

Determinación de curvatura de flagelos de espermatozoide en espacio 3D.

Silva-Villalobos, F.¹, Montoya F.², Darszon, A.², Corkidi, G.².

¹ Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México, franksv@ibt.unam.mx.

² Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México, darszon@ibt.unam.mx, corkidi@ibt.unam.mx.

Resumen— El espermatozoide de humano, al entrar en contacto con los fluidos del tracto genital femenino adquieren la habilidad de fecundar al óvulo. Este proceso se conoce como 'capacitación', en el cual se observan patrones de hiperactividad en la célula, particularmente en el flagelo. Sin embargo, no todos logran adquirir esta condición y no logran cumplir su cometido. En este trabajo se presenta un método basado en el análisis de valores de curvatura local de datos tridimensionales (3D) del flagelo del espermatozoide para detectar células capacitadas y no capacitadas. Las herramientas actuales sólo se basan en datos bidimensionales (2D), sin tener en cuenta la información tridimensional (3D) presente en el batido flagelar. Los resultados preliminares alcanzados muestran que el método es viable, constituyendo una herramienta poderosa para extender los estudios de motilidad del flagelo del espermatozoide a tres dimensiones.

Palabras clave— Imágenes 3D, espermatozoide, flagelo, curvatura, segmentación.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los temas estudiados en el campo de la fisiología celular del espermatozoide es la motilidad, que entre otros, considera la habilidad de desplazamiento de la célula. En este fenómeno juega un papel muy importante el flagelo, el cual impulsa al espermatozoide ayudándolo a trasladarse a través del aparato reproductor femenino. Es aquí donde las células adquieren la capacidad de fecundar al óvulo realizando la reacción acrosomal [1].

La capacitación es el proceso complejo que ocurre de manera natural durante el viaje por el tracto femenino. Este involucra una serie de eventos fisiológicos, entre los cuales está el cambio en el movimiento del espermatozoide y en especial de su batido flagelar. Esta condición fisiológica muestra patrones de hiperactividad, pues su trayectoria deja de ser rectilínea, convirtiéndose en oscilante y caracterizada por fuertes impulsos de la cabeza [2]; asimismo, el movimiento del flagelo deja de ser simétrico. Es importante destacar que cuando se incuba con medios que favorecen la capacitación en condiciones *in vitro*, el porcentaje de espermatozoides con características de células capacitadas es bajo. Es por ello la importancia de obtener herramientas sensibles que permitan el estudio de este fenómeno, al tener gran impacto en un tema de vital importancia como es la fertilidad.

Las herramientas utilizadas en el estudio de la hiperactividad tales como el CASA (Computer-Assisted

Sperm Analysis), permiten clasificar una población determinada de espermatozoides, basados en algoritmos de procesamiento sobre imágenes adquiridas durante el nado de espermatozoides sobre la superficie de una laminilla. Para determinar la hiperactividad se calculan una serie de variables, como son VCL (velocidad curvilínea), VSL (velocidad rectilínea), ALH (magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide) y LIN (linealidad de la trayectoria curvilínea), entre otros [3, 4, 5].

La herramienta antes mencionada utiliza imágenes adquiridas de un solo plano focal del microscopio (bidimensional (2D)), despreciando cualquier información tridimensional (3D) proveniente del movimiento del espermatozoide, en especial de su batido flagelar, componente importante dentro de la dinámica de desplazamiento de la célula.

Por lo antes mencionado, en este trabajo presentamos un método basado en el análisis de los valores de curvatura local del flagelo del espermatozoide utilizando datos de segmentación 3D. Con esta metodología, pretendemos aportar de manera cuantitativa, un parámetro que permita evaluar en tres dimensiones el estado fisiológico del espermatozoide en cuanto a su estado de capacitación. Cabe hacer notar que hasta el momento, no existen antecedentes del uso de esta información tridimensional para este tipo de estudio, por lo que este trabajo representa una valiosa herramienta con repercusiones importantes en el campo de la fecundación del espermatozoide.

En una primera fase de este proyecto, el método se aplicó en 2 poblaciones de espermatozoides (capacitados y no capacitados), mostrando resultados preliminares.

II. METODOLOGÍA

Para obtener y preparar la muestra biológica, se colecta una muestra de semen de un donador en un frasco estéril de plástico y se incuba en una cámara húmeda a 37° C y 5% de CO₂ 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). Los espermatozoides móviles recuperados (no capacitados) se incuban durante 5 horas en una cámara húmeda a 37° C y 5 % de CO₂ en un medio con bicarbonato, albumina y Ca²⁺ para promover la capacitación y la hiperactivación [6]. De esta manera se obtienen las dos poblaciones de espermatozoides separadas (capacitados y no capacitados).

Las adquisición de las imágenes fue realizada utilizando el sistema experimental desarrollado por Corkidi *et al.* [7], con el que se obtuvo secuencias de imágenes con información tridimensional del volumen que contiene las muestras.

Se utilizó el método de segmentación 3D del flagelo de espermatozoide humano desarrollado recientemente por nuestro grupo de trabajo [8], el cual se apoya en la herramienta 'Simple Neurite Tracer' desarrollada por Longair *et al.* [9] y que permite la segmentación de estructuras tubulares utilizando el método de búsqueda bidireccional A* y el cálculo de la matriz de Hessiano en 3D con el que se encuentran las principales componentes de cambio dentro de las imágenes. Con ello obtenemos las partes del flagelo que se encuentran en foco en cada imagen adquirida a diferente altura. En la Fig. 1 se ilustra un ejemplo.

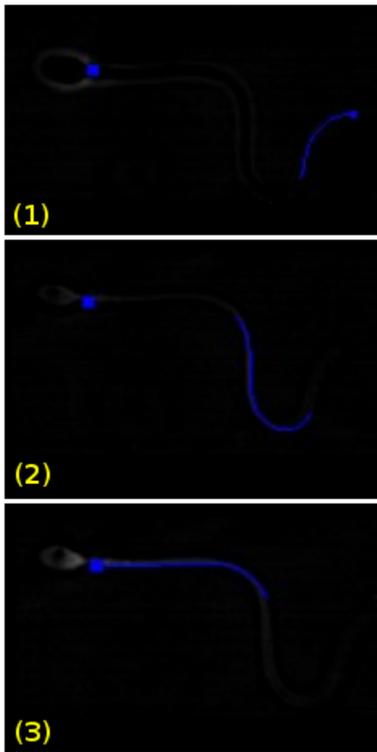


Fig. 1 Imágenes sucesivas de un espermatozoide. En azul se observa la zona ya segmentada. Se ilustra el comportamiento 3D de este espermatozoide ya que las imágenes fueron adquiridas a diferentes alturas.

Luego de realizar la segmentación del flagelo del espermatozoide a lo largo del nado en la secuencia, obtenemos datos tridimensionales de la posición espacial del flagelo, los cuales pueden representarse como una lista de puntos consecutivos con información local de su situación espacial. En la Fig 2 se ilustra el resultado de la segmentación del flagelo de un espermatozoide.

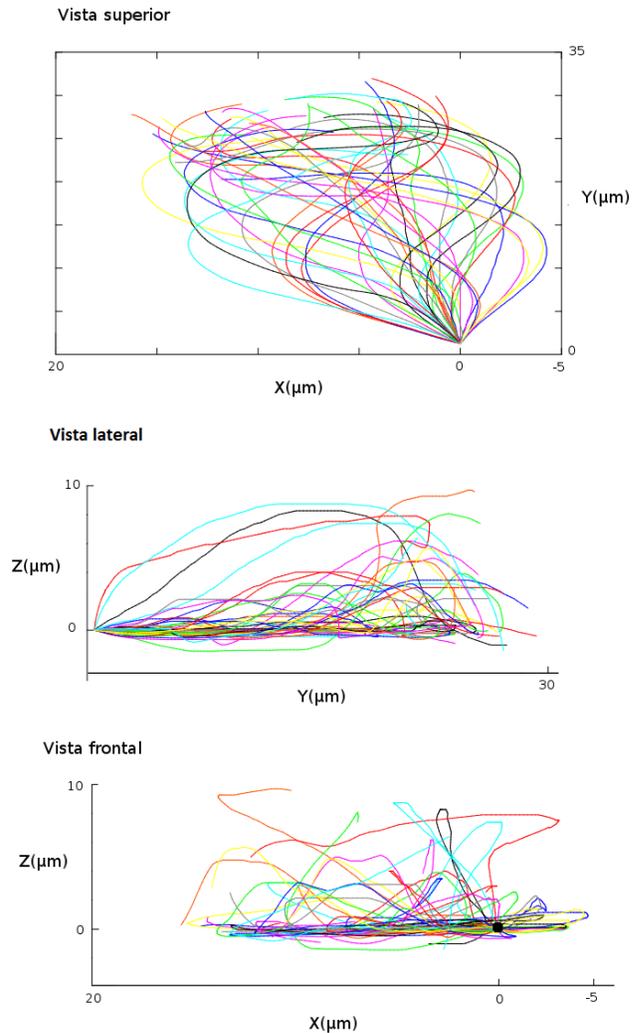


Fig. 2 Se ilustra la segmentación de los batidos flagelares de un espermatozoide.

Nuestro método realiza el cálculo de curvatura local sobre cada uno de los puntos que describe el movimiento del flagelo. La Fig. 3 ilustra el método, en donde:

- P_c : Punto de cálculo de curvatura.
- P_i : Punto inicial de cálculo de curvatura.
- P_f : Punto final de cálculo de curvatura.
- L_c : Línea curva que describe el flagelo en los puntos de cálculo de curvatura.
- L_r : Línea recta que une los puntos P_i y P_f .

El cálculo de curvatura local está dado por:

$$Curv = \frac{L_r}{L_c} \quad (1)$$

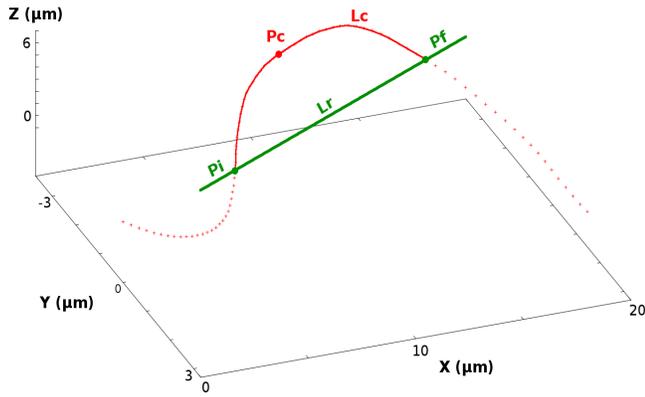


Fig. 3. En la figura se ilustra el método utilizado en el cálculo de curvatura local del flagelo del espermatozoide. Se representa un batido flagelar del espermatozoide, el cual tiene una frecuencia de batido de aproximadamente 20 Hz [10].

La lista de puntos que describe el flagelo del espermatozoide puede ilustrarse como una lista de vectores ordenados:

$$\left[\vec{V}_i \right]_{i=1}^N \quad (2)$$

cuya representación está dada por:

$$\vec{V}_i = (x_i, y_i, z_i) \quad (3)$$

La longitud de la curva que describe el flagelo en los puntos de cálculo está dada por:

$$L_c = \sum_{i=1}^{N-1} \sqrt{(x_i - x_{i+1})^2 + (y_i - y_{i+1})^2 + (z_i - z_{i+1})^2} \quad (4)$$

La distancia entre P_i y P_f está dada por la longitud del segmento que los une:

$$L_r = \sqrt{(x_i - x_f)^2 + (y_i - y_f)^2 + (z_i - z_f)^2} \quad (5)$$

Los valores de curvatura calculados en cada punto del flagelo poseen valores en el intervalo $(0,1]$, siendo las regiones de poca curvatura aquellas donde el valor sea próximo a 1.

III. RESULTADOS

En este trabajo se presenta una prueba de viabilidad del método desarrollado, para lo cual se analizó el batido flagelar (durante aproximadamente 60 batidos) de 2 espermatozoides que pertenecen a dos poblaciones diferentes (capacitados y no capacitados). En la Fig. 4 se

muestran los histogramas de curvatura local realizado sobre los datos extraídos mediante la segmentación 3D del flagelo.

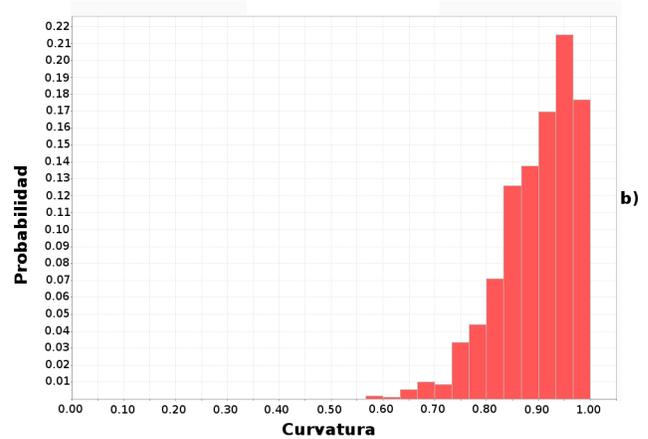
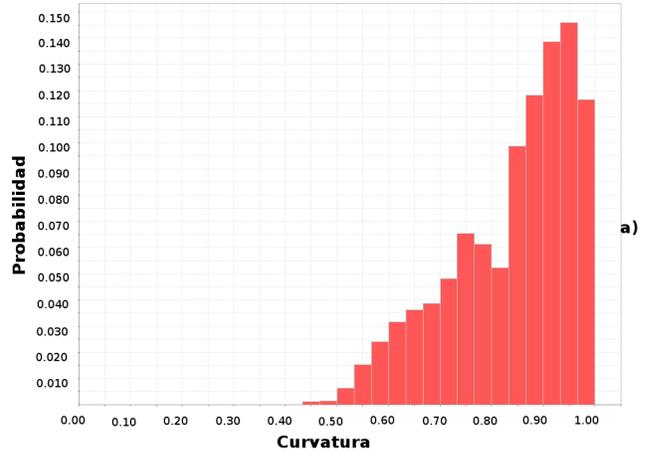


Fig. 4. Histograma de curvatura local del flagelo de espermatozoides (durante 60 batidos aproximadamente) pertenecientes a dos poblaciones diferentes: a) capacitados. b) no capacitados.

Puesto que el análisis de curvatura es local, cada barra del histograma representa la frecuencia de aparición de cada componente de curvatura del flagelo que se presenta en sus diferentes zonas.

Se puede observar que existe diferencia en la zona de máxima curvatura (valores menores a 0.8 de curvatura) en donde se nota una mayor frecuencia de datos en la población capacitada (Fig. 2a). El espermatozoide de la población capacitada tiene un 33% de los datos en la zona de máxima curvatura mientras que el perteneciente a la población de no capacitados tiene un 10% en la misma zona (Fig. 2b).

Si bien en este estudio preliminar se cuenta con resultados alentadores de identificación de espermatozoides a través del cálculo de la curvatura del flagelo en el espacio

3D, es necesario hacer una validación formal de este método sobre un volumen mayor de datos.

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la actualidad las herramientas utilizadas en la evaluación cuantitativa de parámetros relacionados a la motilidad de espermatozoides sólo utilizan información 2D, a pesar del comportamiento 3D que posee el flagelo (componente importante en la motilidad de la célula).

Los parámetros que utiliza el sistema CASA están diseñados para analizar el batido bidimensional del espermatozoide, confinando mecánicamente su batido al espacio entre dos superficies de vidrio. Esta configuración de entrada afecta el batido flagelar ya que se aplican fuerzas externas sobre el flagelo. El método que proponemos tiene la ventaja que analiza el batido 3D del flagelo del espermatozoide en su nado sobre la superficie del vidrio, condición que se puede considerar semejante a la realidad cuando los espermatozoides tienen que nadar por el tracto femenino. En los últimos años ha crecido el interés por el estudio de la motilidad de esta célula en situaciones que simulen la realidad (3D), ya sea caracterizando el batido del flagelo o la trayectoria de nado de la célula, demostrándose en varios trabajos la diferencia que existe entre 2D y 3D [7, 11, 12].

En este trabajo, se obtuvieron datos de segmentación en 3D del flagelo de espermatozoides de humano pertenecientes a poblaciones diferentes (capacitados y no capacitados). Realizando cálculos de curvatura local sobre los datos tridimensionales del flagelo (durante 60 batidos), se encontró mayor frecuencia de componentes de alta curvatura en el espermatozoide perteneciente a la población de capacitados, llegando a tener aproximadamente un 13% de diferencia con respecto a la clase no capacitada.

El presente trabajo mostró resultados alentadores y requiere una validación formal con un mayor volumen de datos, lo cual se realizará en el futuro inmediato y en el que además tendremos en cuenta el cálculo de otras variables, como pueden ser: torsión del flagelo, velocidad de batido flagelar y velocidad de traslación del espermatozoide.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos al personal del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide la ayuda brindada, en especial a Paulina Torres, Omar José Ramirez y Fabio Herrera.

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 y 128566.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Yanagimachi, R. (1994) Mammalian fertilization. In Knobil, E., Neill, J.D. (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York .
- [2] Suarez, S.S. (1996) Hyperactivated motility in sperm, en *J. Androl.*, 17, 331–335.
- [3] Aida M. Cancel, Danelle Lobdell, Pauline Mendola, Sally D. Perreault, en *Human Reproduction*, vol.15 no.6 pp.1322–1328, 2000.
- [4] WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (2010), WHO Press, Geneva, Switzerland, 5^a edición.
- [5] Sperm Class Analyzer (2013) User manual, Barcelona, España.
- [6] [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 (2012) Mouse Sperm Membrane Potential Hyperpolarization Is Necessary and Sufficient to Prepare Sperm for the Acrosome Reaction, *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 44384–44393.
- [7] Corkidi, G., Taboada, B., Wood, C., Guerrero, A. y Darszon, A. (2008) Tracking sperm in threedimensions. En *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 373 (1):125–129. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.189.
- [8] Silva-Villalobos F, Pimentel JA, Darszon A, Corkidi G. (2014) Imaging of the 3D dynamics of flagellar beating in human sperm. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2014; 2014:190-3. doi: 10.1109/EMBC.2014.6943561.
- [9] Mark H. Longair, Dean A. Baker, Douglas Armstrong (2011) Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. En *Bioinformatics*, Vol. 27 no. 17, pages 2453–2454, doi:10.1093/bioinformatics/btr390 .
- [10] Smith DJ, Gaffney EA, Gadelha H, Kapur N, Kirkman-Brown JC. (2009) Bend propagation in the flagella of migrating human sperm and its modulation by viscosity, *Cell Motil, Cytoskeleton*. 66: 220– 236 .
- [11] Adán Guerrero, Jorge Carneiro, Arturo Pimentel, Christopher D. Wood, Gabriel Corkidi, Alberto Darszon (2011) Strategies for locating the female gamete: the importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions. *Molecular Human Reproduction*, Vol.17, No.8 pp. 511– 523, 2011.
- [12] Jan F. Jikeli, Luis Alvarez, Benjamin M. Friedrich, Laurence G. Wilson, René Pascal, Remy Colin, Magdalena Pichlo, Andreas Rennhack, Christoph Brenker, U. Benjamin Kaupp (2015) Sperm navigation along helical paths in 3D chemoattractant landscapes. *Nature*. DOI: 10.1038/ncomms8985