



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Análisis Automatizado de
la Movilidad Espermática en Zánganos

Automated Analysis of Sperm Mobility in Drones

Autor

Pablo Luesia Lahoz

Directores

Jesús Alastruey Benedé

Jesús Yániz Pérez de Albéniz

Titulación

Máster Universitario en Ingeniería Informática

ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA (EINA)
2020

TRABAJOS DE FIN DE GRADO / FIN DE MÁSTER



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe entregarse en la Secretaría de la EINA, dentro del plazo de depósito del TFG/TFM para su evaluación).

D./Dª. Pablo Luesia Lahoz ,en
aplicación de lo dispuesto en el art. 14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de
septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el
Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,
Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster)
Máster Universitario en Ingeniería Informática (Título del Trabajo)
Análisis Automatizado de la Movilidad Espermática en Zánganos

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser
citada debidamente.

Zaragoza, 16 de Noviembre de 2020

LUESIA
LAHOZ, PABLO
(FIRMA)

Fdo: Pablo Luesia

Firmado digitalmente
por LUESIA LAHOZ,
PABLO (FIRMA)
Fecha: 2020.11.16
13:16:41 +01'00'

Agradecimientos

Quiero agradecer principalmente a Jesús Alastruey y a Jesús Yániz, porque sin su ayuda no habría sido posible la realización de este proyecto. Agradezco también a mi familia: mis padres, hermano y hermana por el soporte emocional que me han dado. A mis amigos no les agradezco nada. Ya basta de bromas de abejas.

Análisis Automatizado de la Movilidad Espermática en Zánganos

RESUMEN

El estudio y análisis de la calidad seminal de una determinada especie se realiza con frecuencia en el ámbito de la zoología. A partir de imágenes por microscopio de una muestra de esperma, se puede detectar y analizar los patrones de movilidad de los distintos espermatozoides.

El procedimiento de recuento manual de espermatozoides móviles bajo el microscopio es costoso y propenso a errores, especialmente si hay un gran número de células en el campo de visión para muestras concentradas. Los sistemas CASA, del inglés *Computer-Aided Sperm Analysis*, surgieron como herramienta para solucionar estos problemas. Sin embargo, la morfología de las células espermatozoides de la abeja melífera impiden un análisis correcto por parte de los sistemas CASA actuales.

Además, se ha observado una elevada mortalidad de las colonias de abejas, lo que pone en riesgo la supervivencia de una especie fundamental para mantenimiento de la biodiversidad vegetal y producción agrícola. Se requiere una herramienta capaz de analizar automáticamente la calidad seminal de esta especie, entre otras cosas para realizar estudios toxicológicos, reproductivos y para la creación de bancos de semen que permita preservar variedades en peligro de extinción.

En este trabajo se ha diseñado, implementado y evaluado un prototipo de sistema software para el análisis automatizado de la movilidad espermática en zánganos. Dada una secuencia de imágenes de esperma de la abeja melífera obtenida por microscopio, el sistema detecta y clasifica los espermatozoides según su patrón de movilidad. El sistema está formado por cuatro módulos: preprocesamiento, segmentación, extracción de forma de espermatozoides, y clasificación y corrección.

El prototipo es robusto frente a variaciones en las condiciones de captura de los vídeos de entrada. Constituye una base sobre la cual crear un sistema CASA para el análisis de la movilidad espermática de la abeja melífera.

El trabajo se ha realizado en colaboración con el grupo BIOFITER (Biología, Fisiología y Tecnologías de la Reproducción) de la Universidad de Zaragoza.

Automated Analysis of Sperm Mobility in Drones

ABSTRACT

The study and analysis of the seminal quality of a given species is often carried out in the field of zoology. From microscopic images of a sperm sample, it is possible to detect and analyze the motility patterns of different spermatozoa.

The procedure of manually counting motile sperm under the microscope is costly and prone to errors, especially if there are a large number of cells in the field of view for concentrated samples. The CASA systems (Computer-Aided Sperm Analysis) emerged as a tool to solve these problems. However, the morphology of the honeybee sperm cells prevents a correct analysis by current CASA systems.

In addition, high mortality has been observed in bee colonies, putting at risk the survival of a species that is fundamental to the maintenance of plant biodiversity and agricultural production. A tool capable of automatically analyzing the seminal quality of this species is required, among other things for toxicological and reproductive studies and for the creation of sperm banks to preserve endangered varieties.

In this work, a software system prototype for the automated analysis of sperm mobility in drones has been designed, implemented and evaluated. Given a sequence of sperm images from the honeybee obtained by microscope, the system detects and classifies the spermatozoa according to their motility pattern. The system consists of four modules: preprocessing, segmentation, sperm shape extraction, and classification and correction.

The prototype is robust against variations in the capture conditions of the input videos. It constitutes a base on which to create a CASA system for the analysis of the sperm mobility of the honeybee.

The work has been done in collaboration with the BIOFITER group (Biology, Physiology and Reproduction Technologies) of the Universidad de Zaragoza.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Motivación	1
1.2. Estado del arte	1
1.3. Objetivos y alcance del proyecto	2
1.4. Contribuciones	2
1.5. Organización del documento	3
2. Análisis automático de muestras espermáticas	5
2.1. Requisitos del sistema	5
2.1.1. Entrada del sistema	5
2.1.2. Salida del sistema	6
2.2. Sistema desarrollado	6
3. Segmentación de espermatozoides	9
3.1. Preprocesamiento de la imagen	9
3.1.1. Filtrado de ruido	9
3.1.2. Normalización de la imagen	11
3.1.3. Detección de imagen invertida	12
3.1.4. Preprocesamiento en los vídeos	13
3.2. Segmentación de la imagen	13
3.2.1. Segmentación de espermatozoides mediante sFCM	14
3.2.2. Implementación	15
4. Detección y clasificación de espermatozoides	19
4.1. Representación de los espermatozoides	19
4.2. Grafo morfológico	20
4.2.1. Definición del grafo morfológico	20
4.2.2. Extracción del grafo morfológico de las capas	21
4.3. Extractor de forma de espermatozoides	24
4.3.1. Predicción de forma de un espermatozoide	24

4.3.2. Valor de selección de aristas	25
4.4. Funcionamiento entre fotogramas: corrector y clasificador	27
4.4.1. Emparejamiento entre fotogramas	27
4.4.2. Consideración temporal en emparejamientos	28
4.4.3. Ejecución general y filtrado final	29
5. Metodología	31
5.1. Entorno de desarrollo	31
5.2. Captura de las imágenes a analizar	32
5.3. Métricas	32
5.4. Cronograma	33
6. Resultados	35
6.1. Segmentación	35
6.2. Detección de forma	36
6.3. Evaluación del análisis del vídeo	38
7. Conclusiones y trabajo futuro	41
7.1. Conclusiones	41
7.2. Trabajo futuro	42
7.3. Valoración personal	42
Bibliografía	43
Lista de Figuras	47
Lista de Tablas	49
Anexos	50
A. Spatial Fuzzy c-Means (sFCM)	53
B. Código	55

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación

La abeja melífera es fundamental para el mantenimiento de la biodiversidad vegetal y la producción agrícola. En los últimos años se ha observado una elevada mortalidad de las colonias de abejas, lo que pone en riesgo la supervivencia de la especie [1, 2, 3, 4]. Uno de los elementos clave para el mantenimiento de la abeja melífera es una reproducción eficiente, que requiere zánganos funcionales con buena calidad seminal.

Uno de los parámetros más importantes de calidad seminal es la movilidad espermática, ya que condiciona el éxito reproductivo [5]. Sin embargo, actualmente el estudio de este parámetro es rudimentario y subjetivo. Los técnicos toman imágenes por microscopio, que posteriormente analizan. Los espermatozoides son detectados, categorizados y contados de forma manual. Este procedimiento es costoso y propenso a errores, especialmente si hay un gran número de células en el campo de visión para muestras concentradas, por lo que es necesario un análisis automatizado cuyos resultados no dependan del factor humano. Los sistemas de análisis de semen asistido por ordenador (CASA, *Computer-Assisted Sperm Analysis*) existentes que realizan estas tareas están diseñados para analizar muestras de mamíferos, y no sirven para los espermatozoides de los zánganos debido a su morfología filiforme con la cabeza apenas distinguible.

1.2. Estado del arte

Los sistemas de análisis de semen asistido por ordenador (CASA, del inglés *Computer-Aided Sperm Analysis*, han demostrado su utilidad para el análisis de la calidad espermática [6, 7]. Sin embargo, los sistemas CASA comerciales a menudo no son aplicables a entornos de investigación. Por esta razón, en los últimos años han surgido alternativas como OpenCASA que han ofrecido funcionalidades relevantes a los investigadores que trabajan en áreas relacionadas con la fertilidad [8, 9].

Los sistemas CASA comerciales están orientados al análisis del semen de mamífero. Por ello, sus algoritmos de detección de espermatozoides se suelen basar en la segmentación de sus cabezas. Por lo tanto, estos sistemas no están adaptados a la morfología del espermatozoide del zángano de la abeja melífera [5]. Las células espermatozoides del zángano cuentan con una cabeza estrecha, que es muy difícil de distinguir del resto del cuerpo en las imágenes por microscopio. Hasta donde sabemos, no existe ningún sistema CASA capaz de detectar espermatozoides de zángano. Tampoco conocemos ningún trabajo académico que proponga una solución específica a este problema.

1.3. Objetivos y alcance del proyecto

El objetivo de este trabajo es implementar un prototipo software que, dada una secuencia de imágenes obtenida por microscopio de una muestra de semen de zángano, detecte los espermatozoides y los clasifique según su forma y patrón de movimiento. Este análisis permitirá estudiar con mayor rigor los factores que influyen en el declive de las abejas, entre otras posibles aplicaciones.

Para cumplir este objetivo, se plantearon las siguientes tareas:

- Estudiar el estado del arte sobre algoritmos de detección de espermatozoides.
- Desarrollar un prototipo modular que permita la evaluación de distintas técnicas de procesado de imagen dirigidas a la detección de espermatozoides de la abeja melífera.
- Implementar y evaluar distintas técnicas para la detección y clasificación de espermatozoides de zánganos.

El resultado final es un prototipo que analiza de forma automática la movilidad espermática en zánganos. Además, el sistema desarrollado permitirá explorar otras técnicas de cara a su futura integración en un sistema CASA, como por ejemplo, openCASA [10].

El proyecto ha sido realizado en colaboración con el grupo BIOFITER (Biología, Fisiología y Tecnologías de la Reproducción) de la Universidad de Zaragoza.

1.4. Contribuciones

Las principales contribuciones de este trabajo son:

- Se han generado soluciones para la segmentación de una imagen por microscopio, extracción de la forma, y clasificación de las células espermáticas de la abeja melífera, con posibles solapamientos. Hasta donde sabemos, es el primer trabajo que propone un algoritmo para detectar y clasificar espermatozoides en zánganos.
- Hemos observado que el algoritmo implementado para procesar imágenes con espermatozoides de zánganos solapados es complejo en términos de coste computacional.

1.5. Organización del documento

Este documento está dividido en siete capítulos, incluyendo este introductorio. En el Capítulo 2 se recogen los requisitos del proyecto y se presenta el esquema general del sistema diseñado e implementado. El Capítulo 3 detalla el diseño e implementación de los módulos de preprocesamiento y segmentación de la imagen. En el Capítulo 4 se detalla el diseño e implementación de los módulos para la detección y clasificación de espermatozoides. El Capítulo 5 presenta la metodología seguida durante el proyecto. También presenta las herramientas utilizadas. En el Capítulo 6 se describen los experimentos realizados y se analizan los resultados obtenidos. Finalmente, el Capítulo 7 presenta las conclusiones finales del proyecto, así como futuras líneas de trabajo.

Capítulo 2

Análisis automático de muestras espermáticas

Este capítulo recoge los requisitos del proyecto y presenta el esquema general del sistema diseñado e implementado.

El sistema se ha desarrollado de manera modular. Cada módulo se ha diseñado e implementado de manera independiente pensando en la integración o modificación de módulos.

2.1. Requisitos del sistema

El objetivo de este trabajo es implementar un sistema que a partir de un vídeo de una muestra de semen de zángano, detecte los espermatozoides, los clasifique según su forma y patrón de movimiento, y calcule varios parámetros relacionados con su motilidad.

2.1.1. Entrada del sistema

La entrada al sistema es un vídeo de una muestra de esperma de zánganos de abeja melífera. En él se pueden apreciar los espermatozoides en escala de grises. Estos vídeos son capturados mediante una cámara acoplada a un microscopio en el laboratorio por técnicos del grupo BIOFITER.

Las características del vídeo dependen de la configuración del sistema de captura. Dependiendo del técnico, puede variar el rango de valores de los píxeles, escala del píxel, resolución. Las imágenes puede ser negativas o no. Además, la óptica de microscopio y cámara puede generar variaciones de intensidad. Por último, dependiendo de la calidad de la muestra, se pueden apreciar partículas no correspondientes a los espermatozoides.

Los vídeos disponibles fueron tomados para realizar un análisis manual de los espermatozoides. Como la densidad de espermatozoides se redujo para facilitar el

trabajo a los técnicos, el fondo domina la mayor parte de la escena. El tono del fondo es uniforme, aunque puede existir ruido de baja frecuencia causado por los artefactos antes mencionados.

2.1.2. Salida del sistema

Se especificó que el sistema debería calcular los siguientes parámetros:

- Número total de espermatozoides.
- Número total de espermatozoides móviles.
- Porcentaje de espermatozoides móviles respecto a total.
- Velocidad media de desplazamiento de los espermatozoides móviles, en $\mu m/s$.
- Longitud máxima de los espermatozoides, en μm .
- Longitud mínima de los espermatozoides, en μm .
- Longitud media de los espermatozoides, en μm .

2.2. Sistema desarrollado

Esta sección realiza una descripción general del sistema diseñado e implementado. En los capítulos 3 y 4 se detallan los módulos.

La figura 2.1 muestra el esquema general del sistema completo. El sistema se divide en cuatro módulos:

- Preprocesamiento de imagen
- Segmentación de espermatozoides
- Detección de espermatozoides
- Clasificación de espermatozoides y corrección

A continuación se describe brevemente el funcionamiento general de los distintos módulos. Se estructura siguiendo el flujo de datos desde la entrada hasta la salida.

Las imágenes del vídeo a analizar entran al módulo de preprocesamiento, donde son normalizadas para facilitar su posterior tratamiento. También se elimina el ruido de baja frecuencia descrito en la sección 2.1.1. Este módulo se detalla en la sección 3.1.

Las imágenes normalizadas se envían al módulo de segmentación, que por medio de un clúster sFCM [11], separa las imágenes en tres capas: fondo, espermatozoides y cruce

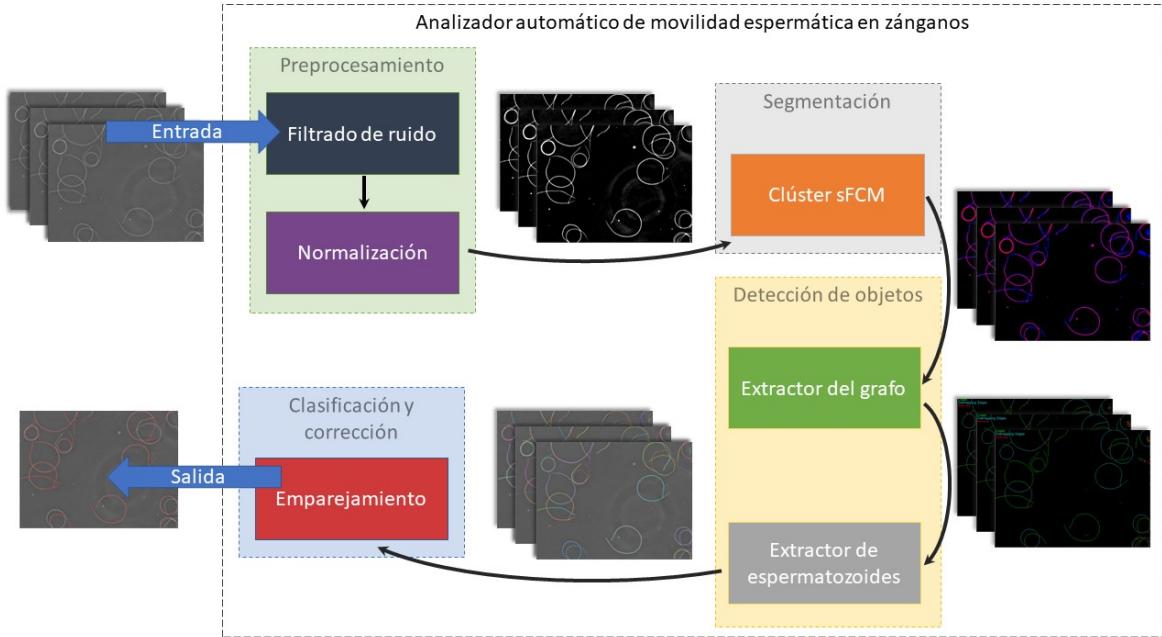


Figura 2.1: Esquema general del sistema. Los rectángulos de borde discontinuo corresponden a sistemas y subsistemas. Los rectángulos lisos representan las tareas. Las distintas flechas corresponden al flujo de datos desde la entrada hasta la salida del sistema. Las imágenes muestran las transformaciones realizadas a los datos de entrada.

de espermatozoides. Si el clúster falla en su ajuste, se repetirá el preprocesamiento con distintos parámetros. Este último paso se repite hasta que el clúster encuentra al menos las capas de fondo y espermatozoides. Este módulo se describe en la sección 3.2.

El módulo de detección busca espermatozoides en cada imagen del vídeo. Para ello, realiza dos tareas: extraer un grafo intermedio e identificar los espermatozoides de dicho grafo. La primera transforma las capas de interés en un tipo de dato intermedio, que favorece la extracción final de los espermatozoides. El extractor de espermatozoides devuelve una lista de espermatozoides en la imagen. Estas tareas se detallan en las secciones 4.2 y 4.3).

El último módulo realiza la corrección y la clasificación mediante una función de emparejamiento. Los módulos previos trabajan con cada fotograma de manera independiente. El emparejamiento busca correlaciones entre todas las listas de espermatozoides de cada fotograma. Un espermatozoide válido se encontrará en varios fotogramas. Utilizando el componente temporal, se calcula movilidad del espermatozoide de un emparejamiento. La tarea se detalla en la sección 4.4.

El resultado final es una lista de espermatozoides totales y corregidos del vídeo original. De esta lista, se extraen los parámetros de salida del sistema.

Capítulo 3

Segmentación de espermatozoides

Este capítulo detalla el diseño y la implementación de los módulos de preprocessamiento y segmentación de imagen.

3.1. Preprocesamiento de la imagen

El preprocessamiento de imagen tiene como objetivo preparar las imágenes para su posterior tratamiento. Normalmente, las aplicaciones de visión por computador filtran el ruido y normalizan las imágenes de entrada.

En esta aplicación, sería deseable que las imágenes resultado de este preprocessamiento tuvieran las siguientes características: fondo oscuro y uniforme, espermatozoides en blanco, y un elevado contraste entre la intensidad del fondo y la de los espermatozoides. En la figura 3.1 se pueden observar dos imágenes antes y después del preprocessamiento, izquierda y derecha, respectivamente.

3.1.1. Filtrado de ruido

Ruido de alta frecuencia

El ruido de alta frecuencia en una imagen puede eliminarse mediante la aplicación de filtros: mediana, media, gaussiano, bilateral, etc. Sin embargo, estos filtrados difuminan la escena, sacrificando información de la imagen.

Generalmente, la cabeza y la cola de un espermatozoide de zángano se estrechan a medida que se acercan al extremo. En las imágenes se observa cómo disminuye la intensidad de los píxeles de un espermatozoide al aproximarse a su extremo. Filtrar el ruido de alta frecuencia dificulta la identificación de los límites de un espermatozoide. Por lo tanto, se ha decidido no filtrar el ruido de alta frecuencia.

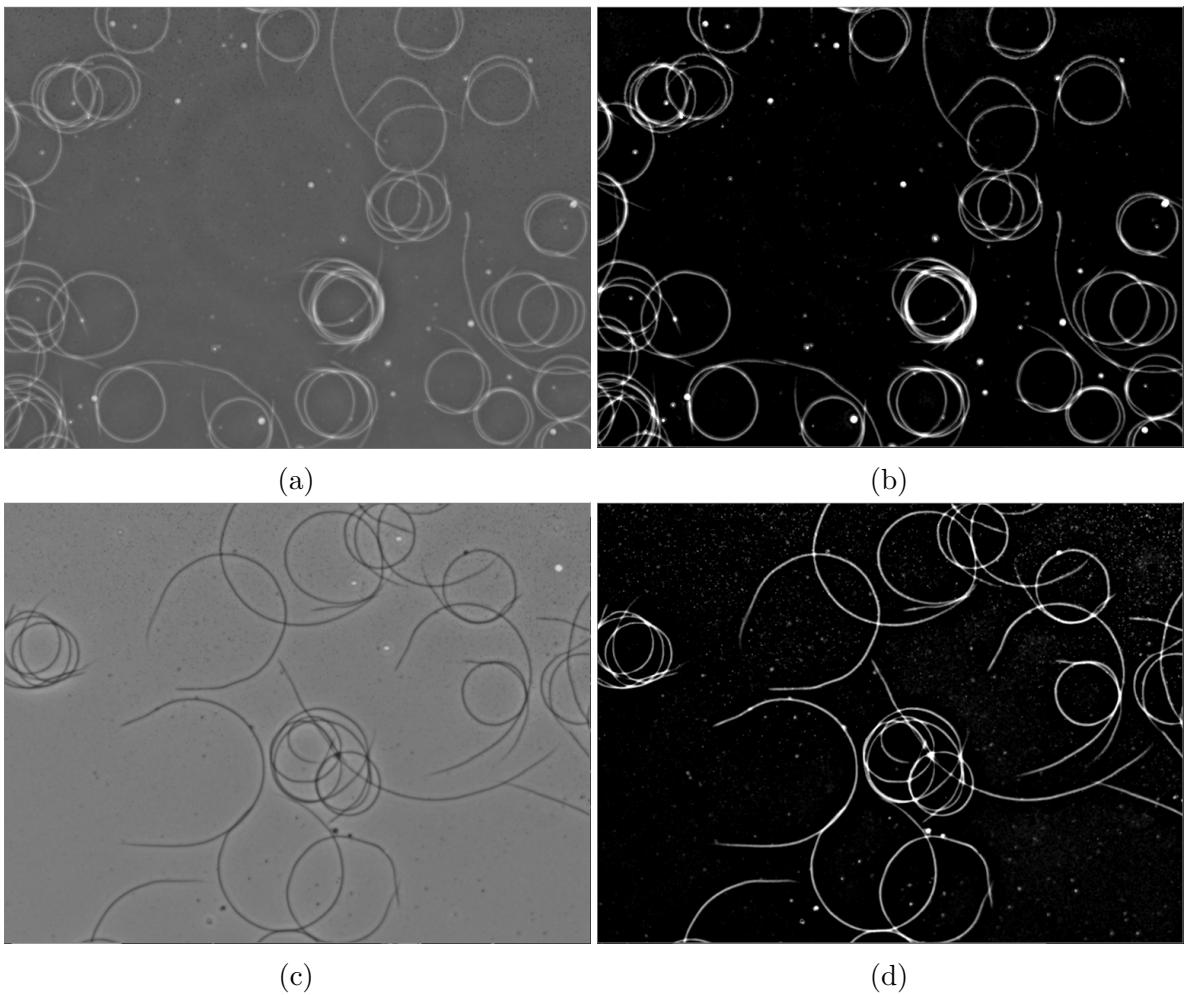


Figura 3.1: Ejemplos de preprocessamiento de las imágenes. (a) y (c): imágenes de entrada del sistema. (b) y (d) imágenes preprocessadas.

Ruido de baja frecuencia

En cuanto al ruido de baja frecuencia, en principio tampoco se filtra. En caso de que la segmentación falle, sí que se aplicaría un filtrado para reducir este ruido. A continuación, se explica esta operación.

El área de los espermatozoides en la imagen es mucho menor que la del fondo. La media de píxeles de un área suficientemente grande de la imagen tenderá al valor del fondo en esa zona. La corrección del ruido de baja frecuencia se realiza en base a dicho valor del fondo.

Se genera una imagen de corrección, cuyos valores de cada píxel se obtienen dividiendo la media global de la imagen por la media local del píxel en la imagen original. La media local de un píxel se obtiene con un filtrado de media en un área de 25x25 píxeles centrada en dicho píxel. La multiplicación píxel a píxel de la máscara y la imagen original, devolverá la imagen con color uniforme.

3.1.2. Normalización de la imagen

La normalización de una imagen en visión por computador consiste en variar el valor de los píxeles de la imagen, para hacerla independiente de ciertas propiedades como brillo o contraste. Existen numerosos métodos para normalizar una imagen. La mayoría de estas transformaciones de la imagen se realizan directamente sobre el histograma.

El objetivo de la **ecualización del histograma** es uniformizar la cantidad de píxeles con distintas intensidades. Este método, utilizado en numerosas aplicaciones de visión por computador, permite aumentar el detalle de los distintos componentes de una escena. Pese a ello, la ecualización no es útil en este proyecto. Las imágenes del microscopio se componen de un fondo de intensidad uniforme que ocupa la mayor parte de la escena. Como la ecualización aumenta el contraste de las valores de intensidad más frecuentes, una mayor realce del fondo dificultaría la discriminación de los espermatozoides.

La **normalización lineal** modifica los valores de los píxeles de forma que las intensidades de la imagen cubran el rango completo. Este método depende de los valores máximos y mínimos de los píxeles de la imagen original, y es muy sensible al ruido. La existencia de un único píxel blanco, alterará el valor del máximo; la transformación será distinta a si no estuviera dicho píxel. Para evitar estas variaciones, se pueden predefinir valores máximos y mínimos, pero no es recomendable dadas las variaciones en brillo y contraste de las imágenes de entrada. El mismo motivo descarta otras transformaciones del histograma, como por ejemplo, la logarítmica y la exponencial.

El fondo representa la mayor parte de la escena, por tanto, la media de todos los píxeles tendrá un valor cercano al color del fondo. Utilizando la intensidad de color del fondo, y su relación con el resto de la imagen, puede normalizarse la imagen, abstrayéndose del brillo y contraste de la imagen. Mediante la **normalización de valor z o z-score**, esta información es utilizada asumiendo normalidad en la distribución de los píxeles de la imagen. A continuación se explica con mayor detalle.

Normalización mediante *z-score*

Se calcula en primer lugar la media de todos los píxeles de la imagen, y su desviación típica. La masa de probabilidad se encuentra cerca del valor de los píxeles del fondo de la imagen, como se observa en la figura 3.2. Asumiendo que los píxeles tienen distribución normal, se ajustan todos los píxeles a una normal estándar, de media 0 y desviación típica 1:

$$\mu = E[X], \sigma = \sqrt{E[(X - \mu)^2]}, \frac{X - \mu}{\sigma} \sim N(0, 1), \quad (3.1)$$

dónde X son los píxeles de la imagen. Tras esta transformación, todas las imágenes

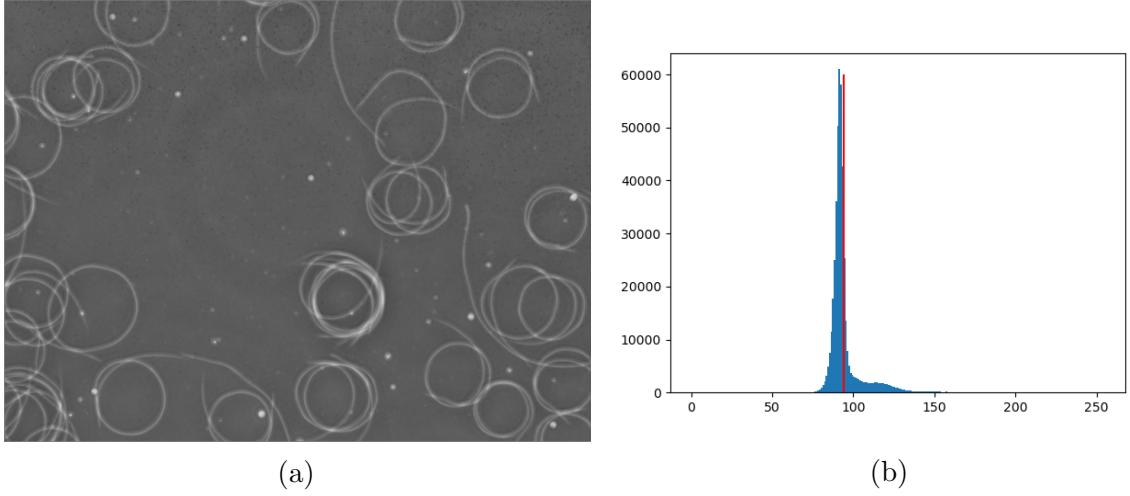


Figura 3.2: (a) Imagen de entrada y (b) histograma de la misma. En rojo en el histograma se muestra la media de los píxeles

se encuentran en la misma escala.

Se considera que la imagen es un conjunto de píxeles cuyo valor sigue una distribución normal. Como el rango de intensidad es de $[0, \dots, 256]$, por tanto, la media por defecto de una imagen es $\mu_d = 127,5$. La desviación típica por defecto se extrae de una de las propiedades de la distribución normal:

$$X \sim N(\mu, \sigma), \Pr(\mu - 3\sigma \leq X \leq \mu + 3\sigma) \approx 0,9973 \approx 1, X \in [0, \dots, 256], \quad (3.2)$$

$$\mu_d - 3\sigma_d = 0 \wedge \mu_d = 127,5 \rightarrow \sigma_d = 42,7,$$

Para reescalar al rango del color de la imagen, se realiza la operación inversa, con σ_d y μ_d . No obstante, se quiere minimizar al máximo posible la información del fondo. Como la media es próxima al color del fondo, para el reescalado se asume $\mu_d = 0$, convirtiendo todos los valores al rango $[0, 1, \dots, 255]$.

Los píxeles de los espermatozoides tendrán un valor mayor que la media. Como resultado, se produce un fondo negro. Se produce un aumento del rango de intensidad en los espermatozoides, consecuencia de reescalar.

3.1.3. Detección de imagen invertida

Si la imagen está invertida, una cantidad pequeña de píxeles claros de los espermatozoides se encuentra sobre una gran cantidad de píxeles oscuros. El histograma resultante será asimétrico positivo en este caso. Por otro lado, la imagen no invertida tendrá un histograma asimétrico negativo. Mediante el coeficiente de asimetría de Fisher-Pearson se determina si una imagen está invertida o no.

3.1.4. Preprocesamiento en los vídeos

El preprocesado a lo largo del vídeo consiste en dos partes: la extracción de los parámetros de la imagen de normalización, y la transformación. La transformación siempre realiza la normalización *z-score*, pero la inversión y filtrado de ruido de baja frecuencia solo si es necesario.

Las imágenes no varían de su luminosidad a lo largo del vídeo. Por ello, se extraen los parámetros del primer fotograma, y se utilizan para la transformación de cada fotograma posterior del vídeo.

3.2. Segmentación de la imagen

En el ámbito de la visión por computador, la segmentación consiste en dividir los píxeles de la imagen en áreas de interés. Atañendo al trabajo, las zonas de interés son las asociadas a los espermatozoides, y se busca discriminarlas de las del fondo.

La segmentación se realiza clásicamente por dos métodos: umbralización, o detección de contornos. La umbralización busca un rango de intensidad en la imagen, el cual abarca el valor de los píxeles con la información requerida. La detección de contornos busca los puntos de una imagen en las que se produce un cambio en la intensidad de los píxeles.

El uso de una **Red Neuronal Convolucional (RNN)** se descartó porque requiere una gran base de datos para su entrenamiento. Construir la base de datos requiere una gran cantidad de tiempo y esfuerzo, y se considera demasiado trabajo para un solo estudiante.

La siguiente estrategia estudiada fue la extracción de contornos. El algoritmo de **Canny** es la opción más clásica en la extracción de contornos en visión por computador [12]. La sensibilidad del algoritmo al ruido requiere un filtrado adicional sobre las imágenes. En la sección 3.1 se menciona la prioridad de la información de la imagen frente la aplicación de ciertos filtros.

Otras alternativas a la extracción de contornos son el algoritmo de **Watershed** y los **contornos activos** o **snakes**. Ambos han dado buenos resultados en distintas aplicaciones de imágenes médicas [13], e imágenes microscópicas de células [14, 15, 16].

No obstante, la morfología de los espermatozoides de los zánganos es alargada. La información relevante puede resumirse a una sola curva. Las estrategias descritas extraen una figura cerrada con mayor dimensión que la necesaria para estas células. Además, los detectores de contornos difícilmente encontrarán el extremo correctamente al basarse principalmente en el gradiente del color de la imagen, como se explica en la sección 3.1.1.

Respecto a la umbralización, existen numerosos algoritmos para su realización:

estática con parámetros predefinidos, Otsu [17], **dinámica gaussiana**, etc. El algoritmo de agrupamiento **k-medias** o **k-means** [18] permite agrupar los valores de intensidad de los píxeles de una imagen, por rangos cercanos, permitiendo además una segmentación en varias capas. No obstante, todas las técnicas mencionadas de umbralización se ven afectadas por la elección de parámetros, o por la sensibilidad al ruido de baja frecuencia.

El **acoplamiento difuso espacial** o sFCM (del inglés *spatial fuzzy c-means*) [11] es más robusto frente al ruido que el *k-means*, al considerar un componente espacial. El sFCM es el utilizado para la segmentación en este trabajo.

El algoritmo funciona definiendo unos centros. Se discriminan los píxeles según el centro que tengan más cercano. El valor de los centros se actualiza dado el valor de los píxeles asociados a dicho centro. La fase de calculo de distancia y actualización de centros se repite hasta que no se actualizan los centros. La peculiaridad del sFCM es la adición del componente espacial en la función de distancia. El algoritmo se detalla en el anexo A.

3.2.1. Segmentación de espermatozoides mediante sFCM

La intensidad del fondo es menor que la de los espermatozoides. También se ha observado una mayor intensidad en el cruce entre espermatozoides. Por ello, se definen tres clases para el clúster: fondo, espermatozoide, y cruce de espermatozoides. El valor de los centros tras el ajuste, indicará la clase a la que pertenece, correspondiéndose al de la intensidad en la imagen.

Los valores de brillo y contraste no varían entre los distintos fotogramas de un mismo vídeo. Por este motivo, el ajuste de los centros se realiza en el primer fotograma. La clasificación de los píxeles se realiza con dichos centros para todos los fotogramas del análisis.

Gracias al preprocesado, todos los vídeos presentan valores similares para sus centros ajustados. Para reducir el número de iteraciones, antes del ajuste se inicializan los centros a los siguientes valores obtenidos empíricamente: 5, 100 y 200

El ajuste mediante sFCM puede devolver un resultado indeseado, como por ejemplo, valores muy próximos para las clases fondo y espermatozoide. En tales casos, se sacrifica la información de los cruces de espermatozoides, y se repite el ajuste y clasificación con solamente dos capas, cuyos centros se inicializan con los valores 10 y 150.

Los parámetros del clúster son $p = 1$, $q = 1$ y $m = 2$. Aprovechando dicha parametrización, se realiza una optimización considerando la ecuación A.2, donde la distancia es euclídea. Con estos valores, se optimiza el cálculo de pertenencia, omitiendo

varias operaciones de raíces cuadráticas y potencias:

$$\begin{aligned}
 u^{(ij)} &= 1 / \sum_{k=1}^c \left(\frac{\sqrt{\sum_{l=1}^d (x_l^{(i)} - v_l^{(j)})^2}}{\sqrt{\sum_{l=1}^d (x_l^{(i)} - v_l^{(k)})^2}} \right)^{2/(m-1)} \\
 &= 1 / \sum_{k=1}^c \frac{\sum_{l=1}^d (x_l^{(i)} - v_l^{(j)})^2}{\sum_{l=1}^d (x_l^{(i)} - v_l^{(k)})^2},
 \end{aligned} \tag{3.3}$$

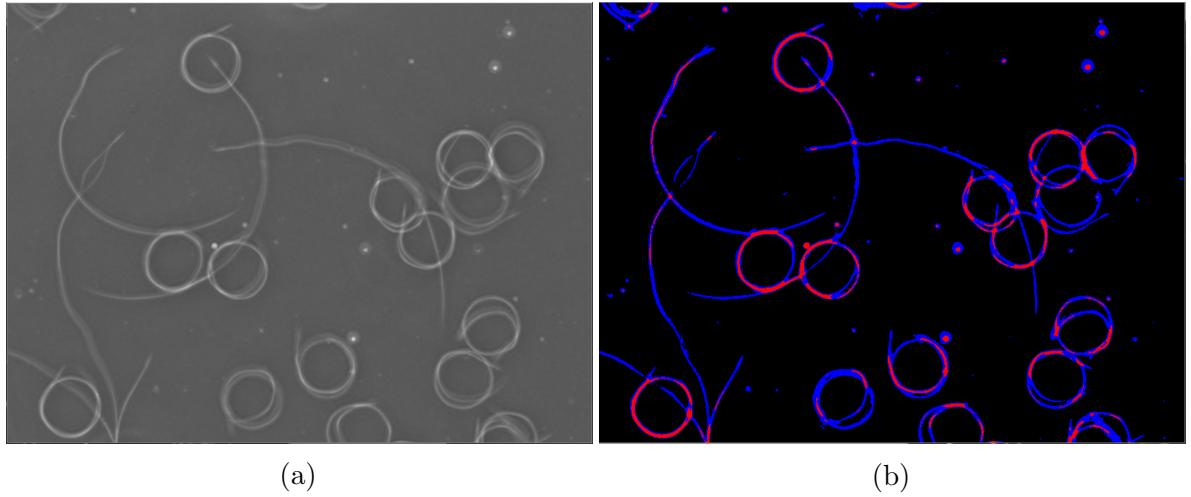


Figura 3.3: (a) Imagen original. (b) Imagen segmentada en tres capas: (1) fondo en negro, (2) espermatozoide en azul, (3) cruce de espermatozoides en rojo.

3.2.2. Implementación

La implementación del clúster sFCM se describe a continuación. Las operaciones de cálculo de pertenencia y la actualización de los centros de las clases se han implementado por medio de cálculo vectorial y matricial.

Cálculo de pertenencia según la distancia al centro de la clase

Se almacena en memoria los píxeles de la imagen como vector ($x_1 \dots x_n$), y el valor de los centros ($v_1 \dots v_c$):

$$X = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix}, V = \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ \vdots \\ v_c \end{pmatrix}, \tag{3.4}$$

Se requiere la distancia de cada píxel a cada centro en la ecuación A.2, calculada con la función *cdist* de la librería SciPy:

$$\text{cdist}(X, V) = D_{n \times c}, \tag{3.5}$$

donde $d_{ij} \in D$ es la distancia euclídea del píxel i al centro de la clase j . Posteriormente, se eleva cada elemento de D a $2/(m - 1)$ donde $m = 2$, mediante la función *power* de NumPy. Se genera así la matriz P .

Se repiten las filas de P c veces, con la función *repeat* de NumPy por columnas:

$$\text{repeat}(P, c) = R_{n \cdot c \times c} = \left(\begin{array}{ccc} p_{1,1} & \cdots & p_{1,c} \\ p_{1,1} & \cdots & p_{1,c} \\ \vdots & & \\ p_{1,1} & \cdots & p_{1,c} \\ p_{2,1} & \cdots & p_{2,c} \\ \vdots & & \\ p_{n,1} & \cdots & p_{n,c} \\ \vdots & & \\ p_{n,1} & \cdots & p_{n,c} \end{array} \right) \Bigg\} n \cdot c, \quad (3.6)$$

donde

$$i \in [1..n], \{k, j\} \in [1..c], r_{k \cdot i, j} \in R \wedge p_{i,j} \in P \rightarrow r_{k \cdot i, j} = p_{i,j},$$

Posteriormente, se redimensiona P a una sola dimensión con la función *reshape* de NumPy:

$$\text{reshape}(P, 1) = S_{n \cdot c \times 1} = \left(\begin{array}{c} p_{1,1} \\ p_{1,2} \\ \vdots \\ p_{1,c} \\ p_{2,1} \\ \vdots \\ p_{n,1} \\ \vdots \\ p_{n,c} \end{array} \right), \quad (3.7)$$

Se divide cada elemento de cada fila de R , por el elemento de S que está en la misma fila. Se utiliza la función *divide* de NumPy. Redimensionando con *reshape* se define un conjunto tridimensional $T_{n \times c \times c}$, donde:

$$i \in [1..n], \{j, k\} \in [1..c], t_{ijk} \in T \rightarrow t_{ijk} = \left(\frac{\|x_i - v_j\|}{\|x_i - v_k\|} \right)^{2/(m-1)}, \quad (3.8)$$

Realizando el sumatorio por el eje de k , y calculando su inversa, se consigue una matriz $U_{n \times c}$. La matriz contiene el valor de pertenencia de cada uno de los n píxeles, a cada una de las c clases.

Los posibles valores *NaN* que hayan sido generados por las divisiones de 0 entre 0, se sustituyen por 1 (distancia 0, por consiguiente, se encuentra sobre el centro).

Cálculo del componente espacial

Se ha obtenido previamente una matriz U , con dimensiones son el número de píxeles n y el de clases c . Se redimensiona U a la imagen original, resultando tridimensional. Cada valor u_{ij} de U se encuentra ahora en la misma posición original del píxel x_j en la imagen. Puede considerarse como una imagen con c canales de color.

El valor de la ecuación A.3 se calcula con la función *filter2D* de OpenCV sobre el U redimensionado. Esta función realiza una convolución con un kernel indicado por parámetros. Utilizando un kernel de 5×5 unos, la convolución resulta la suma de una ventana cuadrada de tamaño 5, centrada en cada una de las posiciones. Se redimensiona el resultado de la convolución al tamaño original de U , obteniendo matriz H . En la matriz H , h_{ij} es el componente espacial del píxel x_i a la clase j -ésima.

Cálculo de pertenencia con componente espacial

Con las matrices U y H en memoria se calcula el valor indicado en la ecuación A.4. Las potencias de U y de H , a p y q respectivamente, se calculan en primer lugar con la función *power* de NumPy. Se multiplica elemento por elemento ambas matrices, devolviendo una matriz A . Finalmente, se dividen todos los elementos de cada fila por el sumatorio de esa misma fila.

El resultado es la matriz $U'_{n \times c}$, cuyo elemento u'_{ij} es la pertenencia conjunta del píxel x_i a la clase j -ésima.

Actualización de los centros según los píxeles de las clases

La actualización de los centros de las clases está definida en la ecuación A.5. Se define X y U_m :

$$U_m = \begin{pmatrix} u'_{1,1}^m & \dots & u'_{1,c}^m \\ u'_{2,1}^m & \dots & u'_{2,c}^m \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ u'_{n,1}^m & \dots & u'_{n,c}^m \end{pmatrix}, X = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix}, \quad (3.9)$$

Dónde $\forall u'_{i,j} \in U'$. U_m se obtiene elevando cada elemento de U' a $m = 2$ usando la función *power* de la librería NumPy.

El sumatorio del numerador de la ecuación A.5 se puede definir como:

$$\begin{pmatrix} \sum_{j=1}^N u'_{i1}^m x_i \\ \sum_{j=1}^N u'_{i2}^m x_i \\ \vdots \\ \sum_{j=1}^N u'_{ic}^m x_i \end{pmatrix} = U_m^\top \cdot X = M_{c \times 1}, \quad (3.10)$$

El resultado buscado se devuelve con una multiplicación matricial. La función la realiza *matmul* de la librería NumPy.

El sumatorio del denominador de la ecuación A.5, se obtiene con la función *sum* de NumPy, indicando el eje por columnas. El resultado es:

$$\begin{pmatrix} \sum_{j=1}^N u'_{i1}{}^m \\ \sum_{j=1}^N u'_{i2}{}^m \\ \vdots \\ \sum_{j=1}^N u'_{ic}{}^m \end{pmatrix} = \text{sum}(U', \text{eje} = 0) = B_{c \times 1}, \quad (3.11)$$

La función *divide* de la librería NumPy realiza la división elemento por elemento de las matrices M y B . El vector generado, de tamaño c número de clases, corresponde con los centros de cada clase.

Capítulo 4

Detección y clasificación de espermatozoides

Este capítulo detalla el diseño y la implementación de los módulos para la detección y clasificación de espermatozoides.

4.1. Representación de los espermatozoides

Definir la representación de los espermatozoides y extraer su forma han sido dos de los principales retos de este proyecto. En esta sección se discuten los diferentes métodos planteados para la representación de espermatozoides y la estrategia implementada para su extracción.

En los espermatozoides de la abeja melífera es muy difícil diferenciar la cabeza del resto del cuerpo. La morfología de estos espermatozoides se ha modelado como una curva abierta. En un primer momento, se intentó aproximar cada espermatozoide a una curva paramétrica, una concatenación de ellas, o descriptores utilizados comúnmente para curvas no paramétricas. Se consideró tanto la **transformada de Hough** [19], como la **transformada generalizada de Hough** [20]. Ambas permiten transformar información de la imagen en curvas paramétricas, o formas no analíticas en el caso de la generalizada. La transformada generalizada de Hough también contempla comparación entre formas. Sin embargo, la extracción de la transformada de Hough es costosa computacionalmente. Otra aproximación basada en formas no analíticas son los **descriptores de forma de Fourier** [21]. Sin embargo, para utilizar los descriptores de Fourier, y la transformada de Hough generalizada es necesario que las formas sean curvas cerradas. Otro detalle a considerar es que la forma de varios espermatozoides puede coincidir en una misma imagen. De hecho, se observa que tienden a enrollarse formando un círculo.

Dado que la forma no es un descriptor válido por sí mismo, se ha optado por basarse en la posición. En los vídeos tratados en este proyecto, la cámara es estática.

La posición de un mismo espermatozoide puede estimarse a lo largo del vídeo. Por ello, la decisión final ha sido la de definir los espermatozoides como una lista de puntos en la imagen. Para representar todos de una manera similar, se ha elegido utilizar como descriptor del espermatozoide un número determinado de l puntos. Estos puntos estarán ordenados según el camino que sigue el espermatozoide en la imagen, y estarán repartidos uniformemente por la curva.

Estas representaciones requieren separar los espermatozoides que presenten solapamientos. Existen trabajos previos con distintos tipos de imágenes al de microscopio [22]. Dicha separación se realiza en base al esqueleto de la imagen. Existen múltiples algoritmos de adelgazamiento para obtener el esqueleto. En primer lugar se utilizó el morfológico. Los esqueletos devueltos son inexactos y con irregularidades presentes. Por ello, se consideró utilizar el algoritmo de Zhang-Suen [23]. Aunque esta alternativa presenta mejores resultados, el esqueleto sigue presentando irregularidades. Además, en la imagen devuelta se genera una 8-vecindad mayor que 2 en un punto sin intersecciones entre esqueletos. Por ello, finalmente se ha utilizado el algoritmo de Guo-Hall [24]. Este es más costoso en tiempo, pero genera mejores resultados. Dado que el tiempo de ejecución no tiene ninguna restricción en el proyecto, se ha aceptado la última variante. Existe una versión mejorada del algoritmo de Guo-Hall [25]. No obstante, por cuestiones de implementación, se decidió utilizar su versión sin mejorar (véase la sección 4.2.2).

4.2. Grafo morfológico

Como resultado de la segmentación por capas de la imagen, se conocen los píxeles pertenecientes al fondo y los pertenecientes a los espermatozoides. Esta información está representada como una proyección de la posición de los espermatozoides en la imagen. Se requiere la posición de los espermatozoides dada la imagen para poder realizar la detección y clasificación.

La extracción del grafo morfológico transforma la imagen por capas a un grafo, un tipo de dato más manejable para un computador.

4.2.1. Definición del grafo morfológico

El grafo morfológico se trata de un grafo no dirigido no conexo G . Los vértices V representan los extremos de los espermatozoides, o de cruce entre segmentos de espermatozoides. Las aristas E del grafo representan los segmentos de cuerpos de espermatozoides, desde un vértice a otro. Un espermatozoide s estará representado por una o varias aristas $E_s = \{e_1, e_2 \dots e_n\} \in E$. Por la definición de una arista en un grafo,

cada espermatozoide está formado por dos o más vértices $V_s = \{v_1, v_2 \dots v_m\} \in V$ tal que para todo vértice v_i , al menos una de sus aristas incidentes e_j , pertenece a E_s . Tanto vértices como aristas pueden pertenecer a varios espermatozoides.

La definición del grafo permite conocer la posición y relación relativa entre los segmentos de espermatozoides. Para mantener información de la longitud y de la posición de cada segmento, tanto aristas como vértices se etiquetan con un vector de puntos $\{p_1, p_2, \dots p_n\} \in P$, siendo P todos los puntos en el rango de la imagen. La etiqueta representa en una arista los píxeles que sigue el segmento de espermatozoide que representa. En un vértice representa la posición del extremo o cruce de segmentos.

Una arista puede estar marcada como solapamiento si tiene una elevada probabilidad pertenecer a dos o más segmentos de espermatozoides.

4.2.2. Extracción del grafo morfológico de las capas

En esta subsección se explica cómo se extrae el grafo morfológico de las capas devueltas por la segmentación.

La implementación del grafo se realiza variando la representación de grafos de lista de adyacencia. Cada vértice mantiene una lista de punteros de las aristas que llegan al mismo. Por su parte, las aristas mantienen dos punteros, hacia los dos vértices que las contienen.

Obtención del esqueleto

La anchura de un espermatozoide de un zángano de abeja apenas es relevante para conocer su movimiento. Se aplica un algoritmo de adelgazamiento para obtener el esqueleto de los espermatozoides. La entrada del algoritmo será la imagen por capas, excluyendo el fondo.

Como algoritmo de adelgazamiento, se utiliza Guo-Hall [24]. Tanto los algoritmos de Zhang-Suen y de Guo-Hall se encuentran implementados en el paquete *opencv-contrib* de OpenCV. La versión mejorada del algoritmo de Guo-Hall [25] requiere una implementación adicional. Como los resultados del algoritmo de Guo-Hall sin mejorar se consideran suficientes, se ha decidido no dedicar tiempo a implementar su versión mejorada.

Extracción de vértices

La extracción de vértices comienza encontrando los puntos de interés de la imagen esqueleto S . Se define la función $\text{NC}(x)$ donde x sería una imagen cualquiera tal que:

$$\text{NC}(x) = K_{8n} \otimes x, \quad K_{8n} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}, \quad (4.1)$$

donde K_{8n} representa un kernel. La operación $\text{NC}(S)$ devuelve el número de vecinos para cada píxel del esqueleto.

Se define como punto de interés todo aquel punto $s \in S$, siendo s un píxel blanco del esqueleto, que cumpla alguna de las siguientes condiciones:

1. $\text{NC}(s) = 1$
2. $\text{NC}(s) > 2$

Los puntos de interés que cumplen con la condición 1 son considerados extremos. Aquellos que cumplen la condición 2 serán considerados intersecciones entre dos o más segmentos de espermatozoides. Se define para cada tipo de punto dos matrices booleanas: I_x para extremos y I_c para intersecciones. El valor en una posición será verdadero si el punto situado en la misma posición del esqueleto es punto de interés.

Pueden detectarse cruces de segmentos muy próximos entre sí. Los segmentos entre estos cruces no contienen suficiente información. En la imagen original estos cruces podrían corresponder a una misma intersección entre espermatozoides. Por ello, se aplica una dilatación de I_c , con un kernel circular K_c :

$$A_c = I_c \oplus K_c, \quad K_c = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}, \quad (4.2)$$

donde A_c representa ahora las áreas de interés de cruces de espermatozoides. La función *findContours()* de *OpenCV* extrae de A_c los contornos de cada uno de los ahora considerados vértices de tipo cruce. La función *argwhere()* de *NumPy* sobre I_x , buscando aquellos valores verdaderos, devuelve la posición de cada uno de los vértices considerados extremos.

Los vértices obtenidos se ordenan en un vector de vértices V , situando primero los vértices extremo, y a continuación los vértices de intersección.

Seguimiento de las aristas

Una arista parte de un vértice origen, siguiendo la línea del esqueleto. El seguimiento de la línea del esqueleto se realiza según el algoritmo 1. Los puntos en un segmento tienen

solo dos vecinos, dadas las condiciones de los puntos de interés descritas anteriormente. En consecuencia, el algoritmo siempre continuará desde un vecino hacia el otro, hasta encontrar un vértice final.

Algoritmo 1 Seguimiento de un segmento P de un espermatozoide desde el origen p_0 por el esqueleto S

Ensure: $P \leftarrow (p_0, p_1, \dots, p_n)$

$D \leftarrow \text{copy}(S)$

$p \leftarrow p_0$

$i \leftarrow 0$

$P \leftarrow []$

repeat

$D[p] \leftarrow \text{false}$

for all $n_j \in 8\text{-neighbor}(p)$ **do**

if $D[n_j]$ **then**

$p = n_j$

end if

end for

$P[i] \leftarrow p$

$i \leftarrow i + 1$

until $p \in I_c$ **or** $p \in I_x$

El problema radica ahora en la selección de los puntos origen. Los vértices extremo son simples; el vértice es tan solo un punto, y únicamente tiene un vecino. Para los vértices de intersección de segmentos se aplican las siguientes operaciones:

$$I_{c'} \leftarrow I_c \oplus K_c$$

$$C \leftarrow I_{c'} \wedge S \wedge \neg I_c$$

resultando C , una matriz cuyas posiciones con valor verdadero son los puntos de la imagen candidatos a ser orígenes de segmentos. Si entre los 8-vecinos del candidato se encuentra algún píxel del esqueleto que sea vértice, se considera un origen válido.

Se extraen los orígenes de todos los vértices, y de ellos, las aristas. Las aristas extraídas se clasifican según sean simples o solapamientos. Si se dispone de la información de la capa de solapamientos devuelta por la segmentación, se superponen los distintos segmentos de las aristas sobre la imagen de capas. Cada segmento se clasifica entonces como solapamiento si cumple las siguientes condiciones:

1. Ambos vértices que contienen el segmento son intersecciones entre espermatozoides.
2. Si disponiendo de la capa de solapamiento, el segmento contiene más píxeles de solapamiento que simples

De no disponer de la capa de solapamiento, solamente habría de satisfacerse la condición 1.

4.3. Extractor de forma de espermatozoides

El grafo morfológico contiene los segmentos de los espermatozoides divididos en aristas. El sistema debe encargarse de agrupar y separar las aristas para conseguir la forma de espermatozoides completos. El extractor de forma de espermatozoides se encarga de esta tarea, devolviendo una lista de los posibles espermatozoides dado un grafo morfológico. Este es el último paso que trata cada fotograma de manera independiente, y es capaz de devolver una estimación con tan solo una imagen.

La agrupación y separación de segmentos se realiza en otros proyectos de visión por computador [22]. Al separar este componente del componente de extracción del grafo morfológico se facilita la integración de futuras implementaciones del extractor.

4.3.1. Predicción de forma de un espermatozoide

Para extraer un espermatozoide s , se parte de un grafo morfológico G . Dicho grafo contiene $\{e_1, e_2, \dots, e_n\} = E$ aristas, y $\{v_1, v_2, \dots, v_m\} = V$ vértices. Se sabe que cada arista e del grafo G corresponde a un segmento de un espermatozoide. También se conoce que tanto extremos de espermatozoides como cruces de los mismos en la imagen corresponden a un vértice v en G . Por consiguiente, un espermatozoide será una consecución de aristas del grafo, hasta llegar a un vértice final. Dado que la generación del grafo proviene de una esqueletización de la imagen, puede perderse información de segmentos muy cortos. En el grafo, dichos segmentos partirían de un cruce de espermatozoides hasta un vértice final muy próximo.

Así, se define s' como la predicción de la curva que sigue el espermatozoide s . Siendo $E_{s'} \in E$ y $V_{s'} \in V$ subconjuntos de aristas y vértices respectivamente que definen la curva mencionada, E_{v_a} las aristas que llegan al vértice v_a , y V_{e_b} los vértices que contienen a la arista e_b , se definen las siguientes condiciones:

$$\{e_j, e_k\} \in E_{s'} \rightarrow \forall e_i \in E_{s'} \setminus \{e_j, e_k\}, \exists \{e_l, e_m\} \in E_{s'}, V_{e_l} \cap V_{e_i} \neq \emptyset \wedge V_{e_i} \cap V_{e_m} \neq \emptyset, \quad (4.3)$$

$$\{v_j, v_k\} \in V_{s'} \rightarrow \forall v_i \in V_{s'} \setminus \{v_j, v_k\}, \exists v_l \in V_{s'}, E_{v_i} \cap E_{v_l} \neq \emptyset, \quad (4.4)$$

Estas condiciones implican una continuidad recorriendo el grafo para deducir la forma de un espermatozoide. Todas los vértices deben ser alcanzables entre sí. De esta conclusión, la forma seguida por un espermatozoide se extrae partiendo de una arista aleatoria que no pertenezca ya a un espermatozoide. Se seleccionará una arista adyacente de cada vértice que contiene la arista inicial. La selección de arista se realiza

acorde al valor explicado en la subsección 4.3.2. Aquella arista que maximice dicho valor será la elegida para continuar con la forma del espermatozoide.

Tomando los nuevos vértices de las dos nuevas aristas, se repite el mismo proceso. Cuando un vértice es final y no contiene más aristas, o ninguna arista supera un umbral mínimo con su valor de selección, se considera un punto final del espermatozoide.

El algoritmo es voraz, estableciendo como espermatozoide aquellas aristas que maximicen el valor de selección en el momento en el que se alcance uno de sus vértices. Al finalizar la selección de todas las aristas, se combinan todas las etiquetas de las mismas. Se genera así una lista de puntos que recorre la forma del espermatozoide. El cardinal de dicha lista varía según la longitud del espermatozoide. Para presentar un resultado normalizado, se seleccionan 16 puntos de la lista, incluyendo el primero y el último, uniformemente distribuidos por la lista. Estos puntos describen la posición predicha del espermatozoide.

En el momento en el que todas las aristas pertenecen al menos a un espermatozoide, se dejan de buscar nuevos espermatozoides, y se devuelve una lista de todos los espermatozoides encontrados.

4.3.2. Valor de selección de aristas

El algoritmo detallado anteriormente de extracción de forma de espermatozoides depende del cálculo del valor de selección. Modificar dicho cálculo tiene efecto al tomar un camino u otro en el grafo.

Los puntos de decisión son aquellos en los que hay un cruce de espermatozoides. La arista más probable sera aquella que siga con mayor constancia el camino previo: se busca la arista con mayor continuidad para la forma del espermatozoide.

Para una arista $e \in E$ y un vértice $v \in V$, donde v es uno de los vértices que contiene a e , se define el ángulo de incidencia $\Theta_{e,v}$ de la arista e al vértice v , y el valor de curvatura c_e de la arista e . El cálculo de $\Theta_{e,v}$ es realizado tomando los últimos 9 puntos de la etiqueta en dirección al vértice, calculando su primera derivada, realizando una media, y obteniendo el valor en radianes gracias a su arco-tangente. c_e se calcula con la ristra de puntos de la etiqueta completa, calculando la segunda derivada y realizando su media. Se obtiene la evolución media de un punto respecto al siguiente.

Tanto el ángulo como la curvatura se calculan también para la forma predicha del espermatozoide cuando encuentra un vértice. El ángulo de incidencia se extrae de la misma manera que las aristas, con el mismo número de puntos. Dado que una arista de solapamiento puede tener varias posibles salidas al alcanzar un vértice, la curvatura del espermatozoide se obtiene de manera distinta cuando se encuentra una arista de este tipo. La curvatura se obtiene como una media entre la curvatura de la arista de

solapamiento, y la que tuviera anteriormente la predicción espermatozoide. En caso de que la última arista añadida fuera un no solapamiento, se toma la curvatura de la arista.

El ángulo de entrada al vértice por parte de la arista de solapamiento es la media entre todos los segmentos de entrada de la imagen original. El criterio de selección entonces será la similitud entre curvaturas de las aristas y la forma del espermatozoide.

A parte de la continuidad, hay dos casos que se quieren evitar: paso excesivo de todos los espermatozoides por una arista, evitando otras; y no considerar aristas de las que se tiene poca información. Para el primer caso, se ha definido una función cuyo valor depende del número de veces que se ha utilizado una arista para algún espermatozoide. La función se basa en la función de densidad de distribución de la distribución exponencial, con parámetro $\lambda = 0,6$:

$$R(e_i) = \lambda e^{-\lambda r_{e_i}}, \quad (4.5)$$

donde r_{e_i} es el número de veces que la arista e_i ha sido utilizada para algún espermatozoide, y e es el número de Euler para la ecuación 4.5. Esta función decrementa el valor devuelto a medida que crece r_{e_i} , pero sin devolver valores próximos a 0 con altos valores de r_{e_i} (véase la figura 4.1).

El segundo caso consiste en fomentar los valores de aquellas aristas cortas, cuyos valores c_e y $\Theta_{e,v}$ se hayan extraído incorrectamente. Se define como:

$$L(e) = \max \left(1, \frac{9}{|p_e|} \right), \quad (4.6)$$

donde p_e es la lista de puntos de la arista e , y 9 el número de puntos para extraer $\Theta_{e,v}$.

Con estas definiciones, se define el valor de selección $B(s, e)$, dado el camino del espermatozoide s , y la arista e , donde v es el vértice donde ambas curvas coinciden, como:

$$B(s, e) = \left(\left(1 - \frac{|\Theta_{e,v} - \Theta_{s,v}| - \pi|}{\Theta_{max}} \right) + \left(1 - \frac{(c_e - c_s)^2}{c_{max}} \right) \right) L(e) R(e), \quad (4.7)$$

donde Θ_{max} y c_{max} son los máximos valores permitidos en la diferencia entre ángulos y entre continuidades. En el proyecto se utilizan $\Theta_{max} = \pi/4$ y $c_{max} = 0,1$. Se ha añadido una condición, en caso de que cualquiera de las diferencias entre Θ o c supere los valores máximos, se devuelve el valor -1.

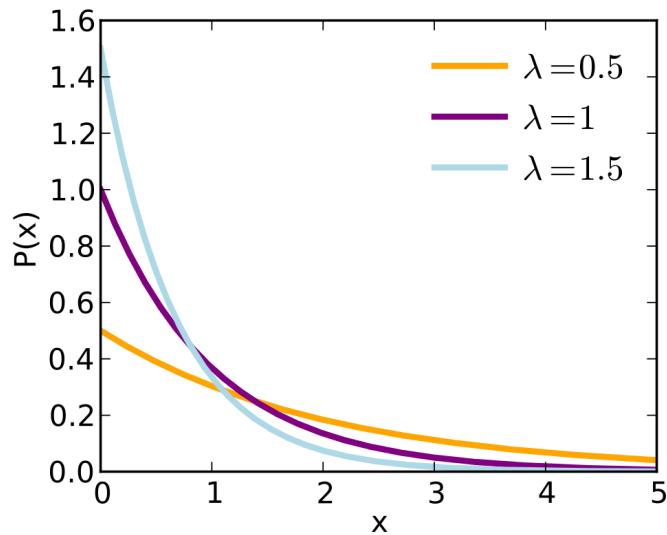


Figura 4.1: Función de densidad de probabilidad de la distribución exponencial con distintos parámetros de λ . Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Distribuci%C3%B3n_exponencial

4.4. Funcionamiento entre fotogramas: corrector y clasificador

Con varios fotogramas del mismo vídeo se obtiene redundancia y un componente temporal. La redundancia viene dada por la existencia de un mismo espermatozoide en varios fotogramas del propio vídeo. Si existe en el fotograma actual, existirá en el siguiente, a no ser que salga de plano. El componente temporal existe dado el tiempo transcurrido entre dos fotogramas. Utilizando estas dos nuevas características, se puede conseguir una corrección en la detección de los espermatozoides, así como un seguimiento del movimiento de los mismos a lo largo del tiempo. El seguimiento permitirá posteriormente realizar una clasificación según la movilidad.

En esta sección se explica el módulo encargado de realizar la corrección y el seguimiento de los distintos espermatozoides. En primer lugar se realiza un emparejamiento entre los fotogramas para detectar los espermatozoides *correctos*. Con dichos emparejamientos, se realizan los cálculos pertinentes para realizar un seguimiento. Finalmente se realiza un filtrado final para eliminar aquellos que no pasen los criterios definidos.

4.4.1. Emparejamiento entre fotogramas

Se consideran dos fotogramas A y B consecutivos del vídeo $v_1, v_2, \dots, v_n = V$, tal que $A = v_i$ y $B = v_{i+1}$ para un momento determinado i . Con el extractor de forma

de los espermatozoides, se pueden extraer S_A y S_B , los conjuntos de espermatozoides predichos en cada imagen A y B respectivamente.

En la sección 4.3.1, se especifica que un espermatozoide es una lista de 16 puntos en el plano. Dado que la posición entre dos fotogramas de un mismo espermatozoide será muy similar en dos fotogramas consecutivos, se utiliza la distancia euclídea al cuadrado entre las dos listas de puntos. Se calculará la distancia punto a punto entre las dos predicciones de posición. Debido al proceso de extracción del grafo morfológico, es posible que una de las dos listas esté en orden invertido perteneciendo al mismo espermatozoide. Por ello, se define la distancia entre predicciones de espermatozoides como:

$$s_x - s_y = \min \left(\sum_{j=1}^l (\|s_x[j] - s_y[j]\|_2)^2, \sum_{j=1}^l \|s_x[j] - s_y[l+1-j]\|_2^2 \right), \quad (4.8)$$

donde s_x , s_y son dos predicciones de espermatozoides, y l es la cantidad de puntos que los definen, 16 en este proyecto.

Volviendo a los dos conjuntos de predicciones de espermatozoides S_A y S_B , se define un conjunto de emparejamientos $M_{A,B}$. Un emparejamiento está compuesto por dos predicciones que cumplen:

$$s_i \in S_A, s_j \in S_B, m_{i,j} = \{s_i, s_j\}, m_{i,j} \in M_{A,B} \iff s_i - s_j < \epsilon, \quad (4.9)$$

donde ϵ es un error máximo cuyo valor es un área de $l * 225 = 3600$ píxeles al cuadrado.

Todas las predicciones que cumplen la condición 4.9 pertenecen a $M_{A,B}$. Dicho conjunto contiene todos los emparejamientos encontrados entre las predicciones de los fotogramas A y B .

4.4.2. Consideración temporal en emparejamientos

Los emparejamientos de la forma predicha de los espermatozoides se realizan entre distintos fotogramas. Tomando el número de fotograma al que pertenece, puede extraerse información temporal. Dado un emparejamiento de dos predicciones de espermatozoides, se extrae su velocidad lineal, y dadas tres o más predicciones, su velocidad lineal y aceleración.

Dadas las predicciones de su forma $\{s_1, \dots, s_n\}$, y $\{t_1, \dots, t_n\}$ el momento (o fotograma) del que se ha extraído, siendo t_i el momento en el que se ha extraído

s_i se define:

$$v = \left(\sum_{i=1}^{n-1} \frac{s_{i+1} - s_i}{t_{i+1} - t_i} \right) \frac{1}{n-1}, \quad (4.10)$$

$$a = \left(\sum_{i=1}^{n-2} \left(\frac{s_{i+2} - s_{i+1}}{t_{i+2} - t_{i+1}} - \frac{s_{i+1} - s_i}{t_{i+1} - t_i} \right) \frac{1}{t_{i+1} - t_i} \right) \frac{1}{n-2}, \quad (4.11)$$

siendo v la velocidad lineal media del espermatozoide, y a su aceleración media. Obsérvese que para la implementación puede crearse un vector v' donde cada elemento es la velocidad en un momento determinado, y utilizar este para definir a , reduciendo el número de operaciones.

Con la velocidad y aceleración de cada emparejamiento se define una nueva comparación entre emparejamientos. Consiste en predecir la posición de cada emparejamiento en un momento determinado, y posteriormente compararlos según la fórmula 4.8 de la subsección 4.4.1.

Para predecir la posición de un emparejamiento, se selecciona un tiempo determinado. Dadas su velocidad y aceleración medias, se calcula la posición en dicho tiempo para cada predicción contenida en el emparejamiento. La media en las posiciones obtenidas es la posición del espermatozoide del emparejamiento en ese determinado momento.

4.4.3. Ejecución general y filtrado final

Este componente se ejecuta al final, con la información extraída por el extracto de forma de espermatozoides de los primeros fotogramas. El número de fotogramas que se utiliza por defecto es 7, pero este valor puede ser modificado por el técnico. De cada fotograma se extrae una predicción de forma de los distintos espermatozoides, y posteriormente se extraen los emparejamientos simples entre dos fotogramas consecutivos, según la subsección 4.4.1. Todos los emparejamientos obtenidos se comparan según lo definido en la subsección 4.4.2. Si la comparación devuelve un valor de error menor que el utilizado en la fórmula 4.9, se combinan los dos emparejamientos. Para ello, se combinan predicciones de forma de espermatozoides de ambos emparejamientos, omitiendo repeticiones de aquellos que pertenezcan al mismo fotograma. Posteriormente se calcula la velocidad (fórmula 4.10) y aceleración (fórmula 4.11) del emparejamiento. Esta etapa de comparación-combinación se repite con todos los emparejamientos hasta que no haya ninguna actualización.

Completada la ejecución, se tiene una lista de emparejamientos. Los emparejamientos sirven como resultado del sistema. Mediante ellos, se corrigen posibles errores de la extracción de la información de un simple fotograma. Además, se realiza un seguimiento a lo largo del tiempo, dada la consideración de su componente temporal.

El final del análisis se completa con un filtrado de los emparejamientos. En primer lugar se toman aquellos emparejamientos que se han visto en al menos 3 fotogramas. El técnico indicará los valores mínimos de longitud y movimiento. Estos valores permiten filtrar los emparejamientos según la longitud de las predicciones, y clasificar según su velocidad y aceleración respectivamente. Del conjunto resultante, se calcula la salida acordada y se devuelve al técnico.

Capítulo 5

Metodología

Esta sección presenta la metodología seguida en el proyecto, las herramientas utilizadas, las imágenes de prueba utilizadas como entrada del sistema, las métricas usadas para la evaluación del sistema y por último el cronograma.

En la fase de diseño, el sistema se dividió a cuatro subproblemas: preprocesamiento de la imagen, segmentación, detección de objetos y clasificación. Se reduce de este modo la complejidad del problema inicial a varios de menor tamaño.

El prototipo inicial se ha generado de manera modular, donde cada módulo corresponde a uno de los subproblemas mencionados. Cada módulo es independiente al resto. Por ese motivo, el diseño, implementación y evaluación de un módulo se establece como una etapa del proyecto. Al finalizar un módulo, se comienza con el siguiente, hasta que se genera el sistema prototípico inicial.

Tras la implementación de todos los módulos, se realiza una metodología iterativa sobre el prototipo resultante. La iteración comienza entregando el prototipo a los técnicos que utilizarán el sistema. Tras realizar pruebas, los técnicos proveen una retroalimentación para corregir y añadir más funcionalidades al prototipo. La retroalimentación indica el comienzo de la siguiente iteración, marcando nuevos objetivos de diseño e implementación.

5.1. Entorno de desarrollo

En esta sección se describe el entorno de trabajo utilizado para la implementación y documentación del sistema.

- **Python:** lenguaje de programación interpretado. Se ha utilizado este lenguaje para implementar todo el sistema. Los motivos subyacen en su legibilidad, la facilidad para gestionar estructuras complejas de datos, y en el alto soporte que presenta mediante actualizaciones y librerías. Es una herramienta muy utilizada para el prototipado.

- **OpenCV** (Open Computer Vision): biblioteca libre que ofrece soporte para tratamiento de imágenes y visión por computador. Está disponible para C++ y Python. La gran cantidad de documentación y la existencia de funciones adicionales creadas por terceros, como por ejemplo, OpenCV-contrib, han sido determinantes para el uso de esta biblioteca.
- **NumPy**: biblioteca para Python que da soporte para el tratamiento de vectores, matrices multidimensionales y funciones matemáticas de alto nivel. Permite ahorrar tiempo de implementación, a la vez que hace el código más legible.
- **Visual Studio 2019**: entorno de desarrollo integrado que permite la edición, depuración y evaluación de aplicaciones en Python.
- **GitHub**: repositorio para control de versiones del código de manera distribuida [26].
- **Overleaf**: entorno para la edición colaborativa de documentos en formato LaTeX [27].

5.2. Captura de las imágenes a analizar

En la captura de las imágenes se utilizó un microscopio Olympus IX40 con un objetivo de contraste de fases negativo de $10x$, una pletina termostatizada a 35°C y una cámara Makler como soporte de las muestras. Las secuencias de vídeo se capturaron con una cámara ISAS USB3 controlada desde un ordenador con el programa ISAS v1. Las imágenes se grabaron con una resolución de 1439×1079 píxeles, una escala de $0,59 \mu\text{m/píxel}$ y a 25 fotogramas por segundo (fps) en secuencias de 2 segundos.

5.3. Métricas

Se han definido dos métricas para la evaluación general del sistema:

- Número total de espermatozoides de cada imagen: cantidad de espermatozoides que aparece por completo en una imagen sin que ninguna parte salga de plano.
- Número de espermatozoides móviles: cantidad de espermatozoides que aparece por completo en una imagen con algún movimiento claramente apreciable en la secuencia de imágenes.

5.4. Cronograma

Se muestra en la tabla 5.1 el diagrama de Gantt con las distintas etapas del proyecto, las horas dedicadas de manera aproximada, y su distribución temporal en meses. Cada etapa exceptuando la de documentación está formada por un ciclo de lectura de documentación, diseño, implementación, y evaluación. Obsérvese que la documentación se realizó de manera parcial al finalizar la etapa de segmentación y de extractor de espermatozoides. Posteriormente, se avanzaba la documentación mientras se esperaba la retroalimentación en las distintas iteraciones con el grupo BIOFITER.

Tarea	Horas	Mes										
		En	Fe	Mr	Ab	My	Jn	Jl	Ag	Se	Oc	No
Preprocesamiento	100											
Segmentación	160											
Grafo morfológico	100											
Extractor de espermatozoides	200											
Corrector y clasificador	130											
1 ^a iteración con el grupo Biofilter	60											
2 ^a iteración con el grupo Biofilter	30											
3 ^a iteración con el grupo Biofilter	20											
4 ^a iteración con el grupo Biofilter	20											
Documentación	100											
Total	820											

Tabla 5.1: Diagrama de Gantt del trabajo realizado en el proyecto por parte del estudiante

Capítulo 6

Resultados

En este capítulo se presentan los resultados de la pruebas más relevantes realizadas a lo largo del proyecto.

La evaluación realizada solo considera aspectos de funcionalidad. Al ser un prototipo, la eficiencia en tiempo de ejecución y uso de memoria no se ha considerado relevante. Además, no se ha indicado ninguna restricción en términos de eficiencia.

En este capítulo se muestran los resultados de dos pruebas intermedias del sistema, y una evaluación final del análisis de varios vídeos. Las dos pruebas intermedias consisten en el análisis de la segmentación, y el análisis de la extracción de forma. Estas evaluaciones corresponden a las pruebas de desarrollo que se realizaron a lo largo de la creación del prototipo, al finalizar la implementación del módulo de segmentación, y el de corrección y clasificación respectivamente.

6.1. Segmentación

En las imágenes de la figura 6.1 se observan fotogramas de distintos vídeos de entrada, y el resultado de su segmentación. Se puede apreciar en las imágenes como se separa la capa de fondo de las otras dos más relevantes de espermatozoide y cruce de espermatozoides. Las partículas de suciedad presentes en las muestras son incluidas en las capas de los espermatozoides. Al tratarse de segmentación basada en el color, no puede evitarse incluir estos elementos en las capas útiles.

En conjunto, las capas de solapamiento de espermatozoides y de espermatozoides simples abarcan todo el área perteneciente a los espermatozoides. No obstante, la capa de solapamiento de espermatozoides, en rojo en las imágenes de la figura 6.1), abarca parte del solapamiento simple, como se aprecia en las imágenes (d) y (j). El centro de la capa está más cercano al color del espermatozoide simple (véase la sección A). Esto ocurre en imágenes con poca área de solapamientos. Escenas con espermatozoides formando bucles, o con alta densidad de los mismos contienen mayor área de solapamiento. El algoritmo

de clúster agrupa los píxeles por el valor de su color. Si el valor de color buscado tiene poca presencia en la imagen, este se ajustará más próximo a otro valor. Por este motivo, la capa de solapamiento se utiliza como indicador de posible solapamiento. Solo existen solapamientos en la capa de solapamiento, y no en la de espermatozoide simple.

La imagen (b) de la figura 6.1 muestra el resultado del clúster tras haber fallado al encontrar tres capas. El sistema ha utilizado solamente la capa de fondo y de espermatozoide para la segmentación. Se observa como el clúster separa el área de espermatozoide del área de fondo.

6.2. Detección de forma

La evaluación de la detección de forma se ha realizado observando el resultado del extractor de forma de espermatozoides, y la salida tras la corrección con múltiples fotogramas. Se recuerda que el extractor de forma de espermatozoides funciona con cada fotograma de manera independiente.

En las imágenes de la figura 6.2 se exponen de izquierda a derecha varios vídeos de entrada, y de arriba a abajo el primer, cuarto y séptimo fotograma utilizado para la clasificación, cuyo resultado se muestra en la cuarta fila.

El extractor de forma por fotogramas es un algoritmo voraz que busca conectar los dos segmentos con mayor continuidad cuando se encuentra con un cruce (véase sección 4.3). En un cruce, el extractor puede seleccionar otro segmento incidente de espermatozoide, si el ángulo de cruce es pequeño. Se pueden generar extracciones de forma erróneas de espermatozoides. En las imágenes de las tres primeras filas de la figura 6.2 se observan ejemplos de ello, donde la forma de espermatozoides en bucle, o las formas de dos espermatozoides cruzándose no es detectada correctamente. Al ser formas que no corresponden a ningún espermatozoide, en siguientes fotogramas se extraen otras distintas. Estas formas erróneas e inestables entre fotogramas son desechadas por el corrector descrito en la sección 4.4. En consecuencia, algunos espermatozoides no son considerados en la salida, como se aprecia en las imágenes de la última fila de la figura 6.2. Las formas de aquellos espermatozoides que se encuentran aislados, sin bucle, o cruzándose en un ángulo más perpendicular con otros espermatozoides se extraen de manera mucho más estable. En consecuencia, el corrector es capaz de definir de dichas formas como correctas.

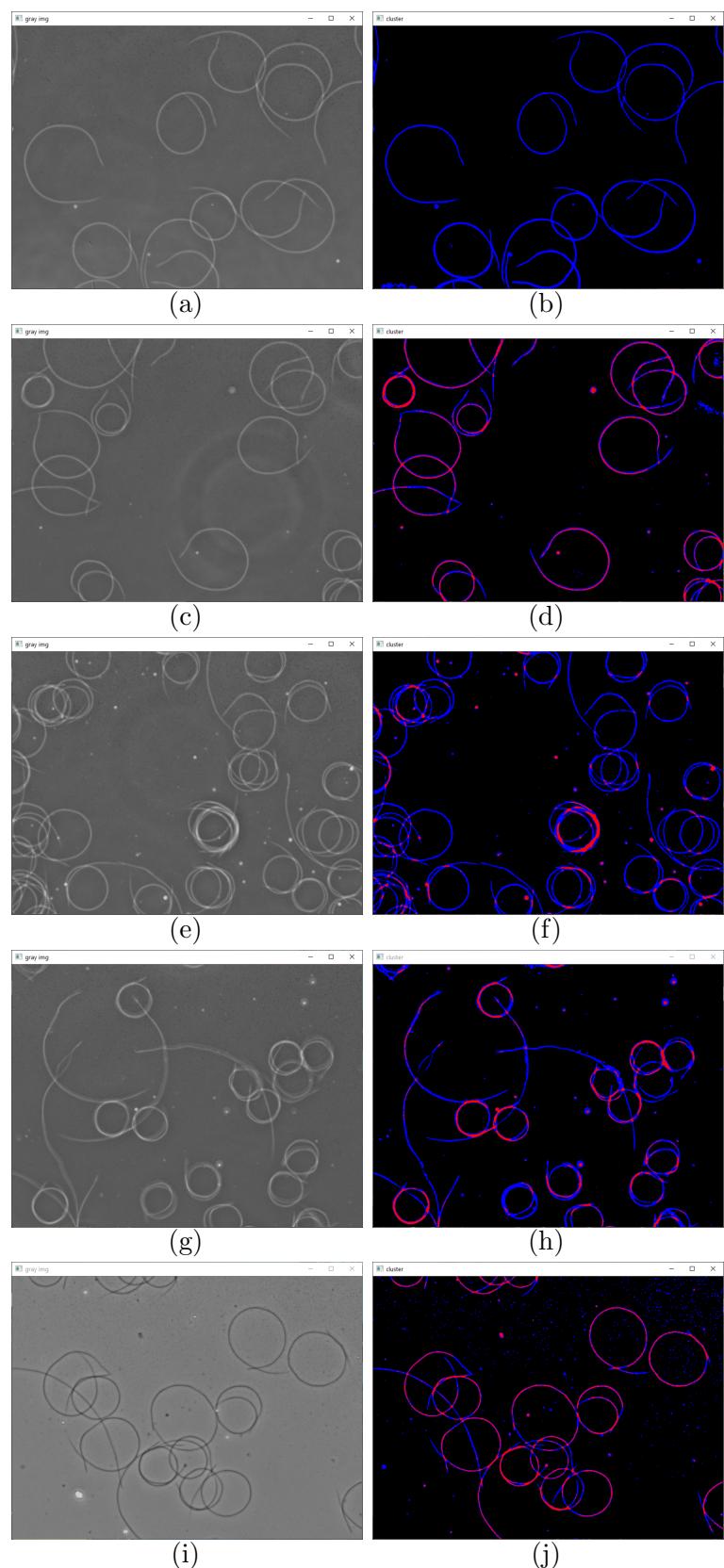


Figura 6.1: Resultados de la segmentación. Columna izquierda: imágenes de entrada. Columna derecha: imágenes segmentadas en tres capas tras su normalización: (1) fondo en negro, (2) espermatozoide en azul, (3) cruce de espermatozoides en rojo.

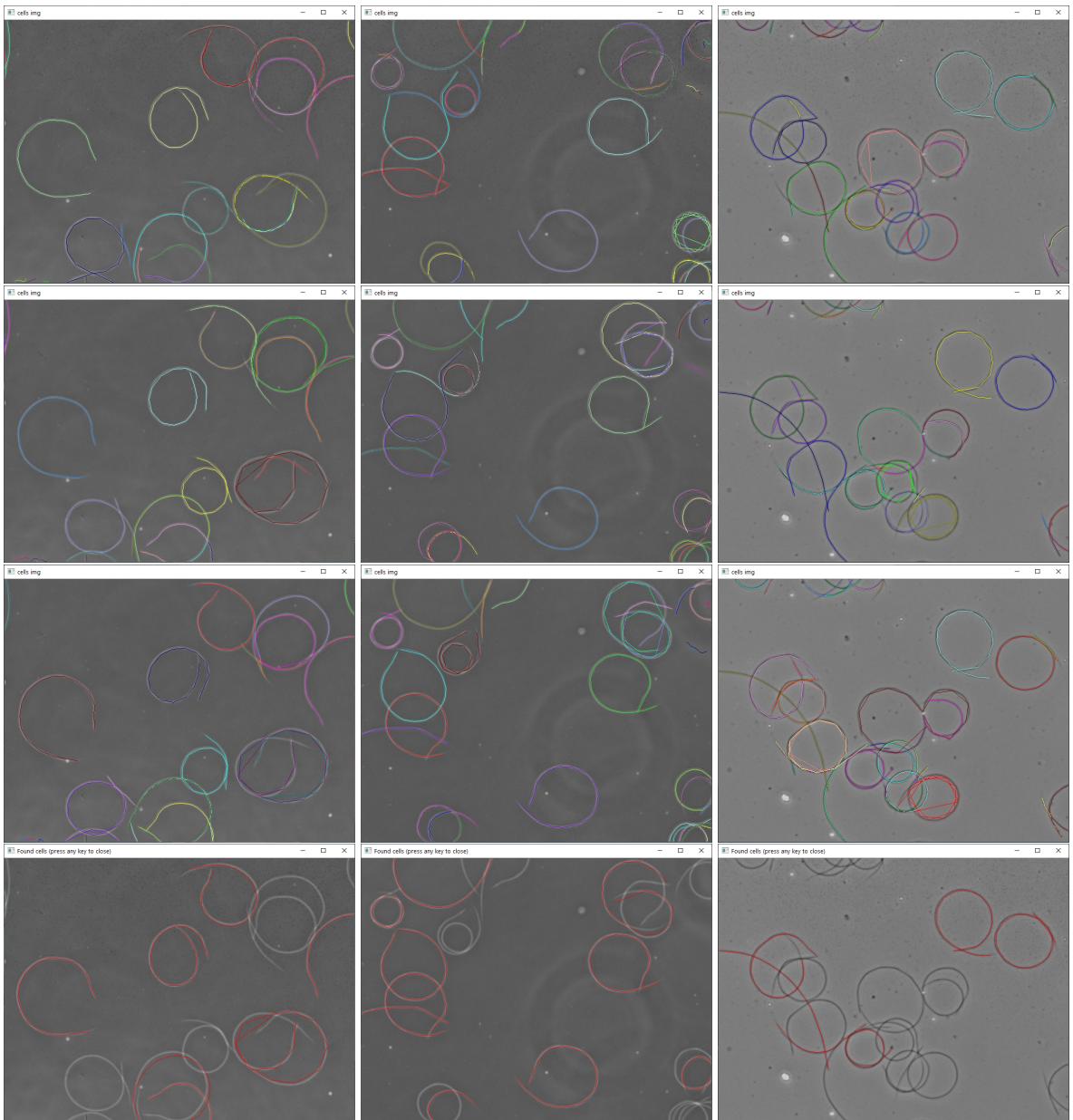


Figura 6.2: Resultados del detector de espermatozoides. Filas primera, segunda y tercera: salida del detector de forma de espermatozoides en el primer, cuarto y séptimo fotograma; última fila: células filtradas, después del emparejamiento entre fotogramas. En las imágenes de las tres primeras filas, cada espermatozoide detectado se marca con un color distinto. En la última fila, se marcan en rojo todos los espermatozoides encontrados.

6.3. Evaluación del análisis del vídeo

Se han analizado una batería de vídeos de forma automática y manual. El resultado se recoge en la tabla 6.1. Partiendo de la evaluación realizada sobre la extracción de forma en la sección anterior, se estimó un número de espermatozoides menor al existente. En la tabla 6.1 se observa que los resultados tienden a confirmar dicha hipótesis. En la mayoría

de casos, el sistema detecta un menor número de espermatozoides, tanto inmóviles como móviles. El sistema tiene mayor precisión en la detección de espermatozoides inmóviles, mientras que es menor en la detección de espermatozoides móviles. Esto puede deberse a una extracción incorrecta de forma. Si las formas detectadas son inmóviles, pueden detectarse incorrectamente en varios fotogramas, y entonces superar el criterio del corrector, como ha ocurrido en los vídeos 2 y 7.

Video ID	Análisis automático		Análisis manual	
	n células	n móviles	n células	n móviles
1	7	6	10	10
2	11	9	9	9
5	7	6	17	14
6	7	3	12	10
7	14	10	14	11
8	6	2	7	4
9	7	3	7	5
10	5	5	11	10
11	5	3	11	10
Total	69	47	98	83

Tabla 6.1: Comparación de los resultados obtenidos por análisis automático y manual.

Capítulo 7

Conclusiones y trabajo futuro

En este capítulo se recogen las conclusiones del proyecto, se sugieren posibles trabajos futuros y se realiza una valoración personal del trabajo.

7.1. Conclusiones

Se ha diseñado, implementado y evaluado un prototipo de sistema software para el análisis automatizado de la movilidad espermática en zánganos. Dada una secuencia de imágenes obtenida por microscopio de semen de la abeja melífera, el sistema detecta y clasifica los espermatozoides según su patrón de movilidad.

El sistema es capaz de analizar secuencias de imágenes de distintas características. La normalización realizada al comienzo del tratamiento de las imágenes hace el análisis independiente del brillo de la escena. Así, el sistema resulta robusto frente a la variabilidad introducida por las condiciones de captura de las imágenes. También destaca la robustez del sistema frente al ruido propio de la imagen. El uso del clúster sFCM soporta una mayor cantidad de ruido de alta frecuencia en la propia imagen.

El sistema ha sido construido desde cero por el alumno. Hasta donde sabemos, es el primer sistema específico para detectar espermatozoides de zángano y obtener parámetros como su movilidad. La precisión de las funcionalidades de detección y clasificación de los distintos espermatozoides se considera válida. Creemos que el prototipo constituye una base sólida sobre la que construir un sistema CASA más preciso y con funcionalidades adicionales para el análisis del semen de la abeja melífera.

Todos los ficheros fuente del código y de esta memoria se encuentran en un repositorio de GitHub¹.

¹<https://github.com/698387/bee-sperm-analysis.git>

7.2. Trabajo futuro

Este proyecto abre nuevas y prometedoras líneas de trabajo.

Los resultados obtenidos indican que el sistema requiere ciertos ajustes para obtener mayor precisión, en concreto la tarea de extracción de componentes. Creemos que mejorando dicho componente, puede mejorar la precisión de los resultados.

Se podrían añadir nuevas funcionalidades al sistema. El carácter modular del prototipo facilita este tipo de trabajos. Por ejemplo, el módulo de corrección y clasificación de espermatozoides podría modificarse para realizar un seguimiento a largo plazo de los distintos espermatozoides en un vídeo. Este seguimiento puede permitir un análisis más detallado del movimiento de los espermatozoides. Un seguimiento correcto ofrece información acerca del comportamiento de la población de espermatozoides. Puede servir en un futuro para encontrar elementos atractivos o repulsivos para estas células.

La eficiencia se ha dejado en segundo plano en este proyecto centrándose en precisión. Sin embargo, un sistema en desarrollo requerirá un tiempo de ejecución de análisis aceptable por los técnicos que utilicen el sistema. Por tanto, se considera conveniente un trabajo futuro dedicado a la optimización del tiempo de ejecución, en forma de vectorización o paralelización del código existente. Los componentes del clúster sFCM y la extracción del grafo deberían ser el objetivo en términos de optimización en tiempo de ejecución.

7.3. Valoración personal

Se considera en general que se han cumplido los objetivos del proyecto. El alumno ha realizado en solitario un trabajo de investigación, siguiendo una metodología propia de ese ámbito. El resultado es un prototipo software que abre nuevas líneas de trabajo para futuros proyectos. Además, el trabajo realizado puede resultar útil en otros entornos de visión por computador.

Bibliografía

- [1] Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández, Amparo Martínez-Salvador, Encarna Garrido-Bailón, Amelia Virginia González-Porto, Aránzazu Meana, José Luis Bernal, María Jesús Del Nozal y José Bernal. «A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain». En: *Environmental Microbiology Reports* 2.2 (2010), págs. 243-250.
- [2] N Bacandritsos, A Granato, G Budge, I Papanastasiou, E Roinioti, M Caldon, C Falcaro, A Gallina y F Mutinelli. «Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies». En: *Journal of Invertebrate Pathology* 105.3 (2010), págs. 335-340.
- [3] Matthias A Becher, Juliet L Osborne, Pernille Thorbek, Peter J Kennedy y Volker Grimm. «Towards a systems approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models». En: *Journal of Applied Ecology* 50.4 (2013), págs. 868-880.
- [4] Jerry J Bromenshenk, Colin B Henderson, Charles H Wick, Michael F Stanford, Alan W Zulich, Rabih E Jabbour, Samir V Deshpande, Patrick E McCubbin, Robert A Seccomb, Phillip M Welch y col. «Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline». En: *PloS one* 5.10 (2010), e13181.
- [5] Jesús L Yániz, Miguel A Silvestre y Pilar Santolaria. «Sperm quality assessment in honey bee drones». En: *Biology* 9.7 (2020), pág. 174.
- [6] Cristina Cortinovis, Fabiola Pizzo, Leon J Spicer y Francesca Caloni. «Fusarium mycotoxins: Effects on reproductive function in domestic animals—A review». En: *Theriogenology* 80.6 (2013), págs. 557-564.
- [7] Sharon T Mortimer. «CASA — Practical Aspects». En: *Journal of Andrology* 21.4 (2000), págs. 515-524.
- [8] Carlos Alquézar-Baeta, Silvia Gimeno-Martos, Sara Miguel-Jiménez, Pilar Santolaria, Jesús Yániz, Inmaculada Palacín, Adriana Casao, José Álvaro Cebrián-Pérez, Teresa Muñoz-Blanco y Rosaura Pérez-Pé. «OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis». En: *PLOS Computational Biology* 15.1 (ene. de 2019), págs. 1-18. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006691. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006691>.

- [9] Jesús Yániz, Carlos Alquézar-Baeta, Jorge Yagüe-Martínez, Jesús Alastraßey-Benedé, Inmaculada Palacín, Sergii Boryshpolets, Vitaliy Kholodnyy, Hermes Gadêlha y Rosaura Pérez-Pe. «Expanding the Limits of Computer-Assisted Sperm Analysis through the Development of Open Software». En: *Biology* 9.8 (ago. de 2020), pág. 207. ISSN: 2079-7737. DOI: 10.3390/biology9080207. URL: <http://dx.doi.org/10.3390/biology9080207>.
- [10] C Alquézar-Baeta, S Gimeno, MJ Santorromán, P Santolaria, J Yániz, A Casao, JA Cebrián-Pérez, T Muino-Blanco, R Pérez-Pé y col. «OpenCASA: an open project for developing open source software oriented to spermatozoa analysis.» En: *XVII Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza, España, 30 y 31 de mayo de 2017* (2017), págs. 398-400.
- [11] Keh-Shih Chuang, Hong-Long Tzeng, Sharon Chen, Jay Wu y Tzong-Jer Chen. «Fuzzy c-means clustering with spatial information for image segmentation». En: *computerized medical imaging and graphics* 30.1 (2006), págs. 9-15.
- [12] John Canny. «A computational approach to edge detection». En: *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence* 6 (1986), págs. 679-698.
- [13] HP Ng, SH Ong, KWC Foong, PS Goh y WL Nowinski. «Medical image segmentation using k-means clustering and improved watershed algorithm». En: *2006 IEEE southwest symposium on image analysis and interpretation*. IEEE. 2006, págs. 61-65.
- [14] Leyza Baldo Dorini, Rodrigo Minetto y Neucimar Jeronimo Leite. «White blood cell segmentation using morphological operators and scale-space analysis». En: *XX Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing (SIBGRAPI 2007)*. IEEE. 2007, págs. 294-304.
- [15] Alexandre Dufour, Vasily Shinin, Shahragim Tajbakhsh, Nancy Guillén-Aghion, J-C Olivo-Marin y Christophe Zimmer. «Segmenting and tracking fluorescent cells in dynamic 3-D microscopy with coupled active surfaces». En: *IEEE Transactions on Image Processing* 14.9 (2005), págs. 1396-1410.
- [16] Bo Zhang, Christophe Zimmer y J-C Olivo-Marin. «Tracking fluorescent cells with coupled geometric active contours». En: *2004 2nd IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: Nano to Macro (IEEE Cat No. 04EX821)*. IEEE. 2004, págs. 476-479.
- [17] Nobuyuki Otsu. «A threshold selection method from gray-level histograms». En: *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics* 9.1 (1979), págs. 62-66.
- [18] James MacQueen y col. «Some methods for classification and analysis of multivariate observations». En: *Proceedings of the fifth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability*. Vol. 1. 14. Oakland, CA, USA. 1967, págs. 281-297.

- [19] Paul VC Hough. *Method and means for recognizing complex patterns*. US Patent 3,069,654. Dic. de 1962.
- [20] Dana H Ballard. «Generalizing the Hough transform to detect arbitrary shapes». En: *Pattern recognition* 13.2 (1981), págs. 111-122.
- [21] Charles T Zahn y Ralph Z Roskies. «Fourier descriptors for plane closed curves». En: *IEEE Transactions on computers* 100.3 (1972), págs. 269-281.
- [22] Nikzad Babaii Rizvandi, Aleksandra Pižurica, Filip Rooms y Wilfried Philips. «Skeleton analysis of population images for detection of isolated and overlapped nematode C. elegans». En: *2008 16th European Signal Processing Conference*. IEEE. 2008, págs. 1-5.
- [23] TY Zhang y Ching Y. Suen. «A fast parallel algorithm for thinning digital patterns». En: *Communications of the ACM* 27.3 (1984), págs. 236-239.
- [24] Zicheng Guo y Richard W Hall. «Parallel thinning with two-subiteration algorithms». En: *Communications of the ACM* 32.3 (1989), págs. 359-373.
- [25] Fen Zhang, Yun-shan Wang, Cheng-yong Gao, Shu-chun Si y Jian-qiang Xu. «An improved parallel thinning algorithm with two subiterations». En: *Optoelectronics Letters* 4.1 (2008), págs. 69-71.
- [26] Pablo Luesia Lahoz. *Bee sperm analysis*. 2020. URL: <https://github.com/698387/bee-sperm-analysis> (visitado 20-11-2020).
- [27] Overleaf. *Overleaf LaTex Online Editor*. 2020. URL: <https://www.overleaf.com/> (visitado 20-11-2020).
- [28] David Arthur y Sergei Vassilvitskii. *k-means++: The advantages of careful seeding*. Inf. téc. Stanford, 2006.

Lista de Figuras

2.1.	Esquema general del sistema	7
3.1.	Ejemplos de preprocesamiento de las imágenes	10
3.2.	Imagen de entrada e histograma	12
3.3.	Ejemplo de segmentación	15
4.1.	Distribución exponencial	27
6.1.	Resultados de la segmentación	37
6.2.	Resultados del detector de espermatozoides	38

Lista de Tablas

5.1. Cronograma	33
6.1. Comparación de resultados obtenidos por análisis automático y manual	39

Anexos

Anexo A

Spatial Fuzzy c-Means (sFCM)

El sFCM realiza un agrupamiento o clustering no supervisado [11]. Este algoritmo calcula la pertenencia difusa de cada muestra a una clase. El algoritmo trata de minimizar de manera iterativa la siguiente **función de coste**:

$$J = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^c u_{ij}^m \|x_i - v_j\|^2, \quad (\text{A.1})$$

donde se puede considerar $X = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ una imagen X de N píxeles, y x_i el valor del píxel i -ésimo, m es una constante, cuyo valor es 2 en el proyecto; c el número de clases, v_j el valor del centro de la j -ésima clase, y u_{ij} el valor de pertenencia del píxel i -ésimo a la clase j -ésima. $\|a\|$ es la aplicación de la norma a a .

La minimización de la función de coste A.1 depende del valor u_{ij} de pertenencia. En concreto, mayor si el píxel x_i es cercano a v_j , y menor cuando es lejano. **El valor de pertenencia representa la probabilidad del píxel de pertenecer a la clase.** Su cálculo sin componente espacial de la imagen se define como:

$$u_{ij} = 1 / \sum_{k=1}^c \left(\frac{\|x_i - v_k\|}{\|x_i - v_j\|} \right)^{2/(m-1)}, \quad (\text{A.2})$$

Los píxeles cercanos tienen una alta probabilidad de pertenecer a la misma clase en una imagen. La agrupación sFCM añade un paso más en función de los píxeles cercanos. Se define una **función espacial** como:

$$h_{ij} = \sum_{k \in NB(x_i)} u_{kj}, \quad (\text{A.3})$$

donde $NB(x_i)$ es una ventana cuadrada centrada en el píxel x_i . La ventana utilizada en el proyecto tiene tamaño 3×3 . Al depender de la información de los vecinos, h_{ij} permite reducir el ruido que pudiera haber en la imagen. El valor se combina con u_{ij}

para extraer una probabilidad de **pertenencia dependiente del espacio próximo del píxel**:

$$u'_{ij} = \frac{u_{ij}^p h_{ij}^q}{\sum_{k=1}^c u_{ik}^p h_{ik}^q}, \quad (\text{A.4})$$

donde las constantes q y p son parámetros para ajustar el agrupamiento.

A partir del valor de los píxeles y con la pertenencia calculada, el **centro de una clase** se define como:

$$v_i = \frac{\sum_{i=1}^N {u'_{ij}}^m x_i}{\sum_{i=1}^N {u'_{ij}}^m}, \quad (\text{A.5})$$

El sFCM consta de dos fases fundamentales: el cálculo de las probabilidades de pertenencia, y la actualización de los centros de las clases dadas esas probabilidades. El algoritmo converge finalmente con los centros en un determinado punto. En el proyecto, se establece un movimiento mínimo de 0,5. Si el movimiento es menor que esa cantidad, se considera que ha convergido.

En todo momento se supone que existe al menos unos centros de las clases. Una buena **inicialización** es necesaria para una convergencia rápida. Se ha utilizado k-means++ [28] para la inicialización de los mismos. Este algoritmo funciona de la siguiente manera:

1. Selección de aleatoriedad uniforme de una muestra como centro de una clase
2. Calcular la distancia de cada muestra al centro más cercano
3. Seleccionar aleatoriamente un nuevo centro de las muestras, ponderando la probabilidad según la distancia del paso 2 al cuadrado
4. Repetir los pasos 2 y 3, hasta que se consigue el número deseado de centros
5. Devolver los centros calculados

Obtenidos los centros iniciales, puede comenzarse el resto del algoritmo

Con los centros ya calculados por el algoritmo, la **predicción** de una clase para un determinado píxel se realiza utilizando la probabilidad de pertenencia para cada píxel, tal que

$$x_p \in k \iff \arg \max_{i=p, \forall j} u'_{ij} = k, \quad (\text{A.6})$$

siendo k la clase a la que pertenece el píxel x_p .

Anexo B

Código

El código del proyecto se puede encontrar en la plataforma GitHub [26].