

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA HERRAMIENTA COMPUTACIONAL  
PARA EL ANÁLISIS ASISTIDO DE LOS PARÁMETROS DE CONCENTRACIÓN Y  
VIABILIDAD ESPERMÁTICA EN BOVINOS MEDIANTE TÉCNICAS DE  
PROCESAMIENTO DE IMÁGENES**

**Autor (es)**

Millan Arley Llanos Gualtero  
Jeisson Fernando Beltrán Dimate

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE INGENIERÍA ELECTRÓNICA  
TRABAJO DE GRADO  
FUSAGASUGÁ  
2016

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA HERRAMIENTA COMPUTACIONAL  
PARA EL ANÁLISIS ASISTIDO DE LOS PARÁMETROS DE CONCENTRACIÓN Y  
VIABILIDAD ESPERMÁTICA EN BOVINOS MEDIANTE TÉCNICAS DE  
PROCESAMIENTO DE IMÁGENES**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de  
ingeniero electrónico

**Autor (es)**

Millan Arley Llanos Gualtero  
Jeisson Fernando Beltrán Dimate

Director:

Edgar Eduardo Roa Guerrero

Co-director:

Diego Alexander Garzón Olaya

Asesores:

Daniel Castro

Línea de investigación:

Investigación de Software, sistemas emergentes y nuevas tecnologías.

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE INGENIERÍA ELECTRÓNICA  
TRABAJO DE GRADO  
FUSAGASUGÁ  
2016



# Dedicatoria

Millán Arley Llanos Gualteros

Esta tesis está dedicada a mis papas y hermanos que con su constante amor y apoyo incondicional me han ayudado a afrontar los momentos difíciles en la academia y a que no me debo rendir nunca por difíciles que estén las circunstancias.

Jeisson Fernando Beltrán Dimate

Mis grandes agradecimientos ante todo a Dios por culminar esta etapa de mi vida sin olvidar a mis padres que me apoyaron en cada proceso de mi trabajo por los grandes esfuerzos que realizaron, a mis hermanos por su ayuda en tantas situaciones difíciles, a mi director de tesis por guiarnos en este proceso y a mis compañeros por su apoyo incondicional.

# **Agradecimientos**

En primer lugar agradecemos al ingeniero Edgar roa por guiarnos en la construcción de la tesis, al veterinario Daniel castro que nos enseñó los procedimientos en el laboratorio para poder evaluar las muestras, al zootecnista diego Alexander garzón por su asesoría en el campo de la reproducción bovina y a nuestro amigo Felipe Baquero que desinteresadamente siempre estuvo apoyándonos.



# Resumen

El análisis viabilidad espermática consiste en detectar espermatozoides vivos y muertos mediante técnicas de tinciones específicas que actúan cuando hay espermatozoides muertos, estas tinciones son las encargadas de teñir los espermatozoides muertos de otro color para poder diferenciarlos totalmente, esta muestra es vista por un técnico mediante un microscopio el cual determinara el porcentaje de viabilidad espermática del animal. Para el análisis de concentración se utiliza una cámara de nuebauer en la cual se maneja una dilución de semen y de agua y de esta manera se observa mediante el microscopio por parte del técnico experto, este realiza el conteo de espermatozoides que se observan en la cámara y mediante un cálculo matemático se encuentra la concentración espermática del bovino.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una herramienta computacional para el análisis seminal de concentración y viabilidad espermática en bovinos por medio de técnicas de procesamiento de imágenes, esto se realizó con el fin de minimizar el error subjetivo por parte del técnico experto al momento de realizar el análisis seminal.

La metodología implementada se basó en las siguientes fases, la primera fase consistió en la adquisición de las imágenes en el laboratorio de reproducción de la universidad de Cundinamarca mediante el microscopio Olympus CX31 el cual cuenta con una cámara de 3 megapíxeles, este esta acoplado a un computador mediante conexión USB. En la segunda fase las imágenes son procesadas mediante técnicas de filtrado como mediana, average y gaussian para homogenizar la imagen. En la tercera fase para el análisis de viabilidad se utilizó el método discriminante de Fisher para extraer los espermatozoides y el método de clustering para la clasificación de espermatozoides vivos y muertos. Para la concentración se implementó el método de canny para la extraer los de los espermatozoides de las imágenes.

Los resultados obtenidos por parte de la herramienta computacional fueron comparados y validados con el técnico experto y para el caso de concentración también se comparó con el spermacue. Para viabilidad espermática se utilizaron 70 imágenes de 5 toros y se obtuvo una exactitud del 78% y una precisión del 83% con respecto al técnico experto.

## **Abstract**

The analysis sperm viability is to detect living and dead sperm using techniques specific stains acting when dead sperm, these stains are responsible for staining the dead sperm of another color to differentiate fully, this sample is seen by a technician through a microscope which will determine the percentage of sperm viability of the animal. For concentration analysis chamber neubauer in which a dilution of semen and water and thus is handled seen through the microscope by the skilled artisan is used, this makes sperm count seen in the camera and through a mathematical calculation is bovine sperm concentration.

The aim of this work was to develop a computational tool for seminal analysis of concentration and sperm viability in cattle by techniques of image processing; this was done in order to minimize the subjective error by the expert technician at the time of semen analysis.

The implemented methodology was based on the following phases, the first phase consisted of the acquisition of the images in the reproduction laboratory at the University of Cundinamarca by microscope Olympus CX31 which has a 3-megapixel camera, and this is coupled to a computer via USB connection. In the second phase, images are processed by filtering techniques as median, average and Gaussian to homogenize the image. The Fisher Discriminate method was used to extract sperm and clustering method for classification of living and dead sperm in the third phase for feasibility analysis. For concentration, canny method was implemented for extracting sperm images.

The results obtained by the computational tool were compared and validated with expert technical and in the case of concentration was also compared with SpermaCue. Sperm viability for 70 images of 5 bulls were used and an accuracy of 78% and an accuracy of 83% was obtained with respect to the skilled artisan.



# Contenido

Resumen.....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	15
<b>1. Capítulo 1. El problema.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1. Planteamiento del problema.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2. Hipótesis.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3. Objetivos del estudio.....</b>	<b>18</b>
1.3.1. Objetivo general.....	18
1.3.2. Objetivos específicos.....	18
<b>1.4. Justificación.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5. Alcances y limitaciones.....</b>	<b>21</b>
1.5.1. Alcances.....	21
1.5.2. Limitaciones.....	21
<b>2. Capítulo 2: Marco teórico.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Estado del arte.....</b>	<b>22</b>
2.1.1. Fundamentos teóricos.....	27
2.1.2. Fundamentos en visión artificial.....	27
2.1.3. Examen andrológico.....	30
2.1.3.1. Examen físico.....	30
2.1.3.2. Examen seminal.....	31
2.1.3.3. Técnicas utilizadas en la evaluación manual.....	33
<b>3. Capítulo 3. Diseño metodológico.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Metodología.....</b>	<b>35</b>
3.1.1. Recolección de muestras.....	36
3.1.2 Viabilidad espermática.....	38
3.1.2.1 Adquisición de imágenes (eosina Y).....	39
3.1.2.2 Suavización de la imagen.....	41
3.1.2.3 Segmentación por Fisher y eliminación de áreas.....	42

3.1.2.4 Clasificación por rangos de color (Clustering).....	45
3.1.2.5 Validación del algoritmo de viabilidad con el técnico experto.....	46
3.1.3 Concentración espermática .....	47
3.1.3.1 Adquisición de imágenes cámara de neubauer .....	48
3.1.3.2 Suavización de la imagen .....	49
3.1.3.3 Ajuste de contraste por imadjust .....	49
3.1.3.4 Extracción de regiones pertenecientes a los espermatozoides por el método de CANNY .....	50
3.1.3.5 Dilatación de objetos segmentados.....	50
3.1.3.5 Validación de algoritmo de concentración .....	51
<b>4. Capítulo 4. Análisis de resultados y discusión.....</b>	<b>52</b>
4.1. VIABILIDAD.....	52
<b>4.1.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.2. PRE-PROSESAMIENTO DE LA IMAGEN .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1.3. SEGMENTACIÓN DE ESPERMATOZOIDES .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1.4. CLASIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS POR CLUSTERING .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1.5. VALIDACIÓN DE LA HERRAMIENTA CON EL TÉCNICO EXPERTO .....</b>	<b>56</b>
4.2. CONCENTRACIÓN.....	60
<b>4.2.1 Adquisición y pre-procesamiento.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.2. Métodos de segmentación.....</b>	<b>62</b>
<b>5. Conclusiones y trabajos futuros.....</b>	<b>66</b>
Apéndice 1: Matriz de confusión de viabilidad para los cinco toros evaluados.....	68
A.1.1. ....	68
Bibliografía.....	73

# Índice de figuras

Figura. 1 Imagen aumentada, imagen del autor.....	27
Figura. 2 Imagen de escala de grises, A) Imagen en escala de grises, B) Matriz de imagen en escala de grises.....	28
Figura. 3 Descomposición de imagen RGB. Imagen tomada de (Quintana Duque & Mendieta Borja, 2005) .....	29
Figura. 4 Resultado de aplicar el detector de bordes de Canny: (a) imagen original; (b) orientación; (c) supresión no máxima; (d) histéresis de umbral, imagen tomada de (Valverde Rebaza).....	30
Figura. 5 Medición del perímetro testicular durante el examen andrológico a toros. A) Se deben sujetar ambos testículos firmemente por detrás de éstos evitando separarlos. B) Forma incorrecta de sujetar los testículos aumentando la separación entre éstos. Imagen tomada de (De los Reyes & Duchens, 1999).....	31
Figura. 6 imagen representativa de cámara Makler. Imagen tomada de (Roa Guerrero, 2012) .....	33
Figura. 7 Conteo de espermatozoides con cámara neubauer. Imagen tomada de (Angelino Olivera, 2009).....	34
Figura. 8 Metodología. Imagen obtenida del autor. ....	35
Figura. 9 Limpieza de escroto. Imagen obtenida del autor.....	36
Figura. 10 Lavado del prepucio. Imagen obtenida del autor. ....	36
Figura. 11 A) Inserción de sonda en toro. B) caja de instrumentos de electro eyaculador. Imagen obtenida del autor. ....	37
Figura. 12 Recolección de muestra seminal. Imagen obtenida del autor. ....	37
Figura. 13 Diagrama de flujo algoritmo de viabilidad. Elaborada por los autores.....	38
Figura. 14. Termo con muestras seminales y nitrógeno líquido. Imagen obtenida del autor..	39
Figura. 15 Micro pipeta. Imagen obtenida del autor. ....	40
Figura. 16 Barrido de la muestra. Imagen obtenida del autor.....	40
Figura. 17 Placa de calefacción. Imagen obtenida del autor. ....	41
Figura. 18 A) Lente de luz azul. B) Microscopio con cámara. Imagen obtenida del autor. Imagen obtenida del autor. ....	41
Figura. 19 Comparación imagen original y filtrada. A) Imagen original B) imagen filtrada. Imagen obtenida del autor. ....	42
Figura. 20 Interpretación geométrica de Fisher. Tomada de (Bishop, 2006) .....	42
Figura. 21 Extracción de información con <code>impixel()</code> , elaborada por el autor.....	43
Figura. 22 A) imagen segmentada por Fisher. B) imagen original. Imagen obtenida del autor. ....	44
Figura. 23 Imagen segmentada con errores. Imagen obtenida del autor. ....	44
Figura. 24 Imagen de segmentación con eliminación de áreas menores y mayores a los espermatozoides. Imagen obtenida del autor.....	45
Figura. 25 Imagen con componentes RGB interpuestos. Imagen obtenida del autor.....	45

Figura. 26 Clasificación de pixeles de cada objeto. Imagen obtenida del autor. ....	46
Figura. 27 A) Imagen original. B) Clasificación de espermatozoides vivos y muertos. Imagen obtenida del autor.....	46
Figura. 28 Diagrama de flujo algoritmo de concentración. Imagen elaborada por los autores. ....	47
Figura. 29 Cámara neubauer. Imagen obtenida del autor.....	48
Figura. 30 Vista de cámara neubauer desde microscopio. Imagen obtenida del autor.....	48
Figura. 31 A) imagen original. B) imagen en escala de grises con filtro. Imagen obtenida del autor.....	49
Figura. 32. A) imagen en escala de grises. B) imagen con imadjust. Imagen obtenida del autor.....	49
Figura. 33 A) imagen con imadjust. B) imagen CANNY. Imagen obtenida del autor.....	50
Figura. 34 A) imagen dilatada. Imagen obtenida del autor.....	50
Figura. 35 Imagen con eliminación de áreas. Imagen obtenida del autor.....	51
Figura. 36 imágenes obtenidas con el laboratorio del sena .....	52
Figura. 37 Imágenes obtenidas en el laboratorio de reproducción de la universidad de Cundinamarca.....	53
Figura. 38 Filtros implementados para suavización.....	53
Figura. 39 Imagen original y filtro de mediana.....	54
Figura. 40 A. imagen con filtro de mediana con espermatozoides no segmentados, B. imagen segmentada con Fisher.....	55
Figura. 41 A. Imagen original señalando ruido parecido en color a los espermatozoides y en área, B. Segmentación por Fisher, C. Segmentación por áreas menores a los espermatozoides, D. Segmentación por áreas mayores a los espermatozoides señalando ruido existente después de la segmentación total. ....	55
Figura. 42 A. Tinción con azul de metileno, B. Eosina nigrosina, C. Eosina Y en base de alcohol.....	56
Figura. 43 Comparación de espermatozoides vivos entre herramienta computacional y técnico experto.....	57
Figura. 44 Comparación de espermatozoides muertos entre herramienta computacional y técnico experto.....	57
Figura. 45 Comparación de total de espermatozoides entre herramienta computacional y técnico experto.....	58
Figura. 46 Cantidad de imágenes en rangos de error absoluto en vivos .....	58
Figura. 47 Cantidad de imágenes en rangos de error absoluto en muertos.....	59
Figura. 48 Cantidad de imágenes en rangos de error absoluto en total de espermatozoides	59
Figura. 49 A) imagen original. B) imagen escala de grises con filtro gaussian. Imagen elaborada por el autor.....	60
Figura. 50 A) imagen con filtro prewitt. B) imagen con filtro sobel. Imagen elaborada por el autor.....	61
Figura. 51 A) imagen con filtro laplacian. B) imagen escala de grises con filtro de mediana. C) imagen con filtro average Imagen elaborada por el autor .....	61

Figura. 52 A) imagen original. B) imagen método CANNY. C) imagen método PREWITT. D) imagen método ROBERTS. E) imagen método LOG. Imagen elaborada por el autor .....	62
Figura. 53 A) imagen original. B) Imagen dilatada. Imagen elaborada por el autor .....	63
Figura. 54 Imagen comparación de resultados entre técnico experto, herramienta computacional y spermacue. Imagen obtenida del autor. ....	64

# Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación concentración espermática. ....	32
Tabla 2 Clasificación de motilidad seminal. ....	32
Tabla 3 Errores mínimos y máximos de la medición de la herramienta computacional .....	59
Tabla 4 Matriz de confusión en resultados de viabilidad de las 70 imágenes.....	60
Tabla 5 Resultados de pruebas entre métodos para el cálculo de concentración espermática. .....	63
Tabla 6 error absoluto y error relativo de la herramienta computacional en relación con la medición del experto por cada toro evaluado.....	64
Tabla 7 error absoluto y error relativo de la herramienta computacional en relación con la medición del spermacue por cada toro evaluado.....	65
Tabla 8 Matriz de confusión toro 1 .....	68
Tabla 9 Matriz de confusión toro 2 .....	68
Tabla 10 Matriz de confusión toro 3 .....	69
Tabla 11 Matriz de confusión toro 4 .....	69
Tabla 12 Matriz de confusión toro 5 .....	69

# Introducción

Actualmente, a nivel mundial se ha evidenciado un gran avance en el desarrollo de sistemas para identificación de los parámetros espermáticos como es el caso de los sistemas automáticos CASA (RODRIGO MUIÑO, 2008). Estos sistemas permiten el análisis e identificación de los parámetros espermáticos como concentración, viabilidad, motilidad entre otros de forma rápida, con repetitividad en los resultados y altos porcentajes de acierto. Sin embargo, su utilización ha sido muy limitada por sus elevados costos y además dichos sistemas no disponen de estándares adecuados. Por esta razón, en Colombia y particularmente en el departamento de Cundinamarca se sigue realizando la evaluación de viabilidad y concentración espermática de bovinos, por medio de técnicas manuales y semiautomáticas, dichas técnicas comprenden principalmente de la observación de un técnico experto por medio de un microscopio.

Hoy en día para la evaluación de la viabilidad espermática es necesario la implementación de un reactivo químico (eosina y), este reactivo se filtra en los espermatozoides muertos, donde su membrana espermática se ha roto, formando un contraste de color entre el fondo y los espermatozoides vivos y muertos de la muestra, siendo de gran facilidad para su respectiva evaluación. Por otra parte, la concentración espermática se evalúa implementando la cámara de Neubauer la cual consta de dos cuadrículas en las cuales se hace el conteo de espermatozoides, el semen es diluido con solución salina y luego vertido en la cámara de Neubauer, gracias a su cuadrícula es posible mediante una relación matemática evaluar la concentración de espermatozoides de la muestra. Finalmente, es utilizado el método semiautomático para concentración espermática, este se basa en un aparato electrónico donde un haz de luz pasa por la muestra seminal y gracias a la diferencia de luz se puede calcular la cantidad de espermatozoides, esta última técnica no es muy utilizada por el ganadero promedio por sus elevados costos.

Analizar los espermatozoides por medio de un microscopio requiere de un gran esfuerzo visual, conllevando a una fatiga ocular al técnico experto, si el técnico experto se dispone a evaluar varias muestras va tener un alto porcentaje de error por el cansancio visual, conllevando a un error subjetivo en la evaluación de la muestra seminal. Otro gran problema en la evaluación espermática por medio de un técnico experto es la falta de repetitividad puesto que los resultados de la evaluación pueden variar dependiendo del técnico experto, los conocimientos conceptuales pueden ser diferentes entre evaluadores.

Este trabajo plantea una solución tecnológica al problema de la subjetividad y repetitividad en los resultados de concentración y viabilidad espermática, mediante el diseño e implementación de una herramienta computacional para el análisis asistido de concentración y viabilidad espermática en bovinos por medio del procesamiento de imágenes, este proceso consta de un pre procesamiento de la imagen donde se elimina ruido y se homogeniza, luego se segmenta un objeto de interés, en este caso los espermatozoides y posteriormente se clasifica los espermatozoides vivos y muertos para comparar nuestra herramienta computacional con la evaluación manual y semiautomática por parte del técnico experto. La herramienta computacional proporcionará un soporte técnico a los estudiantes de la universidad de Cundinamarca y ganaderos de la región ya que podrán hacer pruebas de análisis seminales y tener resultados más acertados a bajo costo y menor tiempo.



# 1. Capítulo 1. El problema

---

## 1.1. Planteamiento del problema

Hoy en día, el nivel de fertilidad en bovinos es evaluado por medio del examen andrológico, el cual se divide en 3 exámenes: examen físico, examen interno y análisis seminal. Inicialmente, se desarrolla el examen físico, en el cual se evalúan los miembros posteriores, el pene, prepucio, escroto, epidídimo y los testículos, con el fin de confrontar los resultados con los estándares de la raza para determinar normalidades o anormalidades anatómicas en el toro evaluado. Seguidamente, en el examen interno, se realiza la palpación rectal y básicamente evalúa el tamaño de las vesículas y la respuesta del macho al masaje sobre la porción diseminada de la próstata. Finalmente, se toma una muestra del líquido seminal mediante el electro eyaculador o vagina artificial, esta muestra es llevada a un laboratorio para su respectiva evaluación en donde se determinan los parámetros espermáticos. Actualmente, se ha evidenciado que el análisis andrológico no es totalmente confiable debido a que se presentan errores subjetivos por parte de técnico experto en el análisis de los parámetros espermáticos.

Los parámetros de concentración y viabilidad espermática, que determinan la cantidad de espermatozoides por ml y la cantidad de espermatozoides vivos y muertos por ml respectivamente son determinados de forma manual. Esta prueba consiste en la evaluación visual bajo el microscopio por parte del técnico experto. Para el análisis de concentración espermática es utilizada la cámara de makler que consta de una cuadrícula de 1 mm por 1 mm, profundidad de 0.01mm y dividida en 100 cuadros de 0.1mm por 0.1mm donde se realiza el conteo de los espermatozoides en movimiento y en diferentes campos visuales de la imagen microscópica. Para el análisis de viabilidad espermática se emplea la adición de un colorante vital (eosina nigrosina) sobre la muestra, con el fin de identificar los espermatozoides vivos como (incolores) y los espermatozoides muertos teñidos de rojo.

Posteriormente se evalúan las medidas obtenidas en el análisis manual con respecto a los parámetros establecidos por IRAC<sup>1</sup> y CGR<sup>2</sup> en el libro especialización en reproducción bobina con el fin de clasificar los espermatozoides y dar su respectivo diagnóstico. Luego de una revisión exhaustiva de las diferentes técnicas para

---

<sup>1</sup> IRAC *instituto de reproducción animal córdoba.*

<sup>2</sup> CGR *centro de biotecnología reproductiva.*

detección de los parámetros espermáticos de concentración y viabilidad en bovinos, se desconoce de una metodología generalizada que permita repetitividad en las mediciones.

El problema que se pretende resolver con el desarrollo de la herramienta computacional es: ¿Cómo reducir los errores subjetivos y disminuir los tiempos de análisis por parte del técnico experto en la evaluación de los parámetros espermáticos en bovinos mediante técnicas de visión artificial?

## **1.2. Hipótesis**

La evaluación de concentración y viabilidad espermática de bovinos se logra mediante la toma de fotografías digitales de muestras seminales tomadas mediante un microscopio, para el pre-procesado se utilizarán técnicas de filtrado para quitar ruido en las imágenes luego de esto se utilizarán métodos de vector discriminante lineal de Fisher y canny para segmentar e identificar los espermatozoides los resultados obtenidos serán validados por un técnico experto.

## **1.3. Objetivos del estudio**

### **1.3.1. Objetivo general**

Diseñar e implementar una herramienta computacional para la evaluación de concentración y viabilidad espermática en bovinos mediante técnicas de procesamiento de imágenes

### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Realizar la recolección de las muestras espermáticas por medio del laboratorio móvil del SENA en fincas ganaderas del departamento de Cundinamarca.
- Desarrollar una metodología para realizar la adquisición y pre procesamiento de las imágenes microscópicas que realce los bordes de los espermatozoides
- Establecer un método para segmentar y extraer los espermatozoides vivos y muertos mediante técnicas de procesamiento de imágenes

- Caracterizar y clasificar los espermatozoides mediante un estándar de identificación y evaluación de la concentración y viabilidad espermática
- Evaluar y comparar los resultados obtenidos en la clasificación de espermatozoides con respecto a sistemas semiautomáticos (spermacue) y el método manual bajo los criterios establecidos por IRAC y CGR en el libro especialización en reproducción bobina.

## 1.4. Justificación

El análisis de los parámetros espermáticos en la antigüedad, se realizaba únicamente a través de la capacidad de observación de los técnicos expertos en reproducción por largos lapsos de tiempo a través de un microscopio; a la fecha, el desarrollo de las técnicas para el análisis de la fertilidad ha avanzado de forma significativa, desde la introducción de programas informáticos hasta la implementación de sistemas automatizados como el CASA (RODRIGO MUIÑO, 2008), que proporcionan gráficos estadísticos que han permitido un estudio objetivo sin depender de evaluaciones subjetivas. Sin embargo, estos sistemas presentan altos costos por lo tanto su incursión en el mercado es limitada, por esta razón, el análisis de los parámetros espermáticos aún se sigue realizando de forma manual. El propósito de esta investigación fue diseñar e implementar una herramienta computacional para el análisis de la concentración y la viabilidad espermática en bovinos empleando técnicas de procesamiento de imágenes, con el fin de mejorar la calidad de la inspección con respecto al análisis manual realizado actualmente.

Este trabajo soporta el diagnóstico clínico del análisis de fertilidad en bovinos, permitiendo detecciones automáticas de los espermatozoides vivos y muertos por muestra, empleando técnicas de procesamiento de imágenes. Se plantea una solución tecnológica e innovadora al problema de la inexactitud en la identificación de los espermatozoides vivos y muertos, disminuyendo subjetividades en el proceso implementado. La aplicación se justifica por la disminución de los tiempos en la toma de los datos clínicos, que son recopilados actualmente empleando equipos como microscopios que exigen un tiempo de calibración y otro de medida, adicionando situaciones no deseadas en el examen médico que modifican los resultados de la fertilidad.

Este sistema de visión por computador se convierte en una herramienta fundamental para el análisis objetivo de espermatozoides en bovinos, favoreciendo el sector de reproducción animal usando un sistema cuantitativo en la ciudad. Así mismo, el

desarrollo de su metodología presenta una alternativa a nivel nacional, frente a los costosos sistemas automáticos como el CASA.

### **Beneficios tecnológicos**

Se pretende realizar una herramienta computarizada para determinar el análisis de concentración y viabilidad espermática en bovinos; y parametrizar las condiciones en la cual debe ser estudiada la muestra para disminuir el error en la medición, empleando técnicas de visión artificial con el fin de disminuir errores subjetivos y mejorar la evaluación con respecto al análisis manual realizado actualmente.

Contribuye con el mejoramiento del análisis objetivo de fertilidad en bovinos, así como en cuanto a la rapidez y repetitividad en los resultados, debido a que se trabajará con imágenes directamente en el espacio del color RGB.

Fortalece la investigación y posterior desarrollo de sistemas computacionales para beneficio de la comunidad, como apoyo al diagnóstico de la fertilidad en animales proporcionado por los expertos en reproducción animal.

### **Beneficios institucionales**

Esta herramienta será de gran utilidad en la universidad de Cundinamarca para los estudiantes de zootecnia donde podrán hacer sus prácticas de evaluación seminal y tener un punto de referencia más acertado a la realidad.

El desarrollo de la herramienta computacional permitirá interactuar con las comunidades ganaderas del país, a través de los cursos de extensión universitaria y de las estrategias para realizar la incorporación de conocimiento entre la universidad y el sector empresarial.

Finalmente, se fortalecerá la investigación en el grupo de investigación GITEINCO de la Universidad de Cundinamarca, a medida que las técnicas novedosas en procesamiento de imágenes aplicadas a procesos de la agricultura permitan mejorar sus procesos, así como también, el proyecto sea presentado en congresos, simposios internacionales y socialización de resultados en revistas de divulgación científica.

## **1.5. Alcances y limitaciones**

### **1.5.1. Alcances**

El proyecto en desarrollo tiene como alcance medir la concentración y viabilidad del semen bovino en Colombia. Los aspectos puntuales que comprenden la investigación están referidos a la concentración y viabilidad espermática en bovinos, las muestras seminales serán obtenidas en fincas ganaderas del departamento de Cundinamarca.

### **1.5.2. Limitaciones**

Las muestras serán analizadas en el laboratorio móvil del SENA y las imágenes estarán limitadas por los microscopios con los que cuenta el SENA y sus respectivas cámaras digitales, la rapidez de los resultados está sujeto a las características técnicas del computador utilizado en el pre-procesamiento y procesamiento de las imágenes, el algoritmo a desarrollar estará limitado a parámetros de luz, enfoque y resolución de la cámara microscópica.

## **2. Capítulo 2: Marco teórico**

---

### **2.1. Estado del arte**

#### **EVALUACION DE LA MOTILIDAD Y VIALIDAD DEL SEMEN BOVINO MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS CASA Y CITOMETRIA DE FLUJO IDENTIFICACION DE SUBPOBLACIONES ESPERMATICAS**

Esta tesis se basó en la aplicación de las tecnologías de sistemas como el CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) y citometria de flujo, para valorar los nuevos métodos de congelación y descongelación del semen, la utilidad de nuevos diluyentes y la presencia de subpoblaciones espermáticas con característica de movimientos específicos, se realizaron 4 experimentos sobre distintos aspectos del protocolo de criopreservación de semen bovino. Inicialmente se realizó un estudio comparativo de tres diluyentes más frecuentemente utilizados en inseminación artificial. Luego se procedió a establecer valores medios para parámetros cinéticos descriptores del movimiento espermático obtenidos mediante el sistema CASA en eyaculaciones de toros Holstein y de raza rubia, como resultado se obtuvo que los espermatozoides de los toros Holstein tenían un mayor porcentaje de espermatozoides rápidos y de trayectoria rectilínea que los toros rubios. El tercer experimento consistió en la identificación de diferentes subpoblaciones espermáticas con patrones de movimientos específicos en los toros Holstein el resultado obtenido mostro que las muestras con los espermatozoides más rápidos presentaban mayor resistencia a la criopreservacion y mayor supervivencia espermática. Por último se evaluó el efecto de diferentes temperaturas de descongelación del semen en diferentes temperatura los resultados demostraron que se obtuvieron resultados similares en las pruebas realizadas. (Otero)

#### **NUEVAS TECNOLOGIAS APLICADAS AL PROCESADO Y EVALUACION DEL SEMEN BOVINO EN CENTROS DE INSEMINACION ARTIFIAL**

En el presente artículo se revisan algunas de las técnicas para valorar la capacidad fecundante del semen bovino por medio del estudio de atributos espermáticos, para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito se deben tener en cuenta una serie de requisito los cuales son: Motilidad que es el movimiento activo de los espermatozoides. Volumen y concentración se refiere a la cantidad de espermatozoides en un eyaculado. Morfología la cual se refiere a la forma física que tienen los espermatozoides y de esta manera hallar las anomalías que están presentes en un eyaculado (R. Muiño, 2005). Estos parámetros se analizan por sistemas de análisis computarizados algunos de ellos son:

- CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer)  
Consta de varias unidades independientes: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de video, que envía la imagen desde un microscopio a un monitor de TV (R. Muiño, 2005).
- ASMA (Assisted Sperm Morphology Analysis)  
Están diseñados para realizar medidas del área, perímetro, longitud y anchura de las cabezas espermáticas presentes en una extensión de semen fijada y teñida (R. Muiño, 2005).

Existen otros métodos para el análisis de espermatozoides bovinos como lo es la citometría de flujo la cual es una técnica que permite identificar, cuantificar y separar las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra de células en suspensión, en función de los distintos patrones de tinción con colorantes fluorescentes (R. Muiño, 2005).

## **ANALISIS DE SEMEN BOVINO**

La inseminación artificial ha demostrado ser la herramienta más exitosa para la mejora genética de animales, especialmente en la industria bovina, esto depende de una cuidadosa valoración de fertilidad. Las cualidades que deben tener los espermatozoides son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactiva, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, sin embargo este análisis integral es muy difícil de desarrollar debido a la enorme complejidad inherente a la fecundación espermática (Carlos Hidalgo).

Actualmente el análisis seminal ha mejorado gracias a los nuevos sistemas de análisis como lo son el CASA y el espectrofotómetro (Carlos Hidalgo).

Estos sistemas tienen en cuenta factores como:

- Concentración  
La presencia de un mayor número de espermatozoides siempre y cuando sus características sean normales (Carlos Hidalgo).
- Motilidad  
Evalúan el porcentaje de espermatozoides móviles así como el tipo de movimiento que presentan (Carlos Hidalgo).

➤ Viabilidad

Es la rotura de la membrana plasmática para diferenciar esto se aplican tinciones los cuales colorean a los espermatozoides que tiene la membrana rota, algunos de estas tinciones son: verde/eosina, eosina/azul de anilina, tripan azul/giemsá, amarillo de naftol/eritrosina (Carlos Hidalgo).

➤ Morfología

La evaluación de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado (Carlos Hidalgo).

### **EVALUACION DE LAS CARACTERISTICAS SEMINALES DE SEMENTALES BOVINOS MEDIANTE EL ANALIZADOR SEMINAL COMPUTARIZADO (CASA)**

En la actualidad los estudios andrológicos se realizan con el fin de conocer el estatus reproductivo de los toros, se han basado principalmente en la evaluación de muestras seminales. Para evaluar las características seminales de toros reproductores se han utilizado los Sistemas Computarizados de Análisis Seminal (CASA), los cuales proporciona información precisa, objetiva. Se evaluaron un total de 18 toros, provenientes de cinco toros reproductores de alto valor genético. Se evaluó la motilidad individual en semen fresco (SF) y descongelado (SD) a través del sistema CASA, no se observaron diferencias significativas entre ambos métodos. Con base en patrones de velocidad se estableció que existen cuatro sub-poblaciones de espermatozoides en SF y SD: espermatozoides con movimiento rápido, movimiento medio, movimiento lento y estáticos, lo cual indica que la distribución de las sub-poblaciones espermáticas se mantiene entre el SF y SD. Al evaluar el efecto de la criopreservación sobre las sub-poblaciones, se determinó que los espermatozoides rápidos fueron más abundantes en un 18% en SF que en SD el cual fue de 7%, los espermatozoides con velocidad media fueron similares 40% en SF y 37% en SD. La sub-población de espermatozoides lentos presentó mayor diferencia, siendo 32% en SF y 45% en SD. En el caso de la fracción de células espermáticas estáticas fue similar entre ambos tipos de semen 10% en SF y 11% en SD. Al evaluar la variación de las subpoblaciones en SF a través del tiempo, la sub-población de movimientos medios se mantuvo sin mayor variación, habiendo variaciones en la sub- poblaciones de espermatozoides rápidos y estáticos. En el SD las sub-poblaciones de espermatozoides medios y lentos fueron las que menos variaron, mientras que la de movimientos rápidos varió poco, siendo la subpoblación de estáticos la que presentó mayor variación (Aguero, 2012).



## EVALUACION DE SEMEN BOVINO CONGELADO

Cuando se quiere evaluar el semen hay que tener en cuenta cuando se evalúa semen es que no existe ningún examen in vitro que esté altamente correlacionado con la fertilidad. Existen sí diversas pruebas de laboratorio para “estimar” la calidad del semen que es extremadamente útiles si son realizadas correctamente e interpretadas con criterio (Catena, 1999).

Para evaluar semen resulta esencial contar con un microscopio de calidad, preferentemente con adaptación para contraste de fase, una platina térmica y un baño María. En la evaluación del semen congelado se deben tener en cuenta al menos 3 parámetros básicos (Catena, 1999). Ellos son:

- Viabilidad post-descongelación.  
Se determina mediante el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático. Es recomendable efectuar además, un examen directo del acrosoma. El daño a la membrana puede no ser completamente expresado inmediatamente después de la descongelación. Por ello, el semen debe ser incubado a 37° C durante 2 horas. Esta evaluación es conocida como prueba de termo resistencia o de incubación (Catena, 1999).
- Morfología.  
La coloración de eosina-nigrosina es ideal para evaluar la morfología espermática dado que al carecer de pasos de lavado, todo lo que está en el semen se descubrirá en el frotis. El concepto de defectos primarios y secundarios sirve bien para evaluar la aptitud reproductiva de un toro pero no para predecir la fertilidad de cierta partida de semen congelado (Catena, 1999).
- Número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis inseminante.  
Surge de multiplicar el número de espermatozoides totales por el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva a la hora 0 pos descongelación. Existen al menos 4 formas distintas de determinar el número de espermatozoides. Un criterio vigente durante años, basado en la definición de pubertad, indicaba que la dosis inseminante no debía ser inferior a 10 millones de espermatozoides con motilidad progresiva (Catena, 1999).

## **COMPARACION DE LA CONCENTRACION ESPERMATICA USANDO LA CAMARA DE MAKLER Y LA CAMARA NEUBAUER**

La concentración de espermatozoides es uno de los parámetros más importantes en la valuación de la fertilidad masculina. Tradicionalmente, el recuento de espermatozoides se realiza utilizando la cámara de Neubauer que se ha convertido en el patrón de oro y el método recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo se han diseñado otras cámaras como la Makler, Microcell y Horwell, para determinar la concentración de espermatozoides. La ventaja de las nuevas cámaras sobre la cámara de Neubauer es que estas utilizan las muestras sin diluir, aumentando la precisión del procedimiento y la reproducibilidad de los resultados. La implementación de estas cámaras alternativas para la evaluación de la concentración de espermatozoides ha generado controversia debido a los informes que cuando se utilizó la cámara Makler no mostraron resultados uniformes. El objetivo del presente estudio fue determinar la concordancia entre los recuentos obtenidos con las cámaras Makler y Neubauer en eyaculaciones de 112 hombres fértiles provenientes de individuos fértiles fueron analizados en el presente estudio. El recuento espermático se realizó en la cámara de Makler y en la cámara de Neubauer, El promedio de las concentraciones fue 107,8 y 106,2 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL usando la cámara de Makler y de Neubauer, respectivamente. Se encontró concordancia entre ambos métodos.

Los resultados mostraron que la determinación de la concentración espermática mediante la cámara de Makler es tan exacta como la realizada con la cámara de Neubauear y que ambas pueden ser usadas en el análisis rutinario de semen (Cardona Maya W, 2008).

## **EVALUACION SEMINAL COMPARATIVA PRE Y POST CONGELACION EN MACHOS BOVINOS**

La evaluación seminal en toros en especial en aquellos seleccionados como reproductores es fundamental para evitar problemas de sub-fertilidad e infertilidad en el rebaño. Existen muchos factores que pueden afectar la calidad del semen de esos reproductores como lo son los factores medioambientales, el estado nutricional, las condiciones sanitarias y el manejo. Se utilizan diferentes métodos de uso rutinario para evaluar la calidad seminal en los Centros de Inseminación Artificial (I.A.) o en los Laboratorios de investigación en Reproducción Animal. Los métodos deben tener gran precisión y deben ser además sencillos, económicos y rápidos, de manera que permitan detectar a tiempo cualquier cambio en la calidad del semen de los reproductores que pudieran afectar la capacidad fértil del mismo. Cuando se evalúa semen, se está evaluando calidad seminal. La calidad seminal viene dada por la comparación de los parámetros obtenidos al evaluar el semen de un toro con los

valores que son considerados como normales para un toro reproductor adulto. Los valores normales o estándares del semen fresco se han establecido por el estudio, a lo largo de muchos años, de un número de eyaculados. El macho en monta natural significa más o menos la mitad del rebaño pero en la I.A. constituyen una parte muy significativa en muchos rebaños, de ahí la importancia de seleccionar los machos superiores no sólo de valor genético y buena libido sino que también por mostrar semen de elevada calidad y fertilidad (Muñoz).

## 2.1.1. Fundamentos teóricos

### 2.1.2. Fundamentos en visión artificial

La visión artificial o visión por computador es parte de la inteligencia artificial donde por medio de un ordenador identifica características específicas de un ambiente o escena. Gracias al avance de la computación, los sistemas de visión artificial se han vuelto más rápidos por la velocidad de procesamiento del ordenador, y robustos por la cantidad de técnicas de procesamiento de imágenes que contenga el código, para familiarizarnos con el tema veremos unos conceptos importantes de la visión artificial.

#### 2.1.2.1. Píxel

Es la menor unidad de información de una imagen digital, esta información se encuentra reflejada medio de un color, entre más pixeles halla en una imagen, esta tendrá una mejor resolución, por lo tanto tendremos más información de la imagen captada.

Por medio de la información que ofrece el píxel, podemos implementar técnicas de procesamiento de imágenes, para extraer información que nos interesa. Al ampliar una imagen podemos observar detalladamente los pixeles.

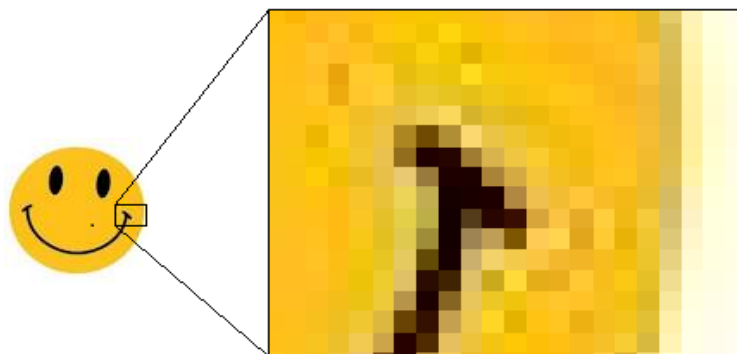


Figura. 1 Imagen aumentada, imagen del autor

### 2.1.2.2. Imagen digital

Una imagen digital es una agrupación de píxeles, que con su configuración de colores o escalas de grises, es capaz de mostrar un ambiente (fotografía) o una imagen creada por la imaginación de un diseñador. Estas imágenes son almacenadas por medio de datos digitales en una matriz de diferentes dimensiones, dependiendo si la imagen es de color o de escala de grises. Como se puede evidenciar en (Moreira Quiroz, Valencia Delgado, & Chávez Burbano, 2009).

### 2.1.2.3. Imagen escala de grises

En esta imagen los píxeles toman una escala de colores desde el blanco hasta el negro, teniendo una variación de esta rango de colores de 256 posibilidades, en los formato jpeg la información de este color es almacenado en un byte ( $2^8$  posibilidades de almacenamiento), la matriz que obtendremos de esta imagen será bidimensional.

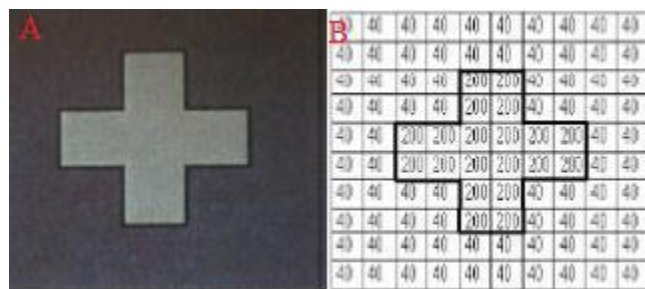


Figura. 2 Imagen de escala de grises, A) Imagen en escala de grises, B) Matriz de imagen en escala de grises. Imagen tomada de (Roa Guerrero, 2012)

### 2.1.2.4. Imagen en formato RGB

Por medio de este formato se puede almacenar una imagen de colores (escalas rojas, verdes, azul, blanco y negro), aunque existen más formatos de almacenaje de imágenes de colores, el formato RGB es el más popular en este momento, siendo el idóneo para nuestro proyecto. En este formato el píxel tendrá tres componentes de color: rojo, verde y azul. En donde cada una podrá oscilar entre 256 posibilidades ( $2^8$ ) teniendo lo anterior en cuenta, con la configuración de los componentes rojo, verde y azul podemos obtener 16.777.216 colores almacenados y representando una imagen. Este formato está guardado en una matriz tridimensional ya que en cada píxel almacenara tres byte, en el momento de extracción de información o modificación de la imagen, es necesario evaluar las tres matrices por aparte y luego correlacionarlas evidenciado (QUINTANA DUQUE & MENDIETA BORJA, 2005)



Figura. 3 Descomposición de imagen RGB. Imagen tomada de (Quintana Duque & Mendieta Borja, 2005)

### 2.1.2.5. Operación de filtrado

Es un barrido implementado a la matriz de la imagen, para evaluar y modificar características de la imagen, este proceso se implementa para adecuar la imagen y luego pasar al procesado como tal. El nombre de estos barridos se llama el procesado como se evidencia en (woods & Gonzales, 2008).

Los cambios más relevantes que se pueden obtener usando las operaciones de filtrado son:

- Suavizar la imagen: aumentar la homogeneidad de los píxeles en determinada región.
- Eliminar ruido: elimina aquellos píxeles cuyo nivel de intensidad es muy diferente al de sus vecinos y su forma grupal no tiene relación con la imagen del ambiente, este ruido lo puede adherir a la imagen, la lente de la cámara o específicamente en nuestro proyecto, el microscopio y el portaobjetos.
- Realzar bordes: modifica la imagen acentuando los bordes de la imagen.

Detectar bordes: por medio del cambio brusco de color de los píxeles detecta los bordes que la imagen.

### 2.1.2.6. Detección de bordes por medio del algoritmo de canny

La detección de bordes en el procesamiento de imágenes, es utilizada para reconocimiento de objetos en la imagen a partir de la forma y segmentar regiones comprendidas entre los bordes. El algoritmo es conocido como uno de los mejores métodos de detección de bordes, esencialmente el algoritmo utiliza mascarar de convolución y basados en la primera derivada (Valverde Rebaza), se encuentra los píxeles que tienen una gran diferencia de color y así detectando los bordes.

Esta técnica se divide en tres partes

- Obtención del gradiente.
- Supervisión no máxima.
- Histéresis de umbral para extraer los bordes de los espermatozoides.

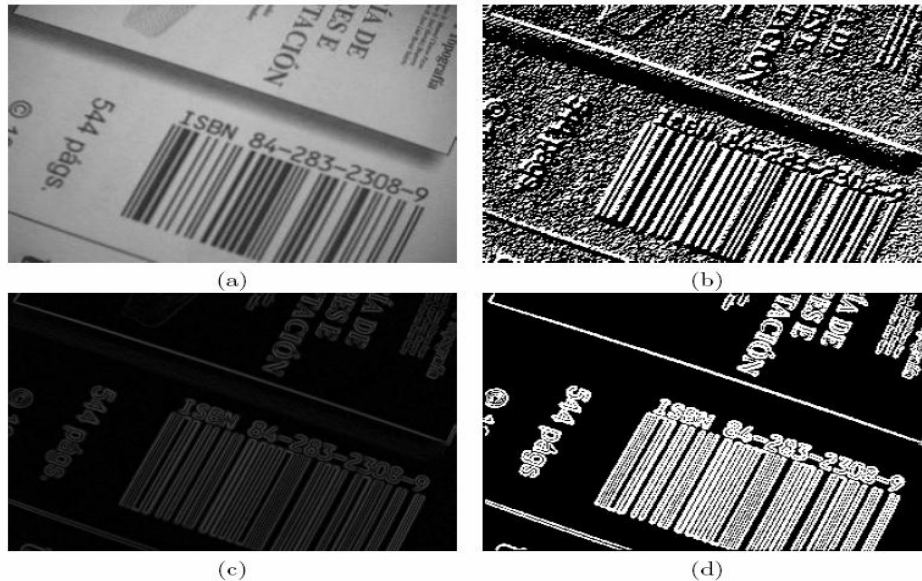


Figura. 4 Resultado de aplicar el detector de bordes de Canny: (a) imagen original; (b) orientación; (c) supresión no máxima; (d) histéresis de umbral, imagen tomada de (Valverde Rebaza)

### 2.1.3. Examen andrológico

El examen andrológico es una evaluación de tipo clínico que se realiza con el fin de conocer el estado o potencial reproductivo de los toros, esta evaluación se divide en tres partes como el examen físico, examen del pene – prepucio, examen testicular, examen órganos internos y examen seminal, las cuales se explicaran a continuación.

#### 2.1.3.1. Examen físico

Consiste en la evaluación física del toro. Primero se debe determinar el estado de nutrición o condición corporal, esta se califica en un rango de 1 a 5 siendo 1 un toro flaco y 5 un toro gordo u obeso. A continuación se procede a examinar los genitales del toro en donde se deben tener en cuenta 2 factores importantes los cuales son:

**Examen del pene – prepucio:** El prepucio se examina para encontrar anomalías las cuales puedan llegar a dificultar la erección normal de este. El pene se examina manualmente se debe verificar que no hayan adherencias, hematomas, fracturas, ni desviaciones del pene (González-Stagnaro & Soto Beloso, 2005).

**Examen testicular:** Este examen se evalúa el escroto y el epidídimo mediante la palpación de estas. En el escroto de debe verificar que no existan parásitos ya que esto alterara el desarrollo espermatogénico, ni tampoco que existan laceraciones o heridas, además se debe verificar la presencia de ambos testículos en el escroto debido a que en algunos casos solo se encuentra un solo testículo, los testículo deben examinarse para encontrar anomalías con respecto a su tamaño, simetría y consistencia. En este examen es de gran importancia el perímetro testicular o perímetro escrotal, el procedimiento para la medición del perímetro escrotal se realiza deslizando los testículos hacia abajo hasta dejar la piel del escroto tensa (Figura 5).

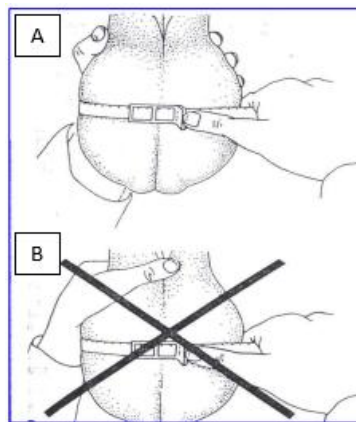


Figura. 5 Medición del perímetro testicular durante el examen andrológico a toros. A) Se deben sujetar ambos testículos firmemente por detrás de éstos evitando separarlos. B) Forma incorrecta de sujetar los testículos aumentando la separación entre éstos. Imagen tomada de (De los Reyes & Duchens, 1999)

**Examen órganos internos:** Se realiza mediante la palpación rectal de las glándulas vesiculares, la próstata y la uretra en las cuales se verifica su forma, tamaño y consistencia con el fin de encontrar anomalías que degeneren el estado reproductor del toro.

### 2.1.3.2. Examen seminal

Primero se debe hacer la recolección del semen ya sea por vagina artificial o utilizando un electro eyaculador (De los Reyes & Duchens, 1999). El electro eyaculador es un aparato que consta de un electrodo el cual se introduce por el recto del toro, el cual va conectado a una batería que genera pequeños pulsos eléctricos los cuales estimulan los órganos genitales produciendo la emisión del semen. Luego de haber recolectado el semen se procede hacer un análisis este, teniendo en cuenta parámetros ya establecidos y detallados en (RODRIGO MUIÑO, 2008) los cuales son:

**Volumen:** Este parámetro depende del método utilizado para la obtención del semen ya que con la vagina artificial se obtiene un promedio de 2 a 10 ml de semen, mientras que con el electro eyaculador se obtiene hasta 25 ml de semen.

**Color:** Varía desde blanco grisáceo hasta blanco amarillento.

**Concentración:** Es la cantidad de espermatozoides que hay por cada ml de semen.

Tabla 1 Clasificación concentración espermática.

Muy buena (MB):	Semen cremoso, granular con 750 a 1,000 millones de espermatozoides/ml o más.
Buena (B):	Semen lechoso con 400 a 750 millones de espermatozoides/ml
Suficiente (S):	Semen semejante a leche descremada con 250 a 400 millones de espermatozoides/ml
Pobre (P):	Semen translúcido con menos de 250 millones de espermatozoides/ml

Fuente: (Angelino Olivera, 2009)

**Motilidad:** Es la velocidad con la que se desplazan los espermatozoides.

Tabla 2 Clasificación de motilidad seminal.

Muy bueno	Movimientos masivo muy marcado y rápidos	70-100%
Bueno	Movimientos en masa aparente, pero moderados	50-69%
Suficiente	Ondas en movimientos apenas apreciables	30-49%
Pobre	No hay ondas, semen sin movimiento	Menos De 30%

Fuente: (Angelino Olivera, 2009)

**Viabilidad:** Se determina la cantidad de espermatozoides vivos y muertos por medio de colorantes supra vitales los cuales colorean los espermatozoides muertos deja a



los espermatozoides vivos intactos de esta manera se da un porcentaje en función a los espermatozoides vivos.

**Morfología:** Se analizan los espermatozoides de la muestra en busca de anomalías físicas o espermáticas de la muestra. Como es evidenciado en (Carrillo, Villarreal, Sotaquirá, Goelkel, & Gutiérrez, 2007)

### 2.1.3.3. Técnicas utilizadas en la evaluación manual

**Cámara Makler:** La cámara makler se usa para determinar la concentración espermática, para realizar este análisis se introduce una muestra de semen y se observa al microscopio con el aumento adecuado para el conteo de los espermatozoides, esta cámara está conformada por una cuadrícula que mide 1 x 1 mm, y tiene una profundidad de sólo 0,01 mm, y está subdividida en 100 cuadros de 0,1 x 0,1mm, cada uno, por lo que el volumen total en una cámara Makler® es 0,01 µl (Roa Guerrero, 2012). El conteo de células de la cámara Makler se describe en la Ec1:

$$\#celulas = \frac{cf}{c} * 10^6 \quad (1)$$

Donde, cf es la cantidad de espermatozoides de una fila, c es la columna donde se hizo el conteo.

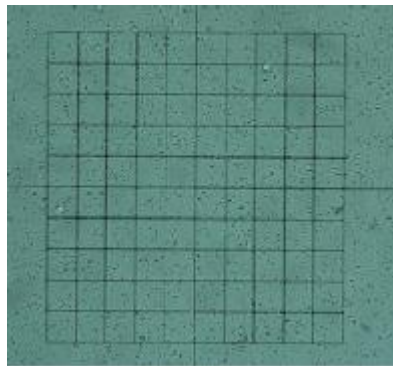


Figura. 6 imagen representativa de cámara Makler. Imagen tomada de (Roa Guerrero, 2012)

**Cámara neubauer:** Para realizar el análisis se introduce la muestra de semen que generalmente se ha sometido a una dilución previa con un diluyente y se observa al microscopio con el aumento adecuado para contar las células. Esta cámara está conformada por un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. De esta manera, el área de cada cuadro corresponde a 1 mm<sup>2</sup>. El cubreobjetos tiene una profundidad de 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie 0.1

milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie de cada cuadro y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1µl (Roa Guerrero, 2012), El conteo de células de la cámara neubauer se describe en la Ec2:

$$\#celulas = \frac{Pc}{Sc * Prof * dil} \quad (2)$$

Donde, Pc son las partículas contadas, Sc es la superficie contada en, Prof es la profundidad de la cámara en y Dil es la dilución utilizada antes del conteo para separar los espermatozoides por todos los cuadros.

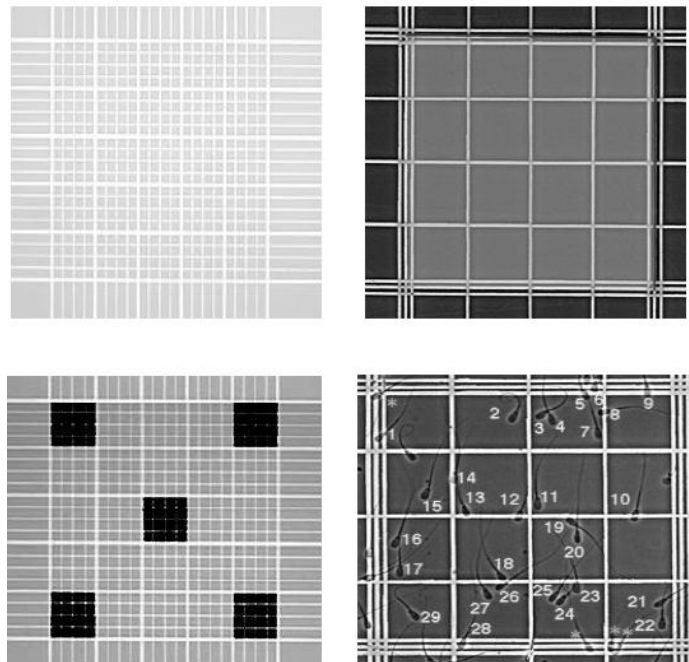


Figura. 7 Conteo de espermatozoides con cámara neubauer. Imagen tomada de (Angelino Olivera, 2009)

### 3. Capítulo 3. Diseño metodológico

---

#### 3.1. Metodología

La metodología de este proyecto está dividida en dos procesos desarrollados paralelamente, un proceso para viabilidad espermática y otro para concentración espermática, en la figura 8 se describe las secuencias de las actividades.

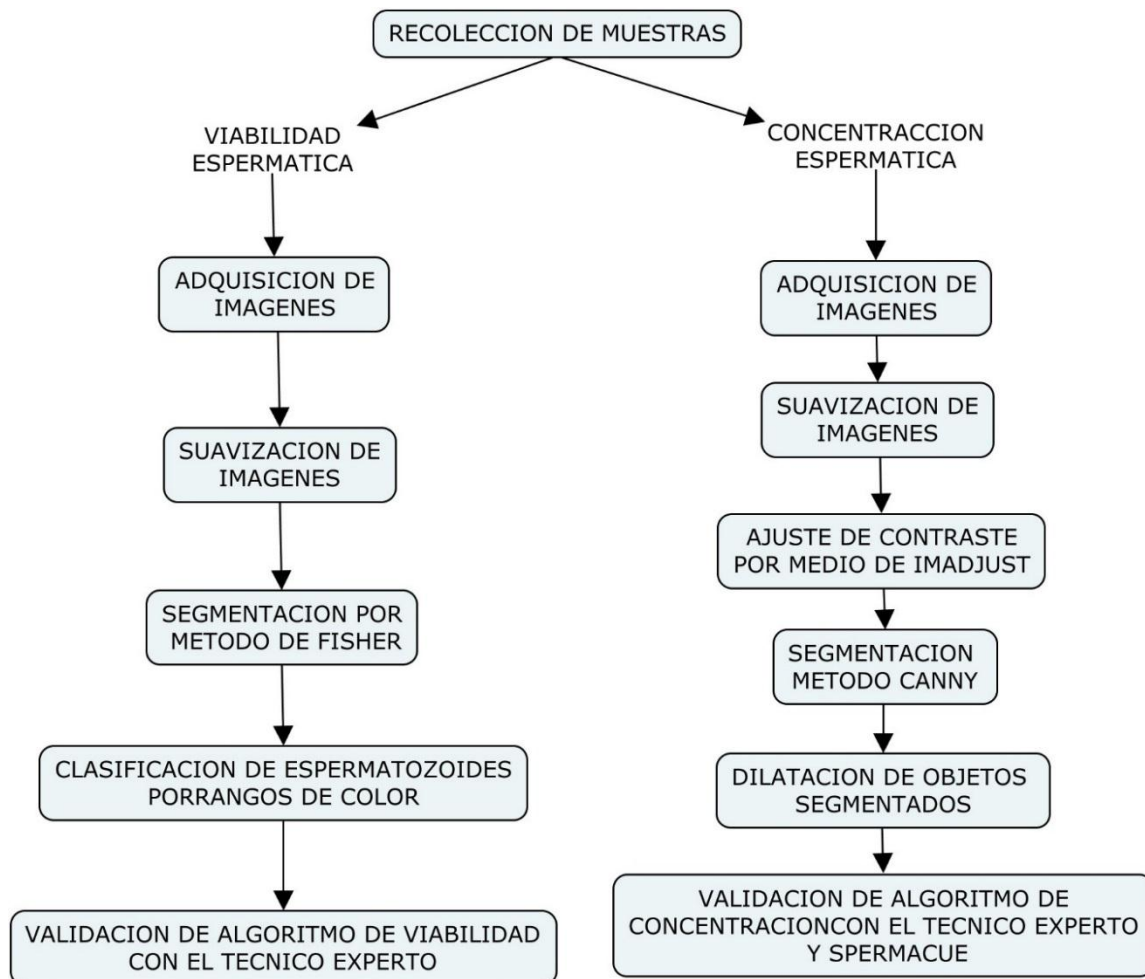


Figura. 8 Metodología. Imagen obtenida del autor.

### 3.1.1. Recolección de muestras

Este proyecto se desarrolló en el laboratorio de reproducción bovina de la universidad de Cundinamarca, el cual cuenta con equipos especializados para el análisis seminal y la obtención de las fotografías digitales de las muestras. En el proyecto trabajamos con muestras seminales pos congeladas. Dichas muestras fueron obtenidas del banco de esperma bovino de la universidad de Cundinamarca, y adicionalmente 3 pajillas del comité de ganaderos de la provincia del sumapaz.

Protocolo para obtención de la muestra

Limpieza escrotal para evitar impurezas durante el eyaculado.



Figura. 9 Limpieza de escroto. Imagen obtenida del autor.

Lavado del prepucio para eliminar residuos que afecten la muestra.



Figura. 10 Lavado del prepucio. Imagen obtenida del autor.

Uso de electro eyaculador para generar estímulos en el toro



Figura. 11 A) Inserción de sonda en toro. B) caja de instrumentos de electro eyaculador. Imagen obtenida del autor.

Recolección de líquido seminal.



Figura. 12 Recolección de muestra seminal. Imagen obtenida del autor.

### 3.1.2 Viabilidad espermática

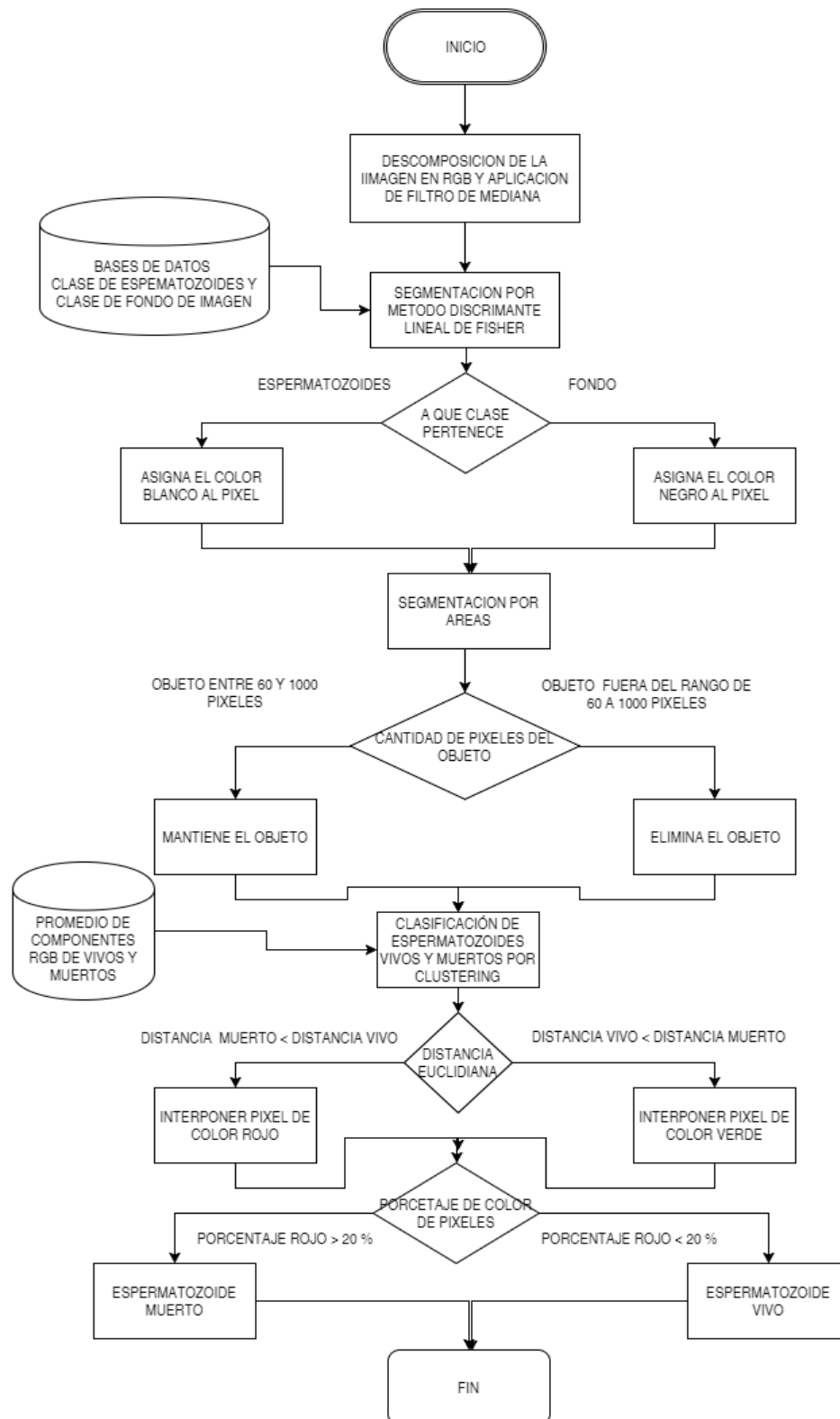


Figura. 13 Diagrama de flujo algoritmo de viabilidad. Elaborada por los autores

### 3.1.2.1 Adquisición de imágenes (eosina Y)

Las muestras seminales están almacenadas en un termo que contiene nitrógeno líquido, para garantizar la baja temperatura de los espermatozoides, las muestras que nos proporcionó comigan fueron trasladadas en un recipiente pequeño también con nitrógeno, hasta el laboratorio de universidad de Cundinamarca.



Figura. 14. Termo con muestras seminales y nitrógeno líquido. Imagen obtenida del autor.

Para la descongelación de las muestras es necesario un baño de maría a 36 grados centígrados, sumergido la muestra seminal en el baño de maría tenemos que esperar un minuto para sacar la pajilla y verter su contenido en un recipiente más pequeño. Es de vital importancia mantener el recipiente más pequeño en el baño de maría si no se va utilizar las muestras para su evaluación, con el fin de mantener los espermatozoides vivos.



Figura 15. Baño de maría. Imagen obtenida del autor.

Con la ayuda de una micro-pipeta calibrada en 5  $\mu$ l, montamos 5  $\mu$ l de muestra seminal en un portaobjeto y simultáneamente 5  $\mu$ l de eosina Y, con otro porta objetos mezclamos las dos sustancias y luego hacemos el barrido



Figura. 15 Micro pipeta. Imagen obtenida del autor.

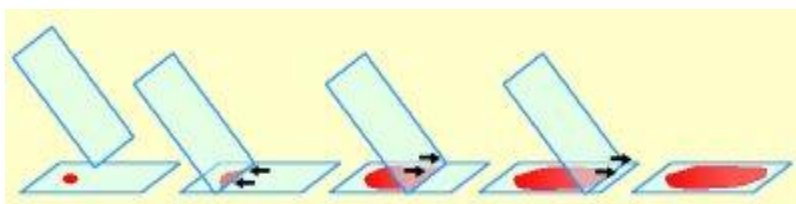


Figura. 16 Barrido de la muestra. Imagen obtenida del autor.

El porta objeto se coloca encima de una placa de calefacción para que la muestra se seque, este proceso de mora no menos de 10 minutos





Figura. 17 Placa de calefacción. Imagen obtenida del autor.

Después de los 10 minutos montamos el portaobjetos en el microscopio Olympus CX31 y observamos la muestra seminal con el lente de 40X, este microscopio cuenta con una abertura superior donde montamos la cámara moticam de 3 mega píxeles, la cual cuenta con conexión USB, con ello podemos observar la muestra seminal con el microscopio o en un monitor de un computador con la ayuda de la interfaz gráfica Motic Images Plus 2.0, estas imagen son almacenadas en el ordenador en la carpeta de cada toro evaluado.

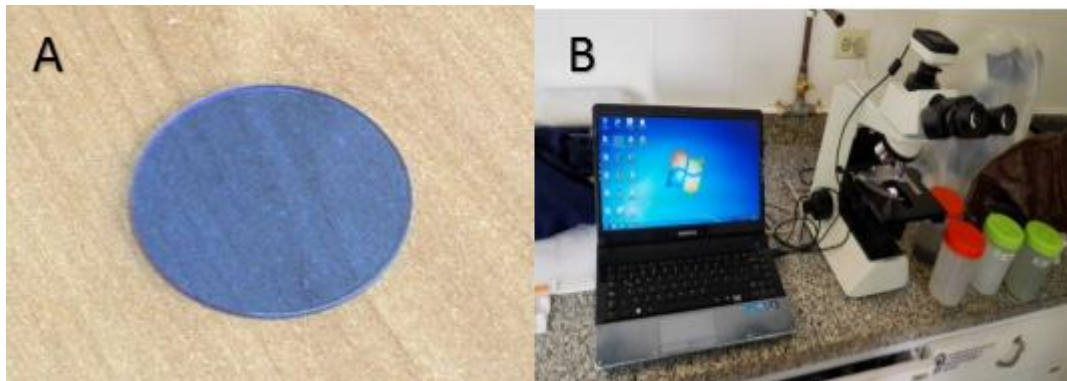


Figura. 18 A) Lente de luz azul. B) Microscopio con cámara. Imagen obtenida del autor.

### 3.1.2.2 Suavización de la imagen

En esta etapa se toman las imágenes adquiridas de las muestras seminales y se procede a reducir el ruido que nos puede entregar el lente del microscopio o el portaobjetos, para este fin utilizaremos el filtro de mediana puesto que fue con el que se obtuvo el mejor resultado, como las imágenes que se procesan en viabilidad son RGB, es necesario tomar cada componente de color y aplicar el filtro, y luego concatenar los componentes nuevamente.

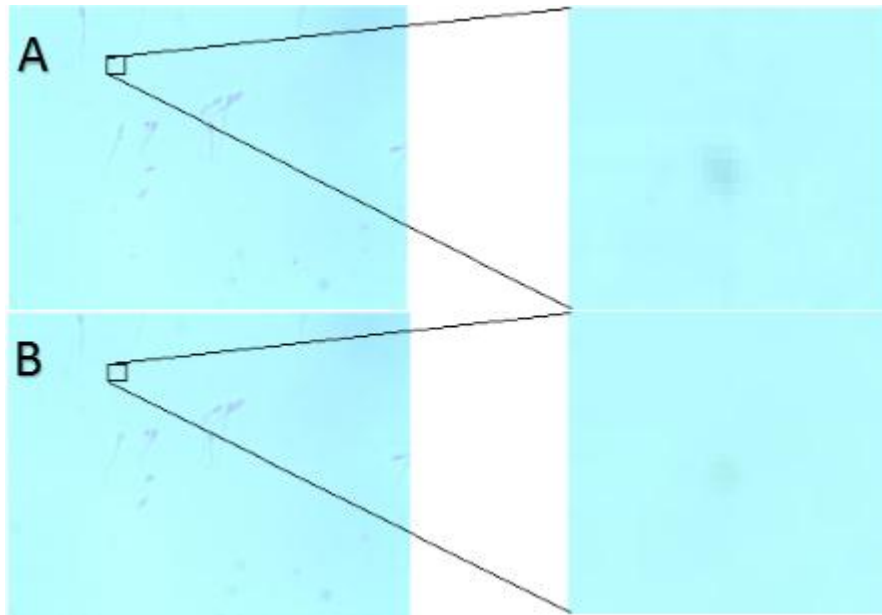


Figura. 19 Comparación imagen original y filtrada. A) Imagen original B) imagen filtrada. Imagen obtenida del autor.

### 3.1.2.3 Segmentación por Fisher y eliminación de áreas

La segmentación es el proceso en el cual destacamos el objeto de interés en la imagen procesada, el método discriminante lineal de Fisher es una serie de procedimientos matemáticos matriciales que logra disminuir la distancia entre los integrantes de una clase y aumentar la distancia entre las clases

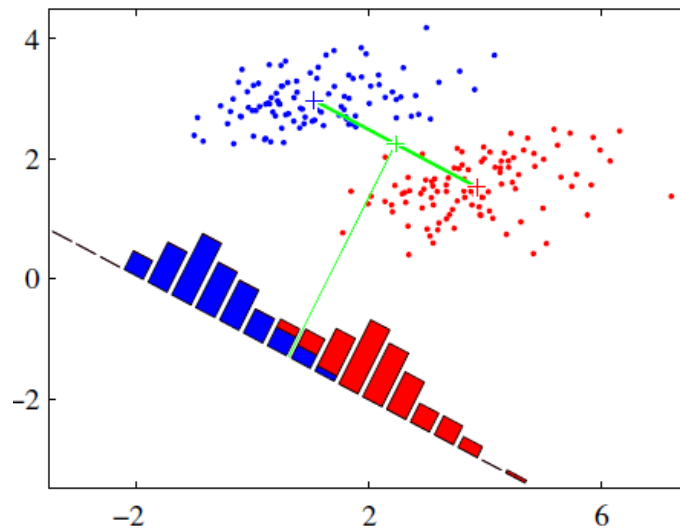


Figura. 20 Interpretación geométrica de Fisher. Tomada de (Bishop, 2006)

Encontrando el vector discriminante podemos evaluar la información de la cada pixel de la imagen y establecer en que clase se encuentra.

Para poder utilizar este método es necesario crear dos bases de datos, en una base de datos estará la información de los pixeles de los espermatozoides (vivos y muertos), y en la otra base de datos estará la información del fondo de la imagen (lo que no es espermatozoides).

Las bases de datos está conformada por 677 puntos de información de pixeles de espermatozoides vivos y muertos, y 677 puntos de fondo de la imagen, esta información fue extraída con la ayuda de la función `impixel()`.

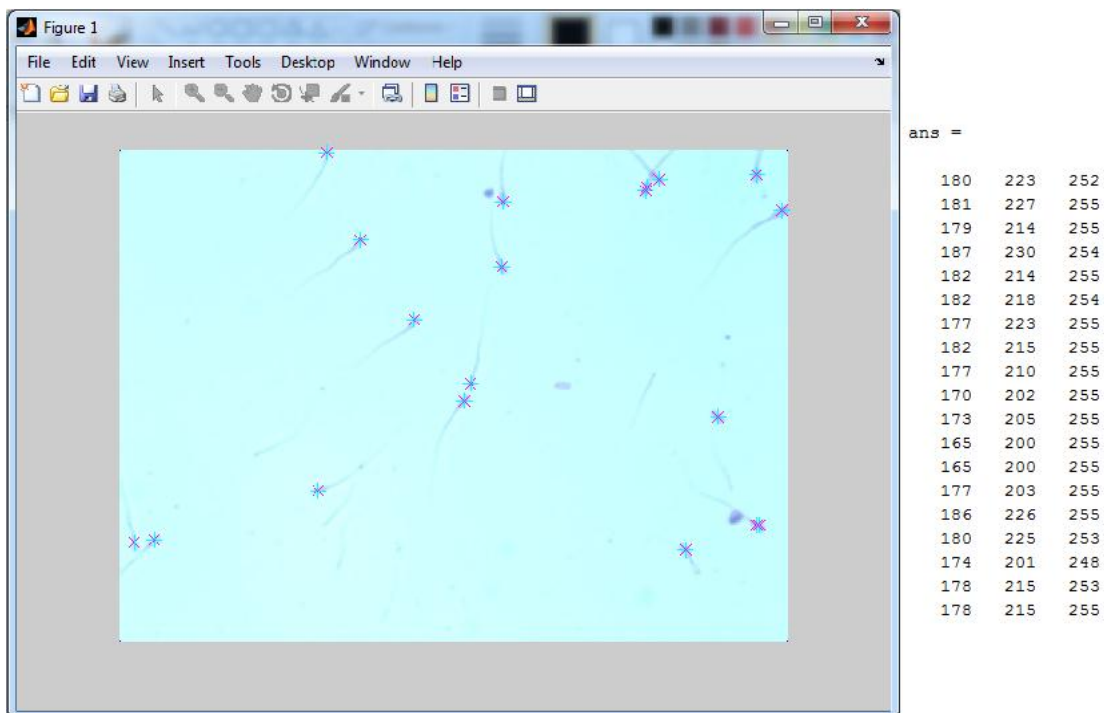


Figura. 21 Extracción de información con `impixel()`, elaborada por el autor.

La función **`impixel()`** crea un índice que puede recorrer la imagen y clicar las partes de interés, luego presionando enter nos arroja los componente de color de RGB de los pixeles anterior mente cliqueados. Este procedimiento se realizó con 15 imágenes de muestra seminal con eosina Y al 1 %, de cada imagen se tomó 45 puntos de información de los espermatozoides vivos y muertos, y otros 45 puntos del fondo de la imagen. Estas dos bases de datos son almacenadas en formato `.mat` de MatLab para su fácil llamado por medio del programa a la hora de la evaluación espermática.

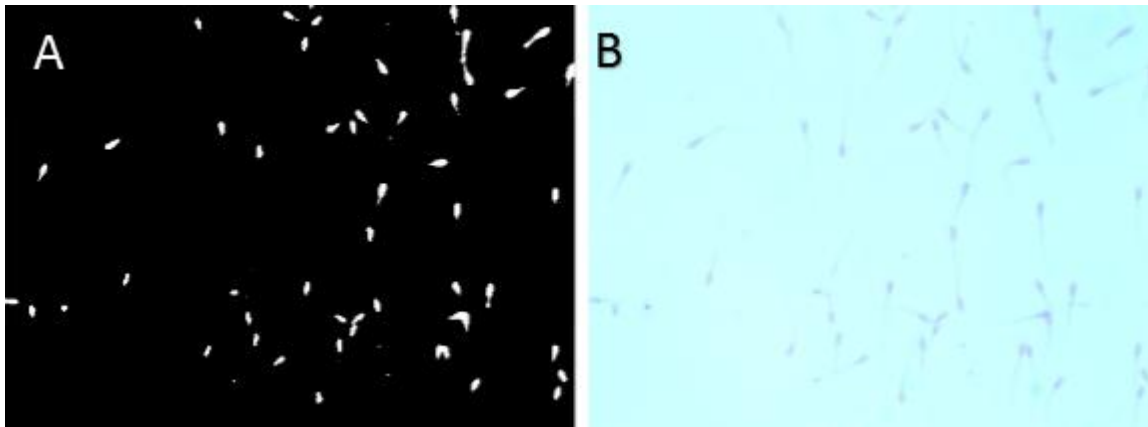


Figura. 22 A) imagen segmentada por Fisher. B) imagen original. Imagen obtenida del autor.

Notamos que puede haber pixeles del fondo de la imagen que son parecidos al de los espermatozoides, por tener este parecido Fisher los destaca en la clase de los espermatozoides, produciendo errores en la segmentación como se muestra en la figura 23

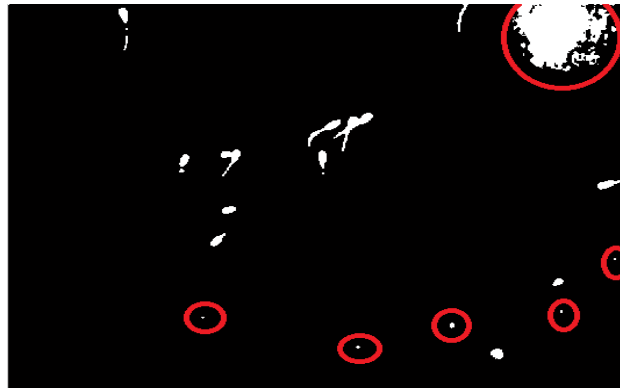


Figura. 23 Imagen segmentada con errores. Imagen obtenida del autor.

En la imagen anterior observamos que estos errores tienden a ser más pequeños o más grandes que los espermatozoides, por medio de la función **regionprops** que nos arroja el área (cantidad de pixeles) de cada objeto segmentados, limitamos estos objetos de menor y mayor tamaño de los espermatozoides y en otra imagen interponemos solo los objetos que estén en el rango de 60 a 1000 pixeles, en este rango están normalmente los espermatozoides, reduciendo en un alto porcentaje los errores producidos por aquellas regiones u objetos que presentan una coloración similar a los espermatozoides como se muestra a continuación.

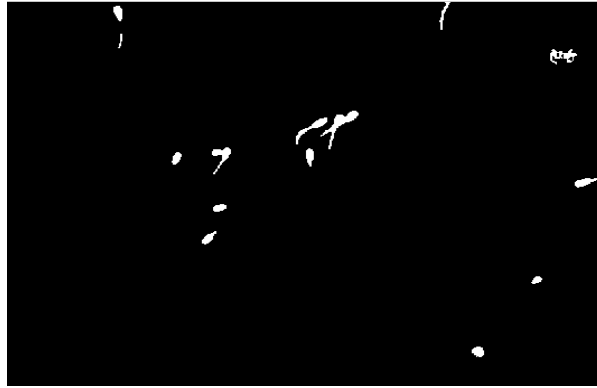


Figura. 24 Imagen de segmentación con eliminación de áreas menores y mayores a los espermatozoides. Imagen obtenida del autor.

#### 3.1.2.4 Clasificación por rangos de color (Clustering)

Con la imagen segmentada sabemos exactamente donde están ubicados los espermatozoides, con estas coordenadas se recorrió la imagen RGB inicialmente suavizada con el filtro de mediano e interponemos los pixeles de los espermatozoides en una nueva imagen.

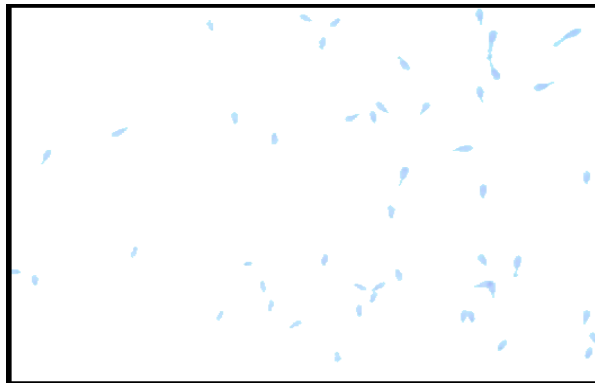


Figura. 25 Imagen con componentes RGB interpuestos. Imagen obtenida del autor.

Para la clasificación se tomó el 22 % de las imágenes obtenidas en la base de datos, para identificar un promedio del color en los objetos a clasificar (espermatozoides vivos y muertos), a cada pixel de la figura 25 se le identifico la distancia euclidiana con respecto al color promedio de cada una de las bases de datos  $dm_1$  para los espermatozoides vivos y  $dm_2$  para los espermatozoides muertos. Finalmente, con la distancia en el espacio del color para cada pixel con respecto al píxel promedio de cada clase, fueron clasificados los pixeles de la siguiente manera: si  $dm_1$  es menor que  $dm_2$  el píxel pertenece a espermatozoides vivos y se marca de color verde, pero si la  $dm_1$  es mayor que  $dm_2$  el píxel pertenece a espermatozoides muertos, a

continuación en la figura 26 se puede evidenciar la clasificación de píxeles de los espermatozoides.

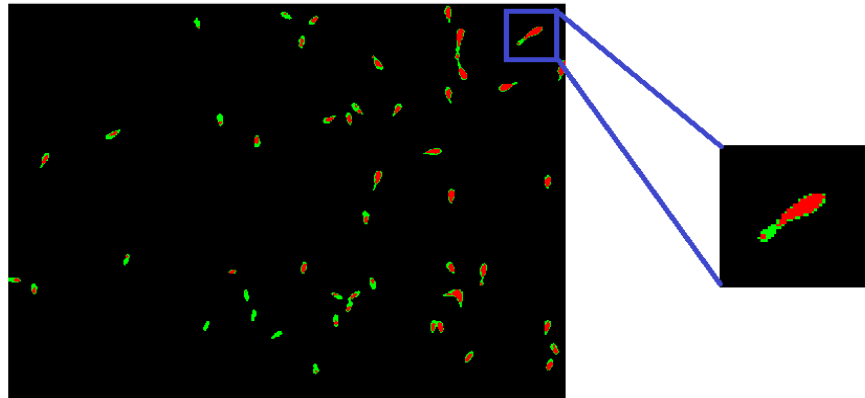


Figura. 26 Clasificación de píxeles de cada objeto. Imagen obtenida del autor.

En la figura anterior, se evidenció que las áreas de espermatozoides presentan coloración roja y verde debido a que en el proceso de tinción de la muestra; el colorante vital utilizado no penetra uniformemente la membrana rota de cada espermatozoide muerto. Posteriormente, se tomó cada espermatozoide de la imagen y calculamos el porcentaje de píxeles rojos y píxeles verdes de cada uno y si los píxeles rojos superan el 20 %, clasificamos el espermatozoide como muerto y los que no cumplan esta condición se clasifican como vivos. A continuación en la figura 27 se evidencian las áreas de espermatozoides vivos de color verde y las áreas de espermatozoides muertos de color rojo.

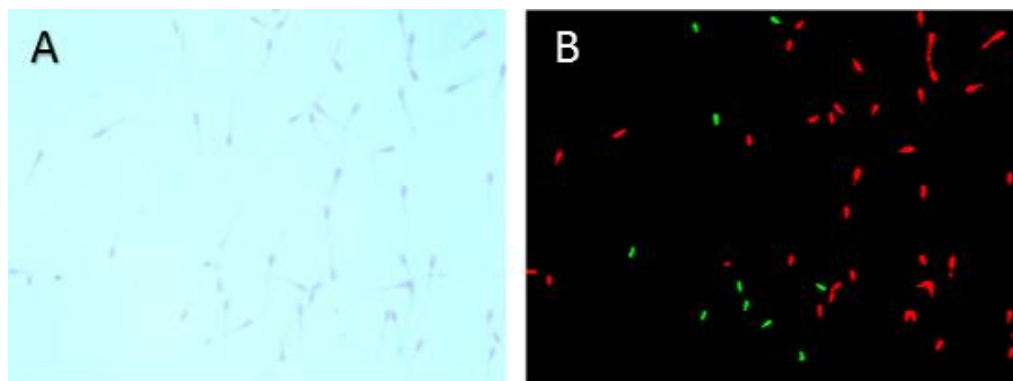


Figura. 27 A) Imagen original. B) Clasificación de espermatozoides vivos y muertos. Imagen obtenida del autor.

### 3.1.2.5 Validación del algoritmo de viabilidad con el técnico experto

Para la validación del algoritmo de viabilidad espermática, fueron utilizadas 70 imágenes de diferentes muestras seminales. Las imágenes fueron evaluadas por unos técnicos expertos en reproducción y por la herramienta computacional desarrollada.

### 3.1.3 Concentración espermática

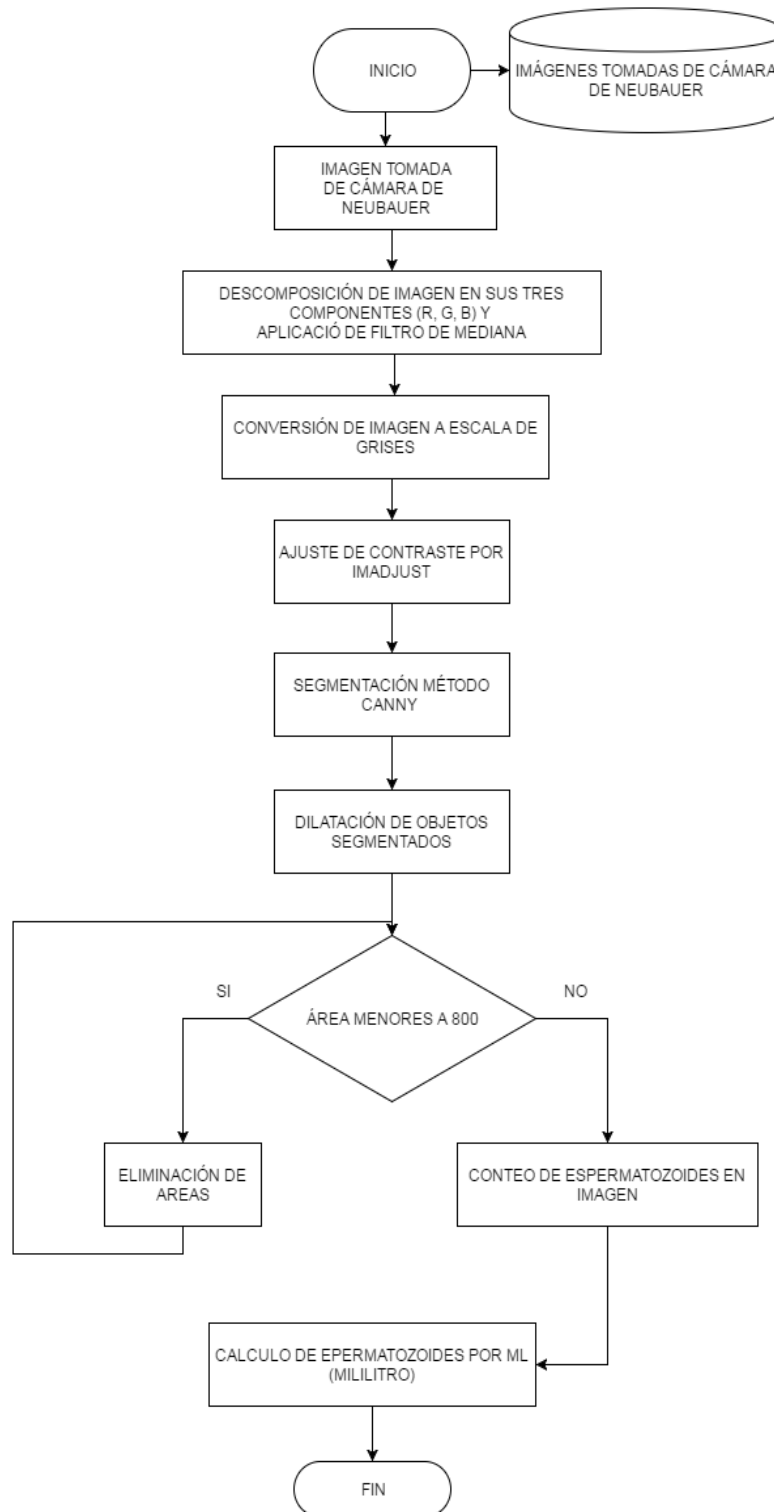


Figura. 28 Diagrama de flujo algoritmo de concentración. Imagen elaborada por los autores.

### 3.1.3.1 Adquisición de imágenes cámara de neubauer

En el proceso de adquisición de las imágenes para viabilidad espermática fue utilizado un microscopio olympus CX31 con cámara de 3 megapíxeles, con un objetivo de 40x y una cámara de neubauer para el conteo de los espermatozoides.

Proceso de concentración espermática

1. Realizar dilución de semen y agua destilada.
2. Verter dilución en cámara de neubauer.
3. Colocar cámara de neubauer en microscopio.
4. Adquisición de imágenes.

Inicialmente, se hizo una dilución de semen y agua destilada se tomaron 50  $\mu$ l (micro litros) del semen y 10 ml (mililitros) de agua (dilución 1/200) (Brogliatti). Una vez realizada la dilución se procede a tomar una muestra de esta y se verte en la cámara de neubauer.

La cámara de neubauer se situó en el microscopio para poder hacer el conteo y la adquisición de imágenes mediante el microscopio.

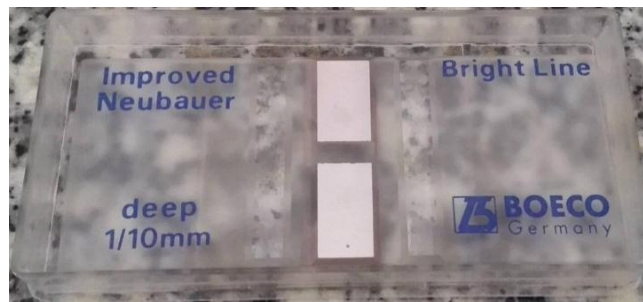


Figura. 29 Cámara neubauer. Imagen obtenida del autor.



Figura. 30 Vista de cámara neubauer desde microscopio. Imagen obtenida del autor.



### 3.1.3.2 Suavización de la imagen

Una vez obtenida las imágenes se prosigue a ingresarlas a MatLab descomponiendo la imagen en sus tres componentes (R, G, B), se procede a realizar un suavizado de la imagen el cual consiste en reducir el ruido de la imagen, esto se hace mediante un filtro de mediana hecho esto se procede a concatenar la imagen para convertirla en escala de grises.

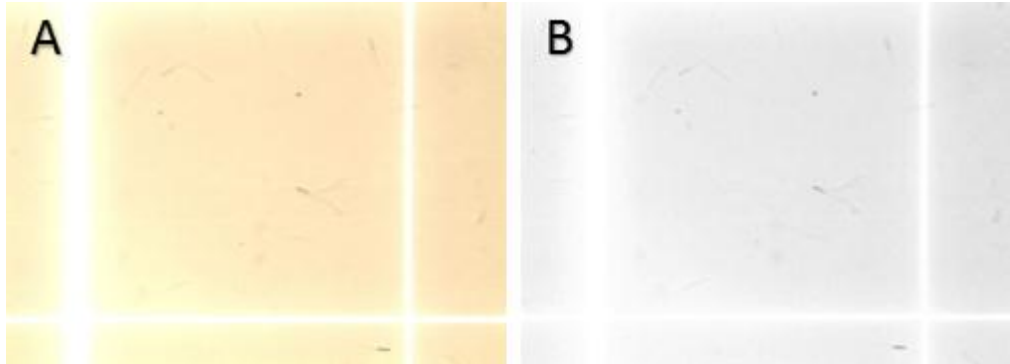


Figura. 31 A) imagen original. B) imagen en escala de grises con filtro. Imagen obtenida del autor.

### 3.1.3.3 Ajuste de contraste por imadjust

Teniendo las imágenes en escala de grises se implementó la función `imadjust` de MatLab que se usa para las transformaciones de intensidad en las imágenes adquiridas. Este procedimiento se realizó ya que las imágenes en escala de grises el fondo y los espermatozoides son similares en intensidad como se muestra en la imagen A de la figura 32. Se implementó `imadjust` para poder crear diferencia de intensidades entre el fondo y los espermatozoides, de esta manera se logró segmentar las imágenes con mayor facilidad como se puede observar en la imagen B de la figura 32.

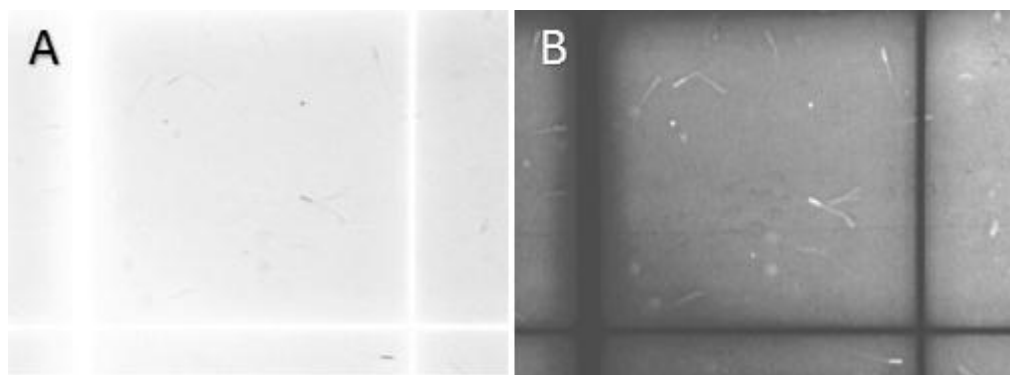


Figura. 32. A) imagen en escala de grises. B) imagen con `imadjust`. Imagen obtenida del autor.

### 3.1.3.4 Extracción de regiones pertenecientes a los espermatozoides por el método de CANNY

Para la segmentación se utilizó el método de CANNY ya que fue con el que mejor resultado se obtuvo. Este método consiste en la convolución de un filtro gaussiano, posteriormente se calcula el gradiente para hallar los píxeles de máxima variación por último se realiza un proceso de doble umbralización. Con este método la imagen resultante nos muestra los bordes de los espermatozoides y otras áreas las cuales tiene que ser eliminadas por medio de otros métodos como se muestra en la figura 33.

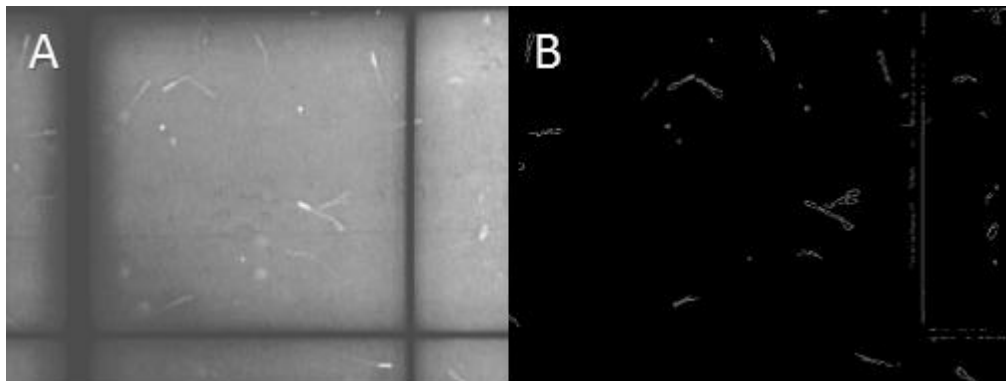


Figura. 33 A) imagen con imadjust. B) imagen CANNY. Imagen obtenida del autor.

### 3.1.3.5 Dilatación de objetos segmentados

La dilatación se usó para agrandar los bordes de los elementos segmentados es decir aumenta las áreas, como se observa en la figura 34

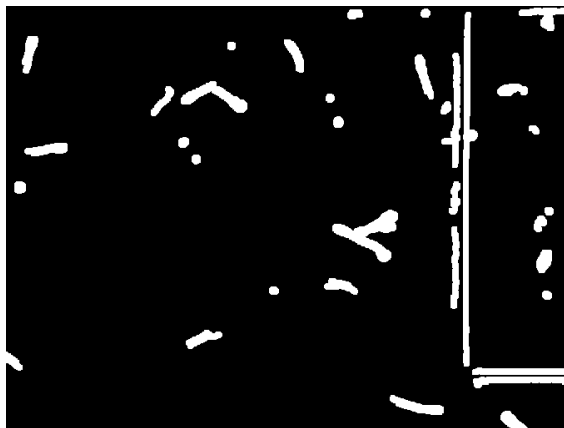


Figura. 34 A) imagen dilatada. Imagen obtenida del autor.

Una vez dilatada la imagen se observa que se encuentran muchos objetos que no son espermatozoides, todo esto es ruido en la imagen así que se procede a quitar estos objetos. Se empieza por los elementos más pequeños este proceso se realiza calculando las áreas de todos los objetos en la imagen una vez hecho esto se identifica las áreas de los objetos más pequeños y más grandes que los espermatozoides y se procede a eliminarlos.

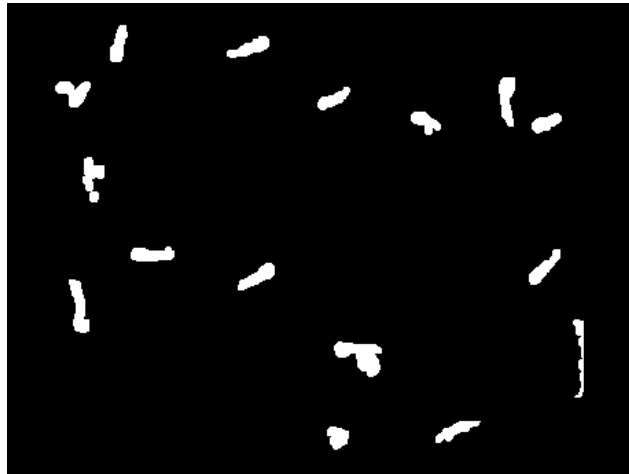


Figura. 35 Imagen con eliminación de áreas. Imagen obtenida del autor.

### 3.1.3.5 Validación de algoritmo de concentración

Para la validación del algoritmo de concentración se tomó una foto desde el microscopio, esta imagen fue segmentada para poder extraer los espermatozoides y de esta manera poder contarlos, seguidamente se implementó la siguiente fórmula tomada de (Brogliatti) para hallar la concentración por mililitro (ml).

$$N^{\circ} \text{ espermatozoides} * 10 (\text{altura del recuadro}) * 1000 (\text{pasaje a ml}) * 200 (\text{dilución}) = N^{\circ} \text{ espermatozoides por ml} \quad (1)$$

Además de esto se realizó la validación mediante el técnico experto con cámara de Neubauer y con la herramienta Spermacue.

## 4. Capítulo 4. Análisis de resultados y discusión

---

### 4.1. VIABILIDAD

#### 4.1.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Inicialmente se recolectaron muestras seminales de cinco toros, en la finca (La alemana) en el municipio de Pandi (Cundinamarca) usando los equipos del laboratorio móvil del Sena, estas imágenes no fueron aptas para la evaluación espermática de nuestra herramienta computacional, las imágenes no presentaban contraste de color para identificación de espermatozoides vivos y muertos, su alto grado de ruido no permitía la segmentación de las mismas. Los malos resultados de estas imágenes son provenientes de los equipos de laboratorio del Sena, como microscopio y cámara e implementación para la recolección de muestras, en la figura 36 se observa las imágenes obtenidas por medio del laboratorio de Sena.

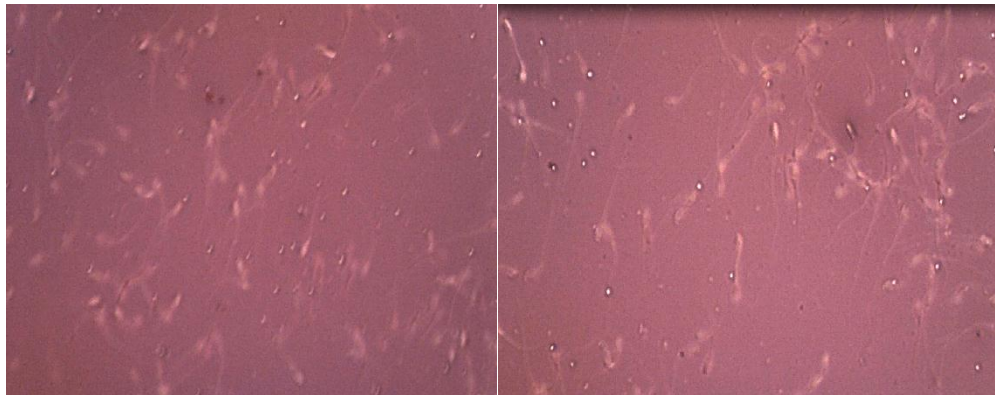


Figura. 36 imágenes obtenidas con el laboratorio del sena. Imagen elaborada por el autor.

Por dicha razón la tesis se desarrolló en el laboratorio de reproducción bovina de la universidad de Cundinamarca, ya que contaba con equipos más precisos y calificados, las imágenes obtenidas allí fueron más amigables con el procesamiento de imágenes, ya que la cámara nos permitía tener una mejor resolución de la imagen y el microscopio no añadía demasiado ruido, como si lo hacía el microscopio del laboratorio del Sena, gracias a estas cualidades se podía observar en la figura 37 claramente los espermatozoides.

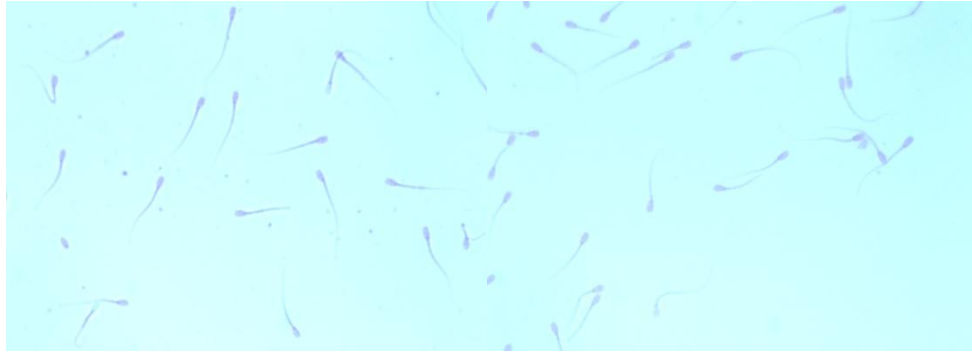


Figura. 37 Imágenes obtenidas en el laboratorio de reproducción de la universidad de Cundinamarca  
Imagen elaborada por el autor

#### 4.1.2. PRE-PROSESAMIENTO DE LA IMAGEN

Se implementaron cuatro filtros para eliminar el ruido en las imágenes, se buscó que el filtro no distorsionara la imagen, produciendo pérdida de información, en la figura 38 se observa la implementación de cada filtro en una imagen del proyecto.

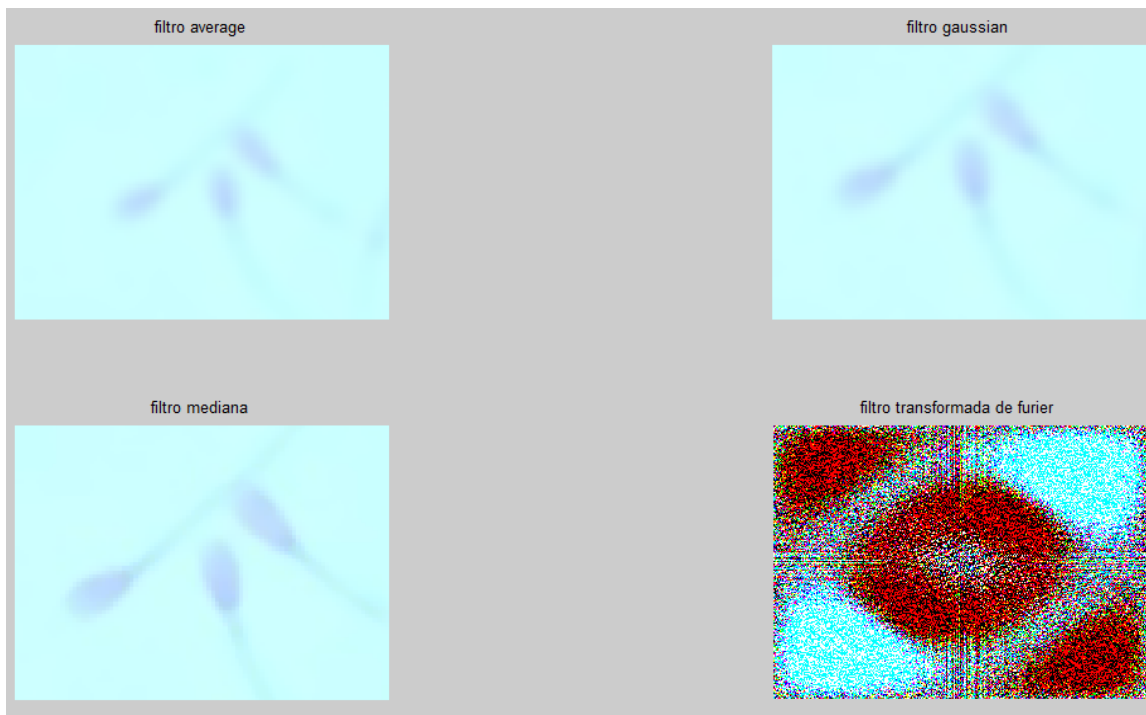


Figura. 38 Filtros implementados para suavización Imagen elaborada por el autor

en este caso el filtro de transformada de Fourier, distorsionaba totalmente la imagen haciendo imposible la detección de los espermatozoides, los otros tres filtros (average, gaussian y mediana) mantienen la forma de los espermatozoides con algunas grandes diferencias, el filtro average difumina la cola y disminuye las áreas de las cabezas de

los espermatozoides, el filtro gaussian desvanece los bordes de los espermatozoides, altera el color de los espermatozoides y también disminuye el área de las cabezas.



Figura. 39. Imagen original y filtro de mediana Imagen elaborada por el autor

Siendo el filtro de mediana la mejor opción de suavizado de la imagen, puesto que no altera su área, no varía el color de los espermatozoides con respecto a la imagen original y desvanece las partículas pequeñas que se encuentran en el fondo de la imagen, filtro de mediana se puede observar en la figura 39.

#### **4.1.3. SEGMENTACIÓN DE ESPERMATOZOIDES**

Se encontraron falencias en la segmentación de espermatozoides por método discriminante lineal Fisher, puesto que no segmentó el total de espermatozoides de las imágenes, esto sucedió por que los espermatozoides se parecían bastante al fondo, para implementar el método discriminante lineal de Fisher es necesario tener dos clases, para el desarrollo de este proyecto estaba la clase de espermatozoides y la clase de fondo de la imagen, algunos espermatozoides no fueron segmentados ya que sus componentes de color eran parecidos a la clase de fondo de la imagen, siendo eliminados de la imagen segmentada, en la imagen A de la figura 40 indicamos con un círculo rojo los espermatozoides que se perderán por tener componentes de color parecidos y en la imagen B se rectificó la pérdida de estos espermatozoides después de la segmentación .



Figura. 40 A. imagen con filtro de mediana con espermatozoides no segmentados, B. imagen segmentada con Fisher. Imagen elaborada por el autor

Complementario al método discriminante lineal de Fisher se implementó segmentación por áreas, las áreas por debajo y por encima del área de los espermatozoides se eliminaban de la imagen como se observa en las imágenes C y D de la figura 41, esta metodología contribuyo bastante para reducir ruido en el fondo de la imagen, como partículas que Fisher tomo cercanos a la clase de los espermatozoides.

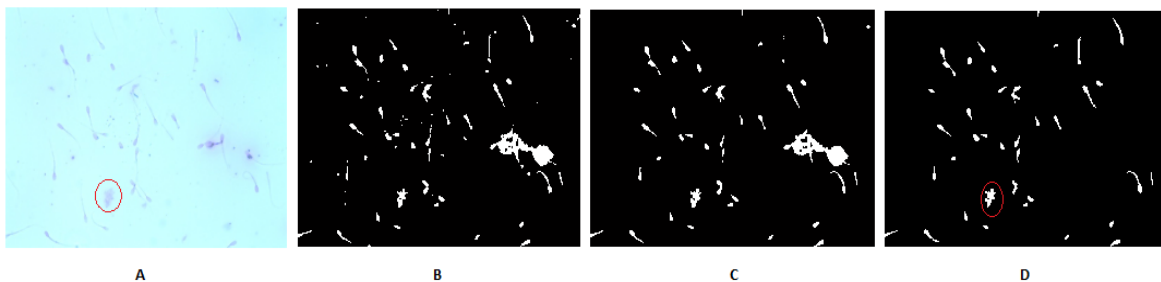


Figura. 41 A. Imagen original señalando ruido parecido en color a los espermatozoides y en área, B. Segmentación por Fisher, C. Segmentación por áreas menores a los espermatozoides, D. Segmentación por áreas mayores a los espermatozoides señalando ruido existente después de la segmentación total. Imagen elaborada por el autor

Aunque se haya filtrado las imágenes por dos métodos de segmentación no se elimina totalmente el ruido, algunos objetos como sangre o cristales de la muestra seminal tienen los mismos componentes de color de los espermatozoides y áreas similares a los mismos, siendo segmentados como espermatozoides como se observa en la imagen A y D de la figura 41 donde se indica con un círculo rojo un objeto que sobrevive a las dos segmentaciones y no es un espermatozoide.

#### 4.1.4. CLASIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS POR CLUSTERING

La clasificación de los espermatozoides vivos y muertos está directamente relacionada con color de los mismos, lamentablemente el contraste de color entre ellos es muy poco, siendo difícil el reconocimiento de espermatozoides vivos y muertos, esto se presentó por la tinción con el reactivo eosina Y en agua desionizada, aunque este reactivo no dio el resultado esperado fue el mejor ya que anteriormente se experimentó con eosina nigrosina, azul de metileno y eosina ,en base de alcohol, obteniendo resultados peores, donde los espermatozoides se parecían al fondo y el contraste de color entre vivos y muertos era nulo, en la figura 42 se puede observar la implementación de las tinciones que fracasaron en el transcurso del proyecto.

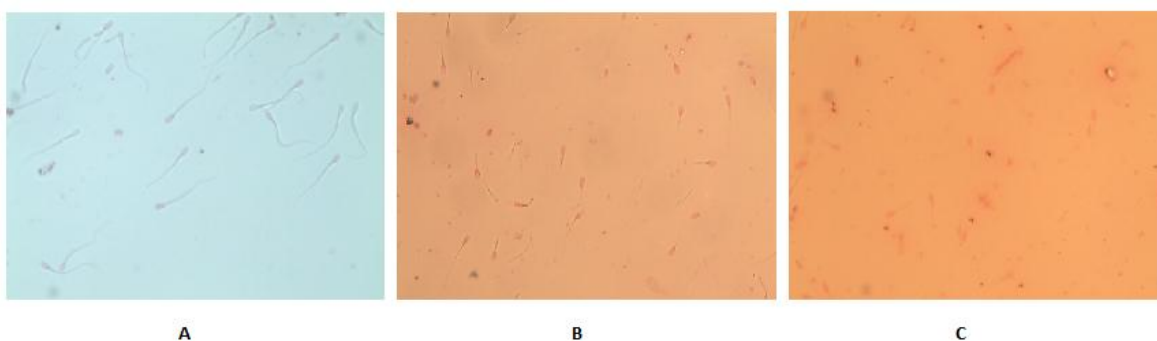


Figura. 42 A. Tinción con azul de metileno, B. Eosina nigrosina, C. Eosina Y en base de alcohol.  
Imagen elaborada por el autor

Aun con el poco contraste que presenta la tinción con eosina Y en agua desionizada, se pudieron clasificar los espermatozoides vivos y muertos, cabe resaltar que esta clasificación está sujeta a errores, puesto que los espermatozoides vivos y muertos son parecidos, nuestra herramienta puede tomar espermatozoides que para el técnico experto son vivos, como muertos. Como mencionamos anteriormente, la clasificación de los espermatozoides está relacionada con el color dependemos estrictamente del tinte, esperamos este trabajo sea la base para futuras investigaciones en el desarrollo de nuevas tinciones que obtengan un mayor contraste entre los espermatozoides vivos y muertos y de esta manera disminuir el error que se produce en estos análisis.

#### 4.1.5. VALIDACIÓN DE LA HERRAMIENTA CON EL TÉCNICO EXPERTO

Se implementó la herramienta computacional en 70 imágenes y se guardaron los resultados con el número de espermatozoides vivos, muertos y total, por otra parte el técnico experto, que por medio de su concepto evaluó la cantidad de espermatozoides vivos, muertos y total de las mismas setenta imágenes que se implementaron en el



programa y luego contrarrestar los resultados. Se tomaron como parámetros de referencia o valores reales los datos obtenidos por el experto.

En las gráficas 43, 44 y 45 se muestran las medidas obtenidas por la herramienta computacional y el técnico experto en cuanto a espermatozoides vivos, muertos y total de cada imagen, observamos que la gráfica 43 tiene los valores más alejados respecto al valor real por medio del técnico experto, y la gráfica 45 la cual pertenece al total de espermatozoides, allí se evidenció que los valores del experto y la herramienta más presentaron alta correlación, esto nos indica que la segmentación está tomando la mayoría de espermatozoides en la imagen.

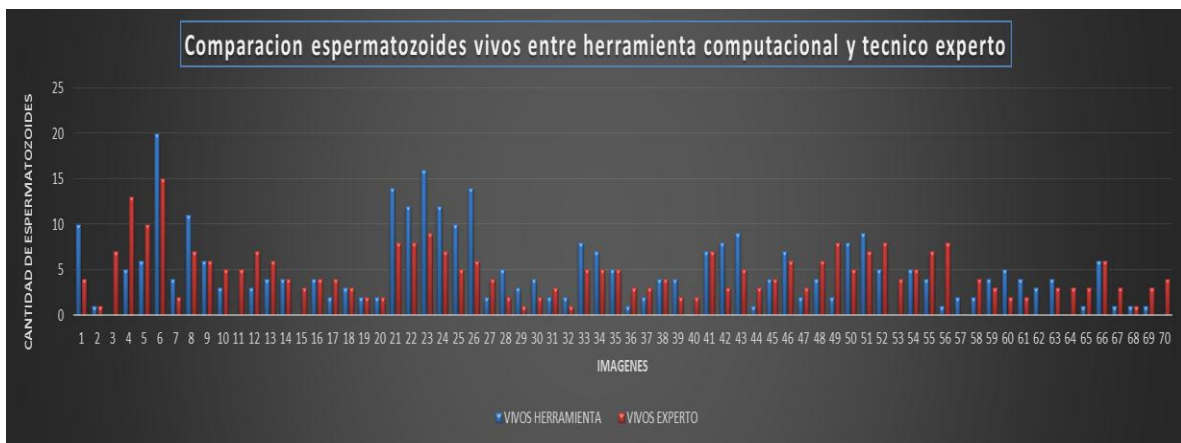


Figura. 43 Comparación de espermatozoides vivos entre herramienta computacional y técnico experto  
Imagen elaborada por el autor

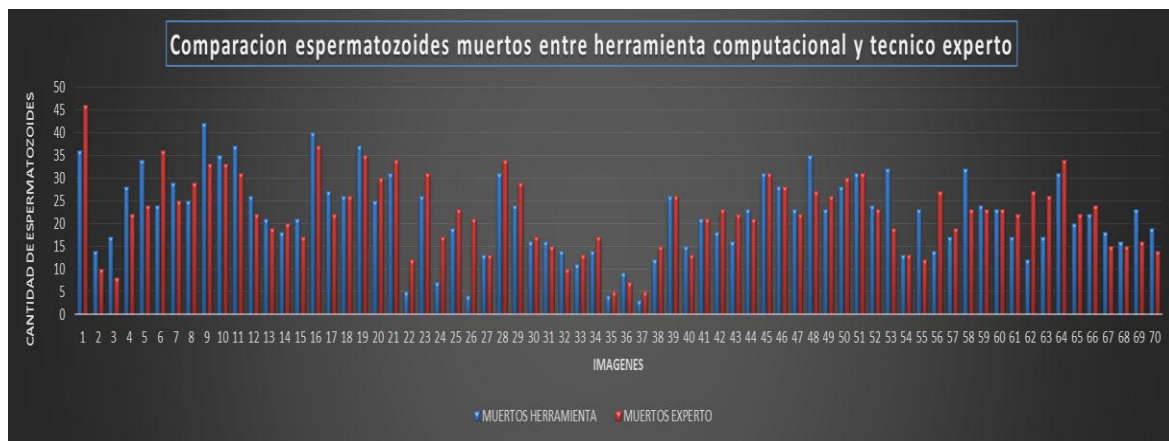


Figura. 44 Comparación de espermatozoides muertos entre herramienta computacional y técnico experto.  
Imagen elaborada por el autor

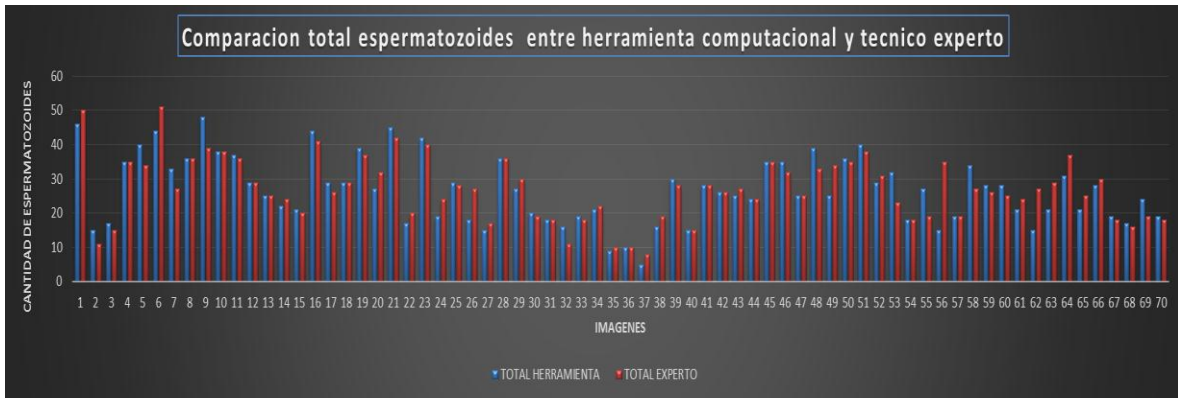


Figura. 45 Comparación de total de espermatozoides entre herramienta computacional y técnico experto. Imagen elaborada por el autor

Con el fin de corroborar los resultados se identificó el error absoluto para los espermatozoides vivos y otra para espermatozoides muertos, en la figura 48 se muestra los resultados en la cual se evidencia que en la mayoría de las imágenes el error estuvo entre los valores mínimos, además se identificó el error absoluto de espermatozoides vivos, muertos y total de cada imagen y teniendo en cuenta el error absoluto mínimo y máximo de cada clase se obtuvieron cuatro rangos, esto con el fin de encontrar en que rango se encuentra la mayoría de las imágenes, en la tabla 3 se muestra el error mínimo y máximo de la medición de vivos muertos y total de espermatozoides. En los tres casos la mayoría de las imágenes se encuentran en el rango con el error absoluto más pequeño.

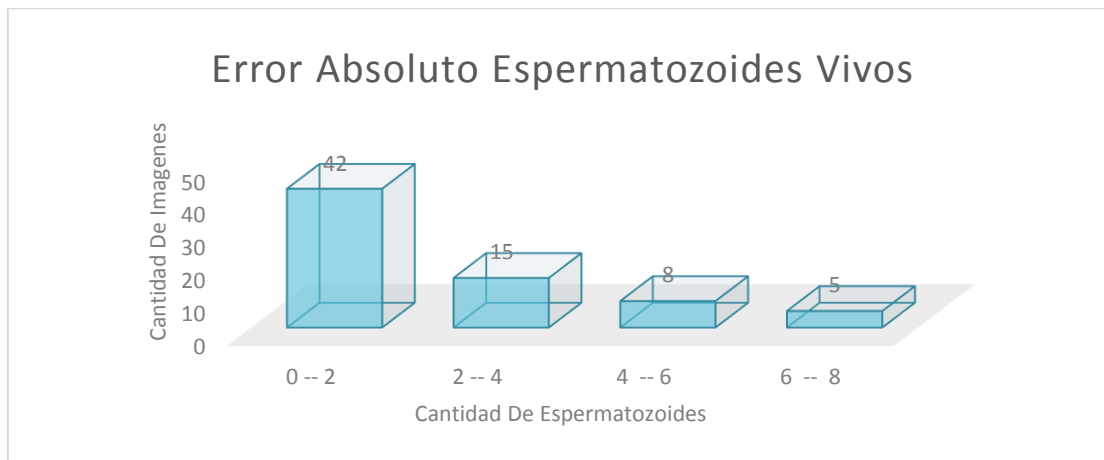


Figura. 46 Cantidad de imágenes en rangos de error absoluto en vivos Imagen elaborada por el autor

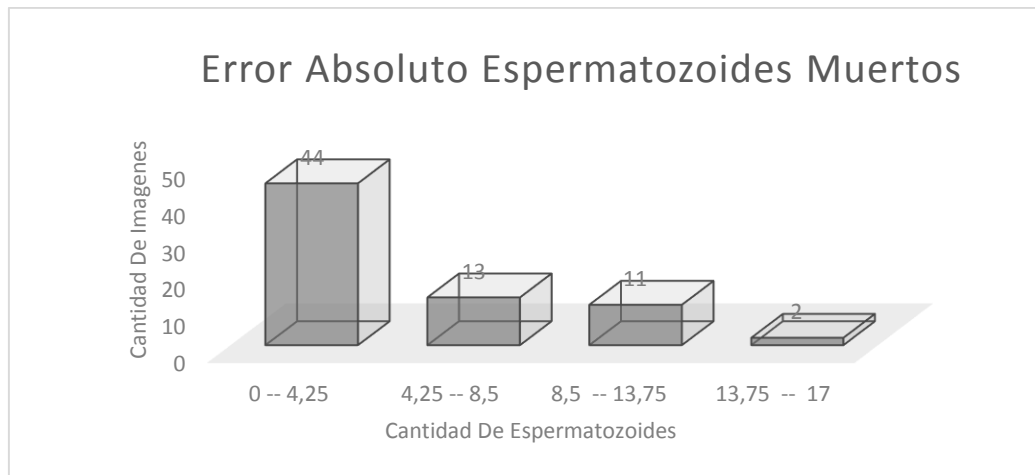


Figura. 47 Cantidad de imágenes en rangos de error absoluto en muertos Imagen elaborada por el autor

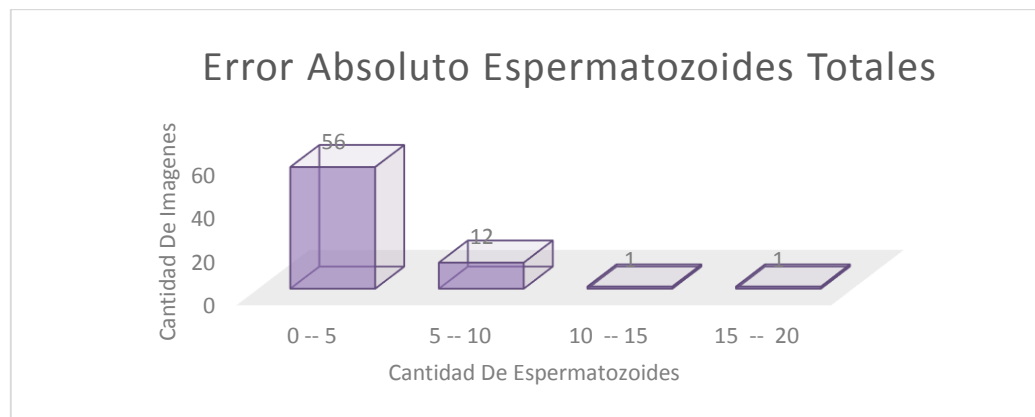


Figura. 48 Cantidad de imágenes en rangos de error absoluto en total de espermatozoides Imagen elaborada por el autor

Tabla 3 Errores mínimos y máximos de la medición de la herramienta computacional

CLASE DE ESPERMATOZOIDES	ERROR ABSOLUTO	NUMERO DE ESPERMATOZOIDES
VIVOS	ERROR MINIMO	0
	ERROR MAXIMO	8
MUERTOS	ERROR MINIMO	0
	ERROR MAXIMO	17
TOTAL	ERROR MINIMO	0
	ERROR MAXIMO	20

Por medio de la matriz de confusión podemos encontrar la exactitud y precisión la herramienta computacional, en esta matriz se debe llenar con el número de

espermatozoides vivos y muertos que fueron encontrados tanto por el experto como por la herramienta y también se debe llenar otros dos campos de falsos positivos y falsos negativos, en este caso sería los espermatozoides que la herramienta tomó como vivos y realmente eran muertos y viceversa.

Tabla 4 Matriz de confusión en resultados de viabilidad de las 70 imágenes.

	Vivos herramienta computacional	muertos herramienta computacional
Vivos experto	235	272
Muertos experto	190	1408
Exactitud	78,05 %	
precisión	83,8 %	

## 4.2. CONCENTRACIÓN

### 4.2.1 Adquisición y pre-procesamiento

Para la toma de imágenes se utilizaron pajillas las cuales se obtuvieron en el laboratorio de reproducción de la Universidad de Cundinamarca, estas imágenes fueron tomadas mediante el microscopio Olympus CX31 que cuenta con una cámara de 3 megapíxeles y con cámara nubauer BOECO.

Durante el proceso de pre-procesamiento se probaron varios filtros con el fin de determinar cuál de estos tenía mejores resultados en la imagen en cuanto a eliminación de ruido, los filtros utilizados fueron: average, gaussian, prewitt, sobel, laplacian y mediana como se puede evidenciar en las figuras 49, 50 y 51.

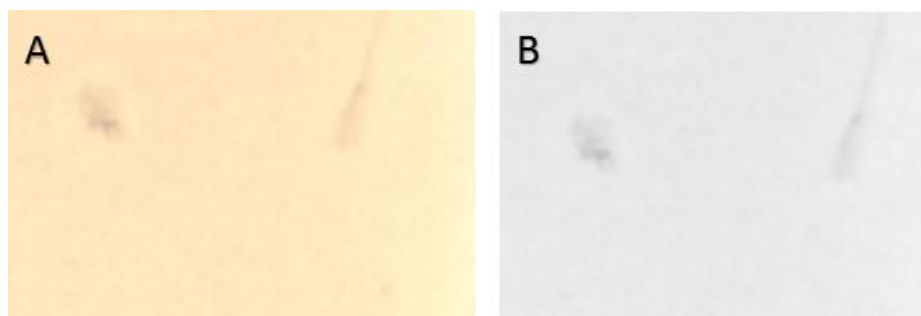


Figura. 49 A) imagen original. B) imagen escala de grises con filtro gaussian. Imagen elaborada por el autor

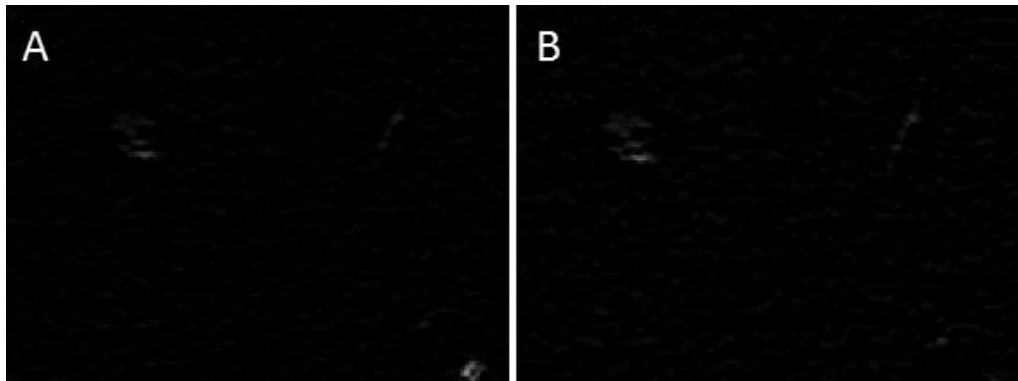


Figura. 50 A) imagen con filtro prewitt. B) imagen con filtro sobel. Imagen elaborada por el autor

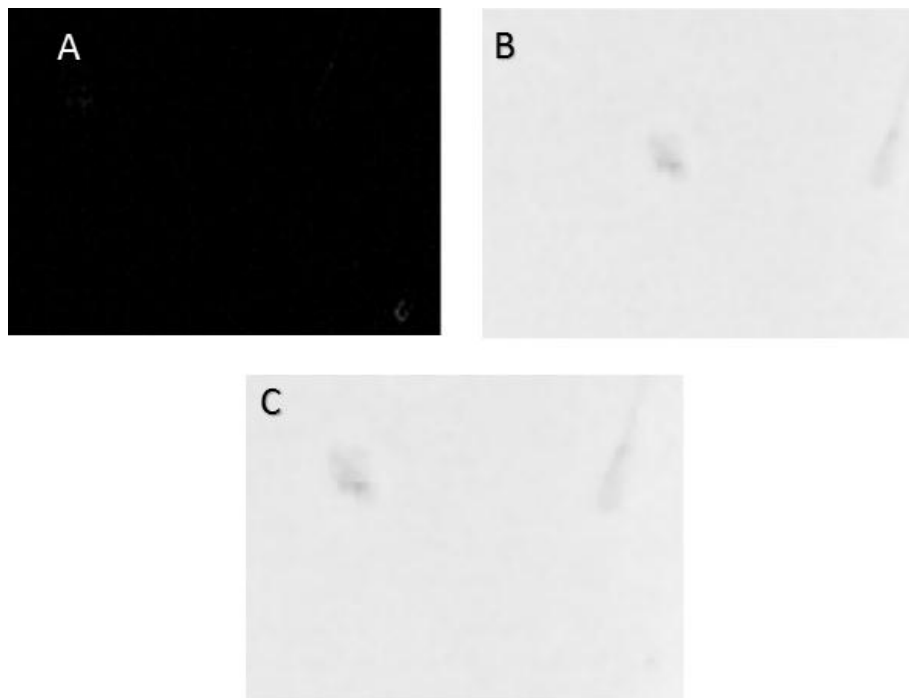


Figura. 51 A) imagen con filtro laplacian. B) imagen escala de grises con filtro de mediana. C) imagen con filtro average Imagen elaborada por el autor

El filtro gaussian y de average tiene buenos resultados pero no limpian la imagen muy bien y el fondo de estas aún queda con mucho ruido, con los filtros de prewitt, sobel y laplacian no se obtuvieron buenos resultados debido a que estos eliminan espermatozoides y agregan demasiado ruido a la imagen. El filtro que mejores resultados presento fue el de mediana debido a que los objetos pequeños como ruido los trata de asemejar al fondo y los objetos grandes como espermatozoides los intenta diferenciar del fondo por estos motivos se eligió el filtro de mediana para implementarlo en el pre-procesamiento de la imágenes.

#### 4.2.2. Métodos de segmentación

Para la extracción de características en las imágenes se implementaron varios métodos de segmentación y poder obtener los espermatozoides en la imagen con menor error posible, las pruebas se realizaron con los siguientes métodos: sobel, canny, roberts, log y prewitt los resultados se pueden observar en la figura 52.

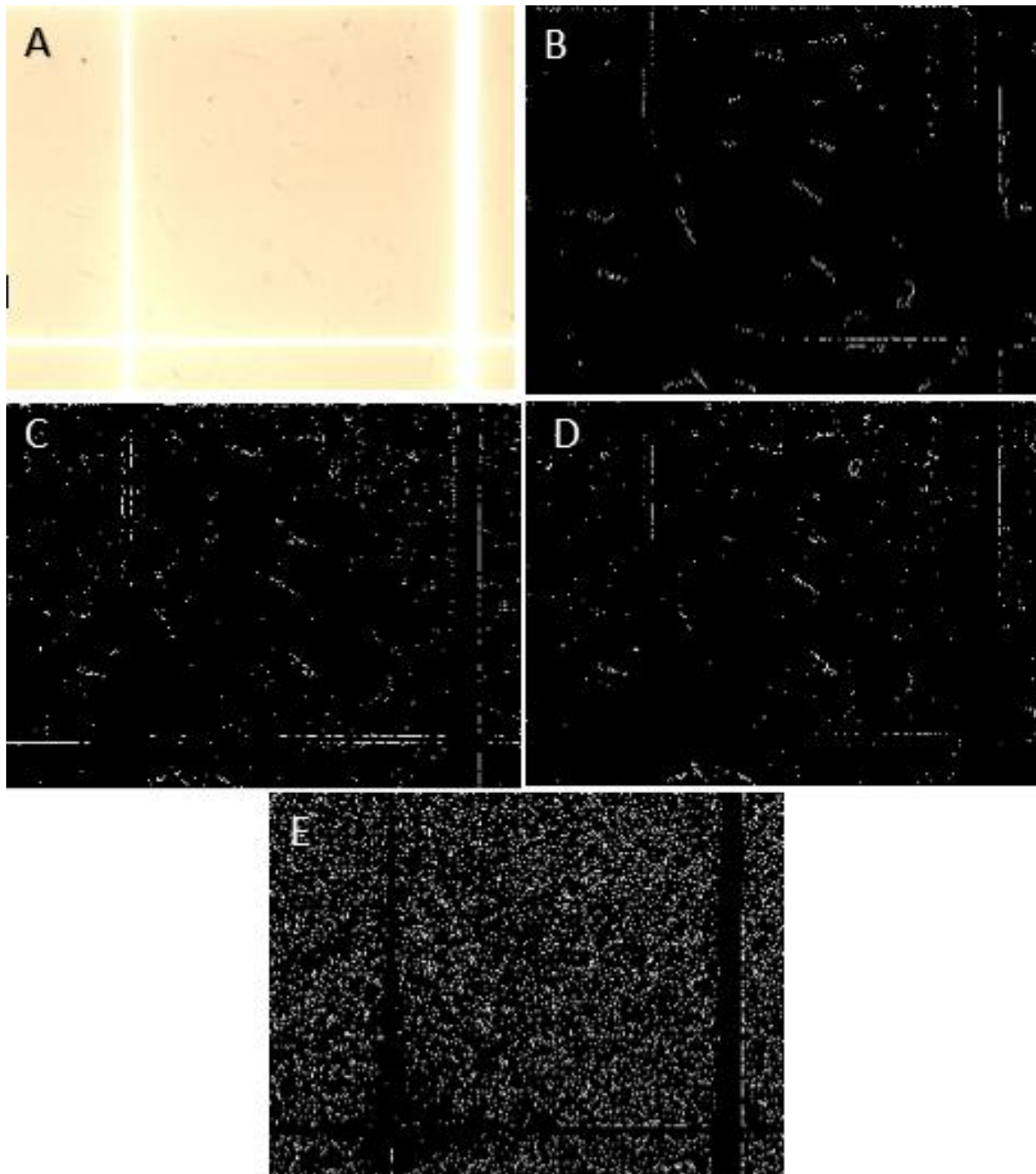


Figura. 52 A) imagen original. B) imagen método CANNY. C) imagen método PREWITT. D) imagen método ROBERTS. E) imagen método LOG. Imagen elaborada por el autor

Todos los métodos implementados tuvieron errores al momento de extraer los espermatozoides, los métodos tuvieron pérdida de espermatozoides y segmentaban áreas distintas a las de interés, observando los resultados se optó por el método de CANNY ya que fue el que obtuvo menor pérdida de espermatozoides y menor número de áreas erróneas.

Posteriormente al método de segmentación se realizó una dilatación a la imagen para poder tener una mejor identificación de los espermatozoides como se muestra en la figura 53, de esta manera se pudo identificar las áreas que no son de interés y poder eliminarlas mediante el tamaño de las áreas.

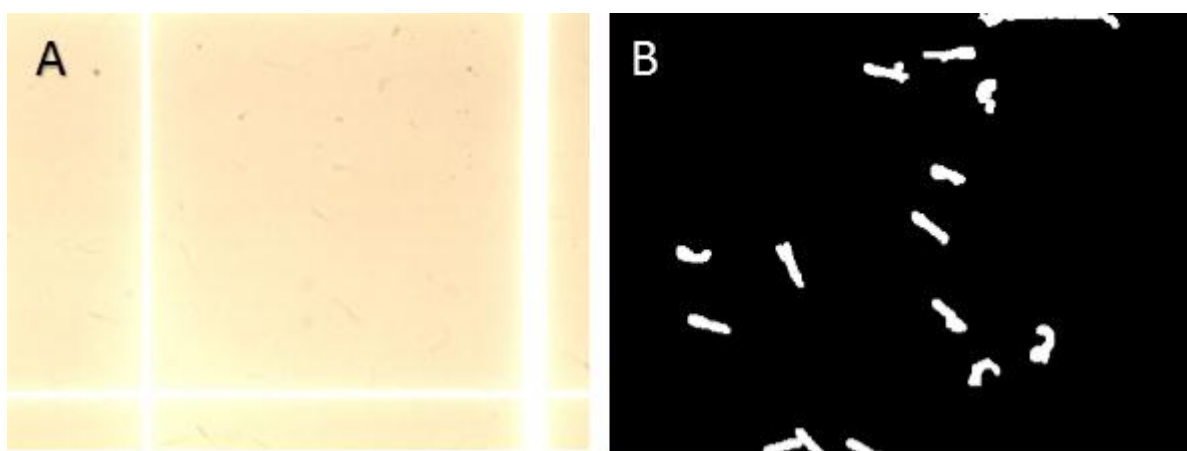


Figura. 53 A) imagen original. B) Imagen dilatada. Imagen elaborada por el autor

Una vez terminado el proceso de segmentado se cuentan los espermatozoides hallados y utilizamos la fórmula tomada de (Brogliatti) para el cálculo de espermatozoides por ml (mililitro), la cual se muestra a continuación.

$$N^{\circ} \text{ espermatozoides} * 10 (\text{altura del recuadro}) * 1000 (\text{pasaje a ml}) * 200 (\text{dilución}) = N^{\circ} \text{ espermatozoides por ml} \quad (1)$$

Tabla 5 Resultados de pruebas entre métodos para el cálculo de concentración espermática.

	TECNICO EXPERTO	HERRAMIENTA COMPUTACIONAL	SPERMACUE
TORO1	214 x10 <sup>6</sup> ml	200 x10 <sup>6</sup> ml	143 x10 <sup>6</sup> ml
TORO 2	212 x10 <sup>6</sup> ml	184 x10 <sup>6</sup> ml	130 x10 <sup>6</sup> ml
TORO 3	154 x10 <sup>6</sup> ml	130 x10 <sup>6</sup> ml	94 x10 <sup>6</sup> ml
TORO 4	162 x10 <sup>6</sup> ml	144 x10 <sup>6</sup> ml	95 x10 <sup>6</sup> ml
TORO 5	202 x10 <sup>6</sup> ml	195 x10 <sup>6</sup> ml	102 x10 <sup>6</sup> ml

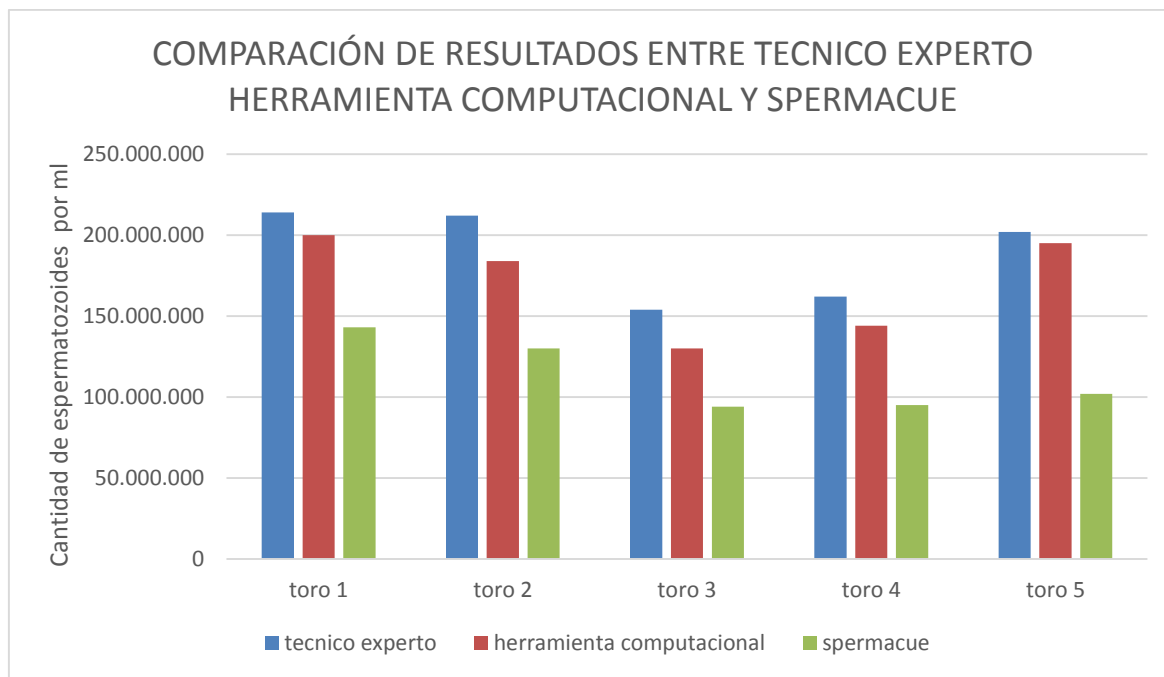


Figura. 54 Imagen comparación de resultados entre técnico experto, herramienta computacional y spermacue. Imagen obtenida del autor.

Con los resultados obtenidos anteriormente representados en la figura 54 se puede observar que el técnico experto y la herramienta computacional están altamente relacionados ya que sus resultados son similares, pero no se logró esta misma relación de resultados entre la herramienta computacional y spermacue debido a que el spermacue con el que cuenta la universidad de Cundinamarca presenta falencias en su calibración.

Tabla 6 error absoluto y error relativo de la herramienta computacional en relación con la medición del experto por cada toro evaluado

	Error absoluto	Error relativo
Toro1	14 millones	6 %
Toro2	28 millones	13 %
Toro 3	24 millones	15 %
Toro 4	18 millones	11 %
Toro 5	7 millones	3.4 %



Tabla 7 error absoluto y error relativo de la herramienta computacional en relación con la medición del spermacue por cada toro evaluado

	Error absoluto	Error relativo
Toro1	57 millones	39 %
Toro2	54 millones	41 %
Toro 3	36 millones	38 %
Toro 4	49 millones	51 %
Toro 5	93 millones	91 %

## 5. Conclusiones y trabajos futuros

---

En procesamiento de imágenes los equipos para la toma de mediciones juegan un papel importante, el éxito de un proyecto depende en gran parte de los equipo, en el desarrollo del proyecto vivimos estas falencias cuando trabajamos con el laboratorio móvil del Sena. Se comprobó que las imágenes obtenidas con los equipos del laboratorio móvil del Sena no contaban con las condiciones necesarias, por esta razón no se pudo trabajar de lleno en el procesamiento de imágenes por los malos resultados que se obtuvieron adquiriendo las imágenes de la muestra seminal.

En la preparación de las muestras seminales fueron utilizados diferentes colorantes vitales, para ello se logró con convenio con una empresa de químicos de Bogotá "Bioquigen" ellos nos proporcionaron los reactivos químicos para poder encontrar la tinción que lograra un contraste de color, en el laboratorio de reproducción de la universidad de Cundinamarca se experimentó con reactivos como azul de metileno, eosina nigrosina, eosina Y en base de alcohol y eosina Y en agua desionizada, en las cuatro se presentaba el mismo problema los espermatozoides vivos se parecen en componentes de color a fondo de la imagen, y esto nos acarrió problemas en la segmentación de los espermatozoides, finalmente se determinó que el colorante vital eosina Y en base de agua desionizada presentó los mejores resultados en la tensión de los espermatozoides muertos.

En el proceso de filtrado fueron utilizados 4 filtros como average, sobel, gaussian y Fourier, se comprobó que el filtro de mediana fue la mejor opción para el suavizado de la imagen de viabilidad espermática, homogenizando la imagen donde existían cambios abruptos, en el proyecto se implementó el filtro mencionado anteriormente con una ventana de (5 5) píxeles.

En la segmentación se implementaron los métodos discriminante lineal de Fisher, eliminación por áreas y detección de bordes canny, la herramienta no está exenta de errores, ya que cada método de segmentación tiene un margen de error, en el caso de Fisher algunos espermatozoides tienen componentes de color los cuales son parecidos al fondo de la imagen eliminando estos espermatozoides. Por otra parte, el método de eliminación de áreas fue una eficiente forma de eliminar ruido que este fuera del rango de 60 a 1000 píxeles, y la detección de bordes de canny presentó muy buenos resultados ya que con poco contraste de color entre los espermatozoides y el fondo, puede detectar estos límites y segmentar los espermatozoides, aunque algunos espermatozoides no se pudieron segmentar por su total parecido al fondo, pero esto

no impidió que se obtuvieran resultados favorables con alto grado de exactitud y precisión.

En el proceso de clasificación de espermatozoides se obtuvieron los resultados esperados, la mayoría de imágenes evaluadas tuvieron errores absolutos mínimos, como podemos observar en las figuras (47,48.49), por otra parte a través de la matriz de confusión la exactitud y precisión de la herramienta fue de 78% y 83% respectivamente.

El desarrollo de este trabajo abre las puertas en la universidad de Cundinamarca a la implementación de herramientas computacionales que logren automatizar procesos industriales, incorporando el procesamiento de imágenes en el campo de la zootecnia, por esta razón se constituye como punto de partida para que otros estudiantes comiencen a trabajar con trayectorias o morfologías espermáticas, evaluaciones más complejas.

# Apéndice 1: Matriz de confusión de viabilidad para los cinco toros evaluados

## A.1.

En las siguientes tablas se puede observar la matriz de confusión para los cinco toros evaluados donde obtenemos la exactitud y precisión que tuvo la herramienta en la evaluación de cada uno de los toros.

Tabla 8 Matriz de confusión toro 1

	Vivos herramienta computacional	muertos herramienta computacional
Vivos experto	60	49
Muertos experto	57	330
Exactitud	78,6 %	
Precisión	85,2%	

Tabla 9 Matriz de confusión toro 2

	Vivos herramienta computacional	muertos herramienta computacional
Vivos experto	62	68
Muertos experto	45	311
Exactitud	76,7 %	
Precisión	82,0 %	

Tabla 10 Matriz de confusión toro 3

	Vivos herramienta computacional	muechos herramienta computacional
Vivos experto	40	31
Muechos experto	23	194
Exactitud	81,2 %	
Precisión	86,2 %	

Tabla 11 Matriz de confusión toro 4

	Vivos herramienta computacional	muechos herramienta computacional
Vivos experto	51	60
Muechos experto	38	308
Exactitud	78,5 %	
Precisión	83,6 %	

Tabla 12 Matriz de confusión toro 5

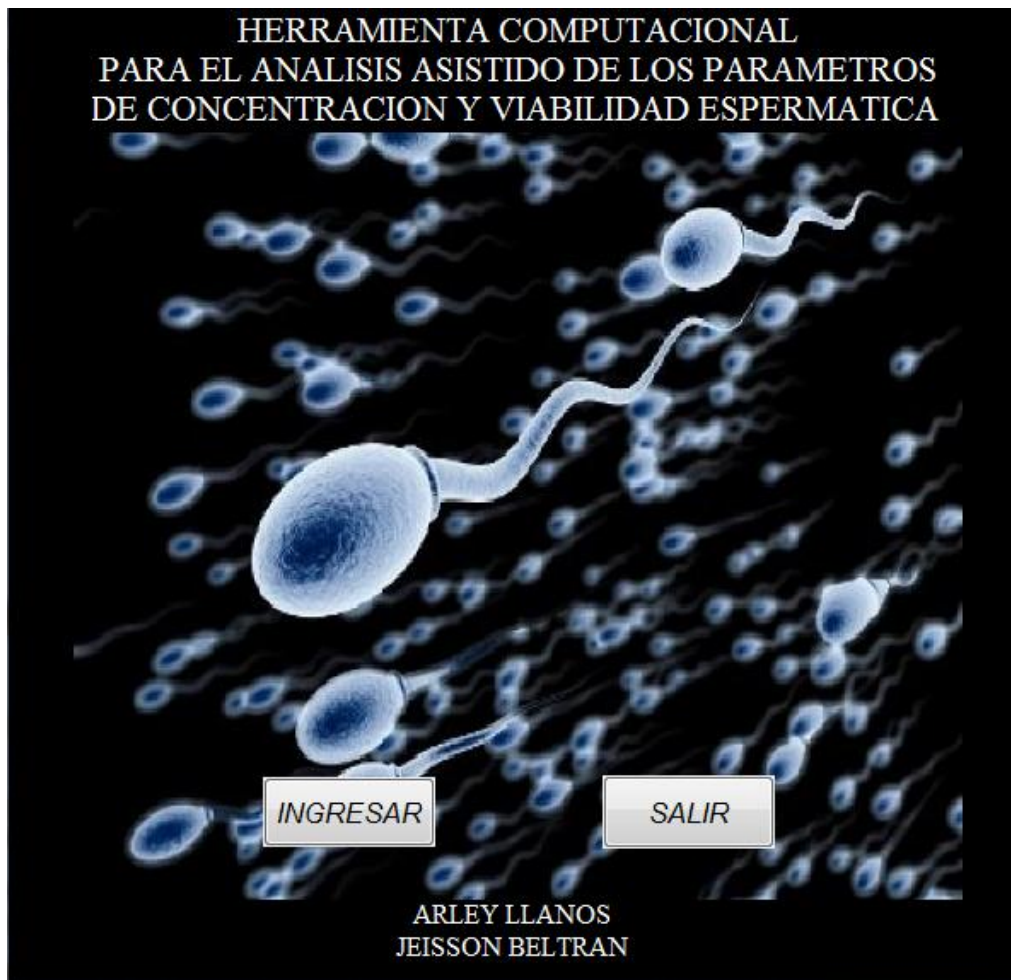
	Vivos herramienta computacional	muechos herramienta computacional
Vivos experto	22	64
Muechos experto	27	265
Exactitud	75,9 %	
Precisión	80,5 %	

## Apéndice 2: Manual de uso de software.

### A.2.

En la primera interfaz del software se mostrara el nombre del software los autores y dos opciones.

- **INGRESAR:** Nos dará ingreso a la segunda interfaz.
- **SALIR:** Cerrara el programa.



Una vez se ingresa al programa nos mostrara la segunda interfaz donde se tendra las opciones de escoger el tipo de analisis que se requiera ya sea concentración o viabilidad espermatica.



Al escoger la opción de concentración espermática nos llevara a la siguiente ventana:



Para el analisis de concentración de imágenes se tendran cuatro opciones los cuales son:

- **SELECCIONAR IMÁGENES:** Se cargaran cuatro imágenes necesias para el analisis de concentración espermatica.

- **CALCULAR:** Se realizara el calculo para hallar la concentración espermatica por mililitro (ml).
- **LIMPIAR ESPACIOS:** Se limpiaran todos los campos de la ventana.
- **SALIR:** Cerrara el programa.

Al escoger la opción de viabilidad espermática nos llevara a la siguiente ventana:



Para el analisis de concentración de imágenes se tendran cuatro opciones los cuales son:

- **SELECCIONAR IMÁGENES:** Se cargaran cinco imágenes necesias para el analisis de concentración espermatica.
- **CALCULAR:** Se realizara el calculo para hallar la cantidad de espermatozoides, espermatozoides vivos, espermatozoides muertos y la viabilidad espermatica.
- **LIMPIAR ESPACIOS:** Se limpiaran todos los campos de la ventana.
- **SALIR:** Cerrara el programa.



## Apéndice 3: Análisis de costos

### A.3.

#### RESUMEN POR RUBROS

Rubros	Solicitado en efectivo a UDEC	Contrapartida en especie		Total
		UDEC	Otros	
Personal		\$2.000.000	\$5.500.000	\$7.500.000
Equipos		\$26.600.000	\$1.300.000	\$27.900.000
Materiales e insumos		\$200.000	\$100.000	\$300.000
<b>Total</b>		<b>\$28.800.000</b>	<b>\$6.900.000</b>	<b>\$35.700.000</b>

#### DETALLE DE RUBROS

##### Detalle de personal

Personal	Función	Formación profesional	Contrapartida en especie	
			UDEC	Propios
Millán arley Llanos	Ejecutor	Estudiante		\$2.750.000
Jeisson Beltrán	Ejecutor	Estudiante		\$2.750.000
Edgar Roa Guerrero	Asesor	MsC. Ing. Electrónico	\$2.000.000	
<b>Subtotal</b>			<b>\$2.000.000</b>	<b>\$5.500.000</b>
<b>Total</b>			<b>\$7.700.000</b>	

### Descripción de equipos

Descripción	Cantidad	Entidad	Contrapartida en especie		total
			UDEC	Propios	
Microscopio olympus cx31	1	UDEC	\$5.000.000		\$5.000.000
Cámara moticam	1	UDEC	\$1.500.000		\$1.500.000
Cámara De Neubauer	1	UDEC	\$100.000		\$100.000
Computador portátil Corei3 1.7Ghz RAM 6GB	1			\$1.300.000	\$1.300.000
Spermacue	1	UDEC	\$20.000.000		\$20.000.000
<b>Total</b>					\$27.900.000

### Descripción de materiales e insumos

Descripción	Cantidad	Entidad	Contrapartida en especie		total
			UDEC	Otras entidades	
Eosina Y	1	Bioquigen		\$100.000	\$1000.000
Eosina nigrosina	1	UDEC	\$100.000		\$100.000
Azul de metileno	1	UDEC	\$100.000		\$100.000
<b>Total</b>					\$300.000

## Apéndice 4: Gasto computacional

### A.4.

Los algoritmos de viabilidad como de concentración se ejecutaron en un computador marca VAIO con las siguientes características

- Procesador Intel Pentium CPU B980 doble núcleo (2.40 GHz)
- Memoria RAM de 4 GB
- Sistema operativo Windows 7 ultimate.
- Disco duro 320 GB

El algoritmo de concentración espermática evalúa una imagen en un tiempo estimado de 2 segundos y el algoritmo de viabilidad evalúa una imagen en 1 min y 30 segundos aproximadamente, detectamos que el tiempo de ejecución de los códigos depende del número de objetos segmentados en las imágenes, por esta razón los tiempos de evaluación puede cambiar por imagen.

Por otra parte, para el análisis de concentración espermática a través de la interfaz gráfica desarrollada, es necesario cargar 4 imágenes para la evaluación y el resultado final toma un tiempo aproximado de 9 segundos. Así mismo, para la evaluación de viabilidad espermática se cargan 5 imágenes en la interfaz gráfica, el resultado es entregado por parte del algoritmo en aproximadamente 8 minutos, esta evaluación necesita más tiempo puesto que la imagen pasa por varios procesos para poder identificar la cantidad de reactivo filtrado en los espermatozoides y decidir que espermatozoide está vivo o muerto.

Vale la pena resaltar que el gasto computacional está relacionado directamente con las características de los equipos de cómputo y de la resolución en la cual se capturen las imágenes de los espermatozoides.

# Bibliografía

- Angelino Olivera, J. (2009). *MANUAL DE AVLUACIÓ DE SEMEN EN BOVINOS*. Veracruz: Universidad Veracruzana.
- Brogliatti, G. (s.f.). *CURSO DE CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO* . Instituto de reproducción animal cordoba (IRAC) .
- Carrillo, H., Villarreal, J., Sotaquirá, M., Goelkel, Á., & Gutiérrez, R. (2007). *Sistema de Visión por Computador para el Análisis Morfológico de Espermatozoides Humanos*. STSIVA.
- De los Reyes, M., & Duchens, M. (1999). *EXAMEN DE FERTILIDAD POTENCIAL A TOROS*. chile: universidad de chile.
- Duchens , M., & De los Reyes, M. (2012). *EXAMEN DE FERTILIDAD POTENCIAL A TOROS*. Universidad de chile.
- González-Stagnaro, C., & Soto Belloso, E. (2005). *Manual de Ganadería Doble Propósito*. Maracaibo: Fundación GIRARZ.
- Moreira Quiroz, J., Valencia Delgado, V., & Chávez Burbano, P. (2009). *Implementación de un algoritmo para la detección y conteo de células en imágenes microscópicas*. Guayaquil: FIEC.
- QUINTANA DUQUE, J., & MENDIETA BORJA, M. (2005). *SINTESIS ANIMADA DE VOZ VISUAL A PARTIR DEL VIDEO DE UN ROSTRO HUMANO*. BOGOTA: PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
- Roa Guerrero, E. E. (2012). *METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS ASISTIDO DE DOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS HUMANOS, MEDIANTE TÉCNICAS DE VISIÓN ARTIFICIAL*. Medellín: Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín.
- RODRIGO MUIÑO, O. (2008). *EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD Y VIALIDAD DEL SEMEN BOVINO MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS CASA Y CITOMETRÍA DE FLUJO: IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS*. España: Universidad santiago de compostela.
- Silva, M., Pedrosa, V., Silva, J., Herrera, L., Eler, J., & Albuquerque, L. (2012). *Parámetros genéticos de las características andrológicas en la especie bovina*. Medellín.
- Valverde Rebaza, J. (s.f.). *Detección de bordes mediante el algoritmo de Canny*. trujillo,peru.
- woods, R., & Gonzales, R. (2008). *digital image processing*. prentice hall.

