

QUIMIOTAXIS

Un mecanismo para
orientar el movimiento
del espermatozoide
hacia el óvulo en
mamíferos.



Dr. Héctor Alejandro Guidobaldi

Investigador Asistente (CONICET)

Profesor Asistente (UNC)

Centro de Biología Celular y Molecular

FCEFyN - UNC

Taxismos

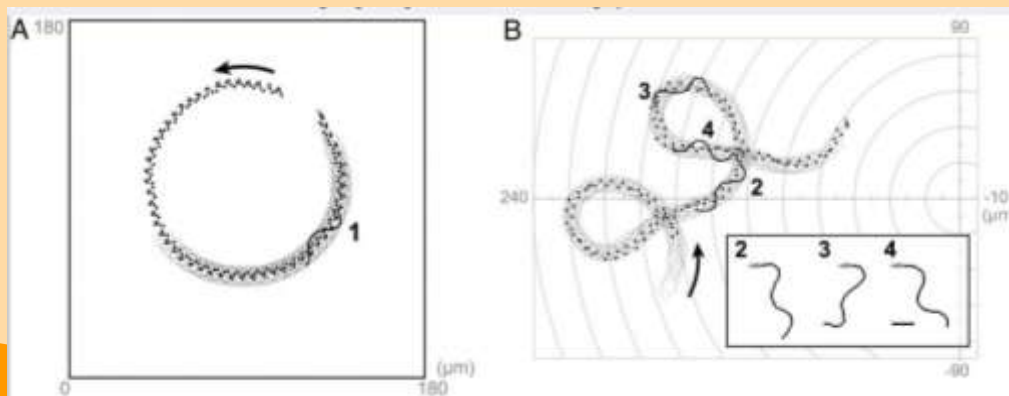
Es la orientación del movimiento hacia una fuente de un estímulo físico o químico

- | | | |
|---------------------|---|--------------|
| ○ Temperatura | > | Termotaxis |
| ○ Luz | > | Fototaxis |
| ○ Gravedad | > | Geotaxis |
| ○ Campo eléctrico | > | Electrotaxis |
| ○ Compuesto químico | > | Quimiotaxis |

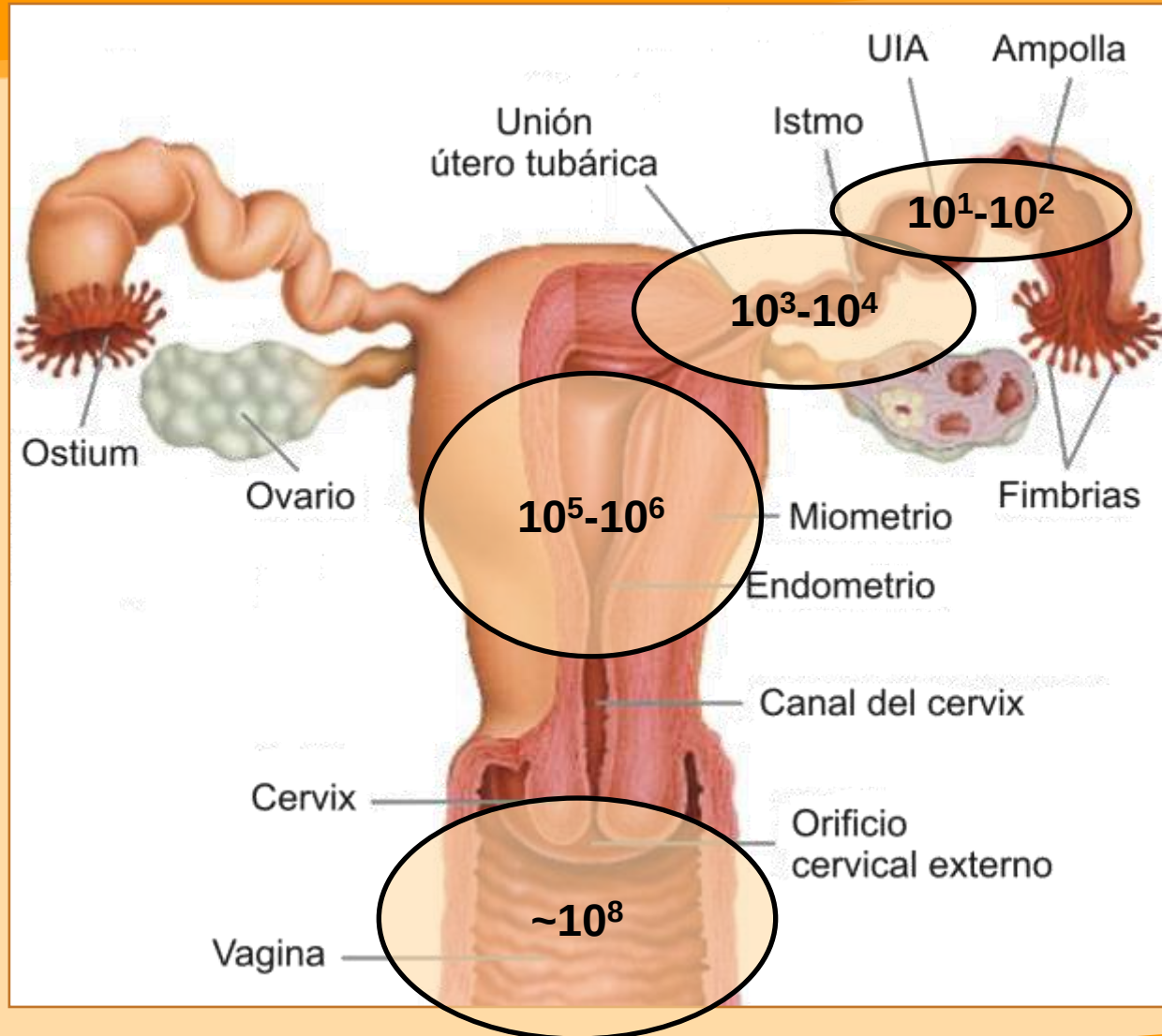


Quimiotaxis en organismos de fertilización externa

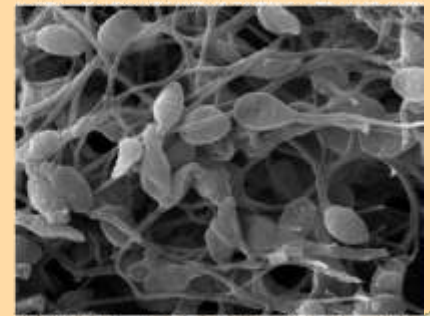
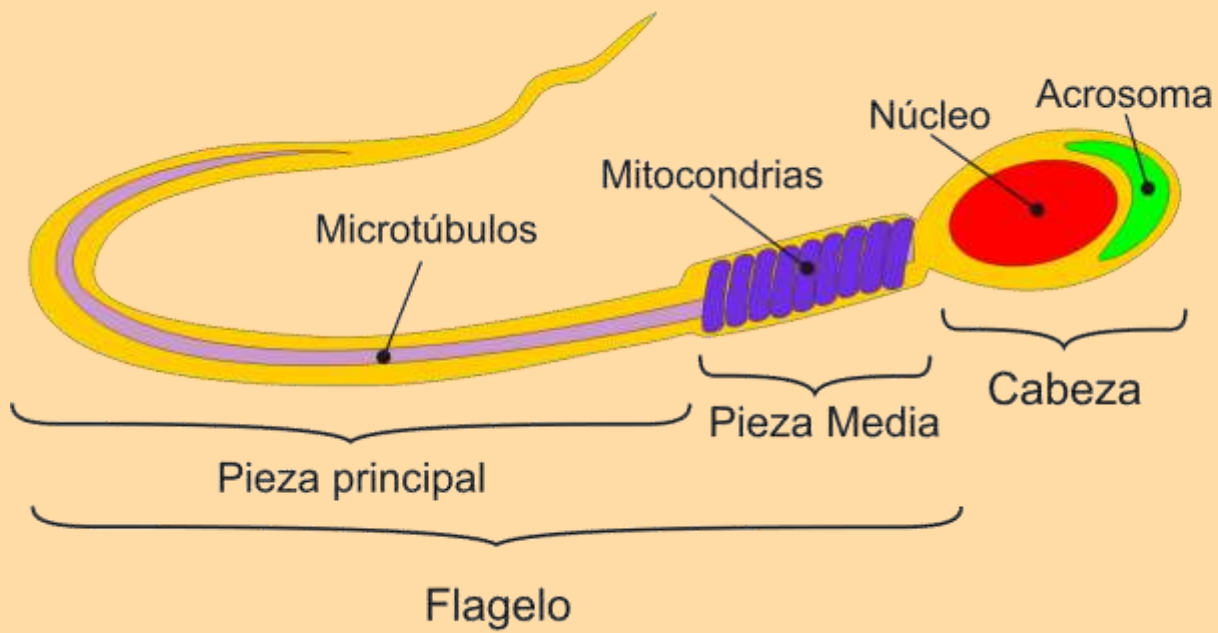
- Invertebrados marinos
 - Rol fundamental
 - Barrera interespecífica
 - Muy estudiado



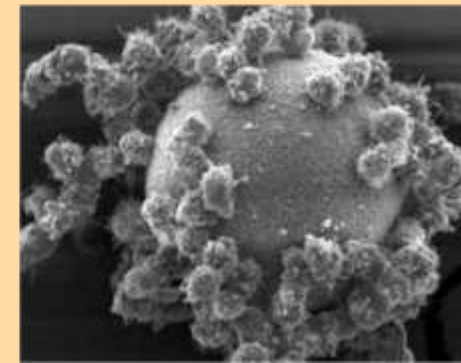
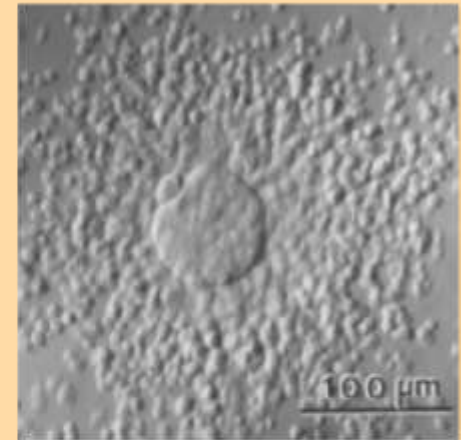
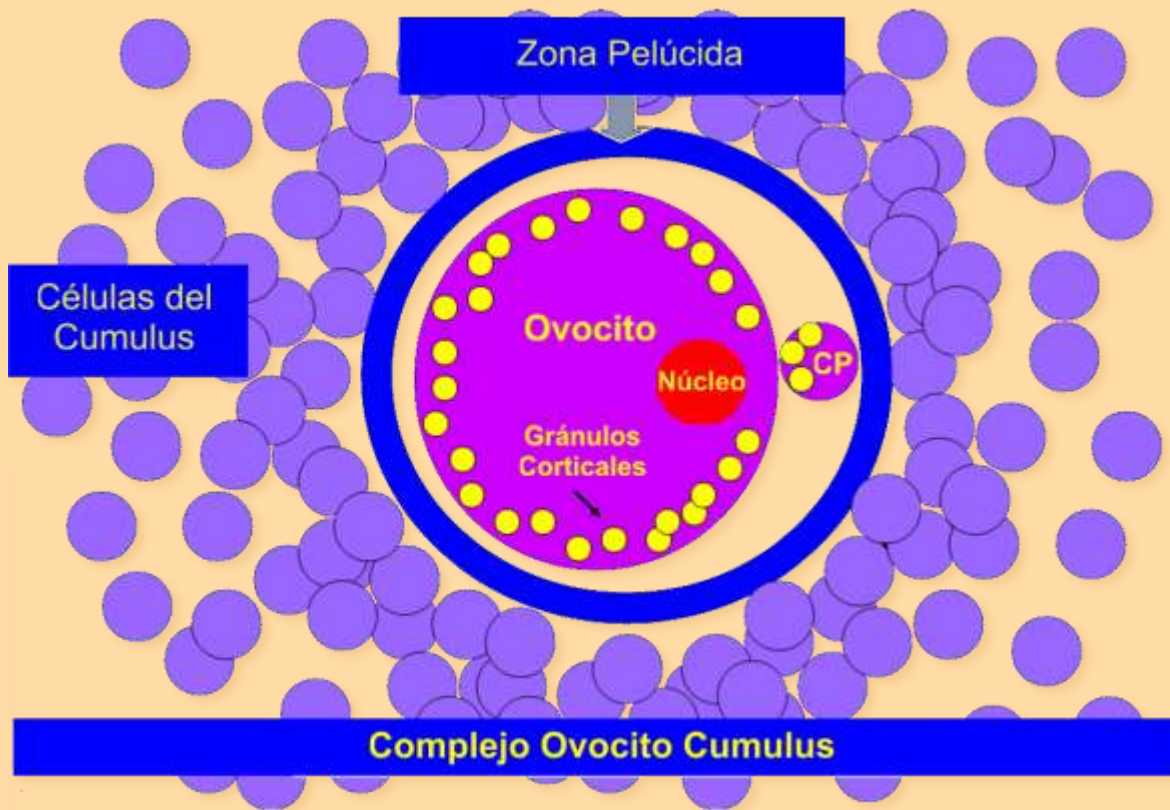
¿y en los organismos de fertilización interna?



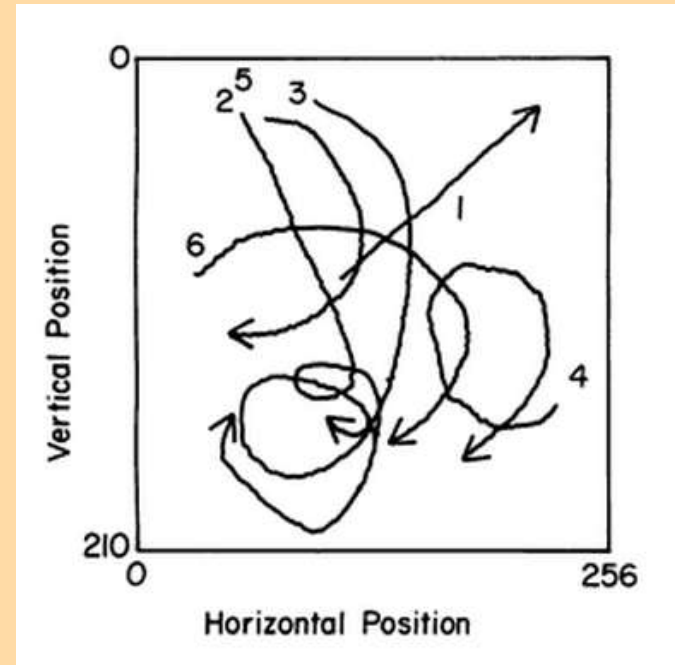
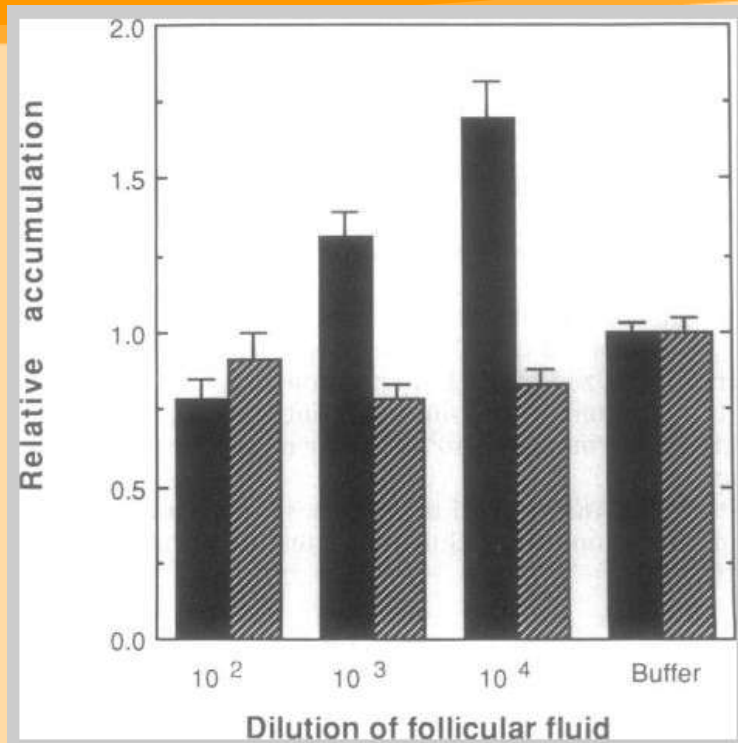
El espermatozoide



El complejo Ovocito-Cumulus



Primeros estudios sobre quimiotaxis en mamíferos...

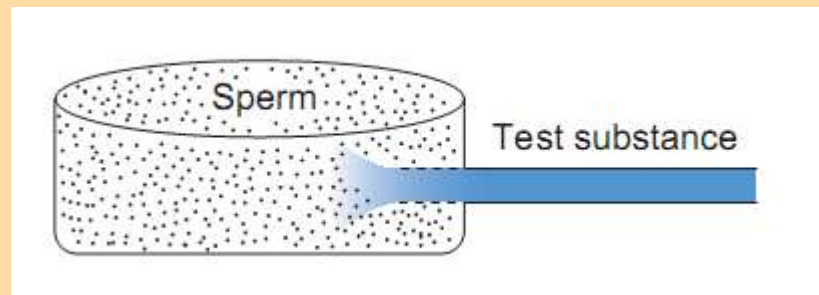
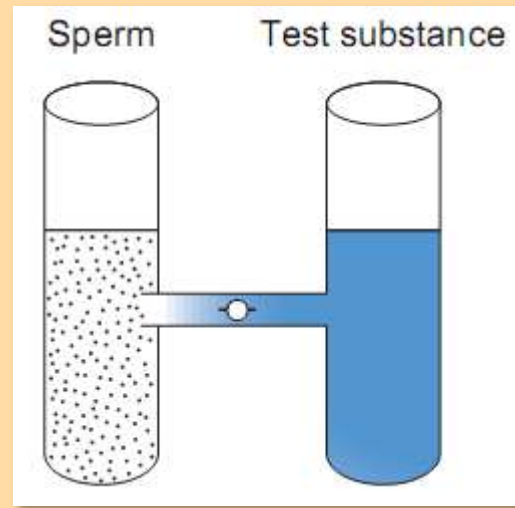
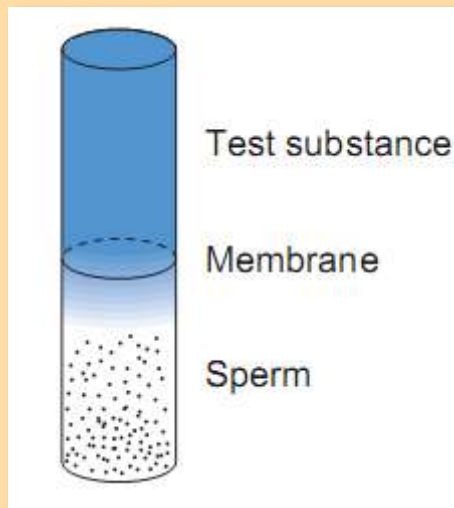


Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability.

Ralt et al., PNAS. 1991, 88(7):2840-4.



... sin embargo estas técnicas miden acumulación celular

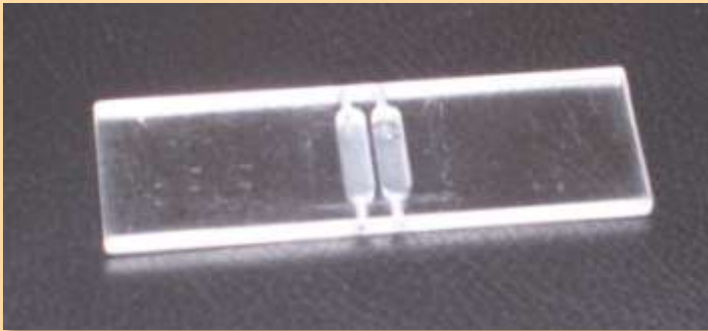


1. Quimiotaxis
2. Quimiocinesis
3. Trapping

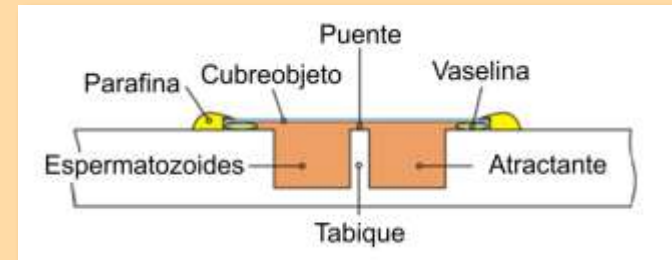


¿Cómo podemos evaluar solamente quimiotaxis?

Seguimiento celular (tracking)



Cámara de quimiotaxis



Esquema de una cámara de quimiotaxis armada

Formación de gradiente

Medio de cultivo
+
Atractante

Medio de cultivo

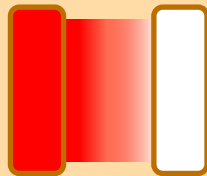
Gradiente
unidimensional

● Atractante

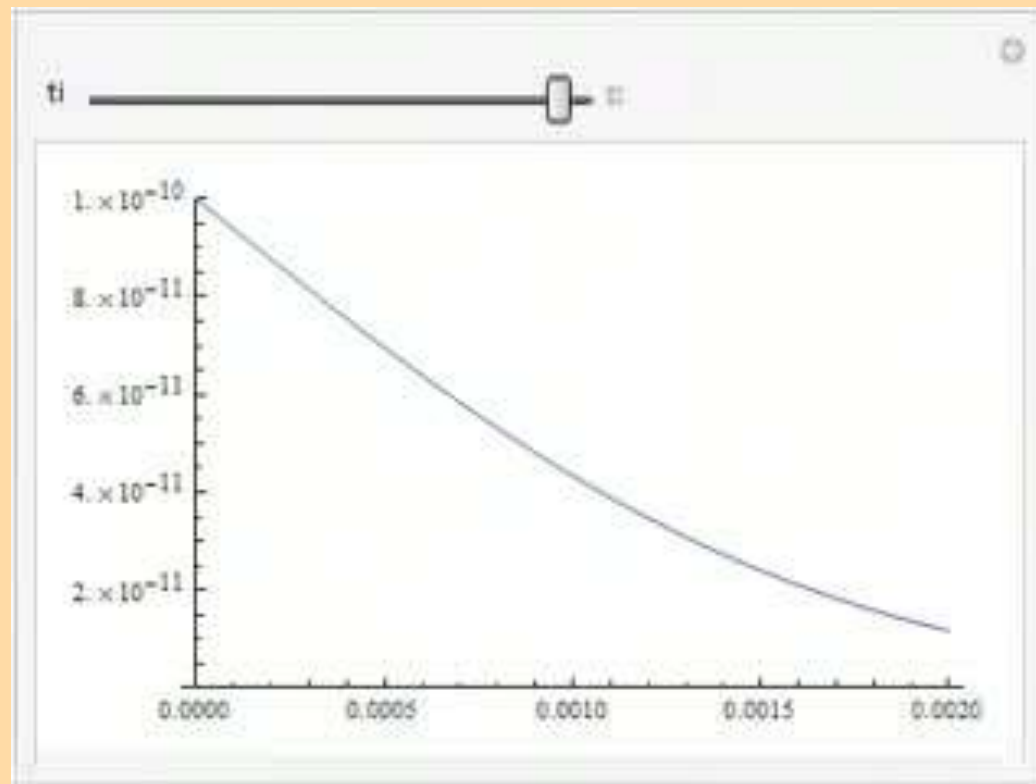


Formación de gradiente...

Resolución de la ecuación de Flick para 1 dimensión

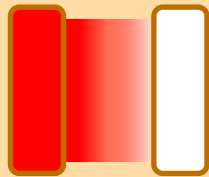


$$n(x, t) = n(0) \operatorname{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right)$$

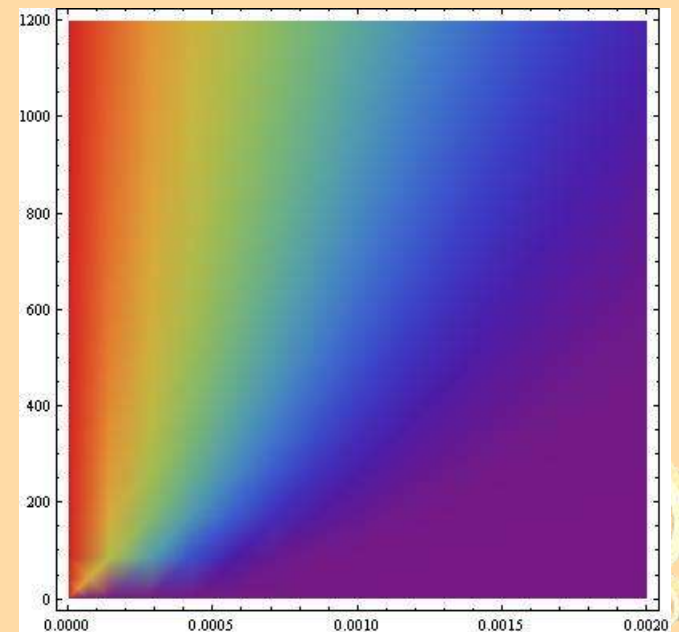
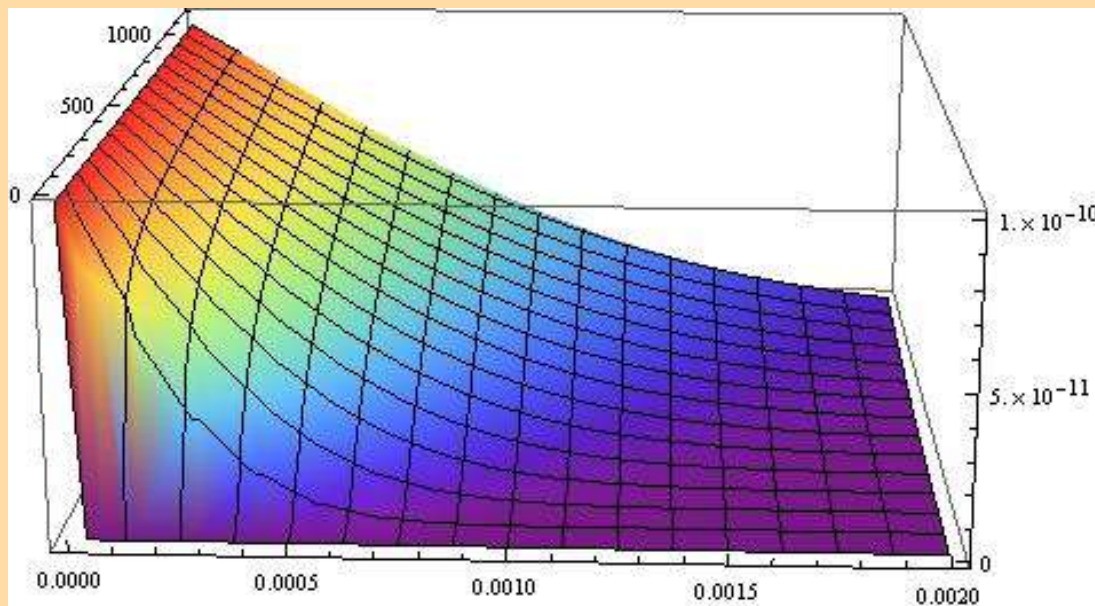


Formación de gradiente...

Resolución de la ecuación de Flick para 1 dimensión

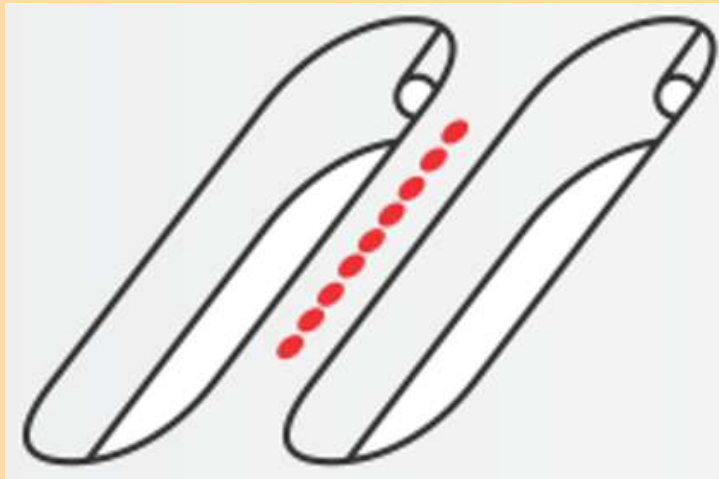


$$n(x, t) = n(0) \operatorname{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right)$$



Ensayo de quimiotaxis

Condiciones experimentales



Tiempo de espera

15 min.

Ubicación en el puente

medio

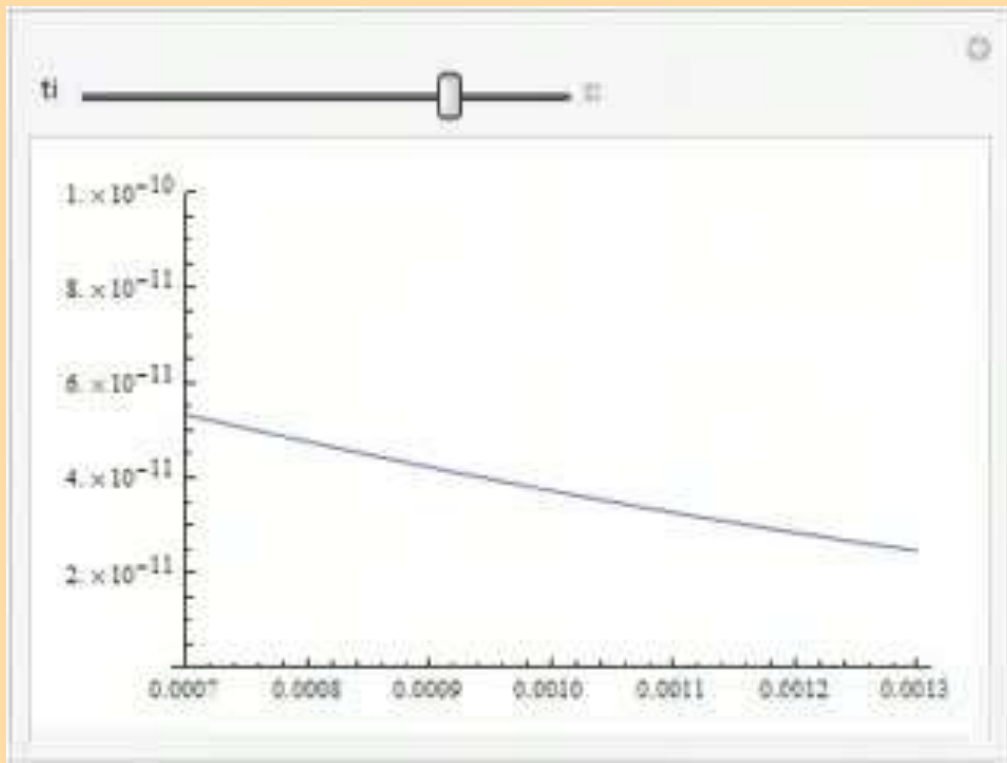
Filmación por

5 minutos



Formación de gradiente...

Condiciones experimentales

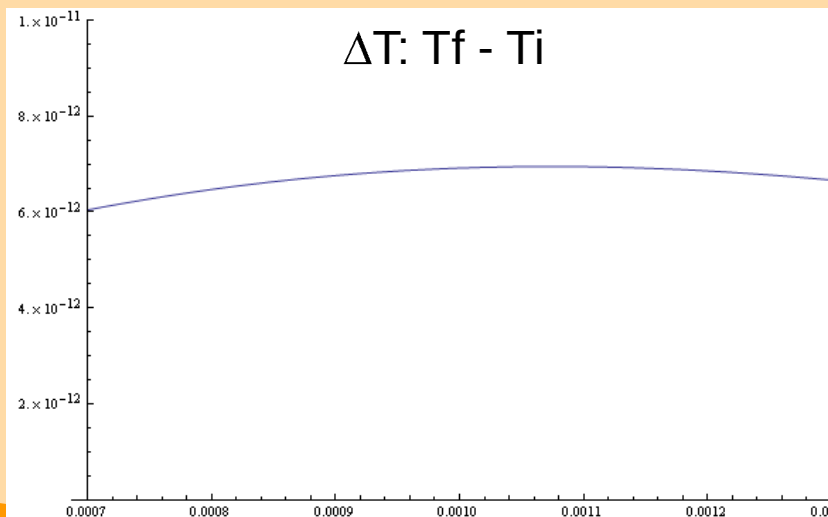
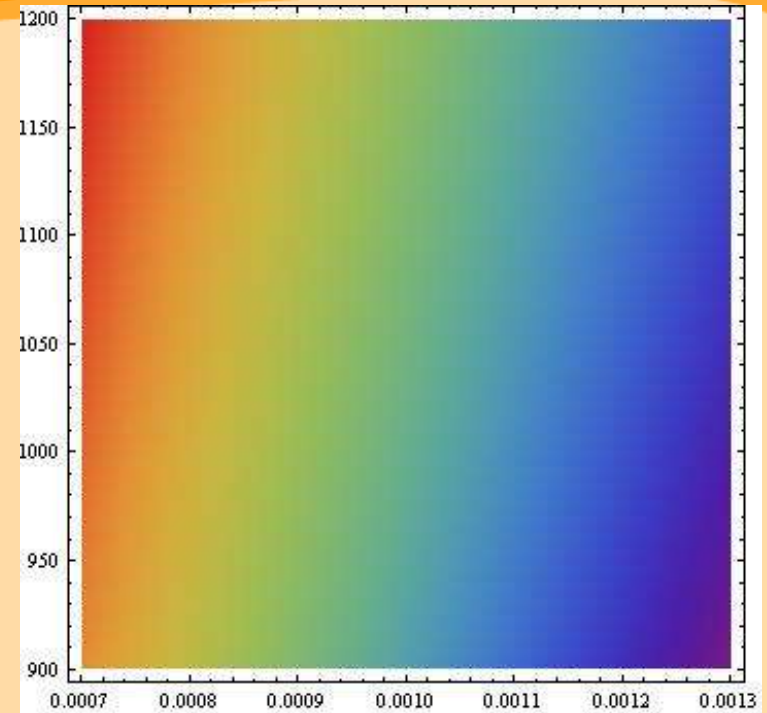
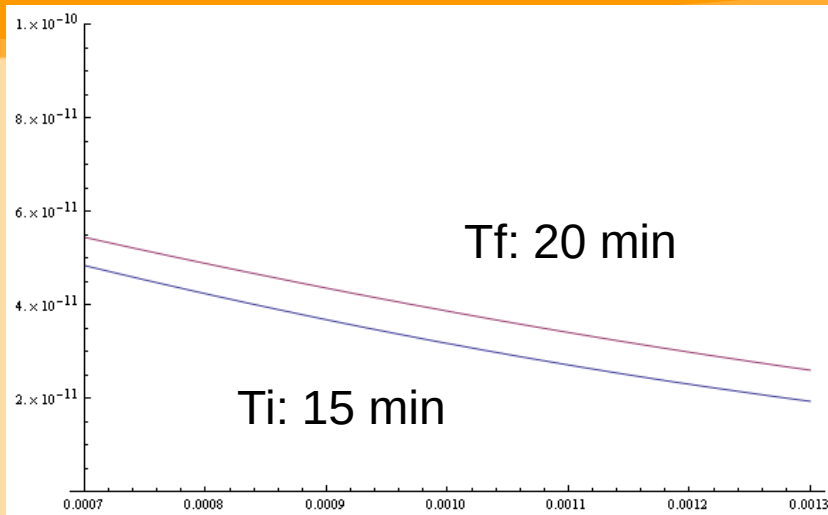


Tiempo de espera
15 min.

Ubicación en el puente
medio

Filmación por 5
minutos

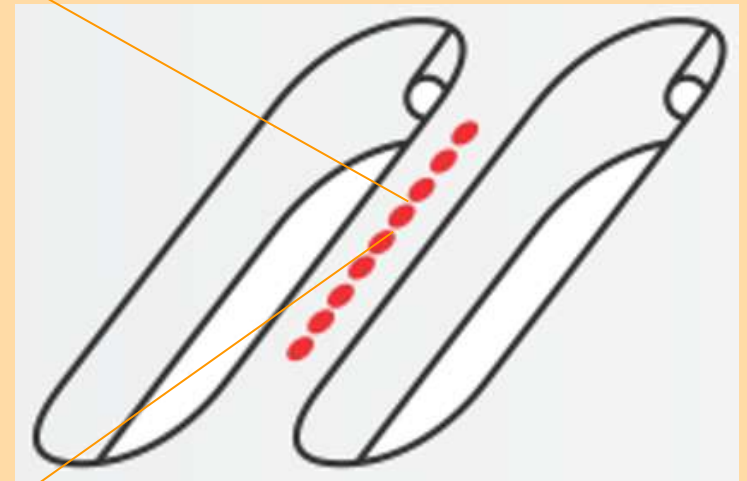
Formación de gradiente...



Gradiente “estable”

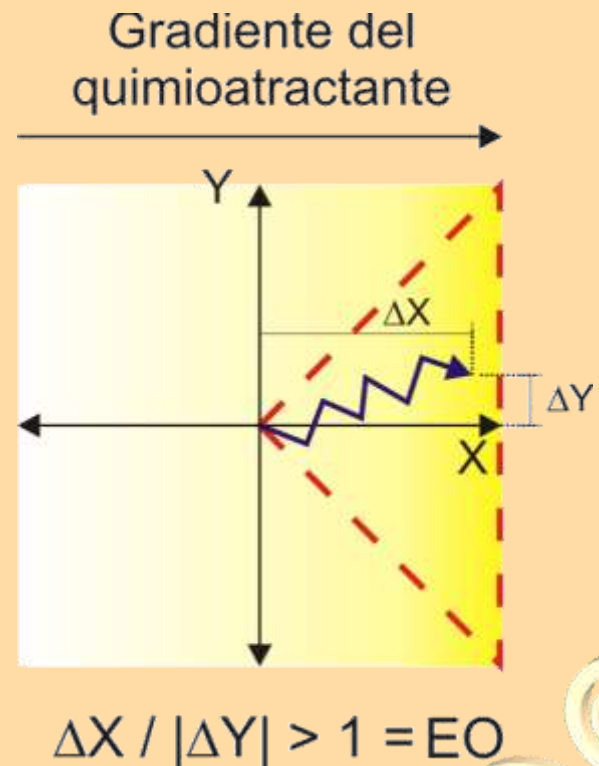
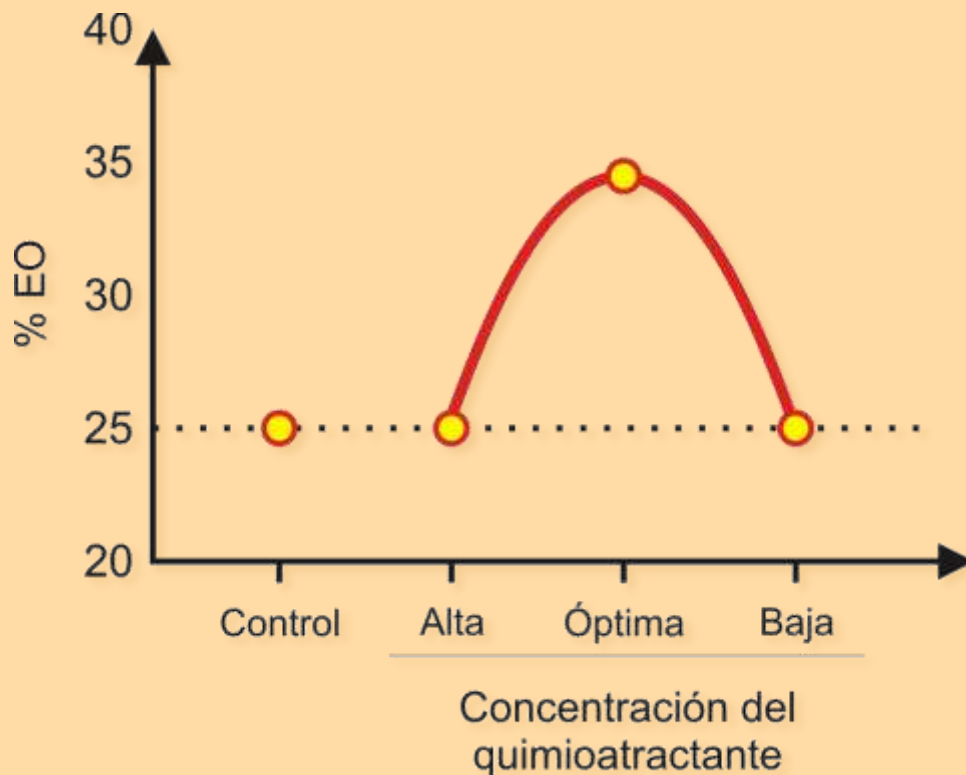
¿Qué evaluamos?

Analisis de las trayectorias



¿Qué evaluamos?

Analisis de las trayectorias



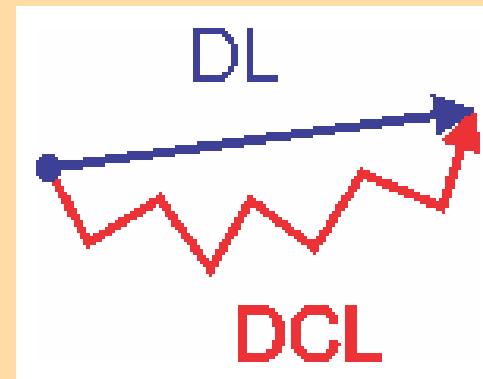
¿Qué evaluamos?

Otros parámetros: Quimiocinesis

Velocidad Curvilineal
y Lineal

$$VCL = DCL / \Delta t$$

$$VL = DL / \Delta t$$



¿Qué evaluamos?

Otros parámetros: Hiperactivación



Dimensión
Fractal

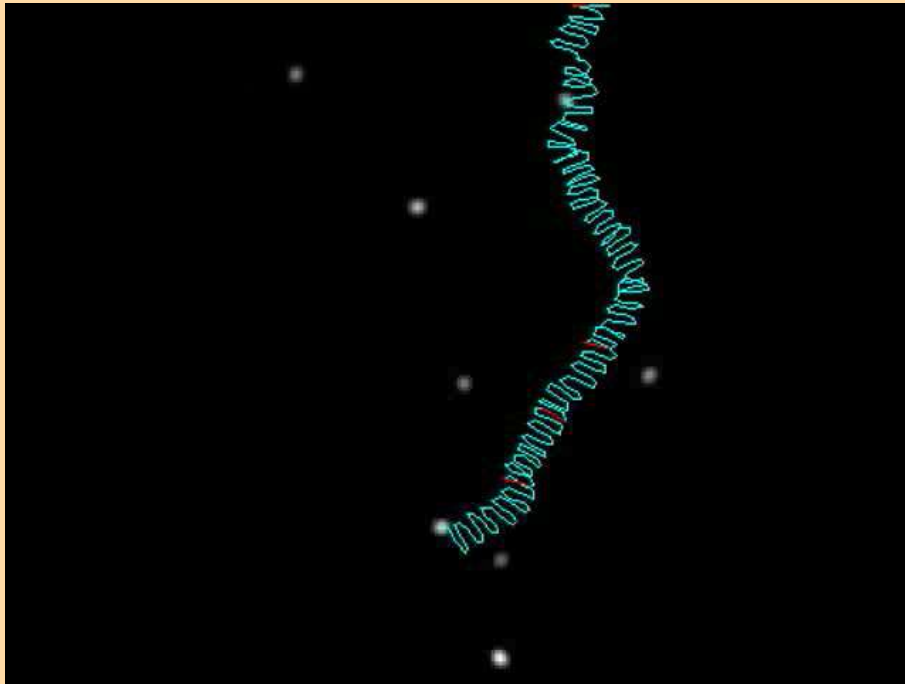
$$DF = \frac{\log(n)}{\log(n) \left(\frac{DL}{DCL} \right)}$$

Lineal: $DF < 1,3$



¿Qué evaluamos?

Otros parámetros: Hiperactivación



Dimensión
Fractal

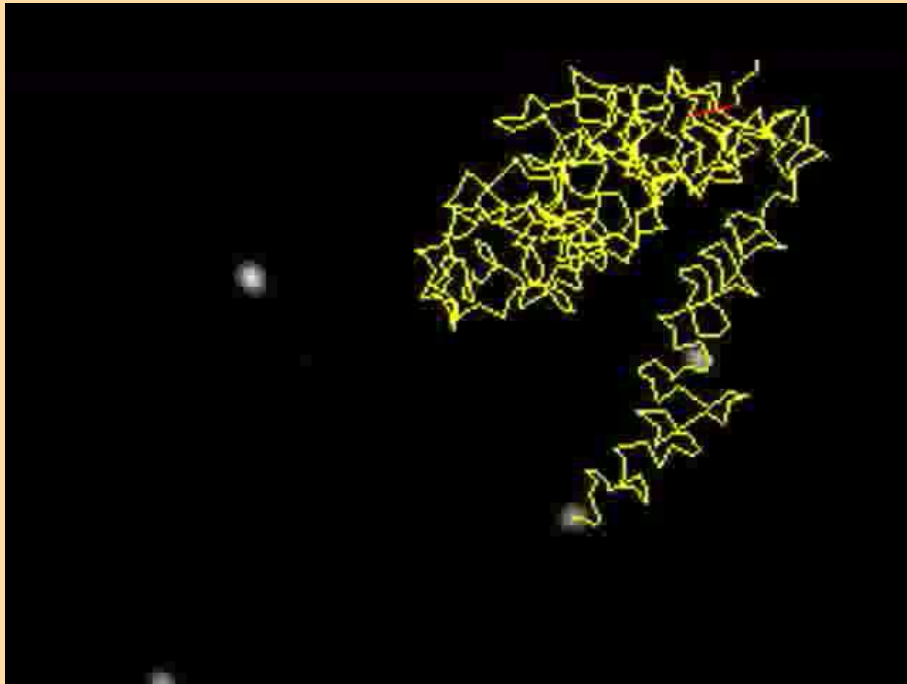
$$DF = \frac{\log(n)}{\log(n) \left(\frac{DL}{DCL} \right)}$$

Transicional: $1,3 < DF < 1,8$



¿Qué evaluamos?

Otros parámetros: Hiperactivación



Dimensión
Fractal

$$DF = \frac{\log(n)}{\log(n) + \log\left(\frac{DL}{DCL}\right)}$$

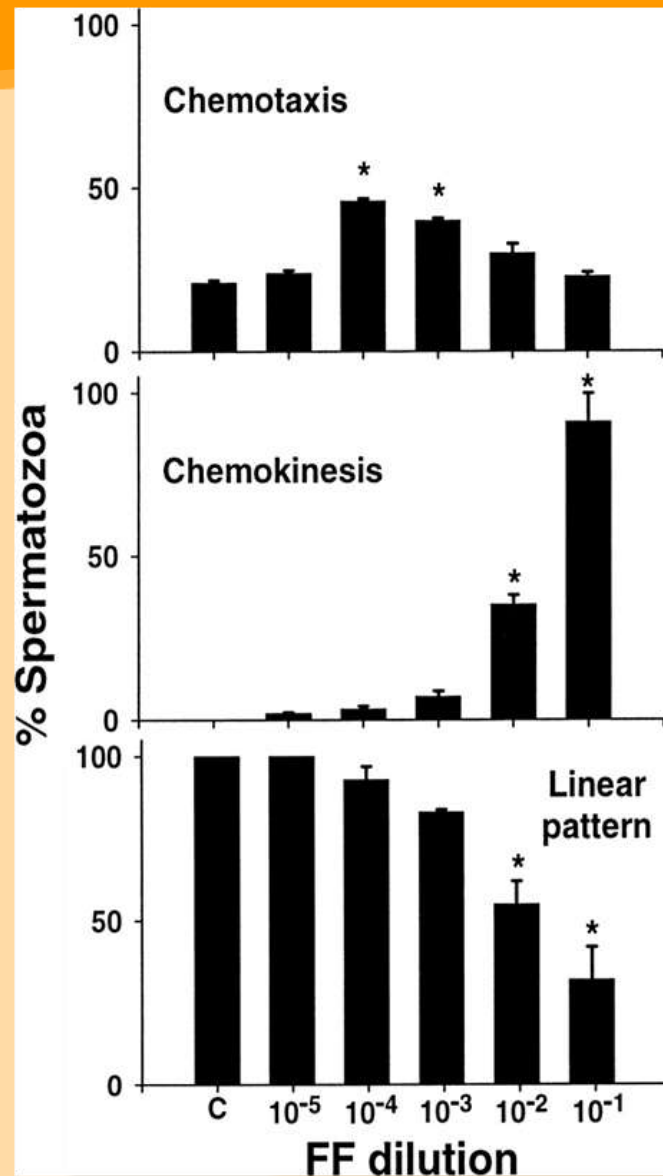
Hiperactivado: $1,8 < DF$



Primeros resultados con fluidos fisiológicos...

Chemotaxis of Capacitated Rabbit Spermatozoa to Follicular Fluid Revealed by a Novel Directionality-Based Assay

Fabro et al., Biol Reprod. 2002.
67(5):1565-71



En la búsqueda de la identidad del quimioattractante...

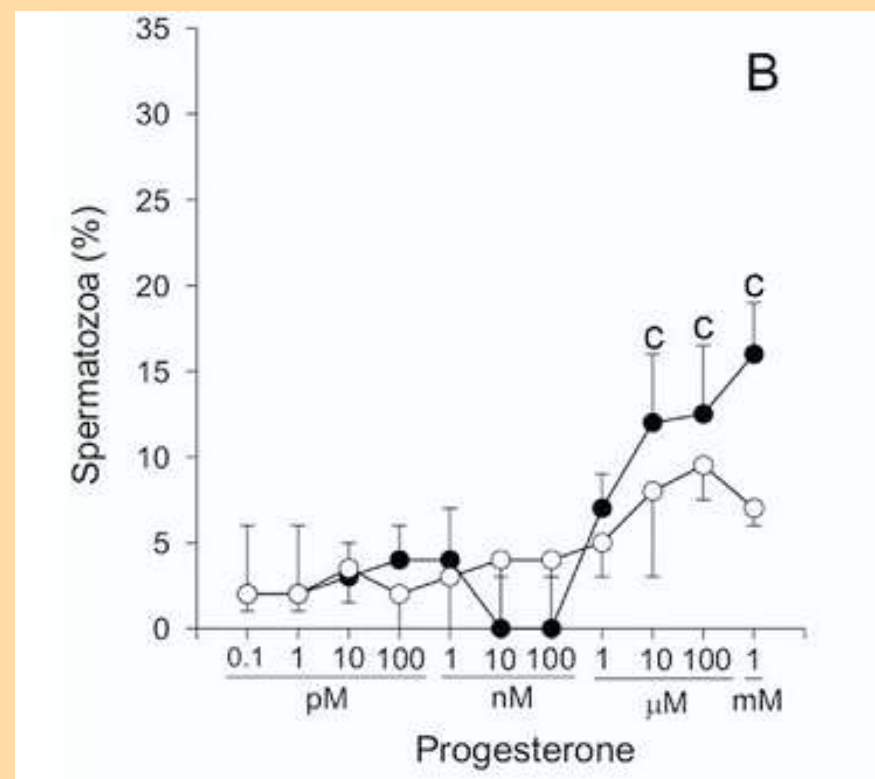
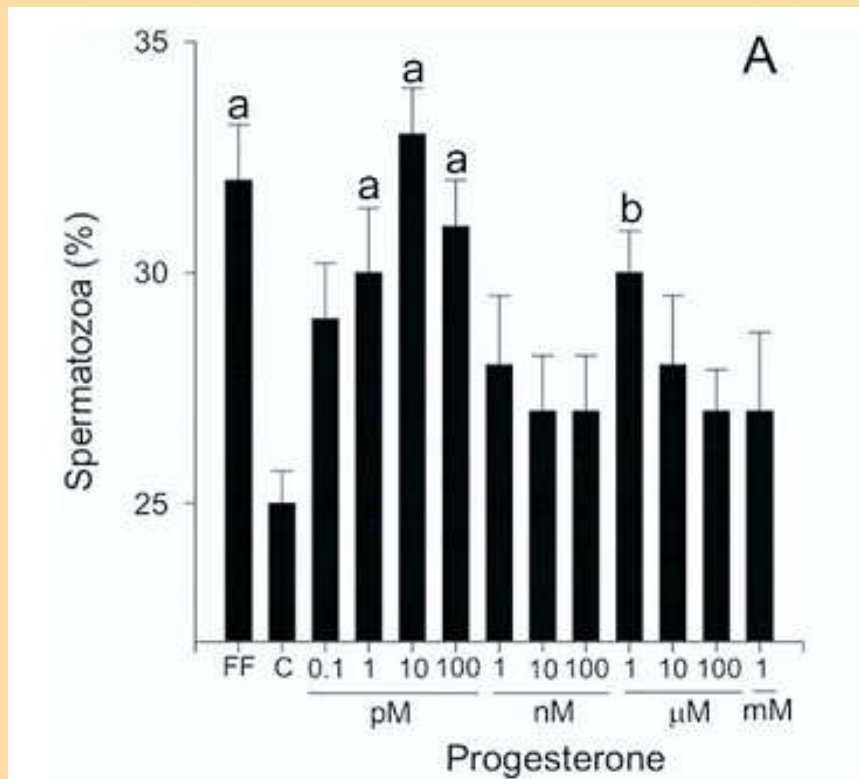
Table 1. Substances reported to cause sperm accumulation in mammals

Substance	Species	Assay type*	Reference	Chemotaxis criterion fulfilled
Acetylcholine	Mouse	c	Sliwa, 1995	-
Adrenaline	Mouse	c	Sliwa, 1994	-
Atrial natriuretic peptide	Human	a,b,c	Zamir <i>et al.</i> , 1993; Anderson <i>et al.</i> , 1995	+ / - [†]
Antithrombin III	Boar	a	Lee <i>et al.</i> , 1994	-
Calcitonin	Mouse	c	Sliwa, 1995	-
Follicular fluid	Human	a,c	Villanueva-Díaz <i>et al.</i> , 1990, 1992	-
	Human	a,b,c,d	Ralt <i>et al.</i> , 1991, 1994; Cohen-Dayag <i>et al.</i> , 1994	+
	Mouse	d	Giojalas and Rovasio, 1998; Oliveira <i>et al.</i> , 1998	+
Heparin	Human	c	Sliwa, 1993a	-
	Mouse	c	Sliwa, 1993b	-
Oxytocin	Mouse	c	Sliwa, 1994	-
Progesterone	Human	c	Villanueva-Díaz <i>et al.</i> , 1995	-
Synthetic N-formylated peptides	Human, bull	a	Iqbal <i>et al.</i> , 1980; Gnessi <i>et al.</i> , 1985	- [†]

Eisenbach M, 1999. Reviews of Reproduction. 4, 56–66.



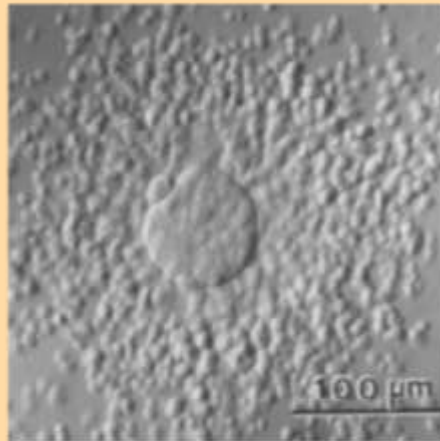
En la búsqueda de la identidad del quimioattractante...



Teves et al., Fertil Steril. 2006. 86(3):745-9

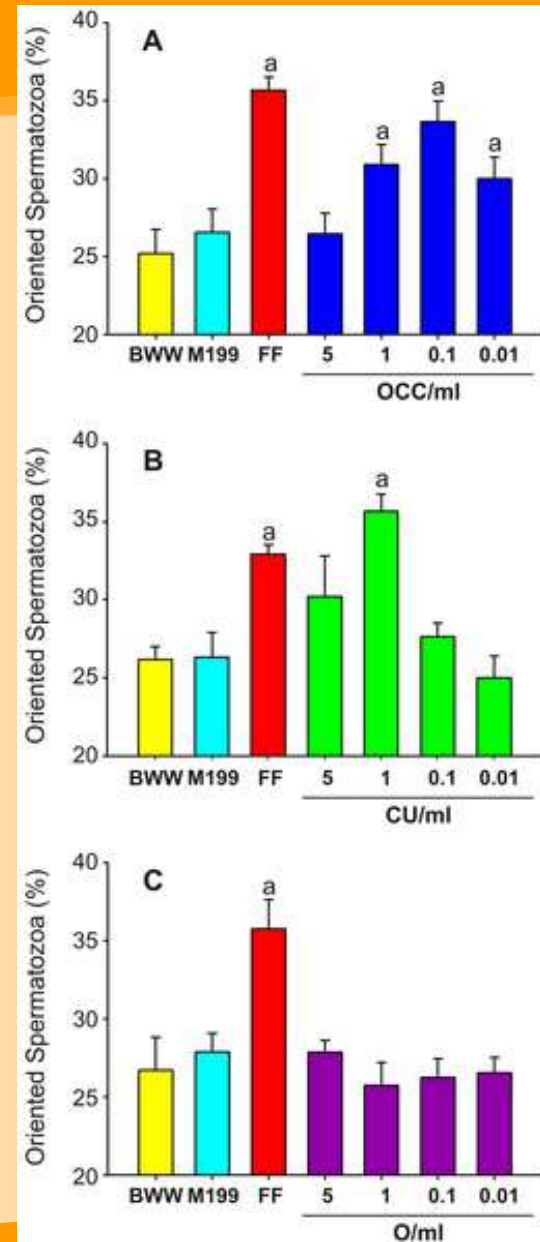
... y de la fuente del quimioattractante.

**Evaluación de medio
condicionado de complejo
ovocito-cumulus, cumulus
y ovocito por separado**

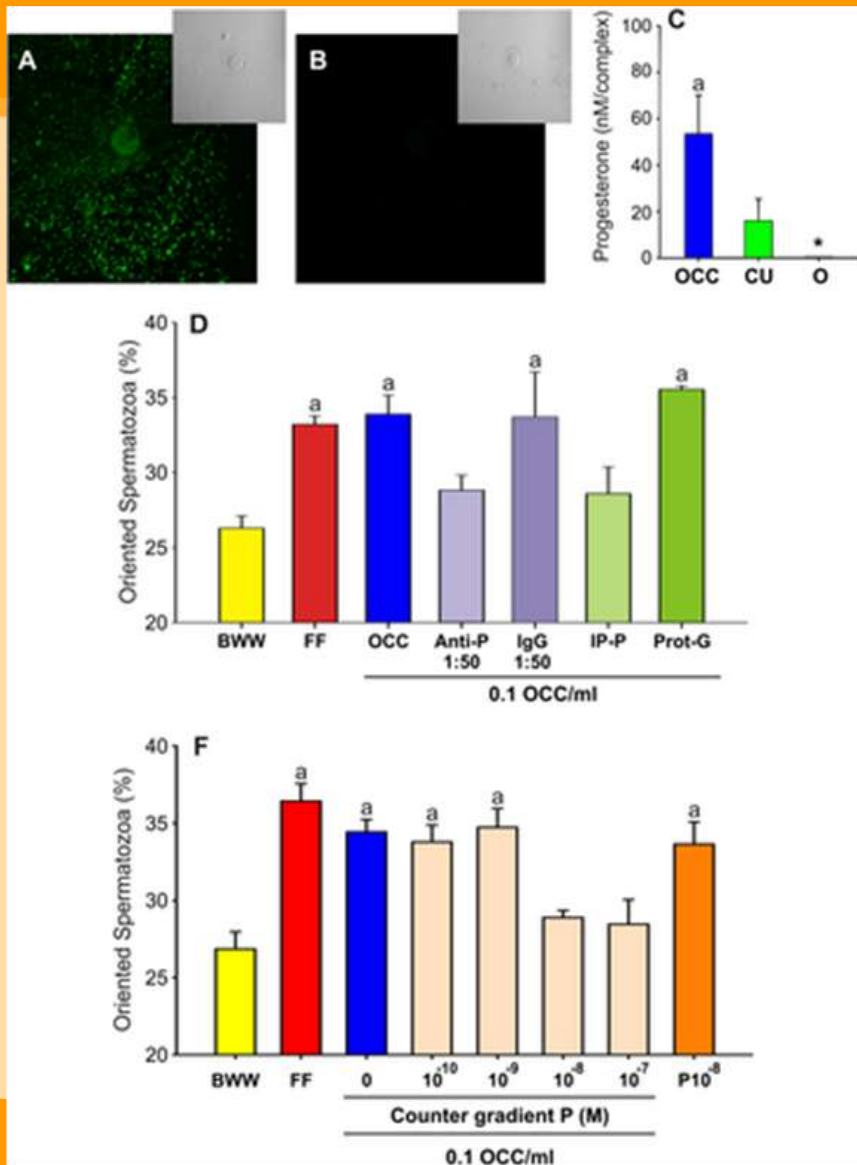


... y de la fuente del quimioattractante.

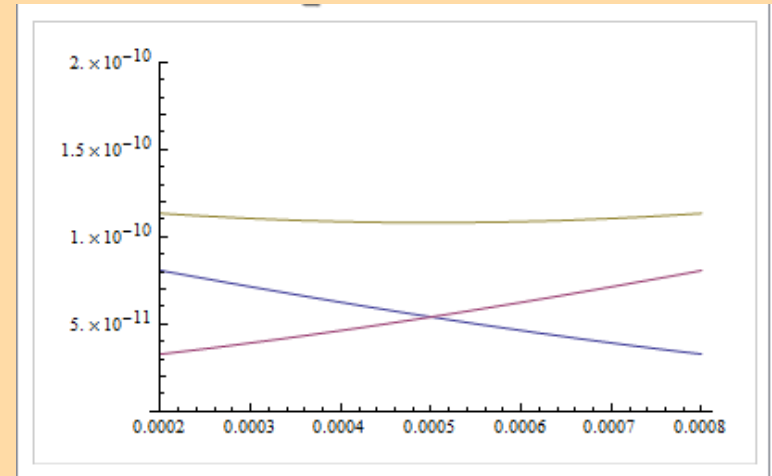
...el medio condicionado de las células del cumulus posee quimioattractantes



... y de la fuente del quimioattractante.



Progesterona es secretada solo por las células del cumulus

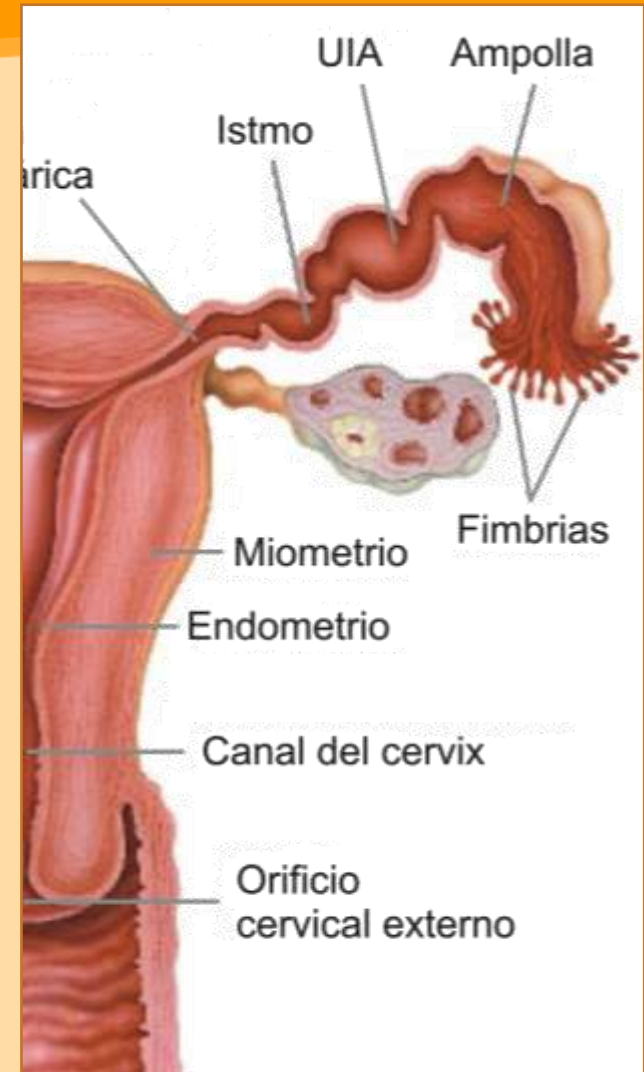


Aparentemente P es el único attractante secretado por el complejo ovocito-cumulus

Verificación de la quimiotaxis *in vivo*

B)

		Female i.m. Saline solution		Female i.m. Ritodrine	
		Oviduct non ligated	Oviduct ligated	Oviduct non ligated	Oviduct ligated
Inhibition	Ovulation products	no	yes	no	yes
	Muscle contractions	no	no	yes	yes
Sperm transport mechanism expected to be inhibited		None	Chemotaxis	Oviduct movement	Chemotaxis and Oviduct movement
Treatment		#1	#2	#3	#4



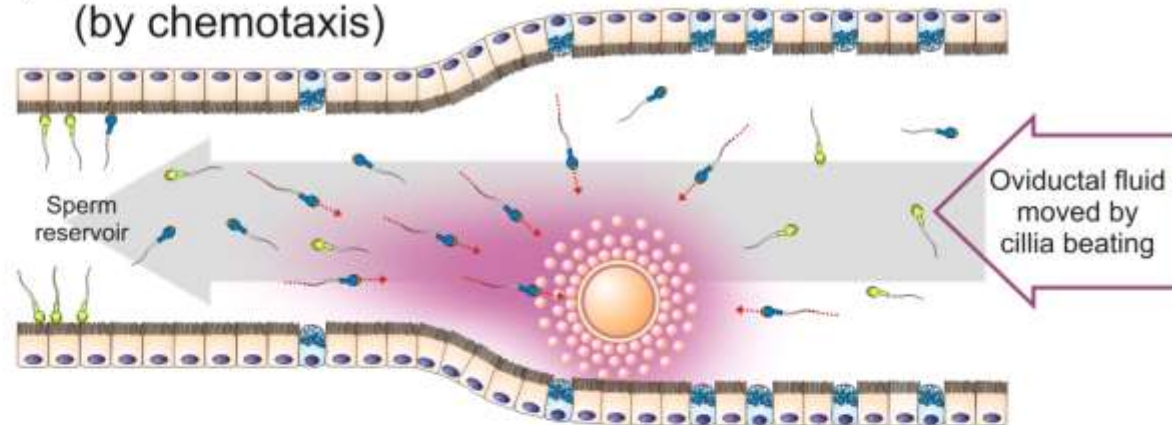
Verificación de la quimiotaxis *in vivo*

Trat		#1 (n=4)	#2 (n=4)	#3 (n=3)	#4 (n=3)
Inhibición	Productos de la ovulación	no	sí	no	sí
	Contracciones musculares	no	no	sí	sí
Region del Oviducto	Istmo	85.9 ± 4.6 % (129 - 6,801)	94.0 ± 1.1 % (875 - 4,760)	93.7 ± 3.1 % (761 - 17,114)	97.9 ± 1.2 % (713 - 3,813)
	AIJ	6.8 ± 1.0 % ^{ab} (10 - 281)	2.3 ± 1.1 % ^{ac} (7 - 124)	4.6 ± 2.1 % ^d (27 - 305)	0.2 ± 0.1 % ^{bcd} (0 - 4)
	Ampulla	7.2 ± 3.8 % (7 - 42)	3.7 ± 1.4 % (15 - 149)	1.7 ± 1.0 % (6 - 99)	2.0 ± 0.1 % (0 - 42)

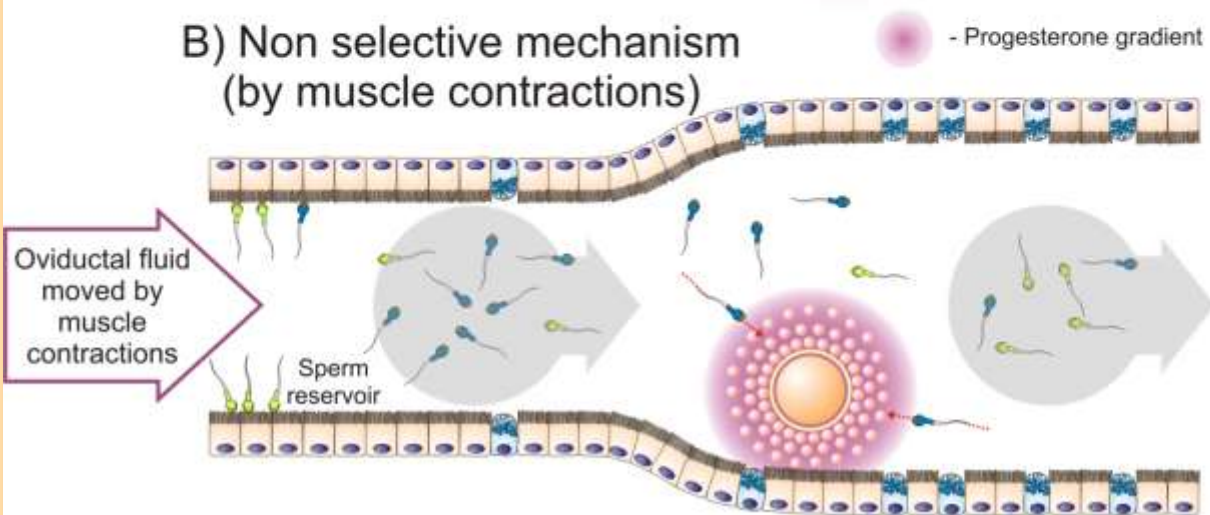
Los espermatozoides llegan al sitio de fertilización por quimiotaxis y por las contracciones oviductales

Modelo de transporte espermático *in vivo*

A) Selective mechanism (by chemotaxis)



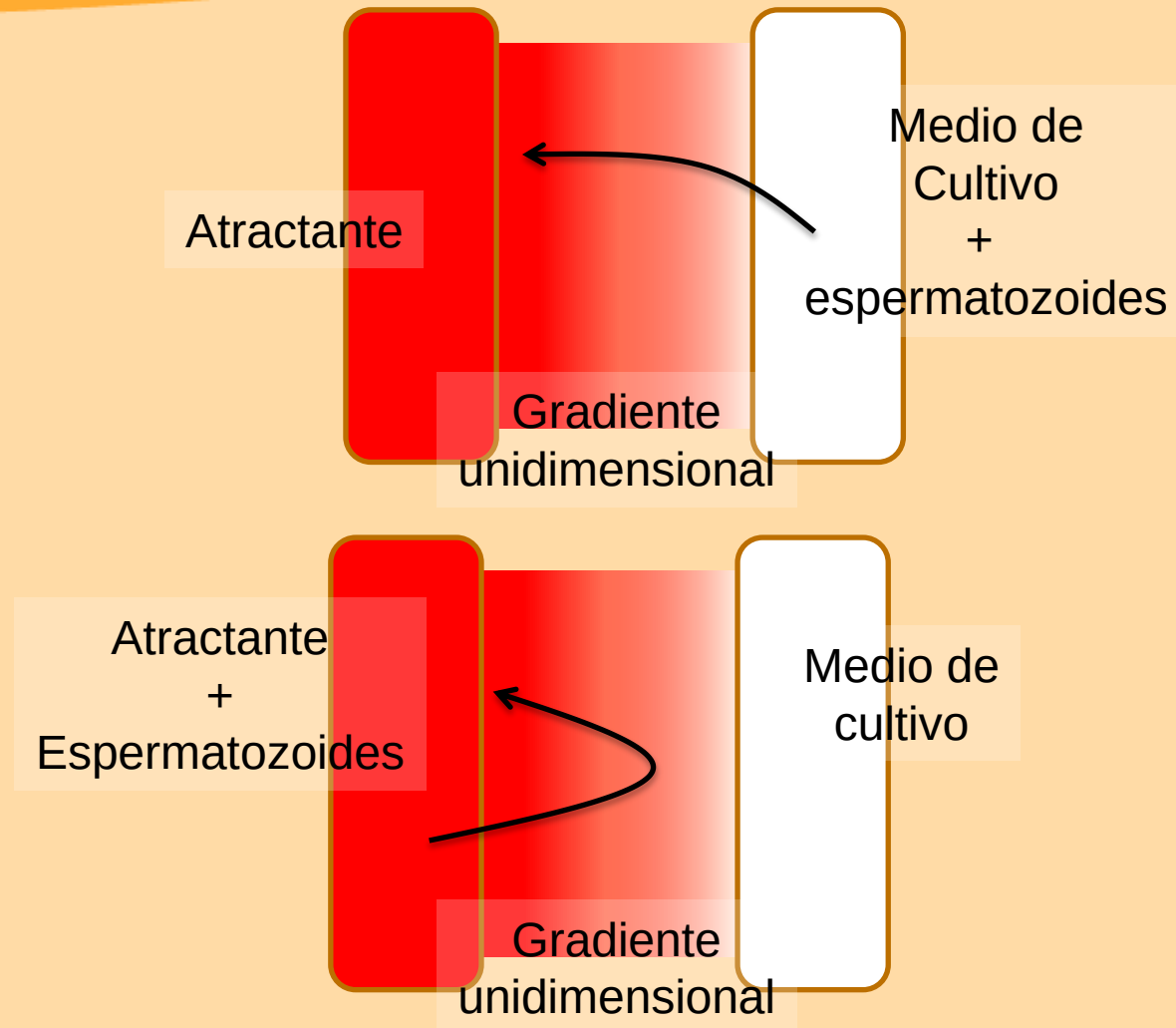
B) Non selective mechanism (by muscle contractions)



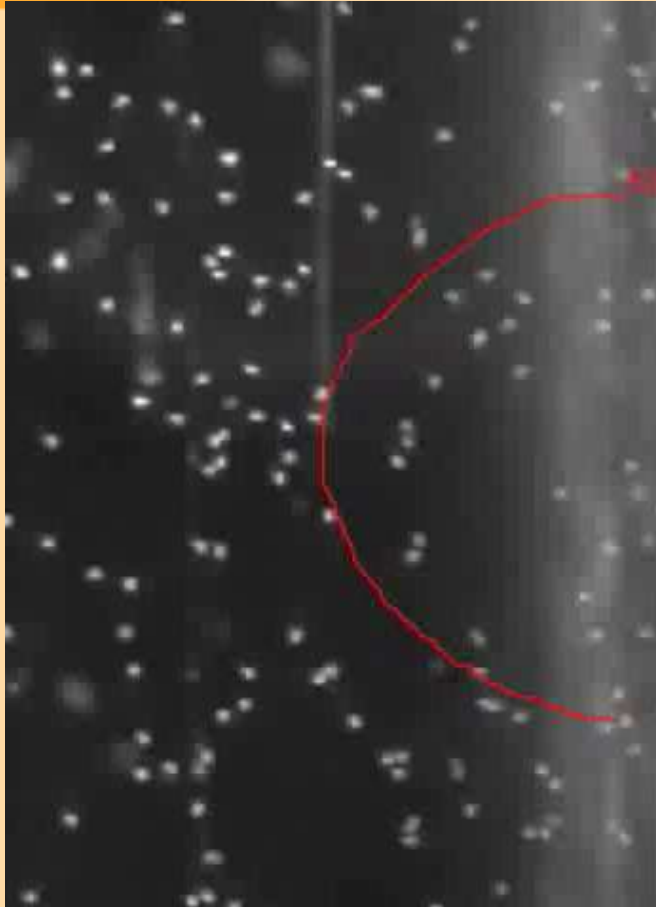
Isthmus

Ampulla

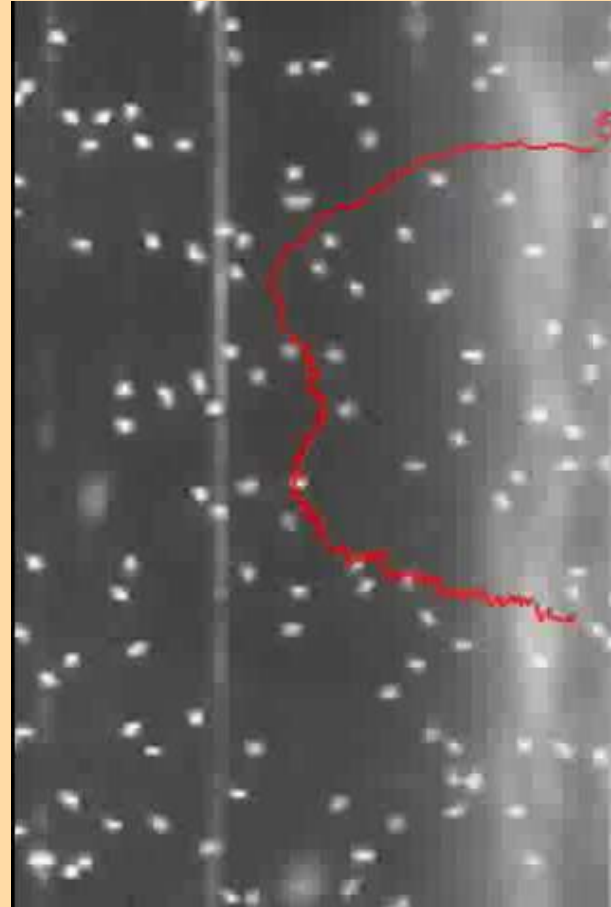
¿Cómo se orientan los espermatozoides hacia la progesterona?



¿Cómo se orientan los espermatozoides hacia la progesterona?



Sin progesterona



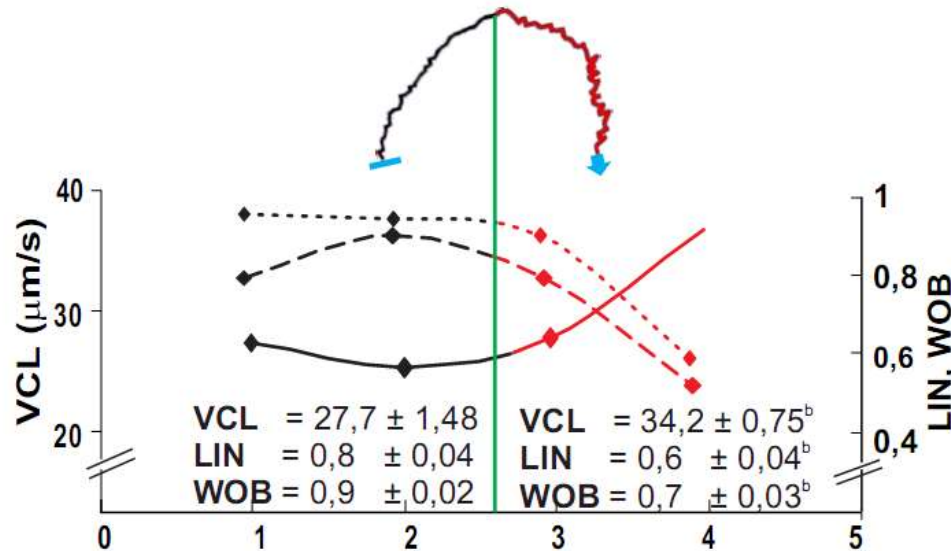
Progesterona 10pM

Blengini et al., Asian Journal of Andrology, en prensa



¿Cómo se orientan los espermatozoides hacia la progesterona?

D



Hay un cambio en el patrón de movimiento acompañado por cambios en los parámetros cinéticos



Resumiendo...

Hemos desarrollado un método que permite evaluar objetivamente quimiotaxis

Hemos identificado el atractante fisiológico

Hemos identificado las fuentes del atractante

Hemos evaluado la participación de la quimiotaxis *in vivo*

Hemos propuesto un modelo de transporte espermático

Hemos caracterizado parcialmente la respuesta quimiotáctica



Perspectivas a futuro

Determinar cómo detecta el espermatozoide el gradiente de progesterona...

Establecer cuáles son los mecanismos de trasducción de señales que controlan la orientación...

Desarrollar un modelo matemático del mecanismo de quimiotaxis *in vitro* e *in vivo*...

Desarrollar un software específico para análisis de imágenes que permita evaluar quimiotaxis...

Explorar nuevos mecanismos que permitan regular el proceso de fertilización...





Muchas gracias!!!

