

Análisis de Métricas Sobre el Flagelo de Espermatozoides de Humano en 3D para su Clasificación entre Activados e Hiperactivados

H. Ehrlich¹, F. Montoya², P. Hernández¹, A. Darszon², G. Corkidi²

¹Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

²Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.

Resumen — Los espermatozoides se capacitan químicamente en el tracto genital femenino para fecundar al óvulo, y cuando dicho proceso ocurre, éstos presentan un cambio en su motilidad llamado “hiperactivación”. En este trabajo se presenta el análisis 3D de diversas métricas sobre el batido flagelar del espermatozoide de humano con el objetivo de diferenciar entre movimiento activado e hiperactivado, obteniendo resultados satisfactorios sobre métricas que en primera instancia pueden permitir una separación adecuada, y dejando las puertas abiertas para un análisis más profundo de los parámetros que permita una clasificación óptima.

Palabras clave— Clasificación, espermatozoide, flagelo, imágenes 3D.

I. INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides han sido de gran interés debido a su papel fundamental en la reproducción humana. La capacitación de estas células es un proceso bioquímico de interés que ocurre en el tracto genital femenino, mediante el cual, éstos se vuelven capaces de fecundar al óvulo. Dicho proceso tiene como consecuencia un cambio en la motilidad del espermatozoide denominado “hiperactivación”. En esta modalidad se observa que la trayectoria del espermatozoide deja de ser rectilínea, presentando fuertes impulsos de la cabeza y donde su flagelo se mueve de forma asimétrica [1], tal como se muestra en la Fig 1.

El proceso de capacitación se ha estudiado tradicionalmente en dos dimensiones (2D) con el sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), el cual ha permitido hacer la clasificación de espermatozoides a través del análisis de la trayectoria que éstos siguen (por medio del rastreo de su cabeza). Sin embargo, el análisis que realiza dicho sistema desprecia la información que proporciona el movimiento del flagelo, el cual es de suma importancia, puesto que es lo que permite el desplazamiento de estas células.

En el 2008 se revolucionó la manera de observar los espermatozoides, dado que Corkidi *et al.* [2] desarrolló un sistema que permitió por primera vez la cuantificación de trayectorias tridimensionales descritas por múltiples espermatozoides simultáneamente, y recientemente sobre su batido flagelar en tres dimensiones (3D) [3]. Con la información tridimensional que proporciona este sistema, ha sido posible concluir que el movimiento del flagelo es diferente de lo que se esperaba y que se está perdiendo información relevante cuando solamente es estudiado en 2D [3,4]. Lo anterior es de gran importancia para entender el funcionamiento de dichas células, ya que naturalmente, éstas

no se mueven únicamente sobre una superficie, sino que también lo hacen libremente en un espacio tridimensional.

Actualmente ya existen diversos sistemas que permiten la reconstrucción en tercera dimensión del flagelo de los espermatozoides, una de las más novedosas es la microscopía sin lentes, la cual permite analizar múltiples células al mismo tiempo mediante detección holográfica [5], otra de ellas es el algoritmo de “Rayleigh-Sommerfeld Back-Propagation” sobre un video bidimensional tomado a un solo plano focal [6], sin embargo, en ninguna de estas técnicas puede ser utilizada la fluorescencia, que es empleada para la detección de los procesos bioquímicos básicos que ocurren en el espermatozoide, por la naturaleza incoherente de la luz emitida. La aplicación final de los resultados del desarrollo de este trabajo pretende realizarse sobre imágenes con fluorescencia, por tal motivo el empleo de dichas técnicas fue descartado, optándose por utilizar el sistema desarrollado por Corkidi *et al.* [2,3] que es lo suficientemente sensible para medir la diferencia entre los distintos tipos de batido, y el cual no presenta dicha limitante.

En estudios realizados en 3D hoy en día no es posible observar la trayectoria y el batido flagelar del espermatozoide simultáneamente, ya que la memoria requerida para almacenar la dinámica flagelar 3D (corto plazo) y la trayectoria que describe la cabeza de esta célula (mediano plazo) rebasa la capacidad de las cámaras de alta velocidad actuales. Es por esto que este trabajo presenta métricas basadas únicamente en la forma del batido flagelar, con el objetivo de que la clasificación pueda realizarse bajo dichas circunstancias; pero sobre todo, porque ya se conoce que hay diferencias entre la motilidad del flagelo en dos y tres dimensiones. Así pues se presenta un análisis de diversas métricas representativas del movimiento del flagelo en 3D que podrían permitir una clasificación más exacta entre espermatozoides activados e hiperactivados, utilizando la información espacial tridimensional como función del tiempo. Los resultados que permitan esta clasificación serán útiles en estudios acerca de la motilidad del espermatozoide, lo cual tiene una repercusión importante en el entendimiento de su fisiología, ya que ésta, está ligada al proceso de fecundación.

II. METODOLOGÍA

Como primera etapa en este trabajo se realiza la obtención de muestras de semen de humano y éstas se

preparan bioquímicamente en un laboratorio para que pueda ser apropiada para nuestros fines. Se obtiene dos tipos de poblaciones, una de espermatozoides activados (sin capacidad de fecundar), y otra en la que una proporción de ellos se capacita artificialmente usando bicarbonato, albúmina y Ca^{2+} .

Las imágenes se obtuvieron haciendo uso del sistema desarrollado por Corkidi *et al.* [2,3], que haciendo uso de un piezoeléctrico, el cual oscila con una función triangular acercando y alejando iterativamente la lente de la cámara a la muestra, proporciona una secuencia de imágenes enfocadas a diferentes planos focales, así como la altura a la que fue capturada cada imagen. Con dicha información, haciendo una correspondencia de cada imagen con su altura, se llevó a cabo una reconstrucción en tres dimensiones de la célula para cada tiempo, obteniendo así secuencias de imágenes en 3D.

De las secuencias de imágenes obtenidas, después de haberse familiarizado con el movimiento característico de los espermatozoides de cada clase, se hizo una selección de espermatozoides típicos en muestras no sometidas al proceso de capacitación artificial, y otra de los espermatozoides con patrones de hiperactivación en las muestras capacitadas.

Las imágenes obtenidas se sometieron a un algoritmo de segmentación del flagelo desarrollado por Hernández-Herrera *et al.* [7], para identificar el conjunto de sus coordenadas (x,y,z) para cada tiempo (Fig. 2). Este algoritmo identifica los píxeles (x,y) correspondientes a la parte enfocada del flagelo en cada plano focal y los asocia con su altura (z).

Una vez dadas las listas de coordenadas del flagelo de los espermatozoides se procedió a realizar diversas métricas geométricas.

- 1) *Ángulo en Y y Z respecto a X de la recta definida por el primer y último punto del flagelo.* Sea (x_i, y_i, z_i) el punto correspondiente al centro de la cabeza del espermatozoide o punto inicial del flagelo al tiempo t , y sea (x_F, y_F, z_F) el último punto reconocido o punto final del flagelo, para el mismo tiempo t , obtenemos:

$$m_{recY}(t) = (y_F - y_i)/(x_F - x_i) \quad (1)$$

$$\alpha_{recY}(t) = \tan^{-1}(m_{recY}) \quad (2)$$

$$m_{recZ}(t) = (z_F - z_i)/(x_F - x_i) \quad (3)$$

$$\alpha_{recZ}(t) = \tan^{-1}(m_{recZ}) \quad (4)$$

donde m_{recY} y m_{recZ} es la pendiente de la recta Y y Z en función de X respectivamente, y α_{recY} y α_{recZ} son los ángulos correspondientes a m_{recY} y m_{recZ} .

- 2) *Ángulo en Y y Z respecto a X de la regresión lineal definida por los puntos del flagelo.* Dada la lista de n coordenadas correspondientes al flagelo en un tiempo t , se realiza una regresión lineal por mínimos cuadrados, así se obtiene:



Fig. 1. Imágenes obtenidas del sistema [1] de un espermatozoide activado (arriba) y uno hiperactivado (abajo).

$$m_{regY}(t) = \frac{\sum_i(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i(x_i - \bar{x})^2} \quad (5)$$

$$\alpha_{regY}(t) = \tan^{-1}(m_{regY}) \quad (6)$$

$$m_{regZ}(t) = \frac{\sum_i(x_i - \bar{x})(z_i - \bar{z})}{\sum_i(x_i - \bar{x})^2} \quad (7)$$

$$\alpha_{regZ}(t) = \tan^{-1}(m_{regZ}) \quad (8)$$

donde m_{regY} y m_{regZ} es la pendiente de la regresión lineal Y y Z en función de X respectivamente, y α_{regY} y α_{regZ} son los ángulos correspondientes a m_{regY} y m_{regZ} .

- 3) *Distancia máxima a la recta definida por el primer y último punto del flagelo.* Para todos los puntos (x_i, y_i, z_i) del flagelo en un tiempo t , se calcula la mínima distancia d_i a la recta definida en 1), es decir, la distancia sobre una recta perpendicular a la definida por el flagelo. Entonces, la máxima distancia a la recta es definida como:

$$d_{max}(t) = \max_i(d_i) \quad (9)$$

- 4) *Distancia máxima a la regresión lineal definida por los puntos del flagelo.* Definida como en el inciso anterior, pero donde las distancias d_i son definidas respecto a la regresión definida en 2).

- 5) *Diferencia de ángulos entre 2 rectas definidas en el flagelo.* Sean $p_i=(x_i, y_i, z_i)$ el punto inicial del flagelo, $p_M=(x_M, y_M, z_M)$ el punto medio y $p_F=(x_F, y_F, z_F)$ el punto final, de la misma manera que en 1) se estima la pendiente de la recta que pasa por p_i y p_M , obteniendo el vector director de la recta $u=(1, m_{recY1}, m_{recZ1})$, y otra entre p_M y p_F obteniendo el vector director $v=(1, m_{recY2}, m_{recZ2})$. El ángulo entre ambas rectas se define como:

$$\alpha = \cos^{-1} \left(\frac{u \cdot v}{\|u\| \|v\|} \right) \quad (10)$$

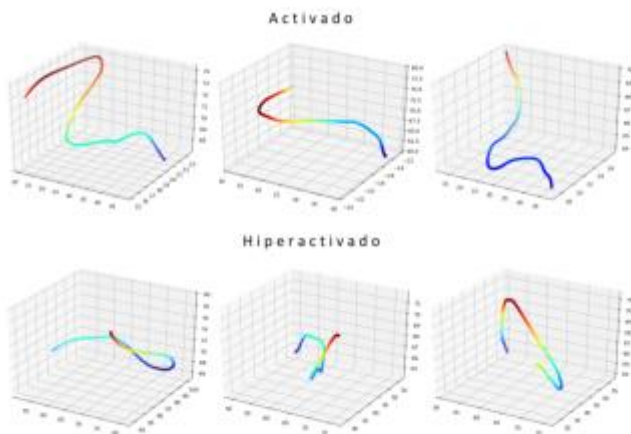


Fig. 2. Gráficas de la segmentación del flagelo de espermatozoides activados (arriba) y de espermatozoides hiperactivados (abajo), donde la escala de colores representa la coordenada en z.

- 6) *Diferencia de ángulos entre 2 regresiones definidas en el flagelo.* De manera similar a 5), usando la ecuación (10), pero aquí los vectores directores se calculan basándose en la pendiente de las rectas definidas por la regresión lineal entre todos los puntos entre p_I y p_M , y entre p_M y p_F , teniendo así $u=(1, m_{regY1}, m_{regZ1})$ y $v=(1, m_{regY2}, m_{regZ2})$.
- 7) *Razón $v=(1, m_{recY2}, m_{recZ2})$ de Curvatura Total.* Es la razón de la distancia lineal entre el primer y último punto del flagelo y la longitud de curva a un tiempo t .

$$RCT(t) = \frac{\sqrt{(x_F - x_I)^2 + (y_F - y_I)^2 + (z_F - z_I)^2}}{\sum_i \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2 + (z_{i+1} - z_i)^2}} \quad (11)$$

III. RESULTADOS

Al graficar las series de tiempo de cada una de las métricas empleadas en espermatozoides pertenecientes a cada clase, se observó que existen notables diferencias entre el comportamiento de éstas. En la Fig. 3 se muestran los resultados de cada métrica para dos espermatozoides de cada clase.

En general, se puede notar que el comportamiento de las series de tiempo de los espermatozoides activados es más regular y presenta una amplitud menor en cuanto a los valores de los parámetros a través del tiempo respecto a los espermatozoides hiperactivados.

Haciendo un análisis más detallado se encuentra que en los ángulos tanto de la recta como de la regresión, el ángulo en Y y en Z presenta un comportamiento similar en los espermatozoides activados, sin embargo, en los hiperactivados no parece haber relación alguna entre el movimiento respecto a Y y respecto a Z.

Además, haciendo uso de la Transformada de Fourier para hacer el análisis de frecuencias de los resultados del ángulo en Y de la regresión lineal, en varios espermatozoides de ambas clases, se obtuvo como resultado

la Fig 4. En ella se puede observar que la frecuencia más significativa para los espermatozoides activados se encuentra muy cercana a 15.3 Hz, mientras que en los hiperactivados la componente de frecuencia principal (9 Hz) se encuentra por debajo de la correspondiente a activados, además de presentar una mayor contribución por otras componentes.

Es interesante cómo la distancia máxima a la recta y a la regresión presentan resultados muy parecidos sobre el mismo espermatozoide, sea cual sea la clase a la que pertenece; y a pesar de que sí se puede apreciar una diferencia entre los resultados de espermatozoides activados e hiperactivados, son los parámetros menos discriminantes de todos los empleados.

Un parámetro que tiene resultados significativos es la diferencia de ángulos entre la regresión lineal de la primera y de la segunda mitad del espermatozoide, ya que es muy notable la diferencia entre los resultados de espermatozoides activados, que presentan un comportamiento casi estable respecto al de los hiperactivados, que repentinamente tiene diferencias muy grandes.

Por último, la razón de curvatura total manifiesta un comportamiento no esperado en el segundo espermatozoide hiperactivado, ya que no toma valores tan bajos de RCT como se suponía, sin embargo sí se puede observar diferencia en la variación de los valores respecto al tiempo, ya que en los activados, la variación es muy pequeña, y en los hiperactivados, sí tienden a variar en mayor medida.

IV. DISCUSIÓN

Los resultados de todos los parámetros fueron diferentes en el caso de espermatozoides activados e hiperactivados, por lo cual todos podrían ser útiles para la clasificación, sin embargo, la técnica de la utilización de un umbral como tal sobre las series de tiempo no podría funcionar, ya que en todos los casos los parámetros pueden tomar los mismos valores, sus diferencias se encuentran más bien en la forma en que el parámetro se desenvuelve a través del tiempo.

Para algunos casos un umbral aplicado sobre la amplitud de los datos, que sería la manera más simple para la clasificación, presentaría muy buenos resultados principalmente en el caso de la diferencia entre ángulos de 2 regresiones lineales, medida que aparentemente está directamente relacionada con la simetría del flagelo, por lo tanto, para los espermatozoides activados la diferencia de los ángulos es mínima, mientras que para los hiperactivados, debido a la irregularidad de su batido flagelar, la diferencia alcanza valores mucho mayores repentinamente.

La amplitud de la RCT también presenta un comportamiento similar, por lo tanto, se podría utilizar también un umbral sobre ella, solamente que al ser menos notable la diferencia, se tiene que tener un poco de cuidado en los resultados, puesto que se podría presentar menor precisión.

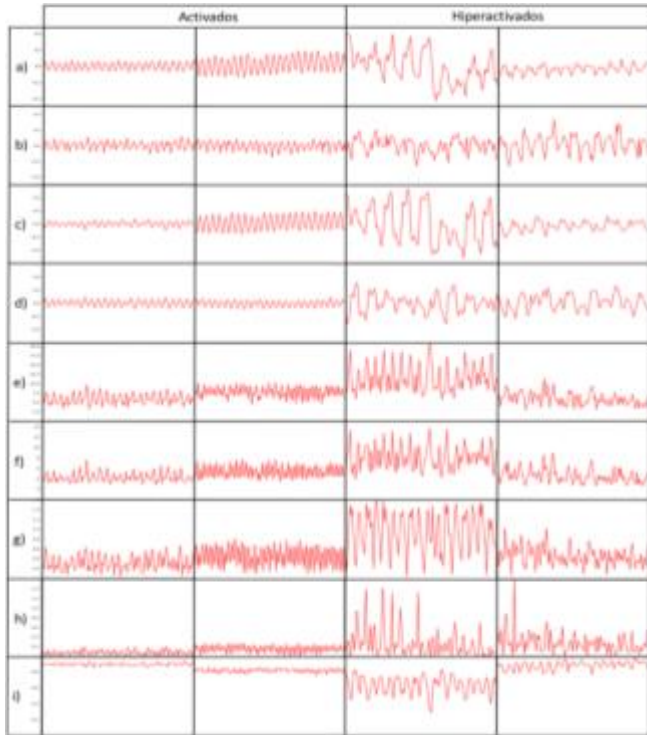


Fig. 3. Gráficas de los parámetros a) ángulo Y de la recta, b) ángulo Z de la recta, c) ángulo Y de la regresión, d) ángulo Z de la regresión, e) distancia máxima a la recta, f) distancia máxima a la regresión, g) diferencia de ángulos entre 2 rectas, h) diferencia de ángulos entre 2 regresiones e i) razón de curvatura total, todas respecto a 140 tiempos; 2 espermatozoides activados (izquierda) y 2 hiperactivados (derecha).

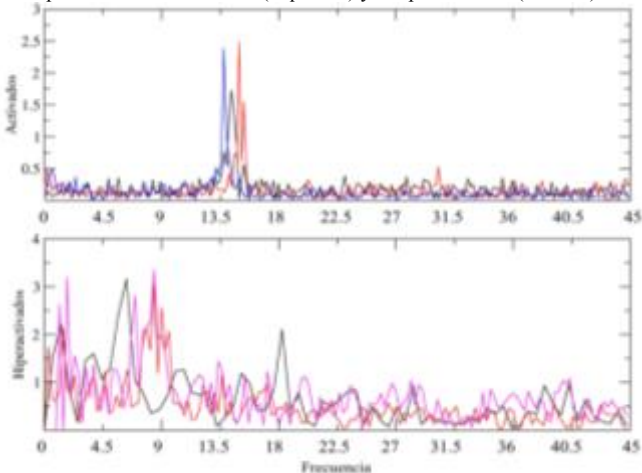


Fig. 4. Espectro de la Transformada de Fourier del parámetro "Ángulo en Y de la regresión lineal" de espermatozoides activados (arriba) e hiperactivados (abajo).

Haciendo un análisis más profundo de los resultados, empleando la transformada de Fourier para tener información acerca de la frecuencia, entonces las diferencias se vuelven enormemente notables. Lo anterior indica que, haciendo el uso más exhaustivo del espacio de frecuencias, la clasificación podría ser mucho más exacta. Queda como trabajo a futuro explorar esta estrategia a mayor profundidad con un grupo de datos de mayor tamaño.

V. CONCLUSIÓN

El presente trabajo presentó avances importantes sobre métricas 3D en base al movimiento tridimensional del flagelo de espermatozoides que pueden permitir su clasificación entre activados e hiperactivados.

En la siguiente etapa, se hará un análisis detallado de estos parámetros y se seleccionarán los más representativos que permitan una clasificación eficiente. Asimismo, en base a los resultados aquí presentados, se realizará un estudio en el que se comparan las métricas aplicadas en 2D y 3D. De esta manera será posible definir si la información tridimensional presenta un aporte significativo y cuál es la herramienta que permite realizar una mejor clasificación.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (subsidios 253952 a GC, 156667 a FMM y Borders 71 39908-Q a AD y becas postdoctorales 366844 a PH-H y 291028 a FM) y la Dirección General de Asuntos Académicos de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) (subsidios CJIC / CTIC / 4898/2016 a FM e IN205516 a AD). Agradecemos a Paulina Torres por su ayuda con los procedimientos experimentales biológicos y a Andrés Bribiesca por su apoyo computacional.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Suarez, S. S., & Ho, H. C. (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in domestic animals*, 38(2), 119-124.
- [2] Corkidi, G., Taboada, B., Wood, C. D., Guerrero, A., & Darszon, A. (2008). Tracking sperm in three-dimensions. *Biochemical and biophysical research communications*, 373(1), 125-129.
- [3] Corkidi, G., Montoya, F., Hernández-Herrera, P., Ríos-Herrera, W. A., Müller, M. F., Treviño, C., & Darszon, A. (2017). Are there intracellular Ca²⁺ oscillations correlated with flagellar beating in human sperm? *Molecular Human Reproduction*, en prensa, <https://doi.org/10.1093/molehr/gax039>
- [4] Guerrero, A., Carneiro, J., Pimentel, A., Wood, C. D., Corkidi, G., & Darszon, A. (2011). Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 17(8), 511-523.
- [5] McLeod E. & Ozcan Aydogan (2017) Microscopy without lenses. *Physics Today*. 51-56.
- [6] Bukatin, A., Kukhtevich, I., Stoop, N., Dunkel, J., & Kantsler, V. (2015). Bimodal rheotactic behavior reflects flagellar beat asymmetry in human sperm cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(52), 15904-15909.
- [7] Hernandez-Herrera, P., Montoya, F., & Rendón, J. M. (2017) Sperm Flagellum Center-Line Tracing in Fluorescence 3D+ t Low SNR Stacks Using an Iterative Minimal Path Method. *Lecture Notes in Computer Science book series (LNCS, volume 10317)*, 437-445.