

Proyecto: Determinación de la calidad de semen bovino mediante Speckle dinámico.

Tipo de proyecto: Grupal.

Instituciones participantes: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y Universidad Politécnica Territorial del Estado Mérida “Kléber Ramírez” (UPTM).

Participantes: MSc. Carlos Alberto Leal Fernández (IVIC). MSc. Eileen Maritze Pérez Santiago (IVIC) y Lic. Adriana Elizabeth García Pineda (UPTM).

Responsable: MSc. Carlos Alberto Leal Fernández (IVIC).

Ubicación Geográfica: Municipios Campo Elías, Andrés Bello y Sucre del Estado Mérida (ganadería de Altura).

Planteamiento del problema

Para aumentar la eficiencia de la producción y la calidad del ganado vacuno, es necesario desarrollar nuevas técnicas de análisis espermático, con el fin de conocer la capacidad reproductiva de cada toro. Predecir la fertilidad de un animal, es un proceso muy complejo, debido a la gran cantidad de variables que intervienen, siendo las más importantes la concentración, motilidad, viabilidad y la morfología (1). En la actualidad no existe un análisis ideal que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal, por lo que se plantea el uso del Speckle dinámico para evaluar la calidad espermática, implementando nuevos métodos de análisis más eficientes, con el potencial de predecir la fertilidad de un animal, siendo esta una técnica eficaz en la determinación de concentración y motilidad en bacterias, empleando una fuente de luz y sin reactivos (2; 3), y en la evaluación solo de la motilidad espermática en ganado vacuno (4; 5).

Antecedentes

Carvalho, Barreto y colaboradores (2008), emplean el Biospeckle con estadística de segundo orden, encontrando una correlación entre el momento de inercia y la velocidad del espermatozoide, planteándolo como un método viable para la determinación de la motilidad de semen bovino empleado en inseminación artificial (4), corroborando estos resultados Carvalho, Rossi y colaboradores (2019), empleando dos longitudes diferentes de onda (5). Ansari, Grassi y colaboradores (2016), emplean el biospeckle para monitorear en tiempo real la acción de parásitos de *T. Cruzi*, demostrando que a través de un procesamiento diferente (historia de imagen en movimiento) los cambios en la motilidad de las bacterias en un periodo prolongado de tiempo,

siendo estos cambios en la motilidad relacionada con la concentración del fármaco empleado (3; 2). Todos estos montajes experimentales son por reflexión del láser, por lo que se plantea una variante en el montaje experimental utilizando speckle dinámico por transmisión y los métodos de nuevos procesamiento.

Justificación

Entre las biotecnologías aplicadas a la reproducción, la inseminación artificial (IA) ha demostrado ser la herramienta más exitosa para la mejora genética de los animales de importancia zootécnica, especialmente en la industria bovina (6). Un sistema ganadero eficiente requiere de una alta eficiencia reproductiva. En este sentido, una vez cubiertos los requerimientos nutricionales y sanitarios fundamentales de los reproductores, la IA se convierte en una herramienta útil para mejorar la rentabilidad de estos sistemas, ya que facilita y aumenta la distribución de genes de alto valor en los programas de mejora genética (7). El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino, por lo que el desarrollo de nuevas técnicas de análisis es fundamental para la ampliación y mejora del rebaño nacional.

Objetivo General

Desarrollar un método por Biospeckle dinámico para la determinación de la calidad de semen bovino empleado en inseminación artificial en los Municipios Campo Elías, Andrés Bello y Sucre del Estado Mérida (ganadería de Altura).

Objetivos específicos

1. Evaluar la relación funcional entre los cambios en los patrones del Speckle dinámico y su correlación con la concentración espermática, por diversos métodos de análisis.
2. Evaluar la relación funcional entre los cambios en los patrones del Speckle dinámico y su correlación con la motilidad espermática, por diversos métodos de análisis.
3. Evaluar la relación funcional entre los cambios en las características granulométricas del patrón de Speckle dinámico y su correlación con la morfología espermática.
4. Determinar la correlación entre los parámetros evaluados por Speckle dinámico con la capacidad de fecundación.
5. Diseñar y validar un dispositivo de Speckle dinámico portátil para análisis de campo.

Metodología

El montaje experimental consiste en tres haces de luz colineales, con una longitud de onda de 447 nm (azul), 532 nm (verde) y 660 nm (rojo), acoplados a un microscopio óptico (ver Figura 1-a),

durante el recorrido de los haces de luz se coloca un difusor para crear el patrón de interferencia inicial, luego esta atraviesa la muestra, y es captado por un objetivo y un ocular, para ser grabado los cambios en el patrón de interferencia con una cámara CCD (charge-coupled device) (ver Figura 1-b). Siendo un montaje de speckle por transmisión y subjetivo formando un patrón como se muestra en la (ver Figura 1-c). Este montaje tiene la característica de permitir el uso de varias longitudes de ondas, utilizando los equipos que están en la Tabla 1, estas puede ser utilizadas independientemente y todas a la vez, permitiendo ampliar los métodos de análisis a ser empleados.

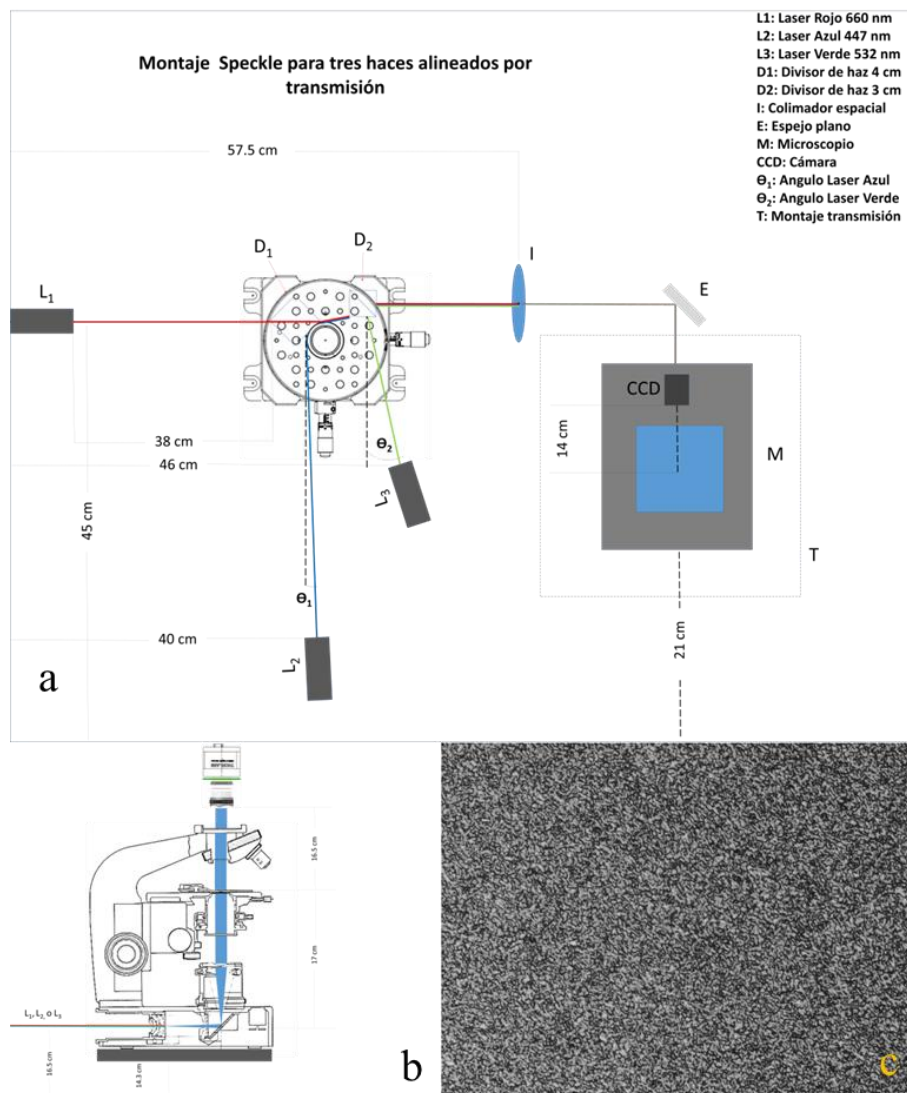


Figura 1. Montaje experimental. a) Arregle de láseres b) Recorrido del haz en el microscopio c) Patrón de Speckle.

Tabla 1. Equipos empleados para la recolección de los datos.

Equipo	Marca	Modelo	Observación
Laser Rojo	DPSS L DRIVER	MRL-III	Longitud de onda 660 nm, con potencia variable hasta 1W.
Laser Azul	PSU-H-LED	OEM-SD	Longitud de onda 447 nm, con potencia variable hasta 3w.
Laser Verde	PSU-H-LED	MGL-F	Longitud de onda 532 nm, con potencia variable hasta 3w.
Microscopia	Nikon	S-Kt	Con objetivos de 4,10,40X
Cámara CCD	Thorlab	D1024G13C	-----
Divisor de haz	-----	-----	4 cm
Divisor de haz	-----	-----	3 cm
Bases y soportes varios	-----	-----	-----
Mesa óptica	Thorlab	590250-364831	-----
Microscopio	Olympus	CH	-----
Espectrómetro	Ocean Optics	USB2000	-----
Balanza analítica	Ohaus	AR2140	-----

Los métodos de análisis a ser utilizados son dos, un a través de la evaluación de las diferencias temporales, el cual consiste en la selección de un intervalo de N fotogramas, empleando la Ecuación 1, para obtener el valor promedio del pixel $D(\tau)$ (ver Figura 2), este procedimiento se repite hasta completar el total de fotogramas del video, permitiendo la obtención de la curva de variación de la intensidad del pixel medio en función del tiempo

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

Ecuación 1. Método de las diferencias temporales.

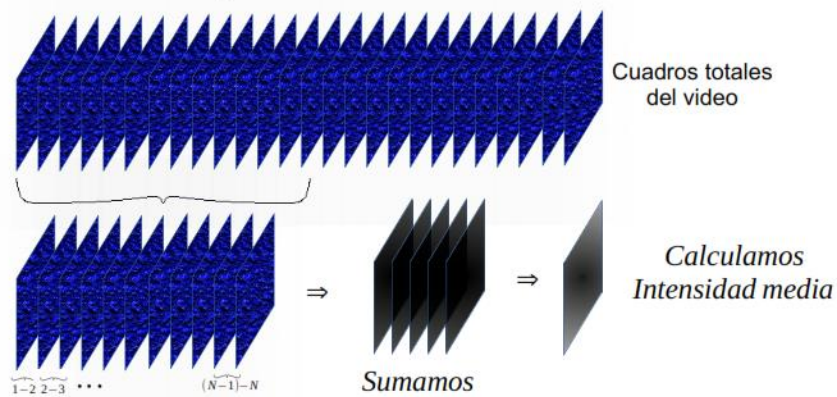


Figura 2. Método de las diferencias temporales.

La relación entre la concentración de los espermatozoides está directamente relacionada con la $D(\tau)$, como se puede observar en el trabajo de Grassi y colaboradores (2016) (8), por lo que se espera que el máximo de esta función esté relacionado con la concentración espermática (Objetivo 1). Se espera que esta función será de tipo gaussiano, y que el cambio de $D(\tau)$ en función del tiempo esté relacionada con la motilidad (Objetivo 2). Los cambios de la motilidad ha sido estudiado en bacterias en los trabajos de Anzari y colaboradores (2016) (2; 3) y de Carvalho y colaboradores (2008 y 2019) (4; 5), siendo una técnica eficaz para este tipo de análisis.

El segundo método de análisis es por morfologías matemáticas, para determinar la distribución de tamaño medio del grano de speckle, empleando un código desarrollado en Matlab, en el cual se puede determinar, el número de motas, el área, diámetro equivalente, semi eje mayor y menor, Angulo, excentricidad entre otras, nos puede permitir la caracterización morfológica de los espermatozoides (objetivo 3). Este método desarrollado Carlos Leal del Laboratorio de Óptica Aplicada del IVIC y se encuentra en proceso de publicación. Los métodos de procesamiento se realizan mediante programas desarrollados en Matlab (ver Figura 3).

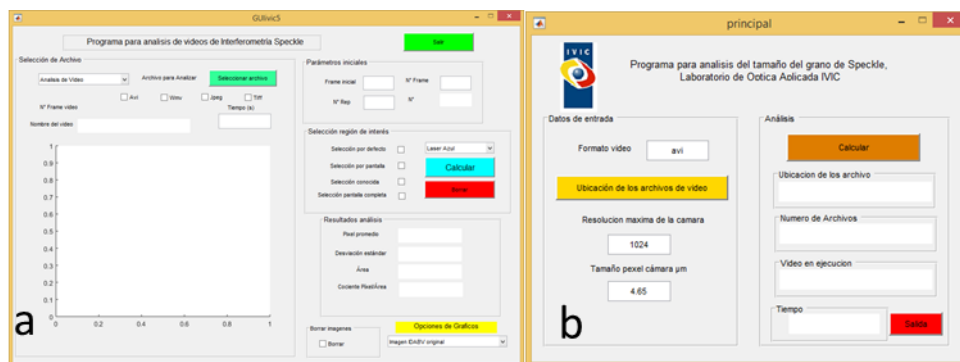


Figura 3. Programas diseñados para el análisis de las imágenes. a) Método de las diferencias temporales b) Granulometría.

Las muestras de semen son recolectadas a través del método de la vagina artificial, manteniendo las condiciones sanitarias requerida, para evitar la contaminación de las muestras, protegiéndolo de la luz solar directa procediendo, midiendo el volumen, peso y Ph de la muestra, luego trasladando la muestra al laboratorio de Óptica Aplicada (LOA) del IVIC, manteniendo una temperatura de 37° y comenzando los análisis dentro de la primera hora posterior a la eyaculación. Posteriormente se realizan en paralelo las pruebas con el speckle dinámico y los ensayos estándares para la determinación de concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides, mediante el uso de programa OpenCasa (open-access computer assisted sperm analysis).

Para las pruebas con el speckle dinámico se utilizará un volumen de 20 μ L de semen, sin dilución, posterior al proceso de licuefacción, a temperatura ambiente, siendo iluminados por la luz láser (la longitud de onda a ser empleada esta por ser determinada ya que se cuenta con 3, seleccionando la que de los mejores resultados) y adquiriendo videos hasta que se observe cambios en el patrón de interferencia, esto con la finalidad de obtener las curvas de calibración para la estandarización del procedimiento. Todos los ensayos con speckle dinámico son contratados con pruebas estándares, para la determinación de la concentración a través del conteo por campo en una rejilla de Neubauer y espectrofotometría para determinar la absorbancia, y pruebas en el microscopio para la determinación de la motilidad y morfología, como se establece en los protocolos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (9). Una vez estandarizado el método se determina el protocolo para seleccionar los tiempos de requerido para la realización del análisis posterior a la eyaculación y el tiempo de adquisición del video.

Posteriormente al determinar y caracterizar en el laboratorio los parámetros de interés, se procede a las pruebas de campo, realizando el análisis de una muestra de al menos 21 eyaculando de la misma raza, procedentes de fincas ganaderas de los Municipios Campo Elías, Andrés Bello y Sucre del Estado Mérida (ganadería de Altura), motivado a la cercanía a las instalaciones del LOA. Se procede a realizar pruebas de estadísticas no paramétricas para determinar la correlación entre los datos obtenidos por el método propuesto y la capacidad de fecundación de las muestras (Objetivo 4). Con la finalidad de validar la técnica de análisis propuesta.

Finalmente en caso de que la técnica sea exitosa, se procederá al desarrollo y validación de un sistema de medición portátil, de bajo costo, para realizar los ensayos directamente en el campo, utilizando un sistema de apuntador láser y una cámara web, realizando la comparación entre los resultados obtenidos con los equipos del laboratorio con este dispositivo, con los mismos métodos de análisis (Objetivo 5).

Cronograma de actividades

Fecha de Inicio del proyecto 04-11-19.

Fecha de finalización del proyecto 04-11-2020.

Actividad	1° trimestre	2° trimestre	3° trimestre	4° trimestre
Evaluar la relación funcional entre los cambios en los patrones del Speckle dinámico y su correlación con la concentración espermática, por diversos métodos de análisis	Inicio: 04-11-2019, fin: 06-01-2020			
Evaluar la relación funcional entre los cambios en los patrones del Speckle dinámico y su correlación con la motilidad espermática, por diversos métodos de análisis.	Inicio: 04-11-2019, fin: 06-01-			

	2020			
Evaluar la relación funcional entre los cambios en las características granulométricas del patrón de Speckle dinámico y su correlación con la morfología espermática.	Inicio: 04-11-2019, fin: 06-01-2020			
Determinar la correlación entre los parámetros evaluados por Speckle dinámico con la capacidad de fecundación.		Inicio: 06-01-2020	fin: 08-06-2020	
Diseñar y validar un dispositivo de Speckle dinámico portátil para análisis de campo.				Inicio 08-06-2020, fin: 04-11-2020.

Resultados esperados y usuarios de los mismos

Realizando el análisis en el por el métodos de diferencias temporales, se espera determinar los cambios del patrón de interferencia en función del tiempo, este comportamiento debe ser del tipo gaussiano y la relación con el máximo de intensidad debe estar relacionado con la concentración espermático y la primera derivada con la motilidad. La morfología se pretende evaluar a través del análisis granulométrico del patrón, relacionándola con el tamaño medio del grano. Estos tres parámetros se estima que deben estar relacionados estadísticamente con el éxito en la fecundación, comparando este método con las técnicas tradicionales. Al finalizar la fase experimental en el LOA, se diseñara un dispositivo móvil de bajo costo, para que pueda ser empleado en el campo directamente por el productor, suministrándoles las herramientas necesarias para el análisis. Este tecnología puede beneficiar a los productores bovinos de las 26 fincas con 1258 vacas (según la Asociación de ganaderos zona alta del estado Mérida), permitiendo las mejoras genéticas del rebaño, siendo extensivo a los productores del país, a través de la incorporación de nuevas tecnologías aplicadas al sector productivo, de bajos insumos, permitiendo incrementar la producción agropecuaria.

Bibliografía

1. *El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros.* **Quintero Moreno, Armando, Mayorga-Torres, José Manuel y Cardona Maya, Walter.** 1, January-June de 2017, Journal of Veterinary Andrology, Vol. 2, págs. 30-37.
2. *Real time monitoring of drug action on T. cruzi parasites using a biospeckle laser method.* **Ansari, M Z, y otros, y otros.** 29 de April de 2016, Laser Phys, Vol. 26. doi:10.1088/1054-660X/26/6/065603.
3. *Online fast Biospeckle monitoring of drug action in Trypanosomacruzi parasites by motion history image.* **Ansari, Mohammad Zaheer, et al., et al.** June 27, 2016, Lasers Med Sci. DOI 10.1007/s10103-016-2008-6.

4. *Motility parameters assessment of bovine frozen semen by biospeckle laser (BSL) system.*

Carvalho, Pablo H.A., y otros, y otros. 31-35, 25 de november de 2008, biosystems engineering. doi:10.1016/j.biosystemseng.2008.09.025.

5. *Bovine Frozen Semen Motility Analysis Using Two Different Laser Wavelengths.* **Carvalho, PHA, y otros, y otros.** 17 de May de 2019, Advances in Biochemistry and Biotechnology. DOI: 10.29011/2574-7258.001087.

6. *Análisis del semen bovino.* **HIDALGO ORDÓÑEZ, CARLOS OLEGARIO , TAMARGO MIGUEL, CAROLINA y DÍEZ MONFORT, CARMEN.** 2, 2005, Boletín informativo del SERIDA.

7. **Tamayo Torres, Manuel.** Variación de la calidad del semen desde el centro de inseminación artificial hasta los termos de la granja e inseminador. *engormix.com*. [En línea] 08 de febrero de 2013. [Citado el: 2019 de agosto de 2019.] <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/variacion-calidad-semen-desde-t29861.htm>.

8. *Quantitative Laser Biospeckle Method for the Evaluation of the Activity of Trypanosoma cruzi Using VDRL Plates and Digital Analysis.* **Grassi, HildaCristina, y otros, y otros.** 5 de November de 2016, Plos. DOI:10.1371/journal.pntd.0005169.

9. **Organización Mundial de la Salud.** *Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical.* Cuarta Edición. Madrid : Editorial Medica Panamericana, 2001.

Plan de inversión

Tabla 2. Plan de inversión. Materiales y suministros, servicios y equipos.

	Descripción	Cantidad	Monto Bs.	Desagregación
Materiales y suministro	Papel tamaño carta	2 resmas	200.000	2° semestre
	Tóner impresora HP	2	400.000	2° semestre
	Porta Objetos	2 cajas de 50 unidades	100.000	1° mes
	Cubre Objetos	2 cajas de 50 unidades	50.000	1° mes
	Guantes	2 Cajas	100.000	1° mes
	Puntas Micropipeta	2 paquetes de 100 unidades	1.000.000	1° mes
	Tubos Eppendorf	2 paquetes de 100 unidades	1.000.000	1° mes
	Cauchos 265/70/R16	6	13.800.000	1° mes
	Aceite mineral 20/50	20 litros	2.000.000	1° mes
	Liga de frenos	20 litros	1.000.000	1° mes
	Alternado Toyota Samurai	1	6.000.000	1° mes

Sub-Total Materiales y Suministros			25.650.000	
Servicios	Servicios profesionales	Becas para 2 estudiantes 50.000 Bs mensual	12.000.000	6.000.000 1° semestre y 6.000.000 2° semestre
Sub-Total Servicios			12.000.000	
Equipos	Punteros laser	5	1.000.000	2° semestre
	Webcam	5	2.500.000	2° semestre
	Rejilla Neubauer	1	2.000.000	1° mes
	Micropipeta automática 2-20 microlitros	1	7.000.000	1° mes
	Medidor de Ph digital	1	1.500.000	1° mes
	Mufla	1	11.000.000	1° mes
Sub-Total Equipos			25.000.000	
Monto Total Proyecto			62.650.000	

Tabla 3. Plan de inversión por trimestres.

	1° semestre	2° semestre	3° semestre	4° semestre
Materiales y suministro	25.050.000		600.000	
Servicios		6.000.000		6.000.000
Equipos	21.500.000		3.500.000	
Total	46.550.000	6.000.000	4.100.000	6.000.000