

Parámetros para evaluar la motilidad del espermatozoide, medición indirecta del batido del flagelo *

Cecile Bustamante-Gómez * Juan E. Sosa-Hernández *
Aaron Vazquez-Jimenez * Jesús Santana-Solano *
Jesús Rodríguez-González * Blanca E. Galindo *

* Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional, Unidad Monterrey. Vía del Conocimiento 201,
PIIT, Apodaca, N.L. México. C.P. 66600 (e-mail:
bgalindo@cinvestav.mx)

Resumen: La motilidad del espermatozoide, una propiedad que radica en su flagelo, es la capacidad de realizar movimientos complejos y coordinados necesarios para el proceso de fecundación. Se sabe que el batido flagelar del espermatozoide de erizo de mar es regulado por la composición iónica del medio, sin embargo hasta el momento no se cuenta con una parametrización adecuada de la motilidad que nos permita evaluar de manera sencilla cómo estos cambios en el medio afectan la motilidad del espermatozoide. En este trabajo se exploró la búsqueda de parámetros para la evaluación de la motilidad del espermatozoide de erizo de mar, *Strongylocentrotus purpuratus*, los cuales serán útiles para el estudio de efectos biológicos; para ello se monitoreó el nado de 97 espermatozoides bajo un espacio confinado, mediante la implementación de un algoritmo basado en el seguimiento de partículas que nos permitió caracterizar tres parámetros de motilidad del espermatozoide de erizo de mar: radio de curvatura media, rapidez instantánea y cambio del ángulo del vector velocidad. Además, encontramos que el cambio del ángulo del vector velocidad, puede ser utilizado para medir indirectamente la frecuencia de batido del flagelo.

Keywords: motilidad, espermatozoide, flagelo, trayectoria, rapidez.

1. INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides son células móviles y requieren de esta capacidad para poder fecundar al óvulo. Sin embargo, la motilidad es un proceso que aún no está bien entendido. En el espermatozoide, de erizo de mar, se han dilucidado algunos de los componentes moleculares de la vía de transducción de señales que activan el movimiento y conducen al espermatozoide hasta el óvulo, Morisawa (1994); Garbers (1989). Sin embargo, para conocer más acerca de cómo ocurre la transducción de la señal para que se dé el movimiento del flagelo, se requiere de la evaluación de la motilidad.

El espermatozoide de erizo de mar, es una célula muy pequeña que consiste en una cabeza cónica de aproximadamente $2 \mu\text{m}$ de diámetro y $4 \mu\text{m}$ de alto, y un flagelo de aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$ de diámetro y $50 \mu\text{m}$ de largo, Darszon et al. (2008), lo que dificulta el seguimiento del flagelo en movimiento, dejando como opción más viable para el estudio de la motilidad seguir solamente la cabeza del espermatozoide. Algunos parámetros simples como la velocidad traslacional media y velocidad angular, ya se han evaluado para diferentes especies de espermatozoides, Boryshpolets et al. (2013), bajo diferentes condiciones,

siguiendo la cabeza de los espermatozoides en 2D. Sin embargo, observamos que no se tiene un consenso en cómo evaluar algunos de estos parámetros para el espermatozoide de erizo de mar, siendo éste un modelo predilecto para estudios de quimiotaxis y fecundación.

El batido generado por el flagelo propulsa al espermatozoide de erizo de mar a través de un fluido a una velocidad de aproximadamente $200 \mu\text{m/s}$, Gray and Hancock (1955); Gray (1955); Riedel et al. (2005), usualmente en trayectorias helicoidales (en 3D). Si el espermatozoide se acerca a una superficie plana (en 2D), por interacciones hidrodinámicas, queda atrapado en esa superficie siguiendo trayectorias de nado circulares con sentido antihorario y de un diámetro aproximado de 30 a $100 \mu\text{m}$, Gray and Hancock (1955); Gray (1955). Estas características de nado en 2D sólo han sido estudiadas en célula única, es decir siguiendo sólo la trayectoria de un espermatozoide aislado, sesgando la muestra con un bajo número de espermatozoides modelo.

Por lo anterior descrito, se hace necesario conocer los parámetros y patrones del movimiento del espermatozoide, relacionados al batido del flagelo, que permitan una buena evaluación de la motilidad en 2D, en un gran número de células y sin necesidad de un montaje experimental complicado para 3D. Es así que en este trabajo reportamos los diferentes parámetros de motilidad de los esperma-

* Este trabajo se realizó con el apoyo del Cinvestav y del donativo de CONACyT para Ciencia Básica No. 82831 a B.E.G.

tozoides de erizo de mar observados en 2D, como son: radio de curvatura media, rapidez instantánea y cambio del ángulo del vector velocidad, así mismo proponemos que el seguimiento de este último parámetro puede utilizarse para medir la frecuencia de batido del flagelo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

Los espermatozoides de erizo de mar *S. purpuratus* se obtuvieron mediante una inyección intracelómica de KCl 0.5 M y se diluyeron 1:1000 en agua de mar artificial (ASW, *Artificial Sea Water*) a 4°C y pH de 7.0, para mantenerlos inmóviles hasta el momento del ensayo. Para cada ensayo se diluyeron 1:100 en ASW pH 8.0 (ASW8). Transcurridos 40 s de su dilución en el medio de ensayo, contenido en la cámara de registro, se adquirieron 30 s de video del nado del espermatozoide.

2.2 Cámaras de registro

Para el registro de los videos se fabricaron cámaras desechables de Polydimethylsiloxane (PDMS) con el "SYLGARD® 184 SILICONE ELASTOMER KIT" (Dow Corning Corporation) de la siguiente manera: se virtieron 4 ml de PDMS en un vidrio de 5 cm por 5 cm y se dejaron polimerizar a 120°C por 30 minutos, con lo que se formó un cuadrado de PDMS de ≈ 1 mm de alto y 5 cm por lado. El cuadrado se cortó en cuatro partes iguales, cada cuarto de PDMS se perforó con dos círculos unidos de 8 y 11 mm de diámetro cada uno.

Las cámaras de registro se colocaron sobre cubreobjetos tratados con 0.05% w/v de *Polivinilpirrolidona* (PVP40) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), por lo menos media hora, para evitar que los espermatozoides se adhieran al vidrio, Berke et al. (2008).

2.3 Equipo

La adquisición de los videos se realizó mediante una cámara digital MyoCam-S (IonOptix LLC, USA) en un microscopio óptico invertido Eclipse Ti (Nikon Instruments Inc.), con un objetivo 40x/0.75 con un aumento óptico de 1.5x. La adquisición de los videos se realizó a 90 cuadros por segundo (fps, *frames per second*) y se desfragmentaron en imágenes para su análisis posterior.

2.4 Procesamiento de imágenes

Para generar las trayectorias de los espermatozoides se desarrolló un algoritmo en Matlab, donde se realizaron cinco etapas de procesamiento imágenes:

1. Restauración de las imágenes para corregir la calidad y el contraste.
2. Filtrado para remover el fondo y dejar sólo los puntos con mayor intensidad (correspondientes a la cabeza del espermatozoide).
3. Localización de picos de intensidad en la imagen.
4. Refinación de la posición de la cabeza del espermatozoide, localizando los centroides dentro de la zona con mayor intensidad.

5. Unión en tiempo de las posiciones de la cabeza de los espermatozoides para construir las trayectorias.

La restauración de las imágenes se llevó a cabo por medio de una corrección del contraste e incremento de la intensidad entre el fondo y la cabeza de los espermatozoides. Con el fin de obtener los centroides de la cabeza de los espermatozoides (y por consiguiente la posición de la cabeza del espermatozoide); se utilizó la convolución entre una función Gaussiana (ver Ecuación 1) y la imagen, obteniendo así el radio aparente (w), en pixeles, de la cabeza del espermatozoide. Así, tomando ahora como base el diámetro de la cabeza, se traza un área circular en pixeles y se hace una comparación por toda la imagen. De tal suerte, que se descartan aquellas áreas de la imagen que no cumplan con el parámetro de área generado (A_{λ_n}) con normalización $B = [\sum_{i=-w}^w \exp(-(i^2/4\lambda_n^2))]^2$ en donde λ_n es la correlación del ruido o longitud del ruido, en pixeles, presente en la imagen.

$$A_{\lambda_n}(x, y) = \frac{1}{B} \sum_{i, j=-w}^w A(x+i, y+j) \exp\left(-\frac{i^2 + j^2}{4\lambda_n^2}\right) \quad (1)$$

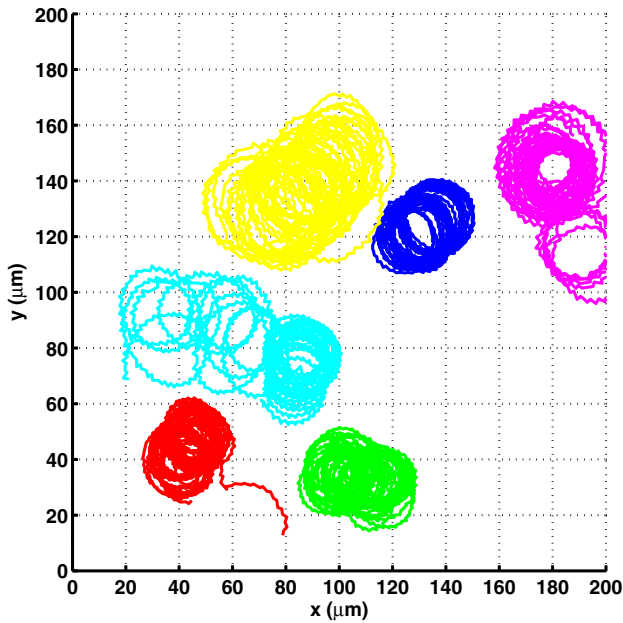
La trayectoria se construye al relacionar las posiciones entre dos imágenes consecutivas. Tomando en cuenta que no hay interacción entre los espermatozoides, se implementó el algoritmo de Crocker and Grier (1996) para ligar posiciones, con la consideración de no interacción entre partículas Brownianas. Primero se establece la probabilidad de desplazamiento del espermatozoide a una distancia en el plano en un instante de tiempo, es decir, la velocidad del espermatozoide. Para un ensamble similar de N espermatozoides idénticos se asignan etiquetas. Para reducir la complejidad de asignación de etiquetas se acota la distribución de probabilidad del desplazamiento característico. Por último, se hace una adecuación para cuando los espermatozoides salen de la imagen y la trayectoria no es clara, por lo que se considera como trayectoria "perdida", para evitar conflictos. Una vez obtenida la trayectoria de los espermatozoides tomando en cuenta el sistema de referencia a la esquina superior izquierda como el origen, a la derecha el eje X positivo y hacia abajo el eje Y positivo, se analizaron los siguientes parámetros:

1. Radio de curvatura media.
2. Rapidez instantánea.
3. Cambio del ángulo del vector velocidad.

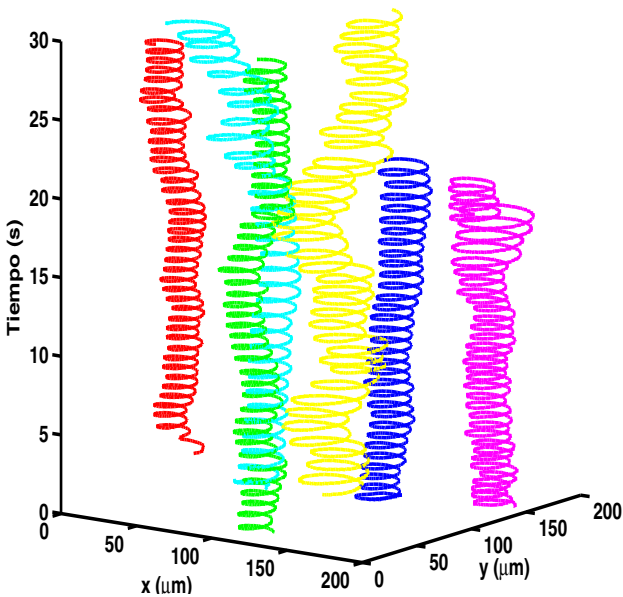
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Trayectoria

Se realizaron seis videos de espermatozoides provenientes de seis diferentes erizos de mar, donde logramos seguir aproximadamente a 97 espermatozoides. Los espermatozoides de *S. purpuratus* nadan en contra de las manecillas del reloj describiendo una trayectoria circular, lo cual coincide con reportes anteriores, Riedel et al. (2005), (ver Figura 1(a)). Debido a la resolución temporal con la que se adquirieron los videos, nos percatamos de que la forma de la trayectoria no es simplemente un círculo, sino más bien las trayectorias parecen estar constituidas por dos componentes, una de ellas regida por la ecuación de un círculo, y la otra por una función sinusoidal que le otorga



(a) Trayectorias en plano X, Y.

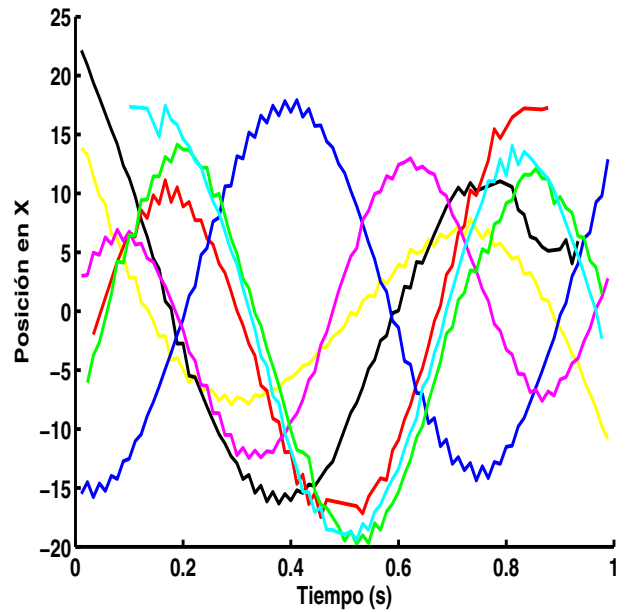


(b) Reconstrucción en el tiempo.

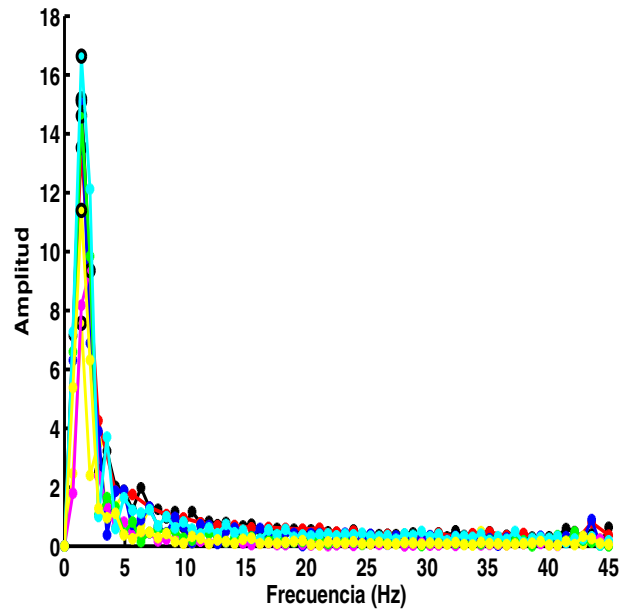
Figura 1. Trayectorias típicas descritas por los espermatozoides durante 30 s de nado. Donde cada color representa a un espermatozoide elegido al azar.

al círculo no ser una simple línea continua, sino más bien una línea en forma de zigzag. Se torna interesante hacer un análisis teórico que demuestre la naturaleza de este supuesto.

Al realizar una reconstrucción de la trayectoria en el tiempo, encontramos que la forma de la trayectoria no se ve afectada en el tiempo, por lo menos durante 30 s, por lo tanto, para facilitar el análisis, se segmentaron las trayectorias en bloques de 1 s, tiempo en el cual la mayoría de los espermatozoides completan al menos una vuelta de la trayectoria circular (ver Figura 1(b)).



(a) Posición de la cabeza del espermatozoide en la coordenada X en el tiempo.



(b) Amplitud del espectro de la posición del espermatozoide.

Figura 2. Radio de curvatura media. Donde cada color representa a un espermatozoide elegido al azar.

3.2 Radio de curvatura media

Tomando como referencia la posición de la cabeza del espermatozoide en las coordenadas X o Y, se generó una serie en el tiempo (ver Figura 2(a)), de la cual se obtuvo la amplitud del espectro mediante la transformada discreta de Fourier (DFT):

$$F(k) = \sum_{j=1}^N x(j)\omega_N^{(j-1)(k-1)}, \quad (2)$$

donde $\omega_N = e^{(-2\pi i)/N}$, $x(j)$ representa la j -ésima muestra del conjunto de N puntos ($N = 90$) que representan el parámetro de interés de la trayectoria del espermatozoide

en cada instante de tiempo t . La amplitud del espectro se calculó como sigue: $A(k) = 2 | F(k) |$. El valor máximo en el espectro corresponde al radio de curvatura media de la trayectoria del espermatozoide, es decir, al radio del círculo de la trayectoria descrita. La frecuencia en la que se presenta la máxima amplitud corresponde a la frecuencia en la que se completa una vuelta de la trayectoria circular del espermatozoide (ver Figura 2(b)).

El radio de la curvatura media encontrado fue de $10.87 \pm 3.73 \mu m$, congruente con lo reportado por Riedel et al. (2005) donde encuentran un radio promedio descrito por la trayectoria de $13.2 \pm 2.8 \mu m$ para espermatozoides de *S. purpuratus*.

El valor máximo encontrado para la amplitud del espectro, correspondiente a la frecuencia de vuelta promedio, fue de $1.4 \pm 0.3 Hz$, es decir la frecuencia con la que los espermatozoides completan una vuelta de la trayectoria circular, que al igual que el radio de la curvatura media concuerda con lo reportado por Riedel et al. (2005). Encontramos que esta frecuencia de vuelta es sumamente conservada entre los espermatozoides, es decir, prácticamente no existe variabilidad en la velocidad angular, permitiendo así que todos completen una vuelta de la trayectoria en el mismo lapso de tiempo, sin importar la magnitud del radio de la trayectoria. Para que esto sea posible, los espermatozoides que describen trayectorias de mayor radio tendrían que sustentar el recorrer más distancia en el mismo tiempo con una rapidez instantánea mayor.

El análisis de la trayectoria se realizó para ambas coordenadas (X y Y), donde encontramos que los espermatozoides no describen trayectorias en forma de círculos perfectos, puesto que el radio medio encontrado para cada coordenada varía aproximadamente $0.5 \mu m$, lo que las convierte en trayectorias cuasi circulares. Sin embargo, los valores de radio para cada coordenada están sumamente correlacionados (coeficiente de correlación ≈ 0.7), y estos valores se mantienen para todos los bloques de tiempo, por lo que para fines prácticos, se puede considerar un círculo perfecto y tomar solamente los valores de un eje coordenado en un segundo de nado.

3.3 Rapidez instantánea

La rapidez instantánea del espermatozoide en cada instante de tiempo se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rapidez}(t) = \sqrt{V_x(t)^2 + V_y(t)^2} \quad (3)$$

donde $V_x(t)$ y $V_y(t)$ son la velocidad en x y y , respectivamente, en un determinado tiempo t , las cuales se definen como:

$$V_x(t) = \frac{x_{i+1} - x_i}{\Delta t}, \quad (4)$$

$$V_y(t) = \frac{y_{i+1} - y_i}{\Delta t} \quad (5)$$

donde x_i y y_i son la posición en x y y , respectivamente, en el momento i e $i + 1$ y Δt es el cambio de tiempo entre los eventos.

La rapidez media encontrada en el bloque 20, es decir, a los 20 s, fue de $158.38 \pm 41.15 \mu/s$, acorde con los valores

reportados en la literatura, Gray and Hancock (1955); Gray (1955); Riedel et al. (2005).

3.4 Cambio del ángulo del vector velocidad

Se realizó un análisis del cambio del ángulo del vector velocidad, es decir de cómo cambia la dirección del espermatozoide en cada instante de tiempo a lo largo de la trayectoria. Para ello, se midió la diferencia entre la posición angular del vector velocidad en un instante de tiempo determinado y en el tiempo anterior, de la siguiente manera:

$$A(t) = \arctan \frac{V_{yi+1} - V_{yi}}{V_{xi+1} - V_{xi}} \quad (6)$$

donde V_{xi} y V_{yi} son la velocidad en x y y , respectivamente, en el momento i .

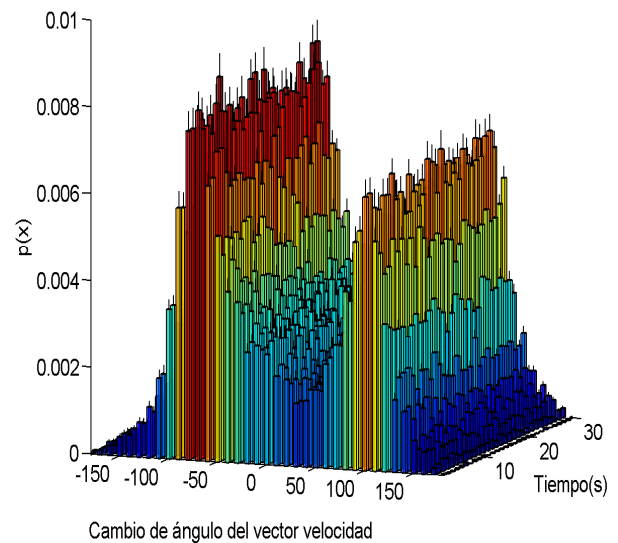


Figura 3. Distribución promedio de probabilidad ($P(x)$) del cambio del ángulo del vector velocidad en el tiempo.

La Figura 3 muestra la distribución de probabilidades del cambio del ángulo del vector velocidad en función del tiempo, donde se observa una distribución bimodal que, congruente con nuestra observación de la conservación de la trayectoria, se mantiene durante todo el experimento. Esta distribución se caracterizó por tener modas aproximadas a -70° y 100° , y estar descentralizada de 0. Dichas características de la distribución concuerdan con la forma de la trayectoria, donde la descentralización parece estar relacionada con la curvatura del círculo descrito por la trayectoria y puesto que no es una línea continua, sino más bien una línea en forma de zigzag, encontramos dos modas que podrían estar reflejando el batido del flagelo, ya que no es simétrico, Goldstein (1977). El batido del flagelo va acompañado por una conservación de momento y de un desplazamiento irregular de la cabeza del espermatozoide, lo que veríamos con una línea en forma de zigzag. Cabe resaltar, que este parámetro de motilidad nunca antes ha sido estudiado para el espermatozoide, sin embargo, de ser

como suponemos, el reflejo del batido del flagelo, sería biológicamente un parámetro sumamente interesante, puesto que con un método de evaluación relativamente sencillo y en 2D, se podrán estudiar efectos directamente sobre el flagelo, considerado como el motor del espermatozoide.

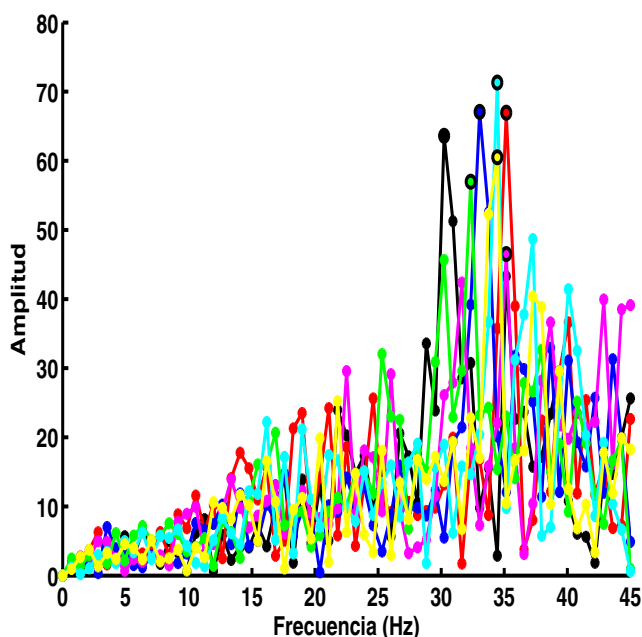


Figura 4. Amplitud del espectro del cambio del ángulo del vector velocidad. Donde cada color representa a un espermatozoide elegido al azar.

A manera de cuantificar este parámetro tan interesante, se utilizaron los valores del cambio del ángulo en el tiempo para obtener la amplitud del espectro utilizando la DFT definida por la ecuación 2. Interesantemente, encontramos que la frecuencia media predominante del cambio del ángulo en el tiempo ($37.27 \pm 5.03 \text{ Hz}$) coincide con los valores reportados por Riedel et al. (2005) y Gray and Hancock (1955), de frecuencia del batido del batido del flagelo (ver Figura 4).

4. CONCLUSIONES

Mediante la implementación del algoritmo fue posible obtener las trayectorias de un considerable número de espermatozoides, lo que nos permitió, de una manera muy sencilla, evaluar tres parámetros que podrían ser útiles en el análisis de la motilidad del espermatozoide a manera de población. Es decir, eliminando el sesgo que implica hacer el estudio en muy pocas células.

Uno de estos parámetros, cambio de ángulo del vector velocidad, nunca antes había sido implementado en el estudio de la motilidad del espermatozoide. Nuestro análisis refleja que mediante este parámetro se podría medir indirectamente el batido del flagelo, lo cual lo convierte en un parámetro de mucho interés biológico.

REFERENCIAS

Berke, A., Turner, L., Berg, H., and Lauga, E. (2008). Hydrodynamic attraction of swimming microorganisms by surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 101.

Boryshpolets, S., Kowalski, R., Dietrich, G., Dzyuba, B., and Ciereszko, A. (2013). Different computer-assisted sperm analysis (casa) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*, 758–765.

Crocker, J. and Grier, D. (1996). Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179, 298 – 310.

Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B., Nishigaki, T., and Wood, C. (2008). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *Int J Dev Biol.*, 595–606.

Garbers, D. (1989). Molecular basis of signalling in the spermatozoon. *Journal of andrology*.

Goldstein, S. (1977). Asymmetric waveforms in echinoderm sperm flagella. *Journal of Experimental Biology*, 157–170.

Gray, J. (1955). The movement of sea-urchin spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 775–801.

Gray, J. and Hancock, G. (1955). The propulsion of sea-urchin spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 802–814.

Morisawa, M. (1994). Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zoological Science*, 647–662.

Riedel, I., Kruse, K., and Howard, J. (2005). A self-organized vortex array of hydrodynamically entrained sperm cells. *Science*, 300–303.