60	40	50	10
1	40	70	70	50	60	20
1	40	60	60	40	50	10
1	40	60	50	25	50	20
1	50	60	60	40	50	10
1	50	60	50	30	50	0
1	50	60	40	25	30	0
1	50	50	25	0	25	0
2	50	70	60	30	50	20

* Cepa : 1 = U. urealyticum 1867 PR
2 = U. urealyticum DKF-4

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla II.- Tanto por ciento de espermatozoo con **endósmosis negativa** de las muestras Control y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación a distintas concentraciones bacterianas.

* Cepa	** UCC/esp	Condic. Basales (%)	2 Horas		4 Horas		24 Horas	
			Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
1	2	30	30	32	32	35	40	46
1	2	25	30	35	36	48	40	58
2	2	38	38	36	48	55	72	80
1	3	38	36	38	40	50	60	75
1	3	30	34	38	40	49	66	77
2	4	30	30	32	38	46	40	65
1	4	28	30	35	42	50	50	68
2	4	25	30	36	40	52	52	70
1	5	50	54	55	55	65	59	79
2	5	32	30	36	44	50	50	60
1	5	21	20	30	40	52	45	70
2	10	40	40	45	45	65	50	75
2	10	25	25	28	28	38	35	48
2	10	35	35	42	41	56	63	76
1	10	35	35	40	40	58	60	75
1	10	38	36	46	52	68	72	86
1	25	26	26	36	30	48	45	72
1	25	46	49	60	65	82	61	85
1	25	34	33	45	38	60	45	75
2	25	38	40	45	50	68	75	90
1	30	38	40	48	42	62	50	72
1	30	32	36	46	40	58	52	75
2	30	30	40	50	40	50	66	84
1	40	25	30	42	40	58	60	78
1	40	35	30	35	38	48	42	65
1	40	36	34	45	42	60	62	80
1	50	42	47	53	-	-	52	65
1	50	26	25	36	26	59	50	78
1	50	28	29	42	26	66	39	80
1	50	20	30	39	42	60	50	72
2	50	25	25	39	30	48	50	75

* Cepa : 1 = U. urealyticum 1867 PR
2 = U. urealyticum DKF-4

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla III.- Tanto por ciento de espermatozoos **morfológicamente normales** a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación a distintas concentraciones bacterianas en las muestras Control y Problema.

* Cepa	** UCC/esp	Condic. Basales (%)	2 Horas		4 Horas		24 Horas	
			Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
1	2	68	66	62	65	69	66	59
1	2	72	70	68	65	69	60	62
2	2	56	55	54	54	57	54	55
1	3	66	66	62	63	62	56	58
1	3	76	75	70	68	69	64	54
2	4	58	57	55	55	56	50	45
1	4	65	65	60	64	66	60	58
2	4	65	64	63	60	58	54	55
1	5	67	60	54	52	48	46	48
2	5	58	55	50	48	59	55	57
1	5	78	76	75	70	71	62	63
2	10	65	65	64	62	64	60	59
2	10	66	61	59	56	55	43	41
2	10	67	66	66	62	60	46	43
1	10	78	76	68	68	63	48	48
1	10	75	70	69	60	62	56	55
1	25	59	50	52	53	54	47	48
1	25	58	56	59	58	58	54	56
1	25	62	59	59	55	56	48	48
2	25	59	54	53	50	48	41	54
1	30	66	60	60	58	55	53	56
1	30	60	62	60	62	60	46	47
2	30	55	54	53	51	50	45	54
1	40	58	50	50	48	44	40	47
1	40	71	71	70	68	62	58	56
1	40	72	68	67	60	52	46	47
1	50	59	55	55	50	48	43	45
1	50	67	65	64	62	60	56	56
1	50	66	60	58	50	48	45	47
1	50	65	64	64	62	60	49	50
2	50	58	56	54	50	54	47	46

* Cepa : 1 = U. urealyticum 1867 PR
2 = U. urealyticum DKF-4

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla IV.- Tanto por ciento de **espermatozoos móviles** (+ + +) de las muestras Control y Problema a las 0, 2 y 4 horas de incubación utilizando una sola muestra de semen a distintas concentraciones bacterianas de U. urealyticum 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales %	2 Horas		4 Horas	
		Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
2	50	50	45	45	40
3	60	60	50	60	40
4	70	70	70	60	50
5	70	70	60	60	50
10	70	70	60	60	30
10	70	60	60	50	50
25	70	70	50	60	20
25	70	70	50	60	20
30	60	60	40	50	20
30	70	60	45	45	15
40	60	60	40	50	10
40	70	60	30	40	0
50	70	70	40	30	0
50	60	60	30	40	10

** U.C.C./esp.: n² de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla V.- Tanto por ciento de espermatozoos con **endósmosis negativa** en las muestras Control y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación utilizando una sola muestra de semen a distintas concentraciones bacterianas de U. urealyticum 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales (%)	2 Horas		4 Horas		24 Horas	
		Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
2	25	30	35	36	48	40	58
3	38	36	38	40	50	60	75
4	30	30	32	38	46	40	65
4	25	28	30	36	40	48	68
5	21	20	30	40	52	47	65
10	35	35	40	40	58	60	75
10	30	36	42	48	52	60	78
25	38	40	45	50	68	75	86
25	36	38	49	56	69	60	78
30	30	40	50	40	50	66	72
40	35	30	35	38	48	42	78
40	40	42	48	50	60	52	75
50	26	30	36	35	58	49	76

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla VI.- Tanto por ciento de espermatozoos **morfológicamente normales** de las muestras Control y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación utilizando una sola muestra de semen a distintas concentraciones bacterianas de U. urealyticum 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales (%)	2 Horas		4 Horas		24 Horas	
		Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
2	72	70	68	65	69	60	62
3	66	66	62	63	62	56	58
4	58	57	55	55	56	50	45
5	78	76	75	70	71	62	63
10	78	76	68	62	63	48	48
10	75	70	72	68	67	60	58
25	59	54	53	50	48	41	54
25	62	60	62	58	58	50	52
30	55	54	53	51	50	45	54
40	71	71	70	68	62	58	56
40	70	71	68	65	64	52	50
50	62	60	62	58	56	45	42

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla VII.- Tanto por ciento de espermatozoos con **movilidad activa** de las muestras Control y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación utilizando muestras de semen fresco y sin lavar a distintas concentraciones bacterianas de U. urealyticum 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales (%)	2 Horas		4 Horas		24 Horas	
		Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
2	60	60	60	50	50	10	0
3	70	70	60	65	55	20	0
5	50	50	45	40	30	0	0
10	70	65	50	60	40	15	0
10	80	70	60	60	40	25	10
25	70	60	50	60	40	15	0
30	60	60	45	50	30	10	0
40	60	50	40	40	10	10	0
50	75	70	60	65	25	20	0
50	60	60	40	60	30	0	0

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla VIII.- Tanto por ciento de espermatozoos con **endósmosis negativa** de las muestras Control y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación utilizando muestras de semen fresco y sin lavar a distintas concentraciones bacterianas de U. urealyticum 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales (%)	2 Horas		4 Horas		24 Horas	
		Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
2	25	26	30	30	40	40	52
3	30	32	36	35	46	46	58
5	32	30	32	35	48	48	60
10	20	25	30	30	35	35	48
10	18	20	32	30	40	40	56
25	30	32	40	38	52	52	66
30	32	30	42	36	48	48	72
40	20	26	38	30	32	32	65
50	28	30	41	40	46	46	68
50	25	30	46	36	40	40	79

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla IX.- Formas espermáticas **morfológicamente normales** (en %) de las muestras Control y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación con U. urealyticum 1867 PR utilizando semen fresco sin lavar.

** UCC/esp	Condic. Basales (%)	2 Horas		4 Horas		24 Horas	
		Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
2	68	65	66	70	72	60	56
3	70	72	70	69	65	60	58
5	72	70	72	71	70	58	54
10	59	61	60	58	60	50	52
10	64	65	64	62	60	49	48
25	75	70	72	70	68	62	60
30	70	68	65	66	60	48	46
40	62	65	63	60	58	50	48
50	60	58	59	56	54	50	51
50	58	62	60	58	60	62	49

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla X.- Tanto por ciento de espermatozoos **móviles** (+ + +) de las muestras Control y Problema a las 0, 2 y 4 horas de incubación lavadas con medio urea y a distintas concentraciones de U. urealyticum 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales %	2 Horas		4 Horas	
		Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
2	60	60	60	55	40
4	65	65	60	50	40
5	70	65	60	60	35
10	60	60	50	50	30
25	65	60	50	50	25
30	75	70	50	65	40
40	55	55	40	45	25
50	60	60	45	40	20
50	70	60	40	40	10

** U.C.C./esp.: n^o de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla XI.- Tanto por ciento de espermatozoos con **endósmosis negativa** de las muestras Control y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación lavadas con medio urea a distintas concentraciones de U. urealyticum 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales %	2 Horas		4 Horas		24 Horas	
		Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
2	24	24	30	30	44	44	65
4	35	37	40	40	54	54	60
5	32	33	38	34	46	53	66
10	43	40	46	44	53	68	76
25	36	38	46	40	51	46	72
30	26	31	39	32	56	45	87
40	32	30	38	43	60	59	88
50	25	27	42	28	57	44	79
50	19	24	44	26	55	43	86

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla XII.- Formas espermáticas **morfológicamente normales** (en %) de las muestras Control y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación lavadas con medio urea y a distintas concentraciones de U. urealyticum 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales (%)	2 Horas		4 Horas		24 Horas	
		Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)	Control (%)	Problema (%)
2	67	66	65	64	59	58	55
4	65	60	58	65	63	60	59
5	58	60	62	58	62	57	58
10	72	66	65	63	60	55	50
25	56	60	62	60	62	58	54
30	55	58	55	50	58	45	48
40	60	62	59	62	60	56	55
50	68	66	65	62	60	59	60
50	59	62	60	61	63	53	50

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla XIII.- Tanto por ciento de espermatozoos **móviles** de las muestras Control, Control+U. *urealitycum* inactivado y Problema a las 0, 2 y 4 horas de incubación a distintas concentraciones de U. urealitycum 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales %	2 Horas			4 Horas		
		Control (%)		Problema (%)	Control (%)		Problema (%)
		C ₁	C ₂		C ₁	C ₂	
2	60	55	55	50	50	50	40
4	65	65	65	50	60	60	35
5	55	55	55	50	50	50	30
10	68	65	65	60	50	50	30
25	55	55	55	40	50	50	25
30	70	65	60	50	60	60	30
40	75	70	70	50	50	50	25
50	60	60	60	45	50	50	10
50	65	65	60	40	45	50	20

** U.C.C./esp.: n^o de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla XIV.- Tanto por ciento de espermatozoos con **endósmosis negativa** de las muestras Control, Control + *U. urealyticum* inactivo y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación a distintas concentraciones de *U. urealyticum* 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales %	2 Horas			4 Horas			24 Horas		
		Control (%)		Problema (%)	Control (%)		Problema (%)	Control (%)		Problema (%)
		C1	C2		C1	C2		C1	C2	
2	25	26	24	35	28	29	46	42	44	55
4	32	33	34	38	38	40	48	54	54	67
5	30	32	33	41	40	42	54	50	53	66
10	24	25	23	37	33	35	59	48	47	69
25	25	30	34	44	39	44	62	55	58	76
30	34	32	33	42	40	42	60	56	55	78
40	36	33	36	55	42	45	68	58	60	87
50	21	24	26	53	46	44	69	60	62	89
50	32	33	30	42	40	43	57	50	52	88

** U.C.C./esp.: nº de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla XV.- Formas espermáticas **morfológicamente normales** (en %) de las muestras Control, Control + *U. urealyticum* inactivo y Problema a las 0, 2, 4 y 24 horas de incubación a distintas concentraciones de *U. urealyticum* 1867 PR.

** UCC/esp	Condic. Basales (%)	2 Horas		Problema (%)	4 Horas		Problema (%)	24 Horas		Problema (%)
		Control (%)			Control (%)			Control (%)		
		C1	C2	C1	C2	C1	C2			
2	66	65	67	64	66	68	65	59	56	55
4	54	55	58	56	54	43	44	41	42	39
5	53	54	56	53	54	55	49	36	33	34
10	62	64	63	66	60	65	67	59	55	50
25	59	61	62	59	58	55	58	47	45	48
30	62	63	66	65	64	60	64	46	44	48
40	63	62	65	61	64	66	67	53	54	55
50	54	55	56	57	55	53	55	40	39	37
50	59	59	58	60	62	59	58	44	40	45

** U.C.C./esp.: n² de Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla XVI.- Concentraciones bacterianas (U.C.C./ml) en las 5 líneas del experimento I en las muestras Control Microorganismo y Problema a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas de incubación.

Tiempo (horas) / Líneas	0		1		2		3		4	
	Control	Problema	Control	Problema	Control	Problema	Control	Problema	Control	Problema
I	10^6	10^6	10^6	10^6	10^5	10^6	10^3	10^2	10^2	10^2
II	10^7	10^7	10^7	10^7	10^6	10^6	10^3	10^3	10^2	10
III	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^5	10^6	10^4	10^5	10^2
IV	10^6	10^6	10^7	10^7	10^6	10^6	10^4	10^2	10^3	10
V*	10^7	10^7	10^7	10^6	10^6	10^5	10^4	10^2	10^2	10^2

* En esta línea se realizaron titulaciones al los mismos tiempos no detectándose crecimiento bacteriano en el control 2 (semen + U. urealyticum inactivo).

Tabla XVII.- Tanto por ciento de espermatozoos **móviles** en las muestras Control y Problema (con y sin antibiótico) a 2 y 4 horas de incubación a distintas concentraciones bacterianas.

* Cepa	** UCC/esp	2 Horas				4 Horas			
		Control semen (%)	Problema (UU+esp) (%)	Control antibiótico (esp+doxy) (%)	Problema antibiótico (esp+UU+doxy) (%)	Control semen (%)	Problema (UU+esp) (%)	Control antibiótico (esp+doxy) (%)	Problema antibiótico (esp+UU+doxy) (%)
1	10	60	50	60	50	50	30	55	40
1	10	60	50	55	50	50	30	60	40
1	10	50	40	50	35	50	20	60	30
2	10	70	65	70	60	60	40	65	40
1	30	60	50	60	50	50	30	70	40
2	30	55	40	50	45	50	20	60	20
1	40	60	40	65	40	40	20	65	20
2	40	70	50	70	50	60	20	70	30
1	50	80	60	70	55	75	10	75	10
1	50	60	40	60	40	50	5	70	15
1	50	75	50	70	55	60	10	70	10
2	50	60	30	55	30	50	0	70	10

* Cepa : 1 = U.Urealyticum 1867 PR
2 = U. Urealyticum DKF-4

** U.C.C./esp = Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla XVIII.- Tanto por ciento de espermatozoos con **endósmosis negativa** en las muestras Control y Problema (con y sin antibiótico) a 2, 4 y 24 horas de incubación con distintas concentraciones de ureaplasmas.

* Cepa	** UCC/esp	2 Horas				4 Horas				Control semen (%)	Problema (UU+esp) (%)	Control antibiótico (esp+doxy) (%)	Problema antibiótico (esp+UU+doxy) (%)
		Control semen (%)	Problema (UU+esp) (%)	Control antibiótico (esp+doxy) (%)	Problema antibiótico (esp+UU+doxy) (%)	Control semen (%)	Problema (UU+esp) (%)	Control antibiótico (esp+doxy) (%)	Problema antibiótico (esp+UU+doxy) (%)				
1	10	35	40	38	42	38	45	36	46	45	56	48	56
1	10	30	36	32	40	36	44	36	44	44	58	40	60
1	10	32	35	32	34	34	40	38	42	40	50	42	48
2	10	36	40	35	42	40	46	42	44	48	54	46	52
1	30	34	38	34	40	38	32	36	40	52	59	50	60
2	30	30	36	32	38	35	45	34	44	50	60	48	60
1	40	36	40	40	40	40	45	42	43	46	62	45	59
2	40	40	45	42	46	42	50	44	52	44	64	43	62
1	50	34	40	38	42	40	52	42	50	48	60	46	62
1	50	38	42	42	45	42	60	44	60	50	70	52	68
1	50	32	40	36	38	40	48	45	50	48	62	40	60
2	50	37	46	40	44	44	56	42	54	53	68	52	70

* Cepa : 1 = U. Urealyticum 1867 PR
2 = U. Urealyticum DKF-4

** U.C.C./esp = Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla XIX.- Tanto por ciento de espermatozoos **morfológicamente normales** en las muestras Control y Problema (con y sin antibiótico) a 2, 4 y 24 horas de incubación con distintas concentraciones bacterianas.

* Cepa	** UCC/esp	2 Horas				4 Horas				Control semen (%)	Problema (UU+esp) (%)	Control antibiótico (esp+doxy) (%)	Problema antibiótico (esp+UU+doxy) (%)
		Control semen (%)	Problema (UU+esp) (%)	Control antibiótico (esp+doxy) (%)	Problema antibiótico (esp+UU+doxy) (%)	Control semen (%)	Problema (UU+esp) (%)	Control antibiótico (esp+doxy) (%)	Problema antibiótico (esp+UU+doxy) (%)				
1	10	62	64	60	62	64	64	62	65	57	56	54	52
1	10	65	64	64	65	64	60	62	62	54	52	50	48
1	10	68	70	72	70	65	72	68	67	60	58	58	61
2	10	60	62	64	70	62	60	65	64	48	46	52	50
1	30	63	65	60	62	64	60	62	58	44	48	46	50
2	30	65	70	72	70	66	68	70	68	54	50	58	54
1	40	68	64	65	68	64	60	67	60	60	58	50	48
2	40	70	72	70	72	68	66	65	67	50	48	52	44
1	50	72	70	74	73	66	64	63	60	48	42	45	40
1	50	70	72	71	74	67	70	72	66	52	50	51	49
1	50	75	74	76	75	72	70	74	69	48	49	52	50
2	50	76	75	70	72	75	70	68	70	54	52	56	50

* Cepa : 1 = U. Urealyticum 1867 PR
2 = U. Urealyticum DKF-4

** U.C.C./esp = Unidades Cambiadoras de Color por espermatozoo

Tabla XX.- Concentraciones bacterianas (U.C.C./ml) en el experimento II en las muestras Control Microorganismo, Problema y Antibiótico Problema a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas de incubación.

0			1			2			3			4		
Control microorganismo	Problema	Antibiótico Problema	Control microorganismo	Problema	Antibiótico Problema	Control microorganismo	Problema	Antibiótico Problema	Control microorganismo	Problema	Antibiótico Problema	Control microorganismo	Problema	Antibiótico Problema
10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^3	10^5	10^5	10^2	10^4	10^4	10	10^2	10^2	0
10^6	10^6	10^5	10^5	10^5	10^4	10^5	10^5	10^3	10^4	10^4	10^2	10^2	10^2	10
10^6	10^6	10^5	10^6	10^6	10^3	10^5	10^6	10^2	10^4	10^6	10	10^2	10^2	0
10^7	10^6	10^7	10^6	10^6	10^4	10^4	10^4	10^2	10^4	10^4	10	10^4	10^4	0
10^6	10^6	10^5	10^6	10^6	10^6	10^4	10^5	10^6	10^3	10^3	10^3	10	10^2	10
10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^5	10^4	10^4	10^6	10^3	10^3	10^4	10^2	10^3	10^2
10^7	10^7	10^6	10^6	10^7	10^6	10^5	10^5	10^6	10^6	10^6	10^4	10^4	10^3	10^3
10^6	10^7	10^6	10^7	10^6	10^5	10^5	10^6	10^4	10^6	10^6	10^4	10^4	10^4	10^2
10^7	10^6	10^7	10^7	10^7	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^4	10^6	10^3	10^3	10^3
10^6	10^7	10^7	10^6	10^6	10^6	10^4	10^4	10^6	10^4	10^6	10^4	10^3	10^3	10^2
10^7	10^7	10^6	10^6	10^6	10^5	10^5	10^6	10^6	10^4	10^6	10^3	10^2	10^2	10
10^6	10^7	10^6	10^5	10^6	10^6	10^5	10^5	10^4	10^3	10^3	10^4	10	10	10^2

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL

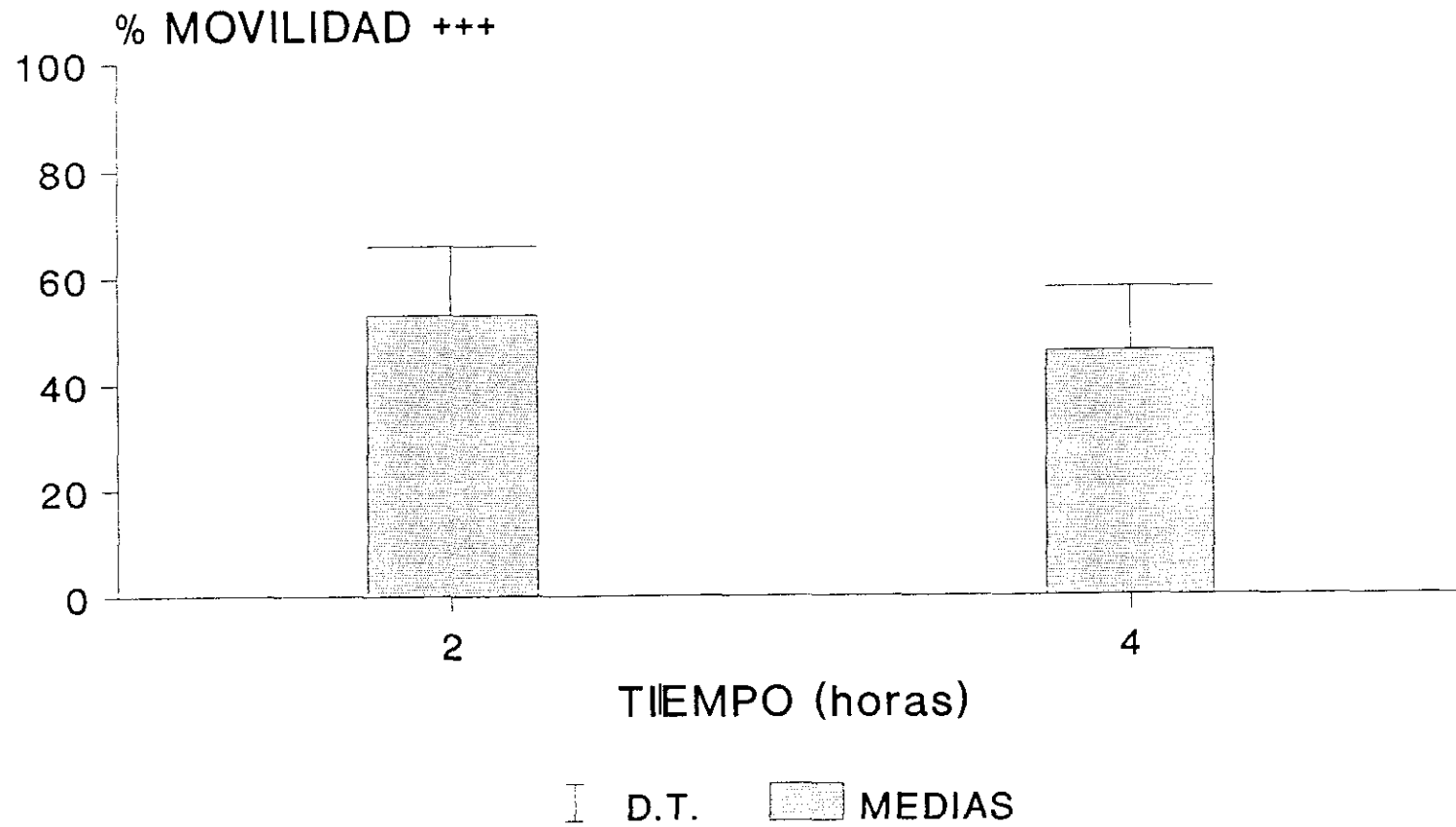


GRAFICO I

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA

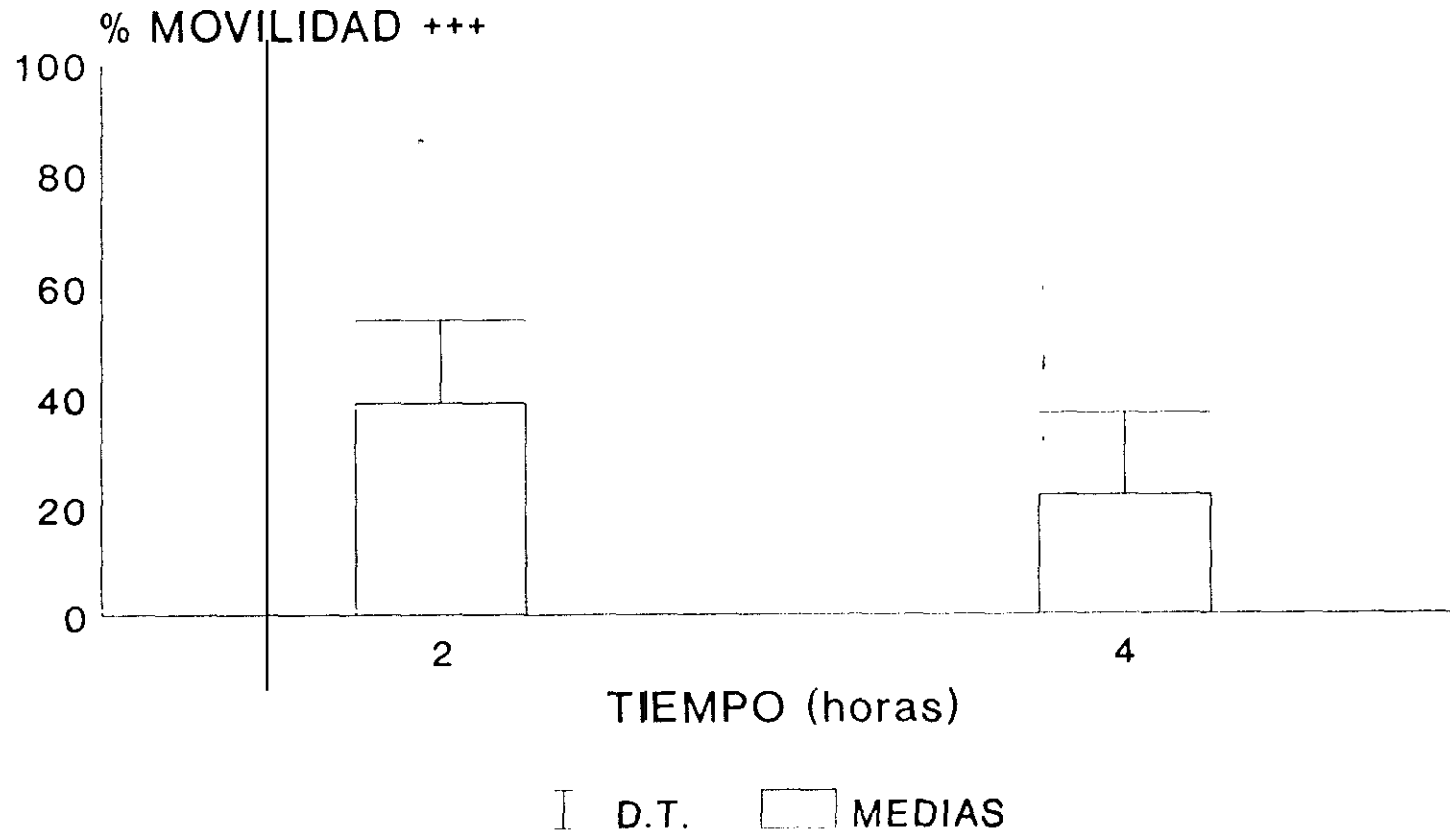
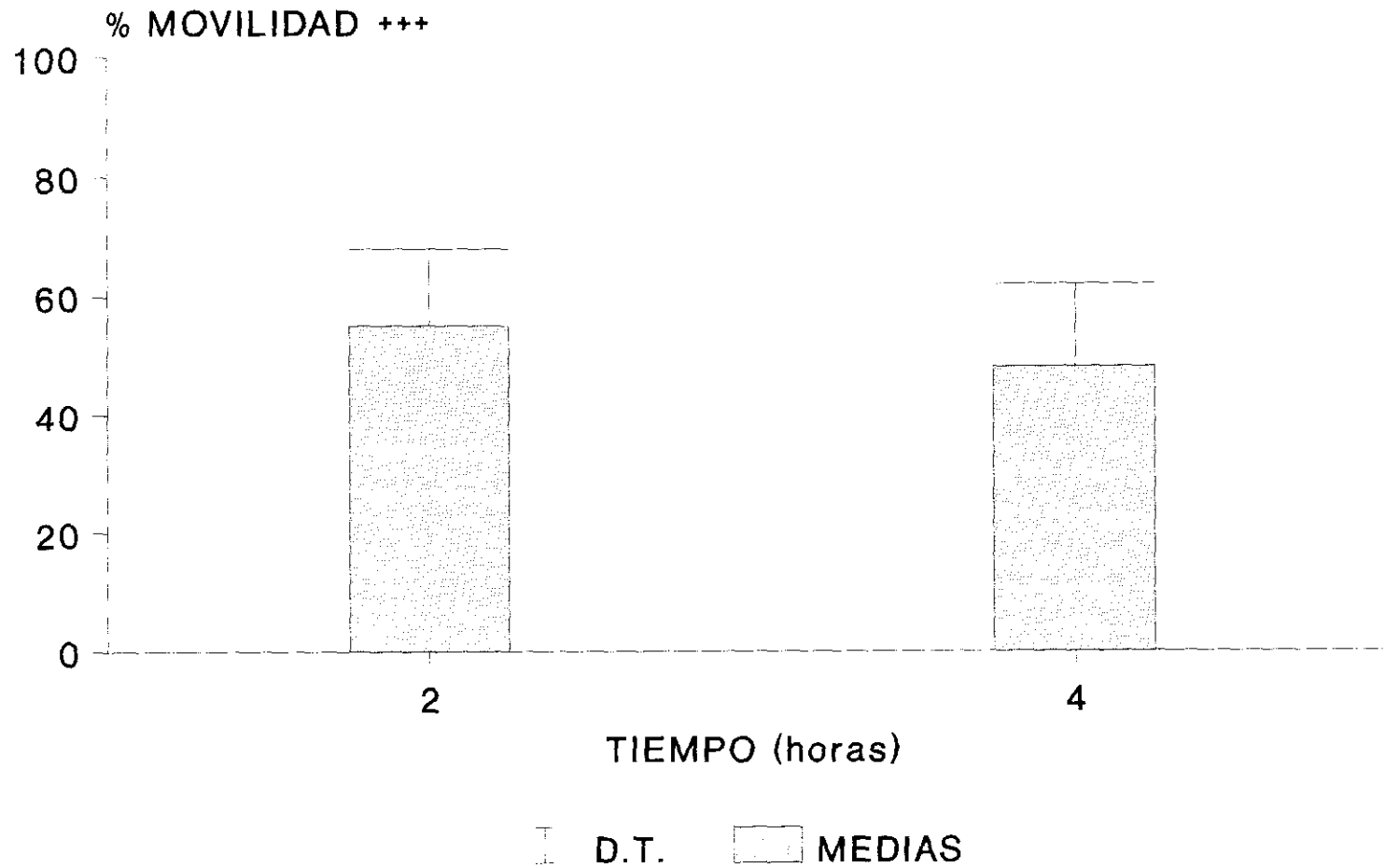


GRAFICO II

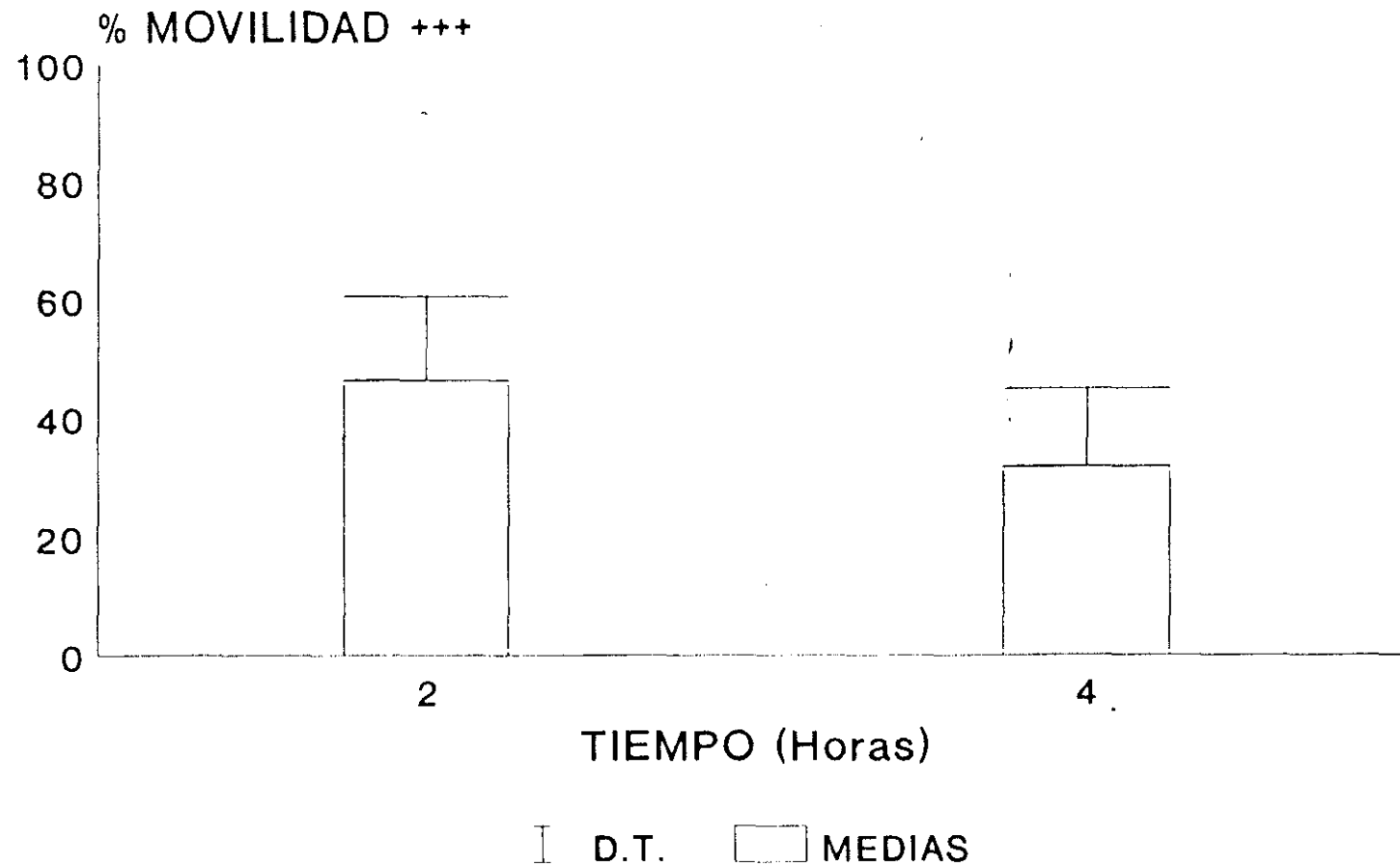
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL CON < 10 UCC/esp



GRAFICA III

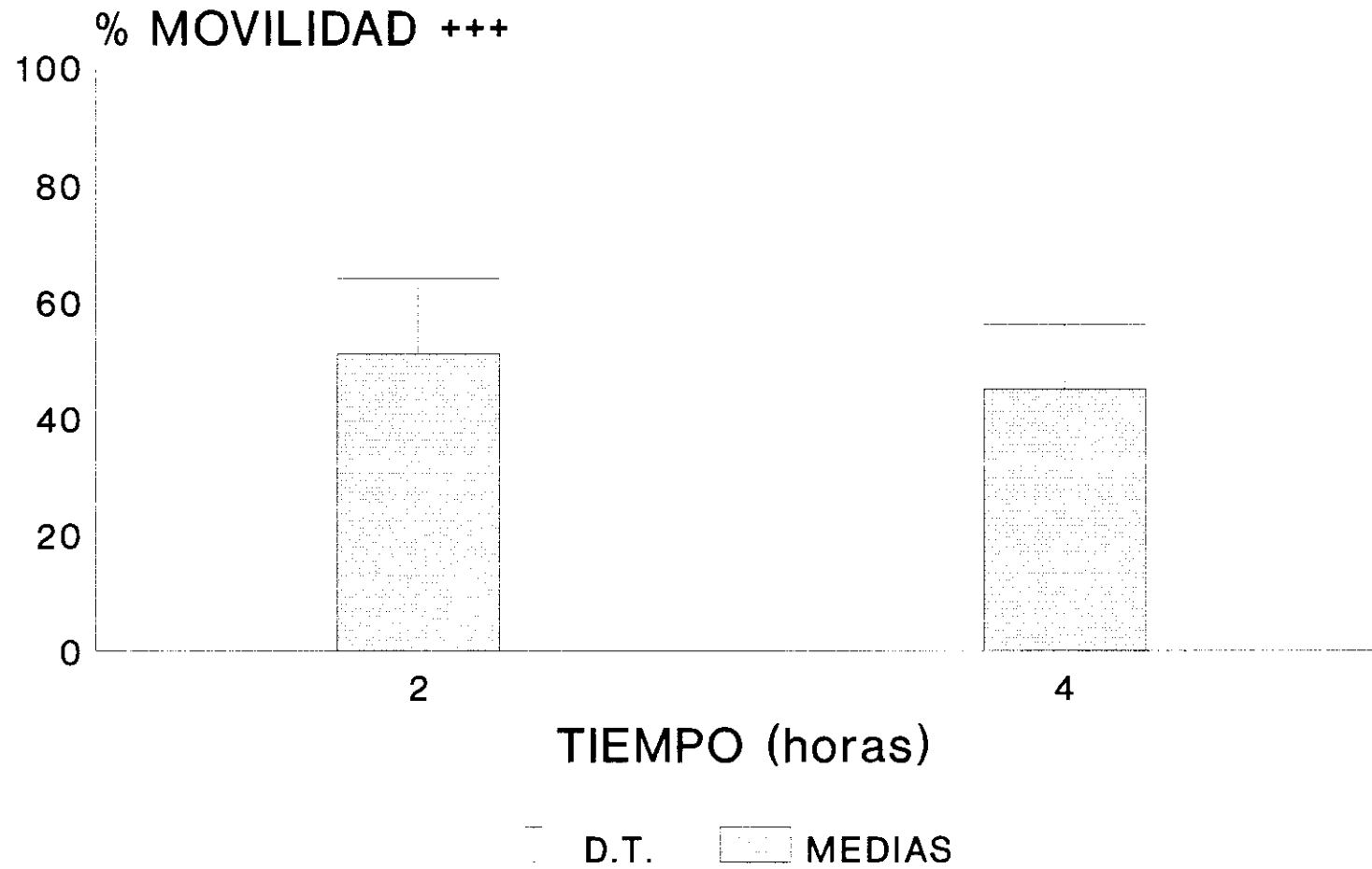
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD

MUESTRAS PROBLEMA CON < 10 U.C.C\esp



GRAFICA IV

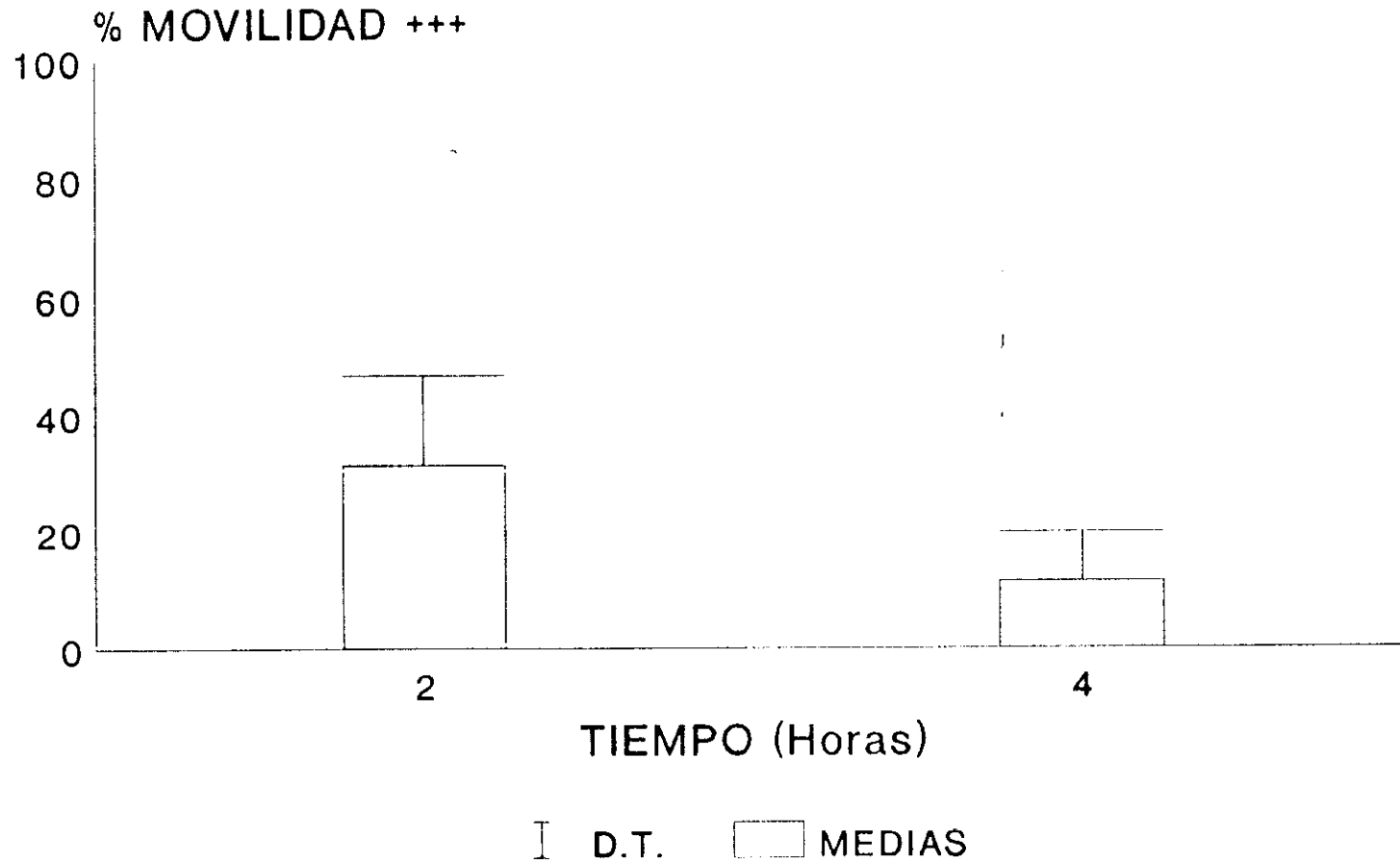
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL CON > 10 U.C.C.\ esp



GRAFICA V

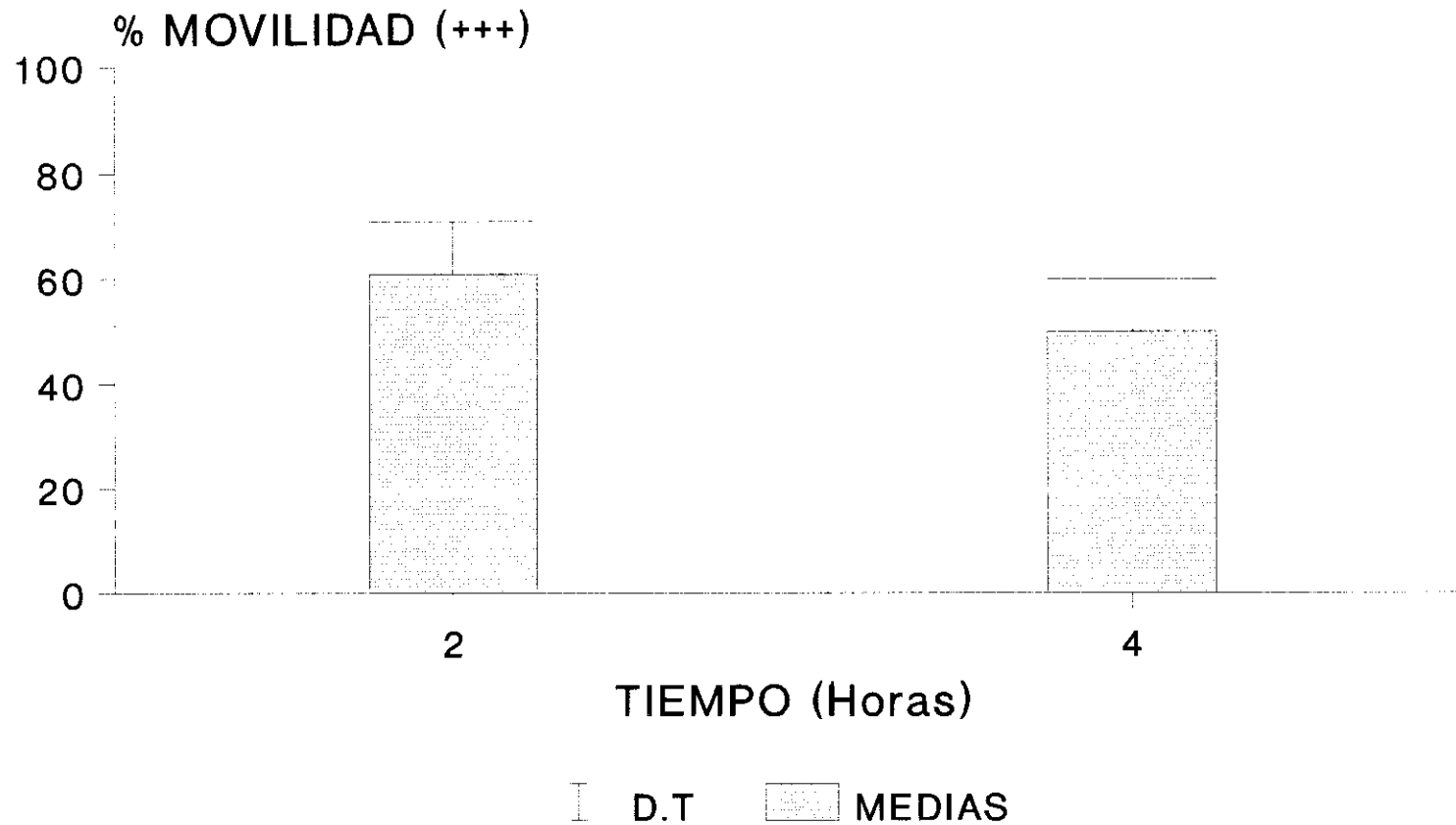
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD

MUESTRAS PROBLEMA CON > 10 U.C.C\esp



GRAFICA VI

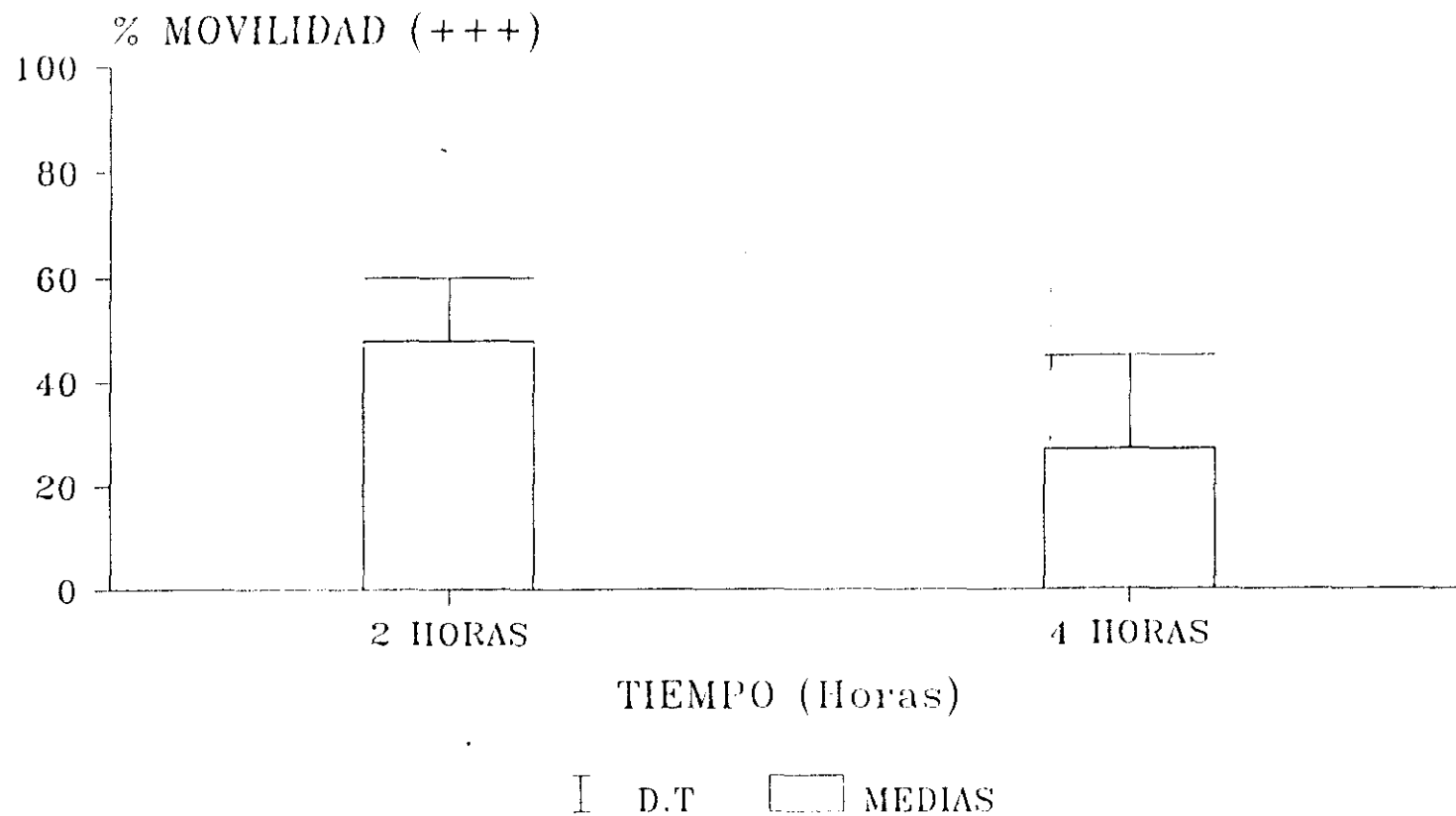
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICO VII

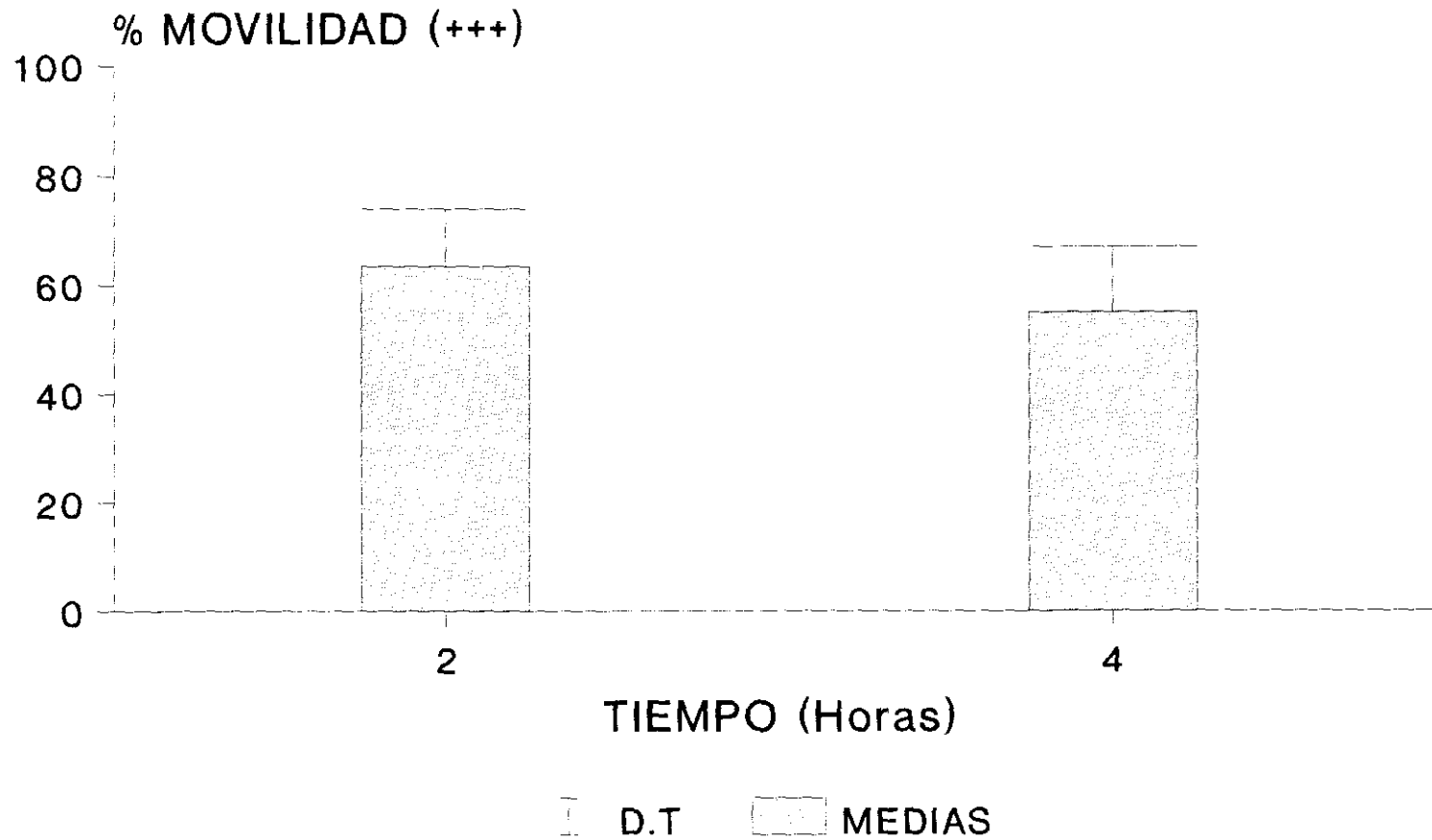
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICO VIII

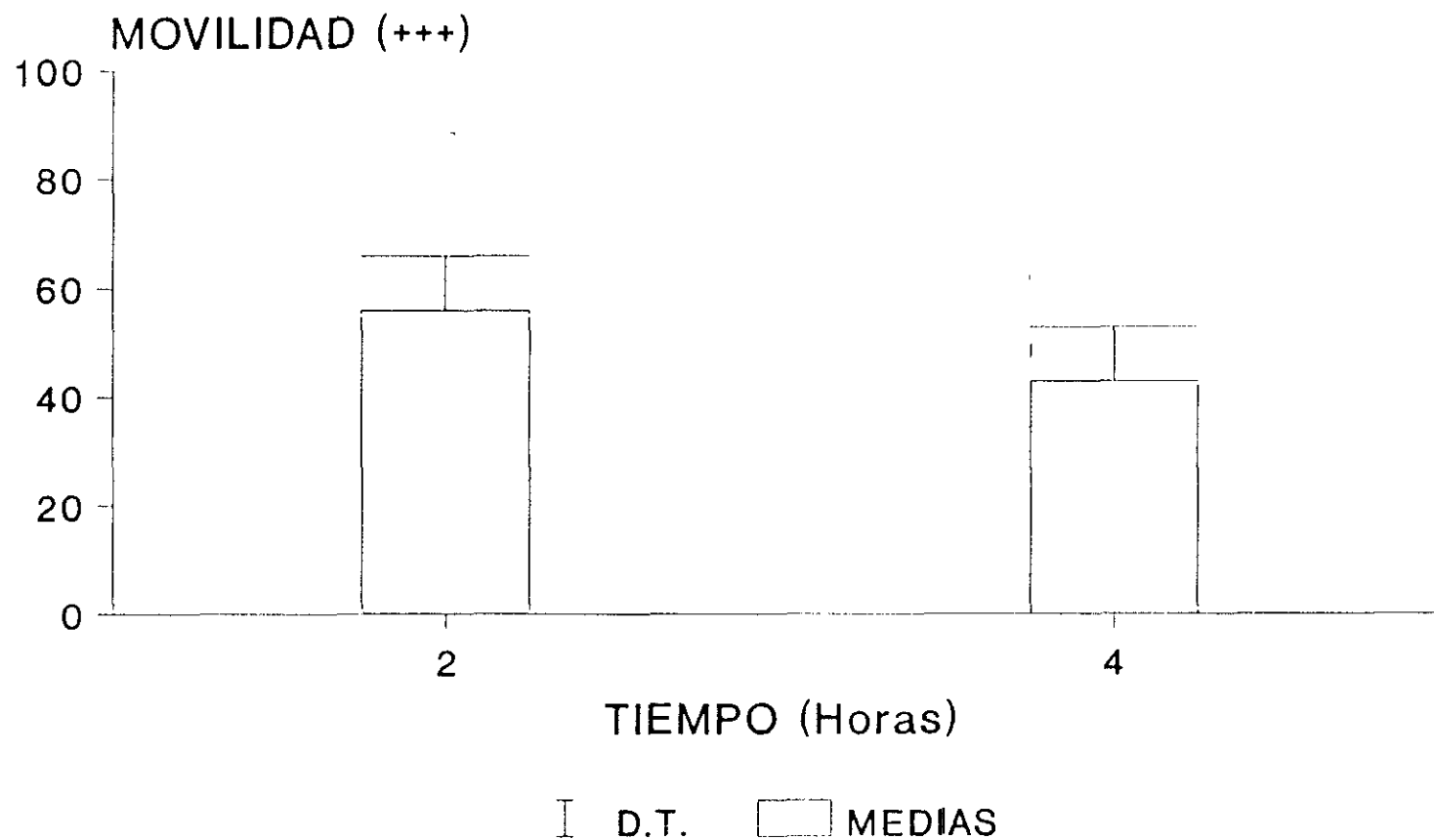
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL CON < 10 U.C.C/esp



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICA IX

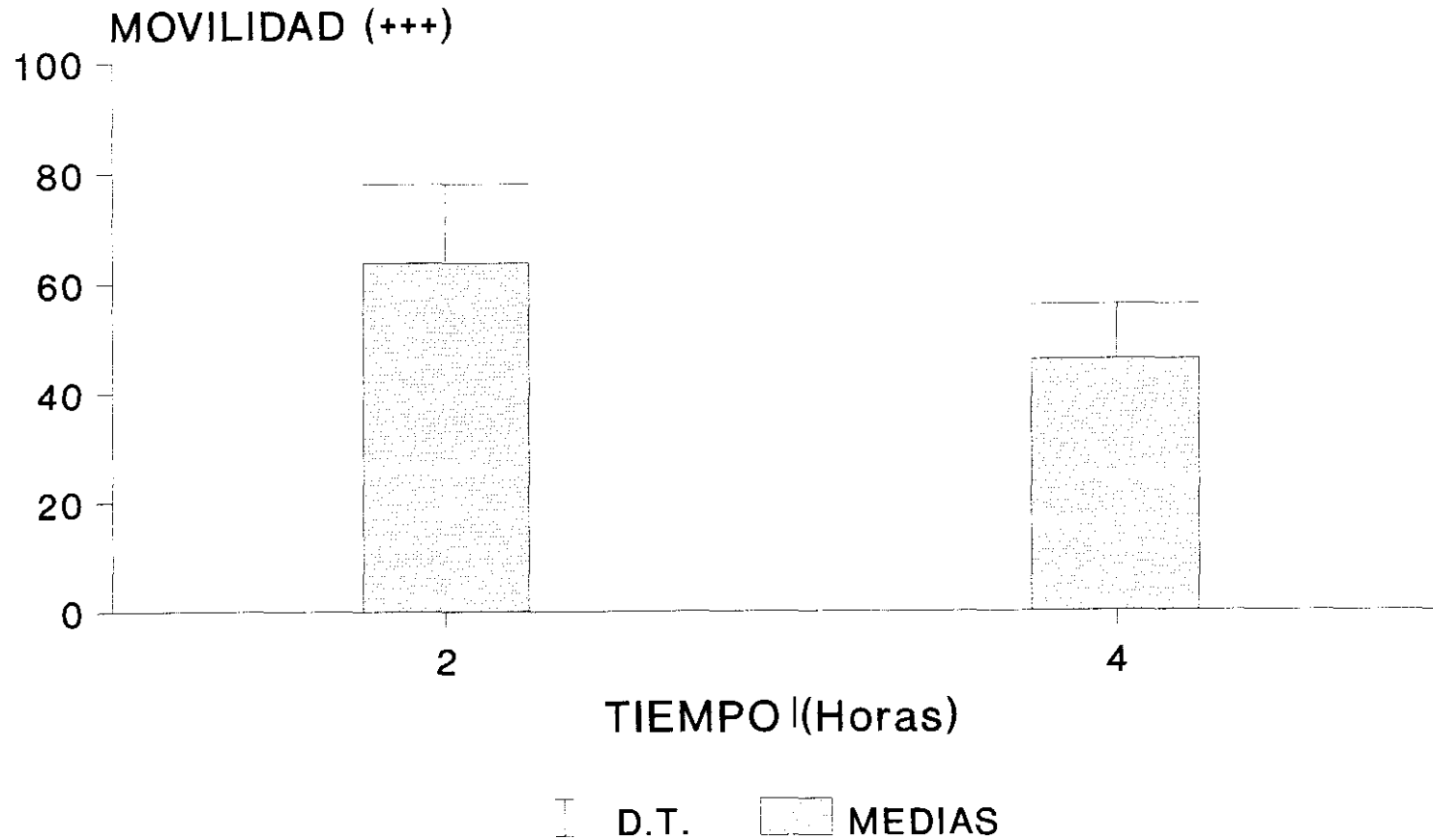
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA CON < 10 U.C.C/esp



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICA X

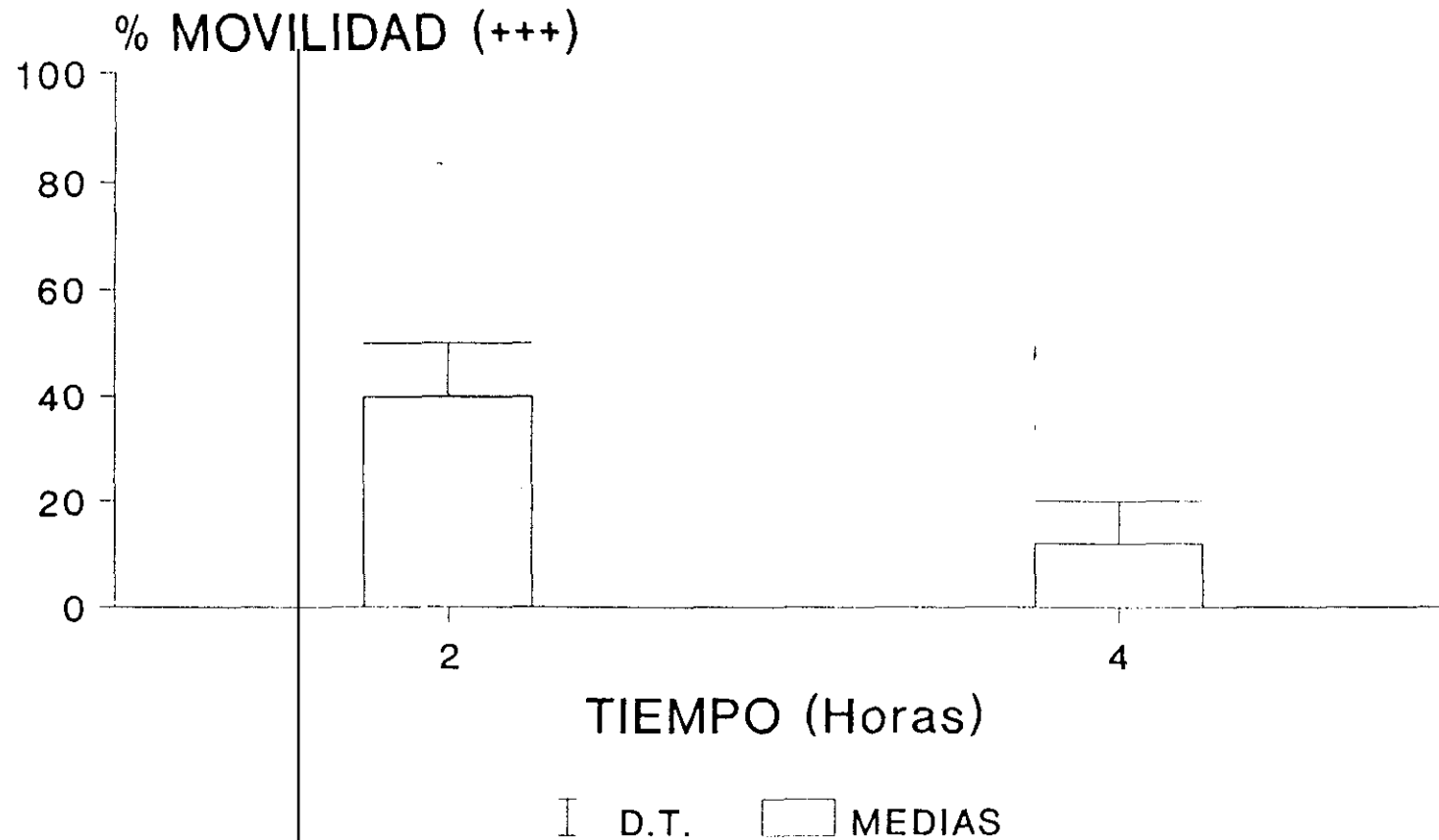
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL CON > 10 U.C.C/esp



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICA XI

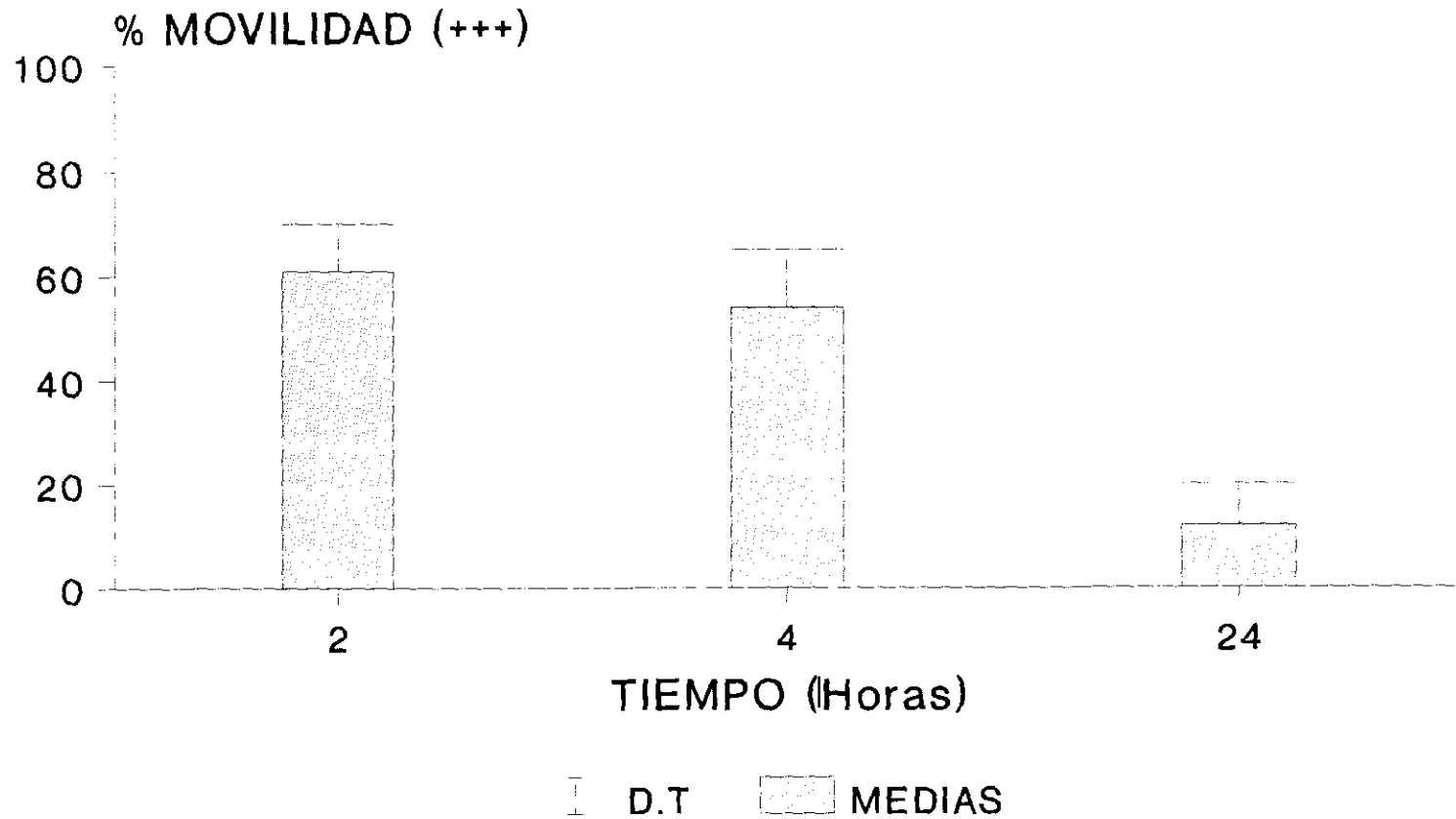
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA CON > 10 U.C.C/esp



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICA XII

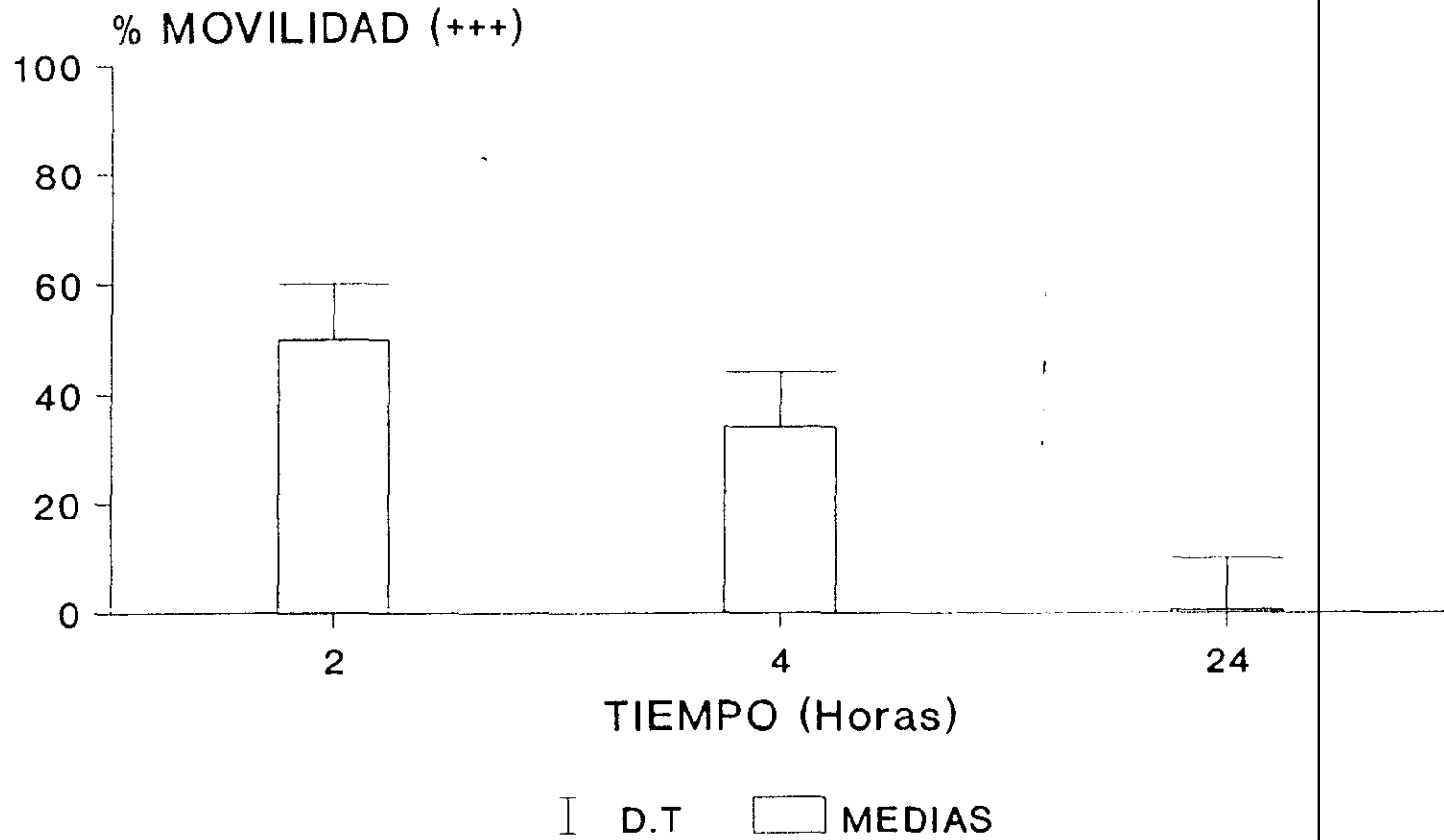
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL



MUESTRAS DE SEMEN SIN LAVAR

GRAFICO XIII

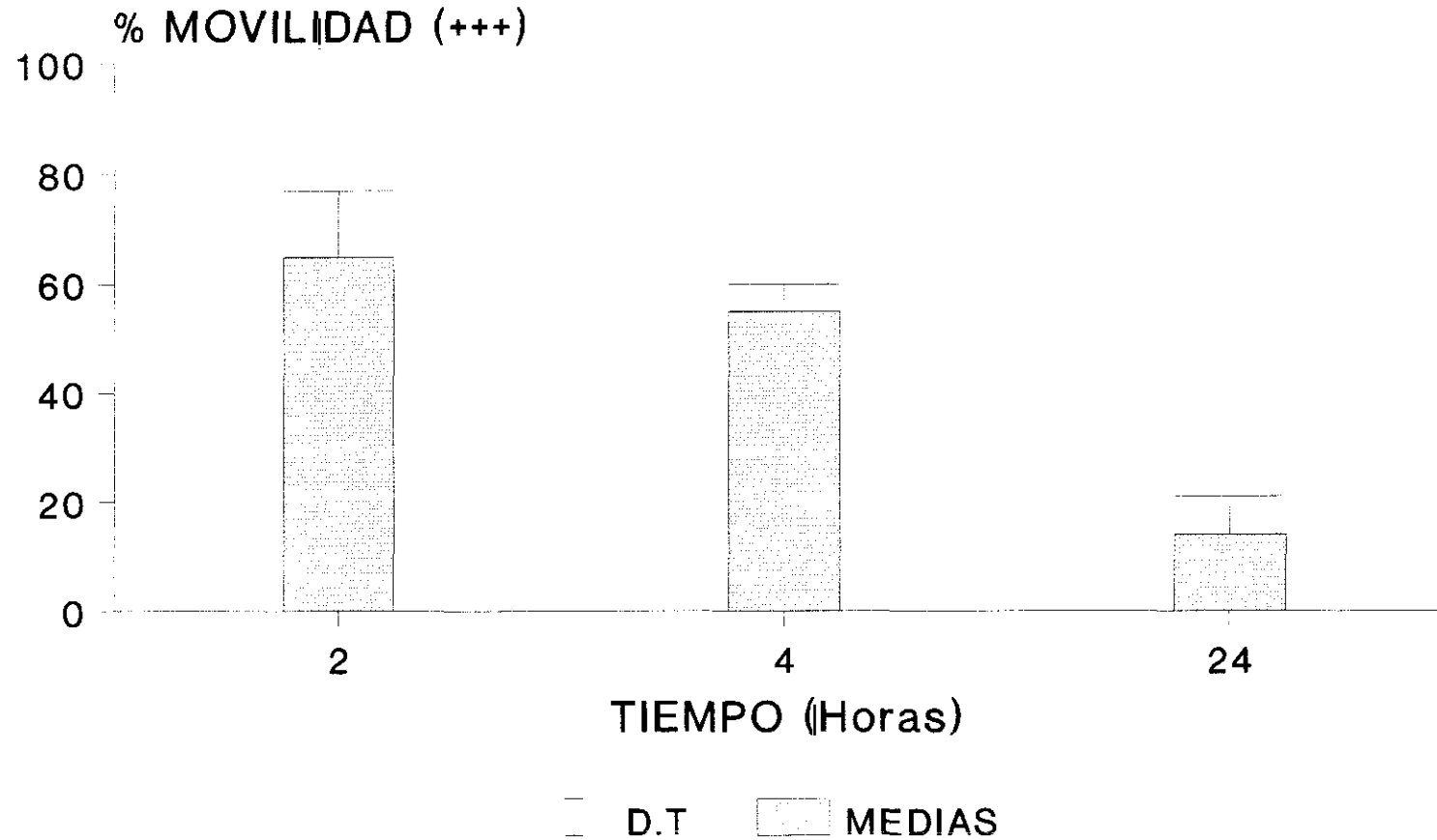
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA



MUESTRAS DE SEMEN SIN LAVAR

GRAFICO XIV

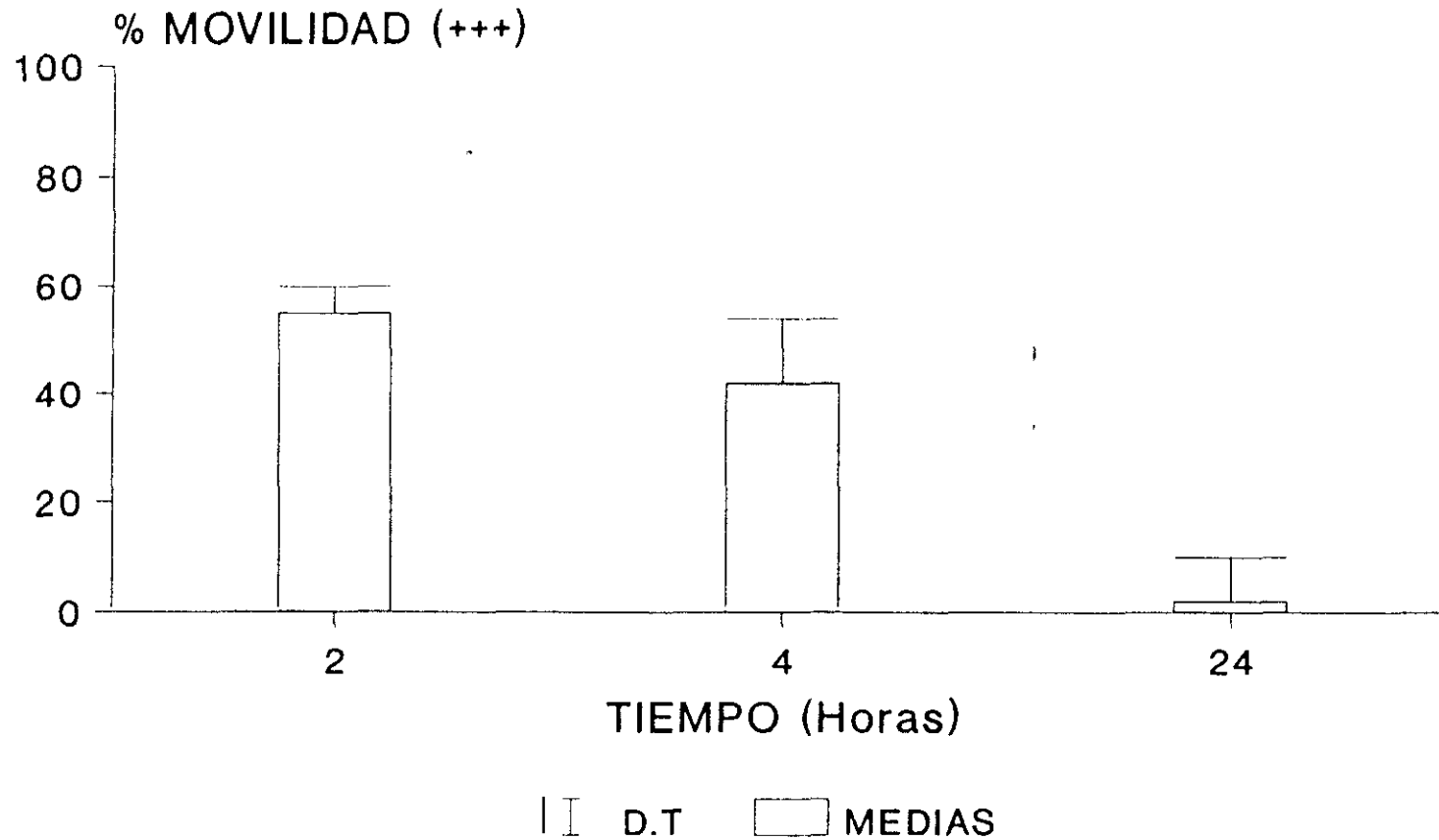
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL CON < 10 U.C.C/ esp



MUESTRAS DE SEMEN SIN LAVAR

GRAFICA XV

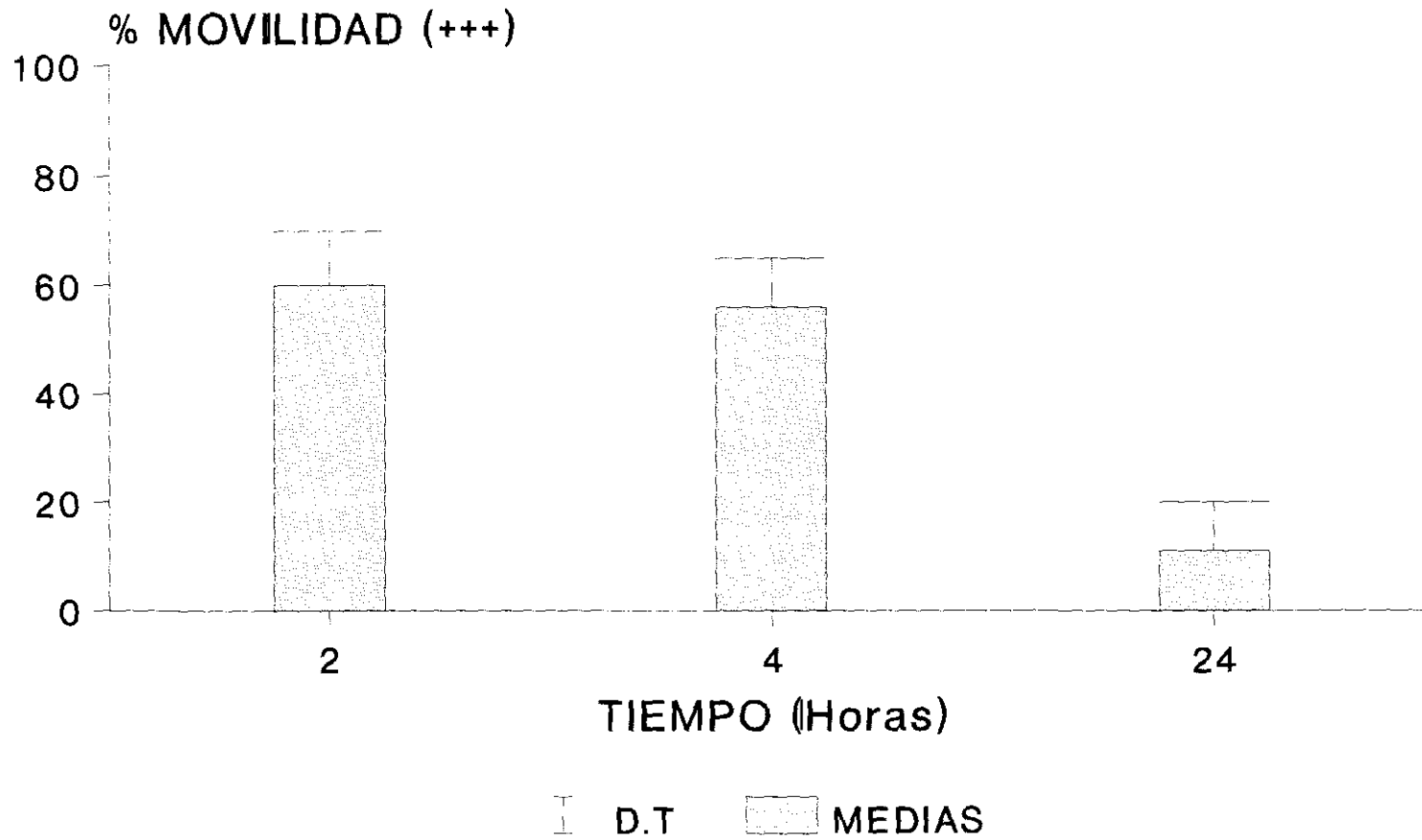
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA CON < 10 U.C.C/esp



MUESTRAS DE SEMEN SIN LAVAR

GRAFICA XVI

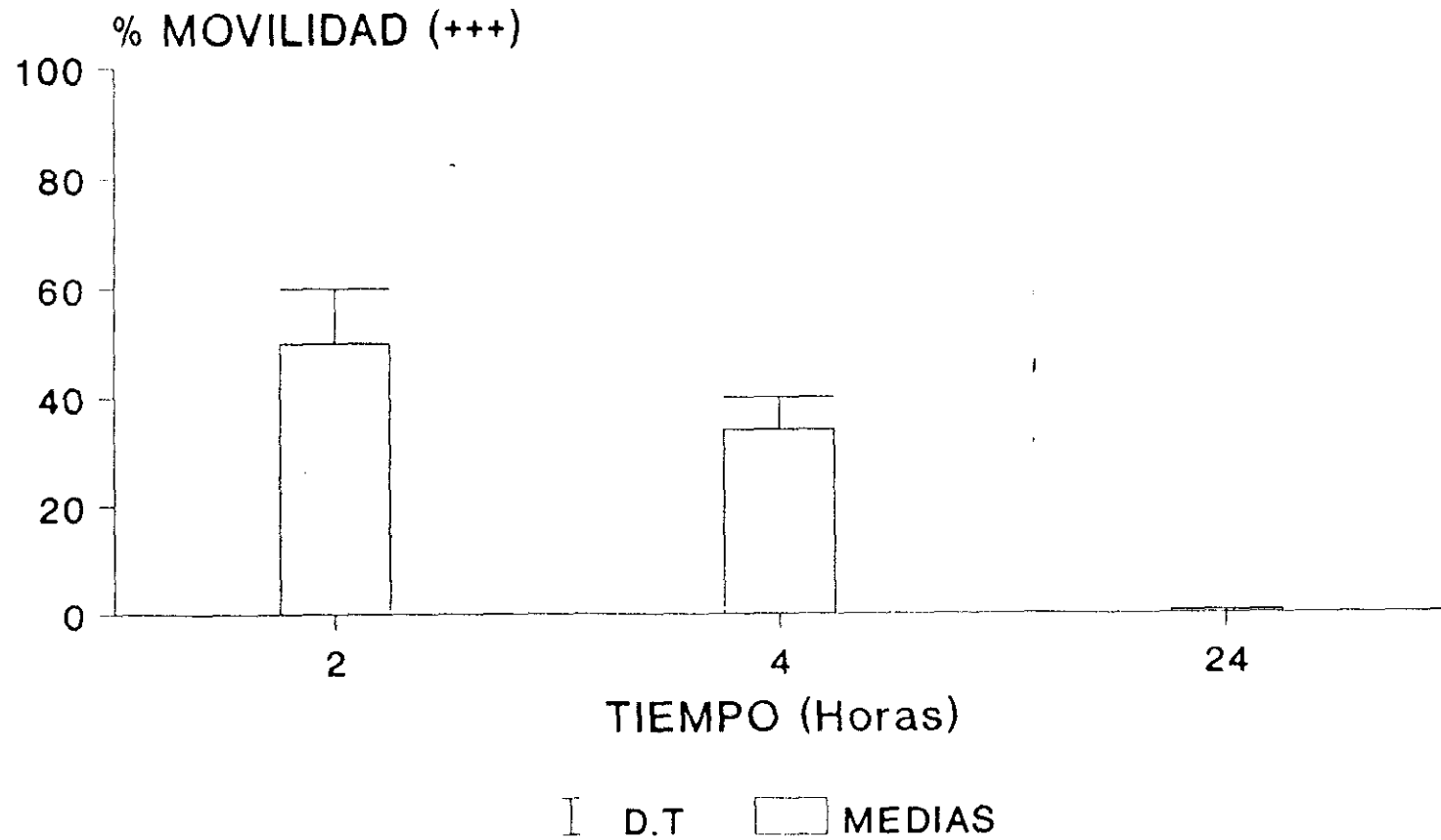
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL CON > 10 U.C.C/esp



MUESTRAS DE SEMEN SIN LAVAR

GRAFICA XVII

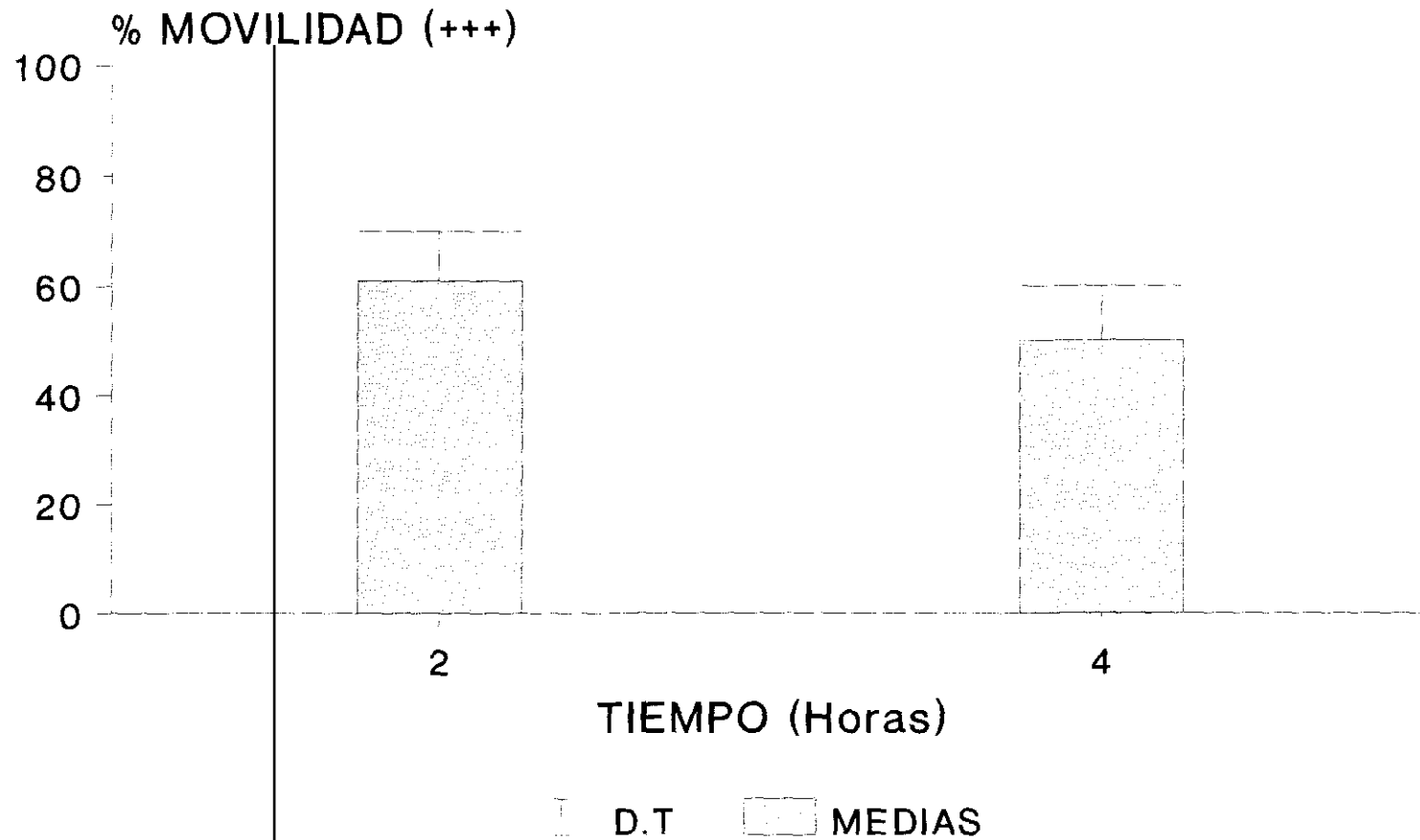
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA CON > 10 U.C.C/esp



MUESTRAS DE SEMEN SIN LAVAR

GRAFICA XVIII

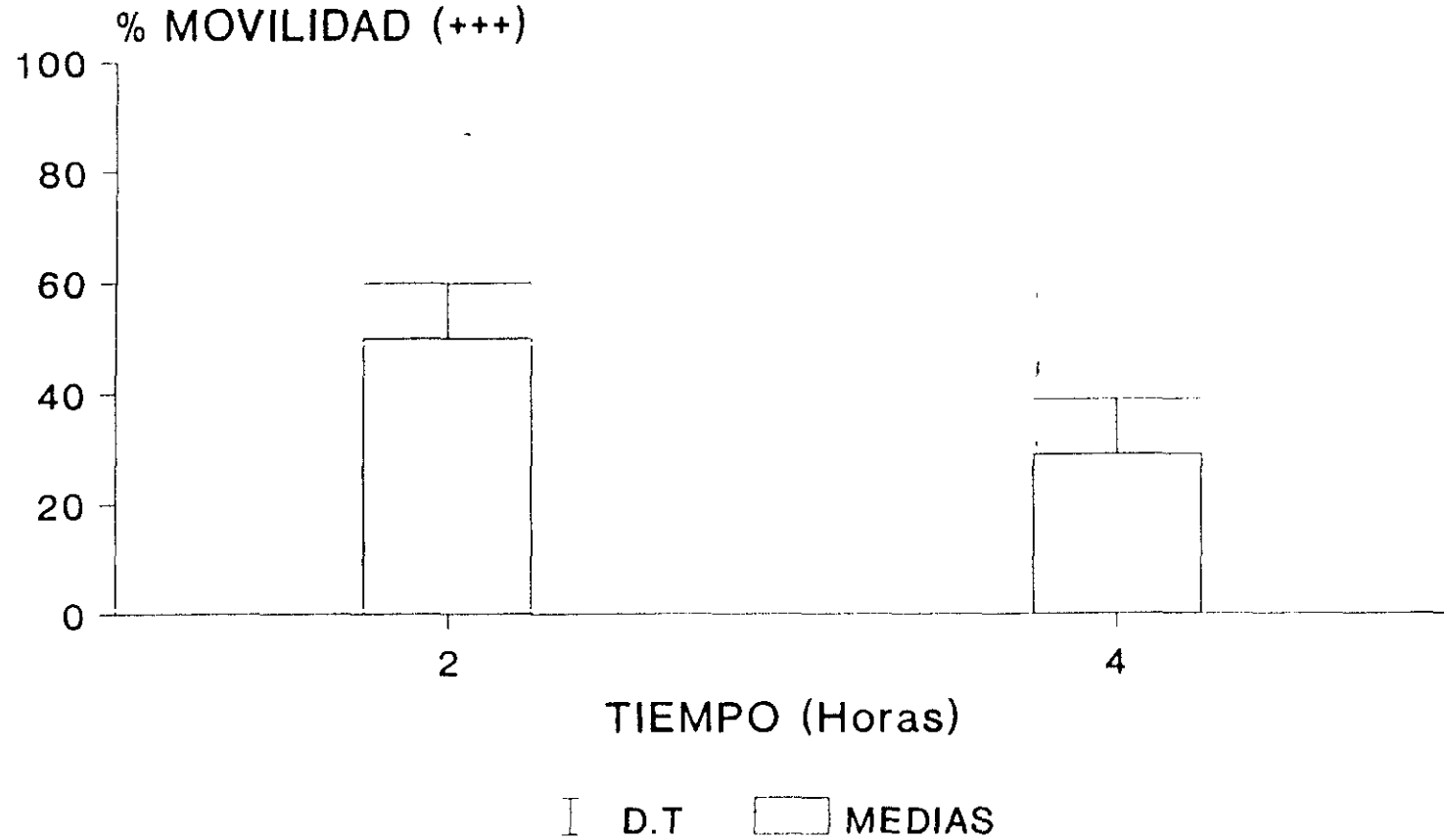
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL



MUESTRAS DE SEMEN LAVADAS CON MEDIO UREA

GRAFICA XIX

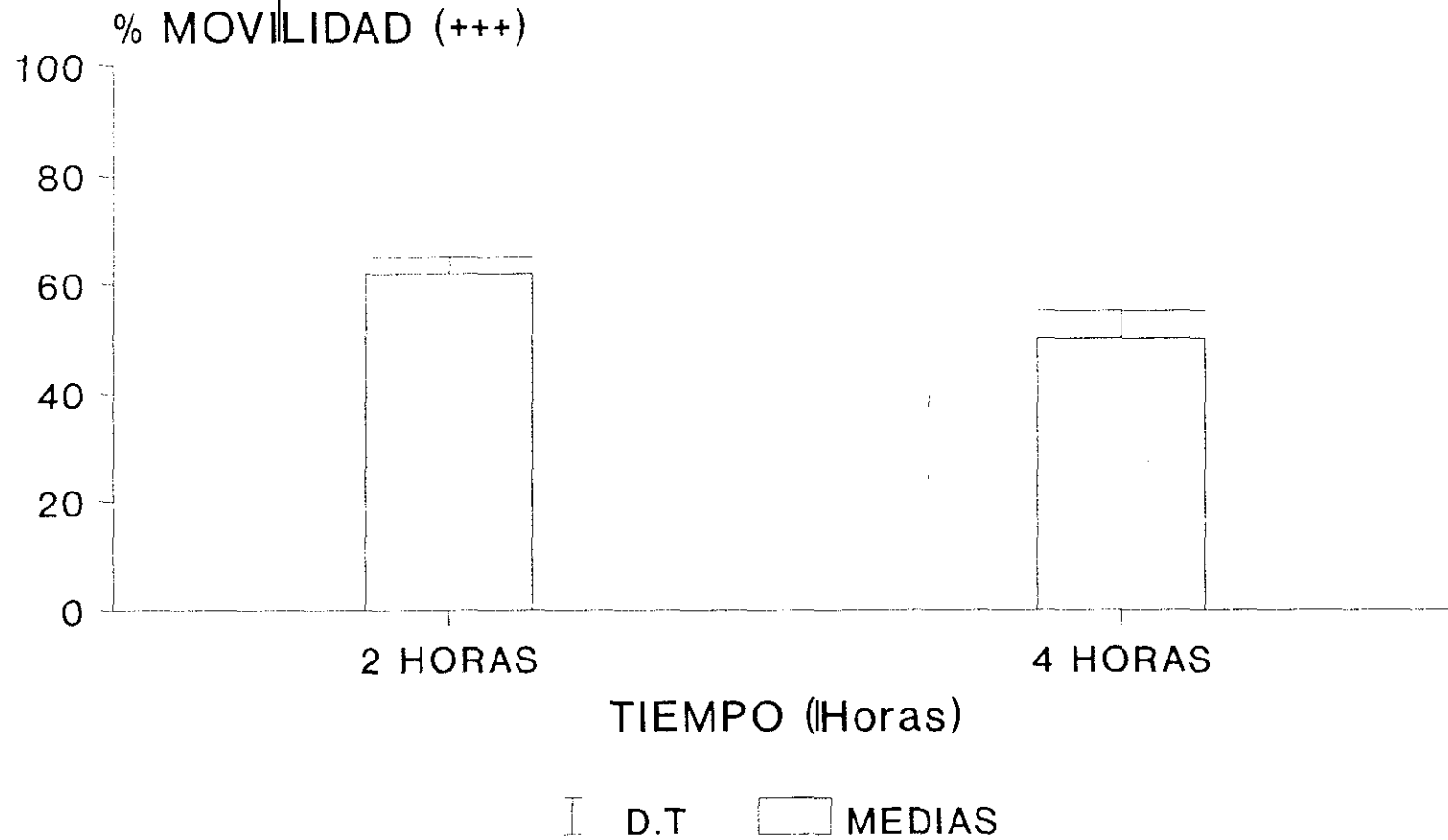
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA



MUESTRAS DE SEMEN LAVADAS CON MEDIO UREA

GRAFICA XX

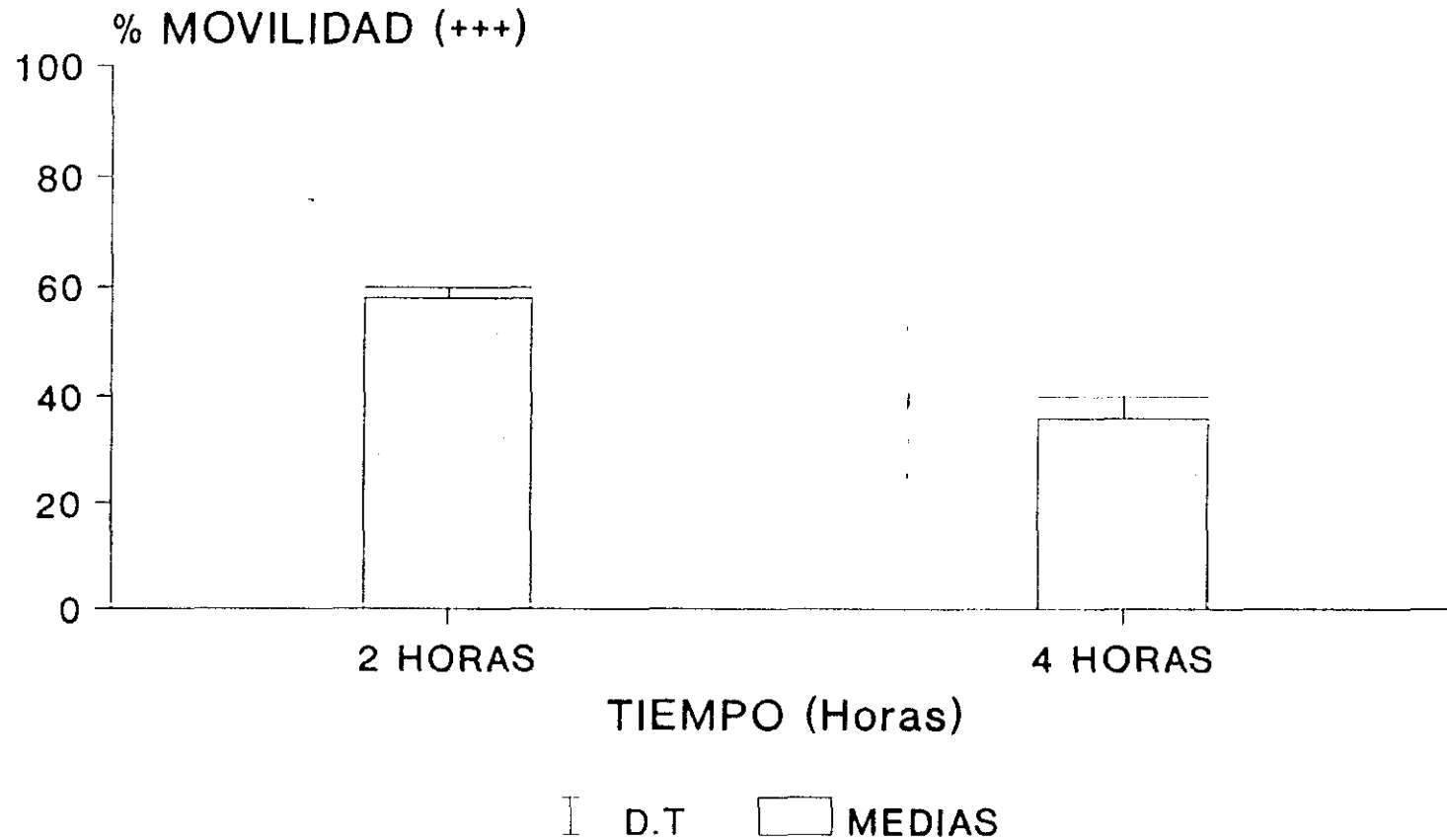
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL CON < 10 U.C.C/esp



MUESTRAS LAVADAS CON MEDIO UREA

GRAFICA XXI

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA CON < 10 U.C.C/esp

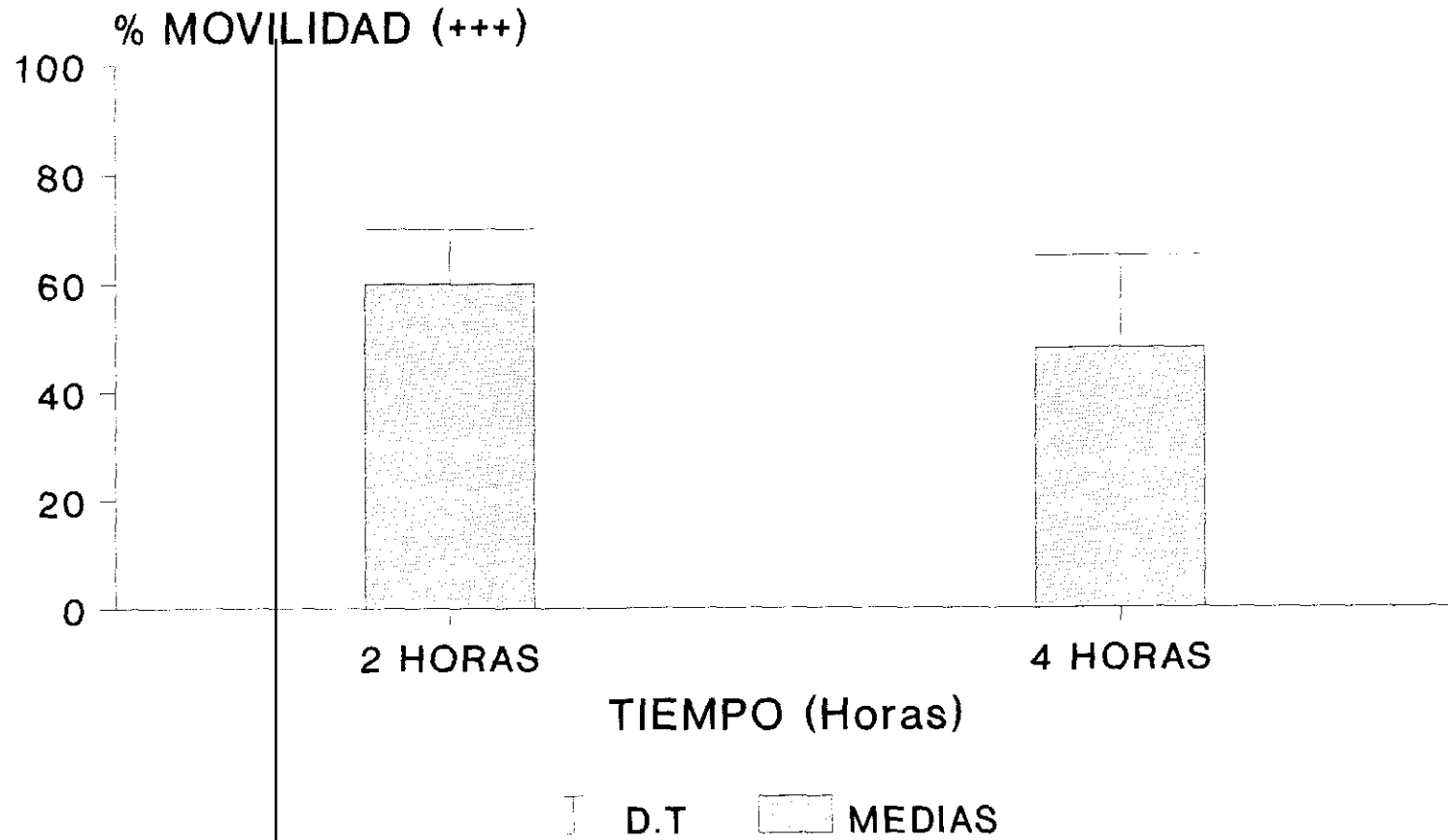


MUESTRAS LAVADAS CON MEDIO UREA

GRAFICA XXII

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD

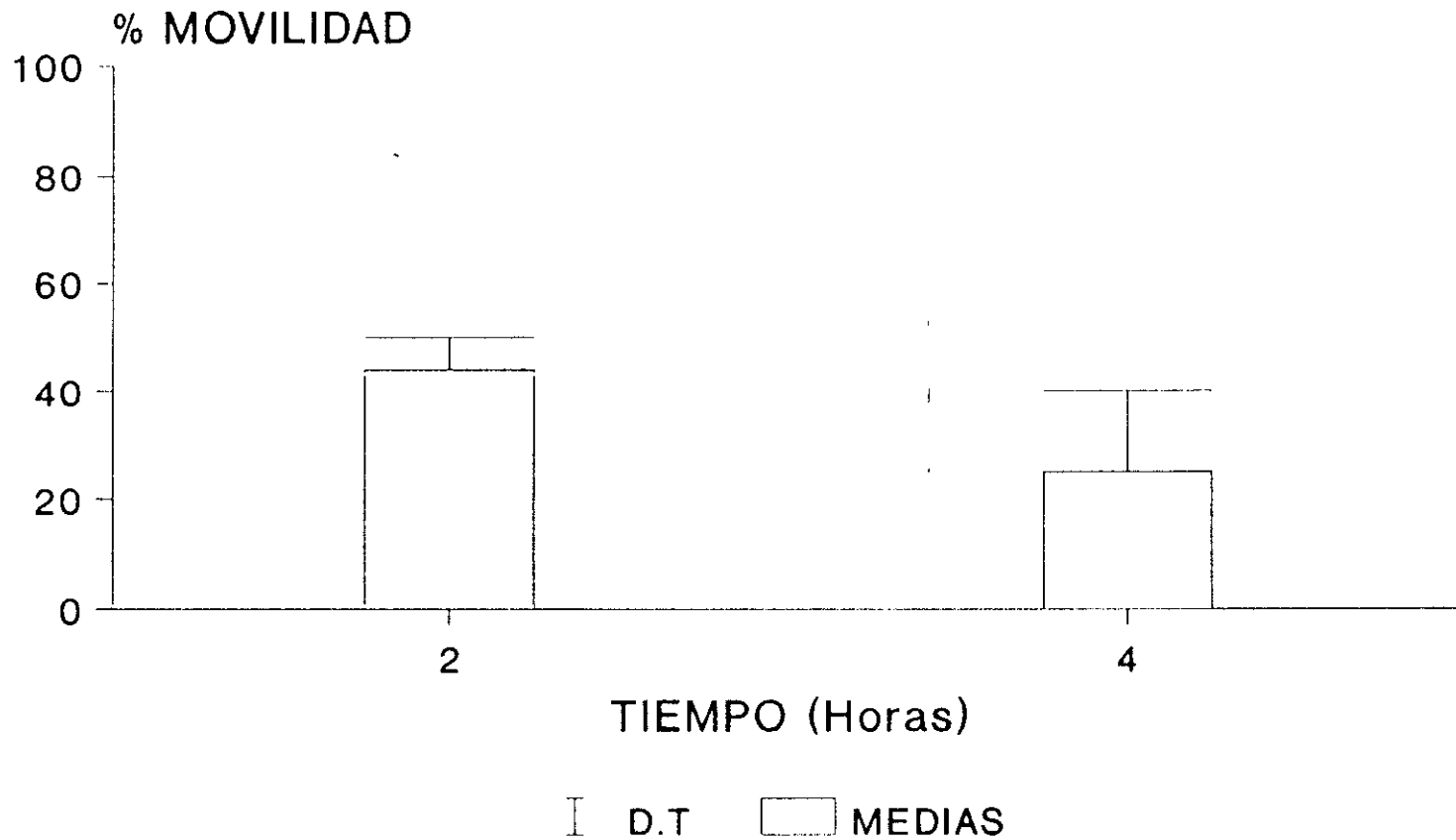
MUESTRAS CONTROL CON > 10 U.C.C/esp



MUESTRAS LAVADAS CON MEDIO UREA

GRAFICA XXIII

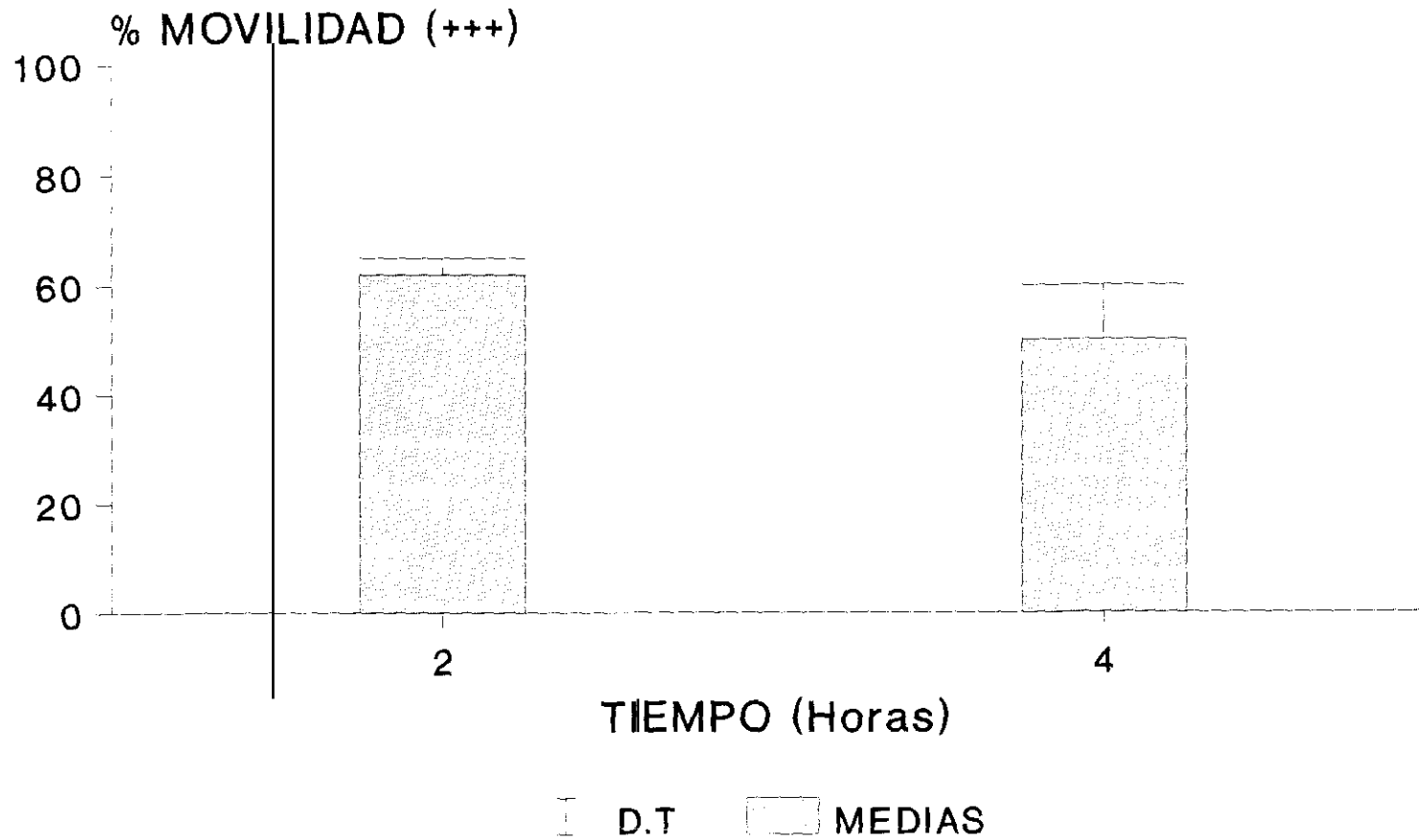
UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA CON > 10 U.C.C/esp



MUESTRAS LAVADAS CON MEDIO UREA

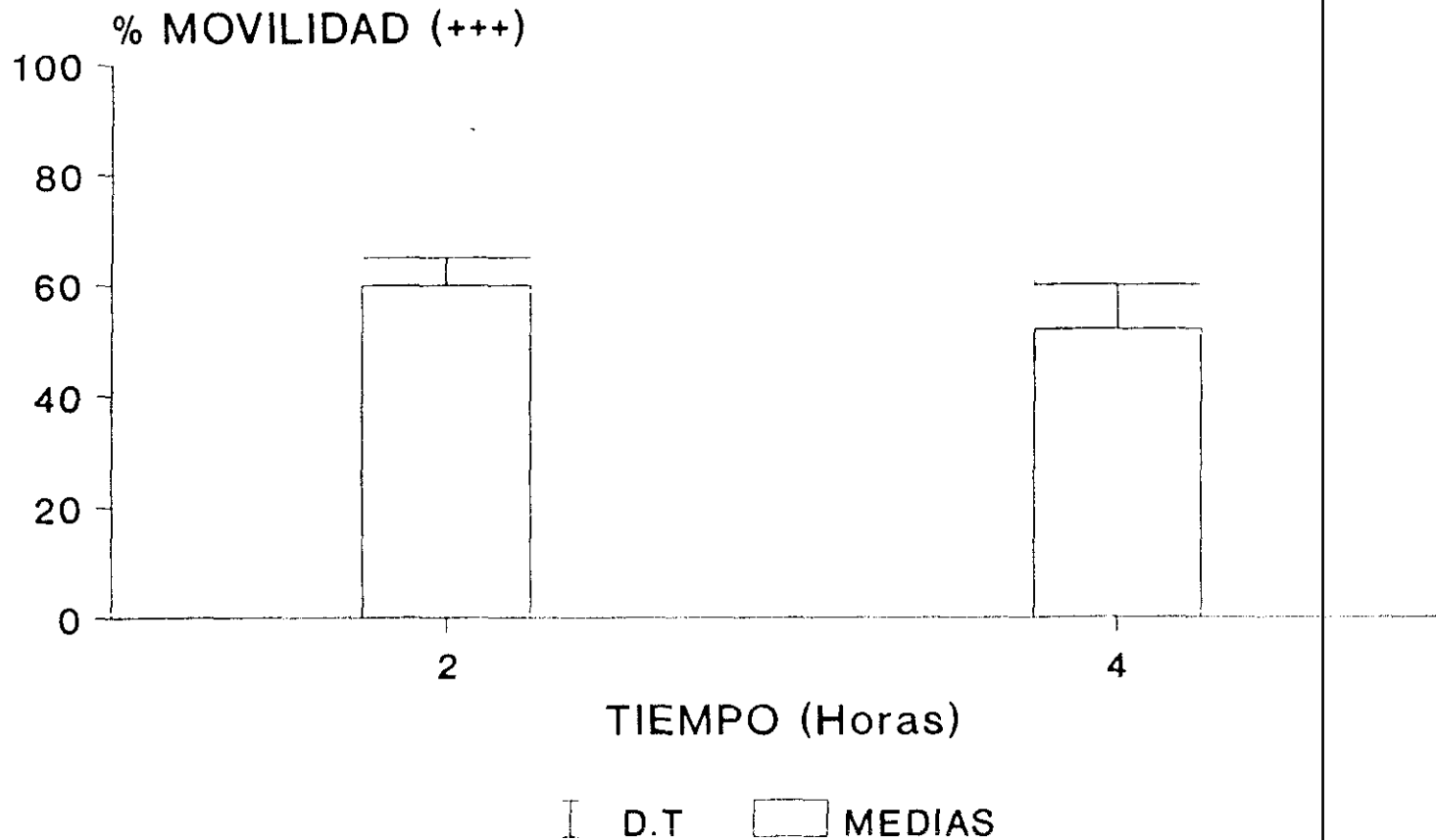
GRAFICA XXIV

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL (C1)



GRAFICA XXV

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL (C2)



MUESTRAS C2 CON UREAPLASMAS INACTIVADOS

GRAFICA XXVI

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA

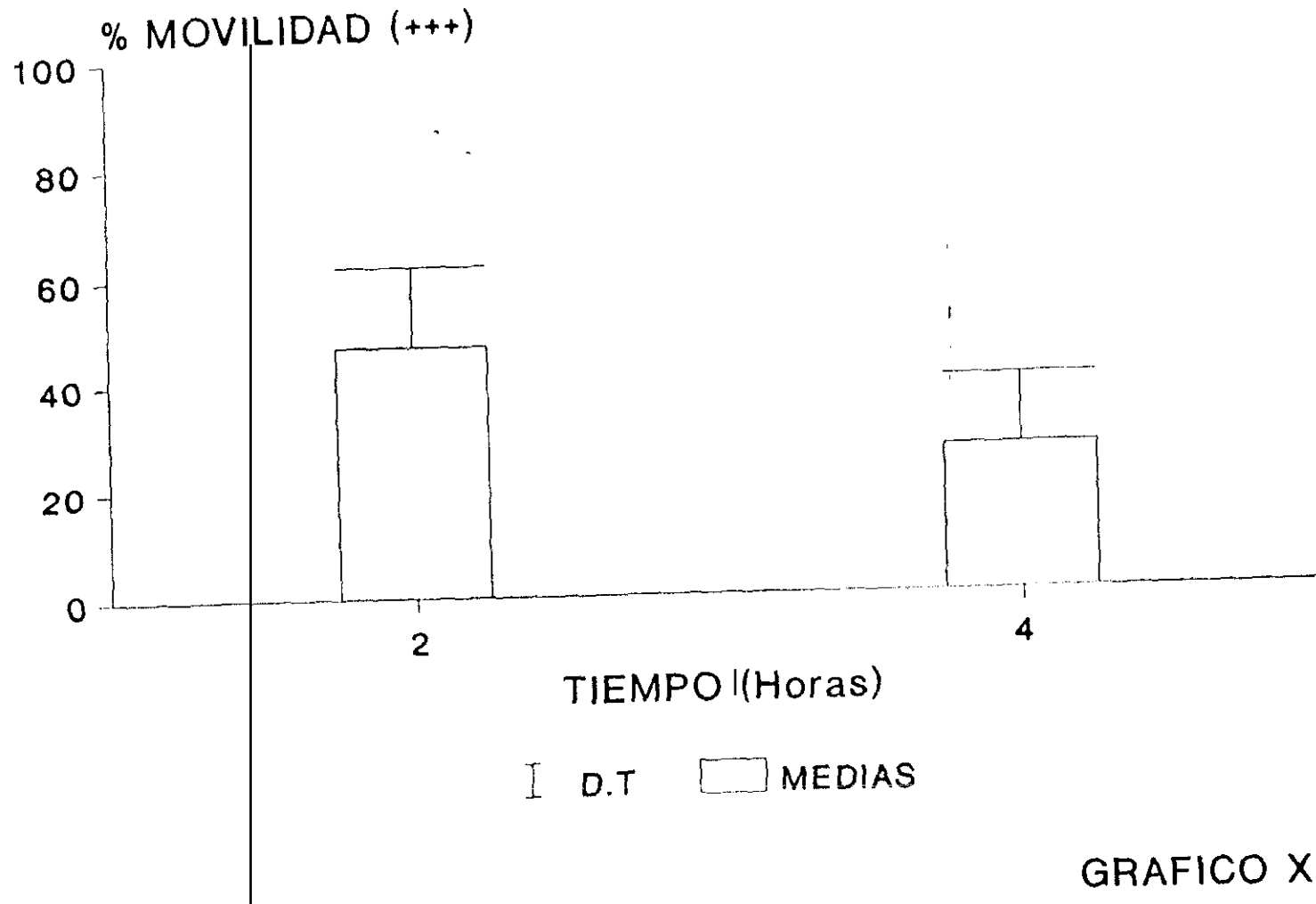
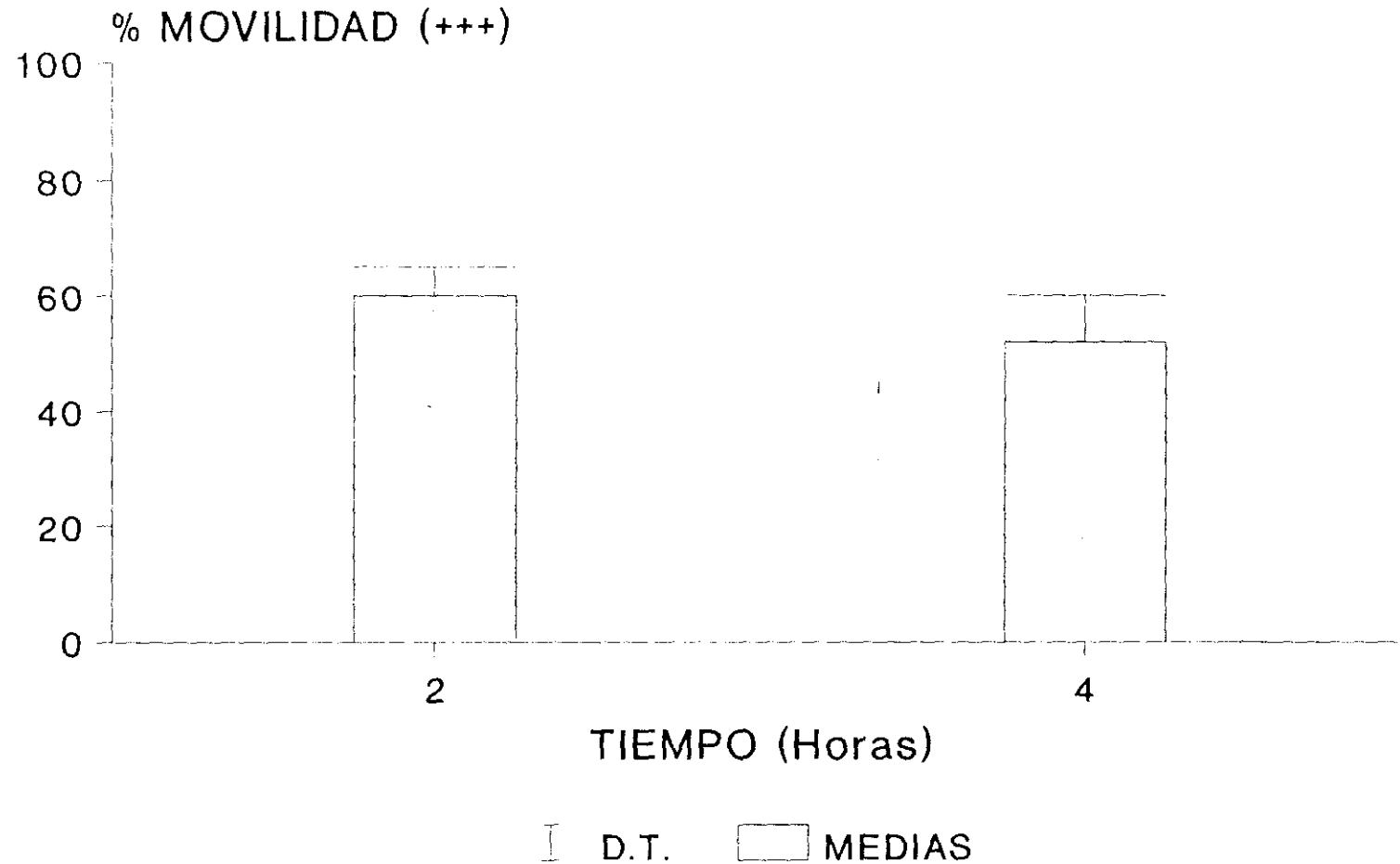


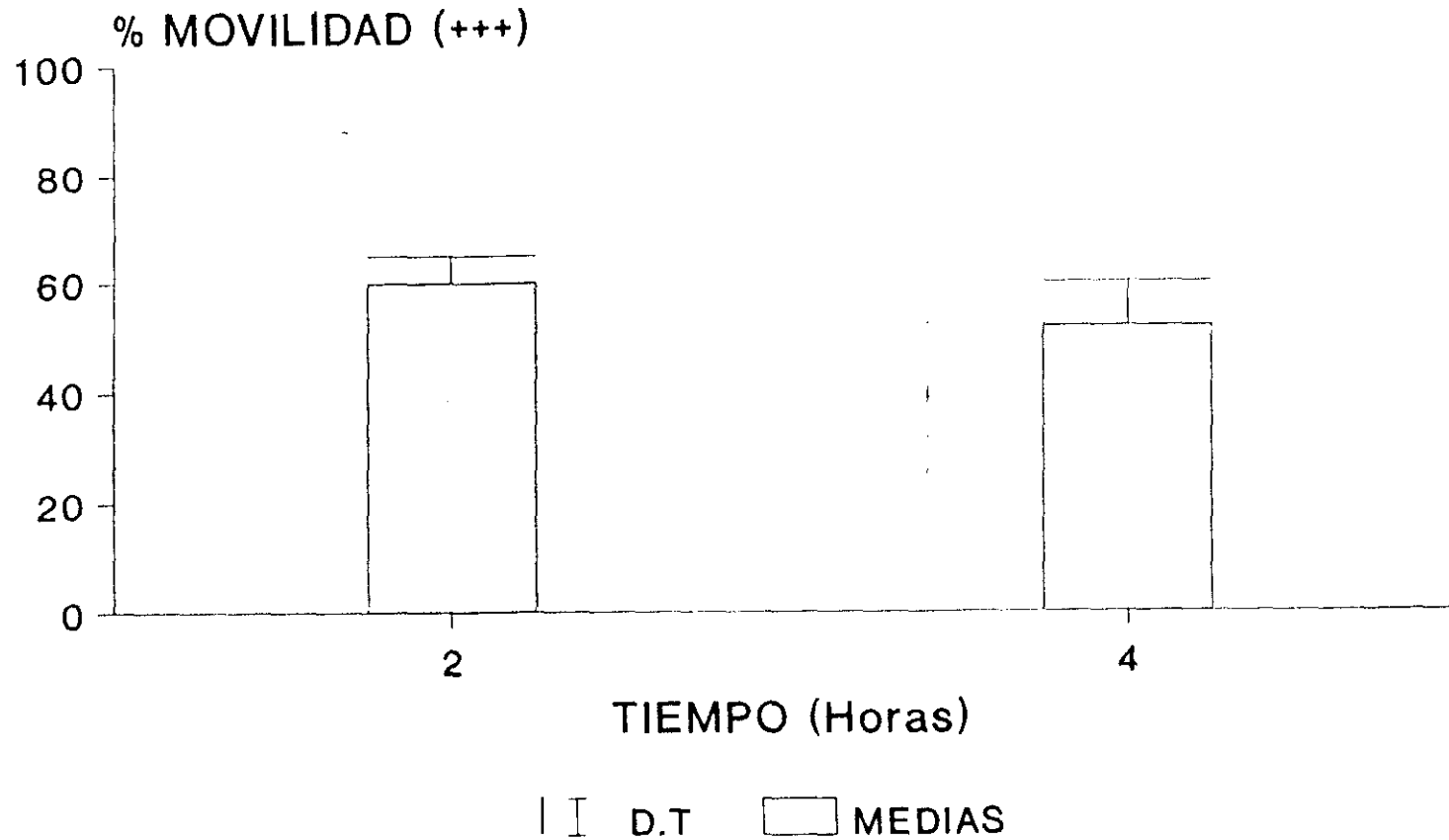
GRAFICO XXVII

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL (C1) CON < 10 U.C.C/esp



GRAFICA XXVIII

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL (C2) CON < 10 U.C.C/esp

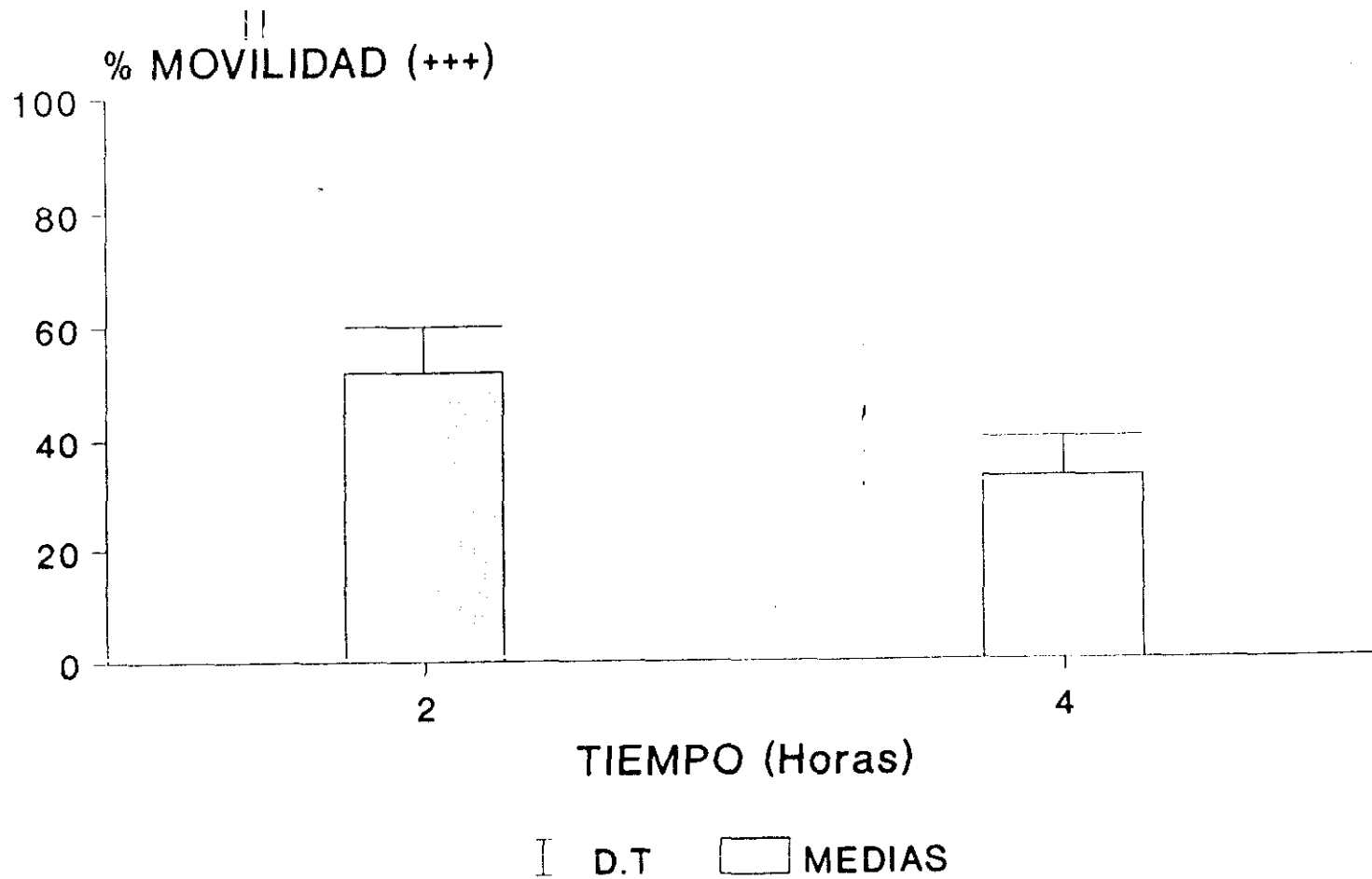


MUESTRAS C2 CON UREAPLASMAS INACTIVADOS

GRAFICA XXIX

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD

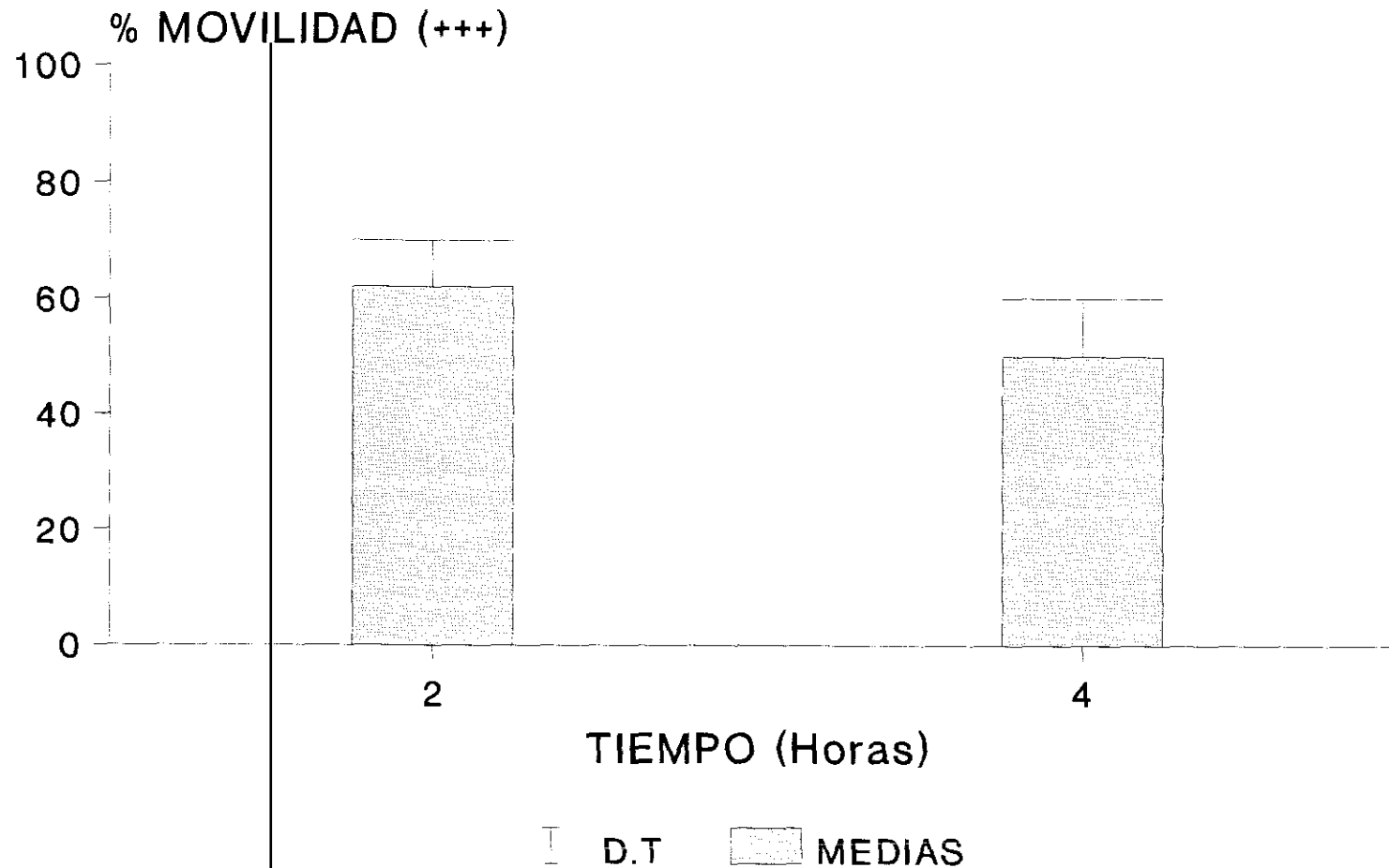
MUESTRAS PROBLEMA CON <10 U.C.C/esp



GRAFICA XXX

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD

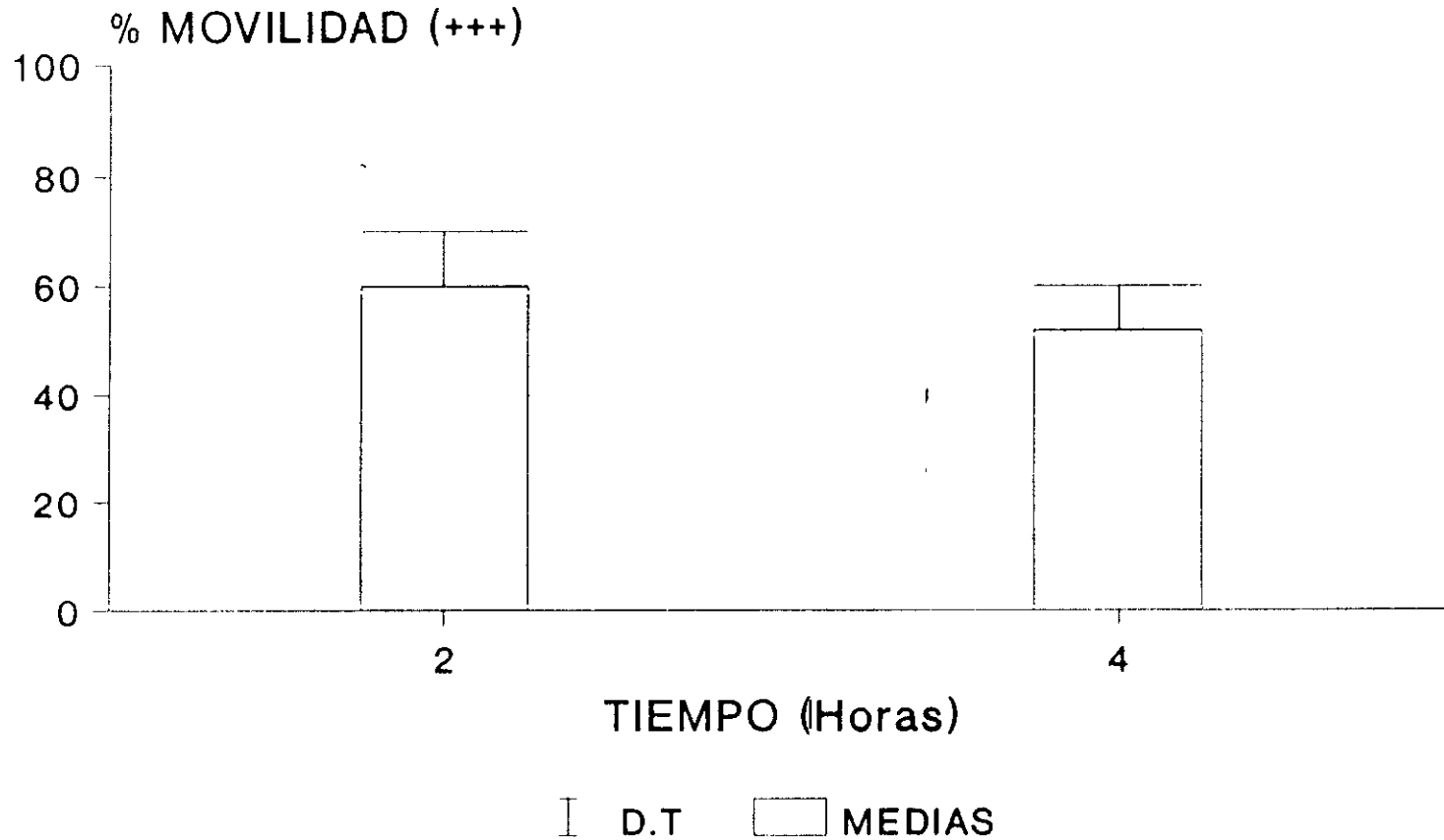
MUESTRAS CONTROL CON > 10 U.c.c/esp



GRAFICA XXXI

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD

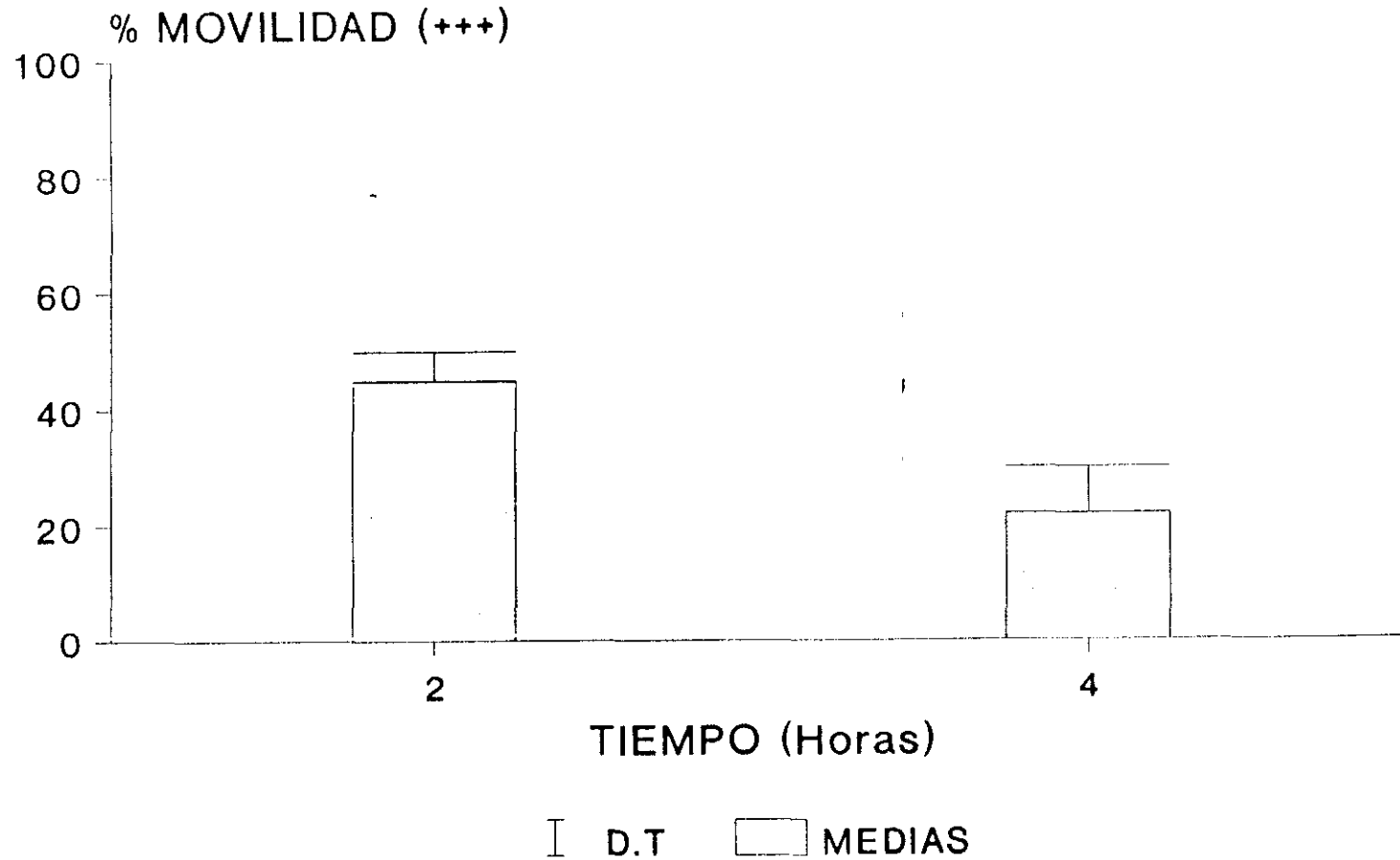
MUESTRAS CONTROL 2 CON > 10 U.C.C/esp



MUESTRAS CONTROL 2 CON U.U. inactivado

GRAFICA XXXII

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA CON > 10 U.C.C/esp



GRAFICA XXXIII

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL

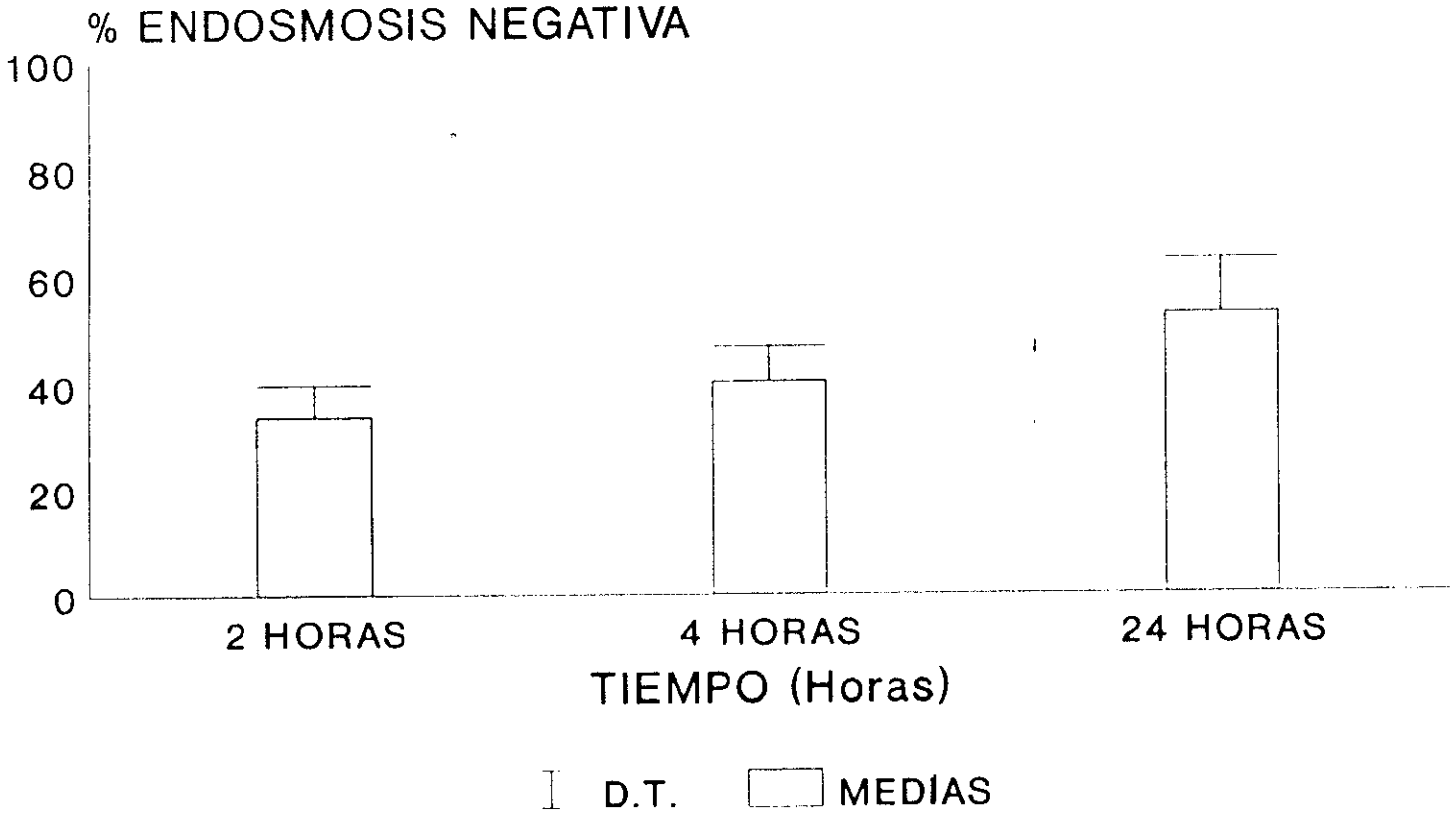


GRAFICO XXXIV

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA

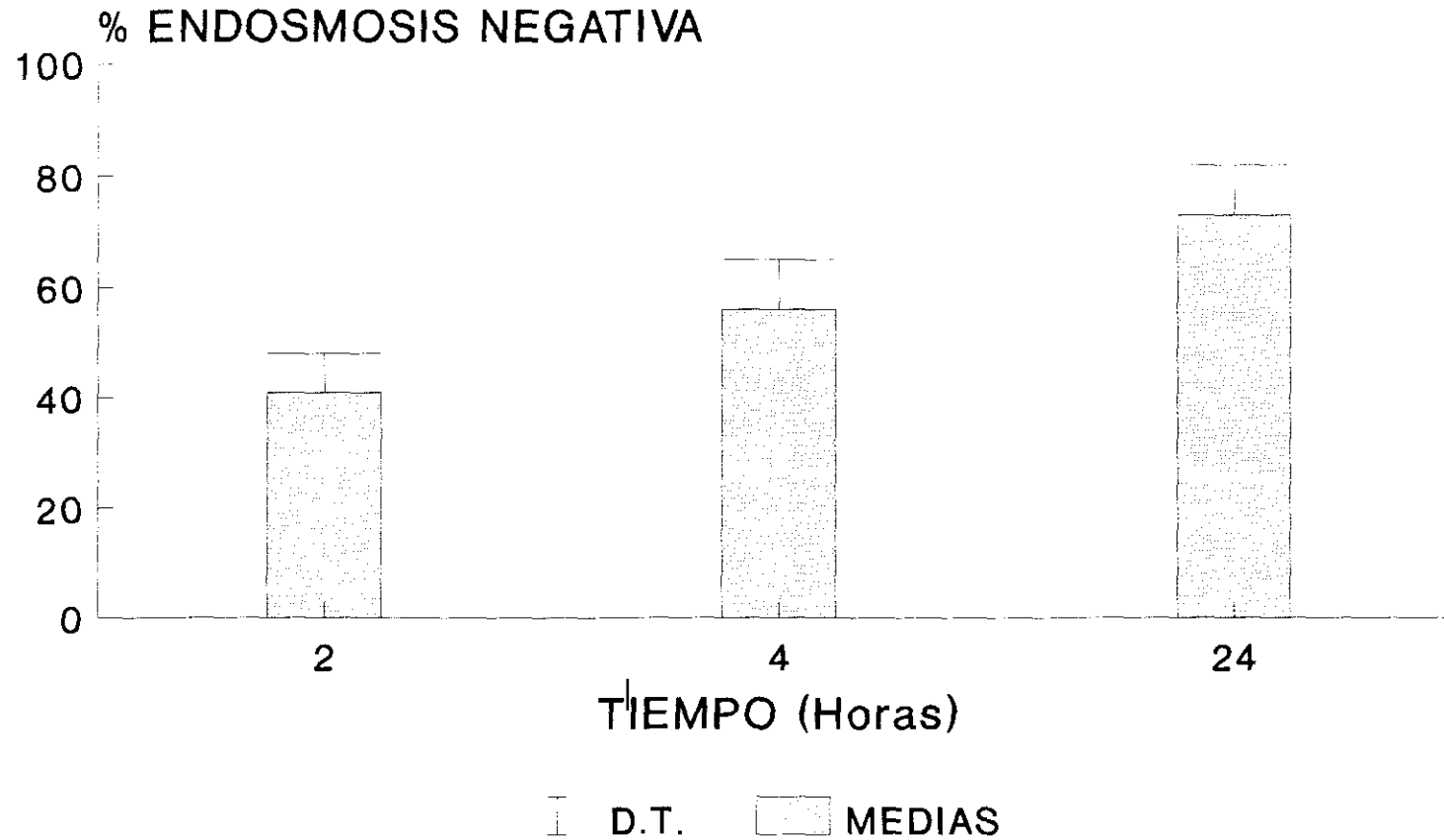
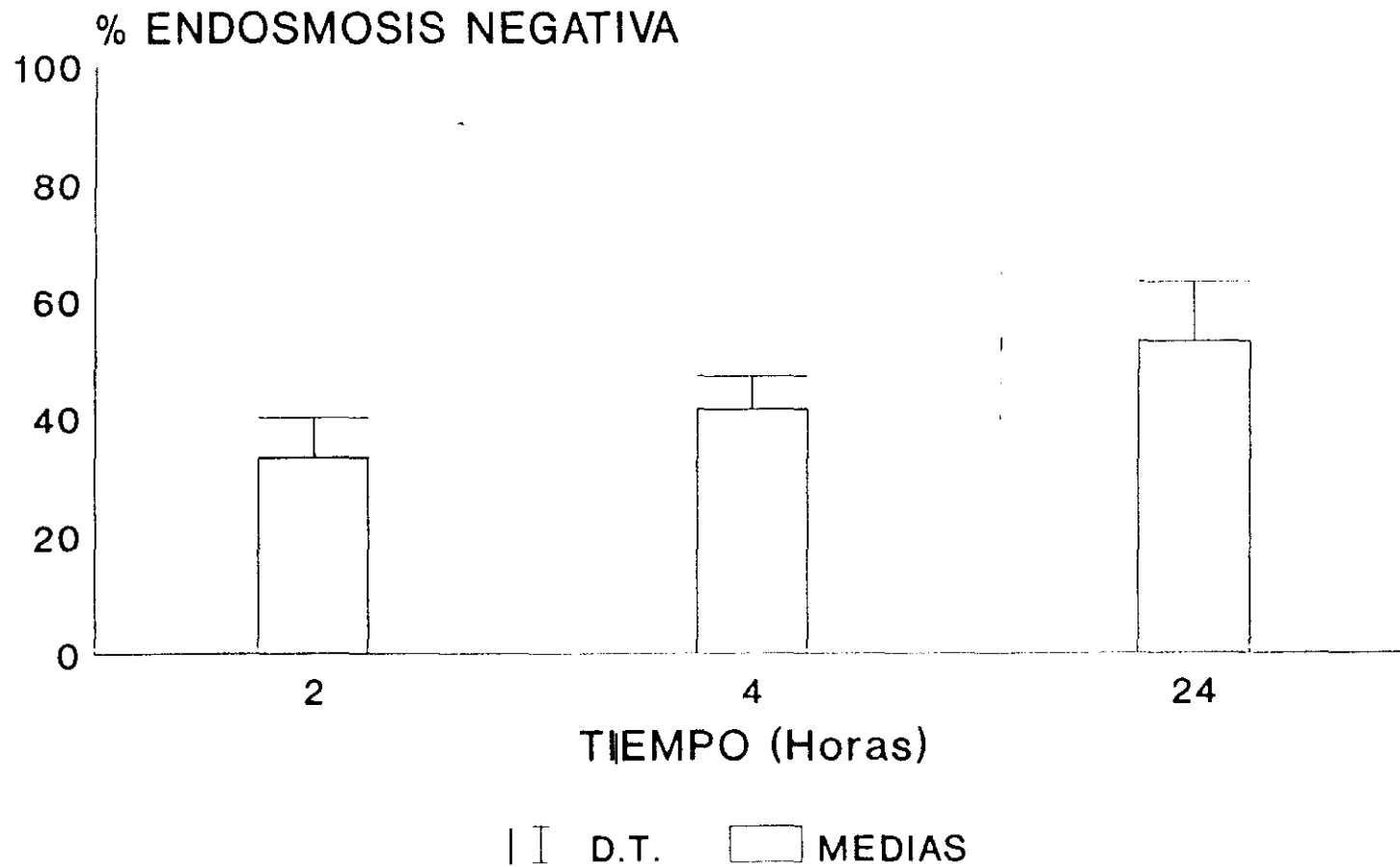


GRAFICO XXXV

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA

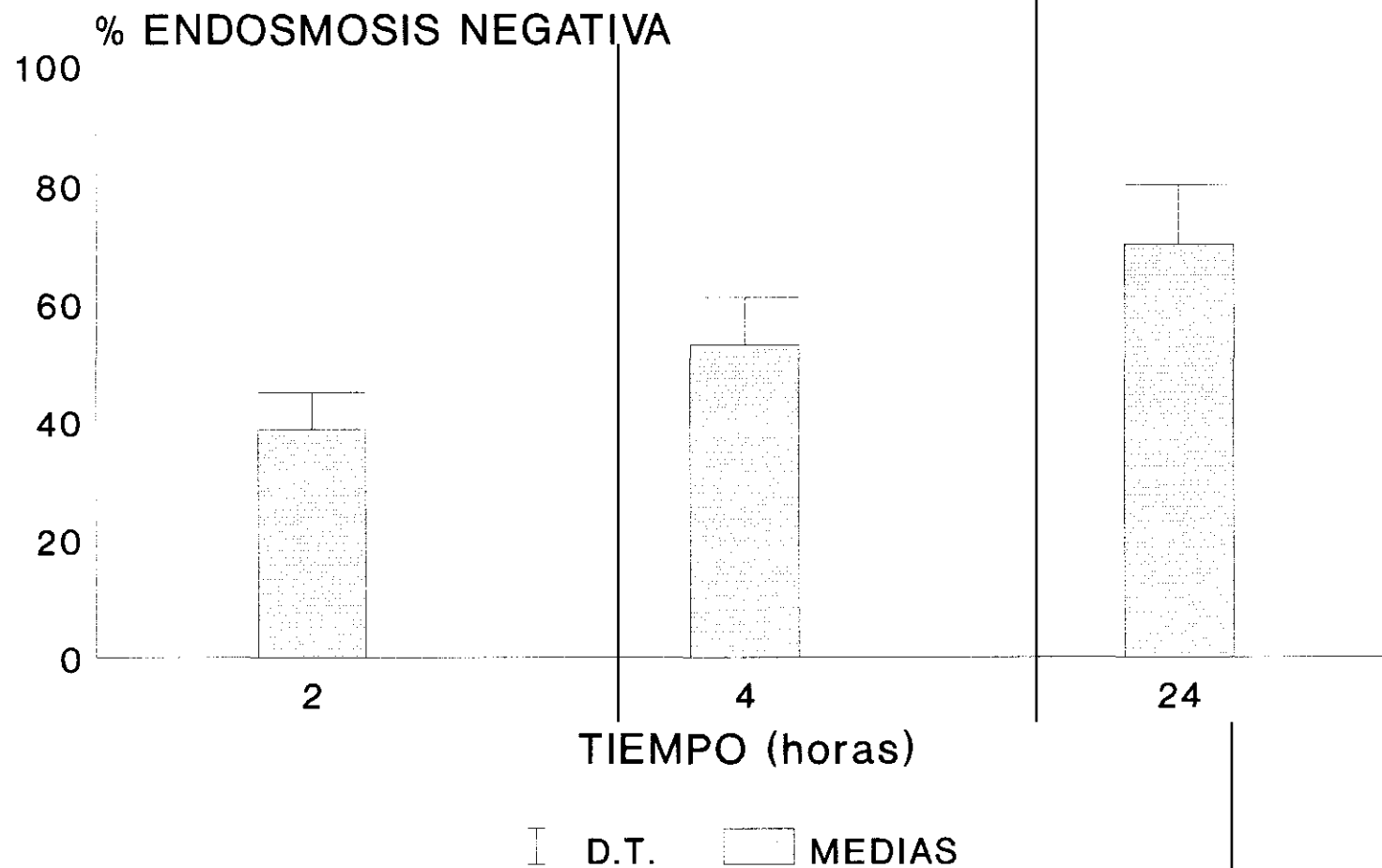
MUESTRAS CONTROL CON < 10 U.C.C\esp



GRAFICA XXXVI

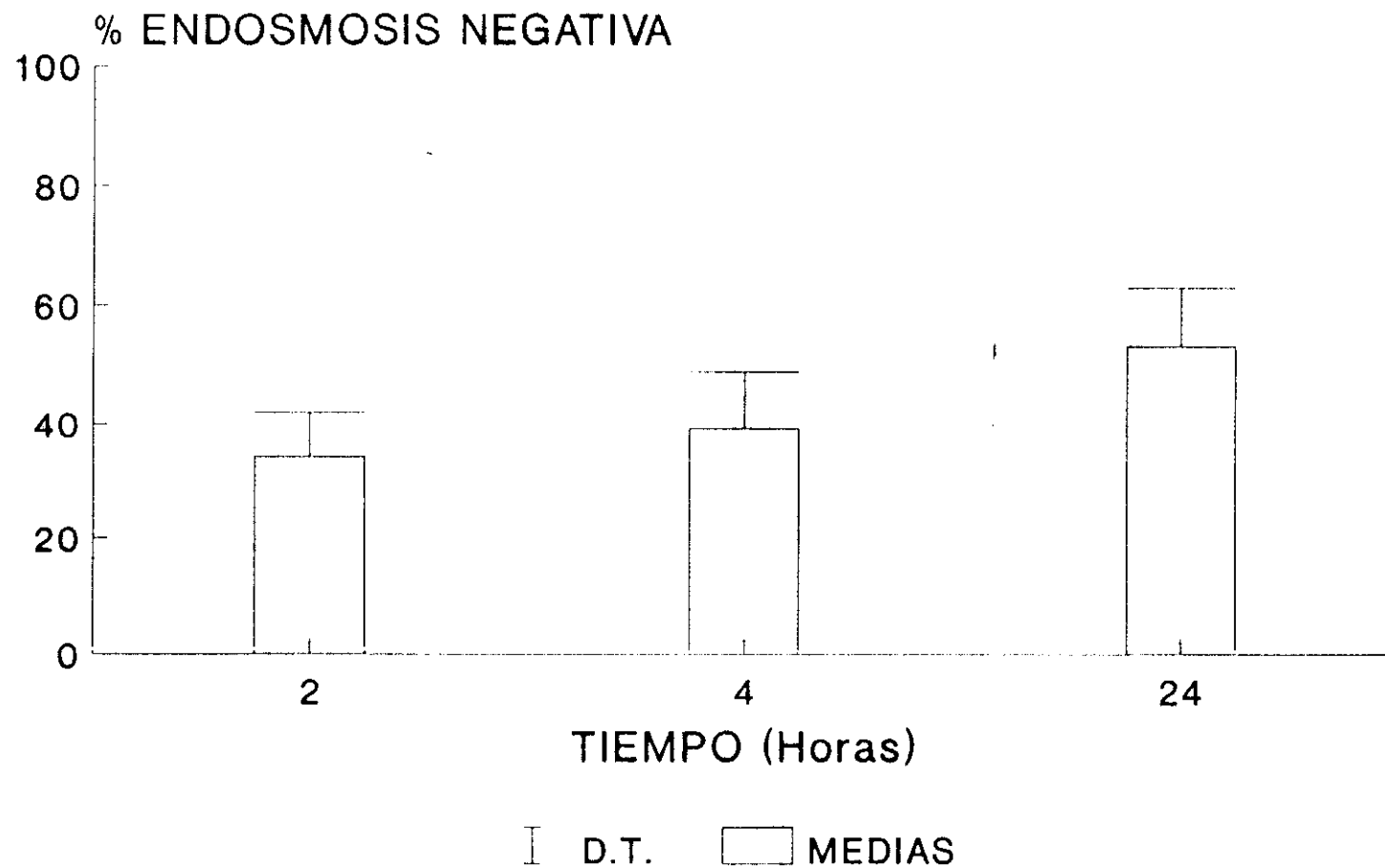
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA

MUESTRAS PROBLEMA CON < 10 U.C.C\esp



GRAFICA XXXVII

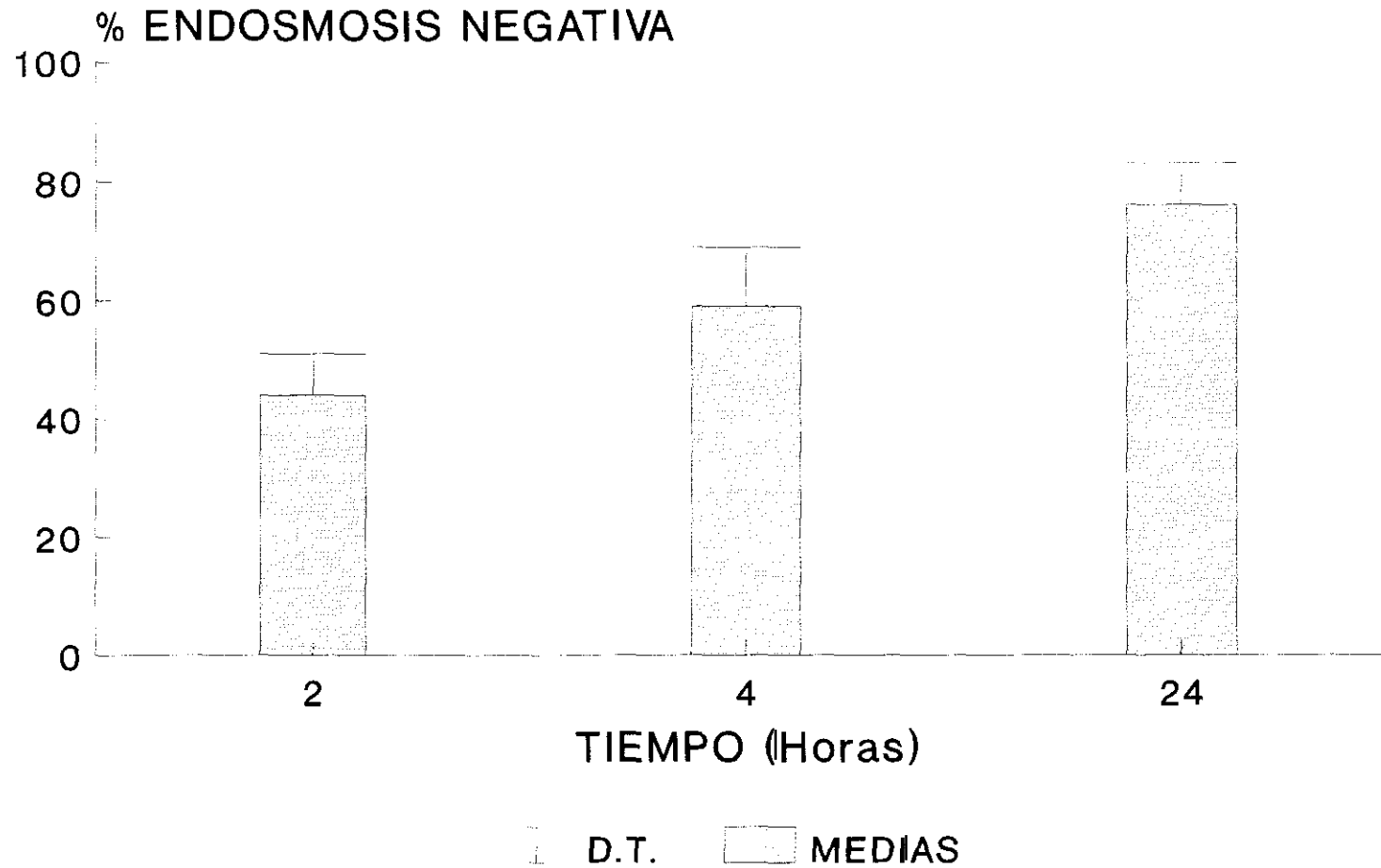
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL CON > 10 U.C.C\esp



GRAFICA XXXVIII

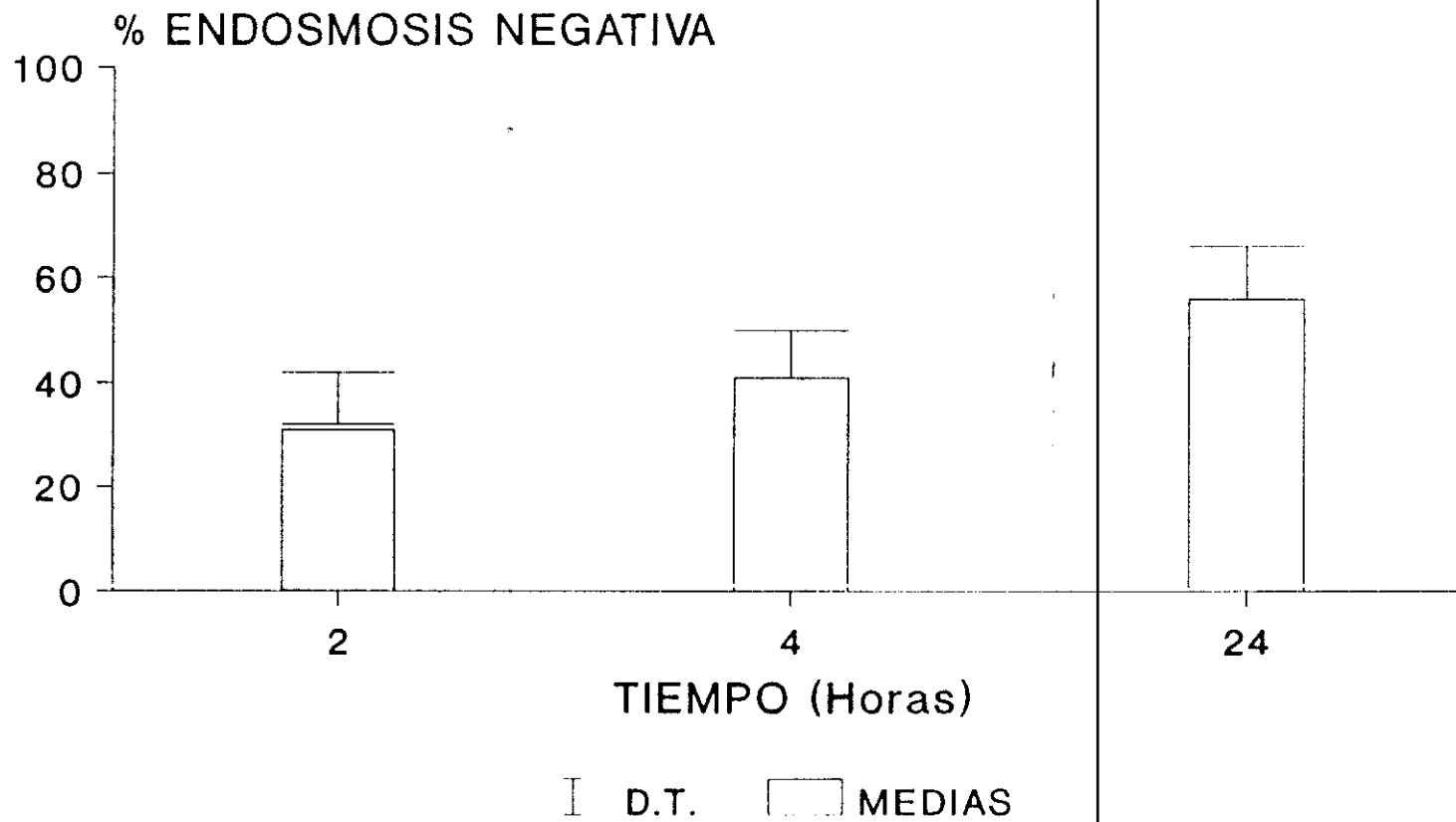
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA

MUESTRAS PROBLEMA CON > 10 U.C.C\esp



GRAFICA XXXIX

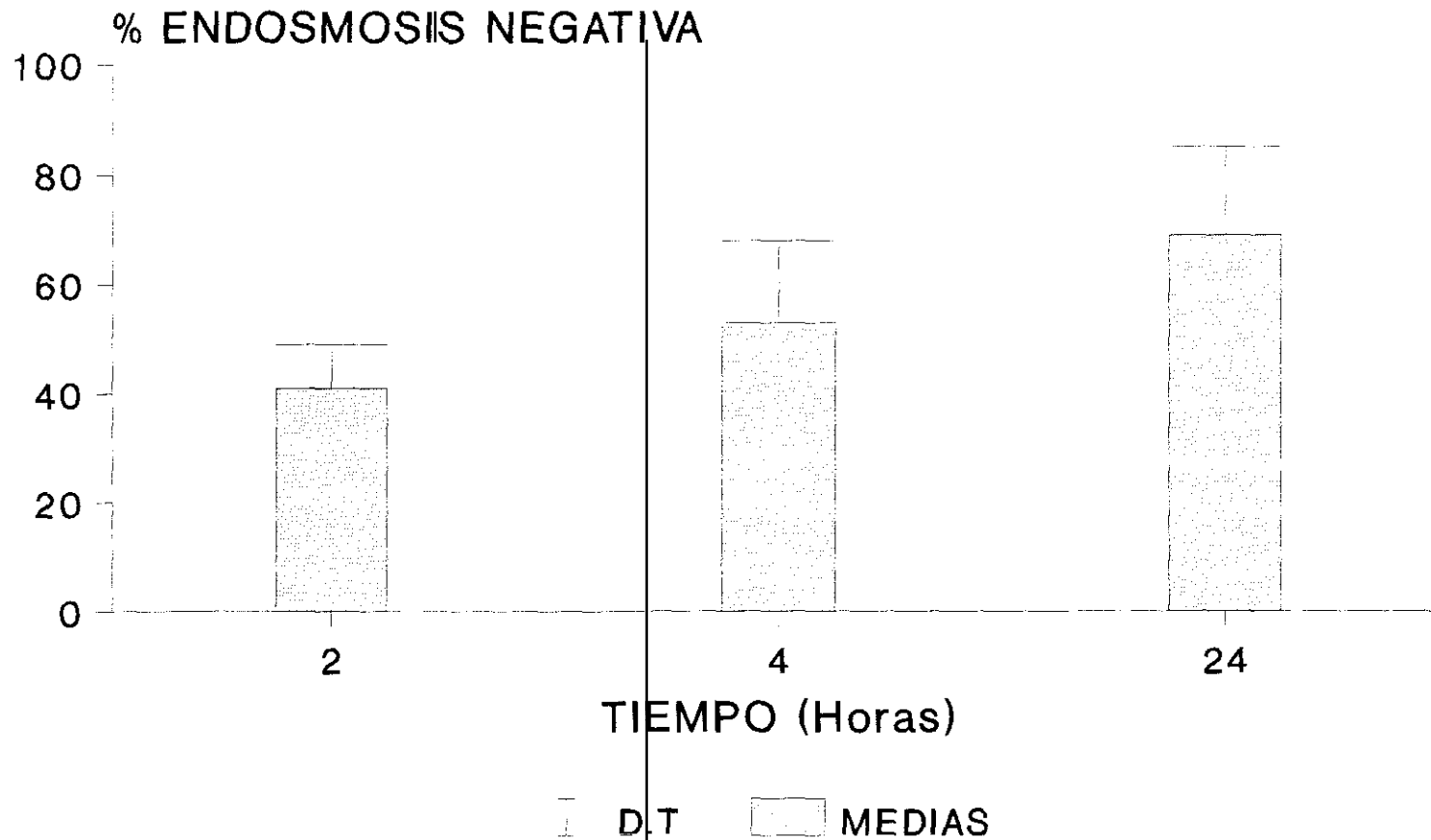
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICO XL

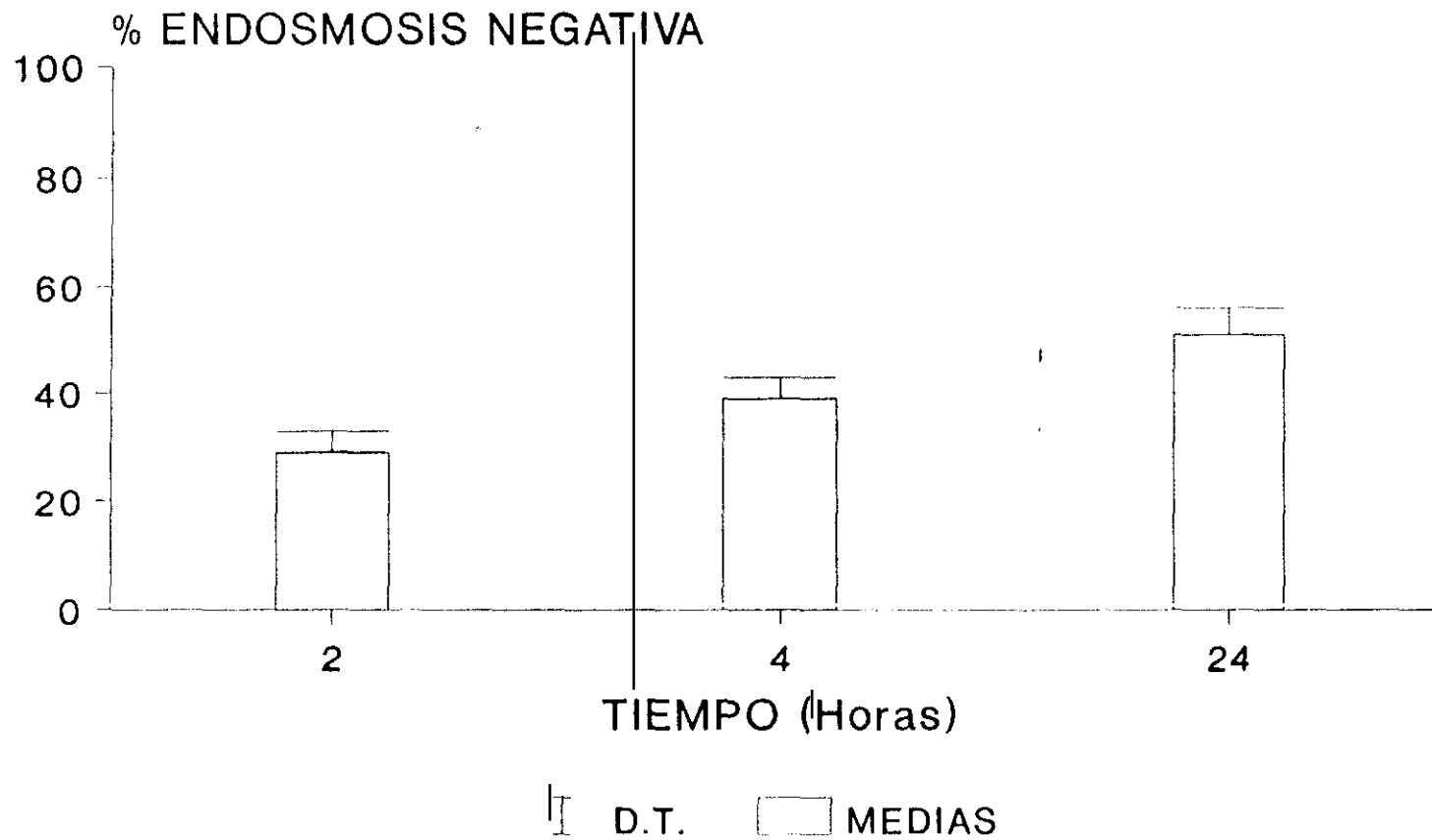
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICO XLI

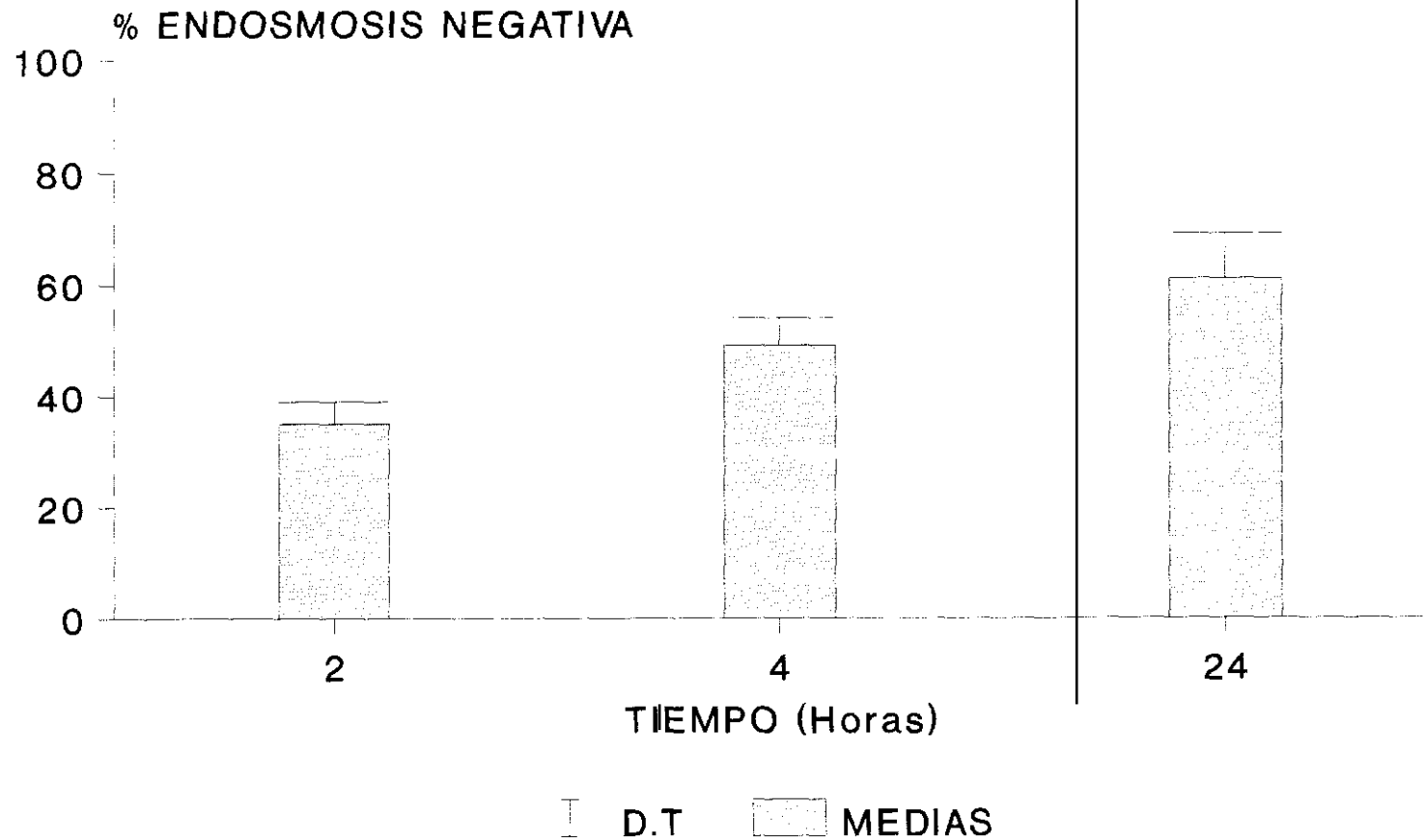
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL CON < 10 U.C.C /esp



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICA XLII

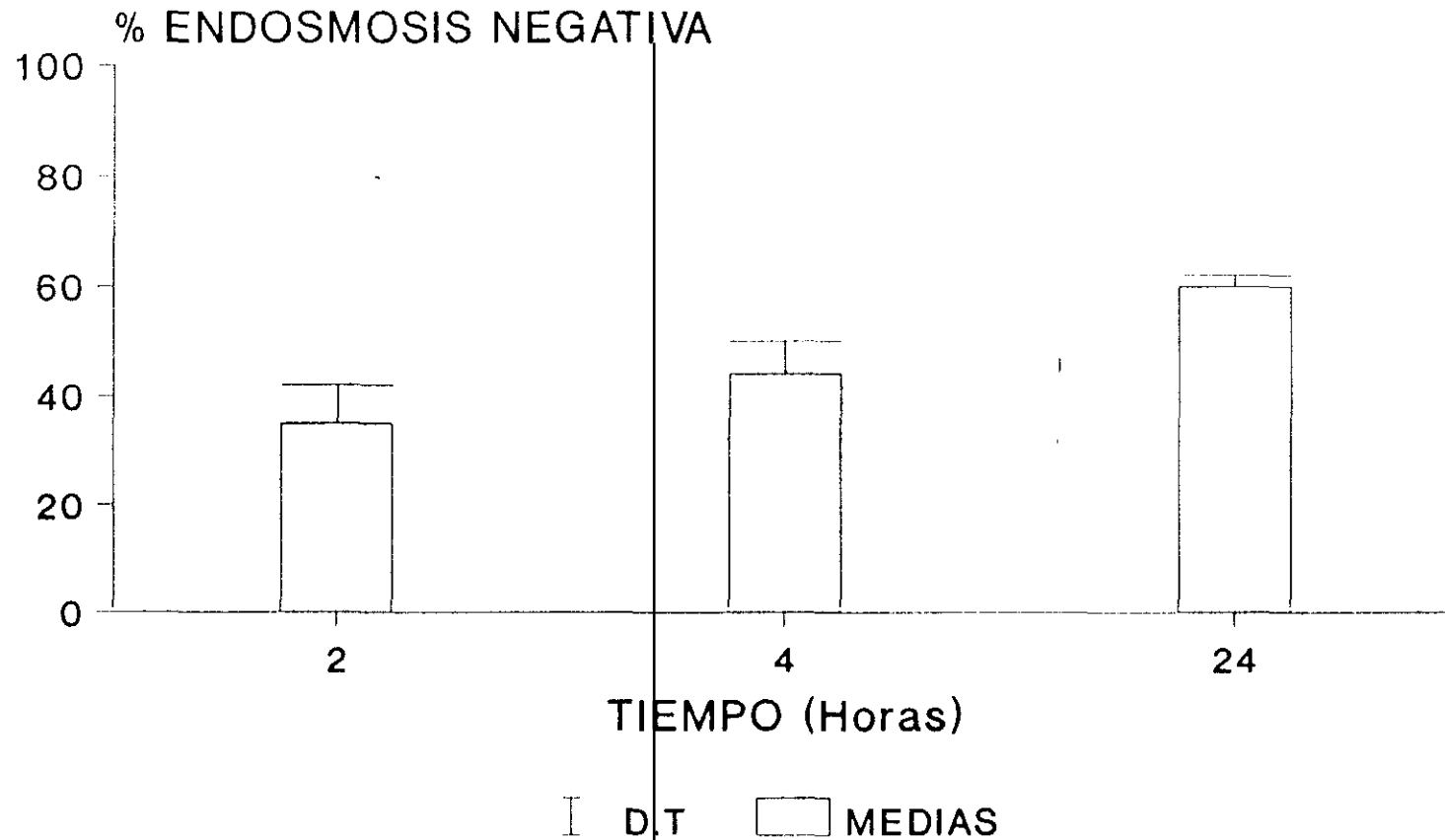
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA CON < 10 U.C.C/ esp



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867

GRAFICA XLIII

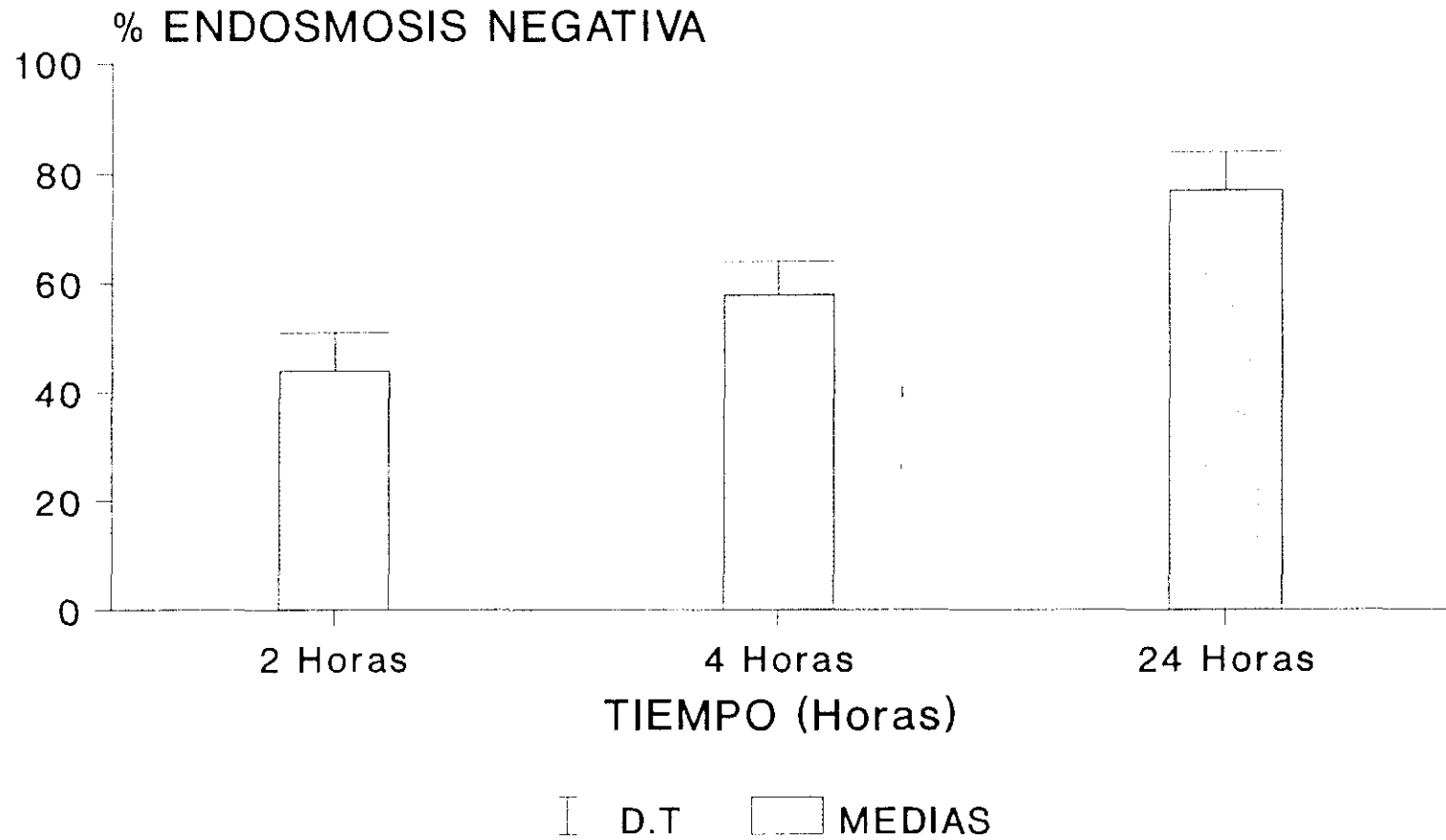
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL CON > 10 U.C.C/esp



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICA XLIV

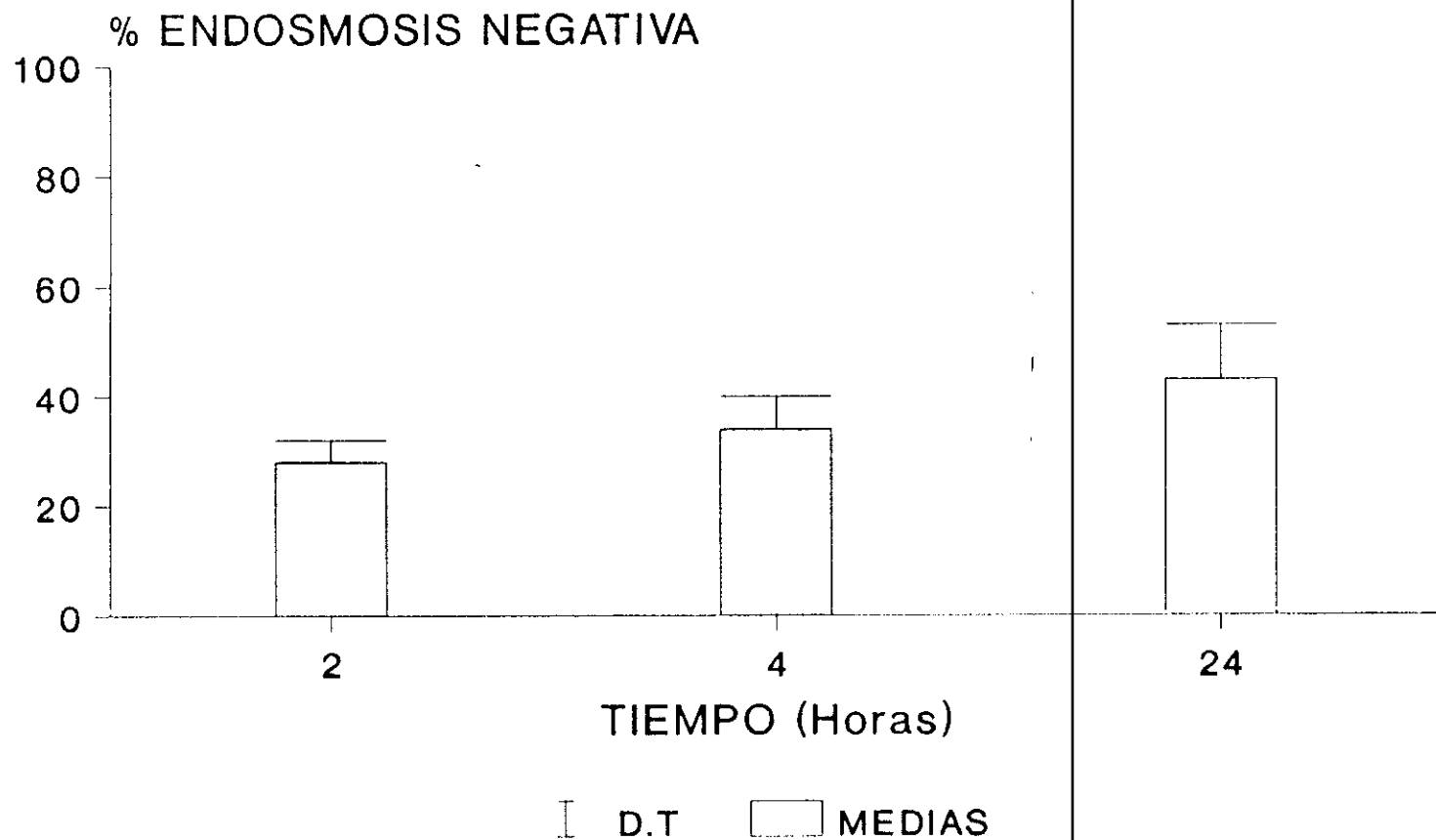
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA CON > 10 U.C.C/esp



UN SOLO EYACULADO CON U.ureal. 1867 PR

GRAFICA XLV

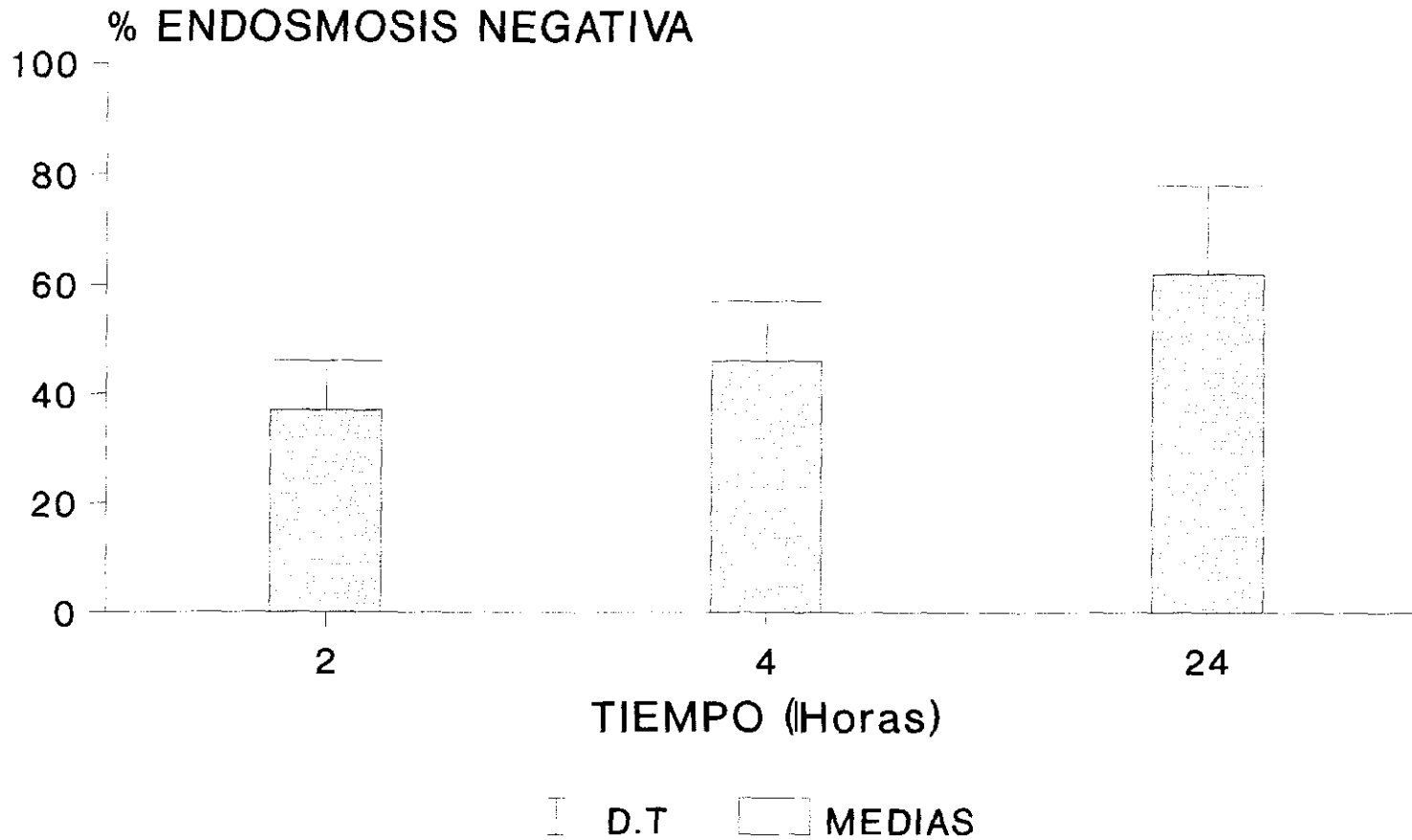
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL



SEMEN FRESCO, SIN LAVAR

GRAFICO XLVI

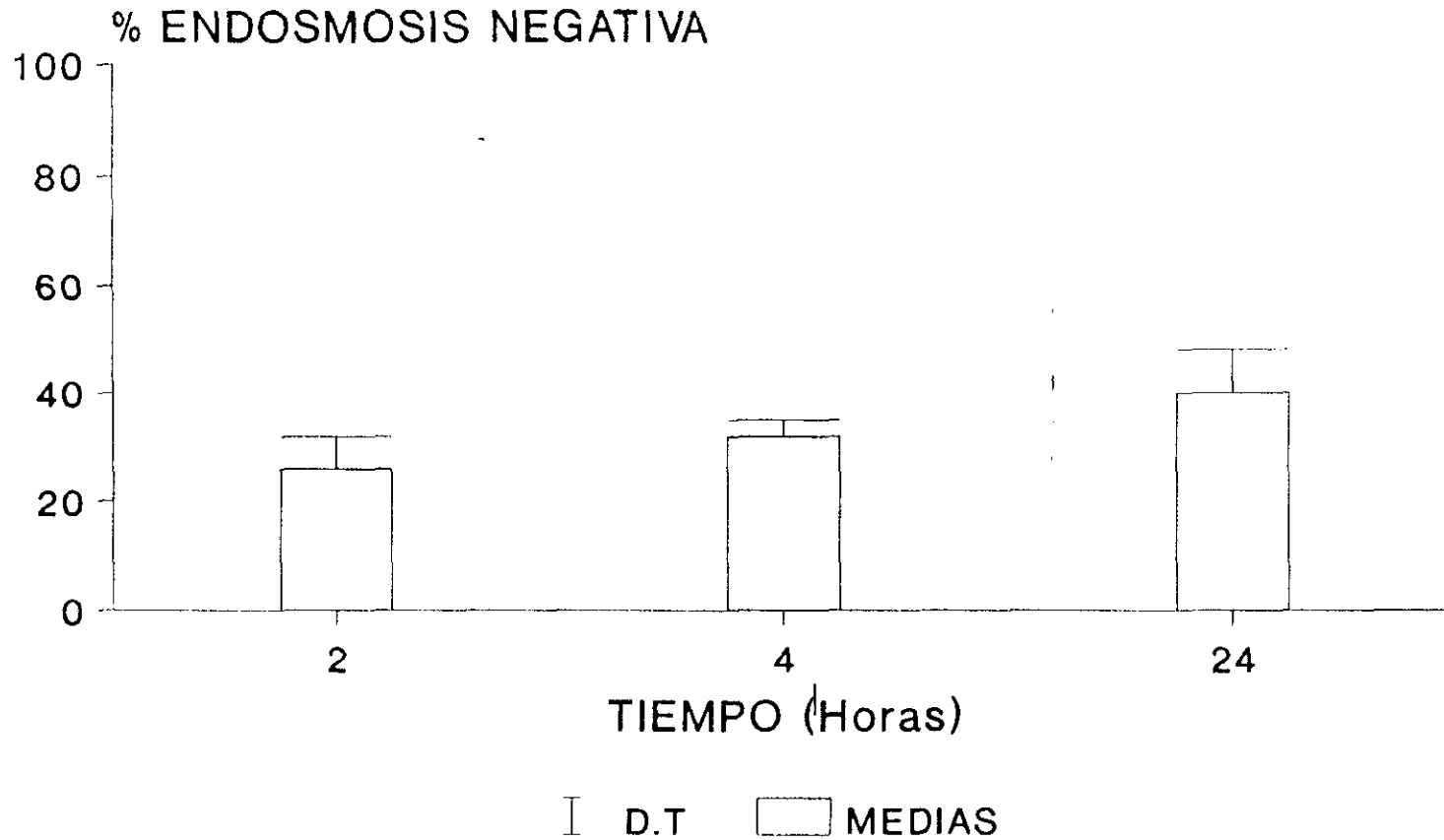
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA



SEMEN FRESCO, SIN LAVAR

GRAFICO XLVII

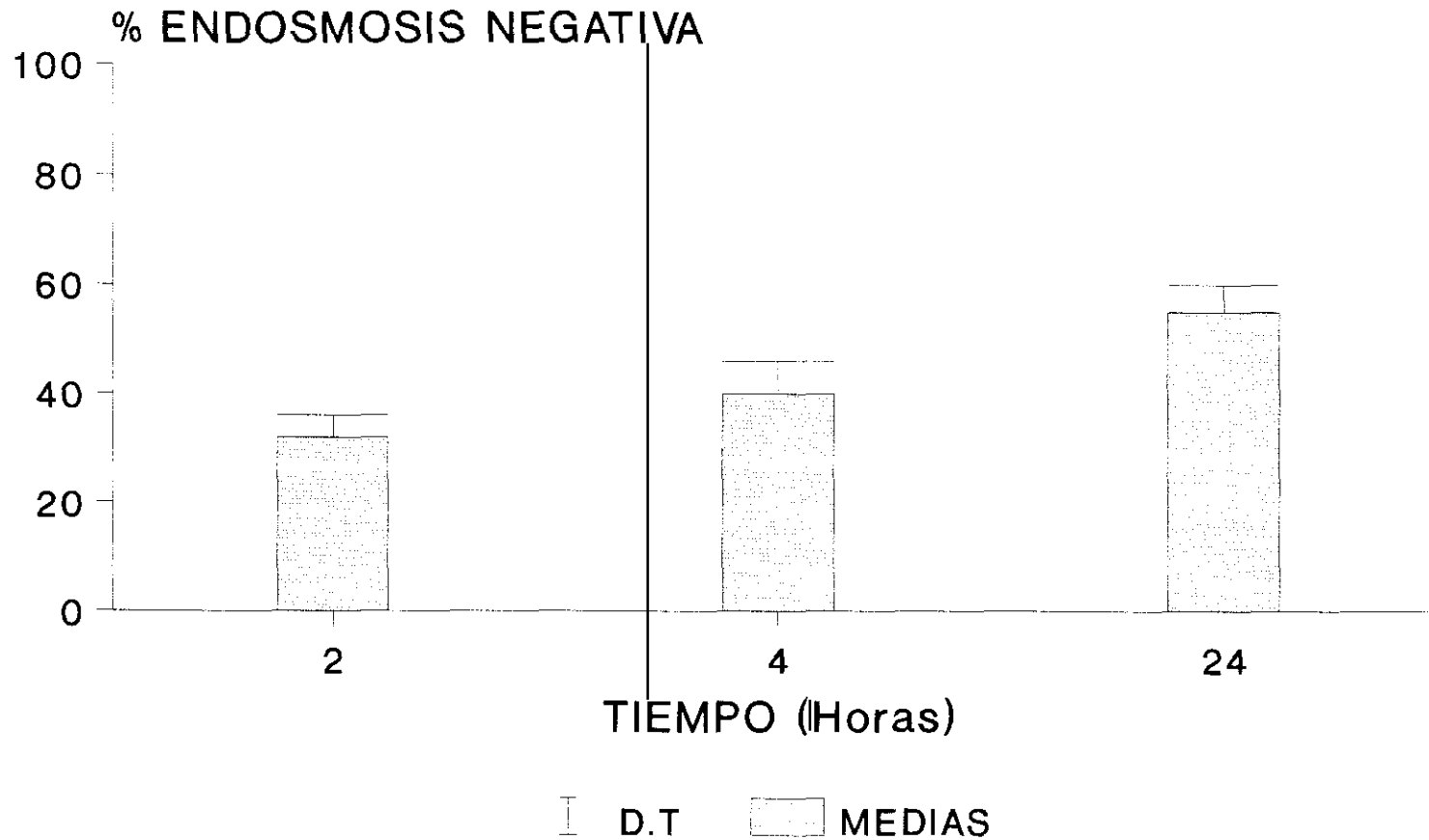
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL CON < 10 U.C.C/esp



SEMEN FRESCO, SIN LAVAR

GRAFICA XLVIII

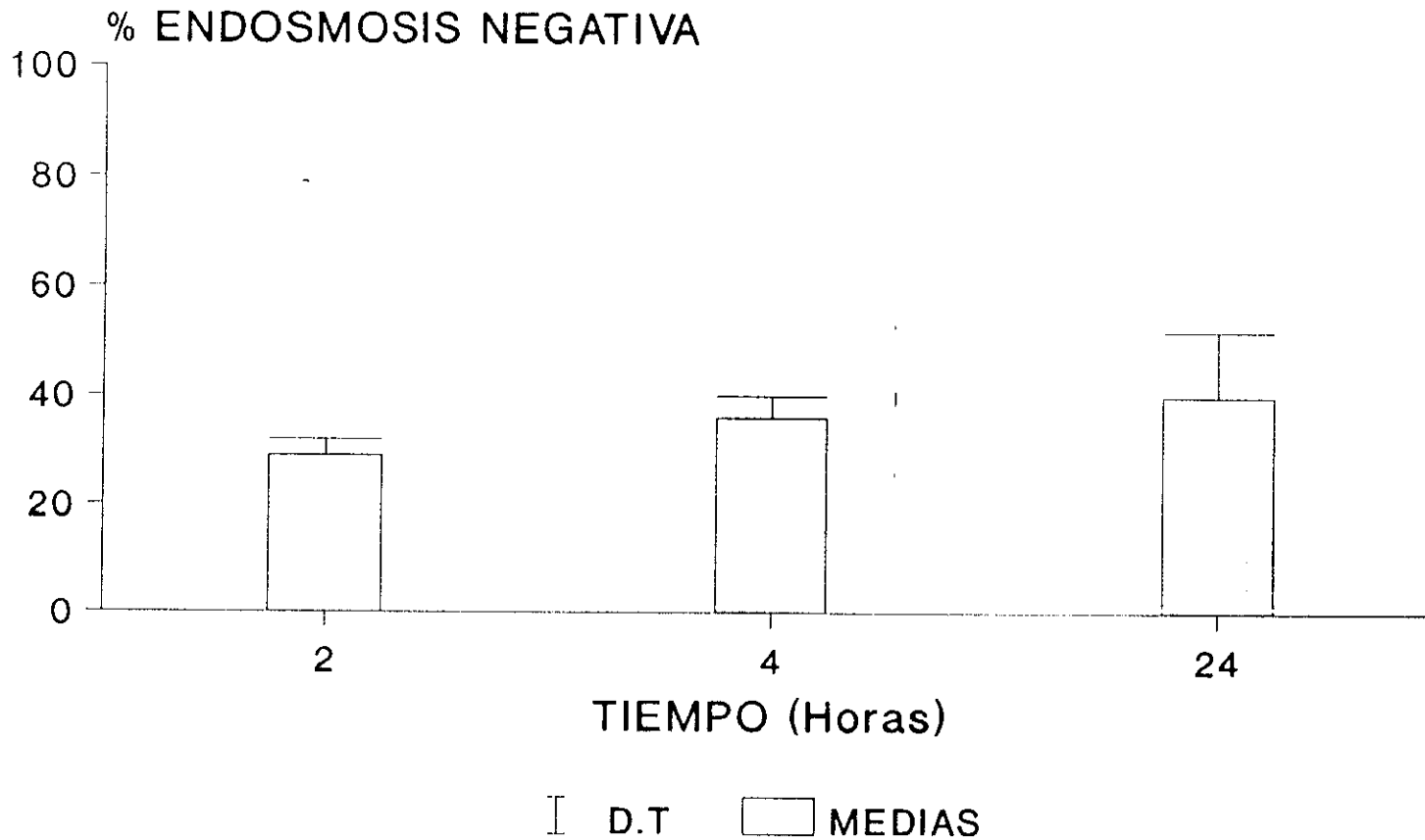
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA CON < 10 U.C.C/esp



SEMEN FRESCO, SIN LAVAR

GRAFICA XLIX

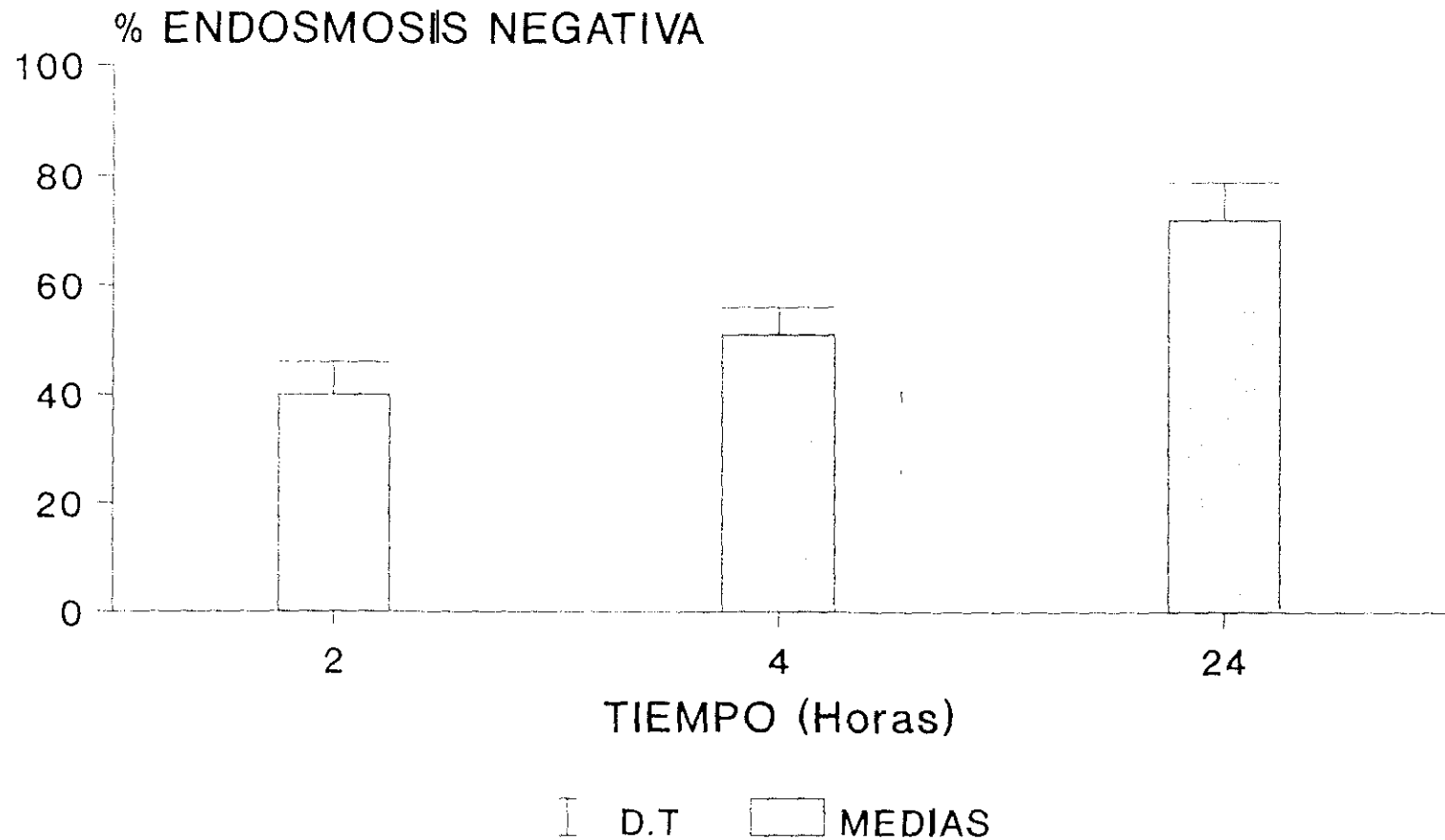
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL CON > 10 U.C.C/esp



SEMEN FRESCO, SIN LAVAR

GRAFICA L

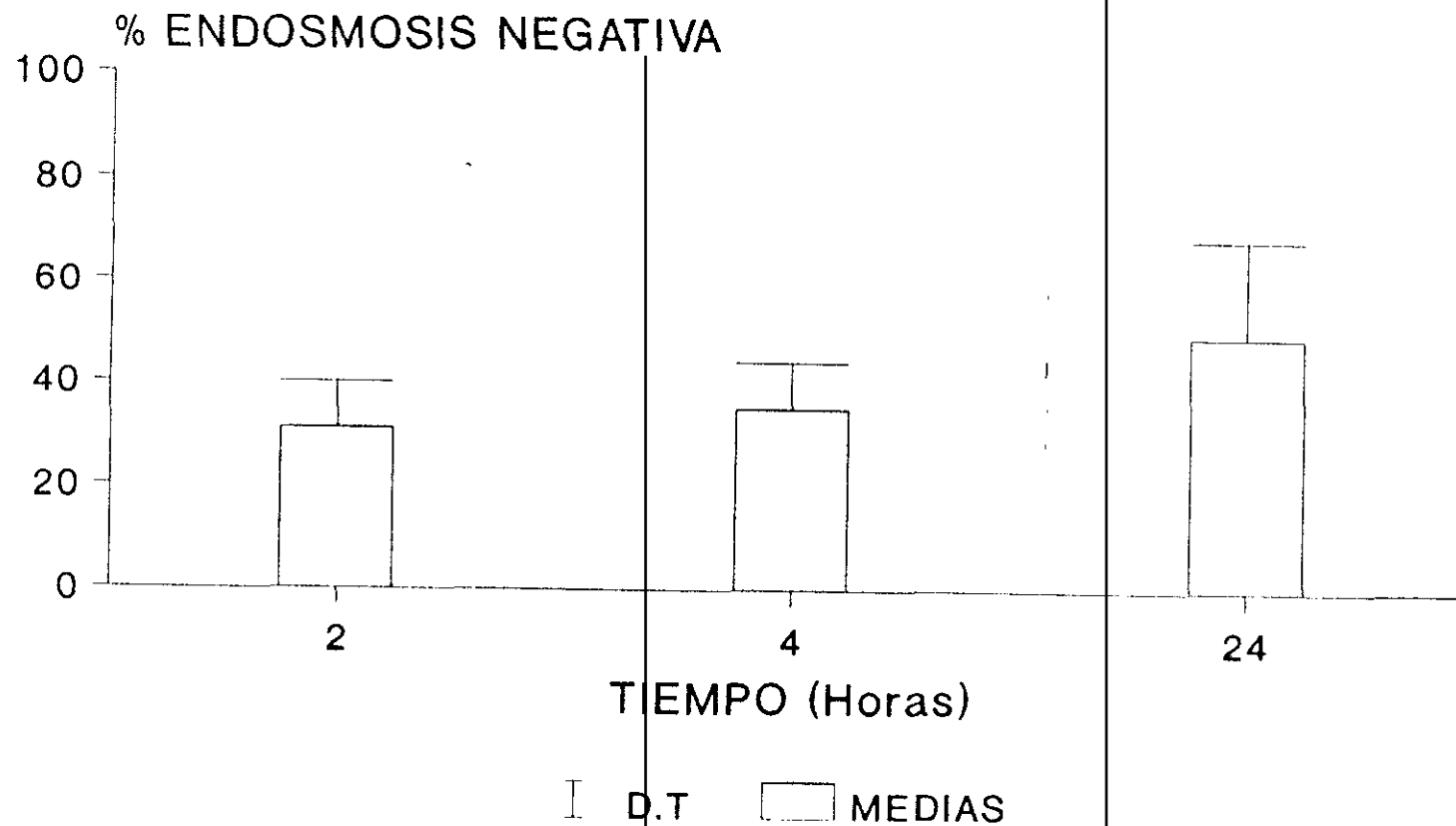
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA CON > 10 U.C.C/esp



SEMEN FRESCO, SIN LAVAR

GRAFICA LI

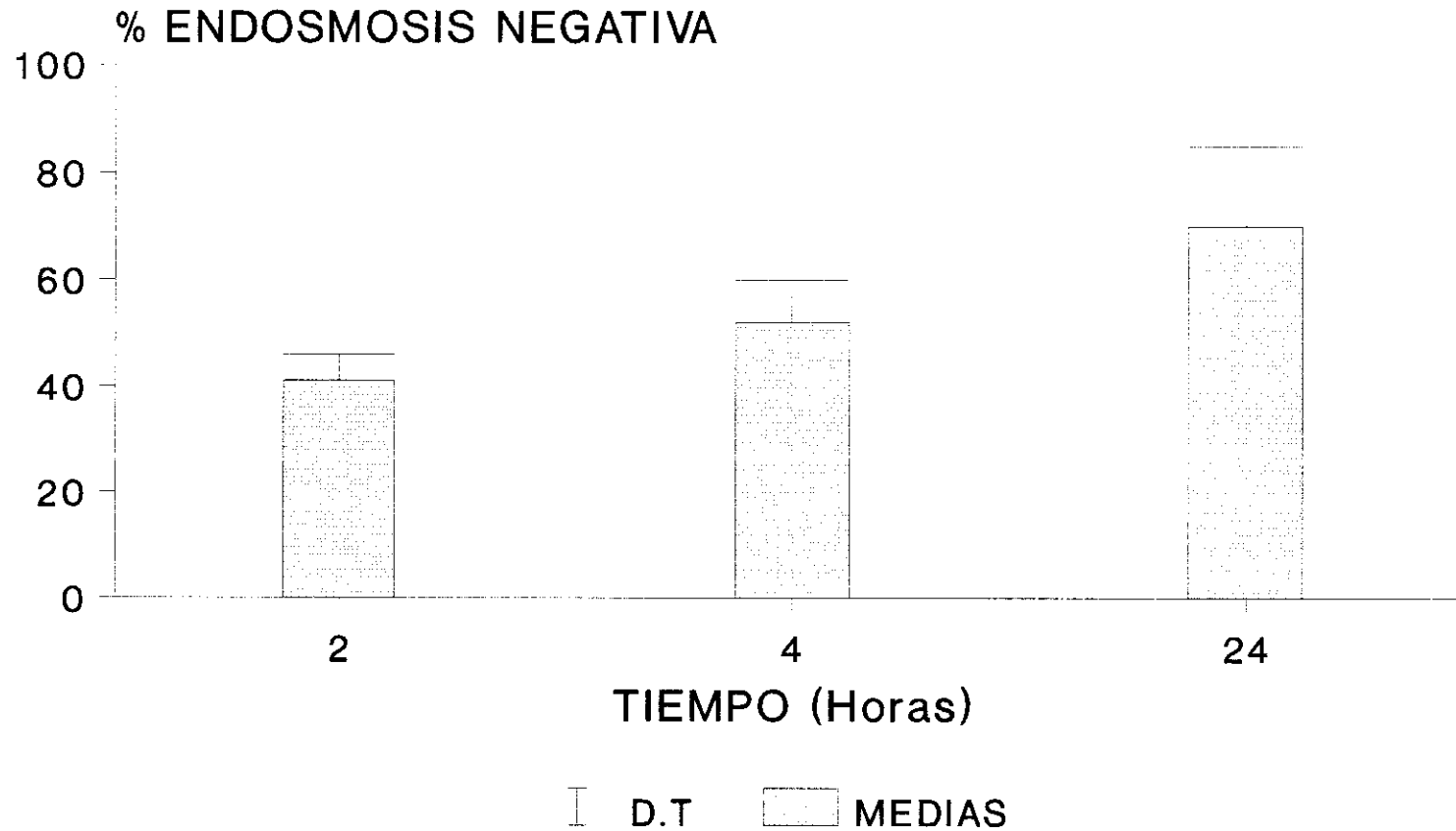
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL



MUESTRAS LAVADAS CON MEDIO UREA

GRAFICO LII

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA

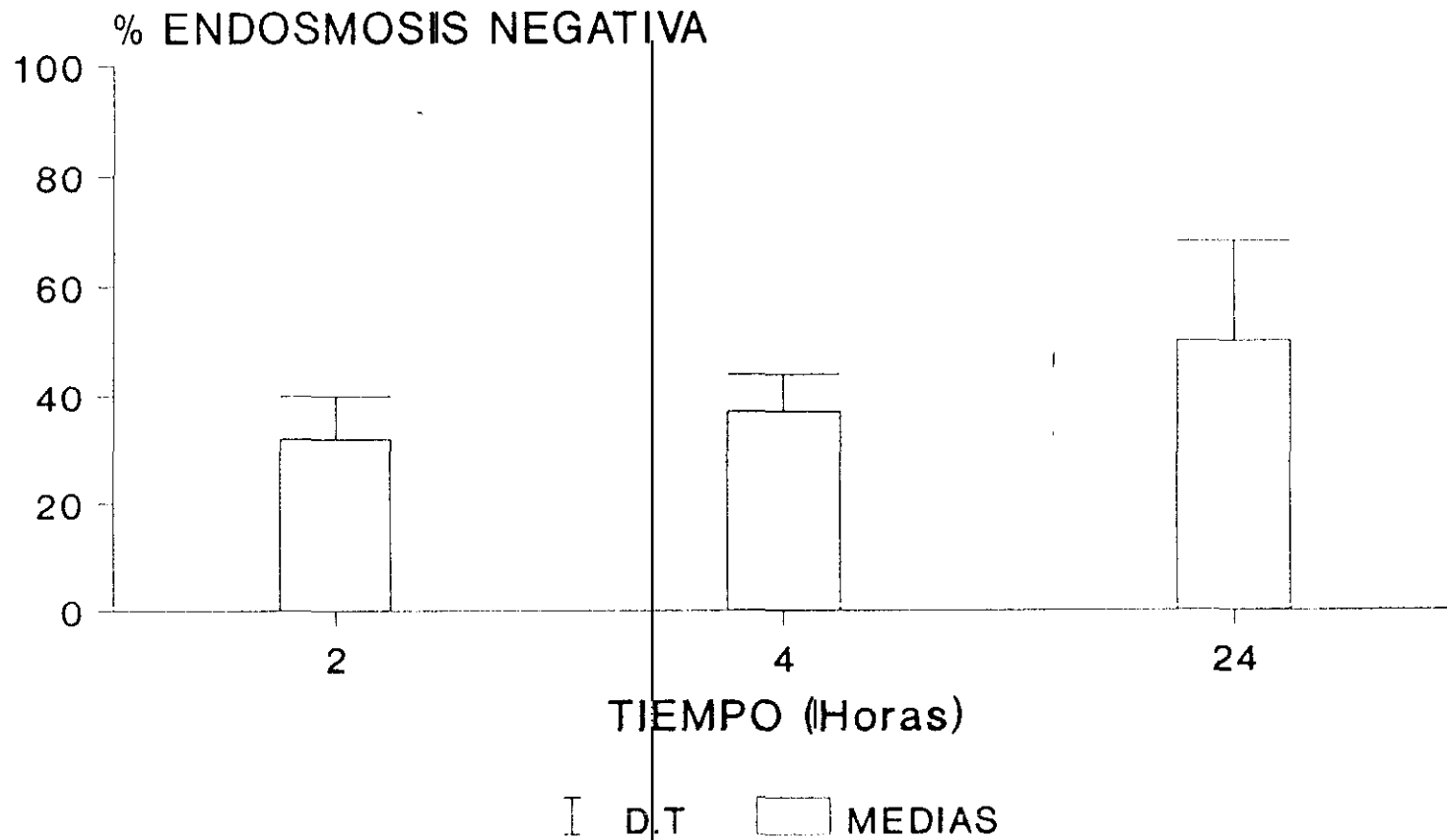


MUESTRAS LAVADAS CON MEDIO UREA

GRAFICO LIII

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA

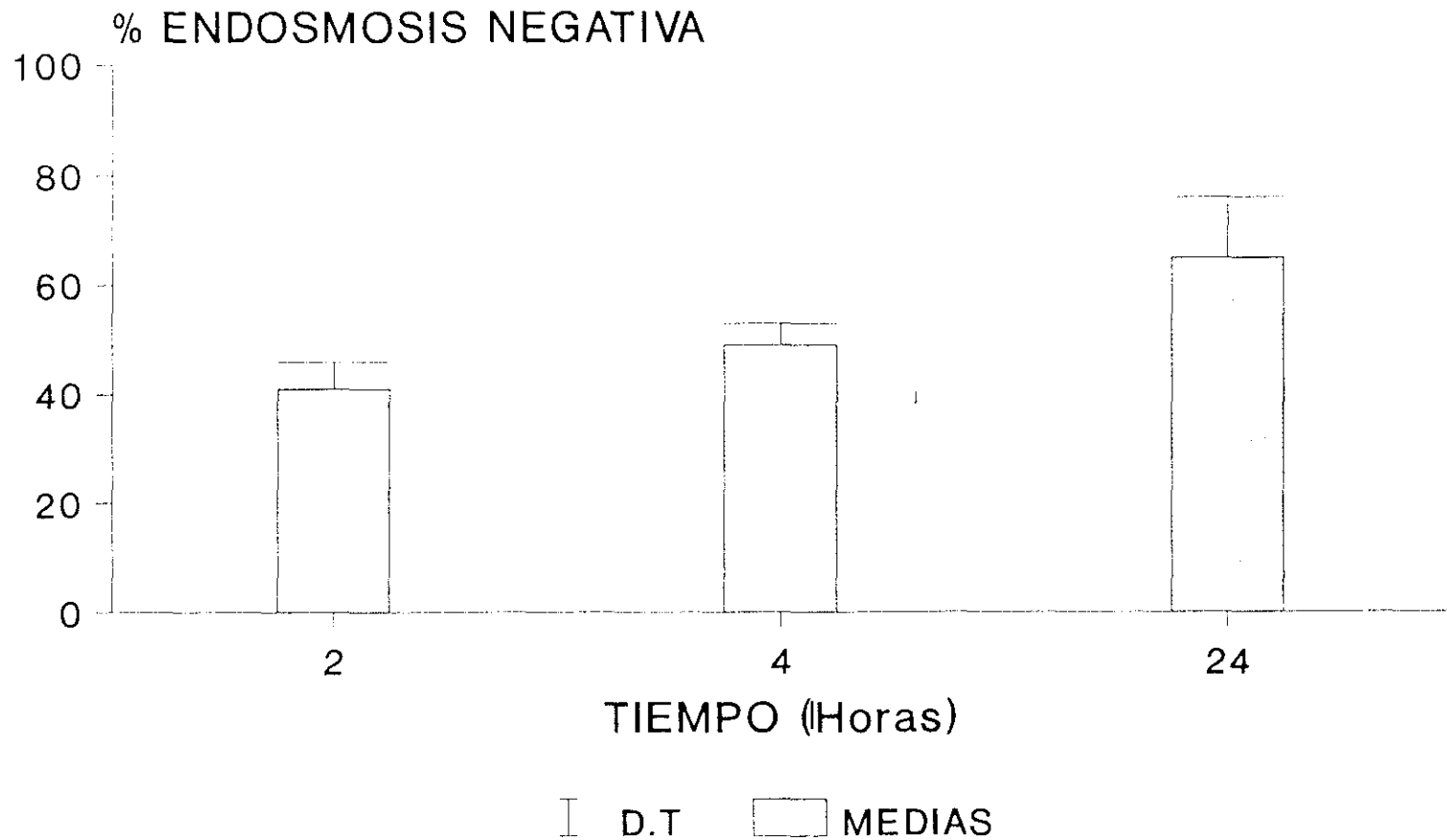
MUESTRAS CONTROL CON < 10 U.C.C/esp



MUESTRAS LAVADAS CON MEDIO UREA

GRAFICA LIV

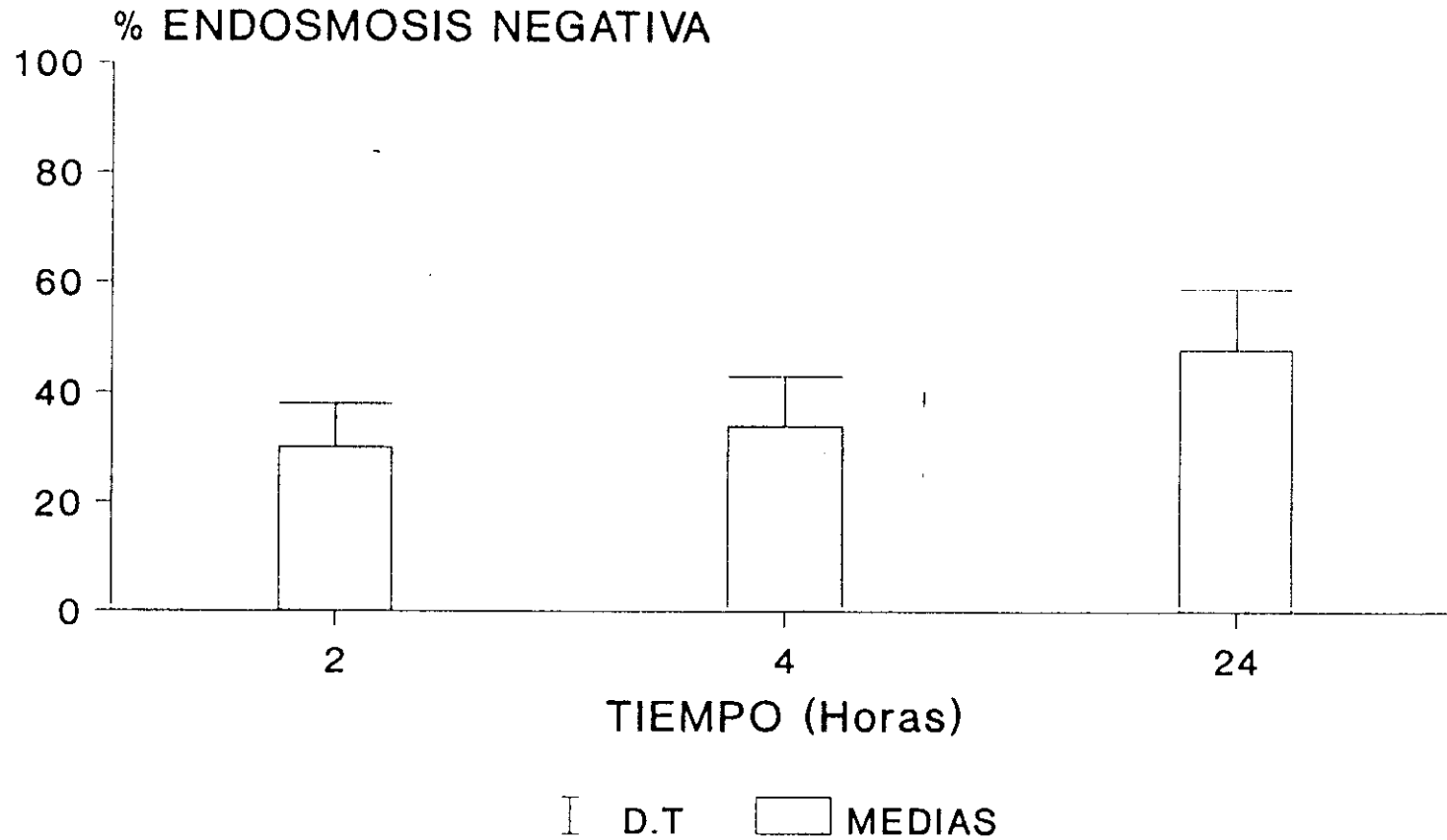
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA CON < 10 U.C.C/esp



MUESTRAS LAVADAS CON MEDIO UREA

GRAFICA LV

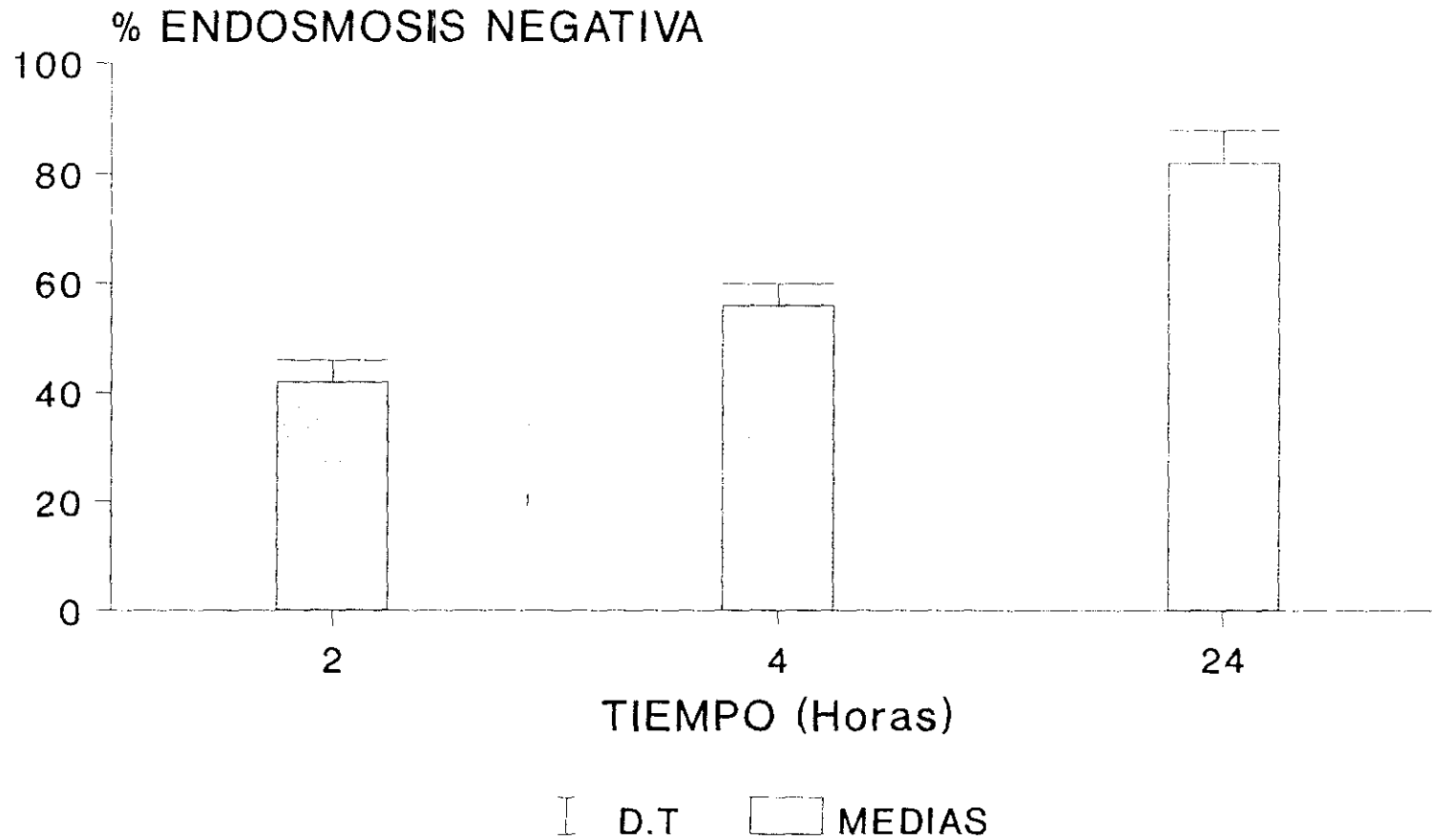
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL CON > 10 U.C.C/esp



MUESTRAS LAVADAS CON MEDIO UREA

GRAFICA LVI

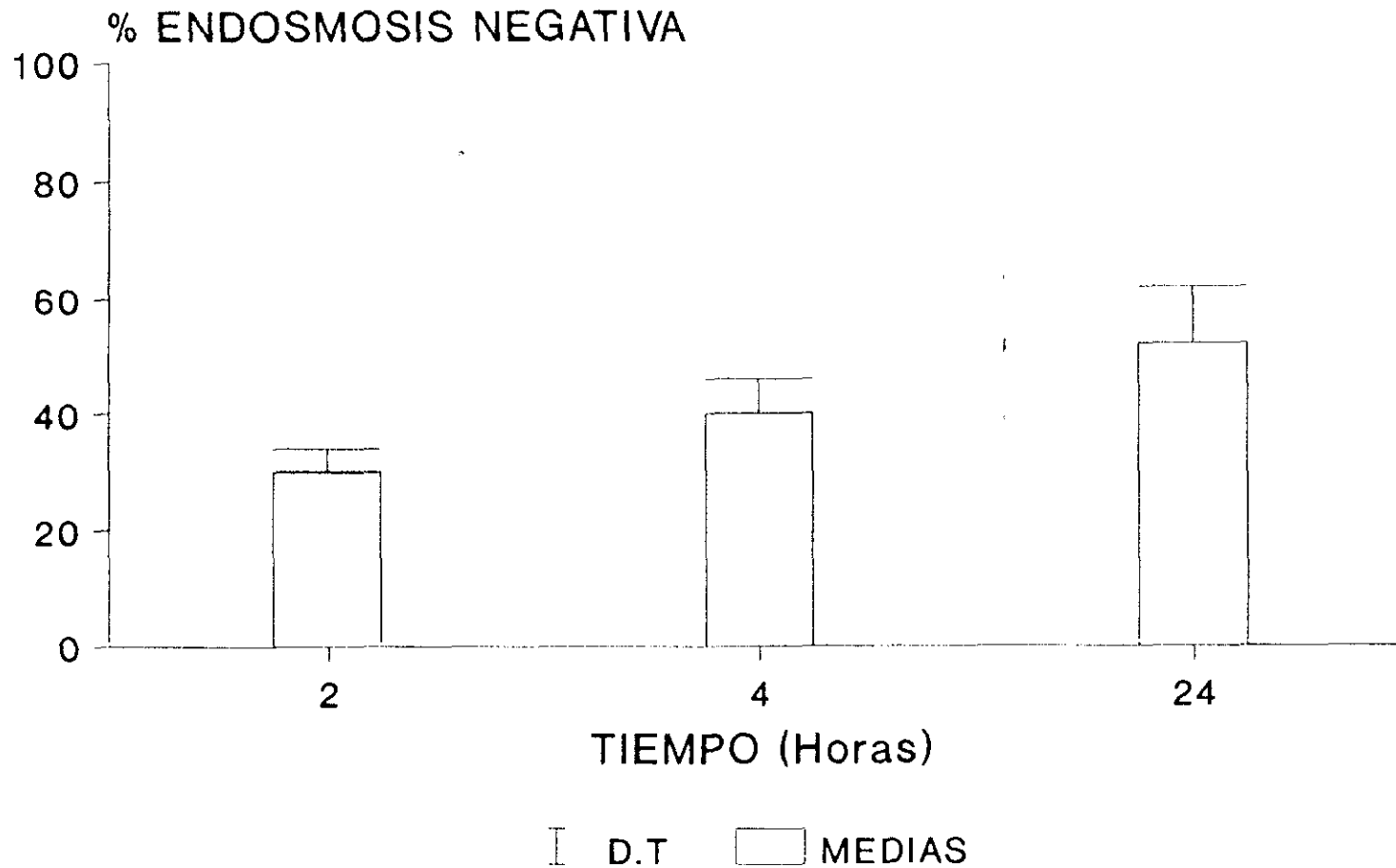
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA CON > 10 U.C.C/esp



MUESTRAS LAVADAS CON MEDIO UREA

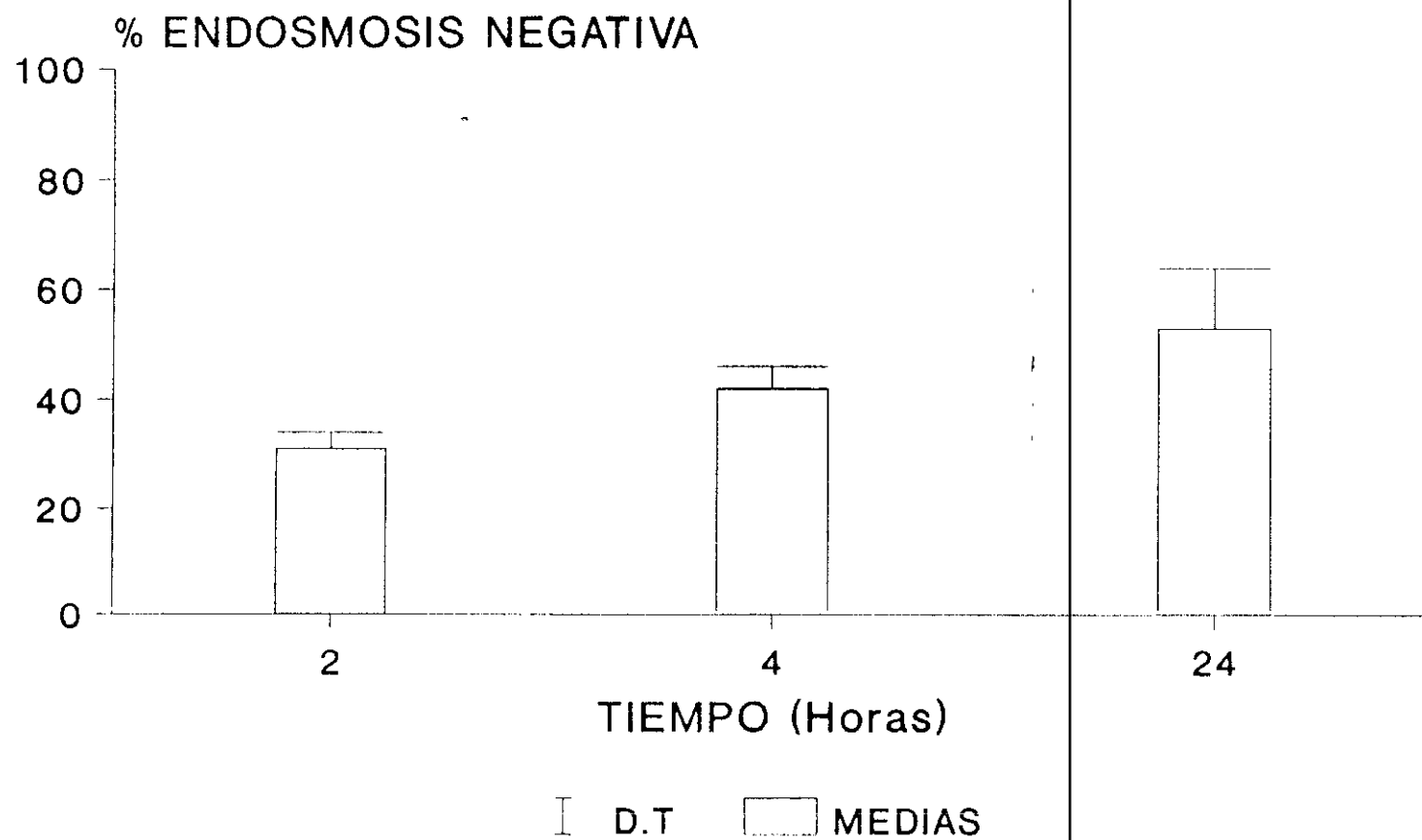
GRAFICA LVII

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL C1



GRAFICA LVIII

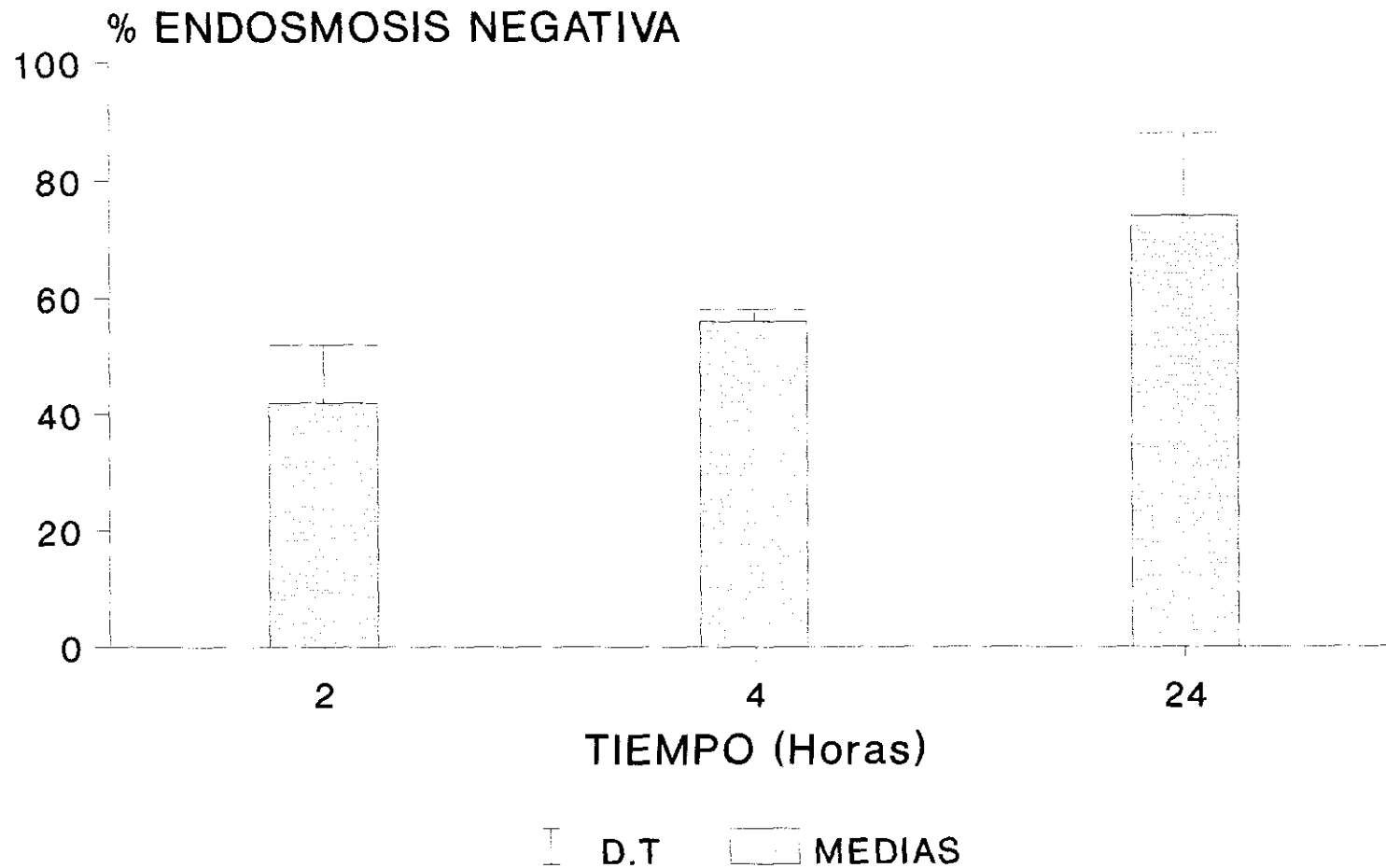
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL C2



CONTROL 2 CON U.ureal.INACTIVADO

GRAFICA LIX

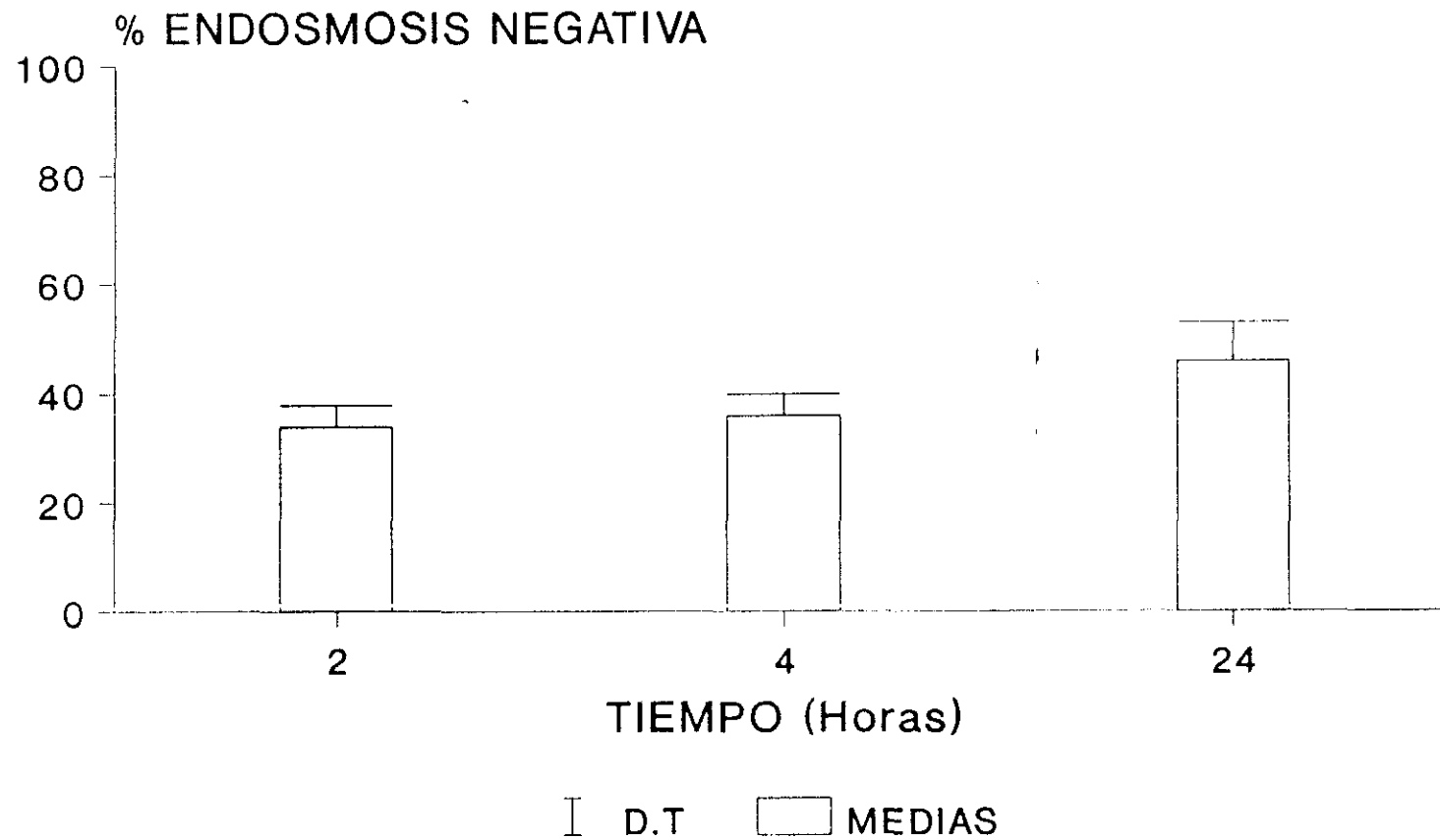
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA



GRAFICA LX

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA

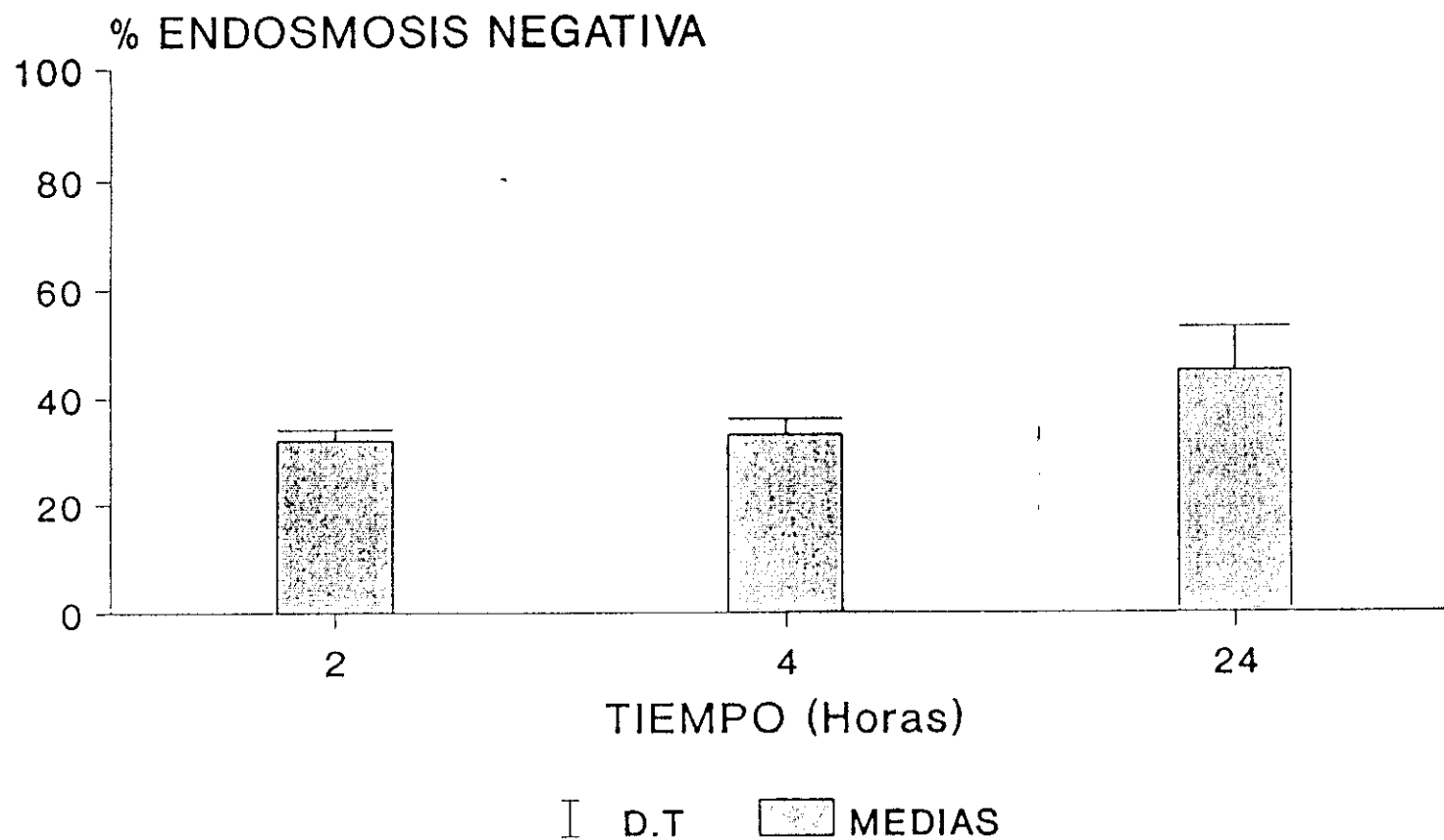
MUESTRAS CONTROL CON < 10 U.C.C/esp



GRAFICA LXI

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA

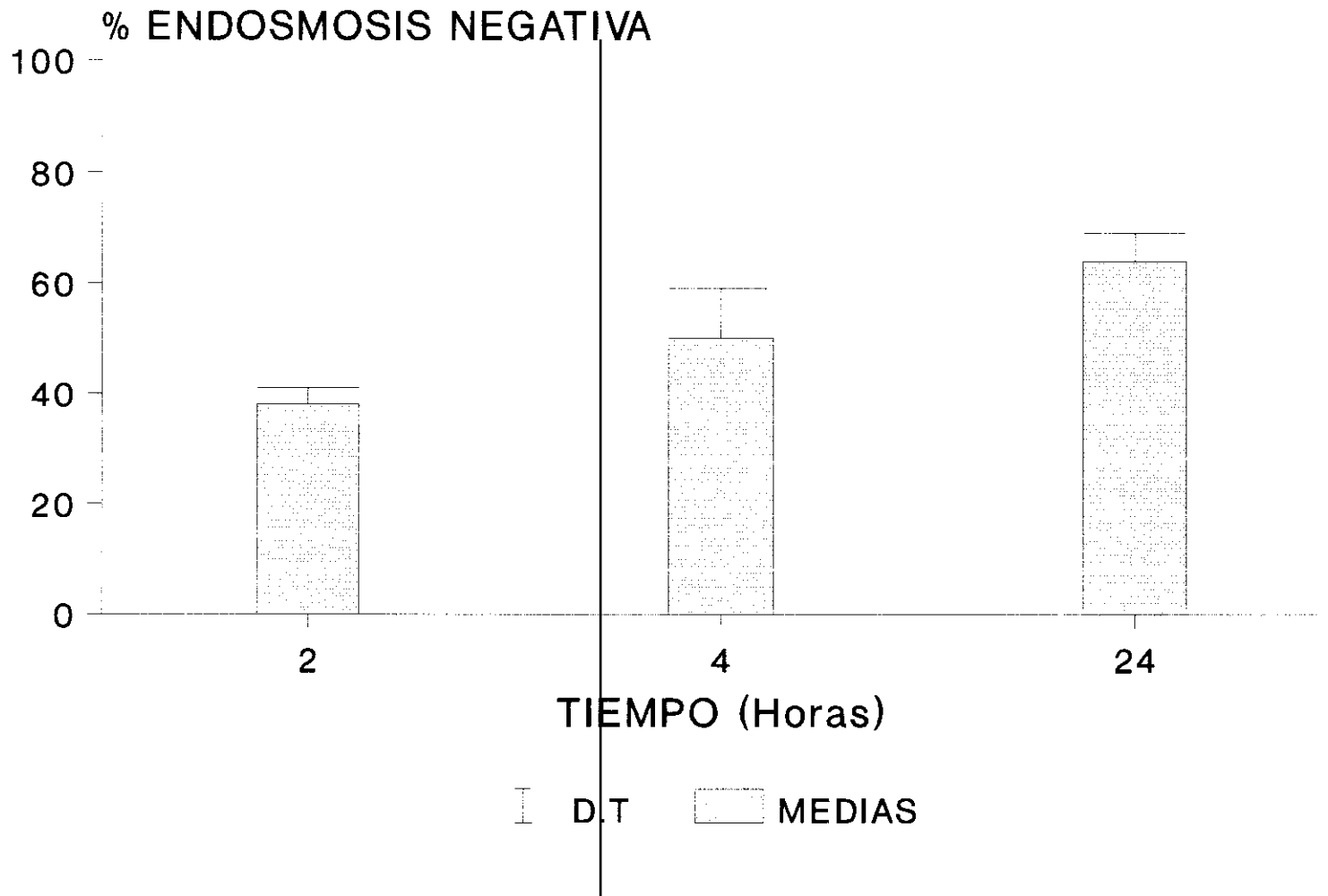
MUESTRAS CONTROL 2 CON < 10 U.C.C/esp



CONTROL 2 CON U.ureal.INACTIVADO

GRAFICA LXII

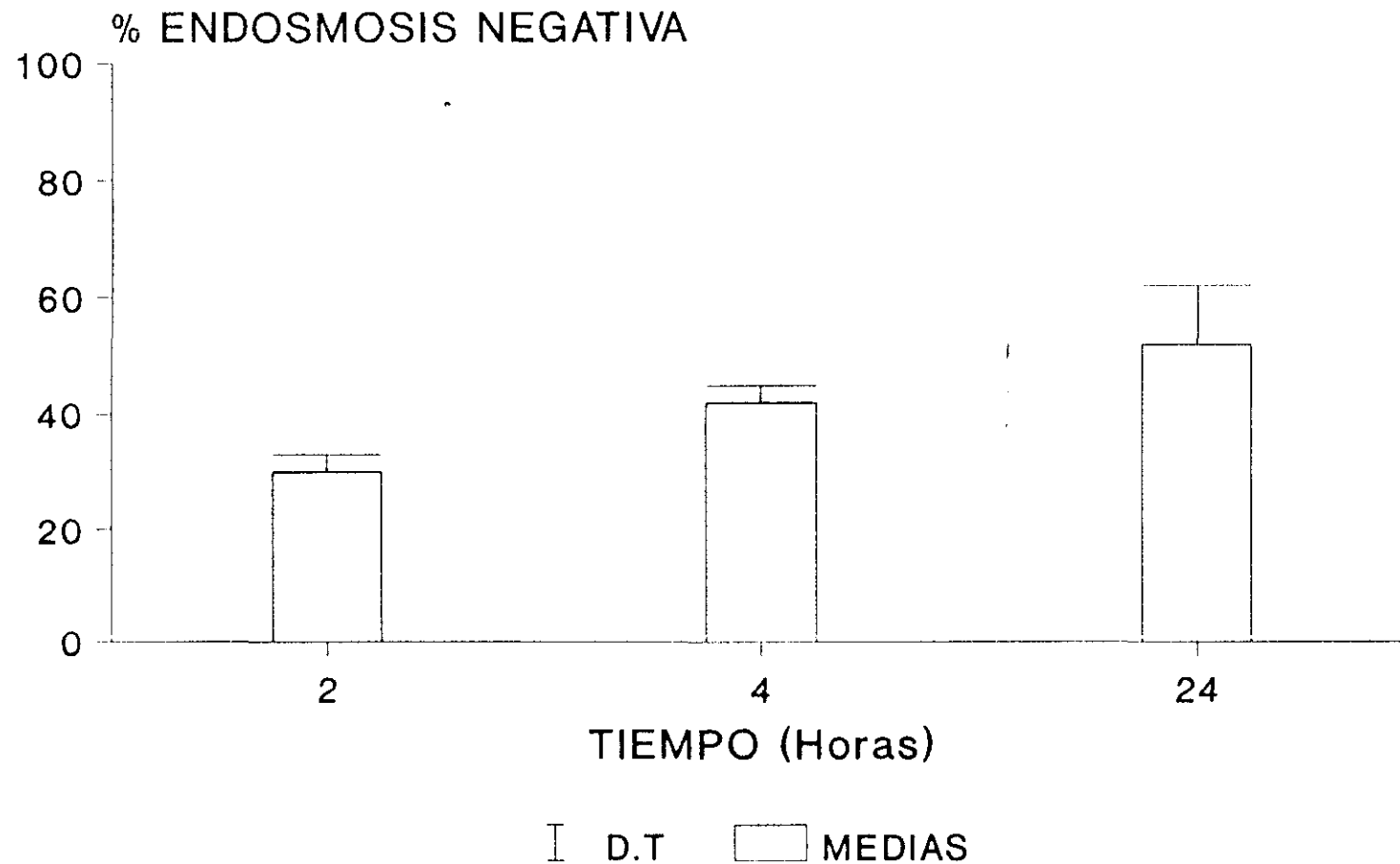
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA CON < 10 U.C.C/esp



GRAFICA LXIII

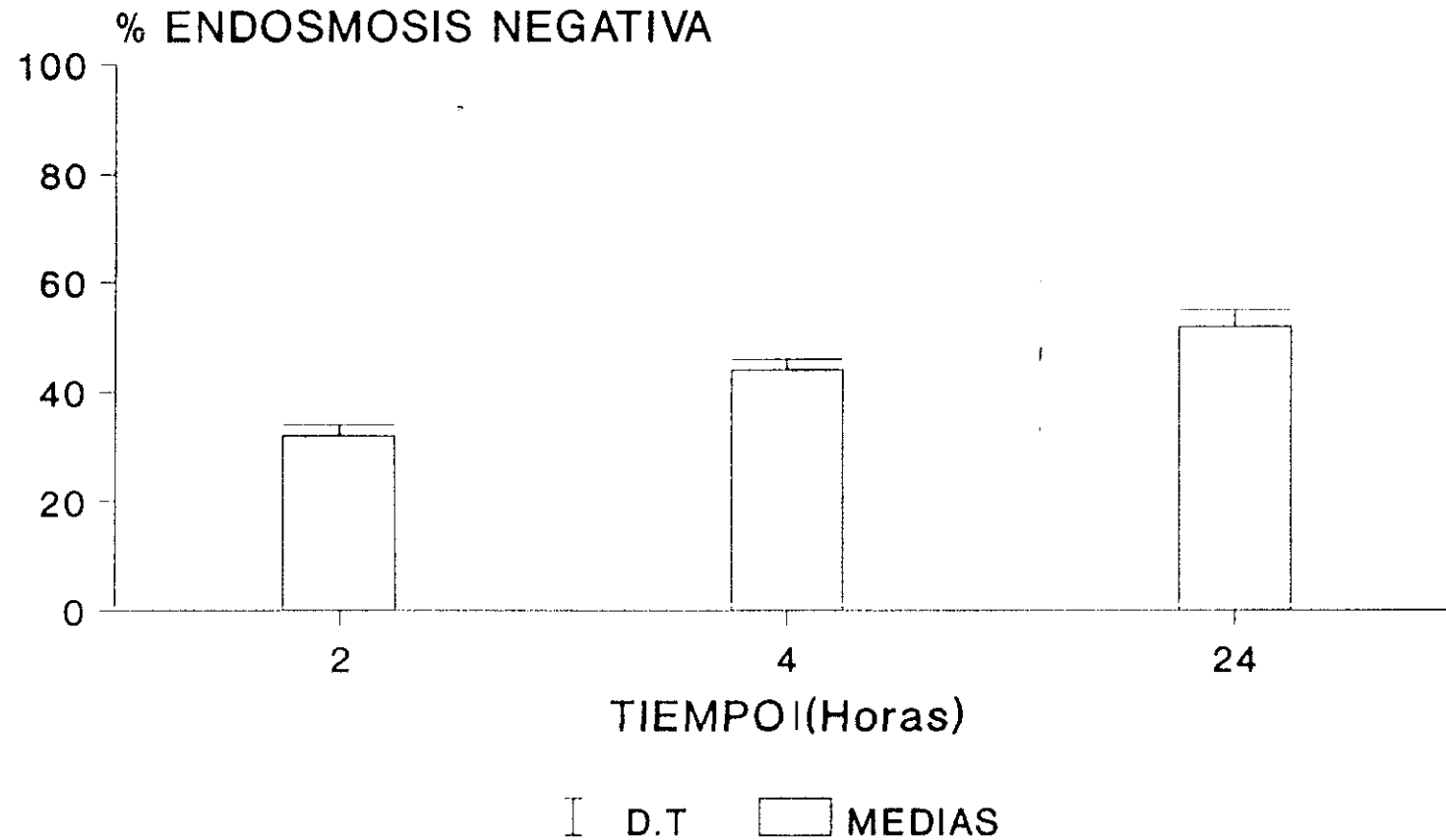
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA

MUESTRAS CONTROL CON > 10 U.C.C/esp



GRAFICA LXIV

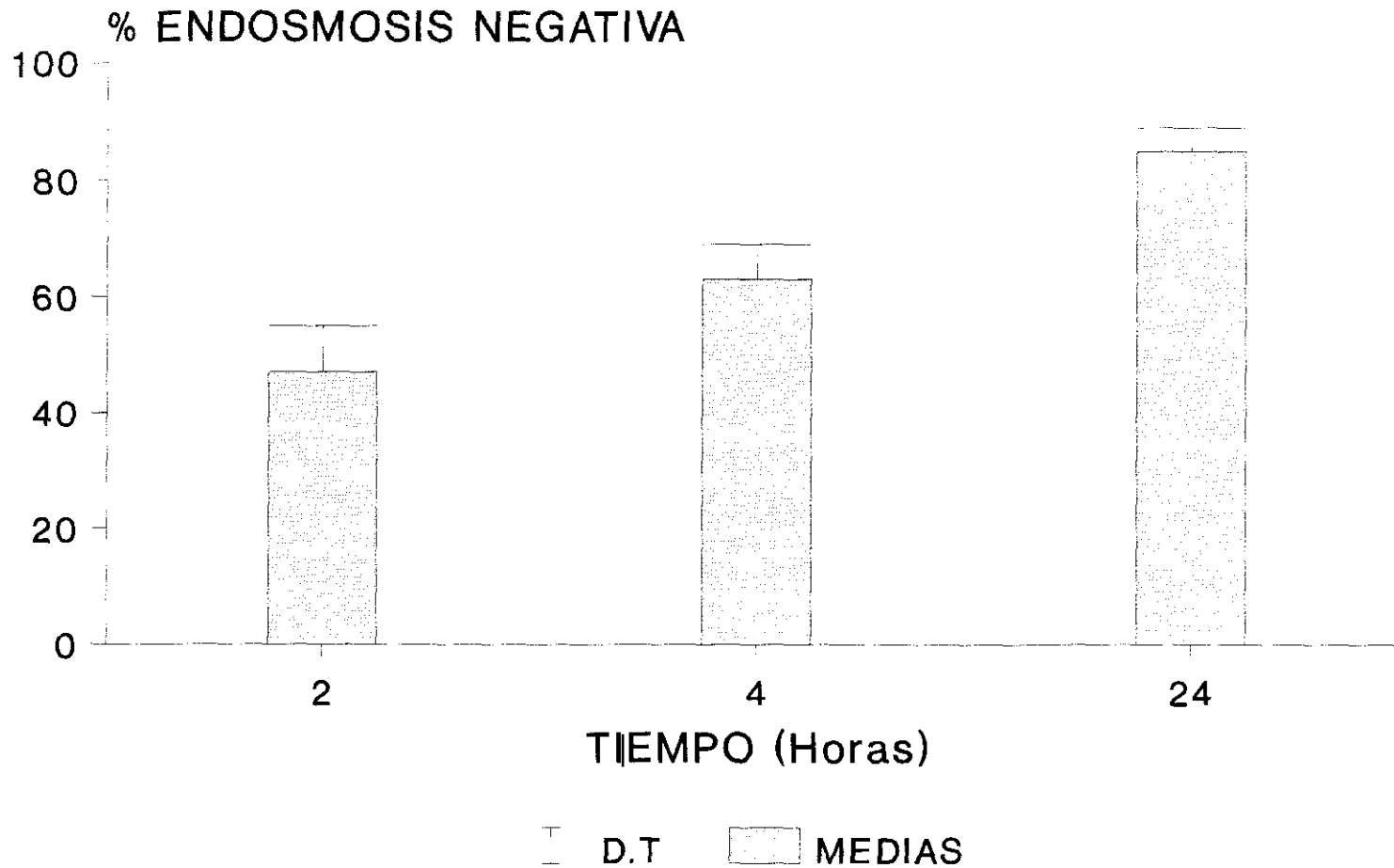
U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL 2 CON > 10 U.C.C/esp



CONTROL 2 CON U.ureal.INACTIVADO

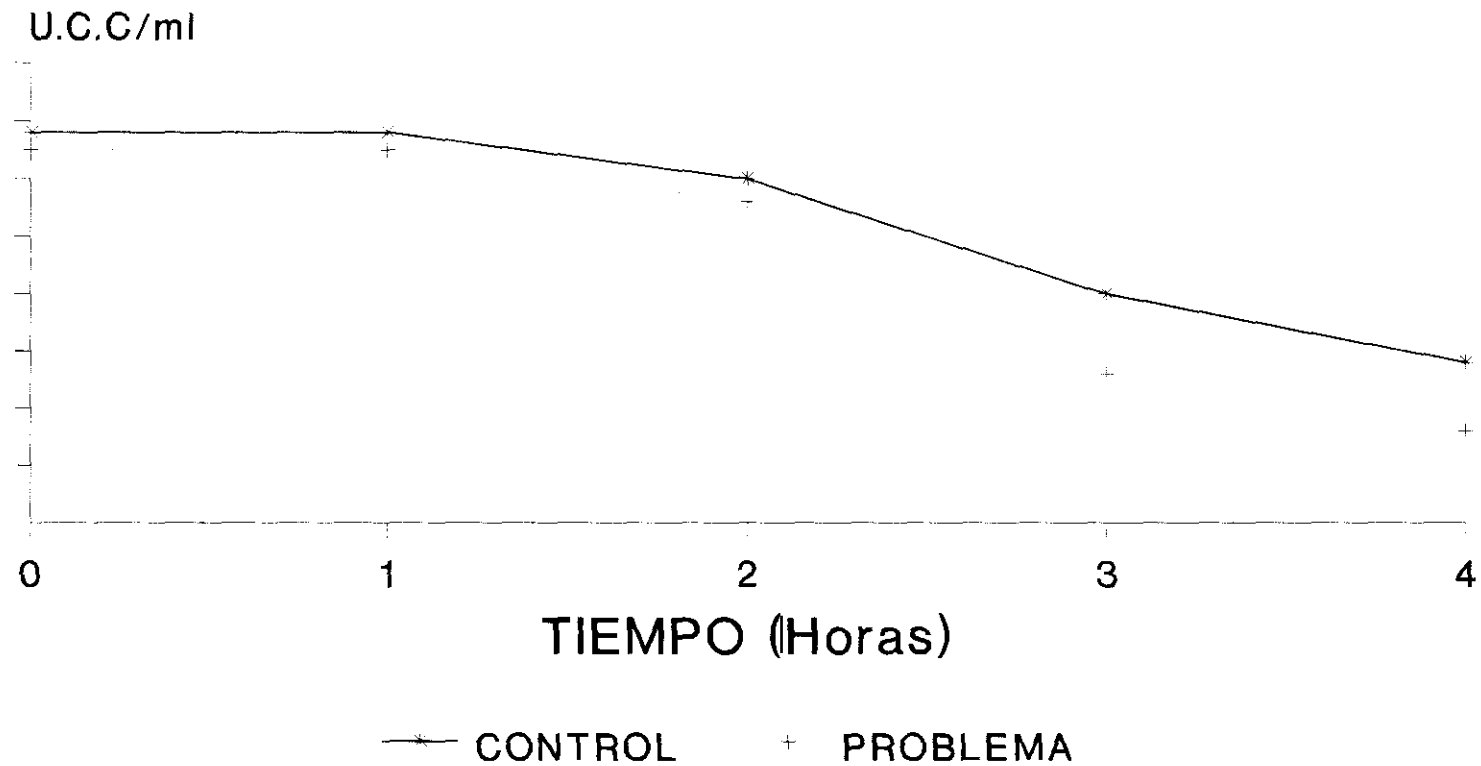
GRAFICA LXV

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA CON > 10 U.C.C/esp



GRAFICA LXVI

CONCENTRACIONES BACTERIANAS
U.UREALYTICUM (U.C.C/ml)
MUESTRAS CONTROL Y PROBLEMA



MEDIAS DE LA CONCENTRACION BACTERIANA
EN LAS 5 LINEAS DEL EXPERIMENTO I

GRAFICA LXVII

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL SIN DOXICICLINA

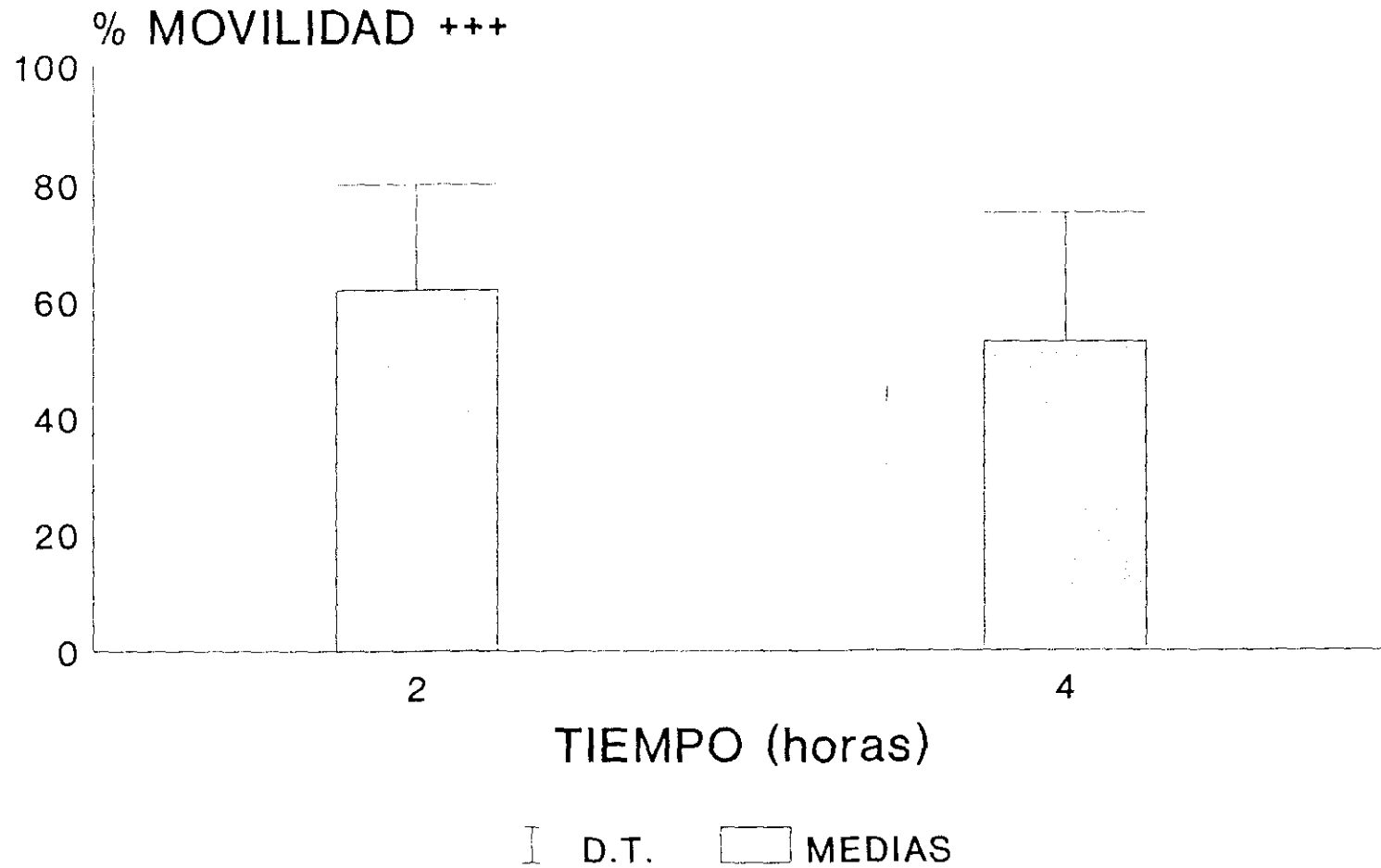


GRAFICO LXVIII

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS CONTROL CON DOXICICLINA

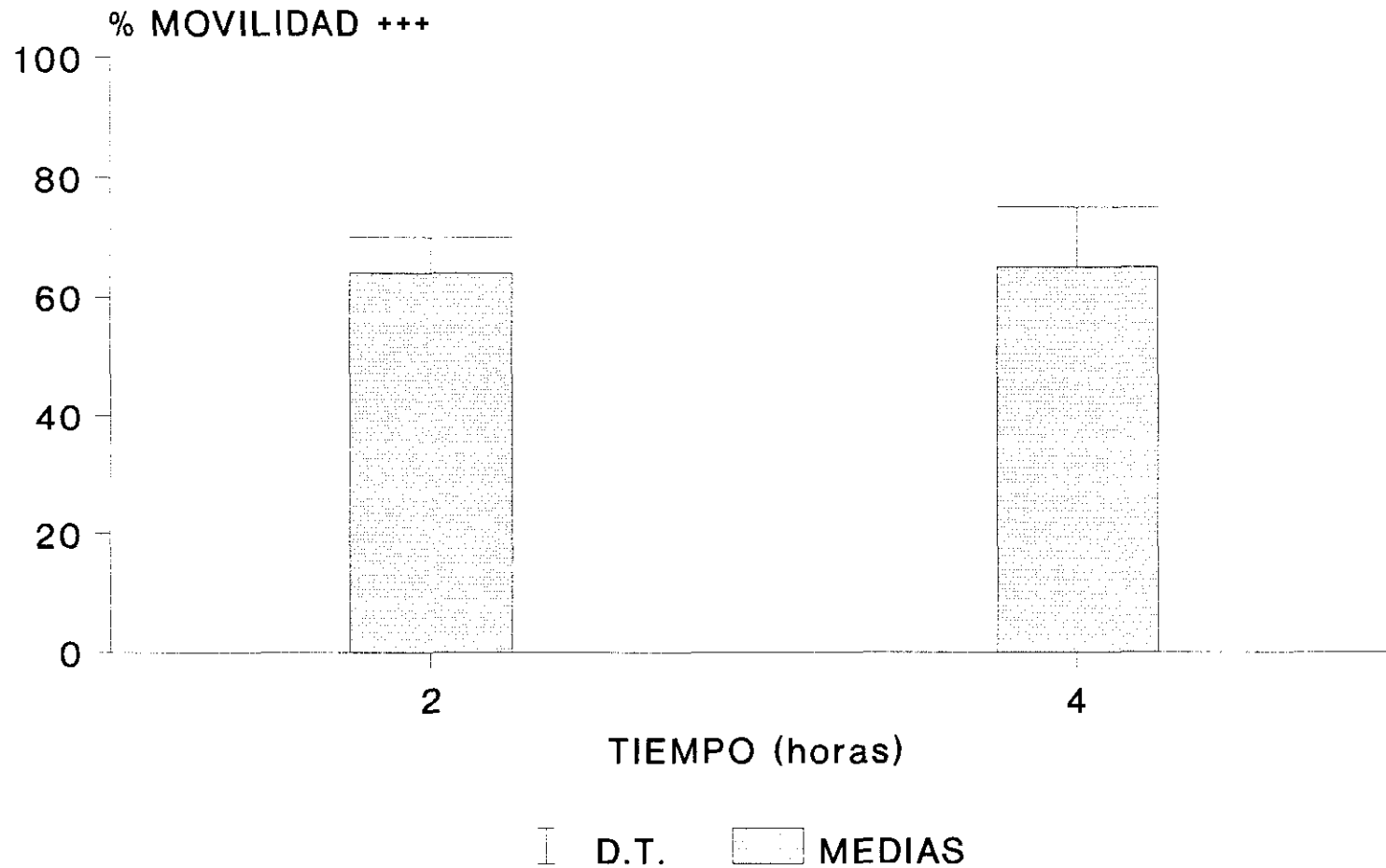


GRAFICO LXIX

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA SIN DOXICICLINA

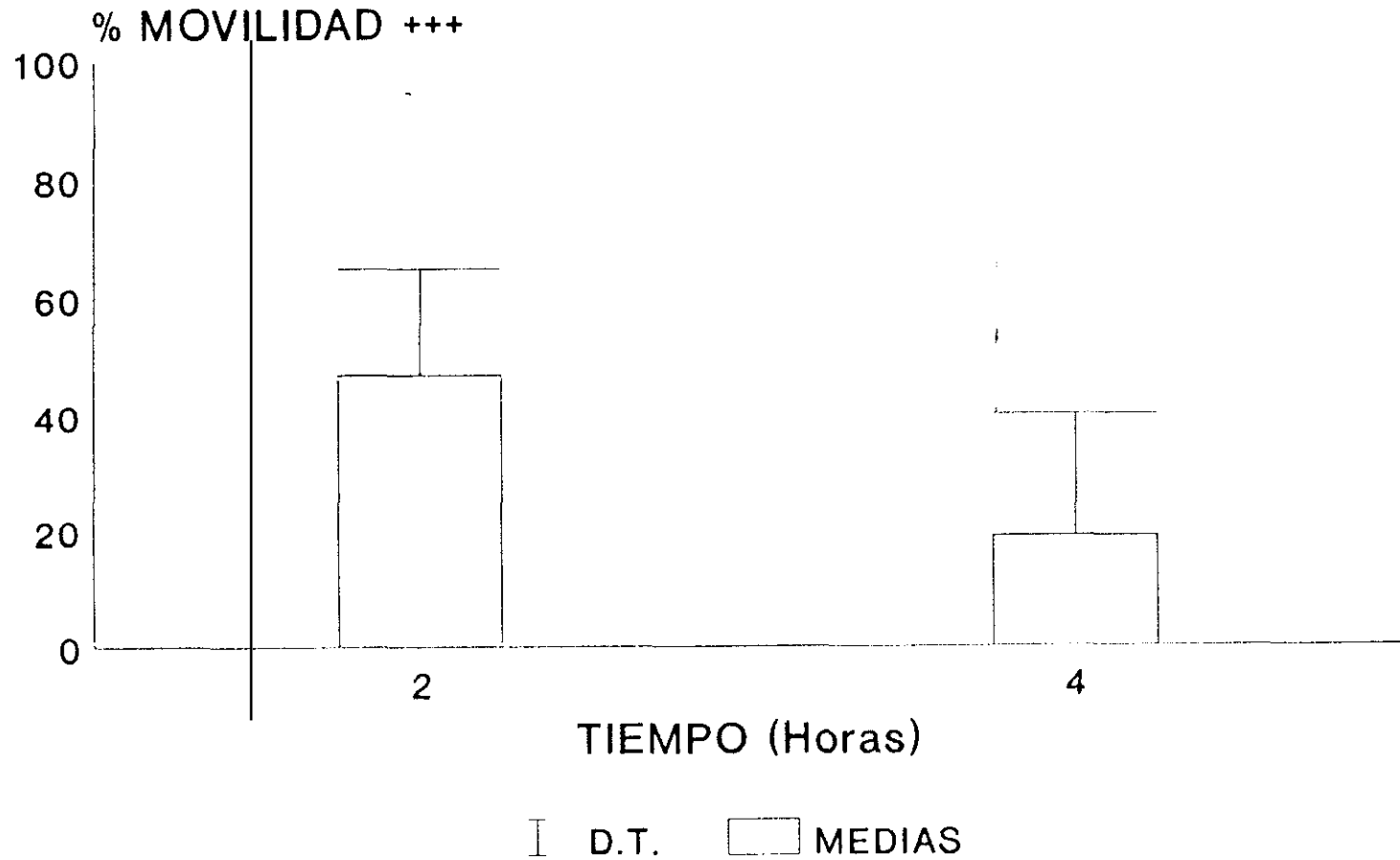


GRAFICO LXX

UREAPLASMA UREALYTICUM Y MOVILIDAD MUESTRAS PROBLEMA CON DOXICICLINA

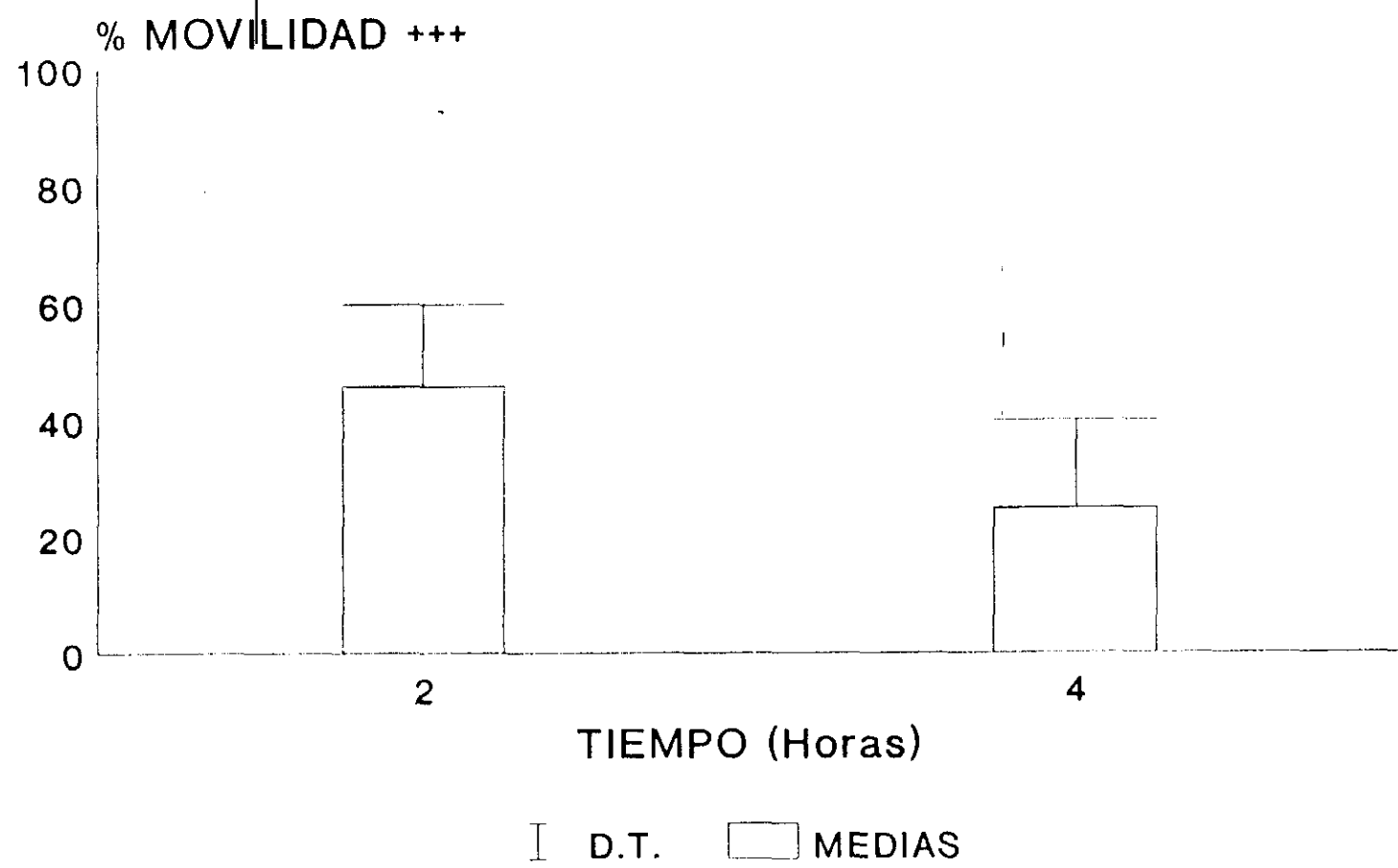


GRAFICO LXXI

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS CONTROL SIN DOXICICLINA

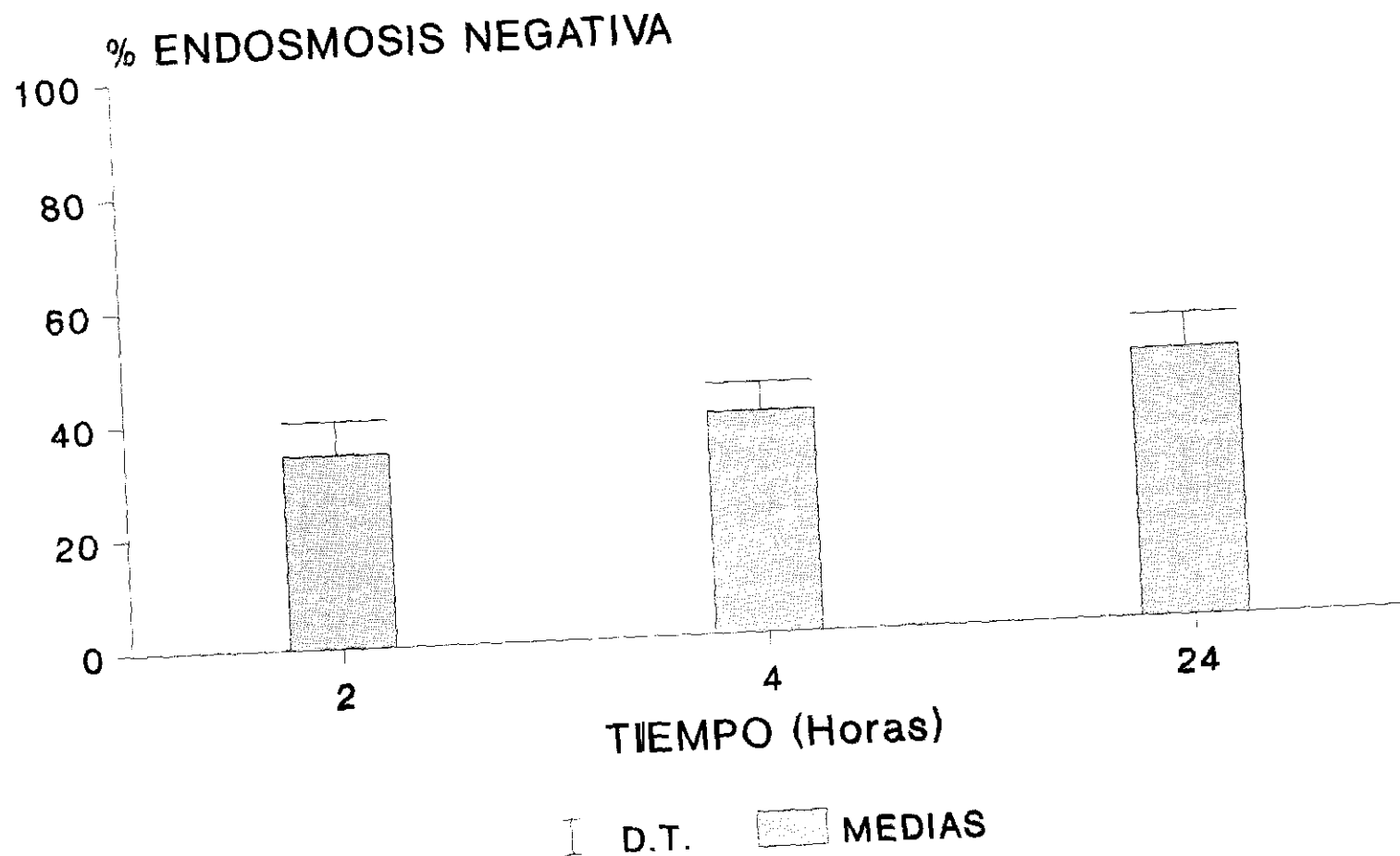


GRAFICO LXXII

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA SIN DOXICICLINA

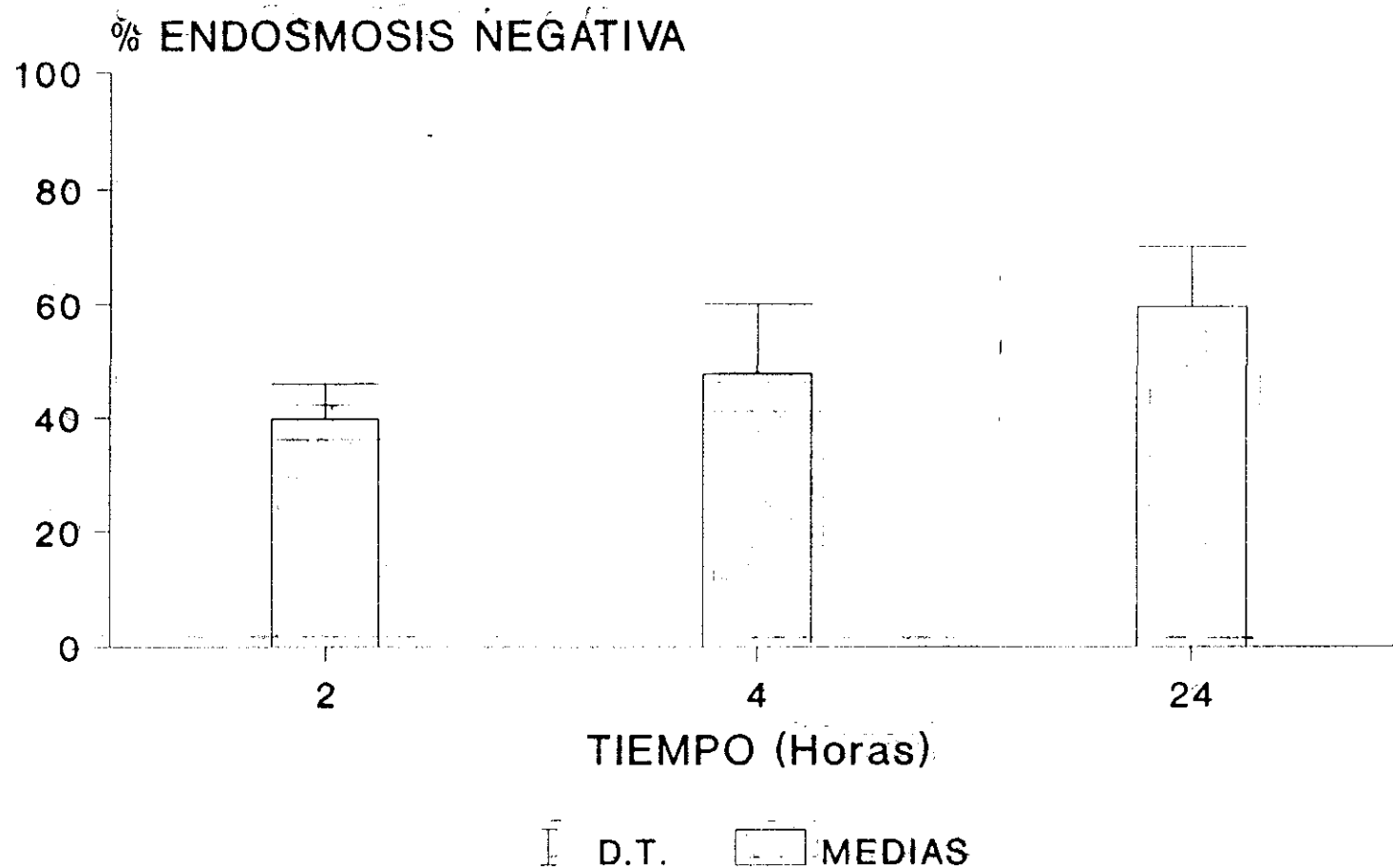
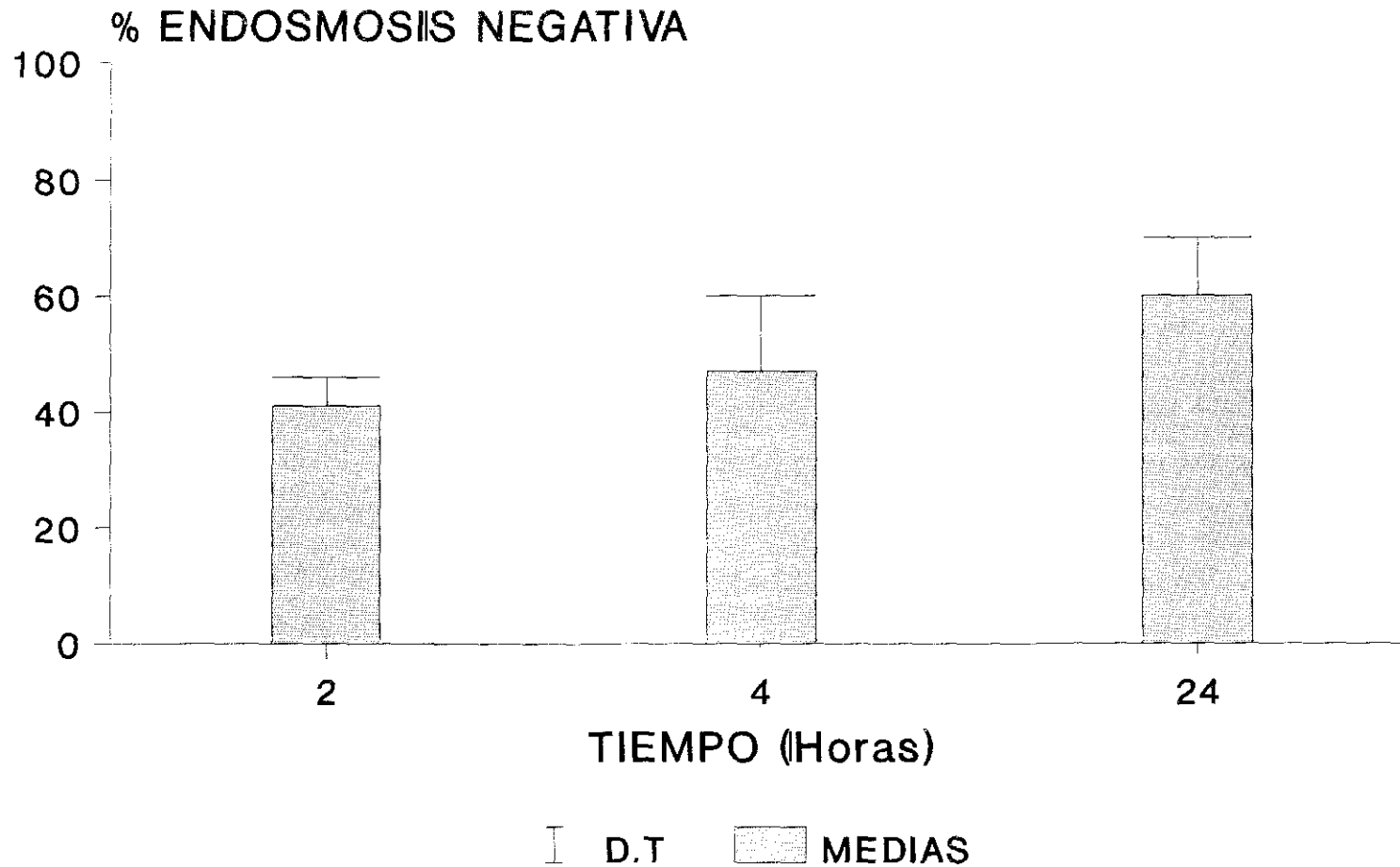


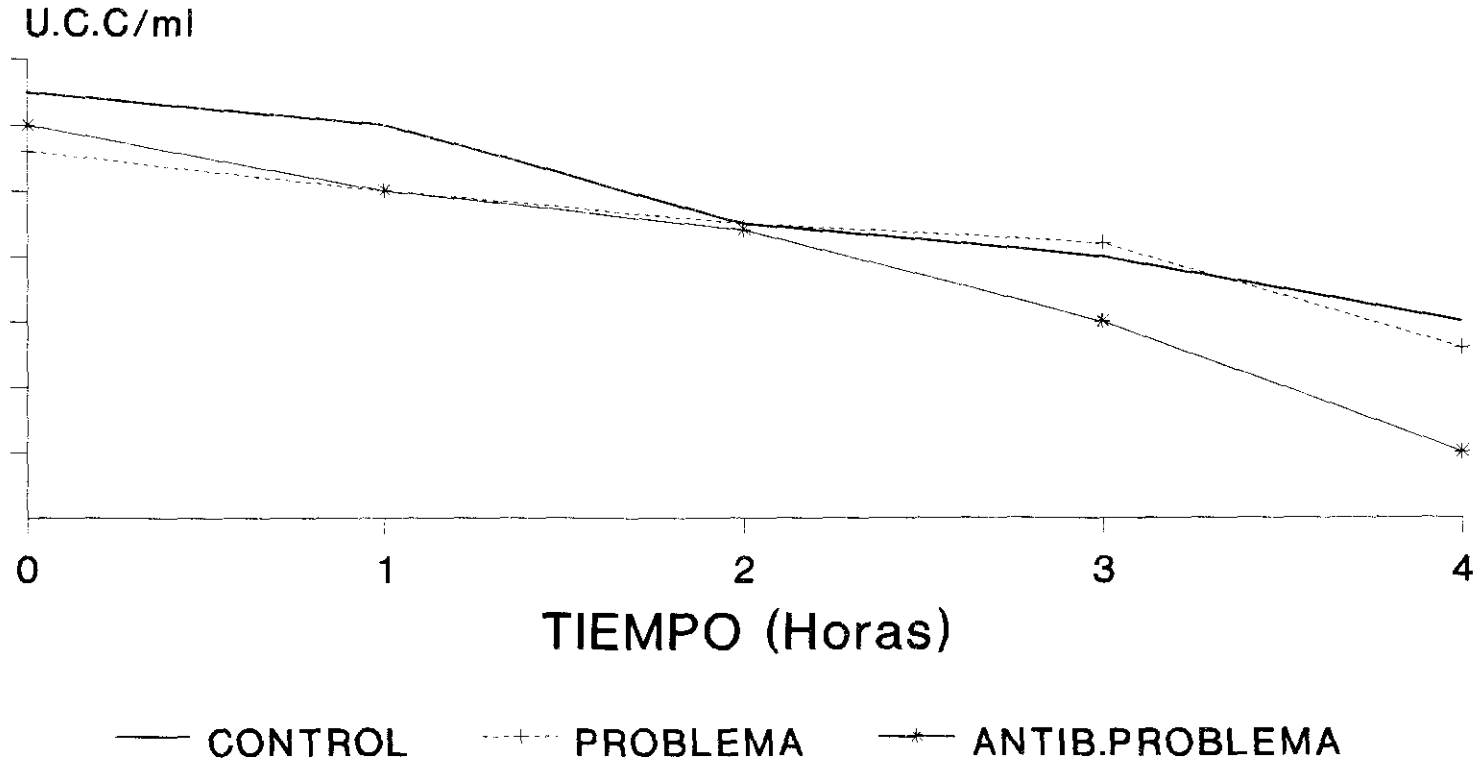
GRAFICO LXXIII

U.UREALYTICUM Y ENDOSMOSIS NEGATIVA MUESTRAS PROBLEMA CON DOXICICLINA



GRAFICA LXXIV

CONCENTRACIONES BACTERIANAS
U.UREALYTICUM (U.C.C/ml)
MUESTRAS CONTROL Y PROBLEMA



MEDIAS DE LA CONCENTRACION BACTERIANA
EXPERIMENTO II

GRAFICA LXXV