



ORIGINAL

Papel de los espermatozoides en la transmisión de bacterias uropatógenas: *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*



L.S. Guerrero-Hurtado, J. Puerta-Suárez y W.D. Cardona-Maya*

Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Recibido el 1 de diciembre de 2015; aceptado el 2 de marzo de 2016
Disponible en Internet el 29 de abril de 2016

PALABRAS CLAVE

Bacterias;
Espermatozoides;
Escherichia coli;
Enterococcus faecalis;
Infecciones;
Tracto reproductivo masculino

Resumen

Introducción: Los espermatozoides viajan por el tracto reproductivo femenino en búsqueda del oocito con el fin de fecundarlo. En su recorrido interactúan con diferentes sustancias y microorganismos que alteran la biología espermática, interfiriendo con el éxito reproductivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad que tienen los espermatozoides humanos de interactuar y transportar las bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*).

Materiales y métodos: Se incubaron espermatozoides humanos seleccionados de muestras de semen de voluntarios aparentemente sanos con concentraciones crecientes de *E. coli* y *E. faecalis* durante una hora. Posteriormente se realizaron cultivos cuantitativos en los agares MacConkey y chocolate de la mezcla bacterias-espermatozoides con y sin lavados o tratamiento postinfección con tripsina.

Resultados: Los espermatozoides interactúan y transportan las bacterias. En conjunto, los lavados y el tratamiento con tripsina causan una disminución estadísticamente significativa de unidades formadoras de colonia para *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299 y *E. coli* ATCC 25922.

Conclusión: Los espermatozoides humanos crean interacciones fuertes con las bacterias *E. coli* y *E. faecalis* favoreciendo su difusión en el tracto reproductivo femenino.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: wdcmaya@gmail.com, wdario.cardona@udea.edu.co (W.D. Cardona-Maya).

KEYWORDS

Bacteria;
Sperm;
Escherichia coli;
Enterococcus faecalis;
Infection;
Male reproductive tract

Role of sperm in the transmission of uropathogenic bacteria: *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*

Abstract

Introduction: Sperm travel through female reproductive tract seeking an oocyte to fertilise. During this journey, the sperm may interact with various substances and microorganisms that change its biology, interfering with reproductive success. The aim of this study was to evaluate the ability of human sperm to interact with and carry the bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*).

Materials and methods: Human sperm selected from semen samples of apparently healthy volunteers were incubated with increasing concentrations of *E. coli* and *E. faecalis* for one hour. Subsequently, quantitative cultures of the bacteria-sperm mixture were grown in MacConkey and chocolate agars with and without washing or post-infection treatment with trypsin.

Results: Sperm interact and carry bacteria. Washes and trypsin treatment together cause a statistically significant reduction in colony-forming units for *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299 and *E. coli* ATCC 25922.

Conclusion: Human sperm create strong interactions with *E. coli* and *E. faecalis* bacteria, promoting their dissemination in the female reproductive tract.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La interacción con el ambiente incluye el contacto permanente con microorganismos, relación de predominio microbiano, debido a que en una persona promedio existen al menos 10 veces más células microbianas que humanas¹. En la mayoría de los casos esta interacción es benéfica, sin embargo existen ocasiones en las cuales su desequilibrio ocasiona infecciones como es el caso del tracto reproductivo donde se incluyen las infecciones endógenas, iatrogénicas y de transmisión sexual².

Las infecciones de transmisión sexual son un grupo de infecciones transmitidas de individuo a individuo por medio de las relaciones sexuales y pueden ser ocasionadas por bacterias³, virus^{4,5} hongos e incluso parásitos⁶. Se encuentran entre las diez primeras causas de infecciones de los adultos jóvenes en los países desarrollados y en el mundo es la segunda causa de infección en mujeres adultas⁷, con amplias consecuencias sobre la salud como la enfermedad pélvica inflamatoria, muerte fetal, disfunción sexual e infertilidad, incrementando los costos en salud, con altas consecuencias sociales, económicas y personales^{3,4}.

Además de las infecciones de transmisión sexual, las infecciones del tracto urogenital son la causa más común de infecciones bacterianas y son responsables de una alta morbilidad⁵, siendo *E. coli* el principal agente etiológico⁸ y este microorganismo también es descrito por diferentes autores como el más prevalente en las infecciones prostáticas^{5,9,10}. Aunque en los hombres las infecciones del tracto urogenital generalmente son asintomáticas y se caracterizan por afectar sitios anatómicos del tracto reproductivo, como las vías urinarias, los testículos, el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias⁵, un estudio llevado a cabo en nuestro grupo reportó que el semen puede albergar microorganismos como *E. coli*, *E. faecalis*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus coagulans* negativo, *Klebsiella*

pneumoniae y microbiota mixta, lo que indica que el semen puede ser un reservorio de bacterias, especialmente las denominadas enterobacterias⁵.

Por otro lado, los espermatozoides, el mayor componente celular del eyaculado, son células altamente especializadas cuya principal función es transportar el material genético paterno hasta el oocito en el tracto reproductivo femenino (TRF)³ y durante su viaje, pueden interactuar con algunas sustancias, células epiteliales y microorganismos que aprovechan la movilidad de estas células para colonizar algunos lugares del TRF que en condiciones normales deberían estar libres de patógenos³. Adicionalmente, debido a los múltiples orígenes de bacterias en el tracto urogenital, se presume que los espermatozoides durante su desarrollo, maduración y transporte, interactúan con diferentes especies bacterianas, permitiendo su difusión a otros organismos mediante el contacto sexual¹¹. Es así como las infecciones provenientes del tracto urinario podrían tener un papel importante en el proceso reproductivo. Por ejemplo, las enterobacterias *E. coli* y *E. faecalis*, patógenos encontrados en las infecciones del tracto urogenital, interactúan con los espermatozoides¹², promoviendo procesos inflamatorios en los cuales se liberan especies reactivas del oxígeno desencadenando efectos deletéreos sobre el espermatozoide¹³⁻¹⁵ y sobre otros parámetros espermáticos¹⁶.

Estudios previos del Grupo Reproducción, han demostrado que el espermatozoide tiene la capacidad de interactuar con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) *in vitro*⁴, sugiriendo que esta célula no solo es importante en la transmisión horizontal sino también vertical, del padre al hijo^{4,17,18}. Por lo tanto, el siguiente paso fue postular que los espermatozoides sirven como medio de transmisión y difusión de infecciones bacterianas, resaltando el papel que cumple el hombre y la célula espermática en la transmisión de microorganismo por vía sexual. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la

capacidad de interacción y transporte de las bacterias *E. coli* y *E. faecalis* con los espermatozoides humanos *in vitro*.

Material y métodos

Bacterias

Se emplearon las cepas: i) *E. coli* sensible (ATCC 25922) y resistente (ATCC 35218) a ampicilina/sulbactam y piperacilina/tazobactam; ii) *E. faecalis* sensible (ATCC 29212) y resistente (ATCC 51299) a gentamicina y estreptomina de alto nivel. Los cultivos se realizaron en agar chocolate y MacConkey (Merck-Chemicals, Alemania). Los inóculos bacterianos de 10^5 , 10^3 , 10^1 unidades formadoras de colonias –UFC– se prepararon a partir de la primera dilución de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ –UFC– por mL, DensiCHEK™ Estados Unidos).

Muestras de semen

Las muestras de semen fueron donadas por voluntarios aparentemente sanos, mayores de 18 años, mediante masturbación después de una abstinencia sexual de 3 a 5 días, con parámetros seminales iguales o superiores a los límites inferiores de referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud en 2010¹⁹. A cada muestra de semen se le determinaron los parámetros seminales convencionales: volumen, movilidad, viabilidad siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud^{19,20}, la concentración fue determinada empleando la cámara de Makler (Sefi-Medical Instruments, Israel)²¹.

Posteriormente, se realizó la selección de los espermatozoides móviles empleando la técnica de gradiente (PureSperm® Nidacon, Gothenburg, Suecia). Brevemente, en un tubo cónico de 15 mL se adicionaron 300 μ L de la fase más densa (PureSperm® 80), 300 μ L de la fase menos densa (PureSperm® 40) y 600 μ L de semen sobre ambas fases, se centrifugó durante 12 min a 2.000 g. Finalmente, se retiró el sobrenadante y el botón de espermatozoides móviles fue resuspendido en 1 mL de medio HAM-F12 (GIBCO®, Grand Island, NY, EE. UU.), centrifugando durante 6 min a 2.000 g, para finalmente determinar la concentración espermática.

Interacción entre espermatozoides y bacterias *in vitro*

Un millón de espermatozoides se incubó con cada concentración de bacterias (10^1 , 10^3 y 10^5 UFC) durante una hora. Posteriormente se centrifugaron a 2.000 g/5 min, el botón fue resuspendido en 50 μ L de PBS y homogenizado mediante vortex (Labnet, Estados Unidos), repitiendo este procedimiento cinco veces. Finalmente 10 μ L fueron sembrados cuantitativamente en agar MacConkey o chocolate e incubados a 37 °C/24 h. La muestra inicial de espermatozoides (10 μ L) se sembró como control de los microorganismos existentes en la muestra.

Adicionalmente, se realizaron ensayos incubando la solución de los espermatozoides y bacterias con tripsina (Gibco®, Grand Island, New York) por 15 min/37 °C, en relación 1:1 v/v.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos se realizó una prueba no paramétrica: un test de Friedman y un posttest de Dunns, empleando el programa estadístico GraphPad Prism 6 GraphPad Prism 6 (Graphpad, CA, EE. UU.). Para todos los casos se utilizó un nivel de significación de $p < 0,05$.

Resultados

Los espermatozoides humanos interactúan *in vitro* con las bacterias (*E. coli* y *E. faecalis*) y logran transportarlas al medio de cultivo (fig. 1). Adicionalmente, el tratamiento con tripsina y los lavados disminuyen el crecimiento bacteriano. Se observó que los lavados y el tratamiento con tripsina en conjunto causan una disminución estadísticamente significativa de UFC frente al control (muestras sin lavado y sin tripsina). Con la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, se observó una reducción del 65,9, 64,0 y del 82,5% en el recuento de las UFC para las concentraciones 10^1 UFC, 10^3 UFC y 10^5 UFC, respectivamente frente al control; $p < 0,05$. Con la cepa *E. faecalis* 51299 las reducciones observadas fueron del 59,4, 54,4 y del 56,0% para las concentraciones 10^1 UFC, 10^3 UFC y 10^5 UFC, respectivamente; $p < 0,01$. Finalmente, con la cepa *E. coli* 25922 las reducciones en el conteo de UFC después de los tratamientos con lavados y tripsina fueron de 58,2 y de 95,2% para las concentraciones 10^1 UFC y 10^3 UFC, respectivamente, $p < 0,05$.

Discusión

Gracias a diversos estudios se ha observado que la célula espermática cuenta con una amplia capacidad de interacción con diferentes microorganismos y sustancias a través de su recorrido por el tracto reproductivo masculino y femenino^{4-6,22}, facilitando su transmisión y generando diferentes procesos infecciosos e inflamatorios^{5,8,23}. Adicionalmente, teniendo en cuenta los resultados previos^{4-6,9,13,18} y los obtenidos en el presente estudio, se puede afirmar que los espermatozoides interactúan con diferentes enterobacterias, por lo cual participarían como vectores de transmisión de infecciones hacia el TRF.

En este estudio se analizó la interacción de los espermatozoides seleccionados empleando la técnica de gradiente, con las bacterias *E. coli* y *E. faecalis*. La selección con gradiente facilita la obtención de espermatozoides móviles, pero se observó que no elimina los microorganismos unidos a estas células espermáticas, debido a que se encontró que muestras de espermatozoides seleccionados no incubados con las cepas bacterianas empleadas, presentaban crecimiento bacteriano en el cultivo (datos no mostrados), por lo que estas muestras eran excluidas del estudio. Datos similares se obtienen con otras técnicas de selección por migración como el *Swim up*²⁴, con las cuales no se logra una eliminación completa de los microorganismos presentes en la muestra, aspecto importante especialmente en lo que refiere a las técnicas de reproducción asistida donde se debe tener mayor cuidado y vigilancia para evitar la transmisión de microorganismos que afectarían el éxito reproductivo.

En este estudio observamos que los tratamientos en conjunto de lavados y tripsina disminuían de forma

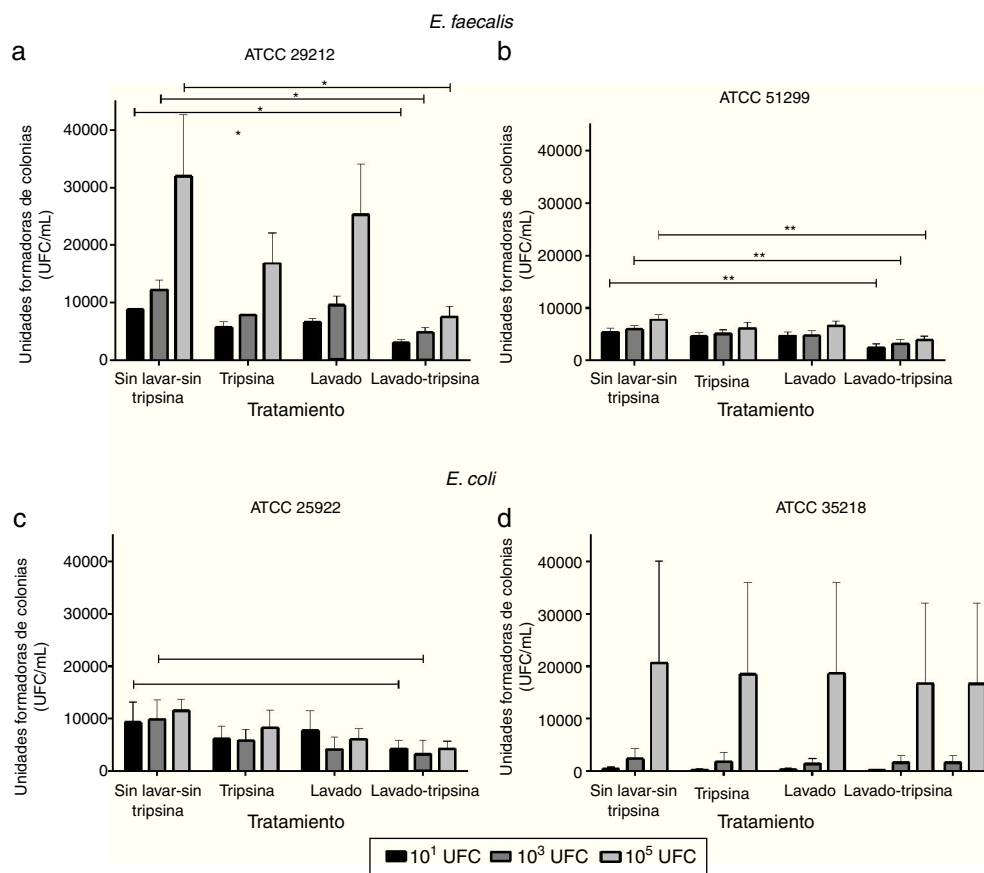


Figura 1 Evaluación de la interacción espermatozoide-bacteria y el efecto de los tratamientos aplicados.

a: *E. faecalis* ATCC 29212; b: *E. faecalis* ATCC 51299; c: *E. coli* ATCC 25922 d: *E. coli* ATCC 35218.

* p < 0,05; ** p < 0,01. *E. coli* y *E. faecalis* disminuyen su crecimiento de forma estadísticamente significativa con respecto al control (muestras sin lavado y sin tripsina) tras la aplicación de los diferentes tratamientos.

estadísticamente significativa la interacción bacterias-espermatozoides. La tripsina es una enzima peptidasa que rompe los enlaces peptídicos de la membrana espermática principalmente en las cabezas de los espermatozoides, la debilita y por tanto modifica su interacción con las bacterias empleadas en el estudio, tal como lo refiere Gerald et al.²⁵.

En estudios previos del grupo evaluando la interacción del espermatozoide con el VIH⁴, se evidenció un incremento en la difusión del virus a través de los espermatozoides después del tratamiento con tripsina. El hecho de encontrar una interacción mayor del virus del VIH con los espermatozoides tratados con tripsina en comparación con los no tratados, sugiere un efecto potenciador de esta enzima en la unión del virus y por lo tanto de su difusión. Sin embargo, con los resultados obtenidos en el presente ensayo, se pudo observar que la tripsina tiene un efecto contrario en la interacción espermatozoide-bacteria, su aplicación disminuyó el crecimiento bacteriano en los cultivos probablemente por el debilitamiento de la membrana espermática, lo que impide que las bacterias se adhieran adecuadamente al espermatozoide.

Similar a lo encontrado en estudios con *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) tratada con tripsina, se encontró que esta molécula disminuye las interacciones espermatozoide-bacteria, pero no las elimina

completamente, causando debilitamiento de la membrana y eliminación de estructuras como el pili, el cual facilita la adhesión bacteriana²⁶. Teniendo en cuenta que no todas las bacterias cuentan con dichas estructuras y considerando la existencia de otros medios de adhesión, se puede explicar la presencia de crecimiento bacteriano postratamiento, al igual que *N. gonorrhoeae*, cuya cepa con ausencia de pili al ser expuesta a la acción de la tripsina, no presentó una disminución significativa en el crecimiento bacteriano²⁶.

Gracias a las estructuras de adherencia, las bacterias podrían continuar unidas a los espermatozoides a pesar de tratamientos para debilitar la membrana espermática con la aplicación de tripsina, lo que sugiere que la unión de los espermatozoides con diferentes microorganismos podría estar mediada también por receptores presentes en la membrana espermática como el caso del virus del VIH, el cual interactúa con el receptor de manosa²⁷, sin embargo, no se puede descartar que *E. faecalis* se adhiera a los espermatozoides humanos a través de estructuras como el pili²⁸. *E. coli* puede emplear para su interacción con los espermatozoides al receptor de manosa⁹, o estructuras como el pili²⁸, por lo que queda aún por definir cuál de las estructuras es de mayor relevancia para esta interacción, si hay otras estructuras involucradas o si hay varias estructuras que en conjunto sean responsables de esta unión; por lo que la profundización sobre el conocimiento de estas interacciones

ayudaría a implementar técnicas de eliminación de microorganismos especialmente en procedimientos de reproducción asistida, además de contribuir a limitar la difusión de infecciones a través de los espermatozoides, esencialmente de los microorganismos responsables de la infección de transmisión sexual.

En conclusión, los espermatozoides interactúan con las bacterias *E. coli* y *E. faecalis* seguramente mediante receptores de la membrana espermática y esta interacción no es eliminada mediante los tratamientos, por lo tanto los espermatozoides son un vector importante en la transmisión de procesos infecciosos e inflamatorios hacia el TRF¹⁸.

Financiación

Este trabajo fue financiado por Colciencias (111556933373) y por la Estrategia de Sostenibilidad, Grupo Reproducción, de la Universidad de Antioquia. LSG es joven investigadora de la Universidad de Antioquia (2014-2015).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la bacterióloga Mariluz Giraldo por su ayuda técnica.

Bibliografía

- Mändar R. Microbiota of male genital tract: impact on the health of man and his partner. *Pharmacol Res.* 2013;69:32–41.
- Ochsendorf F. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia.* 2008;40:72–5.
- Puerta-Suárez J, Giraldo M, Cadavid AP, Cardona-Maya W. Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2014;79:209–17.
- Cardona Maya W, Rugeles MT, Cadavid AP. Interacción entre espermatozoides humanos y el virus de la inmunodeficiencia humana. *Actas Urol Esp.* 2009;33:223–6.
- Puerta Suárez J, Villegas Castaño A, Serna Quintana GJ, Martínez A, Romero Palacio J, Giraldo M, et al. Espermocultivo: crecimiento bacteriano del eyaculado y su relación con los parámetros seminales. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2015;80:33–40.
- Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJ, Maria-Engler SS, Bonini MG, et al. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat Rev Urol.* 2014;11:672–87.
- Ángel-Müller E, González MP, Núñez L, Pacheco J, Tolosa JE, Díaz LA, et al. Frecuencia de infecciones del tracto genital femenino en mujeres sintomáticas y uso de pruebas rápidas para su diagnóstico en dos poblaciones de Bogotá (Colombia) 2008. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2010;61:220–30.
- Chiavassa L, Vaschalde G. Prevalencia y perfil de resistencia de microorganismos en infecciones del tracto urinario. *ByPC.* 2008;72:11.
- Wolff H, Panhans A, Stolz W, Meurer M. Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. *Fertil Steril.* 1993;60:154–8.
- Boguen R, Treulen F, Uribe P, Villegas JV. Ability of *Escherichia coli* to produce hemolysis leads to a greater pathogenic effect on human sperm. *Fertil Steril.* 2015;103:1155–61.
- Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, et al. Genital tract infections and infertility. *EJOG.* 2008;140:3–11.
- Gerbase A, Rowley J, Heymann D, Berkley S, Piot P. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sex Transm Infect.* 1998;74:S12.
- Schulz M, Sánchez R, Soto L, Risopatrón J, Villegas J. Effect of *Escherichia coli* and its soluble factors on mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine translocation, viability, and motility of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2010;94:619–23.
- Villegas J, Schulz M, Soto L, Sanchez R. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis.* 2005;10:105–10.
- Diemer T, Weidner W, Michelmann H, Schiefer HG, Rován E, Mayer F. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *Int J of Androl.* 1996;19:271–7.
- Cano Chaves A, Galarzo Pardo S, Puerta Suárez J, Giraldo M, Cadavid A, Cardona Maya W. Efecto de las bacterias uropatógenas y los factores solubles de su metabolismo sobre la calidad espermática: *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. *Revista Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia.* Doi: 10.1016/j.gine.2015.11.005.
- Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Role of male factor in early recurrent embryo loss: do antioxidants have any effect? *Fertil Steril.* 2009;92:565–71.
- Tamara Viscarra A, Priscilla Brebi M, Alejandra Andana V, Raul Sanchez G. Sexual transmission infections in semen. men as vector transmission. *Int J Morphol.* 2013;31:254–63.
- Cardona Maya W. Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud-2010. *Actas Urol Esp.* 2010;34:577–8.
- World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
- Cardona-Maya W, Berdugo J, Cadavid A. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urol Esp.* 2008;32:443–5.
- Lozano-Hernandez R, Vivas-Acevedo G, Muñoz dVM. Mycoplasmas y anticuerpos anti-Chlamydia en semen de hombres infértiles y su relación con la calidad seminal y los marcadores de glándulas sexuales accesorias masculinas. *Invest Clin.* 2012;53:138–47.
- Córdova E, Lespada MI, Cecchini D, Jacob N, Gomez N, Gutfraind G, et al. Prevalencia de gérmenes multirresistentes en infecciones del tracto urinario de la comunidad y asociadas a los cuidados de la salud. *Actualizaciones en Sida e Infectología.* 2014;22:33–8.
- Yélamo MÁC, Jiménez MJG, Fernández-Sánchez M. Inseminación artificial. En: García Velasco JA, editor. *Enfermería en Reproducción Humana*, 9. Editorial Dykinson; 2007. p. 95.
- Edelman GM, Millette CF. Molecular probes of spermatozoan structures. *Proc Nat Acad Sci.* 1971;68:2436–40.
- Gomez C, Stenback W, James A, Criswell B, Williams R. Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to human sperm. Microscopical study of trypsin and iron. *Br J Vener Dis.* 1979;55:245–55.
- Cardona Maya W, Velilla PA, Montoya CJ, Cadavid A, Rugeles MT. In vitro human immunodeficiency virus and sperm cell interaction mediated by the mannose receptor. *J Reprod Immunol.* 2011;92:1–7.
- James-Holmquest AN, Swanson J, Buchanan TM, Wende RD, Williams RP. Differential attachment by piliated and nonpiliated *Neisseria gonorrhoeae* to human sperm. *Infect Immun.* 1974;9:897–902.