

## Determinación del error en la medición de fluorescencia 2D del flagelo de espermatozoide humano durante su batido 3D

Fernando Montoya<sup>1</sup>, C.L. Treviño<sup>2</sup>, A. Darszon<sup>2</sup> y G. Corkidi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Imágenes y Visión por Computadora, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.

<sup>2</sup>Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.

**Resumen--** La movilidad es una propiedad fundamental de muchas células. El espermatozoide es una de estas células, su flagelo le permite nadar y cumplir con su objetivo principal, fecundar al óvulo. En este sentido, el estudio de cómo el calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) modula el funcionamiento de los flagelos es fundamental. La movilidad está estrechamente relacionada con los cambios de  $[Ca^{2+}]_i$  por lo que medir estos cambios es fundamental. Este análisis se realiza tradicionalmente usando colorantes fluorescentes sensibles a calcio y midiendo en dos dimensiones, despreciando las componentes tridimensionales que pueden afectar la precisión de las medidas. En este trabajo se presenta un análisis del error que se obtiene en medidas de fluorescencia 2D cuando no se toma en cuenta la naturaleza 3D del movimiento.

**Palabras clave--** Fluorescencia, Cilios, Flagelos, Espermatozoide, Visión por Computadora, Análisis de Imágenes.

### I. INTRODUCCIÓN

En el movimiento del espermatozoide, el flagelo juega un papel fundamental, por lo que entender su funcionamiento es importante para la reproducción que impacta no solo a la fisiología y la salud humana, sino a la ganadería, la pesca y a la preservación de las especies. La reproducción sexual requiere de la comunicación entre los gametos, el espermatozoide y el óvulo, sin embargo los mecanismos moleculares involucrados no se conocen con detalle. El intercambio de información entre los gametos, y entre ellos y su entorno, está cifrado en buena medida por cambios en la permeabilidad iónica de sus membranas. Los canales y transportadores iónicos tienen un papel importante en la movilidad ya que de ellos depende el  $[Ca^{2+}]_i$  que a su vez regula el nado del espermatozoide [1]. Por la complejidad de análisis del movimiento de los flagelos, los estudios reportados han limitado este análisis a dos dimensiones [2, 3, 4], cuando en la realidad, su movimiento se realiza en un espacio tridimensional.

En diferentes casos, este tipo de estudios 2D usan fluoróforos que son sensibles a los cambios en el  $[Ca^{2+}]_i$ . Un fluoróforo es una molécula que emite luz al ser excitada, con la particularidad de que las longitudes de onda de absorción y de emisión son diferentes, lo que facilita filtrar la luz para obtener altos contrastes en las imágenes adquiridas. En particular, para este trabajo, se empleó Fluo4-AM, un fluoróforo que se une a las moléculas de calcio, lo cual produce un aumento en la fluorescencia y además es permeable en la membrana celular de los espermatozoides. Con estas características, el Fluo4-AM reporta los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  presente en el flagelo, siendo la intensidad de fluorescencia el observable experimental.

El desenfoque es uno de los problemas que aparecen cuando se pretende medir la intensidad de la fluorescencia proveniente del flagelo (estructura tridimensional) en un solo plano focal a una altura fija. Este efecto se produce por el movimiento 3D de la célula, teniendo como consecuencia que la intensidad de luz emitida por el Fluo4-AM se vea amortiguada en las regiones desenfocadas, llevando a una medida incierta de la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$ .

El objetivo de este trabajo es determinar la magnitud del error que se produce al medir en un solo plano óptico (2D) la totalidad de fluorescencia emitida por la estructura tridimensional del flagelo de espermatozoide de humano. Para lograrlo, se utilizó la configuración del sistema reportado en Corkidi et al 2008 [5], en donde se hace oscilar el objetivo de un microscopio para obtener en intervalos de tiempos cortos, diferentes planos focales que contienen la estructura 3D del flagelo, y de esta manera, realizar medidas 3D que minimicen las consecuencias del desenfoque.

### II. METODOLOGÍA

El dispositivo experimental utilizado para este trabajo, descrito en [6], consiste en un microscopio óptico invertido Olympus IX71, con una cámara Optronis 5000 adquiriendo

a 3000 cuadros por segundo y con resolución de 512X512 píxeles. Para la reconstrucción 3D de la estructura de las células, se utilizó un dispositivo piezoeléctrico (Physics Instruments) acoplado a un objetivo 60x de inmersión en agua, el cual permite cambiar la altura del plano focal de manera periódica con una frecuencia de 90Hz y amplitud de movimiento de hasta 60 micras. Como producto de la alta resolución temporal de la cámara y la baja intensidad de luz que emiten las células observadas también fue necesario acoplar un intensificador de luz Hamamatsu (C9016-04). Como fuente de excitación del fluoróforo se utilizó una luz LED emitiendo a 490 nm y un bloque de filtros apropiados para Fluo 4 para separar la banda de luz emitida por las células, de la utilizada para excitarlas.

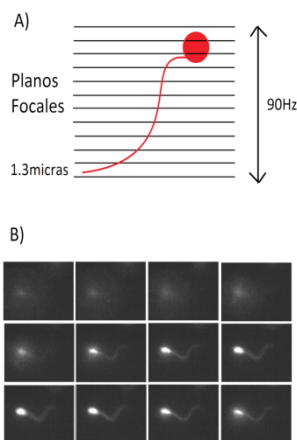


Figura 1. A) Representación de un espermatozoide y los distintos planos focales que lo enfocan en distintos puntos de su estructura. La distancia entre planos es de 1.3 micras y la frecuencia de oscilación del piezoeléctrico de 90Hz. B) Secuencia de imágenes correspondientes a un ciclo de oscilación del piezoeléctrico.

La muestra biológica de semen se colecta de un donador en un frasco estéril de plástico y se incuba en una cámara húmeda a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante ~40 minutos para su licuefacción. Después, se separan los espermatozoides móviles mediante la técnica de “swim-up” (del inglés, *nado hacia arriba* dentro de un tubo con medio HAM’s F-10) [7]. La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se mide incubando a los espermatozoides de humano aislados en medio de registro que contiene 10 μM de Fluo-4 AM (fluoróforo de Ca<sup>2+</sup>) durante 30 minutos. Posteriormente se centrifuga la suspensión y la pastilla celular se resuspende en medio de registro.

La Figura 1A muestra un esquema de la adquisición de las imágenes. La oscilación del plano focal permite el enfoque de las distintas regiones del flagelo a distintas alturas, pudiendo reconstruir la estructura completa en cada oscilación del piezoeléctrico. La Figura 1B muestra un

conjunto de imágenes consecutivas correspondientes a un ciclo del movimiento del piezoeléctrico encargado de cambiar la altura del plano focal.

El análisis de las imágenes se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se utilizó la herramienta *Simple Neurite Tracer* [6], el cual es un *plugin* que se encuentra embebido dentro de *ImageJ*, software gratuito de procesamiento de imágenes [8]. Existen otros métodos y algoritmos capaces de segmentar estructuras tubulares [9], sin embargo, no todas tienen una implementación disponible para uso gratuito y habría que implementarlas. Este *plugin* tiene como función la segmentación de estructuras tubulares en un conjunto de imágenes que reconstruyen un volumen en el espacio; utiliza algoritmos de tipo bidireccional y el Hessiano para determinar las coordenadas de la estructura. Con esta herramienta se obtiene un conjunto de puntos que representa la posición física del flagelo en cada ciclo del piezoeléctrico. De esta manera, usando como unidad de tiempo los ciclos, es posible obtener la dinámica del flagelo en 3D y hacer una proyección bidimensional del mismo que servirá para comparar las medidas en tres y dos dimensiones.

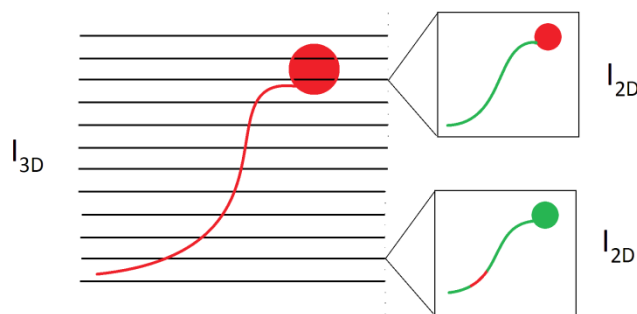


Figura 2. Del lado izquierdo se muestra que el conjunto  $I_{3D}$  se reconstruye tomando en cuenta todas las imágenes que contiene parte de la estructura del flagelo. Del lado derecho, para dos imágenes, correspondientes a alturas distintas, se muestra en rojo la sección enfocada del flagelo y en verde la proyección del resto de la estructura. Ambas secciones corresponden al conjunto  $I_{2D}$ .

La segunda parte del análisis se enfoca en la comparación entre la medida 3D de la fluorescencia del flagelo y su análoga 2D. Para alcanzar este propósito es necesario definir dos conjuntos de puntos. Llamaremos  $I_{3D}$  al conjunto de puntos que contiene la estructura tridimensional del flagelo y al conjunto que contiene la proyección bidimensional la designaremos como  $I_{2D}$ . El conjunto tridimensional se obtiene directamente de *Simple Neurite Tracer*. Su contraparte bidimensional es extraída haciendo una proyección de las distintas partes enfocadas del flagelo y proyectándolas sobre una de estas imágenes. La Figura 2 muestra un esquema de este proceso. El lado izquierdo

muestra que con el conjunto de imágenes que contienen al flagelo se construye  $I_{3D}$ ; la Figura 2B muestra una representación de la proyección 2D. La parte roja del flagelo representa la sección enfocada para esa imagen particular y en verde se muestra la sección proyectada desde las otras imágenes. Aquí se puede observar que para cada ciclo van a existir varios subconjuntos  $I_{2D}$ .

Si se toma a  $I_{3D}$  como la medida real y a  $I_{2D}$  como una medida obtenida en un solo plano focal, es posible definir al error en 2D como:

$$E = \frac{I_{2D}}{I_{3D}} \quad (1)$$

Esta medida tiende a 1 cuando el flagelo tiende a nadar en un solo plano focal debido a que los conjuntos son iguales. La medida tiende a cero cuando el flagelo tiene una componente  $Z$  mayor debido a que solo una parte está bien enfocada.

### III. RESULTADOS

La Figura 3 demuestra en primera instancia que el flagelo del espermatozoide, a pesar de nadar sobre una superficie plana de vidrio, bate en un espacio tridimensional. Para demostrar esto, se segmentó de manera tridimensional durante aproximadamente 5 batidos, el flagelo de 4 espermatozoides (cada uno representado por un color). La gráfica muestra que durante el batido flagelar, la dimensión de la componente  $Z$  (número de planos focales perpendicular al plano del vidrio) existe (batido tridimensional), y a manera de un histograma, se muestra cómo esa componente puede abarcar valores de entre 2 y 10 planos focales (equivalentes a 2.6 y 13 micras respectivamente), y con un valor medio de 4 planos focales (5.2 micras).

Por otra parte, la Figura 4 muestra el valor de  $E$ , definida en la Ecuación 1, para las cuatro células en una ventana de tiempo. En la figura, es claro que para cada ciclo del movimiento del dispositivo piezoeléctrico, hay tantos valores de  $E$  como planos en los que está contenido el batido del flagelo. Se puede apreciar que el intervalo en que varía  $E$  es (0.75, 1). Es decir, el intervalo de variación representa un porcentaje de error de hasta 25% que correspondería al plano donde el flagelo presenta mayor desenfoque.

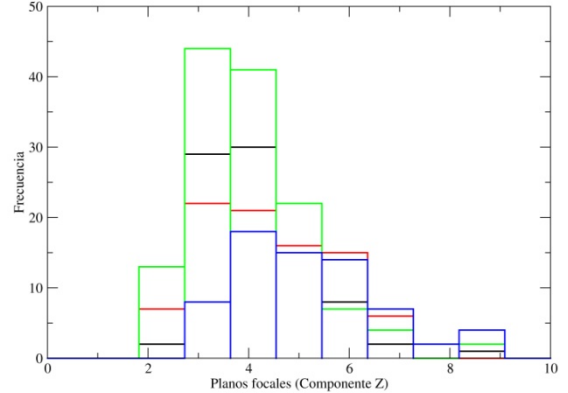


Figura 3. Histograma de la componente  $Z$  del flagelo para cuatro células que nadan sobre la superficie de un vidrio. El valor medio de la componente tridimensional es de 4 planos lo que significa una componente vertical de 5.2 micras en promedio.

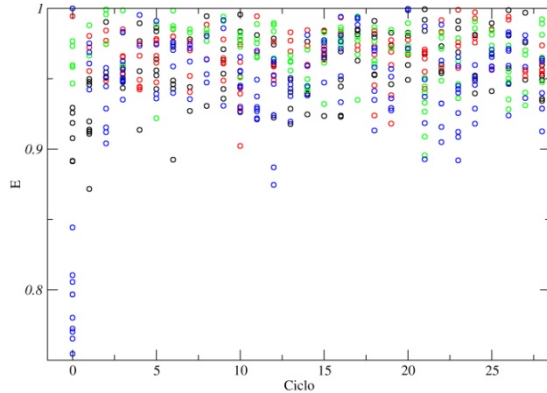


Figura 4. Gráfica de  $E$  como función del ciclo del piezoeléctrico para cuatro células. Los distintos valores de  $E$  para un mismo ciclo corresponden a las magnitudes de error en la medida de fluorescencia según su desenfoque. Esta medida tiende a 1 cuando el flagelo tiende a nadar en un solo plano focal y tiende a cero cuando el flagelo tiene una componente  $Z$  mayor debido a que solo una parte está bien enfocada.

La Figura 5 muestra la tendencia de la medida (error medio) como función de  $Z$ . De la gráfica es claro que hay una correlación entre el error en la medida 2D y  $Z$ .

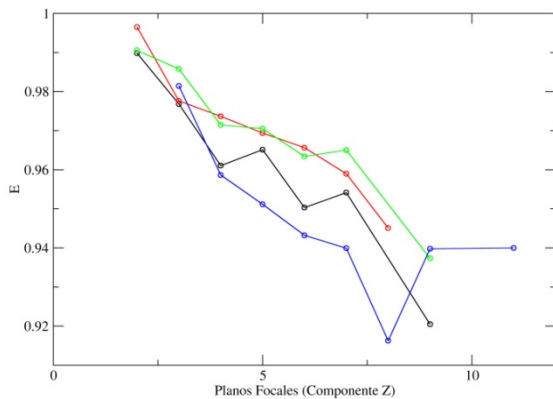


Figura 5. Medida del E como función de Z. La tendencia muestra que el error en la medida es proporcional a Z.

### III. DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos, se puede apreciar en primera instancia, que el batido de los flagelos de los espermatozoides estudiados es tridimensional a pesar de que éstos describan trayectorias de movimiento 2D cuando están pegados a la superficie de un vidrio. Esto es de vital importancia ya que tradicionalmente, por las dificultades técnicas que representa estudiar estas células en 3D, se desprecia esta componente, la cual hemos demostrado en este trabajo, que introduce errores no despreciables en las medidas de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Es importante hacer notar que el error máximo reportado en este estudio está en proporción a la componente tridimensional particular que presentaron los espermatozoides que se analizaron. Por lo que este error no representa un valor absoluto máximo y puede incrementarse considerablemente en función del movimiento particular de la población estudiada. Este análisis no pretende acotar el rango de error en valores absolutos, sino demostrar que según el propósito, resolución y sensibilidad del análisis del  $[Ca^{2+}]_i$  para estudios de motilidad o calcio en espermatozoides, será necesario considerar la componente del movimiento tridimensional del flagelo.

### IV. CONCLUSIONES

El proceso de observar un objeto tridimensional a través de un microscopio con plano focal fijo conlleva un error de

medida intrínseco. Dicho error proviene de la incapacidad de enfocar la estructura completa. Al variar el plano focal es posible capturar la estructura bajo observación de manera adecuada, y por lo tanto, tomar una medida precisa. Los resultados muestran una variación de la intensidad de fluorescencia entre las medidas 2D y 3D de hasta el 26%, como consecuencia del desenfoque. Como es natural esperar, esta diferencia tiende a aumentar con Z pudiendo llegar a valores aún mayores.

### V. AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos al personal del Laboratorio del Dr. Alberto Darszon por la ayuda brindada, en especial a Julio Chávez, Paulina Torres y Héctor Ramírez.

Este trabajo fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico; por la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) IN225406-3 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 39908-Q.

### VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Adan Guerrero, Jorge Carneiro, Arturo Pimentel, Christopher D. Wood, Gabriel Corkidi y Alberto Darszon, "Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions", *Mol Hum Reprod*, **17**, 511-523, 2011.
- [2] Adan Guerrero, Takuya Nishigaki, Jorge Carneiro, Yoshiru Tatsu, Christopher D. Wood y Alberto Darszon, "Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing", *Developmental Biology*, **344**, 52-65, 2010.
- [3] M Rocio Servin-Vences, Yoshiru Tatsu, Hisanori Ando, Adan Guerrero, Noboru Yumoto, Alberto Darszon y Takuya Nishigaki, "A caged progesterone analog alters intracellular  $Ca^{2+}$  and flagellar bending in human sperm", *Reproduction Research*, **144**, 101-109, 2012.
- [4] Susan S. Suarez, Stephen M. Varosi y Xiaobing Dai, "Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle", *PNAS*, **90**, 4460-4664, 1993.
- [5] G. Corkidi, B. Taboada, C. D. Wood, A. Guerrero y A. Darszon, "Tracking sperm in three-dimensions", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **373**, 125-129, 2008.
- [6] F. Frangi, W. J. Niessen, K. L. Vinc y M. A. Viergever, "Multiscale Vessel Enhancement Filtering", *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention — MICCAI'98 Lecture Notes in Computer Science* **1496**, 130, 1998.
- [7] Jose Luis de la Vega-Beltran, Claudia Sánchez-Cárdenas, Dario Krapf, Enrique O. Hernandez-González, Eva Werthelmer, Claudia L. Treviño, Pablo E. Visconti y Alberto Darszon, "Mouse Sperm Membrane Potential Hyperpolarization Is Necessary and Sufficient to Prepare Sperm for the Acrosome Reaction", *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 44384-44393, 2012.
- [8] <http://imagej.nih.gov/ij/>
- [9] David Lesage, Elsa D. Angelini, Isabelle Bloch y Gareth Unka-Lea, "A review of 3D vessel lumen segmentation techniques: Models, features and extraction schemes", *Medical Image Analysis*, **13**, 819-845, 2009.