

# ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL MOVIMIENTO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS APLICANDO UN PROGRAMA DE USO LIBRE, ESTUDIO-PILOTO

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF HUMAN SPERM MOTILITY USING OPEN SOURCE SOFTWARE, A PILOT-STUDY

Walter Cardona Maya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bacteriólogo y Laboratorista Clínico, Ph.D. Grupo Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Calle 52 # 61-30, Laboratorio 534. Teléfono: 57 4 2196476, e-mail: wdcmaya@medicina.udea.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 16(2): 313-317, Julio-Diciembre, 2013

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la movilidad espermática humana, mediante el programa Image J, usando el complemento Manual Tracking. Se realizó un estudio piloto, con el fin de determinar el desplazamiento espermática en seis muestras de semen, a través del sistema propuesto y el análisis convencional manual, ejecutado por un técnico experto. El análisis, mediante el software libre, cuantifica el desplazamiento de los espermatozoides, con resultados similares a los obtenidos por el análisis convencional. Adicionalmente, permite cuantificar la velocidad espermática promedio, la velocidad espermática lineal hacia delante y la linealidad media que, por medio del análisis cualitativo, no es posible. Esta es una primera aproximación para la evaluación cuantitativa de la movilidad espermática, aplicando un programa de uso libre, el cual, permitirá, en el futuro, desarrollar un sistema de análisis cuantitativo para la movilidad espermática, generando mayor información para un mejor análisis clínico.

Palabras clave: Análisis seminal, espermatozoides, fertilidad, movilidad.

### SUMMARY

The aim of this study was to evaluate human sperm motility using the Image J program and the Manual Tracking plugin. A pilot study in order to assess motility in six semen samples by the proposed system and conventional analysis was performed. The results using the Image J software to quantify the movement of sperm are similar to the results obtained by conventional analysis by an expert technician. Furthermore, using the software it was possible to calculate curvilinear velocity, straight-line velocity and linearity. This is a first approach to the quantitative assessment of sperm motility with an open source software which will allow in the future

to develop a quantitative analysis system for sperm motility, generating more information for better clinical analysis.

Key words: Fertility, motility, semen analysis, sperm.

### INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides fueron observadas por primera vez hace casi 350 años y son células altamente especializadas, que cumplen funciones celulares, como morfogénesis, migración e interacción celular. Cada día, más artículos son publicados acerca de estas células (Cardona Maya, 2011), intentando determinar, entre otros parámetros, la calidad y el tipo de desplazamiento.

El análisis seminal es, hasta la fecha, la única prueba de laboratorio que permite valorar la capacidad fértil de un hombre (De los Ríos *et al.* 2004) y, para ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publica, periódicamente, el Manual para el Análisis Seminal Humano (Cardona Maya, 2010; WHO, 1999; 2010), para poder estandarizar esta evaluación; sin embargo, la evaluación de los parámetros seminales y, en especial la movilidad espermática, sigue siendo un procedimiento realizado manualmente por parte de un experto, a pesar de la inclusión de los sistemas automáticos para el análisis seminal, asistido por computador CASA, en 1985 (Lu *et al.* 2013), los cuales, ofrecen alta precisión en el análisis de los parámetros espermáticos, repetitividad en las determinación de las variables y mayor rapidez en los análisis, pero con alto costo (Pascual-Gaspar *et al.* 2008; Soler *et al.* 2003).

Los sistemas computarizados surgieron, como una propuesta, para realizar una evaluación cuantitativa de los parámetros seminales (Roa Guerrero *et al.* 2012). A pesar de

la importancia y las ventajas de la medición de los parámetros seminales cuantitativos (Munuce *et al.* 2006), continúa siendo realizada de forma manual. En el caso particular de la movilidad espermática, según los criterios establecidos por la OMS (WHO, 1999; 2010), el técnico experto lleva a cabo una inspección visual de al menos 200 espermatozoides en diferentes campos visuales, de la imagen microscópica (WHO, 1999; 2010).

Si bien, el grupo del profesor Ozcan (Su *et al.* 2012; Cardona-Maya, 2013), recientemente publicó un impresionante estudio, en el cual, se evaluó la movilidad espermática en tres dimensiones, realizar el análisis de la movilidad espermática de manera cuantitativa, usando un programa informático de uso libre y, por lo tanto, muy económica, debido a que se obtendrán resultados mas precisos sobre el desplazamiento de los espermatozoides.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la movilidad espermática humana, mediante el programa Image J, usando el complemento Manual Tracking.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Image J y plugin Manual Tacking:** El programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) es de descarga libre. El complemento usado fue desarrollado por el profesor Fabrice P. Cordelières (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/track/track.html>) el cual es usa para determinar el desplazamiento celular aunque es la primera vez que se aplica para valorar la movilidad espermática.

**Muestras de semen:** Se evaluaron seis muestras seminales de cuatro voluntarios sanos. Dos de las muestras fueron recuperadas, mediante un gradiente de centrifugación, con el fin de obtener los espermatozoides con mayor movilidad, siguiendo los protocolos previamente estandarizados en el grupo (Cardona-Maya *et al.* 2009; 2011). Las movilidades para cada muestra fueron evaluadas, usando el procedimiento propuesto por la OMS, por un técnico entrenado (WHO, 1999; 2010).

**Adquisición de imágenes:** Para la captura del video, se dispuso de un microscopio de luz (Eclipse-Nikon), con objetivo de 40x y un ocular de 10x, para un aumento final de 400 veces; la cámara digital Nikon digital sight DS-Fi1 fue empleada para la adquisición de seis videos, de dos segundos, para cada muestra. Para llevar a cabo la validación de la distancia, se utilizaron las dimensiones de una cámara de Makler y las cuadrículas estandarizadas, evaluando la distancia entre dos vértices, la cual, es igual a 100mm (Cardona-Maya *et al.* 2008).

**Procesamiento de los videos:** Los videos fueron cargados en el software libre Image J (File/Open); posteriormente, se crearon las cuadrículas (Plugin/Analyze/Grid) y, en área por punto, se cambia por -6000-, para que queden los 12 cuadros.

**Aleatorización:** Con el fin de realizar un análisis aleatorio de los campos que se pretenden analizar, 6 de los 12 campos fueron seleccionados, usando la función de aleatorizar en Excell, Office® (= ALEATORIO.ENTRE (1,12)), en el que se seleccionaron 9 campos, por si alguno de los primeros se repetía. En este caso en particular, el orden de los campos fue 1, 5, 10, 11, 2, 8 y los opcionales fueron 6, 4 y 9.

Después de realizar el análisis, anteriormente descrito para cada célula, se determinó: la velocidad espermática promedio (VCL, mm/seg), velocidad espermática lineal hacia delante (VSL, mm/seg) y la linealidad media (LIN: VSL/VCL), usando los cálculos respectivos en Excel, basados en los datos que arroja el programa Image J, con el complemento Manual Tracking, que permite calcular la distancia recorrida de cada espermatozoide, basados en las coordenadas (X y Y) iniciales (i) y finales (f) obtenidas, de la siguiente manera:

$$\sqrt{(Xf-Xi)^2 + (Yf - Yi)^2}$$

**Análisis estadístico:** Se realizó análisis descriptivo de cada una de las variables de movilidad. Con el fin de comparar ambas metodologías, se practicó una prueba de t de Student y una correlación de Pearson, aplicando el software GraphPad Prism 5.0®. Finalmente, la diferencia entre el método manual y el método propuesto, en este estudio, permitió valorar la variabilidad entre los métodos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo, se muestran resultados similares en la valoración de la movilidad espermática, mediante el sistema propuesto y el método de análisis seminal manual, por parte de un técnico experto, siguiendo los lineamientos establecidos por OMS, en su manual de 2010 (WHO, 2010). Se efectuaron comparaciones para cada una de las movilidades en porcentaje (Figura 1), evaluaciones de los tipos de velocidad y linealidades (Figura 2), además de la correlación y el análisis de la razón de los dos métodos usados, para evaluar la movilidad espermática (Figura 3), con resultados similares.

Adicionalmente, como se observa en la figura 2, las muestras de semen recuperada 1 y 2, incrementan los valores de VCL y VSL respecto a la muestra inicial 1 y 2, respectivamente.

En este trabajo, se logró demostrar que es posible evaluar la trayectoria de un espermatozoide humano, utilizando un

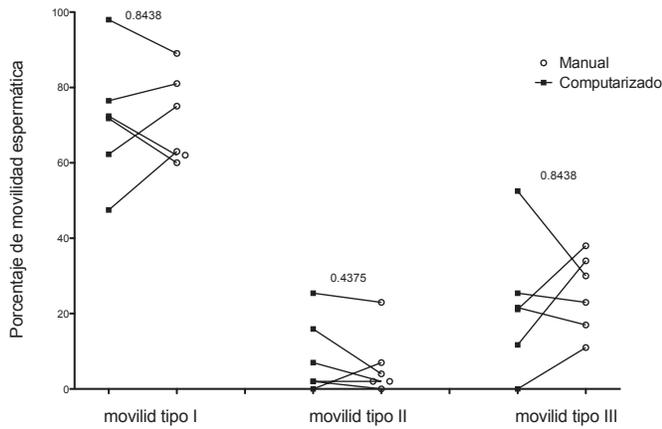


Figura 1. Movilidad espermática en porcentaje, mediante el sistema computarizado (cuadro oscuro) y la metodología manual (círculo abierto), realizada por un técnico experto. No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos. Resultados en porcentaje para cada tipo de movilidad espermática: espermatozoides móviles (movilidad tipo I), espermatozoides móviles no progresivos (movilidad tipo II) y espermatozoides inmóviles (movilidad tipo III), para las 6 muestras de semen analizadas.

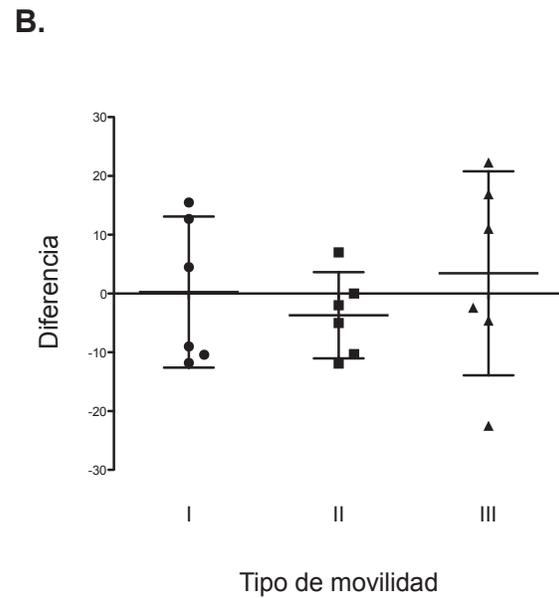
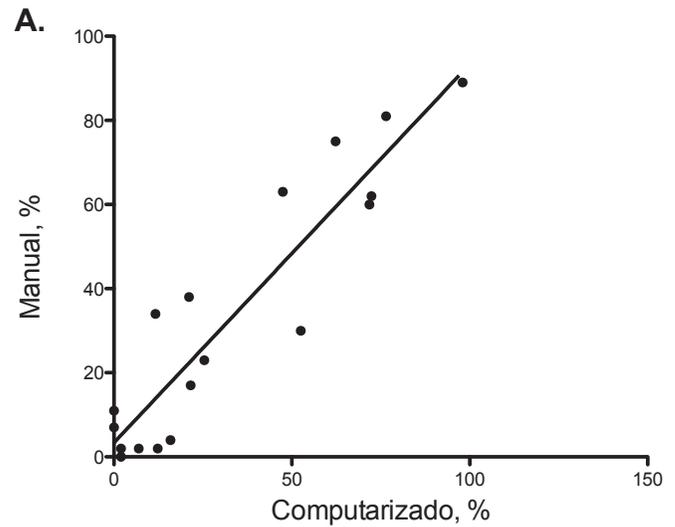


Figura 3. Correlación y análisis de la diferencia de los dos métodos usados para evaluar la movilidad espermática. **A.** Correlación (Pearson 0.924,  $p < 0.0001$ ), entre la evaluación de la movilidad tipo I, II y III, mediante el sistema propuesto y un técnico experto (método manual). **B.** La diferencia entre los métodos manual y computarizado para cada tipo de movilidad: tipo I (círculo oscuro), tipo II (cuadro oscuro) y tipo III (triángulo oscuro), una media e intervalo de confianza, al 95% de 0,99 (0,8-1,2), 2,93 (-0,1-5,97), y 0,84 (0,16-1,52), respectivamente.

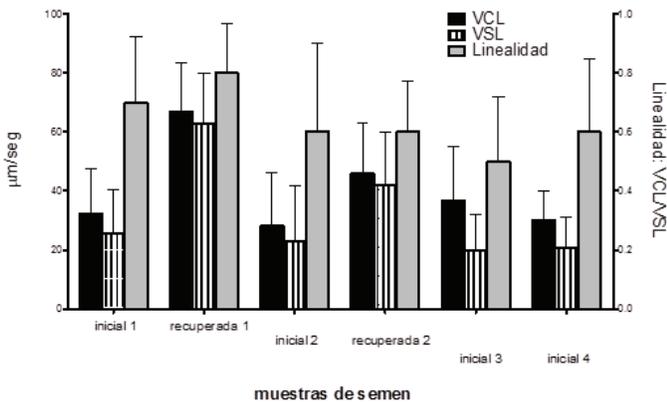


Figura 2. Velocidad movilidad tipo I. Velocidad espermática promedio (VCL), velocidad espermática lineal hacia delante (VSL) y linealidad media (LIN) de los espermatozoides en la muestra inicial, de las 4 muestras y en la seleccionada –espermatozoides móviles– de las dos primeras. La desviación evidencia la variabilidad en la muestra.

microscópico de luz y un programa informático de uso libre. Adicionalmente, el incremento de VCL y VSL en las muestras recuperadas era de esperar, debido a que los procedimientos de selección espermática permiten mejorar la calidad seminal (Figura 2).

Desde comienzos de 1940, algunos académicos han reportado la necesidad de datos objetivos, con pocos sesgos de la movilidad de los espermatozoides (Amann & Katz, 2004). Los sistemas CASA ofrecen múltiples ventajas a la hora de realizar la evaluación de la movilidad, la viabilidad y la morfología espermática (Lu *et al.* 2013); sin embargo, su distribución en países en vía de desarrollo, como Colombia, son pocos los centros que pueden tener el equipo y el personal entrenado para manejarlo, por lo tanto, utilizar aproximaciones metodológicas, como la planteada en este artículo, toman gran importancia a la hora de cuantificar la movilidad espermática.

De manera similar a lo que ocurre usando el sistema CASA (Lu *et al.* 2013), aplicando la metodología propuesta en este artículo, se puede evaluar el efecto de sustancias tóxicas sobre los espermatozoides, la relación de los parámetros con los procesos de fertilización *in vitro*, el efecto de algunas moléculas sobre la capacitación espermática y el efecto de la congelación sobre la movilidad espermática.

En conclusión, esta es la primera aproximación, en Colombia, que permite evaluar la posibilidad para realizar un análisis de la movilidad espermática, sin necesidad de adquirir un sistema CASA. En el futuro cercano, se desea poder aplicar esta misma aproximación, pero usando una captura de cada espermatozoide automatizada.

**Agradecimientos:** A la Estrategia de Sostenibilidad 2013/2014 de la Universidad de Antioquia. **Conflicto de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado por el autor, quien declara que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AMANN, R.P.; KATZ, D.F. 2004. Andrology Lab Corner: Reflections on CASA after 25 Years. *J. Andrology*. 25(3):317-325.
2. CARDONA MAYA, W. 2010. Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud-2010. *Actas Urol. Esp.* 34(7):577-578.
3. CARDONA MAYA, W. 2011. Letter to Editor: Publications about Sperm during the Years 1897 to 2010. *J. Reprod. Infert.* 12(1):43-43.
4. CARDONA-MAYA, W. 2013. Words of wisdom: re: high-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *Eur. Urol.* 63(4):768-769.
5. CARDONA-MAYA, W.; BERDUGO, J.; CADAVID, A. 2008. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urol. Esp.* 32(4):443-445.
6. CARDONA-MAYA, W.; VELILLA, P.; MONTOYA, C.J.; CADAVID, A.; RUGELES, M.T. 2009. Presence of HIV-1 DNA in spermatozoa from HIV-positive patients: changes in the semen parameters. *Curr. HIV Res.* 7:418-424.
7. CARDONA-MAYA, W.; VELILLA, P.A.; MONTOYA, C.J.; CADAVID, A.; RUGELES, M.T. 2011. In vitro human immunodeficiency virus and sperm cell interaction mediated by the mannose receptor. *J. Reprod. Immunol.* 92(1-2):1-7.
8. DE LOS RÍOS, J.; CARDONA, W.D.; BERDUGO, J.A.; CORREA, C.; ARENAS, A.; OLIVERA-ANGEL, M.; PENA, R.B.; CADAVID, A.P. 2004. Los valores espermáticos de 113 individuos con fertilidad reciente no mostraron correlación con los parámetros establecidos por la OMS. *Arch. Esp. Urol.* 57(2):147-152.
9. LI, J.C.; HUANG, Y.F.; LI, N.Q. 2013. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrología* (en impresión).
10. MUNICE, M.J.; CARDONA-MAYA, W.; BERTA, C.L. 2006. ¿Existe asociación entre la morfología normal del espermatozoide y su cinética de desplazamiento? *Actas Urol. Esp.* 30(6):591-597.
11. PASCUAL-GASPAR, J.; OLMEDO, H.; EXPOSITO, A.; EXPOSITO, A.; FINAT, J. 2008. A simple and effective system for Computer-Assisted Semen Analysis. *IET*, p.1-4.
12. ROA GUERRERO, E.; CORTES MANCERA, F.; GUERRERO GONZÁLEZ, N.; CARDONA MAYA, W.; MORANTES GUZMÁN, L. 2012. Evaluación asistida por computador de la viabilidad espermática en humanos. *Rev. Ing. Bioméd.* 6(12):17-28.
13. SOLER, C.; DE MONSERRAT, J.; GUTIÉRREZ, R.; NÚÑEZ, J.; NÚÑEZ, M.; SANCHO, M.; PÉREZ SÁNCHEZ, F.; COOPER, T. 2003. Use of the Sperm Class Analyser® for objective assessment of human sperm morphology. *Int. J. Androl.* 26(5):262-270.

14. SU, T.W.; XUE, L.; OZCAN, A. 2012. High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. Proc. Natl Acad. Sci. United States of America. 109(40):16018-16022.
15. WHO. 1999. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge: University Press Cambridge. 271p.
16. WHO. 2010. Laboratory manual for the examination and processing of human semen, World Health Organization. 5<sup>th</sup> ed. Geneva. 128p.

Recibido: Mayo 28 de 2013

Aceptado: Septiembre 18 de 2013

Como citar:

Cardona Maya, W. 2013. Análisis cuantitativo del movimiento de espermatozoides humanos aplicando un programa de uso libre, estudio-piloto. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 16(2): 313-317.