

# Evaluación asistida por computador de la viabilidad espermática en humanos

Edgar Roa Guerrero<sup>1,✉</sup>, Fabian Cortés Mancera<sup>1</sup>, Neil Guerrero González<sup>2</sup>,  
Walter Cardona Maya<sup>3</sup>, Luis Morantes Guzmán<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Grupo de Investigación e Innovación Biomédica-SINERGIA. Instituto Tecnológico Metropolitano - ITM, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Telecomunicaciones Aplicadas – GITA, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Grupo Reproducción, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>4</sup> Grupo de Investigación en Automática y Electrónica, Instituto Tecnológico Metropolitano - ITM, Medellín, Colombia.

Recibido 14 de junio de 2012. Aprobado 30 de noviembre de 2012

COMPUTER-ASSISTED EVALUATION OF SPERM VITALITY IN HUMANS

---

**Resumen** — En la actualidad una de cada seis parejas presenta problemas de fertilidad y en el 50% de los casos se debe al factor masculino. A la fecha, el análisis seminal es la única prueba que permite determinar el potencial fértil de un hombre. Entre otros parámetros, la viabilidad espermática es evaluada manualmente presentando una variabilidad debido a la subjetividad producida por la fatiga ocular del experto. El propósito de este trabajo fue desarrollar y validar experimentalmente una herramienta computacional flexible, programable y modular basada en el procesamiento digital de imágenes, para la identificación y clasificación de espermatozoides humanos en una muestra seminal. Las regiones fueron extraídas mediante la técnica de análisis discriminante de Fisher y su clasificación se realizó a través del análisis de agrupamiento y particularmente la técnica de K-medias. Los resultados obtenidos muestran 87,9% de exactitud en la identificación de los espermatozoides vivos y los espermatozoides muertos, 93,4% de efectividad para detectar espermatozoides vivos y 76% de efectividad para detectar los espermatozoides muertos, a partir de un conjunto de 110 imágenes obtenidas de 14 individuos, en comparación con el análisis manual acorde a los procedimientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud. La herramienta computacional mostrada aquí contribuye al análisis objetivo de espermatozoides humanos, convirtiéndose en una alternativa a los costosos sistemas comerciales de análisis seminal asistido por computador.

**Palabras clave** — Discriminante de fisher, Espermatozoide, Espermograma, Procesamiento de imágenes, Viabilidad espermática.

**Abstract** — Currently one out of six couples present fertility problems, with 50% of the cases being due to the male. Until now, seminal fluid analysis is the only test that evaluates a male's fertility potential. Among other parameters, sperm viability is manually assessed, which contributes to high data variability as a result of expert subjectivity and eye-fatigue. The purpose of the present study was to develop and experimentally validate a flexible, programmable and modular-based computational tool for digital image processing, identification and classification of human sperm in a semen sample. The regions were extracted using Fisher discriminant analysis and classification methods by cluster analysis and particularly the K-means technique. The results show 87.9% accuracy in identifying living and dead sperm, 93.4% effectiveness in detecting live sperm and 76% effectiveness in detecting dead sperm, from a set of 110 images obtained from 14 individuals, compared with manual analysis according to the procedures established by the World Health Organization. This computational tool contributes to the objective analysis of human sperm, becoming an alternative to expensive commercial systems for computer-assisted semen analysis

**Keywords** — Fisher discriminant, Sperm, Semen examination, Image processing, Sperm vitality.

---

✉ Dirección para correspondencia: msc.edgar.roa@hotmail.es, reproducción@medicina.udea.edu.co.

## I. INTRODUCCIÓN

La infertilidad es una condición que afecta a una de cada seis parejas y en el 50% de los casos se debe al factor masculino, generalmente debido a la disminución en la cantidad y calidad de los espermatozoides. El espermograma es el único examen paraclínico que brinda una visión de la capacidad reproductiva del hombre [1]. En éste se evalúan los aspectos físicos del semen, como el volumen, el pH, la viscosidad, el color y los aspectos celulares del espermatozoide como la concentración, la movilidad, la morfología y la viabilidad [2,3].

La evaluación de los parámetros seminales asistidos por computador se ha popularizado, debido a la rapidez, confiabilidad y repetitividad que ofrecen para identificar espermatozoides en imágenes [4-6]. Los sistemas comerciales de análisis asistido por computador (CASA), ofrecen alta precisión en el análisis de los parámetros espermáticos, reproducibilidad en los resultados, fiabilidad en las medidas de las variables y mayor rapidez en los análisis [7,8]. Sin embargo, los sistemas CASA presentan un alto costo lo cual limita su incursión en el mercado. Debido a esto, el análisis seminal [9], se continúa realizando mediante una inspección visual por parte del personal especializado en laboratorios, clínicas y centros de reproducción.

Como consecuencia de la gran cantidad de campos visuales que deben ser analizados en el microscopio para identificar la viabilidad espermática diferenciando los espermatozoides vivos y los espermatozoides muertos, las medidas de confiabilidad tienden a disminuir y a variar entre observadores en función del número de observaciones por día. Por esta razón, las técnicas de procesamiento digital de imágenes surgen como una propuesta prometedora para soportar diagnósticos clínicos del espermograma y unificar los criterios de análisis de las imágenes microscópicas por parte de los expertos [10]. La digitalización de las imágenes con información del líquido seminal, permiten el empleo de diversas metodologías para la caracterización de los parámetros espermáticos, utilizando recursos computacionales que posibilitan mediciones más precisas y con menor variabilidad inter- e intralaboratorios [11].

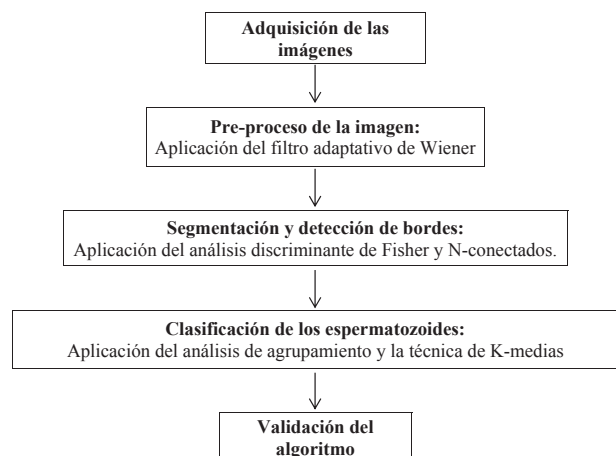
En muchos países, incluido Colombia, a pesar de la importancia y las ventajas de la medición de los parámetros seminales, ésta continúa siendo realizada de forma manual [12,13]. En el caso particular de la viabilidad espermática, según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el técnico experto realiza una inspección visual de al menos 200 espermatozoides en diferentes campos visuales de la imagen microscópica [14], sin embargo esta evaluación

puede no ser lo suficientemente confiable, dado el grado de subjetividad operador-gradiente en la determinación [15]. En el presente artículo se reporta el diseño y la validación experimental de un algoritmo de segmentación y clasificación de espermatozoides vivos y muertos en imágenes microscópicas de muestras seminales.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Evaluación de la viabilidad espermática*

En la primera etapa de la herramienta computacional se construyó la base de datos de imágenes que contiene información característica de los espermatozoides vivos y muertos, seleccionados a partir de imágenes microscópicas de una muestra seminal. La segunda etapa consistió en el tratamiento y remoción de los efectos indeseados (ruido) producidos por distorsiones asociadas con la toma de las imágenes, como irregularidades y cambios en las condiciones de iluminación, así como la penetración de los colorantes utilizados en la preparación de la muestra seminal. La tercera etapa se basó en la identificación y segmentación automática de los objetos de interés, espermatozoides vivos y espermatozoides muertos, a partir de la aplicación de técnicas de procesamiento digital de imágenes que serán descritas a continuación. La cuarta etapa consistió en la clasificación de cada una de las regiones como espermatozoide vivo o muerto. Finalmente, la herramienta computacional extrae las características más relevantes de los objetos identificados dentro de la imagen seminal, tales como el color y el área para el cálculo de los parámetros de viabilidad espermática. A continuación se describen los módulos que componen la herramienta (Fig. 1).



**Fig. 1.** Metodología propuesta para la identificación y extracción de espermatozoides vivos y espermatozoides muertos, mediante la herramienta computacional.

### 1. Preparación de las muestras

Para la visualización diferencial de los espermatozoides fue utilizado el colorante vital Eosina-Y 0,5% (IHR Diagnóstica®, Colombia), debido a que permite distinguir más fácilmente un espermatozoide vivo de uno muerto a través de la diferencia en las tonalidades, en comparación con otros colorantes como el azul de tripano. Para esto, fueron mezclados 10µL de la muestra de semen y 10µL del colorante vital Eosina-Y; una vez hecho el montaje lámina-laminilla, se siguieron las recomendaciones establecidas por el manual para el análisis seminal de la OMS [9] previamente estandarizadas en el laboratorio del Grupo Reproducción [16]. Los espermatozoides muertos obedecen a aquellos teñidos de rojo mientras que los espermatozoides vivos permanecen incoloros.

### 2. Parametrización de las imágenes

#### Adquisición de imágenes

El sistema fue equipado con un microscopio de luz normal (Eclipse-Nikon) con objetivo de 40x, ocular de 10x, cámara digital Nikon con resolución de 1280x960 píxeles y equipado con 3 filtros: filtro para la luz halógena, filtro azul que corrige el amarilleo de la luz halógena y filtro gris para reducir la intensidad de la luz del día. De esta manera, 110 imágenes fueron tomadas directamente en el espacio del color RGB (Red, Green, Blue), en laboratorios de bioseguridad tipo II (Grupo Reproducción, Universidad de Antioquia UdeA y SINERGIA, Instituto Tecnológico Metropolitano ITM).

En la adquisición de las imágenes se observó que los fondos varían levemente entre muestras seminales, aunque fuesen tomadas bajo condiciones similares; este efecto puede explicarse por las condiciones de iluminación y la composición química de la muestra (Fig.2).

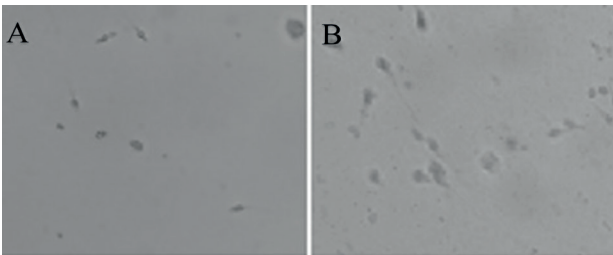


Fig. 2. A) Imagen original individuo 1 tomada con objetivo de 40x. B) Imagen original individuo 2 tomada con objetivo de 40x.

#### Proceso de filtrado: Aplicación del filtro adaptativo de Wiener.

Este paso fue realizado con el fin de suavizar la imagen disminuyendo la cantidad de variaciones de intensidad en las regiones pertenecientes a los espermatozoides,

reduciendo el ruido en aquellos píxeles cuyo nivel de intensidad es muy diferente al de sus vecinos, realzando y detectando los bordes de las regiones que representan las cabezas de los espermatozoides vivos y espermatozoides muertos, e identificando los píxeles donde se produce un cambio brusco en la intensidad del color. Durante este trabajo se realizaron pruebas con el filtro adaptativo de Wiener el cual minimiza el efecto de objetos indeseados en la imagen microscópica, según las características de la imagen dentro de la región del filtro definida por la ventana rectangular de tamaño NxM [17]. El filtro identifica la media y la varianza de los píxeles definidos por la ventana NxM, de acuerdo a (1) y (2).

$$\mu = \frac{1}{N*M} \sum_{n_1 n_2 \in n} a(n_1, n_2) \quad (1)$$

$$\sigma^2 = \frac{1}{N*M} \sum_{n_1 n_2 \in n} a^2(n_1, n_2) - \mu^2 \quad (2)$$

donde  $n$ , son todos los píxeles definidos por la ventana  $N*M$ .

Los parámetros del filtro se recalculan para cada uno de los píxeles en función del histograma, con una ventana definida de 5x5, permitiendo homogenizar la imagen, remover el ruido ocasionado por los artefactos, células o cristales presentes en las imágenes microscópicas de muestras seminales y posibilitando efectuar operaciones de procesado sobre ella, creando cada píxel empleando (3).

$$b(n_1, n_2) = \mu + \frac{\sigma^2 - u^2}{\sigma^2} (a(n_1, n_2) - \mu^2) \quad (3)$$

donde  $u^2$  es la varianza del ruido,  $\mu$  y  $\sigma^2$  son la media y la varianza de los píxeles definidos por la ventana  $N*M$  respectivamente.

### 3. Segmentación y detección de bordes: Aplicación del análisis discriminante de Fisher y el criterio de los píxeles N-conectados

Para la clasificación de los espermatozoides fueron probadas las técnicas de análisis discriminante lineal y el análisis discriminante lineal de Fisher [18]. Se utilizó el análisis discriminante lineal de Fisher el cual permite separar las regiones de interés minimizando la varianza intra clases y maximizando la varianza entre clases. Las clases son el conjunto de puntos (entendiéndose por punto a las componentes de color RGB de cada píxel en una imagen) pertenecientes a espermatozoides vivos y a espermatozoides muertos y el conjunto de puntos pertenecientes al fondo de las imágenes. El discriminante de Fisher es calculado maximizando la función objetivo en (4).

$$J(W) = \frac{W^T \cdot S_B \cdot W}{W^T \cdot S_w \cdot W} \quad (4)$$

Donde  $W$  es la dirección del vector discriminante,  $S_B$  es la matriz de dispersión inter-clase y  $S_w$  es la matriz de dispersión intra-clase como se describen en (5) y (6).

$$S_B = \sum_c N_c \cdot (\mu_c - \mu) (\mu_c - \mu)^T \quad (5)$$

$$S_w = \sum_c \sum_{i \in c} (x_i - \mu_c) \cdot (x_i - \mu_c)^T \quad (6)$$

Siendo  $\mu_c$  la media de cada clase,  $\mu$  la media de todos los datos y  $N_c$  la cantidad de patrones de la clase  $c$ . El método determina a través de las características de cada clase los píxeles de fondo y los elimina de las imágenes [18,19].

Con el fin de separar los espermatozoides vivos y los espermatozoides muertos del fondo de las imágenes, se identificaron las características de los espermatozoides vivos, espermatozoides muertos y el fondo de las imágenes a través de los puntos (componentes de color RGB) pertenecientes a cada clase tomados en diferentes imágenes:

**Clase 1:** Espermatozoides vivos y muertos. Se tomaron 100 puntos pertenecientes a las componentes de color RGB de diferentes imágenes.

**Clase 2:** Fondo de las imágenes. Se tomaron 100 puntos pertenecientes a las componentes de color RGB de diferentes imágenes.

Una vez extraídas de las imágenes las regiones pertenecientes a los espermatozoides vivos y muertos. Posteriormente, se identificaron los bordes en la imagen, los cuales se pueden definir como transiciones entre dos regiones de niveles de gris significativamente distintos.

Para determinar el número de elementos (agrupaciones bajo criterios de conectividad de 4 o 8 píxeles) presentes en cada micrografía, se procedió a establecer los límites de los objetos mediante la detección de bordes a partir del operador de Canny [20], con el fin de hacer la cuantificación de los espermatozoides vivos (sin coloración) y muertos (teñidos con el colorante), asignando a cada píxel perteneciente a un determinado objeto su respectiva etiqueta, permitiendo extraer de esta manera todas las posibles regiones de espermatozoides vivos y espermatozoides muertos que se encuentren en el rango seleccionado para áreas de las cabezas entre 70 y 150 píxeles.

#### 4. Caracterización y clasificación de los espermatozoides: Aplicación del análisis de agrupamiento, técnica K-medias

Luego de extraer las regiones de espermatozoides sobre la imagen original RGB, se procedió a clasificar los espermatozoides mediante la aplicación de técnicas de agrupamiento y particularmente la técnica de K-medias, debido a que tiene un significado gráfico y estadístico inmediato. La suma de las discrepancias entre cada píxel de la imagen y el centroide de las clases, expresado a través de la distancia apropiada, se usa como función objetivo, con el fin de solucionar el problema de la distribución no uniforme de los espermatozoides en la imagen. Luego, se determinan las distancias de todos los píxeles segmentados en la imagen, con respecto a cada centroide. Finalmente se asigna cada píxel a la clase cuya distancia euclidiana en el espacio de color RGB sea la mínima [21].

#### 5. Validación del algoritmo propuesto

Con el fin de evaluar la metodología asistida de análisis de la viabilidad espermática, el algoritmo implementado en MATLAB fue aplicado a diferentes imágenes espermáticas teñidas con el colorante eosina-Y 0,5%; se realizó en muestras con filancia y detritos, y también en pre-tratadas para disminuir este tipo de artefactos. Para determinar el nivel de correlación, los resultados obtenidos fueron comparados con los reportados por un experto que evaluó de manera manual la viabilidad espermática en 14 individuos entre 20 y 35 años de edad de la ciudad de Medellín, Colombia, siguiendo los parámetros estipulados por la OMS. Como control de esta evaluación se utilizaron muestras espermáticas sin teñir.

La herramienta computacional fue validada mediante la técnica de validación cruzada y "Bootstrapping", con el fin de encontrar la probabilidad para identificar los espermatozoides vivos y los espermatozoides muertos a partir de la información en el espacio del color RGB y en escala de grises. Fueron utilizadas las clases 3 y 4 que representan la información característica de los espermatozoides.

**Clase 3:** Espermatozoides vivos. Se tomaron 1020 puntos en el espacio del color RGB, a partir de las imágenes de los diferentes individuos.

**Clase 4:** Espermatozoides muertos. Se tomaron 1020 puntos en el espacio del color RGB, a partir de las imágenes de los diferentes individuos.

Para definir las clases fueron seleccionados 9 puntos en promedio de cada imagen de 110 en total, que representan el 4,5% de los espermatozoides que deben ser analizados por muestra.

Finalmente, se realizó una comparación entre la medida manual y el algoritmo implementado con el fin de encontrar a partir de la matriz de confusión la exactitud que presentó la herramienta computacional para clasificar los espermatozoides.

### III. RESULTADOS

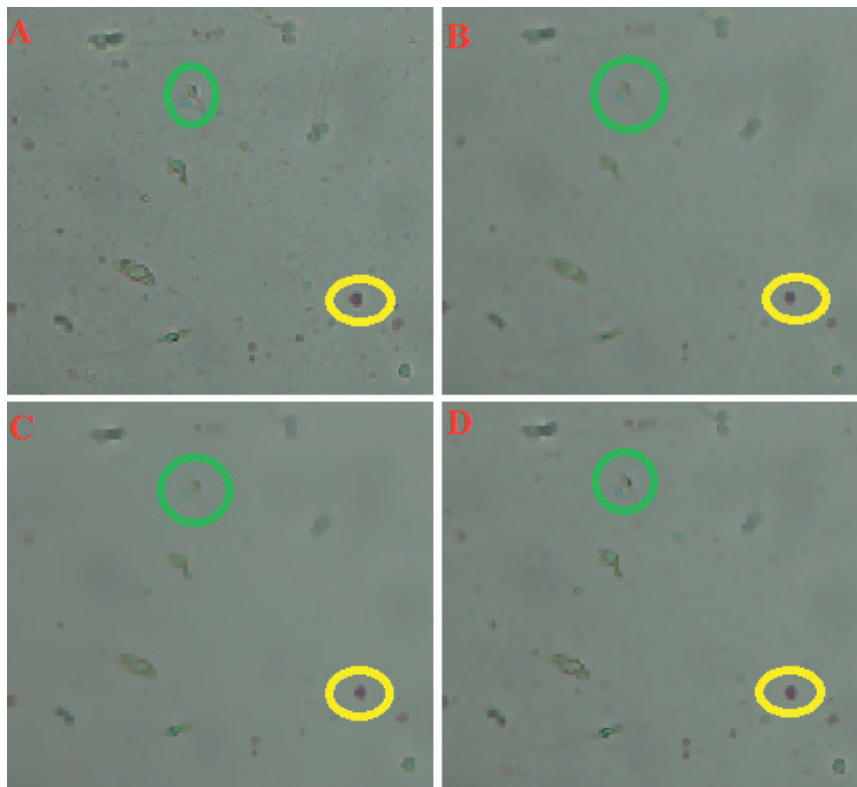
#### *Generación del algoritmo de evaluación de la viabilidad espermática*

Con el fin de generar una metodología para la evaluación asistida por computador de la viabilidad espermática y previo al desarrollo del algoritmo se analizaron múltiples imágenes de una muestra seminal previamente teñida con el colorante Eosina-Y, pero sin tratamiento previo para disminuir artefactos como la presencia de poblaciones celulares diferentes o de detritos celulares. La primera etapa probada fue el proceso de filtrado para eliminar tales artefactos. Se estudió el desempeño de tres filtros diferentes en imágenes de prueba obtenidas de la base de datos.

El filtro de media homogeniza la imagen, filtrando cada píxel de ella teniendo en cuenta la información de color de los cuatro vecinos del píxel de interés. Éste fue implementado en MatLab a través de la función

`medfilt2(imagen, [5 5])`, con una ventana para el filtro de  $[5 \times 5]$ . A diferencia de éste, el filtro de variación total [22] conserva la posición geométrica de los bordes, tiene una estructura fija y simple con una fórmula exacta para los coeficientes del filtro. El filtro adaptativo (Wiener), el cual minimiza el ruido según las características de la imagen dentro de la región del filtro definida por la ventana rectangular de tamaño  $N \times M$ , fue implementado en MatLab a través de la función `wiener2(imagen,[5,5])`, con una ventana para el filtro de  $[5 \times 5]$ .

En la Fig. 3 se muestra la disminución de ruido ocasionado por objetos presentes en la imagen como: células sanguíneas y demás tipos de células (resaltados en círculos amarillos). A través del filtro de *Wiener* representado en la Fig. 3D se obtienen los mejores resultados en cuanto a disminución en las variaciones de intensidad de los píxeles, reducción de ruido y realce de los bordes de los espermatozoides, como se observa en las regiones encerradas en círculos verdes, en comparación con el filtro de variación total representado en la Fig. 3C y el filtro de media representado en la Fig. 3B, los cuales filtran regiones pertenecientes a espermatozoides que presentan un tono de color claro y reducen de forma considerable el área de los espermatozoides induciendo de esta manera errores en la identificación para la etapa de segmentación.



**Fig. 3.** Procesos de filtrado analizados para imágenes tomadas con objetivo de 40x. A) imagen original. B) Imagen con filtro de media. C) Imagen con filtro de variación total. D) Imagen con filtro adaptativo de Wiener.

En la Tabla 1 se muestran los resultados correspondientes a la detección de las regiones pertenecientes a espermatozoides vivos y espermatozoides muertos, para imágenes aleatorias de individuos diferentes teniendo en cuenta los tres filtros utilizados en el estudio. Las regiones detectadas fueron comparadas con las medidas obtenidas por un técnico experto, en las cuales se analizan los espermatozoides hallados por el experto y los espermatozoides hallados con el algoritmo bajo los tres filtros utilizados. Seguidamente, se evalúa mediante una regla de tres simple directa el porcentaje de acierto para cada filtro (7).

$$\% \text{ de acierto} = \frac{\text{Total algoritmo} \cdot 100}{\text{Total manual}} \quad (7)$$

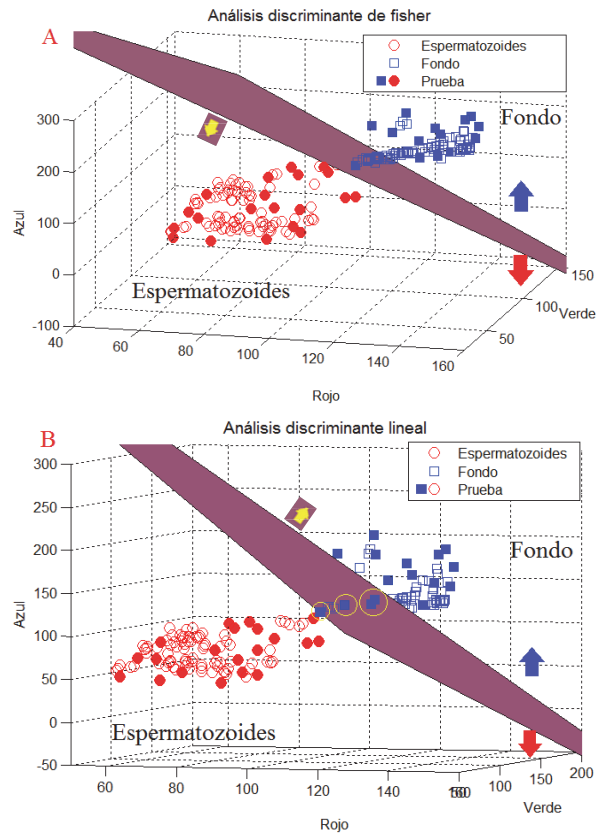
**Tabla 1.** Resultados de la aplicación de los tres filtros evaluados para la detección de las áreas pertenecientes a espermatozoides vivos y muertos.

Prueba	Filtro de media		Filtro de variación total		Filtro adaptativo	
	Manual	Algoritmo	Manual	Algoritmo	Manual	Algoritmo
Imagen 1	76	51	76	49	76	72
Imagen 2	60	42	60	47	60	63
Imagen 3	45	41	45	44	45	57
Imagen 4	54	36	54	34	54	72
Imagen 5	61	57	61	59	61	69
Imagen 6	76	70	76	78	76	87
Imagen 7	140	120	140	73	140	121
Imagen 8	169	98	169	68	169	136
Total	681	515	681	452	681	677
% de acierto	75,6%		66,4%		99,4%	

Una vez filtrada, la etapa de extracción de las regiones fue evaluada teniendo en cuenta la clase 1, componentes de color RGB de cada píxel correspondiente a espermatozoides vivos y espermatozoides muertos y la clase 2, componentes de color RGB de cada píxel identificado como fondo de las imágenes.

La Fig. 4 presenta los resultados de clasificación obtenidos al aplicar el análisis discriminante de Fisher y el análisis discriminante lineal para separar los espermatozoides (vivos y muertos) del fondo de las imágenes en el espacio del color (RGB). Fueron utilizados 100 puntos pertenecientes a la clase de espermatozoides y 100 puntos pertenecientes a la clase del fondo de las imágenes. Se realizó el entrenamiento de los clasificadores con el 80% (80 puntos) y se evaluó con el 20% (20 puntos) pertenecientes a cada clase, es decir 160 puntos para entrenamiento y 40 puntos para prueba entre espermatozoides y fondo de la imagen. Los clasificadores (análisis discriminante de Fisher y análisis discriminante lineal) dividen el espacio del color RGB en dos sub-espacios por un hiperplano en tres dimensiones

llamado vector discriminante, como se aprecia en la Fig. 4. El vector discriminante es definido como la frontera de decisión que separa las clases de espermatozoides vivos y muertos (círculos rojos) con respecto al fondo (cuadros azules), que pasa a través del punto central entre las medias de cada clase, extendiéndose en la dirección señalada por la flecha amarilla. Los resultados mostrados en la Fig. 4A evidencian que el análisis discriminante de Fisher presentó un 100% de aciertos para clasificar los puntos de prueba, 20 para espermatozoides (vivos y muertos) visualizados a través de círculos rojos y 20 para el fondo de las imágenes visualizados a través de cuadros azules, mientras que en la Fig. 4B el análisis discriminante lineal presentó un 82.5% de aciertos para clasificar correctamente los puntos de prueba, debido a que se corre la frontera de decisión obtenida a través del plano de color purpura, clasificando 7 puntos del fondo de las imágenes visualizados mediante cuadros azules, como puntos pertenecientes a la clase de espermatozoides, induciendo así errores en la clasificación.



**Fig. 4.** A) Clasificación mediante el análisis discriminante de Fisher. B) Clasificación mediante el análisis discriminante lineal

En la Fig. 4A se observa mejor la separación debido a que el análisis discriminante de Fisher maximiza la varianza entre clases, permitiendo separar las clases con más exactitud. Mientras que, el análisis discriminante lineal reduce el error cuadrático medio, donde los valores

atípicos que se presentan en las imágenes corren la frontera de decisión disminuyendo los aciertos. En la Fig. 4B se evidencia que 7 puntos pertenecientes al fondo visualizados a través de cuadros azules y encerrados en círculos amarillos, fueron clasificados como puntos pertenecientes a la clase de espermatozoides (círculos rojos), comprobando así la ventaja que presenta el análisis discriminante de Fisher con respecto al análisis discriminante lineal.

La etapa de segmentación fue comparada y caracterizada por medio del área de las cabezas de los espermatozoides (varía entre 70 y 150 píxeles en la escala usada) y la conectividad entre ellos para eliminar aquellas áreas que fueron extraídas con la etapa de segmentación que no pertenecen a los espermatozoides. En la Fig. 5 se evidencia la extracción de los espermatozoides vivos y muertos a partir del análisis discriminante de Fisher.

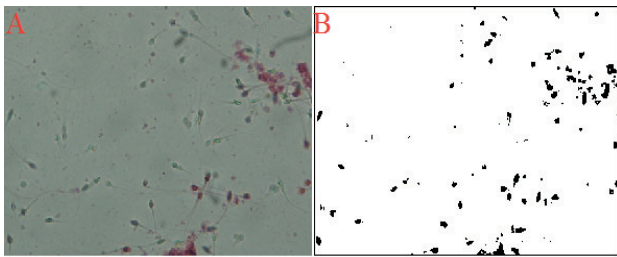


Fig. 5. A) Imagen original tomada con objetivo de 40x. B) Segmentación a partir del análisis discriminante de Fisher.

Finalmente para la etapa de caracterización se aplicó el análisis de agrupamiento para separar los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos, obteniéndose resultados que fueron validados con el cálculo de viabilidad espermática en las muestras de semen.

En la Fig. 6C se observa la clasificación de los 1020 puntos pertenecientes a los espermatozoides vivos, representados en círculos azules y los 1020 puntos pertenecientes a los espermatozoides muertos representados en círculos rojos, a través de la técnica de agrupación de K-medias, evidenciando que la clase de los espermatozoides vivos es separable de la clase de los espermatozoides muertos, por medio de las componentes de color RGB. A su vez, en la Fig. 6B se obtienen los resultados de la clasificación de los espermatozoides, donde se muestran las áreas pertenecientes a los espermatozoides vivos en verde y las áreas que corresponden a los espermatozoides muertos en rojo. También, se presentan áreas con los dos colores debido a la penetración no uniforme del colorante vital en las cabezas de los espermatozoides. En las imágenes se evalúan los porcentajes de color rojo y de color verde por área, con el fin de clasificarla según los porcentajes de color.

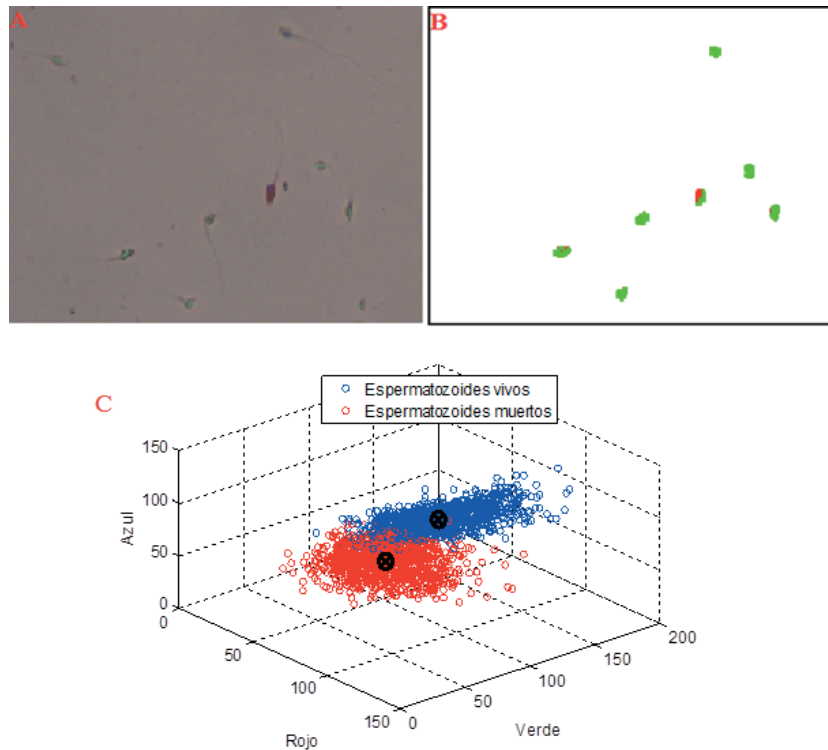


Fig. 6. A) Imagen original de un individuo, tomada con objetivo de 40x. B) Clasificación de espermatozoides vivos y espermatozoides muertos mediante análisis de Clustering. C) Separación de los puntos que representan los espermatozoides vivos y los espermatozoides muertos.

*Validación del algoritmo propuesto*

Con el fin de evaluar la herramienta generada fue analizada la viabilidad espermática en muestras de 14 individuos y se compararon estos resultados con los obtenidos por expertos en el análisis seminal manual, acorde a los procedimientos establecidos por la OMS. Además se realizó la estimación del error mediante la técnica de “Bootstrapping” y validación cruzada a partir de las clases 3 y 4 mencionadas en la sección 2. El Bootstrapping permite evaluar la capacidad que tiene el algoritmo de identificar los espermatozoides vivos y muertos a partir de la información del color RGB, seleccionando el 70% de los datos aleatoriamente para el entrenamiento y el 30% para prueba.

Asimismo, fue utilizado el método de validación cruzada de particiones, para evaluar el desempeño del algoritmo, en términos de precisión, eficiencia y fiabilidad. Este método consistió en tomar los datos y particionarlos en subconjuntos, tomar subconjuntos para entrenar el algoritmo y para probarlo, continuando hasta que cada subconjunto haya sido usado para prueba una vez, es

decir, se debe repetir el entrenamiento k veces, sobre el mismo algoritmo. Hecho esto, se va a obtener un resultado promedio de los porcentajes de precisión obtenidos en cada partición, donde k=10 particiones.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para imágenes en el espacio del color RGB y en la Tabla 3 para imágenes en escala de grises, con el fin de determinar con qué tipo de imágenes se encontraban mejores resultados. Se determinó que la probabilidad para identificar correctamente los espermatozoides vivos y espermatozoides muertos por medio de imágenes en el espacio del color RGB fue de 94,3% y mediante imágenes en escala de grises fue de 88%, indicando que el color es un parámetro clave para la identificación de los espermatozoides en imágenes que presentan variaciones de intensidad en los fondos para cada individuo. Adicionalmente, la evaluación en este espacio del color no generaría procedimientos adicionales en la evaluación rutinaria de la viabilidad espermática puesto que las muestras siempre son previamente coloreadas con el colorante vital Eosina.Y.

**Tabla 2.** Validación de resultados entre validación cruzada y Bootstrap para imágenes en color RGB.

Validación	test1	test2	test3	test4	test5	test6	test7	test8	test9	test10	% de acierto
Bootstrap	96,07	96,1	94,93	95,42	95,75	94,44	93,79	94,93	94,6	94,77	95,18
Validación cruzada	94,3										

**Tabla 3.** Validación de resultados entre validación cruzada y Bootstrap para imágenes en escala de grises.

Validación	test1	test2	test3	test4	test5	test6	test7	test8	test9	test10	% de acierto
Bootstrap	68,33	66,67	65	71,66	71,66	73,33	70	63,33	70	71,66	69,16
Validación cruzada	88										

Asimismo, se realizó la comparación con las medidas obtenidas por parte del técnico experto mediante la matriz de confusión, también llamada matriz de error o contingencia, dado que de esta manera es posible evaluar la exactitud de una clasificación. Esta es una matriz cuadrada de  $n \times n$ , donde  $n$  es el número de clases. Dicha matriz muestra la relación entre dos series de medidas correspondientes al área en estudio. La primera serie corresponde a datos de referencia adquiridos de observaciones de campo y otras fuentes similares. La segunda corresponde a la categorización de los píxeles realizada por el clasificador para las clases de interés. En una matriz de confusión las filas corresponden a los datos de referencia, mientras que las columnas corresponden a las asignaciones del clasificador. A partir de la matriz de confusión representada en la Tabla 4, pueden deducirse varios índices relativos como: exactitud, sensibilidad y especificidad.

**Tabla 4.** Representación de la matriz de confusión.

	Vivos(algoritmo)	Muertos(algoritmo)
Vivos(real)	$Vp$	$Fp$
Muertos(real)	$Fn$	$Vn$

La exactitud se define como el grado de concordancia entre las clases asignadas por el clasificador y sus ubicaciones correctas según datos recolectados por el usuario y considerados como datos de referencia.

$$Exactitud = \frac{(Vp+Vn)}{(Vp+Fp+Vn+Fn)} \tag{7}$$

La sensibilidad se define como la probabilidad para clasificar correctamente un espermatozoide vivo como vivo.

$$Sensibilidad = \frac{Vp}{(Vp+Fn)} \tag{8}$$



La especificidad se define como la probabilidad para clasificar correctamente un espermatozoide muerto como muerto.

$$Especificidad = \frac{Vn}{(Vn+Fn)} \quad (9)$$

donde  $Vp$  son los verdaderos positivos,  $Vn$  son los verdaderos negativos,  $Fp$  son los falsos positivos y  $Fn$  son los falsos negativos.

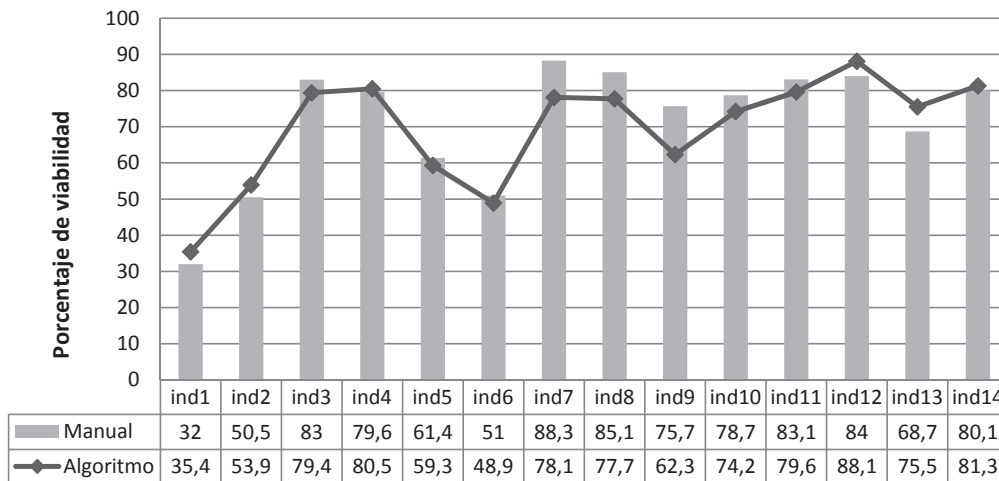
**Tabla 5.** Resultados de viabilidad espermática a través de la matriz de confusión para los 14 individuos.

	Vivos(algoritmo)	Muertos(algoritmo)
Vivos(real)	2918	355
Muertos(real)	207	1159
Exactitud		0,8788
Sensibilidad		0,934
Especificidad		0,76

En la Tabla 5 se presentan los porcentajes de acierto entre las medidas realizadas por el algoritmo y un técnico experto, a partir del conjunto de imágenes obtenidas de

los 14 individuos. Con base en el análisis, se comprobó un 87,88% de exactitud en la identificación de los espermatozoides vivos y los espermatozoides muertos. Igualmente, se reporta en la Tabla 5, la sensibilidad y especificidad de la herramienta con respecto a las medidas obtenidas por el técnico experto en el análisis del espermograma, donde la sensibilidad, del 93,4%, representa por el porcentaje de espermatozoides vivos detectados correctamente por el algoritmo, y la especificidad, del 76%, muestra la capacidad que tiene la herramienta para detectar los espermatozoides muertos correctamente.

Finalmente, mediante los diagramas de correlación, que representan la diferencia entre los métodos implementados, no se encontró variabilidad significativa entre la medida manual y el algoritmo implementado. Los resultados obtenidos muestran las diferencias de la medida manual con respecto al algoritmo con una media de 0,9822 en un intervalo de confianza del 95% de 0,9352 – 0,9352, indicando que las medidas fueron muy similares. Si las dos metodologías fueran iguales la razón esperada sería 1.

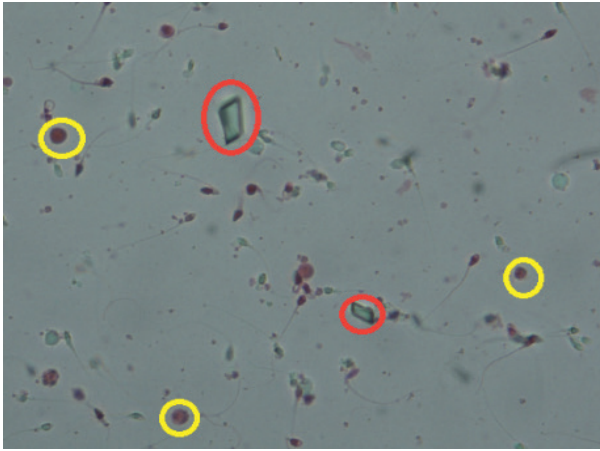


**Fig. 7.** Comparación del análisis manual frente al algoritmo para el cálculo de la viabilidad espermática en 14 individuos.

#### IV. DISCUSIÓN

El análisis de la viabilidad espermática es el componente principal para la identificación de la fertilidad. Actualmente la evaluación convencional es subjetiva y se ve afectada por la experiencia del evaluador. Se ha reportado que la variabilidad está entre 40% - 60% [9], mientras que con un sistema asistido como el propuesto en este manuscrito se obtuvo 94,3% de probabilidad para detectar los espermatozoides correctamente.

En concordancia con otro trabajo [4], las técnicas de procesamiento digital de imágenes posibilitan mediciones más precisas y con menor variabilidad inter e intra-laboratorios. Durante el proceso de identificación y clasificación de espermatozoides vivos y muertos, se presentaron problemas en cada una de las etapas de la metodología. Uno de éstos fue la presencia de objetos diferentes a los espermatozoides en el campo visual de análisis dentro de la imagen microscópica de la muestra seminal. En la Fig. 8 se señalan en círculos amarillos células sanguíneas y en círculos rojos cristales.



**Fig 8.** Imagen de espermatozoides teñidos con Eosina-Y, tomada con objetivo de 40x. En círculos amarillos se señalan células sanguíneas y en círculos rojos artefactos.

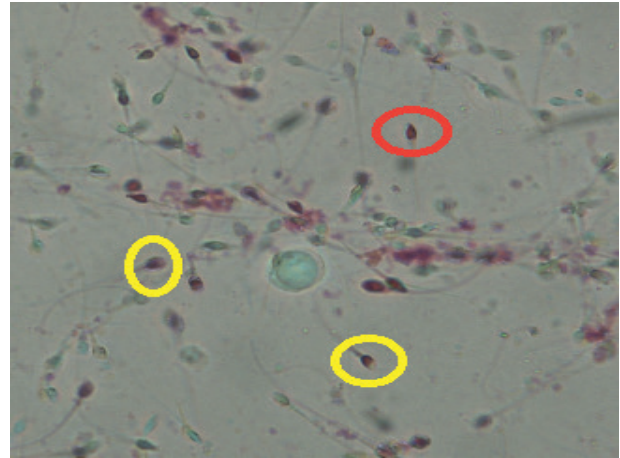
En esta etapa se comprobó mediante un proceso heurístico con imágenes de diferentes individuos que el filtro adaptativo de Wiener reduce las variaciones de intensidad entre los píxeles vecinos y objetos presentes (células sanguíneas, aglomeraciones de espermatozoides y cristales), que afectan dicho análisis, permitiendo un mejor reconocimiento de las regiones de interés en imágenes con variación en los niveles de intensidad en los fondos, en comparación con los filtros de media y el filtro de variación total.

Otra de las dificultades observadas correspondió a las variaciones de intensidad del fondo de la imagen microscópica de la muestra seminal, debido a las condiciones de iluminación y a variaciones en las características químicas del líquido seminal entre individuos. En la Fig. 2 se muestra la variación en los fondos para dos individuos diferentes, afectando de forma significativa la extracción de las regiones de interés; para esta dificultad se implementó el análisis discriminante lineal de Fisher, logrando separar los espermatozoides vivos y espermatozoides muertos del fondo de las imágenes por medio de la información del color.

En cuanto a la metodología de segmentación propuesta, se pudieron obtener regiones bien definidas a partir de las imágenes microscópicas, logrando en el 87,8% de las evaluaciones que los espermatozoides fuesen detectados correctamente, a pesar de las variaciones de intensidad entre individuos y a la penetración no uniforme del colorante vital.

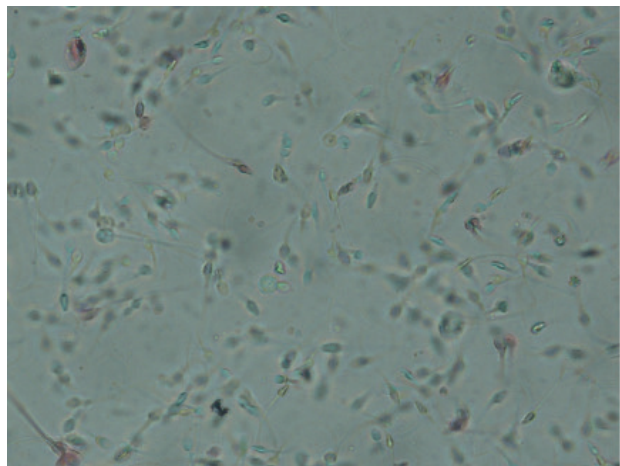
Por otra parte se observaron diferencias en el tamaño de las cabezas de los espermatozoides luego de ser teñidos con el colorante vital. Por esta razón se propuso realizar su detección a través del análisis de los bordes de las regiones pertenecientes a los espermatozoides para clasificarlos

según el área de las cabezas, la cual varió entre 70 y 150 píxeles. En la Fig. 9 se muestra un espermatozoide con coloración uniforme (círculo rojo) y espermatozoides con una coloración no uniforme (círculos amarillos).



**Fig 9.** Imagen de espermatozoides teñidos con Eosina-Y, tomada con objetivo de 40x. En un círculo rojo un espermatozoide teñido uniformemente y en círculos amarillos espermatozoides teñidos por zonas.

El análisis de agrupamiento se constituye en un método óptimo para clasificar los espermatozoides debido a la inexistencia de un criterio único de interpretación. Así mismo, la distribución espacial no uniforme de los espermatozoides sobre la imagen, dificulta en gran medida el conteo de los espermatozoides, presentando una precisión de 97,3% para viabilidad espermática, mejorando la consistencia estadística en los resultados en comparación con el análisis manual. En la Fig.10 se muestra que los espermatozoides están dispersos por toda la imagen.



**Fig 10.** Distribución no uniforme de los espermatozoides sobre la imagen, tomada con objetivo de 40x.

El presente estudio mostró una correlación positiva sin diferencias significativas entre la metodología

implementada con respecto a la medida manual; la razón fue de 0,9822 con un nivel de confianza del 95%. En la Tabla 6 se presentan los resultados del algoritmo en comparación con otras técnicas de segmentación utilizadas en la literatura, encontrando ventajas significativas en cuanto a la detección y clasificación de los espermatozoides en la imagen. En [11] fueron utilizados equipos de microscopía de alta tecnología con cámaras que permiten obtener imágenes con una resolución de 3072 x 2304, a diferencia del algoritmo implementado

en el manuscrito, donde se utilizaron equipos de fácil acceso en los laboratorios de análisis seminal. Finalmente, es importante notar que mediante estos sistemas semi automáticos fueron utilizadas técnicas de procesamiento digital de imágenes como: operadores morfológicos y crecimiento de regiones para extraer las características de los espermatozoides, los cuales no proporcionan información completa de los objetos de estudio en imágenes microscópicas trabajando en escala de grises.

**Tabla 6.** Comparación entre el algoritmo implementado y técnicas de análisis semi-automática.

Método	Exactitud	Sensibilidad	Parámetros	Costo	Tiempo	Características
Algoritmo propuesto	87,88%	93,4%	Viabilidad	Muy bajo	Muy corto	1280x960. A 400x y baja tecnología
[11]	95,78%	98,9%	Morfología	Muy Alto	Lento	3072*2304 Alta tecnología
[4]	Se obtuvieron las velocidades		Morfología y movilidad	bajo	Corto	400x, video 25 frames
[23]	84%	88%	Morfología	bajo	Corto	288*352 Baja tecnología

**Tabla 7.** Comparación entre el algoritmo implementado y sistemas comerciales CASA.

Método	Exactitud	Sensibilidad	Parámetros	Costo	Tiempo	Características
Algoritmo propuesto	87,88%	93,4%	Viabilidad	Muy bajo	Muy corto	1280x960. A 400x y baja tecnología
[5, 8]	89,87%	100%	Morfología, concentración, viabilidad y movilidad	Muy Alto	Muy corto	Alta tecnología

En la Tabla 6 se evidencian las ventajas del algoritmo implementado en comparación con sistemas semi-automáticos encontrados en la literatura, con un 87,88% de exactitud y 93,4% de sensibilidad, para encontrar espermatozoides vivos y espermatozoides muertos sobre las imágenes (Viabilidad espermática), con un sistema abierto, a bajo costo y con tecnología que está al alcance de los laboratorios de andrología en Colombia.

Asimismo, la herramienta desarrollada fue comparada con sistemas automáticos CASA como se muestra en la Tabla 7. Si bien estos sistemas son muy exactos, rápidos y presentan muy buena repetibilidad en sus medidas, los sistemas son cerrados y trabajan con muy alta tecnología. Cabe anotar, sin embargo, que para competir con dichos sistemas, será necesario identificar parámetros adicionales como concentración, morfología y movilidad espermática.

## V. CONCLUSIÓN

En el presente artículo se muestra paso a paso el diseño e implementación de una herramienta computacional basada en técnicas de procesamiento digital de imágenes para la determinación de la viabilidad espermática en imágenes de espermatozoides coloreados con Eosina-Y, la cual tiene como ventaja que puede ser adaptada para

determinar otra clase de tipos celulares, como es el caso de glóbulos rojos, leucocitos, células epiteliales y bacterias.

El sistema propuesto permitió la detección de los espermatozoides, se comprobó que el análisis de la técnica de agrupación de K-medias permite clasificar cada región extraída de la imagen original como espermatozoide vivo o espermatozoide muerto, aplicando el criterio de la distancia mínima, obteniendo una exactitud en los resultados de 87,88% para la viabilidad espermática. También, muestra a partir de la matriz de confusión utilizando medidas subjetivas por parte del experto, que la herramienta posee un 93,4% de sensibilidad para la detección de los espermatozoides vivos, y un 76% de efectividad para detectar los espermatozoides muertos,.

Los resultados fueron validados mediante una razón entre la prueba manual y el algoritmo. La prueba evidenció la que la media final de estas razones fue de 0,98, de un máximo esperado de 1, indicando el buen desempeño del algoritmo. Sin embargo, es necesario una validación con un mayor número de individuos para su uso clínico. Este sistema constituye una herramienta útil para el análisis objetivo de espermatozoides humanos y presenta una alternativa a nivel nacional frente a los costosos sistemas CASA.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Instituto Tecnológico Metropolitano (Grant P10241) y a la Universidad de Antioquia (sostenibilidad 2011-2012) por el apoyo económico y la obtención de las muestras seminales.

## REFERENCIAS

- [1]. De Los Ríos J., Cardona-Maya W., Berdugo J., Correa C., Peña B., Arenas A., Olivera M., Cadavid A. Los valores espermáticos de 113 individuos con fertilidad reciente no mostraron correlación con los parámetros establecidos por la OMS. *Archivos Españoles de Urología*, 57 (2), 147-152, 2004.
- [2]. Cardona-Maya W. Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud. *Actas Urológicas Españolas*, 34 (7), 577-578, 2010.
- [3]. Vásquez F., Vásquez D. Espermograma y su utilidad clínica. Clinical utility of espermograma. *Revista Salud Uninorte* 23 (2), 220-230, 2007.
- [4]. Pascual J., Olmedo H., Expósito A., Finat J. A simple and effective system for computer assisted semen analysis. *Memorias de la IV conferencia sobre avances en medicina*, Santa Margherita Ligure, Italia, July 2008.
- [5]. Aulesa C., Cabrera M., Alonso R., Benítez M., Martínez M. Evaluación del sistema automatizado Sperm Class Analyzer® (SCA) para análisis de semen. *Revista del Laboratorio Clínico*, 2, 8-16, 2009.
- [6]. Soler C., Monserrat J., Gutiérrez R., Núñez J., Núñez M., Sancho M., Pérez-Sánchez F., Cooper TG. Use of the Sperm-Class Analyzer for objective assessment of human sperm morphology. *International Journal of Andrology*, 26, 262-270, October 2003.
- [7]. Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Journal international Theriogenology*, 57, 149-179, January 2002.
- [8]. Fréour T., Jean M., Mirallié S., Dubourdiou S., Barrière P. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 149, 186-189, 2010.
- [9]. World Health Organization. WHO laboratory manual for examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. 5 Ed. Cambridge, 2010. Capítulo 2, 7-113.
- [10]. González R., Woods R. Digital Image Processing: Principles and Applications. Prentice Hall, 2005. Capítulo 17; 551-589.
- [11]. Carrillo H., Villareal J., Sotaquirá M., Goelkel A., Gutiérrez R. Sistema de visión por computador para el análisis morfológico de espermatozoides humanos. *Memorias del 7th simposio internacional de bioinformática y bioingeniería*, Barranquilla, Colombia, 2007.
- [12]. Berdugo J., Andrade-Rocha F., Cardona-Maya W. Semen parameters in fertile men from two South American populations. *Archivos Españoles de Urología*. 62 (8), 646-650, 2009.
- [13]. Berdugo J., Madero J.I., Díaz-Yunez I., Restrepo F., Cardona-Maya W. Evaluación de los parámetros seminales en tres ciudades colombianas. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 37 (2), 288-296, 2011.
- [14]. Cardona-Maya W., Berdugo J., Cadavid A. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urológicas Españolas*, 32 (4), 443-445, 2008.
- [15]. Katz D., Overstreet J., Samuels S., Niswander P., Bloom T., Lewis E. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *Journal of Andrology*, 7, 203-210, 1986.
- [16]. Cardona W., Berdugo J., Ríos J., Cadavid A. Functional evaluation of sperm in Colombian fertile men. *Archivos Españoles de Urología*, 60, 827-831, 2007.
- [17]. Lim Jae S. Two-Dimensional Signal and Image Processing. Prentice Hall, 1990. Pp. 536-540
- [18]. Bishop C. Pattern recognition and machine learning. Spring Street, New York 2006. Capítulo 4, 179-224.
- [19]. Welling M. University of Toronto. Fisher Linear Discriminant Analysis. Consultado en julio de 2002 en: [www.ics.uci.edu/~welling/classnotes/papers\\_class/Fisher-LDA.pdf](http://www.ics.uci.edu/~welling/classnotes/papers_class/Fisher-LDA.pdf).
- [20]. Canny J. A Computational Approach to Edge Detection. *Journal IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 8 (6), 679-698, November 1986.
- [21]. Rui Xu., Donald C. Clustering Algorithms in Biomedical Research. *Reviews in Biomedical Engineering IEEE*, 3, 120-154, 2010.
- [22]. Chan T., Osher S., Shen J. The digital tv filter and nonlinear denoising. *IEEE Transactions on Image Processing*. 10 (2), February 2001.
- [23]. Nowshiravan F., Hassan M., Reza V. A Multi Steps Algorithm for Sperm Segmentation in Microscopic Image. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 12, 43-45, 2005.