

Efecto del triptófano sobre la cinemática de los espermatozoides de cerdo: Análisis de la dinámica de los agrupamientos de las trayectorias, utilizando los descriptores de Fourier

Eder Alejandro Rodríguez-Martínez¹, Cindy Ursula Rivas-Arzaluz²,
Andrés Aragón-Martínez²

¹ Universidad Autónoma de Baja California,
Facultad de Ingeniería,
México

² Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Estudios Superiores Iztacala,
México

armandres@gmail.com

Resumen. La identificación de subpoblaciones cinemáticas espermáticas es esencial en biología reproductiva, particularmente cuando se evalúa la movilidad espermática mediante un sistema CASA. Tradicionalmente, la identificación de las subpoblaciones se realiza con estadística multivariada utilizando como entrada los parámetros de movilidad espermática. A partir de las coordenadas, es posible reconstruir las trayectorias de los espermatozoides. Estas reconstrucciones pueden ser utilizadas como insumo para algoritmos de clasificación. Sin embargo, este enfoque presenta desafíos significativos en términos de costos computacionales y omite el análisis de la dimensión temporal. En este trabajo, desarrollamos un método computacional que hace uso de las coordenadas espermáticas para generar descriptores de Fourier, que sirvieron como entrada para el análisis de componentes principales seguido de agrupamiento jerárquico. Las imágenes de las trayectorias se reconstruyeron en cada agrupamiento para verificar la homogeneidad de los grupos. Trabajamos con muestras de semen de cerdo, fueron tratadas con diferentes concentraciones de triptófano y se evaluó la movilidad con un sistema CASA. Se obtuvieron seis subpoblaciones, la subpoblación tres presentó el valor más alto de movilidad en el control. En esta subpoblación el triptófano indujo una disminución de la velocidad curvilínea y aumentó la linealidad de las trayectorias. El efecto del triptófano puede explicarse por la presencia de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), encargada de convertir el triptófano a serotonina. En conclusión, los descriptores de Fourier son una alternativa al uso de la generación de imágenes que sirvan como entrada para algoritmos de agrupamiento, a la vez que los grupos formados resultan homogéneos.

Palabras clave: Subpoblaciones cinemáticas, triptófano, serotonina, trayectorias espermáticas, descriptores de Fourier.

Effect of Tryptophan on the Kinematics of Boar Sperm: Analysis of Clustering Dynamics of Trajectories Using Fourier Descriptors

Abstract. The identification of kinematic subpopulations of sperm is essential in reproductive biology, particularly when evaluating sperm motility using a CASA system. Traditionally, the identification of subpopulations is performed conventionally with multivariate statistics using the values of sperm motility parameters as input. From the obtained coordinates, it is possible to visually reconstruct the sperm trajectories. These reconstructions can be used as input for classification algorithms. However, this approach presents significant challenges in terms of computational costs and omits the analysis of the temporal dimension. In this work, we developed a computational method that uses sperm coordinates to generate Fourier descriptors, which served as input for principal component analysis followed by hierarchical clustering. The trajectory images were reconstructed in each cluster to verify the homogeneity of the groups. We worked with boar semen samples, which were treated with different concentrations of tryptophan and evaluated for motility with a CASA system. Six subpopulations were obtained, and subpopulation three presented the highest motility value in the control. In this subpopulation, tryptophan induced a decrease in curvilinear velocity while increasing the linearity of the trajectories. The effect of tryptophan can be explained based on its metabolism or the presence of the enzyme tryptophan hydroxylase (TPH), which converts tryptophan to serotonin. In conclusion, Fourier descriptors are an alternative to the use of image generation as input for clustering algorithms, while the formed groups are homogeneous.

Keywords: Kinematic subpopulations, tryptophan, serotonin, sperm trajectories, Fourier descriptors.

1. Introducción

Los sistemas automatizados de análisis de la movilidad espermática (CASA), reconocen la cabeza de los espermatozoides en imágenes consecutivas, y mediante rastreo digital registran las coordenadas de cada célula detectada. Con esas coordenadas es posible: 1) calcular distintos parámetros cinemáticos y 2) reconstruir la trayectoria de los espermatozoides (Figura 1). La identificación de subpoblaciones cinemáticas se realiza de manera convencional analizando los valores de los parámetros cinemáticos [1].

Recientemente, nosotros hemos utilizado las coordenadas espermáticas para reconstruir las imágenes de las trayectorias espermáticas individuales, y hemos utilizado esas imágenes como entrada para algoritmos de agrupamiento jerárquico y SCAN, mediante machine learning [1,2]. En los trabajos citados anteriormente describimos seis [1] y siete clusters [2], respectivamente. Aunque el agrupamiento jerárquico agrupa satisfactoriamente las imágenes, tiene algunos inconvenientes como la sensibilidad a la rotación y traslación.

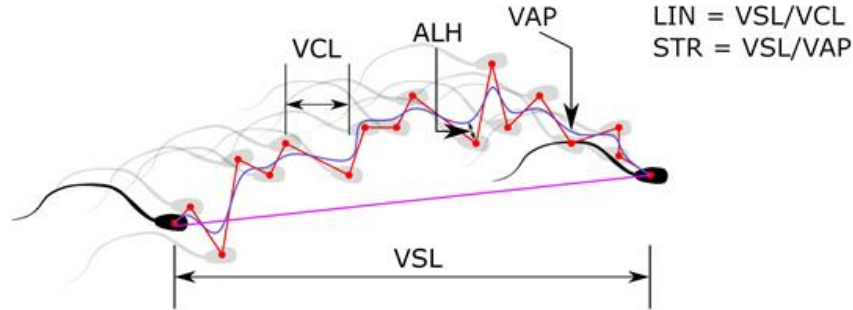


Fig. 1. Esquema de la trayectoria de un espermatozoide, y de algunos de los parámetros cinemáticos que pueden calcularse a partir de las coordenadas. Los puntos rojos son los sitios donde se detectó la cabeza de un espermatozoide en fotogramas consecutivos. El espermatozoide negro a la izquierda indica el punto inicial en el que se detectó al espermatozoide, los espermatozoides grises indican la posición del mismo en fotogramas sucesivos, y el espermatozoide negro a la derecha muestra la posición final del espermatozoide en el segmento de video. La línea roja: la velocidad punto a punto, la línea azul: la velocidad promedio y la línea rosa: la velocidad en línea recta. VCL, velocidad curvilínea; VAP, velocidad promedio; VSL, velocidad en línea recta; ALH, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza con respecto a VAP; LIN y STR son dos índices que dan idea de la linealidad de la trayectoria con respecto a VCL y VAP, respectivamente.

Por su parte, el algoritmo SCAN es robusto a transformaciones de imágenes, por ejemplo, la rotación, la escala y la traslación, entre otras [3]. Esto se debe a que la función de costo es capaz de destruir la información no deseada relativa a las transformaciones de imagen. En consecuencia, los agrupamientos resultantes son más homogéneos que los propuestos por el algoritmo aglomerativo jerárquico. Por su parte, los Descriptores de Fourier (FD) son una representación global de la forma para modelar contornos cerrados utilizando la transformada de Fourier.

Una de las principales ventajas del uso de los descriptores de Fourier es que son fáciles de calcular, simples de normalizar e interpretar [4], además es posible capturar propiedades generales de la forma con solo unos pocos valores numéricos, y el nivel de detalle puede aumentarse o disminuirse, añadiendo o eliminando elementos [5]. Son métodos ampliamente aplicados en varios campos como el análisis de imágenes médicas, bioinformática, biología, gráficos y visión por computadora [6].

Por otra parte, se ha reportado que los espermatozoides expresan proteínas relacionadas con la comunicación serotoninérgica, como receptores, transportadores y proteínas metabolizadoras [7]. Los autores describieron un aumento en las velocidades promedio de los espermatozoides debido a la exposición a la serotonina. En otros estudios se describieron los valores promedio de los parámetros de movilidad de los espermatozoides expuestos a agonistas o antagonistas de los receptores de serotonina [8,9].

Actualmente, se desconoce la estructura de las subpoblaciones cinemáticas de espermatozoides expuestos a sustancias que regulan la comunicación serotoninérgica. Sin embargo, si la serotonina estimula la movilidad de los espermatozoides, entonces el bloqueo de la comunicación serotoninérgica podría cambiar la estructura de las subpoblaciones cinemáticas.

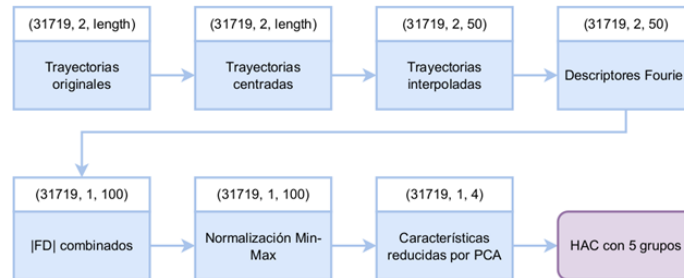


Fig. 2. Representación esquemática del proceso de análisis de trayectorias, ilustra los pasos secuenciales desde los datos crudos de las trayectorias hasta el agrupamiento. El proceso comienza con la fase de pre-procesamiento, donde las trayectorias son centradas a su media e interpoladas de manera uniforme para asegurar consistencia. Las etapas subsecuentes involucran el cálculo de los FDs capturando los patrones geométricos, la normalización de los vectores y la reducción de la dimensionalidad mediante un PCA para retener el 95% de la varianza de los datos. El conjunto final de características reducidas sirvió como entrada para el HAC. Los números y el texto en paréntesis son: Número de elementos, dimensiones de características, número de muestras de características.

Recientemente, nosotros demostramos que, en una subpoblación de espermatozoides, la inhibición del receptor 2 de serotonina aumenta la velocidad y disminuye la linealidad de las trayectorias dependiendo de la duración de la exposición [1]. En Biología reproductiva, la identificación-cuantificación de subpoblaciones espermáticas con trayectorias definidas podrían servir como indicadores de fertilidad masculina. En este trabajo utilizamos la coordenada de espermatozoides expuestos a diferentes concentraciones de triptófano, como entrada para el algoritmo que genera los descriptores de Fourier [10]; mientras que el algoritmo de agrupamiento jerárquico se realizó sobre esos descriptores, y la descripción estadística del efecto del triptófano se realizó utilizando los parámetros cinemáticos asociados a las trayectorias espermáticas.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras espermáticas

Se utilizaron muestras de semen de cerdo obtenidas del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP). Las muestras fueron diluidas con un diluyente comercial y se mantuvieron en alícuotas a 38°C en un baño seco durante 25 minutos antes de su evaluación.

2.2. Evaluación de la movilidad espermática

La movilidad espermática se evaluó en un sistema CASA open-source a los 0 y 30 minutos después de la incubación con diferentes concentraciones de triptófano (10 nM, 100 nM, o 1000 nM). Se colocaron 15 µl de suspensión espermática sobre un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos limpio (22×22 mm) y se observó en un microscopio de contraste de fases (B3 CLINLAB, Motic, British Columbia, Canada)

Algorithm 1 Proceso de análisis de trayectorias

Require: Ajuste de las trayectorias $T = \tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n$.

Ensure: Etiqueta de cluster para cada trayectoria.

1: **for all** $\tau \in T$ **do**

2: Centrado τ_i a su media: $\tau'_i \leftarrow \tau_i - \mu(\tau_i)$

3: Interpolación τ'_i a la longitud L : $\tau''_i \leftarrow$ interpolación (τ'_i, L)

4: Computación de FD: $FD_i \leftarrow$ Descriptores de Fourier (τ''_i)

5: Normalizado de los FD: $FD_i \leftarrow$ Normalizado FD_i

6: **end for**

7: $FD \leftarrow \{FD_1', FD_2', \dots, FD_n'\}$

8: Ejecución de PCA sobre FD , retiene el 95% de la varianza $FD_{PCA} \leftarrow PCA(FD, 0.95)$

9: Ejecución de HAC $FD_{PCA}: C \leftarrow HAC(FD_{PCA}, \text{método}=\text{Ward})$

10: Determinación del número de clusters k a partir del dendograma C

11: Asignación de las etiquetas de los clusters con base en k : $L \leftarrow ClustersLabels(C, k)$

12: **return** L

equipado con una platina térmica a 38°C. Para cada muestra espermática se tomaron cuatro secuencias de imágenes, de distintos campos visuales, a 100X (se evaluaron al menos 500 espermatozoides por muestra). Las secuencias de imágenes fueron capturadas con una cámara Stingray, modelo F 033B (Allied Vision Technologies Inc., Exton, PA, USA) y se almacenaron en una computadora hasta su análisis. Cada secuencia de imágenes se capturó a 60 cuadros por segundo (60 Hz), durante dos segundos, 640 × 480 píxeles, usando el software μ Manager, versión 1.4 [11].

Las secuencias de video se analizaron con el software ImageJ [12], versión 1.50d y el plugin CASA-RA (modificado para espermatozoides de cerdo) [13,14]. Los parámetros de movilidad analizados para cada espermatozoide fueron: velocidad de la ruta promedio (VAP, $\mu\text{m}/\text{sec}$), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m}/\text{sec}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m}/\text{sec}$), frecuencia de cruce de batido (BCF, Hz), linealidad (LIN, VSL/VCL), rectitud (STR, VSL/VAP), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y bamboleo de la cabeza (WOB, VAP/VCL). Después del análisis, el software generó una hoja de resultados que contenía los valores de los parámetros de movilidad y las coordenadas de cada espermatozoide analizado.

2.3. Construcción de la base de datos

Los algoritmos fueron implementados en un cuaderno de Jupyter (JupyterLab versión 3.3.2) en Anaconda, versión 3.21.5 ejecutando Python, versión 3.8.10 y las librerías utilizadas fueron Scikit-Learn [15], versión 1.0.2; Pandas, versión 1.4.2; Numpy, versión 1.21.5; y Matplotlib, versión 3.6.

2.4. Enfoque para identificar subpoblaciones cinemáticas utilizando los descriptores de Fourier

Este enfoque aprovecha los Descriptores de Fourier (FD) para el análisis de las trayectorias de los espermatozoides, utiliza un método que ofrece una representación integral de los patrones de forma y movilidad.

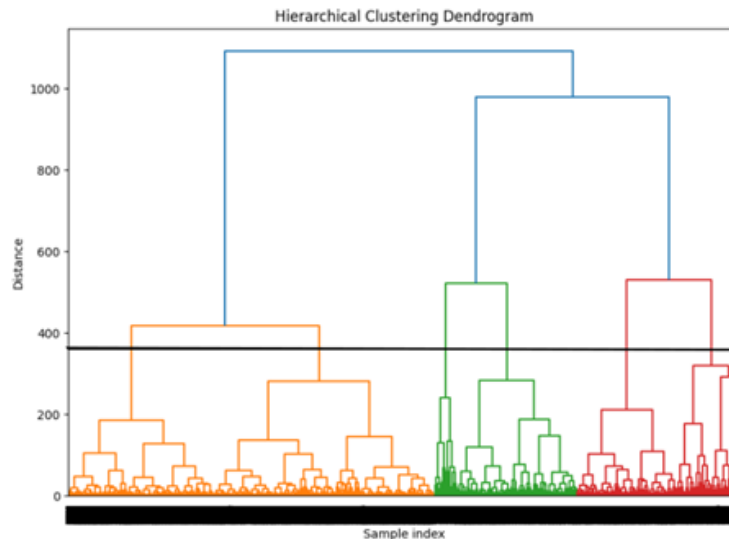


Fig. 3. Dendrograma resultante del HAC. Ilustra la estructura jerárquica de los clusters obtenidos. La línea negra horizontal indica el umbral que define el número óptimo de clusters. Este umbral se seleccionó evaluando la distancia vertical más larga que no tenga intersección con las líneas horizontales extendidas, lo que facilita la identificación de los clusters.

A diferencia de los métodos convencionales, que se basan únicamente en los parámetros de movilidad, los FD proporcionan una perspectiva multidimensional al encapsular tanto la frecuencia como la amplitud de los movimientos, ofreciendo así una comprensión matizada de las características de la movilidad [16].

Inicialmente, cada trayectoria espermática es transformada en una secuencia de números, con la subsecuente aplicación de la Transformada Discreta de Fourier (DFT) para calcular los FDs. Esta transformación convierte los datos de la trayectoria espacial a dominios de frecuencia, los cuales son capaces de capturar la forma y el movimiento inherentes a la movilidad espermática [17].

Para abordar la alta dimensionalidad de los FD y enfocarse en los componentes más significativos, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA). La selección de los componentes principales (PCs) sigue el criterio de Kaiser, asegurando que solo se retengan los componentes con eigenvalues mayores que uno, capturando así la mayoría de la varianza del conjunto de datos con menos dimensiones [18].

Posterior a la reducción de la dimensionalidad, se aplicó el algoritmo de agrupamiento aglomerativo jerárquico (HAC) a los PCs, utilizando el criterio de Ward para la unión de los clusters o agrupamientos. El criterio de Ward opera bajo el principio de minimización de la varianza, asegurando que la unión de cualquier par de clusters no aumente significativamente la varianza total dentro del cluster, manteniendo así la homogeneidad dentro de las subpoblaciones [19].

Las etapas de procesamiento seguidas hasta obtener los clusters, se muestran en la Figura 2. Para determinar el número de clusters, inicialmente se utilizaron dos métodos cuantitativos: el método del codo (elbow method) y el método de la silueta (silhouette

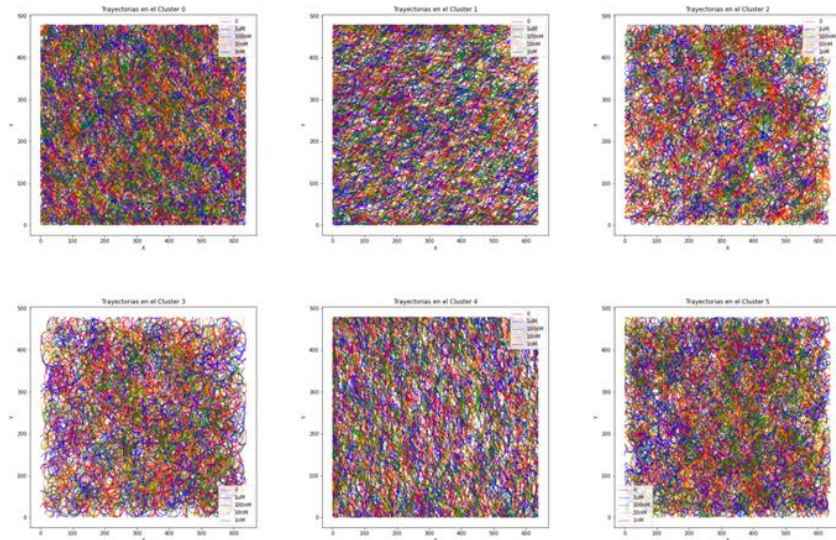


Fig. 4. Gráficos Pollock de los agrupamientos de las imágenes de las trayectorias espermáticas individuales, cada trayectoria fue mapeada de acuerdo con los tratamientos de triptófano. El número de trayectorias en cada gráfico “Pollock” corresponden al 80% del total de las trayectorias en cada subpoblación. Las trayectorias de las subpoblaciones 2, 3 y 5 presentaron trayectorias curvas; sin embargo, las trayectorias de la subpoblación 3 fueron más largas. Las imágenes de las trayectorias cortas y lineales se encontraron en la subpoblación 1 y 4.

method); sin embargo, las imágenes de las trayectorias en los clusters sugeridos por los métodos mencionados, fueron muy heterogéneas.

Por lo tanto, se realizó un análisis visual del dendrograma, y se priorizó un buen balance entre la variación de los clusters, el número de clusters y la homogeneidad de las trayectorias dentro de cada cluster. Este refinamiento metodológico ofrece un marco sólido para la delimitación de subpoblaciones espermáticas, proporcionando información sobre la heterogeneidad de los patrones de movilidad espermática con posibles implicaciones para comprender la biología reproductiva [20].

2.5. Preprocesamiento

Se construyeron dos bases de datos (dataframe) con ayuda del plugin CASA- RA [1], en el software ImageJ versión 1.53 [12]. Un dataframe contiene las coordenadas de los espermatozoides representadas por secuencias de (x, y) ; el segundo dataframe contiene los parámetros de movilidad de cada espermatozoide analizado. Cada trayectoria $\tau \in T$ se centró en su posición media para neutralizar la influencia de la posición original. Para una trayectoria τ que consiste de coordenadas (x_i, y_i) donde $i = 1, 2, \dots, n$, la posición media (μ_x, μ_y) fue calculada como sigue:

$$\mu_x = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad \mu_y = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i, \quad (1)$$

donde n es el número de puntos en la trayectoria. Nuestra base de datos contiene $|T| = 31719$ trayectorias con un promedio $\bar{\tau} = 1/|T| = \sum |n| \approx 76.42$ puntos en cada trayectoria con una desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{(\sum (\tau - \bar{\tau})^2 / (|T| - 1))} \approx 33.245. \quad (2)$$

La trayectoria centrada $\tau = (x', y')$ fue restando la posición media a cada punto:

$$x'_i = x_i - \mu_x, \quad y'_i = y_i - \mu_y. \quad (3)$$

Para estandarizar el número de puntos en todas las trayectorias, se aplicó una interpolación lineal. Para cada trayectoria centrada $\tau = (x'_i, y'_i)$ generamos un conjunto de puntos $\tau'' = (x''_j, y''_j)$, llamado trayectoria interpolada, donde $j = 1, 2, \dots, m$ (con $m = 50$ en nuestro caso) usando funciones de interpolación lineal f_x y f_y :

$$f_x(t) = x'_i + \frac{x_{i+1}' - x'_i}{t_{i+1} - t_i}(t - t_i), f_y(t) = y'_i + \frac{y_{i+1}' - y'_i}{t_{i+1} - t_i}(t - t_i). \quad (4)$$

2.6. Extracción de características usando los descriptores de Fourier

Los Descriptores de Fourier [6] son calculados para cada trayectoria interpolada para capturar sus componentes de frecuencia y representar la forma de su trayectoria. Los FDs son obtenidos aplicando la Transformada Discreta de Fourier (DFT) [21] – específicamente la Transformada Rápida de Fourier (DFT) [22] – a las coordenadas x y y de manera separada:

$$FD_x(k) = \sum_{n=0}^{L-1} x(n) e^{-\frac{2\pi i k n}{L}}, \quad FD_y(k) = \sum_{n=0}^{L-1} y(n) e^{-\frac{2\pi i k n}{L}}, \quad (5)$$

donde $L = 50$ es la longitud de la trayectoria interpolada, y k es el índice del componente de frecuencia. La magnitud de cada FD, $|FD|$, es usada para representar la trayectoria, combinando los descriptores de ambas dimensiones en un solo vector de características:

$$FD_{\text{combined}} = [|FD_x(0)|, \dots, |FD_x(L-1)|, |FD_y(0)|, \dots, |FD_y(L-1)|]. \quad (6)$$

2.7. Normalización y reducción de la dimensionalidad

Los vectores FD concatenados fueron normalizados al rango $[0,1]$ para asegurar una contribución uniforme en todas las características. Los datos normalizados se utilizaron como entrada para el análisis de componentes principales (PCA) [23]. Este paso reduce la complejidad computacional y enfoca el análisis en las características significativas.

Tabla 1. Efecto del triptófano sobre los valores promedio de los parámetros de movilidad espermática al tiempo 0 y 30, en la subpoblación 3. (media + S.E).

Tiempo (min)	Triptófano (nM)	Parámetros cinemáticos								n
		VCL (um/s)	VAP (um/s)	VSL (um/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)	ALH (um)	
0	0	117.13+47.67	62.62+26.58	47.79+23.38	0.42+0.15	0.77+1.17	0.54+0.13	35.75+6.52	4.43+1.84	541
	10	99.44+34.97*	55.82+20.78*	44.03+19.32*	0.45+0.14*	0.79+0.16	0.56+0.11*	36.16+6.31	3.89+1.42*	646
	100	101.40+36.37*	53.90+20.87*	43.71+18.75*	0.43+0.11	0.81+0.13*	0.53+0.11	37.08+5.69*	3.95+1.48*	564
	1000	111.46+44.72	59.86+23.16	44.63+19.69	0.42+0.15	0.76+0.17	0.54+0.12	36.22+6.44	4.27+1.68	545
30	0	100.21+40.62	57.25+26.58	47.55+20.68	0.49+0.16	0.84+0.15	0.58+0.14	36.62+6.69	3.83+1.65	540
	10	93.37+28.48*	56.13+21.53	46.74+20.23	0.5+0.14	0.83+0.14	0.59+0.12	36.01+5.98	3.68+1.25	604
	100	99.30+30.36	58.32+22.21	48.68+20.55	0.49+0.14	0.83+0.12	0.58+0.12	35.75+6.51	3.91+1.30	944
	1000	91.69+27.34*	52.99+21.48*	45.81+20.40	0.49+0.14	0.86+0.11	0.57+0.13	36.43+6.57	3.57+1.25*	875

2.8. Agrupamiento jerárquico aglomerativo

Los componentes principales obtenidos en la etapa previa, sirvieron como entrada para el algoritmo de agrupamiento jerárquico aglomerativo (HAC).

El HAC se ejecutó utilizando el criterio de enlace de Ward, el cual minimiza la varianza dentro de los clusters. El proceso no requiere la pre-especificación del número de clusters. En su lugar, se genera un dendrograma para visualizar la jerarquía de agrupamiento, a partir del cual se puede elegir un corte apropiado para elegir los clusters finales:

$$D(i, j) = \sqrt{\sum_{k=1}^m (x_{ik} - x_{jk})^2}, \quad (7)$$

donde $D(i, j)$ es la distancia entre clusters i y j , y m es el número de características en el espacio de características reducido. El número óptimo de clusters se determinó analizando el dendrograma y seleccionando un umbral que separe de mejor manera los distintos patrones de movilidad. Se presenta el pseudocódigo del flujo de trabajo en el Algoritmo 1.

3. Resultados

Se obtuvieron los FD a partir de los datos de coordenadas espermáticas. Del análisis de PC se obtuvieron 4 PCs que describieron el 95% de la varianza de los datos. El dendrograma obtenido del PC sugiere la existencia de tres clusters; sin embargo, el agrupamiento de las trayectorias con tres clusters no resultó significativo debido a la heterogeneidad de los agrupamientos. Se decidió entonces utilizar seis grupos para el ajuste de las condiciones del análisis de agrupamiento jerárquico (Figura 3). El número de espermatozoides en las subpoblaciones 0 a 5 en el tiempo 0 de incubación con triptófano fue de 8239, 2731, 982, 2296, 532 y 228, respectivamente; mientras que al tiempo 30 fue de 7500, 3290, 1526, 2963, 945 y 487, respectivamente.

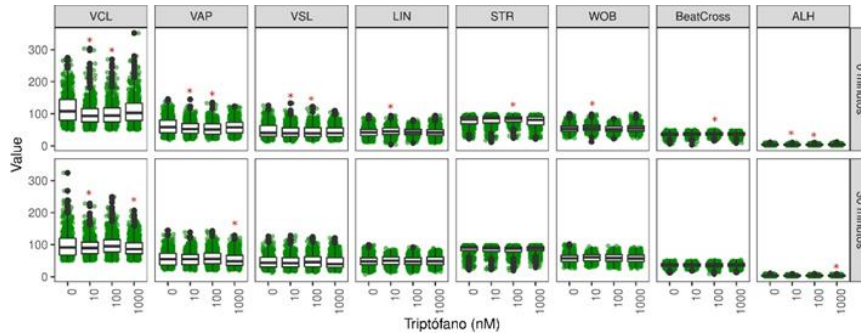


Fig. 5. Efecto del triptófano sobre los parámetros de movilidad en la subpoblación 3 en los dos tiempos de evaluación. Gráficas de cajas con bigote por cada parámetro de movilidad de la subpoblación 3. Las líneas horizontales en cada caja representan el cuartil 2 (mediana), el cuartil 1 y cuartil 3. Los bigotes representan el valor mínimo y máximo. Los puntos verdes corresponden a cada espermatozoide evaluado por concentración de triptófano. Los puntos negros indican valores extremos. * $P < 0.05$ vs Control (0), ANOVA de una vía, seguida de Tuckey.

El agrupamiento de las imágenes en las subpoblaciones 3 corresponden a trayectorias cortas y lineales; mientras que las trayectorias con curvas más cerradas, incluso formando bucles se observaron predominantemente en la subpoblación 5 (Figura 4). La exposición al triptófano indujo una disminución en VCL, VAP y VSL; mientras que los valores de LIN y STR aumentaron en las concentraciones intermedias en el clúster 3 (Figura 5).

Aquí se describe el efecto en el clúster 3 por ser el que presentó la velocidad de VCL más alta en el control; los valores promedio de los parámetros de movilidad espermática en las subpoblaciones 0, 1, 2, 3, 4 y 5 a los tiempos 0 o 30 de incubación se pueden observar en¹.

4. Discusión

En este trabajo diseñamos un modelo computacional, que utiliza las coordenadas del rastreo de la cabeza de los espermatozoides en imágenes sucesivas, para generar descriptores de Fourier y caracterizar las trayectorias espermáticas con base en los parámetros de movilidad espermática. Posteriormente, los descriptores de Fourier se utilizaron en un proceso de reducción de la dimensionalidad y agrupamiento jerárquico. Finalmente, las subpoblaciones identificadas se describieron con base en los descriptores de movilidad espermática, y se utilizó estadística inferencial para identificar el efecto de la exposición de los espermatozoides a triptófano.

Los descriptores de Fourier se han utilizado para describir la geometría de imágenes biológicas [24]. No obstante, de acuerdo con nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se utilizan los descriptores de Fourier para describir la forma de las trayectorias espermáticas.

El uso de los descriptores de Fourier tiene ventajas sobre el agrupamiento de imágenes de trayectorias, puesto que es insensible a la rotación, la

¹ github.com/armandres/COMIA_2024_Descriptores_de_Fourier/blob/main/COMIA_2024_Tablas_Parametros_de_movilidad.pdf

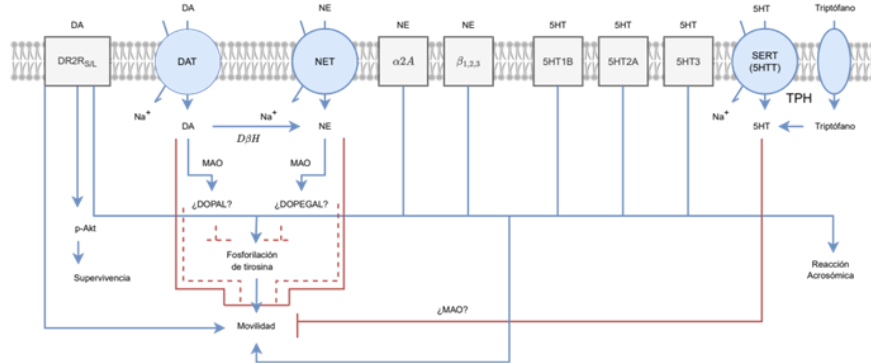


Fig. 6. Descripción de la acción de las monoaminas en la función espermática. DA, dopamina; NE, norepinefrina; 5HT, serotonina; DR2R, receptor 2 de dopamina, DAT, transportador de dopamina; NET, transportador de norepinefrina; $\alpha 2A$, receptor $\alpha 2$ adrenérgico; $\beta_{1,2,3}$, receptor β adrenérgico; 5HT1B, 5HT2A y 5HT3, receptores de serotonina; SERT (5HTT), transportador de serotonina; TPH, triptófano hidroxilasa; D β H, dopamina- β -hidroxilasa; MAO, monoamino oxidase; DOPAL, 3,4-dihidroxifenilacetaldehído; DOPEGAL, 3,4-dihidroxifenilglicolaldehído. En este modelo bifásico de la regulación de la funcionalidad espermática, están incluidas dos acciones, los efectos de activación mediados por los receptores de monoaminas (DR2RS/L, $\alpha 2A$, $\beta 1$, 2, 3, 5HT1B, 5HT2A, 5HT3), y los efectos inhibitorios mediados por la recaptura de los transportadores (DAT, NET y SERT) y los derivados oxidados de las catecolaminas producidas por la acción de MAO (Modificado de Ramírez- Reveco et al., 2017).

traslación y el escalado [10]. El uso de los descriptores de Fourier, es computacionalmente menos costoso que el agrupamiento jerárquico sobre imágenes generadas a partir de coordenadas.

Sin embargo, de manera semejante a resultados previos [1], consideramos que tenemos un área de oportunidad en la selección automática del número de clusters, puesto que cuando analizamos los gráficos "Pollock", derivados del agrupamiento jerárquico con ajuste de tres, cinco o seis clusters, de acuerdo con el dendrograma obtenido, no se apreciaron grupos homogéneos.

Visualmente, nosotros encontramos una mayor homogeneidad cuando se seleccionó seis clusters como ajuste para el agrupamiento jerárquico. Se ha demostrado que la serotonina se encuentra presente en el semen humano [25], y que puede tener un efecto sobre la fisiología reproductiva femenina [26].

Aunque se desconoce el sitio de síntesis de la serotonina presente en el eyaculado, es claro que tiene un efecto, no solo en el tracto reproductor femenino, sino también sobre los espermatozoides. La comunicación serotoninérgica puede ser exógena o bien, endógena. La síntesis de serotonina endógena inicia con la modificación química del aminoácido triptófano [27] (Figura 6).

Recientemente, nosotros demostramos que la inhibición de la comunicación serotoninérgica exógena, mediante la exposición a la ketanserina (un inhibidor del receptor 2 de serotonina), afecta a los espermatozoides de cerdo en la subpoblación más veloz, induciendo un aumento de la velocidad, a la vez que las trayectorias de los espermatozoides se tornan más curvas [1].

En el presente trabajo observamos que la exposición de los espermatozoides a triptófano, afecta los espermatozoides de la subpoblación que es más veloz en condiciones control, disminuyendo la velocidad curvilínea y tornando más lineales las trayectorias. Así, vemos que la comunicación serotoninérgica tiene efectos opuestos cuando la disrupción ocurre de manera exógena o de manera endógena. En este momento desconocemos la explicación celular y molecular por la cual solamente un subconjunto (subpoblación) de espermatozoides responda de esta manera al triptófano.

Una posible explicación es que la subpoblación responsiva expresa intensamente a la enzima TPH (triptófano hidroxilasa), que es la encargada de convertir el triptófano a serotonina (Figura 6). Otra posibilidad es que el triptófano entre a otra ruta metabólica, distinta a la de la síntesis de serotonina; y que los productos bioquímicos derivados de esa ruta afecten de alguna manera la movilidad. Previamente se reportó que el triptófano puede convertirse a kinurena [28]; posiblemente esa u otras moléculas puedan participar en él. En conclusión, el método computacional que hace uso de las coordenadas como entrada para generar a los descriptores de Fourier, para que a su vez estos descriptores sirvan de entrada para una estrategia de reducción de la dimensionalidad y de agrupamiento jerárquico, permite obtener subpoblaciones homogéneas de trayectorias espermáticas. De tal manera, que los descriptores de movilidad asociados a las trayectorias espermáticas permitieron caracterizar la estructura cinemática de las subpoblaciones; así como identificar el efecto de la exposición a triptófano sobre la cinemática de la movilidad espermática a nivel subpoblacional. fenómeno de movilidad espermática.

Agradecimientos. Este proyecto se desarrolló gracias al apoyo del programa DGAPA-PAPIIT de la UNAM número IT201021.

Referencias

1. Rodríguez-Martínez, E.A., Rivas, C.U., Ayala, M.E., Blanco-Rodríguez, R., Juárez, N., Hernández-Vargas, E.A., Aragón, A.: A New Computational Approach, based on Images Trajectories, to Identify the Subjacent Heterogeneity of Sperm to the Effects of Ketanserin. *Cytometry Part A*, vol. 103, no. 8, pp. 655–663 (2023). DOI: 10.1002/cyto.a.24732.
2. Rodríguez-Martínez, E.A., Rivas-Arzaluz, C.U., Aragón-Martínez, A.: Aplicación del algoritmo SCAN en el agrupamiento de imágenes de trayectorias espermáticas: Identificación de la heterogeneidad de la respuesta espermática a la Ketanserin. *Research in Computing Science*, vol. 152, no. 8, pp. 253–266 (2023)
3. Van-Gansbeke, W., Vandenhende, S., Georgoulis, S., Proesmans, M., Van-Gool, L.: Scan: Learning to Classify Images without Labels. In: *Proceedings of the European Conference on Computer Vision*, vol. 12355, pp. 268–285 (2020). DOI: 10.1007/978-3-030-58607-2_16.
4. El-ghazal, A., Basir, O., Belkasim, S.: A New Shape Signature for Fourier descriptors. In: *2007 IEEE International Conference on Image Processing*, vol. 1, pp. 161–164 (2007). DOI: 10.1109/icip.2007.4378916.
5. Burger, W., Burge, M.J.: *Digital Image Processing: An Algorithmic Introduction using Java*. Texts in Computer Science, Springer London (2016). DOI: 10.1007/978-1-4471-6684-9.
6. Valizadeh, G., Babapour-Mofrad, F.: A Comprehensive Survey on Two and Three-Dimensional Fourier Shape Descriptors: Biomedical Applications. *Archives of*

- Computational Methods in Engineering, vol. 29, no. 7, pp. 4643–4681 (2022). DOI: 10.1007/s11831-022-09750-7.
7. Jiménez-Trejo, F., Tapia-Rodríguez, M., Cerbón, M., Kuhn, D.M., Manjarrez-Gutiérrez, G., Mendoza-Rodríguez, C.A., Picazo, O.: Evidence of 5-HT Components in Human Sperm: Implications for Protein Tyrosine Phosphorylation and the Physiology of Motility. *Reproduction*, vol. 144, no. 6, pp. 677–685 (2012). DOI: 10.1530/rep-12-0145.
 8. Fujinoki, M.: Serotonin-Enhanced Hyperactivation of Hamster Sperm. *Reproduction*, vol. 142, no. 2, pp. 255–266 (2011). DOI: 10.1530/rep-11-0074.
 9. Sakamoto, C., Fujinoki, M., Kitazawa, M., Obayashi, S.: Serotonergic Signals Enhanced Hamster Sperm Hyperactivation. *Journal of Reproduction and Development*, vol. 67, no. 4, pp. 241–250 (2021). DOI: 10.1262/jrd.2020-108.
 10. Raghavendra, G.S., Danish, M., Khan, S.I., Venkateswarlu, S.C.: Fourier Descriptors for Shape-based Image Retrieval. *International Journal of Engineering Research and Technology*, vol. 2, no. 4, pp. 857–863 (2013)
 11. Edelstein, A.D., Tsuchida, M.A., Amodaj, N., Pinkard, H., Vale, R.D., Stuurman, N.: Advanced Methods of Microscope Control using μ Manager Software. *Journal of Biological Methods*, vol. 1, no. 2, pp. 1 (2014). DOI: 10.14440/jbm.2014.36.
 12. Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W.: NIH Image to Image: 25 Years of Image Analysis. *Nature Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–675 (2012). DOI: 10.1038/nmeth.2089.
 13. Giaretta, E., Munerato, M., Yeste, M., Galeati, G., Spinaci, M., Tamanini, C., Mari, G., Bucci, D.: Implementing an Open-Access CASA Software for the Assessment of Stallion Sperm Motility: Relationship with other Sperm Quality Parameters. *Animal Reproduction Science*, vol. 176, pp. 11–19 (2017). DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.11.003.
 14. Rivas, C.U., Ayala, M.E., Aragón, A.: Effect of Various pH Levels on the Sperm Kinematic Parameters of Boars. *South African Journal of Animal Science*, vol. 52, no. 5, pp. 693–704 (2023). DOI: 10.4314/sajas.v52i5.13.
 15. Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., Brucher, M., Perrot, M., Duchesnay, É.: Scikit-Learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*, vol. 12, no. 85, pp. 2825–2830 (2011)
 16. Stéphanou, A., Ronot, X., Tracqui, P.: Analysis of Cell Motility Combining Cytomechanical Model Simulations and an Optical flow Method. *Mathematics and Biosciences in Interaction*, pp. 91–112 (2003). DOI: 10.1007/978-3-0348-8043-5_9.
 17. Díaz-Guerrero, D.S., Montoya, F., Hernández, H.O., Hernández-Herrera, P., Darszon, A., Corkidi, G.: Computation of Human-Sperm Local Flagellar Instantaneous Velocity. In: *Proceedings of the XLVI Mexican Conference on Biomedical Engineering, International Federation of Medical and Biological Engineering*, vol. 96, pp. 59–66 (2023). DOI: 10.1007/978-3-031-46933-6_7.
 18. Auerswald, M., Moshagen, M.: How to Determine the Number of Factors to Retain in Exploratory Factor Analysis: A Comparison of Extraction Methods under Realistic Conditions. *Psychological Methods*, vol. 24, no. 4, pp. 468–491 (2019). DOI: 10.1037/met0000200.
 19. Ward, J.H.: Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*, vol. 58, no. 301, pp. 236–244 (1963). DOI: <https://doi.org/10.2307/2282967>.
 20. Martínez-Pastor, F., Tizado, E.J., Garde, J.J., Anel, L., de-Paz, P.: Statistical Series: Opportunities and Challenges of Sperm Motility Subpopulation Analysis. *Theriogenology*, vol. 75, no. 5, pp. 783–795 (2011). DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.034.
 21. An, M., Gertner, I., Rofheart, M., Tolimieri, R.: Discrete Fast Fourier Transform Algorithms: A Tutorial Survey. *Advances in Electronics and Electron Physics*, vol. 80, pp. 1–67 (1991). DOI: 10.1016/s0065-2539(08)60607-1.

22. Rajaby, E., Sayedi, S.M.: A Structured Review of Sparse fast Fourier Transform Algorithms. *Digital Signal Processing*, vol. 123, pp. 103403 (2022). DOI: 10.1016/j.dsp.2022.103403.
23. Shah, J., Sharif, M., Raza, M., Azeem, A.: A Survey: Linear and Nonlinear PCA based Face Recognition Techniques. *International Arab Journal of Information Technology*, vol. 10, no. 6, pp. 536–545 (2013)
24. Tomakova, R., Komkov, V., Emelianov, E., Tomakov, M.: The use of Fourier Descriptors for the Classification and Analysis of Peripheral Blood Smears Image. *Applied Mathematics*, vol. 8, no. 11, pp. 1563–1571 (2017). DOI: 10.4236/am.2017.811114.
25. Platek, S.M.: *Female Infidelity and Paternal Uncertainty: Evolutionary Perspectives on Male Anti-cuckoldry Tactics*. Cambridge University Press, pp. 256 (2006). DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511617812>.
26. Burch, R.L.: Semen and vaginal chemistry. *Encyclopedia of Evolutionary Psychological Science*, Springer, Cham, pp. 6999–7001 (2021). DOI: 10.1007/978-3-319-19650-3_2008.
27. Ramírez-Reveco, A., Villarroel-Espíndola, F., Rodríguez-Gil, J.E., Concha, I.I.: Neuronal Signaling Repertoire in the Mammalian Sperm Functionality. *Biology of Reproduction*, vol. 96, no. 3, pp. 505–524 (2017). DOI: 10.1095/biolreprod.116.144154.
28. Oxenkrug, G.F.: Metabolic Syndrome, Age-associated Neuroendocrine Disorders, and Dysregulation of Tryptophan—Kynurenine Metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1199, no. 1, pp. 1–14 (2010). DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05356.x.