

MOVILITAT ESPERMATICA I DOSIFICACIO  
D' ADENOSIN TRIFOSFAT

Miquel Pardo i Nuria Bancells

LABORATORI J. SABATER-TOBELLA,

Institut Dexeus

Barcelona

ABSTRACT:

Espermatozoa Motility and Adenosine Triphosphate.

The purpose of this work is to analyze the diferents parameters in relation to the spermatic motility, of a sample of males treated for infertility. This was done by means of a built in automatic images analyzer (HAMILTON THORN MOTILITY ANALIZER). A total of 103 ejaculates, corresponding to the same amount of males, are analized. The sample was divided into two subpopulations varying in accordance the Adenosine triphosphate (ATP) concentrations, as follows: A) ejaculates with ATP concentrations >6000 ng/ml. B) ejaculates with ATP concentrations <6000 ng/ml. WE have taken into consideration the fact that 80% of fertile males and 10% of non fertile males of a similar population had a ATP concentration >6000 ng/ml. Statistical analysis of the the results show significant diferences between the two subpopulations.

KEY WORDS: Sperm motility, computer assisted sperm analysis, adenosine triphosphate.

## INTRODUCCIO;

L' anàlisi d' imatges aplicat a l' estudi de la movilitat espermàtica.

Una de les peculiaritats d' aquest treball és l' aplicació de l' anàlisi d' imatges a la quantificació de la movilitat espermàtica.

L' anàlisi d' imatges permet quantificar diferents paràmetres com: nombre, mida, forma, posició i densitat òptica de les parts identificables d' una imatge. Permet també mitjançant un sistema digitalitzat, fer després de la quantificació, una classificació dels objectes identificats. HAMILTON THORN MOTILITY ANALYZER, utilitza una combinació de diferents components que, de manera automàtica permeten determinar la concentració i movilitat espermàtica. El sistema òptic d' adquisició d' imatges el componen una font de llum infrarroig i una càmera de video. El sistema de il·luminació és per camp fosc de manera que els espermatozoides apareixen en el monitor com objectes brillants en un camp fosc. El llum emès per la mostra es recullit per un sistema de lens i enfocada a un detector d' imatges (video). La imatge electrònica es transmesa al sistema de processament de dades per a la seva anàlisi.

## Adquisició i processament de les imatges.

L'anàlisi de les imatges comença amb l'adquisició d'una sèrie d'imatges successives en espais constants de temps. Els senyals anàlogues produïts per la càmera, són transmesos al processador d'imatges a on són digitalitzats (convertits en pixels) i guardats en la memòria de l'ordinador per al seu posterior anàlisi. El pas següent es retirar tots els artefactes de la imatge a analitzar. Es localitzen i separen les imatges mòbils i les inmòbils i s'eliminen tots aquells objectes que són més petits en imatge i contrast que els mínims especificats per l'operador. És necessari diferenciar entre els espermatozoides inmòbils de tots els detritus, leucòcits, hematies i cèl·lules d'espermatogènesi que poden haver-hi en l'esperma.

El sistema integrat analitza tots els objectes que es mouen i calcula la mitjana de la mida de l'intensitat òptica, obtenint així els factors discriminants. Aquests valors són diferents per a cada espècie.

### Paràmetres de la movilitat espermàtica (figure 1)

La VELOCITAT LINIAL (path velocity) dels espermatozoides es computada individualment a partir del trajecte recorregut (micres) i dels temps (segons) que ha passat entre imatges successives.

VELOCITAT RECTILINIA (progressive velocity) és la distància en línia recta entre la primera i la darrera imatge, dividida per el temps transcurregut (micres/seg.)

Abstracció i processament de les imatges. INTRODUCCIÓ

L' anàlisi de les imatges comença amb l' abstracció d' una sèrie d' imatges successives de la mateixa imatge original. Al cap d' un cert nombre d' imatges s' obté una imatge única que representa la suma de totes les imatges originals. Aquesta imatge única és la que s' analitza i es troben les línies que hi ha. Les línies així trobades són les que s' analitzen i es troben els punts que les formen. Els punts així trobats són els que s' analitzen i es troben les velocitats que hi ha. Les velocitats així trobades són les que s' analitzen i es troben l' índex de linialitat.

VELOCITAT ESPERMATICA

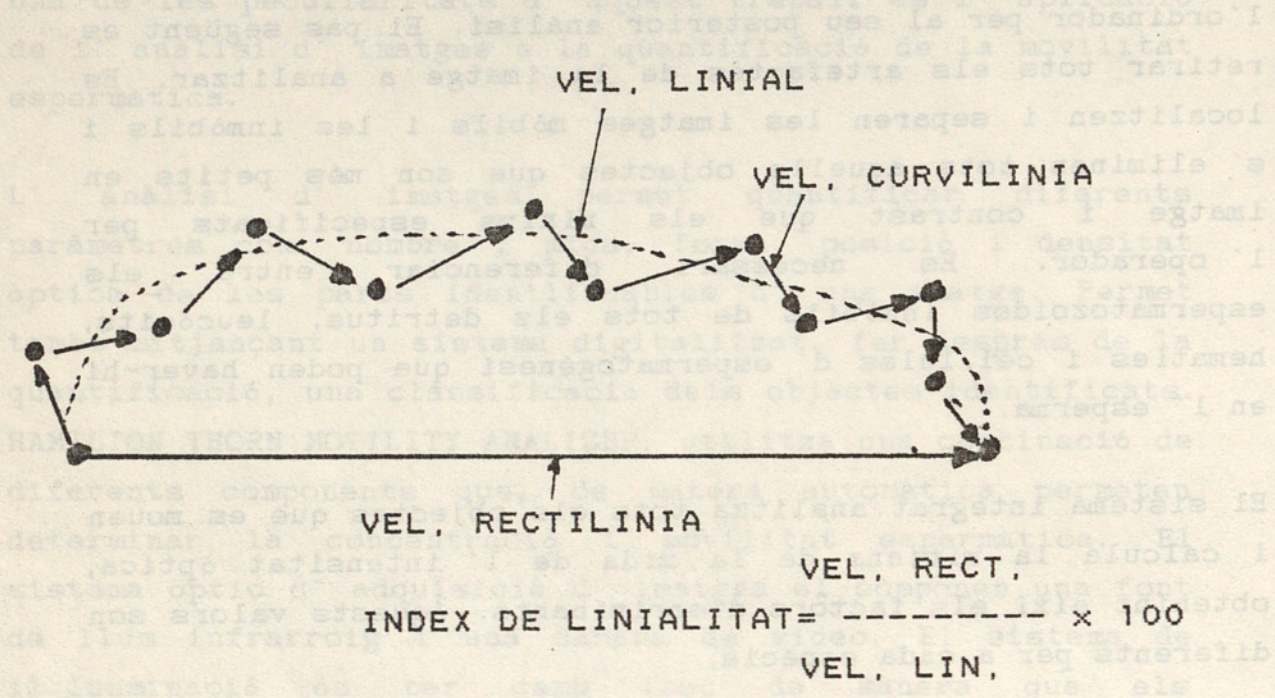


Figure 1.

La velocitat linial (per velocitat) és la velocitat que té el cap de la espermatozoide en el moment de la seva moviment. La velocitat curvilinia és la velocitat que té el cap de la espermatozoide en el moment de la seva moviment. La velocitat rectilinia és la velocitat que té el cap de la espermatozoide en el moment de la seva moviment. La velocitat recta és la velocitat que té el cap de la espermatozoide en el moment de la seva moviment. L' índex de linialitat és el cocient de la velocitat recta i la velocitat linial multiplicat per 100.

VELOCITAT RECTILINIA (progressive velocity) és la distància en línia recta entre la primera i la darrera imatge dividida per el temps transcorregut (minuts:seg.).

INDEX DE LINIALITAT és el cocient entre la velocitat rectilínea i la linial expressat en percentatge.

VELOCITAT CURVILINIA (track speed) es calcula sumant la distància total recorreguda per el cap de l' espermatzoide durant el procés d' adquisició d' imatges dividit per el temps.

DESPLAÇAMENT LATERAL DEL CAP (lateral head displacement. LHD). Medeix l' amplitud en micres- del mobiment sinusoidal espermàtic, calculat a partir del trajecte curvilíni linial que segueix l' espermatzoide.

## MATERIAL I METODES

Un total de 103 ejaculats - corresponets a igual nombre de varons- varen ser analitzats com a part de l' estudi d' infertilitat de la parella.

Anys d' infertilitat:  $3,85 \pm 1,62$  (mitjana  $\pm$  desviació estandar)

Mitjana de l' edat dels pacients:  $31,34 \pm 4,45$  anys

La concentració i movilitat espermàtica es varen analitzar a  $36,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  amb un analitzador d' imatges HTMA (HAMILTON THORN MOTILITY ANALIZER).

La concentració d' ATP (adenosin trifosfat) es va determinar per bioluminiscència, segons tècnica descrita ( Pardo, 1988) (Gotlieb et al, 1987) (Comhaire et al., 1983).

## RESULTATS

G: població total (n=103 ejaculats)

A: subpoblació amb concentració d' ATP >6000 ng/ml (n=41 ejaculats)

B: subpoblació amb concentració d' ATP <6000 ng/ml (n=62 ejaculats)

Anàlisi estadístic dels valors obtinguts (t student):

### VOLUM (ml)

població	G	A	B
màxim	9,8	7,20	9,90
mínim	1,0	1,0	1,0
mitjana	3,5	3,23	3,69 NS
desv. est.	1,66	1,37	1,82

### CONCENTRACIO D' ESPERMATOZOIDES (milions/ml)

població	G	A	B
màxim	278	270	278
mínim	10	33	10
mitjana	93,57	134,0	66,8 p<0,000
desv. est.	60,83	54,5	49,0

-----

ESPERMATOZOIDES AMB VELOCITAT LINIAL >30 micres/seg  
(%)

població	G	A	B	
màxim	84	84	62	
mínim	0	11	0	
mitjana	27,58	39,63	19,61	p<0,0000
desv. est.	18,40	17,85	13,97	

-----

-----

ESPERMATOZOIDES AMB VELOCITAT LINIAL <30 mic/seg. i  
>10 mic/seg. (%)

població	G	A	B	
màxim	38	38	26	
mínim	0	0	0	
mitjana	12,26	15,46	10,14	p<0,0004
desv. est.	7,60	8,18	6,42	

-----

-----

ESPERMATOZOIDES AMB VELOCITAT LINIAL <10  
mic/seg. (%)

població	G	A	B	
màxim	39	39	34	
mínim	0	0	0	
mitjana	14,52	15,46	10,14	dif. NS
desv. est.	9,36	10,22	8,77	

-----

---

 ESPERMATOZOIDES INMOBILS (%)

població	G	A	B	
màxim	97	66	97	
mínim	8	8	10	
mitjana	45,69	29,78	56,22	p<0,0000
desv. est.	23,81	14,03	23,15	

---



---

 CONCENTRACIO D' ESPERMATOZOIDES AMB VELOCITAT  
 LINIAL >10 mic/seg. (milions/ml)

població	G	A	B	
màxim	90	90	77	
mínim	2	23	2	
mitjana	40,19	55,07	30,35	p<0,0000
desv. est.	20,91	15,73	17,94	

---



---

 MITJANA DE LA VELOCITAT LINIAL (mic./seg)

població	G	A	B	
màxim	81	72	81	
mínim	8	8	26	
mitjana	43	46,41	40,75	p<0,018
desv. est.	11,95	11,77	11,62	

---



---



---

 MITJANA DE LA VELOCITAT RECTILINIA (mic./seg.)

població	G	A	B	
màxim	80	71	80	
mínim	21	22	21	
mitjana	39,40	42,56	37,32	p<0,0273
desv. est.	11,84	12,10	11,28	

---



---



---

 MITJANA DE L' ÍNDEX DE LINIALITAT (%)

població	G	A	B	
màxim	99	99	99	
mínim	0	68	0	
mitjana	85	86,43	84,88	dif. NS
desv. est.	11,18	6,7	13,34	

---



---



---

 MITJANA DEL DESPLAÇAMENT LATERAL DEL CAP (micres)

població	G	A	B	
màxim	7,0	7,0	5,7	
mínim	0,0	2,8	0	
mitjana	3,9	4,2	3,7	p<0,0187
desv. est.	1,0	0,9	0,9	

---

MITJANA DE LA CONCENTRACIO D' ESPERMATOZOIDES AMB VELOCITAT LINIAL >30 mic/seg. I INDEX DE LINIALITAT >60% (milions/ml),

població	G	A	B	
màxim	141	141	66	
mínim	0	6,4	0	
mitjana	28,71	52,21	13,17	p<0,0000
desv. est.	31,74	35,84	15,01	

MITJANA DE L' ELONGACIO (eix petit/eix gros)

població	G	A	B	
màxim	0,8	0,79	0,81	
mínim	0,5	0,58	0,51	
mitjana	0,7	0,7	0,71	dif. NS
desv. est.	0,04	0,04	0,05	

MITJANA DE L' EIX PETIT (micres)

població	G	A	B	
màxim	9,69	5,3	9,7	
mínim	4,2	4,30	4,39	
mitjana	4,83	4,85	4,82	dif. NS
desv. est.	0,52	0,22	0,66	

---

 MITJANA DE L' EIX GROS (micres)

població	G	A	B
màxim	9,39	8,3	9,4
mínim	5,5	6,3	5,5
mitjana	7,07	7,30	6,92
desv. est.	0,66	0,56	0,69

p < 0,0048

---



---

 CONCENTRACIO D' ADENOSIN TRIFOSFAT (ATP) (ng/ml)

població	G	A	B
màxim	28,181		
mínim	857		
mitjana	6,577		
desv. est.	5,316		

---

Al comparar les dues subpoblacions que resulten de dividir la població global segons la concentració d' ATP sigui superior (població A) o inferior a 8000 ng/ml (població B) s'observa que la mitjana dels valors poblacionals d'alguns paràmetres són clarament diferents. Els paràmetres que presentaven diferències estadísticament significatives entre les dues subpoblacions eren: Concentració total d'espermatocides amb velocitats inicials > 10 micres/mil·lons/ml; percentatge d'espermatocides mòbils i immobils; mitjana de la velocitat inicial i la mitjana del desplaçament lateral del cap.

## DISCUSIO:

Des d'un punt de vista citomorfològic, la qualitat d'un ejaculat ve determinada per la concentració, la movilitat i la morfologia espermàtica. Des d'un punt de vista bioquímic-funcional, la concentració d'adenosin trifosfat indica la massa cel·lular viable de l'ejaculat. La movilitat i la concentració d'ATP estan correlacionades (Pardo, 1988).

La concentració d'ATP permet discriminar entre ejaculats de varons fèrtils i infèrtils (Comhaire et al. 1983). Concentracions >6000 ng/ml pertanyen majoritàriament a varons fèrtils (84%), mentre que un 8% dels ejaculats amb una concentració semblant corresponen a varons inclosos dins d'una població infèrtil (Pardo, 1988). Aquestes dades varen ser obtingudes en una població de 232 varons de característiques semblants a l'estudiada en aquest treball.

Plantejem la hipòtesi de treball de que ejaculats amb concentracions d'ATP altes tenen millors paràmetres espermàtics que ejaculats amb concentracions baixes.

Al comparar les dues subpoblacions que resulten de dividir la població global segons la concentració d'ATP sigui superior (població A) o inferior a 6000 ng/ml (població B), s'observa que la mitjana dels valors poblacionals d'alguns paràmetres eren clarament diferents. Els paràmetres que presentaven diferències estadísticament significatives entre les dues subpoblacions eren: Concentració total d'espermatozoides amb velocitats linials >10 mic/seg. (milions/ml); percentatge d'espermatozoides mòbils i in mòbils; mitjana de la velocitat linial i la mitjana del desplaçament lateral del cap.

L'analitzador d'imatges permet també càlculs morfomètrics del cap espermàtic., medint l'eix petit, l'eix gros i l'àrea del cap dels espermatozoides mòbils. La única diferència és a nivell de l'eix gros: Els espermatozoides mòbils d'ejaculats amb concentracions d'ATP >6.000 ng/ml (població A), tenien una mitjana de 7,3 micres, mentres que la longitud de l'eix gros en la població B era de 6,92 micres ( $p < 0,0048$ ). Això pot estar relacionat amb que els espermatozoides que no tenen o han perdut l'acrosoma (espermatozoides no fecundants) tenien una estructura morfològica diferent, amb un cap més esfèric en comparació amb els espermatozoides que tenen l'acrosoma intacte amb un cap més elipsoidal.

Segons tots els resultats obtinguts es pot concloure que l'aplicació de l'anàlisi d'imatges a l'estudi de l'esperma, serà en un futur no molt llunyà, un element essencial en l'avaluació del poder fecundador de l'esperma humà.

Key words: Antisperm antibodies, Passive Hemagglutination, Tray Agglutination Test, Immunofluorescence Test

## BIBLIOGRAFIA

COMHAIRE F., VERMEULEN L., GHEDIRA K, MAS J, IRVINE S, KALLIPOLITIS G. (1983): Adenosine triphosphate in human semen: a quantitative estimate of fertilizing potential. *Fertil Steril* . 40: 500-504.

GOTLIEB C, SVANBORG K, ENEROTH P, BYGDEMAN M. (1987): Adenosine triphosphate in human semen: a study on conditions for a bioluminescence assay. *Fertil Steril* 47:992-998.

PARDO M. (1988): Aportaciones al estudio biológico de la fertilidad masculina. Tesis Doctoral. UAB . Facultat de Ciències. Depart. Fisiologia i Biologia Cel.lular.

Al comparar les dues subpoblacions que resulten de dividir la població global segons la concentració d'ATP sigui superior (població A) o inferior a 2000 ng/ml (població B), s'observa que la mitjana dels valors poblacionals d'alguns paràmetres són clarament diferents. Els paràmetres que presentaven diferències estadísticament significatives entre les dues subpoblacions eren: Concentració total d'espermatozoides amb velocitats lineals  $>10$  mic/seg. (milions/ml), percentatge d'espermatozoides mòbils i inestables, mitjana de la velocitat lineal i la mitjana del desplaçament lateral del cap.