

Artículo original

Impacto de *Staphylococcus epidermidis* en el testículo murino

Ricardo Lozano-Hernández^a, Judith Velasco^{b,*}, Pacheco Liliana^a, Sayago Alba^a, Juliana Peña^a

^aCentro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Ginecológicas (CEDIEG) "Dr. Giovanni Vivas-Acevedo". ^bDepartamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Recibido 11 de noviembre de 2017; aceptado 30 de mayo de 2018

Resumen: El impacto de *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) sobre la calidad espermática es un tema controversial. Se evaluaron los espermatozoides epididimarios y la histología testicular en ratones después de una inyección intratesticular de *S. epidermidis*. Los animales fueron sacrificados a las tres semanas posteriores a la infección, los espermatozoides del epidídimo fueron analizados microscópicamente, mientras que los testículos fueron pesados y procesados histológicamente. Se observaron cambios en la forma de la cabeza de los espermatozoides con formas globosas y reducción del acrosoma, la movilidad espermática se mantuvo inalterada. En los testículos se observó vacuolización en el epitelio intratubular, desprendimiento celular moderado e hipertrofia de las células de Leydig. Los hallazgos en murinos sugieren que *S. epidermidis* puede alterar la calidad espermática aun en ausencia de leucocitos seminales, generando desprendimiento de las células redondas y aumento de las formas espermáticas globosas. Los mecanismos deletéreos son poco conocidos y podrían estar asociados con estrés oxidativo. El estudio en murinos sugiere que la alteración de las formas espermáticas y la celularidad en el semen ameritan un estudio más amplio de estos aparentes comensales y de las condiciones de cada hospedero, para comprender las causas de infertilidad masculina que a menudo son idiopáticas.

Palabras clave: *Staphylococcus* coagulasa negativa, *S. epidermidis*, testículo, epidídimo, calidad espermática.

Impact of *Staphylococcus epidermidis* on the murine testicle

Abstract: The impact of coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) on sperm quality is a controversial issue. Epididymal sperm and testicular histology were evaluated in mice after the intratesticular injection of *S. epidermidis*. Animals were sacrificed three weeks after infection and the sperm of the epididymis was analyzed microscopically, while the testes were weighed and processed histologically. Changes were observed in the shape of the head of the sperm with globe-like forms and acrosome reduction, sperm motility remained unchanged. In the testicles vacuolization of the intratubular epithelium, moderate cell detachment and hypertrophy of the Leydig cells were observed. The findings in murine suggest that *S. epidermidis* can alter the sperm quality even in the absence of seminal leukocytes, generating detachment of the round cells and increase of globe head sperm forms. The deleterious mechanisms are little known and could be associated with oxidative stress. This study in murine suggests that alterations of the sperm morphology and cellularity in semen require a wider study of the apparent commensalism and the conditions of the host, to understand the causes of male infertility that are often idiopathic.

Keywords: Coagulase negative *Staphylococcus*, *S. epidermidis*, testicle, epididymis, sperm quality.

* Correspondencia:

E-mail: judithvelasco2005@yahoo.es

Introducción

Las infecciones del tracto genital masculino son causa importante de infertilidad y se caracterizan por ser generalmente asintomáticas y crónicas [1]. Microorganismos como *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en el semen de hombres infértiles se han asociado con alteraciones en los parámetros

seminales; mientras que otras especies bacterianas como *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp., no han mostrado mayor grado de impacto en la calidad seminal [2,3]. Enwuru *et al.* consideraron que los microorganismos comensales grampositivos en el semen humano pueden alterar la morfología y la movilidad espermática [4]. De manera que el impacto de estos microorganismos, aparentemente saprofitos, sobre los parámetros espermáticos es un

tema controversial, especialmente con las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) que son detectadas frecuentemente en el semen de hombres infértiles [5-8].

Algunas especies de SCN son parte de la microbiota del tracto genitourinario y evitan la colonización de otras bacterias nocivas como *Staphylococcus aureus*; mientras que en otras condiciones, *S. epidermidis* puede comportarse como patógeno nosocomial, lo que hace interesante el estudio de estas especies en algunas patologías infecciosas, que son detectadas con relativa frecuencia en semen de hombres infértiles (25 a 86%) [5,6,9,10].

El impacto de *S. epidermidis* en la calidad seminal no debería subestimarse, especialmente por su capacidad de producir una variedad de factores de adherencia, toxinas, hemolisina, leucocidinas y enterotoxinas, polímeros superficiales protectores, exoenzimas, agentes citolíticos y biopelículas que inhiben los principales mecanismos de defensa del hospedero, aunque no se observen alteraciones relevantes en los parámetros espermáticos [11-15]. De esta manera la identificación y el tratamiento antimicrobiano serían aportes de interés clínico, especialmente cuando la especie más frecuente de los SCN, *S. epidermidis*, muestra mayor resistencia a los antibióticos cuando está asociado a infección [16].

Los estudios en animales de experimentación han ayudado a comprender los cambios celulares y tisulares del hospedero ante la presencia de un agente infeccioso [16-18]. Algunos estudios han puesto en evidencia que se producen cambios tisulares luego de la inoculación de bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus* en testículos de animales, demostrando lesiones inflamatorias testiculares; sin embargo, no se destacaron cambios específicos de la citoarquitectura del testículo por infección [17-19]. En tal sentido, sería interesante observar si suspensiones de SCN obtenidas de muestras de semen de pacientes infértiles normozoospermicos tienen impacto en el tracto genital masculino del ratón.

El objetivo de este estudio fue evaluar los parámetros espermáticos e histológicos de testículos de ratón después de haber sido inoculados con una suspensión de *S. epidermidis*.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 12 ratones machos NMRI de 35 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes (ULA), Mérida, de acuerdo a la Comisión de Bioética de la ULA para solicitar el aval de investigación y docencia que involucra animales de laboratorio [20]. El tamaño de la muestra fue determinada probabilísticamente con el nivel de confianza de 95% y un valor de $p \leq 0,05\%$ mediante la fórmula estadística:

$$n = \left[\frac{(1,96)^2 \times 0,7 \times 0,3}{(0,36)^2} \right] = 6,2 \approx 6 \text{ animales para cada grupo [21]}$$

S. epidermidis fue aislado del espermocultivo de un hombre infértil, e identificado por el método convencional y la galería API®/32 ID STHAP (bioMérieux, Francia).

El inóculo de *S. epidermidis* se preparó a partir de un cultivo en caldo Müeller-Hinton (Oxoid®) incubado a 37 °C durante 6-8 horas; posteriormente se preparó una suspensión en solución salina fisiológica estéril (0,85%, SSF) con una turbidez equiparable al patrón 0,5 Mc Farland [22].

El grupo experimental se inoculó con 0,1 mL de la suspensión bacteriana ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL) vía subcutánea en la cara ventral de cada testículo hasta alcanzar el mediastino testicular. El grupo control se inoculó de manera similar pero con 0,1 mL de SSF. Durante 3 semanas los animales se mantuvieron en jaulas de polipropileno a una temperatura promedio $21 \text{ °C} \pm 3$ en grupos de seis, alimentados con ratarina comercial (Protinal®, Caracas, Venezuela) y con agua esterilizada *ad libitum* en un ambiente de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales fueron anestesiados con halotano y posteriormente sacrificados [23]. Los testículos fueron removidos, se pesaron y se procesaron histológicamente en bloques de parafina y se colorearon con hematoxilina-eosina. Se evaluaron los compartimientos intratubulares, membrana basal de los túbulos y el espacio intersticial [23]. Se separaron los epidídimos en viales Eppendorf, de manera que para el epidídimo derecho se determinó la concentración espermática y de la cauda del epidídimo izquierdo se cuantificaron los espermatozoides/mL en cámara de Neubauer [24]. La morfología espermática se llevó a cabo por el criterio de Domínguez-Odio y col [25] como se expone en la figura 1.

Los datos obtenidos se analizaron según el diseño a través del *Statistical Package for the Social Science* (SPSS), versión 17.0 para determinar frecuencias absolutas y análisis comparativo mediante test de Tukey.

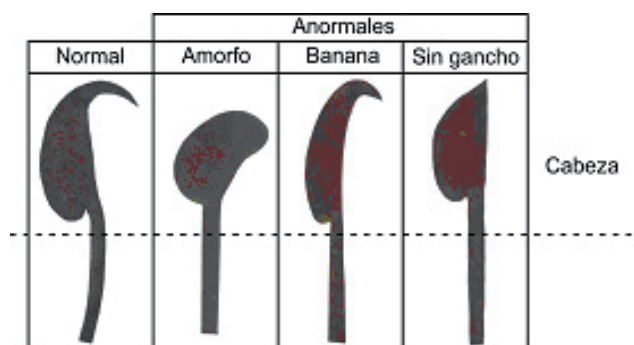


Figura. 1. Categorías de formas espermáticas del ratón. (Autorizada por Domínguez-Odio y col. 2012).

Resultados y discusión

Al evaluar el peso del ratón, luego de transcurrir 3 semanas de la inoculación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos corporales de ambos grupos de estudio (grupo experimental $32,20 \pm 1,67$ g y grupo control $33,72 \pm 2,49$ g). El peso de los testículos tanto derecho como izquierdo mostraron un valor muy parecido entre ambos grupos ($0,12 \pm 0,03$ g).

Al comparar la concentración espermática y la

movilidad no se encontraron cambios significativos, solo una leve disminución de la concentración espermática del grupo experimental de $650.000.000 \pm 222.710.575$ espermatozoides/mL vs. el grupo control $799.000.000 \pm 176.436.957$ espermatozoides/mL. La movilidad espermática expresada en porcentaje de progresivos, no progresivos e inmóviles no mostró diferencias. No obstante, el valor absoluto de movilidad no progresiva se presentó más elevado en el grupo inoculado con *S. epidermidis*, pero la dispersión de los valores no permitió marcar alguna diferencia significativa (Tabla 1). Moretti *et al.* encontraron que *S. epidermidis* causaba aumento de la apoptosis en los espermatozoides y otros cambios ultraestructurales descendiendo la capacidad fecundante de esos gametos [26].

Tabla 1. Movilidad de espermatozoides epididimarios

	SCN	Control
Móviles Progresivos (%)	58,8 ± 11,6	57,4 ± 14,8
Móviles No Progresivos (%)	9,5 ± 8,3	7,4 ± 7,0
Inmóviles (%)	31,7 ± 4,1	35,2 ± 6,2

Movilidad de espermatozoides en ratones inoculados con SCN (*S. epidermidis*) y grupo control $p \leq 0,05$.

De acuerdo al criterio morfológico de Domínguez-Odio y col [25] se demostró que en presencia de *S. epidermidis* aumentaron las formas anormales: cabeza amorfa ($p=0,0055$) y forma de banana ($p=0,0001$) asociadas a reducción de las formas normales con gancho ($p=0,0019$). El porcentaje de cabezas sin gancho fue similar en ambos grupos ($p=0,135$) (Tabla 2). La forma de banana representa la pérdida de la forma elongada con gancho típica de la morfología normal de espermatozoides de ratón, tendiendo a ser más globosa que elongada. En humanos se ha propuesto una de las formas anormales caracterizada por cabeza globosa o globozoospermia; estas formas han sido observadas en muestras seminales de hombres infértiles con presencia pura y elevada de SCN, en las cuales se observó aumento del número de células redondas sin leucitospermia y predominio de las cabezas globosas; la globozoospermia del humano se ha asociado con estrés oxidativo que afecta

Tabla 2. Morfología espermática de acuerdo al criterio morfológico de Domínguez-Odio y col 2012.

	SCN	Control
Cabeza en forma de gancho	92,1 ± 6,5*	97,8 ± 5,5
Cabezas amorfas	4,7 ± 6,5*	1,8 ± 6,5
Cabeza en forma de banana	1,1 ± 0,5*	0
Cabeza sin gancho	2,2 ± 1,2*	0,4 ± 0,2

Formas de espermatozoides en ratones infectados con SCN (*S. epidermidis*) y en el grupo control * $p \leq 0,05$.

la estructura del material nuclear del espermatozoide [27]. En las patologías testiculares infecciosas e inflamatorias del hombre infértil las especies reactivas al oxígeno (ERO) se han relacionado inversamente con la calidad de los parámetros seminales. No obstante, existe una falta de consenso sobre el tipo de pacientes que requiera la valoración de ERO y sobre la estandarización del ensayo, por lo que su medición rutinaria en el hombre infértil no es recomendable aún [28]. Los estudios del impacto de la infección sobre los parámetros seminales, en cuanto a la morfología espermática, se refieren exclusivamente a la reducción de las formas normales y no a la descripción de las formas anormales, siendo una de estas las formas globosas, las cuales se han relacionado directamente con la producción de ERO [29,30]. El impacto negativo de SCN en el tracto masculino del modelo murino ha podido ser revertido cuando los ratones fueron tratados oralmente con antioxidantes (datos no incluidos en este estudio). Los estudios del efecto favorable de los antioxidantes en las formas y en la movilidad espermática han sido observados en humanos [31,32].

Las diferentes formas espermáticas observadas en las muestras de ratones infectados se observan en la figura 2 (2a normal, 2b, 2c y 2d anormales).

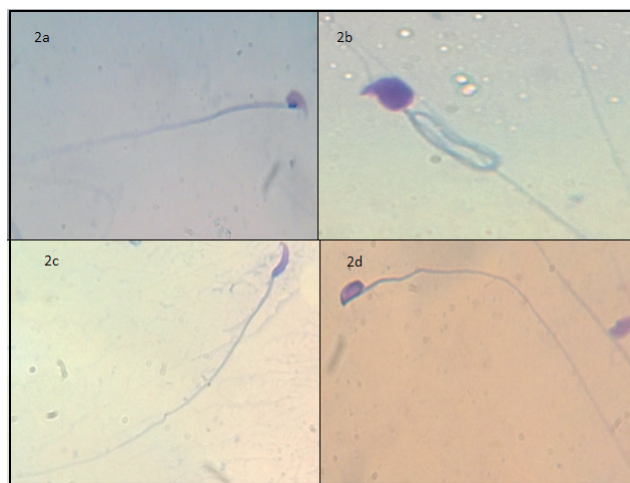


Figura. 2. Morfología espermática del ratón. 2a: Cabeza normal con gancho; 2b: cabeza amorfa; 2c: cabeza en forma de banana; 2d: cabeza sin gancho (sin acrosoma). Aumento 1000X con tinción Dift Quick.

Análisis histopatológico del testículo: En los cortes transversales de los testículos inoculados con *S. epidermidis* se observó: vacuolización del epitelio intratubular con desprendimiento de las células germinales (Figura 3b), megalocitosis y en el intersticio se observó leve hipertrofia de las células de Leydig. Un detalle importante observado en las células germinales es la presencia de células anucleadas (Figura 3d), que puede explicar la presencia de estas células en mayor proporción que los leucocitos, generando aumento en el número de las células redondas como ha sido reportado [27]. La figura 3a representa un corte transversal del grupo control.

Los hallazgos demostraron un impacto negativo de *S. epi-*

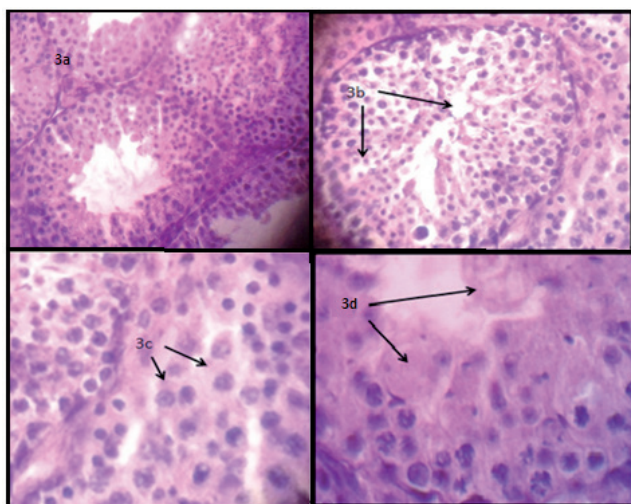


Figura 3. Cortes transversales de testículo de ratón inoculado con *S. epidermidis* y control. 3a: Tejido testicular normal 100X; 3b: vacuolización epitelial 100X; 3c: hipertrofia de las células de Leydig a nivel intersticial 400X y 3d: Las flechas señalan células grandes anucleadas que son desprendidas en el epitelio 400X. Tinción hematoxilina-eosina.

dermidis en la arquitectura testicular, lo que destaca el papel de este comensal sobre el tracto genitourinario masculino [9,10]. La sobreproducción de ERO podría explicar el daño oxidativo en las células espermáticas, pérdida nuclear, megalocitosis y liberación de células redondas asociados al estrés oxidativo [32]. Se ha propuesto una asociación entre morfología anormal de los espermatozoides y el exceso de ERO en el semen humano, ayudando a comprender la compleja relación biológica entre la teratozoospermia y el estrés oxidativo. La presencia de células redondas diferentes a los leucocitos podrían ser indicadores de una infección seminal subyacente [27,33]. La detección de SCN en muestras seminales durante los procesos de reproducción asistida, destaca la importancia de las medidas terapéuticas y de asepsia preventiva que se deben tomar en estos casos, tanto en la manipulación del semen como en la extracción de espermatozoides testiculares o epididimarios [15]. Este tipo de estudio debe ser ampliado, bien sea estandarizando una técnica de medición de los productos de estrés oxidativo, o demostrando si los efectos negativos de estas especies pueden revertir el daño espermático.

Conclusión

El estudio de infección de *S. epidermidis*, como representante del grupo de SCN en el testículo del ratón, demostró el impacto negativo de estas especies microbianas en las formas espermáticas, en la alta celularidad seminal y, probablemente, en la fertilidad. La elevada concentración de estos microorganismos en el semen humano debe ser conscientemente analizada y tratada, ya que la mayor causa de infertilidad masculina es idiopática.

Referencias

1. Esfandiari N, Saleh RA, Abdoos M, Rouzrokh A,

- Nazemian Z. Positive bacterial culture of semen from infertile men with asymptomatic leukocytospermia. *Int J Fertil Womens Med.* 2002; 47:265-70.
2. Solomon M, Henkel R. Semen culture and the assessment of genitourinary tract infections. *Indian J Urol.* 2017; 33:188-93.
3. Lozano-Hernández R, Vivas-Acevedo G, Muñoz de Vera MG. Mycoplasmas and antibodies anti-*Chlamydia* in semen of infertile men and their relationship with seminal quality and markers of male accessory sex glands. *Invest Clin.* 2012; 53:138-47.
4. Enwuru CA, Iwalokuna B, Enwurub VN, Ezechi O, Oluwadun A. The effect of presence of facultative bacteria species on semen and sperm quality of men seeking fertility care. *Afr J Urol.* 2016; 22:213-22.
5. Vilvanathan S, Kandasamy B, Jayachandran AL, Sathiyarayanan S, Tanjore Singaravelu V, Krishnamurthy V, Elangovan V. Bacteriospermia and its impact on basic semen parameters among infertile men. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2016; 2016:2614692. doi:10.1155/2016/2614692.
6. Puerta J, Giraldo M. Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2014; 79:209-17.
7. von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2:677-85.
8. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27:870-926.
9. Cogen AL, Nizet V, Gallo R. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol.* 2008; 158:442-55.
10. Murdoch DA. Gram-positive anaerobic cocci. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:81-120.
11. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2014; 1106:17-31. doi: 10.1007/978-1-62703-736-5_2.
12. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis.* 1994; 19:231-43.
13. Novick RP, Muir TW. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 1999; 2:40-5.
14. Galarzo S, Cano MA, Puerta J, Giraldo M, Mayorga J, Cadavid A, Maya W. Efecto de los factores solubles de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus epidermidis* sobre la funcionalidad espermática. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2015; 80:316-23.
15. Leterrier M, Fréour T, Guillouzeuic A, Juvin ME, Barriere P, Reynaud A, Corvec S. Semen cultures analysis: retrospective study during a 6-year period and interest in the management of infertility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011; 30:401-6. doi: 10.1007/s10096-010-1100-2.
16. David G. Baker. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 231-66.

17. Sanui H, Yoshida S, Himeno K, Nomoto K. Delayed hypersensitivity to syngeneic testicular cells induced by intratesticular bacterial infection in guinea-pigs. *Immunology*. 1982; 46:635-42.
18. Nagaosa K, Nakashima C, Kishimoto A, Nakanishi Y. Immune response to bacteria in seminiferous epithelium. *Reproduction*. 2009; 137:879-88.
19. Universidad de Los Andes. Bioterio. Comisión de Bioética. Aplicación para solicitar el aval por la comisión de bioética protocolos de investigación y docencia que involucran animales de laboratorio. Disponible en: <https://www.google.co.ve/search?q=c%C3%A1culo+del+n%C3%BAmero+de+animales+para+proyecto+de+investigaci%C3%B3n&aq=c%C3%A1culo+del+n%C3%BAmero+de+animales+para+proyecto+de+investigaci%C3%B3n+&aqs=chrome..69i57.26924j0j8&sourceid=chrome&ie=UTF-8#q=c%C3%B3digo+de+bio%C3%A9tica+animales+de+laboratorio+ULA>.
20. Rojo A. Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias. *Animales de Laboratorio*. Verano 2014. Disponible en: http://www.uib.cat/digitalAssets/303/303729_2014_animaleslaboratorio_num62_31_33.pdf.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. Supplement M100. Wayne PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
22. Álvarez Gómez De Segura I. Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. Departamento de Cirugía Experimental. Hospital Universitario La Paz, Madrid. Disponible en: <https://www.unrc.edu.ar/unrc/coedi/docs/guia-anestesia-eutanasia.pdf>.
23. Gallegos de Lerma G. Estudio morfológico de las alteraciones producidas por el etilmetanosulfonato, en células espermatogénicas de ratón. 1984. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/7353/1/1020127848.PDF>. Consultado 04 Septiembre 2015.
24. Domínguez-Odio A, Puente-Zapata E, Pérez-Andrés IY, Salas-Pérez H. *Solanum torvum*. Toxicidad sobre microorganismos y células espermáticas. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2012; 50: 363-70.
25. Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini V, Collodel G. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet*. 2009; 26:47-56. doi: 10.1007/s10815-008-9283-5.
26. Lozano-Hernández R, Velasco J, Rodríguez M. Impact of coagulase-negative staphylococci and other germs on sperm forms. *Int J Med Res Health Sci*. 2017; 6:92-7.
27. Ko EY, Sabanegh ES Jr, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril*. 2014; 102:1518-27. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.020.
28. Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Du Plessis SS, Gopalan B, Willard B *et al*. Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress. *Reprod Endocrinol*. 2013; 11:85. doi:10.1186/1477-7827-11-85.
29. Niederberger C. Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a review. *J Urol*. 2012; 188:2320.
30. Cakiroglu B, Eyyupoglu SE, Gozukucuk R, Uyanik BS. Ubiquinol Effect on sperm parameters in subfertile men who have astheno-teratozoospermia with normal sperm concentration. *Nephrourol Mon*. 2014; 6:e16870. doi:10.5812/numonthly.16870.
31. Agarwal A, Tvrda E, Sharma R. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. *Reprod Biolog Endocrin*. 2014; 12:45. doi:10.1186/1477-7827-12-45.
32. Iommiello VM, Albani E1, Di Rosa A, Marras A, Menduni F, Morreale G, Levi SL, Pisano B, Levi-Setti PE. Ejaculate oxidative stress is related with sperm DNA fragmentation and round cells. *Int J Endocrinol*. 2015; 2015:321901. doi: 10.1155/2015/321901.