

Nuevo método para determinar el tiempo de licuefacción en semen fresco mediante Speckle dinámico

New method to determine liquefaction time in fresh semen using dynamic Speckle

Carlos Leal

Centro Multidisciplinario de Ciencias, Laboratorio de Óptica Aplicada.
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).
cleal78@gmail.com

Fecha de recepción: 28/09/2020

Fecha de aceptación: 03/11/2020

Pág: 103– 116

Resumen

El tiempo de licuefacción (T_L) juega un rol importante en la reproducción, es un indicador del estado clínico de la actividad prostática, refleja la función de las glándulas sexuales accesorias, ya que al aumentar el T_L la motilidad disminuye significativamente. El T_L también podría ser utilizado para pruebas de despistaje de cáncer de próstata, debido a la correlación entre el valor del Antígeno prostático específico y el T_L . Con este estudio se plantea desarrollar nuevos métodos estandarizados de análisis, que permitan la evaluación del líquido seminal, teniendo mayor precisión y exactitud, con miras al aumento y mejora en el proceso reproductivo de cualquier especie, como es el caso del rebaño vacuno nacional. Se propone el uso del Speckle dinámico (SD) para el análisis de la calidad de muestras de semen fresco, con un láser de 660 nm, con una potencia media de $(43,50 \pm 1,11)\mu W$, para cuantificar los cambios de la intensidad mediante una modificación del método de las diferencias temporales. El procesamiento de los videos obtenidos se realiza con una interfaz gráfica desarrollada en Matlab, se obtiene una función de tipo exponencial de primer orden con un $R^2 = 0,98$. Se plantea un nuevo método para la determinación cuantitativa del T_L del líquido seminal, definido como el tiempo que tarda en alcanzar el 98 % de la intensidad I_0 (asíntota), de una muestra de 0,2595 ml, se obtiene un valor de $T_L = 15,66 \pm 0,27min$, donde se contrasta con la técnica de la observación visual, sin utilizar ningún tipo de reactivos.

Palabras Clave: Speckle dinámico, Láser, Análisis de Imágenes, Tiempo de Licuefacción, Semen fresco.

Abstract

The liquefaction time (L_T) has a very important role in reproduction. It is an indicator of clinical status of prostate activity, it reflects the function of accessory sex glands, since by increasing the mentioned time L_T , and then motility decreases significantly. The L_T could also be used for prostate cancer screening tests, due to correlation between the value of Prostate Specific Antigen and the L_T . This study aims to develop new standardized methods of analysis to permit evaluation of seminal fluid, with greater precision and accuracy with a view to increasing and improving the reproductive process of any species, such as the national cattle herd. The use of Dynamic Speckle (DS) is proposed for the analysis of the quality of fresh semen samples, with a 660 nm laser, with a mean power of $(43,50 \pm 1,11)\mu W$, to quantify the changes in intensity by modifying the time difference methods. The processing of videos obtained is done with a graphical interface developed at Matlab, a first-order exponential type function is obtained with $R^2 = 0,98$. A new method is proposed for quantitative determination of L_T of seminal fluid, defined as the time it takes to reach 98% of intensity I_0 (asymptote), from a sample of 0,2595 ml, obtaining a value of $L_T = 15,66 \pm 0,27min$, where it contrasted with the visual observation technique, without using any type of reagents.

Keywords: Dynamic Speckle, Laser, Image analysis, liquefaction time, fresh semen.

Introducción

La reproducción es un proceso complejo, en el cual las especies dan origen a sus descendencias, siendo necesario un conocimiento detallado del proceso reproductivo, que permita manipularlo y predecir su fertilidad [Ávalos et al., 2018]. La evaluación del líquido seminal (LS) se realiza a través de una serie de ensayos de laboratorio estandarizados, mediante un conjunto de pruebas macroscópicas: tiempo de licuefacción, color, volumen, viscosidad, PH, y microscópicas: concentración, movilidad, vitalidad, aglutinamiento, morfología, evaluación celular, entre otros. La mayoría de las pruebas tiene una variabilidad considerable, debido al error humano asociado, por lo que es de suma importancia el desarrollo de nuevos métodos de análisis más eficientes, que permitan la evaluación de los procesos, con una mayor precisión y exactitud, ya que se puede inferir del análisis del semen información sobre el estado clínico del individuo [OMS, 2001], siendo de gran importancia en aplicaciones clínicas (reproducción humana), producción pecuaria, investigación y desarrollo, entre otros.

Uno de los principales interés en aplicaciones en biotecnología de la reproducción, es la caracterización del semen utilizado en inseminación artificial (IA), la cual ha demostrado ser la herramienta más exitosa para la mejora genética de los animales de importancia zootécnica, especialmente en la industria bovina [Hidalgo et al., 2005]. Un sistema ganadero

eficiente requiere de una alta eficacia reproductiva. En este sentido, una vez cubiertos los requerimientos nutricionales y sanitarios fundamentales de los reproductores, la IA se convierte en una herramienta útil para mejorar la rentabilidad de estos sistemas, ya que facilita y aumenta la distribución de genes de alto valor en los programas de mejora genética [Tamayo, 2013]. El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino, por lo que el desarrollo de nuevas técnicas de análisis es fundamental para la ampliación y mejora del rebaño nacional.

La cantidad y la calidad del semen pueden variar por factores como: la edad, la temporada de reproducción, la temperatura ambiental, la condición corporal, el tamaño de los testículos o la raza. Para conocer la calidad seminal, las muestras deberán de ser obtenidas de forma cuidadosa y manejada correctamente, ya que en condiciones inadecuadas de manejo las características del semen pueden variar con facilidad [Ávalos et al., 2018]. El análisis convencional tiene limitación ya que no se refuerza correctamente la etiología de los problemas de fertilidad subyacentes, ni predice el éxito reproductivo. En humanos el 40% de las parejas infértiles es causado por un factor masculino [Barbarosie, 2020]. Actualmente no existe un análisis ideal que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal, por lo que se plantea el uso del Speckle dinámico (SD) para evaluar la calidad espermática, implementando nuevos métodos de análisis más eficientes, con el potencial de pronosticar la fertilidad de una especie, por lo que es necesario la evaluación de múltiples parámetros que pueden ser medidos a través de esta técnica. Comenzando con la determinación del tiempo de licuefacción (T_L), definido como el tiempo que transcurre en el paso de gel del eyaculando (masa semisólida y coagulada) hasta licuefaccionarse y homogenizarse, en este los espermatozoides se encuentran atrapados entre las fibras del coágulo mucoso y en letargo, en un medio líquido por la acción de los activadores del plasminógeno [Azisyan, 2016]. Este líquido está compuesto por un 10% de células reproductoras (Espermatozoides) y 90% del LS proveniente de las glándulas anexas, próstata y vesícula seminal. Siendo el T_L analizado mediante simple observación visual, ocurre normalmente en los primeros 15 minutos posteriores a la eyaculación a temperatura ambiente, siendo una muestra generalmente homogénea, sin grumos ni coágulos. Se considera anormal cuando no pasa de 60 minutos [OMS, 2001]. No existe un consenso sobre el tiempo normal de licuefacción, como un parámetro en el análisis general del semen [Mar'ie, 2016], por lo que el desarrollo de nuevas técnicas puede llevar a una estandarización de este parámetro para la determinación de la calidad del LS.

El T_L es dependiente de la actividad de la próstata, reflejando la función de las glándulas sexuales accesorias (vesícula seminal y próstata), la licuefacción incompleta suele aparecer en varones con infecciones en la próstata o con características espermáticas anormales [Ávalos et al., 2018]. La principal función de la próstata es la producción de la secreción prostática, responsable de la licuefacción del semen, que es parte integral en la motilidad de los espermatozoides para facilitar la fertilización, por lo tanto juega un rol importante en la reproducción. Los andrógenos son responsables del crecimiento, desarrollo, diferenciación y función de la próstata en condiciones fisiológicas normales [Azisyan, 2016]. Hay evidencias que confirman la correlación entre la motilidad del espermatozoide y el T_L , al aumentar el T_L la

motilidad disminuye significativamente [Shabani et al., 2017].

Hay una correlación entre el T_L prolongado con problemas de motilidad y morfología, mostrando una relación final positiva entre el T_L prolongado y el retraso en la concepción en meses, predominante en aquellos hombres hipofértiles que no pudieron concebir en más de 36 meses. El análisis del semen es la base de las investigaciones de infertilidad masculina, sugiriendo que hay una relación entre el T_L y la calidad del semen, incluyendo el conteo de espermatozoides, la motilidad y el volumen del semen, la disminución en la actividad prostática con respecto a la de las vesículas seminales parece ser la causa de la licuefacción lenta [Mar´ie, 2016]. La presencia de anticuerpos anti espermáticos evidencian una correlación negativa con la concentración de espermatozoides y la motilidad, además la presencia de anticuerpos anti espermáticos aumenta el T_L del semen [Barbarosie, 2020]. Al conocerse con precisión el parámetro del T_L del semen, se pueden encontrar parámetros de ajustes, que pueden caracterizar el estado reproductivo de la especie en estudio, permitiendo realizar comparaciones, siendo esta tecnología aplicable a cualquier tipo de muestra seminal.

El fundamento básico que describe la técnica de SD, se basa en que una superficie ópticamente rugosa es iluminada con luz coherente, a partir del principio de Huygens-Fresnel, el campo óptico en un punto de observación es igual a la suma coherente de las ondas emitidas por cada centro dispersor (rugosidad de la superficie iluminada), produciendo un patrón de interferencia, siendo un fenómeno estadístico que tiene lugar siempre que la luz coherente este sometida a fluctuaciones aleatorias de fases [Marengo, 2008]. Si existen movimientos de la superficie rugosa o del centro de dispersión, o alteraciones temporales del medio de transmisión o la fuente de luz, el patrón observado comienza a variar con el tiempo, denominándose Speckle dinámico [Sendra, 2009]. La óptica aplicada puede proveer una serie de herramientas, como es el caso de la holografía digital, utilizada para la caracterización de la morfología, motilidad y concentración de semen, siendo un método no invasivo y de alta resolución [Di Caprio et al., 2014]. El SD ha sido empleado en la determinación de la movilidad espermática, en muestras de semen congeladas, encontrando una relación entre el momento de inercia y el porcentaje de movilidad de las células espermáticas, por lo que la metodología y la precisión de la medición son importantes para la evaluación del semen [Carvalho et al., 2019], adicionalmente el porcentaje de la movilidad de las células espermáticas y la concentración de espermatozoides presentan una correlación positiva, evidencia de la coherencia entre la actividad del semen y los valores del momento de inercia [Carvalho et al., 2009].

Hay una gran variedad de aplicaciones que podrían derivar de este estudio, entre esta se encuentra la posibilidad de tener una correlación entre el valor del Antígeno prostático específico abreviado en ingles PSA (Prostate Specific Antigen) y el T_L , determinado mediante SD. PSA es el marcador de cáncer más solicitado por los médicos en el mundo, siendo una herramienta muy útil en el seguimiento de pacientes con cáncer de próstata (CP), el nombre técnico de esta glicoproteína PSA es Calicreína o Kallikrein-3 (KLK3), esta es sintetizada en las células epiteliales de la próstata [Uribe, 2008], siendo una prueba para determinar la presencia de Proteasa Serina relacionada con la familia de Kallikrein (KLK), que van desde la KLK1 a KLK15. Esta familia esta codificada por el genoma humano, de los cuales KLK2 y

KLK3 se encuentran solo en la próstata y KLK3 se considera como biomarcador (PSA) en el diagnóstico del CP. El KLK3 es el principal modulador del estado de espermatozoides en términos de licuefacción y coagulación del semen, también se ha demostrado que el polimorfismo genético KLK3 contribuye al alto riesgo de infertilidad masculina, como un factor degradante a la semenogélica [Aslan y Cetinkaya, 2020]. También KLK3 promueve la metástasis de CP, el gen KLK3 es un marcador clínicamente relevante utilizado para la detección de CP, usado en las pruebas de despistaje de CP, este gen está normalmente involucrado con la licuefacción del semen, degradando sustratos que promueven la metástasis [Fonseka et al., 2015]. Considerando que el CP es la enfermedad más potencialmente mortal entre los hombres en todo el mundo, siendo el 98% de origen glandular, de tipo heterogéneo y exhibe diversas formas, que van desde los tumores de crecimiento lento, hasta los de rápido crecimiento, resultando fatales, en años se han desarrollado estudios y análisis que han proporcionado una forma conveniente para el diagnóstico del CP [Aslan y Cetinkaya, 2020]. En Venezuela desde el año 1995 al 2011 el cáncer representa la segunda causa de muerte en la población. El CP representa en promedio el 19% de las muertes registradas [MPPS, 1995-2014], por lo que es muy importante el desarrollo de nuevos procedimientos para el diagnóstico de CP, teniendo una potencialidad la aplicación del SD en esta área. El objetivo principal de este trabajo es aplicar esta técnica analítica (SD), para el aumento y mejora del rebaño nacional, acrecentar la eficiencia de la producción y la calidad del ganado vacuno. Verificando la viabilidad de esta misma, mediante un ensayo preliminar en una muestra de semen humano, para verificar el montaje experimental y técnicas de análisis de los datos obtenidos.

Materiales y método

El montaje experimental del SD consiste en tres haces colineales, con longitudes de ondas de 447 nm (azul), 532 nm (verde) y 660 nm (rojo), acoplados a un microscopio óptico (ver Figura 1), durante el recorrido de los haces de luz se coloca un difusor para crear el patrón de interferencia inicial, esta atraviesa la muestra (transmisión de haz de luz coherente), captado por un objetivo y un ocular, con un aumento de 100X, para ser grabado los cambios en el patrón de interferencia con una cámara CCD (charge-coupled device), acoplada a un ordenador (PC). Este montaje tiene la peculiaridad de permitir el uso de varias longitudes de ondas, dependiendo de las características de las muestras a ser estudiadas. Los equipos utilizados están descritos en la tabla 1. Los haces pueden ser utilizados independientemente o todos a la vez, permitiendo una gran versatilidad en los métodos de análisis a ser empleados.

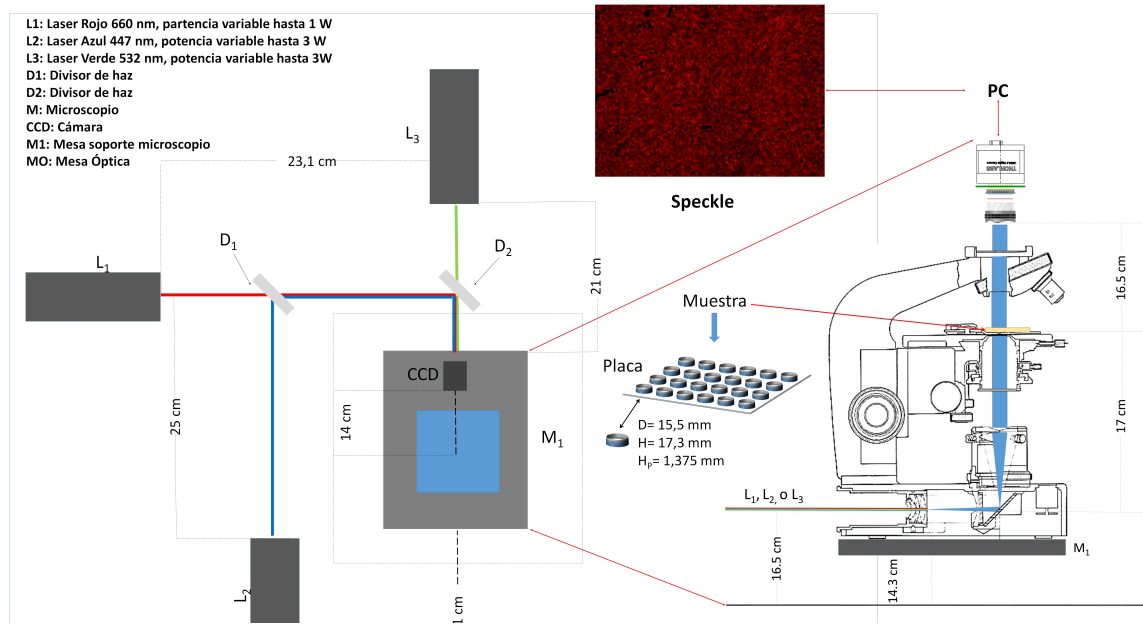


Figura 1: Montaje experimental SD

Tabla 1: Equipos empleados en el montaje experimental.

Equipo	Marca	Modelo	Observación
Laser Rojo	DPSS L DRIVER	MRL-III	Longitud de onda 660 nm, con potencia variable hasta 1W
Laser Azul	PSU-H-LED	OEM-SD	Longitud de onda 447 nm, con potencia variable hasta 3w
Laser Verde	PSU-H-LED	MGL-F	Longitud de onda 532 nm, con potencia variable hasta 3w
Microscopio	Nikon	S-Kt	Con objetivos de 4,10,40X
Cámara CCD	Thorlab	D1024G13C	—
Mesa óptica	Thorlab	590250-364831	—
Balanza analítica	Ohaus	AR2140	—

La intensidad $I(i, j, t)$ que alcanza la cámara CCD de (i, j) pixeles en un tiempo t , y la intensidad $I(i, j, t + \tau)$ en un tiempo $t + \tau$ posterior, es utilizado para evaluar los cambios temporales de la intensidad, a través del valor medio del pixel $D(\tau)$, denominado método de las diferencias temporales, se calcula mediante la expresión [Pamarico y DiRocco, 2004]:

$$D(\tau) = \frac{1}{N} \sum_{i,j}^N |I(i, j, t) - I(i, j, t + \tau)| \quad (1)$$

Debido a que se necesita evaluar los cambios de la intensidad en una ventana de un tiempo determinado. Se realiza una modificación del método de las diferencias temporales, para obtener

una correlación temporal (ver Figura 2), definiendo a N como el número de fotogramas donde se evaluarán la diferencia de la intensidad, trasladando este intervalo de manera periódica (m) a lo largo de todo el vídeo a ser procesado, para cada valor de mN , m puede tener los valores comprendido de 1 hasta N_i/N , donde N_i es el número total de fotogramas, obteniéndose un valor medio del píxel $D(\tau)$ para N imágenes, para cada valor de m , en un tiempo intervalo de tiempo constante, hasta completar todos los fotogramas del vídeo adquirido. Para el caso particular de ese trabajo se consideró para el procesamiento $N = 10$ fotogramas, obteniéndose la diferencia temporal en 500 puntos, separados en intervalos de 2 segundos, respectivamente.

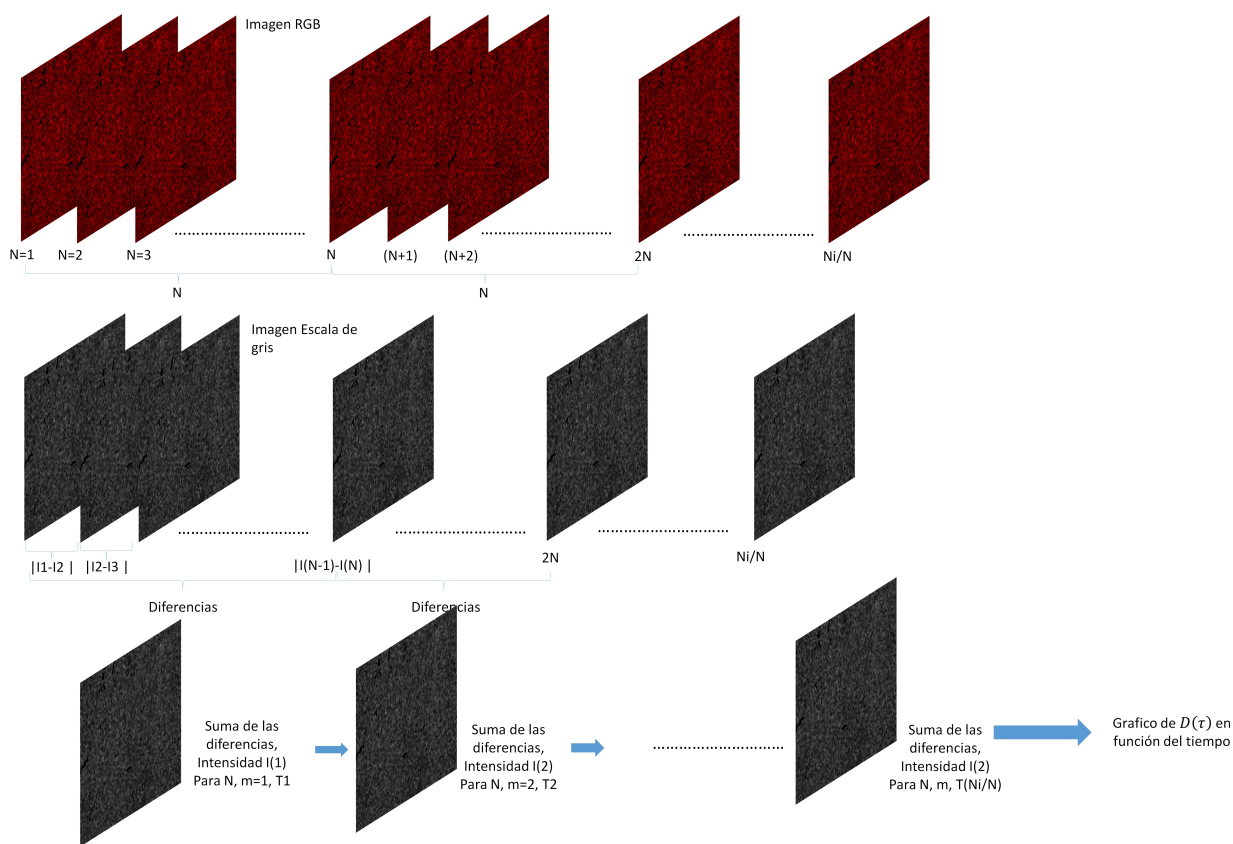


Figura 2: Método de las diferencias temporales modificado

Realizando el procesamiento de los vídeos de manera automática, a través de un código escrito en Matlab, diseñando una interfaz gráfica propia. Teniendo como parámetros de entrada el formato del vídeo, el fotograma inicial para los cálculos de las diferencias temporales, el intervalo de fotogramas (N) a ser analizados, el tiempo transcurrido desde el inicio de la grabación del vídeo y la toma de la muestra, finalmente el procesamiento de las imágenes en escala de grises o por canal independiente (colores RGB), mostrando los resultados en tiempo real, para la pronta verificación de la variación de la intensidad en función del tiempo (ver Figura 3). Desarrollado especialmente para las necesidades de este estudio. Es de destacar que el formato de vídeo

depende de la cámara utilizada, por lo que el programa se diseña para la gran variedad de formatos soportados por Matlab, también permite variar el valor de N, repitiendo de manera automática este intervalo de tiempo, hasta procesar todos los fotogramas del vídeo.

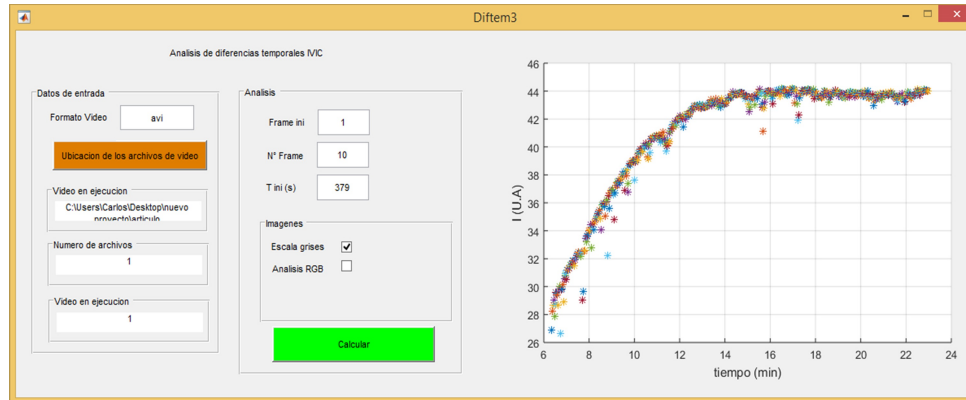


Figura 3: Interfaz gráfica en Matlab para el análisis por el método de las diferencias temporales modificado

Para el presente estudio se utilizó a un voluntario de 41 años de edad, con 5 días sin actividad sexual, realizándose la recolección según las recomendaciones de la OMS, una vez colectada la muestra se toma la hora de la eyaculación, denominado tiempo de eyaculación (T_E). La adquisición de los datos de la muestra debe realizarse lo más pronto posible para poder percibir los cambios propios en el LS, tomando la hora del inicio de la grabación del vídeo, tiempo video (T_V), para conocer el intervalo de tiempo entre la toma de la muestra (T_E) y el inicio de la adquisición de los datos (T_V), tiempo necesario para ajustar el eje de referencia temporal en el procesamiento de las imágenes, siendo T_E el tiempo cero en el sistema de coordenadas.

Luego se determina el peso de la muestra con una balanza digital. Obteniéndose dicha muestra, lo más homogénea posible, con un volumen aproximado de $0,25\text{ml}$, se coloca en una placa de cultivo de 24 pozos de fondo plano, con un diámetro de $15,5\text{mm}$, con una altura del pozo de $17,3\text{mm}$, la altura de la muestra en el pozo es de $1,375\text{mm}$ (ver Figura 1). Se hace incidir el haz de luz de 660nm (laser rojo) sobre la muestra, con una potencia media de $(43,50 \pm 1,11)\mu\text{W}$ medida, para un rango de longitud de onda de $200 - 1100\text{nm}$, con un equipo marca ThorLab, modelo PM100A acoplado a un sensor S120VC para un rango de 50 nW a 50 mW con una apertura de $9,5\text{ mm}$. Paralelo al proceso de adquisición del video, se realizan las pruebas básicas, para determinar los parámetros macroscópicas iniciales sugeridas por las OMS, evaluando de manera visual el T_L , aspecto y presencia de gel. Para la medición de pH distribuyendo una gota de semen sobre el papel de pH (con un rango de 6,1 hasta 10), la viscosidad se evalúa mediante la caída de una gota observando la longitud del filamento formado. Todas las mediciones se realizan a temperatura ambiente (entre $25 - 28\text{ }^\circ\text{C}$).

Resultados

La muestra posee un volumen total de la muestra de 5,6549ml, con un pH de 7,4; con un aspecto homogéneo de color gris-opalescente, posterior a la licuefacción, con una viscosidad normal (filamento menor a 2 cm), con escasa presencia de gel, utilizándose una muestra de 0,2595ml. Encontrándose dentro de los parámetros normales. Se obtiene un video de 5000 fotogramas (Ni), con una duración de 16,66 min, a una tasa de 5 Fotogramas por segundo, con una resolución de 1024x768 pixeles de 4,67 μ m, empleando un tiempo de exposición de 120 ms, en formato Audio/Video Interleaved (avi), posterior al procesamiento del video adquirido se obtiene una curva de 500 puntos, calculando la intensidad de acuerdo con la ecuación 1. Se evidencian los cambios ocurridos en el LS, mediante la variación en la intensidad del patrón de interferencia (ver Figura 4), realizándole un ajuste de una función tipo exponencial de primer orden (ecuación 2), obteniéndose un $R^2=0,98$, los parámetros de ajuste siguientes: $A = -16,45$, $I_0 = 44,20 \pm 0,05U.A$, $\sigma = 3,040,05min$, $t_0 = 6,47min$. Siendo los parámetros de mayor relevancia para la caracterización de la curva los valores de I_0 y σ , representando geoméricamente I_0 la asíntota de la función ajustada, indicando el valor de la intensidad cuando es superado el T_L y σ representa la suavidad de la curva.

$$I = Ae - \left(\frac{t - t_0}{\sigma}\right) + I_0 \quad (2)$$

El tipo de función tipo exponencial es consistente a los cambios asociados a la variación de color que experimente el LS, pasando de un color blanco a un fluido semitransparente una vez completado el proceso de licuefacción, siendo consistente con la Ley de Lambert-Beer en donde los cambios en la intensidad son una función tipo exponencial, siendo claramente detectado en el análisis por SD. En la Figura 4, se puede observar claramente que el cambio en la intensidad llega a una asíntota, comportándose como un valor constante en el tiempo, para la determinación con precisión del tiempo de licuefacción (T_L) se define como el tiempo que tarda la intensidad I en alcanzar el 98 % de I_0 , expresada en la siguiente ecuación:

$$T_l = t_0 - \sigma LN\left(\frac{I(0,98) - I_0}{A}\right) \quad (3)$$

Donde T_L es tiempo de licuefacción, $I(0,98)$ es el 98 % del valor de la Intensidad I_0 (valor máximo de la función), σ coeficiente de suavidad de la curva, t_0 el tiempo transcurrido desde la eyaculación hasta el inicio de la toma de datos y A la amplitud. Obteniéndose como resultado que el $TLde15,66 \pm 0,27min$, con un coeficiente de variación de 1,75 %, mostrando una muy buena precisión. El valor obtenido es menor que el valor derivado de 17 min por observación visual. A diferencia del método por observación visual, el método propuesto se puede obtener un valor con una alta precisión, lo cual puede permitir la caracterización y diferenciación de individuos.

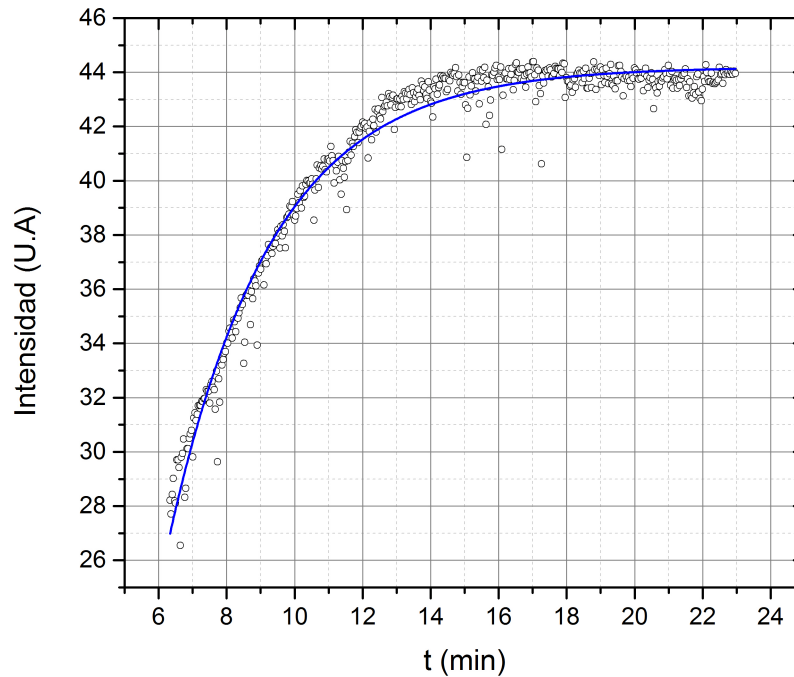


Figura 4: Variación de la intensidad en función del tiempo

Otro punto de interés es la diferencia entre el tiempo transcurrido entre la eyaculación (T_E) y la toma de los datos (T_V) de $6,32 \pm 0,03 \text{ min}$, se obtiene a través del ajuste de la función exponencial expresada en la Ecuación 2, con un valor de t_0 de 6,47 min, representando un porcentaje de diferencia de 2,37% y una diferencia de 9 segundos. Esta diferencia en los tiempo medidos de la eyaculación y el ajustado por la curva se deben a error experimental asociado a la medición y también al proceso fisiológico de expulsión del LS, que se realiza en dos etapas, la primera es el clímax del coito, los músculos en el epidídimo, las vesículas seminales, la glándula prostática y el conducto deferente se contraen, forzando la secreción de las glándulas hacia el conducto deferente y mover los espermatozoides desde el epidídimo, la segunda etapa de la eyaculación, el esfínter en la base del pene se relaja admitiendo al semen dentro del pene, donde una serie de contracciones musculares alrededor de la base y a lo largo de la uretra expelen el semen afuera del cuerpo. Esta técnica puede representar un método para la estimación del tiempo transcurrido en las dos etapas de la eyaculación, definido como el tiempo de contracción (T_C) del pene, expresado como:

$$T_c = (T_E - T_V) - t_0 \quad (4)$$

El T_C (ecuación 4) puede ser otro parámetro a ser utilizado para la caracterización y diferenciación del semen de diferentes especies e individuos. Este nuevo método por SD

para la caracterización del LS, permitirá evaluar parámetros no contemplados en las pruebas convencionales, permitiendo realizar comparaciones, además el análisis no depende de la pericia del observador, una vez estandarizada la técnica de análisis, los parámetros de interés son obtenidos mediante ajustes de funciones, permitiendo aumentar la precisión y exactitud de los resultados, con miras al desarrollo del Espermiograma Laser, una vez caracterizada los parámetros concentración, motilidad y morfología, a través del SD.

Conclusiones

A diferencia de la observación visual, el método propuesto es una propuesta novedosa y eficiente, que no depende de la pericia del operador, disminuyendo significativamente el error humano en el proceso de medición, con un amplio potencial en el campo de la salud. Al obtener de manera cuantitativa el tiempo de licuefacción (T_L) del líquido seminal, permite evaluar la actividad de la glándula prostática, reflejando la función de las glándulas sexuales accesorias, estado directamente relacionado con la motilidad y morfología de los espermatozoides, parámetros de importancia en el proceso de fertilización, jugando un rol impórtate en la reproducción de cualquier especie. Se puede evaluar el PSA con esta técnica, debido al correlacione en el PSA y el TL, teniendo la potencialidad de ser utilizado en las pruebas de despistaje de CP, ya que KLK3 se encuentran solo en la próstata y siendo considerado como un biomarcador (PSA) en el diagnóstico del CP.

El cambio experimentando por la intensidad del patrón de interferencia en el tiempo, mediante el uso de un montaje experimental de diseño propio, con equipos de alta tecnología (láseres de estado sólido, cámara CCD científica) y en condiciones de laboratorio, acoplados a un microscopio para mejorar la detección de los cambio en la intensidad, permite obtener cuantitativamente el T_L , logrando el objetivo principal de este trabajo. Se obtiene un excelente ajuste, a pesar de realizar un solo experimento, siendo de tipo exponencial de primer orden con un R^2 de 0,98, sin el uso de ningún tipo de reactivos para su evaluación. Definido el T_L como el tiempo transcurrido en alcanzar el 98 % del valor de la intensidad I_0 , obteniendo un valor de $15,66 \pm 0,27min$, definido a través de la Ecuación 3, al conocerse con precisión el parámetro del T_L del semen y los parámetros de ajustes, pueden ser comparados con la finalidad de encontrar diferencias en las características del LS de diferentes especies, mediante una seria de cálculos complejos realizado de manera automática a través de una interfaz gráfica desarrollada en Matlab, procesando los datos en un corto periodo de tiempo, siendo más eficiente, ya que permite la variación de los parámetros N y el análisis de un gran número de fotogramas, es decir vídeos de larga duración, empleando el método de las diferencias temporales modificado propuesto en este trabajo. Este método puede ser empleado para cualquier tipo de muestra se semen y puede ser un utilizado para el diagnóstico de la fertilidad o infertilidad de un individuo. Otro parámetro adicional definido es el tiempo de contracción (TC) del pene, definido en la ecuación 4, definiendo un método para la estimación del tiempo transcurrido en las dos etapas de la eyaculación, siendo esto un proceso fisiológico, obteniéndose un valor de 9 segundos, definido a través de la Ecuación 4, este puede ser un parámetro característico de la especie o

individuo. Este es el inicio del proceso de caracterización del LS, la idea es la evaluación de la motilidad, concentración, tiempo de licuefacción y morfología, utilizando el SD, con miras al desarrollo del Espermiograma Laser.

Finalmente uno de los objetivos futuros de esta investigación, es facilitar estas herramientas tecnológicas y hacerlas accesibles a los productores nacionales especialmente o a laboratorios clínicos, debido a las bondades de la técnica, a pesar de que este montaje experimental presentado en este trabajo es de alta complejidad, puede ser simplificado, como lo ha sido ampliamente demostrado en los trabajos de [Grassi, 2012, Muñoz, 2015, Lobo, 2011, Contreras, 2018], entre otros, desarrollado en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, mostrando la factibilidad del uso de un puntero laser como fuente de luz y una cámara web para la adquisición de los vídeos, presentando la posibilidad de realizar instrumentación científica de bajo coste, abriendo la posibilidad de uso masivo de esta técnica.

Agradecimientos

Un especial agradecimiento al Plan Nacional de Innovación Tecnológica (PNIT), por el apoyo y financiamiento del proyecto *Determinación de la calidad de semen bovino mediante Speckle dinámico*, a través del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (Fonacit), que permitió el desarrollo de este trabajo.

Bibliografía

- [Aslan y Cetinkaya, 2020] Aslan E. y Cetinkaya S. (2020), Use of miRNA as a Biomarker in Prostate Cancer and New Approaches, *Turkish Journal of Oncology*, 35(1):99–113. DOI: 10.5505/tjo.2019.2202
- [Ávalos et al., 2018] Ávalos A., González J., Vargas A. y Herrera J. (2018), *Recolección y manipulación seminal in vitro*. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, primera edición, ISBN: PDF 978-607-28-1299-4, México.
- [Azisyan, 2016] Azisyan M. (2016), *Mono-ubiquitination mediated regulation of KMT5A and its role in prostate cancer*. Newcastle University, Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy.
- [Barbarosie, 2020] Barbarosie C., Agarwal A. and Henkel R. (2020), *Diagnostic value of advanced semen analysis in evaluation of male infertility*, *Andrologia*, DOI:10.1111/and.13625
- [Carvalho et al., 2009] Carvalho PHA., Barreto J., Braga Jr. R., and Rabelo G. (2009), Motility parameters assessment of bovine frozen semen by biospeckle laser (BSL) system, *Biosystems engineering I02*, pp. 31-35, DOI:10.1016/j.biosystemseng.2008.09.025

- [Carvalho et al., 2019] Carvalho PHA., Rossi RODS., Lopes A., Santos APC., Sales JNS., Rabelo GF., Braga Jr JB. and Barreto JB. (2019), *Bovine frozen semen motility analysis using two different laser wavelengths*, *Advences in Biochemistry and Biotechnology*, vol. 7, DOI:10.29011/2574-7258.001087
- [Contreras, 2018] Contreras. A. (2018), *Evaluación del Efecto de Ampicilina sobre Escherichia coli K-12 HfrH por Bioespequeleometría Láser, usando Programas de Edición de videos y Series de Tiempo*. Tesis de Maestría para obtener el Magister Scientiae en el Postgrado en Química de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela).
- [Di Caprio et al., 2014] Di Caprio G, Ferrara M, Miccio L, Merola F, Memolo P, Ferraro P and Coppola G. (2014), Holographic imaging of unlabelled sperm cells for semen analysis: a review, *Journal of Biophotonics*, Vol. 8, No. 10, pp. 779-789, DOI10.1002/jbio.201400093
- [Fonseka et al., 2015] Fonseka L., Kallen M., Serrato-Guillen A., Chow R. and Tirado C. (2015), Cytogenetics and Molecular Genetics of Prostate Cancer: A Comprehensive Update, *The Journal of the Association of Genetic Technologists*. Vol. 41, No. 3, pp.100-111.
- [Grassi, 2012] Grassi. HC. (2012), *Producto y proceso para medir el efecto de antibióticos sobre microorganismos en un tiempo corto y utilizando biospeckle*, Proyecto de Innovación del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación-FONACIT. Proyecto Nro. 2012001862.
- [Hidalgo et al., 2005] Hidalgo C., Tamargo C. y Díaz C. (2005), *Análisis del semen bovino*, Boletín informativo del SERIDA, Nro. 2.
- [Lobo, 2011] Lobo. L. (2011), *Estrategias para evaluar la actividad biológica de fármacos comerciales sobre Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría para obtener el Magister Scientiae en el Postgrado en Química de Medicamentos, opción biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela).
- [Marengo, 2008] Marengo F. (2008). *Medición de la distribución de fase en interferometría de speckle temporal usando descomposición empírica de modos y transformada de Hilbert*. Universidad Nacional de Rosario. Tesis doctoral.
- [Mar'ie, 2016] Mar'ie S. (2016), Evaluation of Significance of Prolonged Liquefaction Time of Semen in Hypofertile Men, *The Iraqi Postgraduate Medical Journal*. Vol. 15, No. 3.
- [MPPS, 1995-2014] MPPS (1995-2014), *Anuario de Mortalidad*, Dirección General de Epidemiología, Ministerio del Poder Popular para la Salud, Venezuela.
- [Muñoz, 2015] Muñoz. O. (2015), *Uso del prototipo de biospeckle Para evaluar la actividad bacteriana en muestras De orina de pacientes con infección del tracto urinario En el área*

de emergencia adultos del IAHULA en el periodo comprendido entre Mayo/Junio 2015, Tesis de Maestría para obtener el título de Magister Scientae en el Postgrado de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela).

- [OMS, 2001] OMS. (2001), *Manual de laboratorio de la OMS para examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*, Cuarta Edición, Editorial Médica Panamericana, Organización Mundial de la Salud.
- [Pamarico y DiRocco, 2004] Pamarico J. y DiRocco H. (2004), Compact device for assessment of microorganism motility. *Review of Cientific Instruments*. Vol. 75, No. 11, DOI: 10.1063/1.1809266
- [Sendra, 2009] Sendra G. (2009), *Análisis de actividad en patrones de speckle dinámico*, Universidad Nacional de Mar del Plata. Tesis doctoral.
- [Shabani et al., 2017] Shabani K., Hosseini S., Nohammad A y Moghbelinejad S. (2017), The effects of semen parameters and age on sperm motility of Iranian men, *Global Journal of Fertility and Research*, Vol. 2, No.1, pp. 024-029.
- [Tamayo, 2013] Tamayo M. (2013), *Variación de la calidad del semen desde el centro de inseminación artificial hasta los termos de la granja e inseminado*. Disponible en <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/variacion-calidad-semen-desde-t29861.htm>. (Consultado 07/08/2019)
- [Uribe, 2008] Uribe J. (2008), La bioquímica del antígeno específico de próstata (AEP) y sus fracciones. *Medicina y Laboratorio*, Vol. 14, No. 3-4, pp. 153-166.