

**Identificación de la heterogeneidad cinemática  
de los espermatozoides expuestos a triptófano  
mediante el uso de machine learning**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

Yael Aquetzalli Camarillo Martínez

**DIRECTOR DE TESIS:**

Andrés Aragón Martínez

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. 2024**  
**Este proyecto se realizó con el apoyo PAPIIT IT201021**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Estructura y función espermática.....	4
Heterogeneidad espermática.....	5
Análisis automatizado del movimiento espermático.....	6
Descripción de los parámetros de movilidad espermática.....	6
Inteligencia artificial.....	7
Generalidades de Machine Learning (ML).....	8
Algoritmos supervisados.....	8
Algoritmos no supervisados.....	9
Machine Learning en los datos derivados del sistema CASA.....	10
Generalidades de la serotonina.....	11
Biosíntesis de la serotonina.....	12
Comunicación serotoninérgica.....	12
Componentes serotoninérgicos en el espermatozoide.....	14
Justificación.....	16
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	16
General.....	16
Particulares.....	16
Materiales y métodos.....	17
Muestras espermáticas.....	17
Evaluación de la movilidad espermática.....	17
Identificación de subpoblaciones espermáticas en función de los parámetros de movilidad.....	18
Identificación de subpoblaciones espermáticas usando un algoritmo de Machine Learning no supervisado.....	18
Estadística.....	19
Resultados.....	19
Discusión.....	35
Conclusión.....	39
Perspectivas.....	39
Referencias.....	40

# Resumen

La identificación de las subpoblaciones espermáticas ha permitido evidenciar la heterogeneidad intrínseca del eyaculado. El correcto análisis de las muestras espermáticas es posible gracias al uso de sistemas de análisis espermático asistidos por computadora (CASA). Los datos obtenidos de los sistema CASA se han utilizado como entrada para métodos estadísticos o algoritmos de machine learning (ML) para la identificación de subpoblaciones espermáticas cinemáticas en mamíferos.

La serotonina (5-HT) es un regulador importante de diferentes mecanismos en la reproducción de mamíferos, por lo que se tiene registro de la localización de distintos componentes serotoninérgicos en espermatozoides de humano, también se tienen reportes del efecto de la exposición a serotonina (5-HT) y del efecto de la estimulación con agonistas de diferentes receptores de 5-HT sobre los parámetros de movilidad de espermatozoides de distintas especies de mamíferos. Sin embargo, todos esos trabajos utilizan datos promedio de los parámetros de movilidad de los espermatozoides, es decir, no trabajan con datos individuales de los espermatozoides. Por lo que en este trabajo evaluamos el efecto del triptófano (precursor de la 5-HT) a nivel subpoblacional en los espermatozoides de cerdo, evaluando los cambios de la exposición de los espermatozoides a las diferentes concentraciones de triptófano (1, 10, 100 y 1000 nM) al tiempo 0 y al tiempo 30 de incubación.

Identificamos subpoblaciones espermáticas cinemáticas de cerdo con métodos estadísticos, realizando un análisis de componentes principales (PCA) seguido de agrupamiento jerárquico, obtuvimos tres subpoblaciones y realizamos la descripción estadística de las subpoblaciones en cada tratamiento con triptófano. Describimos los resultados de la subpoblación 3 por sus altos valores de velocidad (la velocidad se ha relacionado con la fertilidad en mamíferos) y observamos que al tiempo 0 disminuyó los valores de VCL en las concentraciones 1, 10 y 100 nM y aumentó los valores de LIN en las concentraciones 1 y 10 nM, mientras que al tiempo 30 de incubación disminuyó los valores de VCL en todas las concentraciones y aumentó los valores de LIN solo en la concentración mas alta de triptófano (100 nM).

Al identificar las subpoblaciones espermáticas cinemáticas de cerdo con un algoritmo de ML no supervisado obtuvimos seis subpoblaciones y realizamos la descripción estadística de las subpoblaciones en cada tratamiento con triptófano. De igual forma describimos los resultados de

la subpoblación 3 por presentar altos valores de velocidad en comparación con las otras subpoblaciones. Observamos que al tiempo 0 disminuyó VCL en las concentraciones 1, 10 y 100 nM, respecto al control, mientras que LIN aumentó en las mismas concentraciones y STR aumenta en todas las concentraciones. Después de 30 minutos de incubación, VCL disminuyó en las mismas concentraciones que al tiempo 0, pero los parámetros de linealidad (LIN y STR) no se modificaron.

Concluimos que la exposición de los espermatozoides de cerdo a diferentes concentraciones de triptófano modifica la estructura de las subpoblaciones cinemáticas, presenta un efecto directo sobre la subpoblación más veloz modificando la linealidad de su trayectoria. Esto indica que la comunicación serotoninérgica tiene un efecto sobre la movilidad espermática a nivel subpoblacional, en donde los espermatozoides de un mismo eyaculado se comportan de manera distinta en respuesta al triptófano. Además la identificación de subpoblaciones utilizando un algoritmo de machine learning proporciona un enfoque preciso del análisis espermático. Además, hasta el momento, no se tiene información de reportes donde se evalúe la exposición de espermatozoides de cerdo al precursor de 5-HT, por lo que este es uno de los primeros trabajos en evaluar los efectos del triptófano sobre las subpoblaciones basadas en trayectorias identificadas con un algoritmo de machine learning, por lo que puede servir para referencia en futuros estudios.

## Introducción

### Estructura y función espermática

El espermatozoide está compuesto por la cabeza y el flagelo, ambas partes están cubiertas por la membrana plasmática del espermatozoide. La cabeza del espermatozoide contiene el núcleo haploide, con la cromatina altamente compactada que contiene la información hereditaria en el ADN, y al acrosoma, un gránulo excitotico con enzimas que al liberarse ayudan a los espermatozoides a penetrar en el ovulo durante la fertilización. Además existen compartimientos citoplasmáticos definidos por las membranas acrosómicas, la envoltura nuclear y la membrana plasmática. Las regiones extranucleares son, la teca perinuclear que es una vaina que envuelve al núcleo (Sutovsky and Manandhar, 2006) y el perforatorium, que es una estructura especializada que se encuentra en la región apical de la teca perinuclear subacrosomal y que sirve para anclar

el acrosoma a la región anterior del núcleo (Teves and Roldan, 2022).

El flagelo se une a la cabeza del espermatozoide a través de la pieza de conexión (cuello), que incluye centriolos proximales. El flagelo tiene tres regiones: pieza media, pieza principal y pieza terminal. La pieza media contiene mitocondrias que generan ATP por fosforilación oxidativa, mientras que la pieza principal puede generar ATP a través de la glucólisis. La energía del ATP es utilizada por la pieza principal para propulsar al espermatozoide a través de una estructura denominada filamento axial o axonema. El axonema se extiende desde la pieza de conexión hasta la parte final del flagelo y tiene un arreglo estructural de 9+2 pares de microtúbulos. Las proteínas asociadas a los microtúbulos del axonema hidrolizan el ATP y convierten la energía química del ATP en fuerzas mecánicas que deslizan los microtúbulos y generan la movilidad flagelar (Teves and Roldan, 2022). La pieza principal esta rodeada por una vaina fibrosa, que consta de dos columnas longitudinales y la pieza terminal solo tiene el axonema rodeado por membrana plasmática (Kumar and Singh, 2021).

La función mas importante de flagelo es la movilidad. Existen dos tipos de movilidad en los espermatozoides de mamíferos; la movilidad activada, que se observa en los espermatozoides almacenados en el epidídimo y en espermatozoides recién eyaculados, y la movilidad hiperactivada, que se observa en los espermatozoides que pasan por el tracto reproductor femenino (Kumar and Singh, 2021). Además la función del espermatozoide es llegar a fertilizar al ovulo (Teves and Roldan, 2022) y la movilidad de los espermatozoides es crucial para lograr su función. Los defectos en el movimiento de los espermatozoides pueden derivar en infertilidad (Leung *et al.*, 2023).

## Heterogeneidad espermática

Una de las características reconocidas de los eyaculados de los mamíferos es su heterogeneidad, reflejada en la presencia de subpoblaciones de espermatozoides (Ramón *et al.*, 2012); es decir, la heterogeneidad espermática puede ser definida como el resultado de la presión evolutiva y de las estrategias reproductivas de cada especie, además se propone que las subpoblaciones también pueden ser el resultado de la integración de varios factores durante la espermatogénesis y el tránsito por el epidídimo, así como su paso por el aparato reproductor femenino (Martínez-Pastor, 2022).

El uso de los sistemas de análisis espermático asistido por computadora (CASA, por sus siglas en inglés) ha confirmado la existencia de una clara heterogeneidad espermática (Ramón and Martínez-Pastor, 2018); además para caracterizar esta heterogeneidad se han utilizado métodos estadísticos para identificar subpoblaciones de espermatozoides que comparten características comunes (Ramón *et al.*, 2013), basándose en los datos obtenidos del sistema CASA.

## Análisis automatizado del movimiento espermático

Un sistema CASA se refiere a un sistema automatizado (hardware y software) para visualizar, digitalizar imágenes sucesivas de espermatozoides, procesar y analizar información, y proporcionar información exacta, precisa y significativa sobre la cinemática de las células individuales (Amann and Katz, 2004).

El sistema CASA está compuesto por una cámara de video, una tarjeta electrónica de captura de imágenes de video, una computadora y un microscopio. La correcta visualización de los espermatozoides incluye el uso de la técnica óptica del contraste de fases, lo cual permite observar las cabezas de los espermatozoides blancas sobre un fondo oscuro (Mortimer, 2000). Así mismo, se requiere de software especializado, es decir un plugin que corre sobre ImageJ para el análisis computacional de la información. Este software se encargará de identificar y rastrear los espermatozoides en las imágenes de video, y calcular los parámetros cinemáticos.

## Descripción de los parámetros de movilidad espermática

Los valores cinemáticos (aspectos geométricos del movimiento que varían en el tiempo) se utilizan para diferenciar los patrones de movimiento de los espermatozoides (Mortimer, 2000). Para obtener estos valores cinemáticos, se captura una secuencia de imágenes  $\geq 50$  fotogramas por segundo a una velocidad de captura y durante un tiempo definido (Amann and Waberski, 2014). Después las secuencias de imágenes son importadas a ImageJ y son analizadas usando un plugin, primero se debe procesar la secuencia de imagen; cada fotograma se procesa hasta obtener una imagen binaria mediante tresholding, de forma que la cabeza de los espermatozoides será la información de interés marcada con el valor de 1 y el resto es marcado con el valor 0; de tal forma que el software obtiene una imagen donde únicamente están los puntos correspondientes a la cabeza de los espermatozoides. Al obtener esta imagen binaria el plugin identifica el centroide para cada espermatozoide; una vez identificado el centroide, el plugin

genera las coordenadas (x, y) que describen las características del movimiento espermático y los parámetros de movilidad de cada espermatozoide (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007) (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Descriptores de movimiento espermático analizados en un sistema CASA.**

Parámetro de movilidad	Abreviación, (unidades)	Descripción
Velocidad curvilínea	VCL, ( $\mu\text{m/s}$ )	Velocidad punto a punto (distancia total viajada) por segundo.
Velocidad promedio de la ruta	VAP, ( $\mu\text{m/s}$ )	Velocidad punto a punto en una ruta construida utilizando el movimiento no sistemático promedio. El número de puntos en el movimiento no sistemático promedio es de 1/6 de la tasa de cuadro de video utilizado.
Velocidad en línea recta	VSL, ( $\mu\text{m/s}$ )	La velocidad desde el primer punto de la ruta promedio y el punto alcanzado durante el periodo de tiempo medido.
Linearidad	LIN, $(\text{VSL/VCL}) \times 100$	La linearidad de la trayectoria curvilínea.
Rectitud	STR, $(\text{VSL/VAP}) \times 100$	Indica la trayectoria en línea recta de la ruta promedio.
Frecuencia de batido	BCF, (Hz)	La tasa del tiempo promedio en la que la trayectoria del espermatozoide cruza su ruta promedio.
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza	ALH, ( $\mu\text{m}$ )	La amplitud de la variación de la trayectoria de la cabeza a lo largo de la trayectoria promedio.

Cuadro modificado de (Aragón, 2016).

## Inteligencia artificial

La inteligencia artificial (IA) se define como la capacidad de las máquinas para aprender y mostrar inteligencia. En consecuencia los ordenadores actuales que son alimentados con grandes cantidades de datos se han encargado de tareas de aprendizaje complejas, logrando éxito en la resolución de problemas (Wang *et al.*, 2019).

La IA aprende las relaciones potenciales de una gran cantidad de datos mediante algoritmos



complejos, siendo así que el aprendizaje automático (machine learning o ML) es un subcampo de la IA, donde su objetivo principal será encontrar patrones en el conjunto de datos (Shimizu and Nakayama, 2020). Los avances de la IA se han aplicado en la medicina reproductiva, con el objetivo de proporcionar una mayor eficacia y eficiencia en el análisis de datos obtenidos de clínicas de fertilidad (Wang *et al.*, 2019). Sin embargo, existen pocos reportes en donde se hayan aplicado las técnicas de ML al análisis del movimiento espermático.

## Generalidades de Machine Learning (ML)

Machine learning es el estudio científico de algoritmos y modelos estadísticos, que los sistemas informáticos utilizan para realizar una tarea específica, sin estar explícitamente programados (Mahesh, 2018); es decir, se refiere al proceso de ajustar modelos predictivos a los datos o identificar información dentro de los datos (Greener *et al.*, 2022).

La selección del algoritmo dependerá del tipo de problema que se quiera resolver, el número de variables y el tipo de modelo más adecuado (Mahesh, 2018). ML es de gran utilidad cuando el conjunto de datos que se desea analizar es demasiado grande (muchos puntos de datos individuales) o es complejo (un gran número de características) y los datos de los experimentos biológicos suelen presentar estas características. Los métodos de ML pueden ser clasificados en supervisados y no supervisados. La principal diferencia entre estos métodos es la ausencia o la presencia de una variable de resultado o dependiente, a la que se le denomina marca o etiqueta (Greener *et al.*, 2022).

## Algoritmos supervisados

El aprendizaje supervisado se refiere al ajuste de un modelo a datos o un subconjunto de datos etiquetados (Greener *et al.*, 2022). En este tipo de algoritmo se requiere ayuda externa, es decir que la maquina necesita conocimiento previo (etiqueta) que indique el valor de salida de cada dato (Mahesh, 2018).

El objetivo de los algoritmos supervisados es la predicción, por lo que el algoritmo es entrenado para relacionar un conjunto de variables con un resultado de interés. Una vez que el entrenamiento se termina, el algoritmo puede hacer predicciones utilizando nuevos datos desconocidos para la máquina. El resultado de este tipo de aprendizaje puede ser una

clasificación o una probabilidad. Algunos ejemplos de este tipo de algoritmos son: máquinas de soporte vectorial (SVM), redes neuronales, árboles de decisión, bosques aleatorios, entre otros (Pedrero *et al.*, 2021).

## Algoritmos no supervisados

El aprendizaje no supervisado hace referencia a que la máquina o el ordenador debe aprender patrones de los datos sin referirse a ninguna respuesta específica. Lo que hace este algoritmo es explorar la estructura de los datos y generar una hipótesis (Valkenborg *et al.*, 2023).

Estos algoritmos se caracterizan por su capacidad para extraer, clasificar y reducir la dimensionalidad. Los ejemplos de este tipo de algoritmo son los métodos de agrupación y el análisis de componentes principales (PCA) (Wang *et al.*, 2019).

En los métodos de agrupación el algoritmo calcula una medida de distancia para cuantificar la similitud o diferencia entre diferentes sujetos en el conjunto de datos (Valkenborg *et al.*, 2023); por otro lado, en el PCA son combinaciones lineales de las variables del conjunto de datos, la combinación lineal se optimiza y se seleccionan los componentes principales que expliquen la mayor proporción de varianza del conjunto de datos original (Greener *et al.*, 2022).

El algoritmo de agrupación es un procedimiento informático que define cómo se fusionan o se dividen sujetos en el grupo (del inglés “*cluster*”). Estos algoritmos pueden dividirse en dos grupos: métodos de partición y métodos de agrupación jerárquica (Valkenborg *et al.*, 2023). El método de agrupación jerárquica (“*hierarchical clustering*”) realiza la construcción de un dendograma de acuerdo con la similitud de los datos y no se requiere preespecificar el número de conglomerados, además su objetivo es minimizar la distancia intracluster y maximizar la distancia intercluster (Namratha and Prajwala, 2012). Existen dos tipos de agrupación jerárquica: 1) agrupación aglomerativa, combina los dos objetos más cercanos entre sí, fusionando objetos al cluster iterativamente; 2) agrupación divisiva, este método considera cada posible división en el conjunto de datos y maximiza la distancia entre los nuevos conglomerados (Valkenborg *et al.*, 2023).

## Machine Learning en los datos derivados del sistema CASA

El análisis de los datos de movilidad espermática, derivados del sistema CASA, se realizó durante mucho tiempo con datos promedio de los parámetros de movilidad de los espermatozoides observados en un video. Aunque es un enfoque más eficaz que el análisis visual de las muestras espermáticas, este enfoque no toma en cuenta la heterogeneidad de las muestras espermáticas (Ramón and Martínez-Pastor, 2018); es decir, trabajar con datos promedio de los parámetros de movilidad presenta sesgos del verdadero efecto del tratamiento sobre los espermatozoides y no considera la variabilidad intrínseca del eyaculado (Hidalgo *et al.*, 2021). Este sesgo se elimina al evaluar la heterogeneidad de las muestras espermáticas mediante la descripción estadística de las subpoblaciones cinemáticas (Rivas *et al.*, 2022). Recientemente, en nuestro laboratorio se ha abordado la identificación de las subpoblaciones cinemáticas mediante un enfoque centrado en las imágenes de las trayectorias y ML (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2023).

En trabajos previos, como el de Goodson *et al.*, (2011), se utilizó el sistema CASA para analizar espermatozoides de ratón capacitados *in vitro*, los datos se clasificaron visualmente en cinco categorías, y los parámetros de movilidad de estos espermatozoides se incorporaron en el algoritmo máquinas de soporte vectorial (del inglés Support Vector Machines o SVM) para generar ecuaciones. Estas ecuaciones se utilizaron para clasificar de manera automática los patrones de movilidad de los espermatozoides individuales.

Poco después, los mismos autores adaptaron su método para el análisis de espermatozoides de humano capacitados, donde se siguió el mismo flujo de trabajo: clasificaron visualmente las muestras, se obtuvieron las ecuaciones y se probó el modelo Goodson *et al.*, (2017). Este método clasificó, con una precisión del 89.9 %, a los espermatozoides en las mismas cinco categorías que en el trabajo de (Goodson *et al.*, 2011). En ambos trabajos se menciona que este método puede ser reproducible y objetivo, aunque aún existe el sesgo del error humano debido a la clasificación visual (etiquetado) de los datos.

En el trabajo de (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2023) utilizaron muestras espermáticas de cerdo que fueron tratadas con diferentes concentraciones de ketanserina (antagonista del receptor 5-HT<sub>2</sub>), estas muestras se analizaron inicialmente con el sistema CASA (evaluadas al tiempo 0 y 30 minutos) para obtener los parámetros de movilidad y las coordenadas de las trayectorias de los espermatozoides; después escribieron un código de python para reconstruir las imágenes de las

trayectorias utilizando las coordenadas. Las imágenes de las trayectorias fueron los datos de entrada para el algoritmo de agrupación de machine learning. Las subpoblaciones también fueron descritas estadísticamente con los parámetros de movilidad. Finalmente con las imágenes de las trayectorias de cada subpoblación se realizaron graficas “Pollock”.

Encontraron seis subpoblaciones, la subpoblación 2 presentó altos valores de velocidad en ambos tiempos de evaluación. La exposición de los espermatozoides a altas concentraciones de ketanserina aumenta los valores de VCL mientras que disminuye LIN y STR. Este es el primer antecedente del análisis espermático a nivel subpoblacional utilizando un algoritmo no supervisado, en el que se identificaron objetivamente las subpoblaciones cinemáticas en comparación con anteriores trabajos.

## Generalidades de la serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) es una amina biogénica que actúa como neurotransmisor dentro del sistema nervioso central (SNC) y actúa en el sistema nervioso periférico (SNP) como neuromodulador; se encuentra en los núcleos del rafe que representan los principales núcleos con fibras serotoninérgicas ascendentes que se proyectan al prosencéfalo y fibras descendentes que se dirigen hacia el bulbo raquídeo y la médula espinal (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). La 5-HT se sintetiza en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal (GI) y en las neuronas serotoninérgicas del SNC (Andrews *et al.*, 2022); también se ha reportado la síntesis de 5-HT en el testículo de hámster (Frungieri *et al.*, 2002).

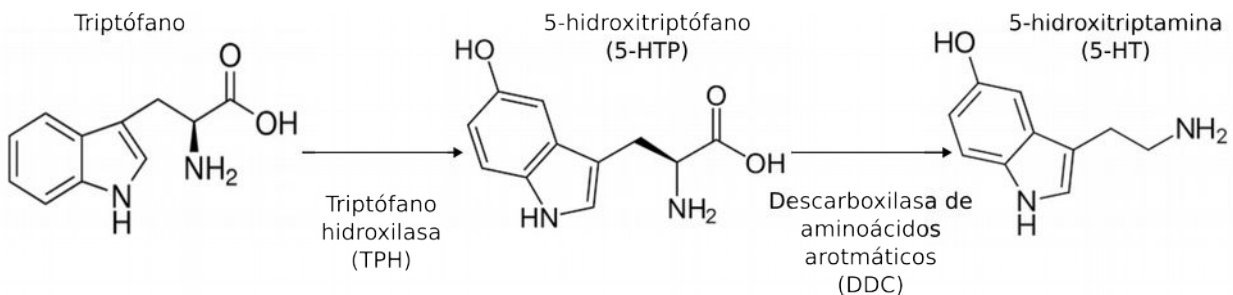
Además tiene un rol importante en tejidos reproductivos y los desequilibrios en su metabolismo podrían afectar negativamente en la reproducción de los mamíferos (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012). El sistema del comportamiento sexual esta bajo un control inhibitorio constante para garantizar que el comportamiento se produzca en circunstancias adecuadas. La 5-HT participa en esta inhibición y en la desinhibición para inducir los comportamientos sexuales, por lo tanto, la liberación de 5-HT se regula mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Snoeren *et al.*, 2014).

La biosíntesis de 5-HT es catalizada por dos diferentes tipos de triptófano hidroxilasa (TPH): TPH1 y TPH2. La TPH1 es altamente expresada en células enterocromafines del intestino, tiene un rol importante en la síntesis de 5-HT en tejidos periféricos; mientras que la TPH2 solo se

expresa en neuronas serotoninérgicas; es decir solo se expresa en el sistema nervioso central y su nivel de expresión en el cerebro puede afectar el contenido de 5-HT en la hendidura sináptica, esto a su vez afecta a la regulación de la eyaculación. También se ha confirmado que el transportador de 5-HT (5-HT<sub>T</sub>) esta implicado en el proceso de eyaculación (Zhu *et al.*, 2022).

## Biosíntesis de la serotonina

En el sistema nervioso central, la síntesis de 5-HT ocurre en los núcleos del rafe a partir del L-triptófano (aminoácido esencial obtenido a partir de la dieta). El triptófano por sí solo no puede atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que es introducido a partir de transportadores (difusión facilitada). Dentro de las células, el L-triptófano es catalizado por la enzima triptófano hidroxilasa TPH, la TPH añade un grupo hidroxilo (OH) en la quinta posición del núcleo indol de la molécula de triptófano, convirtiéndose en 5-hidroxitriptófano (5-HTP), la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos elimina el grupo carboxilo de 5-HTP, obteniendo como resultado la molécula de 5-HT (Figura 1) (Andrews *et al.*, 2022).



**Figura 1. Biosíntesis de la serotonina.** El aminoácido esencial L-triptófano es hidroxilado por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), el producto de esta reacción es la molécula 5-hidroxitriptófano y posteriormente descarboxilada por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DDC) para obtener como producto final de la reacción a la 5-hidroxitriptamina.

## Comunicación serotoninérgica

El sistema de neurotransmisores serotoninérgicos está formado por ligandos endógenos y 14 subtipos de receptores estructural, funcional y farmacológicamente distintos. Los receptores se dividen en siete familias 5-HT<sub>1-7</sub> con distribuciones diferentes y limitadas en el sistema nervioso. Excepto por el 5-HT<sub>3</sub> que es un receptor ligado a un canal iónico, las siete familias de receptores de 5-HT son receptores transmembrana y están acoplados a proteínas G (Snoeren *et al.*, 2014).

En anteriores trabajos se menciona la localización de componentes serotoninérgicos en espermatozoides de mamíferos; en espermatozoide de humano encontraron marcadores

serotoninérgicos de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>3</sub>, también para TPH1, MAO<sub>A</sub>, 5-HT<sub>T</sub> y 5-HT (Cuadro 2) (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012).

**Cuadro 2. Información de los receptores de 5-HT: tipo de receptor, a que tipo de receptor G pertenece, mecanismo de acción y su localización en espermatozoides de humano.**

Receptor	Subtipo de receptor	Tipo de receptor G	Localización en el organismo	Mecanismo de acción	Localización espermática
5-HT <sub>1</sub>	1A	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> -adenilato ciclasa	SNC	Disminuye la concentración intracelular de AMPc	
	1B	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> -adenilato ciclasa	SNC y SNP		Región postacrosomal en humano
	1D	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> -adenilato ciclasa	SNC		
	1E	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> -adenilato ciclasa	SNC		
	1F	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> -adenilato ciclasa	SNC		
5-HT <sub>2</sub>	2A	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> -fosfolipasa C	SNC, tracto GI	Aumenta la concentración intracelular de IP3 y DAG	Humano- no se ha detectado su presencia con inmunocitoquímica.
	2B	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> -fosfolipasa C	SNP		
	2C	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> -fosfolipasa C	SNC (plexos coroideos)		
5-HT <sub>3</sub>	-	Canal iónico Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	SNC y SNP	Despolarización de la membrana plasmática celular.	En toda la longitud del espermatozoide, principalmente en la región media y pieza principal en humanos.
5-HT <sub>4</sub>	-	G <sub>s</sub> –adenilato ciclasa	Tracto GI, corazón, etc.	Aumenta la concentración intracelular de AMPc	
5-HT <sub>5</sub>	5A	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> -adenilato ciclasa	SNC	Disminuye la	

Receptor	Subtipo de receptor	Tipo de receptor G	Localización en el organismo	Mecanismo de acción	Localización espermática
	5B	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> -adenilato ciclasa	No presente en humanos	concentración intracelular de AMPc	
5-HT <sub>6</sub>	-	G <sub>s</sub> – adenilato ciclasa	SNC	Aumenta la concentración intracelular de AMPc	
5-HT <sub>7</sub>	-	G <sub>s</sub> – adenilato ciclasa	SNC	Aumenta la concentración intracelular de AMPc	
TPH	-	-	SNC	Enzima que modifica al L-triptófano en 5-HTP	Región acrosomal en humano (TPH1)
SERT (5-HT <sub>T</sub> )	-	-	SNC	Transportador de 5-HT	Región postacrosomal y pieza principal en humanos.

Este cuadro fue modificado de (Balakrishna *et al.*, 2021).

## Componentes serotoninérgicos en el espermatozoide

En el sistema reproductor masculino de los mamíferos se ha reportado la presencia de componentes serotoninérgicos. En hámster se tiene registro de la presencia de 5-HT en las células intersticiales de las células de Leydig y en mastocitos de la capsula testicular, también se ha detectado la presencia de la TPH en las células intersticiales de las células de Leydig (Frungeri *et al.*, 2002).

La exposición de los espermatozoides de hámster a agonistas de receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>4</sub> aumentó significativamente la presencia de los espermatozoides hiperactivados y un aumento en el éxito de la fertilización *in vitro* (FIV). Además, la estimulación del receptor 5-HT<sub>3</sub> disminuyó los valores de VCL y ALH; sin embargo, este receptor no está asociado con la hiperactivación. Si bien, los datos obtenidos por (Sakamoto *et al.*, 2021) proporcionan valiosa información respecto al papel del sistema serotoninérgico sobre la función espermática, sus resultados se basan en el análisis de datos promedio de los parámetros de movilidad de los espermatozoides

analizados.

Por otro lado, (Sugiyama *et al.*, 2019) evaluaron los efectos de la 5-HT sobre la movilidad e hiperactivación de los espermatozoides de ratón, además investigaron los efectos de esta molécula en la FIV de ratón. Evaluaron los espermatozoides expuestos a diferentes concentraciones de 5-HT (100fM, 100 pM y 100 nM) con el Sistema de Análisis de la Movilidad Espermática (SMAS), la exposición no afectó ningún parámetro de movilidad. También evaluaron a los espermatozoides tratados con agonistas de los receptores de 5-HT con el sistema SMAS, los agonistas del receptor 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>6</sub> no afectaron los parámetros de movilidad; por otro lado, los agonistas de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> disminuyeron parámetros de movilidad como VCL, LIN, STR entre otros. Los autores concluyen que los agonistas de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub> aumentaron significativamente la hiperactivación de los espermatozoides; además que la 5-HT aumentó la tasa de éxito de la FIV a través de esos receptores.

Por último, (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012) identificaron varios componentes serotoninérgicos en espermatozoides de humano como: 5-HT, TPH1, MAOA, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y el transportador de 5-HT. La exposición a 5-HT aumentó el porcentaje de espermatozoides móviles, además de que aumentó los valores de VSL y VAP. La 5-HT se sintetiza, degrada y almacena directamente en el espermatozoide humano, por lo que podría participar como regulador de procesos fisiológicos en la misma célula. Si bien este trabajo proporciona información relevante en cuanto a los componentes serotoninérgicos presentes en el espermatozoide de humano, los datos derivados del sistema CASA no son consistentes con lo esperado de los algoritmos que calculan VCL y VAP; además sus análisis se basan en el análisis de las medias de los valores de los parámetros cinemáticos.

Con base en la información revisada y presentada, los trabajos reportados evalúan el efecto de la 5-HT en espermatozoides hiperactivados, además de trabajar solo con los datos promedio. Hasta el momento no se tiene ningún antecedente que evalúe el efecto del precursor de 5-HT sobre la movilidad espermática a nivel subpoblacional en espermatozoides activados de cerdo. El objetivo principal del trabajo es evaluar si el triptófano afecta la estructura subpoblacional de los espermatozoides de cerdo.



## Justificación

Biológicamente la heterogeneidad reviste importancia evolutiva; mientras que desde el punto de vista productivo, la identificación de la heterogeneidad permite diseñar estrategias reproductivas eficientes. Por otra parte, se ha demostrado que la comunicación serotoninérgica regula diversos aspectos reproductivos en el macho. Con base en lo anterior, resulta relevante la importancia de generar conocimiento respecto de la heterogeneidad espermática y su relación con la comunicación serotoninérgica.

## Hipótesis

Si la comunicación serotoninérgica tiene un papel en la heterogeneidad de la movilidad espermática, entonces la exposición de los espermatozoides a triptófano podría modificar los patrones de movilidad espermática, a nivel subpoblacional.

## Objetivos

### General

-Investigar si el triptófano modifica la estructura de las subpoblaciones espermáticas cinemáticas de cerdo.

### Particulares

-Evaluar el efecto de la exposición a triptófano sobre la movilidad espermática.

-Identificar la estructura de las subpoblaciones espermáticas cinemáticas antes y después de la adición de triptófano.

-Evaluar el efecto del triptófano en las subpoblaciones espermáticas con base en las trayectorias individuales.

# Materiales y métodos

## Muestras espermáticas

Se utilizaron muestras de semen de cerdo obtenidas del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) las muestras fueron obtenidas por la técnica de la mano enguantada. Fueron transportadas al laboratorio para su análisis conforme al protocolo de distribución comercial a 17°C y fueron analizadas el mismo día de su obtención. Una vez en el laboratorio las muestras fueron homogeneizadas con el agitador HOSEM, fabricado en el laboratorio de Gametos y Desarrollo tecnológico de la FES Iztacala y fueron diluidas con una solución Androstar Plus (Minitube, Tiefembach, Germany) con Albumina de Suero Bovino (BSA). Después se mantuvieron en alícuotas de 1500 µl a 38°C en un baño seco durante 25 min antes de su uso. Los procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Gametos y Desarrollo Tecnológico, dentro de la Unidad de Biomedicina, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Se tomaron alícuotas de cada muestra espermática se les agrego triptófano a diferentes concentraciones: 1nM, 10nM, 100nM y 1000nM. Todas las muestras se mantuvieron en un baño seco a 38°C. Todos los materiales de plástico se precalentaron a 38 °C (Rivas *et al.*, 2022).

## Evaluación de la movilidad espermática

La movilidad espermática se evaluó en un sistema CASA open-source en el tiempo 0 y a los 30 minutos después de la incubación con triptófano en las distintas concentraciones.

Se obtuvieron cuatro secuencias de imágenes obtenidas de diferentes campos visuales. Las secuencias de imágenes se capturaron a 100X 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 durante dos segundos mediante el uso del software Micro- Manager (versión 2.0.0). Las secuencias de video se analizaron con el plugin CASA\_bgm (Giaretta *et al.*, 2017) modificado para espermatozoides de cerdo BGM\_RA (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2023). Los parámetros de movilidad analizados para cada espermatozoide fueron: VAP (velocidad de trayectoria promedio - µm/seg), VCL (velocidad curvilínea - µm/seg), VSL (velocidad rectilínea - µm/seg), BCF (frecuencia del cruce

de batido - Hz), LIN (linealidad - VSL/VCL), STR (coeficiente de rectitud - VSL/VAP), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza -  $\mu\text{m}$ ) y WOB (oscilación - VAP/VCL). Además, se registraron parámetros como la movilidad total (%), la movilidad progresiva (%) y el número de espermatozoides lentos, medios o rápidos de acuerdo con la metodología descrita por (Rivas *et al.*, 2022). 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.

## Identificación de subpoblaciones espermáticas en función de los parámetros de movilidad

Con los datos obtenidos del sistema CASA se construyó una base de datos de tipo dataframe. Para la identificación de las subpoblaciones espermáticas cinemáticas, todos los parámetros de movilidad se procesaron mediante un análisis de componentes principales. Los componentes principales de valor eigen mayor a uno de acuerdo con el criterio de kaiser, se conservaron para los análisis posteriores. Los componentes principales seleccionados se utilizaron como entrada para el agrupamiento jerárquico (Husson *et al.*, 2010). Las subpoblaciones obtenidas del agrupamiento jerárquico se definieron gracias a la ganancia de inercia (varianza) (Rivas *et al.*, 2022).

## Identificación de subpoblaciones espermáticas usando un algoritmo de Machine Learning no supervisado

Se utilizó un script de python para automatizar el proceso de análisis espermático, este script toma como entrada la hoja de resultados del sistema CASA y se obtienen dos archivos csv: el primero corresponde a los parámetros de movilidad y el segundo a las coordenadas de cada espermatozoide analizado. El archivo de las coordenadas de los espermatozoides analizados sirvió como entrada para otro script de python para obtener las imágenes individuales de las trayectorias espermáticas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2023).

Las imágenes de las trayectorias se generaron como imágenes png utilizando matplotlib versión 3.6. Se utilizó el módulo de Image Pillow Imaging Library para convertir cada trayectoria en un vector binario; este módulo tiene la opción “L” con la que se mapearon los píxeles a su límite más cercano, ya sea negro (0) o blanco (256). Se verificó que los datos fueran binarios y se configuraron todos los valores como 1, para que los datos de entrada fueran un conjunto de

valores binarios (0 y 1). Todas las imágenes individuales fueron almacenadas en una carpeta (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2023).

Después se ejecutó un algoritmo de agrupamiento no supervisado (agrupamiento aglomerativo), la entrada para este algoritmo fueron las imágenes de las trayectorias individuales de los espermatozoides. El algoritmo se implementó en un cuaderno de Jupyter (JupyterLab versión 3.3.2) bajo Anaconda versión 3.21.5 ejecutando Python versión 3.8.10 y las librerías Scikit-Learn versión 1.0.2, pandas versión 1.4.2, numpy versión 1.21.5 y matplotlib versión 3.6 (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2023).

## Estadística

En ambos enfoques de identificación de subpoblaciones, se compararon los valores medios de cada concentración de triptófano frente al control. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía en un modelo de contrastes ortogonales. En todos los casos se consideró un valor de  $P < 0.05$  como significativo. Todos los análisis se realizaron con el software R versión 4.2.1 (R Core Team, 2022). Todos los datos se presentaron como media  $\pm$  error estándar.

## Resultados

Se construyó una base de datos que consta de 38,300 espermatozoides. Al analizar los promedios de las variables de movilidad espermática, se observó que la exposición de los espermatozoides al triptófano indujo cambios significativos, con las distintas concentraciones utilizadas y a los diferentes tiempos de evaluación. Las variables de velocidad VCL y VAP aumentaron al tiempo 0 de incubación en todas las concentraciones evaluadas, se presentan cambios significativos en las concentraciones 1, 10 y 100 nM; sin embargo, VSL solamente aumentó en la concentración más baja de triptófano ( $P = 5.4e-05$ ). Por otra parte, las variables que describen la linealidad de la trayectoria espermática (LIN y STR), presentaron al tiempo 0 el mismo aumento significativo en sus valores que en las variables de velocidad (VCL y VAP); mientras que BCF aumentó, pero ALH disminuyó significativamente (Cuadro 3).

Después de 30 minutos de incubación con triptófano nuevamente se observaron cambios en las variables cinemáticas de los espermatozoides expuestos a triptófano: VCL disminuyó en las concentraciones 1, 10 y 1000 nM, VAP disminuyó solo en las concentraciones 1 y 1000 nM ( $P =$

4.04e-12 y  $P = 9.62e-06$ , respectivamente); sin embargo, VSL disminuyó en la concentración más baja de triptófano ( $P = 8.52e-07$ ). Finalmente, BCF y ALH disminuyeron (Cuadro 4).

Después del análisis estadístico del efecto del triptófano sobre los valores promedio de las variables de movilidad espermática, se procedió a identificar estadísticamente a las subpoblaciones cinemáticas. Se realizó el análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de reducir la dimensionalidad en la cual se expresa el conjunto original de datos (Husson *et al.*, 2010). Se conservaron los componentes principales de valor eigen mayor a uno de acuerdo con el criterio de Kaiser (Cuadro 5). Los dos componentes principales del PCA (PC1 y PC2) en conjunto explicaron el 79.28% de la varianza total del conjunto de datos (Cuadro 5). Los otros componentes, PC3 al PC8, explican el 9.87%, 8.92%, 1.07%, 0.56%, 0.20% y 0.06%, respectivamente de la varianza.

Los parámetros de movilidad espermática se asociaron con PCs particulares (Cuadro 4). Los parámetros de movilidad VCL, VAP, VSL, WOB y ALH se correlacionan de manera positiva con el PC1 (es decir, que estos parámetros son mejor explicados por el componente principal 1), mientras que LIN y STR se correlacionan positivamente con el PC2. Se aprecian dos agrupaciones en los parámetros de movilidad (Figura 1A), los parámetros que mejor se explicaron por el PC1 y los que se explicaron mejor por el PC2; para ver el efecto de la exposición de los espermatozoides al triptófano en las subpoblaciones de espermatozoides se realizó el método de agrupamiento jerárquico (Figura 2B).

Con el método de agrupamiento jerárquico se identificaron tres subpoblaciones (clusters) (Figura 2B). Se analizaron los promedios de las variables de movilidad espermática de cada tratamiento y tiempo por subpoblación. La exposición a triptófano indujo cambios en los parámetros de movilidad espermática a los diferentes tiempos de evaluación. Los espermatozoides más veloces se identificaron en la subpoblación 3; es decir, son espermatozoides que presentan los valores de VCL más altos en el grupo control. A continuación se describirán los resultados cinemáticos de la subpoblación 3, debido a que la velocidad se ha relacionado con la fertilidad en mamíferos (Ramón *et al.*, 2013). aunque se presentan los resultados cinemáticos de todas las subpoblaciones.

**Cuadro 3. Efecto del triptófano sobre los parámetros promedio de movilidad espermática al tiempo 0, (media ± S.E).**

Triptófano (nM)	Parámetros de movilidad								
	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)	ALH ( $\mu\text{m}$ )	n
0	106.77 ± 0.73	52.71 ± 0.41	36.36 ± 0.34	0.36 ± 0.00	0.71 ± 0.00	0.50 ± 0.00	35.59 ± 0.12	4.11 ± 0.03	3835
1	96.30 ± 0.61*	49.60 ± 0.39*	38.20 ± 0.34*	0.40 ± 0.00*	0.78 ± 0.00*	0.51 ± 0.00*	36.04 ± 0.11	3.80 ± 0.03*	3455
10	96.01 ± 0.54*	50.00 ± 0.34*	36.77 ± 0.30	0.39 ± 0.00*	0.75 ± 0.00*	0.52 ± 0.00*	36.15 ± 0.10*	3.76 ± 0.02*	3851
100	98.31 ± 0.61*	48.35 ± 0.35*	36.07 ± 0.30	0.38 ± 0.00*	0.76 ± 0.00*	0.49 ± 0.00	36.12 ± 0.10*	3.81 ± 0.03*	3826
1000	107.13 ± 0.74	52.88 ± 0.40	36.70 ± 0.32	0.36 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.50 ± 0.00	36.03 ± 0.11	4.13 ± 0.03	3496
* P<0.05 versus control.									

Los valores de P de cada parámetro cinemático, que por cada concentración mostraron diferencias significativas están marcados con un asterisco (\*) en comparación con el control del ANOVA de una vía. VAP (velocidad de trayectoria promedio -  $\mu\text{m/seg}$ ), VCL (velocidad curvilínea -  $\mu\text{m/seg}$ ), VSL (velocidad rectilínea -  $\mu\text{m/seg}$ ), BCF (frecuencia cruzada de batido - Hz), LIN (linealidad - VSL/VCL), STR (coeficiente de rectitud - VSL/VAP), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza -  $\mu\text{m}$ ) y WOB (oscilación – VAP/VCL).

**Cuadro 4. Efecto del triptófano sobre los parámetros promedio de movilidad espermática al tiempo 30, (media ± S.E).**

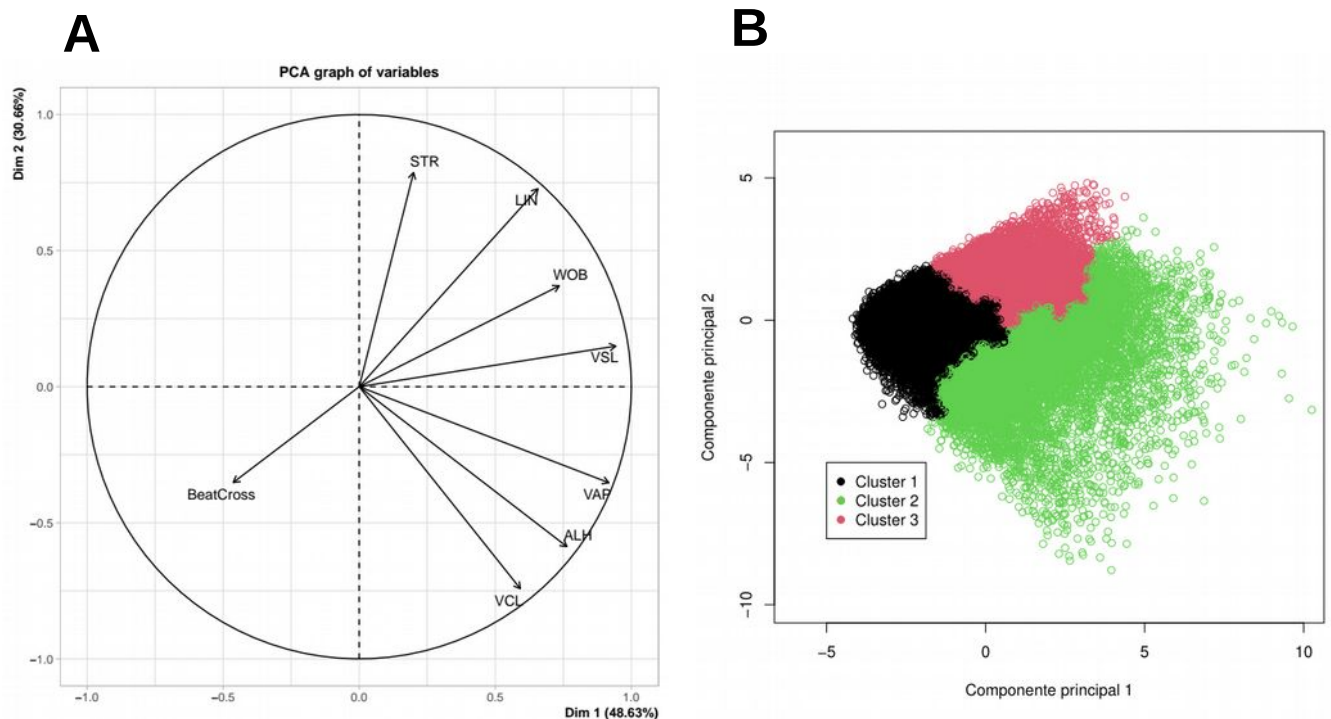
Triptófano (nM)	Parámetros de movilidad								
	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)	ALH ( $\mu\text{m}$ )	n
0	95.79 ± 0.67	51.63 ± 0.45	41.08 ± 0.39	0.44 ± 0.00	0.81 ± 0.00	0.54 ± 0.00	36.51 ± 0.13	3.80 ± 0.03	2891
1	85.84 ± 0.49*	47.71 ± 0.36*	38.56 ± 0.32*	0.45 ± 0.00	0.82 ± 0.00	0.55 ± 0.00*	36.17 ± 0.12	3.50 ± 0.02*	3126
10	89.78 ± 0.44*	51.07 ± 0.36	40.56 ± 0.33	0.45 ± 0.00	0.80 ± 0.00	0.56 ± 0.00*	35.82 ± 0.11*	3.65 ± 0.02*	3610
100	94.11 ± 0.40	51.43 ± 0.30	40.50 ± 0.27	0.43 ± 0.00	0.80 ± 0.00*	0.54 ± 0.00	35.33 ± 0.09*	3.79 ± 0.02	5453
1000	89.15 ± 0.38*	49.35 ± 0.31*	40.72 ± 0.29	0.46 ± 0.00*	0.82 ± 0.00*	0.55 ± 0.00	35.99 ± 0.10	3.62 ± 0.02*	4757
* P<0.05 versus control.									

Los valores de P de cada parámetro cinemático, que por cada concentración mostraron diferencias significativas están marcados con un asterisco (\*) en comparación con el control del ANOVA de una vía. VAP (velocidad de trayectoria promedio -  $\mu\text{m/seg}$ ), VCL (velocidad curvilínea -  $\mu\text{m/seg}$ ), VSL (velocidad rectilínea -  $\mu\text{m/seg}$ ), BCF (frecuencia cruzada de batido - Hz), LIN (linealidad - VSL/VCL), STR (coeficiente de rectitud - VSL/VAP), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza -  $\mu\text{m}$ ) y WOB (oscilación - VAP/VCL).

**Cuadro 5. Análisis de componentes principales de los descriptores de movilidad obtenidos mediante el análisis espermático asistido por computadora.**

	PC1	PC2
<b>Varianza explicada (eigenvalue) Eigenvectors*</b>	48.62 (3.89)	30.66 (2.45)
<b>VCL</b>	<b>0.59</b>	-0.74
<b>VAP</b>	<b>0.91</b>	-0.35
<b>VSL</b>	<b>0.94</b>	0.14
<b>LIN</b>	0.65	<b>0.72</b>
<b>STR</b>	0.19	<b>0.78</b>
<b>WOB</b>	<b>0.73</b>	0.37
<b>BCF</b>	-0.46	-0.35
<b>ALH</b>	<b>0.76</b>	-0.58

\*Los eigenvectors representan el grado de asociación con cada uno de los descriptores de movilidad; PC1= Componente Principal 1; PC2= Componente Principal 2. VAP (velocidad de trayectoria promedio -  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ), VCL (velocidad curvilínea -  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ), VSL (velocidad rectilínea -  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ), BCF (frecuencia cruzada de batido - Hz), LIN (linealidad - VSL/VCL), STR (coeficiente de rectitud - VSL/VAP), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza -  $\mu\text{m}$ ) y WOB (oscilación - VAP/VCL).



**Figura 2. Agrupación jerárquica en el análisis de componentes principales.** A) Correlaciones entre los parámetros de movilidad y los componentes principales (PC1 y PC2); las variables se representan como vectores, cuyas direcciones se determinan en función de las cargas de los componentes. B) Los agrupamientos identifican con colores en el mapa de componentes principales.



En la subpoblación 3 identificada con métodos estadísticos, al tiempo 0 podemos observar que los parámetros de velocidad VAP y VCL disminuyeron de manera significativa en las concentraciones bajas de triptófano, mientras que VSL aumentó cuando los espermatozoides se expusieron a triptófano a 1 nM, los valores de LIN, STR, WOB y ALH aumentaron a concentraciones bajas, BCF aumentó en las concentraciones 10 y 1000 nM (Cuadro 6).

Al tiempo 30 en la subpoblación 3 los parámetros VCL y ALH disminuyeron en todas las concentraciones, VAP disminuyó en las concentraciones 1, 10 y 100 nM, VSL no presentó cambios; sin embargo, los parámetros de linealidad (LIN y STR) aumentaron en la concentración 1000 nM, mientras que WOB aumentó en todas las concentraciones evaluadas y BCF disminuyó en las concentraciones 100 y 1000 nM (Cuadro 7). Además se muestra gráficamente el efecto del triptófano sobre todos los parámetros de movilidad en esta subpoblación (Figura 3).

Con el modelo computacional para analizar imágenes individuales de trayectorias de espermatozoides, mediante el algoritmo jerárquico aglomerativo se identificaron 6 subpoblaciones. Para representar gráficamente las agrupaciones se realizaron gráficas “Pollock” (Figura 4). La subpoblación 3 es la que se describirá a continuación debido a su alta velocidad en el control, porque las altas velocidades se han relacionado con la fertilidad, aunque se presentan los resultados de todas las subpoblaciones.

En la subpoblación 3 identificada con un algoritmo de ML, al tiempo 0 disminuyó VCL en las concentraciones 1, 10 y 100 nM respecto al control, mientras que LIN aumenta en las mismas concentraciones y STR aumenta en todas las concentraciones (Cuadro 8). Después de 30 minutos de incubación, VCL disminuye en las mismas concentraciones que al tiempo 0, pero los parámetros de linealidad (LIN y STR) no se modificaron (Cuadro 9). (Figura 5). Además se muestra gráficamente el efecto del triptófano sobre todos los parámetros de movilidad en esta subpoblación (Figura 6).

**Cuadro 6. Efecto del triptófano en los parámetros cinemáticos promedio de los espermatozoides de cada subpoblación con base en el método de agrupamiento jerárquico al tiempo 0, (media ± S.E).**

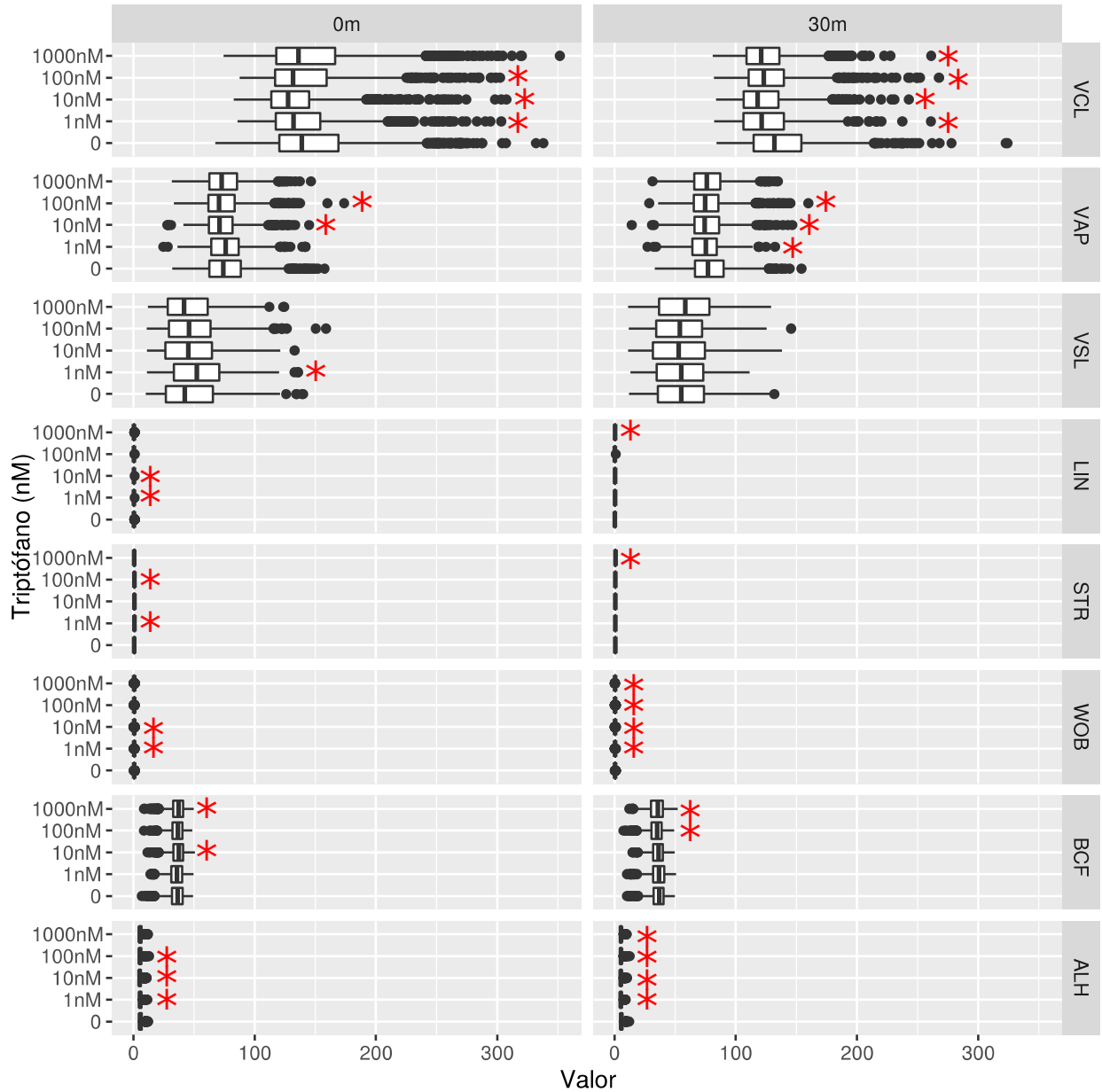
		Parámetros cinemáticos								
Sp	Triptófano (nM)	VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)	ALH (µm)	n
1	0	82.32 ± 0.51	32.19 ± 0.29	22.59 ± 0.23	0.28 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.40 ± 0.00	38.12 ± 0.15	2.90 ± 0.02	1648
	1	79.15 ± 0.47*	31.85 ± 0.29	23.63 ± 0.23	0.30 ± 0.00*	0.76 ± 0.00*	0.40 ± 0.00	38.68 ± 0.14	2.87 ± 0.02	1537
	10	79.51 ± 0.45*	34.36 ± 0.29*	24.61 ± 0.22*	0.31 ± 0.00*	0.74 ± 0.00	0.43 ± 0.00*	38.35 ± 0.14	2.90 ± 0.02	1687
	100	81.00 ± 0.43*	32.81 ± 0.28	24.31 ± 0.22*	0.30 ± 0.00*	0.75 ± 0.00*	0.41 ± 0.00	38.19 ± 0.13	2.90 ± 0.02	1830
	1000	82.54 ± 0.51	33.18 ± 0.31	24.08 ± 0.25*	0.29 ± 0.00*	0.74 ± 0.00*	0.40 ± 0.00	37.76 ± 0.15	2.98 ± 0.02	1454
2	0	76.42 ± 0.66	49.91 ± 0.45	44.26 ± 0.42	0.59 ± 0.00	0.89 ± 0.00	0.66 ± 0.00	30.28 ± 0.28	3.26 ± 0.03	726
	1	79.83 ± 0.56*	50.92 ± 0.39	46.33 ± 0.36*	0.58 ± 0.00	0.91 ± 0.00*	0.64 ± 0.00*	32.70 ± 0.20*	3.41 ± 0.03*	951
	10	80.84 ± 0.57*	50.18 ± 0.38	45.35 ± 0.36	0.56 ± 0.00*	0.90 ± 0.00*	0.62 ± 0.00*	32.13 ± 0.20*	3.38 ± 0.03	1017
	100	80.36 ± 0.59*	49.69 ± 0.39	45.06 ± 0.36	0.57 ± 0.00*	0.91 ± 0.00*	0.62 ± 0.00*	32.34 ± 0.21*	3.43 ± 0.03*	918
	1000	81.53 ± 0.70*	50.76 ± 0.46	45.55 ± 0.42	0.56 ± 0.00*	0.90 ± 0.00	0.63 ± 0.00*	32.11 ± 0.24*	3.39 ± 0.03	713
3	0	149.44 ± 1.10	77.25 ± 0.52	47.98 ± 0.65	0.33 ± 0.00	0.61 ± 0.01	0.54 ± 0.00	35.37 ± 0.18	5.90 ± 0.04	1461
	1	139.77 ± 1.07*	76.51 ± 0.58	53.36 ± 0.76*	0.39 ± 0.01*	0.69 ± 0.01*	0.56 ± 0.00*	35.13 ± 0.21	5.66 ± 0.04*	967
	10	133.73 ± 0.90*	72.85 ± 0.45*	47.04 ± 0.67	0.36 ± 0.01*	0.63 ± 0.01	0.55 ± 0.00*	36.48 ± 0.18*	5.37 ± 0.03*	1147
	100	143.00 ± 1.18*	73.58 ± 0.53*	48.38 ± 0.69	0.35 ± 0.00	0.65 ± 0.01*	0.53 ± 0.00	35.85 ± 0.18	5.68 ± 0.04*	1078
	1000	147.77 ± 1.17	75.58 ± 0.48	45.75 ± 0.58	0.32 ± 0.00	0.60 ± 0.01	0.53 ± 0.00	36.24 ± 0.17*	5.77 ± 0.04	1329

Los valores de P de cada parámetro cinemático, que por cada concentración mostraron diferencias significativas están marcados con un asterisco (\*) en comparación con el control del ANOVA de una vía. Sp (Subpoblación), VAP (velocidad de trayectoria promedio - µm/seg), VCL (velocidad curvilínea - µm/seg), VSL (velocidad rectilínea - µm/seg), BCF (frecuencia cruzada de batido - Hz), LIN (linealidad - VSL/VCL), STR (coeficiente de rectitud - VSL/VAP), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza - µm) y WOB (oscilación - VAP/VCL).

**Cuadro 7. Efecto del triptófano en los parámetros cinemáticos promedio de los espermatozoides de cada subpoblación con base en el método de agrupamiento jerárquico al tiempo 30, (media ± S.E).**

Sp	Triptófano (nM)	Parámetros cinemáticos								
		VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)	ALH (µm)	n
1	0	78.78 ± 0.58	31.41 ± 0.34	24.73 ± 0.27	0.32 ± 0.00	0.80 ± 0.00	0.40 ± 0.00	39.64 ± 0.18	2.80 ± 0.02	1115
	1	76.26 ± 0.48*	32.92 ± 0.33	25.05 ± 0.25	0.33 ± 0.00*	0.78 ± 0.00*	0.43 ± 0.00*	39.42 ± 0.15	2.82 ± 0.02	1308
	10	77.63 ± 0.47	33.51 ± 0.33*	25.08 ± 0.24	0.32 ± 0.00	0.77 ± 0.00*	0.43 ± 0.00*	38.77 ± 0.16*	2.84 ± 0.02	1390
	100	79.52 ± 0.39	32.85 ± 0.25*	25.16 ± 0.20	0.32 ± 0.00	0.78 ± 0.00*	0.41 ± 0.00	38.50 ± 0.13*	2.88 ± 0.02	2168
	1000	78.17 ± 0.39	32.48 ± 0.26	24.94 ± 0.20	0.32 ± 0.00	0.78 ± 0.00*	0.41 ± 0.00*	39.14 ± 0.12	2.83 ± 0.02	1946
2	0	77.97 ± 0.57	50.99 ± 0.41	47.02 ± 0.38	0.61 ± 0.00	0.92 ± 0.00	0.66 ± 0.00	33.39 ± 0.21	3.28 ± 0.03	947
	1	76.41 ± 0.47	49.88 ± 0.34	45.25 ± 0.31*	0.60 ± 0.00	0.91 ± 0.00*	0.66 ± 0.00	32.81 ± 0.19	3.30 ± 0.02	1213
	10	81.15 ± 0.45*	52.74 ± 0.34*	47.91 ± 0.31	0.59 ± 0.00*	0.91 ± 0.00*	0.65 ± 0.00	33.05 ± 0.17	3.46 ± 0.02*	1360
	100	82.32 ± 0.42*	52.47 ± 0.30	47.44 ± 0.28	0.58 ± 0.00*	0.91 ± 0.00*	0.64 ± 0.00*	32.22 ± 0.15*	3.52 ± 0.02*	1747
	1000	80.14 ± 0.39	51.52 ± 0.30	47.45 ± 0.28	0.59 ± 0.00*	0.92 ± 0.00	0.64 ± 0.00*	33.27 ± 0.15	3.43 ± 0.02*	1777
3	0	139.01 ± 1.15	79.55 ± 0.65	56.28 ± 0.86	0.41 ± 0.01	0.70 ± 0.01	0.58 ± 0.00	35.85 ± 0.23	5.75 ± 0.05	829
	1	125.45 ± 1.06*	75.36 ± 0.61*	54.37 ± 0.92	0.44 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.61 ± 0.01*	35.86 ± 0.28	5.34 ± 0.04*	605
	10	123.05 ± 0.80*	76.82 ± 0.55*	53.95 ± 0.86	0.44 ± 0.01	0.68 ± 0.01	0.63 ± 0.00*	35.45 ± 0.21	5.26 ± 0.03*	860
	100	128.06 ± 0.64*	76.43 ± 0.41*	54.24 ± 0.60	0.43 ± 0.00	0.69 ± 0.01	0.61 ± 0.00*	34.40 ± 0.16*	5.39 ± 0.03*	1538
	1000	125.30 ± 0.72*	77.34 ± 0.53	58.82 ± 0.77	0.47 ± 0.01*	0.74 ± 0.01*	0.63 ± 0.00*	34.72 ± 0.21*	5.44 ± 0.03*	1034

Los valores de P de cada parámetro cinemático, que por cada concentración mostraron diferencias significativas están marcados con un asterisco (\*) en comparación con el control del ANOVA de una vía. Sp (Subpoblación), VAP (velocidad de trayectoria promedio - µm/seg), VCL (velocidad curvilínea - µm/seg), VSL (velocidad rectilínea - µm/seg), BCF (frecuencia cruzada de batido - Hz), LIN (linealidad - VSL/VCL), STR (coeficiente de rectitud - VSL/VAP), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza - µm) y WOB (oscilación - VAP/VCL).



**Figura 3. Efecto del triptófano sobre los parámetros de movilidad en la subpoblación 3, a diferentes tiempos de evaluación.** Gráficas de cajas con bigote por cada parámetro de movilidad de la subpoblación 3 (identificada con estadística convencional). Las líneas verticales en cada caja indican el cuartil 2 (mediana), el cuartil 1 es el comienzo de la caja y el cuartil 3 el final. Los bigotes indican el valor mínimo y máximo. Los puntos negros indican valores extremos. \* $P < 0.05$  vs control (0), ANOVA de una vía en un modelo de contrastes ortogonales.

**Cuadro 8. Efecto del triptófano en los parámetros cinemáticos promedio de los espermatozoides de cada subpoblación obtenida con el algoritmo aglomerativo jerárquico de machine learning al tiempo 0, (media  $\pm$  S.E).**

		Parámetros cinemáticos								
Sp	Triptófano (nM)	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)	ALH ( $\mu\text{m}$ )	n
1	0	106.90 $\pm$ 1.39	53.70 $\pm$ 0.76	40.73 $\pm$ 0.75	0.39 $\pm$ 0.01	0.74 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.00	35.55 $\pm$ 0.23	4.11 $\pm$ 0.06	971
	1	99.20 $\pm$ 1.19*	51.21 $\pm$ 0.74	41.56 $\pm$ 0.74	0.42 $\pm$ 0.01*	0.79 $\pm$ 0.01*	0.52 $\pm$ 0.00	36.44 $\pm$ 0.21	3.89 $\pm$ 0.05	801
	10	96.61 $\pm$ 1.14*	50.83 $\pm$ 0.67	41.24 $\pm$ 0.66	0.43 $\pm$ 0.00*	0.80 $\pm$ 0.01*	0.53 $\pm$ 0.00	35.97 $\pm$ 0.21	3.78 $\pm$ 0.05*	859
	100	101.88 $\pm$ 1.29	51.27 $\pm$ 0.71	41.01 $\pm$ 0.68	0.41 $\pm$ 0.00	0.79 $\pm$ 0.01*	0.51 $\pm$ 0.00	36.17 $\pm$ 0.21	3.92 $\pm$ 0.05	865
	1000	110.62 $\pm$ 1.62	54.41 $\pm$ 0.79	42.14 $\pm$ 0.75	0.39 $\pm$ 0.01	0.76 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.00	35.43 $\pm$ 0.24	4.21 $\pm$ 0.06	753
2	0	92.37 $\pm$ 1.33	43.46 $\pm$ 0.84	36.95 $\pm$ 0.81	0.41 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.01	34.06 $\pm$ 0.29	3.67 $\pm$ 0.06	698
	1	86.55 $\pm$ 1.06*	43.50 $\pm$ 0.74	38.16 $\pm$ 0.73	0.44 $\pm$ 0.01*	0.86 $\pm$ 0.00*	0.50 $\pm$ 0.01	34.74 $\pm$ 0.25	3.54 $\pm$ 0.05	805
	10	87.65 $\pm$ 0.99	43.43 $\pm$ 0.70	37.82 $\pm$ 0.69	0.43 $\pm$ 0.01	0.85 $\pm$ 0.00	0.49 $\pm$ 0.01	34.81 $\pm$ 0.25	3.53 $\pm$ 0.05	756
	100	87.11 $\pm$ 1.08*	41.87 $\pm$ 0.65	36.39 $\pm$ 0.64	0.42 $\pm$ 0.01	0.85 $\pm$ 0.00*	0.49 $\pm$ 0.01	34.86 $\pm$ 0.24	3.48 $\pm$ 0.05	842
	1000	89.64 $\pm$ 1.12	42.09 $\pm$ 0.69	35.88 $\pm$ 0.68	0.40 $\pm$ 0.01	0.84 $\pm$ 0.00	0.47 $\pm$ 0.01	34.98 $\pm$ 0.25	3.52 $\pm$ 0.05	685
3	0	131.96 $\pm$ 2.30	64.32 $\pm$ 0.97	34.23 $\pm$ 0.85	0.28 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.01	37.35 $\pm$ 0.25	5.06 $\pm$ 0.08	568
	1	114.29 $\pm$ 2.53*	59.63 $\pm$ 1.23	39.38 $\pm$ 1.19*	0.36 $\pm$ 0.01*	0.66 $\pm$ 0.01*	0.54 $\pm$ 0.01*	37.66 $\pm$ 0.31	4.61 $\pm$ 0.10*	338
	10	108.95 $\pm$ 1.69*	56.90 $\pm$ 0.78*	33.17 $\pm$ 0.82	0.32 $\pm$ 0.01*	0.58 $\pm$ 0.01*	0.53 $\pm$ 0.00*	38.13 $\pm$ 0.19	4.27 $\pm$ 0.06*	529
	100	117.59 $\pm$ 2.25*	58.79 $\pm$ 1.00*	37.12 $\pm$ 0.93	0.33 $\pm$ 0.01*	0.63 $\pm$ 0.01*	0.52 $\pm$ 0.01	37.45 $\pm$ 0.24	4.62 $\pm$ 0.08*	459
	1000	127.90 $\pm$ 2.50	62.66 $\pm$ 0.99	35.83 $\pm$ 0.82	0.31 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.01*	0.51 $\pm$ 0.01	37.84 $\pm$ 0.23	4.96 $\pm$ 0.09	497
4	0	126.94 $\pm$ 2.55	75.70 $\pm$ 1.21	40.73 $\pm$ 0.98	0.35 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.01	37.91 $\pm$ 0.38	5.28 $\pm$ 0.09	257
	1	121.74 $\pm$ 1.89	74.18 $\pm$ 0.97	44.66 $\pm$ 0.91	0.38 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.01*	0.62 $\pm$ 0.01	38.33 $\pm$ 0.31	5.08 $\pm$ 0.07	254
	10	118.11 $\pm$ 1.82	70.21 $\pm$ 0.88*	40.69 $\pm$ 0.82	0.36 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.00	39.59 $\pm$ 0.27*	4.84 $\pm$ 0.07*	277
	100	123.93 $\pm$ 2.45	69.86 $\pm$ 1.03*	39.52 $\pm$ 0.78	0.34 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01*	39.25 $\pm$ 0.26	5.05 $\pm$ 0.09	250
	1000	123.88 $\pm$ 2.11	72.64 $\pm$ 0.96	40.91 $\pm$ 0.75	0.35 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.01	38.52 $\pm$ 0.31	5.05 $\pm$ 0.07	300

		Parámetros cinemáticos								
Sp	Triptófano (nM)	VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)	ALH (µm)	n
5	0	84.46 ± 1.07	35.14 ± 0.69	29.71 ± 0.67	0.36 ± 0.01	0.82 ± 0.00	0.42 ± 0.01	33.69 ± 0.27	2.97 ± 0.04	834
	1	79.84 ± 0.84*	35.90 ± 0.63	31.38 ± 0.62	0.39 ± 0.01*	0.85 ± 0.00*	0.45 ± 0.01*	34.61 ± 0.24	2.89 ± 0.04	856
	10	80.36 ± 0.81	37.95 ± 0.60	33.56 ± 0.60*	0.41 ± 0.01*	0.86 ± 0.00*	0.47 ± 0.01*	33.74 ± 0.25	2.96 ± 0.04	898
	100	82.47 ± 0.82	34.71 ± 0.56	29.88 ± 0.55	0.36 ± 0.01	0.84 ± 0.00	0.42 ± 0.00	34.60 ± 0.22	2.95 ± 0.04	955
	1000	83.81 ± 0.99	34.97 ± 0.68	30.02 ± 0.67	0.36 ± 0.01	0.83 ± 0.00	0.42 ± 0.01	33.66 ± 0.27	2.98 ± 0.04	716
6	0	124.62 ± 2.01	67.81 ± 0.96	38.34 ± 0.84	0.33 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.57 ± 0.01	37.74 ± 0.26	4.95 ± 0.07	507
	1	113.97 ± 1.89*	63.86 ± 0.95	41.00 ± 0.93	0.38 ± 0.01*	0.65 ± 0.01*	0.57 ± 0.01	38.12 ± 0.23	4.59 ± 0.07*	401
	10	108.97 ± 1.45*	60.96 ± 0.76*	35.01 ± 0.71	0.34 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.57 ± 0.00	38.66 ± 0.19	4.37 ± 0.06*	532
	100	111.99 ± 1.73*	61.04 ± 0.85*	36.13 ± 0.78	0.34 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.56 ± 0.00	38.52 ± 0.21	4.50 ± 0.07*	455
	1000	126.80 ± 1.93	68.07 ± 0.88	37.45 ± 0.77	0.32 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.55 ± 0.00	38.25 ± 0.21	5.01 ± 0.07	54

Los valores de P de cada parámetro cinemático, que por cada concentración mostraron diferencias significativas están marcados con un asterisco (\*) en comparación con el control del ANOVA de una vía. Sp (Subpoblación), VAP (velocidad de trayectoria promedio - µm/seg), VCL (velocidad curvilínea - µm/seg), VSL (velocidad rectilínea - µm/seg), BCF (frecuencia cruzada de batido - Hz), LIN (linealidad - VSL/VCL), STR (coeficiente de rectitud - VSL/VAP), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza - µm) y WOB (oscilación - VAP/VCL).

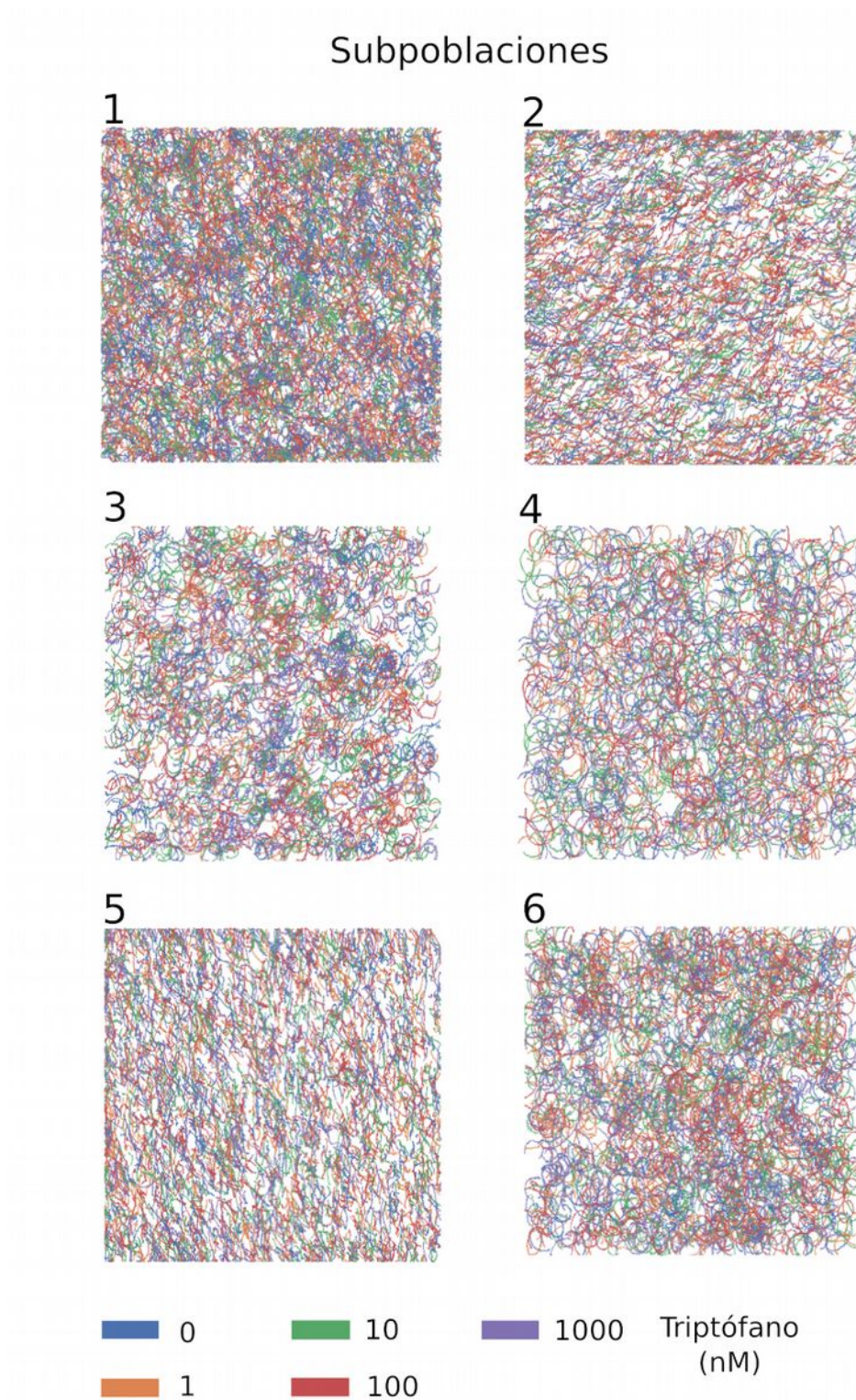
**Cuadro 9. Efecto del triptófano en los parámetros cinemáticos promedio de los espermatozoides de cada subpoblación obtenida con el algoritmo aglomerativo jerárquico de machine learning al tiempo 30, (media ± S.E).**

Sp	Triptófano (nM)	Parámetros cinemáticos								n
		VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)	ALH (µm)	
1	0	101.91 ± 1.46	55.55 ± 0.91	46.80 ± 0.89	0.46 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.55 ± 0.01	36.97 ± 0.25	4.05 ± 0.06	655
	1	87.21 ± 1.01*	50.23 ± 0.71*	43.38 ± 0.71	0.50 ± 0.01*	0.85 ± 0.00	0.58 ± 0.01*	36.25 ± 0.25	3.56 ± 0.04*	692
	10	90.44 ± 0.87*	52.77 ± 0.67	45.06 ± 0.68	0.49 ± 0.01*	0.84 ± 0.00	0.58 ± 0.00*	35.91 ± 0.22	3.68 ± 0.04*	875
	100	98.73 ± 0.79	55.51 ± 0.58	46.48 ± 0.56	0.47 ± 0.00	0.83 ± 0.00	0.56 ± 0.00	35.24 ± 0.18*	3.97 ± 0.04	1373
	1000	92.32 ± 0.82*	51.82 ± 0.62*	44.30 ± 0.63	0.48 ± 0.00	0.84 ± 0.00	0.56 ± 0.00	36.68 ± 0.19	3.76 ± 0.04*	1098
2	0	85.67 ± 1.04	44.41 ± 0.79	39.91 ± 0.77	0.47 ± 0.01	0.89 ± 0.00	0.52 ± 0.01	35.81 ± 0.28	3.56 ± 0.05	669
	1	80.12 ± 0.88*	42.26 ± 0.68	37.93 ± 0.67	0.47 ± 0.01	0.88 ± 0.00	0.53 ± 0.01	35.19 ± 0.28	3.39 ± 0.04	738
	10	82.84 ± 0.81	44.34 ± 0.69	39.79 ± 0.68	0.47 ± 0.01	0.88 ± 0.00	0.53 ± 0.01	35.37 ± 0.24	3.49 ± 0.04	857
	100	85.42 ± 0.71	45.51 ± 0.54	39.85 ± 0.53	0.46 ± 0.00	0.86 ± 0.00*	0.53 ± 0.00	34.30 ± 0.20*	3.59 ± 0.04	1349
	1000	83.83 ± 0.71	45.83 ± 0.62	41.22 ± 0.61	0.48 ± 0.01	0.88 ± 0.00	0.54 ± 0.00	34.96 ± 0.21	3.59 ± 0.04	1201
3	0	114.80 ± 2.73	63.13 ± 1.48	42.84 ± 1.49	0.38 ± 0.01	0.67 ± 0.01	0.56 ± 0.01	37.89 ± 0.37	4.69 ± 0.11	233
	1	92.47 ± 1.74*	54.28 ± 1.07*	37.86 ± 1.16	0.42 ± 0.01	0.69 ± 0.01	0.60 ± 0.01*	37.52 ± 0.34	3.98 ± 0.08*	260
	10	97.42 ± 1.35*	57.09 ± 0.91*	37.55 ± 1.06	0.39 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.59 ± 0.01	37.87 ± 0.29	4.07 ± 0.06*	317
	100	105.27 ± 1.23*	60.24 ± 0.82	41.00 ± 0.86	0.39 ± 0.01	0.68 ± 0.01	0.58 ± 0.01	36.83 ± 0.24	4.36 ± 0.05	492
	1000	99.40 ± 1.46*	57.31 ± 0.99*	41.23 ± 1.06	0.42 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.58 ± 0.01	37.91 ± 0.28	4.17 ± 0.07*	371
4	0	125.02 ± 2.31	76.33 ± 1.20	46.31 ± 1.05	0.39 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.62 ± 0.01	39.21 ± 0.30	5.23 ± 0.09	229
	1	109.46 ± 1.75*	69.55 ± 1.01*	43.62 ± 0.83	0.41 ± 0.01	0.64 ± 0.01	0.64 ± 0.01	39.00 ± 0.31	4.65 ± 0.07*	240
	10	109.87 ± 1.31*	71.55 ± 0.75*	44.15 ± 0.84	0.41 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.66 ± 0.00*	38.00 ± 0.25	4.73 ± 0.05*	321
	100	116.72 ± 1.61*	73.45 ± 0.88	44.85 ± 0.86	0.40 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.64 ± 0.00	37.97 ± 0.26	4.98 ± 0.06	334
	1000	110.18 ± 1.39*	69.69 ± 0.91*	44.69 ± 0.90	0.41 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.64 ± 0.00	38.85 ± 0.25	4.77 ± 0.06*	297
5	0	77.34 ± 0.84	38.11 ± 0.66	34.38 ± 0.66	0.45 ± 0.01	0.88 ± 0.00	0.49 ± 0.01	34.86 ± 0.27	2.78 ± 0.04	803

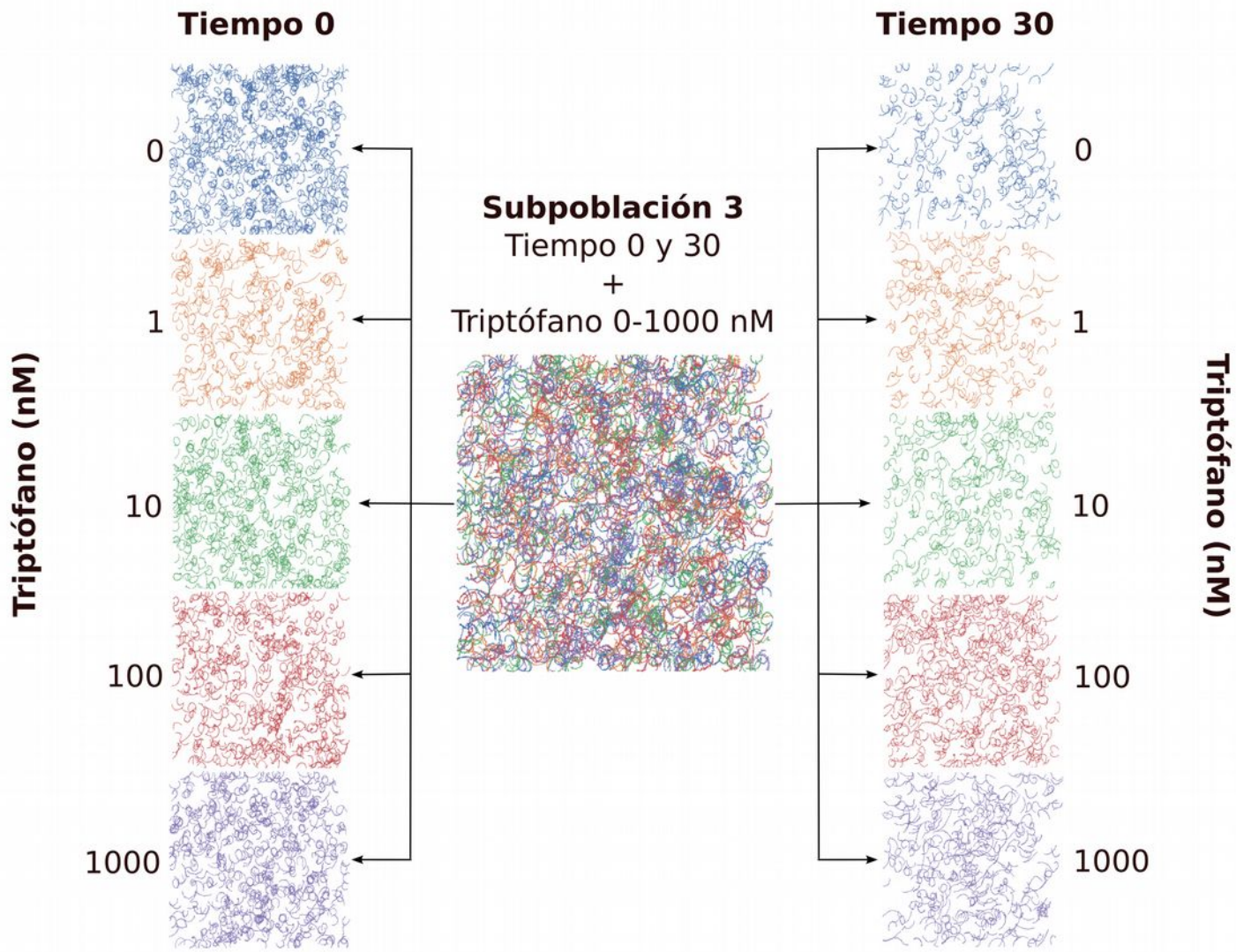
		Parámetros cinemáticos								
Sp	Triptófano (nM)	VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)	ALH (µm)	n
	1	75.83 ± 0.75	37.63 ± 0.59	33.66 ± 0.59	0.44 ± 0.01	0.88 ± 0.00	0.50 ± 0.01	34.78 ± 0.26	2.82 ± 0.03	844
	10	80.06 ± 0.82	40.59 ± 0.71	36.22 ± 0.71	0.44 ± 0.01	0.87 ± 0.00	0.50 ± 0.01	33.82 ± 0.25	2.94 ± 0.04	852
	100	81.81 ± 0.66*	38.29 ± 0.52	33.13 ± 0.51	0.40 ± 0.00*	0.85 ± 0.00*	0.46 ± 0.00*	34.30 ± 0.21	3.01 ± 0.03*	1332
	1000	80.02 ± 0.59	40.38 ± 0.53	36.19 ± 0.53	0.44 ± 0.00	0.88 ± 0.00	0.50 ± 0.00	34.42 ± 0.20	2.95 ± 0.03*	1358
6	0	117.12 ± 2.32	67.45 ± 1.20	43.70 ± 1.14	0.39 ± 0.01	0.66 ± 0.01	0.59 ± 0.01	38.31 ± 0.28	4.74 ± 0.09	302
	1	98.10 ± 1.56*	58.64 ± 0.84*	39.27 ± 0.88	0.41 ± 0.01	0.67 ± 0.01	0.61 ± 0.01	38.44 ± 0.26	4.07 ± 0.06*	352
	10	102.05 ± 1.37*	63.26 ± 0.84	41.08 ± 0.89	0.41 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.62 ± 0.00*	37.57 ± 0.23	4.29 ± 0.06*	388
	100	109.29 ± 1.18*	65.74 ± 0.72	41.86 ± 0.77	0.39 ± 0.01	0.64 ± 0.01	0.61 ± 0.00	37.57 ± 0.20	4.52 ± 0.05	573
	1000	101.35 ± 1.28*	60.16 ± 0.84*	41.24 ± 0.89	0.42 ± 0.01	0.69 ± 0.01	0.60 ± 0.00	38.38 ± 0.23	4.21 ± 0.06*	432

Los valores de P de cada parámetro cinemático, que por cada concentración mostraron diferencias significativas están marcados con un asterisco (\*) en comparación con el control del ANOVA de una vía. Sp (Subpoblación), VAP (velocidad de trayectoria promedio - µm/seg), VCL (velocidad curvilínea - µm/seg), VSL (velocidad rectilínea - µm/seg), BCF (frecuencia cruzada de batido - Hz), LIN (linealidad - VSL/VCL), STR (coeficiente de rectitud - VSL/VAP), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza - µm) y WOB (oscilación - VAP/VCL).

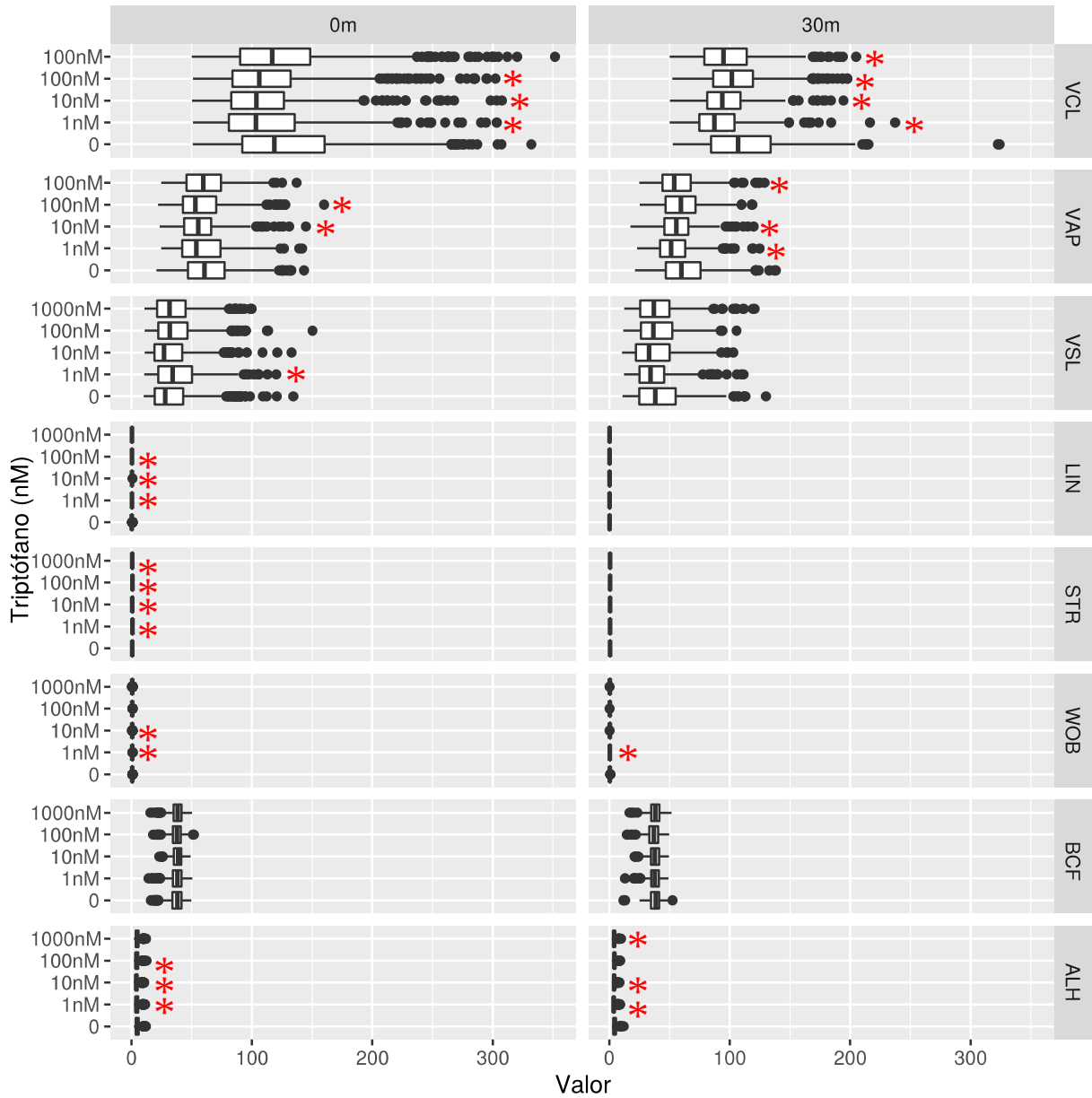




**Figura 4. Agrupación realizada por el algoritmo aglomerativo jerárquico.** En cada gráfica "Pollock" se presentan las trayectorias individuales de los espermatozoides de cada subpoblación; cada trayectoria se mapeo de acuerdo con el tratamiento de triptófano (nM).



**Figura 5. Trayectorias individuales de los espermatozoides de la subpoblación 3 por tiempo y tratamiento.** Se identificaron 6 subpoblaciones; se presentan las graficas Pollock de la subpoblación 3. Las graficas Pollock muestran las imágenes de las trayectorias de los espermatozoides; los números sobre cada imagen indican las concentraciones de triptófano (nM), después de 0 (izquierda) o 30 (derecha) minutos de incubación.



**Figura 6. Efecto del triptófano sobre los parámetros de movilidad en la subpoblación 3, a diferentes tiempos de evaluación.** Gráficas de cajas con bigote por cada parámetro de movilidad de la subpoblación 3 (identificada con ML). Las líneas verticales en cada caja indican el cuartil 2 (mediana), el cuartil 1 es el comienzo de la caja y el cuartil 3 el final. Los bigotes indican el valor mínimo y máximo. Los puntos negros indican valores extremos. \* $P < 0.05$  vs control (0), ANOVA de una vía en un modelo de contrastes ortogonales.

## Discusión

Previamente se reportó que los espermatozoides de humano modifican sus patrones de movilidad como respuesta a la exposición a la 5-HT (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012); no obstante, aunque en ese estudio utilizaron un sistema CASA para evaluar la movilidad, solamente analizaron los datos promedio de los parámetros de movilidad.

En el estudio de (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012) mostraron que el promedio de VCL fue aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  mayor que el control en todas las concentraciones de 5-HT (10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ). Por otra parte, se ha demostrado que los espermatozoides de humano expresan a la proteína TPH (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012), la cual se encarga de metabolizar el triptófano a 5-HT (Zhu *et al.*, 2022). La presencia de la TPH1 se localizó en la región acrosomal y postacrosomal de los espermatozoides de humano. Se desconoce si la TPH se expresa en todos los espermatozoides, puesto que lo reportado hasta el momento han sido ensayos bioquímicos en los que no se puede apreciar la expresión de la enzima en espermatozoides individuales.

En este trabajo observamos que la exposición de los espermatozoides de cerdo, a diferentes concentraciones de triptófano (componente serotoninérgico), induce cambios en los parámetros cinemáticos evaluados con un sistema CASA y su efecto sobre las trayectorias de nuestra subpoblación de importancia biológica. El efecto del triptófano sobre las células en las subpoblaciones se enmascara cuando solamente se analizan los promedios de los parámetros cinemáticos y cuando solo se utilizan métodos estadísticos para identificar subpoblaciones.

Es posible identificar subpoblaciones espermáticas mediante distintas aproximaciones estadísticas (como el análisis de componentes principales seguido de agrupamiento jerárquico) (Martínez-Pastor *et al.*, 2011; Amann and Waberski, 2014; Rivas *et al.*, 2022). Es importante identificar a las subpoblaciones con métodos estadísticos, ya que trabajar con valores promedio de la estadística descriptiva presenta sesgos del verdadero efecto del tratamiento sobre los espermatozoides y no considera la variabilidad intrínseca en el eyaculado (Hidalgo *et al.*, 2021).

Realizamos un análisis de componentes principales seguido de un agrupamiento jerárquico, obtuvimos como resultado tres subpoblaciones; la subpoblación de importancia biológica fue la 3, donde al tiempo 0 los parámetros de velocidad disminuyen a bajas concentraciones y los parámetros de linealidad aumentan. Después de 30 minutos, VCL disminuye en todas las concentraciones, pero los parámetros de linealidad aumentan solo en la concentración más alta de



triptófano. El efecto del triptófano es inmediato en esta subpoblación, el aumento de LIN al tiempo 0 indica una modificación en las trayectorias, que con este método no podemos observar; aunque si podemos afirmar cambios en la movilidad espermática.

La identificación de las subpoblaciones cinemáticas con aproximaciones estadísticas esta basada en los parámetros de movilidad, obtenidos del sistema CASA. El software del sistema CASA nos otorga los valores de los parámetros de movilidad y las coordenadas de cada espermatozoide analizado. Sin embargo, la identificación de las subpoblaciones espermáticas basada en los parámetros de movilidad no es un enfoque adecuado actualmente. La razón fundamental es que se excluye información importante como las coordenadas de las trayectorias; por otro lado, no es posible reconstruir las trayectorias utilizando los parámetros de movilidad (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2023).

Es evidente el sesgo al trabajar solo con los parámetros de movilidad, debido a que con el método estadístico obtuvimos 3 subpoblaciones; mientras que al utilizar un algoritmo de machine learning, donde las coordenadas de las trayectorias sirvieron como entrada para el algoritmo, es un método donde hay mayor precisión en el agrupamiento, por lo que obtuvimos 6 subpoblaciones espermáticas.

En el análisis de las 6 subpoblaciones nos enfocamos en la subpoblación 3 ya que es la que presenta altos valores en VCL en el grupo control, lo anterior es relevante biológicamente debido a que la velocidad es un determinante para obtener éxito en la fertilización (Malo *et al.*, 2006). De manera natural, en la subpoblación 3, tomando en cuenta únicamente el tiempo de incubación observamos que en VCL en el grupo control al tiempo 30 disminuye 17 unidades, es algo que no sucede en las demás subpoblaciones; por lo que marca una diferencia importante entre subpoblaciones, aunque desconocemos el impacto biológico.

En la subpoblación 3 el porcentaje de espermatozoides en el tiempo 0 fue de 12.95, el efecto del triptófano es inmediato aumenta la linealidad en 0.08, 0.04 y 0.05 unidades respectivamente en las primeras tres concentraciones, mientras que disminuyen los valores de VCL en 17.67, 23.01 y 14.01 unidades para las mismas concentraciones. Después de 30 minutos el porcentaje de espermatozoides en la subpoblación 3 fue de 8.43, la subpoblación se vuelve refractaria al efecto del triptófano, ya que la linealidad no se modifica; aunque los valores de VCL disminuyen significativamente en todas las concentraciones.

El triptófano modifica las trayectorias espermáticas. En el grupo control, en ambos tiempos de evaluación, se observaron trayectorias cerradas mientras que en las trayectorias de las concentraciones donde aumentan los valores de LIN (1, 10 y 100 nM) observamos trayectorias abiertas y más rectas. El efecto del triptófano sobre los espermatozoides de la subpoblación 3 podría tener una explicación en la ruta de síntesis que puede seguir el triptófano, debido a que solo el 5% del triptófano es metabolizado a 5-HT y el otro 95% del triptófano es metabolizado por la vía triptófano-quineurenina. La enzima limitante de la formación de quineurenina es la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que se distribuye de forma ubicua en los mamíferos (Oxenkrug, 2010). Por lo tanto, podría depender de la ruta de metabolización del triptófano que otras moléculas estén implicadas en los efectos que observamos en la subpoblación 3 identificada con un algoritmo de ML.

Por otro lado, se reportó que el receptor de andrógenos está implicado en la regulación de TPH1 aunque aún se desconoce el mecanismo de esta regulación (Nakagawa *et al.*, 2016), lo anterior es importante ya que está reportada la localización de la TPH1 en espermatozoides de humano (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012); es decir, podría ser que la TPH1 sea la enzima presente en espermatozoides de cerdo y que esté relacionada con otras señalizaciones a nivel molecular que podrían dar explicación del efecto en la subpoblación 3, la subpoblación más veloz y susceptible a la exposición de diferentes concentraciones de triptófano.

Los valores menores en VCL al tiempo 0 podrían ser un efecto del aumento de la linealidad, lo anterior concuerda con Bravo *et al.*, (2011) estos autores evaluaron el grado de asociación entre los parámetros de movilidad, los espermatozoides más rápidos (contemplando exclusivamente VCL), son también los más vigorosos, pero no progresivos ni lineales, es decir, a menor velocidad mayor linealidad. Al tiempo 30 los valores menores se podrían explicar debido a que el efecto del triptófano va decayendo, ya que no presentan cambios en la linealidad, pero sí disminuye la velocidad; podrían ser otros factores los que regulen este cambio, pero hasta el momento no se tiene ningún reporte donde se explique esta modificación.

La velocidad de la subpoblación 3 en condiciones normales podría tener una explicación biológica por la forma de la cabeza del espermatozoide. Malo *et al.*, (2006) evaluaron la relación entre las diferentes partes del espermatozoide y la velocidad espermática y observaron que los espermatozoides que presentan cabezas largas nadan más rápido. La longitud de la cabeza, así como el tamaño de la pieza principal parecen tener un efecto sobre la rectitud de la trayectoria;

sin embargo, se requieren análisis morfológicos para confirmar lo anterior.

Existía la noción común de que los espermatozoides con trayectorias lineales forman parte de la subpoblación fertilizante (Ferraz *et al.*, 2014); sin embargo, se ha reportado que los parámetros como STR, LIN, BCF y ALH no guardan correlación con la fertilidad (Kathiravan *et al.*, 2011). Además, en otros trabajos se ha sugerido que las trayectorias curvas son las que presentan mayores probabilidades de fertilizar el óvulo (Nagata *et al.*, 2018; Hidalgo *et al.*, 2021). En trabajos anteriores se ha reportado la relación entre los parámetros de movilidad obtenidos con el sistema CASA y la capacidad fertilizante de los eyaculados de diferentes especies (Broekhuijse *et al.*, 2012; Barquero *et al.*, 2021). Actualmente, se ha evaluado la correlación de las trayectorias espermáticas con la fertilidad en espermatozoides de bovino (Nagata *et al.*, 2018), por lo que nuestro resultado y su relación con la fertilidad podría comprobarse en futuros trabajos.

La ventaja que tiene este modelo al usar un algoritmo no supervisado (algoritmo de agrupamiento aglomerativo), es que no necesita la intervención humana para la identificación de los grupos de las trayectorias; ya existían trabajos donde utilizaron machine learning para la clasificación de patrones de movilidad, (Goodson *et al.*, 2011, 2017) a través del uso de Máquinas de soporte vectorial (SVM, en inglés) donde los datos de entrada ya estaban clasificados, generaron una serie de ecuaciones que posteriormente utilizaron para clasificar automáticamente los nuevos datos de entrada. El procedimiento anterior fue aplicado en espermatozoides de ratón y de humano, obtuvieron patrones heterogéneos dentro una misma clasificación. En contraste, en nuestro trabajo obtuvimos resultados precisos y homogéneos dentro de las subpoblaciones obtenidas, de manera similar a lo obtenido por (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2023) cuando evaluaron subpoblaciones espermáticas de cerdo tratados con ketanserina.

En el eyaculado de mamíferos se han reportado varios componentes serotoninérgicos como receptores, enzimas, transportadores, entre otros (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012). Por lo tanto, consideramos que la comunicación serotoninérgica se encuentra relacionada con la movilidad de los espermatozoides de cerdo, debido a que se ha detectado la presencia de serotonina en el tracto reproductor femenino (Nikishin *et al.*, 2018), y por ende, existe la posibilidad de una comunicación bidireccional entre el espermatozoide y los componentes serotoninérgicos presentes naturalmente en su entorno. Sin embargo, en este punto del estudio desconocemos el mecanismo celular/molecular por el que puede verse afectada la movilidad espermática; por otro lado, no existen reportes de la presencia del triptófano en espermatozoides de cerdo.

En otros trabajos se ha descrito el efecto de la 5-HT sobre los valores de movilidad espermática Sakamoto et al., (2021) , determinaron que los agonistas de los receptores 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>4</sub> aumentan la hiperactivación de los espermatozoides de hámster, también encontraron cambios en los valores cinemáticos donde 5-HT<sub>2</sub> disminuyó el valor de VSL y 5-HT<sub>4</sub> disminuyó el valor de ALH. Hasta el momento, no se tiene información de reportes donde se evalúe la exposición de espermatozoides al precursor de 5-HT, por lo que este es uno de los primeros trabajos en evaluar los efectos del triptófano sobre las subpoblaciones basadas en trayectorias identificadas con un algoritmo de machine learning, por lo que puede servir como referencia para futuros estudios.

## Conclusión

La exposición de los espermatozoides de cerdo a diferentes concentraciones de triptófano modifica la estructura de las subpoblaciones cinemáticas, presenta un efecto directo sobre la subpoblación más veloz modificando la linealidad de su trayectoria. Esto indica que la comunicación serotoninérgica tiene un efecto sobre la movilidad espermática a nivel subpoblacional, en donde los espermatozoides de un mismo eyaculado se comportan de manera distinta en respuesta al triptófano. Además la identificación de subpoblaciones utilizando un algoritmo de machine learning proporciona un enfoque preciso del análisis espermático.

## Perspectivas

La comunicación serotoninérgica se encuentra relacionada con la movilidad espermática de los espermatozoides de cerdo, pero aun desconocemos el mecanismo por el que se lleva a cabo esta relación. Aunque observamos una modificación en los parámetros de movilidad y en la trayectoria de una subpoblación de espermatozoides, desconocemos si la TPH se encuentra en los espermatozoides de cerdo. Por lo que se propone para futuros trabajos, ensayos de inmunocitología para la identificación de la TPH en espermatozoides de cerdo.



## Referencias

- Amann RP and Katz DF** (2004) Andrology Lab Corner\*: Reflections on CASA After 25 Years. *Journal of Andrology* **25** 317–325.
- Amann RP and Waberski D** (2014) Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81** 5-17.e1-3.
- Andrews PW, Bosyj C, Brenton L, Green L, Gasser PJ, Lowry CA and Pickel VM** (2022) All the brain's a stage for serotonin: the forgotten story of serotonin diffusion across cell membranes. *Proceedings. Biological Sciences* **289** 20221565.
- Aragón MA** (2016) Uso de los Sistemas Automatizados de Análisis de la Movilidad Espermática (CASA). 178–184.
- Aragón MA and Becerril ML** (2012) El espermatozoide y los marcadores de calidad espermática. In *Avances En Biología de La Reproducción*, Primera, pp 43–60. México.
- Balakrishna P, George S, Hatoum H and Mukherjee S** (2021) Serotonin Pathway in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **22** 1268.
- Barquero V, Roldan ERS, Soler C, Vargas-Leitón B, Sevilla F, Camacho M and Valverde A** (2021) Relationship between Fertility Traits and Kinematics in Clusters of Boar Ejaculates. *Biology* **10** 595.
- Bravo JA, Montanero J, Calero R and Roy TJ** (2011) Relación entre variables subjetivas e informatizadas del movimiento espermático del morueco. *Archivos de Zootecnia* **60** 1087–1094.
- Broekhuijse MLWJ, Šoštarić E, Feitsma H and Gadella BM** (2012) Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* **90** 779–789.
- Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muño R and Mogas T** (2014) Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm–oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology* **81** 1067–1072.
- Frungieri MB, Zitta K, Pignataro OP, Gonzalez-Calvar SI and Calandra RS** (2002) Interactions between Testicular Serotonergic, Catecholaminergic, and Corticotropin-Releasing Hormone Systems Modulating cAMP and Testosterone Production in the Golden Hamster. *Neuroendocrinology* **76** 35–46.
- Fujinoki M, Takei GL and Kon H** (2016) Non-genomic regulation and disruption of spermatozoal in vitro hyperactivation by oviductal hormones. *The Journal of*

- Giaretta E, Munerato M, Yeste M, Galeati G, Spinaci M, Tamanini C, Mari G and Bucci D** (2017) Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Animal Reproduction Science* **176** 11–19.
- Goodson SG, Zhang Z, Tsuruta JK, Wang W and O'Brien DA** (2011) Classification of Mouse Sperm Motility Patterns Using an Automated Multiclass Support Vector Machines Model1. *Biology of Reproduction* **84** 1207–1215.
- Goodson SG, White S, Stevans AM, Bhat S, Kao C-Y, Jaworski S, Marlowe TR, Kohlmeier M, McMillan L, Zeisel SH et al.** (2017) CASAnova: a multiclass support vector machine model for the classification of human sperm motility patterns. *Biology of Reproduction* **97** 698–708.
- Greener JG, Kandathil SM, Moffat L and Jones DT** (2022) A guide to machine learning for biologists. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **23** 40–55.
- Hidalgo MMT, Almeida ABM de, Moraes FLZ de, Marubayashi RYP, Souza FF de, Barreiros TRR and Martins MIM** (2021) Sperm subpopulations influence the pregnancy rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* **56** 1117–1127.
- Husson F, Josse J and Pages J** (2010) Principal component methods - hierarchical clustering - partitional clustering: why would we need to choose for visualizing data? *2010*.
- Jiménez-Trejo F, Tapia-Rodríguez M, Cerbón M, Kuhn DM, Manjarrez-Gutiérrez G, Mendoza-Rodríguez CA and Picazo O** (2012) Evidence of 5-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility. *Reproduction (Cambridge, England)* **144** 677–685.
- Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K and Kadirvel G** (2011) Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System – A Review. *Reproduction in Domestic Animals* **46** 165–172.
- Kumar N and Singh AK** (2021) The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biology of Reproduction* **104** 508–520.
- Leung MR, Zeng J, Wang X, Roelofs MC, Huang W, Zenezini Chiozzi R, Hevler JF, Heck AJR, Dutcher SK, Brown A et al.** (2023) Structural specializations of the sperm tail. *Cell* **186** 2880-2896.e17.
- Mahesh B** (2018) Machine Learning Algorithms - A Review. **9**.
- Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ and Roldan ERS** (2006) Sperm design and sperm function. *Biology Letters* **2** 246–249.

- Martínez-Pastor F** (2022) What is the importance of sperm subpopulations? *Animal Reproduction Science* **246** 106844.
- Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L and de Paz P** (2011) Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* **75** 783–795.
- Méndez Martínez** (2008) Identificación de maracadores serotoninérgicos en espermatozoides de humano: efectos fisiológicos y bioquímicos. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Mohammad-Zadeh LF, Moses L and Gwaltney-Brant SM** (2008) Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **31** 187–199.
- Mortimer ST** (2000) CASA--practical aspects. *Journal of Andrology* **21** 515–524.
- Nagata MPB, Endo K, Ogata K, Yamanaka K, Egashira J, Katafuchi N, Yamanouchi T, Matsuda H, Goto Y, Sakatani M et al.** (2018) Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted bovine spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115** E3087–E3096.
- Nakagawa H, Ueda T, Ito S, Shiraishi T, Taniguchi H, Kayukawa N, Nakanishi H, Ushijima S, Kanazawa M, Nakamura T et al.** (2016) Androgen suppresses testicular cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncotarget* **7** 35224–35232.
- Namratha M and Prajwala TR** (2012) A Comprehensive Overview of Clustering Algorithms in Pattern Recognition. *IOSR Journal of Computer Engineering* **4** 23–30.
- Nikishin DA, Alyoshina NM and Shmukler YB** (2018) Synthesis and Membrane Transport of Serotonin in the Developing Ovarian Follicle of Mouse. *Doklady Biochemistry and Biophysics* **478** 4–7.
- Oxenkrug GF** (2010) Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1199** 1–14.
- Pedrero V, Reynaldos-Grandón K, Ureta-Achurra J, Cortez-Pinto E, Pedrero V, Reynaldos-Grandón K, Ureta-Achurra J and Cortez-Pinto E** (2021) Generalidades del Machine Learning y su aplicación en la gestión sanitaria en Servicios de Urgencia. *Revista Médica de Chile* **149** 248–254.
- R Core Team** (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramón M and Martínez-Pastor F** (2018) Implementation of novel statistical procedures and other advanced approaches to improve analysis of CASA data. *Reproduction, Fertility, and Development* **30** 860–866.

- Ramón M, Martínez-Pastor F, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Jiménez-Rabadán P, Fernández-Santos MR, Bernabéu R and Garde JJ** (2012) Taking advantage of the use of supervised learning methods for characterization of sperm population structure related with freezability in the Iberian red deer. *Theriogenology* **77** 1661–1672.
- Ramón M, Soler AJ, Ortiz JA, García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Roldan ERS and Garde JJ** (2013) Sperm Population Structure and Male Fertility: An Intraspecific Study of Sperm Design and Velocity in Red Deer1. *Biology of Reproduction* **89** 110, 1–7.
- Rivas CU, Ayala ME and Aragón A** (2022) Effect of various pH levels on the sperm kinematic parameters of boars. *South African Journal of Animal Science* **52** 693–704.
- Rodríguez-Martínez EA, Rivas CU, Ayala ME, Blanco-Rodríguez R, Juárez N, Hernandez-Vargas EA and Aragón A** (2023) A new computational approach, based on images trajectories, to identify the subjacent heterogeneity of sperm to the effects of ketanserin. *Cytometry Part A* **n/a**.
- Sakamoto C, Fujinoki M, Kitazawa M and Obayashi S** (2021) Serotonergic signals enhanced hamster sperm hyperactivation. *The Journal of Reproduction and Development* **67** 241–250.
- Shimizu H and Nakayama KI** (2020) Artificial intelligence in oncology. *Cancer Science* **111** 1452–1460.
- Snoeren EMS, Veening JG, Olivier B and Oosting RS** (2014) Serotonin 1A receptors and sexual behavior in male rats: A review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **121** 102–114.
- Sugiyama Y, Fujinoki M and Shibahara H** (2019) Effects of 5-hydroxytryptamine on spermatozoal hyperactivation and in vitro fertilization in mice. *The Journal of Reproduction and Development* **65** 541–550.
- Sutovsky P and Manandhar G** (2006) Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, pp 1–30. Eds C Barratt and CJ De Jonge. Cambridge: Cambridge University Press.
- Teves ME and Roldan ERS** (2022) Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiological Reviews* **102** 7–60.
- Valkenborg D, Rousseau A-J, Geubbelmans M and Burzykowski T** (2023) Unsupervised learning. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics: Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics* **163** 877–882.
- Wang R, Pan W, Jin L, Li Y, Geng Y, Gao C, Chen G, Wang H, Ma D and Liao S** (2019) Artificial intelligence in reproductive medicine. *Reproduction (Cambridge, England)* **158**

R139–R154.

**Wilson-Leedy JG and Ingermann RL** (2007) Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* **67** 661–672.

**Yeste M, Bonet S, Rodríguez-Gil JE and Rivera Del Álamo MM** (2018) Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? *Reproduction, Fertility, and Development* **30** 789–798.

**Zhu T, Gao P, Gao J, Liu X, Jiang H and Zhang X** (2022) The upregulation of tryptophan hydroxylase-2 expression is important for premature ejaculation treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor. *Andrology* **10** 595–603.