



UNIVERSIDAD  
DE LOS ANDES

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

EVALUACIÓN TEMPORAL DEL PROCESO DE LICUEFACCIÓN DE  
MUESTRAS DE SEMEN FRESCO MEDIANTE SPECKLE DINÁMICO

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Autor: Jesús Mendoza

Tutor Externo: Dr. Carlos Leal

Tutor Académico: MsC. Freddy Fernández

Mérida - Venezuela, Mayo 2024.



UNIVERSIDAD  
DE LOS ANDES

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

EVALUACIÓN TEMPORAL DEL PROCESO DE LICUEFACCIÓN DE  
MUESTRAS DE SEMEN FRESCO MEDIANTE SPECKLE DINÁMICO

Trabajo Especial de Grado para Optar al Título de Licenciado en Física.

Autor: Jesús Mendoza

Tutor Externo: Dr. Carlos Leal

Tutor Académico: MSc.Freddy Fernández

Mérida - Venezuela, Mayo 2024.



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

## **EVALUACIÓN TEMPORAL DEL PROCESO DE LICUEFACCIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN FRESCO MEDIANTE SPECKLE DINÁMICO**

Trabajo Especial de Grado para Optar al Título de Licenciado en Física

Autor: Jesús Mendoza

Tutor: Dr. Carlos Leal

CoTutor: MsC.Freddy Fernández

### **Resumen**

En la búsqueda de ofrecer herramientas eficaces en el análisis y caracterización del líquido seminal, se desarrolla esta investigación con el objetivo de evaluar la evolución temporal del proceso de licuefacción en muestras de semen fresco mediante speckle dinámico, siendo este un método preciso que permite medir con exactitud el TL, conociendo que es un indicador del estado clínico del paciente, además de generar información sobre la actividad prostática y función de glándulas sexuales; a su vez, involucra el estudio de distintos patrones macroscópicos y microscópicos del líquido seminal con el fin de aportar datos exactos sobre la calidad del mismo. Donde no se registró algún cambio significativo en el Ph de las muestras, todas estando entre los rangos normales según lo establecido por la OMS, tampoco se registró algún cambio apreciable en los índices de refacción. De igual forma, en el volumen total de la muestra todas estuvieron en el rango normal, solo dos de ellas estaban en el caso limite, P2 con un volumen total de 1,68ml y P5 con 1,48ml, todas las muestras obtuvieron una viscosidad normal, con un hilo de longitud no mayor a los 2 cm. Además de esto, todas las muestras presentaron viabilidad mayor al 54% que es lo que se establece en la OMS, sin embargo, la muestra P10 fue la que presentó un viabilidad más baja del 58,33% entre todas las muestras, solo para las muestras P1 y P3 no se pudo medir este parámetro ya que presentaban posible caso de azoospermia, por lo que tampoco se le

pudo determinar el número de espermatozoides, todas las muestras presentaban baja concentración espermática; es decir; estaban por debajo de lo que establece la organización mundial de la salud ( $16 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ ). Es una investigación experimental con enfoque cuantitativo; con una muestra de 12 participantes de los cuáles dos fueron excluidos por no cumplir con criterios de inclusión; se cuantificaron los cambios de la intensidad mediante una modificación del método de las diferencias temporales donde al comparar los dos métodos de análisis para establecer el tiempo de licuefacción se pudo determinar que el mejor método de análisis para conocer el tiempo de licuefacción es el de la variación del coeficiente de transmisión en función del tiempo (Pixel medio), dando mejores ajustes de  $R^2$  y fallando solo en una muestra (P7) que presentaba un tiempo de licuefacción mayor a lo estipulado ( $95,6 \pm 6,9$ ) min. Mientras que el hecho por la intensidad vs tiempo falló en dos muestras, P1 con un tiempo de licuefacción de ( $2350606 \pm 169765$ ) min y P3 un tiempo de licuefacción de ( $6,72 \pm 0,49$ ) min, además sus  $R^2$  fueron los más bajos entre las demás muestras, 0,19 y 0,21 respectivamente. A su vez, al hacer la comparación con los métodos de análisis tradicionales se pudo demostrar que este es un método eficiente y preciso, el mismo no requiere de alguna experiencia del experimentador, solo tener conocimientos básicos de computación. Por otro lado, se obtuvieron los videos con una interfaz gráfica desarrollada en Matlab. Al medir el TL se evidenció que se trata de un método preciso en la evolución temporal del proceso de licuefacción del semen, involucrando otros parámetros de análisis. Se concluyó que el speckle dinámico es un método eficaz en la determinación cuantitativa del TL del líquido seminal y a través de análisis estadísticos como U de Mann-Whitne donde se logró encontrar la significancia entre los dos métodos de análisis, la cual es de 0,226 o 22,6% superando el nivel de significancia de 0,05 o 5% se pudo demostrar que como esta prueba no es concluyente el mejor método para la determinación del tiempo de licuefacción es el de la variación del coeficiente de transmisión en función del tiempo (Pixel medio). Por otro lado, se hizo otro análisis estadístico como lo es la prueba de componentes principales donde se obtuvo la matriz de correlación, donde se pudo encontrar la significancia entre los valores del tiempo de licuefacción por el análisis de intensidad vs tiempo (Speckle) y por el análisis de la variación del coeficiente de transmisión en

función del tiempo (Pixel medio), con el fin de determinar que método se ajusta mejor a través de las correlaciones entre cada variable.

**Palabras Clave:** Speckle dinámico, Láser, Tiempo de Licuefacción, Semen fresco, métodos de análisis.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios principalmente.

A mis padres Jesús y Marlene por ser quienes con mucho o con poco me ayudaron y me animaron a ser cada día mejor, por creer siempre en mí a pesar de que a veces las cosas no salían como ellos querían. Esto es por ustedes y para ustedes. Los amo infinitamente.

A mis hermanos de sangre Manuel, Josué y Heyismar. Gracias por también creer en mí y nunca dejar de apoyarme, siempre fueron de gran ayuda sus palabras. Sé que nunca se nos fue fácil pero cada uno lo ha logrado, ahora es mi turno. Los amo.

A mi primo Lidio por motivarme a querer estudiar en la ULA y por su ayuda desde el principio de mi carrera hasta el final. Agradecido toda la vida. Lo quiero primo.

A mis hermanos de Mérida. Manuel, Pati, Angela, Angel, Rafa, Guaro, Nathy, Jhonny. Simplemente gracias. Siempre estuvieron para mí. ¡Vamos por más! Los quiero.

A la familia Reinoza Salas, por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir como en la mía, por depositar tanta confianza en mí, por el apoyo incondicional. ¡De verdad gracias! Se les quiere.

Al Dr. Carlos Leal, quien dirigió esta investigación. Gracias por el gran aporte a través de sus ideas y por respetar las mías, por el tiempo dedicado y por invitarme a profundizar en su área de investigación.

Al MsC Freddy Fernandez, por su confianza y dedicación en este trabajo. Agradecido.

Al Laboratorio de Óptica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, por prestar sus instalaciones para desarrollar esta investigación.

A la Universidad de Los Andes, por formar investigadores autónomos.

A los participantes que aceptaron ser la muestra sometida a estudio.  
Gracias por la confianza y disponibilidad.

A todos los que sumaron en el desarrollo del estudio.

Jesús Mendoza.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## DEDICATORIA

A mis padres y a mis hermanos.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Resumen</b> .....                                       | <b>iv</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....                               | <b>vi</b>   |
| <b>DEDICATORIA</b> .....                                   | <b>viii</b> |
| <b>ÍNDICE</b> .....  | <b>ix</b>   |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....                             | <b>xii</b>  |
| <b>ÍNDICE DE GRÁFICO</b> .....                             | <b>xiii</b> |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....                              | <b>xiv</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....                                  | <b>xv</b>   |
| <b>CAPÍTULO I</b> .....                                    | <b>1</b>    |
| <b>El problema</b> .....                                   | <b>1</b>    |
| Planteamiento del Problema .....                           | 1           |
| Objetivos de la investigación: .....                       | 3           |
| Objetivos específicos .....                                | 3           |
| Justificación .....  | 4           |
| <b>CAPÍTULO II</b> .....                                   | <b>7</b>    |
| <b>MARCO TEÓRICO</b> .....                                 | <b>7</b>    |
| Antecedentes de la investigación .....                     | 7           |
| Bases teóricas .....                                       | 9           |
| Espermatogenia .....                                       | 9           |
| Formación del espermatozoide .....                         | 10          |
| Factores hormonales que estimulan la espermatogonias ..... | 11          |
| Maduración del espermatozoide en el epidídimo .....        | 11          |
| Fisiología de la eyaculación masculina .....               | 12          |
| Espermograma .....   | 14          |
| Toma de la muestra .....                                   | 15          |
| Parámetros macroscópicos del espermograma .....            | 17          |
| Apariencia .....   | 17          |
| Licuefacción .....   | 17          |
| Volumen .....  | 22          |
| Viscosidad o consistencia .....                            | 22          |
| PH .....   | 22          |
| Parámetros microscópicos del espermograma .....            | 23          |

|   |    |
|---|----|
| Motilidad .....   | 23 |
| Vitalidad .....   | 24 |
| Recuento .....  | 27 |
| Morfología .....  | 29 |
| Otros elementos celulares .....                                 | 31 |
| Aglutinación .....  | 31 |
| Factores asociados a una baja calidad del espermatozoides ..... | 32 |
| Fenómeno de Speckle .....                                       | 37 |
| Propiedades estadísticas de los patrones de Speckle .....       | 40 |
| Estadística de primer Orden .....                               | 40 |
| Estadísticas de segundo orden .....                             | 40 |
| Modelos y métodos de Procesamiento .....                        | 41 |
| Modelos Teóricos y Numéricos .....                              | 41 |
| Análisis estadísticos .....                                     | 42 |
| Método estadístico de segundo orden: THSP .....                 | 42 |
| Descriptores de actividad .....                                 | 43 |
| Diferencias Temporales .....                                    | 43 |
| Método de las diferencias temporales modificado .....           | 46 |
| Aplicaciones .....  | 47 |
| Aplicaciones agrícolas .....                                    | 47 |
| Aplicaciones Médicas .....                                      | 53 |
| Aplicaciones en muestras biológicas .....                       | 55 |
| Aplicaciones en muestras no biológicas .....                    | 55 |
| Otras aplicaciones .....  | 57 |

**CAPÍTULO III..... 59**

**MARCO METODOLÓGICO ..... 59**

|   |    |
|---|----|
| Tipo y diseño de la investigación .....         | 59 |
| Material y métodos .....                        | 59 |
| Equipos .....                                   | 59 |
| Fuente de luz coherente: .....                  | 59 |
| Microscopio óptico: .....                       | 60 |
| Mesa Óptica: .....                              | 60 |
| Medidor de potencia: .....                      | 61 |
| Refractómetro: .....                            | 61 |
| Cámara CCD: .....                               | 62 |
| Computadora: .....                              | 63 |
| Baño de María: .....                            | 63 |
| Miscelaneos utilizados en el experimento: ..... | 63 |
| Muestra .....                                   | 64 |

|   |            |
|---|------------|
| Adquisición de datos .....                  | 65         |
| <b>CAPÍTULO V .....</b>                     | <b>71</b>  |
| <b>Resultados y discusiones .....</b>       | <b>71</b>  |
| <b>CAPÍTULO V .....</b>                     | <b>107</b> |
| <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b> | <b>107</b> |
| Conclusiones: .....                         | 107        |
| Recomendaciones: .....                      | 115        |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>     | <b>117</b> |
| <b>Apéndice .....</b>                       | <b>124</b> |
| <b>Apéndice A .....</b>                     | <b>124</b> |
| Consentimiento informado .....              | 124        |
| <b>Apéndice B .....</b>                     | <b>126</b> |
| Ficha por Muestra .....                     | 126        |

www.bdigital.ula.ve

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Proceso de formación del espermatozoide (Guyton & Hall, 2003). .....   | 9  |
| Figura 2. Componentes principales del espermatozoide (Bhasin & Jameson, 2003).<br>.....  | 10 |
| Figura 3. Anatomía de la eyaculación masculina (Cruz & San Juan, 2012). .....  | 12 |
| Figura 4. Imágenes de escaneado de semen humano antes y después de la licuefacción. Las muestras se fijaron a (A-D) 3 min, (E-F) 6 min y (G-H) 15 min después de la eyaculación. Las imágenes de (G-H) se tomaron de las muestras inmediatamente después de la licuefacción. (A) 30× aumentos, (B) 600×, (C) 3000×, (D) 2875×, (E) 1200×, (F) 3100× y (H) 1200×. S, espermatozoide. (A-C) y (E-H) licuefacción normal; (D) licuefacción lenta (Anamthathmakula & Winuthayanon, 2020).<br>..... | 18 |
| Figura 5. Variación de la intensidad en función del tiempo (Leal, 2020). .....   | 21 |
| Figura 6. Cámara de Neubauer. ....   | 27 |
| Figura 7. Representación esquemática de algunas anomalías de los espermatozoides (Toro, 2009). .....   | 30 |
| Figura 8. Proceso de evaluación de la morfología del espermatozoide (Bhasin & Jameson, 2003). .....  | 31 |
| Figura 9. Aglutinación del semen (Guyton & Hall, 2003). .....  | 31 |
| Figura 10. Método de las diferencias temporales modificado (Leal, 2020). .....   | 46 |
| Figura 11. Láser de 532 nm. ....   | 59 |
| Figura 12. Microscopio Nikon SBR-kt (Patiño, 2021). .....  | 60 |
| Figura 13. Microscopio Leica. ....   | 60 |
| Figura 14. Mesa óptica ThorLabs (Santos, 2023). .....  | 61 |
| Figura 15. Refractómetro RRA, A21341–cc J-257. ....  | 62 |
| Figura 16. Cámara CCD ThorLabs (Patiño, 2021). .....   | 63 |
| Figura 17. Thermo scientific Neslab RTE 10. ....   | 63 |
| Figura 18. Montaje experimental speckle. ....  | 66 |
| Figura 19. Interfaz gráfica en Matlab para el análisis por el método de las diferencias temporales modificado. ....  | 67 |
| Figura 20. ....  | 68 |
| Figura 21. ....  | 68 |
| Figura 22. ....  | 69 |
| Figura 23. Esquema del protocolo empleado para la adquisición de los datos. ....   | 70 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| Gráfico 1. Intensidad vs. t, muestra M1 Speckle. ....        | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 2. Intensidad vs. t, muestra M3 Speckle. ....        | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 3. Intensidad vs. t, muestra M4 Speckle. ....        | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 4. Intensidad vs. t, muestra M5 Speckle. ....        | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 5. Intensidad vs. t, muestra M8 Speckle. ....        | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 6. Intensidad vs. t, muestra M10 Speckle. ...        | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 7. Intensidad vs. t, muestra M11 Speckle. ...        | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 8. Intensidad vs. t, muestra M12 Speckle. ...        | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 9. Intensidad vs. t para todas las muestras Speckle. | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 10. Pmed vs. t M1. ....                              | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 11. Pmed vs. t M3. ....                              | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 12. Pmed vs. t M4. ....                              | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 13. Pmed vs. t M5. ....                              | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 14. Pmed vs. t M6. ....                              | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 15. Pmed vs. t M8. ....                              | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 16. Pmed vs. t M9. ....                              | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 17. Pmed vs. t M10. ....                             | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 18. Pmed vs. t M11. ....                             | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 19. Pmed vs. t M12. ....                             | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 20. Pmed vs. t para todas las muestras. ....         | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 21. M1 Normalizado. ....                             | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 22. M3 Normalizado. ....                             | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 23. M4 Normalizado. ....                             | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 24. M6 Normalizado. ....                             | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 25. M6 Normalizado. ....                             | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 26. M8 Normalizado. ....                             | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 27. M9 Normalizado. ....                             | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 28. M10 Normalizado. ....                            | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 29. M11 Normalizado. ....                            | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |
| Gráfico 30. M12 Normalizado. ....                            | <b>;Error! Marcador no definido.</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Tabla 1. Valores de referencia (1999) y los nuevos (2010) del límite de referencia inferior (LRI) en espermiograma; entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza del 95% (OMS,2021)..... | 35                                   |
| Tabla 2. Datos generalas y variables macroscópicas.....   | 71                                   |
| Tabla 3. Medidas de Speckle.....  | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |
| Tabla 4. Medidas de Pmed.....   | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |
| Tabla 5. Medidas de speckle.....  | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |
| Tabla 6. Medidas de Speckle Normalizado.....  | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |
| Tabla 7. Medidas de Pmed.....   | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |
| Tabla 8. Medidas de Pmed normalizado.....   | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, poco se ha avanzado en el conocimiento de la etiología y la fisiopatología reproductiva masculina. Esto debido en parte al advenimiento de distintos procedimientos que han facilitado el proceso reproductivo en una pareja aquejada de problemas de fertilidad (Uribe, 2008) , por lo tanto, es necesario un conocimiento detallado del proceso reproductivo, comenzando por el estudio amplio del líquido seminal (Avalos, González, Vargas, & Herrera, 2018).

La caracterización del semen utilizado en inseminación artificial (IA), es uno de los principales intereses de la biotecnología de la reproducción. La evaluación del líquido seminal (LS) se realiza a través de una serie de pruebas de laboratorio estandarizadas, utilizando pruebas macroscópicas: tiempo de licuefacción (TL), color, volumen, viscosidad, pH; y microscópico: concentración, motilidad, viabilidad, aglutinación, morfología, evaluación celular, entre otros (Leal, 2020).

El análisis del semen debe considerarse importante, ya que este aporta información sobre el estado clínico del individuo, además de las aplicaciones clínicas que lleva consigo (reproducción). Por lo tanto, conviene mencionar que la mayoría de las pruebas tienen una variabilidad, estabilidad considerable, y es multifactorial, se debe a fallas en la técnica, el uso de reactivos y 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 (OMS, 2001).

Actualmente, no existe un análisis ideal que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal; muchos han sido los procedimientos de reproducción no exitosos, en gran parte, por falta de análisis detallado de la muestra, por lo que se plantea el uso del Speckle dinámico (SD) para evaluar la calidad espermática, implementando nuevos métodos de análisis más eficientes, por lo que es necesario la evaluación de múltiples parámetros que pueden ser medidos a través de esta técnica óptica (Leal, 2020).

El análisis del semen es la base de las investigaciones de infertilidad masculina, sugiriendo que hay una relación entre el tiempo de licuefacción 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).

Al conocerse con precisión el parámetro del TL del semen, se pueden encontrar parámetros de ajustes, que pueden caracterizar el estado reproductivo de la especie en estudio. Por esta razón, se propone el Speckle láser dinámico (DLS) con el fin de evaluar de forma más precisa que la convencional, el TL de muestras de semen fresco, al mismo tiempo que se evalúa los comportamientos del líquido seminal, a saber, parámetros macroscópicos y microscópicos (Leal, 2020).

El speckle es una técnica óptica que se usa en varias aplicaciones en biología, medicina e industria. Recientemente, se han desarrollado nuevas aplicaciones y algoritmos de cálculo en el uso de esta técnica. Se introdujeron nuevos descriptores para el análisis de patrones de puntos de baja actividad, la exploración de patrones espacio-temporales mediante análisis de componentes principales y la segmentación de imágenes mediante mapas autoorganizados (Carvalho, y otros, 2019).

La técnica de Speckle dinámico se ha aplicado a estudios de quimiotaxis de bacterias, en hidrocarburos, determinación de la dureza en semillas de maíz, caracterización de porcelanas de interés en electrotecnia, procesos de hidro-adsorción en superficies de arcilla para aplicaciones de catálisis, y mediciones de contracción durante la fotopolimerización de resinas utilizadas en odontología, dermatológica y estética, además con un amplio uso en la aplicabilidad clínica (Aizu & Asakura, 1991).

En este trabajo, se discute los conceptos básicos de la técnica (DLS) y los equipos para el procedimiento experimental utilizado. Además, se profundiza en la importancia de la muestra y en la opción que representa el uso del método Speckle dinámico como un método preciso de evaluación del semen.

Por tal motivo, esta investigación se basa en el empleo del speckel dinámico en la evaluación temporal del proceso de licuefacción de muestras de semen fresco; partiendo de investigaciones realizadas en las que se ha determinado que el speckel dinámico es un método preciso no invasivo, en el que la muestra sometida a estudio no sufre modificaciones, ya que la potencia incidente del haz de luz no afecta la naturaleza del semen. La evaluación se lleva a cabo a través de métodos cuantificables por medio de un código escrito en Matlab, diseñando una interfaz gráfica propia.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **CAPÍTULO I**

### **El problema**

#### **Planteamiento del Problema**

El avance de la andrología ha permitido recopilar una gran cantidad de información y conocimientos sobre los espermatozoides, incluyendo sus propiedades estructurales, funcionales y metabólicas, así como los factores hormonales que regulan su producción. También se ha profundizado en el estudio de las glándulas suprarrenales y sus funciones, y en la compleja secuencia de eventos necesarios para lograr la reproducción (Calamera, Introducción al estudio del espermatozoide, 1992).

Se han realizado numerosos estudios sobre crioconservación, fertilidad y enfermedades que afectan la reproducción. Por ello, es crucial examinar las características macroscópicas y microscópicas del semen (Márquez, 2020), a entenderse como un fluido espeso y de color blanquecino, que está compuesto por un líquido en el que se encuentran en suspensión los espermatozoides; es producido por varias glándulas del sistema reproductor masculino, principalmente la próstata y los testículos, excretándose con la eyaculación (Teppa & Palacios, 2003).

Cabe mencionar que el estudio de una muestra de semen es amplio; existen patrones microscópicos y macroscópicos que deben ser analizados. Entre ellos, la célula espermática y su morfología, motilidad, vitalidad, presencia de leucocitos, densidad, pH, volumen, viscosidad, y licuefacción, entre otros (Calamera, 1992).

Después de la eyaculación, las muestras de esperma se licuan, y este fenómeno comienza a aparecer al cabo de unos pocos minutos. El motivo de este fenómeno es el siguiente: la próstata secreta una enzima llamada fibrolisina, que actúa desintegrando la fibrina y destruyendo el coágulo. Dando lugar a la licuefacción del semen (Márquez, 2020).

El semen se coagula casi inmediatamente después de la eyaculación, para nuevamente licuarse 15 a 20 minutos después por acción del antígeno específico de próstata. Una muestra de semen normal se licuefacción en aproximadamente unos 15 minutos, a temperatura ambiente. Si transcurrida una hora, la licuefacción no se produce, puede ser necesario un tratamiento adicional al momento de procesar la muestra de semen, añadiendo una enzima proteolítica que facilite la rotura de enlaces peptídicos por reacciones hidrolíticas, diluyendo y homogeneizando la muestra de semen con medio de cultivo o mezclando la muestra mecánicamente (Brugo, Chillik, & Kopelman, 2002).

Por otro lado, alteraciones en la licuefacción o tiempo de licuefacción podrían indicar mal funcionamiento de las vesículas seminales o próstata que participan en el fenómeno de coagulación-licuación del semen, respectivamente (Márquez, 2020). Por tal motivo, conviene desarrollar estudios que permitan analizar las variaciones temporales en el proceso de licuefacción de muestra de semen; existen distintos métodos para medir el tiempo en que el semen vuelve a su estado líquido, uno de ellos es el método Speckle dinámico.

Cuando un haz de luz coherente se refleja o pasa a través de un medio con un índice de refracción no uniforme, se obtiene una distribución estadística de la radiación luminosa denominada patrón moteado o speckle (Xu, Joenathan, & Khorana, 1995). Estos patrones se utilizaron ampliamente, por ejemplo, en la medición de desplazamientos, deformaciones, entre otros. (Sarohi, 1993).

Una de las aplicaciones más nuevas de los patrones de moteado es el estudio de la evolución de los sistemas biológicos, donde la técnica se llama Biospeckle o Speckle dinámico (Xu, Joenathan, & Khorana, 1995). Algunos ejemplos de aplicaciones del Biospeckle en sistemas biológicos se encuentran en el análisis de especies botánicas, en la evaluación de la motilidad del esperma congelado de bovino (Carvalho, Barreto, Braga Jr, & Rabelo, 2009), en el conteo de células en la sangre (Serra, 2002), en el estudio de las células del endotelio en la córnea (Ayala, Díaz, & Martínez, 2001). También estas técnicas han sido aplicadas para medir la presencia de hongos en especies de frijoles, tal como reportaron (Braga Jr, y otros, 2005).

En estudios patológicos esta técnica ha sido también recurrida, ya que permite estudiar las actividades biológicas en especies de lento crecimiento, tal como el Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Jardim, Santiago, Machado, Aarestrup, de Mendonça, & Lesche, 2003). Otro trabajo publicado muestra la existencia de una relación entre el cambio del índice de refracción y la concentración bacteriana dado por (Machado, y otros, 2008), quienes lograron medir la constante de tiempo del crecimiento bacterial.

El método Speckle dinámico ha sido aplicado en estudios de fluidos, para fines varios, es por ello que con esta investigación 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 de la especie humana. Se propone el uso del Speckle dinámico (SD) para el análisis de la calidad de muestras de semen fresco, con un láser de 532 nm, con una potencia variable hasta 3W, para cuantificar los cambios de la intensidad mediante una modificación del método de las diferencias temporales (Leal, 2020).

Por lo tanto, la presente investigación pretende profundizar en el tema a través de la siguiente interrogante: ¿La variación temporal del proceso de licuefacción del semen puede ser evaluada a través del Speckle dinámico?

### **Objetivos de la investigación:**

#### **Objetivo General**

Evaluar la evolución temporal del proceso de licuefacción en muestras de semen fresco mediante speckel dinámico.

#### **Objetivos específicos**

1. Diseñar un procedimiento para la evaluación temporal del proceso de licuefacción en muestras de semen fresco mediante Speckel dinámico.
2. Evaluar el proceso de licuefacción de semen a través del método de las diferencias temporales modificado.

3. Comparar los resultados obtenidos del procesamiento de los videos para establecer las relaciones estadísticas entre las variables evaluadas.

### **Justificación**

El análisis de líquido seminal y su aporte al diagnóstico de la infertilidad, ha sido tema de estudio en distintas áreas, ya que existe una gran demanda de parejas que se apoyan en técnicas in vitro para procrear (Jardim, Santiago, Machado, Aarestrup, de Mendonça, & Lesche, 2003). Con el advenimiento de las técnicas de reproducción asistida, muchas parejas afectadas por un factor masculino de infertilidad han logrado sus objetivos reproductivos. Adicionalmente, ya desde hace tiempo estos estudios clínicos no son realizados por especialistas adecuadamente entrenados, limitándose en muchos lugares a la valoración del espermograma. La fertilidad puede ser afectada por la presencia de alteraciones en la salud del hombre y pueden ser tratadas directamente, sin considerar causas simples como las infecciones o la exposición a gonadotoxinas, o calidad del líquido seminal, que se pueden beneficiar de un tratamiento sencillo y de bajo costo (Teppa y Palacios, 2004) (Teppa & Palacios, 2004).

Indudablemente, existen herramientas terapéuticas, que permiten alcanzar las metas reproductivas de algunos varones en ausencia de un diagnóstico etiológico y fisiopatológico; no obstante, la realización de una investigación andrológica integral permite crear métodos de tratamiento especiales, que en muchos casos facilitan la concepción de forma natural (González, 1992).

Según Teppa y Palacios (2004), la comprensión de los eventos fisiológicos de la fertilidad masculina establece una estructura organizacional lógica y práctica para tratar con las causas de infertilidad en varones sobre la base de la fisiopatología. La variedad de enfermedades que causan la infertilidad masculina subraya la heterogeneidad de la infertilidad y la necesidad de una evaluación clínica integral. El análisis de semen suele ser el primer signo de que un hombre contribuye a la infertilidad en una pareja. Por lo tanto, el estudio del semen debe ser considerado como el primer paso para descartar anomalías en la capacidad reproductiva de la población masculina.

El análisis del semen es una de las primeras pruebas que se realizan para evaluar la fertilidad de un hombre y ayuda a determinar si la infertilidad es causada por un problema con la producción o la calidad del esperma. En el estudio del líquido seminal se considera el volumen, pH, concentración, movilidad progresiva, morfología, vitalidad espermática y licuefacción. La OMS en el año 2010 estableció estos parámetros y acordó rangos referenciales para cada uno, por lo tanto, el estudio del semen implica un trabajo complejo en el que se involucran distintas áreas de la ciencia.

Por este motivo, se introduce el uso del método Speckle dinámico, a través del análisis del método LSCI (*Laser speckle contrast imaging*), como una técnica óptica y no invasiva que permite monitorear la dinámica de un sistema, independientemente de la naturaleza que lo origine al ser combinado con algoritmos multivariantes, funcionan como una herramienta accesible, prácticamente para cualquier usuario que ya cuente con un sistema LSCI (Arias, 2019).

En el logro de los objetivos en esta investigación, se plantea el análisis e implementación de algoritmos de procesamiento de imágenes de Speckle que permitan medir la evaluación temporal del proceso de licuefacción de muestras de semen fresco, esto se origina cuando la luz interactúa con estructuras que cambian en el tiempo (flujo sanguíneo, líquido seminal), generando fluctuaciones en la intensidad del patrón de Speckle debido a las variaciones en la fase de la luz. Este patrón se genera cuando una superficie ópticamente rugosa (en este caso, semen fresco) es iluminada con luz coherente. La luz esparcida presenta una distribución de intensidad particular, la cual consiste en puntos brillantes y oscuros de formas variables, distribuidos aleatoriamente; asimismo, se procede a evaluar el tiempo preciso en el que el semen vuelve a su estado líquido expresado en horas, minutos y segundos.

De lo expuesto, se deduce que el método Speckle dinámico es considerado una técnica no invasiva que pudiera aportar información clínica, sobre el estado de salud actual del individuo, sin afectar la condición del paciente; contribuyendo en el estudio de fluidos biológicos, como es el caso del semen

fresco, como herramienta eficaz para evaluar los aspectos macroscópicos y microscópicos del líquido seminal.

Se estima que el problema de infertilidad en las parejas está asociado a un 40% debido a infertilidad en los hombres y un 60% de infertilidad en las mujeres. Esto basado en algunos factores asociados a una baja calidad de esperma, el más resaltante y en primer lugar sin duda alguna está la contaminación industrial, como es bien sabido, esta juega un papel importante en la salud de la sociedad mundial y la reproducción de las especies no escapa de este factor, ya que la oligospermia se encuentra localizada en las comunidades con más industrialización haciendo notorias las alteraciones en la concentración del semen, donde estas alteraciones pueden originarse incluso antes del nacimiento de los varones. Este tipo de contaminación es fácil encontrar en los alimentos y medio ambiente por nombrar los más sobresalientes. Por otro lado, también se puede ver afectada la formación de los testículos del feto que por consiguiente altera la formación de los espermatozoides y provocando a su vez una reducción de la concentración espermática (Levine , y otros, 2017).

En el año 2017 la revista Oxford University Press publicó un artículo que ha sido ampliamente citado y revisado donde muestra tendencias temporales en el conteo de espermatozoides a nivel mundial, donde se reporta una muy fuerte disminución en la concentración de espermatozoides. En norte América, Europa, Australia, Nueva Zelanda, pero muy poco se ha publicado en América del sur, centro América, Asia y África para tener una conclusión sobre las tendencias en estos continentes. Para el año 1973 hasta el 2017 hubo una disminución en la concentración de espermatozoides de 1,16% cada año. A partir del 2018 hasta 2022 la disminución de espermatozoides fue de 2,64% por cada año, lo que permite apreciar que si no se hace algún cambio en el estudio de la calidad espermática la población mundial estaría en riesgo (Levine, y otros, 2023).

Es por ello que se plantea la idea de desarrollar un método para evaluar la calidad espermática debido a la relación que existe entre el tiempo de licuefacción y la calidad del semen.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Antecedentes de la investigación

Carvalho, Braga y col. (2009) afirman que la evaluación de la motilidad es un paso necesario en el análisis de semen por los centros de inseminación artificial, tal que, la motilidad es un aspecto importante en el estudio del líquido seminal, relacionado con la fertilidad de los espermatozoides; un método generalizado para evaluar el movimiento progresivo y la velocidad de los espermatozoides es la microscopía óptica. Las limitaciones de los métodos rutinarios desplegaron nuevos enfoques de evaluación, principalmente en ramas ópticas.

Los autores aseveran que la incidencia de la luz láser sobre especímenes que exhiben actividad biológica, genera una imagen de interferencia llamada biospeckle, que se ha utilizado para investigar distintas actividades como en plantas, animales y seres humanos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la cinética de semen congelado de especies bovinas, comparando la actividad con microscopía óptica y con análisis de biospeckle. La metodología se enmarcó en treinta muestras que se descongelaron, posteriormente el semen se iluminó con láser He-Ne justo después de la evaluación con microscopía óptica. Las imágenes de biospeckle se procesaron utilizando un enfoque estadístico de segundo orden obteniendo un valor resumen denominado momento de inercia. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando correlación de Spearman y diagramas de caja. El enfoque momento de inercia se correlacionó ( $r = 0,904$ ) con velocidad de los espermatozoides ( $p < 0,0001$ ). Además, el porcentaje de motilidad y movilidad de los espermatozoides.

La concentración de espermatozoides presentó correlación positiva ( $r = 0,977$ ;  $r = 0,815$ ; respectivamente,  $p < 0,0001$ ), evidenciando coherencia entre las características de actividad seminal y los valores de momento de inercia. La

concentración de las células espermáticas no influyó en los valores de momento de inercia ( $r = 0,262$ ;  $p > 0,05$ ). Estos datos indican que el sistema de láser biospeckle debe considerarse una herramienta confiable para la evaluación de la motilidad del semen que contribuye como método alternativo a la investigación de la fertilidad de los espermatozoides.

Por su parte, Leal (2020) en su investigación titulada Nuevo método para determinar el tiempo de licuefacción en semen fresco mediante Speckle dinámico, presenta que el tiempo líquido (TL) juega un papel importante en la reproducción, es un indicador del estado clínico de la función prostática, refleja la función de las gónadas adicionales, porque cuando el TL aumenta, la movilidad disminuye significativamente. El TL también se puede utilizar para la detección del cáncer de próstata porque existe una correlación entre el valor del antígeno prostático específico y el TL. Con este estudio, el autor se planteó desarrollar nuevos métodos estandarizados de análisis, que permitan la evaluación del líquido seminal, teniendo mayor precisión y exactitud, con el objetivo de mejorar el proceso reproductivo de cualquier especie. Se propuso 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 propuesto en esta investigación.

El procesamiento de los videos obtenidos se realizó con una interfaz gráfica desarrollada en Matlab, se obtuvo una función de tipo exponencial de primer orden con un  $R^2 = 0,98$ . Se planteó 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 obtuvo un valor de  $T_L = 15,66 \pm 0,27 \text{ min}$ , donde se contrasta con la técnica de la observación visual, sin utilizar ningún tipo de reactivos.

Leal (2020) concluyó que, a diferencia de la observación convencional para medir el tiempo de licuefacción del semen, el método Speckle 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.

## Bases teóricas

El análisis del semen o espermograma es una prueba de laboratorio simple y de gran importancia para la evaluación de infertilidad en las parejas, el estudio de enfermedades genitales masculinas, otras patologías causadas por la exposición a productos químicos, factores ambientales, medicamentos, entre otros. El espermograma básico valora las características generales del semen, como son la apariencia, volumen, viscosidad, número de espermatozoides, motilidad, morfología, vitalidad, así como la presencia de eritrocitos y/o leucocitos. El recuento y la motilidad de los espermatozoides son útiles para determinar si hay suficientes espermatozoides para alcanzar un óvulo y fertilizarlo, mientras que la morfología de los espermatozoides es el parámetro del espermograma más estrechamente relacionado con la fertilidad (Agarwal, y otros, 2021).

## Espermatogonia

Durante la formación del embrión, las células germinales primordiales emigran hacia los testículos y se convierten en células germinales inmaduras llamadas espermatogonias (ver Figura 1) que comienzan a dividirse por mitosis a partir de la pubertad y continúan proliferando y diferenciándose para formar espermatozoides (Guyton & Hall, 2003).

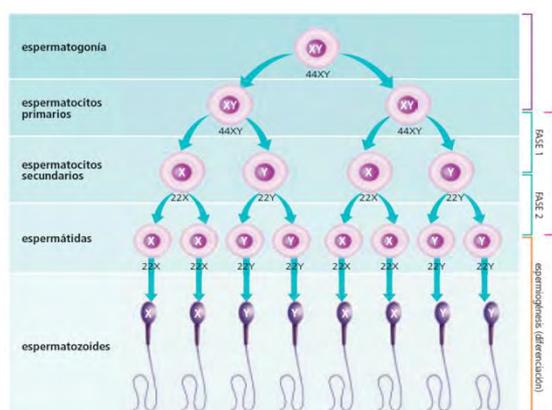


Figura 1. Proceso de formación del espermatozoide (Guyton & Hall, 2003).

La espermatogonia tiene lugar en todos los túbulos seminíferos durante la vida sexual activa, comenzando por término medio a los 13 años y continuando durante el resto de la vida y disminuye notablemente en la vejez. En la primera fase, las espermatogonias emigran hacia la luz central del túbulo seminífero entre las células de Sertoli, atraviesan la barrera y penetran en la capa de células de Sertoli, se modifican y aumentan de tamaño para formar espermatocitos primarios grandes, que se dividen para formar dos espermatocitos secundarios. Al cabo de unos pocos días, estos espermatocitos se dividen a su vez para formar espermatides, que tras estas modificaciones acaban convirtiéndose en espermatozoides ( Balitán, Blanco, & Hernández, 2018).

Durante la etapa de modificación, desde la fase de espermatocito a la de espermatide, los 46 cromosomas (23 pares de cromosomas) del espermatocito se reparten, de manera tal que, 23 cromosomas van a una espermátida y los otros 23 a la otra. También hace que los genes cromosómicos se dividan de modo que, solo la mitad del material genético del feto potencial proviene del padre y la otra mitad del óvulo de la madre. Todo el período espermatogénico dura unos 74 días (Guyton & Hall, 2003).

### Formación del espermatozoide

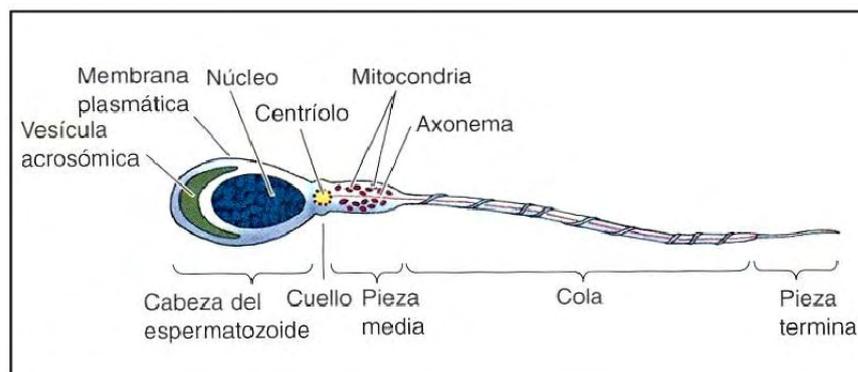


Figura 2. Componentes principales del espermatozoide (Bhasin & Jameson, 2003).

Cuando se forman los espermatozoides, tienen las características de células epiteliales y pronto cada espermatide se alarga para formar espermatozoides, cada uno de los cuales consta de una cabeza y una cola (ver Figura 2). La cabeza está formada por un núcleo celular cubierto por una fina

capa de citoplasma y una membrana celular que rodea su superficie. Delante de la cabeza se encuentra el acrosoma, que consta principalmente del aparato de Golgi y contiene diversas enzimas necesarias para el funcionamiento del espermatozoide y la fertilización del óvulo (Guyton & Hall, 2003).

La cola del espermatozoide tiene tres componentes principales: 1) un esqueleto central denominado axonema; 2) una fina membrana celular que reviste el axonema; y 3) una serie de mitocondrias que rodean el axonema de la porción proximal de la cola. El movimiento flagelar determina la motilidad del espermatozoide. Este movimiento es el resultado del deslizamiento longitudinal del axonema. La energía necesaria para este proceso procede del ATP (Adenosín Trifosfato o Trifosfato de Adenosina) sintetizado por las mitocondrias del axonema (Bhasin & Jameson, 2003).

### **Factores hormonales que estimulan la espermatogonias**

- La testosterona es indispensable para el crecimiento y división de las células germinales testiculares.
- La hormona luteinizante, estimula la secreción de testosterona por las células de Leyding.
- La hormona foliculoestimulante estimula a las células de Sertoli.
- Los estrógenos formados a partir de la testosterona por las células de Sertoli.
- La hormona del crecimiento promueve la división temprana de las propias espermatogonias (Bhasin & Jameson, 2003).

### **Maduración del espermatozoide en el epidídimo**

Luego de su formación en los túbulos seminíferos, los espermatozoides tardan varios días en recorrer el epidídimo, siendo este un tubo de 6 m de largo. Los espermatozoides extraídos de los túbulos seminíferos y de las primeras porciones del epidídimo son poseen motilidad, por lo tanto incapaces de fecundar un óvulo. Sin embargo, tras haber permanecido en el epidídimo entre 18 y 24 h, desarrollan la capacidad de motilidad, aunque un conjunto de proteínas inhibitoras del líquido del epidídimo, impiden el movimiento real hasta después de la eyaculación (Guyton & Hall, 2003).

## Fisiología de la eyaculación masculina

El aparato genital masculino consta (ver Figura 3), entre otros elementos, de un sistema secretor, responsable de la formación del eyaculado, el sistema excretor y la vía seminal, que permite la expulsión del semen. Se debe analizar, en primer lugar, algunos aspectos clínicamente relevantes del eyaculado para, posteriormente, hablar de los fenómenos propiamente relacionados con la eyaculación.

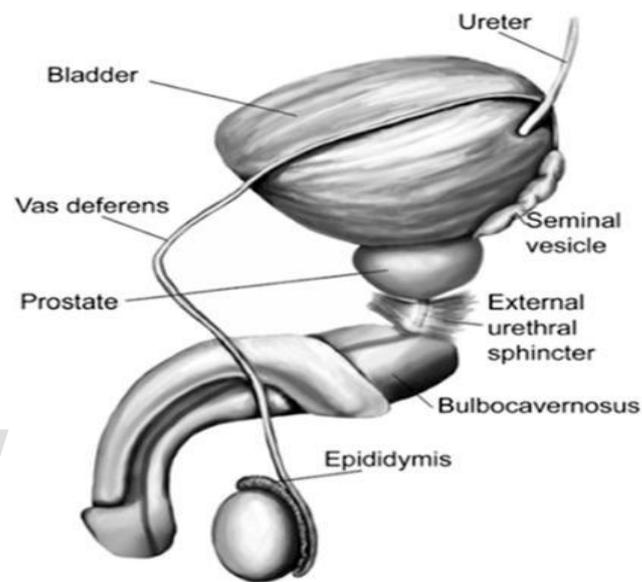


Figura 3. Anatomía de la eyaculación masculina (Cruz & San Juan, 2012).

La eyaculación es la expulsión de espermatozoides a través de la uretra, debido a las contracciones de los músculos pélvicos y al peristaltismo uretral, que suelen ocurrir durante el orgasmo. Es un reflejo complejo, que a su vez consta de dos fases diferenciadas: salida y eyección. La fase de emisión se caracteriza por la secreción de líquido seminal desde las glándulas accesorias (vesículas seminales y próstata) hacia la uretra prostática. Durante la fase de expulsión, las mencionadas contracciones rítmicas uretrales y perineales, junto con una perfecta sincronización de los esfínteres interno y externo, dan lugar a la eyección forzada del semen a través del meato uretral (Hellstrom, 2006).

El producto final de la eyaculación suele ser un volumen medio de 3-4 ml, que varía según la persona y el intervalo de eyaculación. Por tanto, cuanto más frecuente sea la eyaculación, menor será la cantidad. Más del 90% de este volumen en la eyaculación normal corresponde al plasma seminal, que

proceden principalmente de las glándulas accesorias y menor al 10% corresponde a los espermatozoides. Los testículos, donde tiene lugar la espermatogénesis, representan solo entre el 10 y el 15% del volumen de la eyaculación. Las vesículas seminales constituyen entre el 40 y el 80% del volumen total y son ricas en prostaglandinas y fructosa, el principal azúcar del semen. También produce y secreta pequeñas cantidades de pigmento amarillo (principalmente flavinas), que dan al esperma una fuerte fluorescencia bajo la luz ultravioleta, lo cual es de importancia médica. La proporción de la próstata en el volumen total de la eyaculación es del 10 al 30%. El líquido prostático contiene muchas enzimas (fosfatasas) y ácido cítrico. La glándula prostática produce fosfato de espermina, un compuesto de poliamina que abunda en el semen humano. A medida que el esperma se enfría y comienza a secarse, esta sustancia forma cristales de Böttcher (Cruz & San Juan, 2012).

El plasma seminal es rico en azúcares, glicanos, lípidos, iones inorgánicos, metabolitos, ADN libre de células, microARN, péptidos y proteínas, que son secretados por las vesículas seminales, la próstata, el epidídimo y las glándulas bulbouretrales. Las vesículas seminales son ricas en semenogelinas (SEMG), fibronectina, prostaglandinas, citocinas y fructosa, mientras que las secreciones prostáticas son ricas en enzimas proteolíticas, citrato y lípidos. El semen tiene un pH alcalino (7,2-8,0) procedente de las vesículas seminales y las secreciones prostáticas que contienen poliaminas básicas como la espermina, la spermidina y la putrescina, que contrarrestan la acidez vaginal y son importantes para la supervivencia de los espermatozoides. Las secreciones de las glándulas bulbouretrales (contienen mucinas, galactosa, ácido siálico) actúan como lubricantes permitiendo una transferencia espermática eficiente. Las proteínas del plasma seminal desempeñan un papel importante en la coagulación del semen, la motilidad espermática, la capacitación, la reacción acrosómica y la supresión de la actividad inmunitaria en el tracto reproductor femenino (Anamthathmakula & Winuthayanon, 2020).

El líquido seminal está constituido por las excreciones de las vesículas seminales y la próstata principalmente, siendo conformado por un conjunto de azúcares, proteínas, ácidos grasos, entre otros. Identificándose la fructosa, semenogelina, prostaglandina, aminoácido, fósforo, potasio, ácido fólico y

hormonas. En el caso de la próstata, conformado por el ácido cítrico, colesterol, fosfolípidos, carnitina, fosfatasa alcalina, calcio, zinc, magnesio, sodio, potasio, cloro y enzimas. Todas interactuando en el proceso de licuefacción.

Según los autores, el último elemento que se agrega al semen es un fluido que secretan las glándulas uretrales:

- **Glándulas de Cowper.** Están situadas a ambos lados de del bulbo uretral. Aportan la secreción mucosa al semen. Secretan un líquido rico en mucoproteínas que facilita la lubricación de la uretra.

- **Glándulas de Littré.** Son un conjunto de glándulas extendidas a lo largo de la mucosa uretral, también con una secreción lubricante.

- **Constitución del líquido seminal % de componentes.**

### **Espermograma**

El espermograma tiene como finalidad evaluar el líquido seminal y los espermatozoides. Las principales indicaciones incluyen la evaluación de la función reproductiva masculina, el examen de la pareja infértil y la recuperación de esperma después de la vasectomía o la reversión de la vasectomía. Se utiliza clínicamente como prueba de detección de infertilidad y para determinar su causa probable. La combinación de varios de sus parámetros tiene mayor valor predictivo que el uso de los parámetros individuales ( Balitán, Blanco, & Hernández, 2018).

El espermograma tiene sus limitaciones, y el más importante de ellos es la variación de los parámetros en una misma persona. Así, muestras recogidas de un mismo individuo en las mismas condiciones y durante el mismo período de abstinencia pueden mostrar variaciones en todos los parámetros. Por ello, se recomienda realizar al menos dos espermogramas de muestras diferentes antes de realizar un diagnóstico definitivo ( Balitán, Blanco, & Hernández, 2018).

## **Toma de la muestra**

De acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2001) la muestra para el espermograma se debe tomar siguiendo las siguientes normas:

El paciente debe recibir una hoja de instrucciones claramente escrita sobre la recolección de esperma y su entrega al laboratorio (OMS, 2001). Lo ideal es que la muestra se tome después de dos días y no más de siete días de abstinencia sexual. El nombre del paciente, la hora de la detención, la fecha y la hora de recogida deben anotarse en el formulario que acompaña a cada análisis de esperma. Se deben tomar dos muestras de esperma independientes para la evaluación inicial. El tiempo entre recogidas depende de las circunstancias, pero no debe ser inferior a siete días ni superior a tres meses. Si los resultados de estas valoraciones son muy diferentes, se deberían analizar más muestras de esperma, porque puede haber diferencias significativas en la producción de espermatozoides dentro de un mismo individuo (Guzick, y otros, 2006).

Lo ideal es que la muestra se recoja en la intimidad de una dependencia próxima al laboratorio (OMS, 2001). De lo contrario, se debe llevar al laboratorio dentro de una hora después de la recolección, y si la motilidad de los espermatozoides es anormalmente baja (menos del 25% para una motilidad rápida), se debe tomar una nueva muestra lo antes posible después de la recolección. Si se van a realizar pruebas de la función de los espermatozoides, es fundamental separar los espermatozoides del plasma seminal antes de una hora de la producción del eyaculado (Sigman & Zinni, 2009).

La muestra debe tomarse mediante masturbación y eyacularse en un recipiente limpio de vidrio o plástico de boca ancha. Al utilizar plástico se debe tener cuidado para que los espermatozoides no tengan efectos tóxicos. El recipiente debe estar tibio para minimizar el riesgo de choque por frío. Si se realiza una prueba bacteriana, el paciente debe orinar y luego lavarse y lavarse las manos y los genitales antes de recoger la muestra en un recipiente esterilizado. No se deben utilizar condones para recolectar esperma, ya que

esto puede afectar la viabilidad de los espermatozoides. Si en circunstancias especiales no es posible obtener espermatozoides mediante la masturbación, existen condones de plástico especiales para ello (OMS, 2001).

El coitus interruptus no es aceptable para la recolección de espermatozoides porque se puede perder la primera parte de la eyaculación, que generalmente contiene la mayor cantidad de espermatozoides. Además, la muestra contiene contaminación celular, bacteriológica y el pH ácido del fluido vaginal afecta negativamente la motilidad de los espermatozoides. Las muestras incompletas no se deben analizar, en particular si se pierde la primera porción del eyaculado (Guzick, y otros, 2006; Sigman & Zinni, 2009).

La muestra debe protegerse contra temperaturas extremas (al menos 20 °C y no más de 40 °C) durante el transporte al laboratorio. El recipiente debe rotularse con el nombre del paciente, la fecha y hora de la recolección, y la duración de la abstinencia (OMS, 2001).

Las muestras de espermatozoides deben analizarse a más tardar en la primera hora después de su recolección (OMS, 2001). Tenga en cuenta que las muestras de espermatozoides pueden contener patógenos infecciosos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B y el virus del herpes, por lo que deben manipularse con mucho cuidado (Bhasin & Jameson, 2003).

Algunas causas de error incluyen la forma en que se recolectó la muestra: ya sea mediante masturbación, como se debe tomar, o mediante interrupción de las relaciones sexuales; también si se recogió toda la muestra o solo una parte. Por último, hay que tener en cuenta que, aunque el espermograma arroje resultados normales, puede haber otro tipo de anomalías que son visibles solo en análisis adicionales o funcionales, especialmente cuando se trata de problemas de fertilidad. La aplicación cuidadosa de una buena técnica de laboratorio es esencial para la seguridad del operador y no puede ser reemplazada por equipo especializado (OMS, 2001).

## **Parámetros macroscópicos del espermograma**

La evaluación del espermatozoide debe realizarse lo antes posible. Los parámetros macroscópicos iniciales incluyen evaluación de la apariencia, licuefacción, viscosidad o consistencia, determinación del volumen de la muestra y pH.

### **Apariencia**

El semen tiene un aspecto homogéneo y varía del blanco al gris claro y, a veces, al amarillo en pacientes con ictericia o que toman determinadas vitaminas. El color rosa o rojo indica la presencia de sangre (hematospermia) (Bhasin & Jameson, 2003; OMS, 2001).

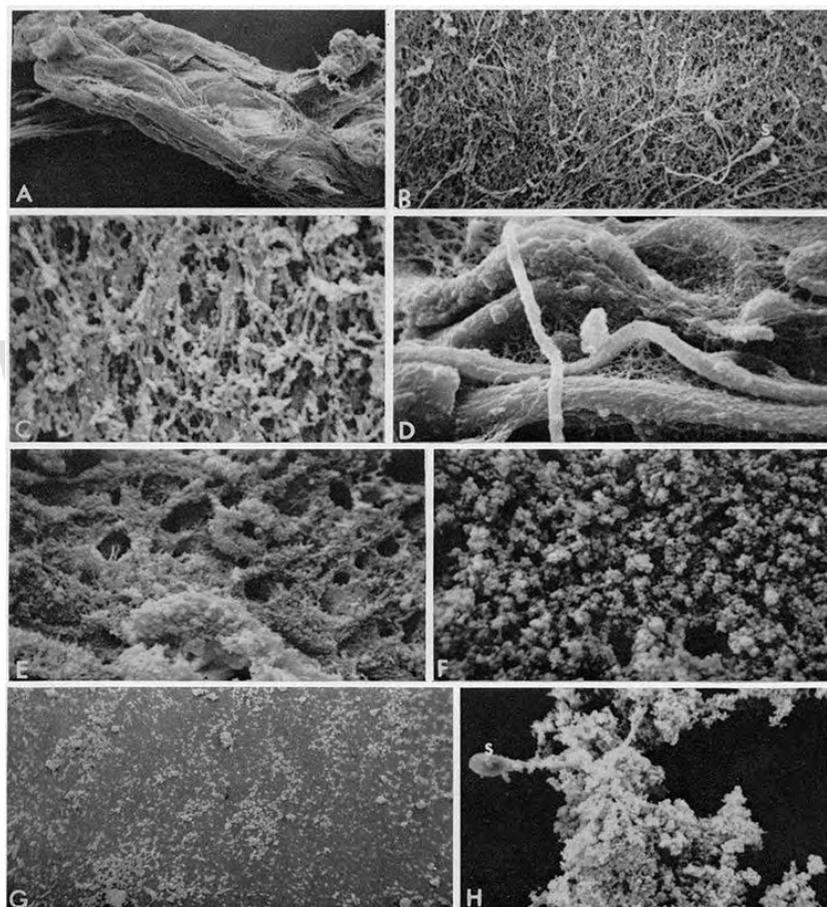
### **Licuefacción**

La licuefacción del semen es un proceso proteolítico en el que el semen eyaculado, gelatinoso, se vuelve acuoso debido a la actividad enzimática de las serina proteasas derivadas de la próstata. Este proceso facilita el transporte de los espermatozoides hacia el tracto reproductivo femenino siendo crucial para que los espermatozoides adquieran su movilidad y sean transportados con éxito al lugar de fecundación en las trompas de Falopio (Anamthathmakula & Winuthayanon, 2020) . 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 líquido seminal (Leal, 2020).

Las proteínas de la semenogelina (codificadas por los genes SEMG1 y SEMG2) son secretadas por las vesículas seminales. SEMG1 y SEMG2 son las dos proteínas principales del coágulo seminal y representan el 20-40% de las proteínas del plasma seminal. La SEMG1, una proteína predominante de 52 kDa, contiene un único residuo de cisteína en la posición 239 (Cys239) y forma puentes disulfuro intermoleculares con la SEMG2, menos abundante (existe como SEMG no glicosilada de 71 kDa y SEMG glicosilada de 76 kDa) en los residuos Cys159 y Cys360, dando lugar a SEMGs complejos de alto peso molecular. Tras la eyaculación, el semen se convierte inmediatamente en una

malla gelatinosa de SEMG reticulados. Como resultado, los espermatozoides quedan atrapados dentro del coágulo seminal (Anamthathmakula & Winuthayanon, 2020).

La licuefacción del semen a nivel molecular se caracteriza por la escisión progresiva y específica de los SEMG en proteínas solubles de bajo peso molecular en el tracto reproductor femenino. El semen humano suele licuarse entre 15 y 20 minutos después de la eyaculación (Figura 4) y es un paso necesario para otros procesos espermáticos relacionados con la fertilización, como la capacitación (Anamthathmakula & Winuthayanon, 2020).



**Figura 4.** Imágenes de escaneo de semen humano antes y después de la licuefacción. Las muestras se fijaron a (A-D) 3 min, (E-F) 6 min y (G-H) 15 min después de la eyaculación. Las imágenes de (G-H) se tomaron de las muestras inmediatamente después de la licuefacción. (A) 30x aumentos, (B) 600x, (C) 3000x, (D) 2875x, (E) 1200x, (F) 3100x y (H) 1200x. S, espermatozoide. (A-C) y (E-H) licuefacción normal; (D) licuefacción lenta (Anamthathmakula & Winuthayanon, 2020).

La licuefacción del semen involucra varios procesos metabólicos y químicos, que se pueden resumir de la siguiente manera:

El semen se compone de espermatozoides y fluido seminal, que proviene de las glándulas accesorias del sistema reproductor masculino, como la próstata, las vesículas seminales y las glándulas de Cowper. El fluido seminal contiene diversas sustancias, como proteínas, azúcares, iones, enzimas y prostaglandinas, que tienen funciones importantes para la supervivencia y el movimiento de los espermatozoides (Bhasin & Jameson, 2003).

Al momento de la eyaculación, el semen tiene una consistencia viscosa y gelatinosa, debido a la presencia de fibrinógeno y otras proteínas coagulantes, que forman una red que atrapa a los espermatozoides, como se muestra en la Figura 4. Esto evita que el semen se derrame rápidamente del tracto reproductivo femenino y protege a los espermatozoides de los cambios de pH y temperatura (Anamthathmakula & Winuthayanon, 2020).

La licuefacción del semen ocurre cuando las enzimas proteolíticas, como la fibrinolisisina y la plasmina, que también se encuentran en el fluido seminal, degradan las proteínas coagulantes y rompen la red de fibrina. Esto hace que el semen se vuelva más líquido y menos viscoso, lo que permite que los espermatozoides se liberen y naden hacia el óvulo. La licuefacción del semen suele tardar entre 15 y 20 minutos después de la eyaculación, pero puede variar según las condiciones ambientales y la composición del semen (Agarwal, y otros, 2021).

La licuefacción del semen también implica cambios en el pH, la osmolaridad, la concentración de iones y la actividad enzimática del semen, que afectan la funcionalidad de los espermatozoides. Por ejemplo, el pH del semen aumenta de alrededor de 6,5 a 7,5 durante la licuefacción, lo que favorece la movilidad y la capacitación de los espermatozoides. La capacitación es el proceso por el cual los espermatozoides adquieren la capacidad de fertilizar al óvulo, mediante cambios en la membrana y el metabolismo de los espermatozoides (Anamthathmakula & Winuthayanon, 2020).

El metabolismo de los espermatozoides depende principalmente de la glucólisis anaeróbica, que es la degradación de la glucosa en ácido láctico, para obtener energía en forma de nucleótido de adenosín trifosfato (ATP). La

glucosa proviene del fluido seminal, que contiene fructosa y otros azúcares. El ATP se utiliza para mantener el movimiento del flagelo de los espermatozoides, así como para activar las bombas de iones que regulan el equilibrio osmótico y el potencial eléctrico de los espermatozoides. Además, los espermatozoides también pueden utilizar otras fuentes de energía, como el piruvato, el lactato y los aminoácidos, mediante la respiración celular aeróbica, que es la oxidación de estas moléculas en el interior de las mitocondrias de los espermatozoides (Anamthathmakula & Winuthayanon, 2020).

El semen se coagula casi inmediatamente después de su eyaculación, para nuevamente licuarse 35 a 60 minutos después, por la acción del antígeno específico de próstata. En algunos casos, la licuefacción demora hasta una hora y debe informarse; sin embargo, su importancia clínica es controvertida. En los casos en que la licuefacción se realiza antes de la evaluación de laboratorio de la muestra, se debe preguntar al paciente si se observaron coágulos antes de la licuefacción. También es posible que el esperma no se licue. Es normal observar coágulos gelatinosos en las muestras y no se asocian con problemas de infertilidad (OMS, 2001).

Para garantizar un cálculo preciso, la muestra debe mezclarse completamente en el recipiente antes de tomar la dosis para análisis. Si la muestra no se licua, se puede añadir la misma cantidad de sal o medio y pipetear varias veces. No se debe olvidar el factor de dilución al calcular el resultado del análisis y al informar que la muestra tuvo que diluirse debido a una desviación de la dilución (OMS, 2001).

Para la presente investigación tomaremos como base que durante el proceso de licuefacción, cambios en el coeficiente de transmisión de la luz, pasando de una baja transmisión a un alta, debido a los cambios metabólicos y químicos del líquido seminal, mostrándose estos cambios en el cambio de color y viscosidad del semen. También consideraremos que estos cambios pueden ser evidentes mediante el uso de speckle dinámico, debido a la ausencia de técnicas cuantitativas para la determinación del tiempo de licuefacción, mediante la medición de la variación en la intensidad del patrón de interferencia

como se muestra en la Figura 5, realizándole un ajuste de una función tipo exponencial de primer orden, mostrada en la Ecuación 1,

$$\text{Ecuación 1. } I = Ae^{-\left(\frac{t-t_0}{\sigma}\right)} + I_0$$

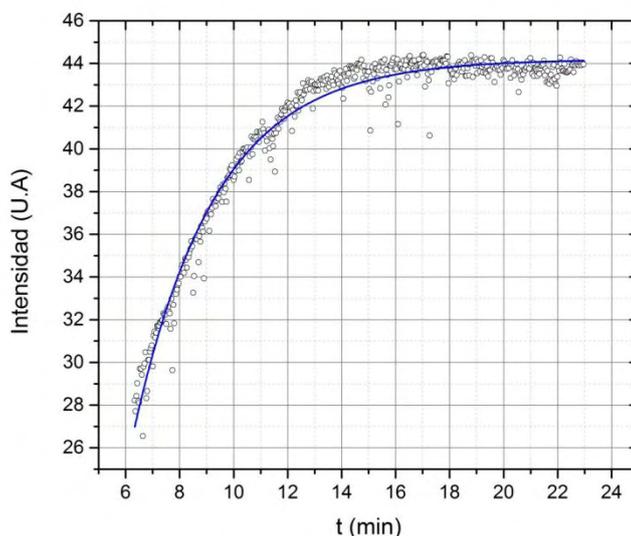


Figura 5. Variación de la intensidad en función del tiempo (Leal, 2020).

Los cambio en la intensidad deben llega a una asíntota, comportándose como un valor constante en el tiempo, para la determinación con precisión del tiempo de licuefacción (TL) se define como el tiempo que tarda la intensidad  $I$  en alcanzar el 98% de  $I_0$ , expresada en la Ecuación 2 (Leal, 2020):

$$\text{Ecuación 2. } T_L = t_0 - \sigma \ln\left(\frac{(I(0,98) - I_0)}{A}\right)$$

Donde TL es tiempo de licuefacción,  $I(0,98)$  es el 98% del valor de la Intensidad  $I_0$  (valor máximo de la función),  $\sigma$  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 (Leal, 2020).

El error asociado al cálculo del tiempo de licuefacción está dado por: el análisis de estimación de incertidumbres total.

## **Volumen**

El volumen debe medirse con un cilindro graduado de base cónica o una pipeta estéril de 5 ml o 10 ml. No se deben utilizar jeringas de plástico ya que pueden alterar la motilidad de los espermatozoides. El volumen normal de eyaculación debe ser de 1,5 ml o más, según (WHO, 2021) los valores deben estar en un rango de  $\geq 1,5 < 6$  mL. Los volúmenes más pequeños se asocian con falta de secreción de vesículas seminales o eyaculación retrógrada y se denominan hipospermia, mientras que los volúmenes superiores a 6 ml se asocian con varicocele o períodos prolongados de abstinencia llamados hiperespermia (OMS, 2001).

## **Viscosidad o consistencia**

La viscosidad o consistencia del líquido seminal se puede estimar retirando una muestra en una pipeta de 5 ml y dejando que las gotas caigan libremente para observar la longitud del filamento resultante. Una muestra típica cae en forma de gotitas o filamentos pequeños y bien definidos de hasta 2 cm de largo. La viscosidad anormal puede complicar ciertos parámetros como el recuento y la motilidad de los espermatozoides. El aumento de la viscosidad puede deberse a una inflamación crónica de la próstata, pero también está asociado con un alto contenido de moco y la presencia de anticuerpos espermáticos (OMS, 2001).

## **PH**

El pH debe medirse en la primera hora después de la recogida de la eyaculación. Para ello se utiliza una gota de semen sobre papel de pH y se toma una lectura a los 30 segundos (OMS, 2001). Un valor normal está entre 7,2 y 8,0 (WHO, 2021). Valores de pH superiores a 7,8 indican infección o anomalías de la secreción prostática, mientras que valores inferiores a 6,5 o 7,0 en una muestra sin espermatozoides (azoospermia) (Poirot & Cherruau, 2005) indicando obstrucción de los conductos eyaculadores. Ausencia bilateral congénita de vasos sanguíneos o anomalía funcional de las vesículas seminales.

## **Parámetros microscópicos del espermograma**

El examen microscópico de los espermatozoides incluye la evaluación de la motilidad, viabilidad, número y morfología de los espermatozoides, así como un examen citobacteriológico, que busca varias células en los espermatozoides, como leucocitos y bacterias. Se debe realizar un análisis microscópico inicial de la muestra sin diluir para estimar la cantidad de espermatozoides por campo y decidir qué dilución utilizar para los parámetros microscópicos. Se utiliza un volumen de semen de 10  $\mu$ L entre lámina y laminilla, a una magnificación de 100X, que permita la visualización de filamentos de moco y la aglutinación de los espermatozoides. Luego se debe pasar a una magnificación de 400X, para el recuento se debe diluir la muestra 1:20 (OMS, 2001).

Para evaluar la motilidad y progresión de los espermatozoides, lo ideal es que la temperatura sea de 37°C; Pero se puede hacer entre 20° C y 24° C siempre que sea constante porque la temperatura afecta la motilidad de los espermatozoides. Todos los parámetros microscópicos se deben procesar por duplicado (OMS, 2001; Calamera, Doncel, Olmedo, Kolm, & Acosta, 1998).

### **Motilidad**

La motilidad de los espermatozoides se evalúa en una muestra de 10  $\mu$ L entre lámina y laminilla, por duplicado. Según la OMS (2021) la motilidad hace referencia al porcentaje de espermatozoides móviles y a los móviles que se desplazan (motilidad progresiva). En los criterios de la OMS de 2001 se clasificaba la motilidad de acuerdo con los siguientes parámetros:

- Motilidad “a”: espermatozoides con motilidad progresiva rápida, a una velocidad de progresión  $\geq 25 \mu\text{m}/\text{segundo}$  a 37° C, lo que equivale a la mitad de la cola en distancia o a 5 cabezas.
- Motilidad “b”: espermatozoides con motilidad progresiva lenta, a una velocidad de progresión entre 5 y 25  $\mu\text{m}/\text{segundo}$  a 37° C, lo que equivale a la mitad de la cola en distancia.
- Motilidad “c”: espermatozoides con motilidad no progresiva.
- Motilidad “d”: espermatozoides inmóviles.

Las revisiones basadas en los criterios propuestos por la OMS en 2001 encontraron cambios muy significativos en las categorías de motilidad de los espermatozoides. A partir de ahora, se recomienda separar los espermatozoides únicamente según 3 categorías: móviles progresivos (PM) (combinando las categorías a y b anteriores), móviles no progresivos (NP) (categoría anterior c) e inmóviles (IM) (como antes). Categoría d). Muchos factores, desde el cultivo hasta el medio ambiente y la exposición a diversas sustancias químicas, entre otros, provocan cambios en los parámetros del espermograma, y la motilidad es uno de los parámetros más sensibles a estos cambios, si la motilidad no supera el 40% se denomina astenozoospermia. Algunos de los factores que con mayor frecuencia provocan cambios en la motilidad y otros parámetros se explican más adelante.

### **Vitalidad**

El parámetro que evalúa la vitalidad de los espermatozoides es útil para saber si los espermatozoides inmóviles están vivos o muertos (necrozoospermia) (Knoblovitz & Rey Valzacchi, 1999).

El porcentaje de espermatozoides vivos se puede determinar por varios métodos, siendo la coloración con eosina, el método más utilizado (técnica de tinción supravital). Se mezcla una gota (10  $\mu$ L a 15  $\mu$ L) del semen con una gota del colorante con eosina al 0,5% en una lámina portaobjeto y se cubre con una laminilla, se deja reposar la muestra 30 segundos y se procede a contar 200 espermatozoides (coloreados y no coloreados), con una magnificación de 400X.

La membrana de los espermatozoides vivos queda intacta, impidiendo la penetración del tinte, mientras que los muertos reciben el tinte. El resultado se expresa en porcentaje. Es importante comparar el resultado de vitalidad con el resultado de los espermatozoides inmóviles, porque el porcentaje de espermatozoides muertos no debe ser superior al porcentaje de espermatozoides inmóviles, o solo mínimamente (dentro de los errores permitidos en el cálculo).

Para el estudio de la vitalidad de los espermatozoides también se realizan pruebas microscópicas adicionales, una de las pruebas más viables, rápidas y

eficaces es la Prueba de hinchazón hipoosmótica de los espermatozoides (HOS), es una prueba muy sencilla basada en el principio de semipermeabilidad de la membrana plasmática intacta. La afluencia de agua que se produce cuando los espermatozoides se exponen a un ambiente hipoosmótico hace que las células se "hinchén" debido a un aumento en el volumen celular ( Balitán, Blanco, & Hernández, 2018).

Por su parte, Knoblovitz, 1999, afirma que la vitalidad espermática depende de distintos factores como la edad, calidad del esperma, concentración, volumen, y tratamiento de la muestra; pero puede verse afectada por variables ambientales y biológicas, como el uso de drogas, consumo excesivo de alcohol, marihuana y otras drogas, exposición a altos grados de radiación, enfermedades de las glándulas secretoras, uso de fármacos y presencia de anticuerpos antiespermáticos.

Presentado como un test clínico por (Jeyendran, Van Der Ven, Pérez-Peláez, Crabo, & Zaneveld, 1984), el HOS no debe ser usado como un examen funcional sino como un análisis adicional de vitalidad. Es simple de realizar e interpretar y brinda información adicional sobre la integridad y función de la membrana de la cola del espermatozoide.

### **Viabilidad**

Los manuales de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el examen del semen humano han sido tema de discusión desde 1980 para tratar la fertilidad masculina. Son muchos los parámetros sometidos a evaluación para determinar la viabilidad de una muestra que se espera ser fecundada, sabiendo que la viabilidad espermática se refiere al porcentaje de espermatozoides vivos que se encuentran en una alícuota de semen.

Referirse a la viabilidad espermática es conjugar otros parámetros importantes en el análisis de muestras de semen, como por ejemplo la vitalidad (que se refiere al porcentaje de espermatozoides vivos y muertos) y la motilidad (siendo esta el porcentaje de espermatozoides móviles). Tomando en consideración estos apartados, y mediante el estudio detallado de todos los

parámetros dentro del espermograma, se puede calcular si una muestra de semen es viable y apta para ser fecundada.

Según la OMS (2010), en su manual de espermograma 5ta edición, el porcentaje de viabilidad se encuentra en el rango  $\geq 58\%$ , es decir, que una muestra de semen es apta si se cumple con ese requerimiento, un porcentaje por debajo de éste se considera no apta. Es válido mencionar que el porcentaje de vitalidad espermática se corresponde con el de viabilidad, ya que solo se estima la cantidad de espermatozoides vivos.

Con el paso de los años, la organización Mundial de la Salud, en su afán de discutir los valores de referencia de los varones fértiles y ofrecer datos que se correspondan con las necesidades actuales de la reproducción masculina, ha publicado la sexta edición del manual de espermograma (OMS, 2021), en el que refleja ciertos cambios (Tabla 2) que se han generado partiendo del estudio minucioso de los parámetros que comprende el análisis del semen, reconociendo que el porcentaje de viabilidad del esperma bajó a un valor  $\geq 54\%$ , lo que permite inferir que en los últimos once años la calidad de una muestra espermática ha estado sujeta a muchos factores asociados a la reproducción, por lo tanto, hoy en día, el varón puede fecundar si su porcentaje de viabilidad es  $\geq 54\%$ .

Para calcular la viabilidad de una muestra de semen se procede, de con un esquema de trabajo en el laboratorio, utilizando un pequeño volumen de la muestra, siguiendo el protocolo del espermograma de la OMS, en el que se requiere el uso de la cámara de Neubauer y la coloración con Eosina que permite la observar y diferenciar los espermatozoides vivos y muertos; en el test de eosina o Williams Pollack solo se tiñen los espermatozoides muertos por la presencia de perforaciones u agujeros en su membrana, por lo que son permeables al colorante de Eosina, entonces al observar en el microscopio los espermatozoides muertos aparecerán teñidos, lo que va a diferenciarlos de los espermatozoides vivos. Las células vivas no son capaces de absorber el colorante puesto que su membrana permanece intacta, por lo que se observarán de color blanco. La observación se hace a través del microscopio óptico y de este modo poder calcular el porcentaje de viabilidad de la muestra.

## Recuento

Para el recuento de espermatozoides se puede utilizar la cámara de Neubauer (Ver Figura 6). Se cuentan en el cuadrante central, que se utiliza para contar los glóbulos rojos. Basándose en observaciones preliminares de la muestra, se diluye el esperma, se llenan ambos lados de la cámara de Neubauer con 10  $\mu$ l de la dilución y se realiza el recuento con un aumento de 200-400X.



Figura 6. Cámara de Neubauer.

Las muestras que contengan menos de 10 espermatozoides en un cuadrado grande deben contarse en un cuadrado completo (incluidos 25 cuadrados pequeños); para muestras que contienen entre 10 y 40 espermatozoides en un cuadrado central grande, se pueden contar 10 cuadrados pequeños de 25; y para muestras que contienen más de 40 espermatozoides en el cuadrado central grande, sólo se pueden contar 5 cuadrados pequeños (OMS, 2001).

Si hay un espermatozoide en la línea que divide dos cuadrados adyacentes, sólo se cuentan los de arriba y a la izquierda, los de abajo y a la derecha se rechazan. Los resultados de ambos lados de la cámara se promedian y el valor se divide por el factor de conversión; el resultado final corresponde al número (en millones) de espermatozoides por mL de eyaculado o concentración de los espermatozoides por ml (OMS, 2001).

El recuento de espermatozoides también debe informarse como la cantidad total de espermatozoides en la eyaculación o la cantidad total de espermatozoides. El recuento incluye sólo los espermatozoides completos con cabeza y cola. Sólo los defectos de la cabeza o la cola deben considerarse por separado y reflejarse en los resultados. Los recuentos mayores de 250 millones

por mL (polizoospermia) se asocian con anomalías cromosómicas, bajo contenido de ATP, función acrosomal alterada 23 y mayor riesgo de pérdida fetal (Steven, Griffin, & Chantle, 1982).

En cambio, la oligozoospermia se asocia a varias entidades como cambios cromosómicos, varicocele, problemas hormonales, paperas-orquitis y factores externos como exposición a rayos X, fármacos y químicos (Huaaya, Sosa, Delgado, & Rosado, 1973).

La azoospermia, o ausencia de espermatozoides en el semen, puede ser de origen obstructivo, que impide la liberación de espermatozoides durante la eyaculación, o de origen no obstructivo, como consecuencia de una insuficiencia testicular severa y también resultado de una vasectomía realizada con éxito ( Balitán, Blanco, & Hernández, 2018).

De una pequeña muestra de semen se toma una dosis que se diluye en agua destilada en una relación 1:20 (por ejemplo, 50µl de semen + 950µl de agua destilada). Después de la homogeneización durante unos 5 segundos en un agitador de forma manual, se pone una muestra de la dilución en cada hemisférico.

El recuento y cálculo de la concentración de espermatozoides, se realiza utilizando una cámara de Neubauer, difiriendo según el tipo de cámara empleada. El cálculo de la concentración espermática para todas las cámaras, se define en la Ecuación 3:

$$\text{Ecuación 3. } E_{sp} = \frac{E}{SAD} * 1000$$

Donde  $E_{sp}$  es el número de espermatozoides por  $\text{mm}^3$ , E el Número de espermatozoides contados, S la superficie empleada en  $\text{mm}^3$ , A la altura de la cámara y D el grado de dilución.

El valor normal es de 15 millones de espermatozoides por cada mililitro de volumen eyaculado ó 39 millones en la totalidad de la muestra. Si no se alcanzaran esos valores hablaríamos de Oligozoospermia y en los casos más severos de Criptoospermia (<100.000 espermatozoides/mL) (WHO, 2021).

## Morfología

La evaluación de la morfología de los espermatozoides consiste en un examen detallado de 200 espermatozoides en un portaobjetos teñido con tinción de Papanicolaou (idealmente) o tinción de Gram, por duplicado (Carlsen, Giwercman, Keiding, & Skakkebaek, 1992). Se debe utilizar un objetivo ocular de 10X y un objetivo de inmersión de 10X, seleccionando varias áreas sistemáticamente.

Según la Organización Mundial de la Salud, es normal encontrar solo el 30% de los espermatozoides normales en los individuos fértiles, pero se han informado estudios de individuos fértiles con un promedio de espermatozoides con morfología normal de solo 20% (rango entre 15% y 35%). La evaluación de anomalías morfológicas (teratozoospermia) debe incluir defectos en la cabeza, la sección media, la cola y la presencia de gotitas citoplasmáticas de más de 1/3 a 1/2 del tamaño de una cabeza normal. Para que los espermatozoides se consideren normales, la cabeza, la sección media y la cola deben ser normales.

La cabeza debe ser ovalada, con una longitud aproximada entre 4 y 5  $\mu\text{m}$  y un ancho entre 2,5 y 3,5  $\mu\text{m}$ ; la región acrosomal debe ocupar entre el 40% y el 70% de la cabeza; el segmento intermedio debe tener un ancho menor de 1  $\mu\text{m}$  y una longitud aproximada de una cabeza y media; las gotas citoplásmicas deben tener un tamaño menor que 1/3 a 1/2 de una cabeza normal y la cola debe ser derecha y uniforme, más estrecha que el segmento intermedio, debe estar desenrollada y medir aproximadamente 45  $\mu\text{m}$  de largo ( Balitán, Blanco, & Hernández, 2018).

Las vacuolas que ocupan más del 20% de la cabeza se consideran anormales. Para el recuento morfológico diferencial, solo se deben incluir los espermatozoides con cola, las células inmaduras no se cuentan, pero se deben informar, al igual que las cabezas y las colas aisladas (Carlsen, Giwercman, Keiding, & Skakkebaek, 1992).

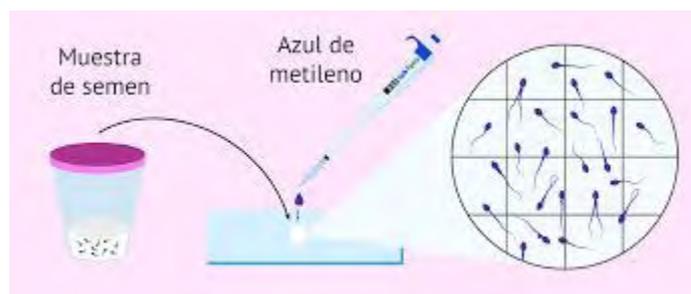
Los espermatozoides deben clasificarse como normales con un defecto en la cabeza, un defecto en el segmento medio o un defecto en la cola, como se muestra en la Figura 7; Si el espermatozoide tiene más de un defecto, se

puede informar con el defecto más importante en este orden: cabeza, medio, cola. El resultado se expresa en porcentaje tras un doble recuento de 200 espermatozoides.



Figura 7. Representación esquemática de algunas anomalías de los espermatozoides (Toro, 2009).

El quinto manual de la OMS establece (ver Figura 8) que en un espermograma normal debe haber igual o más del 4% de espermatozoides normales. Si se encuentra por debajo de este valor se denomina Teratozoospermia.



**Figura 8. Proceso de evaluación de la morfología del espermatozoide (Bhasin & Jameson, 2003).**

No es necesario informar todas las variaciones encontradas en los espermatozoides, pero sí los defectos más frecuentes ( Balitán, Blanco, & Hernández, 2018).

### **Otros elementos celulares.**

Las muestras teñidas también detectan la presencia de otros tipos de células, como leucocitos, espermatozoides inmaduros, células epiteliales de la uretra y la próstata y microorganismos. La presencia de muchas células poligonales cubiertas de bacterias indica que la muestra fue tomada durante el coito y que las células se originan en el epitelio vaginal (OMS, 2001).

Una gran cantidad de formas inmaduras en los espermatozoides indica una alteración del espermatogénesis debido a anomalías de los conductos, varicocele u otros cambios testiculares. Si la concentración de células redondas es superior a 2 millones por ml, las formas inmaduras y los leucocitos deben distinguirse mediante una tinción especial, como la técnica de la peroxidasa (OMS, 2001).

Una cantidad elevada de glóbulos blancos (espermatozoides leucocitarios) indica inflamación o infección en las gónadas y se asocia con una mala calidad del esperma (OMS, 2001). El semen normal debe contener menos de 1 millón de leucocitos por mL.

### **Aglutinación**



**Figura 9. Aglutinación del semen (Guyton & Hall, 2003).**

La aglutinación de espermatozoides puede ser de cabeza a cabeza, de segmento medio a segmento medio, de cola a cola o mixta, como de cabeza a

cola (ver Figura 9). La aglutinina indica la presencia de anticuerpos antiespermatozoides y debe evaluarse al determinar la motilidad de los espermatozoides (OMS, 2001).

### **Factores asociados a una baja calidad del esperma.**

- **La contaminación industrial.**

Los mayores niveles de oligospermia se localizan en las comunidades autónomas con un mayor grado de industrialización en los últimos 50 años, mientras que en otras comunidades se han incorporado de forma más reciente al proceso de desarrollo industrial, se notifica tienen un alto grado de polución atmosférica. Los cambios observados en la concentración de espermatozoides pueden deberse al período embrionario (es decir, originarse antes incluso del nacimiento de esos varones) y deberse en zonas altamente industrializadas a la exposición del embrión a los disruptores endocrinos a través del cordón umbilical.

Se cree que la exposición a los disruptores endocrinos puede afectar a la formación de los testículos del feto; puede alterar el proceso de formación de los espermatozoides, por tanto, provocar una reducción de concentración espermática. “Si esta alteración se produjera después de la pubertad, habríamos visto un empeoramiento de la concentración en función de la edad, pero eso no ha sido así, lo cual apoya la hipótesis de que la afectación se produce durante el embarazo” (Knoblovitz & Rey Valzacchi, 1999).

- **Los disruptores endocrinos.**

Los disruptores endocrinos o estrogénicos son sustancias químicas que en el organismo humano actúan como hormonas femeninas o pseudoestrógenos. Según la Unión Europea, en la industria, la agricultura y el hogar se utilizan más de 550. Son muy resistentes a la degradación biológica, están presentes en nuestros alimentos y se acumulan en el organismo, especialmente en ambientes grasos como la leche materna. Para profundizar en esta cuestión, el Instituto Marqués puso en marcha un estudio comparando la concentración de disruptores endocrinos durante el embarazo y la lactancia en mujeres

residentes en comunidades autónomas, donde la Encuesta Nacional de Esperma Juvenil encontró grandes diferencias en la concentración u oligozoospermia (Levine , y otros, Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis, 2017).

Por lo tanto, para el análisis del semen, conociendo que se considera una muestra de gran importancia en la salud reproductiva, La OMS en el año 2010 actualizó información sobre los valores de referencia que deben tomarse en cuenta en un espermograma, a saber, rasgos macroscópicos y microscópicos del líquido seminal.

Cabe mencionar que, en el año 2017, la revista *Oxford University Press* publicó un artículo que ha sido ampliamente citado y revisado, ya que muestra las tendencias temporales en el conteo de espermatozoides a nivel mundial a través de una revisión sistemática desde el año 1981 hasta el año 2013, usando datos sobre el recuento de espermatozoides en los años mencionados (Levine , y otros, Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis, 2017).

Se reportó una muy fuerte disminución en la concentración de espermatozoides (CE) y el recuento total de espermatozoides (RTE) en América del Norte, Europa, Australia/Nueva Zelanda, pero se han publicado muy pocos estudios en América del Sur/América Central, Asia y África para sacar una conclusión sobre las tendencias en esos continentes. Se examinó la media de CE y RTE en función del año de recolección, aproximadamente a la mitad del año del período de recolección de la muestra. Se realizó una nueva búsqueda bibliográfica en el año 2020 para identificar estudios elegibles publicados entre 1° de enero de 2014 y 31 de diciembre de 2019. Aquí informaron sobre tendencias en CE y RTE en publicaciones de 1981 a 2019, que combina resultados de búsquedas y análisis (Levine, y otros, 2023).

A través de un modelo de meterregresión ajustado por continentes, edad, tiempo de abstinencia, método de recolección de semen informado, método de conteo informado, tener más de una muestra por hombre, indicadores para la selección de la población del estudio y criterios de exclusión (algunos

candidatos a vasectomía, algunos candidatos a donante de semen, exclusión de hombres con enfermedades crónicas, exclusión por otras razones no relacionadas con la fertilidad, selección por ocupación no relacionada con la fertilidad), se estimó el año de recolección, se estimó la media aritmética de CE y RTE, para finalmente mostrar los siguientes resultados.

### **Nuevos valores para el espermiograma OMS 2021.**

En los últimos años, tanto en América Latina como en otras partes del mundo, la discusión sobre la infertilidad ha aumentado significativamente. El análisis de espermatozoides sigue siendo la principal herramienta de rutina que proporciona la mejor información para evaluar la calidad reproductiva masculina. Este estudio nos permite evaluar la gravedad de la infertilidad por factor masculino y determinar posibles estrategias de tratamiento para la pareja. En la determinación de los parámetros seminales, existe un grado de error analítico donde el espermiograma pierde por completo su utilidad clínica si no se realiza bajo estrictas normas de control (Castilla , Alvarez, Aguilar, González-Varea, Gonzalvo, & Martínez, 2006).

En la determinación de los parámetros seminales, existe un grado de error analítico donde el espermiograma pierde por completo su utilidad clínica si no se realiza bajo estrictas normas de control. En respuesta a la gran necesidad de estandarizar o sistematizar los procedimientos de análisis de espermatozoides, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó sucesivas ediciones del "Manual para el estudio de la interacción del espermatozoides y el moco humanos con el espermatozoides" (1980, 1987, 1992, 1999, 2010, 2021) que sirvió como guía para los laboratorios de andrología clínica (Sarabia & Munuce, 2011).

La OMS presentó el nuevo Manual "WHO *Laboratory Manual for the examination and processing of human semen*" en el año 2010. La principal diferencia entre esta guía respecto a las anteriores y otras guías de este tipo es que los valores recomendados los obtienen por primera vez hombres cuya pareja quedó embarazada en los últimos 12 meses, por lo que se tienen en cuenta que son "fructífero". Se analizaron datos de casi 1.900 pacientes en ocho países y tres continentes y se acordó cambiar el término "valor de

referencia" por "límite de referencia inferior". (LRI, al 5° percentil). Este límite separa donde se concentra más de 95% de la población fértil, o sea por arriba del LRI está el 95% de los pacientes fértiles. Valores superiores al LRI no garantizan la fertilidad y el embarazo posterior, pero aumentan sus posibilidades (WHO, 2010).

Este nuevo marco conceptual, sumado a cambios en la metodología sugerida, hace necesario una buena interpretación y amplia difusión del mismo. Presentados en la Tabla 1 con el LRI; sin embargo, la OMS recalca que estos valores son solo una guía y que cada laboratorio, dependiendo de su realidad geográfica, debe hacer esfuerzos para obtener sus propios valores.

**Tabla 1. Valores de referencia (1999) y los nuevos (2010) del límite de referencia inferior (LRI) en espermiograma; entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza del 95% (WHO, 2010).**

|   | 1994, 4ta edición          | 2010, 5ta edición                    |
|---|----------------------------|--------------------------------------|
|   | <b>Valor de referencia</b> | <b>Límite inferior de referencia</b> |
| <b>Licuefacción</b>                                   | Total a los 60 min         | Total a los 60 min                   |
| <b>PH</b>   | 7,2 – 7,8                  | ≥ 7,2                                |
| <b>Volumen</b>  | 2,0 MI                     | 1,5 MI (1,4 – 1,7)                   |
| <b>Concentración espermática</b>                      | 20 x 10 <sup>6</sup> /mL   | 15 x 10 <sup>6</sup> /mL (12 - 15)   |
| <b>Concentración total</b>                            | 40 x 10 <sup>6</sup>       | 39 x 10 <sup>6</sup> (33 - 46)       |
| <b>Motilidad total (progresivos + no progresivos)</b> | No detallada               | 40% (38 - 42)                        |
| <b>Motilidad progresiva</b>                           | 50%                        | 32% (31 - 34)                        |
| <b>Viabilidad</b>                                     | 75%                        | 58% (55 - 63)                        |
| <b>Formas normales</b>                                | 15%                        | 4% (3 - 4)                           |
| <b>Leucocitos</b>                                     | < 1 x 10 <sup>6</sup> /mL  | < 1 x 10 <sup>6</sup> /mL            |

|  |                                |                                |
|--|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>Test de evaluación inmunológica (anticuerpos)</b>                     | < 50% esp. Unidos a partículas | < 50% esp. Unidos a partículas |
| <b>Técnica específica para los anticuerpos localizado (cabeza, cola)</b> | < 50% esp. Unidos a partículas | < 50% esp. Unidos a partículas |

En el año 2021, la organización mundial de la salud publicó la sexta edición del manual de espermiograma con el objetivo de discutir los valores de referencia de la población masculina fértil. Estos valores no solo son utilizados en el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad de los varones, sino que se ha enmarcado también dentro del campo de investigación. La quinta edición publicada por la OMS en el año 2010 fue la primera en presentar los valores de referencia basados en la población de hombres fértiles, es decir, aquellas parejas que consiguieron un embarazo en menos de 12 meses, por lo tanto, es fundamental determinar si los valores publicados en el manual del año 2010 siguen siendo válidos.

En la última edición (WHO, 2021). Se actualizaron los valores de referencia. Estos datos se sustrajeron a través de la información de 3589 individuos de los cinco continentes; África, Oceanía, América, Asia y Europa. Se evaluaron los hombres fértiles que habían logrado un embarazo natural en un lapso  $\leq$  a 12 meses. El propósito de esta nueva edición es indicar que los valores de referencia para los hombres fértiles no son una delimitación clara entre varones fértiles e infértiles, ya que hay hombres con alteraciones en sus parámetros seminales y consiguen un embarazo sin problemas mayores. Por tal motivo, los valores ofrecidos no son determinantes en el éxito de la fecundación, es por ello que para que los rangos presentados tengan sentido es necesario clarificar los límites entre lo normal y anormal.

Es conveniente destacar que los valores que se muestran en la sexta edición, así como en ediciones anteriores no son suficiente para diagnosticar la infertilidad masculina.

En la Tabla 2 se expresan los valores referenciados desde el año 1980 en sus diferentes ediciones, hasta los valores actualizados por la OMS (2021) en su manual de espermiograma.

Tabla 2. Valores referenciados desde el año 1980 hasta la actualidad (OMS 2021) en su manual de espermigrama (WHO, 2021).

| Parámetro seminal                                   | WHO 1980 | WHO 1987 | WHO 1992 | WHO 1999 | WHO 2010 | WHO 2021 |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Volumen (mL)  | ND       | ≥2       | ≥2       | ≥2       | 1,5      | 1,4      |
| Concentración espermática (x10 <sup>6</sup> )       | 20 - 200 | ≥20      | ≥20      | ≥20      | 15       | 16       |
| Número total de espermatozoides (x10 <sup>6</sup> ) | ND       | ≥40      | ≥40      | ≥40      | 39       | 39       |
| Motilidad total (%)                                 | ≥60      | ≥50      | ≥50      | ≥50      | 40       | 42       |
| Motilidad progresiva (%)                            |          | ≥25      | ≥25      | ≥25      | 32       | 30       |
| Vitalidad (%)                                       | ND       | ≥50      | ≥75      | ≥75      | 58       | 54       |
| Morfología normal (%)                               | 80,5     | ≥50      | ≥30      | 14       | 4        | 4        |

### Fenómeno de Speckle

La escala de longitud de onda óptica tiene la propiedad de detectar rugosidad sobre cualquier superficie, sea natural o sintética. Cuando se ilumina con luz coherente, como un láser, las ondas reflejadas desde dicha superficie se reflejan en contribuciones de muchas regiones dispersas independientes. La difusión de esta luz reflejada hacia un punto de observación distante provoca la adición de diferentes componentes dispersos con un retraso relativo que puede variar de unas pocas a varias longitudes de onda, dependiendo de la superficie microscópica, geometría y de perturbaciones externas de sus fases, pero las ondas coherentes dan como resultado un patrón granulado (ver Figura ) que reconocemos como patrón de speckle (Leal, 2020).

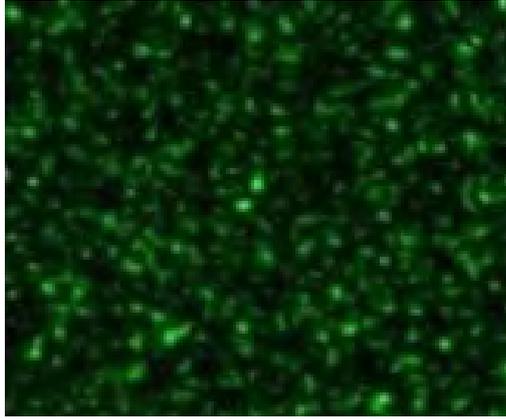


Figura 7. Patrón de Speckle (Patiño, 2021).

A medida que el punto de observación se mueve, la longitud del camino recorrido por los componentes dispersos cambia y puede aparecer un nuevo valor de intensidad independientemente del proceso de perturbación. Por lo tanto, el patrón moteado consta de áreas brillantes donde el desorden fue constructivo, áreas oscuras donde el desorden fue destructivo y niveles de radiación entre estos extremos. Luego se observa un continuo de valores de irradiancia, que aparecen como "motas" en un patrón irregular (Dainty, 1975).

Dado que la interferencia se produce en todo el espacio ocupado por las ondas reflejadas desde la superficie, el punto cubre todo el espacio entre la superficie iluminada y el plano de observación. El patrón de puntos de luz en el espacio libre entre las pantallas se llama punto objetivo (ver Figura .a), mientras que para un sistema de imágenes estudiado con lentes o cámaras CCD (*Charge-Coupled Device*), se llama punto subjetivo (Hector, Rabal, & Braga, 2009) (ver Figura .b).

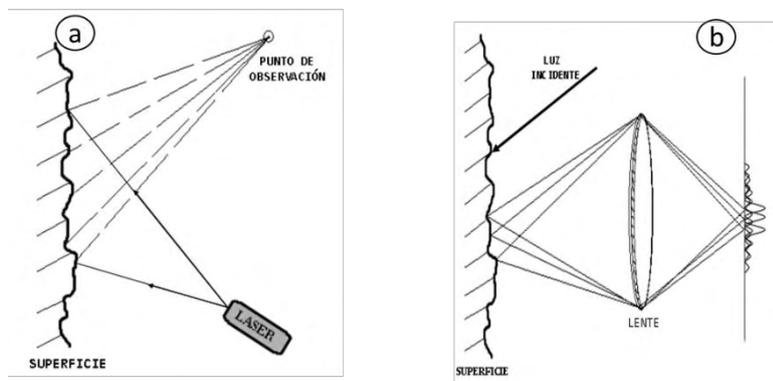


Figura 8. a) Speckle Objetivo y b) Speckle subjetivo (Patiño, 2021).

Aunque el punto de partida de la mancha puede ser más fácil de manejar con la geometría reflectante del espacio libre que se muestra en la Figura .a, también se puede explicar trabajando más con la geometría de la imagen que se muestra en la Figura .b, donde ahora hay que tener en cuenta el fenómeno de la difracción. Por ejemplo, si se coloca una lente convergente frente a una superficie reflectante, debería formar una imagen de esa superficie en el punto de observación (Patiño, 2021).

La imagen de cada punto en la superficie iluminada es una imagen de difracción en forma de un pequeño disco de aire, visto desde el punto de imagen P. Como resultado de la rugosidad de la superficie, se producen interferencias entre patrones de difracción adyacentes, lo que resulta en un frotis (Hector, Rabal, & Braga, 2009).

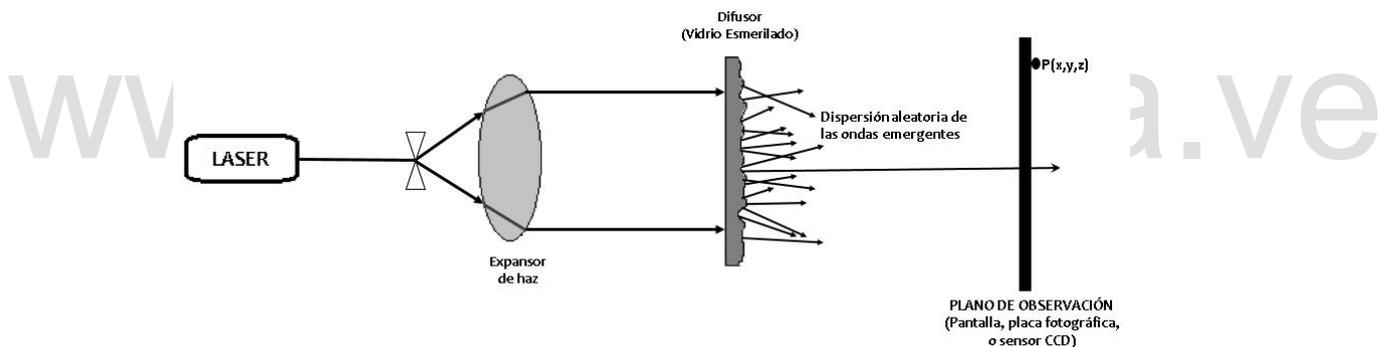


Figura 9. Transmisión de luz coherente a través de un objeto translúcido (Patiño, 2021).

La formación de una mancha no se limita sólo a la luz reflejada, sino también a la luz que pasa a través de algún objeto en difusión; si iluminamos con luz coherente, por ejemplo, detrás de un vidrio esmerilado, como en la Figura . La superficie desde que la luz entra al difusor puede considerarse plana, y pequeñas curvas locales en la superficie rugosa de salida expanden el campo esférico. Ondas, y, además, variaciones aleatorias en el espesor del vidrio producen fases aleatorias de las ondas secundarias, que producen ondas desfasadas pero coherentes y les aplican los mismos principios de moteado objetivo o subjetivo explicados anteriormente.

Aunque la mayoría de las discusiones en este trabajo se presentan en términos de geometrías reflectantes, las conclusiones se aplican igualmente a

las geometrías emisoras, siempre que el frente de onda emitido por el difusor satisfaga los mismos supuestos básicos que el frente de onda reflejado con un objeto áspero (Patiño, 2021).

### **Propiedades estadísticas de los patrones de Speckle**

Dado que el punto es un fenómeno aleatorio, sólo puede describirse y analizarse estadísticamente. Muchos investigadores invirtieron en investigar su naturaleza estadística y demostraron que están estrechamente relacionados con las características estadísticas del objeto que se dispersa y el grado de coherencia de la luz. Por ello, describimos algunas de las características definitorias de este fenómeno desde un punto de vista estadístico. Las estadísticas de puntuación objetiva y subjetiva son las mismas (Patiño, 2021).

### **Estadística de primer Orden**

Las estadísticas de primer orden describen las propiedades punto a punto de un patrón de moteado, es decir, las propiedades estadísticas en un punto en el espacio o; para coma variable en el tiempo, propiedades estadísticas en el espacio-tiempo (Patiño, 2021) . El patrón de moteado es causado por la interferencia de una gran cantidad de ondas coherentes que de alguna manera difieren principalmente en su fase o, con menor frecuencia, en su amplitud. En esta sección, veremos cómo dicho punto de partida es la suma de fases aleatorias, típicamente amplitudes complejas de campos de ondas ópticas y, por lo tanto, se pueden implementar sumas aleatorias.

### **Estadísticas de segundo orden**

Las estadísticas de segundo orden permiten el estudio de la estructura espacial detallada de los granos en el patrón y su distribución dentro del patrón, así como las propiedades físicas que influyen en el tamaño de escala de los granos, a través de la relación entre estos dos puntos separados. A nivel de percepción, esta relación depende del sistema óptico utilizado, ya sea un esquema de difusión libre (punto objetivo) o de formación de imágenes (punto subjetivo). (Lester, 1964) y Goodman (*Statistical properties of laser speckle*

*patrones*, 1963) fueron los primeros en publicar estadísticas de segundo orden basadas en la función de autocorrelación y la densidad espectral de potencia (Patiño, 2021).

### **Modelos y métodos de Procesamiento**

El uso de patrones de puntos como descriptores de una variable biológica o física significa obtener información útil de un objeto iluminado a partir de la conversión de un tipo de señal en otra señal diferente que permite al observador evaluar mediante imágenes o números procesados variables bajo control. Existe una gran cantidad de modelos teóricos, numéricos, análisis estadísticos y de frecuencia y métodos de procesamiento para estudiar las propiedades de patrones de puntos, que permiten extraer información de un objeto o muestra, porque se sabe que la estructura de este patrón depende de la superficie condiciones de textura e iluminación, por lo que cualquier cambio en estas condiciones provoca los cambios correspondientes en el patrón de puntos. A continuación, describiremos cuáles son las diferentes técnicas para la investigación de puntos y puntos dinámicos, y nos detendremos en las más utilizadas en el campo para explicarlas en detalle (Patiño, 2021).

### **Modelos Teóricos y Numéricos**

Los modelos teóricos, permiten reproducir los complejos fenómenos relacionados con la interacción de la luz y la materia biológica y no biológica, como por ejemplo los cambios en una superficie electroerosionada, mediante un análisis de su patrón de Speckle dinámico, también son utilizados para el estudio de los cambios de rugosidad en superficies dieléctricas o metálicas, en donde es muy importante utilizar una técnica no invasiva, mientras que los numéricos se han utilizado para simular el fenómeno del speckle dinámico, como una forma alternativa a los modelos teóricos, que se concentran principalmente en simulaciones no biológicas.

Según Rabal et al, (2005) algunos de estos modelos se basan en la propagación libre, utilizando los conceptos básicos de la formación del patrón de speckle, siendo la fase el origen principal de los cambios de patrones en el

tiempo. La comparación con datos experimentales reales mostró, que los modelos reproducen varias características de los experimentos y conocimientos teóricos previos de la dinámica simplificada (Duncan, 2008).

### **Análisis estadísticos**

Este tipo de análisis permite describir enfoques numéricos y analizar los patrones dinámicos de speckle que se producen a través de materiales biológicos y no biológicos por medio de estadísticas de primer y segundo orden, para análisis de contraste o de dominio temporal del patrón que se forma. Entre los métodos más comunes se encuentra el método estadístico de segundo orden THSP y la función de autocorrelación (Patiño, 2021).

### **Método estadístico de segundo orden: THSP.**

Oulamara *et al* (1989) propusieron por primera vez el THSP, siendo el método más usado para medir la velocidad de dispersiones en objetos biológicos y no biológicos. Sus mediciones se fundamentan básicamente, en valores de la velocidad en la que ocurren los cambios de intensidad en el THSP. Constituidos por un patrón de Speckle a través de imágenes que muestran desiguales texturas, para diferentes fenómenos o diferentes momentos del mismo fenómeno.

Por su parte la cámara CCD muestra la secuencia de  $k$  imágenes que forman una imagen compuesta de  $k \times k$  píxeles, para esto, se selecciona una columna de cada imagen, primordialmente la del intermedio, y, ese conjunto de columnas forman una imagen definitiva denominada THSP. De esta forma, las filas representan diferentes puntos del objeto y las columnas simbolizan su estado de intensidad en cada instante muestreado, cuando la intensidad cambia en dirección horizontal, aparece la acción de la muestra, es decir, un arreglo donde la dirección vertical es el espacio y la horizontal el tiempo (Patiño, 2021).

## **Descriptores de actividad**

Gonzalo (2009) refiere que una imagen de actividad no es más que una cadena de imágenes sucesivas de patrón Speckel mediante una cámara CCD y un capturador de fotogramas, constituyendo esta una manera de recolectar datos y registrar imágenes para luego hacer un análisis digital de estas. Se puede observar diferencias en la actividad de los granos del Speckle local debido a variaciones en sus distintos orígenes. En numerosos experimentos, la actividad de los granos del speckle que se aprecia en la imagen de un objeto no es parejo sobre la superficie de la muestra, puede mostrar diferencias locales debido a variaciones en sus distintos orígenes. A esto se denomina imágenes de actividad (Gonzalo, 2009).

Se puede decir que esta técnica es una alternativa sencilla de hacer, porque se fundamenta en el balance de dos estados con diferente actividad antes y después de alguna activación. Algunas técnicas se pueden implementar en tiempo real o no. Dado que la actividad obedece de varios orígenes posibles, las imágenes de actividad también mostrarán diferentes características según los algoritmos manejados y los métodos de registro. Las imágenes de actividad, son representaciones en las que algunas características del speckle dinámico, se representan como niveles de gris o colores (Rabal, 2005).

De esta manera debido a que la actividad está asociada a cambios de intensidad en el historial de cada píxel de la imagen, entonces los descriptores que miden estos cambios son candidatos para seleccionar las regiones de igual actividad.

## **Diferencias Temporales**

Este método de procesamiento de datos fue creado principalmente para la detección de cambios en imágenes de sistemas de vigilancia visual (Li & Dailey, 2002), afirman que es un método recientemente modificado y propuesto por (L. Martí-López, 2010) para la detección de actividad en patrones de speckle dinámico. Este método consiste en separar imágenes por un intervalo de tiempo de una escena, es decir, se restan las imágenes de una escena respecto a la otra, con el fin de detectar si hay un cambio en esta o no. En otras

palabras, este método no es más que apreciar el cambio de imágenes de una escena que están separadas por un intervalo de tiempo, donde se restan una de la otra para detectar si la escena ha cambiado o no.

Ahora en el caso de imágenes de Speckle dinámico, la diferencia de dos imágenes se relaciona con la actividad de los granos de Speckle. Si no se puede detectar alguna diferencia entre las imágenes de Speckle, se puede afirmar que no hay actividad. Pero si, por lo contrario, la diferencia de imagen cambia, se afirma que hay actividad Speckle. Para complementar lo explicado se puede decir que el método de las diferencias temporales fue utilizado para la caracterización de la cámara CCD y la detección del cambio de actividad debido a la variación de la concentración de las muestras en estudio. En este método, a las imágenes resultantes de la diferencia, se le pueden aplicar los métodos de procesamiento estadísticos o cualquier otro descrito anteriormente (Nan Lu, 2008).

Por otro lado, se puede decir que la cámara CCD adquiere la exposición radiante del patrón de Speckle, como una imagen de resolución de  $M \times N$  píxeles, con un período de muestreo temporal  $T$ . Además, se considera que los píxeles tienen forma cuadrada con una longitud lateral  $d$ . Se puede asumir que la intensidad  $I(r, t)$ , no varía apreciablemente durante el tiempo de exposición  $t_e$ , entonces la energía radiante  $E(m, n, k)$  capturada por el píxel con coordenadas  $x = md$ ,  $y = nd$ , en el momento  $t = kT$ , correspondiente al  $k$ -ésimo fotograma, se puede escribir como:

$$\text{Ecuación 4. } E(m, n, k) = \iint_{A_{m,n}} \int_{kT}^{kT+t_e} I(r, t) dx dy dt \approx I(m, n, k) t_e d^2$$

donde  $m = 1, 2, 3, \dots, M$ ;  $n = 1, 2, 3, \dots, N$ ;  $k = 1, 2, 3, \dots, K$ ;  $K$  es el número de fotogramas, y  $A_{m,n}$  denota la región de  $m, n$  píxeles. La imagen capturada viene con ruido, suponiendo ruido electrónico aditivo en cada píxel, obtenemos que los elementos de la matriz de imagen  $S(m, n, k)$  del patrón de moteado se pueden escribir en la forma:

$$\text{Ecuación 5. } S(m, n, k) = I(m, n, k) t_e d^2 + E_{\text{ruido}}(m, n, k)$$

donde  $E_{ruido}(m, n, k)$  es la exposición de intensidad equivalente al ruido electrónico. Ahora definimos los elementos de la matriz  $\|D(m, n, k)\|$  de diferencias como:

$$\text{Ecuación 6. } D(m, n, k) = [(I(m, n, k + p) - I(m, n, k))]t_e d^2 + (E_{ruido}(m, n, k + p) - E_{ruido}(m, n, k))$$

Donde  $p=1, 2, 3, \dots, p+k < K$ .

Si

$$\text{Ecuación 7. } \langle (I(m, n, k + p) - I(m, n, k))^2 \rangle t_e^2 d^4 \leq \sigma_{ruido}^2$$

Donde:

$$\text{Ecuación 8. } \sigma_{ruido}^2 = \langle [E_{ruido}(m, n, k + p) - E_{ruido}(m, n, k)]^2 \rangle$$

Entonces en esa zona no hay actividad de moteado o se ha perdido en el ruido de fondo. Si, por el contrario:

$$\text{Ecuación 9. } \langle (I(m, n, k + p) - I(m, n, k))^2 \rangle t_e^2 d^4 > \sigma_{ruido}^2$$

La señal de actividad Speckle aumenta con el ruido de fondo. Según los autores (L. Martí-López, 2010). Si se tiene un periodo de muestreo mayor que el tiempo de correlación del campo de Speckle dinámico, esto es  $T \gg \tau$ , se tiene entonces patrones de speckle no correlacionados y definimos:

$$\text{Ecuación 10. } \langle I(m, n, k + p) \rangle > I_{umbral} = \frac{\sqrt{2\sigma_{ruido}^2}}{2t_e d^2}$$

Si la condición Ecuación 10 se cumple, entonces el patrón no está correlacionado y puede interpretarse, como una condición necesaria, para obtener una actividad de moteado detectable en un ruido de fondo. Siendo entonces  $I_{umbral}$  el valor umbral de la intensidad, si es mayor está correlacionado y si no, no lo está.

En la práctica, la intensidad media debe elegirse de modo que  $I(m, n, k) \gg I_{umbral}$ , para facilitar la segmentación de la zona de actividad de la imagen Speckle, durante su procesamiento digital. Ahora bien, si el speckle está completamente correlacionado, entonces:

$$\text{Ecuación 11. } (I(m, n, k + p) - I(m, n, k))^2 = 0$$

En consecuencia, la diferencia del patrón de Speckle se pierde en el ruido de fondo y no se puede detectar ninguna actividad. Del análisis anterior es posible concluir que si el intervalo de tiempo  $pT$  es mayor que el tiempo de correlación y la intensidad media es lo suficientemente grande, las matrices de la imagen de diferencia  $\|D(m, n, k)\|$ .

En este método, a las imágenes resultantes de la diferencia, se le pueden aplicar los métodos de procesamiento estadísticos o cualquier otro descrito, y el valor medio del pixel  $D(\tau)$  se calcula mediante la expresión (Leal, 2020).

Ecuación 12.

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

### Método de las diferencias temporales modificado

Debido a que se necesita evaluar los cambios de la intensidad de una ventana de tiempo determinado se realiza una modificación del método de las diferencias temporales, con el fin de obtener una correlación temporal (ver Figura 10).

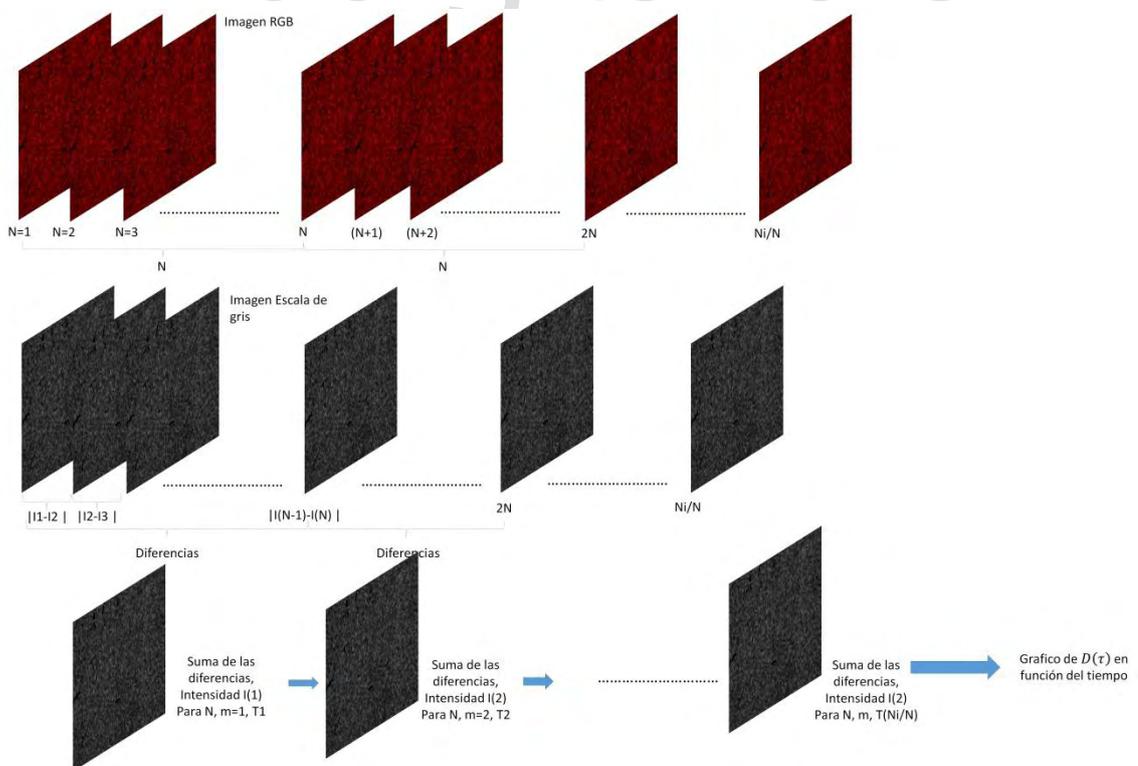


Figura 10. Método de las diferencias temporales modificado (Leal, 2020).

Se define una ventana del total del video en estudio y se separa por segmentos, es decir, se define a  $N$  como el número de fotogramas donde se hará la evaluación de la diferencia de la intensidad, donde posteriormente se traslada este intervalo de manera periódica ( $m$ ) en todo el vídeo que se va a procesar. Luego, para cada valor de  $mN$ ,  $m$  puede tomar los valores comprendidos de 1 hasta  $Ni/N$ , por otro lado,  $Ni$  es el número total de fotogramas del video, donde se obtiene un valor medio del pixel  $D(\tau)$  para  $N$  imágenes totales, para cada valor de  $m$ , en un intervalo de tiempo constante, hasta completar todos los fotogramas del vídeo adquirido (Leal, 2020).

### **Aplicaciones**

En la actualidad existe numerosas aplicaciones a diversos fenómenos que se pueden hacer con el uso de la técnica de bioSpeckle. Al pasar de los años y a medida que hay una evolución en las técnicas de almacenamiento y procesamiento de datos, Esta técnica se hace más posible de implementar, debido a que no se requiere de un gran conocimiento en esta técnica ya que es de fácil manipulación, sobre todo porque permite un estudio sin contacto, no destructivo y en la mayoría de los casos no perturbativo y con un funcionamiento en tiempo real o casi real, lo que lo hace más confiable y más rápido. Todo esto hace que algunos investigadores de diferentes especialidades se sientan atraídos por esta técnica. Como ya se ha mencionado anteriormente, se puede aplicar la técnica de Speckle a materiales biológicos como los que no son biológicos. Las aplicaciones pueden ser de carácter científico, industriales, médicas, agrónomas, entre otros. Por lo que a continuación, se describen algunas de las aplicaciones más importantes, de mayor demanda nacional y con mayor impacto social, lo que lo hace tener mayor potencial (Patiño, 2021).

### **Aplicaciones agrícolas**

La tecnología del Speckle láser, es una técnica de evaluación no destructiva que se puede utilizar de manera automatizada, agilizando los procesos de análisis de alimentos, como por ejemplo evaluar el estado de maduración de

frutas y verduras. No solamente en la rama de alimentos, se hace uso del Speckle, sino también en la reproducción animal agrícola (Patiño, 2021).

### **Semillas**

En el estudio de la calidad de semillas, uno de los desafíos es la evaluación del vigor y la viabilidad de la semilla (Filho, 1999). Una pieza clave para ello es la humedad y el Speckle dinámico tiene una gran capacidad de seguimiento de esta. La medición de humedad es una prueba clave en la producción y almacenamiento de semillas y granos, que requiere soluciones tecnológicas diferenciadas con altos niveles de precisión y exactitud, además de robustez y simplicidad.

Braga et al (2005), haciendo uso del método de diferencias generalizadas, utilizó 100 imágenes de semillas de frijol bajo iluminación láser He-Ne, con un intervalo de 0,08 segundos entre cada fotograma, demostró que el patrón de actividad de Speckle dinámico de semillas hidratadas, es mayor que el patrón de actividad de semillas secas. Un estudio reciente utilizando también diferencias generalizadas, pero en semillas de uchuva y adicional utilizando diferencia temporal, confirmó este resultado, con los dos métodos se detectó mayor actividad en los patrones de Speckle dinámico en las semillas vivas hidratadas, que en las semillas vivas secas y no viables secas (Inciarte, Martí, Ramírez, Hernandez, Vilorio, & Otálora, 2012).

También se implementaron técnicas de Speckle dinámico, para la detección de contaminación por hongos en semillas (Braga Jr, y otros, 2005; Braga Jr, y otros, 2005; Rabelo, Enes, Braga Jr, & Dal Fabro, 2011) adoptaron los métodos diferencias generalizadas e intensidad media, así como el algoritmo de Fujii, para la evaluación de la fluctuación del biospeckle en la semilla de frijol. Los resultados obtenidos mostraron la capacidad de la técnica empleada, para identificar la presencia de microorganismos en el frijol. Las semillas inoculadas con hongos exhibieron mayor actividad de biospeckle, en comparación con el grupo de control.

## Frutas

Una de las evaluaciones en la que más se utiliza la técnica del Speckle dinámico, es en el análisis de calidad de las frutas. Cuando la fruta está creciendo o envejeciendo su actividad celular sufre una modificación que se refleja en su biospeckle. Esto se debe a que el soporte mecánico de la célula vegetal, es mantenido por una pared celular, cuya función básica es proteger la membrana celular contra rupturas mecánicas y osmóticas. La pared celular, entre otros elementos, está constituida por hemicelulosas, pectina y proteínas estructurales. Después de la cosecha y durante el proceso de madurez, la mayor parte de la pectina se disuelve, lo que reduce la fuerza de atracción entre las células, es decir, durante este proceso hay actividades específicas de maduración en la fruta. La estructura celular, puede variar de un espécimen a otro y el movimiento de los componentes celulares también. Por tanto, se puede esperar que el Speckle formado por diferentes células sea diferente y que, además, el Speckle cambiará a medida que la célula envejezca. En otras palabras, se puede usar un Speckle para distinguir especímenes y también la edad del material biológico.

El primer trabajo que mostró diferencias, en la evaluación del Speckle temporal entre una manzana, un tomate y una naranja fue hecho por (A. Oulamara, 1989) . Luego el trabajo de (Xu, Joenathan, & Khorana, 1995) demostró que el biospeckle podría utilizarse para controlar la edad y la vida útil de los especímenes botánicos (naranjas, papas, manzanas, rábanos, tomates) porque las fluctuaciones temporales de los granos de Speckle, disminuyen con el envejecimiento. Utilizando un láser He-Ne polarizado como fuente de luz coherente y una cámara de matriz CCD, conectada a un procesador de imágenes, demostró que el ancho total a la mitad del valor máximo (*FWHM*) de estas muestras con diferentes tiempos de cosecha, varió de 0.33 segundos con frutas de 1 día a 0.97 segundos con frutas de 2 semanas. Esta variación ocurre, porque en todo el período de observación, la actividad de la muestra disminuye con el tiempo, y luego las variaciones del Speckle disminuyen, resultando en un aumento de la autocorrelación *THSP* y, en consecuencia, su *FWHM*.

(Zhao Y, 1997) confirmaron estos resultados y adicional informó que una mayor actividad de *biospeckle* indica una mayor velocidad de flujo en las venas

de las muestras botánicas, por lo que este método también se puede utilizar para monitorear el transporte de nutrientes.

Existen también otros fenómenos, que causan cambios en el speckle de la fruta que permiten estudiarla a través de este, como es el estudio de lesiones, por ejemplo, hematomas en material biológico como frutas y verduras (Pajuelo M, 2003) , han probado el daño en manzanas utilizando varias técnicas de Speckle dinámico, utilizaron métodos cuantitativos, incluida la autocorrelación de la historia temporal de los patrones de Speckle.

También se ha demostrado que la temperatura de almacenamiento afecta la fluctuación medida del biospeckle (Kurenda A, 2012). Los índices calculados de la dinámica del biospeckle de la manzana (es decir, el contraste del speckle, el momento de inercia y el coeficiente de correlación) disminuyeron cuando se enfrió la muestra.

### **Reproducción animal**

El área de reproducción bovina es de gran interés en la rama de la agronomía. Uno de los criterios más importantes en este tema, es el relacionado a la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides. El análisis físico del semen (Henry, 1999) consiste en la evaluación del volumen, la motilidad macroscópica e individual, la concentración, morfología de los espermatozoides y la presencia de elementos inusuales en el eyaculado, como leucocitos, células sanguíneas y células inmaduras del linaje del espermatogénesis.

En los últimos años se han desarrollado algunas técnicas y dispositivos en el campo del análisis, para la manipulación de semen y gametos, utilizando principios láser. En el proceso de espermatogénesis, se ha demostrado que el láser puede tener efectos bioestimuladores sobre las células germinales, también se realizan ensayos de preselección del sexo de los espermatozoides, haciendo uso del láser y numerosas otras aplicaciones.

El uso de la técnica de Speckle dinámica no demoró en figurar. Desde el año 2005 un grupo multidisciplinario de la Universidad Federal de Lavras, Brasil, ha realizado múltiples esfuerzos para desarrollar la tecnología del láser biospeckle, como una herramienta confiable para analizar muestras de

esperma de animales. Los primeros resultados se obtuvieron utilizando el THSP y el momento de inercia, que fueron útiles para discriminar diferentes actividades de motilidad del semen de carnero y mostrar una alta coherencia, en comparación a los análisis de microscopía óptica comunes. Además, la técnica pudo seguir los cambios que se producían en la muestra, cuando los espermatozoides iban reduciendo su actividad, provocada por un proceso de enfriamiento (Ribeiro, 2006; Silva, 2005).

En el semen congelado de toro (*Bos taurus indicus*), se observó que el biospeckle era sensible a muestras de semen con actividad alta y baja, también para detectar patrones de disminución de la motilidad (velocidad y porcentaje de células móviles), a lo largo del tiempo, que es muy útil para evaluar la viabilidad del semen, especialmente después del descongelamiento.

Múltiples parámetros pueden ser medidos en un análisis físico del semen, entre ellos el tiempo de licuefacción. El semen es un gel espeso en el momento de la eyaculación que normalmente, se vuelve líquido minutos posteriores a la eyaculación. El tiempo de licuefacción, es el tiempo que tarda el semen en volverse líquido, y normalmente es evaluado visualmente, es decir se necesita de un perito evaluador. Dicho parámetro permite caracterizar el estado reproductivo de la especie en estudio, permitiendo hacer comparaciones, que permitan acrecentar la eficiencia de la reproducción, por ejemplo, del ganado vacuno.

En 2020, Leal, creó un método, con la técnica de Speckle dinámico que permite medir el tiempo de licuefacción de una muestra de semen, haciendo una modificación del método de las diferencias temporales, consideró para el procesamiento 10 fotogramas y obtuvo la diferencia temporal en 500 puntos, separados en intervalos de 2 segundos. En su trabajo, definió el tiempo de licuefacción  $T_L$  como el tiempo transcurrido en alcanzar el 98% del valor de la intensidad registrada del speckle, adicional pudo obtener otro parámetro, el tiempo de contracción del pene  $T_C$ . Si bien el ensayo fue realizado con una muestra de semen humano, el autor indica que puede ser empleado para cualquier tipo de muestra de semen, y puede ser un utilizado para el

diagnóstico de la fertilidad o infertilidad de un individuo, este estudio representa una base potencial para el estudio de la viabilidad del semen bovino.

Al obtener de manera cuantitativa el tiempo de licuefacción 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, permitiendo también comparar las características del líquido seminal entre distintas especies (Leal, 2020).

### **Monitoreo de Parásitos**

Con la tecnología láser, se han desarrollado numerosos estudios de la motilidad de los parásitos. Especialmente, aquellos con afines a la evaluación de la acción de los fármacos a corto plazo sobre estos. El Speckle dinámico permite evaluar la actividad de los parásitos bajo diferentes concentraciones del fármaco. (Mohammad Ansari, 2016) mostraron resultados en su trabajo sobre la correlación espacio-temporal y el tamaño del grano de Speckle, para evaluar la acción inmediata de la *Epirrubicina* sobre los parásitos *Trypanosoma Cruzi*, paso necesario antes del tratamiento de infecciones, al considerar las estadísticas de segundo orden de las imágenes de Speckle. Sus resultados arrojan que la *Epirrubicina* produce en el primer minuto un efecto a corto plazo, sobre la actividad del patrón de *biospeckle* de *T. cruzi*, que permanece con un perfil similar hasta los 15 min. Utilizaron el método *motion history image* (MHI), el método MHI evita la complejidad, así como el gran cálculo en los métodos basados en el emparejamiento de secuencias y detecta un cambio en el patrón de moteado.

En diferentes artículos (Hilda C. Grassi, 2016; Mohammad Ansari, 2016) autores en común al trabajo mencionado anteriormente, hacen uso de distintos métodos de Speckle dinámico, LASCA, Imagen del Historial de Movimiento (HMI, siglas en inglés para *Motion History Image*), entre otros, implementando la tecnología de procesamiento de información de imagen digital, sus resultados sugieren que este tipo de análisis, puede ser una plataforma para probar la susceptibilidad de parásitos a fármacos específicos, lo cual tiene aplicaciones potenciales en microbiología, desarrollo de vacunas e

identificación temprana de microorganismos. Específicamente en el análisis realizado con el MHI sobre la respuesta del *T. Cruzi* ante la *Epirubicina*, el método no solo diferencia la actividad de los parásitos en presencia y ausencia del fármaco, sino que también es capaz de detectar un efecto instantáneo de la *Epirubicina*, sugiriendo que la aplicación de este método, es eficaz para el estudio de la respuesta instantánea del parásito ante otros fármacos candidatos.

### **Aplicaciones Médicas**

Briers et al (1981), informaron de la primera aplicación biomédica, pero esta técnica no era en tiempo real y tenía limitaciones prácticas, debido a que no usaba sistemas digitales, lo que impedía su uso clínico. Con el desarrollo de adquisición y procesamiento digital, en la década de los 90, fue que se presentaron los desarrollos esenciales de la aplicabilidad clínica del Speckle dinámico.

En medicina, la técnica del Speckle dinámico es comúnmente llamado Imagen de Speckle Láser o Imagen de Contraste de Speckle Láser (LSCI, por sus siglas en inglés). LSCI se utiliza principalmente, para mapear los sistemas de flujo, especialmente el flujo sanguíneo. Como ya sabemos existe una conexión entre las fluctuaciones del patrón de Speckle y el movimiento de los centros de dispersión en los organismos vivos, por ejemplo, el movimiento de los glóbulos rojos y una forma en la que se manifiestan las fluctuaciones del Speckle es en una reducción del contraste normalmente alto del patrón de Speckle. LSCI es una técnica basada en el cambio dinámico en esta luz retrodispersada como resultado de la interacción con los glóbulos rojos. Se puede utilizar para visualizar la perfusión en varios tejidos y, aunque esta técnica ha sido ampliamente descrita en la literatura, la implementación clínica real está rezagada (Heeman, Steenbergen, van Dam, & Boerma, 2019).

Sin embargo, el LSCI representa una poderosa herramienta, para obtener imágenes de la perfusión tisular y numerosos estudios se han desarrollado con este fin. Comenzando como una herramienta de investigación analógica lenta, los sistemas LSCI ahora pueden obtener imágenes del flujo sanguíneo en

tiempo real (o casi), como resultado del rápido aumento de la potencia digital. Esto permite la traducción de LSCI en la práctica clínica, donde es muy adecuado para la evaluación de la perfusión, en una amplia gama de tejidos. Entre las aplicaciones médicas tenemos:

En reumatología, se utiliza para determinar el estado de la esclerosis sistémica, caracterización de las etapas de la artritis en animales (Son & et al, 2014) , e imágenes de Speckle láser endoscópico del flujo sanguíneo tisular aplicados en la rodilla humana (Forrester & al, 2003).

En dermatología, para el monitoreo de las manchas de vino de Oporto (Huang & al, 2009), potencial técnica para la evaluación de las úlceras del pie diabético, relacionadas con la isquemia local (Mennes & al, 2018), mediciones de flujo de la microcirculación en las úlceras venosas (Huisman, Bakker, Wittens, & A, 2013) , predicción de úlceras venosas y úlceras digitales en pacientes con esclerosis sistémica (Ruaro & Et al, 2015).

La oftalmología es el campo de investigación más grande, la técnica de Speckle dinámico se utiliza muy ampliamente, se usa para medir el flujo retiniano superficial y profundo ( Sugiyama & et al, 2010) , mediciones de perfusión de la circulación coroidea, que pueden ser críticas para el diagnóstico de diversas enfermedades como glaucoma, retinopatía y degeneración macular, medir la retina, la cabeza del nervio óptico (ONH) y la dinámica del flujo sanguíneo coroideo (Tamaki & et al, 1994), detectar efectos sobre el sistema cardiovascular de enfermedades, mediante el estudio del flujo sanguíneo ocular (Shiba & et al, 2012).

En neurología, para el monitoreo del flujo sanguíneo cerebral (Parthasarathy & Et al, 2010) en cirugía del tracto intestinal se usa para medir perfusión sanguínea del hígado (Eriksson S, 2014), identificar áreas isquémicas en el tubo gástrico (Milstein & Et al, 2016). En odontología, para el estudio del flujo de sangre gingival (Heeman, Steenbergen, van Dam, & Boerma, 2019) y la clasificación de la caries dental (Gavinho & al, 2018).

## **Aplicaciones en muestras biológicas**

Las muestras biológicas son muy complejas, ya que tienen una red de interacciones asociadas con una gran cantidad de elementos, por tanto, cuando se iluminan muestras con las mismas características, no se obtendrá la misma respuesta con exactitud y es esta variabilidad la que se maneja mediante el uso de réplicas y análisis estadísticos. Por lo tanto, los informes de las aplicaciones del Speckle dinámico, se basan principalmente en una evaluación estricta de valores medios y otras medidas estadísticas (Braga Jr, y otros, 2005).

Es de esperar entonces que los resultados presentados por el Speckle dinámico o *Biospeckle*, se relacionan con muchos factores en un fenómeno colectivo, mediante una medida global, siendo esta la mejor manera de obtener un resultado consistente (Braga Jr, y otros, 2005) . En esta subsección, cubriremos las aplicaciones del Speckle dinámico, en distintas áreas biológicas y se dará una breve revisión de los más utilizados y actuales estudios.

## **Aplicaciones en muestras no biológicas**

Las pruebas sin contacto, no destructivas y, en su mayoría, no perturbativas con funcionamiento en tiempo real, o casi, son características codiciadas del enfoque óptico que ofrece el Speckle láser dinámico, para algunos problemas tanto en la ciencia como de instrumentación industrial. A continuación, describiremos las aplicaciones con más estudios en el campo a saber, el secado de pintura y la corrosión. Posteriormente una mención de otras aplicaciones en muestras no biológicas.

### **Secado de pintura**

Uno de las aplicaciones ampliamente estudiada, es el secado de pintura. La pintura es básicamente un líquido que después de su aplicación, sobre un sustrato en una capa fina, se convierte en una película sólida opaca (Braga Jr, y otros, 2005). El contenido de la pintura puede variar, y según los elementos con los que esté formado, por nombrar algunos, los disolventes, el pigmento, la resina, acrílicos, poliésteres o aceites, entre otros, y según la cantidad de los mismos, es que la pintura se utiliza. Muchos procesos industriales, involucran

el recubrimiento de superficies con capas delgadas de pintura, para impartirle propiedades deseables como brillo, propiedades adhesivas, aceptabilidad de la tinta, sensibilidad a la luz y propiedades magnéticas, como barreras para prevenir la corrosión, modificar la reflexión de la luz o la radiación térmica de una superficie, entre otros.

El secado es la parte inicial del proceso de recubrimiento y este se rige, aparte de los factores ambientales, por el nivel de dilución, el tamaño de la capa de pintura y la geometría de la superficie, así como por su tipo. Las técnicas de Speckle dinámico han demostrado ser herramientas útiles, para (Amalvy, 2001) descubrieron que es posible, utilizando el método del momento de inercia, seguir el secado de los recubrimientos tanto a base de disolvente, como a base de agua, para obtener también información sobre el proceso. Los resultados se correlacionan favorablemente, con la pérdida de peso obtenida con las mediciones gravimétricas convencionales, cuando los resultados se normalizan convenientemente.

Actualmente existen productos comerciales para evaluar el proceso de secado de pintura y tinta en tiempo real. Utilizan cámaras CCD para adquirir imágenes de patrón de Speckle de propagación libre, tanto para geometrías de transmisión como de retrodispersión, como por ejemplo HORUS®, que utiliza una medición de actividad basada en una magnitud definida en unidades de frecuencia, es decir, la transformada rápida de Fourier y la densidad del espectro de potencia.

Muchas veces, cuando se quiere probar la fiabilidad de un nuevo método de Speckle dinámico, se realiza primero en secado de pintura y los resultados se comparan con los encontrados en técnicas usadas anteriormente, o con los resultados de un estudio diferente como con los análisis gravimétricos.

### **Corrosión**

La corrosión es el deterioro que sufre un material a consecuencia de un ataque químico por su entorno. Un ejemplo de ello es el debilitamiento del hierro debido a la oxidación de los átomos de hierro. La medición típica de la corrosión es una amplia gama de técnicas. El método más común utilizado

para un metal o aleación, es la medición de la pérdida de peso, determinada experimentalmente por contacto directo con un medio corrosivo. Sin embargo, estudios sugerían que se podía utilizar el fenómeno de Speckle también como un método de análisis. Los cambios en un perfil metálico, producen modificaciones en el patrón de interferencia bajo una iluminación de luz coherente, y el patrón de Speckle cambia con el tiempo. Por tanto, los fenómenos de corrosión también pueden estudiarse mediante la técnica del biospeckle.

El primer estudio que sugiere que las técnicas de Speckle láser podrían implementarse en el campo de la corrosión metálica fue hecho por (Habib, 1989). El estudio se basa en un modelo matemático, que describe la disolución catódica y la deposición anódica en metal, pudo establecer una relación entre los datos de corrosión y el cambio de rugosidad de la superficie del acero inoxidable. Más adelante surgieron estudios con cobre y latón, y se utilizó la técnica de correlación de Speckle en cobre con placas inhibidoras de corrosión con sus superficies pulidas, para estudiar la oxidación en tiempo real (Muramatsu, 1994).

A partir de entonces, el monitoreo de la corrosión mediante la técnica de Speckle dinámica, no se ha detenido y números estudios se han realizado a lo largo de los años. La mayoría de estos estudios, se hacen con la finalidad conocer la resistencia esperada de un determinado metal o aleación, a un proceso de corrosión en un entorno específico, ya sea para fines industriales o de ingeniería, es muy importante conocer la durabilidad de un material en algunos entornos, para su uso posterior.

### **Otras aplicaciones**

Otras aplicaciones del Speckle dinámico que se pueden encontrar son: Mediciones de tensiones y deformaciones en distintos materiales (Pfeifer, Mischo, Ettemeyer, Wang, & Wegner, 1998) , medición de tensión residual (Lothhammer & al, 2017), análisis de fractura y torsión de metales (Silva, 2005), detección de fugas en contenedores, análisis de comportamiento termomecánico de componentes electrónicos, monitorear el movimiento de

partículas en un líquido (Mizukami, 1997), medir la velocidad de objetos difusos (Asakura, 1981) y medir distancias (Somero et al, 2006), se pueden incluir como muestra del potencial del uso de esta técnica.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### Tipo y diseño de la investigación

Este estudio se enmarca en la metodología de una investigación experimental, además es considerada como investigación bajo un enfoque cuantitativo, ya que se basa en el control, el análisis y la observación del fenómeno que se busca estudiar (Hernández, Fernández, & Baptista, 2014), afirman que el enfoque cuantitativo utiliza la recolección y el análisis de datos para contestar preguntas de investigación, confía en la medición numérica, el conteo y frecuentemente en el uso de estadística para establecer con exactitud patrones de comportamiento en una población.

#### Materiales y métodos

##### Equipos

**Fuente de luz coherente:** La fuente de luz coherente era un láser. La emisión estimulada de luz láser tiene las siguientes propiedades: muy coherente, monocromática y un alto grado de colimación. El láser utilizado en este estudio es un láser verde (ver Figura 11), marca PSU-H-LED, modelo MGL-F, longitud de onda 532 nm, potencia regulable hasta 3W (Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co, 2022).



Figura 11. Láser de 532 nm.

**Microscopio óptico:** Es un aparato que posibilita una mejor visibilidad de objetos de menor tamaño, obteniendo una imagen aumentada de los mismos. Habitualmente los microscopios vienen equipados con 3 o 4 objetivos, cada uno con un aumento distinto y que se puede seleccionar gracias al revólver (ver Figura 12). El objetivo es el elemento más importante y complejo del microscopio óptico, ya que en él se produce la mayor parte del aumento aportado por el microscopio. Se utilizó un microscopio Nikon modelo SBR-kt, con objetivos de 4, 10, 40 y 100 X de amplificación, aperturas numéricas de 0,10; 0,25; 0,65 y 1,25. Con distancias focales de: 28,3; 14,8; 4,3 y 1,25 mm, respectivamente (Collins, 2021).



Figura 12. Microscopio Nikon SBR-kt (Patiño, 2021).

Para la evaluación de los parámetros microscópicos del líquido seminal se utiliza un microscopio óptico marca Leica (ver Figura 13), modelo DM750. Posee objetivos de 4, 10, 40 y 100 X; aperturas numéricas de 0,10; 0,22; 0,65 y 1,25; distancias focales de: 26,2; 7,8; 0,31 y 0,10 mm



Figura 13. Microscopio Leica.

**Mesa Óptica:** Se utilizó una mesa óptica (ver Figura 14), marca ThorLabs, modelo 590250-364831. Con medidas  $1m \times 0.80m \times 0.10m$ , con aislamiento de vibraciones y estabilidad térmica. La mesa tiene orificios de montajes de

roscado, facilitando la sujeción de los elementos que conforman el montaje experimental (Santos, 2023).

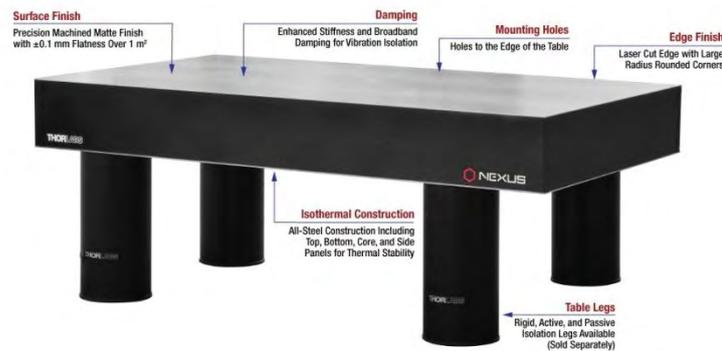


Figura 14. Mesa óptica ThorLabs (Santos, 2023).

**Medidor de potencia:** Es un dispositivo electrónico de mesa para pruebas que se emplea para medir la salida potencia de un equipo de fibra óptica, así como la potencia o la pérdida de una señal de luz láser y otras fuentes de luz monocromáticas o casi monocromáticas y la energía de las fuentes de luz pulsada (Santos, 2023).

Para este experimento es utilizado un medidor de potencia patentado por la empresa ThorLabs, modelo PM100A, serie P1000165. Este medidor de potencia posee un sensor que está bajo supervisión de la misma empresa ThorLabs, modelo S120C, serial 9122820, el sensor opera en un rango de longitud de onda de  $\lambda_s = (400 - 1100)\text{nm}$  y rango de potencia que oscila entre  $P_s = (50\text{nW} - 50\text{mW})$ , el mismo trae consigo una incertidumbre de medición del 3% (Mavilioa, Fernández, & Trivi, 2010).



Figura 13. Medidor de potencia con sensor incluido de ThorLabs (Santos, 2023).

**Refractómetro:** Es un instrumento de medida que permite obtener una prueba con mayor precisión del índice de refracción  $n$  de cada una de las muestras en estudio que fue utilizada en este experimento (ver Figura 15). Este posee una

fuentes de luz de 589,3 nm. Para la práctica se utiliza un refractómetro creado por la empresa RRA, modelo A21341– cc J-257, serial 13659, que cuenta con un rango de (1,26 –1,72) para el índice de refracción  $n$ ; a su vez cuenta con un rango de temperatura de (10 –100)°C y con una precisión de  $\pm 0,0001$  (Santos, 2023).



Figura 15. Refractómetro RRA, A21341–cc J-257.

**Cámara CCD:** Este dispositivo se encarga de hacer la modificación de una señal luminosa, en una señal eléctrica directamente digitalizada, aportando detectores en los rangos visibles, infrarrojo y UV cercano. El funcionamiento de un detector CCD se reduce de tal manera que cada píxel de la matriz CCD pertenece a un elemento semiconductor dentro de un condensador eléctrico, un fotón incidente crea un fotoelectrón cuando da a un electrón del semiconductor la energía necesaria para pasar el umbral energético, los fotoelectrones son depositados en el pozo de potencial, es decir, el píxel está correctamente polarizado, la lectura de estos fotoelectrones es controlada por la polarización de los píxeles, determinada por transistores de efecto campo. Esta lectura ocurre, directamente mientras un obturador tapa el objeto, es decir, la fuente de luz, o también por transferencia de trama. En este caso, una mitad de la superficie del CCD se dedica a recibir la señal, mientras que la otra solamente ve los fotones durante su tránsito hacia el registro de lectura (l'Observatoire de Paris, 2021). La cámara utilizada en este experimento (ver Figura 16), fue una cámara marca ThorLabs modelo D1024G13C, monocromática, de 1024x768 píxeles de resolución, con un sensor de 1/3 pulgadas marca Sony CX204AK, un área sensible exacta de 4,762x3,571 mm, un tamaño de píxel 4,65  $\mu m$ , cuadrado y con la capacidad de que las imágenes de digitalizan en la cámara misma sin necesidad de un capturador de fotogramas adicional (Thorlabs Scientific Imaging, 2018).



Figura 16. Cámara CCD ThorLabs (Patiño, 2021).

**Computadora:** Para el procesamiento digital de las imágenes capturadas, se utilizó un computador con Windows 7 de 64 bit, con un procesador Intel(R) Core(TM) i-3-4150, CPU@ 3.50GHz y 8 GB de memoria RAM.

**Baño de María:** Para mantener la temperatura de los espermatozoides posterior a la licuefacción a una temperatura estable, utilizando un equipo marca: Thermo scientific, modelo: Neslab RTE 10, con un rango de temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$  a  $150^{\circ}\text{C}$ , un volumen de 11,3 L.



Figura 17. Thermo scientific Neslab RTE 10.

**Miscelaneos utilizados en el experimento:**

- Jabón neutro.
- Micropipetas.
- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Placa de Petri.

- Tubos Eppendorf milimetrados.
- Recolector de orina estéril.
- Termómetro.
- Cintas para medir pH.
- Colorante Eosina.
- Cámara de Neubauer.
- Solución fisiológica 0,9%.
- Alcohol antiséptico al 70%V/V.
- Gerdex.
- Termómetro de mercurio.

### **Muestra**

La muestra utilizada en esta investigación fue semen fresco proveniente de hombres en edades comprendidas entre 23 y 48 años de edad. Previo a la obtención de las muestras, por medio de un acta de consentimiento, se le solicitó a un grupo de 16 hombres ser donantes de su muestra de semen. Se les comunicó el uso que se le daría a sus muestras, y, además, se les indicó los pasos a seguir para la recolección correcta de la misma; se esperó la aprobación de cada uno de ellos, para así contar con una totalidad de 12 muestras de semen fresco, de las cuales 2 no pudieron ser procesadas por falla eléctrica al momento de recolección de los datos.

Los voluntarios deben tener al menos 72 horas de abstinencia sexual, realizándose la recolección según las recomendaciones de la OMS, al momento de la recolección de la muestra se le indica que debe realizar una limpieza previa de la zona de los genitales, con un jabón neutro. El proceso de masturbación se debe realizar garantizando que la muestra no se vea comprometida por agentes externos, contaminación por saliva o jabón. Este debe garantizar que todo el fluido es colectado en su totalidad y realizar toma del tiempo al momento de producirse la eyaculación, mediante el uso de un cronómetro, este tiempo será denominado como el tiempo de la eyaculación (Te) o tiempo inicial, expresado en minutos.

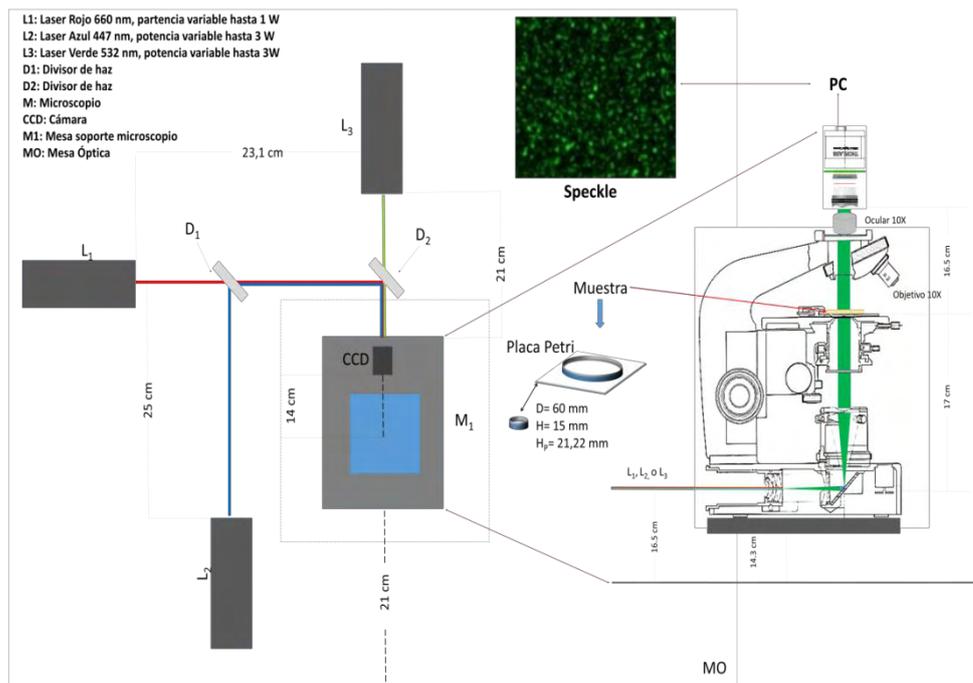
La adquisición de los datos de la muestra debe realizarse lo más pronto posible para poder percibir los cambios iniciales propios en el LS, este tiempo es necesario para ajustar el eje de referencia temporal en el procesamiento de las imágenes, al momento de ser procesados por el programa en Matlab.

### **Adquisición de datos**

El procedimiento experimental es dividido en dos etapas, la primera ocurre antes de la finalización del proceso de licuefacción (AL) y posterior a la licuefacción (DL) de las muestras de semen colectadas. Previa al inicio de la toma de la muestra, se requiere tener esterilizado los portaobjetos y cubreobjetos, y se debe garantizar que los mismos y la muestra se encuentre a una temperatura semejante a la corporal, para evitar el estrés térmico de los espermatozoides, para se mantiene un el *Chiller* a una temperatura de 36,4 °C, este debe estar a la temperatura requerida antes de la obtención de la muestra.

Antes de la licuefacción se toma el tiempo de la eyaculación (min), se determina el volumen de la muestra, temperatura muestra y ambiente, Ph inicial, viscosidad, aspecto, tres mediciones del índice de refracción (AL), utilizando una gota de semen. Se toma una muestra con un volumen de 0,5 ml, con una micropipeta marca: Thermo Electron Corporation, modelo: CH64906 4500, con un rango de medida de 0,5 a 5 mL, siendo colocada en una placa de Petri, evitando la presencia de burbujas, siendo colocada en el montaje dispuesto para el análisis por interferometría speckle. Una vez que se inicia a grabar los videos de speckle, se para el cronómetro, obteniendo la lectura de Te.

El montaje experimental de speckle consiste en un haz colineal, con longitud de onda 532 nm (láser verde) acoplado a un microscopio óptico (ver Figura 18), durante el recorrido del haz 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, para ser grabado los cambios en el patrón de interferencia con una cámara CCD (*charge-coupled device*), acoplada a un ordenador (PC).



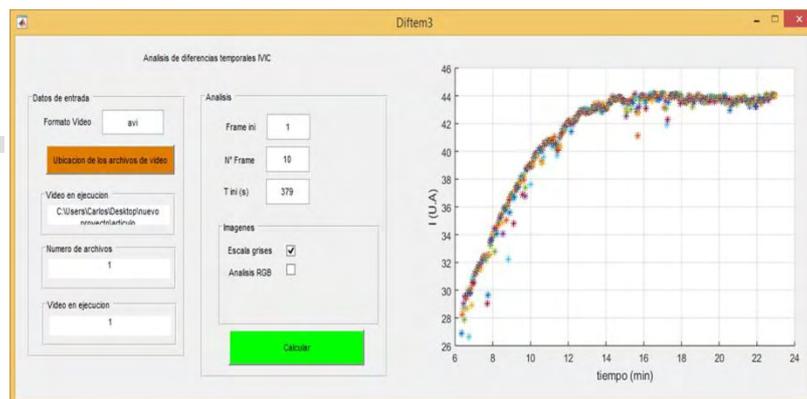
**Figura 18. Montaje experimental speckle.**

El principio de la técnica consiste en que el haz de luz se expande, dentro del sistema óptico del microscopio, posteriormente pasa por un difusor, que genera el patrón de interferencia inicial. Con ayuda de un espejo se desvió un ángulo de 90° la trayectoria del haz, para que atravesasen la muestra en cuestión (semen fresco), que estuvo depositada en una placa de Petri. Los cambios en el patrón de speckle son grabados con una cámara CCD, situada en el ocular a una distancia de la muestra de 16,5 cm y acoplada a un ordenador, para el almacenamiento de las imágenes provenientes de la cámara CCD y finalmente el procesamiento de las mismas. Este montaje tiene la peculiaridad de permitir el uso de varias longitudes de ondas, dependiendo de las características de las muestras a ser estudiadas.

Antes de la adquisición de los videos se procede a realizar la medición de la potencia en mW de entrada en la muestra, para ello se utiliza el programa *Optical Power Monitor* (OPM) de ThorLabs es una interfaz gráfica de usuario o *Graphical User Interface* (GUI), diseñada para el uso sencillo de los medidores de potencia de ThorLabs. El OPM monitorea y guarda las mediciones del medidor de potencia y cuenta con una interfaz para la visualización y el análisis de datos. La versión del software en uso es 3.1.3778.562, es compatible y se utiliza en conjunto con el medidor de potencia (Santos, 2023).

Para el procesamiento de los videos adquiridos, se evalúa los cambios en la intensidad del patrón de speckle por el método de las diferencias temporales modificado, explicado anteriormente y propuesto (Leal, 2020), para monitorear la evolución temporal el proceso de licuefacción del semen utilizando solo el láser verde, ya que este proceso es irreversible.

Se realiza el procesado de los videos de manera automática, a través de un código escrito en Matlab, diseñando una interfaz gráfica propia (ver Figura 19). Teniendo como parámetros de entrada el formato del video, 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 ( $T_e$ ), mostrando los resultados en tiempo real, para la pronta verificación de la variación de la intensidad en función del tiempo. Este programa se ha desarrollado especialmente para las necesidades de este estudio.



**Figura 19. Interfaz gráfica en Matlab para el análisis por el método de las diferencias temporales modificado.**

Los parámetros de adquisición de la cámara CCD es de 5 FPS, una Calidad de 75%, un tiempo de exposición de 120 ms, utilizando el programa ThorCam, adquiriendo los videos en formato avi. Se evalúa el proceso de licuefacción en un tiempo de 40 min, desde que se comienza la adquisición de los videos, teniendo un total de 12.000 fotogramas, con un tamaño de archivo de aproximadamente 1,3 gigabytes.

Posterior al proceso de obtención de los videos del proceso de licuefacción, se procede a la observación con el microscopio una gota de semen, como se

muestra en la Figura 20, para verificar el correcto proceso de licuefacción del semen, y hacer la estimación del grado de dilución requerido para la determinación de la concentración y viabilidad de la muestra. Si en esta evaluación se estima que hay más de 100 espermatozoides por campo, se utiliza una dilución de 1/10, de ser menor una de 1/20 respectivamente.



**Figura 20. Verificación muestra al microscopio.**

Una vez finalizado el proceso de licuefacción del líquido seminal, transcurrida una hora desde el momento de la recolección de la muestra, se procede a realizar las mediciones del Ph posterior a la licuefacción. Se mide el índice de refracción (ver Figura 21). Para evaluar los posibles cambios de estas variables posteriores al proceso de licuefacción.



**Figura 21. Determinación del índice de refracción.**

Para la medición de los parámetros microscópicos viabilidad y concentración, utilizando la cámara de Neubauer, es necesaria diluir la muestra, para ello se utiliza solución fisiológica al 0,5% V/V, para esta investigación se utilizó diluciones de 1/10. Utilizando un volumen de semen de 0,2 ml, en solución fisiológica, mas eosina para la tinción de los espermatozoides.

Se colocan 10  $\mu\text{l}$  de la disolución en la cámara de Neubauer, utilizando una micropipeta marca: Eppendorf Research plus, con un rango de medida de 0,5 a 10  $\mu\text{L}$ , se procede a realizar el conteo de los espermatozoides vivos y muertos, por cada uno de los campos, para este cálculo se utilizó la App *Cells Calculator*, versión V2.2, procediendo a contar el número de espermatozoides vivos y muertos por campo, como se muestra en la Figura 22.

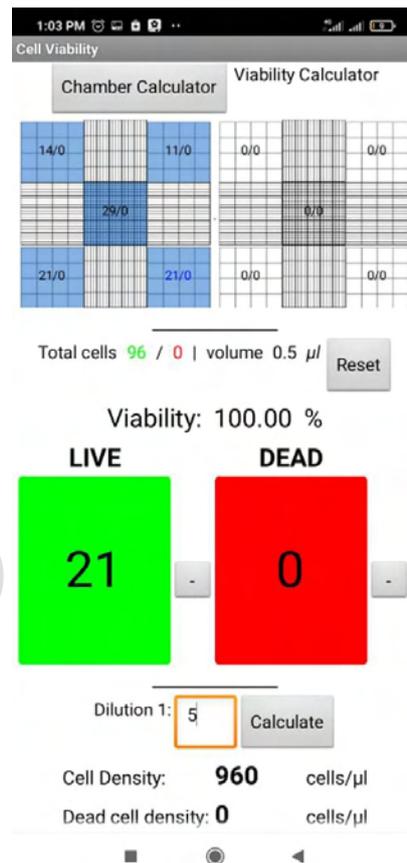


Figura 22. App para la determinación de la concentración y viabilidad de las muestras.

Finalmente, en la Figura 23 se muestra el flujo grama de la adquisición de los datos, por las diferentes técnicas utilizadas en el presente estudio, para cada una de las muestras colectadas.

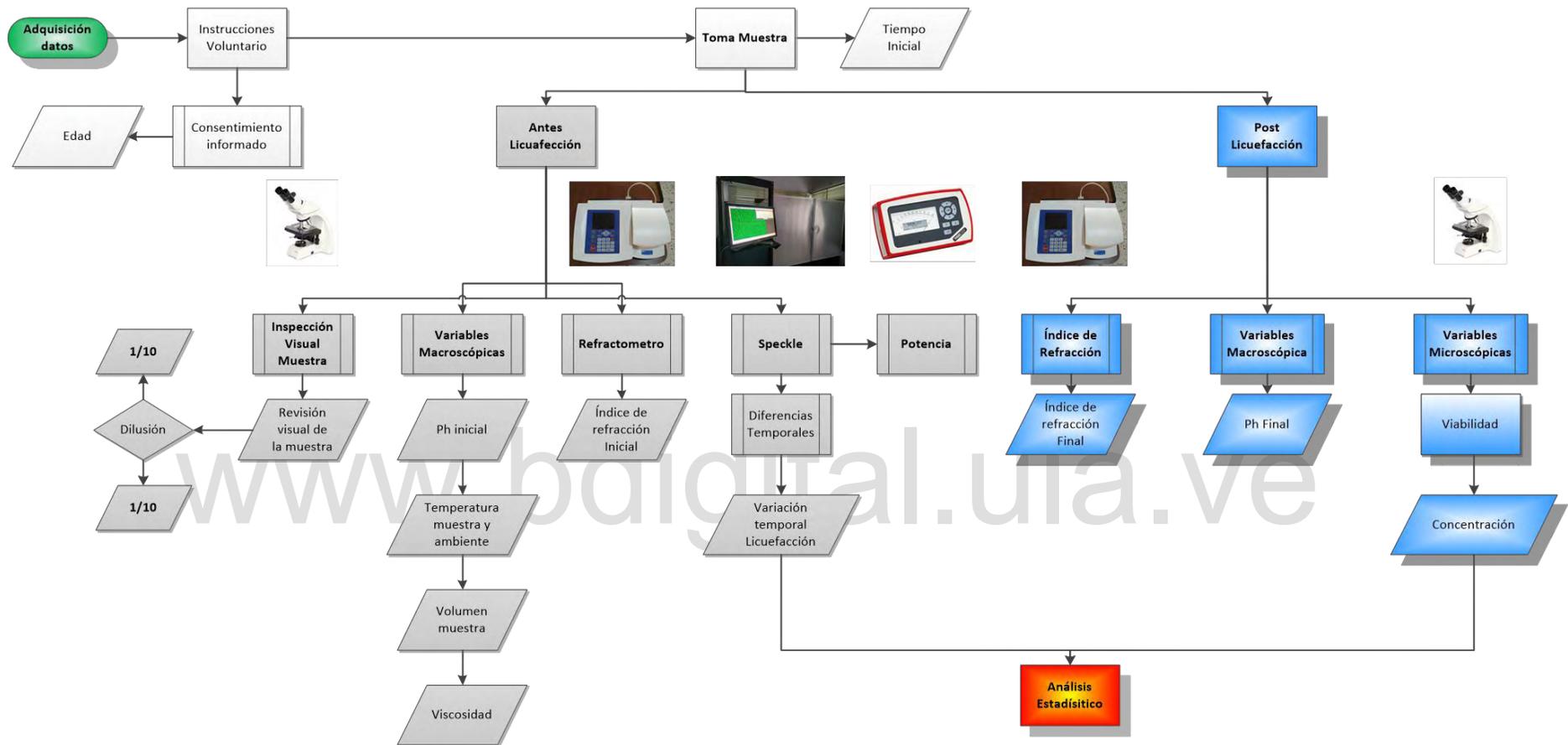


Figura 23. Esquema del protocolo empleado para la adquisición de los datos.

## CAPÍTULO IV

### Resultados y discusiones

A continuación, se presentan los resultados del estudio, así como también, las discusiones que se generaron de los mismos. Se representan gráficamente las variables involucradas en la investigación, asimismo, tablas de datos sometidos a análisis, con el fin de evaluar la evolución temporal del proceso de licuefacción en muestras de semen fresco mediante speckel dinámico.

Como información general se obtienen 10 muestras factibles, los datos iniciales obtenidos por cada muestra se muestran en el Apéndice B. Las edades están comprendidas entre los 23 a 48 años de edad, con un valor medio de  $29,8 \pm 8,6$  años y un coeficiente de variación (CV) del 29%. Realizando las mediciones de los parámetros macroscópicos: Volumen total de la muestra ( $V_T$ ), Ph inicial ( $Ph_i$ ), Ph posterior al proceso de licuefacción ( $Ph_f$ ), temperatura de la muestra ( $T_M$ ), temperatura ambiente ( $T_A$ ) y viscosidad, mostrados en la Tabla 3. En esta tabla se puede observar que no hay cambios apreciables en el Ph en los procesos antes y después de la licuefacción, la temperatura de más muestras está entre 29 a 34 °C, con una media de  $31,1 \pm 1,3$  °C y un CV de 4,18%, de igual manera las condiciones de temperatura ambiente al momento de colectar las muestras, se encuentran entre 24 a 26 °C, con una media de  $24,91 \pm 0,54$  °C y un CV de 2,17%, la viscosidad y Ph siempre se encontró dentro de los valores esperados, no se presentaron cambios en el Ph previo y posterior a la licuefacción, según los valores previstos por la OMS. Finalmente, todas las muestras con un aspecto homogéneo de color gris-opalescente.

Tabla 3. Datos generalas y variables macroscópicas.

| Código | Edad (Años) | $V_T$ (mL) | $Ph_i$ | $Ph_f$ | $T_M$ (°C) | $T_A$ (°C) | Viscosidad |
|--------|-------------|------------|--------|--------|------------|------------|------------|
| P1     | 27          | 4,16       | 7      | 7      | 32         | 25         | Normal     |

|     |    |      |   |   |    |    |        |
|-----|----|------|---|---|----|----|--------|
| P2  | 23 | 1,68 | 7 | 7 | 30 | 25 | Normal |
| P3  | 27 | 5,10 | 7 | 7 | 29 | 25 | Normal |
| P4  | 25 | 3,43 | 8 | 8 | 34 | 25 | Normal |
| P5  | 28 | 1,49 | 7 | 7 | 30 | 26 | Normal |
| P6  | 23 | 4,85 | 7 | 7 | 31 | 24 | Normal |
| P7  | 43 | 5,64 | 7 | 7 | 31 | 24 | Normal |
| P8  | 29 | 2,75 | 7 | 8 | 31 | 25 | Normal |
| P9  | 25 | 3,74 | 7 | 7 | 31 | 25 | Normal |
| P10 | 48 | 1,92 | 7 | 7 | 31 | 25 | Normal |

Para el caso del volumen de las muestras, estas deben ser mayores a 1,5 mL y menores a 6 mL, las muestras obtenidas a excepción de la muestra P5 que presenta un posible caso de hipospermia, las demás se encuentran en los valores esperados, obteniendo un valor medio de  $3,17 \pm 1,64$  mL y un CV de 52%, encontrándose los valores en un rango de 1,49 a 5,64 mL, respectivamente.

Otro punto de interés es hacer la evaluación de las variaciones en el índice de refracción de las muestras del líquido seminal antes (ver Tabla 4) y después (ver Tabla 5) de la licuefacción. En estas se puede observar que los valores de desviación estándar y los coeficientes de variación no superan el 0,5%, el valor del índice de refracción promedio de todas las muestras, antes de la licuefacción es de  $1,3462 \pm 0,0033$ , con un CV de 0,25%; para el caso de las muestras posterior a la licuefacción se obtiene un valor de  $1,3467 \pm 0,0030$ , con un CV de 0,22%. Tomando como referencia el valor de índice de refracción de las muestras ya licuefaccionadas con las muestras previas a este proceso, se obtiene un porcentaje de diferencia del 0,04%, lo que indica que no se evidencian cambios en el índice de refracción de las muestras de semen antes y después de la licuefacción, por lo que esta propiedad óptica no muestra cambios evidentes.

**Tabla 4. Medidas con el refractómetro antes de la licuefacción.**

| Muestra | M1     | M2     | M3     | Pro    | Des    | CV   |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
| P1      | 1,3424 | 1,3429 | 1,3430 | 1,3428 | 0,0003 | 0,02 |
| P2      | 1,3445 | 1,3443 | 1,3443 | 1,3444 | 0,0001 | 0,01 |
| P3      | 1,3442 | 1,3448 | 1,3448 | 1,3446 | 0,0003 | 0,03 |
| P4      | 1,3451 | 1,3449 | 1,3449 | 1,3450 | 0,0001 | 0,01 |
| P5      | 1,3452 | 1,3459 | 1,3461 | 1,3457 | 0,0005 | 0,04 |
| P6      | 1,3445 | 1,3463 | 1,3470 | 1,3459 | 0,0013 | 0,10 |
| P7      | 1,3479 | 1,3480 | 1,3480 | 1,3480 | 0,0001 | 0,00 |
| P8      | 1,3457 | 1,3485 | 1,3485 | 1,3476 | 0,0016 | 0,12 |
| P9      | 1,3444 | 1,3446 | 1,3446 | 1,3445 | 0,0001 | 0,01 |
| P10     | 1,3495 | 1,3603 | 1,3507 | 1,3535 | 0,0059 | 0,44 |

**Tabla 5. Medidas con el refractómetro después de la licuefacción.**

| Muestra | M1     | M2     | M3     | Pro    | Des    | CV    |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| P1      | 1,3442 | 1,3441 | 1,3439 | 1,3441 | 0,0002 | 0,01  |
| P2      | 1,3445 | 1,3445 | 1,3445 | 1,3445 | 0,0000 | -     |
| P3      | 1,3453 | 1,3451 | 1,3451 | 1,3452 | 0,0001 | 0,01  |
| P4      | 1,3498 | 1,3498 | 1,3498 | 1,3498 | 0,0000 | -     |
| P5      | 1,3484 | 1,3484 | 1,3484 | 1,3484 | 0,0000 | -     |
| P6      | 1,3449 | 1,3449 | 1,3449 | 1,3449 | 0,0000 | -     |
| P7      | 1,3429 | 1,3431 | 1,3433 | 1,3431 | 0,0002 | 0,01  |
| P8      | 1,3472 | 1,3473 | 1,3473 | 1,3473 | 0,0001 | 0,004 |

|     |        |        |        |        |        |      |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|------|
| P9  | 1,3466 | 1,3470 | 1,3466 | 1,3467 | 0,0002 | 0,02 |
| P10 | 1,3534 | 1,3534 | 1,3534 | 1,3534 | 0,0000 | -    |

Respecto a las variables microscópicas medidas se muestra en la Tabla 6, se puede observar que todos los valores obtenidos para la viabilidad superan el límite esperado, es decir, todos los valores son superiores al 54%, para el caso de la concentración de espermatozoides/mL todas las muestras se encuentran con valores menores a  $15 \times 10^6$  Cel/mL, comprendida entre  $1,21 \times 10^6$  a  $9,30 \times 10^6$  Cel/mL, con un valor medio de  $4,35 \times 10^6 \pm 2,91 \times 10^6$  Cel/mL y un CV de 67%, estando por debajo del valor mínimo esperado, expresado por el %dif de -71,2%. Para el caso del número total de espermatozoides presentes en los datos, todas las muestras se encuentran con valores menores a  $39 \times 10^6$  Cel, comprendida entre  $1,31 \times 10^6$  a  $38,4 \times 10^6$  Cel, con un valor medio de  $14,1 \times 10^6 \pm 12,4 \times 10^6$  Cel/mL y un CV de 88%, estando por debajo del valor mínimo esperado, expresado por el %dif de -63,8%.

Tabla 6. Variables microscópicas medidas.

| Muestra | Viabilidad (%) | N° espermatozoide muestra | Concentración/mL   |
|---------|----------------|---------------------------|--------------------|
| P1      | _ <sup>a</sup> | _ <sup>b</sup>            | _ <sup>b</sup>     |
| P2      | _ <sup>a</sup> | $15,6 \times 10^6$        | $9,30 \times 10^6$ |
| P3      | _ <sup>a</sup> | _ <sup>b</sup>            | _ <sup>b</sup>     |
| P4      | 71,04          | $20,6 \times 10^6$        | $6,01 \times 10^6$ |
| P5      | 71,11          | $4,77 \times 10^6$        | $3,20 \times 10^6$ |
| P6      | 76,92          | $14,5 \times 10^6$        | $2,99 \times 10^6$ |
| P7      | 64,49          | $38,4 \times 10^6$        | $6,80 \times 10^6$ |
| P8      | 69,57          | $4,40 \times 10^6$        | $1,60 \times 10^6$ |
| P9      | 72,73          | $24,7 \times 10^6$        | $6,60 \times 10^6$ |
| P10     | 58,33          | $2,69 \times 10^6$        | $1,40 \times 10^6$ |

<sup>a</sup>No se midió el valor.

<sup>b</sup> No se pudo determinar el valor.

En el caso de la concentración para la muestra P1 y P3, esta no pudo ser determinada, ya que todos los espermatozoides no presentan cola, siendo una muestra atípica mostrando un caso de azoospermia, esta puede ser debida a un proceso obstructivo que impide la liberación de los espermatozoides o una falla testicular severa, esta muestra es semejante a la esperada en una persona con una vasectomía. Este caso hay que tenerlo en consideración al momento de hacer la evaluación con el speckle dinámico.

**Tabla 7. Valores de tiempo  $T_e$  obtenidos.**

| Muestra | $T_e$ (seg) | Muestra | $T_e$ (seg) |
|---------|-------------|---------|-------------|
| P1      | 194         | P6      | 275         |
| P2      | 256         | P7      | 226         |
| P3      | 177         | P8      | 189         |
| P4      | 211         | P9      | 202         |
| P5      | 225         | P10     | 124         |

Los datos obtenidos de las variaciones temporales del patrón de interferencia, es decir el speckle dinámico, aplicando el método de las diferencias temporales modificado y realizando un ajuste de una función exponencial de grado uno, expresada en la Ecuación 1, tomando como tiempo inicial el valor de  $T_e$ , mostrado en la Tabla 7, se obtiene para todas las muestras los siguientes resultados:

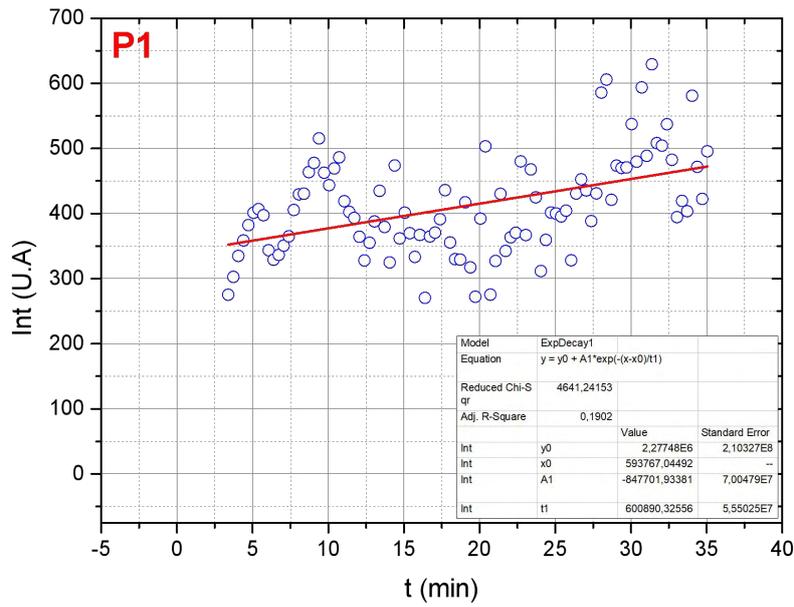


Figura 24. Intensidad vs. t, muestra P1 (Speckle).

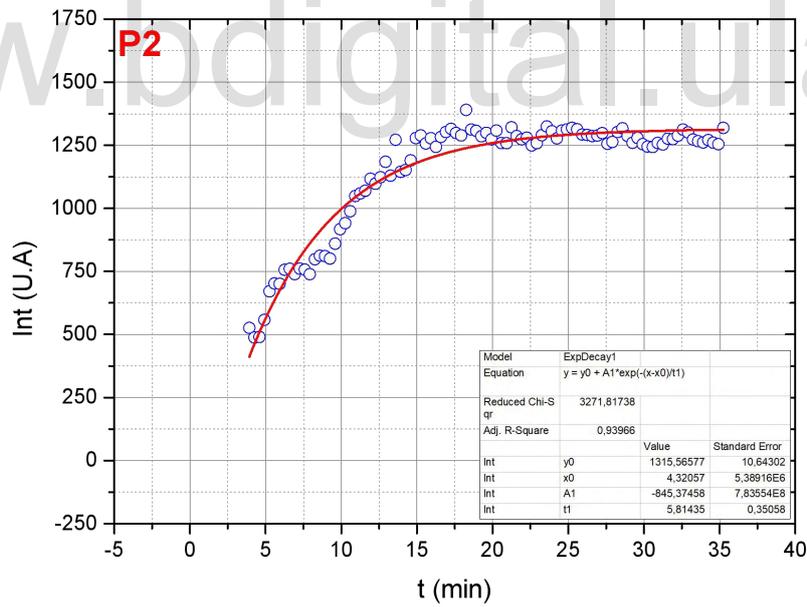


Figura 25. Intensidad vs. t, muestra P2 (Speckle).

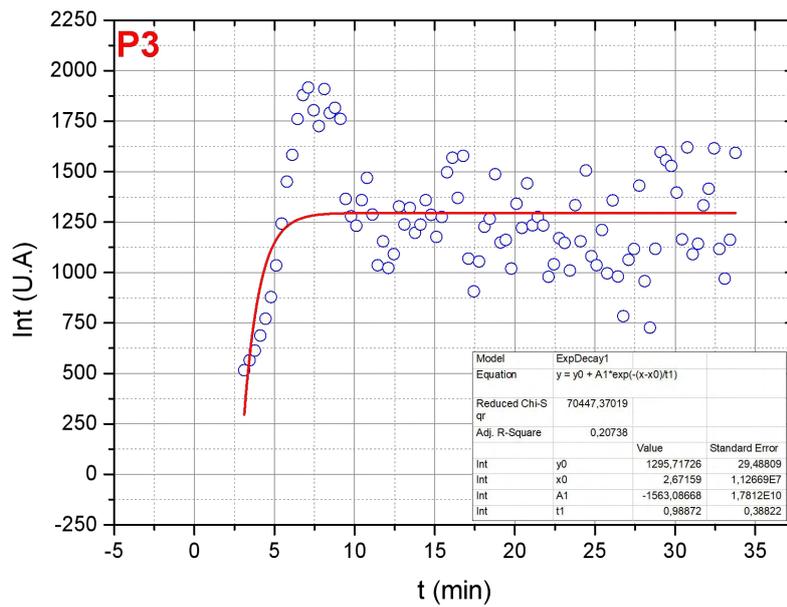


Figura 26. Intensidad vs. t, muestra P3 (Speckle).

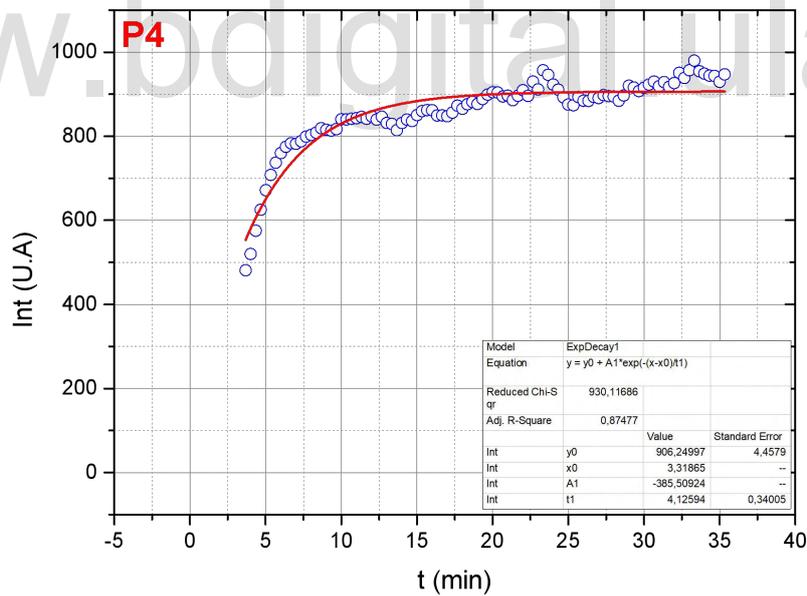


Figura 27. Intensidad vs. t, muestra P4 (Speckle).

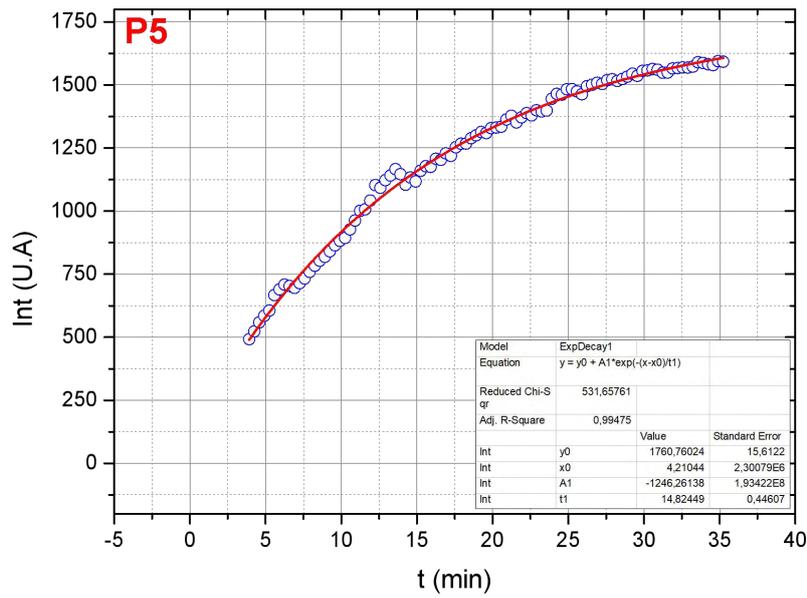


Figura 28. Intensidad vs. t, muestra P5 (Speckle).

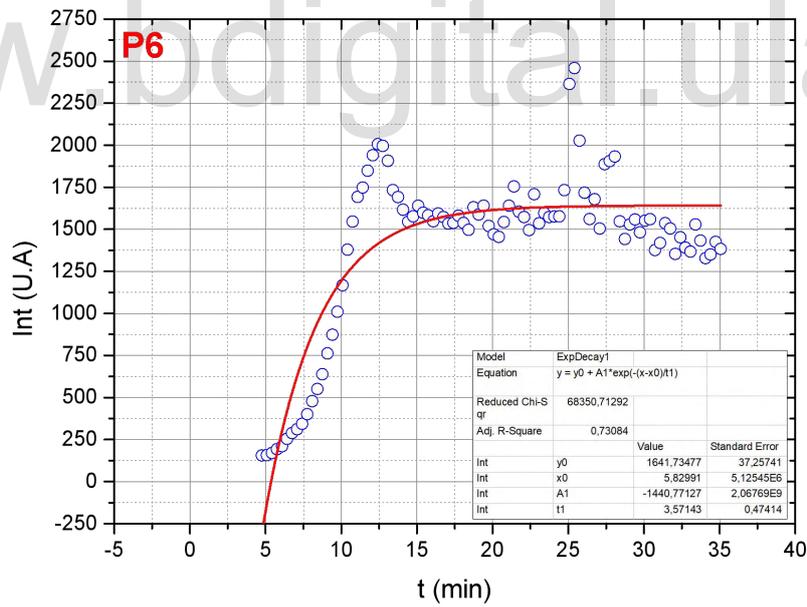


Figura 29. Intensidad vs. t, muestra P6 (Speckle).

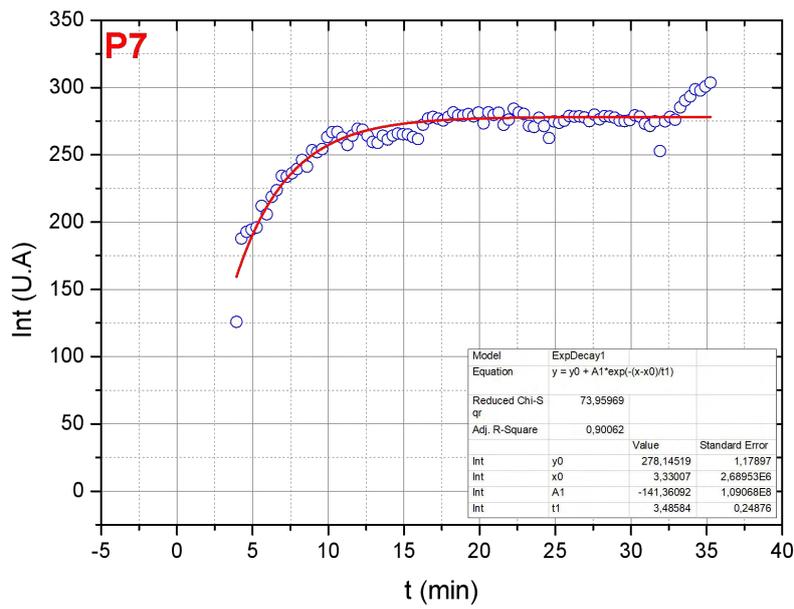


Figura 30. Intensidad vs. t, muestra P7 (Speckle).

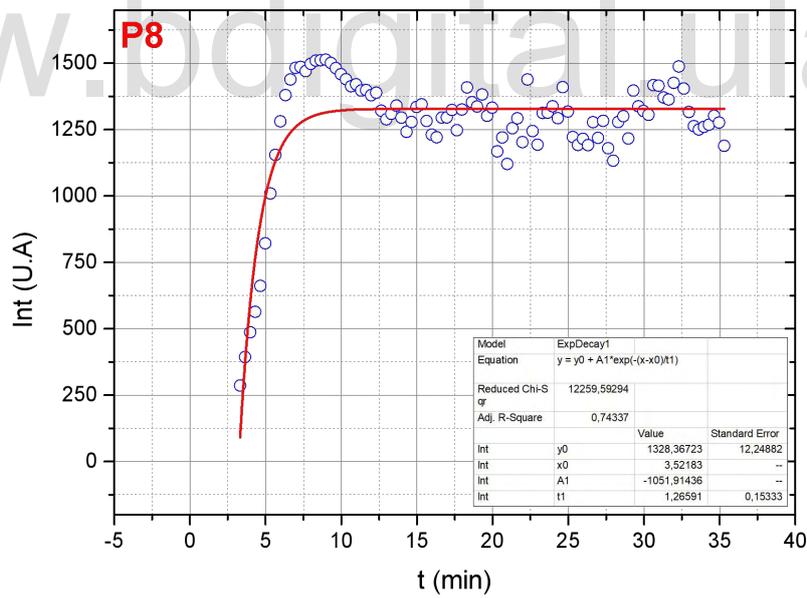


Figura 31. Intensidad vs. t, muestra P8 (Speckle).

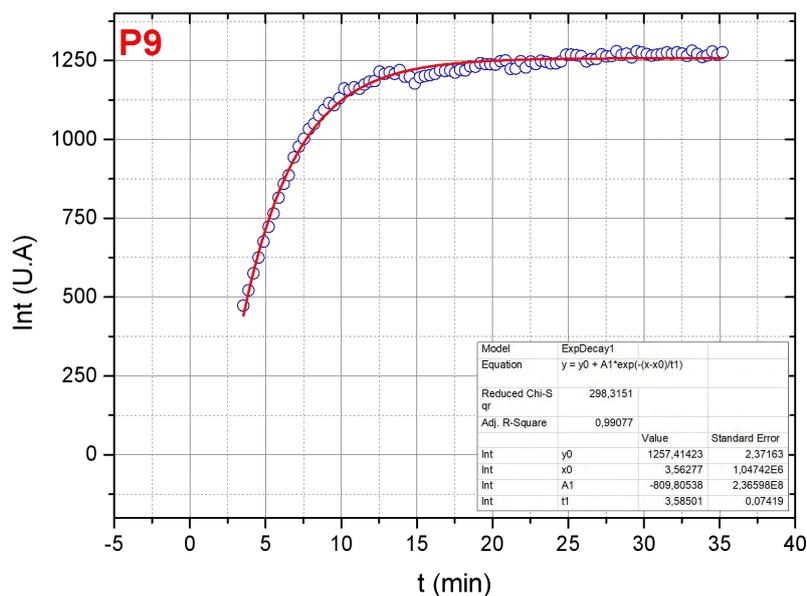


Figura 32. Intensidad vs. t, muestra P9 (Speckle).

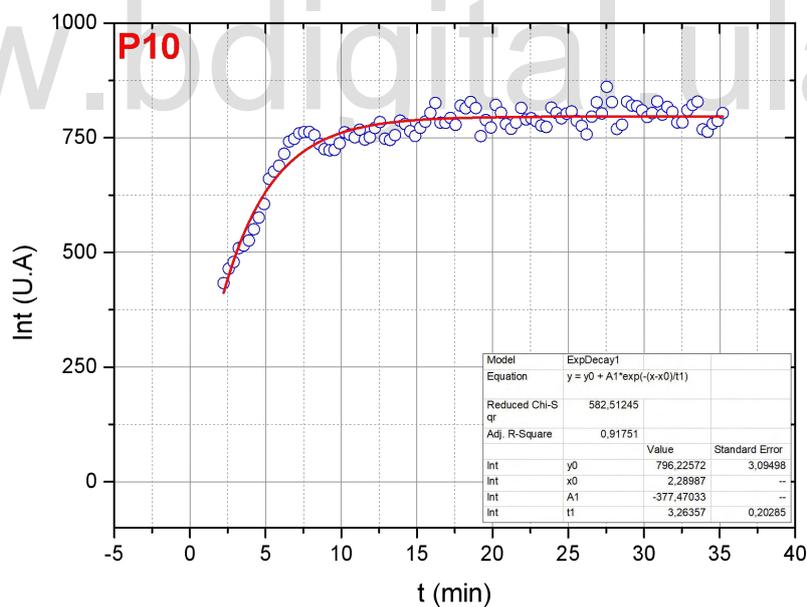


Figura 33. Intensidad vs. t, muestra P10 (Speckle).

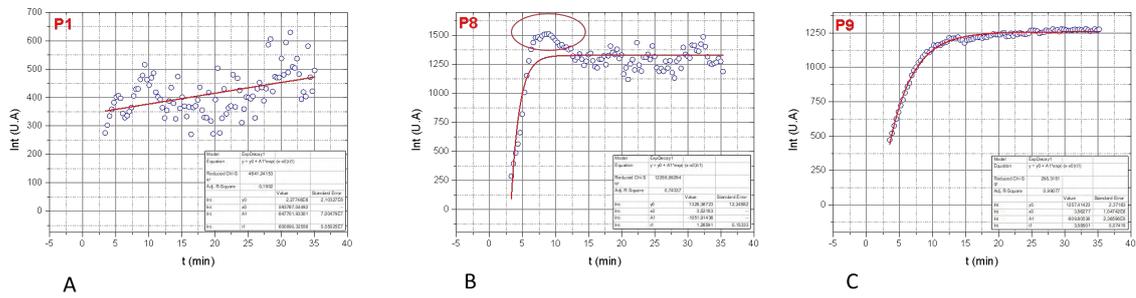
De la Figura 24 a la Figura 33, se obtiene los parámetros de ajustes necesarios para hacer el cálculo del tiempo de licuefacción de las muestras estudiadas, expresados en la Tabla 8, mostrada a continuación:

**Tabla 8. Parámetros de ajustes obtenidos para la variación de la Intensidad vs. t.**

| Muestra | R <sup>2</sup> | y <sub>0</sub>                              | x <sub>0</sub>              | A1                                | t1                            |
|---------|----------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| P1      | 0,19           | 2,28x10 <sup>6</sup> ± 2,10x10 <sup>8</sup> | 593767 ± ----               | -847701 ±<br>7,00x10 <sup>7</sup> | 600890 ± 5,55x10 <sup>7</sup> |
| P2      | 0,94           | 1316 ± 11                                   | 4,32 ± 5,39x10 <sup>6</sup> | -845 ± 7,84x10 <sup>8</sup>       | 5,81 ± 0,35                   |
| P3      | 0,21           | 1296 ± 29                                   | 2,67 ± 1,13x10 <sup>7</sup> | -1563 ± 1,78x10 <sup>10</sup>     | 0,99 ± 0,39                   |
| P4      | 0,87           | 906 ± 4                                     | 3,32 ±                      | -386 ±                            | 4,13 ± 0,34                   |
| P5      | 0,99           | 1761 ± 16                                   | 4,21 ± 2,3x10 <sup>6</sup>  | -1246 ± 1,9x10 <sup>8</sup>       | 14,82 ± 0,45                  |
| P6      | 0,73           | 1642 ± 37                                   | 5,83 ± 5,1x10 <sup>6</sup>  | -1441 ± 2,1x10 <sup>9</sup>       | 3,57 ± 0,47                   |
| P7      | 0,90           | 278 ± 1                                     | 3,33 ± 2,7x10 <sup>6</sup>  | -141 ± 1,1x10 <sup>8</sup>        | 3,49 ± 0,25                   |
| P8      | 0,74           | 13283 ± 12                                  | 3,52 ±                      | -1052 ±                           | 1,27 ± 0,15                   |
| P9      | 0,99           | 1257 ± 2                                    | 3,56 ± 1,05x10 <sup>6</sup> | -810 ± 2,4x10 <sup>8</sup>        | 3,59 ± 0,07                   |
| P10     | 0,92           | 796 ± 3                                     | 2,29 ±                      | -377 ±                            | 3,26 ± 0,20                   |

Las muestras P1 (ver Figura 24) y P3 (ver Figura 26), con una posible azoospermia, no se ajustan bien al modelo propuesto, los valores de R<sup>2</sup> son los más bajos (ver Tabla 8). Las muestras P5 con hipospermia (ver Figura 28) se ajusta bien al modelo previsto con un R<sup>2</sup> de 0,99. Realizando una segmentación por los rangos de los valores del R<sup>2</sup> de las muestras restantes, se puede observar que para un rango entre 0,70 < 0,80, se encuentran las muestras P6 (ver Figura 29) y P8 (ver Figura 31) presentan un pico en la intensidad antes de completarse el proceso de licuefacción, esto puede ser motivado a cambios metabólicos y químicos en el fluido seminal durante este proceso, estos picos puede ser también observados en las muestras P5 (ver Figura 28) y P10 (ver Figura 33), podría este comportamiento estar asociado a la concentración de espermatozoides (Cel/mL) mostrado en la Tabla 6, estas muestras poseen concentraciones menores a 6x10<sup>6</sup> Cel/mL. Para el resto de muestras P2 (ver Figura 25), P4 (ver Figura 27), P7 (ver Figura 30) y P9 (ver Figura 32) con concentraciones mayores a 6x10<sup>6</sup> Cel/mL los valores del R<sup>2</sup> son

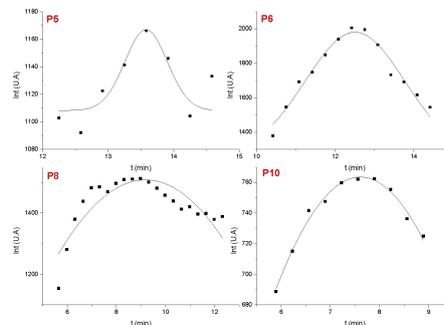
$\geq 0,80$ , sin evidencia aparente de picos y cumpliendo con el ajuste propuesto de la función exponencial de primer grado, expresado en la Ecuación 1.



**Figura 34. Formas de curvas obtenidas para la variación de la intensidad en función del tiempo.**

Al estudiar el comportamiento de los cambios en la intensidad en el patrón de interferencia se puede encontrar al menos tres formas bien definidas, mostradas en la Figura 34. La primera (ver Figura 34A) cuando no se cumple el ajuste exponencial con valores de  $R^2 < 0,30$ , siendo el caso de las muestras P1 y P3 con azoospermia, la segunda (ver Figura 34B) la presencia de un pico antes del proceso de licuefacción, para muestras con concentraciones bajas  $< 6 \times 10^6$  Cel/mL, como se muestra en el caso de P5, P6, P8 y P10 y finalmente las que poseen concentraciones  $> 6 \times 10^6$  Cel/mL (ver Figura 34C), que cumplen con el ajuste propuesto, siendo consistente con lo reportado por (Leal, 2020).

Haciendo un análisis más detallado de la ubicación de los picos presentes en las muestras P5, P6, P8 y P10, se realiza la estimación de la ubicación de los mismos, mediante el ajuste de una función gaussiana (ver Figura 35), para obtener el valor del centro de los picos, obteniendo los valores mostrados en la Tabla 9.



**Figura 35. Ajuste función gaussiana a picos presentes en las muestras.**

Tabla 9. Ubicación temporal de los picos presentes en las muestras.

| Muestra | xc    | $\Delta xc$ | R <sup>2</sup> | CV (%) | Cel/mL               |
|---------|-------|-------------|----------------|--------|----------------------|
| P5      | 13,58 | 0,10        | 0,57           | 0,74   | 3,20x10 <sup>6</sup> |
| P6      | 12,50 | 0,05        | 0,94           | 0,40   | 2,94x10 <sup>6</sup> |
| P8      | 9,18  | 0,14        | 0,69           | 1,53   | 1,60x10 <sup>6</sup> |
| P10     | 7,61  | 0,03        | 0,98           | 0,39   | 1,40x10 <sup>6</sup> |

Los valores obtenidos para el centro de los picos, muestran una relación de proporcionalidad en función de la concentración de los espermatozoides, a medida que la concentración aumente el centro aumenta, como se muestra en la Figura 36, obteniendo el ajuste de una función lineal con un R<sup>2</sup> de 0,96.

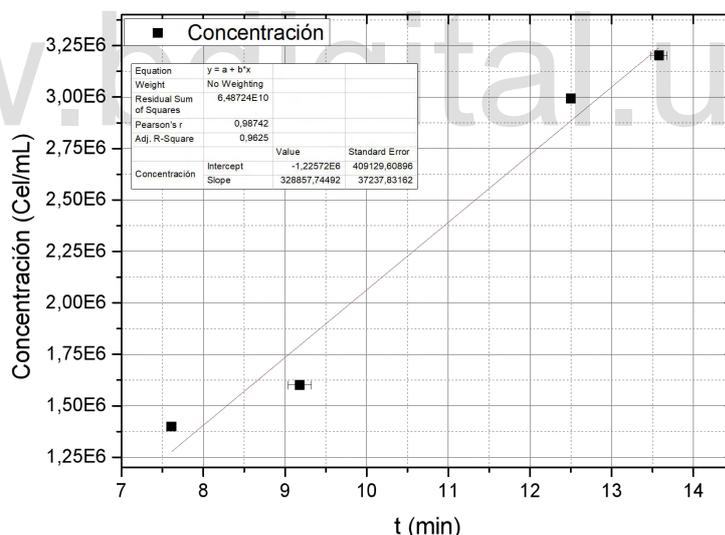


Figura 36. Variación de la concentración centro del pico.

Es posible que los picos se atenúen en el proceso de licuefacción y se confundan con ruido, por lo que manejar una muestra mayor sería deseable para futuras investigaciones en este tema, por lo que se recomienda introducir como variables en el estudio, la evaluación del estado de salud de voluntario y determinar las posibles relaciones con la salud de la glándula prostática y

accesorias, que determinan directamente el tiempo de licuefacción de las muestras de semen.

Otra variable de interés a ser evaluada es el tiempo de licuefacción ( $T_L$ ), para ello se utiliza a partir de los datos obtenidos en la Tabla 8 y utilizando el análisis de incertidumbre para determinar el error asociado. En la Tabla 11 se muestra los resultados obtenidos para este tiempo.

Los errores asociados al tiempo de licuefacción se hacen mediante el análisis de incertidumbres, ya que es una parte importante en la evaluación de las mediciones y estimaciones. Hay que tener en cuenta que primero se debe definir que se está midiendo o estimando en el estudio para luego identificar todas las fuentes asociadas con el proceso de medición o de estimación donde se pueden incluir errores de instrumentación, variabilidad en las condiciones de ambiente, errores al momento del muestreo, entre otros. Por otro lado, se cuantifica la contribución de las fuentes de incertidumbres implicando cálculos estadísticos. En la Tabla 10 se puede observar el análisis de incertidumbres de tipo A y tipo B. La primera se refiere a la incertidumbre que proviene de la variabilidad aleatoria en los datos experimentales, de las mediciones directas o de la instrumentación utilizada en el estudio. Para esta última, esa estimación de errores se obtiene del manual de usuario del instrumento; es decir; este análisis se basa en la dispersión de los valores obtenidos durante el proceso de medición.

**Tabla 10. Análisis de incertidumbres.**

| Incertidumbres                      | Tipo A | Tipo B |
|-------------------------------------|--------|--------|
| Repetitividad                       | 0,5    | 0,1    |
| Estabilidad del Láser               | 2      | 0,1    |
| Linealidad espectral Láser          | 0,1    | 0,003  |
| Longitud de onda                    | 0,1    | 0,003  |
| Estabilidad de la cámara CCD        | 3      | 0,1    |
| Incertidumbre combinada             | 3,6    | 0,1    |
| Incertidumbre relativa global       | 3,6    |        |
| Incertidumbre relativa ampliada K=2 | 7,2    |        |

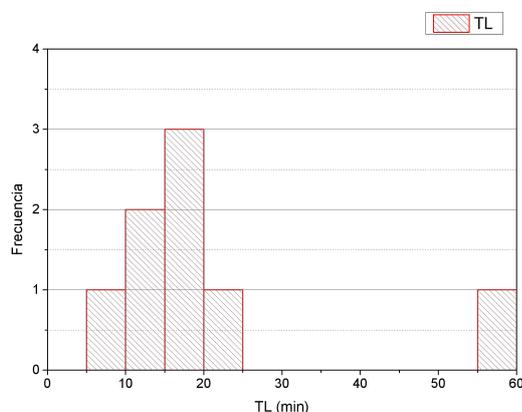
Para hacer un estimado de la incertidumbre tipo A, se utilizan métodos estadísticos como el cálculo de la desviación estándar o el intervalo de

confianza. En cambio, la incertidumbre tipo B se refiere a la incertidumbre que no se puede evaluar directamente a partir de datos experimentales. En cambio, se basa en información externa, como especificaciones del fabricante, conocimiento del experimentador o estimaciones del mismo.

Una vez que se tiene las incertidumbres tipo A y tipo B se hace las combinaciones para obtener la incertidumbre total, la misma se hace mediante la suma cuadrática de ambas componentes para así tener la incertidumbre relativa ampliada que es una cantidad que define un intervalo alrededor del resultado de una medición, donde se espera que este intervalo abarque una fracción significativa de la distribución de valores que se podrían atribuir razonablemente a los valores que se están midiendo o estimando.

**Tabla 11. Determinación de tiempo de licuefacción por speckle dinámico.**

| Muestra | I98      | T <sub>L</sub> (min) | Muestra | I98      | T <sub>L</sub> (min) |
|---------|----------|----------------------|---------|----------|----------------------|
| P1      | 2,23E+06 | 2350606 ± 169765     | P6      | 1,61E+03 | 19,3 ± 1,4           |
| P2      | 1,29E+03 | 24,50 ± 1,8          | P7      | 2,73E+02 | 14,6 ± 1,1           |
| P3      | 1,27E+03 | 6,72 ± 0,49          | P8      | 1,30E+03 | 8,18 ± 0,59          |
| P4      | 8,88E+02 | 15,9 ± 1,2           | P9      | 1,23E+03 | 16,0 ± 1,2           |
| P5      | 1,73E+03 | 57,08 ± 4,1          | P10     | 7,80E+02 | 12,62 ± 0,91         |



**Figura 37. Distribución de frecuencia del TL.**

Se descartan los valores obtenidos para el TL para las muestras P1 y P3, debido al mal ajuste obtenido (ver Tabla 8), se puede observar en la Tabla 11 que todos los valores para el TL se ajustan a lo establecido en la OMS, solo el valor que a pesar de estar en el rango esperado es el menor valor obtenido, como es el caso de la muestra P3 estando notoriamente lejano a los otros valores, esto es mostrado en el análisis de frecuencia del tiempo de licuefacción mostrada en la Figura 37, encontrando los demás valores por debajo de los 25 min. Esto coincido con que la muestra P5 que presenta un bajo volumen del eyaculando (hipospermia). Los valores encontrados se encuentran en un rango de 8,18 a 57,08 min, con un valor medio de  $21 \pm 15$  min y un CV de 71%.

Debido a que los tiempos de licuefacción no se pueden determinar para las muestras P1 y P3, se procede a hacer el análisis de la variación del coeficiente de transmisión en función del tiempo, ya que el speckle puede hacer mediciones de este parámetro como lo demostró (Santos, 2023) en su trabajo. Cuantificando este cambio a través del análisis de la variación del valor del pixel medio (Pmed) en función del tiempo, obteniendo los siguientes resultados para cada una de las muestras estudiadas:

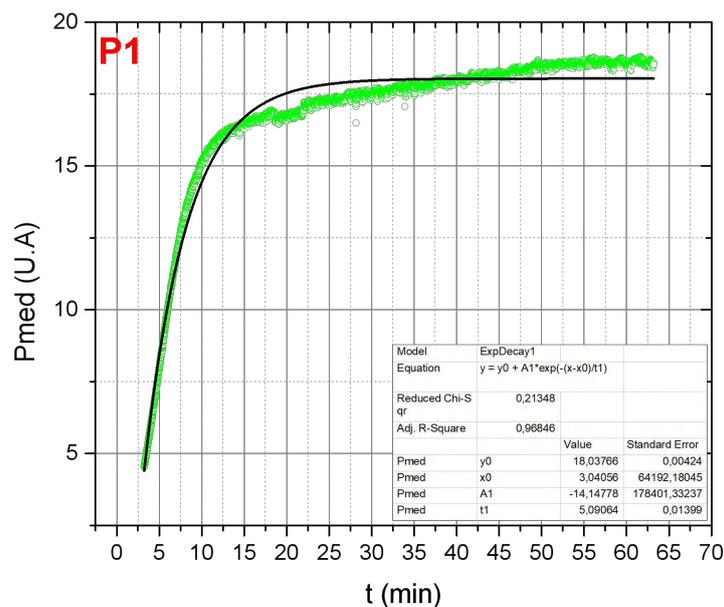


Figura 38. Intensidad píxel medio vs. t, muestra P1 Tramitancia.

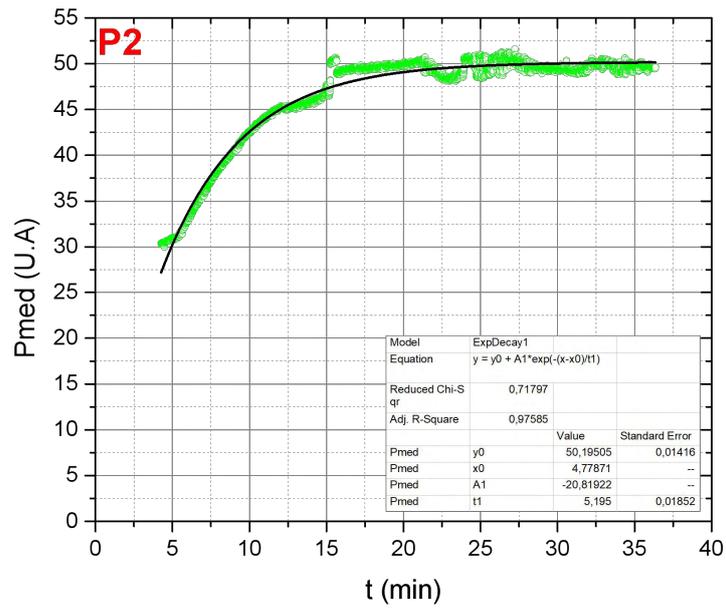


Figura 39. Intensidad píxel medio vs. t, muestra P2 Tramitancia.

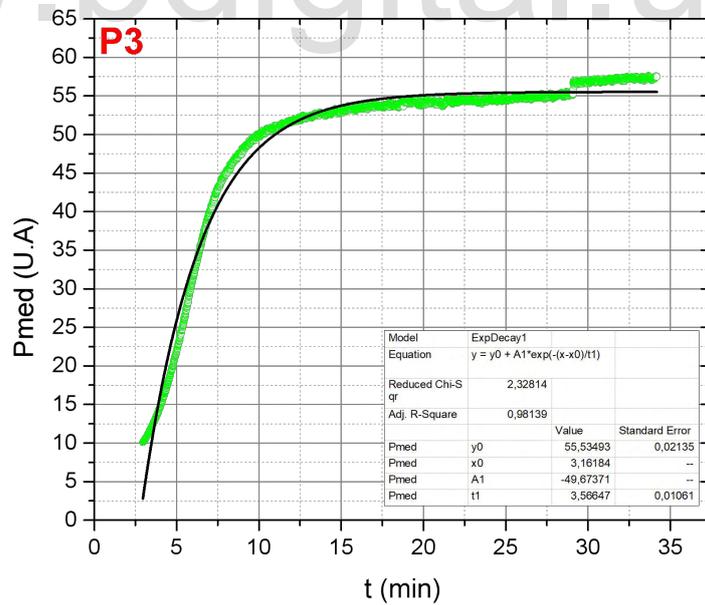


Figura 40. Intensidad píxel medio vs. t, muestra P3 Tramitancia.

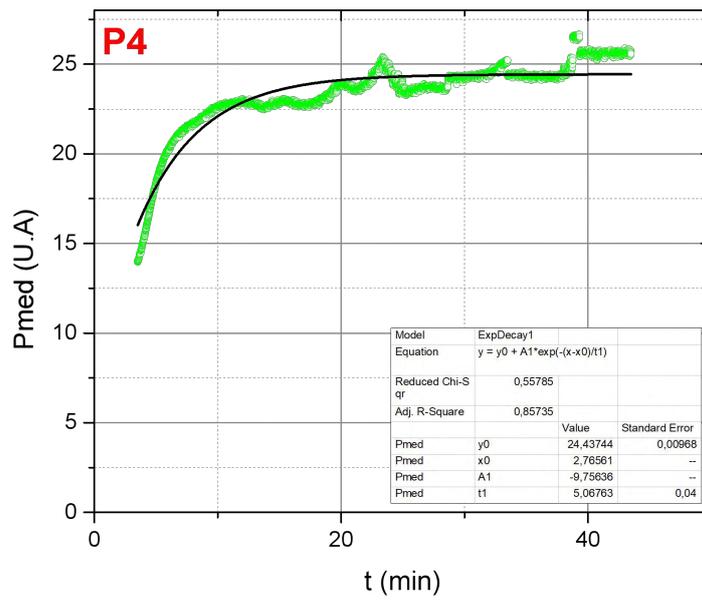


Figura 41. Intensidad píxel medio vs. t, muestra P4 Tramitancia.

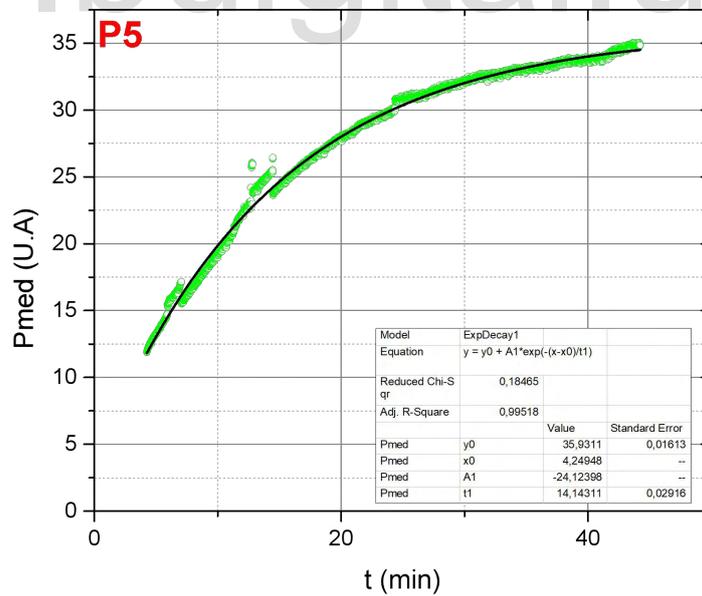


Figura 42. Intensidad píxel medio vs. t, muestra P5 Tramitancia.

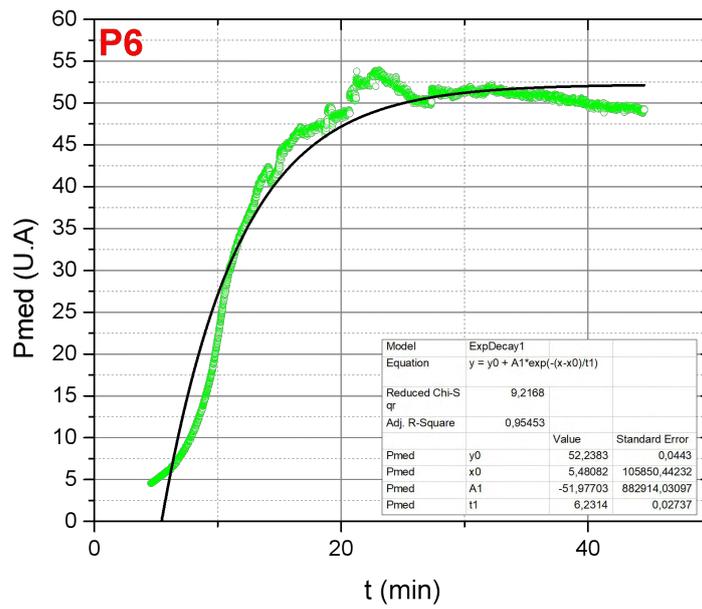


Figura 43. Intensidad píxel medio vs. t, muestra P6 Tramitancia.

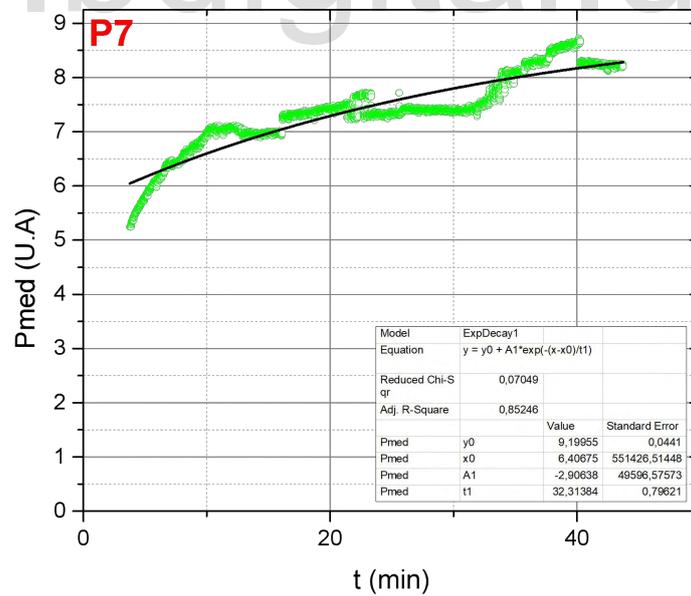


Figura 44. Intensidad píxel medio vs. t, muestra P7 Tramitancia.

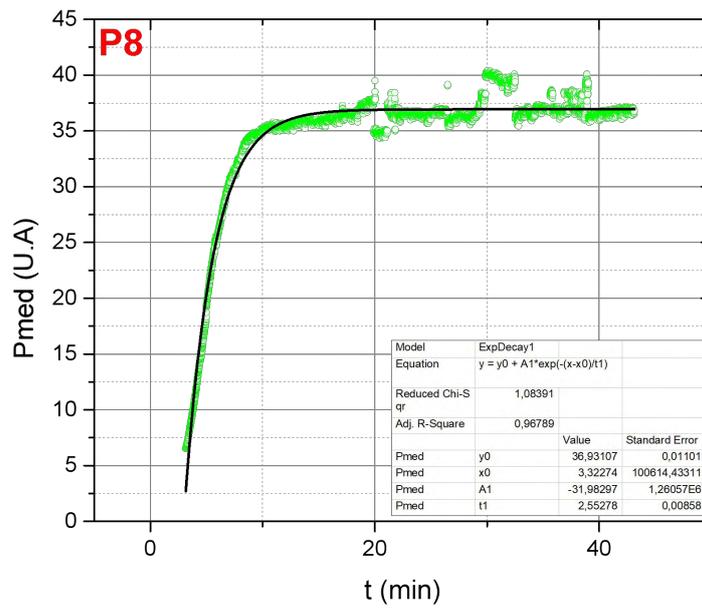


Figura 45. Intensidad píxel medio vs. t, muestra P8 Tramitancia.

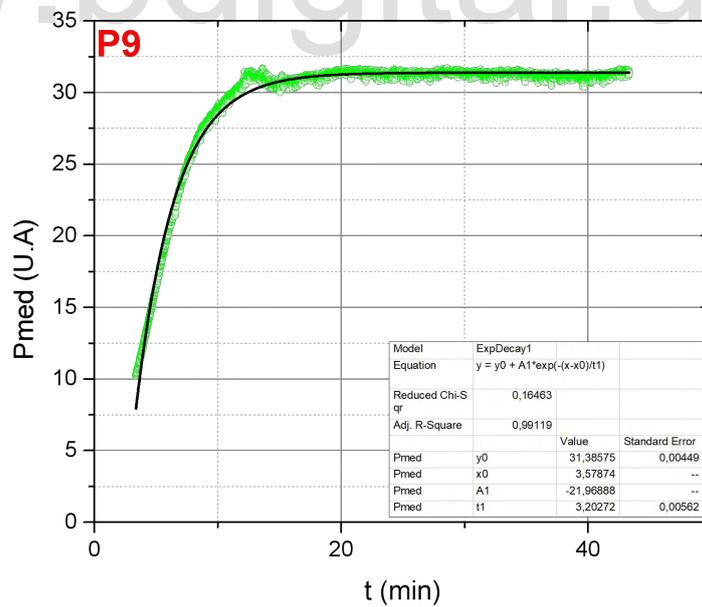


Figura 46. Intensidad píxel medio vs. t, muestra P9 Tramitancia.

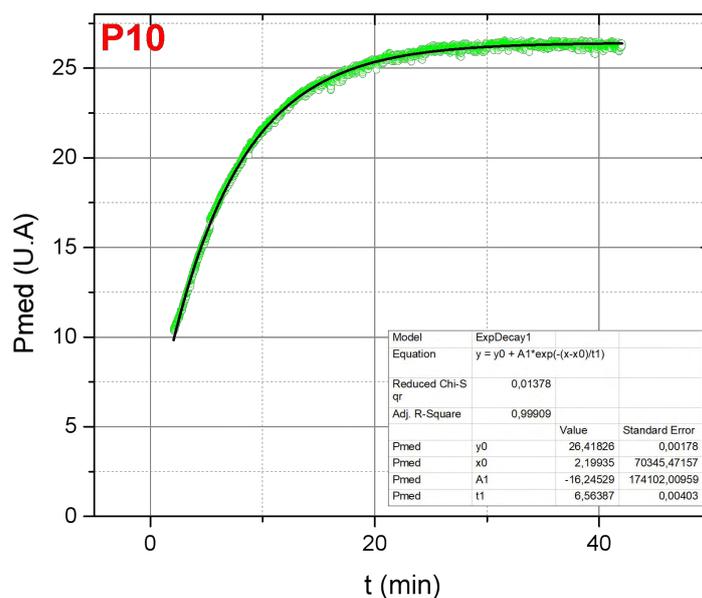


Figura 47. Intensidad píxel medio vs. t, muestra P10 Tramitancia.

De la Figura 38 a la Figura 47, se obtiene los parámetros de ajustes necesarios para hacer el cálculo del tiempo de licuefacción de las muestras estudiadas, expresados en la Tabla 12 mostrada a continuación:

Tabla 12. Parámetros de ajustes obtenidos para la variación del Pmed vs. t.

| Muestra | R <sup>2</sup> | y <sub>0</sub>                    | x <sub>0</sub>           | A <sub>1</sub>           | t <sub>1</sub>                   |
|---------|----------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| P1      | 0,97           | 18,03766 ± 0,00424                | 3,04056 ± 64192,18045    | -14,14778 ± 178401,33237 | 5,09084 ± 0,01399                |
| P2      | 0,98           | 50,19505 ± 0,01416                | 4,77871 ± ---            | -20,81922 ± ---          | 5,195 ± 1,852x10 <sup>-2</sup>   |
| P3      | 0,98           | 55,53493 ± 0,02135                | 3,16184 ± ---            | -49,67371 ± ---          | 3,56647 ± 0,01061                |
| P4      | 0,86           | 24,43744 ± 0,00968                | 2,76561 ± ---            | -9,75636 ± ---           | 5067,63x10 <sup>-3</sup> ± 0,04  |
| P5      | 0,99           | 35,9311 ± 0,1613x10 <sup>-1</sup> | 4,24948 ± ---            | -24,12398 ± ---          | 14,14311 ± 0,02916               |
| P6      | 0,95           | 52,2383 ± 0,0443                  | 5,48082 ± 10585,04432x10 | -51,97703 ± 882914,03097 | 6,2314 ± 0,2737x10 <sup>-1</sup> |

|     |      |                         |                           |  |                       |
|-----|------|-------------------------|---------------------------|--|-----------------------|
| P7  | 0,85 | 9,19955 ±<br>0,00441x10 | 6,40675 ±<br>551426,51448 | -2,90638 ±<br>49596,57573              | 32,31384 ±<br>0,79621 |
| P8  | 0,97 | 36,93107 ±<br>0,01101   | 3,32274 ±<br>100614,43311 | -31,98297 ±<br>1,26057x10 <sup>6</sup> | 2,55278 ± 0,00858     |
| P9  | 0,99 | 31,38575 ±<br>0,00449   | 3,57874 ± ---             | -21,96888 ± ---                        | 3,20272 ± 0,00562     |
| P10 | 0,99 | 26,41826 ±<br>0,00178   | 2,19935 ±<br>70345, 47157 | -16,24529 ±<br>174102,00959            | 6,56387 ± 0,00403     |

Para la muestra P1 (ver Figura 38) se puede observar que, al hacer el ajuste, esta se adecua más a lo propuesto con un  $R^2$  de 0,97 a pesar de que esta muestra presenta una posible azoospermia al igual que la muestra P3, pero es posible notar que los  $R^2$  de estas muestras son parecidos y con mejor valor comparado a cuando se hace el ajuste para Speckle. De igual forma para la muestra P6 (ver Figura 43) con un  $R^2$  de 0,95 y P8 (ver Figura 45) con un  $R^2$  de 0,97 donde se puede notar que estas dos últimas muestras presentan un pico en la intensidad antes de ocurrir el proceso de licuefacción, donde se puede decir que estos picos son debido a diversos cambios que ocurren en los procesos metabólicos y químicos del fluido seminal durante el proceso de licuefacción.

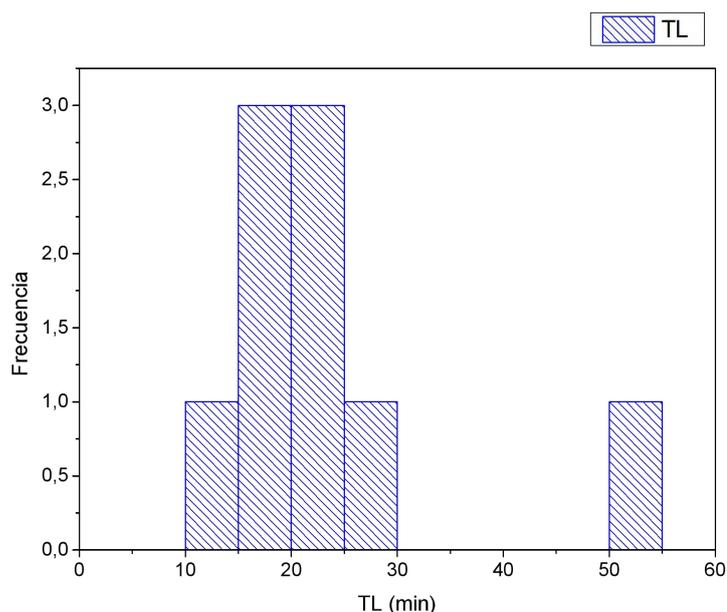
En la muestra P3 (ver Figura 40) con un  $R^2$  de 0,98 y con posible problema de azoospermia, se puede notar que posee un  $R^2$  igual a la muestra P2 (ver Figura 39) con  $R^2$  de 0,98. Esta última también presenta un pico momento antes del proceso de licuefacción y es debido al posible cambio metabólico y químico que ocurre en el fluido seminal. Para P4 y P7 (ver Figura 41 y Figura 44) que presentan los valores de  $R^2$  más bajos de todas las muestras, de 0,86 y 0,85 respectivamente, se puede evidenciar que estas presentan varios picos de intensidad antes y después del proceso de licuefacción, a pesar de que estas muestras poseen concentraciones mayores a  $6 \times 10^6$  Cel/mL. Por lo que si se compara con las medidas hechas en Speckle se ve una clara diferencia, debido a que el método de pixel medio se ajusta mejor a lo propuesto. Mientras que para P5, P9 y P10 (ver Figura 42, Figura 46 y Figura 47) los valores del  $R^2$  son muy cercanos a 1, además no se evidencian notables picos, por lo que se

cumple con el ajuste propuesto de la función exponencial de primer grado expresado en la Ecuación 1.

Otra variable de interés a ser evaluada es el tiempo de licuefacción ( $T_L$ ), para ello se utiliza a partir de los datos obtenidos en la Tabla 12 y utilizando análisis de incertidumbres (ver Tabla 10) para conocer el error asociado para cada medida de  $T_L$ . Partiendo de los parámetros de ajuste obtenidos en la Tabla 13 de las muestras, se realiza la determinación de los tiempos de licuefacción determinados por los cambios de la tramitancia, mostrados en la Tabla 13.

**Tabla 13. Determinación de tiempo de licuefacción por pixel medio.**

| Muestra | I98      | $T_L$ (min) | Muestra | I98      | $T_L$ (min)  |
|---------|----------|-------------|---------|----------|--------------|
| P1      | 1,77E+01 | 21,7 ± 1,6  | P6      | 5,12E+01 | 29,8 ± 2,2   |
| P2      | 4,92E+01 | 20,5 ± 1,5  | P7      | 9,02E+01 | 95,6 ± 6,9   |
| P3      | 5,44E+01 | 16,7 ± 1,2  | P8      | 3,62E+00 | 12,94 ± 0,93 |
| P4      | 2,39E+01 | 17,9 ± 1,3  | P9      | 3,08E+01 | 15,0 ± 1,1   |
| P5      | 3,52E+01 | 53,9 ± 3,9  | P10     | 2,59E+01 | 24,7 ± 1,8   |



**Figura 48. Distribución de frecuencia del  $T_L$ .**

La distribución en frecuencia de los valores obtenidos para los TL de todas las muestras, se muestra en la Figura 48. Se descartan los valores obtenidos para el TL para la muestra P7, debido a que supera el tiempo estipulado por la OMS, se puede observar en la Tabla 13 que todos los valores para el TL se ajustan a lo establecido en la OMS, Encontrando los demás valores por debajo de los 25 min. A pesar de que la muestra P5 presenta un alto valor de tiempo de licuefacción, se toma en cuenta porque entra entre los rangos normales establecidos por la OMS, esta muestra presenta un bajo volumen del eyaculando (hipospermia). Los valores encontrados se encuentran en un rango de 12,94 a 29,8 min, con un valor medio de  $19 \pm 15$  min y un CV de 27%.

Es importante señalar lo descrito por ( Balitán, Blanco, & Hernández, 2018), cuando afirman que existen limitaciones al momento del análisis de una muestra de semen, y la más importante es la variabilidad de los parámetros en un mismo individuo. Es así como las muestras recogidas por un mismo individuo, bajo condiciones iguales y con el mismo período de abstinencia, pueden mostrar variaciones en todos los parámetros, por tal motivo, se aconseja hacer al menos dos procedimientos del mismo estudio con el mismo paciente usando muestras distintas, antes de ofrecer un diagnóstico; por lo tanto, los datos analizados en este apartado solo fueron utilizados para términos de investigación, con los que se espera obtener información que valide los resultados del estudio.

Por otro lado, el comportamiento de cada muestra de semen con respecto a la intensidad del láser que incide en ellas, con el fin de evaluar el tiempo de licuefacción de las muestras sometidas a estudio. Es importante señalar que se analizaron las muestras que resultaron con puntos de dispersión notorios fuera del espacio referencial de acuerdo con los resultados en el estudio de (Leal, 2020), en los cuales se basó el análisis gráfico, tomando en cuenta los criterios de normalidad según la (WHO, 2021).

Las variables involucradas son el tiempo expresado en minutos y la intensidad del láser que incide, expresado en unidad arbitraria. Según la (OMS, 2001) el semen se coagula casi inmediatamente después de su eyaculación, para nuevamente licuarse 35 a 60 minutos después, por la acción del antígeno

específico de próstata, por lo tanto, la investigación apoya sus resultados en lo establecido por la (WHO, 2021) , sin embargo, se debe mencionar que el método propuesto, el speckel dinámico, determinó el tiempo preciso de licuefacción del semen en una población sana con criterios de inclusión; a saber, que los rangos establecidos por la OMS no fueron evaluados a través del mismo método; el espermograma propuesto por la (WHO, 2021) no emplea el speckel dinámico en la determinación de los valores dados.

En las gráficas de pixel medio se observa que las curvas son más suaves y se puede cuantificar el porcentaje de tramitancia, ya que la intensidad de la luz es constante y con el ajuste exponencial se aprecia más claro el comportamiento de las muestras, ya que para este tipo de análisis no se toma en cuenta la actividad biológica de la muestra sino el valor de la tramitancia respecto a la asíntota  $Y_0$  y un punto en la curva, dando un valor exacto de la cantidad de luz que la muestra deja pasar.

Es importante señalar que al comparar el tiempo de licuefacción obtenido de los parámetros de ajustes de los gráficos de  $Int$  (U.A) vs..  $t$  (min) el coeficiente de variación es mayor al tiempo de licuefacción obtenido de los parámetros de ajustes de los gráficos de  $Pmed$  (U.A) vs..  $t$  (min).

Así, de esta manera se puede determinar el tiempo de licuefacción. En uno se ve reflejado la actividad biológica de la muestra espermática, el tiempo de licuefacción depende del metabolismo y de los componentes del semen, donde se puede sugerir que se apliquen pruebas bioquímicas como la determinación de ácido cítrico que permita la evaluación de la próstata y la de fructosa para la evaluación de las vesículas seminales (Cruz & San Juan, 2012).

Estas tablas muestran el comportamiento de los parámetros de ajustes para los análisis gráficos de  $Int$  vs..  $t$  Y  $Pmed$  vs..  $t$ , donde se comparan los coeficientes de variación CV de las medidas por Speckle y por pixel medio, este coeficiente de variación CV permite el análisis de las desviaciones de los datos con respecto a la media y al mismo tiempo las dispersiones que tienen los datos dispersos entre sí.

Es posible notar que al comparar estos resultados de los parámetros de ajustes de los gráficos el valor del coeficiente de variación CV es menor para el análisis gráfico de Pmed debido a que la intensidad de la luz es constante mientras que para Speckle la intensidad de la luz varía respecto al tiempo, lo que se puede asumir que el análisis gráfico más adecuado es Pmed vs. t, otra manera de ver que método se ajusta más a la necesidad, es que con este último es posible cuantificar porcentualmente la tramitancia.

Por otro lado, es posible destacar que mediante el análisis gráfico de Int vs. t (speckle) se puede tener información de la actividad biológica de la muestra, ya que para este caso el TL depende del metabolismo y componentes del semen mientras que en el análisis gráfico de Pmed el TL depende de la tramitancia y se puede ver con claridad en las tablas de los parámetros de ajustes de cada análisis gráfico.

Es importante señalar que a través del método Speckle se puede evidenciar el comportamiento del líquido seminal; es decir; puede proporcionar información sobre el estado de salud del paciente y por ende de la muestra. Mientras que por el método de tramitancia (Pixel medio) se obtiene directamente el tiempo de licuefacción.

Es por esto que se hace una prueba de estadística, la cual consiste en una prueba no paramétrica entre dos variables, las mismas son el tiempo de licuefacción a través de Speckle y el tiempo de licuefacción a través de tramitancia (Pixel medio), la misma consiste en hacer una comparación entre las dos variables y ver si existe una correlación entre ellas a través de la significancia, la cual consiste en la prueba estadística de U de Mann V Whitneg / Wilcoxon.

Esta prueba estadística revela la significancia entre las dos variables; es decir; si la significancia es menor que 0,05 se rechaza la hipótesis nula, la cual consiste en que las variables son correlacionadas entre sí, donde se puede concluir que hay una diferencia significativa entre los grupos y si es mayor o igual que 0,05 se acepta la hipótesis nula y se concluye que no hay evidencia suficiente para afirmar que hay una diferencia entre los grupos.

Hay que tener en cuenta que esta prueba estadística se hace solo para un pequeño número de muestras menores a 50. Por otro lado, esta prueba evidencia si existe una aleatoriedad entre los datos de las variables o si existe un conjunto de datos que son secuenciales. También es importante mencionar que, como cualquier prueba estadística, la interpretación de los resultados debe hacerse en el contexto del estudio. En la Tabla 14 se muestra la prueba estadística de Prueba de Mann-Whitney.

**Tabla 14. Resultados Estadísticos de prueba<sup>a</sup>**

|  | TL                 |
|--|--------------------|
| U de Mann-Whitney                          | 34,000             |
| W de Wilcoxon                              | 89,000             |
| Z  | -1,209             |
| Sig. asin. (bilateral)                     | 0,226              |
| Significación exacta [2*(sig. unilateral)] | 0,247 <sup>b</sup> |

a. Variable de agrupación: Grupo

b. No corregido para empates.

www.digital.uida.ve

En esta prueba estadística se aprecia que el número de significancias de 0,226; siendo mayor a 0,05; lo que hace ver que se acepta la hipótesis nula; es decir; se acepta que los dos grupos tienen significancia entre ellas. Por otro lado, hay que tener en cuenta que esta prueba no es concluyente, al momento de evaluar cuál de los dos métodos es mejor para la determinación del tiempo de licuefacción. Se toma por el criterio del  $R^2$  obtenido en cada uno de los métodos (ver Tabla 8 y Tabla 12), obteniendo los valores expresados en la Tabla 15.

**Tabla 15. Valores de  $R^2$  por ambos métodos.**

| Muestra | Speckle |   | Tramitancia |   |
|---------|---------|---|-------------|---|
|         | $R^2$   |   | $R^2$       |   |
| P1      | 0,19    | X | 0,97        | ✓ |
| P2      | 0,94    | ✓ | 0,98        | ✓ |

|     |      |   |      |   |
|-----|------|---|------|---|
| P3  | 0,21 | X | 0,98 | ✓ |
| P4  | 0,87 | ✓ | 0,86 | ✓ |
| P5  | 0,99 | ✓ | 0,99 | ✓ |
| P6  | 0,73 | ✓ | 0,95 | ✓ |
| P7  | 0,90 | ✓ | 0,85 | X |
| P8  | 0,74 | ✓ | 0,97 | ✓ |
| P9  | 0,99 | ✓ | 0,99 | ✓ |
| P10 | 0,92 | ✓ | 0,99 | ✓ |

En los valores de  $R^2$  por speckle se observan que los ajustes no son buenos para el caso de las muestras P1 y P3. Para el caso de la tramitancia, el menor valor es de 0,85, notándose una discrepancia entre los tiempos de licuefacción obtenidos por ambos métodos, por lo que se podría considerar que falla para la muestra P7. Siendo considerado como el mejor método para la determinación de los tiempos de licuefacción, la evaluación de las variaciones temporales de la tramitancia, consiguiendo los mejores valores adquiridos de  $R^2$  entre los dos métodos aplicados.

En la Tabla 16 se aprecia una matriz de correlación de análisis de componentes principales (prueba estadística) entre las variables estudiadas en el trabajo; como los son: parámetros macroscópicos, microscópicos, parámetros de ajustes de los gráficos y tiempos de licuefacción por ambos métodos. Es importante señalar que esta matriz correlaciona una a una cada variable y con sí misma. Para esta correlación se toma como criterio el  $R^2$  entre las variables, ya que es una medida estadística que indica que tan bien los datos se ajustan a un tipo de regresión. También hay que tener presente que un  $R^2$  alto no garantiza que el modelo sea adecuado o que sean precisas las predicciones. Si se tiene un valor bajo de  $R^2$  no significa tampoco que el modelo sea malo, ya que en ciencias las relaciones son más complejas.

Matriz de correlaciones<sup>ab</sup>

|             | EDAD   | VT    | Phi   | Phf   | Tmues | Tamb  | Viabi | Nesp  | Concen | IRAL  | IRDL  | t1    | A1    | X0    | Y0    | t1Pmed | A1Pmed | X0Pmed | Y0Pmed | TLS   | TLPmed |       |
|-------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|
| Correlación | EDAD   | 1,00  | -0,06 | -0,29 | -0,32 | -0,22 | -0,16 | -0,96 | 0,04   | -0,17 | 0,89  | 0,28  | -0,17 | 0,67  | -0,68 | -0,19  | 0,50   | 0,55   | -0,03  | -0,64 | -0,23  | 0,46  |
|             | VT     | -0,06 | 1,00  | 0,01  | -0,14 | 0,18  | -0,90 | 0,26  | 0,84   | 0,60  | -0,28 | -0,80 | -0,49 | 0,21  | 0,35  | -0,23  | 0,46   | 0,01   | 0,74   | -0,21 | -0,45  | 0,43  |
|             | Phi    | -0,29 | 0,01  | 1,00  | 0,65  | 0,95  | 0,09  | 0,14  | 0,16   | 0,36  | -0,31 | 0,28  | -0,07 | 0,35  | -0,16 | -0,18  | -0,21  | 0,36   | -0,36  | -0,22 | -0,12  | -0,26 |
|             | Phf    | -0,32 | -0,14 | 0,65  | 1,00  | 0,66  | 0,14  | 0,13  | -0,17  | -0,08 | -0,19 | 0,18  | -0,33 | 0,08  | -0,19 | 0,63   | -0,40  | 0,08   | -0,44  | -0,01 | -0,35  | -0,46 |
|             | Tmues  | -0,22 | 0,18  | 0,95  | 0,66  | 1,00  | -0,14 | 0,08  | 0,26   | 0,38  | -0,22 | 0,23  | -0,36 | 0,44  | -0,21 | -0,14  | -0,24  | 0,33   | -0,35  | -0,25 | -0,41  | -0,32 |
|             | Tamb   | -0,16 | -0,90 | 0,09  | 0,14  | -0,14 | 1,00  | -0,05 | -0,60  | -0,26 | -0,08 | 0,58  | 0,68  | -0,22 | -0,27 | 0,14   | -0,33  | 0,12   | -0,59  | 0,10  | 0,64   | -0,29 |
|             | Viabi  | -0,96 | 0,26  | 0,14  | 0,13  | 0,08  | -0,05 | 1,00  | 0,09   | 0,21  | -0,88 | -0,50 | 0,16  | -0,72 | 0,84  | 0,11   | -0,33  | -0,63  | 0,30   | 0,66  | 0,24   | -0,27 |
|             | Nesp   | 0,04  | 0,84  | 0,16  | -0,17 | 0,26  | -0,60 | 0,09  | 1,00   | 0,91  | -0,35 | -0,67 | -0,26 | 0,51  | 0,01  | -0,44  | 0,61   | 0,47   | 0,60   | -0,58 | -0,27  | 0,55  |
|             | Concen | -0,17 | 0,60  | 0,36  | -0,08 | 0,38  | -0,26 | 0,21  | 0,91   | 1,00  | -0,56 | -0,49 | -0,04 | 0,46  | -0,04 | -0,51  | 0,42   | 0,53   | 0,37   | -0,54 | -0,07  | 0,37  |
|             | IRAL   | 0,89  | -0,28 | -0,31 | -0,19 | -0,22 | -0,08 | -0,88 | -0,35  | -0,56 | 1,00  | 0,53  | -0,25 | 0,41  | -0,58 | 0,01   | 0,11   | 0,21   | -0,30  | -0,27 | -0,30  | 0,08  |
|             | IRDL   | 0,28  | -0,80 | 0,28  | 0,18  | 0,23  | 0,58  | -0,50 | -0,67  | -0,49 | 0,53  | 1,00  | 0,10  | 0,19  | -0,57 | -0,04  | -0,52  | 0,18   | -0,90  | 0,01  | 0,03   | -0,53 |
|             | t1     | -0,17 | -0,49 | -0,07 | -0,33 | -0,36 | 0,68  | 0,16  | -0,26  | -0,04 | -0,25 | 0,10  | 1,00  | -0,35 | 0,21  | -0,29  | 0,21   | 0,02   | 0,10   | 0,12  | 0,99   | 0,31  |
|             | A1     | 0,67  | 0,21  | 0,35  | 0,08  | 0,44  | -0,22 | -0,72 | 0,51   | 0,46  | 0,41  | 0,19  | -0,35 | 1,00  | -0,79 | -0,34  | 0,44   | 0,90   | -0,13  | -0,93 | -0,44  | 0,33  |
|             | X0     | -0,68 | 0,35  | -0,16 | -0,19 | -0,21 | -0,27 | 0,84  | 0,01   | -0,04 | -0,58 | -0,57 | 0,21  | -0,79 | 1,00  | -0,01  | -0,07  | -0,79  | 0,57   | 0,74  | 0,32   | 0,02  |
|             | Y0     | -0,19 | -0,23 | -0,18 | 0,63  | -0,14 | 0,14  | 0,11  | -0,44  | -0,51 | 0,01  | -0,04 | -0,29 | -0,34 | -0,01 | 1,00   | -0,37  | -0,34  | -0,21  | 0,29  | -0,26  | -0,38 |
|             | t1Pmed | 0,50  | 0,46  | -0,21 | -0,40 | -0,24 | -0,33 | -0,33 | 0,61   | 0,42  | 0,11  | -0,52 | 0,21  | 0,44  | -0,07 | -0,37  | 1,00   | 0,52   | 0,73   | -0,65 | 0,19   | 0,99  |
|             | A1Pmed | 0,55  | 0,01  | 0,36  | 0,08  | 0,33  | 0,12  | -0,63 | 0,47   | 0,53  | 0,21  | 0,18  | 0,10  | 0,90  | -0,79 | -0,34  | 0,52   | 1,00   | -0,12  | -0,96 | -0,08  | 0,43  |
|             | X0Pmed | -0,03 | 0,74  | -0,36 | -0,44 | -0,35 | -0,59 | 0,30  | 0,60   | 0,37  | -0,30 | -0,90 | 0,02  | -0,13 | 0,57  | -0,21  | 0,73   | -0,12  | 1,00   | -0,07 | 0,16   | 0,77  |
|             | Y0Pmed | -0,64 | -0,21 | -0,22 | -0,01 | -0,25 | 0,10  | 0,66  | -0,58  | -0,54 | -0,27 | 0,01  | 0,12  | -0,93 | 0,74  | 0,29   | -0,65  | -0,96  | -0,07  | 1,00  | 0,21   | -0,56 |
|             | TLS    | -0,23 | -0,45 | -0,12 | -0,35 | -0,41 | 0,64  | 0,24  | -0,27  | -0,07 | -0,30 | 0,03  | 0,99  | -0,44 | 0,32  | -0,26  | 0,19   | -0,08  | 0,16   | 0,21  | 1,00   | 0,29  |
|             | TLPmed | 0,46  | 0,43  | -0,26 | -0,46 | -0,32 | -0,29 | -0,27 | 0,55   | 0,37  | 0,08  | -0,53 | 0,31  | 0,33  | 0,02  | -0,38  | 0,99   | 0,43   | 0,77   | -0,56 | 0,29   | 1,00  |

Rojo: Correlación entre la misma variables.

Verde: Correlación muy fuerte, con  $R^2 \geq 0,8$ .

Amarillo: Correlación fuerte, con  $0,5 \geq R^2 < 0,8$ .

VT=volumen total de la muestra; Phi=Ph inicial; Phf= Ph final; Tmues= Temperatura de la muestra; Tamb= Temperatura ambiente; Viabi= Viabilidad; Nesp= Número de espermatozoides; Concen=Concentración espermática; IRAL= Índice de refracción antes de la licuefacción; IRDL= Índice de refracción después de la licuefacción; t1; parámetro de ajuste de los gráficos por el método Spckle; A1= parámetro de ajuste de los gráficos por el método Spckle; X0= parámetro de ajuste de los gráficos por el método Spckle; X0= parámetro de ajuste de los gráficos por el método Spckle; Y0= parámetro de ajuste de los gráficos por el método Spckle; t1Pmed= parámetro de ajuste de los gráficos por el método de tramitancia; A1Pmed= parámetro de ajuste de los gráficos por el método de tramitancia; X0Pmed= parámetro de ajuste de los gráficos por el método de tramitancia; Y0Pmed= parámetro de ajuste de los gráficos por el método de tramitancia; TLS= Tiempo de licuefacción por el método Speckle; TLPmed= Tiempo de licuefacción por el método de tramitancia.

Tabla 16. Resultados de la prueba de componentes principales.

Es posible observar la correlación que existe entre ellas; ya que al comparar una variable respecto a la otra se puede conocer si esta tiene alguna correlación con una de las demás variables, lo que hace tener información sobre las variables correlacionadas. En estadística este proceso es fundamental, ya que ayuda a entender cómo se relacionan dos variables entre sí, esta correlación tiene un valor que va desde -1 hasta +1, por lo que si el valor es +1 la correlación es positiva perfecta, en cambio, si el valor es 0 no hay correlación entre las variables y si el valor es -1 se dice que hay una correlación negativa perfecta. Por otro lado, es importante mencionar que el  $R^2$  representa la proporción de la variabilidad de una variable que se explica por la otra variable. Entre las variables correlacionadas se pueden destacar las siguientes:

Al correlacionar la variable edad con Volumen Total se puede observar que hay una correlación muy fuerte inversa; es decir; que si una variable aumenta la otra disminuye. Por otro lado, se puede ver una correlación fuerte positiva entre la edad y el índice de refracción antes de la licuefacción, lo que quiere decir que las dos variables aumentan proporcionalmente. A su vez la edad tiene correlación débil positiva con el parámetro de ajuste A1, débil inversa con el parámetro de ajuste X0, débil positiva con el parámetro de ajuste t1 Pmed, débil positiva con el parámetro de ajuste A1 Pmed y débil inversa con el parámetro de ajuste Y0 Pmed.

La variable Volumen Total tiene correlación muy fuerte inversa con Temperatura ambiente, de igual forma, cuando una variable aumenta, la otra disminuye. Se puede evidenciar que la variable Volumen Total tiene correlación fuerte positiva con la variable número de espermatozoides, por lo tanto, las dos variables aumentan proporcionalmente. Esta a su vez posee una correlación débil positiva con la variable concentración espermática, una correlación fuerte negativa con la variable índice de refracción después de la licuefacción, y una correlación fuerte positiva con el parámetro de ajuste X0 Pmed.

Cuando se estudia la correlación de la variable  $pH_i$  respecto a  $pH_f$  se puede observar que existe una correlación débil positiva entre ellas, y una correlación muy fuerte positiva con la variable temperatura de la muestra.

La variable  $pH_f$  tiene correlación débil positiva con la variable  $pH_i$ , también, posee correlación débil positiva con la variable temperatura de la muestra, y una correlación débil positiva con el parámetro de ajuste  $Y_0$ . Se puede evidenciar una clara diferencia entre las correlaciones de las variables  $pH_i$  y  $pH_f$ , ya que en esta última todas sus correlaciones son débiles positivas; es decir, a pesar de que estas correlaciones son débiles cada una de las variables correlacionadas con  $pH_f$  aumentan proporcionalmente mientras  $pH_f$  también aumenta.

Para la variable temperatura de la muestra con la variable  $pH_i$  se puede apreciar que tiene una correlación muy fuerte positiva, y a su vez posee correlación débil positiva con  $pH_f$ , lo que quiere decir que a medida que la muestra va cambiando su temperatura el pH varía.

Al estudiar la correlación existente para la variable temperatura ambiente con la variable Volumen Total, estas experimentan correlación muy fuerte inversa; es decir, al aumentar la variable temperatura ambiente la variable temperatura de la muestra disminuye o viceversa. Por otro lado, la variable temperatura ambiente tiene correlación débil inversa con la variable número de espermatozoides. También, es posible notar la correlación débil positiva que tiene la variable temperatura ambiente con la variable índice de refracción después de la licuefacción. En el mismo orden de ideas se aprecia la correlación débil positiva existente con el parámetro de ajuste  $t_1$ . A su vez, es notoria la correlación débil inversa que se presenta entre la variable temperatura ambiente con el parámetro de ajuste  $X_0$   $P_{med}$ . Por último, se ve que hay una correlación débil positiva entre la variable temperatura ambiente con el tiempo de licuefacción a través del método speckle.

Para la variable viabilidad se puede ver que hay correlación muy fuerte inversa con la variable edad con un buen ajuste de  $R^2$ , lo que quiere decir que mientras una de las variables aumenta, la otra variable disminuye ajustándose

de muy buena manera al modelo propuesto. También, se puede apreciar la correlación fuerte inversa que posee la variable viabilidad con la variable índice de refracción antes de la licuefacción. Es notoria también la correlación débil inversa que existe entre la variable viabilidad y la variable índice de refracción después de la licuefacción. También la variable viabilidad presenta correlación fuerte inversa con el parámetro de ajuste A1, fuerte positiva con el parámetro de ajuste X0, débil inversa con el parámetro de ajuste A1 Pmed, y débil positiva con el parámetro de ajuste Y0 Pmed.

Cuando se estudia la correlación que existe entre la variable número de espermatozoides con la variable Volumen Total es posible notar que su correlación es de característica fuerte positiva con un ajuste del modelo adecuado al propuesto. Se ve también la correlación débil inversa que existe entre la variable número de espermatozoides con la variable temperatura ambiente. Lo que hace pensar que al momento de variar la variable temperatura ambiente, la variable número de espermatozoides varía también de la misma forma. La variable número de espermatozoides presenta correlación fuerte positiva con la variable concentración espermática; es decir; Al aumentar la variable número de espermatozoides la variable concentración espermática también lo hace. Se puede evidenciar que la variable número de espermatozoides también posee una correlación débil inversa con la variable índice de refracción después de la licuefacción, correlación débil positiva con el parámetro de ajuste A1, correlación débil positiva con el parámetro de ajuste t1 Pmed, correlación débil positiva con el parámetro de ajuste X0 Pmed, correlación débil inversa con el parámetro de ajuste Y0 Pmed y correlación débil positiva con el tiempo de licuefacción por tramitancia (Pixel medio).

En la correlación de la variable concentración espermática respecto a la variable Volumen Total se puede observar que la correlación existente es de tipo débil positiva con un ajuste del modelo no muy bueno pero aceptable, ya que su correlación es mientras una variable aumenta la otra también lo hace. Para la correlación de la variable concentración espermática con la variable número de espermatozoides la correlación que existe entre estas es de tipo muy fuerte positiva con un ajuste del modelo muy bueno. Ahora, en la correlación que hay entre la variable concentración espermática con la

variable índice de refracción antes de la licuefacción se dice que es de carácter débil inversa con un ajuste del modelo no muy bueno. Se nota que la correlación de la variable concentración espermática con el parámetro de ajuste  $Y_0$  es de tipo débil inversa con un ajuste del modelo no muy bueno. Si bien, en la correlación que existe entre la variable concentración espermática con el parámetro de ajuste  $A_1$   $P_{med}$  el ajuste del modelo no es muy bueno se puede notar que esta correlación es de tipo débil positiva, y la correlación que tiene la variable concentración espermática con el parámetro de ajuste  $Y_0$   $P_{med}$  es de tipo débil inversa con un ajuste no muy bueno. Se puede apreciar que para la mayoría de las correlaciones que hay entre la variable concentración espermática y las demás variables analizadas el ajuste no es tan bueno, exceptuando la variable número de espermatozoides que tiene un ajuste muy bueno y se adecua notoriamente al modelo.

Ahora, al estudiar la correlación que hay entre la variable índice de refracción antes de la licuefacción con la variable edad, se puede notar que esta correlación es fuerte positiva con buen ajuste del modelo. Para la variable índice de refracción antes de la licuefacción con la variable viabilidad se nota que la correlación entre ellas es fuerte inversa; es decir; mientras una de las variables aumenta la otra variable tiende a disminuir. De igual forma, la correlación que hay entre la variable índice de refracción antes de la licuefacción con la variable concentración espermática es débil inversa con ajuste del modelo no muy bueno. En el caso de la variable índice de refracción antes de la licuefacción con la variable índice de refracción después de la licuefacción presentan una correlación débil positiva; es decir; cuando una de estas variables tiende a aumentar la otra variable tiende a aumentar. Por último, la correlación que existe entre la variable índice de refracción antes de la licuefacción con el parámetro de ajuste  $X_0$  es de tipo débil positiva; es decir; cuando una de estas variables aumenta la otra también lo hace, pero no de la misma manera que la primera variable, ya que su correlación es débil.

En el caso de las variables índice de refracción después de la licuefacción y Volumen Total presentan una fuerte correlación inversa con un buen ajuste del modelo propuesto. Del mismo modo para las variables índice de refracción después de la licuefacción con temperatura ambiente, estas

presentan correlación débil positiva y un ajuste un ajuste del modelo del 58%. De la misma forma presenta correlación débil inversa con la variable viabilidad y un ajuste no muy bueno del modelo propuesto. Posee también correlación débil inversa con la variable número de espermatozoides, débil positiva con la variable índice de refracción antes de la licuefacción, correlación débil inversa con el parámetro de ajuste  $X_0$ , correlación débil inversa con el parámetro de ajuste  $t_1$   $P_{med}$ , también posee una muy fuerte correlación inversa y un ajuste muy bueno del modelo propuesto con el parámetro de ajuste  $X_0$   $P_{med}$  y por último se correlaciona de manera débil inversa con el tiempo de licuefacción por tramitancia (Pixel medio).

Si se analiza la correlación que existe entre las variables  $t_1$  con la de temperatura ambiente y el tiempo de licuefacción por el método Speckle presentan una correlación débil positiva y muy fuerte positiva respectivamente. Esta última correlación entre estas dos variables posee un ajuste muy bueno del modelo propuesto de 99%.

Si siguiendo el estudio de las correlaciones entre las diferentes variables, es posible notar que la variable  $A_1$  se correlaciona de manera débil positiva con la variable edad y un ajuste adecuado del modelo propuesto. Al ver qué correlación existe entre las variables de  $A_1$  y viabilidad se puede notar que estas poseen una correlación fuerte inversa y un ajuste adecuado del modelo propuesto. Si se compara el parámetro de ajuste  $A_1$  con la variable número de espermatozoides es posible obtener que su correlación es débil positiva, pero con  $X_0$  su correlación es fuerte inversa con un ajuste adecuado del modelo propuesto. Si se observa la correlación que hay entre el parámetro de ajuste  $A_1$  y  $A_1$   $P_{med}$  muy notoria, ya que es de tipo muy fuerte positiva con un muy buen ajuste del modelo. De igual forma con  $Y_0$   $P_{med}$  que la correlación es muy fuerte inversa y un ajuste muy bueno del modelo propuesto.

Por otro lado, también se observa las correlaciones entre el parámetro de ajuste  $X_0$  y las variables analizadas. Como primera afinidad de estas, se tiene que hay una correlación débil inversa con la variable edad del 68%, una correlación fuerte positiva con la de viabilidad y un ajuste bueno del modelo, una correlación débil inversa con la de índice de refracción antes de la

licuefacción, al igual que la correlación que existe con la de índice de refracción después de la licuefacción, este parámetro de ajuste también tiene correlación fuerte inversa con el de A1, del mismo modo que para el de A1 Pmed. Por último, posee correlación débil positiva con el de X0 Pmed y fuerte positiva con el de Y0 Pmed.

En la correlación del parámetro de ajuste Y0 con las variables pHf y concentración espermática se tiene correlación débil positiva y correlación débil inversa, de 63% y 51% respectivamente.

La correlación que hay entre el parámetro de ajuste t1 Pmed y las demás variables, se observa que hay de tipo débil positiva con la variable edad, débil positiva con la de número de espermatozoides, débil inversa con la de índice de refracción después de la licuefacción, débil positiva con el parámetro de ajuste A1 Pmed, fuerte positiva con el de X0 Pmed, débil inversa con el de Y0 Pmed y una correlación muy fuerte positiva con el tiempo de licuefacción por tramitancia (Pixel medio), con un muy buen ajuste del modelo del 99%.

De igual forma se observa la correlación entre otro parámetro de ajuste como lo es A1 Pmed con las variables estudiadas, se tiene que este parámetro de ajuste tiene una correlación débil positiva con la variable edad, correlación débil inversa con la variable viabilidad, una correlación débil positiva con la variable concentración espermática de 53%. Este parámetro de ajuste a su vez posee correlación con otros parámetros de ajustes. Primero, una correlación muy fuerte positiva con el de A1 de 90%, correlación débil inversa con el de X0 de 79%, tiene correlación débil positiva con el de t1 Pmed y por último se aprecia una correlación muy fuerte inversa con el parámetro de ajuste Y0 Pmed de 96%.

Cuando se ve la correlación que tiene el parámetro de ajuste X0 Pmed con las variables Volumen Total, temperatura ambiente, número de espermatozoides e índice de refracción después de la licuefacción. Se observa, una correlación fuerte positiva con un buen ajuste del modelo de 74%, una correlación débil inversa con ajuste del modelo de 59% y una

correlación débil positiva con un ajuste del modelo de 60% respectivamente. Así mismo, la correlación que hay entre este parámetro de ajuste con los de  $X_0$ ,  $t_1$  Pmed y tiempo de licuefacción por tramitancia. Es posible ver que las correlaciones son de tipo débil positiva con un ajuste del modelo de 57%, una correlación fuerte positiva con un ajuste del modelo de 73% y una correlación fuerte positiva con un ajuste del modelo de 77% respectivamente.

El parámetro de ajuste  $Y_0$  Pmed presenta correlación con distintas variables. Una correlación débil inversa con la variable edad y un ajuste del modelo de 64%, correlación débil positiva con la de viabilidad con ajuste del modelo de 66%, correlación débil inversa con la variable número de espermatozoides y concentración espermática con ajustes del modelo de 58% y 54% respectivamente. También presenta correlación con algunos parámetros de ajustes. Correlación de tipo muy fuerte inversa con el de  $A_1$  y un ajuste muy bueno del modelo de 93%, una correlación fuerte positiva con el de  $X_0$  y un ajuste adecuado del modelo, una correlación débil inversa con el de  $t_1$  Pmed, una correlación muy fuerte inversa con el parámetro de ajuste  $A_1$  Pmed y un ajuste muy bueno del modelo propuesto de 96%. por último, presenta una correlación débil inversa con el tiempo de licuefacción por tramitancia con ajuste del modelo propuesto de 56%.

Ahora al revisar las correlaciones que posee la variable tiempo de licuefacción por Speckle con otras variables se tiene que; hay correlación débil positiva con la de temperatura ambiente y un ajuste del modelo propuesto de 64%. Tiene también una correlación muy fuerte positiva con el parámetro de ajuste  $t_1$  y un ajuste del modelo propuesto muy bueno de 99%.

Así mismo, se estudia la correlación que tiene la variable tiempo de licuefacción por tramitancia con las demás variables. Se tiene una correlación débil positiva con la variable número de espermatozoides, una correlación débil inversa con la de índice de refracción después de la licuefacción. A su vez, la variable tiempo de licuefacción por tramitancia presenta correlación de tipo muy fuerte positiva y un ajuste muy bueno del modelo propuesto de 99% con el parámetro de ajuste  $t_1$  Pmed, una correlación fuerte positiva con el de  $X_0$  Pmed y una correlación débil inversa con el parámetro de ajuste  $Y_0$  Pmed.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones:

Se pudo medir las variables macroscópicas para cada muestra como Phi, Phf, volumen total de la muestra, temperatura de la muestra y viscosidad de la muestra. En cada uno de estos parámetros se observó que todas las muestras presentaban normalidad, sin embargo, en la muestra P4 se evidenció un Ph alcalino con un Ph inicial y final de 8, en la muestra P8 se observó un cambio de Ph, donde pasó de un Ph inicial de 7 que se considera ácido a un Ph final de 8 que se considera alcalino. Estos cambios pueden deberse a los hábitos alimenticios, infecciones o inflamaciones, medicamentos y sustancias o simplemente a su estilo de vida y factores ambientales. En la muestra P5 se observó un volumen total de la muestra inferior a los establecido por (WHO, 2021) donde se menciona que se considera un volumen normal cuando está por encima de 1,4 ml por eyaculación. Solo la muestra P2 y p5 mostraron un bajo volumen del eyaculado con valores de 1,68 ml y 1,49 ml respectivamente, por lo que se puede decir que estas muestras están en el caso limite en comparación con lo establecido. Por otro lado, se observó que todas las muestras presentaron viscosidad normal, ninguna de ellas tuvo un hilo superior a los 2 cm de longitud que es lo que establece la OMS. Cuando se analizó la temperatura para cada muestra pudo determinarse que todas las muestras estaban en el rango normal según lo que establece la organización mundial de la salud (OMS), solo la muestra P3 tuvo una temperatura de 29°C, esto pudo deberse al momento del traslado de la muestra, ya que según lo que establece la OMS la temperatura de una muestra de semen debe estar alrededor de los 37°C, temperatura corporal.

Por otro lado, se pudo determinar las variables microscópicas de las 10 muestras, mostrando anomalías las muestras P1 y P3, con un caso de azoospermia, es decir, todos los espermatozoides no poseen movilidad, ya que

no poseen cola, solo está la presencia de la cabeza y cuello. Se obtiene otra patología como es el caso de la hipospermia, siendo esta la muestra P5. En la variable microscópica viabilidad todas las muestras estaban en el rango de lo normal según lo que establece la OMS que es superior al 54%, sin embargo, la muestra P10 mostró una viabilidad del 58,33%, este resultado es bajo comparado con las demás muestras estudiadas, de igual manera pudo considerarse normal ya que superaba el rango establecido, esta baja viabilidad se debe a la edad del participante. Cabe mencionar que para las muestras P1 y P3 no se midió el valor debido a la anomalía que presentaba. Se observa que todas las muestras presentan concentraciones menores al valor esperado de  $\geq 16 \times 10^6$  cel en el volumen total de eyaculado, siendo consistente con los reportado por (Levine, y otros, 2023) , donde se reporta un reducción considerable del conteo espermático en la población.

Se pudo notar que en las muestras P5, P6, P8 y P10 se obtuvieron concentraciones de  $3,20 \times 10^6$  cel/ml,  $2,99 \times 10^6$  cel/ml,  $1,60 \times 10^6$  cel/ml y  $1,40 \times 10^6$  cel/ml respectivamente, siendo estos los valores más bajos de concentraciones de todas las muestras, ya que se considera normal una concentración espermática de  $\geq 16 \times 10^6$  cel en el volumen total de eyaculado según la OMS. Para el caso del número total de espermatozoides presentes en los datos, todas las muestras se encuentran con valores menores a  $39 \times 10^6$  Cel, comprendida entre  $1,31 \times 10^6$  a  $38,4 \times 10^6$  Cel, con un valor medio de  $14,1 \times 10^6 \pm 12,4 \times 10^6$  Cel/mL y un CV de 88%, estando por debajo del valor mínimo esperado. Es importante mencionar que para las muestras P1 y P3 no se pudo determinar el número de espermatozoides ya que estas presentaban problemas de azoospermia.

Otro punto importante que se hizo fue hacer la evaluación de las variaciones en el índice de refracción de las muestras del líquido seminal antes y después de la licuefacción, donde se pudo observar que los valores de desviación estándar y los coeficientes de variación no superan el 0,5%, el valor del índice de refracción promedio de todas las muestras, antes de la licuefacción es de  $1,3462 \pm 0,0033$ , con un CV de 0,25%; para el caso de las muestras posterior a la licuefacción se obtiene un valor de  $1,3467 \pm 0,0030$ , con un CV de 0,22%. Tomando como referencia el valor de índice de refracción

de las muestras ya licuefaccionadas con las muestras antes de que se licuefaccionaran, también se obtuvo un porcentaje de diferencia del 0,04%, lo que indica que no se evidencian cambios en el índice de refracción de las muestras de semen antes y después de la licuefacción, por lo que esta propiedad óptica no muestra cambios evidentes.

El estudio del líquido seminal ha representado uno de los procedimientos más importantes dentro del campo de la salud, por tales efectos, la Organización Mundial de la Salud ha diseñado un manual para el análisis y procesamiento del semen humano, llamado espermiograma, siendo una herramienta básica de rutina que aporta información sobre el potencial reproductivo del varón; estandarizado como un método de evaluación de calidad seminal (WHO, 2021).

El estudio abarca el análisis de las características macroscópicas y microscópicas del semen, pero además de esto, ofrece información sobre el estado clínico del paciente, reflejando la función de las glándulas sexuales accesorias, relacionado con la motilidad y morfología de los espermatozoides, parámetros de importancia en el proceso de fertilización y reproducción de cualquier especie (Leal, 2020).

Los datos obtenidos de las variaciones temporales del patrón de interferencia, es decir el speckle dinámico, aplicando el método de las diferencias temporales modificado y realizando un ajuste de una función exponencial de grado uno, permitieron obtener 3 curvas que ayudaron a conocer el comportamiento de las muestras estudiadas.

Donde al estudiar el comportamiento de los cambios en la intensidad en el patrón de interferencia se pudo encontrar al menos tres formas bien definidas, la primera cuando no se cumple el ajuste exponencial con valores de  $R^2 < 0,30$ , siendo el caso de las muestras P1 y P3 con posible presencia de azoospermia, la segunda corresponde a la presencia de un pico antes del proceso de licuefacción, para muestras con concentraciones bajas  $< 6 \times 10^6$  Cel/mL, como es el caso de P5, P6, P8 y P10 y finalmente las que poseen concentraciones  $> 6 \times 10^6$  Cel/mL como lo son P2, P4, P7 y P9 que cumplen con

el ajuste propuesto, siendo consistente con lo reportado por (Leal, 2020). Esto permitió conocer el comportamiento de cada muestra y así poder identificar el problema que posee cada una de ellas, lo que resulta un beneficio en el análisis ya que con solo ver la forma del gráfico se pudo intuir a que grupo pertenece esta muestra, siendo fundamental en el momento de dar un diagnóstico.

Por tal motivo se hizo un análisis más detallado de la ubicación de los picos presentes en las muestras P5, P6, P8 y P10, donde se realizó la estimación de la ubicación de los mismos, mediante el ajuste de una función gaussiana de se adquirió el valor del centro de los picos. Los valores que se obtuvieron para el centro de los picos mostraron una relación de proporcionalidad en función de la concentración de los espermatozoides; es decir; a medida que la concentración aumente el centro aumenta, y se obtuvo el ajuste de una función lineal con un  $R^2$  de 0,96. Por lo que es posible que los picos se atenúen en el proceso de licuefacción y se confundan con ruido.

Cabe señalar que los métodos estandarizados hasta hoy, no cuentan con precisión en el análisis de las características del semen, por la presencia del error humano asociado al estudio y por carecer de métodos precisos que permitan ofrecer datos con mayor exactitud. Los parámetros macroscópicos y microscópicos están relacionados con la calidad del líquido espermático propiamente dicho; el tiempo de licuefacción del semen es importante en el proceso de reproducción, es un indicador de la actividad prostática y de la función de las glándulas sexuales accesorias, ya que al aumentar el TL la motilidad disminuye significativamente, aspecto que pudo comprobarse durante el estudio.

Es por ello que se descartan los valores obtenidos para el TL a través del método Speckle de las muestras P1 y P3, debido al mal ajuste obtenido, ya que sus  $R^2$  fueron de 0,19 y 0,21 respectivamente, siendo estos los valores de  $R^2$  más bajos respecto a las otras muestras estudiadas, de tal manera que para los valores que se encontraron con buen ajuste están en un rango de 8,18 a 57,08 min, con un valor medio de  $21 \pm 15$  min y un CV de 71%. Y donde se pudo observar que todos los demás valores para el TL se ajustan a lo

establecido en la OMS. En el primer caso para la muestra P1 se obtuvo un valor del tiempo de licuefacción de  $(2350606 \pm 169765)$  min, a pesar de que P3 está en el rango esperado con un valor de  $(6,72 \pm 0,49)$  min es el menor valor obtenido, estando notoriamente lejano a los otros valores. Por lo que es notoria la falla de este método en 2 muestras. De esta manera, debido a que los tiempos de licuefacción no se pudieron determinar para las muestras P1 y P3, se hizo el análisis de la variación del coeficiente de transmisión en función del tiempo, ya que el speckle puede hacer mediciones de este parámetro como lo demostró (Santos, 2023) en su trabajo. Cuantificando este cambio a través del análisis de la variación del valor del pixel medio (Pmed) en función del tiempo, Se pudo observar que para la muestra P1 al hacer el ajuste, esta se adecua más a lo propuesto con un  $R^2$  de 0,97 a pesar de que esta muestra presenta una posible azoospermia al igual que la muestra P3, pero es posible notar que los  $R^2$  de estas muestras son parecidos y con mejor valor comparado a cuando se hace el ajuste para Speckle. De igual forma para la muestra P6 con un  $R^2$  de 0,95 y P8 con un  $R^2$  de 0,97 donde se pudo notar que estas dos últimas muestras presentan un pico de intensidad antes de ocurrir el proceso de licuefacción, donde es posible decir que estos picos son debido a diversos cambios que ocurren en los procesos metabólicos y químicos del fluido seminal durante el proceso de licuefacción.

Se pudo ver que en la muestra P3 con un  $R^2$  de 0,98 y con posible problema de azoospermia, se pudo notar que posee un  $R^2$  igual a la muestra P2 con  $R^2$  de 0,98. Donde esta última también presenta un pico momento antes del proceso de licuefacción y es debido al posible cambio metabólico y químico que ocurre en el fluido seminal. Para P4 y P7 que presentan los valores de  $R^2$  más bajos de todas las muestras, de 0,86 y 0,85 respectivamente, se pudo evidenciar que estas presentan varios picos de intensidad antes y después del proceso de licuefacción, a pesar de que estas muestras poseen concentraciones mayores a  $6 \times 10^6$  Cel/mL. Entonces al comparar con las medidas hechas en Speckle se ve una clara diferencia, debido a que el método de pixel medio se ajusta mejor a lo propuesto. De igual forma para las muestras P5, P9 y P10 los valores del  $R^2$  son muy cercanos a 1, además tampoco se evidenciaron notables picos, por lo que cumplen con el ajuste propuesto de la

función exponencial de primer grado. Por lo tanto, es notoria la diferencia entre los dos métodos de análisis, la cual este último tiene falla solo en una muestra, la misma corresponde a la muestra P7 ya que su  $R^2$  es el menor de todos y coincide con el posible caso de hipospermia.

Durante el estudio con muestras de semen fresco, de una población sana y con criterios de inclusión, se demostró que no solamente se trata del tiempo que toma el semen en volverse líquido luego de ser eyaculado, sino que el TL se encuentra directamente relacionado con la actividad biológica, por lo tanto, afecta la motilidad y morfología de la célula espermática. En la evaluación temporal del proceso de licuefacción mediante speckle dinámico, se analizó, en conjunto, factores asociados al TL, pero principalmente se comprobó que el método speckle dinámico cuenta con precisión el determinar el TL, mostrándose como una herramienta novedosa con características de eficiencia y fiabilidad; se trata de un método ampliamente estudiado y con gran aplicabilidad en distintas áreas como la industria, agricultura, salud, entre otros; el método speckle dinámico no es abrasivo y disminuye potencialmente el error humano relacionado con el análisis de distintas muestras.

La evaluación temporal del proceso de TL mediante speckle dinámico permite obtener datos cuantitativos sobre el TL de muestras de semen fresco, alcanzándose el objetivo principal de esta investigación. Tales datos, se puede afirmar que, cuentan con mayor exactitud que los resultados que ofrecen los métodos convencionales, ya que no depende de la pericia de un observador, sino que el speckle dinámico, por medio de un haz de luz y a través de una variación del patrón de interferencia, indica con exactitud el tiempo en el que el semen fresco llega a licuarse. Al conocerse con precisión el parámetro del TL del semen y los parámetros de ajustes, se comparan con la finalidad de encontrar diferencias en las características del LS, empleando cálculos complejos automatizados a través de una interfaz gráfica desarrollada en Matlab, procesando los datos en un corto periodo, siendo más eficiente, ya que permite la variación de los parámetros N y el análisis de un gran número de fotogramas o videos de larga duración, empleando el método de las diferencias temporales modificado propuesto en este trabajo. Debido a la amplia aplicabilidad del método y con rasgos de precisión, la calidad del líquido

seminal puede evaluarse con mínimo margen de error, otorgando confiabilidad en el campo de salud reproductiva y fertilización.

Por otro lado, se hizo un análisis estadístico riguroso donde se pudo demostrar de manera clara las correlaciones que existe entre cada uno de los parámetros microscópicos, macroscópicos, parámetros de ajustes de los gráficos y tiempos de licuefacción. Es por eso que, al estudiar todas las correlaciones existentes entre las variables y los parámetros de ajustes, se puede notar que este tipo de análisis como lo es la matriz de correlación ayuda a explicar y a entender el comportamiento entre cada una de las variables y los parámetros de ajustes, ya que se puede comparar una a una cada variable con otra de manera independiente. Es por esta razón que se adopta esta herramienta como parte del análisis estadístico. De tal manera se pudo encontrar correlaciones apreciables y muy fuertes en distintas variables, en el caso de la edad con viabilidad se pudo encontrar que su correlación fue de  $-0,97$ ; es decir; una correlación muy fuerte inversa de 97%. Por lo tanto, mientras la edad aumenta la viabilidad disminuye. Otra correlación importante que se logró encontrar fue entre el volumen total con número de espermatozoides, la cual fue de tipo fuerte positiva de 84%; es decir; mientras el volumen total de la muestra aumenta el número de espermatozoides también lo hace de la misma forma. El Ph inicial de la muestra se pudo correlacionar de manera muy fuerte positiva con un valor de correlación de 95%, lo que quiere decir que mientras la temperatura de la muestra aumenta el Ph inicial de la muestra también lo hace y de la misma manera. Se encontró una correlación muy fuerte inversa de 90% entre las variables viabilidad con la edad, lo que hace concluir que mientras la edad aumenta la viabilidad disminuye de manera proporcional. Además, se pudo apreciar la correlación fuerte positiva de 84% entre las variables número de espermatozoides con volumen total de la muestra, donde si este último aumenta el número de espermatozoides también lo hace. A su vez se encontró una muy fuerte correlación positiva de 91% entre las variables concentración espermática y número de espermatozoides; es decir; si el número de espermatozoides aumenta la concentración espermática lo hace de manera similar. Se demostró la correlación fuerte positiva de 89% entre las variables índice de

refracción antes de la licuefacción con la edad, lo que da a entender que si la edad aumenta el índice de refracción antes de la licuefacción aumenta de la misma forma. Por otro lado, pudo demostrarse la correlación fuerte inversa de 88% entre la variable índice de refracción antes de la licuefacción y viabilidad; lo que significa que si el índice de refracción aumenta la viabilidad disminuye de manera similar. En cuanto a la correlación fuerte inversa de 80% que se pudo encontrar entre las variables índice de refracción después de la licuefacción y volumen total de la muestra, se puede decir que a medida que el volumen total de la muestra aumenta el índice de refracción después de la licuefacción disminuye. También, se pudo demostrar que hubo una correlación muy fuerte positiva de 99% entre el parámetro de ajuste  $t1P_{med}$  y la variable tiempo de licuefacción a través del pixel medio, eso quiere decir que si el tiempo de licuefacción a través de pixel medio aumenta este parámetro de ajuste también lo hace de manera proporcional y por último hubo una correlación fuerte positiva de 77% entre el parámetro de ajuste  $X0P_{med}$  y el tiempo de licuefacción a través de pixel medio; es decir; mientras el tiempo de licuefacción a través de pixel medio aumenta este parámetro también lo hace.

También como parte del análisis estadístico se usó la prueba de U de Mann-Whitney que permitió ver la significancia entre cada tiempo de licuefacción. El que se obtuvo por el método Speckle y el obtenido por el método de tramitancia o Pixel medio. De tal manera, se pudo demostrar que la significancia entre estas dos variables es de 22,6%, lo que demuestra que cualquiera de los dos métodos utilizados dará un valor para el tiempo de licuefacción, de ésta forma se demuestra que el método de Speckle dinámico es funcional y eficiente para el estudio de muestras de semen fresco, a través esta prueba estadística se pudo lo que ver que al aceptar la hipótesis nula se acepta que los dos grupos tienen significancia entre ellas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta prueba no es concluyente al momento de evaluar cuál de los dos métodos es mejor para la determinación del tiempo de licuefacción. Por lo que se toma por el criterio del  $R^2$  obtenido en cada uno de los métodos, de esta forma el mejor método para determinar el tiempo de licuefacción es el obtenido por el método de tramitancia o pixel medio.

De esta manera a través del método de las diferencias temporales modificado se pudo desarrollar un método de análisis para obtener la evolución temporal del proceso de licuefacción en muestras de semen fresco mediante Speckle dinámico y donde al comparar los resultados obtenidos del procesamiento de los videos se pudo establecer las relaciones estadísticas entre las variables evaluadas.

### **Recomendaciones:**

Este apartado está dirigido a laboratorios dedicados a la salud reproductiva y laboratorios de estandarización de manuales de manejo y análisis de muestras de semen, así como también a futuras investigaciones sobre la calidad del líquido, los rasgos macroscópicos y microscópicos del semen, con características de fiabilidad y eficacia.

Como se menciona en este trabajo, la Organización Mundial de la Salud estandariza el análisis del esperma mediante métodos convencionales con alto margen de error. Se pudo evidenciar que los valores de referencia que ofrece la (WHO, 2021), en el caso de TL, no se ajustan a los valores que refleja el uso de speckle dinámico en la evaluación temporal del proceso de licuefacción de semen fresco. Se exhorta una revisión de los métodos estandarizados e incluir el speckle dinámico como método de preferencia en la detección del TL ya que es un método que permite conocer la dinámica de la muestra sin algún tipo de experiencia en el experimento, por lo que manejar una muestra mayor sería deseable para futuras investigaciones en este tema, también se recomienda introducir como variables en el estudio, la evaluación del estado de salud de voluntario y determinar las posibles relaciones con la salud de la glándula prostática y accesorias, que determinan directamente el tiempo de licuefacción de las muestras de semen, es de bajo costo y sobre todo no se usa ningún tipo de reactivo para mantener la muestra lo que hace que el experimento sea de bajo costo económico.

Asimismo, se debe aportar información confiable y sobre la calidad del esperma, ya que se trata de la muestra más importante en la salud reproductiva y los procesos de fertilización in vitro. Por lo tanto, el método propuesto puede extenderse al análisis de los diferentes parámetros macroscópicos y microscópicos como la motilidad, concentración, viscosidad y morfología de la célula espermática, y, de este modo dirigir la investigación hacia el desarrollo de un espermograma láser. Entonces, es recomendable ampliar la investigación con un número mayor de muestras y lograr así la caracterización completa y precisa del líquido seminal utilizando el speckle dinámico, ya que este método puede ser empleado para cualquier tipo de muestra de semen y puede ser utilizado para el diagnóstico de la fertilidad o infertilidad de un individuo, así como en el monitoreo de tratamiento de salud reproductiva.

Finalmente, el speckle dinámico se percibe como una herramienta tecnológica, que a pesar de que conlleva un protocolo experimental complejo, presenta la posibilidad de utilizar instrumentación científica de bajo costo; es por eso que, se extiende la recomendación sobre su uso, a los laboratorios clínicos y de estudios científicos, con el fin de introducir el método propuesto como la técnica precisa en el estudio del semen, abriendo la posibilidad de uso masivo de speckle dinámico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balítán, C., Blanco, S., & Hernández, Y. (2018). *Factores asociados a la baja calidad del esperma en estudiantes de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN MANAGUA en el año 2017*. Managua, Nicaragua: Tesis Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- González, G. (1992). Tratamiento de la infertilidad masculina. (E. I. Altura, Ed.) *Andrología, fertilidad e infertilidad*, pp.173-208.
- Sugiyama, T., & et al. (2010). Use of laser speckle flowgraphy in ocular blood flow research. *Acta Ophthalmologica*, 87(7), 723 –729.
- A. Oulamara, G. T. (1989). Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. *Journal of Modern Optics*, 36(2), 165-179.
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C., Henkel, R., Vij, S., y otros. (2021). Male infertility. *The Lancet*, vol. 397(N° 10271), pp. 319-333.
- Aizu, Y., & Asakura, T. (Aug. de 1991). Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow. *Optics & Laser Technology*, vol. 24(n° 4), pp. 205-219.
- Amalvy, J. I. (2001). Application of dynamic speckle interferometry to the drying of coatings. *Progress in Organic Coatings*, 42(1), 89.
- Anamthathmakula, P., & Winuthayanon, W. (2020). Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception. *Biol Reprod*, vol. 103(n° 2), pp. 411-426.
- Arias, J. (2019). *Análisis multivariante de imágenes de speckle para visualización de vasos sanguíneos*. Puebla, México: Tesis doctoral INAOE.
- Asakura, T. a. (1981). Dynamic laser speckles and their applications to velocity measurement of the diffuse object. *Journal of Applied Physics*, 25, 179.
- Avalos, A., González, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2018). *Recolección y manipulación seminal in vitro* (primera edición ed.). México: Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
- Ayala, G., Díaz, M., & Martínez, M. (2001). Granulometric moments and corneal endothelium status. *Pattern Recognition*, vol. 34(n° 6), pp. 1219-1227.
- Bhasin, S., & Jameson, L. (2003). Enfermedades de los testículos y del aparato reproductor masculino. En 16ed (Ed.), *Principios de Medicina Interna* (págs. pp. 1504-1565). Mc GrawHill.
- Braga Jr, R., Giovanni, F., Rabelo, J., Bosco, F., Flávio, M., Pereira, J., y otros. (2005). Applications in Biological Samples. En *Dynamic speckle and related phenomena* (págs. pp. 182-217). New York: Taylor & Francis Group, LLC.

- Braga Jr, R., Rabelo, G., Granato, L., Santos, E., Machado, J., Arizaga, R., y otros. (2005). Detection of Fungi in Beans by the Laser Biospeckle Technique. *Biosystems Engineering*, vol. 91(N° 4), pp. 465-469.
- Brugo, O., Chillik, C., & Kopelman, S. (2002). Definición y causas de infertilidad. *Rev Med Reprod CEGYR 2002*, vol. 5, pp. 29-45.
- Calamera, J. (1992). *Introducción al estudio del espermatozoide*. Buenos Aires, Argentina: Ediciones Héctor Macchi.
- Calamera, J., Doncel, G., Olmedo, S., Kolm, P., & Acosta, A. (1998). Modified sperm stress test: a simple assay that predicts sperm-related abnormal in-vitro fertilization. *Hum. Reprod*, vol. 13(n° 9), pp. 2484–2488.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., & Skakkebaek, N. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*, vol. 305, pp. 609-613.
- Carvalho, P., Barreto, J., Braga Jr, R., & Rabelo, G. (2009). Motility parameters assessment of bovine frozen semen by biospeckle laser (BSL) system. *Biosystems Engineering*, vol. 102(N° 1), pp. 31-35.
- Carvalho, P., Rossi, R., Lopes, A., Santos, A., Sales, J., Rabelo, G., y otros. (2019). Bovine frozen semen motility análisis using two different laser wavelengths. *Advances in Biochemistry and Biotechnology*, vol 7(n° 02).
- Castilla, J., Alvarez, C., Aguilar, J., González-Varea, C., Gonzalvo, M., & Martínez, L. (2006). Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Hum Reprod*, vol. 21(n° 4), pp. 847–851.
- Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co. (2022). *LD Pumped All-Solid-State Green Laser, MGL—F—532*. Recuperado el 22 de 06 de 2023, de <http://www.cnilaser.com/PDF/MGL-F-532.pdf>
- Collins, T. R. (2021). *Through the Lens: Microscopes and Other Equipment*. Recuperado el 08 de enero de 2021, de <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artmar16/trc-nikon.html>
- Cruz, N., & San Juan, A. (2012). Anatomía y fisiología de la eyaculación. Clasificación de los trastornos de la eyaculación. En *Tratado de Andrología y Medicina Sexual* (págs. pp. 669-677). México: Editorial Médica Panamericana.
- Dainty, J. C. (1975). *Laser speckle and related phenomena. (Topics in Applied Physics)*. London: Springer-Verlag.
- Duncan, D. D. (2008). The copula: A tool for simulating speckle dynamics. *Journal of the Optical Society of America A*, 25(1), 231.
- Eriksson S, e. a. (2014). Laser speckle contrast imaging for intraoperative assessment of liver microcirculation: a clinical pilot study. *Medical Devices*, 7, 257 –261.
- Filho, J. (1999). Testes de Vigor: Importância e Utilização, in Vigor de sementes: conceitos e testes. *ABRATES*.

- Forrester, & al, A. e. (2003). Endoscopic laser imaging of tissue perfusion: new instrumentation and technique. *Lasers in Surgery and Medicine*, 33(3), 151 –157.
- Gavinho, & al, L. e. (2018). etection of white spot lesions by segmenting laser speckle images using computer vision methods. *Lasers in Medical Science*, 33(7), 1565 –1571.
- Gonzalo, S. (2009). *Análisis de actividad es patrones de speckle dinámico*. Mar del Plata.
- Guyton, A., & Hall, J. (2003). Funciones reproductoras y hormonales masculinos. (12ed, Ed.) *Tratado de fisiología médica*, pp. 973-986.
- Guzick, D., Overstreet, J., Dactor-Litvak, P., Brazil, C., Nakajima, S., Coutifaris, C., y otros. (2006). Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*, vol. 345(n° 19), pp. 1388-1393.
- Habib, K. (1989). Applications Of Laser Speckle In Metallic Corrosion. *Proceedings of SPIE*. San Diego.
- Hector, J., Rabal, A., & Braga, J. (2009). *Dynamic Laser speckle and applications*. New York: Taylor & Francis Group, LLC.
- Heeman, W., Steenbergen, W., van Dam, G., & Boerma, E. (2019). Clinical applications of laser speckle contrast imaging: a review. *Journal of Biomedical Optics*, vol. 24(n° 8).
- Hellstrom, W. (2006). Current and future pharmacotherapies of premature ejaculation. *J Sex Med*, vol. 3(N° 4), pp. 332-341.
- Henry, M. R. (1999). *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal: Belo Horizonte.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (sexta edición ed.). McGRAW-HILL / INTERAMERICANA EDITORES, S.A.
- Hilda C. Grassi, H. C.-M. (2016). *Digital imaging information technology for biospeckle activity assessment relative to bacteria and parasites*. London: Springer-Verlag.
- Huaaya, L., Sosa, A., Delgado, N., & Rosado, A. (1973). A kinetic study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism. *Life Sci*, vol. 13(n° 10), pp. 1383-1394.
- Huang, & al, Y. e. (2009). Blood flow dynamics after laser therapy of port wine stain birthmarks. *Lasers in Surgery and Medicine*, 41(8), 563 –571.
- Huisman, Bakker, C. D., Wittens, & A. (2013). Microcirculatory changes in venous disease. *Phlebology*, 28(1), 73 –78.
- Inciarte, I., Martí, L., Ramírez, E., Hernandez, E., Vilorio, A., & Otálora, F. (2012). Procesado de patrones de speckle mediante dos métodos para medir la desecación de semillas uchuva. *INTERCIENCIA. Revista de Ciencia y Tecnología de las Américas*, 37(9), 644-650.

- Jardim, D., Santiago, R., Machado, R., Aarestrup, F., de Mendonça, J., & Lesche, B. (2003). Observing bacterial activity interferometrically. *European Biophysics Journal*, vol. 32(Nº 2), pp. 159-162.
- Jeyendran, R., Van Der Ven, H., Pérez-Peláez, M., Crabo, B., & Zaneveld, L. (1984). Development of ram assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.*, vol. 70, pp. 219-228.
- Knoblovitz, P., & Rey Valzacchi, G. (1999). Rol de las especies reactivas del oxígeno en el hombre infértil. *Boletín Informativo de la Sociedad Argentina de Andrología. Afiliada a la International Society of Andrology*, vol. 8(nº 3), pp. 28-40.
- Kurenda A, A. A. (2012). Temperature effect on apple biospeckle activity evaluated with different indices. *Postharvest Biology and Technology*, 67, 118-123.
- L. Martí-López, H. C.-C.-P. (2010). Temporal difference method for processing dynamic speckle patterns. *Optics Communications*, 283(24), 4972-4977.
- Leal, C. (2020). Nuevo método para determinar el tiempo de licuefacción en semen fresco mediante Speckle dinámico. *Revista CLIC(Nº 22)*, pp. 103-116.
- Lester, G. (1964). Autocorrelation Function and Power Spectral Density of Laser-Produced Speckle Patterns. *Journal of the optical society of america*, 58(3), 247-253.
- Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., y otros. (2017). Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. vol. 23(nº 6), pp. 646–659.
- Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Jolles, M., y otros. (2023). Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. *Hum Reprod Update*, vol. 29(nº 2), 157-176.
- Li, L., & Dailey, D. (2002). An algorithm to estimate vehicle speed using uncalibrated cameras. *JSAI International Conference on Intelligent Transportation Systems*. Tokio.
- l'Observatoire de Paris. (2021). *Cámara CCD : principio*. (UFE) Recuperado el abril de 2021, de <https://media4.obspm.fr/public/VAU/instrumentacion/instrumento/ccd/camara-ccd/APPRENDRE.html>
- Lothhammer, & al, R. e. (2017). Residual stress measurements in steel pipes using DSPI and the holedrilling technique. *International Journal of Pressure Vessels and Piping*, 152, 46 –55.
- Machado, R., Lima, E., Jardim, D., Ferreira, M., de Faria, C., Duarte, R., y otros. (2008). Metabolic activity interferometer: description and calibration of an interferometric method to measure growth of mycobacteria. *European Biophysics Journal*, vol. 38(Nº 1), pp. 111–119.

- 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), pp. 328-333.
- Márquez, C. (2020). *Parámetros macroscópicos de un seminograma*. Barcelona, España: Editorial Grávida.
- Mavilioa, A., Fernández, M., & Trivi, M. (2010). Uso de la granulometría para el estudio de patrones de speckles dinámicos. *Revista Cubana de Física*, vol. 27, pp. 34-41.
- Mennes, & al, O. e. (2018). Novel optical techniques for imaging microcirculation in the diabetic foot. *Current Pharmaceutical Design*, 24(12), 1304–1316.
- Milstein, M., & Et al. (2016). Laser speckle contrast imaging identifies ischemic areas on gastric tube reconstructions following esophagectomy. *Medicine*, 95(25), e3875.
- Mizukami, A. a. (1997). Mizukami, A. and Muramatsu, M., Correlação de speckle dinâmico produzido por espalhamento de luz por partículas num meio líquido. *XVIII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada*. Caxambu.
- Mohammad Ansari, H. C. (2016). *Online fast Biospeckle monitoring of drug action in Trypanosoma cruzi parasites by motion history image*. London: Springer-Verlag.
- Muramatsu, M. (1994). Speckle correlation used to study the oxidation process in real time. *Optics & Laser Technology*, 26(3), 167.
- Nan Lu, J. W. (2008). An Improved Motion Detection Method for Real-Time Surveillance. *IAENG International Journal of Computer Science*, 35(1).
- O.M.S. (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 ed.). (O. M. Salud, Ed.) Editorial Médica Panamericana.
- Pajuelo M, B. G. (2003). Bio-speckle assessment of bruising in fruits. *Optics and Lasers in Engineering*, 40, 13–24.
- Parthasarathy, A., & Et al. (2010). Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in humans during neurosurgery: a pilot clinical study. *Journal of Biomedical Optics*, 15(6), 066030.
- Patiño, M. (2021). *Análisis de speckle dinámico mediante filtrado por segmentación*. (D. d. Escuela de Ciencias, Ed.) Mérida, Venezuela: Tesis pregrado Universidad de los Andes.
- Pfeifer, T., Mischo, H., Ettemeyer, A., Wang, Z., & Wegner, R. (1998). Strain/stress measurements using electronic speckle pattern interferometry. *Photonics East*. Boston.
- Poirot, C., & Cherruau, B. (2005). Infertilidad masculina: Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquím Clin Latinoam*, vol. 39(nº 2), pp. 225-241.

- Rabal, H. (2005). Activity Images, Generalized Differences, Fujii's, LASCA, and Related Methods. En *Dynamic speckle and related phenomena* (págs. 115-135). New York: Taylor & Francis Group, LLC.
- Rabelo, G., Enes, A., Braga Jr, R., & Dal Fabro, I. (2011). Frequency response of biospeckle laser images of bean seeds contaminated by fungi. *Biosystems Engineering, 110*, 297–301.
- Ribeiro, K. M. (2006). *Efeito da composição nas isotermas de sorção e características do biscoito de polvilho*. Lavras: Universidade Federal de Lavras.
- Ruaro, B., & Et al. (2015). Short-term follow-up of digital ulcers by laser speckle contrast analysis in systemic sclerosis patients. *Microvascular Research, 101*, 82–85.
- Santos, J. (2023). *Método para la determinación de coeficientes de absorción y transmisión para solventes comunes mediante speckle dinámico*. Mérida: Tesis pregrado Universidad de los Andes.
- Sarabia, L., & Munuce, M. (2011). Nuevos valores para el espermiograma OMS 2010. *Rev. méd. Chile, vol. 139*(n° 4), pp. 548-549.
- Serra, J. (2002). "Aplicación de la Morfología Matemática a la telemedicina y la Biotecnología: Caracterización Morfológica de Células de sangre y Análisis de cDNA Microarrays" en *Reconocimiento de Patrones Avances y Perspectivas* (Vol. 1). (E. p. Márquez, Ed.) Centro de Investigación en Computación Instituto Politécnico de Computación México.
- Shiba, T., & et al. (2012). Pulse-wave analysis of optic nerve head circulation is significantly correlated with brachial-ankle pulse-wave velocity, carotid intima-media thickness, and age. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 250*(9), 275–281.
- Sigman, M., & Zinni, A. (2009). Semen analysis and sperm function assays: what do they mean? *Semen reprod med, vol. 27*(n° 2), pp. 115-123.
- Silva, W. A. (2005). *Elaboração e caracterização de biofilmes obtidos de diferentes fontes de amigo*. Lavras: MS degree. Universidade Federal de Lavras.
- Son, T., & et al. (2014). Continuous monitoring of arthritis in animal models using optical imaging modalities. *Biomedical Optics Express, 19*(10), 1083-3668.
- Steven, F., Griffin, M., & Chantle, E. (1982). Inhibition of human and bovine sperm acrosin by divalent metal ions. Possible role of zinc as regulator of acrosin activity. *Int J Androl, vol. 5*, pp. 401-412.
- Tamaki, Y., & et al. (1994). Noncontact, two-dimensional measurement of retinal microcirculation using laser speckle phenomenon. *Investigative Ophthalmology & Visual Science, 35*(11), 3825–3834.
- Teppa, A., & Palacios, A. (2004). Evaluación actual de la infertilidad masculina. *Investigación Clínica, vol. 45*(n° 4).

- Teppa, G., & Palacios, A. (2003). Tratamiento convencional y avanzado de la infertilidad masculina. *Reprod Hum*, vol. 3, pp. 32-40.
- Thorlabs Scientific Imaging. (2018). *DCx Camera Functional Description and SDK Manual*.
- Toro, A. (2009). Espermograma. *Medicina & Laboratorio*, vol 15, pp. 145-169.
- Uribe, J. (2008). La bioquímica del antígeno específico de próstata (AEP) y sus fracciones. *Medicina & Laboratorio*, vol. 14(N° 3-4), pp153-166.
- WHO. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human seme* (Sixth edition ed.). (W. H. Organization, Ed.)
- Xu, Z., Joenathan, C., & Khorana, B. (1995). Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens. *Optical Engineering*, 34(5), 1487–1502.
- Zhao Y, W. J. (1997). Point-wise and whole-field speckle intensity fluctuation measurements applied to botanical specimens. *Optics and Lasers in Engineering*, 28, 443-456.

www.bdigital.ula.ve

## Apéndice

### Apéndice A



Calle 42 Codazzi entre Avs.. Urdaneta y Gonzalo Picón, casa N° 3-78  
Teléfonos (00.58) 274-263.1563/263.0558

<http://www.ivic.gob.ve>

**CENTRO DE ESTUDIOS MULTIDISCIPLINARIOS DE CIENCIAS**  
**LABORATORIO DE OPTICA APLICADA**

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, \_\_\_\_\_ C.I o Pasaporte: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Nacionalidad: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_

Domiciliado en: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Siendo mayor de edad, en pleno uso de mis facultades mentales y en completo conocimiento del propósito del estudio que debajo se indica, y sin que nadie medie coacción alguna, declaro que:

1. He sido invitado a participar en el trabajo de investigación titulado "Determinación del tiempo de licuefacción del semen mediante el método de Speckel", en calidad de muestra a ser analizada en el laboratorio de Óptica Aplicada del Centro de Estudios Multidisciplinarios de Ciencias-IVIC, Mérida.
2. Para tales fines, fui debidamente informado sobre el trabajo de investigación, y se me explicó cómo sería mi participación en la investigación.
3. Bajo ninguna circunstancia participar en este estudio afecta de algún modo mi vida cotidiana.
4. Se me comunicó que mi participación consiste en donar el espécimen (semen) que será utilizado únicamente con fines investigativos.
5. Me comprometo en respetar los tiempos establecidos por los investigadores, del mismo modo, ser honesto al ofrecer los datos que se necesitan en el desarrollo de la investigación.
6. Se me informó que los datos y toda información registrada será confidencial y usada únicamente para términos investigativos, y que mi nombre será asociado a un número de muestra.

7. Estoy de acuerdo que los resultados obtenidos podrán ser utilizados en futuras publicaciones y estudios posteriores.
8. Bajo ningún concepto se me ha ofrecido, ni he recibido algún beneficio de tipo económico para mi participación en el referido estudio de investigación.
9. Mi participación es voluntaria, libre de cualquier cohesión u obligación. Están asegurados los siguientes derechos: libertad para interrumpir la participación en cualquier momento del estudio de acuerdo con mi voluntad. También es garantizada la confidencia de cualquier dato personal, así como de mi identidad.
10. Cualquier pregunta relacionada con este estudio, me será respondida oportunamente por el Bachiller Jesús Mendoza (Tesisista Cs. Física. Universidad de Los Andes) y el Dr. Carlos Leal (Jefe Laboratorio de Óptica Aplicada del IVIC) encargados de la investigación.

Después de haber leído y entendido las informaciones y aclarado mis dudas, concuerdo voluntariamente en participar de este estudio.

Firma y Cédula del participante.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Apéndice B

### Ficha por Muestra

|   |                            |                        |    |   |                         |        |  |
|---|----------------------------|------------------------|----|---|-------------------------|--------|--|
| <b>Código muestra:</b>                                  | P1                         | <b>Edad (años)</b>     | 27 | <b>Fecha:</b>                                   | 15/09/2022              |        |  |
| <b>Volumen Total Muestra colectada (V<sub>M</sub>):</b> | 4,16 mL                    |                        |    | <b>Volumen Muestra Speckle (V<sub>E</sub>):</b> | 0,5 mL                  |        |  |
|   | ≥ 1,5 < 6 mL               |                        |    |   |                         |        |  |
| <b>Ph<sub>i</sub>:</b>                                  | 7                          | <b>Ph<sub>r</sub>:</b> | 7  | <b>Tiempo (seg):</b>                            | 194                     |        |  |
| De 7,2–8 valor normal                                   |                            |                        |    |   |                         |        |  |
| <b>Temperatura Muestra (T<sub>M</sub>):</b>             | 32°C                       |                        |    | <b>Temperatura Ambiente (T<sub>A</sub>):</b>    | 32°C                    |        |  |
| <b>Viscosidad:</b>                                      | Normal                     |                        |    | <b>Viabilidad:</b>                              | ND                      |        |  |
|   | ≤2 Cm                      |                        |    |   | ≥58%                    |        |  |
| <b>Concentración por mL:</b>                            | ND                         |                        |    | <b>Concentración Total:</b>                     | ND                      |        |  |
|   | ≥15x10 <sup>6</sup> cel/mL |                        |    |   | ≥39x10 <sup>6</sup> cel |        |  |
| <b>Índice de refracción AL:</b>                         |                            |                        |    | 1,3429  | 1,3430                  | 1,3428 |  |
| <b>Índice de refracción DL:</b>                         |                            |                        |    | 1,3442  | 1,3441                  | 1,3439 |  |
| <b>Potencia Entrada:</b>                                | 7,52E-06 ± 0,05E-06 W      |                        |    |   |                         |        |  |

|   |                            |                        |    |   |                         |        |  |
|---|----------------------------|------------------------|----|---|-------------------------|--------|--|
| <b>Código muestra:</b>                                  | P2                         | <b>Edad (años)</b>     | 23 | <b>Fecha:</b>                                   | 22/9/2022               |        |  |
| <b>Volumen Total Muestra colectada (V<sub>M</sub>):</b> | 1,68 mL                    |                        |    | <b>Volumen Muestra Speckle (V<sub>E</sub>):</b> | 0,5 mL                  |        |  |
|   | ≥ 1,5 < 6 mL               |                        |    |   |                         |        |  |
| <b>Ph<sub>i</sub>:</b>                                  | 7                          | <b>Ph<sub>r</sub>:</b> | 7  | <b>Tiempo (seg):</b>                            | 256                     |        |  |
| De 7,2–8 valor normal                                   |                            |                        |    |   |                         |        |  |
| <b>Temperatura Muestra (T<sub>M</sub>):</b>             | 30 °C                      |                        |    | <b>Temperatura Ambiente (T<sub>A</sub>):</b>    | 25 °C                   |        |  |
| <b>Viscosidad:</b>                                      | Normal                     |                        |    | <b>Viabilidad:</b>                              | ND                      |        |  |
|   | ≤2 Cm                      |                        |    |   | ≥58%                    |        |  |
| <b>Concentración por mL:</b>                            | 15,6E6                     |                        |    | <b>Concentración Total:</b>                     | 9,3E6                   |        |  |
|   | ≥15x10 <sup>6</sup> cel/mL |                        |    |   | ≥39x10 <sup>6</sup> cel |        |  |
| <b>Índice de refracción AL:</b>                         |                            |                        |    | 1,3444  | 1,3443                  | 1,3443 |  |
| <b>Índice de refracción DL:</b>                         |                            |                        |    | 1,3445  | 1,3445                  | 1,3445 |  |
| <b>Potencia Entrada:</b>                                | 4,85E-06 ± 0,05E-06 W      |                        |    |   |                         |        |  |

|   |                            |                         |    |   |                         |        |  |
|---|----------------------------|-------------------------|----|---|-------------------------|--------|--|
| <b>Código muestra:</b>                                  | P3                         | <b>Edad (años)</b>      | 27 | <b>Fecha:</b>                                   | 22/9/2022               |        |  |
| <b>Volumen Total Muestra colectada (V<sub>M</sub>):</b> | 5,1 mL                     |                         |    | <b>Volumen Muestra Speckle (V<sub>E</sub>):</b> | 0,5 mL                  |        |  |
|   | ≥ 1,5 < 6 mL               |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Phi:</b>   | 7                          | <b>Phi<sub>r</sub>:</b> | 7  | <b>Tiempo (seg):</b>                            | 177                     |        |  |
| <b>De 7,2–8 valor normal</b>                            |                            |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Temperatura Muestra (T<sub>M</sub>):</b>             | 29 °C                      |                         |    | <b>Temperatura Ambiente (T<sub>A</sub>):</b>    | 25 °C                   |        |  |
| <b>Viscosidad:</b>                                      | Normal                     |                         |    | <b>Viabilidad:</b>                              | ND                      |        |  |
|   | ≤2 Cm                      |                         |    |   | ≥58%                    |        |  |
| <b>Concentración por mL:</b>                            | ND                         |                         |    | <b>Concentración Total:</b>                     | ND                      |        |  |
|   | ≥15x10 <sup>6</sup> cel/mL |                         |    |   | ≥39x10 <sup>6</sup> cel |        |  |
| <b>Índice de refracción AL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3442  | 1,3448                  | 1,3443 |  |
| <b>Índice de refracción DL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3453  | 1,3451                  | 1,3452 |  |
| <b>Potencia Entrada:</b>                                | 1,70E-06 ± 0,05E-06 W      |                         |    |   |                         |        |  |

|   |                            |                         |    |   |                         |        |  |
|---|----------------------------|-------------------------|----|---|-------------------------|--------|--|
| <b>Código muestra:</b>                                  | P4                         | <b>Edad (años)</b>      | 25 | <b>Fecha:</b>                                   | 29/9/2022               |        |  |
| <b>Volumen Total Muestra colectada (V<sub>M</sub>):</b> | 3,43 mL                    |                         |    | <b>Volumen Muestra Speckle (V<sub>E</sub>):</b> | 0,5 mL                  |        |  |
|   | ≥ 1,5 < 6 mL               |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Phi:</b>   | 8                          | <b>Phi<sub>r</sub>:</b> | 8  | <b>Tiempo (seg):</b>                            | 211                     |        |  |
| <b>De 7,2–8 valor normal</b>                            |                            |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Temperatura Muestra (T<sub>M</sub>):</b>             | 34 °C                      |                         |    | <b>Temperatura Ambiente (T<sub>A</sub>):</b>    | 25 °C                   |        |  |
| <b>Viscosidad:</b>                                      | Normal                     |                         |    | <b>Viabilidad:</b>                              | 71, 04 %                |        |  |
|   | ≤2 Cm                      |                         |    |   | ≥58%                    |        |  |
| <b>Concentración por mL:</b>                            | 20,6E <sup>6</sup>         |                         |    | <b>Concentración Total:</b>                     | 6,01E6                  |        |  |
|   | ≥15x10 <sup>6</sup> cel/mL |                         |    |   | ≥39x10 <sup>6</sup> cel |        |  |
| <b>Índice de refracción AL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3451  | 1,3449                  | 1,3450 |  |
| <b>Índice de refracción DL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3498  | 1,3498                  | 1,3498 |  |
| <b>Potencia Entrada:</b>                                | 5,04E-06 ± 0,05E-06 W      |                         |    |   |                         |        |  |

|   |                            |                         |    |   |                         |        |  |
|---|----------------------------|-------------------------|----|---|-------------------------|--------|--|
| <b>Código muestra:</b>                                  | P5                         | <b>Edad (años)</b>      | 28 | <b>Fecha:</b>                                   | 30/9/2022               |        |  |
| <b>Volumen Total Muestra colectada (V<sub>M</sub>):</b> | 1,49 mL                    |                         |    | <b>Volumen Muestra Speckle (V<sub>E</sub>):</b> | 0,5 mL                  |        |  |
|   | ≥ 1,5 < 6 mL               |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Phi:</b>   | 7                          | <b>Phi<sub>r</sub>:</b> | 7  | <b>Tiempo (seg):</b>                            | 225                     |        |  |
| <b>De 7,2–8 valor normal</b>                            |                            |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Temperatura Muestra (T<sub>M</sub>):</b>             | 30 °C                      |                         |    | <b>Temperatura Ambiente (T<sub>A</sub>):</b>    | 26 °C                   |        |  |
| <b>Viscosidad:</b>                                      | Normal                     |                         |    | <b>Viabilidad:</b>                              | 71,11 %                 |        |  |
|   | ≤2 Cm                      |                         |    |   | ≥58%                    |        |  |
| <b>Concentración por mL:</b>                            | 4,77E6                     |                         |    | <b>Concentración Total:</b>                     | 3,20E6                  |        |  |
|   | ≥15x10 <sup>6</sup> cel/mL |                         |    |   | ≥39x10 <sup>6</sup> cel |        |  |
| <b>Índice de refracción AL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3452  | 1,3459                  | 1,3461 |  |
| <b>Índice de refracción DL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3484  | 1,3484                  | 1,3484 |  |
| <b>Potencia Entrada:</b>                                | 4,83E-06 ± 0,05E-06 W      |                         |    |   |                         |        |  |

|   |                            |                         |    |   |                         |        |  |
|---|----------------------------|-------------------------|----|---|-------------------------|--------|--|
| <b>Código muestra:</b>                                  | P6                         | <b>Edad (años)</b>      | 23 | <b>Fecha:</b>                                   | 13/10/2022              |        |  |
| <b>Volumen Total Muestra colectada (V<sub>M</sub>):</b> | 4,85 mL                    |                         |    | <b>Volumen Muestra Speckle (V<sub>E</sub>):</b> | 0,5 mL                  |        |  |
|   | ≥ 1,5 < 6 mL               |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Phi:</b>   | 7                          | <b>Phi<sub>r</sub>:</b> | 7  | <b>Tiempo (seg):</b>                            | 275                     |        |  |
| <b>De 7,2–8 valor normal</b>                            |                            |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Temperatura Muestra (T<sub>M</sub>):</b>             | 31 °C                      |                         |    | <b>Temperatura Ambiente (T<sub>A</sub>):</b>    | 24 °C                   |        |  |
| <b>Viscosidad:</b>                                      | Normal                     |                         |    | <b>Viabilidad:</b>                              | 76,92 %                 |        |  |
|   | ≤2 Cm                      |                         |    |   | ≥58%                    |        |  |
| <b>Concentración por mL:</b>                            | 1,45E6                     |                         |    | <b>Concentración Total:</b>                     | 2,99E6                  |        |  |
|   | ≥15x10 <sup>6</sup> cel/mL |                         |    |   | ≥39x10 <sup>6</sup> cel |        |  |
| <b>Índice de refracción AL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3445  | 1,3463                  | 1,3470 |  |
| <b>Índice de refracción DL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3449  | 1,3449                  | 1,3449 |  |
| <b>Potencia Entrada:</b>                                | 3,60E-06 ± 0,05E-06 W      |                         |    |   |                         |        |  |

|   |                            |                         |    |   |                         |        |  |
|---|----------------------------|-------------------------|----|---|-------------------------|--------|--|
| <b>Código muestra:</b>                                  | P7                         | <b>Edad (años)</b>      | 43 | <b>Fecha:</b>                                   | 13/10/2022              |        |  |
| <b>Volumen Total Muestra colectada (V<sub>M</sub>):</b> | 5,64 mL                    |                         |    | <b>Volumen Muestra Speckle (V<sub>E</sub>):</b> | 0,5 mL                  |        |  |
|   | ≥ 1,5 < 6 mL               |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Phi:</b>   | 7                          | <b>Phi<sub>r</sub>:</b> | 7  | <b>Tiempo (seg):</b>                            | 226                     |        |  |
| <b>De 7,2–8 valor normal</b>                            |                            |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Temperatura Muestra (T<sub>M</sub>):</b>             | 31 °C                      |                         |    | <b>Temperatura Ambiente (T<sub>A</sub>):</b>    | 24 °C                   |        |  |
| <b>Viscosidad:</b>                                      | Normal                     |                         |    | <b>Viabilidad:</b>                              | 64,49 %                 |        |  |
|   | ≤2 Cm                      |                         |    |   | ≥58%                    |        |  |
| <b>Concentración por mL:</b>                            | 38,4E6                     |                         |    | <b>Concentración Total:</b>                     | 6,80E6                  |        |  |
|   | ≥15x10 <sup>6</sup> cel/mL |                         |    |   | ≥39x10 <sup>6</sup> cel |        |  |
| <b>Índice de refracción AL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3479  | 1,3480                  | 1,3480 |  |
| <b>Índice de refracción DL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3429  | 1,3431                  | 1,3433 |  |
| <b>Potencia Entrada:</b>                                | 3,55E-06 ± 0,05E-06 W      |                         |    |   |                         |        |  |

|   |                            |                         |    |   |                         |        |  |
|---|----------------------------|-------------------------|----|---|-------------------------|--------|--|
| <b>Código muestra:</b>                                  | P8                         | <b>Edad (años)</b>      | 29 | <b>Fecha:</b>                                   | 19/10/2022              |        |  |
| <b>Volumen Total Muestra colectada (V<sub>M</sub>):</b> | 2,75 mL                    |                         |    | <b>Volumen Muestra Speckle (V<sub>E</sub>):</b> | 0,5 mL                  |        |  |
|   | ≥ 1,5 < 6 mL               |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Phi:</b>   | 7                          | <b>Phi<sub>r</sub>:</b> | 8  | <b>Tiempo (seg):</b>                            | 189                     |        |  |
| <b>De 7,2–8 valor normal</b>                            |                            |                         |    |   |                         |        |  |
| <b>Temperatura Muestra (T<sub>M</sub>):</b>             | 31 °C                      |                         |    | <b>Temperatura Ambiente (T<sub>A</sub>):</b>    | 25 °C                   |        |  |
| <b>Viscosidad:</b>                                      | Normal                     |                         |    | <b>Viabilidad:</b>                              | 69,57 %                 |        |  |
|   | ≤2 Cm                      |                         |    |   | ≥58%                    |        |  |
| <b>Concentración por mL:</b>                            | 4,40E6                     |                         |    | <b>Concentración Total:</b>                     | 1,60E6                  |        |  |
|   | ≥15x10 <sup>6</sup> cel/mL |                         |    |   | ≥39x10 <sup>6</sup> cel |        |  |
| <b>Índice de refracción AL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3457  | 1,3485                  | 1,3485 |  |
| <b>Índice de refracción DL:</b>                         |                            |                         |    | 1,3472  | 1,3473                  | 1,3473 |  |
| <b>Potencia Entrada:</b>                                | 3,54E-06 ± 0,05E-06 W      |                         |    |   |                         |        |  |

|   |                            |                    |    |   |                         |        |  |
|---|----------------------------|--------------------|----|---|-------------------------|--------|--|
| <b>Código muestra:</b>                                  | P9                         | <b>Edad (años)</b> | 25 | <b>Fecha:</b>                                   | 19/10/2022              |        |  |
| <b>Volumen Total Muestra colectada (V<sub>M</sub>):</b> | 3,74 mL                    |                    |    | <b>Volumen Muestra Speckle (V<sub>E</sub>):</b> | 0,5 mL                  |        |  |
|   | ≥ 1,5 < 6 mL               |                    |    |   |                         |        |  |
| <b>Phi:</b>   | 7                          | <b>Phi:</b>        | 7  | <b>Tiempo (seg):</b>                            | 202                     |        |  |
| <b>De 7,2–8 valor normal</b>                            |                            |                    |    |   |                         |        |  |
| <b>Temperatura Muestra (T<sub>M</sub>):</b>             | 31 °C                      |                    |    | <b>Temperatura Ambiente (T<sub>A</sub>):</b>    | 25 °C                   |        |  |
| <b>Viscosidad:</b>                                      | Normal                     |                    |    | <b>Viabilidad:</b>                              | 72,73 %                 |        |  |
|   | ≤2 Cm                      |                    |    |   | ≥58%                    |        |  |
| <b>Concentración por mL:</b>                            | 24,7E6                     |                    |    | <b>Concentración Total:</b>                     | 6,60E6                  |        |  |
|   | ≥15x10 <sup>6</sup> cel/mL |                    |    |   | ≥39x10 <sup>6</sup> cel |        |  |
| <b>Índice de refracción AL:</b>                         |                            |                    |    | 1,3444  | 1,3446                  | 1,3446 |  |
| <b>Índice de refracción DL:</b>                         |                            |                    |    | 1,3466  | 1,3470                  | 1,3466 |  |
| <b>Potencia Entrada:</b>                                | 3,54E-06 ± 0,05E-06 W      |                    |    |   |                         |        |  |

|   |                            |                    |    |   |                         |        |  |
|---|----------------------------|--------------------|----|---|-------------------------|--------|--|
| <b>Código muestra:</b>                                  | P10                        | <b>Edad (años)</b> | 48 | <b>Fecha:</b>                                   | 19/10/2022              |        |  |
| <b>Volumen Total Muestra colectada (V<sub>M</sub>):</b> | 1,92 mL                    |                    |    | <b>Volumen Muestra Speckle (V<sub>E</sub>):</b> | 0,5 mL                  |        |  |
|   | ≥ 1,5 < 6 mL               |                    |    |   |                         |        |  |
| <b>Phi:</b>   | 7                          | <b>Phi:</b>        | 7  | <b>Tiempo (seg):</b>                            | 124                     |        |  |
| <b>De 7,2–8 valor normal</b>                            |                            |                    |    |   |                         |        |  |
| <b>Temperatura Muestra (T<sub>M</sub>):</b>             | 31 °C                      |                    |    | <b>Temperatura Ambiente (T<sub>A</sub>):</b>    | 25 °C                   |        |  |
| <b>Viscosidad:</b>                                      | Normal                     |                    |    | <b>Viabilidad:</b>                              | 58,33 %                 |        |  |
|   | ≤2 Cm                      |                    |    |   | ≥58%                    |        |  |
| <b>Concentración por mL:</b>                            | 2,69E6                     |                    |    | <b>Concentración Total:</b>                     | 1,40E6                  |        |  |
|   | ≥15x10 <sup>6</sup> cel/mL |                    |    |   | ≥39x10 <sup>6</sup> cel |        |  |
| <b>Índice de refracción AL:</b>                         |                            |                    |    | 1,3495  | 1,3603                  | 1,3507 |  |
| <b>Índice de refracción DL:</b>                         |                            |                    |    | 1,3534  | 1,3534                  | 1,3534 |  |
| <b>Potencia Entrada:</b>                                | 3,54E-06 ± 0,05E-06 W      |                    |    |   |                         |        |  |