



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

VOTOS DE APROBATORIOS

Presidente del Consejo Directivo del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Presente.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. Mariana Beatriz Olivares Orbanó

Con número de matrícula 20124006603 cuyo título es:

Citometría de flujo basada en imágenes como herramienta para estudiar rextaxis en espermatozoides de humano

Consideramos que Si reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado Ciencias (Bioquímica y Biología Molecular)**

Atentamente
"Por una humanidad culta"

Cuernavaca, Morelos, a 25 de Noviembre de 2019.

Grado, Nombre y Apellidos completos del jurado

Firma

PRESIDENTE: DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA

SECRETARIO: DRA. MARÍA ÁNGELICA SANTANA CALDERÓN

VOCAL: DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ

PRIMER SUPLENTE: DR. RAMÓN ANTONIO GONZALEZ GARCÍA CONDE

SEGUNDO SUPLENTE: DRA. MARÍA DEL CARMEN BELTRÁN NUÑEZ

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo ICBA@uaem.mx

**UA
EM**

RECTORÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR**

**Citometría de flujo basada en imágenes como herramienta para
estudiar reotaxis en espermatozoides de humano.**

TESIS

QUE PRESENTA:

MARIANA BEATRIZ OLIVARES URBANO

Para obtener el Título de:
Licenciado en Ciencias
(Bioquímica y Biología Molecular)

DIRECTORA DE TESIS
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos

Noviembre 2019

El presente trabajo se realizó en el Consorcio de Fisiología del Espermatozoide del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Mor.), bajo la supervisión de la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz.

FINANCIAMIENTO

Para la realización esta tesis de licenciatura se contó con el aporte económico del donativo DGAPA PAPIT IN202519 de la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz y el apoyo de manutención por parte del programa Ayudante de Investigador SNI III.

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

- Quiero agradecer especialmente a la Dra. Claudia Treviño, por todo su apoyo, guía, dedicación y consejos durante mi aprendizaje; por abrirme las puertas de su laboratorio y por toda la confianza que me ha brindado desde el inicio.

Estoy muy agradecida por haber estado bajo la tutoría de una gran científica y una excelente persona que desde siempre me ha transmitido ese ímpetu científico.

- A los líderes académicos y asociados del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide: el Dr. Alberto Darszon y el Dr. Takuya Nishigaki, a la Dra. Carmen Beltrán, al Dr. Julio Chávez y al Dr. Ignacio López, por brindarme sus consejos y observaciones siempre en pro de mi trabajo, que forman parte de mi aprendizaje en el laboratorio.
- A mi comité evaluador: a la Dra. Verónica Narváez, a la Dra. Angélica Santana, a la Dra. Carmen Beltrán y al Dr. Ramón González por sus importantes comentarios y evaluación crítica, que fue fundamental para mejorar y esforzarme durante el desarrollo de mi proyecto.
- A la asesoría y apoyo técnico de la M. en C. Paulina Torres, M. en C. Yoloxóchitl Sánchez, Biol. José Luis de la Vega, al M. en C. Andrés Saralegui y al Dr. Arturo Pimentel, por su paciencia y disponibilidad siempre para atender mis dudas técnicas y en el funcionamiento de equipos de laboratorio.
- Al M. en C. Arturo Matamoros por ser parte importante mi desarrollo profesional, por la paciencia y dedicación que me brindó durante el desarrollo de mi trabajo y por hacerme ver que la recompensa más importante es el conocimiento y la satisfacción de aprender.
- A todos los miembros del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide, por sus comentarios, por su amistad y disponibilidad para enseñarme y hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia inigualable.
- A Shirley Elizabeth Ainsworth Gore encargada de la Unidad de Biblioteca de la UNAM y al M. en C. Arturo Ocadiz Ramírez, al M.E.M David Santiago Castañeda Carreón, al M. en TI. Juan Manuel Hurtado Ramírez y al Ing. Roberto Pablo Rodríguez Bahena, miembros de la Unidad de Cómputo del Instituto de Biotecnología de la UNAM.
- A mi tutora académica, la Dra. Nina Pastor por seguir mi avance durante la carrera, por aconsejarme profesional y personalmente, y siempre buscando la forma de apoyarme.

AGRADECIMIENTOS

- A mi hermosa familia, que sin su apoyo no hubiera logrado estar en el lugar en donde me encuentro ahora, que siempre estuvo pendiente de mi trayectoria académica y nunca permitió que abandonara mis sueños. A mi madre, que es una mujer excepcional, grandiosa y admirable, de la que siempre estoy aprendiendo algo nuevo y que nunca se ha dejado vencer. A mi padre, que es un hombre increíblemente responsable, que me ha enseñado que el trabajo y el esfuerzo siempre te hacen una mejor persona. A mis hermanos Pao y Lalo, que a pesar de que somos tan diferentes siempre me han apoyado y de los cuales sigo aprendiendo. Los amo.
- A mi pareja, Arturo, que siempre has estado enseñándome, apoyándome, y dirigiéndome en mi camino. Fuiste un pilar muy importante en mi desempeño como científica, te admiro muchísimo. Me siento muy afortunada por haberte conocido y sobre todo por compartir tantas experiencias contigo.
- A mi tutora Claudia Treviño, una mujer fuerte y una gran científica, que nunca permitió que flaqueara, y además siempre estuvo ahí no solo profesionalmente, sino también como amiga. Agradezco su valiosa dirección, consejos y apoyo que me ha brindado desde mi ingreso al laboratorio, siempre pendiente de mi progreso.
- A mis amigos del laboratorio: José Pablo, Pau, Sandra, Vale, Gaby, Julio, Hiram, por pasar momentos muy agradables a su lado.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 El Espermatozoide de humano.....	11
1.2 La Capacitación.....	12
1.3 Mecanismos que guían al espermatozoide hacia el óvulo	13
1.4 Reotaxis (Orientación en contra de un flujo)	15
2. ANTECEDENTES	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVO	22
5.1 General	22
5.2 Particulares	22
6. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	22
6.1 Medio de Cultivo.....	22
6.2 Protocolo para purificar espermatozoides mediante la técnica de Swim-up (nado hacia arriba) ...	22
6.3 Incorporación de Fluoróforos y Viabilidad	23
6.4 Medición de niveles de Ca^{2+} en el espermatozoide	24
6.5 Análisis por citometría de flujo	24
6.6 Análisis por medio de máscaras de segmentación de imágenes, para medir las regiones subcelulares del espermatozoide	25
6.7 Selección de poblaciones y parámetros	25
6.8 Análisis estadístico	26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7.1 Determinación de la orientación	27
7.2 Cambios en la orientación durante capacitación en tres diferentes poblaciones.....	28
7.3 Análisis del batido flagelar mediante citometría de flujo.....	31
7.4 Medición de Ca^{2+} intracelular en espermatozoides	36
8. CONCLUSIONES	38
9. PERSPECTIVAS.....	39
10. REFERENCIAS.....	39
11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	43
12. TABLA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la morfología del espermatozoide de humano	11
Figura 2. Hiperactivación en espermatozoides de humano.....	13
Figura 3. Posibles mecanismos guía del espermatozoide al óvulo.	16
Figura 4. Los espermatozoides de ratón y humano no capacitados presentan reotaxis en condiciones in vitro.....	17
Figura 5. Trazos del nado de espermatozoides de ratón nulos para el canal CatSper.	18
Figura 6. Trayectorias de espermatozoides en condiciones con y sin flujo	19
Figura 7. Porcentaje de cambio de Ca^{2+} en espermatozoides de humano.	20
Figura 8. Técnica de Swim up (nado hacia arriba).....	23
Figura 9. Poblaciones finales	26
Figura 10. Determinación de la orientación de acuerdo al parámetro de centroide en Y .	28
Figura 11. La proporción de células orientadas contra el flujo no cambia durante capacitación	29
Figura 12. Morfología y longitud de espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos (vivos, muertos inducidos y muertos naturales).	30
Figura 13. El valor de centroide en Y determina la orientación de las células e imágenes representativas de células con cambio en el patrón de batido flagelar.	32
Figura 14. Identificación de la subpoblación curvos pronunciados de acuerdo con el valor de la longitud del espermatozoide y de su centroide en Y (a/k).....	34
Figura 15. El porcentaje de las células con el flagelo curvo pronunciado tiene una tendencia a aumentar con el tiempo de capacitación mientras que la subpoblación de células con flagelos curvos discretos disminuye.	35
Figura 16. Aumento en los niveles de fluorescencia en la región de la pieza principal, de células con el flagelo curvo pronunciado en función del tiempo de capacitación.....	37
Figura S1. Esquema que representa el funcionamiento del citómetro basado en imágenes (ANMIS).....	43
Figura S2. Dispositivos para medir reotaxis.	43
Figura S3. Variabilidad de los datos de 7 donadores diferentes	44
Tabla 1. Comparación de velocidades de flujo de espermatozoides en distintos dispositivos para medir reotaxis.....	44

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina Sérica de Bovino
Ca ²⁺	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
Cap	Capacitado
CatSper	Canal de cationes del espermatozoide (Cation Channel of Sperm)
CO ₂	Dióxido de Carbono
Fluo-3AM	Indicador fluorescente de Ca ²⁺
HA	Hiperactivación
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HEPES	Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico
HTF	Fluido Tubal de Humano
IP	Ioduro de Propidio
KCl	Cloruro de Potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
NC	No Capacitado
OMS	Organización Mundial de la Salud
RA	Reacción acrosomal

RESUMEN

El contacto sexual induce la secreción de un flujo a lo largo del tracto reproductor femenino. Se ha propuesto que los espermatozoides pueden ser guiados y dirigidos por este flujo, ya que tienen la habilidad de nadar en contra del flujo, proceso conocido como reotaxis. Algunos reportes indican que la reotaxis en los espermatozoides de humano es independiente del estado de capacitación de las células, un proceso de maduración posterior a la eyaculación, y de influjos de Ca^{2+} , que toman lugar durante el tránsito por el tracto reproductor femenino. Por otro lado, algunos autores sugieren que la reotaxis es un proceso físico pasivo, que depende de la hidrodinámica y de la morfología de las células.

En un esfuerzo por comprender la reotaxis en espermatozoides, en este trabajo exploramos el uso de la citometría de flujo basada en imágenes para analizar el comportamiento de los espermatozoides de humano. Esta técnica permite analizar múltiples parámetros en grandes poblaciones celulares, con la ventaja de contar con un sistema óptico, que muestra la imagen de cada célula analizada. Este equipo genera un flujo que alinea las células hacia el punto de captura de la imagen, y nos preguntamos si los espermatozoides podrían orientarse en contra de este flujo generado por el equipo, si la orientación depende del estado de capacitación, y si la reotaxis está mediada por influjos de Ca^{2+} .

Para analizar los datos diseñamos una técnica que nos permitió localizar la cabeza de los espermatozoides en la imagen y determinar automáticamente si la célula se encontraba a favor o en contra del flujo. Con esta aplicación de las máscaras de segmentación para los espermatozoides desarrollada anteriormente, permitió la cuantificación de los niveles de Ca^{2+} en cada región de la célula.

Los resultados mostraron que aparentemente la orientación de las células no depende del estado de capacitación, además de que creemos que éstas conservan la orientación con la que salen de la cámara de mezclado. De manera inesperada y ajena al objetivo de este trabajo, se localizó una población celular que presenta un batido flagelar vigoroso (curvas pronunciadas) y otra población que presenta su flagelo con curvas discretas, independientemente de la orientación (a favor y en contra del flujo). Se encontró que el número de células con el flagelo curvo pronunciado aumenta en función del tiempo de capacitación, y de manera inversa el número de células con el flagelo curvo discreto disminuye. Se sabe que, durante la capacitación, los espermatozoides cambian su patrón de nado a un batido flagelar vigoroso, y para que la célula se pueda hiperactivar necesita de influjos de Ca^{2+} . De acuerdo con lo anterior, al medir el comportamiento del Ca^{2+} en las diferentes regiones del espermatozoide, de las dos últimas poblaciones mencionadas (flagelo curvo discreto y pronunciado), se encontró que el nivel de Ca^{2+} aumenta con el tiempo de

capacitación en la región de la pieza principal de las células con el flagelo curvo pronunciado, pero no en aquellas células con menor curvatura.

Estos resultados sugieren que mediante esta técnica es posible realizar mediciones simultáneas de parámetros intracelulares (Ca^{2+} , pH, fosforilación en tirosinas, etc.), mediante el uso de marcadores fluorescentes, así como de tipo de batido flagelar, mediante las imágenes de campo claro, lo cual podría ser de utilidad para la evaluación de fármacos relacionados con la función espermática.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Espermatozoide de humano

La fecundación en organismos de reproducción sexual es un proceso muy complejo que involucra una serie de acontecimientos que ocurren dentro del tracto genital femenino, algunos de ellos son la activación de vías de señalización, el reconocimiento y la fusión de dos gametos, el ovocito (femenino) y el espermatozoide (gameto masculino). Donde éstos últimos sufren cambios bioquímicos y morfológicos, que son necesarios para su maduración y pueda llegar a la zona del ámpula para fecundar al ovocito.

Morfológicamente los espermatozoides se componen de dos regiones, la cabeza y el flagelo. La cabeza tiene una morfología ovalada que mide alrededor de 5 μm , contiene el núcleo celular que se encuentra altamente compactado y un organelo llamado acrosoma esencial para la fecundación. El flagelo se divide en la pieza media (donde se encuentran las mitocondrias), la pieza principal y la pieza final. El flagelo le confiere movilidad a la célula para poder desplazarse a través del tracto genital femenino. La longitud de la célula completa es de aproximadamente 60 μm (Figura 1) (Darszon et al., 2011a).

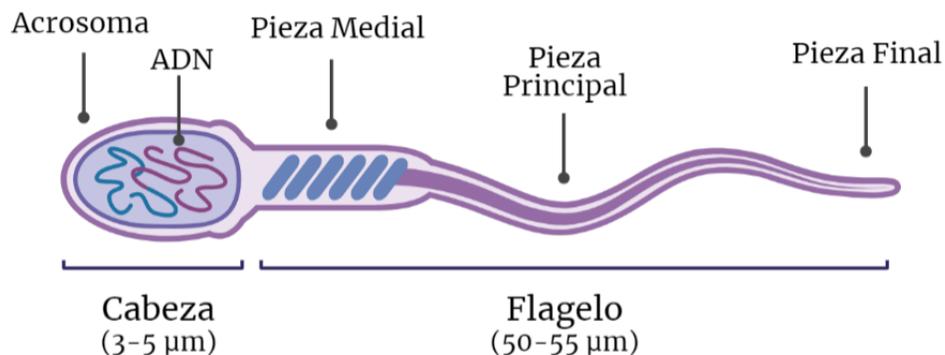


Figura 1. Esquema de la morfología del espermatozoide de humano. Se ilustran dos regiones en el espermatozoide, la cabeza y el flagelo. La cabeza mide aproximadamente 5 μm , se localiza el núcleo que contiene el ADN y en la zona apical, se localiza el acrosoma. El flagelo mide aproximadamente 55 μm y se divide en pieza media, pieza principal y pieza final.

Los espermatozoides se originan en los tubos seminíferos dentro de los testículos, durante la espermatogénesis. Estas células migran hacia la región del epidídimo, donde sufren un tipo de maduración y posteriormente pueden ser eyaculados (Darszon et al., 2011b). Una vez que los espermatozoides entran en el tracto genital femenino, sufren un tipo de maduración que les

permite adquirir la capacidad fecundante, llamada capacitación (Austin, 1952; Chang, 1951; Jaiswal, B.S., 2002).

1.2 La Capacitación

Este proceso de maduración solo se da en aproximadamente el 10% de los espermatozoides de humano (Darszon et al., 2011b), por lo tanto el número de células que pueden alcanzar el ovocito es muy bajo. Solo los espermatozoides capacitados pueden fecundar naturalmente, ya que son los únicos que pueden llegar al óvulo, esto gracias entre otras cosas, a la hiperactivación (HA), que es un proceso que desencadena un movimiento progresivo que favorece el desplazamiento, aún en fluido viscoso (como lo es el moco cervical), además también favorece la penetración a la zona pelúcida, llevar a cabo la exocitosis acrosomal y penetrar en el óvulo. La exocitosis acrosomal es un proceso de liberación del contenido acrosomal, como enzimas hidrolíticas que permiten la penetración de la zona pelúcida del ovocito para fecundarlo.

Durante la capacitación, el espermatozoide cambia su patrón de nado, de un batido flagelar simétrico y lineal, a un batido flagelar asimétrico vigoroso y de gran amplitud llamado HA (Susan S. Suarez, 2008; Yanagimachi, 1970). La movilidad del espermatozoide es un proceso que depende de Ca^{2+} , donde se ha demostrado que el influjo de éste ión está mediado por el canal CatSper expresado específicamente en el espermatozoide. Este canal se localiza en la pieza principal del flagelo (Chung et al., 2014) y se activa por la alcalinización intracelular (Quill et al., 2003).

El canal CatSper está relacionado principalmente con la HA (Xia et al., 2007), ya que en experimentos con ratones nulos (-/-) para CatSper, demostraron que sus espermatozoides no pueden hiperactivarse y por lo tanto son infértiles (Ho et al., 2009; Ren et al., 2001) (Figura 2A).

En muchas especies de mamíferos, dentro del istmo del oviducto se forma un reservorio de espermatozoides, que se anclan a la mucosa epitelial, en caso de que no haya ovocitos para fecundar (Pacey, A. et al., 1995). Una vez que los ovocitos estén disponibles en la zona del ámpula y los espermatozoides capacitados, el movimiento hiperactivado les permite a los espermatozoides desprenderse del epitelio impulsándolos y permitiéndoles nadar por el tracto reproductor femenino a través de diferentes viscosidades y velocidades de flujos (Suarez Susan., 1987). Los espermatozoides nulos para CatSper no pueden hiperactivarse y como consecuencia no se pueden desprender del epitelio (Ho et al., 2009) (Figura 2B).

Por otro lado, se ha demostrado que el batido flagelar que se da durante la HA, proporciona a los espermatozoides una mayor fuerza de empuje para nadar a través del moco del oviducto, así como penetrar en la matriz de las células del cúmulus que rodean al ovocito, que funcionan como almacén para preservar los espermatozoides en un lugar protegido y cerca del sitio de fecundación (Ho et al., 2009; Quill et al., 2003).



Figura 2. Hiperactivación en espermatozoides de humano. **A.** Cambio en la movilidad del espermatozoide capacitado, de un batido flagelar simétrico y lineal, a un batido flagelar vigoroso y asimétrico. **B.** Los espermatozoides una vez que se hiperactivan pueden desprenderse del epitelio debido a cambios en su batido flagelar, lo que provoca que se impulsen y naden a través de diferentes viscosidades y velocidades de flujo. Modificado de Darszon et al., 2011.

1.3 Mecanismos que guían al espermatozoide hacia el óvulo

Durante años los investigadores se preguntaban sobre la dinámica que tiene el espermatozoide para orientarse, ¿Cómo es que el espermatozoide encuentra el camino para llegar al óvulo y qué lo guía?, ¿Qué señales de atracción existen entre una célula y otra? Estas preguntas han sido objeto de investigaciones, simulaciones y modelos, en diferentes animales para conocer estos procesos.

Se hicieron observaciones y estudios con espermatozoides de diferentes organismos, entre ellos están algunos mamíferos como conejos, ratones, toros, humanos, etc., invertebrados como erizos de mar, plantas como helechos, musgos y algas, donde se han reportado tres procesos por los cuales existe una atracción del espermatozoide hacia el óvulo. Se postula que dos de ellos actúan a distancias grandes: la Reotaxis que es el nado en contra de un flujo o corriente y la Termotaxis,

el movimiento dirigido de las células a lo largo de un gradiente de temperatura. Otro mecanismo en las proximidades del ovocito es la Quimiotaxis, que se refiere al movimiento de células hacia un gradiente de concentración de quimioatrayentes (Eisenbach et al., 2015; Lottero-Leconte et al., 2017).

En 2003 se descubrió que los espermatozoides de humano y de conejo, una vez capacitados, tienen la capacidad de detectar diferencias de temperatura (alrededor de 0.5°C) y responder por termotaxis (Eisenbach et al., 2003). Se piensa que la termotaxis y la quimiotaxis *in vivo* son mecanismos complementarios, ya que cada mecanismo funciona en una región donde el otro mecanismo es ineficaz (Bahat & Eisenbach, 2006). Aparentemente entre la región donde se encuentra el reservorio de espermatozoides y el sitio de fecundación existe un gradiente de temperatura durante la ovulación, que no se ve afectado por los movimientos peristálticos del oviducto (Bahat & Eisenbach, 2006; Eisenbach et al., 2015). }

En el 2005, demostraron en el oviducto de coneja, que la diferencia de temperatura (que dura al menos 10 horas después de la ovulación) se crea debido a una caída de temperatura en el reservorio de espermatozoides, que depende del tiempo de ovulación, y que es suficiente para atraer a los espermatozoides capacitados (tiempo aproximado de capacitación 8-10 horas) mediante termotaxis (Bahat et al., 2005). Cicinelli y colaboradores en el 2004 hallaron que la temperatura en la región del istmo hasta el útero en humanos disminuye durante la ovulación, por lo tanto se sugiere que en los humanos haya un proceso de termotaxis similar al de conejo y cerdo (Cicinelli et al., 2004).

En la región cercana al ovocito, que incluye a las células que lo rodean (células del cúmulus), se liberan moléculas que podrían fungir como quimioatrayentes, formando un gradiente que mantiene la concentración de estas moléculas en las cercanías del óvulo, que debido a las contracciones musculares que se generan en el tracto, no se podrían conservar a largas distancias, por lo tanto se cree que los espermatozoides capacitados serán guiados primero por termotaxis hasta el sitio de fecundación que es más cálido y posteriormente por quimiotaxis (Figura 3).

La quimiotaxis se descubrió por primera vez en plantas en 1958 y posteriormente en algunos invertebrados como corales, erizos de mar, estrellas de mar y en anfibios, donde sus quimioatrayentes son proteínas, péptidos o moléculas de bajo peso molecular. En mamíferos se observó un fenómeno similar a la quimiotaxis en espermatozoides hacia factores del fluido

folicular (en humanos), en ratones y conejos hacia fluido oviductal (Yoshida & Yoshida, 2011). Se han propuesto como quimioatrayentes algunos compuestos, entre ellos se encuentra la progesterona que se libera por células del cúmulus que rodean a los ovocitos, como un factor que regula la quimiotaxis en espermatozoides humanos (Yoshida & Yoshida, 2011). Además, es un potente estimulador de la entrada de Ca^{2+} a través del canal CatSper en los espermatozoides y desencadena múltiples respuestas fisiológicas dependientes de Ca^{2+} (como la hiperactivación) que son esenciales para una fecundación exitosa (Lishko et al., 2011).

La concentración de Ca^{2+} intracelular es un factor importante para la regulación del comportamiento quimiotáctico en espermatozoides de mamíferos. Los quimioatrayentes de los espermatozoides inducen la entrada de Ca^{2+} , lo que resulta en un aumento de Ca^{2+} intracelular y éste modula el movimiento flagelar, sin embargo, aún se desconoce con exactitud la relación entre éstos dos factores (Yoshida & Yoshida, 2011).

En algunas especies de fecundación externa se ha demostrado el comportamiento quimiotáctico en espermatozoides, que es dependiente de Ca^{2+} . Por otro lado hay reportes donde demuestran que solo una pequeña subpoblación de espermatozoides capacitados de humano tiene respuesta quimiotáctica, entre el 2-12% de espermatozoides responden quimiotácticamente a progesterona (Cohen-Dayag et al., 1994).

Ya que hasta ahora no se puede distinguir la quimiotaxis de otros procesos como quimiocinesis (aumento de la actividad migratoria aleatoria de las células), no se puede establecer la quimiotaxis como mecanismo de guía en espermatozoides de mamíferos. Aunque se cree que la función principal de la quimiotaxis sea la atracción selectiva de espermatozoides capacitados hacia la zona de la ámpula en el tracto reproductor femenino (Yoshida & Yoshida, 2011).

1.4 Reotaxis (Orientación en contra de un flujo)

Entre otros procesos el coito induce el flujo de líquido desde el oviducto al útero, donde los espermatozoides se alinean contra la dirección de este flujo y nadan contra corriente, un fenómeno denominado reotaxis (Figura 3). Se denomina reotaxis positiva cuando la orientación es en contra del flujo y reotaxis negativa cuando va a favor del flujo. Se demostró que, para que los espermatozoides se dirijan al óvulo es fundamental el flujo y que tanto la termotaxis y la quimiotaxis son procesos que no participan en la migración de los espermatozoides en contra del flujo, ya que en pruebas *ex vivo* los espermatozoides se orientan en contra del flujo (Miki &

Clapham, 2013). Además del flujo producido por los cilios, la contracción muscular, la propensión de los espermatozoides a adherirse a las superficies y los fluidos con alto grado de viscosidad, son factores que influyen en el transporte y dirección de los espermatozoides (Miki & Clapham, 2013).

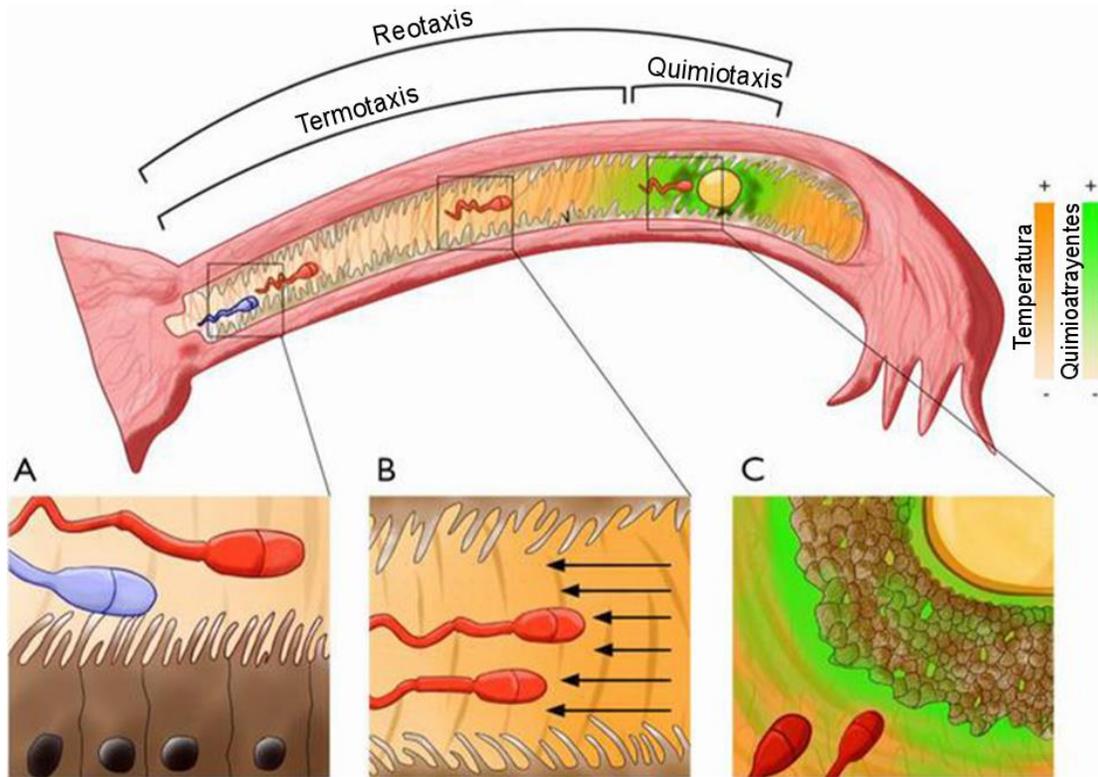


Figura 3. Posibles mecanismos guía del espermatozoide al óvulo. **A.** Los espermatozoides que se capacitan presentan un movimiento hiperactivo del flagelo y tienen pérdida parcial de la capacidad para unirse a las células epiteliales del oviducto. **B.** Los espermatozoides se dirigen en contra del flujo (flechas negras). **C.** Las células del cúmulus secretan progesterona (posible quimioatrayente) que guía al espermatozoide hacia el óvulo. Modificado de Lottero-Leconte et al., 2017.

2. ANTECEDENTES

Se ha descrito que el proceso de reotaxis es un mecanismo independiente de estados de capacitación. Se hicieron pruebas con espermatozoides de humano y de ratón, capacitados y no capacitados, en condiciones donde se provocaba un flujo y otra donde no había flujo. Se encontró que tanto las células no capacitadas (Figura 4) como capacitadas, presentan una rotación en la cabeza que genera una fuerza para colocar al espermatozoide en contra de la corriente provocando un movimiento reotáctico (Miki & Clapham, 2013) (Figura 4).

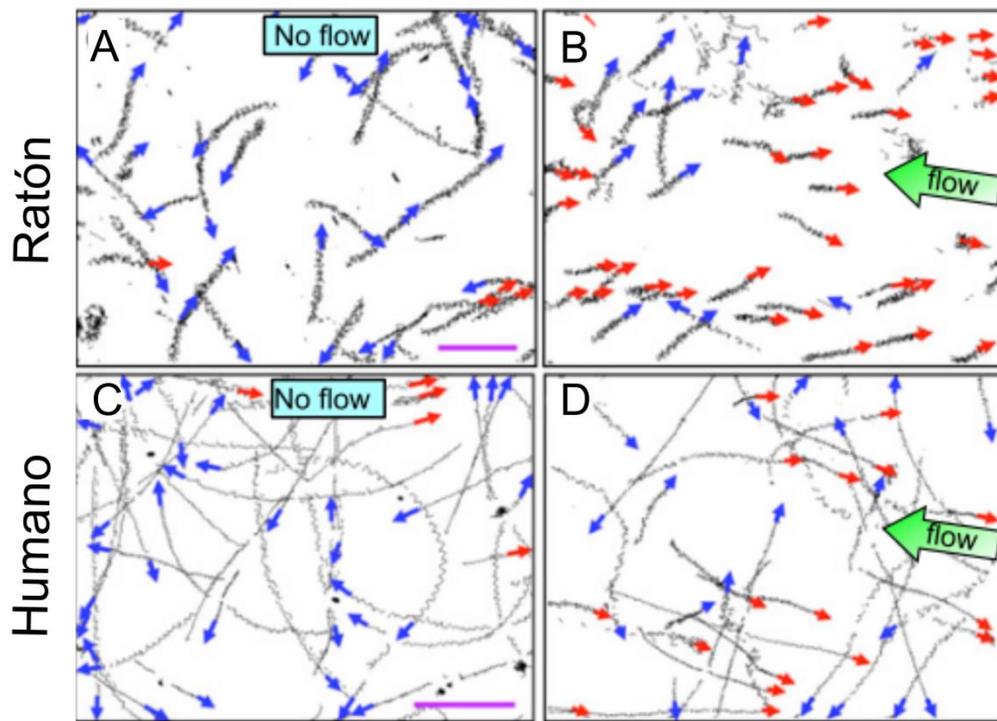


Figura 4. Los espermatozoides de ratón y humano no capacitados presentan reotaxis en condiciones in vitro. A y B. Los espermatozoides de ratón en condiciones sin inducción (izquierda) y con inducción (derecha) de un flujo. **C y D.** Los espermatozoides de humano en condiciones sin inducción (izquierda) y con inducción (derecha) de un flujo. Flechas rojas indican dirección de células que se orientan en contra del flujo (reotácticas) y flechas azules indican la dirección de células que no presentan reotaxis (nado aleatorio). Modificado de Miki & Clapham, 2013.

En otro trabajo, se hicieron experimentos con espermatozoides nulos para el canal de Ca^{2+} CatSper, donde se trazaba la trayectoria de los espermatozoides no capacitados en condiciones donde no había una inducción y otra donde sí había inducción de flujo. Los resultados arrojaron que los espermatozoides nulos para CatSper nadaban en un plano circular en sentido en contra de las manecillas del reloj, pero este comportamiento no cambió en la condición de inducción de flujo, lo que indica que el canal CatSper es indispensable para tener una respuesta reotáctica. Se ha visto que los espermatozoides tienen una rotación en la cabeza que mejora el desplazamiento y de esta forma se orientan contra flujo, además la entrada de Ca^{2+} mejora la rotación de los espermatozoides que cambia el movimiento circular plano a un movimiento rotacional (Miki & Clapham, 2013) (Figura 5).

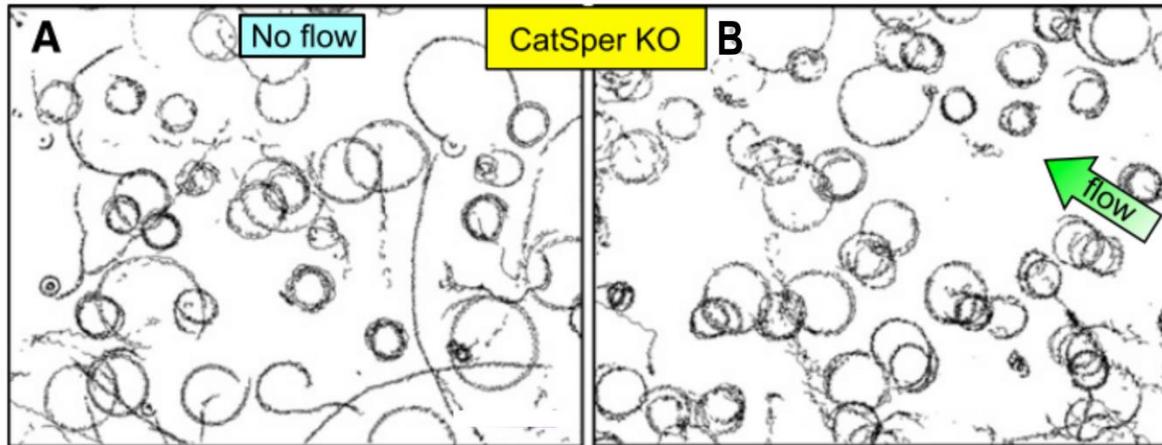


Figura 5. Trazos del nado de espermatozoides de ratón nulos para el canal CatSper. A. Los espermatozoides no capacitados, en la condición donde no hay inducción de flujo, tienen un nado aleatorio en un plano circular. **B.** Los espermatozoides no capacitados, en la condición con inducción de flujo, tienen un nado en un plano circular y no cambia de la condición sin flujo. Modificado de Miki & Clapham, 2013.

Por otro lado hay estudios que contradicen que la reotaxis sea un proceso activo y dependiente de los influjos de Ca^{2+} (Zhang et al., 2016). En este trabajo los autores concluyen que la reotaxis es un proceso físico pasivo, ya que no encontraron diferencias significativas en la amplitud y simetría del batido flagelar de los espermatozoides, que nadan cuando hay inducción y ausencia de flujo. Así mismo no mostraron cambios en los influjos de Ca^{2+} durante la reorientación de los espermatozoides (Zhang et al., 2016) (Figura 6). Confirmando que el comportamiento de reorientación se debe únicamente al flujo.

Para explorar si la reotaxis es un proceso activo o pasivo, analizaron el comportamiento del batido flagelar, entre los diferentes parámetros (asimetría y amplitud) analizados en espermatozoides que nadaban libremente (sin inducción de flujo) y los que tenían un comportamiento reotáctico. Para dilucidar este mecanismo en la Figura 6C se muestra el cambio de la asimetría del patrón de nado de los espermatozoides de acuerdo con el tiempo, donde las trayectorias de los espermatozoides reotácticos (trazos azul, verde y rosa) no presentan cambios significativos comparados con el espermatozoide control (trazo negro). Todos los trazos tienen un comportamiento como el de los espermatozoides que nadan libremente sin la presión de un estímulo (en este caso flujo), por lo tanto no doblan su flagelo de forma asimétrica lo que les permite girar (y reorientarse contra flujo) y se comprueba que la reotaxis no es un proceso activo (Zhang et al., 2016).

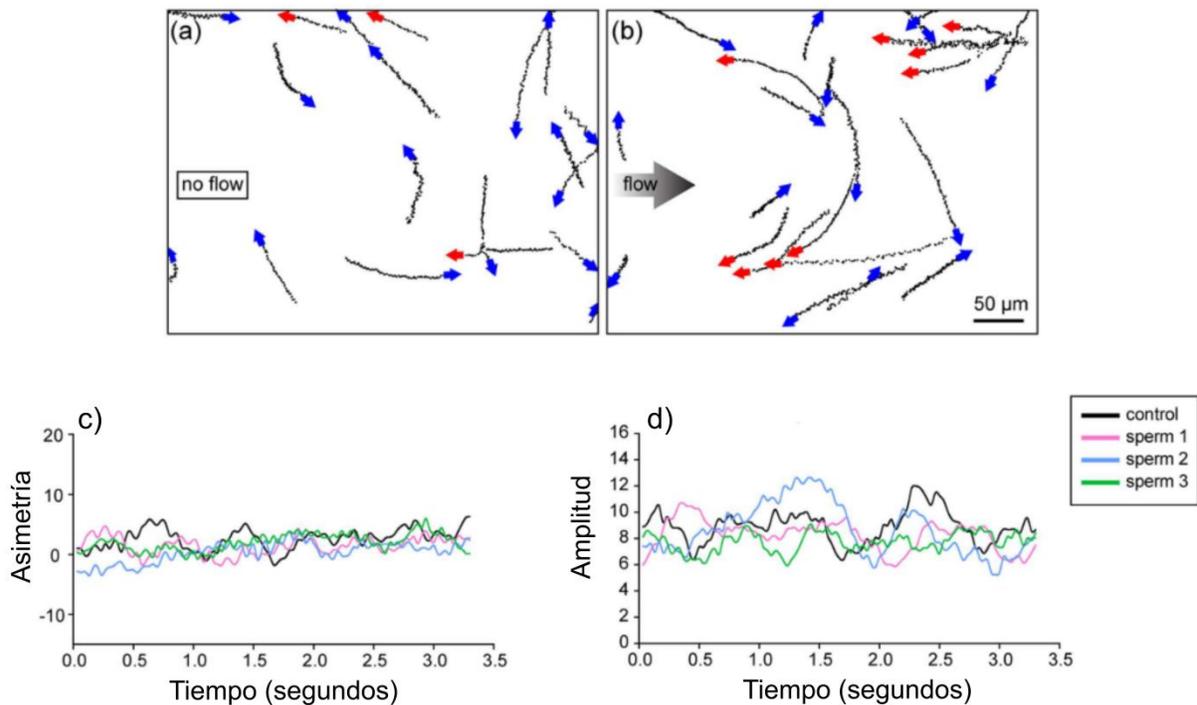


Figura 6. Trayectorias de espermatozoides en condiciones con y sin flujo. a. Espermatozoides que nadan libremente en ausencia de flujo. **b.** Espermatozoides que se reorientan en contra del flujo. Las flechas rojas indican la dirección de células que se orientan contra el flujo (reotácticas) y las flechas azules indican la dirección de células que no se orientan contra flujo. **c** y **d.** Seguimiento cuantitativo de la asimetría y amplitud del batido flagelar de un solo espermatozoide. Se muestra el espermatozoide control (trazo negro) y tres espermatozoides que presentan reotaxis (trazos azul, rosa y verde). Modificado de Zhang et al., 2016.

Debido a la evidencia que indica que el Ca^{2+} es un factor importante para que se efectúe la reotaxis (Miki & Clapham, 2013), se midió el porcentaje de cambio de Ca^{2+} en el tiempo en espermatozoides reotácticos (trazos rosa, azul y verde) y un espermatozoide control (trazo negro). Tanto en la Figura 6c y d, todos los espermatozoides presentan el mismo comportamiento que el espermatozoide control, mostrando no tener significancia estadística. Éstos resultados sugieren que no se produce señalización de Ca^{2+} en los espermatozoides reotácticos (Zhang et al., 2016) (Figura 7).

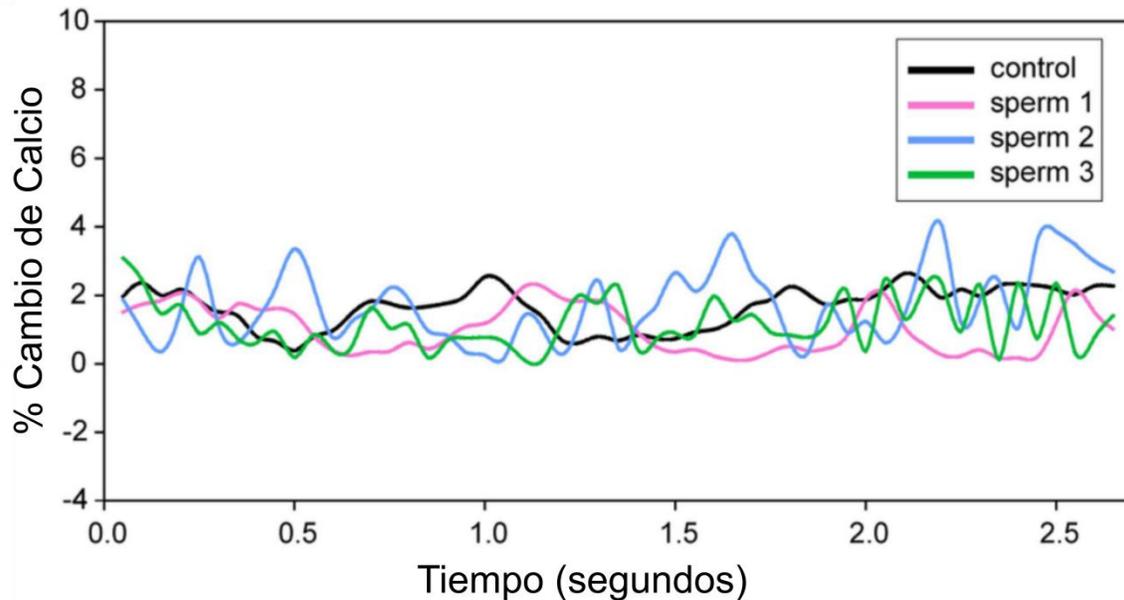


Figura 7. Porcentaje de cambio de Ca^{2+} en espermatozoides de humano. El trazo negro indica el cambio de Ca^{2+} en el espermatozoide control (no reotáctico), que se mantiene durante el tiempo. Trazo rosa, azul y verde, indican el cambio de Ca^{2+} en tres espermatozoides que presentan reotaxis, que aumenta hasta el 4%, indicando que no hay diferencia significativa entre el control y los espermatozoides reotácticos. Modificado de Zhang et al., 2016.

En este trabajo se concluye que la reotaxis en espermatozoides de humano es un proceso físico pasivo que surge de la interacción hidrodinámica del flujo y el flagelo del espermatozoide (Zhang et al., 2016).

Dado que hay resultados contradictorios con respecto a la reotaxis, es importante abordar la pregunta con estrategias experimentales distintas. Es por esto por lo que nuestro grupo de trabajo propuso utilizar la citometría de flujo para determinar la orientación de los espermatozoides.

Recientemente en nuestro grupo de trabajo, utilizando la técnica de citometría de flujo basada en imágenes, se desarrolló un método de segmentación semi-automatizado que permite el estudio de diferentes parámetros en poblaciones grandes de espermatozoides (Matamoros-Volante et al., 2018).

Esta técnica permite analizar una población de células, proporcionando una imagen de cada una y determinar parámetros como intensidad de fluorescencia, tamaño y complejidad. El sistema utiliza un flujo para alinear a las células hasta el punto de captura de la imagen y pensamos que podríamos aprovechar este flujo para estudiar la reotaxis en espermatozoides.

3. JUSTIFICACIÓN

Es importante conocer los procesos que ocurren en el espermatozoide una vez dentro del tracto reproductor femenino y que lo guían hacia el óvulo desencadenando la fecundación. Se ha visto que el mecanismo de orientación en contra de un flujo (reotaxis) en espermatozoides de humano, puede ser un proceso dependiente de capacitación, incluido el aumento de Ca^{2+} (Miki & Clapham, 2013). Por otro lado, otros estudios sugieren que es un proceso pasivo que no depende de influjos de Ca^{2+} , y que es meramente un proceso hidrodinámico (Zhang et al., 2016). Recientemente en nuestro grupo de trabajo se utilizó la técnica de citometría de flujo basada en imágenes para estudiar diferentes parámetros del espermatozoide durante la capacitación. En el citómetro se genera un flujo de fluido que alinea a los espermatozoides, llevándolos a un punto donde se captura la imagen de cada célula. Con la captura de esta imagen se logró cuantificar la orientación (a favor o en contra del flujo) de los espermatozoides. De manera preliminar, observamos que la proporción de células orientadas en contra del flujo aumenta con la capacitación (datos no publicados). Por esta razón decidimos investigar si la técnica de citometría de flujo basada en imágenes podría funcionar como una herramienta para estudiar la orientación de los espermatozoides, y si esta orientación es dependiente de estados de capacitación y de influjos de Ca^{2+} en espermatozoides de humano.

Debido a que en la mayoría de las metodologías utilizadas para medir reotaxis en espermatozoides utilizan un sistema de cámaras de microfluídica, es importante encontrar nuevas herramientas y desarrollar metodologías que permitan medir diversos procesos celulares en diferentes condiciones.

4. HIPÓTESIS

Por medio de la técnica de citometría de flujo basada en imágenes se puede estudiar la reotaxis en espermatozoides de humano, aprovechando el flujo que utiliza el equipo para su funcionamiento.

5. OBJETIVO

5.1 General

Determinar si la citometría de flujo basada en imágenes es una herramienta para estudiar la orientación de los espermatozoides humanos, y si ésta depende de condiciones capacitantes.

5.2 Particulares

- Establecer las condiciones de medición de la orientación de los espermatozoides por medio de la citometría de flujo basada en imágenes (AMNIS).
- Evaluar si la orientación de los espermatozoides cambia debido a la capacitación.
- Determinar si la orientación de los espermatozoides es dependiente de Ca^{2+} .

6. MATERIALES Y METODOLOGÍA

6.1 Medio de Cultivo

Se utilizó el medio modificado *Human Tubal Fluid* (HTF). El medio HTF para condiciones en donde no se promueve la capacitación, el cual contiene (en mM): NaCl 90.69, KCl 4.67, CaCl_2 1.6, MgSO_4 1.2, KH_2PO_4 0.314, Glucosa 2.78, Na-Piruvato 3.38, Na-lactato 60, Hepes 23.8. Para generar un medio que promoviera la capacitación, se suplementó con: NaHCO_3 25 mM, y BSA (Albúmina sérica de bovino) 0.5% (p/v). Ambos medios se ajustaron a un pH 7.4 con NaOH. El medio HTF ha sido ampliamente utilizado en investigación y clínica, para mantener los espermatozoides en condiciones *in vitro*, debido a que simula los componentes en el tracto genital femenino. Modificado del Manual “Examinación y Procesamiento de semen humano” de la OMS, 2010, 5° Edición.

6.2 Protocolo para purificar espermatozoides mediante la técnica de Swim-up (nado hacia arriba)

En todos los experimentos, se utilizaron muestras de semen cuyas características cumplieron los parámetros establecidos por la OMS. Los donadores cumplieron con 72 horas de abstinencia. Cada muestra se colectó en su totalidad dentro de un frasco estéril de plástico en un anexo del laboratorio y posteriormente (máximo un minuto) se incubó dentro de una incubadora a 37°C y con una atmosfera del 5% de CO_2 durante 30-60 minutos, promoviendo así una licuefacción

adecuada de la misma. En seguida se dividió la muestra de semen en tubos de ensayo, se agregaron 300 μ l de células y se adicionó por goteo 1 ml de medio HTF no capacitante a cada tubo. Se colocaron en una gradilla con un ángulo de inclinación de 45°, incubándolos por 60 minutos a 37°C y con una atmósfera del 5% de CO₂. Una vez transcurrido ese tiempo, se seleccionaron los espermatozoides móviles mediante la técnica de *Swim-up* (o nado ascendente), que se colectan de la fase superior del tubo. Este método se basa en el aumento del proceso de migración de los espermatozoides del fluido seminal, a una fase superior de medio artificial HTF (Figura 8). Para determinar la concentración celular tomamos 10 μ l de muestra y se cuantificaron en una cámara Makler®.

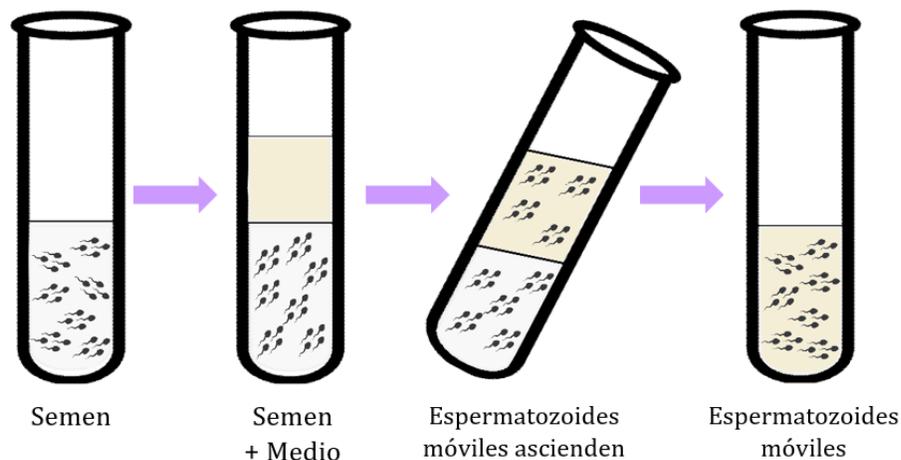


Figura 8. Técnica de Swim up (nado hacia arriba). Se ilustran algunos pasos que se realizan durante la técnica de swim up, que culminan en la purificación de espermatozoides vivos y móviles.

6.3 Incorporación de Fluoróforos y Viabilidad

Se utilizó el fluoróforo Hoechst para teñir la cabeza del espermatozoide (donde está el núcleo), y localizar su orientación, ya que éste compuesto es afín al ADN. Por otro lado, se utilizó Ioduro de propidio (IP), otro colorante afín al ADN que solamente tiñe células muertas para excluirlas del análisis. Por cada condición se utilizó un mínimo de 5×10^6 espermatozoides. Previo a la medición, las células se concentraron por centrifugación (300 g por 5 minutos) en un volumen de ~ 50 μ l. Se añadió Hoechst (concentración final de 10 μ g) e IP (concentración final de 2.4 μ M) para evaluar la viabilidad de la población.

Se establecieron dos condiciones, no capacitante (NC) y capacitante (Cap), a tres tiempos, una hora, dos y cuatro horas de capacitación.

Como control negativo se utilizaron células a las cuales se les provocó la muerte por medio de un choque térmico aproximadamente a 90°C, durante 15 minutos.

6.4 Medición de niveles de Ca^{2+} en el espermatozoide

Las mediciones de Ca^{2+} en la célula se cuantificaron por medio de los valores medios de fluorescencia de los pixeles contenidos dentro de las diferentes máscaras de cabeza, pieza media y pieza principal en los diferentes tiempos de capacitación.

Para hacer las mediciones de Ca^{2+} , a las células se les retiró el medio capacitante, se centrifugaron a 300 g por 5 minutos y se resuspendieron en medio con $NaHCO_3$ sin BSA. En este medio las células se incubaron con Fluo-3AM (sonda de Ca^{2+}), a una concentración final de 2 μM durante 30 minutos. Posteriormente se realizó un lavado por centrifugación a 300 g por 5 minutos, para retirar el exceso de colorante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio capacitante. Por cada condición se utilizó un mínimo de 5×10^6 espermatozoides. Previo a la medición, las células se concentraron por centrifugación (300 g x 5 minutos) en un volumen de ~50 μl , y se añadió IP (a una concentración final de 2.4 μM). Se evaluaron los niveles de Ca^{2+} en las diferentes regiones del espermatozoide.

Como control negativo se utilizaron células a las cuales se les provocó la muerte por medio de un choque térmico aproximadamente a 90°C durante 15 minutos.

6.5 Análisis por citometría de flujo

Se empleó el citómetro de flujo con imágenes Image Stream Mark II (Amnis, USA). Para la adquisición se utilizó el objetivo de 60x, un láser de 405 nm para excitar el colorante Hoechst y 488 nm para excitar el colorante Fluo-3AM y el IP. La potencia de los láseres se ajustó durante cada adquisición (entre 50 y 100 mW) con el fin de reducir los niveles de autofluorescencia, (la cual se obtuvo evaluando espermatozoides sin ningún colorante) al mínimo posible. Para la detección de fluorescencia se emplearon los detectores espectrales: *Ch 02* (480-560 nm) para Fluo-3AM, *Ch 05* (595-660 nm) para IP, *Ch 07* (420-505 nm) para Hoechst, así como el *Ch 04* para campo claro. La adquisición de datos se llevó a cabo utilizando el *software* INSPIRE (Amnis, USA). Durante el momento de la adquisición se utilizaron distintos parámetros para excluir células que morfológicamente no correspondieran a espermatozoides, para ello se fijó un área de $\geq 50 - \leq 200 \mu m^2$, y un valor que determina el grado de circularidad de la célula (*Aspect Ratio*) ≤ 0.4 . Adicionalmente, se estableció un umbral para el gradiente cuadrático medio (*Gradient RMS*), que

determina el grado de enfoque de las células, fijándolo a partir de 60, para excluir eventos fuera de foco (utilizando el *Ch 04* para campo claro). La adquisición celular fue de 10,000 eventos por condición y de ahí se partió para hacer la discriminación celular.

Debido a que las células se cargaron con más de un colorante, se utilizaron controles de células teñidas con cada fluoróforo de manera individual, con el fin de crear matrices de compensación que permitieran eliminar la proporción de sangrado de un fluoróforo en otro canal.

6.6 Análisis por medio de máscaras de segmentación de imágenes, para medir las regiones subcelulares del espermatozoide

Para analizar las imágenes obtenidas, previamente se crearon una serie de máscaras en el *software* de análisis IDEAS versión 6.2 (Amnis, USA) (Matamoros-Volante et al., 2018). Las máscaras tienen como función delimitar la región que contiene los píxeles de interés (es decir los contornos de la célula, regiones específicas). Existen varias opciones para generar máscaras, las cuales identifican diferentes características de los píxeles de una imagen como intensidad, forma, etc. El *software* utiliza este conjunto de píxeles para obtener los parámetros morfológicos, y de intensidad de fluorescencia. Las diferentes máscaras generadas pueden combinarse con el fin de generar máscaras que abarquen diferentes regiones celulares. De esta manera se crearon 4 diferentes máscaras con el fin de identificar: la célula completa, la cabeza, la pieza media y la pieza principal (Matamoros-Volante et al., 2018).

6.7 Selección de poblaciones y parámetros

Como se mencionó anteriormente, se adquirieron alrededor de 10,000 eventos por condición y se crearon parámetros específicos para cada máscara, excluyendo imágenes que no presentan características deseadas en el análisis (Matamoros-Volante et al., 2018).

El orden de los parámetros utilizados para la selección de poblaciones fueron los siguientes: Saturación, Enfoque, Tamaño de célula individual, Longitud y Tasa de Circularidad de la Cabeza, Pieza principal y Pieza media. A partir de esta última población, se generó una, donde por medio de la marca de Hoechst se identifica las células vivas y con la marca de IP a las células muertas (Figura 9A. Población final)

Para las mediciones de Ca^{2+} intracelular se utilizó la marca de Fluo-3AM que identifica las células vivas y teñidas siguiendo la misma secuencia de selección de parámetros (Figura 9B. Población final).

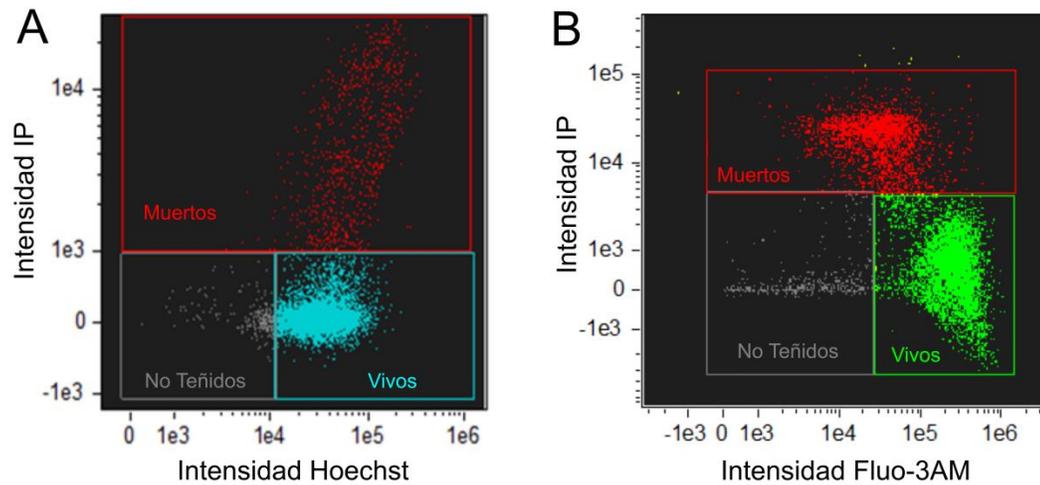


Figura 9. Poblaciones finales. **A.** Población teñida con Hoechst y IP, de la cual las células teñidas se tomarán para hacer las mediciones posteriores. **B.** Población teñida con Fluo-3AM y IP, de la cual las células teñidas se tomarán para hacer las mediciones posteriores.

Después de las discriminaciones, se obtuvieron entre 3000 y 5000 imágenes, sobre las cuales se hicieron los análisis posteriores. Es importante mencionar que todo el procesamiento antes mencionado, se guarda como una plantilla para análisis, el cual se aplica a un archivo sin procesar obtenido del citómetro de imágenes Image Stream Mark II, el software IDEAS realiza todos los procedimientos anteriores de manera automatizada.

6.8 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el software IDEAS 6.2 (AMNIS, USA) mediante histogramas y graficas de puntos (Dot plot) que representan el comportamiento de los eventos celulares adquiridos en diferentes condiciones de viabilidad y capacitación. Los histogramas representan valores normalizados (eje y) contra la intensidad de fluorescencia de un parámetro (eje x). Las gráficas de puntos representan en cada eje (x, y) un parámetro distinto, que nos permite visualizar la distribución de la población, donde cada punto representa una célula analizada. Además, se utilizó el software R versión 1.0.143 que por medio de la agrupación *box plot* (gráficos estandarizados que representan grupos de datos a través de sus cuartiles), nos permitió realizar un análisis de miles de datos de fluorescencia de los diferentes donadores. En

las Figuras 11, 15 y 16 se muestran cajas que representan la dispersión de datos de fluorescencia de Hoechst, IP y Fluo-3AM en la población. En la Figura 16 los datos de fluorescencia fueron normalizados dividiendo la mediana de cada donador, sobre el valor de "curvo pronunciado". Con el software Prism 6.01 (GraphPad, USA) se realizaron las comparaciones de los datos con pruebas de ANOVA de dos vías y con la prueba t-Student para determinar las diferencias entre los tratamientos y la diferencia significativa se consideró cuando $p < 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación de la orientación

En el presente trabajo se planteó determinar si la citometría de flujo es una herramienta para medir orientación de los espermatozoides que permita evaluar distintos parámetros celulares que se podrían aplicar a miles de células. Debido a que se requiere conocer la orientación de los espermatozoides que pasan por el flujo del equipo, se utilizó el parámetro Centroide en Y, que nos permite identificar la localización del centroide de la máscara de la cabeza en la imagen, es decir, se traza un eje de coordenadas en la imagen donde se obtiene un valor de centroide en Y. Los valores altos de centroide en Y indican que la célula se encuentra a favor del flujo "cabeza abajo" y los valores bajos de centroide en Y, que la célula se encuentra con la cabeza en contra del flujo "cabeza arriba" (Figura 10).

Posteriormente con este parámetro se puede graficar la población que va a favor de flujo, la que va en contra y el número de células que hay en cada región (Figura 10B).

Una vez que se establecieron las condiciones de medición y se logró medir la orientación de los espermatozoides por medio del centroide en Y, se determinó que la técnica de citometría de flujo basada en imágenes es una herramienta para determinar y medir la orientación de los espermatozoides en diferentes condiciones de capacitación.

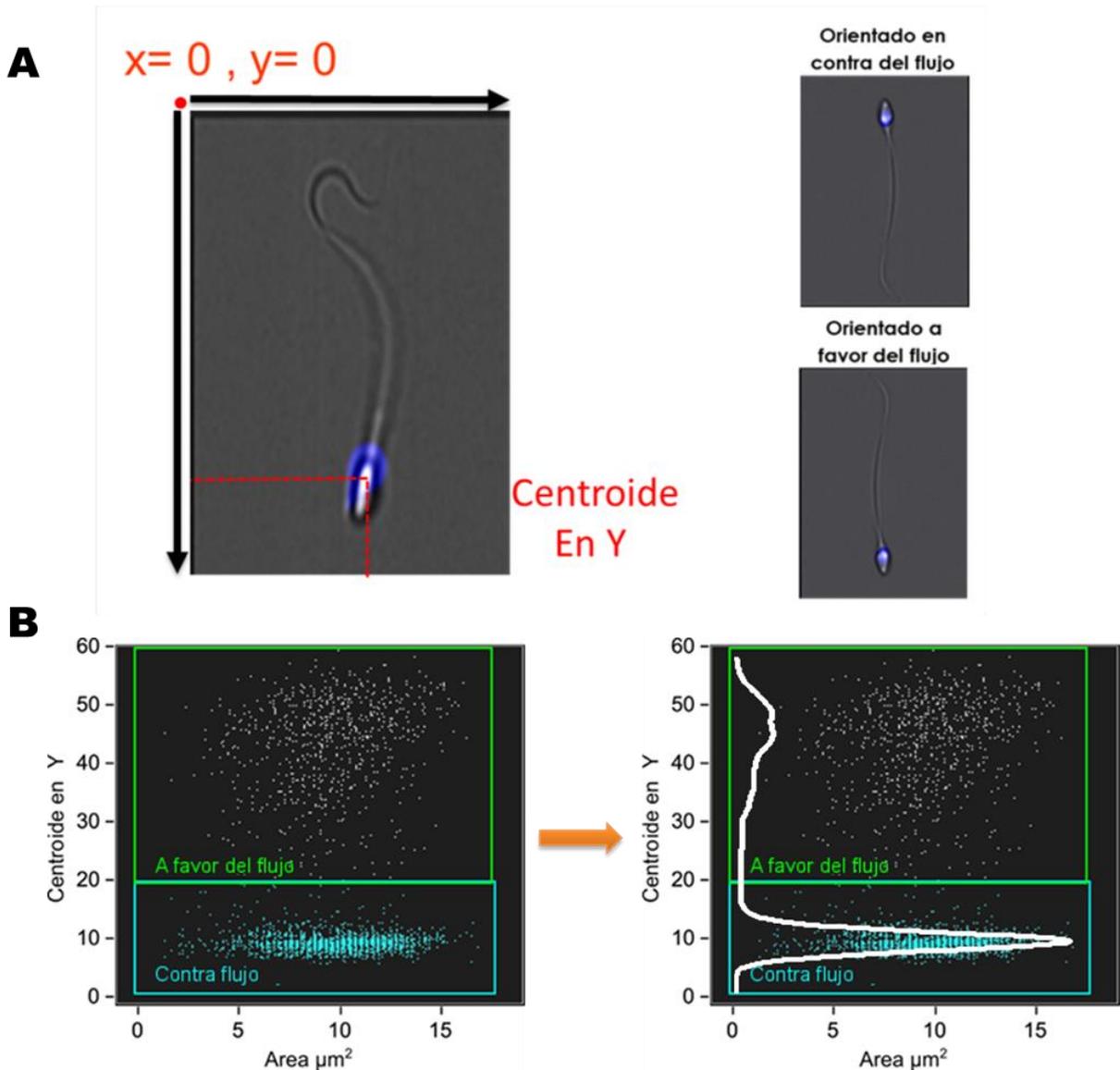


Figura 10. Determinación de la orientación de acuerdo con el parámetro de centroide en Y. **A.** Este valor nos indica si la célula se encuentra en contra del flujo (valor bajo de centroide en Y) o a favor de flujo (valor alto de centroide en Y). **B.** Se muestran con gráfica de puntos (izquierda) o histograma (derecha) los valores de centroide en Y de entre 3000-5000 espermatozoides que se analizaron mediante citometría de flujo acoplada a imágenes. A valores menores y mayores de centroide en Y, las células están orientadas en contra y a favor de flujo, respectivamente.

7.2 Cambios en la orientación durante capacitación en tres diferentes poblaciones

Las células se tiñeron con Hoechst y IP, ambos colorantes de viabilidad, tomando en cuenta que el IP se intercala en las células con la membrana comprometida, es decir, identifica las células muertas. De esta forma, se distinguió la población de células teñidas con Hoechst (Vivos) y las

células muertas por manipulación y/o muerte natural teñidas con IP, a las que se les llamó células por muerte natural (Muertos Nat). Por último, a un grupo de células se les realizó un tratamiento con choque térmico y se tiñeron con IP para identificarlos como células muertas inducidas (Muertos). Se cuantificó la proporción de células orientadas contra flujo de estas tres poblaciones, en los diferentes tiempos de capacitación, como se muestra en la Figura 11.

Se esperaba que solo el porcentaje de células que están orientadas en contra del flujo (cajas azules) aumentara con el tiempo de capacitación. Sin embargo, aumenta el porcentaje de células vivas como las células muertas, por lo tanto, la orientación no depende del tiempo de capacitación, ya que todas las condiciones celulares muestran el mismo comportamiento (Figura 11).

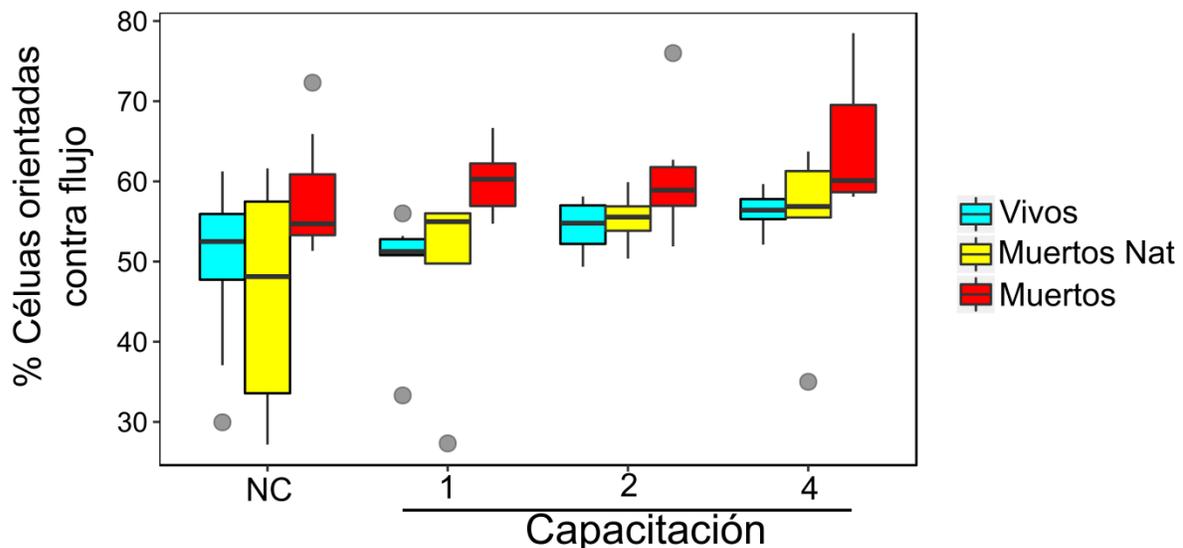


Figura 11. La proporción de células orientadas contra el flujo no cambia durante capacitación. Se muestra el porcentaje de células orientadas en contra del flujo durante capacitación en tres condiciones diferentes. Las cajas azules indican células vivas, las amarillas células muertas de forma natural y en rojo las células por muerte inducida. Los puntos grises son los valores fuera de rango. La prueba se realizó con una n=8 donadores independientes y se midieron entre 2000-4000 células por condición y por donador. La prueba estadística que se utilizó fue una ANOVA de dos vías, la cual no muestra significancia estadística.

Las células a las que se les indujo la muerte (Muertos) presentan un porcentaje de orientación contra flujo mayor a las otras dos condiciones. Una posible explicación a este resultado es que en condiciones normales el tamaño de un espermatozoide es aproximadamente de 60 μm (Figura 1) y una vez que las células se exponen a altas temperaturas (choque térmico a 90°C) su morfología cambia, se vuelven más pequeñas teniendo casi la mitad de longitud de un

espermatozoide normal (Figura 12B). La inducción de muerte provoca que el flagelo se enrolle formando un bucle (Figura 12A, Muertos). Una vez que las células se encuentran en el flujo del equipo al ser más pesadas del lado del bucle, su entrada al sistema se ve favorecida por la región enrollada, dando como resultado un aumento en la orientación en contra del flujo (Figura S1C).

Las condiciones de células vivas y muertas naturales presentan un mismo comportamiento de orientación, ya que su morfología se conserva (Figura 12A), y se muestra en el histograma de la Figura 12B, donde la población de vivos (trazo azul) y Muertos Nat (trazo amarillo) tienen una distribución en la longitud casi idéntica. Por lo tanto, proponemos que la morfología de la célula determina su orientación al alinearse hacia el punto de captura de la imagen (Figura S1).

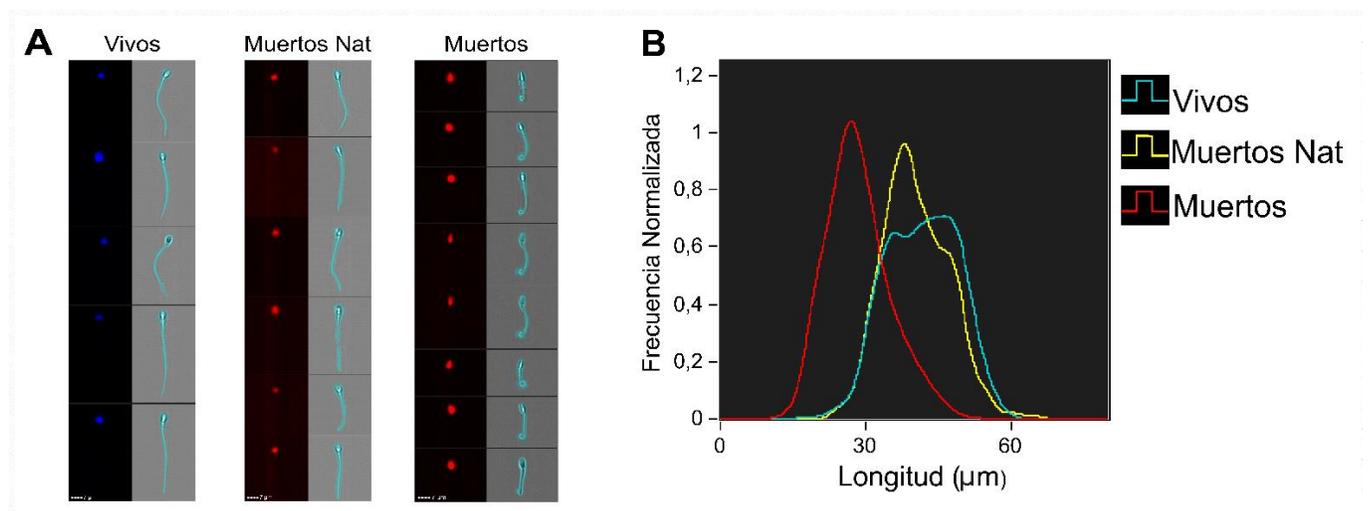


Figura 12. Morfología y longitud de espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos (vivos, muertos inducidos y muertos naturales). **A.** Imágenes representativas de la viabilidad y morfología de espermatozoides bajo 3 condiciones indicadas, donde se aprecia que la morfología de las células muertas cambia con respecto de las otras condiciones. **B.** Histograma que representa la longitud de los espermatozoides en las 3 condiciones indicadas. Cada línea representa la distribución de la longitud en micras de los espermatozoides. La prueba se realizó con $n=8$, y se midieron entre 2000-4000 células por condición.

El equipo cuenta con tres velocidades de flujo envolvente (44, 80 y 120 mm/s), que guían a las células por un capilar una vez que salen de la cámara de mezclado, para que la imagen sea capturada por una cámara (Figura S1). La velocidad de flujo envolvente es diferente de la velocidad de la muestra, donde la velocidad de flujo envolvente que se utilizó fue de 44 mm/s (la más baja) y el equipo calcula el tiempo y la velocidad que tarda en pasar el volumen de muestra, que es de aproximadamente 150 $\mu\text{l/s}$. Ambas velocidades (del flujo envolvente y de la muestra) son más altas que las reportadas en la literatura para el estudio de reotaxis (Tabla 1). En el 2009,

Kölle y colaboradores, midieron la velocidad promedio de transporte de partículas de poliestireno que se presenta en el oviducto de la vaca (prueba *ex vivo*), donde se registró una velocidad de 133 $\mu\text{m/s}$ (Kölle et al., 2009). Otros autores (Miki & Clapham, 2013; Zaferani et al., 2018; Zhang et al., 2016) utilizaron cámaras de microfluídica (Figura S2), lo que les permitió regular la velocidad de flujo (lo que en el equipo de citometría no es posible) y mostrar la reorientación en contra del flujo de los espermatozoides. Por esta razón, proponemos que las células no pueden reorientarse en contra flujo del equipo (debido a la gran velocidad) y que mantienen la orientación que tenían en la cámara de mezclado (Figura S1C).

7.3 Análisis del batido flagelar mediante citometría de flujo

Como anteriormente se mencionó, debido a que no encontramos una orientación favorecida de las células al medirla con esta técnica, se analizó la distribución de la población de acuerdo con su valor de centroide en Y en las diferentes condiciones de capacitación. En el histograma de la Figura 13A, se muestran dos subpoblaciones, una que está orientada en contra del flujo y la otra que está orientada a favor del flujo (Figura 13A). En ésta última población, encontramos que las distribuciones de las diferentes condiciones de capacitación mostraron cambios conforme avanzó el tiempo de capacitación. Las distribuciones de las poblaciones presentaron un menor valor de centroide en Y, es decir, mostraron un corrimiento hacia la izquierda (Figura 13A).

Al observar las imágenes de las células en las diferentes condiciones de capacitación, que presentan un valor de centroide en Y menor (corrimiento a la izquierda), obtuvimos imágenes de espermatozoides con un patrón de batido flagelar muy peculiar, donde su flagelo presentaba muchas curvaturas (Figura 13C), por lo que decidimos llamarle a esa población de células “Curvos pronunciados” (Figura 13).

Por otro lado, de la población de células que presentan un valor de centroide en Y más alto, su patrón de movimiento flagelar mostró movimientos mínimos, en su mayoría se les encontró con menos curvas, y se les llamo “Curvos discretos” (Figura 13B). En la Figura 13C se ilustra el patrón de batido flagelar de las células con flagelo curvo pronunciado y curvo discreto, que corresponden a la población orientadas con el flujo (Figura 13).

Debido a que con el parámetro de centroide en Y, solo se puede analizar la población de células orientadas a favor de flujo (Figura 13), necesitábamos una estrategia que nos permitiera detectar

las curvaturas (pronunciadas y discretas) del flagelo, pero ahora en la población con orientación en contra de flujo.

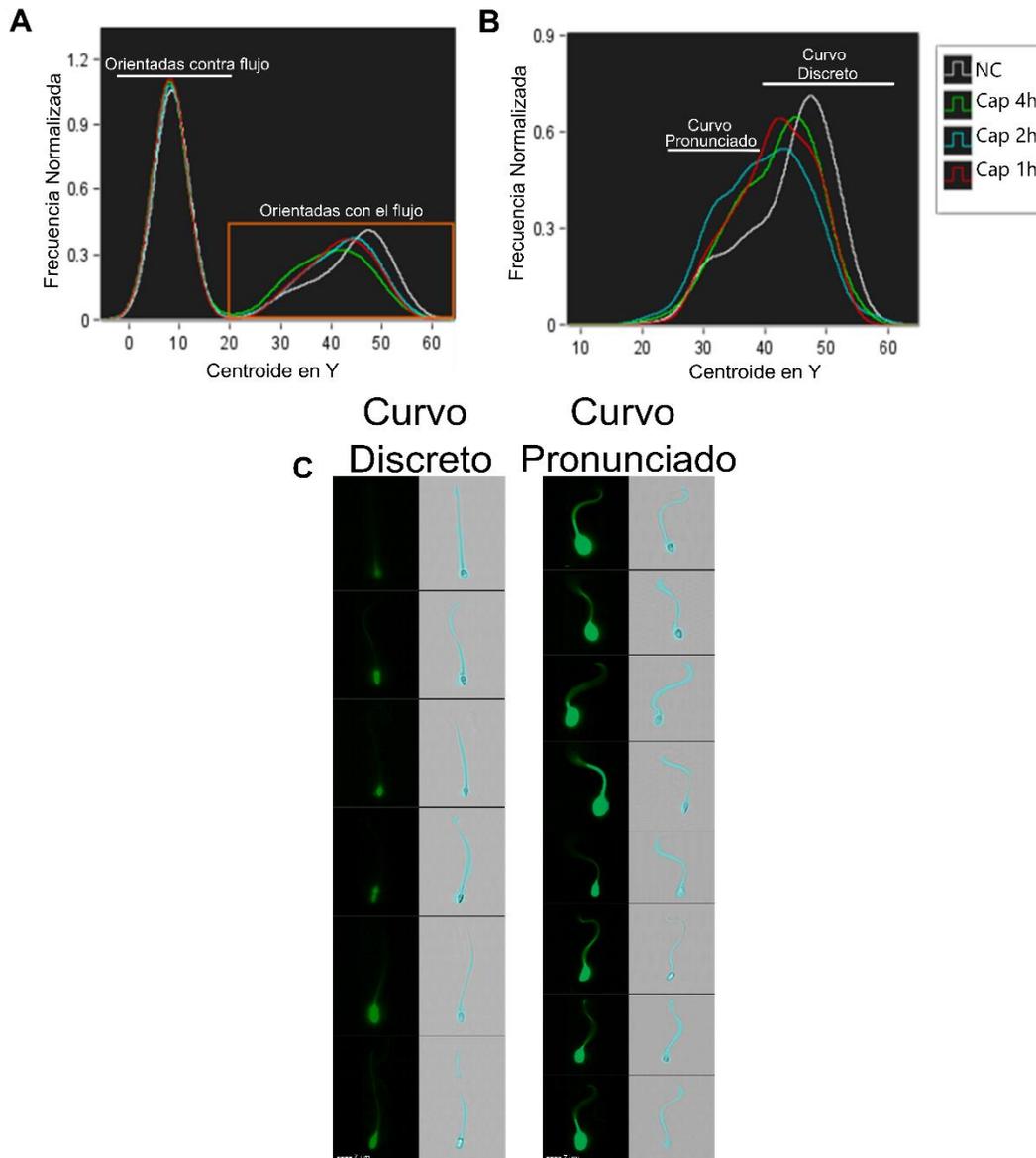


Figura 13. El valor de centroide en Y determina la orientación de las células e imágenes representativas de células con cambio en el patrón de batido flagelar. A. Histograma que muestra el conjunto de células que se orientan con el flujo y las células que se orientan contra flujo en distintos tiempos de capacitación. **B.** Acercamiento de la región de células que están orientadas con el flujo, donde se observa una subpoblación que tiene un valor menor de centroide en Y, a medida que aumenta el tiempo de capacitación. Al observar las imágenes de esa población se encontró que las de menor valor de centroide en Y son espermatozoides con el flagelo curvo pronunciado y las de mayor valor, presentan el flagelo con curvaturas discretas. Las líneas de los histogramas corresponden a diferentes tiempos de capacitación, la línea blanca representa la condición no capacitante (NC), la línea roja 1 hora de capacitación (Cap 1), la línea azul 2 horas de capacitación (Cap 2) y la línea verde 4 horas de capacitación (Cap 4). **C.** Del lado izquierdo se muestran las células de la subpoblación Curvo discreto y del lado derecho la subpoblación de células Curvo pronunciado. Se muestra la

imagen de fluorescencia del lado izquierdo y el campo claro del lado derecho con la máscara de espermatozoide completo. n= 8, se analizaron 2000-4000 células por condición.

Para resolver esta cuestión, utilizamos dos parámetros, la longitud del espermatozoide y el centroide en Y. Como se muestra en la Figura 13A, las células que tienen orientación en contra del flujo (cabezas arriba) presentan un valor de centroide menor, al que se le denominó “k” y a la longitud del espermatozoide se le llamó “a”. Al dividir el valor de la longitud del espermatozoide (a) sobre el centroide en Y (k), obtenemos un valor mayor a 1, que permite agrupar las células del lado derecho del histograma de la Figura 14B. Mientras que las células orientadas con el flujo (cabezas abajo) presentan un valor de centroide en Y alto (k) y el valor de la longitud del espermatozoide es cercano al valor del centroide en Y (a). Al realizar la división del valor de la longitud del espermatozoide (a) sobre el valor del centroide en Y (k), se obtiene un valor aproximado de 1 (Figura 14A), que permite concentrar las células del lado izquierdo del histograma (Figura 14B). Con este procedimiento se detectaron las células con curvaturas pronunciadas en el flagelo, de la población orientada contra el flujo. Posteriormente se realizó una superposición de los histogramas de las diferentes condiciones de capacitación como en la Figura 13 para agrupar las células con el flagelo curvo pronunciado y las células con el flagelo curvo discreto (Figura 14B).

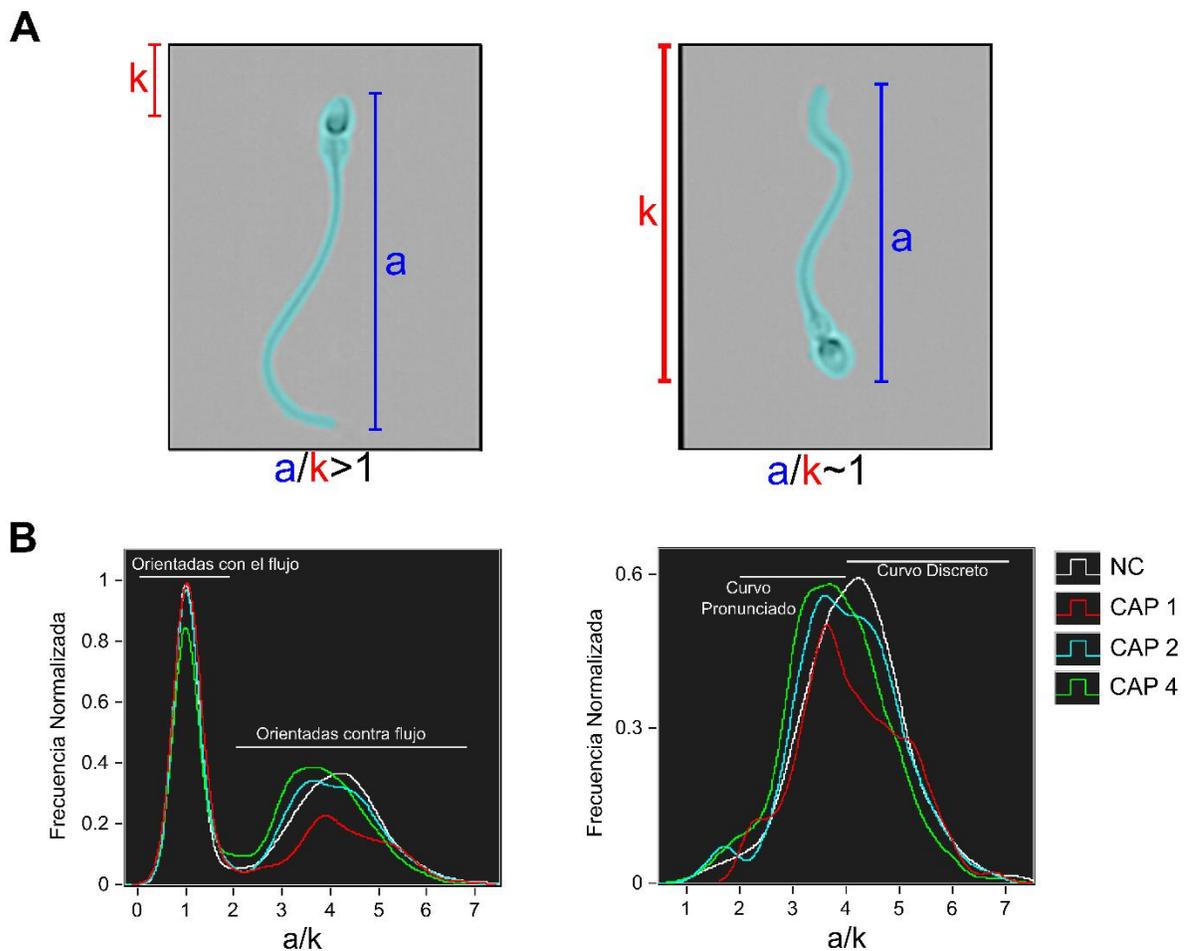


Figura 14. Identificación de la subpoblación curvos pronunciados de acuerdo con el valor de la longitud del espermatozoide y de su centroide en Y (a/k). **A.** Representación de los parámetros utilizados, para obtener la distribución de las células de la población con orientación en contra del flujo, siguiendo los mismos criterios de selección celular. **B-** Izquierda. Histograma que muestra la distribución de las subpoblaciones de células orientadas con el flujo y en contra del flujo, de acuerdo con la relación entre la longitud del espermatozoide y el centroide en Y. **B- Derecha.** Distribución de las células con flagelo curvo pronunciado y discreto, a partir de la población de orientadas contra flujo en los diferentes tiempos de capacitación (NC, 1, 2 y 4 horas). $n=8$, se analizaron 2000-4000 células por condición.

Una vez establecida la identificación de las subpoblaciones de células con el flagelo curvo pronunciado sin importar la orientación, se cambió y extendió el tiempo de capacitación, dejando las células capacitar 4 y 6 horas, esto debido a que el tiempo óptimo de capacitación en espermatozoides de humano es de 6 horas (Davis, 1981).

La capacitación promueve la hiperactivación, que se caracteriza por un batido flagelar vigoroso y de gran amplitud (S. S. Suarez et al., 1991; Susan S. Suarez, 2008), nos preguntamos si la proporción de células con el flagelo curvo pronunciado aumentaría con el tiempo de capacitación, reflejando posiblemente el movimiento hiperactivado y permitiendo que el espermatozoide logre

vencer la fuerza del flujo a la que se ve sometido por el equipo. Por lo que determinamos el porcentaje de células con flagelo curvo pronunciado sin importar su orientación.

La Figura 15 muestra el porcentaje de células con flagelo curvo pronunciado y discreto en los diferentes tiempos de capacitación, a partir de la población de células vivas (Figura 9) sin importar su orientación.

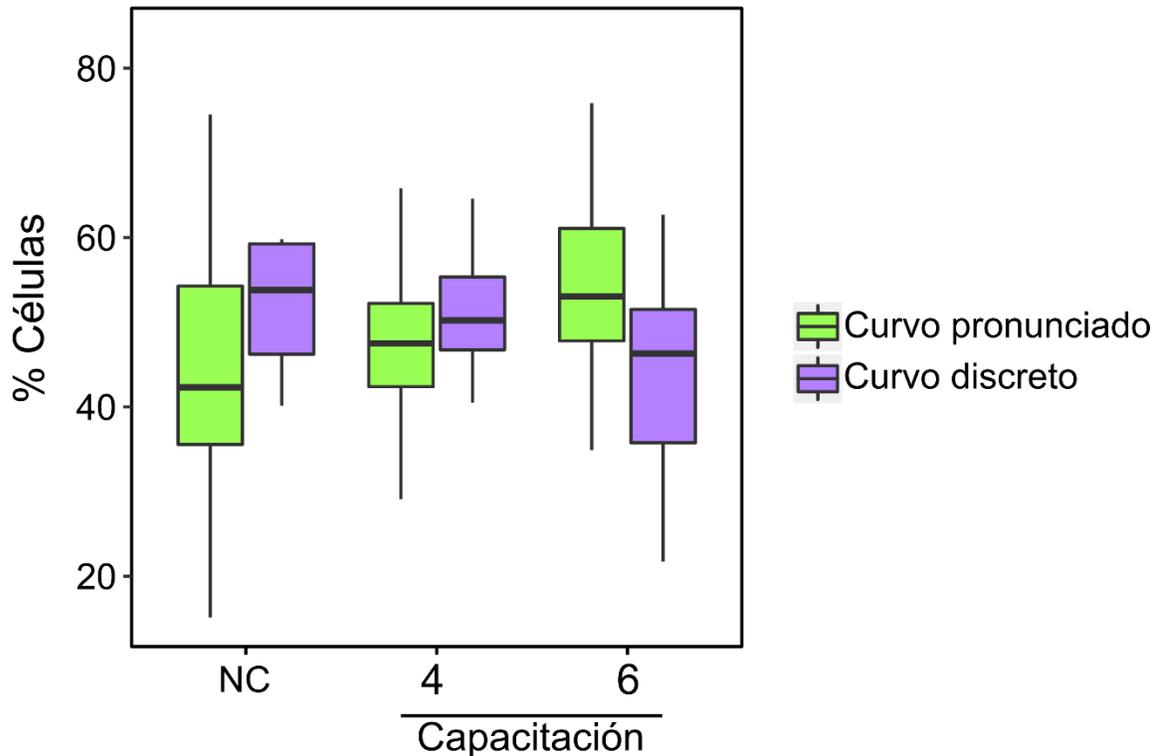


Figura 15. El porcentaje de las células con el flagelo curvo pronunciado tiene una tendencia a aumentar con el tiempo de capacitación mientras que la subpoblación de células con flagelos curvos discretos disminuye. Se grafica el porcentaje de células con flagelo curvo pronunciado y discreto en las diferentes condiciones de capacitación (NC, Capacitación 4 y 6 horas). $n=8$ donadores diferentes, 2000-3000 células por condición. Se aplicó una prueba ANOVA de dos vías sin tener diferencias significativas.

De acuerdo con los datos mostrados, encontramos una tendencia a una relación inversa. Mientras que la proporción de células que tienen el flagelo curvo pronunciado (cajas verdes) aumenta con el tiempo de capacitación, el número de células que se encuentran con el flagelo curvo discreto (cajas moradas) disminuye (Figura 15). Debido a la gran variabilidad de los datos de los diferentes donadores (Figura S3), no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones, pero se evidencia la tendencia del aumento del porcentaje de células curvas pronunciadas contra las células curvas discretas en función del tiempo de capacitación.

Por otro lado, como se mencionó previamente, se sabe que para que los espermatozoides puedan hiperactivarse requieren de CatSper, el canal iónico permeable a Ca^{2+} que se encuentra en la pieza principal del flagelo (Ren et al., 2001) (Chung et al., 2014). El influjo de este ion, les posibilita cambiar el patrón de batido flagelar de los espermatozoides volviéndolo asimétrico y vigoroso (Carlson et al., 2003; S. S. Suarez et al., 1991; Susan S. Suarez, 2008), que les permite salir del reservorio de almacenamiento para liberarse del epitelio, atravesar el fluido oviductal y penetrar en el ovocito (Ho et al., 2009).

Con esta nueva evidencia nos surgieron varias preguntas, de acuerdo con lo que se ha reportado sobre el batido flagelar, ¿Qué pasa con el Ca^{2+} intracelular en estas células que presentan su flagelo con mayores curvaturas? ¿Será diferente que en las células con menores curvaturas en el flagelo? ¿Tendría relación con la hiperactivación de los espermatozoides?

Para responder estas preguntas, decidimos comparar los niveles de Ca^{2+} intracelular en la población de células con el flagelo curvo pronunciado y discreto.

7.4 Medición de Ca^{2+} intracelular en espermatozoides

Para evaluar el Ca^{2+} intracelular en los espermatozoides se utilizó la tinción con el colorante fluorescente Fluo-3AM, el cual incrementa su fluorescencia cuando el Ca^{2+} intracelular aumenta, y nos proporciona una medida cualitativa de los niveles de Ca^{2+} intracelular en la célula.

Se sabe que durante capacitación hay un aumento de Ca^{2+} intracelular principalmente en el flagelo (Ren et al., 2001) (Carlson et al., 2003), región donde se localiza el canal CatSper. Utilizando el protocolo de segmentación (Matamoros-Volante et al., 2018) se midieron los niveles de fluorescencia en las diferentes regiones del espermatozoide: cabeza, pieza media y pieza principal (Figura 16).

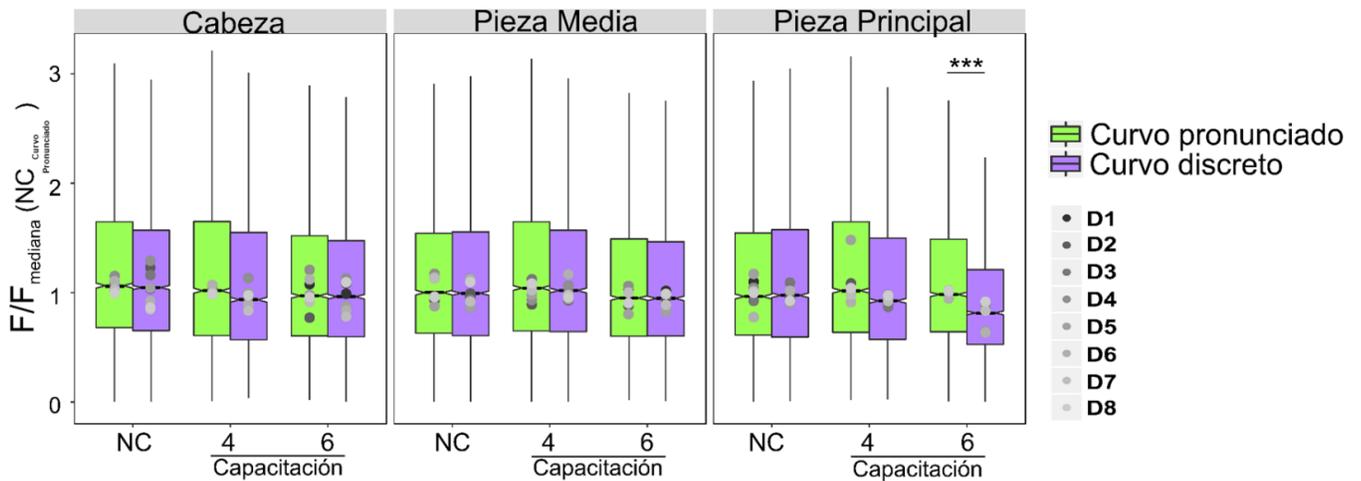


Figura 16. Aumento en los niveles de fluorescencia en la región de la pieza principal, de células con el flagelo curvo pronunciado en función del tiempo de capacitación. Los valores están normalizados contra la mediana de la condición NC (no capacitante) de la población de células con el flagelo curvo pronunciado. Los puntos en las diferentes tonalidades de grises representan el valor de la mediana para cada uno de los diferentes donadores (D1-D8). $n = 8$ donadores, 2000- 4000 células por condición. Se realizó una prueba t-Student, la cual mostró diferencia significativa en la región de la pieza principal a las 6 horas de capacitación, $***p = 0.001$.

Una vez que se midió el Ca^{2+} intracelular, en la región de la cabeza y la pieza media, no se encontraron diferencias significativas entre las dos poblaciones a ningún tiempo de capacitación. Sin embargo, en la región de la pieza principal se presenta un aumento en la fluorescencia en las células con el flagelo curvo pronunciado (cajas verdes), al tiempo de capacitación de 4 y 6 horas, en relación con la fluorescencia de las células curvas discretas (cajas moradas), aunque el efecto es mucho más evidente al tiempo de capacitación de 6 horas (Figura 16). Los resultados muestran una gran variabilidad de los datos registrados en los espermatozoides de humano, aun realizando repeticiones experimentales con diferentes donadores.

Estos resultados mostraron que los espermatozoides al tener mayor tiempo de capacitación (6 horas) y mostrar ángulos de torsión en el flagelo, es decir, mayores curvaturas pronunciadas flagelares, presentan un mayor nivel de fluorescencia (influjos de Ca^{2+} intracelular).

Consideramos que el patrón de curvaturas pronunciadas flagelares podría reflejar el grado de movilidad de las células, es decir, los espermatozoides que presentan curvaturas pronunciadas en su flagelo corresponden a una mayor capacidad de movimiento dada por los influjos de Ca^{2+} intracelular, que se ve reflejada en un aumento en la fluorescencia en la pieza principal del

espermatozoide. Intuimos que estas células con curvaturas pronunciadas en el flagelo podrían estar hiperactivadas, debido a que se exponen a un flujo, se someten a condiciones capacitantes y presentan un aumento de Ca^{2+} intracelular en la región de la pieza principal. En contraste con aquellas células que presentan menos curvaturas flagelares (curvas discretas), así como bajos niveles de Ca^{2+} intracelular.

Con este equipo no fue posible medir reotaxis, hipotetizamos que una de las razones es debido a que no se puede manipular la velocidad de flujo que experimentan las células, en el equipo. La velocidad de flujo registrada es mayor a la reportada por diferentes autores, donde si es posible medir el efecto de la reotaxis. Sin embargo, de manera interesante encontramos una población celular, que presentan curvaturas pronunciadas en el flagelo y que el nivel de Ca^{2+} intracelular de éstas aumenta en función del tiempo de capacitación, sin importar su orientación. Además, consideramos que el efecto del batido flagelar vigoroso puede estar estrechamente relacionado con el movimiento hiperactivado de los espermatozoides y, por lo tanto, sugerimos la participación del canal de Ca^{2+} , CatSper. Este trabajo sirve como precedente para el desarrollo de otros proyectos, donde además de aprovechar la medición de múltiples parámetros fisiológicos por medio de la fluorescencia, se pueden asociar con los diferentes patrones de movimiento flagelar, así como comprobar si las células que tienen curvas pronunciadas corresponden a las hiperactivadas, por medio de tratamientos farmacológicos, donde su blanco sea el canal CatSper.

8. CONCLUSIONES

1. Por medio de la citometría de flujo se puede medir la orientación en los espermatozoides de humano, pero no reotaxis.
2. Se localizó una población de espermatozoides que presenta batido flagelar asimétrico y de gran amplitud.
3. Esta población de células con mayor curvatura flagelar aumenta (de un 40% a un 60% aproximadamente) en función del tiempo (0 a 6 horas) de capacitación.
4. Las células que presentan mayor curvatura flagelar (curvo pronunciado), muestran un aumento en el nivel de fluorescencia (incremento en el nivel de Ca^{2+} intracelular) en función del tiempo de capacitación, en la región de la pieza principal.

9. PERSPECTIVAS

1. Mejorar el procesamiento de las imágenes al seleccionar y discriminar poblaciones para evitar errores.
2. Desarrollar un algoritmo que nos permita identificar en poblaciones celulares aquellas que presenten mayores curvaturas en el flagelo, de forma automatizada y al mismo tiempo nos arroje más información sobre aspectos fisiológicos en grandes poblaciones celulares.
3. Comprobar si las células que tienen curvaturas pronunciadas en el flagelo están relacionadas con la hiperactivación, y a su vez para dilucidar la participación de CatSper, se pueden utilizar fármacos o antagonistas para esta proteína.

10. REFERENCIAS

- Austin. (1952). *The Capacitation of the Mammalian Sperm*. 170(1951), 328–329.
- Bahat, A., & Eisenbach, M. (2006). Sperm thermotaxis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 252(1–2), 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.03.027>
- Bahat, A., Eisenbach, M., & Tur-Kaspa, I. (2005). Periovulatory increase in temperature difference within the rabbit oviduct. *Human Reproduction*, 20(8), 2118–2121. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei006>
- Carlson, A. E., Westenbroek, R. E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D. E., Hille, B., Garbers, D. L., & Babcock, D. F. (2003). CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14864–14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.2536658100>
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277), 697–698. <https://www.nature.com/articles/168697b0>
- Chung, J. J., Shim, S. H., Everley, R. A., Gygi, S. P., Zhuang, X., & Clapham, D. E. (2014). Structurally distinct Ca²⁺-signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell*, 157(4), 808–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.056>
- Cicinelli, E., Einer-Jensen, N., Barba, B., Luisi, D., Alfonso, R., & Tartagni, M. (2004). Blood to the cornual area of the uterus is mainly supplied from the ovarian artery in the follicular phase and from the uterine artery in the luteal phase. *Human Reproduction*, 19(4), 1003–1008.

<https://doi.org/10.1093/humrep/deh171>

- Cohen-Dayag, A., Ralt, D., Tur-Kaspa, I., Manor, M., Makler, A., Dor, J., Mashiach, S., & Eisenbach, M. (1994). Sequential acquisition of chemotactic responsiveness by human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, *50*(4), 786–790. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8199259>
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011a). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*, *91*(4), 1305–1355. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2010>
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011b). Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiological Reviews*, *91*(4), 1305–1355. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2010>
- Eisenbach, M., Breitbart, H., Bahat, A., Gakamsky, A., Giojalas, L. C., & Tur-Kaspa, I. (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: A potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm0203-149>
- Eisenbach, M., Cerezales, S., & Boryshpolets, S. (2015). Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance. *Asian Journal of Andrology*, *17*(4), 628. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.154308>
- Ho, K., Wolff, C. A., & Suarez, S. S. (2009). CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reproduction, Fertility and Development*, *21*(2), 345–350. <https://doi.org/10.1071/RD08183>
- Jaiswal, B.S., and E. (2002). *Fertilization*. (editor. A. P. I. D.M. Hardy (ed.)).
- Kölle, S., Dubielzig, S., Reese, S., Wehrend, A., König, P., & Kummer, W. (2009). Ciliary Transport, Gamete Interaction, and Effects of the Early Embryo in the Oviduct: Ex Vivo Analyses Using a New Digital Videomicroscopic System in the Cow1. *Biology of Reproduction*, *81*(2), 267–274. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073874>
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, *471*(7338), 387–392. <https://doi.org/10.1038/nature09767>
- Lottero-Leconte, R., Isidro Alonso, C. A., Castellano, L., & Martinez, S. P. (2017). Mechanisms of the sperm guidance, an essential aid for meeting the oocyte. *Translational Cancer Research*,

6(S2), S427–S430. <https://doi.org/10.21037/tcr.2017.03.68>

- Mata-Martínez, E., José, O., Torres-Rodríguez, P., Solís-López, A., Sánchez-Tusie, A. A., Sánchez-Guevara, Y., Treviño, M. B., & Treviño, C. L. (2013). Measuring intracellular Ca²⁺ changes in human sperm using four techniques: conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 75, e50344. <https://doi.org/10.3791/50344>
- Matamoros-Volante, A., Moreno-Irusta, A., Torres-Rodríguez, P., Giojalas, L., Gervasi, M. G., Visconti, P. E., & Treviño, C. L. (2018). Semi-automatized segmentation method using image-based flow cytometry to study sperm physiology: the case of capacitation-induced tyrosine phosphorylation. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 24(2), 64–73. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax062>
- Miki, K., & Clapham, D. E. (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Current Biology*, 23(6), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.007>
- Pacey, A. et al., 1995. (1995). Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Human Reproduction*, 10(10), 2603–2609. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135754>
- Quill, T. A., Sugden, S. A., Rossi, K. L., Doolittle, L. K., Hammer, R. E., & Garbers, D. L. (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14869–14874. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136654100>
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly², J. L., & Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. In *NATURE* (Vol. 413). www.nature.com
- Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B., & Powell, R. L. (1991). Evidence for the Function of Hyperactivated Motility in Sperm1. *Biology of Reproduction*, 44(2), 375–381. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.2.375>
- Suarez Susan., 1987. (1987). Sperm Transport and Motility in the Mouse Oviduct : Observations In Situ. *Biology of Reproduction*, 203–210.
- Suarez, Susan S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, 14(6), 647–657. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn029>

- Xia, J., Reigada, D., Mitchell, C. H., & Ren, D. (2007). CATSPER Channel-Mediated Ca²⁺ Entry into Mouse Sperm Triggers a Tail-to-Head Propagation¹. *Biology of Reproduction*, 77(3), 551–559. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.061358>
- Yanagimachi, R. (1970). the Movement of Golden Hamster. *J. Reprod. Fertil.*, 23, 193–196.
- Yoshida, M., & Yoshida, K. (2011). Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca²⁺. *Molecular Human Reproduction*, 17(8), 457–465. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar041>
- Zaferani, M., Cheong, S. H., & Abbaspourrad, A. (2018). Rheotaxis-based separation of sperm with progressive motility using a microfluidic corral system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201800819. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800819115>
- Zhang, Z., Liu, J., Meriano, J., Ru, C., Xie, S., Luo, J., & Sun, Y. (2016). Human sperm rheotaxis: A passive physical process. *Scientific Reports*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep23553>

11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

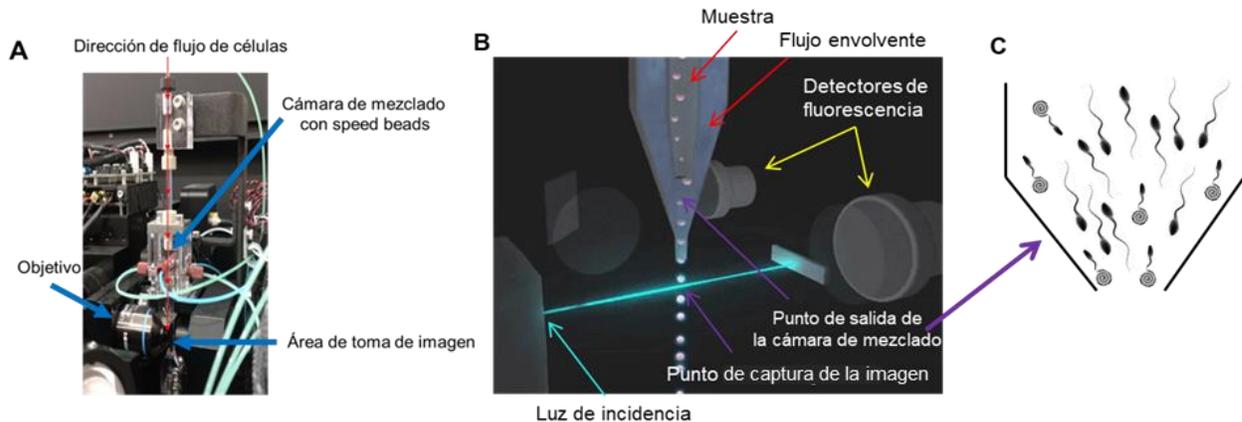


Figura S1. Esquema que representa el funcionamiento del citómetro basado en imágenes (ANMIS). S1A y B. Se muestra la dirección de flujo de las células, una vez que son succionadas por el equipo, los componentes que las dirigen al punto de captura de la imagen. S1C. Dibujo que representa la orientación de las células en el medio antes de la salida de la cámara de mezclado y que una vez que son llevados por la gran velocidad de flujo envolvente las células no pueden cambiar de orientación.

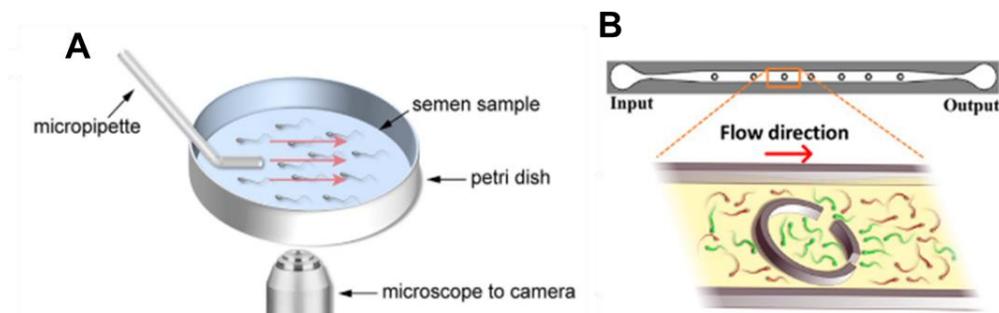


Figura S2. Dispositivos para medir reotaxis. Para medir reotaxis se utilizan cámaras de microfluídica que les permiten fijar la velocidad de flujo a la cual las células se enfrentaran, medir el comportamiento en células individuales y pueden seleccionar las células reotácticas. A) Cámara que utiliza una micropipeta que induce el flujo sobre una placa de Petri y las imágenes son capturadas por una cámara microscópica. Modificado de Zhang et al., 2016 y B) Cámara que al presentar reotaxis los espermatozoides se quedan atrapados en el anillo que se encuentra a la mitad del canal de flujo, de esta manera se pueden seleccionar los espermatozoides reotácticos. Modificado de Zaferani et al., 2018.

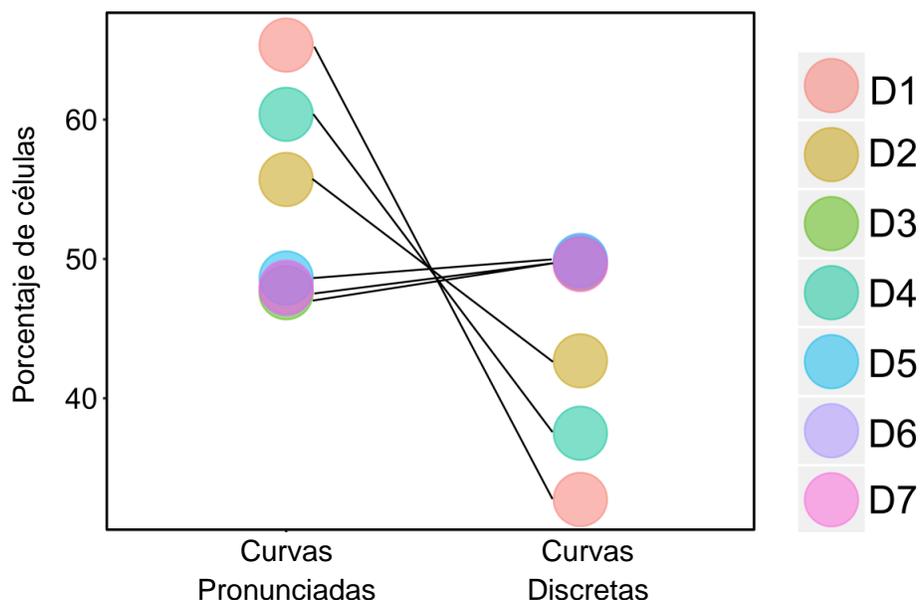


Figura S3. Variabilidad de los datos de 7 donadores diferentes. Los círculos de colores muestran la variabilidad de los datos midiendo la proporción de células con curvaturas pronunciadas en el flagelo y curvaturas discretas de 7 donadores diferentes (D1-D7), que abarca un rango amplio a pesar de que las condiciones y tratamientos se aplicaron de manera homogénea para todas las muestras.

12. TABLA

Tabla 1. Comparación de velocidades de flujo de espermatozoides en distintos dispositivos para medir reotaxis.

Referencia	Velocidad de Flujo	Dispositivo	Organismo
(Miki & Clapham, 2013)	10 $\mu\text{m/s}$	Cámara de microfluídica	Humano/Ratón
(Zhang et al., 2016)	90 $\mu\text{m/s}$	Cámara de microfluídica	Humano
(Zaferani et al., 2018)	0.33 $\mu\text{m/s}$ (1.2 ml/h)	Cámara de microfluídica	Humano/Bovino
	~150 $\mu\text{l/s}$	AMNIS	Humano