



## **SISTEMA DIGITAL AUTOMATIZADO PARA ESTANDARIZACIÓN DE ESPERMIOGRAMAS**

Investigaciones para Potenciar el Desarrollo de la Salud en América Latina

Proyecto FONDEF D07|1019

marso 2009- octubre 2011 – 31/36 meses (86%) – 3<sup>ra</sup> presentación



# Introducción

- **Infertilidad** ... problema creciente de salud pública mundial, afecta alrededor del 15% de las parejas (*Program for Appropriate Technology in Health, 2002*). En Chile, ~6000 parejas consultan por infertilidad al año.
- **Espermiograma** ... provee información fundamental para definir la severidad del factor masculino que determina la estrategia del tratamiento clínico de la pareja.

**Existen grandes diferencias entre laboratorios, debido a:**

- subjetividad,
- falta de estandarización,
- falta de controles de calidad,
- falta de entrenamiento profesional.

## EL MERCURIO

[www.emol.com](http://www.emol.com)

Organización Mundial de la Salud la calificó como tal en 2009:  
**Parejas estériles piden que el Estado de Chile reconozca la infertilidad como una enfermedad**

En el país existen 350 mil familias que no pueden acceder a terapias de fertilidad por el elevado costo de los tratamientos.



**Movilización.-** A través de la marcha de "los coches vacíos", decenas de parejas caminaron por el centro de Santiago para sensibilizar a las autoridades acerca del problema de la infertilidad.



# Propuesta CED·AI

Centro de Espermiogramas Digitales Asistidos por Internet, UChile

**Optimizar, estandarizar y validar espermiogramas** en relación a la concentración, movilidad, vitalidad, morfología estricta y fragmentación del ADN de los espermatozoides.

## **Mediante la integración de ...**

- ... **biomarcadores** de funciones espermáticas,
- ... **imágenes microscópicas digitales,**
- ... **herramientas matemáticas** para el análisis de imágenes,
- ... y **telecomunicación** vía Internet,

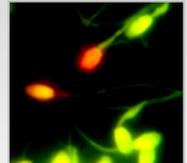
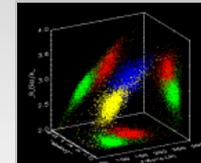
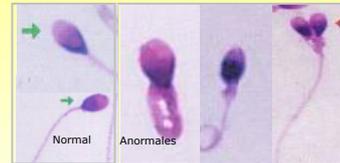
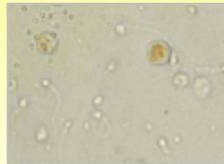
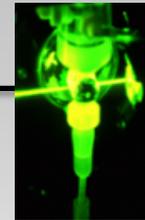


# Espermograma Manual



**Muestras**

**Análisis Visual**



**Concentración  
Movilidad  
Recuento de  
Células  
Redondas**

**Vitalidad**

**Diferenciación  
Células  
Redondas**

**Morfología  
Estricta Kruger**

**Fragmentación  
ADN**

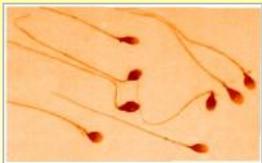


# Espermograma Digital



**Muestras**

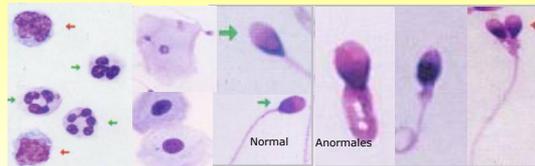
**Análisis Digital vía Internet**



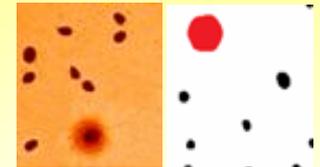
**Concentración  
Movilidad  
Recuento de  
Células  
Redondas**



**Vitalidad**



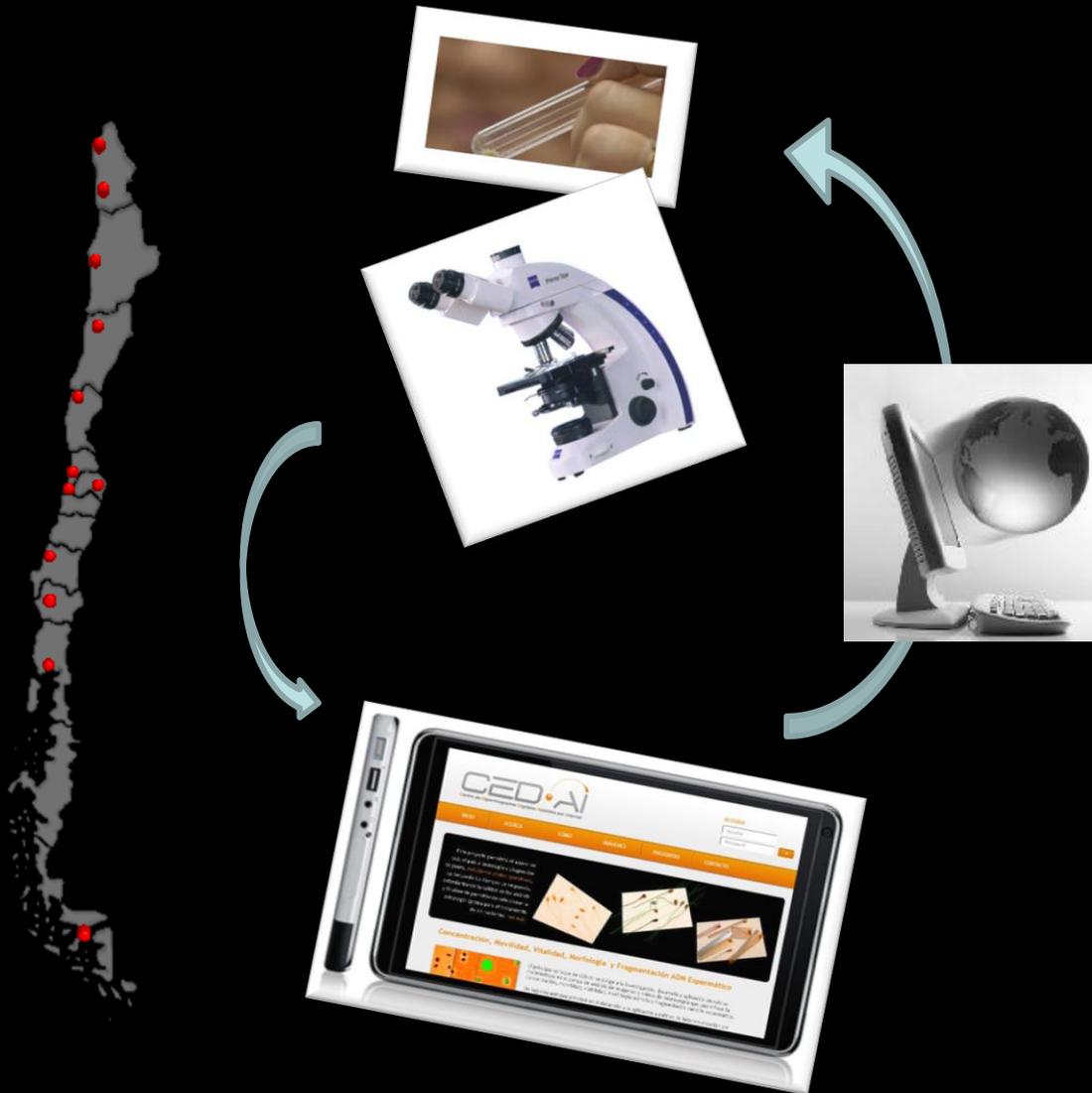
**Morfología Estricta Kruger  
Diferenciación Células  
Redondas**



**Fragmentación  
ADN**

# Solución CED·AI

SAAS Software As A Service, ...

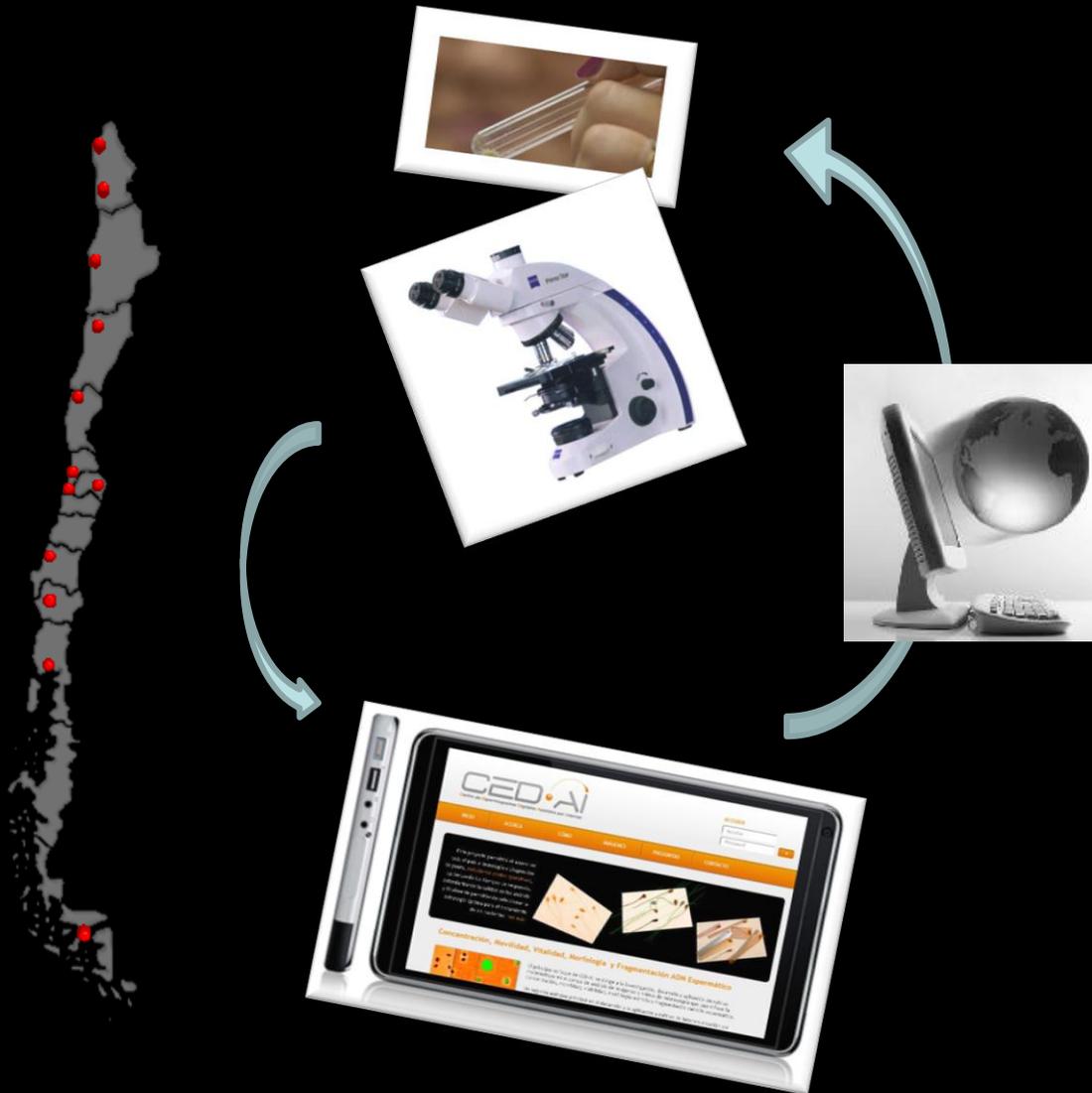


... menor costo  
( 10 MM CLP )

... manejo simple

... soporte y respaldo

... almacenamiento  
en cloud



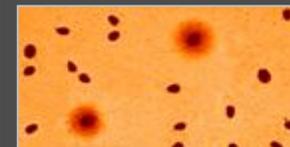
**Concentración  
Movilidad  
Células  
Redondas**



**Vitalidad**



**Fragmentación  
ADN**





Muestras



Manual | Expertos

Digital | ED·AI

Luis Sarabia (U-Chile)  
Marcia Madariaga (IDIMI)  
Adolfo Acosta (Clínica Las Condes)

Espermigramas  
Asistidos por Internet  
(CED·AI, U-Chile)



---

Movilidad (OMS 2010)  
Grupos: Progresivo  
No progresivo  
Inmóvil

Concentración  
millones/ml  
Recuento de  
células redondas  
millones/ml

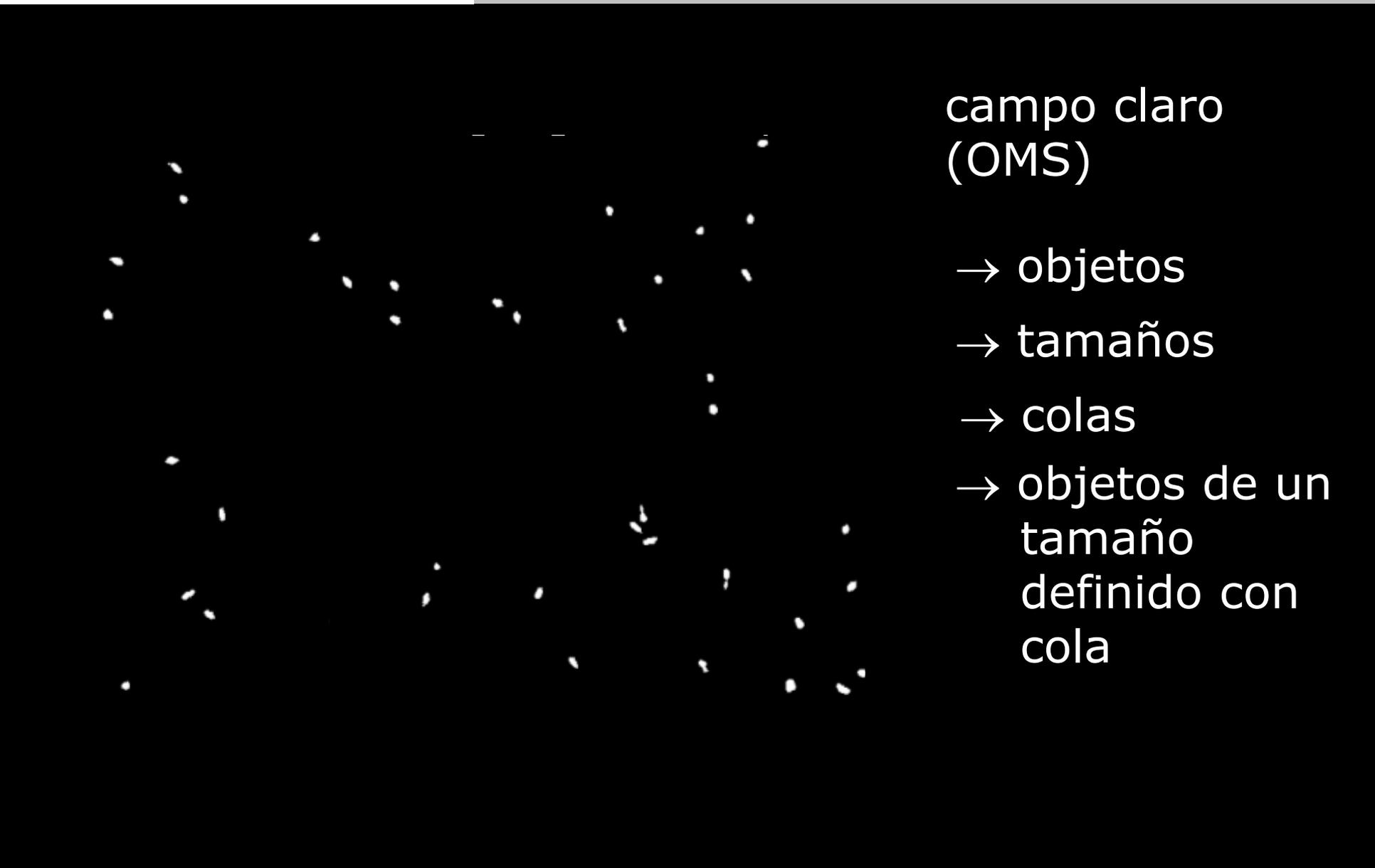
Vitalidad  
% en base de  
>400 espermios

Fragmentación ADN  
% en base de  
>400 espermios

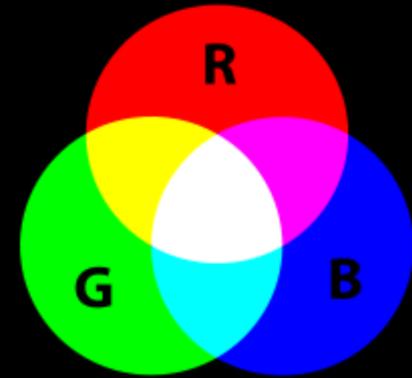
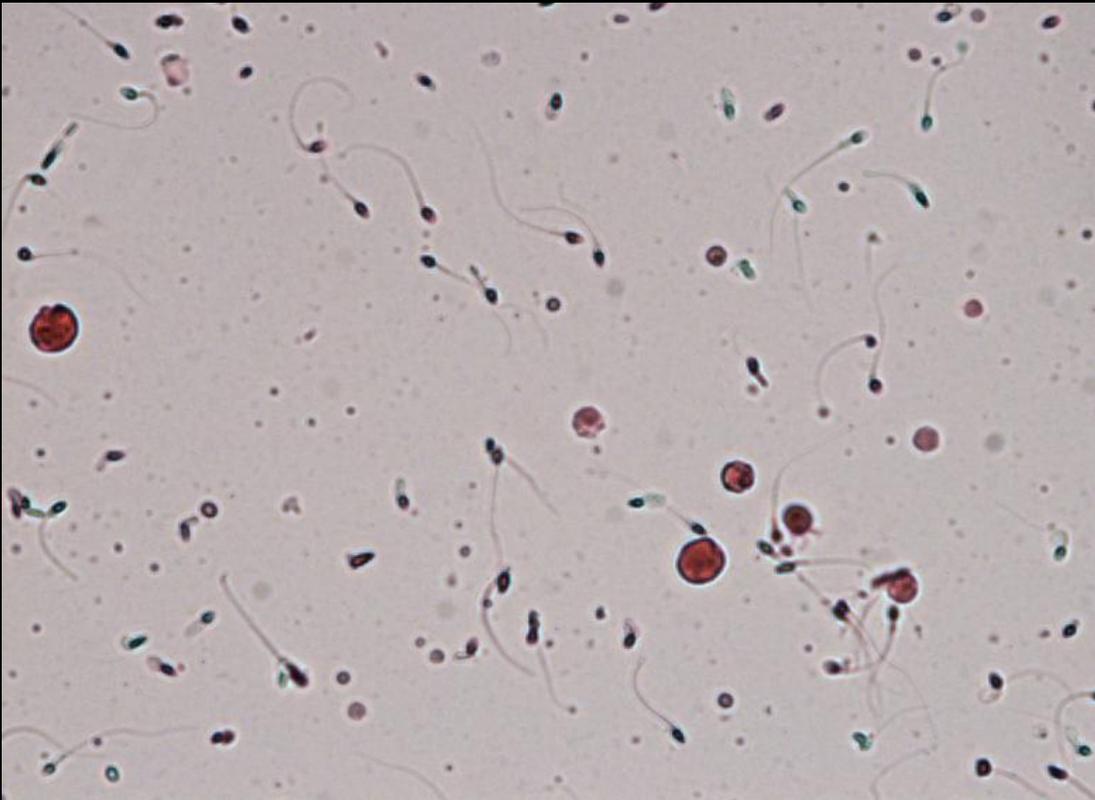
Movilidad y Concentración Espermáticas  
Recuento de Células Redondas

campo claro  
(OMS)

- objetos
- tamaños
- colas
- objetos de un tamaño definido con cola



# Vitalidad... rojicidad



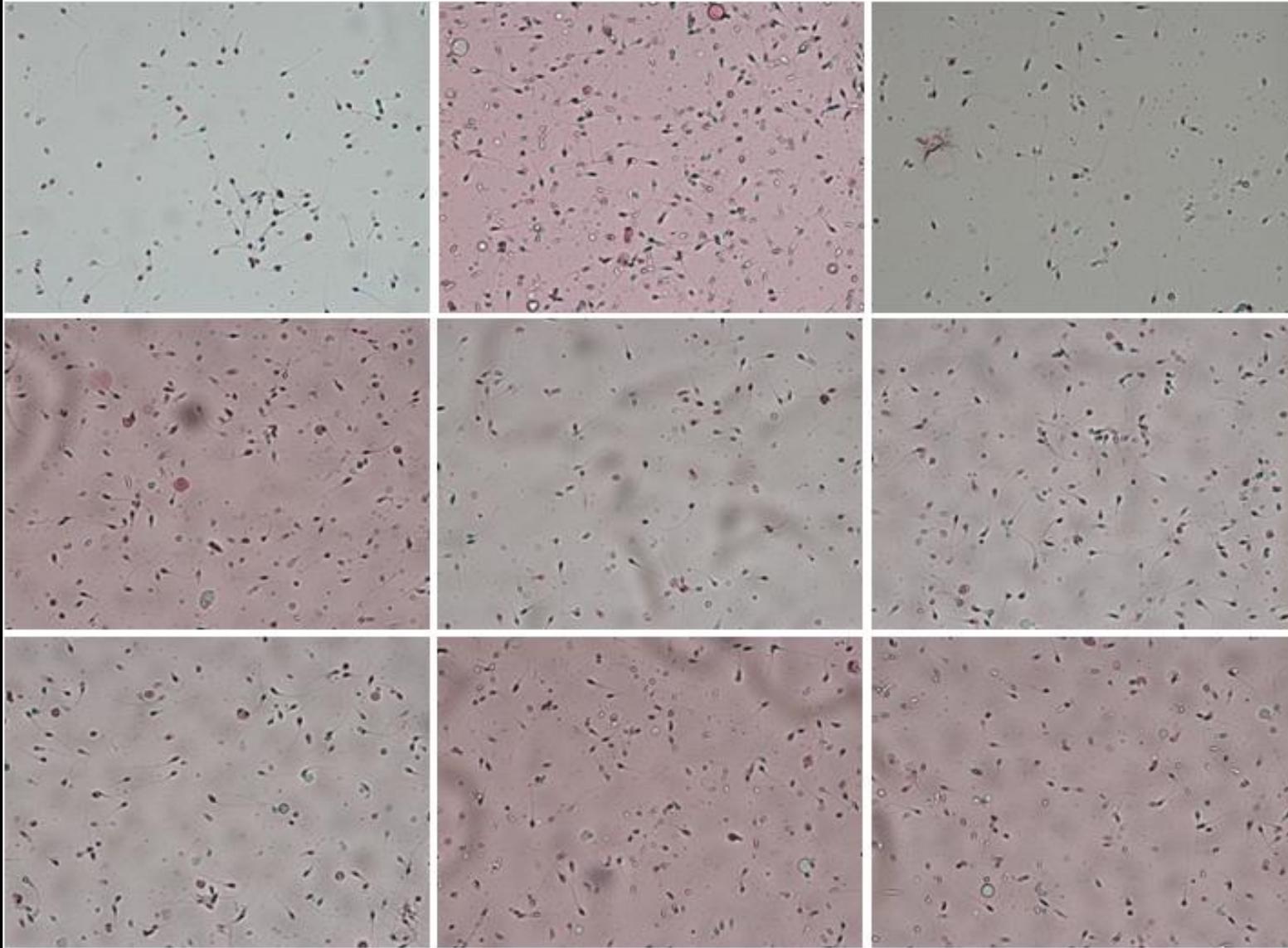
“Rojicidad”:

R/G

o

R/B

# Vitalidad... rojicidad



R/G:

1.00

0.87

1.03

0.88

0.96

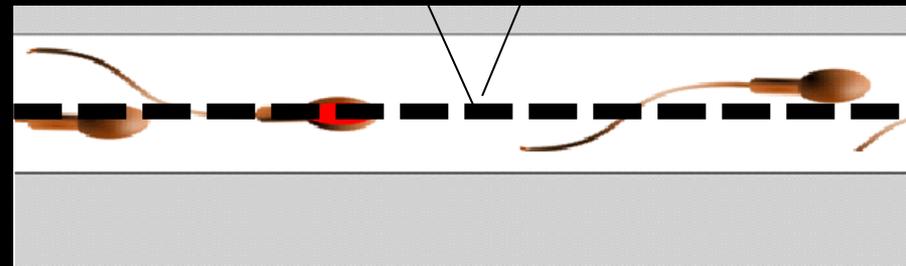
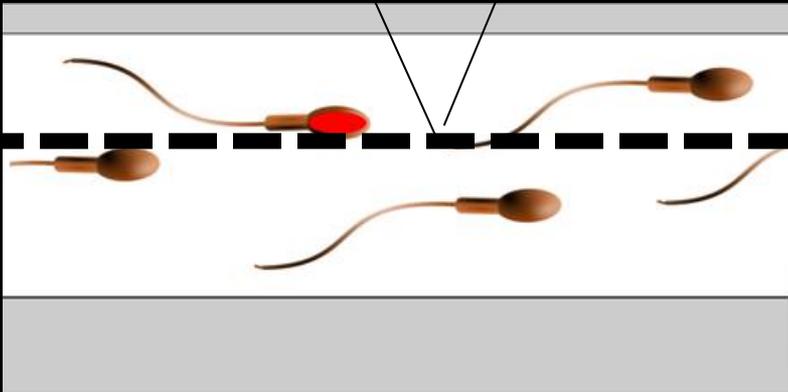
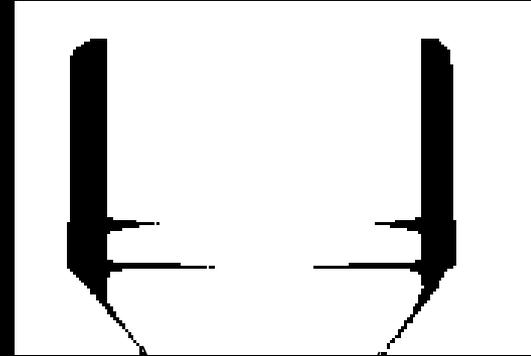
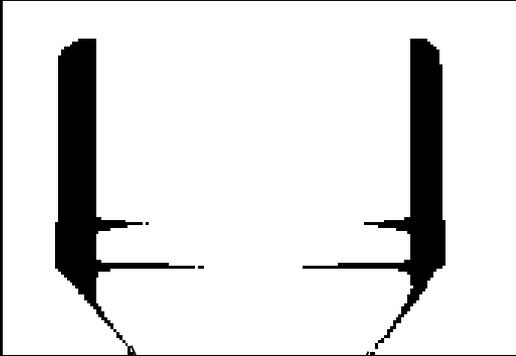
0.95

0.96

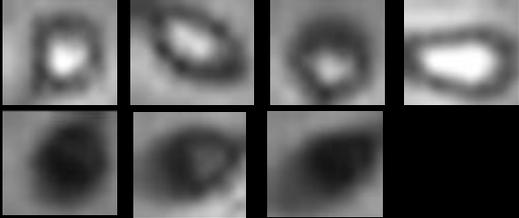
0.89

0.89

# Vitalidad... plano focal

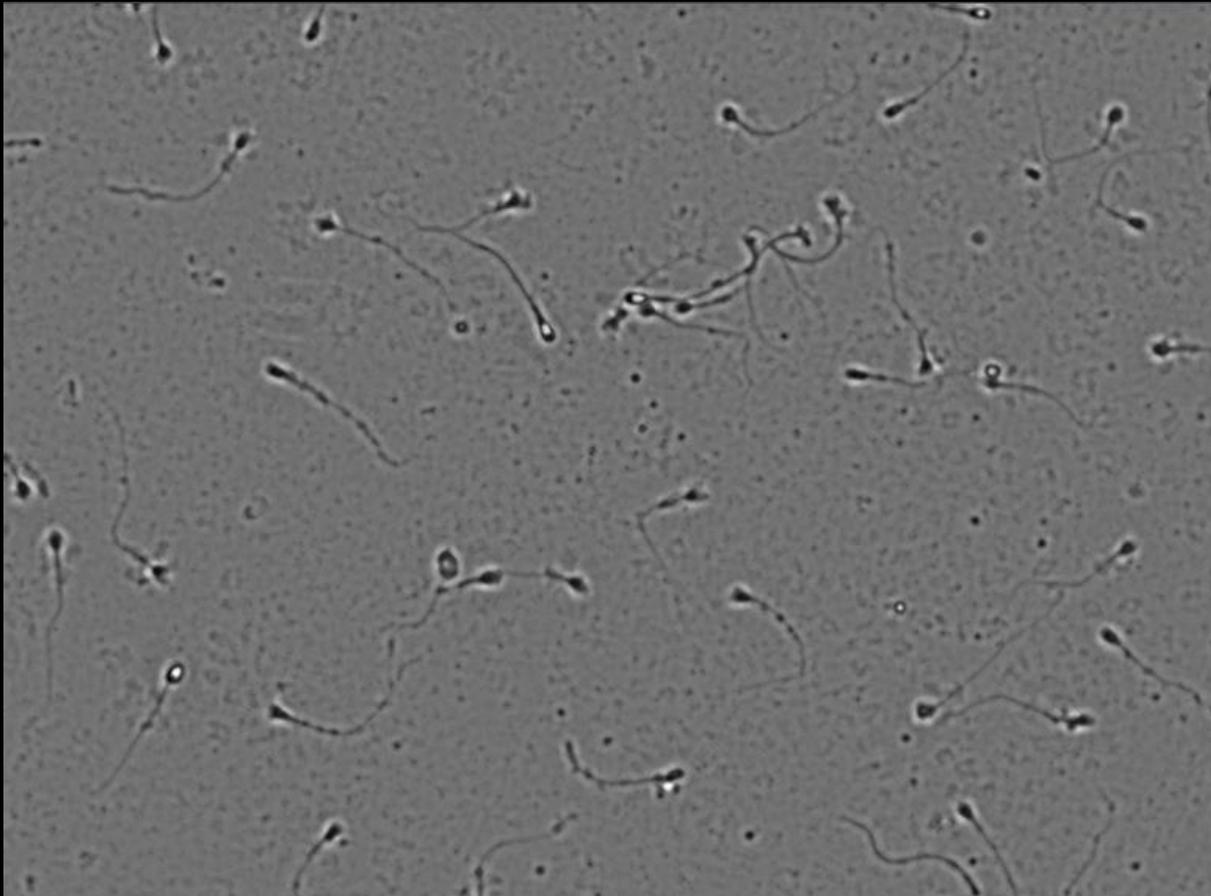


# Vitalidad... Eosina Y (al frotis)

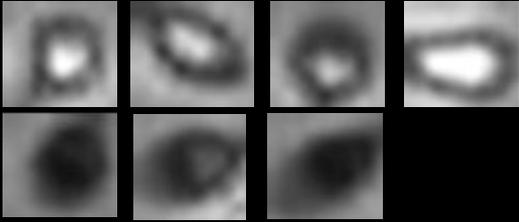


familia de espermios refringentes (**muertos**)

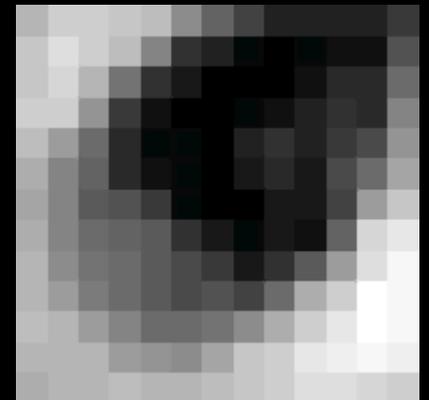
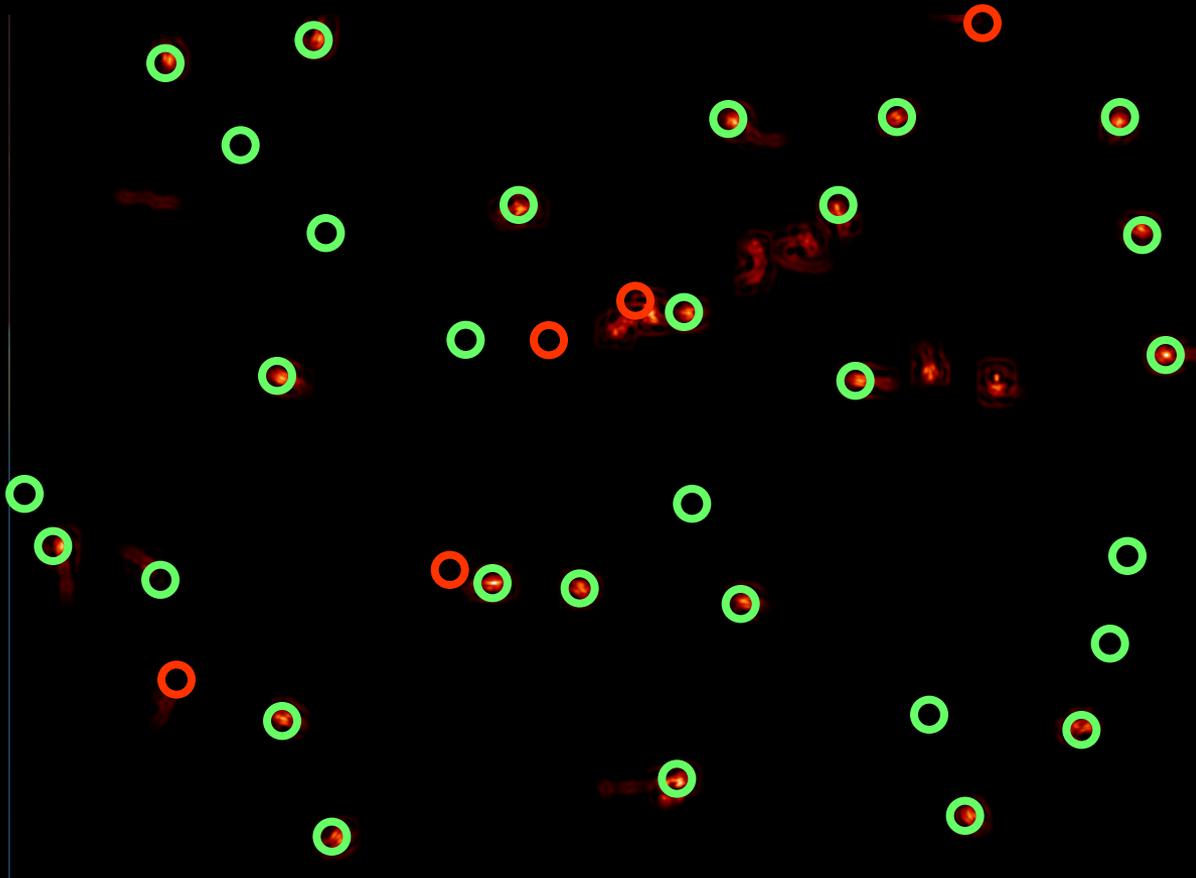
familia de espermios no refringentes (**vivos**)



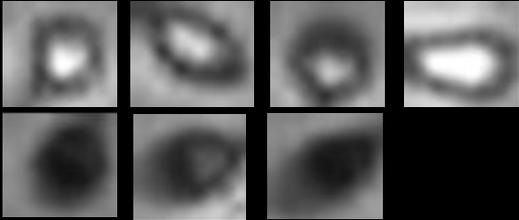
# Vitalidad... Eosina Y (al frotis)



familia de espermios no refringentes (**vivos**)

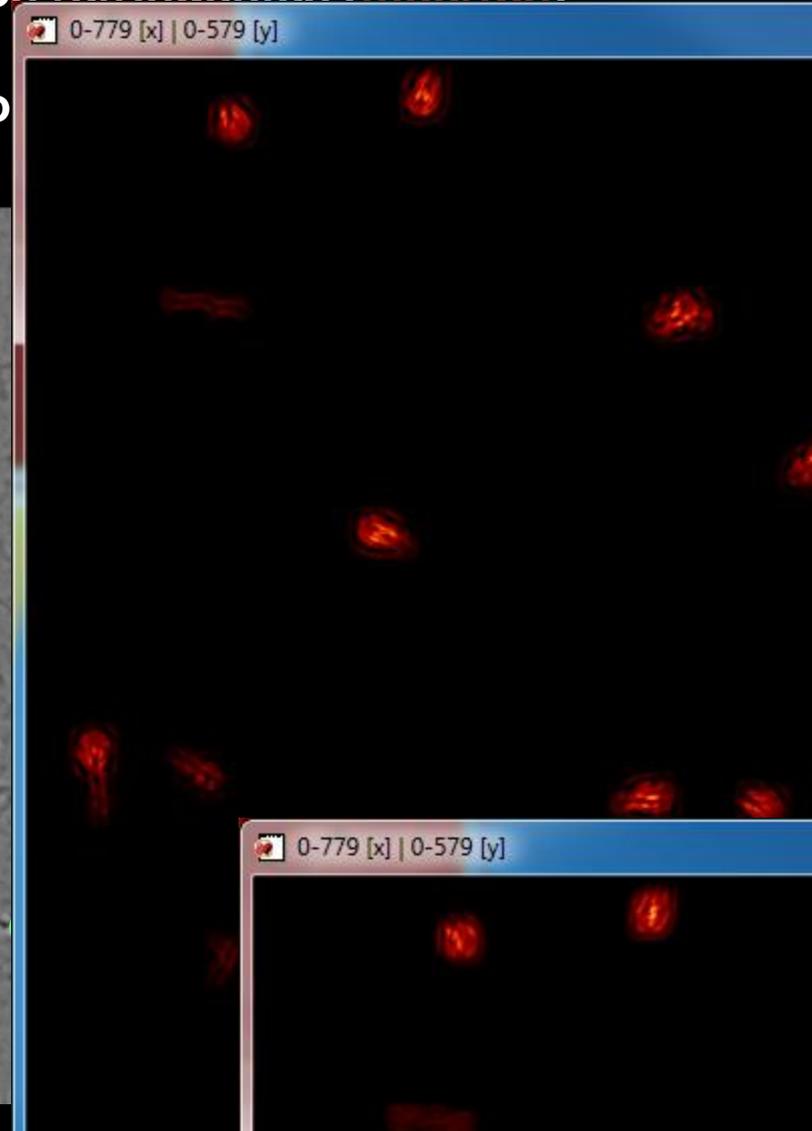
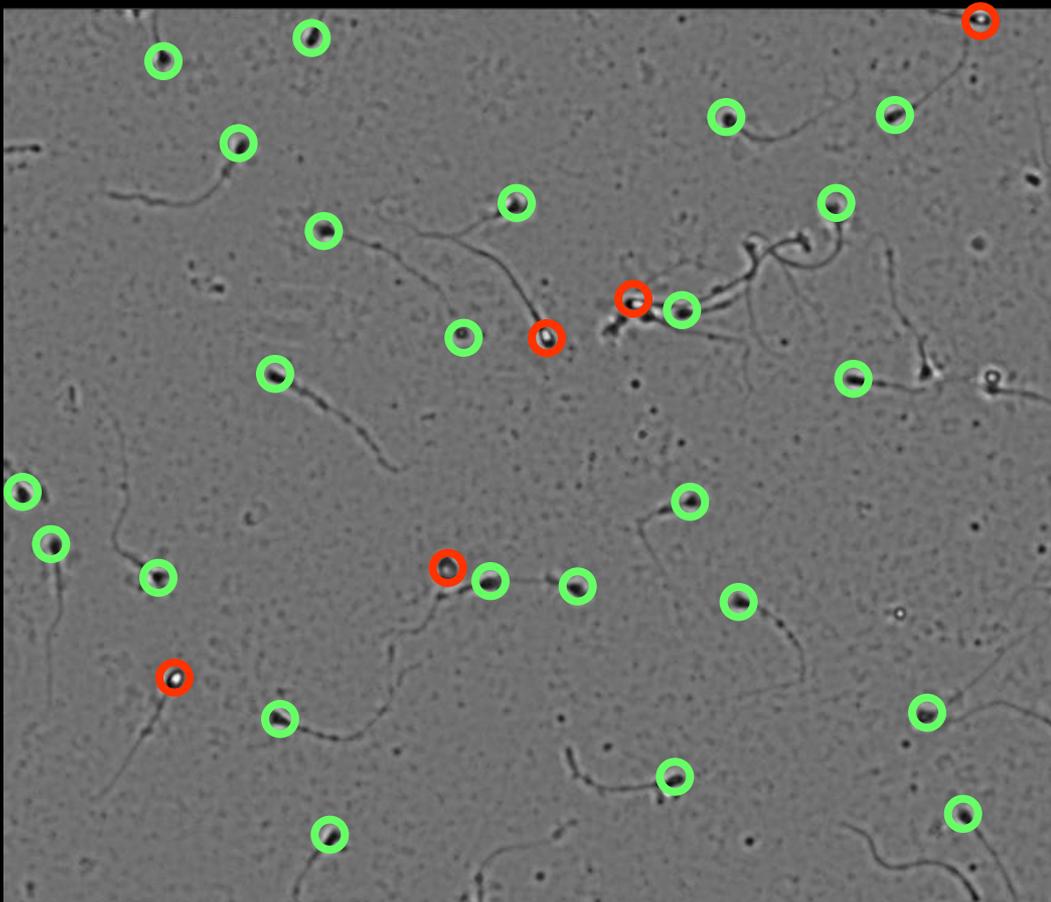


# Vitalidad... Eosina Y (al frotis)

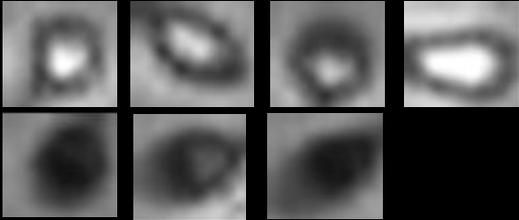


familia de espermios refringentes (**muer**tos)

familia de espermio

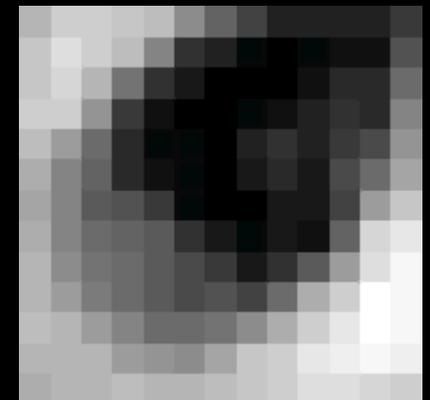
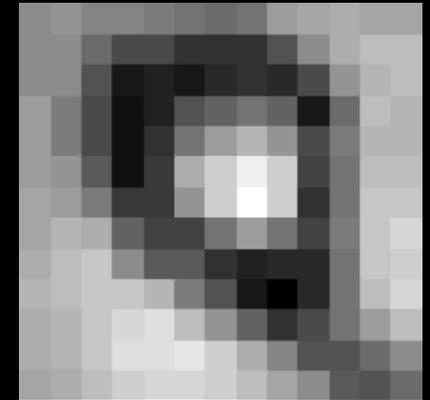
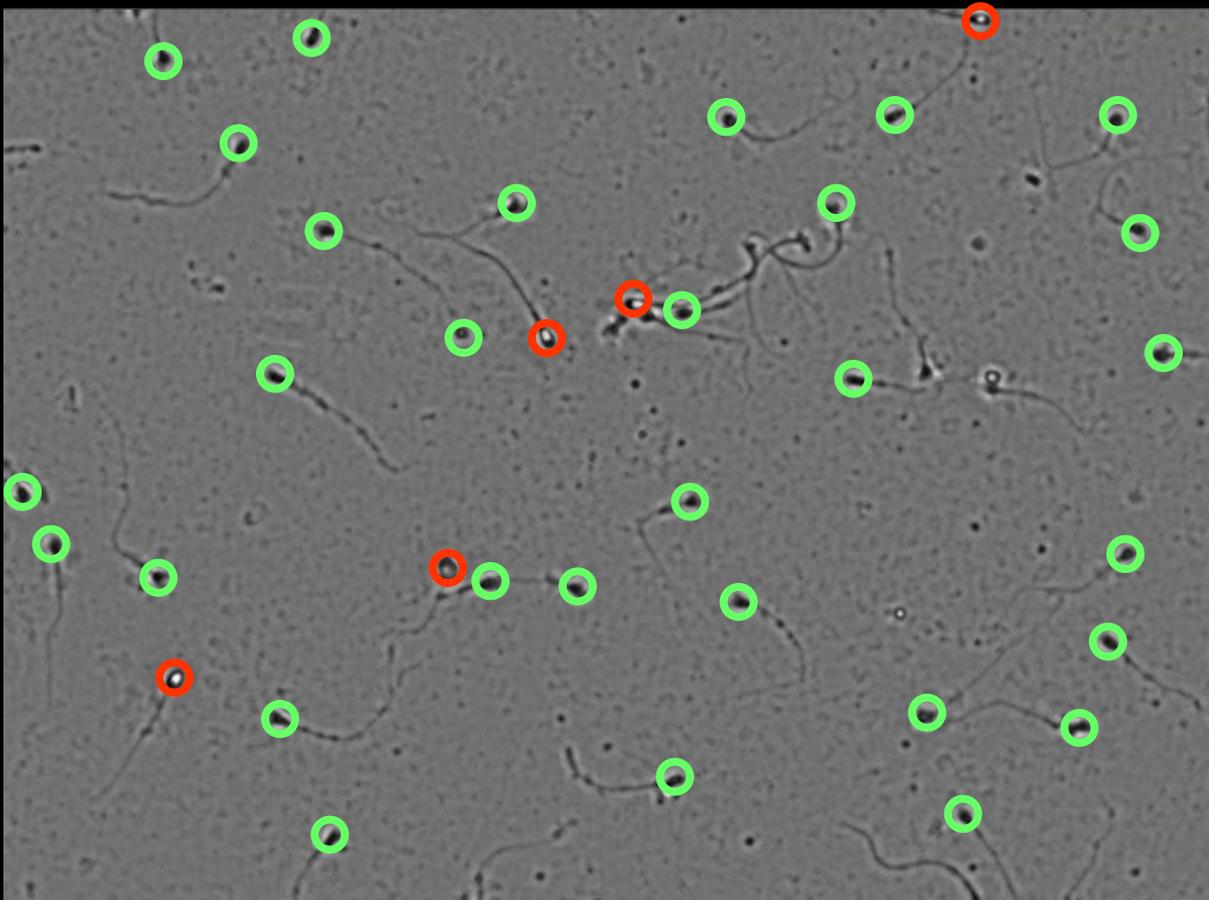


# Vitalidad... Eosina Y (al frotis)



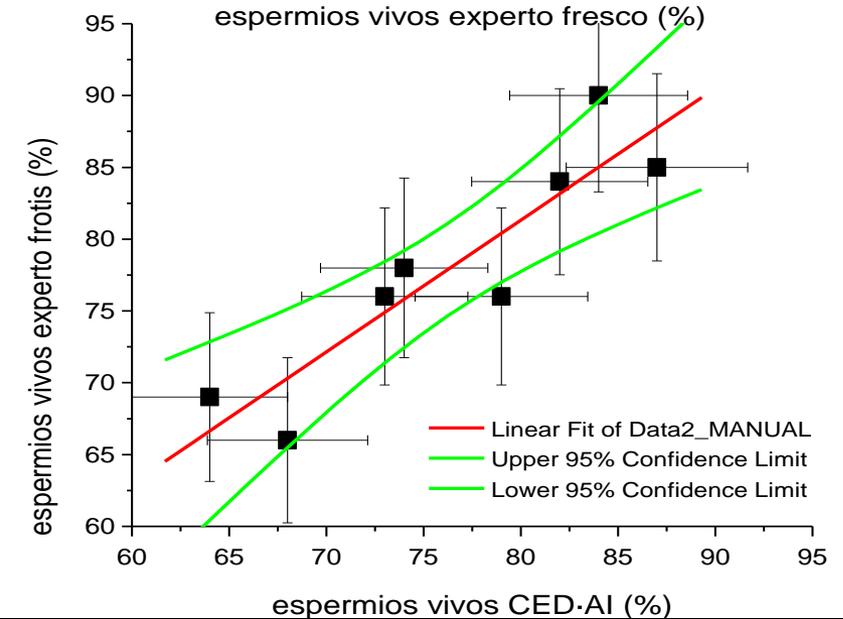
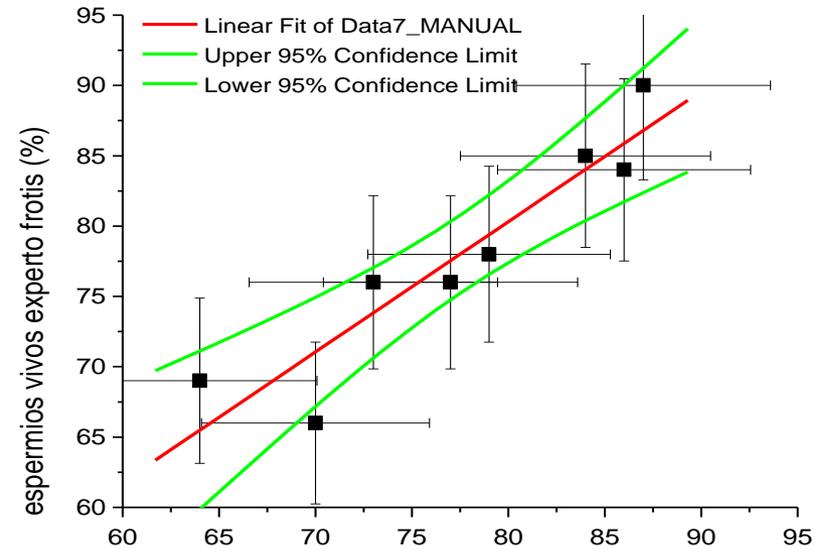
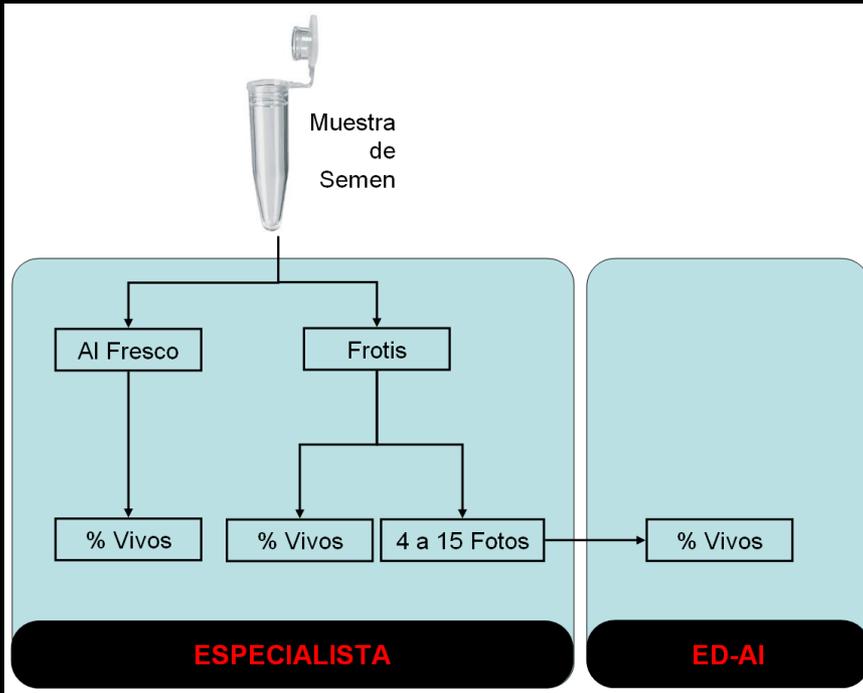
familia de espermios refringentes (**muertos**)

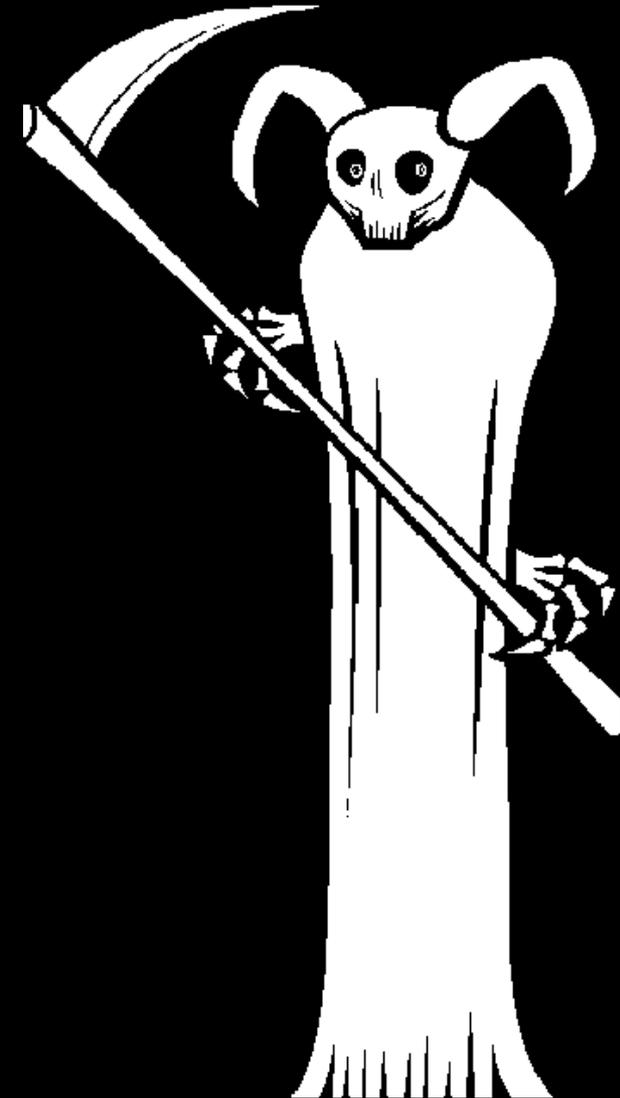
familia de espermios no refringentes (**vivos**)



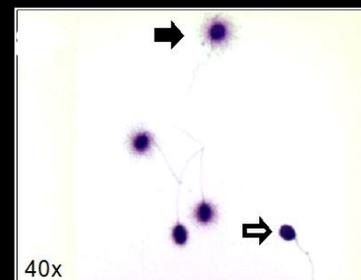
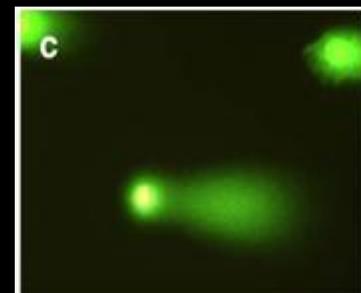
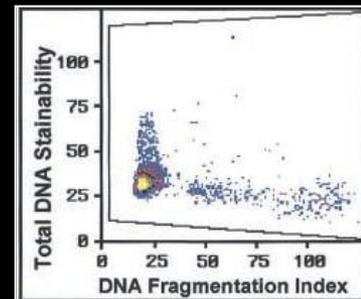
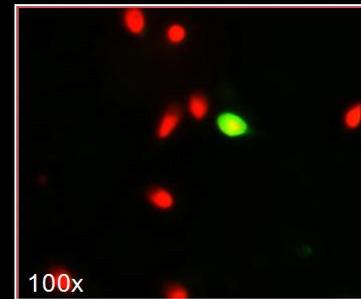


# Vitalidad... fresco vs frotis vs CEDAI





- ... **determinado por:**
- **TUNEL** (*terminal deoxinucleotide transferase dUTP nick end labeling*) FITC/IP via fluorescencia
- **SCSA** (*sperm chromatine structure assay*) via fluorescencia
- **COMET** (*single cell gel electrophoresis*) via fluorescencia
- **SCD** (*sperm chromatine dispersion*)
  - > Halosperm®
  - > en casa





# Fragmentación del ADN

## Dispersión cromatina espermática (SCD)

Tesis Pregrado:

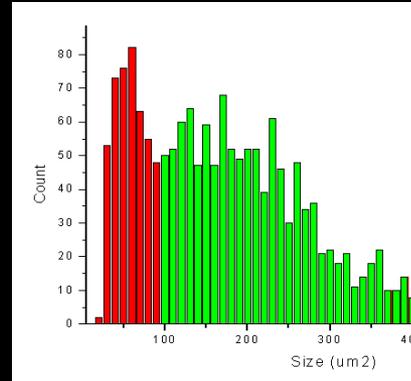
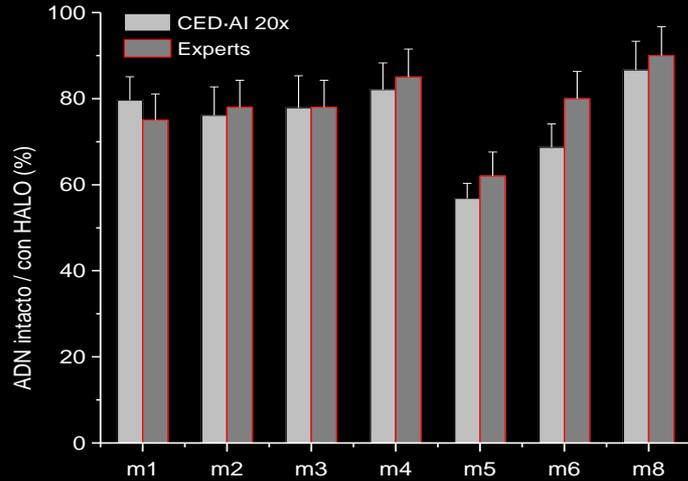
- **Fabrizio Horta Núñez:** “Validación de la metodología de dispersión de la cromatina para cuantificar daño en el DNA espermático en pacientes que consultan por infertilidad.” Tesis Profesional para Optar al Título de Tecnólogo Médico Mención Morfofisiopatología y Citodiagnóstico. Tutora: **Dra. Rosita Smith.**

Consistió en una implementación del protocolo de SCD (Sperm Chromatin Dispersion) previamente publicado por Fernández et. al. 2009.

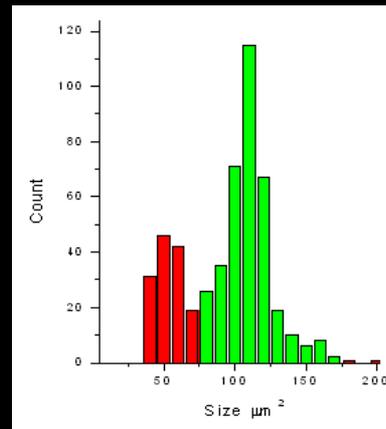
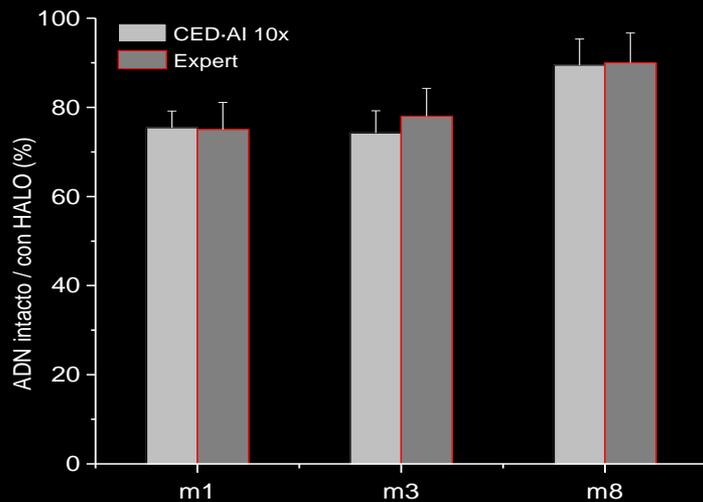
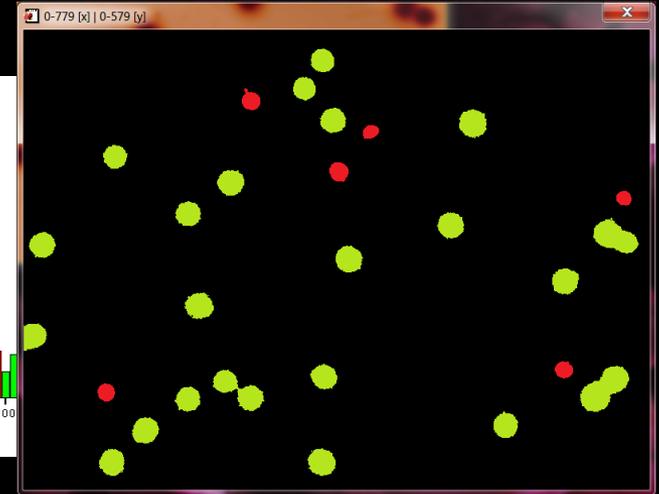
Las conclusiones más importantes de este trabajo son:

- El ensayo SCD permite medir la fragmentación del ADN espermático de manera sencilla, costo efectiva, rápida y con instrumentos de laboratorio de fácil acceso.
- Los ensayos de SCD y TUNEL entregan valores similares de fragmentación del ADN espermático.
- El SCD se correlaciona positiva y significativamente con los ensayos TUNEL y SCSA.

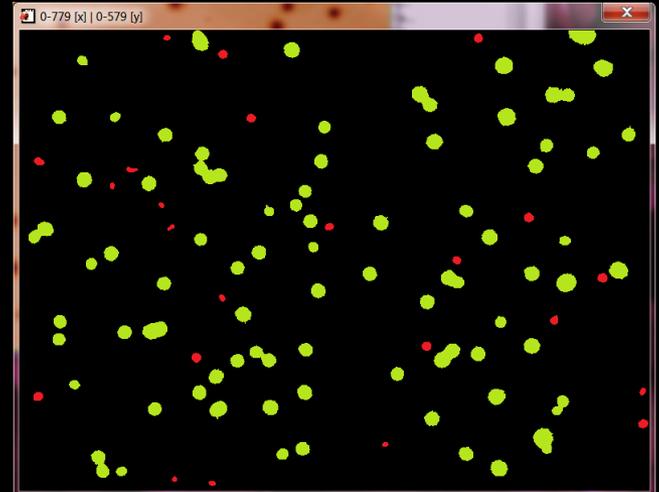
# Fragmentación del ADN ...



20 x



10 x



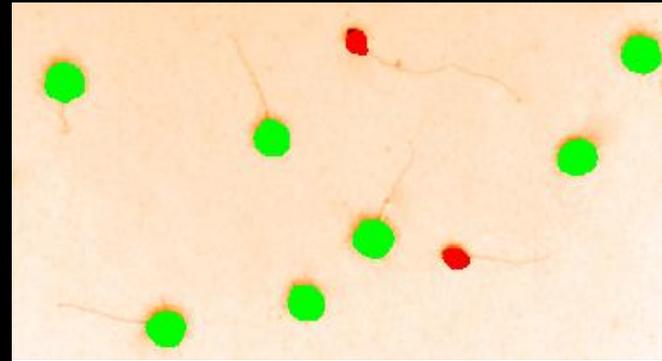
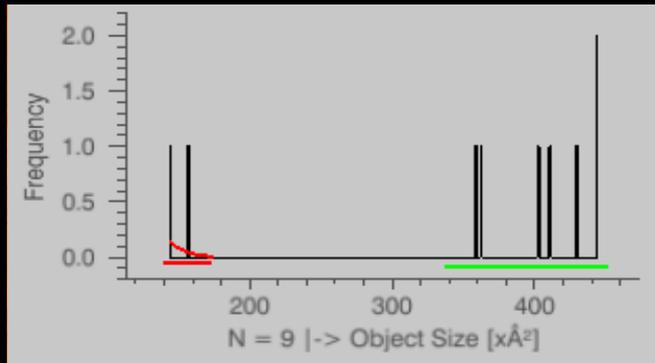


# Estandarización - Finalizando

## Dispersión cromatina espermática (SCD)

Fragmentación de ADN ... con Halosperm

... según Nuñez et Smith (2009)

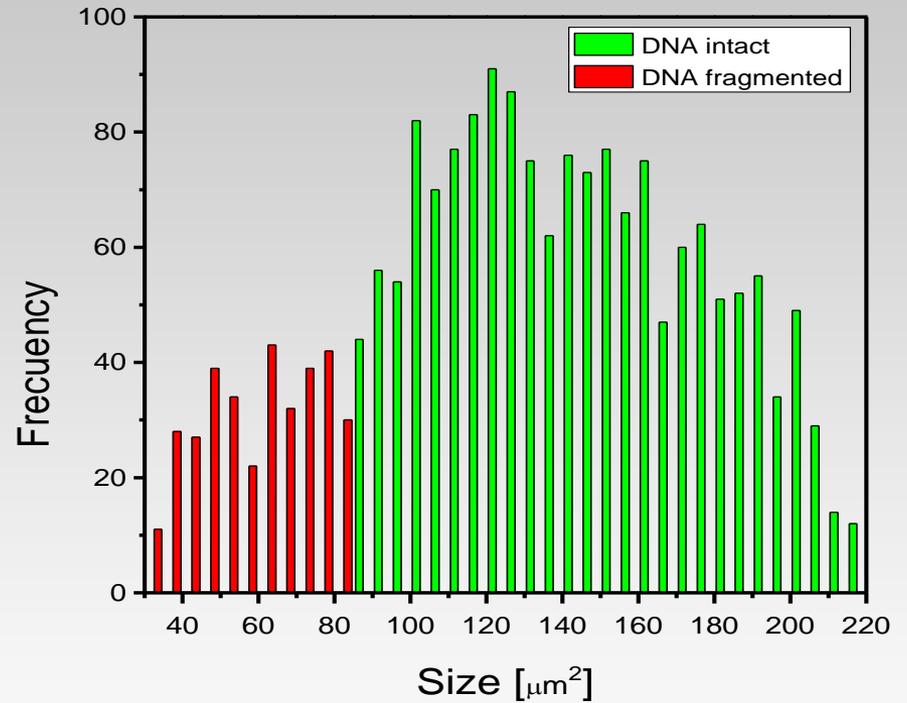
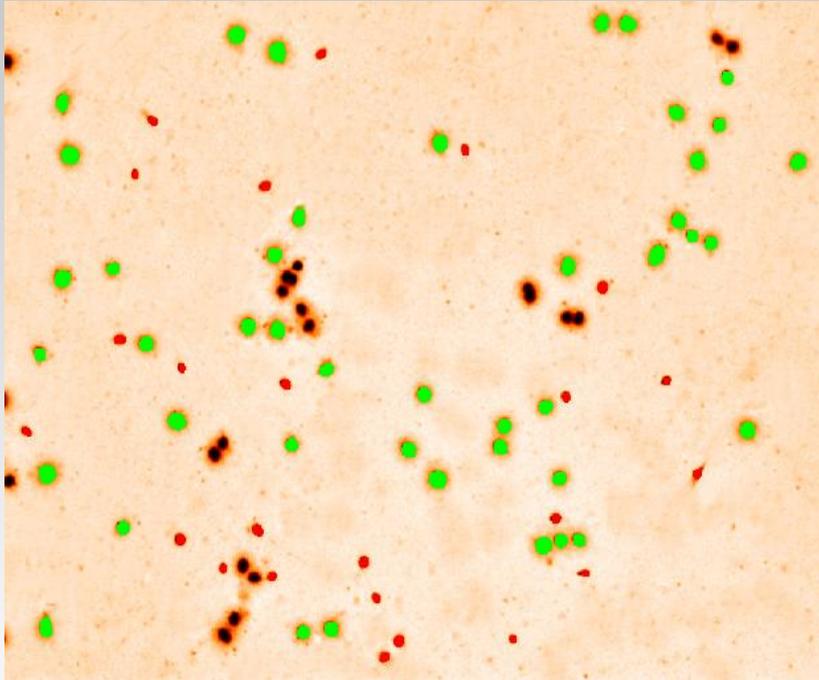


- Expertos evalúan en campo claro con objetivo 40x, cuentan un total de 400 espermatozoides
- ED·AI está probando mediciones con 10x y 20x, logrando recuentos de 1000 (10x) y 400 (20x) espermatozoides



# Verificación / Calibración

Dispersión cromatina espermática (SCD)



Análisis y clasificación automatizada de la fragmentación del ADN espermático a través de la medición del tamaño del halo generado para espermatozoides con el ADN intacto (verde) en contraste a los espermatozoides con el ADN no intacto (rojo).

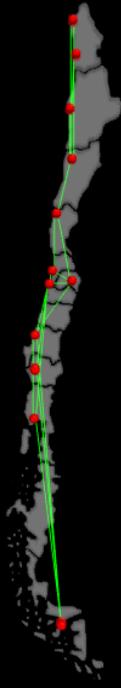


# Morfología Espermática

... en desarrollo ...

Morfología

# Muchas gracias ...



# CED-AI vs CASAs

	<b>CED-AI</b>	<b>SCA Barcelona, Esp</b>	<b>SAS Hamilton, USA</b>	<b>SVP Minitüb, Ger</b>	<b>CASA medeaLAB, Ger</b>
Costo Instalación	\$	\$\$\$	\$\$\$	\$\$\$	\$\$\$
Concentración / Motilidad	++ Colas + Cruces	+	+	+	+
Vitalidad	+ campo claro	(+) fluorescencia	(+) fluorescencia	-	(+) fluorescencia
Fragmentación ADN	+ campo claro	(+) Halo-Kit	(+) fluorescencia	-	(+) fluorescencia
Acceso Online	+ servicio de análisis	(+) análisis remoto sin servicio	-	-	-
Reporte Automático	+	-	-	-	-
Cloud-Storage	+	-	-	-	-



## **ESTANDARIZACION DE CONCENTRACION, RECUENTO DE CELULAS REDONDAS Y MOTILIDAD MEDIANTE ESPERMIOGRAMA DIGITAL**

**García A, Vargas S , Acuña AI, Figueroa C, Scheer J, Osorio-Reich M, Rojas R, Rojas N, Sarabia L, Madariaga M, Acosta A, Crosby J, Smith R y Härtel S.**

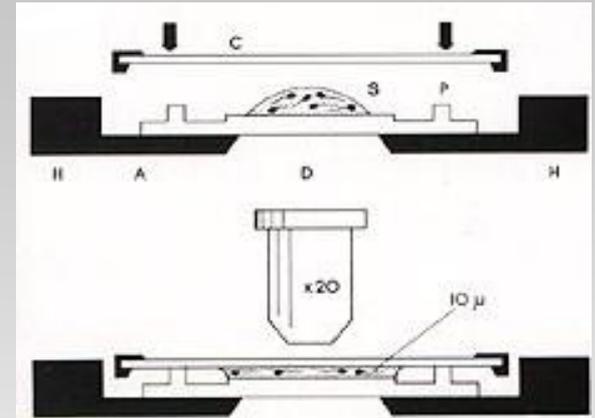
Proyecto FONDEF D07|1019



# Método Manual

Movilidad y Concentración Espermática  
Recuento de Células Redondas

## Carga de Muestra en cámara de recuento



## Lectura



Movilidad (OMS 1999): al menos 200 espermatozoides son clasificados (SE=14rcto = 7.1%) en los Grupos A, B, C o D ; contar solamente espermatozoides completos, es decir, con cabeza y cola.

Concentración [millones/ml], contar al menos 200 espermatozoides

Recuento de células redondas [millones/ml]: Células germinales y/o leucocitos



# Validación



20 Muestras



Manual | Expertos

Digital | ED-AI

Luis Sarabia (U-Chile)  
Marcia Madariaga (IDIMI)  
Adolfo Acosta (Clínica Las Condes)

Espermiogramas  
Asistidos por Internet  
(SCIAN-Lab, U-Chile)

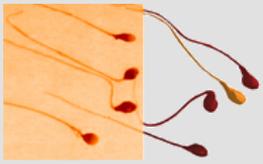


---

Movilidad (OMS 1999)  
Grupos: A, B, C, D

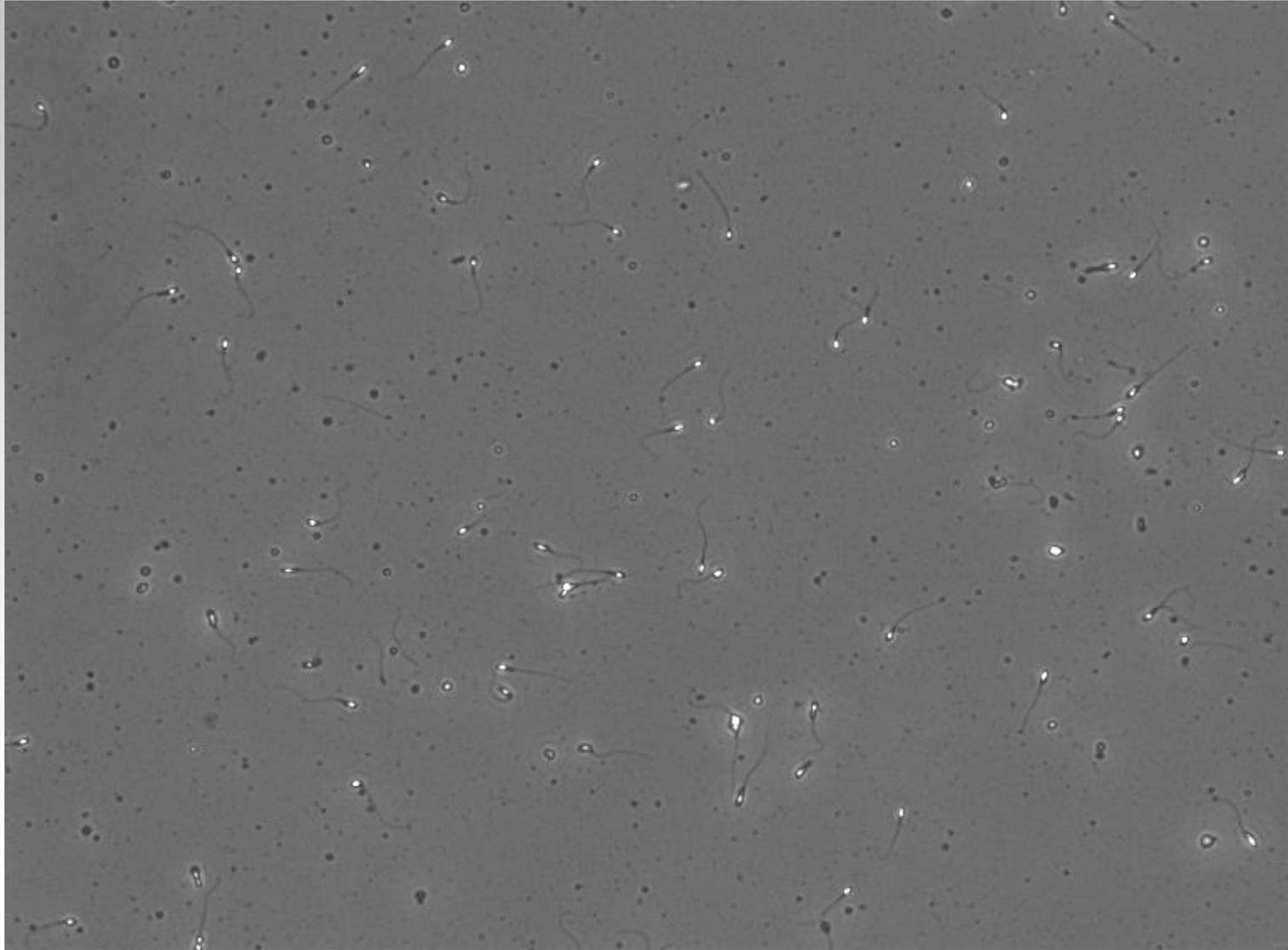
Concentración  
millones/ml

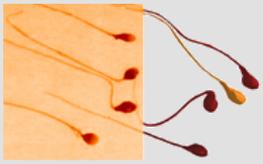
Recuento de células redondas  
millones/ml



# Metodología

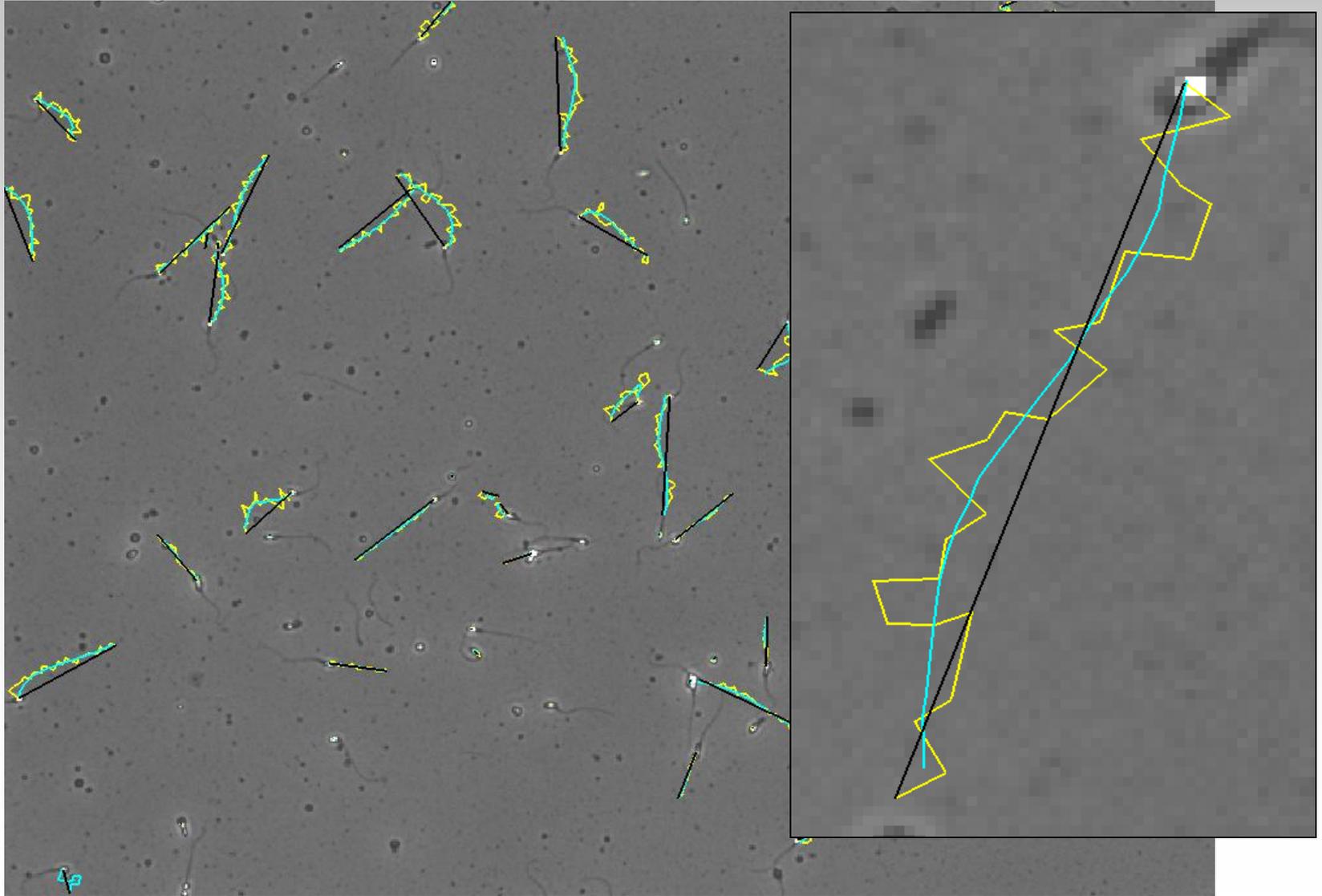
Movilidad - Video





# Metodología

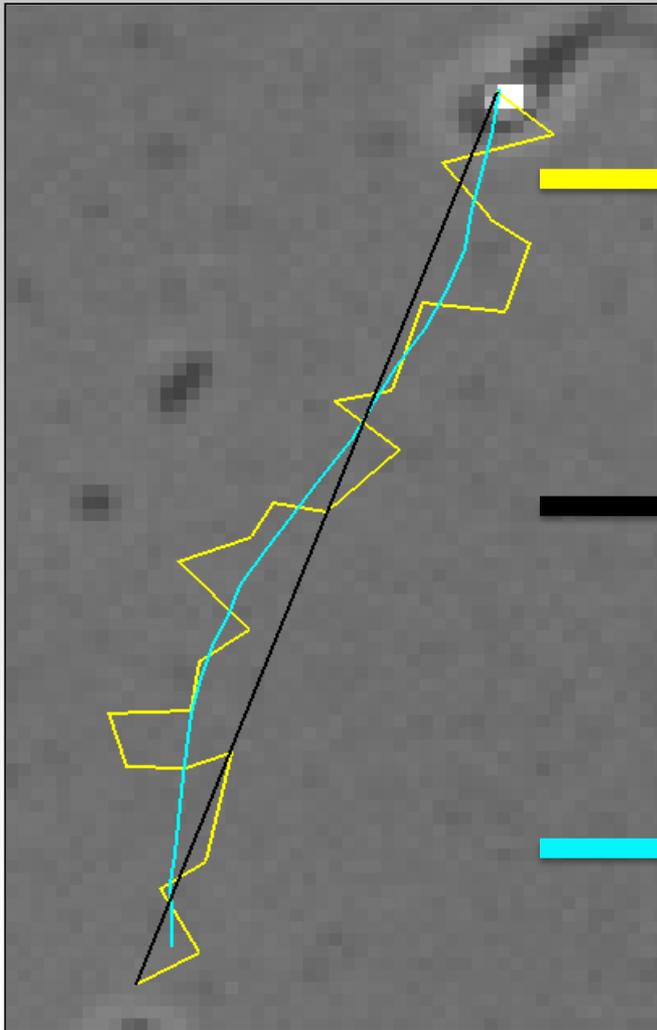
## Movilidad





# Metodología

## Movilidad



$$VCL = \frac{\sum_{i=0}^{t\_final} \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2}}{t_{i+1} - t_i}$$

Velocidad curvilínea

$$VSL = \frac{\sqrt{(x_{t\_final} - x_0)^2 + (y_{t\_final} - y_0)^2}}{t_{t\_final} - t_0}$$

Velocidad lineal

$$VAP = \frac{\sum_{i=0}^{t\_final} \sqrt{(Xs_{i+1} - Xs_i)^2 + (Ys_{i+1} - Ys_i)^2}}{t_{i+1} - t_i}$$

Velocidad promedio



# Metodología

Movilidad

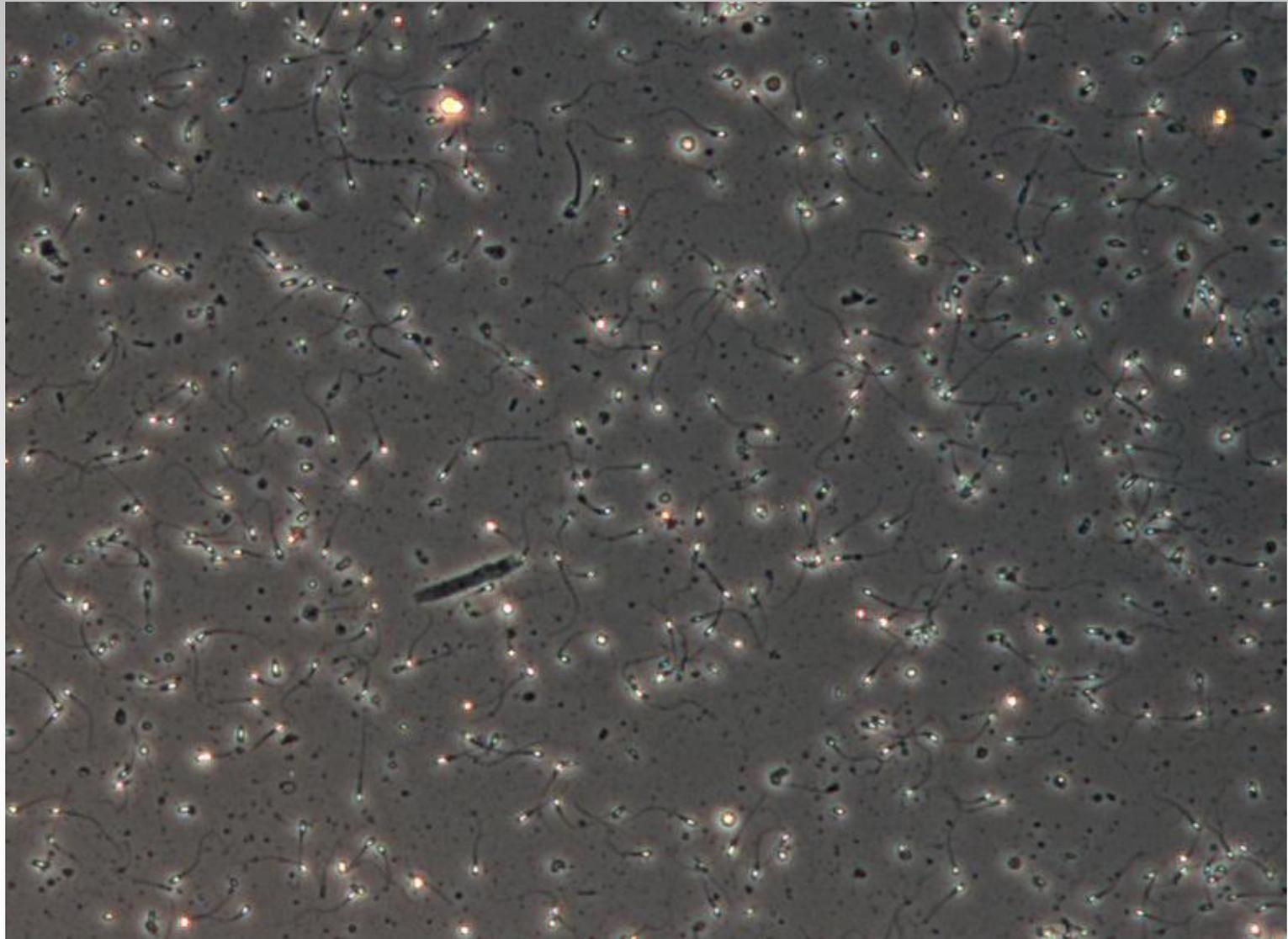
**Diferentes sistemas digitales utilizan diferentes algoritmos matemáticos para:**

- identificar espermatozoides,**
- perseguir trayectorias,**
- calcular movilidad.**

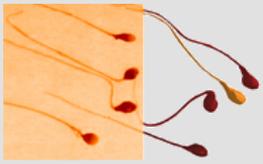


# Metodología

Movilidad y Concentración.



Objetivo 10x *ph1*, 650,138 x 483,436 $\mu$ m



# Metodología

Movilidad y Concentración..

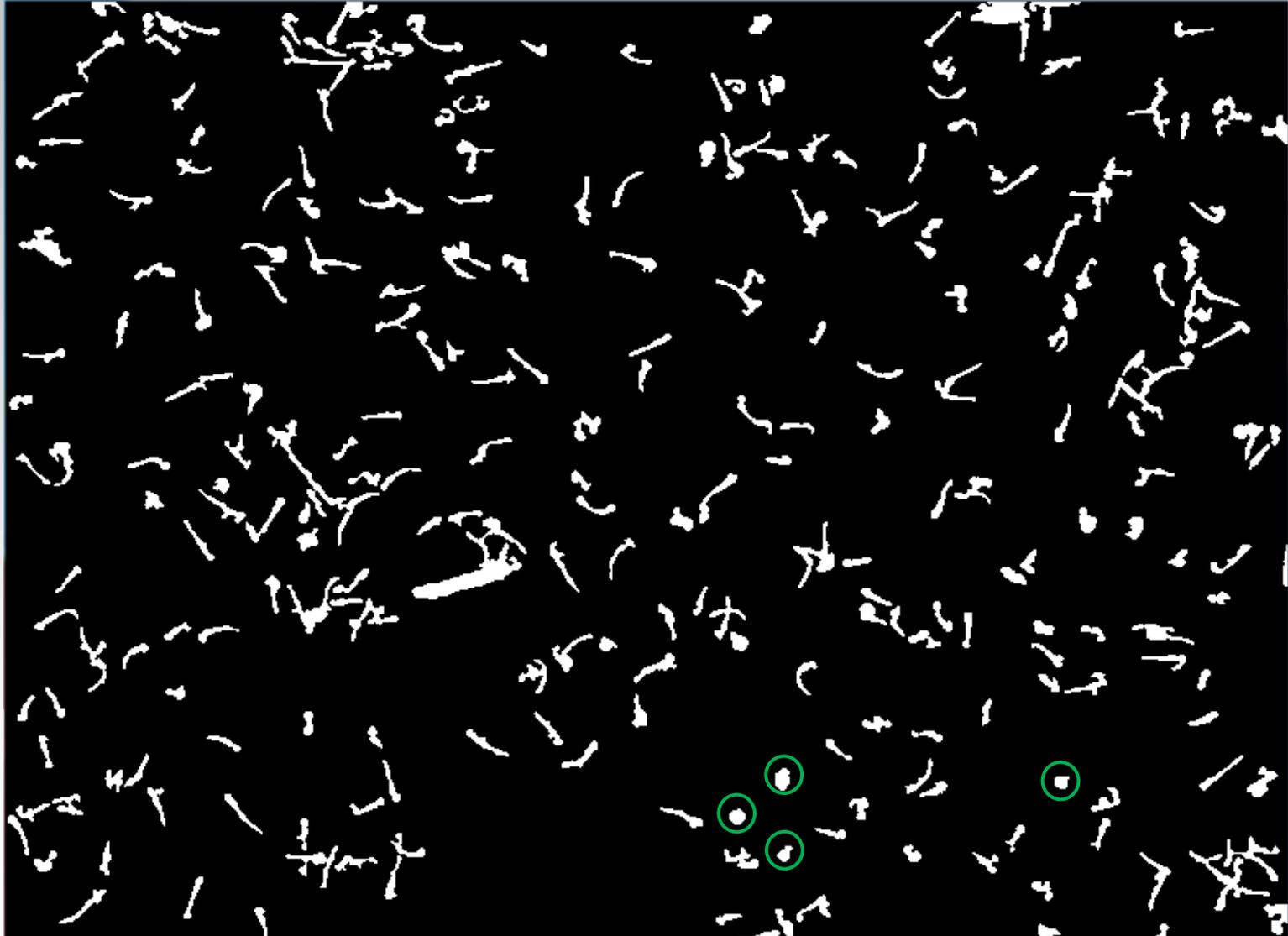


Identificación de cabezas por tamaño (4 a 15 píxeles).

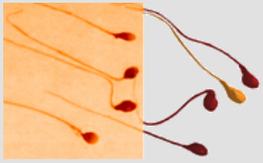


# Metodología

Movilidad y Concentración. Cluster de Colas

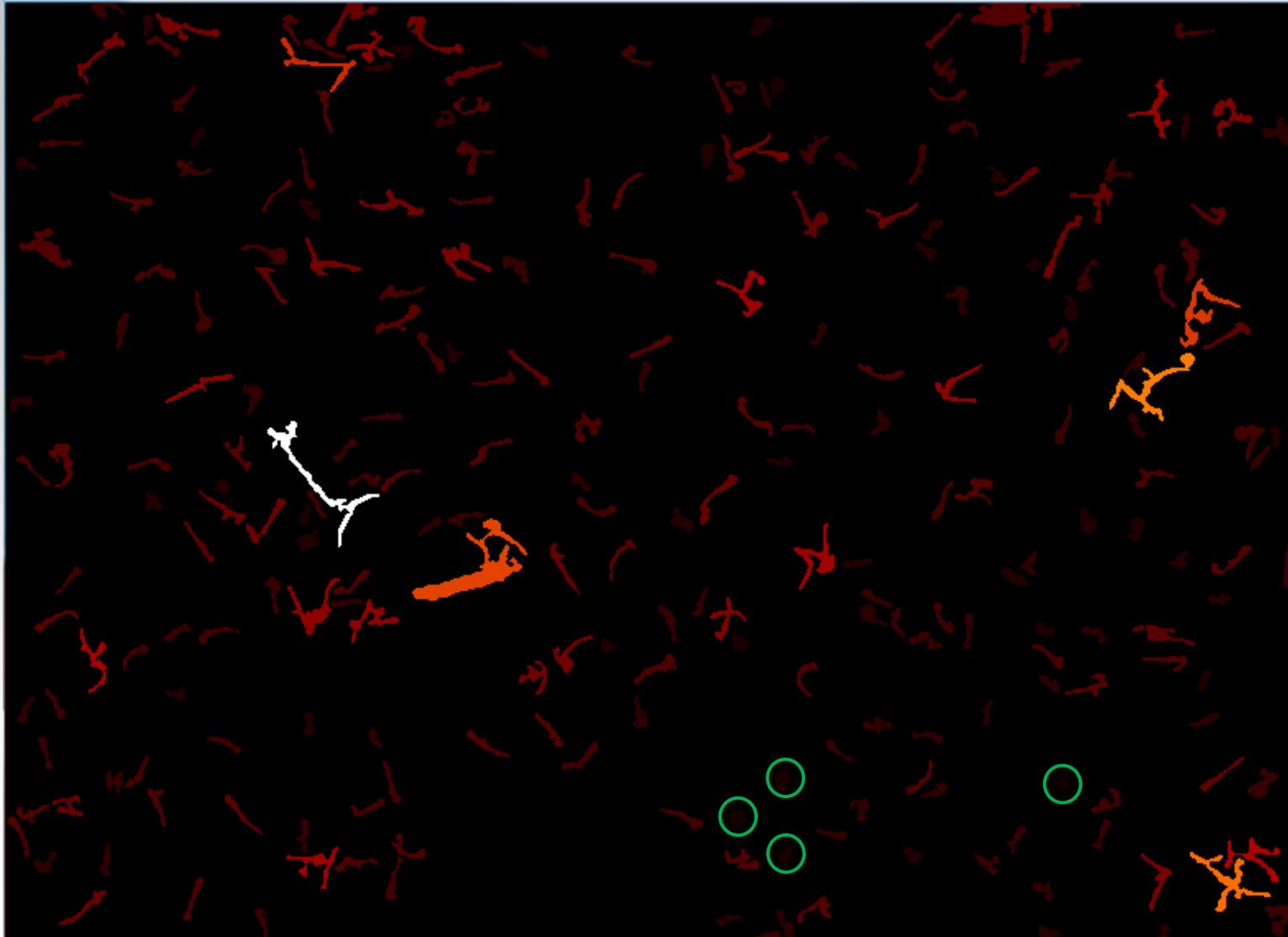


Identificación de colas de espermatozoides



# Metodología

Movilidad y Concentración. Cluster de Colas

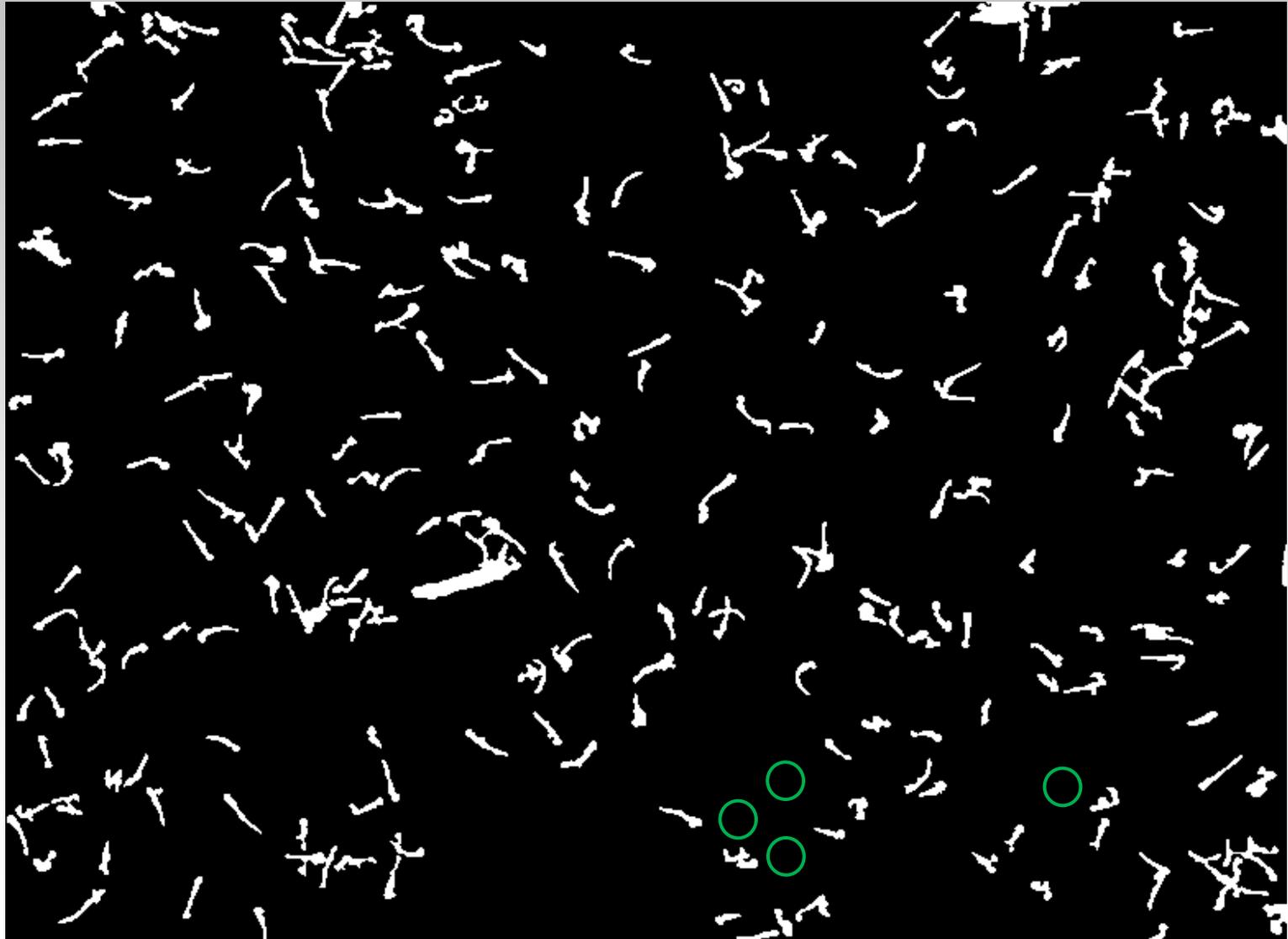


BorderDivCenterPix – Para separar estructuras redondeadas



# Metodología

Movilidad y Concentración. Cluster de Colas



Identificación de colas de espermatozoides



# Metodología

Movilidad y Concentración. Cluster de Cabezas c/ Colas

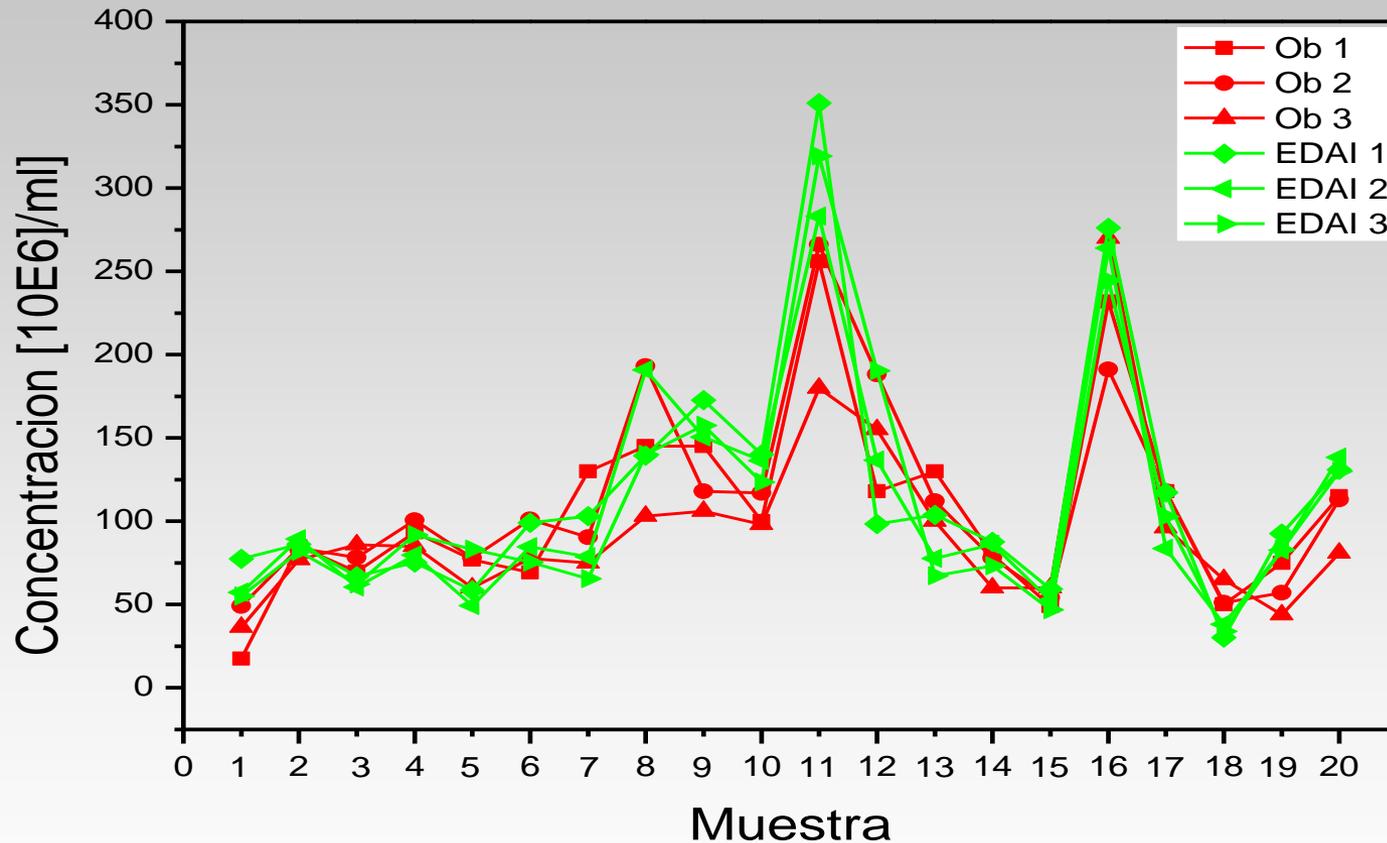


Identificación de cabezas de espermatozoides con colas.



# Verificación / Estandarización

Concentración: Cuantificación de espermatozoides con cola.



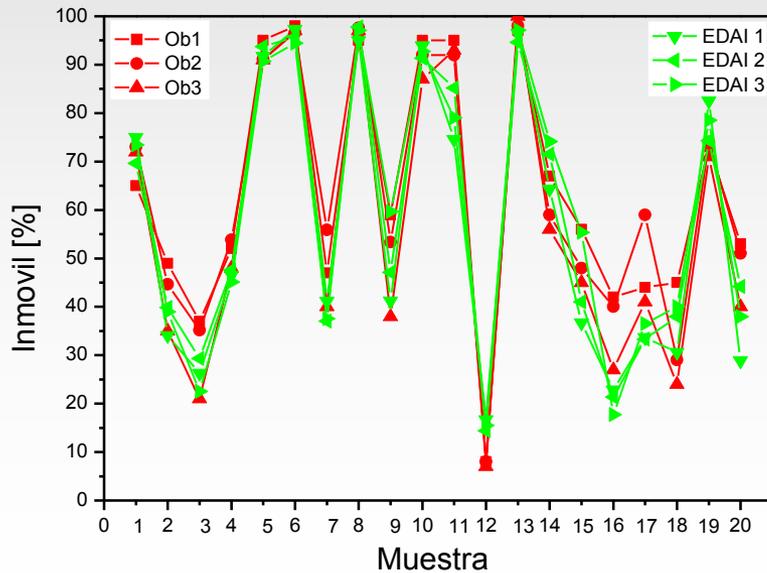
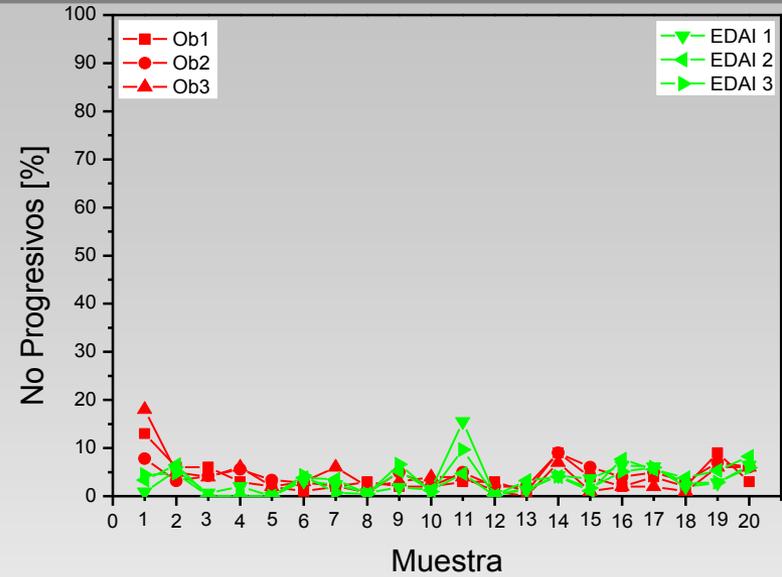
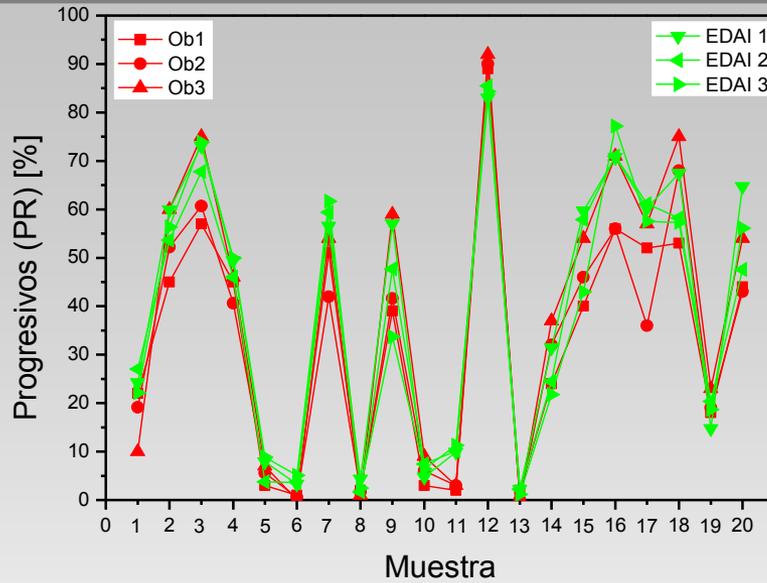
Debido al conteo de un mayor número de objetos en el análisis digital los valores son más cercanos al valor real.

SE = 10.5 % (Expertos) contra SE = 8 % (ED·AI)



# Verificación / Estandarización

## Movilidad



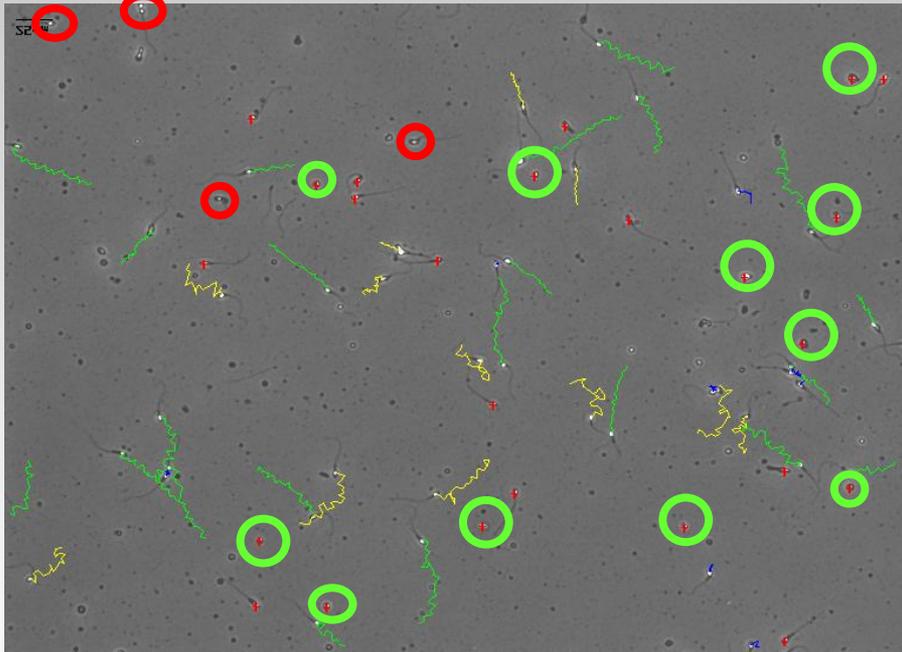
**No existen diferencias significativas entre expertos y el método digital.**



# Comparación

SCA versus ED-AI

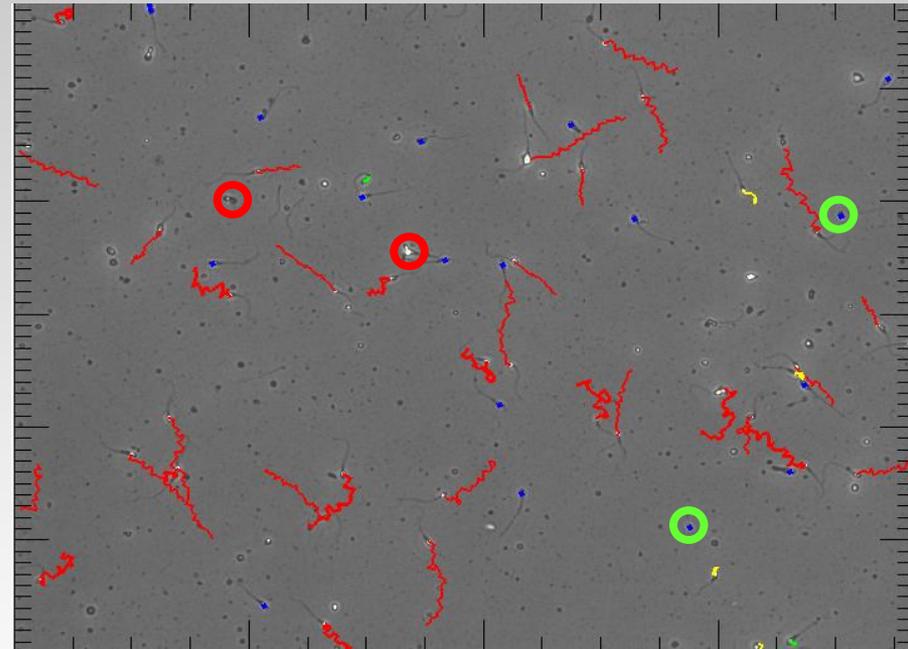
CASA



total=68

CED-AI

Centro de Espermiogramas Digitales  
Asistidos por Internet, UChile



total=57

○ Cabezas sin cola: 11

○ Espermatozoides no encontrados: 4



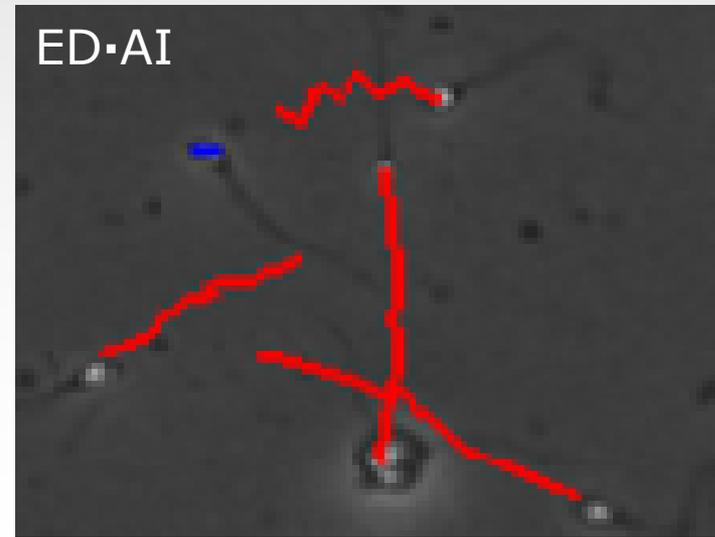
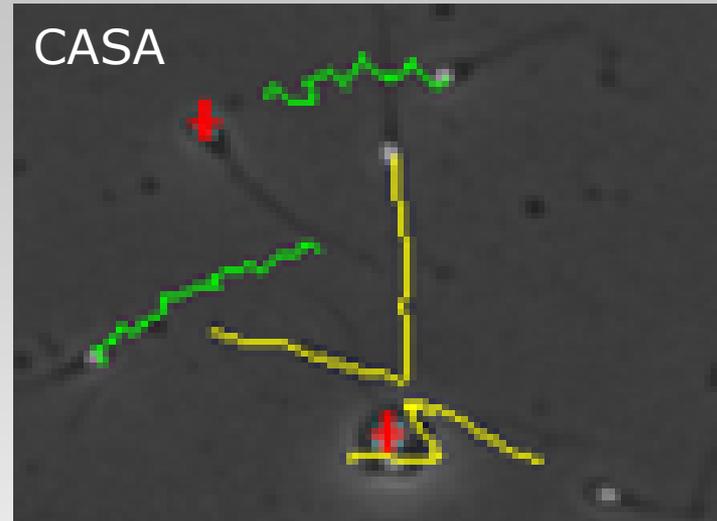
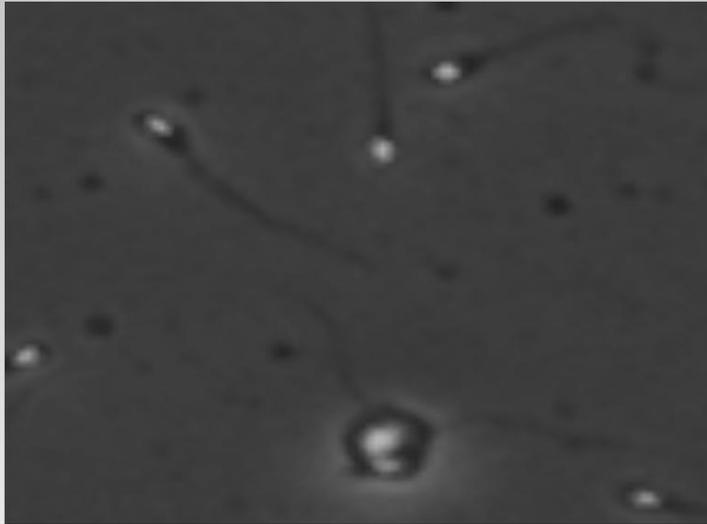
2

2



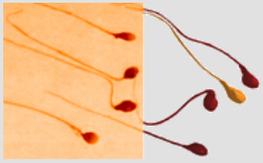
# Comparación

CASA versus ED-AI



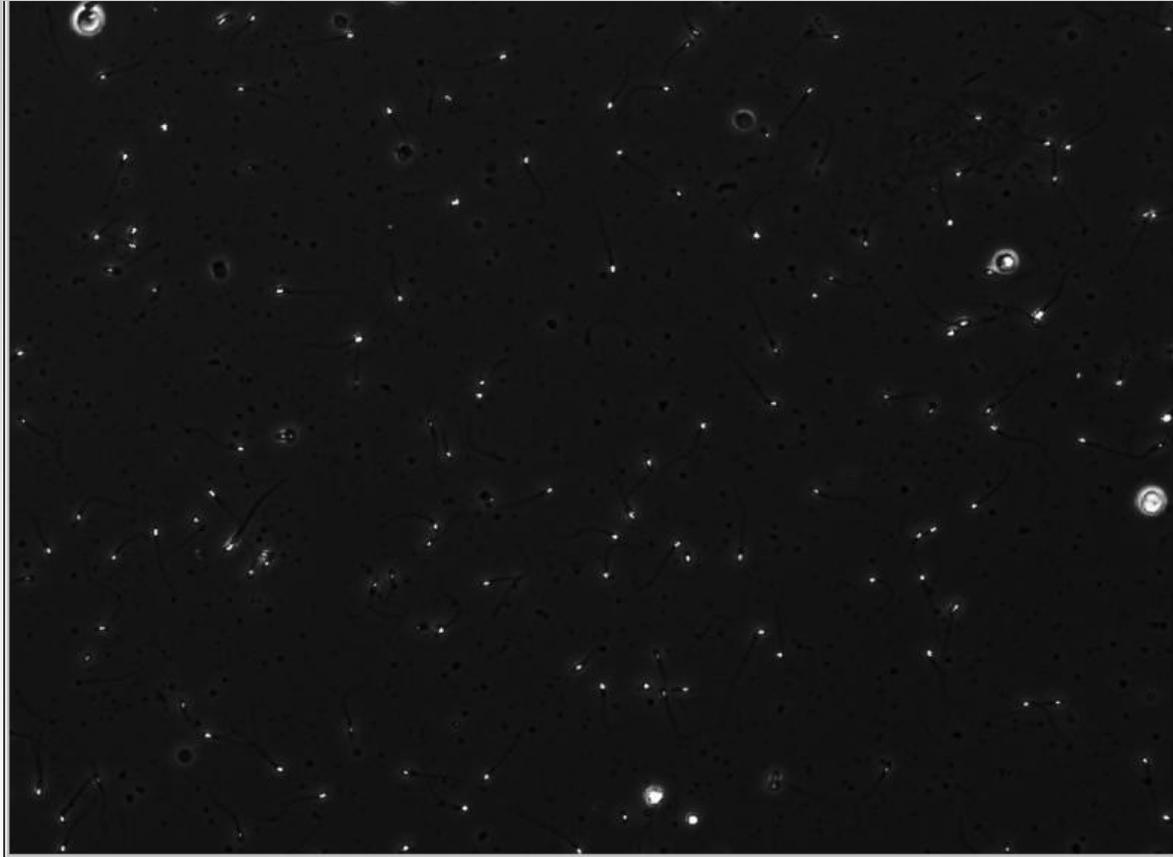
Intersección de trayectorias:  
- Error de Fusión y Fisión

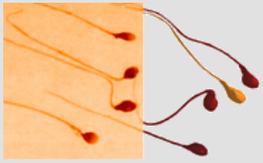
Colisión con detritus celular:  
- Error de velocidad



# Metodología

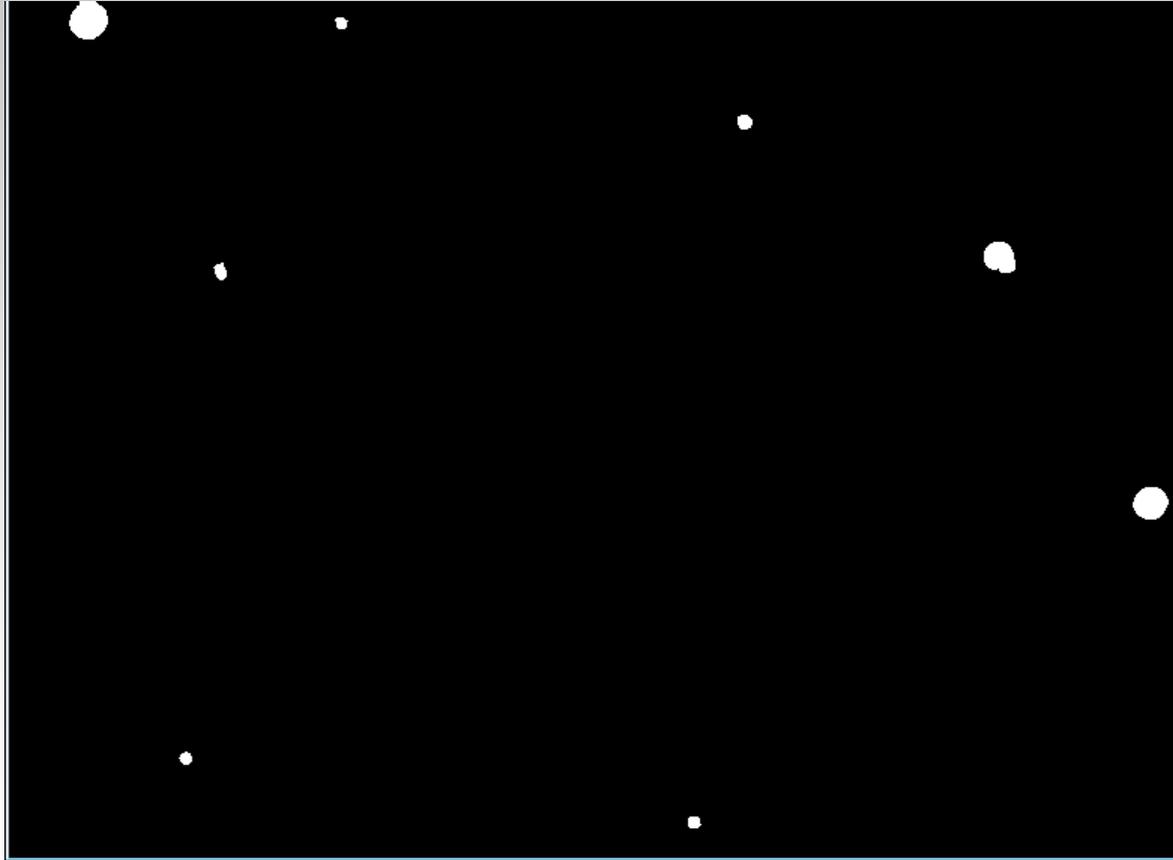
Células Redondas Segmentación





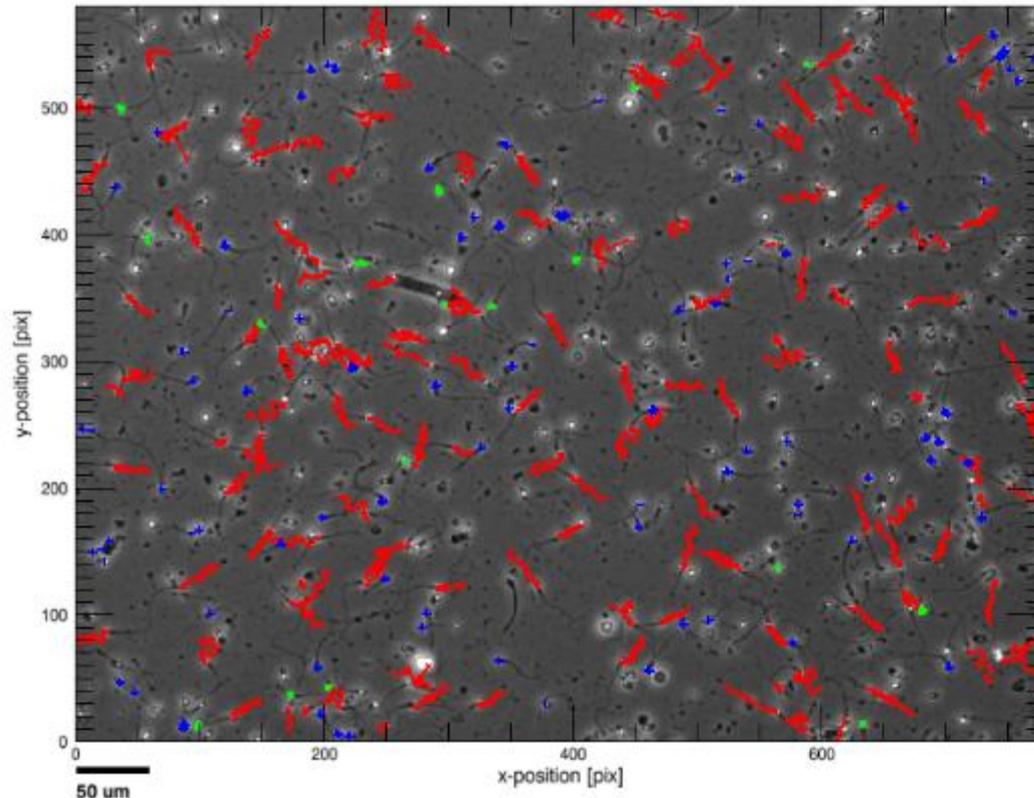
# Metodología

Células Redondas Segmentación



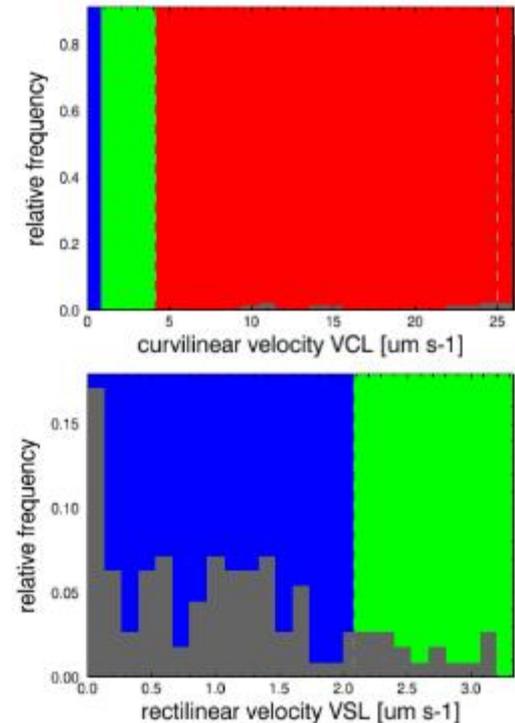
1s

### ■ Trajectories



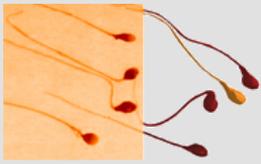
- Identificación de espermatozoides con cola.
- Control de colisión, fusión y fisión.
- Combinación de VCL y VSL.

### ■ Histograms



### ■ Classification

- Type PR: 57.14 % (148 sperms)
- Type NP: 6.56 % (17 sperms)
- Type IM: 36.29 % (94 sperms)



# Verificación / Calibración

## Motilidad

<b>OMS 1999 Movilidad</b>
A: rápida progresiva ( $> 20 \mu\text{m/s}$ a $25^\circ\text{C}$ ).
B: progresiva lenta ( $\geq 5$ y $\leq 20 \mu\text{m/s}$ a $25^\circ\text{C}$ ).
C: no progresiva ( $< 5 \mu\text{m/s}$ ).
D: Inmóviles.

**¿Velocidad lineal o curvilínea?**

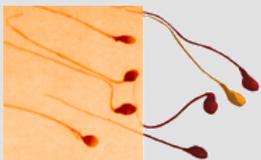
## ED-AI

<b>Tipo</b>	<b>VCL [<math>\mu\text{m/s}</math>]</b>	<b>Color Trayectoria</b>
Progresivos	$> 25$ y $\geq 5$	Rojo
No progresivos	$< 5$ y $\geq 1$	Verde
Inmóviles	$< 1$ y $\geq 0$	Azul

<b>Tipo</b>	<b>VSL [<math>\mu\text{m/s}</math>]</b>
no progresivos	$> 2.5$ y $\leq 4.0$
inmóviles (movimiento inespecífico)	$\leq 2.5$

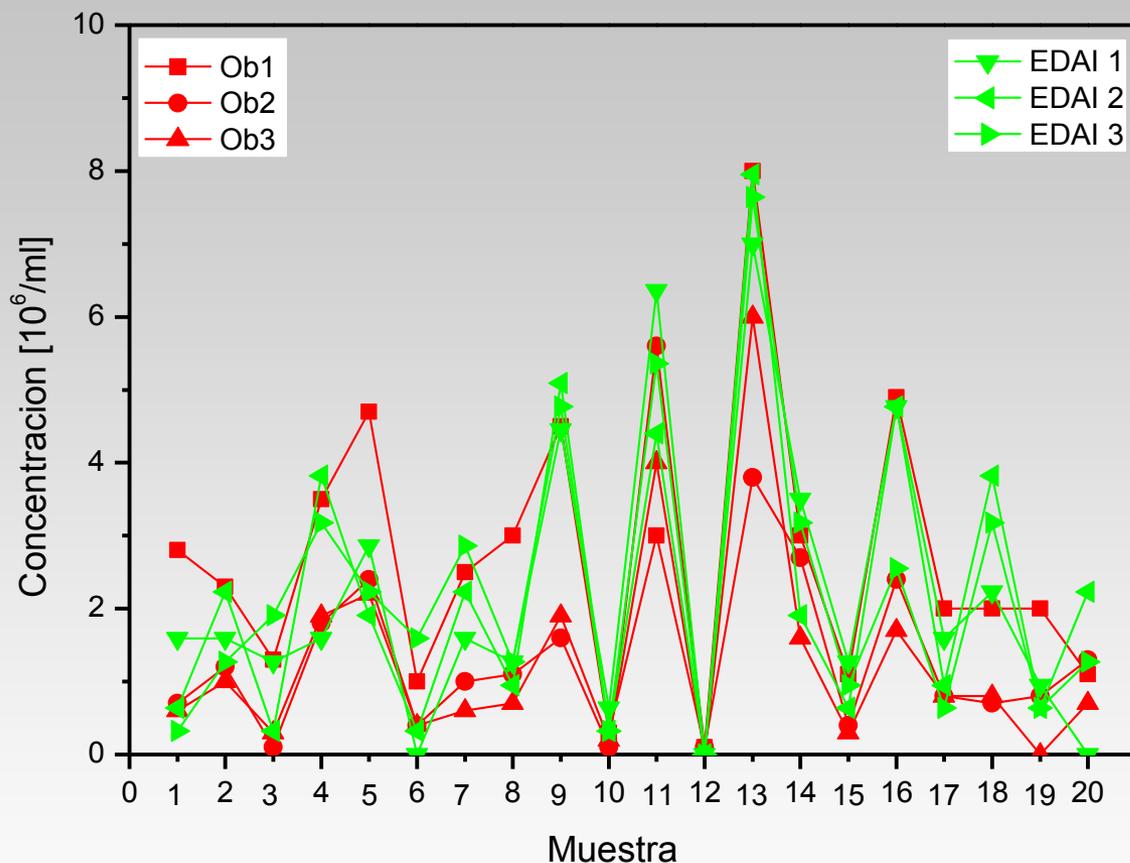
Valores de VSL para reasignar espermatozoides mal clasificados

Clasificación en Tipo de Movilidad Según VCL



# Verificación / Estandarización

Cuantificación de células redondas por tamaño.



El recuento de células redondas puede ser analizada en forma digital y automatizada con resultados que reflejan el análisis de los tres expertos nacionales.

# Morfología Espermática

- Como funciona?
  - Segmentación de cabeza
  - Segmentación de parte media y cola
  - Extracción de Características
  - Clasificación de tipo de espermatozoide

# Morfología Espermática

- Segmentación de Cabeza (Verde)
  - Basado en K-Means de colores
  - Centroides activos (Snake)
- Segmentación de Cola y Parte Media (Rojo)
  - Seguimiento de dirección según detección de cola.
  - Ajuste de función Gaussiana



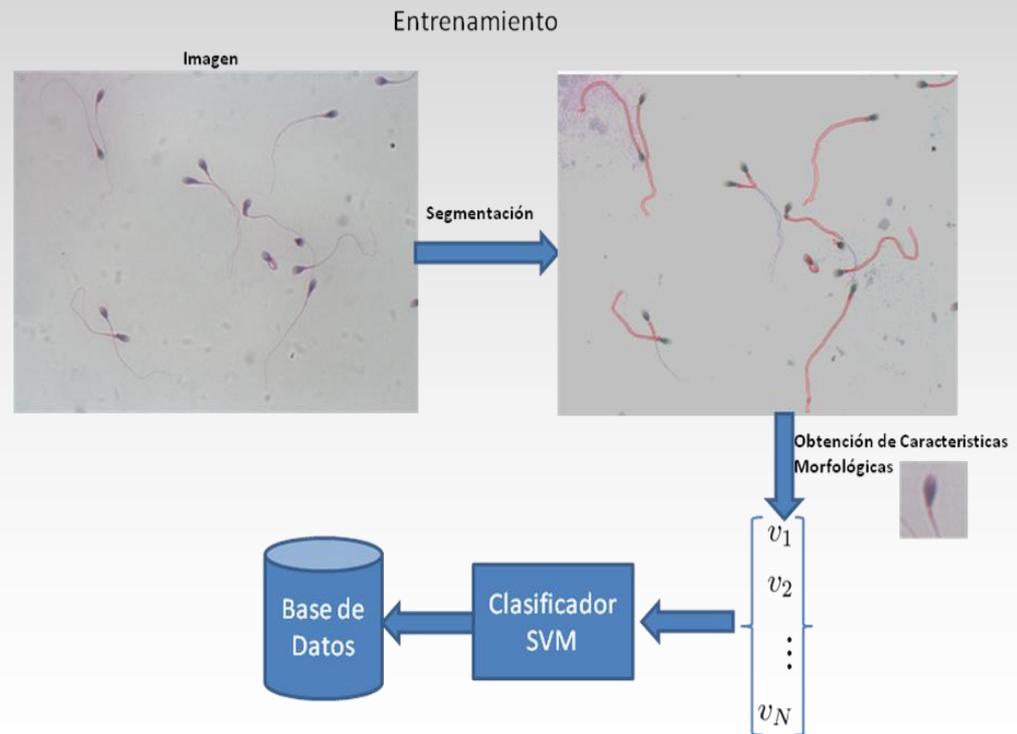
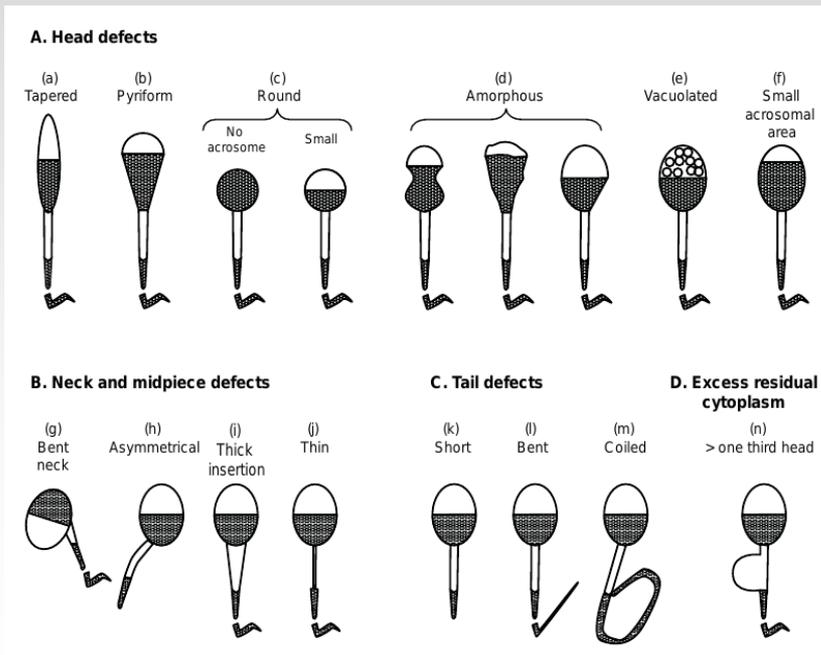
# Morfología Espermática

- Extracción de Características:
  - Características geométricas de cabeza (Área cabeza/Área Elipse, Perímetro cabeza/Perímetro Elipse, excentricidad)
  - Descriptor HOG
  - Creación de Vector de Características

$$\begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ \vdots \\ v_N \end{bmatrix}$$

# Morfología Espermática

- Entrenamiento de Clasificador
  - Clases de tipo de espermatozoides



# Morfología Espermática

## • Clasificador Final

