

Análisis del nado de espermatozoides de erizo de mar en tres dimensiones ante la presencia de una sustancia quimioatrayente

Alejandra Ochoa, Andrea Ortega, Arianne Lupián, Ana Paula López y
Jorge Luís Hinojosa

colegio@marymount.edu.mx

Resumen

En este proyecto se analizó el nado libre y el nado quimiotáctico del espermatozoide de erizo de mar en 3D a partir de videos obtenidos mediante una cámara de alta velocidad acoplada a un microscopio. Para el nado quimiotáctico se utilizó la sustancia atrayente llamada *Speract*. Esta sustancia contiene químicos específicos similares a los que hay en un óvulo. Nuestro trabajo consistió en rastrear y comparar las trayectorias de los espermatozoides en 3D. El *Speract* modificó el patrón de nado, es decir, la velocidad y la trayectoria del nado del espermatozoide, lo cual pudimos notar después de analizar y comparar los cambios producidos la trayectoria y velocidad de nado tomando como referencia el nado control.

Introducción

El erizo de mar es un invertebrado marino o equinodermo, es decir de piel espinosa, perteneciente al reino *Animalia*. En su cuerpo se presentan escudos calizos que forman un esqueleto y sirve como forma de protección como por ejemplo para repeler depredadores. Viven en costas rocosas y se alimentan con restos orgánicos. La mayor parte del tiempo los erizos están congregados en densas poblaciones y tienen un ciclo de vida largo. Estas especies se encuentran ampliamente distribuidas en las costas del mundo [1], es decir, en todos los fondos marinos. Por ejemplo, en México, los erizos de mar son capturados en Baja California y abundan en distintas épocas del año. Llegan a vivir hasta profundidades de 2500 metros. Existen alrededor de 950 especies. Los erizos tiene dos tipos de reproducción: la sexual y asexual.

La manera en la que se reproducen es que la hembra libere los óvulos y sean fecundados en el agua por los espermatozoides. La fecundación toma lugar en el mar, por lo que, a pesar de que las hembras liberan millones de óvulos, es más probable que ocurra si los erizos se juntan en grandes grupos y sueltan sus células sexuales al mismo tiempo. Durante el proceso de la fecundación, sólo unos cuantos (algunas decenas) logran llegar hasta donde está el óvulo. Cuando los espermatozoides no logran llegar al óvulo, generalmente es debido a una disfunción en su movilidad [2].

Los espermatozoides son de gran interés de estudio porque la comprensión de los mecanismos moleculares que gobiernan su motilidad es significativo dentro de áreas fisiológicas.

Las células sexuales de los erizos son muy comunes para el uso experimental ya que se obtienen con mucha facilidad, poseen una gran similitud morfológica y funcional comparado con los gametos de otros mamíferos (esto a pesar de sus diferencias evolutivas) [3]. Existen muchas técnicas mediante las cuales se pueden obtener los gametos del erizo de mar. Los erizos de mar son estimulados con un compuesto químico el cual actúa directamente sobre las gónadas induciendo la salida de los gametos. Los músculos del erizo se contraen y el semen es expulsado.

El nado de los espermatozoides tanto en agua dulce como en agua salada es de forma helicoidal, es decir, nadan formando espirales; a este nado se le llama nado control. Cuando los espermatozoides nadan bajo el efecto de cierta sustancia quimioatrayente, la cual contiene químicos similares a los presentes en un óvulo, se le conoce como nado quimiotáctico o quimiotaxis. Durante el nado quimiotáctico es espermatozoide es atraído por la sustancia quimioatrayente, cambiando su pH, concentraciones de calcio, propiedades eléctricas y parámetro de nado. El parámetro de nado se refiere al conjunto de características del nado del espermatozoide como la distancia, velocidad y trayectoria.

La importancia del análisis del nado de los espermatozoides en 3D, se debe a que el estudio del comportamiento de las células sexuales podría generar conocimientos aplicables a la salud, como por ejemplo contribuir al desarrollo de fármacos para resolver problemas de infertilidad y podría implicar avances significativos en el campo de la fisiología celular y de la fecundación.

Antecedentes

Se han realizado estudios sobre la motilidad, o capacidad para moverse de manera espontánea e independiente de los espermatozoides en dos dimensiones, haciendo estudios acerca sus trayectorias de nado. Este análisis ha sido importante para saber la capacidad de fertilización que posee el espermatozoide [4]. Sin embargo, llevar un análisis del nado libre de los espermatozoides en 3D es

un proceso muy elaborado debido a la velocidad con la que se mueve (30 a 200 $\mu\text{m}/\text{seg}$)

Actualmente, científicos del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM llevan a cabo el proyecto "Distintas *adenilil* ciclasas modulan la movilidad del espermatozoide de erizo de mar mediando la fosforilación de proteínas", en el cual explican que buscan afectar la movilidad de los espermias de especies acuáticas al ser afectadas por péptidos [4]. Como resultados en esta investigación, se pudo obtener más información acerca del nado de espermatozoides en dos dimensiones. También se obtuvieron parámetros de nado como la velocidad y el número de revoluciones en dos diferentes grupos de espermatozoides expuestos a diferentes superficies. Además se observó que la proximidad de una superficie afecta el comportamiento del espermatozoide.

En el proyecto (*Tracking sperm in three dimensions*) [4] realizado por el Dr. Gabriel Corkidi Blanco, encargado del Laboratorio de Imágenes y Visión por Computadora del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. (UNAM) se utilizó un método que permite el análisis y el seguimiento de espermatozoides en tres dimensiones de las trayectorias del nado libre de éstos (*Figura 1*). En este estudio se prueba que las trayectorias de los espermatozoides en tres dimensiones varían significativamente con aquellas de los espermatozoides en dos dimensiones.

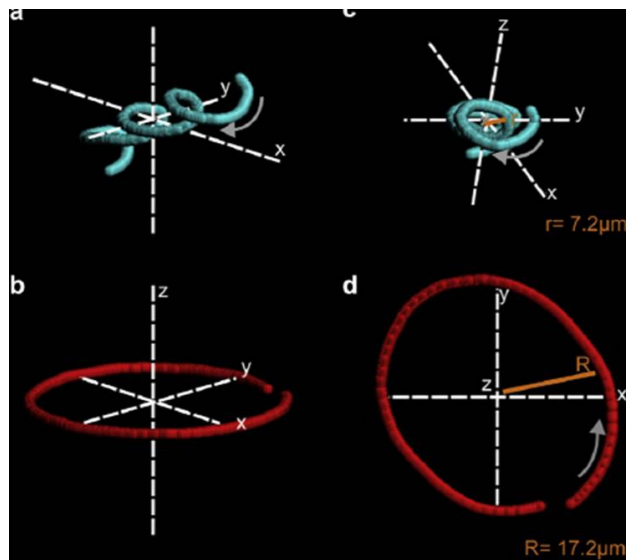


Figura 1. Trayectoria del nado de espermatozoides durante un segundo. a) nado control, b) nado en dos dimensiones, c) nado control en vista helicoidal, d) nado en dos dimensiones visto desde arriba para comparar diámetros.

La observación del nado de los espermatozoides en 3D ha obtenido diferentes resultados a los que se tenían anteriormente en 2D, lo cual significa que

puede ser que los datos obtenidos en 2D no sean del todo exactos. Se necesitará estudiar más el nado de los espermatozoides en 3D para ir completando todos estos espacios que pueden existir en las investigaciones ya hechas en dos dimensiones.

Es un proyecto novedoso ya que anteriormente se han rastreado y analizado las trayectorias que realiza el espermatozoide en dos dimensiones con la sustancia y en tres dimensiones pero nunca se había analizado esto mismo con la sustancia quimioatrayente *Speract*.

Objetivo

General

Hacer una comparación de nado control y quimiotáctico del espermatozoide, en tres dimensiones.

Específicos

1. Obtener un video del nado de espermatozoides mediante una cámara de alta velocidad.
2. Procesar y analizar el video con el fin de extraer las coordenadas.
3. Graficar el nado con las coordenadas obtenidas.
4. Calcular la distancia recorrida en tres dimensiones por cada espermatozoide.
5. Con la distancia obtenida deducir la velocidad de cada espermatozoide.
6. Con los datos elaborados ver si hay diferencias significativas entre el nado control y nado quimiotáctico.

Hipótesis

El parámetro de nado de los espermatozoides de los erizos de mar se ve afectado por la presencia de la sustancia quimioatrayente llamada *Speract*.

Metodología

Materiales

Cajas Petri, agua y espermatozoides de erizo de mar, sustancia quimioatrayente (*Speract*) 0.1% de concentración.

Equipo (instrumentos)

Microscopio invertido *Olympus*(*Figura 2*), equipado para poder adquirir los datos de trayectorias 3D de espermatozoides(*Figura 3*). Cámara de video *Motion Pro* (*Redlake*) de alta velocidad, controlador de dispositivo piezoeléctrico (*Physik Instrument*) con objetivo de larga distancia (*Nikon*), equipo de refrigeración,

regulador de temperatura, programa de análisis de imágenes “*Image Pro*” y computadora personal (*Figura 4*).

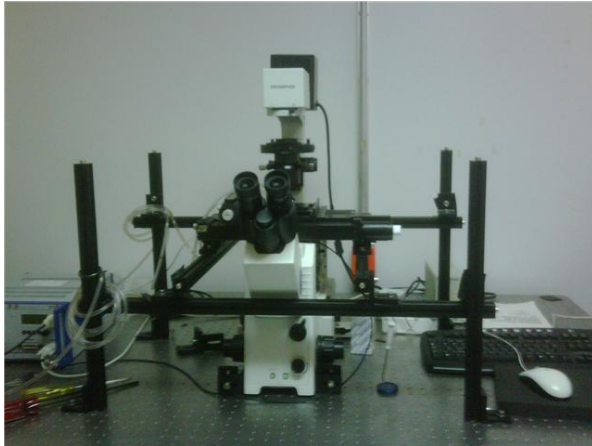


Figura 2. Microscopio inverso *Olympus*.

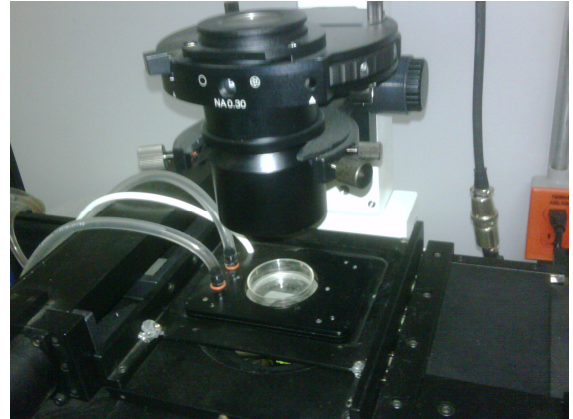


Figura 3. Microscopio inverso *Olympus*



Figura 4. Computadora personal.

Metodología (procedimiento)

Nuestros asesores nos proporcionaron un video de aproximadamente 18,300 cuadros. Este video fue obtenido por medio de una cámara de alta velocidad *Red Lake* que captura 5,000 imágenes por segundo, esta se conectó al microscopio inverso por el cual se observaron los espermatozoides. Este video presenta, en la primera parte, a los espermatozoides en nado control y exactamente en la mitad del video es liberado el *Speract*, por lo cual la segunda parte los espermatozoides presenta un nado quimiotáctico.

Este video lo observamos en la computadora con un programa especial llamado *Image Pro*. De este video obtuvimos 75 secuencias diferentes, con un stack (*Figura 5*) de 244 imágenes cada uno, en la que cada secuencia representa un plano diferente en el eje Z.



Figura 5. Stack de imágenes.

El microscopio está equipado con un dispositivo piezoeléctrico (de cristal de cuarzo), montado en el objetivo del microscopio, el cual sirvió para poder adquirir imágenes de diferentes planos focales debido a que este dispositivo tarda en regresar al mismo foco 67 cuadros y con esto se obtuvieron los datos en tres dimensiones de la muestra de los espermatozoides. Al cristal de cuarzo se le aplicó un voltaje, causando que éste se dilatara. Esto quiere decir que el material piezoeléctrico convirtió la energía eléctrica en otro tipo de energía en que se manifiesta como una fuerza mecánica. La lente del microscopio se mueve (sube y baja) a una velocidad muy rápida para poder ver muchos planos focales, en donde en cada plano se observaron imágenes de los espermatozoides. Para tener las secuencias pusimos como condición que del número de cuadro en el que comenzara se saltara 67 cuadros y así consecutivamente. Por ejemplo, empezamos en el cuadro uno y se siguió al cuadro 68, luego al cuadro 135, etc.

Ya obtenidas las 75 secuencias del video, escogimos un video al azar. Observamos el video cuidadosamente y seleccionamos un espermatozoide que se mantuviera en foco, es decir que no se viera muy borroso, el mayor tiempo posible. Empezamos en el cuadro en donde aparece el espermatozoide en foco, pusimos el cursor en el centro del espermatozoide y en una barra en el borde inferior de la ventana aparecían las coordenadas (X, Y,). Para Z era el número de secuencia, el cual indica la altura del espermatozoide. Fuimos tomando las coordenadas del espermatozoide cada cuatro cuadros, hasta que se terminara el video. Cuando el espermatozoide se salía de foco en ese video; abríamos dos videos antes y dos videos después, veíamos el mismo cuadro y seleccionamos el

video en el cual el espermatozoide de los cinco videos estaba más en foco. Este procedimiento lo hicimos con cinco espermatozoides.

Con las coordenadas que obtuvimos graficamos el nado del espermatozoide para poder ver la alteración en su nado.

Diseño experimental

Variables dependientes

Las variables dependientes son los elementos que conforman el nado de los espermatozoides. Estos incluyen su trayectoria característica y su velocidad de movimiento. De acuerdo a nuestra hipótesis éstos están en función de la presencia de la sustancia quimioatrayente que se introduce.

La cantidad concentrada de espermatozoides puede afectar la trayectoria de éstos, ya que cuando hay muchos juntos tienden a armonizar, a nadar en una forma parecida.

Variables independientes

La presencia de la sustancia quimioatrayente *Speract* que afectará el comportamiento de los espermatozoides.

Análisis-procedimiento

Se midieron las coordenadas (X,Y) y el eje Z fue analizado mediante las secuencias. Con la cámara de alta velocidad se pudieron recrear cuadros de video.

El programa utilizado, "*Image Pro*", el cual es un *software* de manipulación de imágenes, ayudó a realizar el análisis de las trayectorias de los gametos (*Figura 6*). Este programa usa umbrales para destacar la imagen. Los umbrales se usan para resaltar la imagen deseada, en este caso se destacaron los espermatozoides y se hizo una recreación del nado.

Una vez que se obtuvieron las trayectorias de las muestras utilizadas a través de las coordenadas, se observa y analiza el comportamiento general de los gametos y así se pudo establecer si la trayectoria fue modificada.

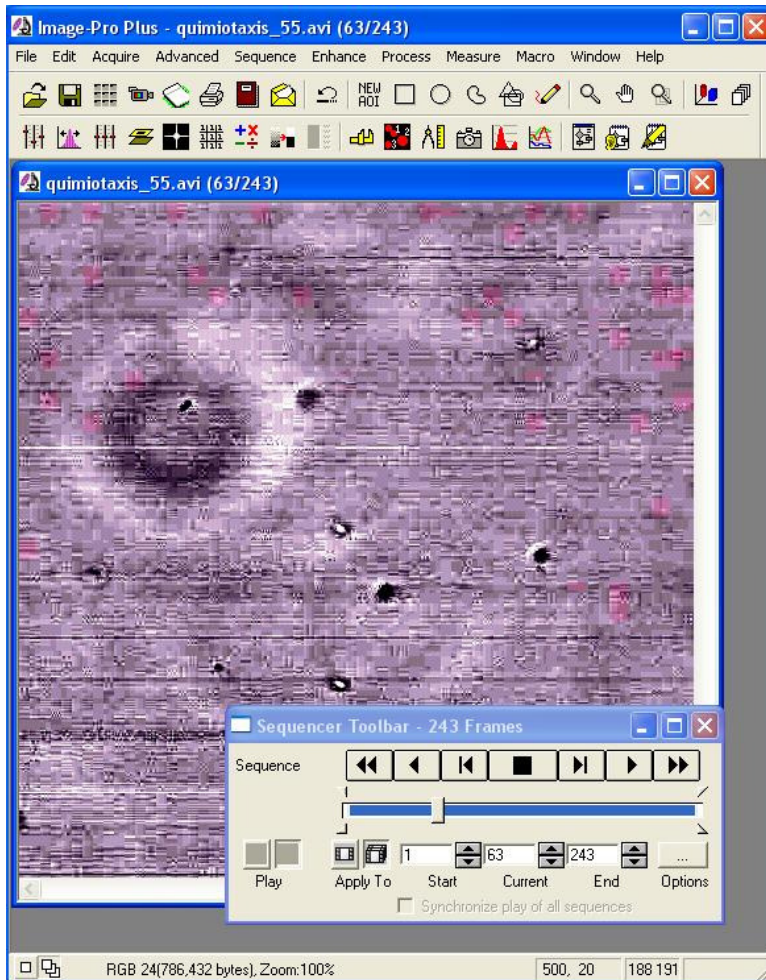


Figura 6. Ventana de *Image Pro* usando umbrales.

Resultados

Se analizaron las gráficas que se muestran a continuación. Cada gráfica representa la trayectoria de un espermatozoide diferente, algunos ante la presencia de la sustancia quimiotáctica, otros sin la presencia y otros con y sin el *Speract*. En algunos de los casos la trayectoria del espermatozoide se vio claramente afectada ante la presencia del quimioatrayente *Speract* y en el resto se pueden comparar entre ellos para ver la alteración del nado.

En las figuras:

El color azul representa el nado libre o control del espermatozoide.

El color rojo representa el nado quimiotáctico del espermatozoide.

Para analizar los resultados se hicieron seis gráficas en tres dimensiones que demuestran la trayectoria recorrida por cada uno de los espermatozoides

analizados. Así mismo para cada espermatozoide se hizo una tabla que muestra las coordenadas, la distancia en tres dimensiones y la velocidad.

En el espermatozoide 1 (*figura 6*) se muestra el nado quimiotáctico (en color rojo) se observa un aumento en la distancia recorrida y por lo tanto un aumento en la velocidad que recorrió el espermatozoide analizado. También se puede observar un cambio en la trayectoria, se puede ver que su posición disminuye en y y en z y aumenta en x, lo cual indica un cambio en su dirección.

La tabla 1 (ver anexo) demuestra el aumento de la distancia y esto se puede observar a partir de la posición del objeto número 10.

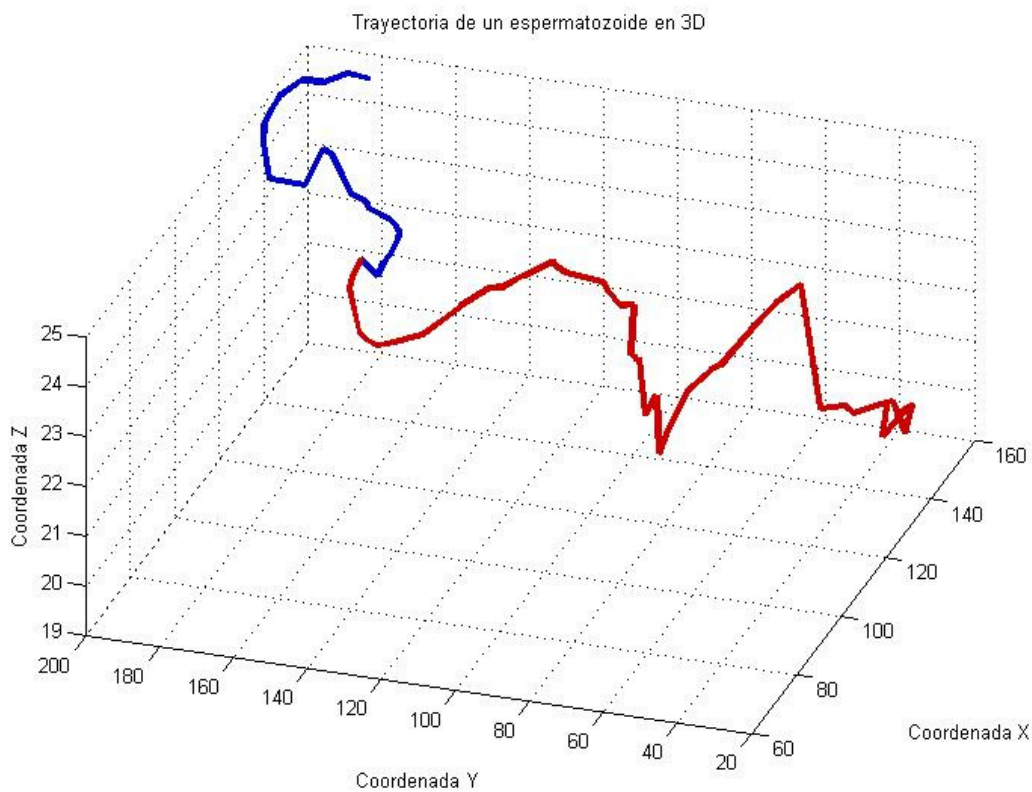


Figura 6. Gráfica de la trayectoria en 3D del espermatozoide 1.

En el espermatozoide 2 (figura 7) se muestra el nado control, y el nado quimiotáctico. En el momento en el que se libera la sustancia quimioatrayente (en color rojo) se observa un aumento en la distancia recorrida. Además de que su trayectoria cambia disminuyendo sus coordenadas en x y en z.

La tabla 2 (ver anexo) demuestra el aumento de la distancia y esto se puede observar a partir de la posición del objeto número 16 .

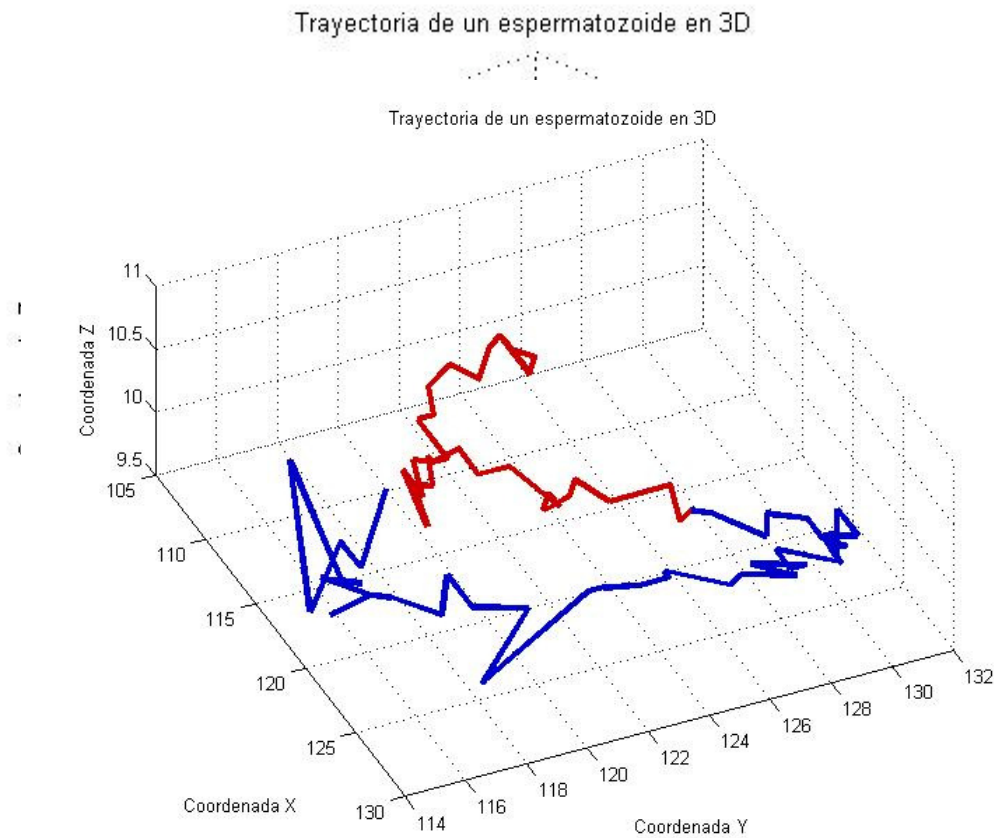


Figura 7. Gráfica de la trayectoria en 3D del espermatozoide 2.

En el espermatozoide 3 (*figura 8*) se muestra el nado control (en color azul). No se muestra ningún cambio de velocidad debido a que no se liberó la sustancia quimioatrayente *Speract* en ese segmento del video. Sin embargo, se puede observar que su trayectoria es, efectivamente, helicoidal

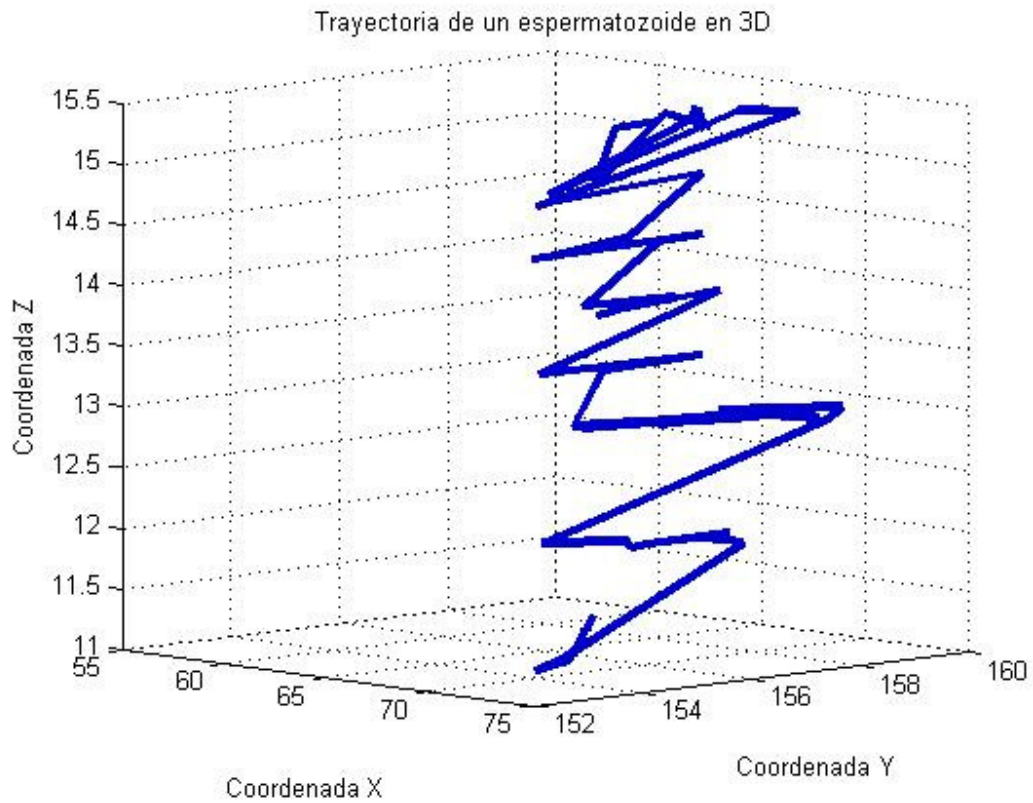


Figura 8. Gráfica de la trayectoria en 3D del espermatozoide 3.

En el espermatozoide 4 (*figura 9*) se muestra el nado quimiotáctico (en color rojo) se observa un aumento en la distancia recorrida y por lo tanto un aumento en la velocidad que recorrió el espermatozoide analizado. También que se puede observar que su trayectoria es ahora aumentando sus coordenadas en los ejes x, y y.

La tabla 4(ver anexo) demuestra el aumento de la distancia y esto se puede observar a partir de la posición del objeto número 23.

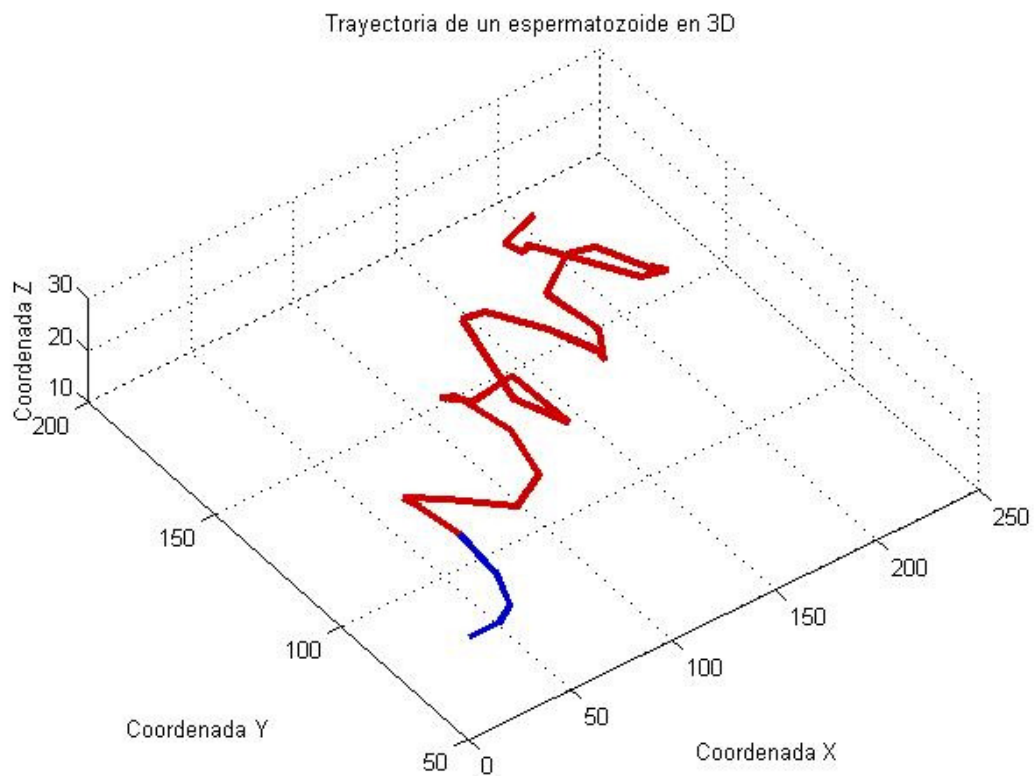


Figura 9. Gráfica de la trayectoria en 3D del espermatozoide 4

En el espermatozoide 5 (figura 10) se muestra el nado quimiotáctico (en color rojo) se observa un aumento en la distancia recorrida respecto al nado control del espermatozoide 3 (figura 8) y por lo tanto un aumento en la velocidad que recorrió el espermatozoide analizado.

La tabla 5 (ver anexo) demuestra el aumento de la distancia y esto se puede observar a partir de la posición del objeto número 44.

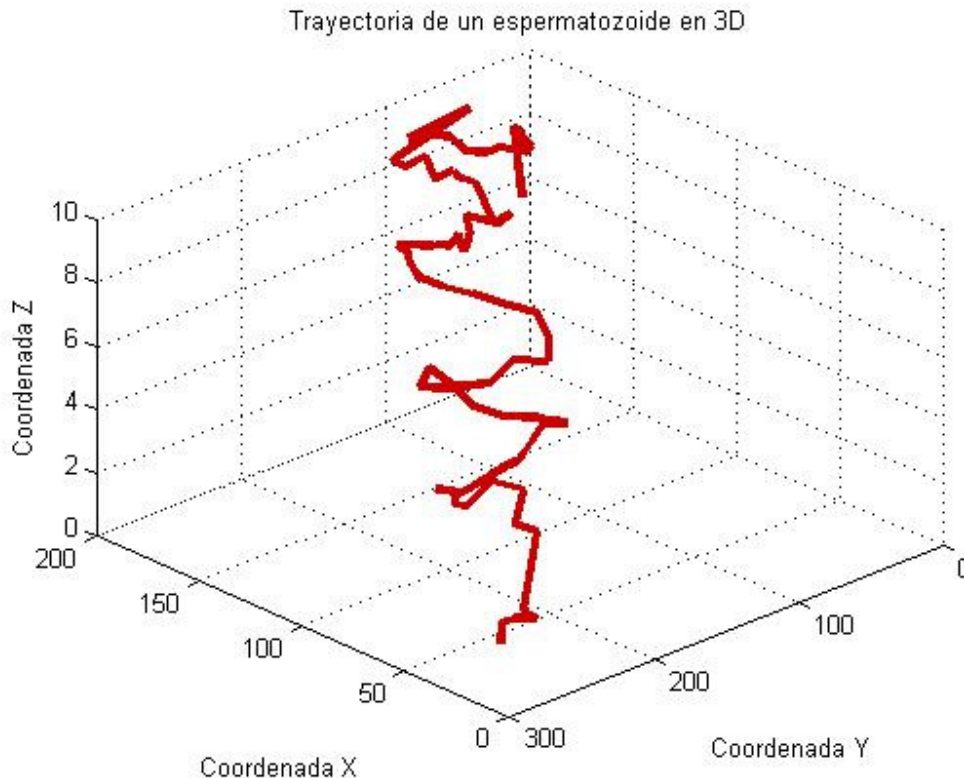


Figura 10. Grafica de la trayectoria en 3D del espermatozoide 5.

En todas las gráficas se observó que tanto en el nado control como el quimiotáctico el espermatozoide nadó en forma helicoidal, dando vueltas como una hélice. Sin embargo en el momento que se colocó la sustancia quimioatrayente *Speract*, los desplazamientos del espermatozoide fueron más prolongados con una gran separación entre cada giro, la velocidad aumentó así como la distancia recorrida en tres dimensiones.

Conclusión

El parámetro del nado de los espermatozoides de erizo de mar sí resultó afectado con la presencia del *Speract*, su velocidad aumentó y su trayectoria cambió. Al medirse los parámetros de nado se pudo observar que la distancia y la velocidad en tres dimensiones aumentan cuando se libera la sustancia quimioatrayente *Speract*, además de cambiar su dirección.

Esto demuestra que el espermatozoide reacciona al detectar al óvulo, lo cual es un aporte al conocimiento sobre la fisiología celular de los espermatozoides, lo cual podría servir para realizar muchos avances en el área de la salud (infertilidad, anticonceptivos, etc.).

Reconocimientos:

Asesores:

Dr. Gabriel Corkidi
Dr. Alfonso Rojas Domínguez
Instituto de Biotecnología, UNAM

Profesor responsable:

Dr. Enrique Galindo

Referencias

[1] Calva, L. (2002). Hábitos alimenticios de algunos equinodermos, parte 2. Erizos de mar y pepinos de mar. Laboratorio de Ecosistemas Costeros, Depto. Hidrobiología D.C.B.S UAM-1, pp.54, 55.

Disponible en: <http://www.izt.uam.mx/contactos/n47ne/2eqno.pdf> [consultado el: 9 de febrero de 2009].

[2] Gutiérrez, R. (2007). Analizan cómo funciona el espermatozoide, El Universal, Proyecto UNAM, Cultura, E13. pp.1

[3] López-Godínez, J., Ramírez-López, M., Morales-González, D. Martínez-Cadena M. G. y García-Soto, J. (2005). Participación de una proteína Rho cinasa en la reacción acrosomal del espermatozoide de erizo de mar. Instituto de Investigación en Biología Experimental. Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. pp. 1.

Disponible en: http://www.smb.org.mx/Memorias_Bioener2005/Posters/C51.pdf [consultado el: 3 de marzo de 2009].

[4] Corkidi G., Taboada B., Wood C.D., Guerrero A., Darszon A., (2008). Tracking sperm in three dimensions. BBRC Biochemical and Biophysical Research Communications, 373: 125–129

Anexos

Distancia recorrida por el esperma #1 en tres dimensiones					
posición	x	y	z	dist. en 3D(μm)	velocidad (μm/seg)
1	291	243	17		
2	291	240	16	3.16	3952.50
3	289	250	15	10.25	12808.75
4	291	255	16	5.48	6846.25
5	301	253	15	10.25	12808.75
6	307	259	15	8.49	10606.25
7	308	265	15	6.02	7528.75
8	322	282	15	22.02	27527.50
9	325	290	15	8.54	10680.00
10	308	299	15	15.91	19881.25
11	295	315	15	20.62	25768.75
12	275	332	15	26.25	32810.00
13	256	329	15	19.24	24043.75
14	232	319	15	26.00	32500.00
15	208	312	15	25.00	31250.00
16	181	303	15	28.46	35575.62
17	166	308	14	15.81	19764.24
18	157	321	13	15.81	19764.24
19	175	343	13	28.43	35531.68
20	187	372	12	31.38	39230.89
21	185	398	12	26.08	32596.01
22	193	416	12	19.70	24622.14
23	205	431	12	19.21	24011.72
24	209	419	13	12.65	15811.39
25	191	406	12	22.20	27754.50
26	174	399	11	18.38	22980.97
27	149	393	11	25.71	32137.40
28	133	371	11	27.20	34003.68

Tabla 1.

Distancia recorrida por el esperma #2 en tres dimensiones					
posición	x	y	z	dist. en 3D(μm)	velocidad (μm/seg)
1	305	358	50		
2	306	370	50	12.04	15051.99
3	299	379	50	11.40	14252.19
4	298	390	50	11.05	13806.70
5	286	395	50	13.00	16250.00
6	277	394	50	9.06	11319.23
7	267	392	50	10.20	12747.55
8	256	386	50	12.53	15662.46
9	249	378	49	10.68	13346.35
10	249	368	49	10.00	12500.00
11	249	359	49	9.00	11250.00
12	257	354	50	9.49	11858.54
13	254	347	50	7.62	9519.72
14	247	333	49	15.68	19605.48
15	244	323	49	10.44	13050.38
16	240	319	49	5.66	7071.07
17	237	310	49	9.49	11858.54
18	235	305	49	5.39	6731.46
19	232	300	49	5.83	7288.69
20	229	296	49	5.00	6250.00
21	225	294	49	4.47	5590.17
22	216	292	49	9.22	11524.43
23	208	292	49	8.00	10000.00
24	200	290	49	8.25	10307.76
25	193	295	50	8.66	10825.32
26	182	293	50	11.18	13975.42
27	174	290	50	8.54	10680.00
28	163	278	49	16.31	20386.88
29	159	271	49	8.06	10077.82
30	156	261	49	10.44	13050.38
31	160	257	49	5.66	7071.07
32	167	246	49	13.04	16298.01
33	180	241	49	13.93	17410.49
34	188	238	49	8.54	10680.00
35	202	231	49	15.65	19565.59
36	204	224	49	7.28	9100.14
37	213	219	49	10.30	12869.54
38	224	210	49	14.21	17765.84
39	221	206	49	5.00	6250.00
40	218	199	49	7.62	9519.72
41	217	189	49	10.05	12562.34

Tabla 2.

Distancia recorrida por el esperma #3 en tres dimensiones						
posición	x	y	z	dist. en 3D(μm)	velocidad (μm/seg)	
1	501	312	34			
2	493	308	34	8.94	11180.34	
3	492	296	35	12.08	15103.81	
4	480	284	36	17.00	21250.00	
5	461	266	36	26.17	32715.63	
6	440	248	36	27.66	34573.29	
7	412	242	36	28.64	35794.55	
8	375	249	36	37.66	47070.43	
9	345	244	36	30.41	38017.27	
10	339	221	36	23.77	29712.16	
11	334	193	34	28.51	35641.44	
12	304	175	34	34.99	43732.14	
13	271	183	34	33.96	42444.82	
14	258	186	34	13.34	16677.08	
15	244	175	34	17.80	22255.62	
16	243	135	34	40.01	50015.62	
17	218	113	34	33.30	41627.06	
18	187	115	34	31.06	38830.56	
19	170	131	34	23.35	29181.54	
20	162	139	34	11.31	14142.14	
21	175	119	36	23.94	29921.77	
22	167	85	35	34.94	43678.51	
23	147	72	35	23.85	29817.15	
24	127	93	34	29.02	36271.55	
25	133	122	34	29.61	37017.73	
26	136	142	34	20.22	25279.69	
27	143	162	34	21.19	26487.03	
28	146	161	34	3.16	3952.85	

Tabla 3.

Distancia recorrida por el espermatozoide #4 en tres dimensiones

posición	x	y	z	dist. en 3D(μm)	velocidad (μm/seg)
1	244	232	22		
2	245	230	21	2.45	3061.86
3	241	230	21	4.00	5000.00
4	241	228	20	2.24	2795.08
5	237	228	22	4.47	5590.17
6	238	231	20	3.74	4677.07
7	239	232	20	1.41	1767.77
8	237	230	20	2.83	3535.53
9	241	232	20	4.47	5590.17
10	242	229	20	3.16	3952.85
11	241	232	20	3.16	3952.85
12	242	233	20	1.41	1767.77
13	246	235	20	4.47	5590.17
14	241	237	20	5.39	6731.46
15	246	237	20	5.00	6250.00
16	248	240	20	3.61	4506.94
17	248	237	19	3.16	3952.85
18	248	244	20	7.07	8838.83
19	248	245	20	1.00	1250.00
20	249	247	20	2.24	2795.08
21	249	249	20	2.00	2500.00
22	248	249	20	1.00	1250.00
23	252	252	20	5.00	6250.00
24	251	253	20	1.41	1767.77
25	253	256	20	3.61	4506.94
26	250	254	20	3.61	4506.94
27	252	257	20	3.61	4506.94
28	252	256	20	1.00	1250.00
29	249	256	20	3.00	3750.00
30	253	259	20	5.00	6250.00
31	251	259	20	2.00	2500.00
32	252	259	20	1.00	1250.00
33	251	259	20	1.00	1250.00
34	251	260	20	1.00	1250.00
35	249	259	20	2.24	2795.08
36	249	260	20	1.00	1250.00
37	250	259	20	1.41	1767.77
38	252	259	20	2.00	2500.00
39	246	261	20	6.32	7905.69
40	250	261	20	4.00	5000.00
41	249	259	20	2.24	2795.08
42	246	259	20	3.00	3750.00

43	244	257	20	2.83	3535.53
44	247	256	20	3.16	3952.85
45	242	254	20	5.39	6731.46
46	241	253	20	1.41	1767.77
47	242	252	20	1.41	1767.77
48	237	253	20	5.10	6373.77
49	237	249	20	4.00	5000.00
50	233	248	20	4.12	5153.88
51	235	247	20	2.24	2795.08
52	236	245	20	2.24	2795.08
53	234	246	20	2.24	2795.08
54	236	246	20	2.00	2500.00
55	229	245	20	7.07	8838.83
56	229	243	20	2.00	2500.00
57	229	243	20	0.00	0.00
58	227	243	20	2.00	2500.00
59	227	243	20	0.00	0.00
60	225	243	20	2.00	2500.00
61	226	241	20	2.24	2795.08
62	225	241	20	1.00	1250.00
63	229	240	20	4.12	5153.88
64	229	240	20	0.00	0.00
65	228	239	20	1.41	1767.77
66	234	238	20	6.08	7603.45
67	226	239	20	8.06	10077.82
68	230	239	20	4.00	5000.00
69	225	240	20	5.10	6373.77
70	226	241	20	1.41	1767.77
71	226	242	20	1.00	1250.00
72	220	242	20	6.00	7500.00
73	220	243	20	1.00	1250.00
74	216	244	20	4.12	5153.88
75	214	246	20	2.83	3535.53
76	217	247	20	3.16	3952.85
77	213	249	20	4.47	5590.17
78	212	250	20	1.41	1767.77
79	213	250	20	1.00	1250.00
80	218	250	20	5.00	6250.00
81	216	251	20	2.24	2795.08
82	214	250	20	2.24	2795.08

Tabla 4.

Distancia recorrida por el esperma #5 en tres dimensiones					
posición	x	y	z	dist. en 3D(μm)	velocidad (μm/seg)
1	141	312	31		
2	142	310	31	2.24	2795.08
3	140	310	30	2.24	2795.08
4	139	313	31	3.32	4145.78
5	146	312	31	7.07	8838.83
6	139	314	31	7.28	9100.14
7	140	314	31	1.00	1250.00
8	141	308	30	6.16	7705.52
9	141	315	31	7.07	8838.83
10	144	316	31	3.16	3952.85
11	145	306	30	10.10	12624.38
12	140	314	30	9.43	11792.48
13	138	312	29	3.00	3750.00
14	142	307	29	6.40	8003.91
15	140	314	29	7.28	9100.14
16	141	312	29	2.24	2795.08
17	139	310	28	3.00	3750.00
18	140	313	28	3.16	3952.85
19	141	311	28	2.24	2795.08
20	143	309	28	2.83	3535.53
21	139	315	28	7.21	9013.88
22	144	312	28	5.83	7288.69
23	140	308	27	5.74	7180.70
24	140	314	27	6.00	7500.00
25	141	310	27	4.12	5153.88
26	138	310	26	3.16	3952.85
27	140	313	26	3.61	4506.94
28	139	310	26	3.16	3952.85
29	140	312	26	2.24	2795.08
30	141	315	26	3.16	3952.85
31	141	312	26	3.00	3750.00
32	143	314	26	2.83	3535.53
33	143	316	26	2.00	2500.00
34	142	316	26	1.00	1250.00
35	141	317	26	1.41	1767.77
36	146	316	26	5.10	6373.77
37	139	315	26	7.07	8838.83
38	143	318	26	5.00	6250.00
39	147	316	26	4.47	5590.17
40	135	310	24	13.56	16955.82
41	138	312	24	3.61	4506.94
42	141	311	24	3.16	3952.85
43	140	312	24	1.41	1767.77

44	140	315	24	3.00	3750.00
45	140	314	24	1.00	1250.00
46	144	314	24	4.00	5000.00
47	134	311	22	10.63	13287.68
48	137	309	22	3.61	4506.94
49	135	311	22	2.83	3535.53
50	119	318	22	17.46	21830.31

Tabla 5.