

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Detección de fragmentación del ADN espermático por medio de
procesamiento de imágenes.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Lucía José Porres Jerez
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Mecatrónica

Guatemala,
2017

Detección de fragmentación del ADN espermático por medio de procesamiento de imágenes.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Detección de fragmentación del ADN espermático por medio de
procesamiento de imágenes.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Lucía José Porres Jerez
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Mecatrónica


Guatemala,
2017

Vo. Bo. :

(f) 

(MSc. Miguel Enrique Zea Arenales)


Tribunal Examinador:

(f) 

(MSc. Miguel Enrique Zea Arenales)

(f) 

(MSc. Carlos Alberto Esquit Hernández)

(f) 

(MSc. José Eduardo Morales Espinoza)

Fecha de Aprobación: Guatemala 7 de diciembre de 2017

ÍNDICE

LISTA DE ECUACIONES	viii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	2
A. GENERAL.....	2
B. ESPECÍFICOS	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	3
IV. MARCO TEÓRICO	4
A. SEMINOGRAFÍA	4
B. CALIDAD ESPERMÁTICA.....	5
C. FRAGMENTACIÓN ESPERMÁTICA.....	6
D. TÉCNICAS PARA EVALUAR LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO.....	7
E. CRITERIOS DE OBSERVACIÓN Y CLASIFICACIÓN ESPERMÁTICA.....	8
D. PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.....	9
E. IMAGE PROCESSING TOOLBOX DE MATLAB.....	10
F. MODELOS RGB.....	10
G. MÉTODO DE LUMINOSIDAD.....	11
H. MODELO CIE XYZ.....	11
I. MODELO L^*A^*B	12
J. MODELO DE COLOR HSV.....	13
K. MODELO DE COLOR YCbCr.....	14
L. HISTOGRAMA DE UNA IMAGEN.....	14
M. UMBRAL.....	15
N. BINARIZACIÓN DE UNA IMAGEN EN ESCALA DE GRISES.....	15
Ñ. DETECCIÓN DE BORDES CON EL MÉTODO DE VICINIDAD DE MOORE.....	16
V. METODOLOGÍA.....	17
A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	17
B. SEGMENTACIÓN DE ESPERMAS.....	18
1. Aplicación de modelos de color.....	18
2. Umbral y binarización.....	22
3. Detección de bordes.....	26
4. Medición de propiedades en áreas detectadas.....	27
5. Cálculo de tamaño del halo generado por esperma.....	28
C. ANÁLISIS DE MUESTRAS TOTALES POR PACIENTE.....	32
D. ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN ESPERMÁTICA.....	33
VI. RESULTADOS.....	35
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	51
VIII. CONCLUSIONES.....	54

IX. RECOMENDACIONES.....	55
X. BIBLIOGRAFÍA.....	56
XI. ANEXOS	58
A. ESPECIFICACIONES SOBRE TRATAMIENTO SpermFunc DNaf.	58
B. ESPECIFICACIONES DE CÁMARA AmScope MA500-CK.....	60
XII. GLOSARIO	61

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1 Ecuación de Ponderación RGB	11
Ecuación 2 Número de celdas en la vecindad de Moore.	16
Ecuación 3 Relación de diámetros mayor y menor entre halo y esperma	30
Ecuación 4 Área del halo con las relaciones de diámetros	30
Ecuación 5 Área de una elipse para un esperma.	30
Ecuación 6 Proporción de áreas.	31

LISTA DE CUADROS

Cuadro No. 1 Técnicas existentes para estudio a de fragmentación de ADN espermático.....	7
Cuadro No. 2 Valores de umbral promedio en espacio Lab	23
Cuadro No. 3 Análisis realizado en el laboratorio para el paciente I.	35
Cuadro No. 4 Comparación de resultados del laboratorio contra resultados del Software para el paciente I. ...	36
Cuadro No. 5 Comparación del total de espermatozoides por imagen del paciente I.....	37
Cuadro No. 6 Comparación del total de espermatozoides fragmentados por imagen del paciente I.	38
Cuadro No. 7 Comparación del total de espermatozoides no fragmentados por imagen del paciente I.	39
Cuadro No. 8 Media y desviación estándar del error por imagen del paciente I.	40
Cuadro No. 9 Comparación del total de espermatozoides por imagen del paciente II.	42
Cuadro No. 10 Comparación del total de espermatozoides fragmentados por imagen del paciente II.	43
Cuadro No. 11 Comparación del total de espermatozoides no fragmentados por imagen del paciente II.	44
Cuadro No. 12 Comparación del total de espermatozoides por imagen del paciente III.....	45
Cuadro No. 13 Comparación del total de espermatozoides fragmentados por imagen del paciente III.....	46
Cuadro No. 14 Comparación del total de espermatozoides no fragmentados por imagen del paciente III.	47
Cuadro No. 15 Comparación del análisis del laboratorio y el análisis por software para el paciente II.	48
Cuadro No. 16 Comparación del análisis del laboratorio y el análisis por software para el paciente III.	48
Cuadro No. 17. Confiabilidad de resultados del programa.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1 Proceso de espermatogénesis.....	4
Figura No. 2 Valores del límite de referencia inferior (LRI).....	6
Figura No. 3 SpermFunc DNaf-Kit.....	8
Figura No. 4 Criterio de clasificación espermática.....	8
Figura No. 5 Etapas del Procesamiento de imágenes.....	9
Figura No. 6 Modelado RGB.....	10
Figura No. 7 Modelo CIE XYZ.....	12
Figura No. 8 Modelo CIELAB.....	13
Figura No. 9 Modelo HSV.....	14
Figura No. 10 Histograma de una fotografía.....	15
Figura No. 11 Vecindad de Moore.....	16
Figura No. 12 Estereoscopio con cámara AmScope.....	17
Figura No. 13 Muestra espermática.....	18
Figura No. 14 Halo espermático en modelo RGB.....	19
Figura No. 15 Halo y esperma en modelo RGB.....	19
Figura No. 16 Halo espermático en modelo Lab.....	20
Figura No. 17 Halo y esperma en modelo Lab.....	20
Figura No. 18 Halo espermático en modelo HSV.....	21
Figura No. 19 Halo y esperma en modelo HSV.....	21
Figura No. 20 Halo espermático en modelo YCbCr.....	22
Figura No. 21 Halo y esperma en modelo YCbCr.....	22
Figura No. 22 Pseudocódigo para Binarización en L y A.....	23
Figura No. 23 Imagen en subespacio L binarizada.....	24
Figura No. 24 Imagen en subespacio A binarizada.....	24
Figura No. 25 Imagen en subespacio L sin perturbaciones.....	25
Figura No. 26 Imagen en subespacio A sin perturbaciones.....	25
Figura No. 27 Criterio de detección de bordes.....	26
Figura No. 28 Detección de bordes en espermas.....	26
Figura No. 29 Detección de bordes en halos.....	27
Figura No. 30 Pseudocódigo para obtención de propiedades.....	27
Figura No. 31 Pseudocódigo para obtención de cajas en regiones detectadas.....	28
Figura No. 32 Pseudocódigo para emparejar halos y epermas.....	29
Figura No. 33 Relación halo-esperma.....	29
Figura No. 34 Pseudocódigo para relación halo-esperma.....	31
Figura No. 35 Pseudocódigo para el análisis de muestras totales.....	32
Figura No. 36 Cuadro de diálogo para selección de muestras.....	33
Figura No. 37 Pseudocódigo para el contador espermático.....	33
Figura No. 38 Resultados obtenidos con Matlab.....	35
Figura No. 39 Análisis realizado con Matlab.....	36
Figura No. 40 Dispersión de puntos para el total de espermas por foto del paciente I.....	40
Figura No. 41 Dispersión de puntos para espermas fragmentados por foto del paciente I.....	41
Figura No. 42 Dispersión de puntos para espermas no fragmentados por foto del paciente I.....	41
Figura No. 43 Halos de espermas juntos.....	49
Figura No. 44 Manchas en el ambiente.....	49
Figura No. 45 Grupos grandes de espermas.....	50
Figura No. 46 Error humano.....	50

RESUMEN

La detección de fragmentación del ADN espermático se realiza aplicando un tratamiento ácido seguido de una desproteínización a una muestra de espermatozoides. Luego, estos se observan en un microscopio a 20X y 40X y se van contando los que presentan fragmentación. El cálculo se basa en que la cabeza del espermatozoide producirá un halo de color inversamente proporcional a la fragmentación que este tenga, indicando que un esperma con fragmentación producirá un halo menor o inexistente, mientras que uno no fragmentado producirá un halo de mayor tamaño.

Esta tesis tiene como objetivo desarrollar una herramienta que sea capaz de reducir el trabajo humano y el tiempo de análisis visual en el laboratorio, por medio de la automatización del conteo espermático al igual que su fragmentación utilizando procesamiento de imágenes.

La implementación se hizo utilizando el entorno de computación numérica Matlab. El procesamiento de imágenes consistió en aplicar el modelo de color Lab seguido de un umbral para resaltar características de interés. Con esto se logró identificar exitosamente los halos y los núcleos de los espermatozoides, así como sus características individuales. Haciendo uso de estas características se logró el conteo de espermatozoides y se determinó la fragmentación por medio de la relación de áreas halo-esperma.

Al aplicar este algoritmo a la muestra de tres pacientes se obtuvo un resultado satisfactorio, logrando un porcentaje de aceptación mayor al 93% para el conteo total de espermatozoides, total de espermatozoides fragmentados y el total de espermatozoides no fragmentados, así como un porcentaje de aceptación del 97.46% para el índice de fragmentación del paciente en relación con lo establecido por el laboratorio de fertilización invitro de Hope International.

I. INTRODUCCIÓN

Este trabajo tiene como finalidad apoyar a la investigación de la calidad espermática del hombre, esto a base de determinar el índice de fragmentación del ADN espermático por medio del procesamiento de imágenes, antes de empezar es importante detallar algunos términos que ayudarán a comprender el estudio de este factor.

La infertilidad es catalogada, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una enfermedad del sistema reproductivo en la cual no se logra un embarazo luego de 12 meses o más de tener relaciones sexuales no protegidas con la pareja. Esta enfermedad produce varios efectos en la salud mental, emocional, social y física de las parejas que sufren de este problema.

Alrededor del mundo afecta al 15% de las parejas en edad reproductiva, esto equivale y se le atribuye un 40 a 50% de los casos de infertilidad al factor masculino. Por lo tanto, un análisis de características de semen es esencial en parejas con dificultades reproductivas. La OMS estableció la siguiente lista de parámetros básicos para evaluar la fertilidad masculina: morfología, concentración, motilidad y volumen eyaculado. Estos deben analizarse en un seminograma o prueba de fertilidad masculina para determinar la fertilidad del varón, a pesar de dicha prueba se ha encontrado que un 15% de hombres estériles tienen parámetros ubicados en rangos normales, esto podría ser un indicador que la infertilidad masculina podría deberse a otros defectos en la membrana del espermatozoide.

Por esta razón, en los últimos años ha surgido el interés por estudiar el daño del ADN espermático y se han desarrollado técnicas analíticas especializadas en medir la fragmentación del ADN espermático. En esta investigación se realizará un proceso bioquímico con el *Kit DNA Sperm Fragmentation*, para generar halos de color en los espermias con ADN no fragmentado y con la herramienta de programación MATLAB se llevará a cabo el procesamiento de imágenes que ayudará en la detección, clasificación y conteo de espermias fragmentados y no fragmentados, para poder determinar con mayor certeza el índice de fragmentación espermática del paciente y por lo tanto su nivel de fertilidad.

II. OBJETIVOS

A. GENERAL

Detectar fragmentación en el ADN espermático mediante algoritmos para procesamiento de imágenes.

B. ESPECÍFICOS

1. Estudiar algoritmos para procesamiento de imágenes microscópicas.
2. Identificar los algoritmos más adecuados para la detección de espermias.
3. Diferenciar espermias con halo de color y sin color con una certeza del 90%.
4. Contar espermatozoides con halo de color y sin halo de color con una certeza del 90%.

III. JUSTIFICACIÓN

Los estudios actuales de la calidad espermática realizados a través de un seminograma convencional (calidad espermática) no aportan información completa sobre el potencial fecundante y la capacidad de dar lugar a un embrión sano. Es por eso que se requiere determinar el parámetro del índice de fragmentación del ADN espermático, ya que se ha demostrado que los hombres infértiles tienen una mayor fracción de espermatozoides con rupturas en el ADN.

Este proyecto busca apoyar la investigación que realiza el departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala en las clínicas del centro de radioterapia Hope International, en donde se está estudiando la calidad del ADN espermático.

Por lo tanto, propone mejorar la detección de espermias fragmentados de los pacientes, reduciendo el error humano a la hora de realizar el diagnóstico, reducir el tiempo de observación de las muestras y agilizar el análisis por medio de procesamiento de imágenes.

El procesamiento de imágenes en el ámbito biomédico es de gran aporte ya que busca mejorar la obtención de información que contribuya a un buen diagnóstico y a la vez sea de ayuda a la investigación de la patofisiología de enfermedades.

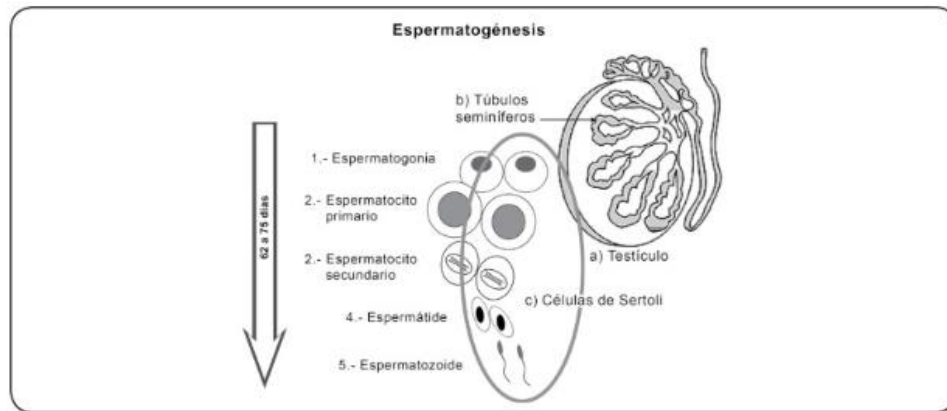
IV. MARCO TEÓRICO

A. SEMINOGRAFÍA

Es el proceso encargado de la producción de espermatozoides en el hombre, este abarca la producción, crecimiento, maduración y liberación del empaquetamiento del ADN de las células germinales masculinas. Este proceso se lleva a cabo en los testículos e inicia en la pubertad y dura aproximadamente de 62 a 75 días y consta de tres fases:

- Fase Proliferativa: en esta etapa las espermatogonias experimentan divisiones meióticas y se diferencian los espermatocitos primarios.
- Fase meiótica: ocurre el proceso de división celular conocido como meiosis, se reduce a la mitad el número de cromosomas.
- Fase espermiogénesis: implica un nuevo arreglo de la estructura del citoesqueleto y termina con las células germinales llamadas espermatozoides.

Figura No. 1 Proceso de espermatogénesis.



(Quintero, 2015).

El proceso de espermatogénesis se lleva a cabo en los túbulos seminíferos (b) ubicados en los testículos (a), en las células Sertoli (c) se llevan a cabo las siguientes etapas: Proliferación (1), las espermatogonias se dividen mitóticamente y dan origen a espermatocitos primarios (2), por último, la meiosis se divide en I y II, en la I los espermatocitos primarios se dividen y originan a dos espermatocitos secundarios (3) y en la meiosis II se dividen los espermatocitos secundarios y originan dos espermátides (4), los cuales pasan por un proceso de diferenciación celular y dan origen a los espermatozoides (5) (Quinteros, 2015).

B. CALIDAD ESPERMÁTICA

La calidad espermática se determina mediante un seminograma, esto es una prueba analítica que permite determinar la fertilidad del varón. La organización Mundial de la Salud (OMS) se encarga de publicar el “Manual para el examen del semen humano y la interacción moco semen” este sirve de guía en los laboratorios de andrología o fertilidad.

Se dice que una muestra de semen es de mala calidad cuando no alcanza los valores mínimos establecidos por la OMS, este resultado puede afectar a la hora de querer un embarazo ya que se necesita que el semen sea de alta calidad para que el espermatozoide pueda fecundar al óvulo y así mismo dar lugar a la gestación.

En un espermiograma se estudian muchos parámetros y los que se analizan con más frecuencia son:

- Motilidad: es el porcentaje de espermias móviles y el de espermias progresivos (se desplazan), los móviles deben superar al 32% de lo contrario este caso se denomina Astenozoospermia.
- Morfología: debe tener un 4% de espermatozoides normales, si no fuera este el caso se le denomina Teratozoospermia.
- Viscosidad: si la muestra es demasiado viscosa indica que tiene disfunción prostática.
- Color: el color normal es blanco opalescente o ligeramente amarillento.
- Volumen: en una eyaculación transcurrida de 3 a 5 día de abstinencia el volumen aproximado es de 1.5 ml, si este fuera menor se le denomina hipospermia.
- Concentración: el valor normal es de 15 millones por cada ml o 39 millones en la totalidad de la muestra, si no alcanza dichos valores se le denomina Oligozoospermia.
- Vitalidad: Debe tener un 58% de espermias vivos, si este fuera inferior se le conoce como Necrozoospermia (Bernabeu, 2017).

Figura No. 2 Valores del límite de referencia inferior (LRI)

	4ª edición (1999)	5ª edición* (2010)
Licuefacción	Total a los 60min	Total a los 60min
Volumen	2ml	1.5ml
Color	Blanco opalescente	Blanco opalescente
pH	7.2-7.8	>7.1
Concentración (ml)	20 millones	15 millones
Móviles progresivos	50%	32%
Vitalidad	75%	58%
Morfología	15%	4%
Leucocitos (ml)	< 1 millón	< 1 millón
Mar test	<50% esp. Unidos a partículas	<50% esp. Unidos a partículas

(Andrea, 2017).

La última edición del manual publicado por la OMS estableció el Límite de Referencia Inferior (LRI), este valor cada año es más bajo debido a las costumbres sociales y los hábitos alimenticios. Los resultados que se encuentren por encima de este límite no garantizan una fecundación exitosa, pero si tiene altas posibilidades.

C. FRAGMENTACIÓN ESPERMÁTICA

La fragmentación espermática consiste en la presencia de defectos en el material genético, en los últimos años se ha relacionado con la infertilidad del hombre. Entre las anomalías se cuenta la condensación de la cromatina en el proceso de maduración del espermatozoide, la integridad del ADN relacionada con las roturas de la cadena sencilla y doble y la reordenación genómica estructural.

Se ha encontrado una estrecha relación entre la fragmentación del ADN espermático y los parámetros anormales, especialmente cuando el paciente presenta una situación oligoastenoteratozoospermia (alteración de concentración, movilidad y morfología), estos se ven alterados cuando existe fragmentación del ADN.

Cuando se selecciona un espermatozoide para una técnica de reproducción asistida, se deben considerar los daños en el ADN que pueda presentar. Existen casos en donde el paciente presenta parámetros seminales normales y presenta fragmentación en su ADN, esto no implica que no pueda embarazar a su pareja, pero podría presentar deformaciones en el embrión o bien provocar abortos.

Existen estudios en donde relacionan la fragmentación del ADN y el potencial fertilizante, han demostrado que un índice de fragmentación espermático menor al 15% tiene excelente potencial, un índice entre 15-24% tiene alto potencial, un índice del 25-30% tiene bajo potencial y un índice mayor al 40% tiene muy bajo potencial (Góngora, 2010).

D. TÉCNICAS PARA EVALUAR LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO.

Cuadro No. 1 Técnicas existentes para estudio a de fragmentación de ADN espermático.

MÉTODO	INSTRUMENTOS	DESCRIPCIÓN
TUNEL	Microscopio de fluorescencia, Citometría de flujo.	Incorporación de nucleótidos marcados con fluorocromo en los extremos de las roturas del ADN, se logra la reacción con una transferasa terminal lo cual produce mayor señal en caso de fragmentación.
SCSA	Citometría de flujo	Desnaturaliza la molécula de ADN mediante solución ácida, luego se marca con naranja de acridina la cual se intercala entre las dos cadenas de ADN, al ser excitado emite diferentes longitudes de onda: verde y rojo. El ADN fragmentado se visualiza en color rojo al ser más susceptible a la desnaturalización.
SCD (HALOSPERM)	Microscopio de fluorescencia, campo claro.	Se realiza un tratamiento ácido y desproteización, forma halos de dispersión de la cromatina según la formación de bucles de ADN, al generar halo se considera no fragmentado.
COMETA	Microscopio de fluorescencia electroforesis de ADN.	Se colocan espermias en un microgel de azarosa y se someten a lisis, los núcleos desproteinizados se someten a electroforesis, el ADN fragmentado avanza en dirección al campo eléctrico y forma una imagen de cometa.

(Góngora, 2010).

E. CRITERIOS DE OBSERVACIÓN Y CLASIFICACIÓN ESPERMÁTICA.

El proceso bioquímico se realizó utilizando el Kit SpermFunc® DNAf, el cual evalúa los niveles de fragmentación del ADN espermático a través del método SCD (Sperm Chromatin Dispersion Test).

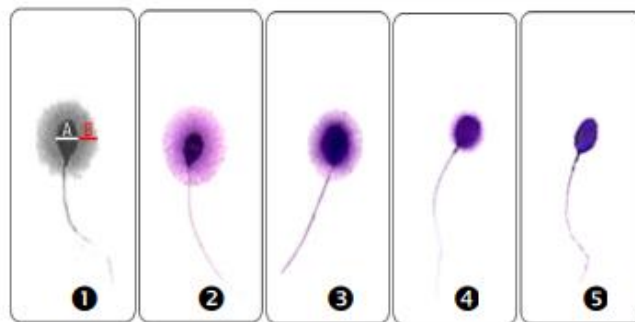
Figura No. 3 SpermFunc DNAf-Kit



(Golden Lab, 2017.)

Luego de aplicar el kit, las muestras se someten a observación para contar y clasificar los espermias que generaron halo de color y los espermias con halos muy pequeños o sin ellos. Para llevar a cabo este conteo y clasificación se utiliza una proporción relacionada al diámetro de la cabeza.

Figura No. 4 Criterio de clasificación espermática.



(Golden Lab, 2017.)

La Figura No.4 muestra en (1) la forma de medir el halo, para que se considere no fragmentado B debe ser mayor que $1/3$ del diámetro A. Los espermias (2) y (3) se consideran no fragmentados, mientras que (4) y (5) si tienen fragmentación en su ADN.

D. PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.

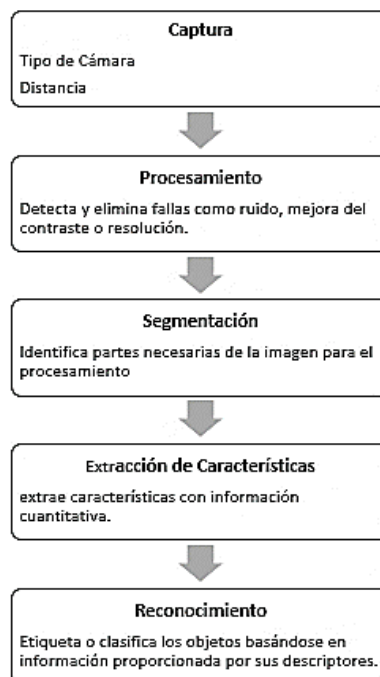
Es un conjunto de técnicas utilizadas para mejorar el aspecto de una imagen y resaltar detalles que se desean hacer notar. En la Figura No.5 se muestran las etapas que debe seguirse al realizar procesamiento de imágenes.

El proceso inicia con la captura u obtención de la imagen, para esto se requiere de un sensor de imagen que se encargará de producir las señales que van a digitalizarse, por ejemplo: en la fotografía se utiliza la luz; en las radiografías los rayos X y en una ecografía un ultrasonido.

En la etapa de procesamiento se debe eliminar cualquier falla o imperfección que tenga la imagen por ejemplo el ruido, luego tenemos la segmentación en donde se divide la imagen y se separan las partes necesarias para el procesamiento del resto que no son de interés. Las técnicas utilizadas para segmentar la imagen se basan en los píxeles, los bordes y regiones.

Luego tenemos la extracción de características, aquí se extrae información cuantitativa que sea de interés o que son fundamentales para diferenciar los objetos. Por último, tenemos la etapa de reconocimiento, este proceso etiqueta los objetos según la información dada por los descriptores, esto implica dar significado al conjunto de objetos (Rodríguez, 2002).

Figura No. 5 Etapas del Procesamiento de imágenes.



(Rodríguez, 2002).

E. IMAGE PROCESSING TOOLBOX DE MATLAB.

Brinda un amplio grupo de algoritmos para manipulación de imágenes, análisis, visualización, procesamiento de imágenes y desarrollo de algoritmos. Esta caja permite realizar segmentaciones, mejoras, reducción de ruido, transformaciones y procesamiento de imágenes en 3D.

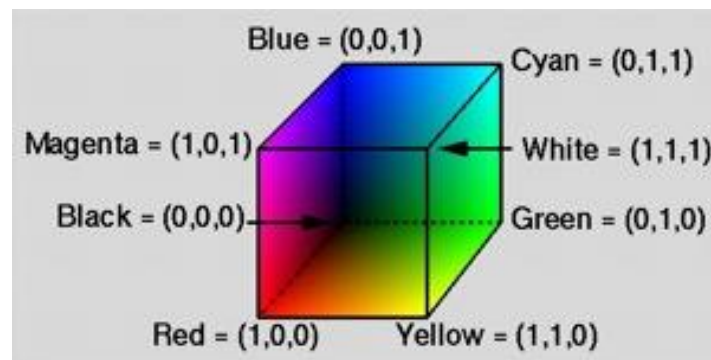
El Image Processing Toolbox puede soportar archivos fotográficos y de video, generados por una amplia gama de dispositivos, por ejemplo: microscopios, telescopios y otros instrumentos científicos. También soporta distintos formatos, como los BIP y BIL de las imágenes multibandas, NITF para imágenes geoespaciales e imágenes de alto rango dinámico HDR.

Para el procesamiento de imágenes permite aumentar la proporción de señal a ruido y acentuar las características de la imagen, modifica los colores o la intensidad. También incluye filtros especializados, permite la detección de bordes para identificar el contorno de los objetos, realiza conversiones a espacios de color, tiene distintas técnicas de segmentación de imágenes como la creación de umbrales, enfoques iterativos, entre otros (Mathworks, 2017).

F. MODELOS RGB.

Es el modelo más conocido y utilizado para representar un color mediante la mezcla de los tres colores de luz primaria. Está representado por los valores de rojo (R), verde (G) y azul (B), ubicados a lo largo de los ejes de coordenadas cartesianas sobre un cubo. La intensidad de cada componente según la escala puede ir de $[0,1]$ o de $[0,255]$ y cada color se define por un conjunto de estos valores (R, G, B). De esta forma el blanco se representa como $(1,1,1)$ o $(255,255,255)$ y el negro como $(0,0,0)$. En la siguiente imagen se puede observar que el color negro y blanco se encuentran representados por dos esquinas opuestas del cubo.

Figura No. 6 Modelado RGB.



(Córtez, 2011).

Las puntas sobrantes del cubo representan el rojo, verde, azul, cian, magenta y amarillo. Los colores pertenecientes a la escala de grises se representan con componentes idénticas de R, G, B y están situadas en la diagonal que une al color blanco y al negro.

G. MÉTODO DE LUMINOSIDAD.

Consiste en asignar una ponderación a cada uno de los canales de color, esto va a depender de la aportación de estos. El ojo humano es más sensible al color verde que al resto de colores, por eso mismo el porcentaje otorgado a este es mayor que el valor del resto. Los valores fueron establecidos por REC.601 NTSC por la International Telecommunication Union- Radiocommunications, encargados de crear un estándar mundial para la televisión a color con compatibilidad a blanco y negro.

Ecuación 1 Ecuación de Ponderación RGB

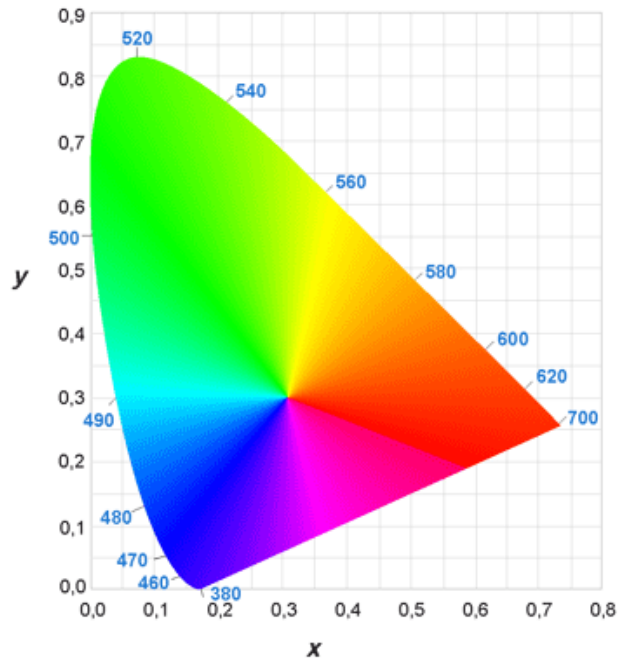
$$Grey(i, j) = 0.299 * R(i, j) + 0.587 * G(i, j) + 0.114 * B(i, j)$$

(Platero, 2010).

H. MODELO CIE XYZ.

Es un modelo basado en los colores de luz primaria RGB (Rojo, Verde y Azul), en 1931 fue establecido por la Comisión Internationale de l'Éclairage (CIE) basándose en experimentos elaborados por David Wright y John Guild a finales de 1920. En dicho modelo, Y significa luminosidad, Z es una aproximación del azul y X es una mezcla que tiende a la curva del rojo al verde, es por esto que tienden a confundirlo con el RGB. En el espacio CIE XYZ los valores triestímulos no son iguales a las respuestas S, M y L del ojo ya que X y Z son parámetros derivados de los colores R, G y B (Valero, 2013).

Figura No. 7 Modelo CIE XYZ.



(Valero, 2013.)

I. MODELO L*A*B.

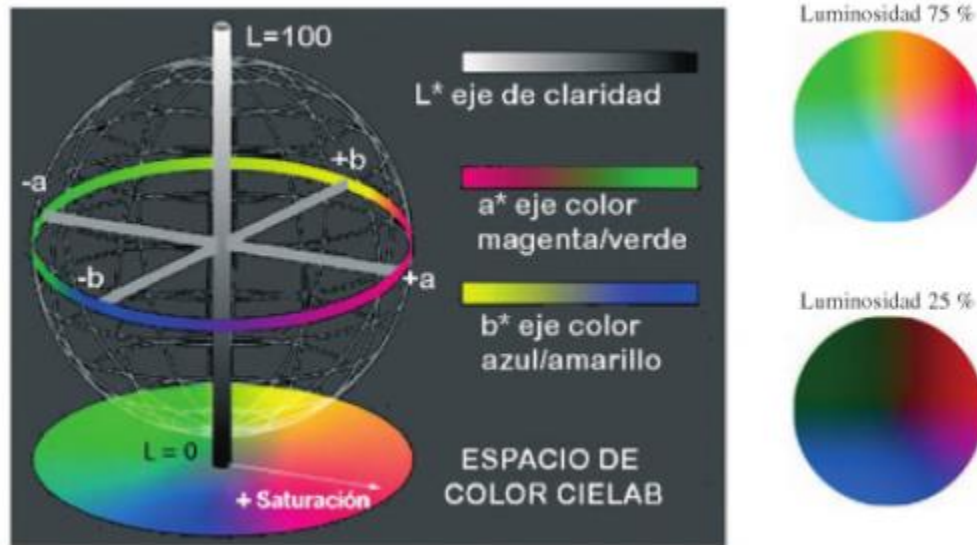
Este modelo también se conoce como CIELAB, es utilizado para describir todos los colores que puede llegar a percibir el ojo humano y el nombre CIE-lab se le dio debido a que fue desarrollado para mejorar el modelo XY desarrollado por la CIE.

El modelo está compuesto por tres parámetros que son:

- L (Lightness): es el parámetro de luz que se representa como un porcentaje, en donde 0 es negro y 100 es blanco.
- a: es una posición de color, en donde los valores del eje negativos pertenecen al color verde y los valores del eje positivo pertenecen al rojo (-120 al 120).
- b: es también un eje que indica la posición de un color, en donde los valores negativos pertenecen al azul y los valores positivos al amarillo (-120 al 120)

El espacio CIELAB permite especificar los estímulos en un espacio de tres dimensiones. El eje L muestra la claridad o brillo, mientras que a y b (coordenadas colorimétricas) forman un plano perpendicular a L. Cuando a y b tienden a cero, aparecen los colores acromáticos por lo tanto el eje L representa la escala de grises que va de negro a blanco (Valero, 2013).

Figura No. 8 Modelo CIELAB.



(Valero, 2013.)

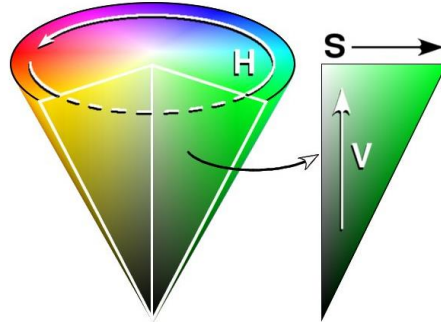
J. MODELO DE COLOR HSV.

Fue creado por Alvy Ray Smith en 1978 y también se le conoce como modelo HSB, este consiste en una transformación no lineal del modelo RGB a un espacio cilíndrico, sus siglas HSV representan a un espacio tridimensional de color basado en: matiz (Hue), saturación (S) y brillo o valor (V).

Los colores en este modelo se definen con las siguientes dimensiones:

- Matiz: se representa con una región circular y el valor se da con un ángulo definido entre 0 y 360 grados.
- Saturación: En algunos se puede normalizar del 0 al 100% o simplemente darse un valor 0 o 1, en donde 1 representa el matiz en su total intensidad y 0 no tiene saturación alguna.
- Brillo: el nivel de brillo también se representa con 0 y 1 o puede utilizarse un percentil como en la saturación, en donde 1 es blanco y 0 es negro.

Figura No. 9 Modelo HSV.



(EcuRed, 2017.)

K. MODELO DE COLOR YCbCr.

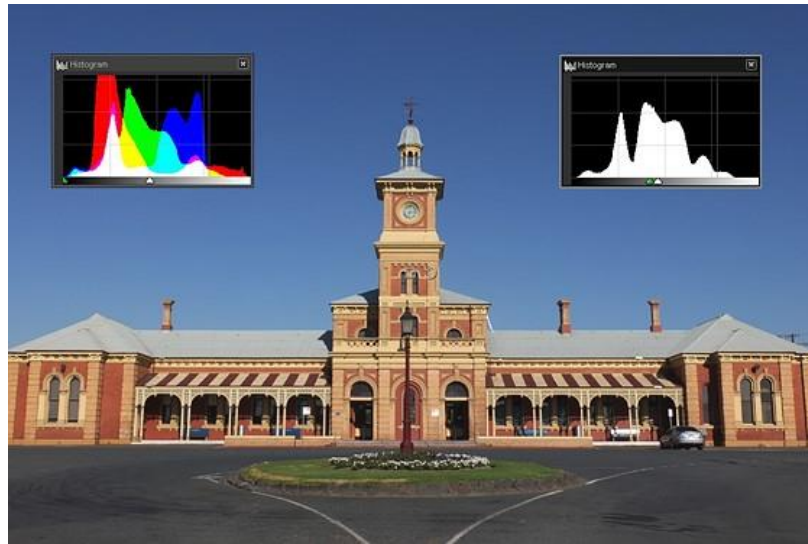
Este espacio de color es utilizado en el procesamiento de imágenes y video digital, comúnmente empleado en estudios de televisión europea y en compresión de imágenes. Su modelo consiste en la codificación no lineal del modelo de color RGB, representa el color con un formato en donde Y representa la luminosidad, la información del color se da con las componentes Cb y Cr que son las características colorimétricas del color. Cb representa la crominancia Azul y Cr la crominancia Roja, ambas son una diferencia entre la componente de color azul y rojo con el valor de referencia Y.

La luminancia es directamente proporcional a la intensidad física, es una cantidad lineal y se puede ponderar por la sensibilidad de percepción humana lo que permite calcularla con la ecuación 1 “Ecuación de ponderación RGB” (Darío, 2005).

L. HISTOGRAMA DE UNA IMAGEN.

Es una representación gráfica de la cantidad de valores que se repiten en un conjunto de datos. En este diagrama se representa en el eje horizontal el valor de cada dato y en el eje vertical la frecuencia con la que se presentan, por lo que se puede aplicar esta herramienta a las matrices de datos que componen una imagen. En la siguiente imagen se muestra una fotografía de la estación de trenes de Albury, junto con un histograma para los canales R, G, B y en el lado derecho un histograma de la escala de grises (Atienza, 2011).

Figura No. 10 Histograma de una fotografía.



(Dpreview, 2017)

M. UMBRAL.

El umbral se conoce como el valor mínimo de referencia a partir del cual se clasifica un conjunto de datos. Esta palabra tiene diversos significados dependiendo del área donde se aplique, por ejemplo: el umbral de rentabilidad indica el volumen de negocio mínimo para que una empresa o producto sea rentable, el umbral del dolor indica la intensidad mínima de un estímulo que activará la sensación de dolor o bien el umbral de fotografía utilizado en la binarización de imágenes en escala de grises que indica cuando se tomará cada pixel como blanco o negro (Rodríguez, 2002).

N. BINARIZACIÓN DE UNA IMAGEN EN ESCALA DE GRISES.

Se trata de comparar los valores de una imagen con el valor umbral seleccionado. Cuando el nivel de gris de la imagen es menor que el umbral establecido, al pixel se le asigna un valor 0 es decir, negro, y si es mayor, se le asigna un uno (blanco). Con esta técnica se obtiene una imagen en blanco y negro.

La binarización se utiliza para separar una región de interés en una imagen, en la mayoría de casos se utiliza la segmentación por niveles de grises, pero también puede hacerse una segmentación con un rango de color determinado (Rodríguez, 2002).

Ñ. DETECCIÓN DE BORDES CON EL MÉTODO DE VECINDAD DE MOORE.

Es el conjunto conformado por ocho pixeles que rodean a uno central, con el cual comparten un vértice o un borde. En la siguiente imagen se muestra un ejemplo donde los pixeles P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 y P8 rodean al central P.

Figura No. 11 Vecindad de Moore.



(Mekala 2012.)

El algoritmo de Moore tiene como propósito encontrar el contorno de una imagen, la vecindad de Moore de un punto está compuesta por un conjunto de puntos a una distancia de Chebyshev de valor 1 desde el punto brindado. El número de celdas de la vecindad de Moore de un punto dado a una distancia de r unidades se determina mediante

Ecuación 2 Número de celdas en la vecindad de Moore.

$$(2r + 1)^2 - 1$$

(Mekala 2012.)

El algoritmo se resume en tomar un píxel negro de la cuadrícula como inicio, se puede comenzar por la esquina inferior izquierda e ir escaneando cada columna de píxeles de abajo hacia arriba. Por lo tanto, empezamos en el píxel negro y seguimos el recorrido en sentido horario y cada vez que se tope con un píxel negro, debe retroceder, es decir que regresa al píxel blanco en donde se encontraba parado anteriormente y gira alrededor del píxel negro que acaba de localizar y así sucesivamente va visitando a todos sus vecinos. Para detener el algoritmo se utiliza la condición de parada de Jacob Eliosoff, este consiste en parar luego de introducir el píxel de inicio por segunda vez en la misma dirección de origen (Mekala, 2012).

V. METODOLOGÍA

A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

La adquisición se realizó a partir de muestras espermáticas de pacientes del centro de fertilidad Gestar ubicado en el edificio Hope International. Estas se prepararon con el Kit SpermFunc® DNaf, cada una de ellas se sometió a observación con un estereoscopio marca Premiere al cual se le adaptó una cámara microscópica AmScope de 5 mega pixeles. Los oculares de observación que se utilizaron fueron de 40x, el campo de enfoque cubre aproximadamente 10 espermatozoides y para que la muestra por paciente fuese significativa se debían contar 500 espermias, por lo tanto, para cada paciente se tomó un aproximado de 60 fotografías con el fin de lograr una muestra representativa al predecir el índice de fragmentación espermática.

Figura No. 12 Estereoscopio con cámara AmScope.



B. SEGMENTACIÓN DE ESPERMAS.

En esta etapa de segmentación se desea detectar todos los espermias que se encuentran en cada una de las fotografías del paciente, al localizarlos se deben clasificar según el tamaño del halo de color que estos hayan generado, si la proporción del halo es mayor a un $1/3$ de la cabeza del espermatozoide, se debe clasificar y contar en el grupo de células con ADN no fragmentado y si este no tuviera dicha proporción se debe clasificar y contar en el grupo de los fragmentados.

1. **Aplicación de modelos de color** Se utilizó el Image Processing Toolbox de Matlab y la aplicación Color Thresholder para aplicar los distintos modelos de color por separado a una misma imagen y así mismo generar un histograma para cada subespacio. Esto permite aplicar un umbral superior e inferior, los cuales se pueden variar por medio de unas barras deslizadoras, mostrando una vista previa del resultado.

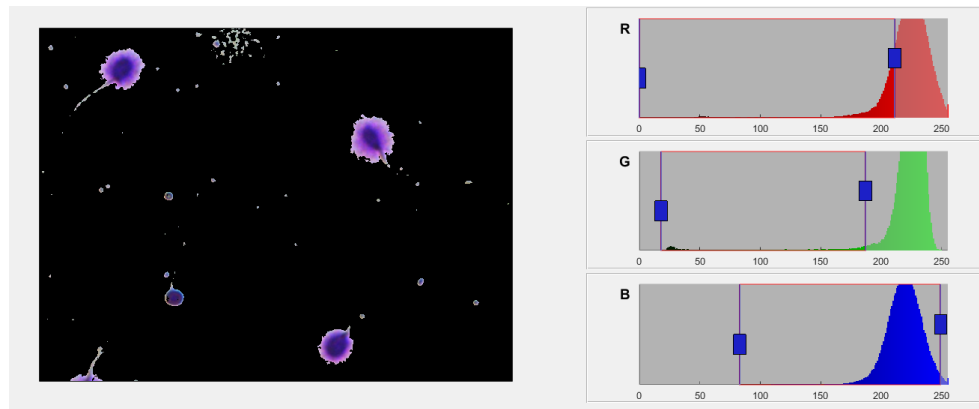
Iterando con varias imágenes de prueba se determinó los valores de umbrales superiores e inferiores promedio para cada modelo de color. Para los siguientes ejemplos se utilizó la Figura No.13 como base para aplicar los modelos de color y los umbrales promedio.

Figura No. 13 Muestra espermática.



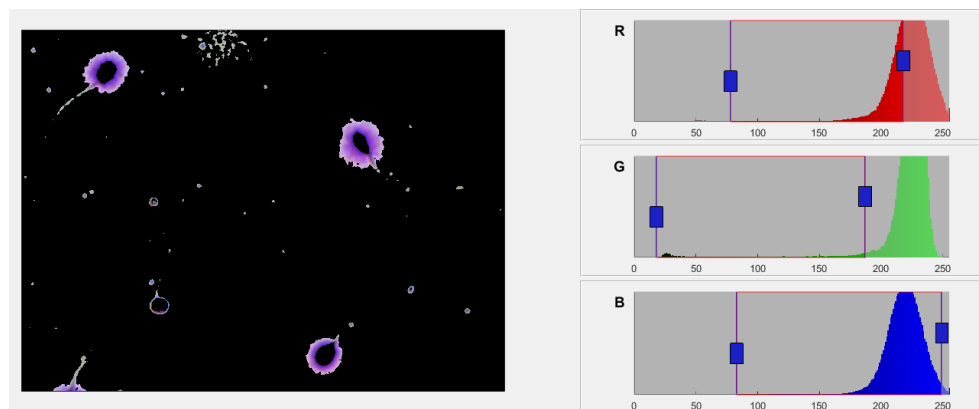
El primer modelo de color analizado fue RGB, este espacio tiene tres planos de imágenes independientes, uno para cada color (rojo, verde y azul). La Figura No.14 contiene la muestra espermática en la que se ilustran sus respectivos histogramas para cada plano de color, estos diagramas permiten modificar el valor del umbral inferior y superior. Los umbrales se modificaron hasta obtener un fondo mayormente negro y resaltar el halo morado que generan los espermias, al tener la imagen de la forma deseada se tomaron los valores de los umbrales y se repitió este proceso con otras imágenes de un mismo paciente.

Figura No. 14 Halo espermático en modelo RGB



De la misma forma se modificaron los valores de los umbrales superiores e inferiores para R, G y B con la diferencia que, en este caso, se trató de pigmentar el espermatozoide y el halo de color morado. Estos valores de umbral se registraron para obtener un promedio para generalizar el proceso y no repetirlo para futuras imágenes.

Figura No. 15 Halo y espermatozoide en modelo RGB



Este proceso se realizó para los tres modelos de color restantes: Lab, HSV y YCbCr. Al realizar esto, se pudo determinar qué espacio de color presenta menor cantidad de ruido y mayor definición en los dos enfoques que se le dan a las imágenes.

Figura No. 16 Halo espermático en modelo Lab

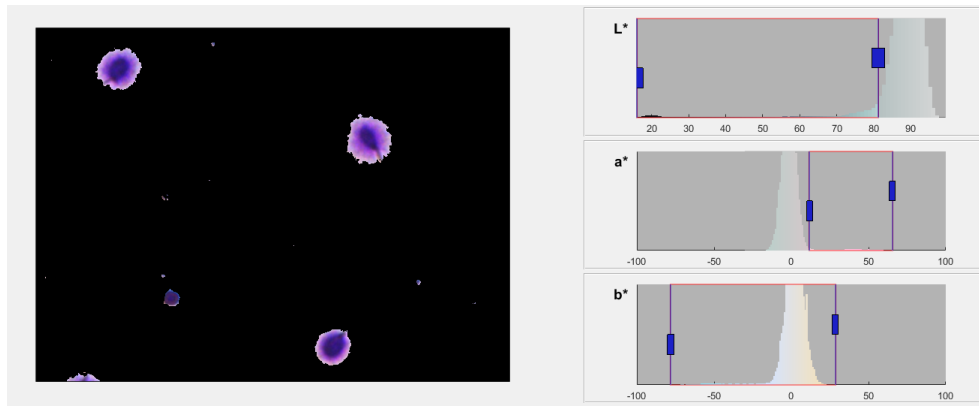


Figura No. 17 Halo y esperma en modelo Lab

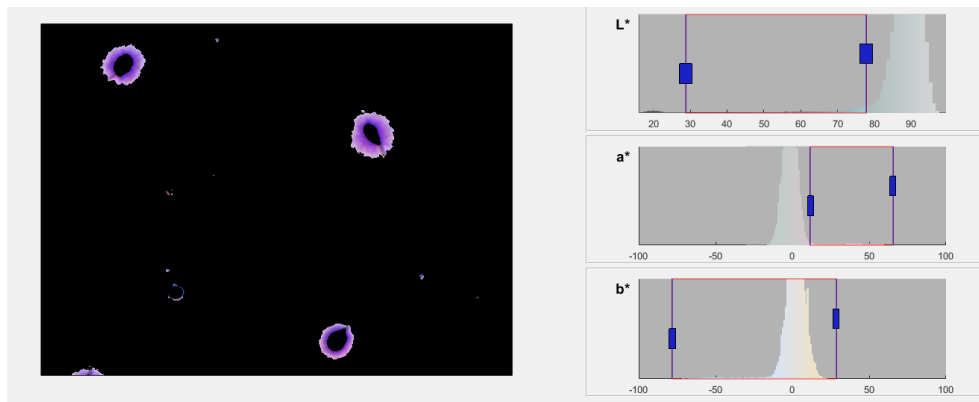


Figura No. 18 Halo espermático en modelo HSV

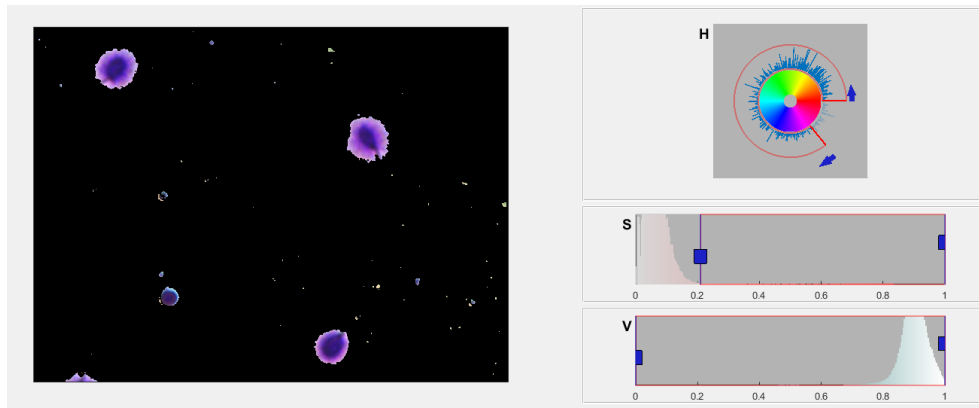


Figura No. 19 Halo y esperma en modelo HSV

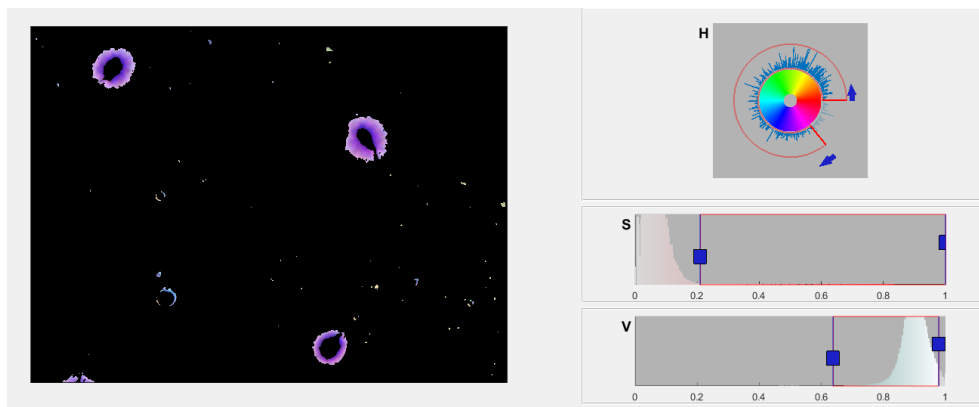


Figura No. 20 Halo espermático en modelo YCbCr

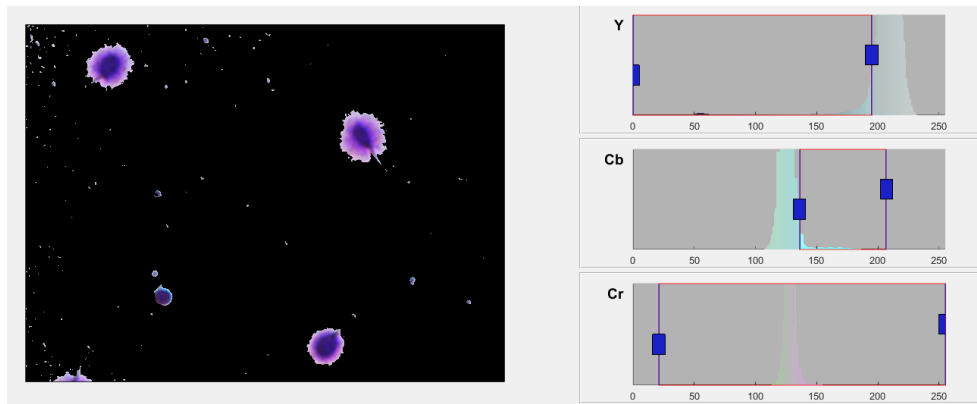
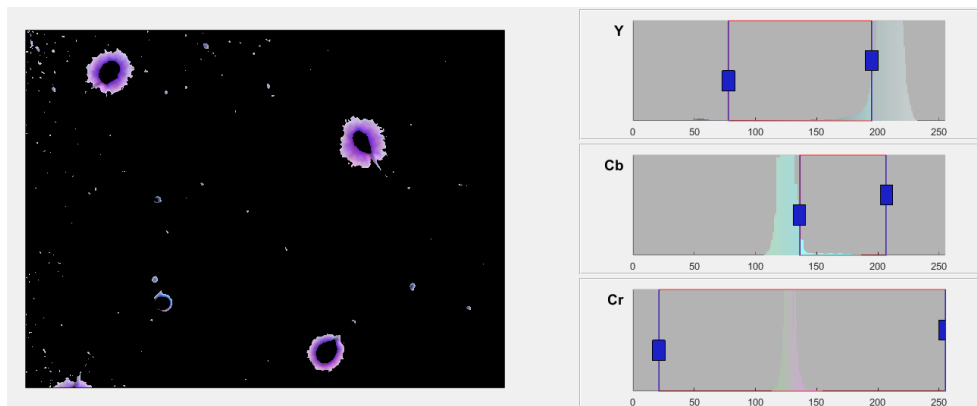


Figura No. 21 Halo y esperma en modelo YCbCr



Luego de analizar las figuras 14 a 21, se logró determinar que el espacio de color Lab era el más adecuado para realizar el enfoque halo-esperma. Como se puede observar, este espacio presenta pocas perturbaciones en el área umbralizada al igual que una alta definición de la cabeza del esperma. En cuanto a los otros espacios de color, presentaron ruidos, mal formaciones y mucha dependencia entre subespacios. Esta codependencia permite muy poco juego entre los umbrales para poder hacer un buen procesamiento de imágenes.

2. **Umbral y binarización.** En esta fase ya se seleccionó el modelo de color Lab para aplicarle la umbralización que más adelante nos será de utilidad para binarizar las imágenes. Se utilizó la aplicación Color Thresholder de Matlab para ir variando los valores de umbral inferior y superior hasta lograr resaltar las zonas de interés de la imagen, este proceso se realizó con varias muestras de un paciente hasta encontrar los valores de umbral promedio para todos los subespacios.

El cuadro No.2 muestra los valores promedio obtenidos para el umbral inferior y superior, estos lograron que todas las imágenes de muestra presentasen el enfoque deseado. Como es de notar únicamente tiene los valores de umbral para los subespacios L, A y no para B, ya que al variar el umbral con la aplicación Color Thresholder se notó que el subespacio B no tenía mayor influencia en los pixeles de la imagen, por lo que no ayudaba a la hora de querer realizar el enfoque en los halos y espermas. En cuanto a L y A se encontró que cada uno de ellos modifica los pixeles dando un realce diferente, es decir, L pigmentaba los pixeles del cuerpo espermático y A modificaba los pixeles del fondo para resaltar el halo generado (figuras 16 y 17).

Cuadro No. 2 Valores de umbral promedio en espacio Lab

Subespacio	Umbral inferior	Umbral superior
L	30	100
A	20	70

Con los valores de umbral ya definidos se implementó en Matlab el código mostrado en la Figura No. 22, por medio de esto se llevó a cabo la binarización. Se recorre la imagen y se elimina todo lo que se encuentre afuera de los valores umbrales establecidos, si los pixeles están por abajo del límite inferior o por arriba del límite superior estos pixeles se ponen en 255 (blanco) y los pixeles que se encuentran dentro de ese rango se pintan de negro.

Figura No. 22 Pseudocódigo para Binarización en L y A.

```

1. Inicio [Binarización para los espacios L y A]
2. Desde i = 1 hasta la cantidad total de pixeles en la imagen.
  2.1. Si el pixel i del subespacio L es menor al umbral inferior L o es mayor al umbral superior L.
    2.1.1. El pixel i del subespacio L = 0.
  2.2. Fin
  2.3. Si el pixel i del subespacio A es menor al umbral inferior A o es mayor al umbral superior A.
    2.3.1. El pixel i del subespacio A = 0.
  2.4. De lo contrario
    2.4.1. El pixel i del subespacio A es = 255.
  2.5. Fin
3. Fin.

```

En la Figura No.23 se puede ver el resultado de aplicar el código que se describió anteriormente (Figura 22). El establecer los valores de umbral inferior y superior del subespacio L permite realizar un realce en los espermas, mientras que al aplicar los de A (Figura 24) se obtuvo únicamente el halo generado.

Figura No. 23 Imagen en subespacio L binarizada

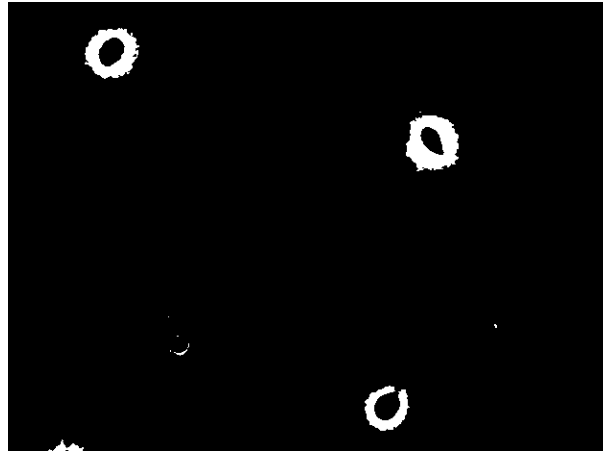


Figura No. 24 Imagen en subespacio A binarizada.



Al tener las imágenes ya binarizadas se notó que aún aparecían pequeños pixeles de perturbación, los cuales darían lugar a falsos positivos en la fase de detección bordes. Para eliminar estos pequeños objetos se utilizó la función `bwareopen(BW, P)` de Matlab, esta se encarga de quitar los pixeles que se encuentren conectados utilizando la imagen binaria que se desea limpiar (BW) y el número de pixeles conectados (P), si estos se encuentran por debajo de este número establecido simplemente lo elimina aplicándole un color de fondo ya sea negro o blanco.

Al utilizar esta función se obtuvo como resultado una imagen binaria, con la diferencia que se encuentra un poco más libre de perturbaciones. Para el análisis actual se utilizó una cantidad de 100 píxeles conectados, lo cual se estimó en base al tamaño aproximado de la cabeza de un espermatozoide dado que la mayoría sobrepasan los 100 píxeles. Esta segunda binarización se realizó con las imágenes del subespacio L y A, en donde a L se le cambió el color de fondo para poder apreciar mejor el tamaño del espermatozoide y así mismo que el halo no interviniera al realizar la detección de bordes.

Figura No. 25 Imagen en subespacio L sin perturbaciones.

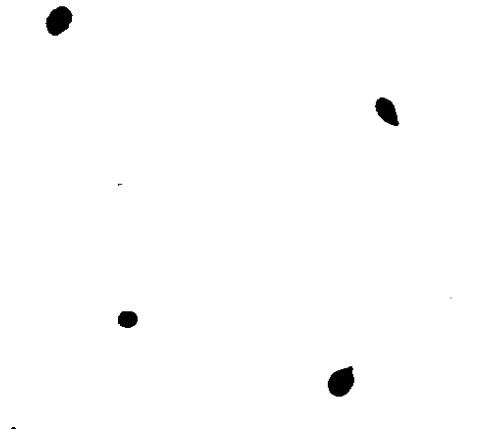
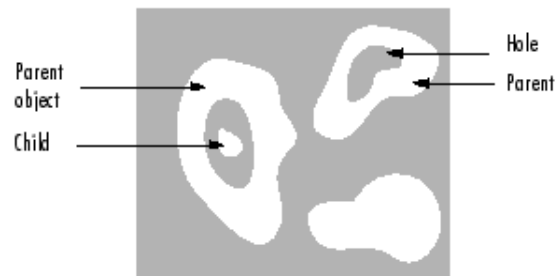


Figura No. 26 Imagen en subespacio A sin perturbaciones.



3. **Detección de bordes.** Luego de tener las imágenes lo más libre de perturbaciones posible se realizó la detección de bordes, para esto se empleó la función `bwboundaries(BW)` de Matlab la cual se basa en el algoritmo de vecindad de Moore. Esta función se encarga de trazar los contornos exteriores de los objetos detectados, así como los contornos de los agujeros que se encuentran adentro, de la imagen ya binarizada (BW). A los objetos externos los denomina como padres y a los que se encuentran encerrados en estos los llama hijos, al finalizar la detección devuelve un matriz de celdas, en donde cada celda contiene la ubicación de los objetos encontrados y con estas mismas direcciones traza los bordes.

Figura No. 27 Criterio de detección de bordes.



Esta función se aplicó tanto en las imágenes de L como en las de A para lograr la detección de Halos (A) y de espermias (L) resaltándolos de color verde y enumerando cada una de las regiones encontradas.

Figura No. 28 Detección de bordes en espermias.

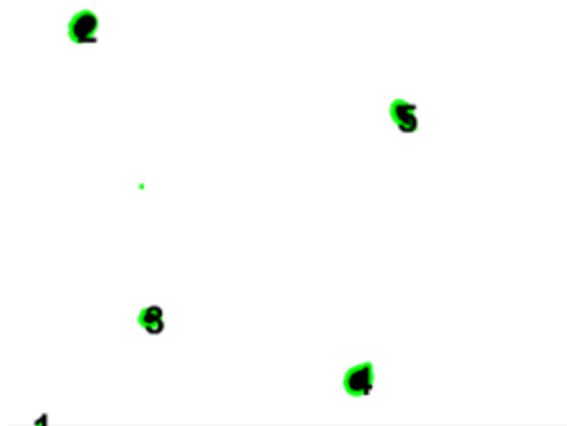
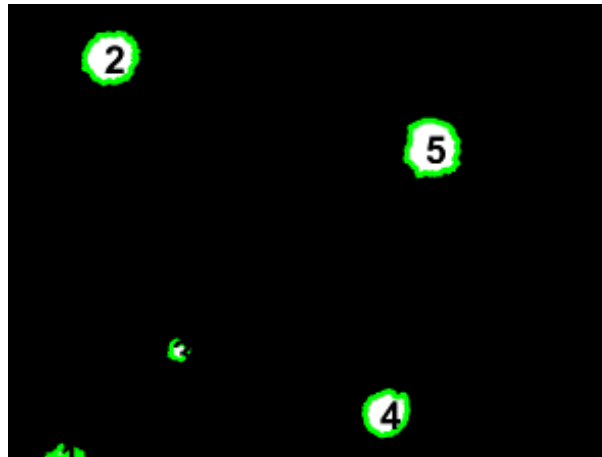


Figura No. 29 Detección de bordes en halos.



4. **Medición de propiedades en áreas detectadas.** En esta sección se midió las propiedades de las regiones encontradas en las imágenes de los subespacios L y A, es decir las propiedades pertenecientes a los halos y espermas de forma separada. Primero se utilizó la función `bwlabel(Bw,n)`, esta se encarga de identificar los pixeles conectados en una imagen binaria (Bw) siendo esta la imagen binaria libre de perturbaciones (figuras 25 y 26), luego de identificar los grupos de conexiones les asigna una etiqueta, un número, el cual se encarga de diferenciarlo del resto. Finalmente retorna una matriz de etiquetas que puede representarse con una imagen en escala de grises en donde conectividad se puede identificar con n.

Figura No. 30 Pseudocódigo para obtención de propiedades.

1. Inicio [Obtención de propiedades de las regiones detectadas]
2. `LImL` = imagen en subespacio L etiquetada por grupos.
3. `LImA` = imagen en subespacio A etiquetada por grupos.
4. `RegPropsL` = todas las propiedades de las regiones etiquetadas en el subespacio L
5. `RegPropsA` = todas las propiedades de las regiones etiquetadas en el subespacio A
6. `MedidasL` = área de las regiones etiquetadas en el subespacio L.
7. `MedidasA` = área de las regiones etiquetadas en el subespacio A.
8. Fin.

Luego de identificar los grupos de pixeles conectados para L y A, se utilizó la función `regionprops(Bw, properties)`, con la cual pueden determinarse algunas propiedades como: centroides, áreas, perímetros, excentricidad. Para el cálculo de propiedades dicha función utilizó la imagen obtenida con `bwlabel(Bw)` y se escogió el cálculo de todas las mediciones (`properties`).

Finalmente se creó una variable para cada subespacio de color (L y A) en las que se almacenó el valor del área perteneciente a cada halo y esperma encontrado en la imagen. Estas variables fueron de mucha utilidad en las siguientes etapas del procesamiento de imágenes, ya que con ellas se determinó si el esperma cumple con los parámetros de fragmentación del ADN.

5. **Cálculo de tamaño del halo generado por esperma.** Para calcular el tamaño del halo que genera un esperma, primero se determinó que halo corresponde a cada esperma, ya que ambos se encuentran en diferentes subespacios y aunque la imagen esté limpia de perturbaciones, todavía se presentan falsos positivos que pueden alterar los resultados. Al momento de hacer este mapeo de espermias y halos, se garantizó la eliminación de estos falsos positivos tanto para los halos como para los espermias. Para lograrlo se empleó la propiedad `BoundingBox` de la función `RegionProps`, la cual traza rectángulos que rodean a las regiones localizadas en las imágenes de L y A.

Figura No. 31 Pseudocódigo para obtención de cajas en regiones detectadas.

```

1. Inicio [ Obtención de cajas que rodean los espermias detectados]
2. Desde i = 1 hasta la cantidad de espermias detectados
   2.1 CajasL(i,1:4) = coordenadas de la caja del esperma detectado.
3. Fin

```

```

1. Inicio [ Obtención de cajas que rodean halos detectados]
2. Desde i = 1 hasta la cantidad de halos detectados
   2.1 CajasA(i,1:4) = coordenadas de la caja del halo detectado.
3. Fin

```

Luego se recorrió la caja de los halos y espermias, de forma que para cada caja de un halo se recorrió la caja de todos los espermias de la imagen. Al realizar esto se verificó si la caja de los espermias estaba dentro de la caja de los halos, tomando como referencia la esquina superior izquierda y la esquina inferior derecha de las dos cajas. Al finalizar únicamente se guardó las direcciones de las cajas que si encajaron.

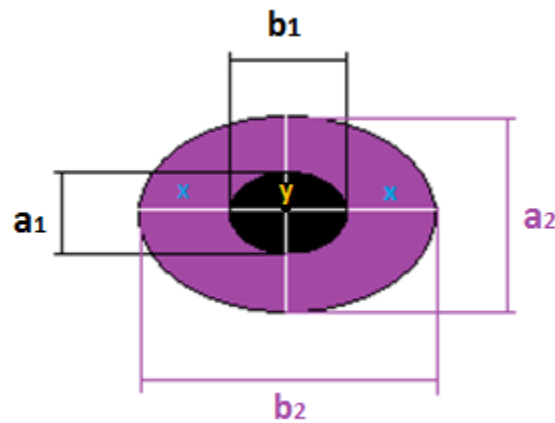
Figura No. 32 Pseudocódigo para emparejar halos y epermas.

```

1. Inicio [Emparejando halos y espermas.]
2. Desde i = 1 hasta la cantidad de halos detectados.
  2.1 Desde J = 1 hasta la cantidad de espermas detectados.
    2.1.1 Si las coordenadas de la esquina superior izquierda del esperma son
      mayores que las del halo.
      2.1.1.1 Si las coordenadas de la esquina inferior derecha del esperma es
        menor que las coordenadas que las del halo.
        2.1.1.1.1 Guarda las direcciones (i, j) de la caja del halo y esperma.
        2.1.1.1.2 Fin.
      2.1.1.2 Fin.
    2.1.2 Fin.
  2.2 Fin.
3. Fin

```

Figura No. 33 Relación halo-esperma.



Ya que se identificó el esperma perteneciente a cada halo, se determinó una proporción utilizando las áreas de los espermas y las del halo (incluyendo al esperma adentro), esto permitió diferenciar a los espermas con y sin fragmentación. Para empezar, se consideró el halo y el esperma como elipses ideales y concéntricas, la Figura 33 muestra el diámetro mayor y menor de cada región (a_1 , b_1 , y a_2 , b_2) y se sabe que el halo generado (x) debe ser mayor a $\frac{1}{3}$ del diámetro del esperma (y), por lo tanto, se tiene:

$$x > \frac{y}{3}$$

Como muestra la Figura 33 se sabe que:

$$b_2 = 2x + y$$

Al sustituir x se obtiene:

$$b_2 > \frac{2y}{3} + y$$

Entonces se obtienen las condiciones para los diámetros del halo (b_2 y a_2)

Ecuación 3 Relación de diámetros mayor y menor entre halo y esperma

$$b_2 > 1 \frac{2}{3} b_1 \quad y \quad a_2 > 1 \frac{2}{3} a_1$$

Se utilizó la ecuación de área de una elipse y se sustituyó las relaciones encontradas anteriormente únicamente para el halo.

Ecuación 4 Área del halo con las relaciones de diámetros

$$A_H = \pi \frac{a_2}{2} * \frac{b_2}{2}$$

$$A_H = \frac{\pi}{4} \left(1 \frac{2}{3}\right) a_1 * \left(1 \frac{2}{3}\right) b_1$$

Luego, para la ecuación de área del esperma:

Ecuación 5 Área de una elipse para un esperma.

$$A_E = \pi \frac{a_1}{2} * \frac{b_1}{2}$$

Y se observa el área del esperma está contenida en el área del halo:

$$A_E = \pi \frac{a_1}{2} * \frac{b_1}{2}$$

$$A_H = \frac{\pi}{4} \left(1 \frac{2}{3}\right) a_1 * \left(1 \frac{2}{3}\right) b_1$$

Por lo tanto, se obtuvo la siguiente proporción en las áreas del halo y esperma:

Ecuación 6 Proporción de áreas.

$$A_H > A_E \left(1 \frac{2}{3}\right)^2$$

$$\frac{A_H}{A_E} > 2.7$$

Esto indica que la proporción halo-esperma debe ser mayor a 2.7 para que el esperma se considere como no fragmentado en caso de que esta sea menor se le considera como fragmentado.

Del algoritmo ya se tenían las direcciones de los halos y espermas que, sí encajaron, con lo cual se obtuvieron todas las medidas de áreas de los halos (areaA) y espermas (areaL). Se debe tomar en cuenta que el área obtenida de los halos (Figura 26) tiene la forma de una elipse, la cual contiene al esperma correspondiente, así como se tomó en la Ecuación 4 al momento de calcular el área. Por esta razón, al momento de calcular la relación de áreas solamente se dividió el área del halo (areaA) dentro del área del esperma (areaL) para obtener la relación correspondiente. A manera de eliminar falsos positivos, los cuales tuvieran halos o espermas con un área menor a 100 pixeles se utilizó esta condición para tomar en cuenta únicamente los mayores a este parámetro.

Figura No. 34 Pseudocódigo para relación halo-esperma.

```

1. Inicio [ Relación halo-esperma.]
2. Desde k = 1 hasta la cantidad total de cajas emparejadas.
  2.1 AreaL = área de esperma k encajado.
  2.2 AreaA = área del halo k encajado.
  2.3 Rel = área del halo dividida el área del esperma.
  2.4 Si el área del esperma es mayor a 100 pixeles.
    2.4.1 Si el área del halo es mayor a 100 pixeles
      2.4.1.1 Imprime las propiedades.
      2.4.1.2 n = n+1
    2.4.2 Fin.
  2.5 Fin
3. Fin.

```

C. ANÁLISIS DE MUESTRAS TOTALES POR PACIENTE.

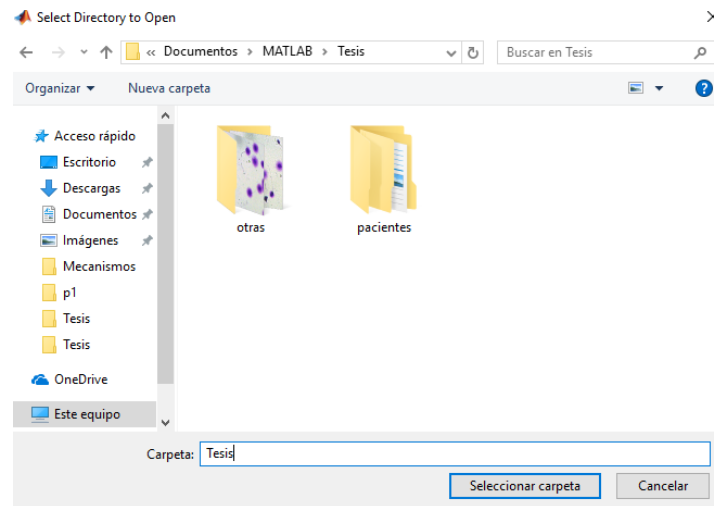
El análisis realizado en las etapas anteriores se hizo únicamente para una imagen y se afinó probando con diferentes casos en la muestra de un paciente. Para que el análisis fuese significativo se debían contar como mínimo 500 espermias y se estima que cada foto contiene 10 espermias, por lo tanto, el total de fotografías requeridas por paciente eran de aproximadamente 60 para tener un margen de error válido y contar la cantidad deseada. Por lo tanto, el análisis se realizó para las 60 muestras del paciente con el fin de tener un conteo y clasificación válida.

Figura No. 35 Pseudocódigo para el análisis de muestras totales.

```
1. Inicio [Análisis de muestras totales.]
2. Folder_name = dirección del directorio seleccionado.
3. Abre la dirección seleccionada.
4. Files = todos los archivos con extensión .jpg dentro del directorio
5. Nfiles = cantidad de archivos .jpg encontrados.
6. Desde ii = 1 hasta la cantidad total de archivos.
   6.1 currentfilename = nombre del archivo ii con extensión .jpg.
   6.2 foto = lectura del archivo ii.
   6.3 images{ii} = guarda la foto en un listado.
7. Fin.
```

La Figura 35 muestra la implementación en Matlab, se utilizó la función `uigetdir` para obtener un cuadro de diálogo el cual enseña las carpetas que se encuentran dentro del directorio de trabajo actual. Esta ventana permite navegar en la carpeta al momento de seleccionarla o simplemente buscarla. Al tener seleccionada la carpeta que se desea analizar se abre su dirección y la variable `files` guarda todos los archivos con extensión `.jpg` encontrados y se almacena la cantidad de archivos encontrados (`nfiles`). Por últimos se hizo un ciclo que se encargará de realizar el procesamiento de imágenes y que finalizará al haber analizado todas las muestras encontradas.

Figura No. 36 Cuadro de diálogo para selección de muestras.



D. ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN ESPERMÁTICA.

En esta sección se implementó el conteo total de espermias y se determinó cuántos de estos están fragmentados y cuantos no lo están. La ecuación 6 indica la proporción de área que debe haber entre halo y esperma, si esta es menor a 2.7 se cuenta como esperma fragmentado (frag) mientras que si es mayor o igual es un esperma no fragmentado (nofrag) y el total de espermias contados (tot), se determinó con el tamaño del área del esperma y halo (areaL y areaA) ya que cuenta cuando estas medidas son mayores a 100 pixeles.

Figura No. 37 Pseudocódigo para el contador espermático.

```

1. Inicio [ Contador espermático.]
2. Si la relación halo-esperma es menor a 2.7.
   2.1 frag = frag + 1.
3. De lo contrario
   3.1 nofrag = nofrag + 1.
4. Fin.
5. Fin.

```

Este proceso se realizó para todo el paquete de fotos de un mismo paciente hasta contar los 500 espermatozoides que hizo que la muestra fuese válida. Al terminar el conteo se sacó el porcentaje de espermatozoides fragmentados y el de no fragmentados con el cual se determinó el potencial del paciente, mediante los siguientes estándares:

- Si el porcentaje de fragmentación es 15%, al paciente se le considera con excelente potencial.
- Porcentaje de fragmentación entre 15% - 24%, tiene alto potencial.
- Porcentaje de fragmentación entre 25% - 40%, tiene bajo potencial.
- Porcentaje de fragmentación mayor al 40%, tiene muy bajo potencial.

VI. RESULTADOS

Cuadro No. 3 Análisis realizado en el laboratorio para el paciente I.

Espermas contados	545
Espermas fragmentados	59
Espermas no fragmentados	486
Porcentaje de fragmentación del paciente	10.83
Potencial del paciente.	Excelente

Figura No. 38 Resultados obtenidos con Matlab.

Opciones

Imagen: 38

Espermas Fragmentados

Espermas No Fragmentados

Información

Resumen

Número total de espermas:	514
Espermas no fragmentados:	458
Espermas fragmentados:	56
% de fragmentación:	10.89
Calidad Espermática:	Excelente

Detalle

	# Total	# No fragmentados	# Fragmentados
35	17	15	2
36	14	14	0
37	6	4	2
38	4	4	0
39	19	16	3
40	12	12	0
41	10	10	0

Seleccionar carpeta

Figura No. 39 Análisis realizado con Matlab.

Información			
Resumen			
Número total de espermatozoides:			514
Espermatozoides no fragmentados:			458
Espermatozoides fragmentados:			56
% de fragmentación:			10.89
Calidad Espermática:			Excelente
Detalle			
	# Total	# No fragmentados	# Fragmentados
35	17	15	2
36	14	14	0
37	6	4	2
38	4	4	0
39	19	16	3
40	12	12	0
41	10	10	0

Cuadro No. 4 Comparación de resultados del laboratorio contra resultados del Software para el paciente I.

Especificaciones	Laboratorio	Software	Porcentaje Error	Porcentaje Aceptación
Total	545	514	5.69	94.31
Fragmentados	59	56	5.08	94.92
No fragmentados	486	458	5.76	94.24
Porcentaje Fragmentación	10.82	10.89	0.59	99.41
Potencial	Excelente	Excelente	-	-

Cuadro No. 5 Comparación del total de espermias por imagen del paciente I

Foto #	Laboratorio	Software	Porcentaje de error
1	11	12	9.09
2	13	13	0.00
3	13	11	15.38
4	5	5	0.00
5	10	8	20.00
6	11	11	0.00
7	9	8	11.11
8	10	10	0.00
9	8	8	0.00
10	8	9	12.50
11	13	13	0.00
12	10	9	10.00
13	2	2	0.00
14	6	6	0.00
15	10	10	0.00
16	9	9	0.00
17	6	5	16.67
18	7	6	14.29
19	8	7	12.50
20	8	7	12.50
21	5	4	20.00
22	8	9	12.50
23	13	14	7.69
24	9	10	11.11
25	6	7	16.67
26	4	4	0.00
27	6	6	0.00
28	6	6	0.00
29	5	5	0.00
30	5	5	0.00
31	7	7	0.00
32	6	6	0.00
33	8	12	50.00
34	6	6	0.00
35	18	17	5.56
36	18	14	22.22
37	5	6	20.00
38	4	4	0.00
39	19	19	0.00
40	17	12	29.41
41	10	10	0.00
42	21	13	38.10
43	25	27	8.00
44	5	5	0.00
45	13	10	23.08
46	5	5	0.00
47	4	4	0.00
48	3	2	33.33
49	17	16	5.88
50	21	21	0.00
51	18	17	5.56
52	4	3	25.00
53	6	6	0.00
54	19	19	0.00
55	22	14	36.36

Cuadro No. 6 Comparación del total de espermias fragmentados por imagen del paciente I.

Foto #	Laboratorio	Software	Porcentaje de error
1	2	3	50.00
2	0	0	0.00
3	0	0	0.00
4	2	2	0.00
5	0	0	0.00
6	1	0	100.00
7	1	0	100.00
8	1	0	100.00
9	1	1	0.00
10	0	0	0.00
11	4	2	50.00
12	2	1	50.00
13	1	1	0.00
14	1	0	100.00
15	4	2	50.00
16	3	2	33.33
17	2	1	50.00
18	1	1	0.00
19	3	2	33.33
20	1	1	0.00
21	1	0	100.00
22	2	2	0.00
23	2	1	50.00
24	0	0	0.00
25	0	0	0.00
26	1	1	0.00
27	1	1	0.00
28	0	0	0.00
29	2	2	0.00
30	3	3	0.00
31	1	1	0.00
32	2	2	0.00
33	2	4	100.00
34	1	1	0.00
35	1	2	100.00
36	0	0	0.00
37	0	2	0.00
38	0	0	0.00
39	2	3	50.00
40	0	0	0.00
41	0	0	0.00
42	0	0	0.00
43	1	1	0.00
44	2	2	0.00
45	0	2	0.00
46	0	0	0.00
47	0	0	0.00
48	0	0	0.00
49	0	1	0.00
50	1	1	0.00
51	2	2	0.00
52	0	0	0.00
53	1	0	100.00
54	1	3	200.00

Cuadro No. 7 Comparación del total de espermatozoides no fragmentados por imagen del paciente I.

Foto #	Laboratorio	Software	Porcentaje de error
1	9	9	0.00
2	13	13	0.00
3	13	11	15.38
4	3	3	0.00
5	10	8	20.00
6	10	11	10.00
7	8	8	0.00
8	9	10	11.11
9	7	7	0.00
10	8	9	12.50
11	9	11	22.22
12	8	8	0.00
13	1	1	0.00
14	5	6	20.00
15	6	8	33.33
16	6	7	16.67
17	4	4	0.00
18	6	5	16.67
19	5	5	0.00
20	7	6	14.29
21	4	4	0.00
22	6	7	16.67
23	11	13	18.18
24	9	10	11.11
25	6	7	16.67
26	3	3	0.00
27	5	5	0.00
28	6	6	0.00
29	3	3	0.00
30	2	2	0.00
31	6	6	0.00
32	4	4	0.00
33	6	8	33.33
34	5	5	0.00
35	17	15	11.76
36	18	14	22.22
37	5	4	20.00
38	4	4	0.00
39	17	16	5.88
40	17	12	29.41
41	10	10	0.00
42	21	13	38.10
43	24	26	8.33
44	3	3	0.00
45	13	8	38.46
46	5	5	0.00
47	4	4	0.00
48	3	2	33.33
49	17	15	11.76
50	20	20	0.00
51	16	15	6.25
52	4	3	25.00
53	5	6	20.00
54	18	16	11.11
55	22	14	36.36

Cuadro No. 8 Media y desviación estándar del error por imagen del paciente I.

Dato estadístico	Total de espermias	Espermias fragmentados	Espermias no fragmentados
Media	3.81	25.76	11.02
Desviación estándar	14.64	43.72	11.68

Figura No. 40 Dispersión de puntos para el total de espermias por foto del paciente I.

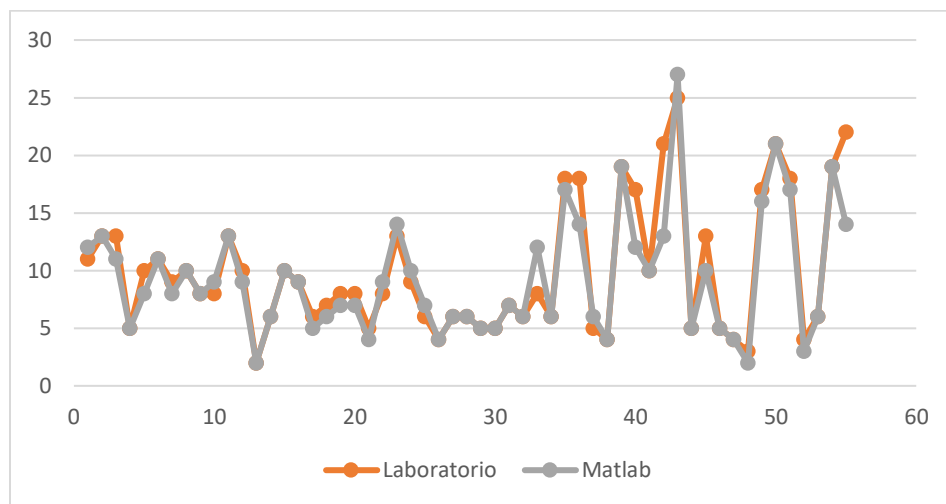


Figura No. 41 Dispersión de puntos para espermias fragmentados por foto del paciente I.

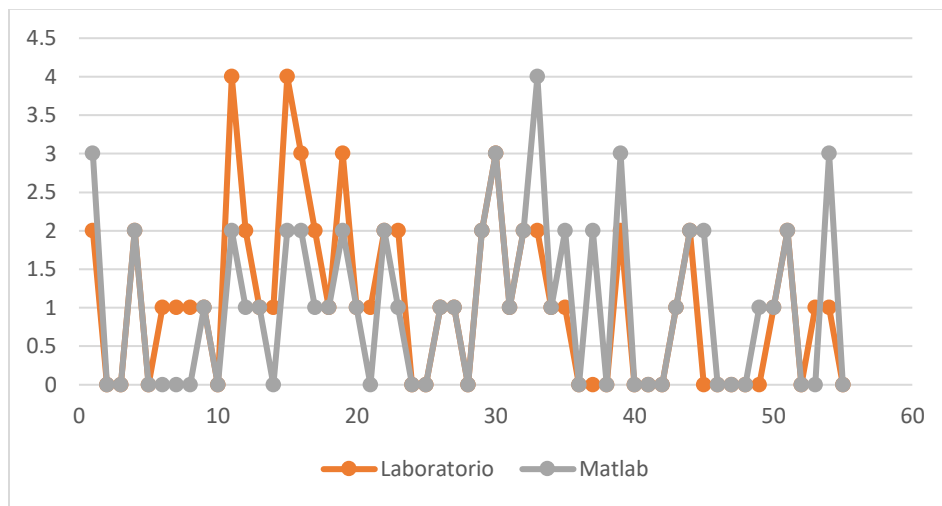
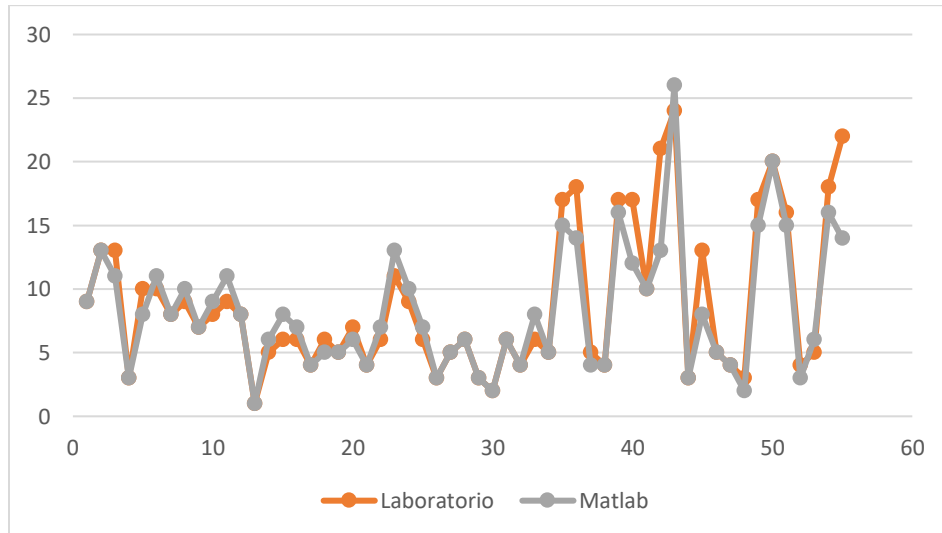


Figura No. 42 Dispersión de puntos para espermias no fragmentados por foto del paciente I.



Cuadro No. 9 Comparación del total de espermatozoides por imagen del paciente II.

Foto #	Laboratorio	Software	Porcentaje de error
1	4	4	0.00
2	2	2	0.00
3	4	4	0.00
4	5	6	20.00
5	4	4	0.00
6	8	8	0.00
7	3	3	0.00
8	4	3	25.00
9	5	5	0.00
10	3	4	33.33
11	5	6	20.00
12	3	3	0.00
13	8	8	0.00
14	9	10	11.11
15	6	6	0.00
16	7	7	0.00
17	4	4	0.00
18	5	6	20.00
19	6	6	0.00
20	2	2	0.00
21	3	3	0.00
22	6	6	0.00
23	4	5	25.00
24	4	4	0.00
25	2	2	0.00
26	5	5	0.00
27	7	8	14.29
28	4	3	25.00
29	4	4	0.00
30	6	6	0.00
31	6	6	0.00
32	7	7	0.00
33	8	8	0.00
34	4	6	50.00
35	7	7	0.00
36	5	5	0.00
37	7	7	0.00
38	9	9	0.00
39	7	7	0.00
40	5	5	0.00
41	4	4	0.00
42	6	6	0.00
43	3	3	0.00
44	7	9	28.57
45	3	3	0.00
46	6	5	16.67
47	6	5	16.67
48	15	17	13.33
49	6	6	0.00
50	7	8	14.29
51	5	5	0.00
52	9	9	0.00
53	8	8	0.00
54	11	12	9.09
55	15	15	0.00
56	6	6	0.00
57	7	7	0.00
58	9	9	0.00
59	17	19	11.76
60	13	14	7.69
61	6	6	0.00
62	16	16	0.00
63	13	14	7.69
64	8	8	0.00
65	15	16	6.67
66	8	8	0.00
67	3	3	0.00
68	6	5	16.67
69	6	6	0.00
70	8	8	0.00
71	13	13	0.00
72	6	6	0.00
73	7	7	0.00
74	2	2	0.00
75	4	5	25.00

Cuadro No. 10 Comparación del total de espermias fragmentados por imagen del paciente II.

Foto #	Laboratorio	Software	Porcentaje de error
1	1	1	0.00
2	0	0	0.00
3	1	1	0.00
4	0	0	0.00
5	0	0	0.00
6	1	1	0.00
7	0	0	0.00
8	1	1	0.00
9	0	0	0.00
10	1	1	0.00
11	1	1	0.00
12	0	0	0.00
13	0	0	0.00
14	0	0	0.00
15	1	2	100.00
16	1	0	100.00
17	1	1	0.00
18	0	0	0.00
19	0	0	0.00
20	0	0	0.00
21	1	1	0.00
22	1	1	0.00
23	0	1	0.00
24	0	0	0.00
25	0	0	0.00
26	0	0	0.00
27	2	3	50.00
28	2	1	50.00
29	0	0	0.00
30	3	3	0.00
31	2	2	0.00
32	3	3	0.00
33	1	1	0.00
34	2	3	50.00
35	2	1	50.00
36	1	0	100.00
37	0	0	0.00
38	0	0	0.00
39	0	0	0.00
40	1	2	100.00
41	1	2	100.00
42	1	1	0.00
43	1	3	200.00
44	0	0	0.00
45	1	1	0.00
46	0	0	0.00
47	0	0	0.00
48	2	0	100.00
49	0	0	0.00
50	0	0	0.00
51	0	0	0.00
52	0	0	0.00
53	0	0	0.00
54	0	0	0.00
55	1	1	0.00
56	6	0	100.00
57	2	2	0.00
58	1	1	0.00
59	2	2	0.00
60	1	1	0.00
61	1	0	100.00
62	0	0	0.00
63	1	2	100.00
64	1	1	0.00
65	1	1	0.00
66	0	0	0.00
67	2	2	0.00
68	5	5	0.00
69	0	0	0.00
70	1	1	0.00
71	1	2	100.00
72	2	2	0.00
73	1	1	0.00
74	0	0	0.00
75	0	1	0.00

Cuadro No. 11 Comparación del total de espermatozoides no fragmentados por imagen del paciente II.

Foto #	Laboratorio	Software	Porcentaje de error
1	3	3	0.00
2	2	2	0.00
3	3	3	0.00
4	5	6	20.00
5	4	4	0.00
6	7	7	0.00
7	3	3	0.00
8	3	2	33.33
9	5	5	0.00
10	2	3	50.00
11	4	5	25.00
12	3	3	0.00
13	8	8	0.00
14	9	10	11.11
15	5	4	20.00
16	6	7	16.67
17	3	3	0.00
18	5	6	20.00
19	6	6	0.00
20	2	2	0.00
21	2	2	0.00
22	5	5	0.00
23	4	4	0.00
24	4	4	0.00
25	2	2	0.00
26	5	5	0.00
27	5	5	0.00
28	2	2	0.00
29	4	4	0.00
30	3	3	0.00
31	4	4	0.00
32	4	4	0.00
33	7	7	0.00
34	2	3	50.00
35	5	6	20.00
36	4	5	25.00
37	7	7	0.00
38	9	9	0.00
39	7	7	0.00
40	4	3	25.00
41	3	2	33.33
42	5	5	0.00
43	2	0	100.00
44	7	9	28.57
45	2	2	0.00
46	6	5	16.67
47	6	5	16.67
48	13	17	30.77
49	6	6	0.00
50	7	8	14.29
51	5	5	0.00
52	9	9	0.00
53	8	8	0.00
54	11	12	9.09
55	14	14	0.00
56	0	6	0.00
57	5	5	0.00
58	8	8	0.00
59	15	17	13.33
60	12	13	8.33
61	5	6	20.00
62	16	16	0.00
63	12	12	0.00
64	7	7	0.00
65	14	15	7.14
66	8	8	0.00
67	1	1	0.00
68	1	0	100.00
69	6	6	0.00
70	7	7	0.00
71	12	11	8.33
72	4	4	0.00
73	6	6	0.00
74	2	2	0.00
75	4	4	0.00

Cuadro No. 12 Comparación del total de espermatozoides por imagen del paciente III.

Foto #	Laboratorio	Software	Porcentaje de error
1	17	17	0.00
2	17	17	0.00
3	15	14	6.67
4	17	16	5.88
5	21	21	0.00
6	6	6	0.00
7	5	5	0.00
8	5	6	20.00
9	10	11	10.00
10	10	11	10.00
11	10	10	0.00
12	11	10	9.09
13	10	11	10.00
14	8	8	0.00
15	8	8	0.00
16	9	10	11.11
17	8	8	0.00
18	4	4	0.00
19	6	6	0.00
20	6	6	0.00
21	13	13	0.00
22	13	11	15.38
23	10	11	10.00
24	17	16	5.88
25	12	12	0.00
26	6	6	0.00
27	9	8	11.11
28	13	13	0.00
29	9	8	11.11
30	8	8	0.00
31	7	7	0.00
32	11	11	0.00
33	8	8	0.00
34	10	11	10.00
35	6	6	0.00
36	7	7	0.00
37	7	7	0.00
38	8	8	0.00
39	5	5	0.00
40	7	7	0.00
41	11	11	0.00
42	11	11	0.00
43	6	6	0.00
44	11	12	9.09
45	11	11	0.00
46	13	14	7.69
47	5	5	0.00
48	14	14	0.00
49	7	6	14.29
50	15	16	6.67
51	8	8	0.00

Cuadro No. 13 Comparación del total de espermias fragmentados por imagen del paciente III.

Foto #	Laboratorio	Software	Porcentaje de error
1	2	2	0.00
2	2	2	0.00
3	0	0	0.00
4	1	1	0.00
5	1	1	0.00
6	0	0	0.00
7	2	2	0.00
8	0	0	0.00
9	0	0	0.00
10	0	0	0.00
11	1	1	0.00
12	3	3	0.00
13	1	1	0.00
14	1	1	0.00
15	1	0	100.00
16	0	0	0.00
17	1	0	100.00
18	0	1	0.00
19	0	0	0.00
20	0	0	0.00
21	0	0	0.00
22	1	0	100.00
23	0	0	0.00
24	1	0	100.00
25	1	0	100.00
26	1	2	100.00
27	2	4	100.00
28	2	2	0.00
29	2	2	0.00
30	1	2	100.00
31	1	1	0.00
32	2	8	300.00
33	1	1	0.00
34	0	0	0.00
35	1	1	0.00
36	1	1	0.00
37	0	0	0.00
38	1	1	0.00
39	2	2	0.00
40	2	1	50.00
41	0	0	0.00
42	0	0	0.00
43	0	0	0.00
44	1	1	0.00
45	2	2	0.00
46	0	0	0.00
47	2	2	0.00
48	2	2	0.00
49	1	1	0.00
50	1	1	0.00
51	1	0	100.00

Cuadro No. 14 Comparación del total de espermias no fragmentados por imagen del paciente III.

Foto #	Laboratorio	Software	Porcentaje de error
1	15	15	0.00
2	15	15	0.00
3	15	14	6.67
4	16	15	6.25
5	20	20	0.00
6	6	6	0.00
7	3	3	0.00
8	5	6	20.00
9	10	11	10.00
10	10	11	10.00
11	9	9	0.00
12	8	7	12.50
13	9	10	11.11
14	7	7	0.00
15	7	8	14.29
16	9	10	11.11
17	7	8	14.29
18	4	3	25.00
19	6	6	0.00
20	6	6	0.00
21	13	13	0.00
22	12	11	8.33
23	10	11	10.00
24	16	16	0.00
25	11	12	9.09
26	5	4	20.00
27	7	4	42.86
28	11	11	0.00
29	7	6	14.29
30	7	6	14.29
31	6	6	0.00
32	9	3	66.67
33	7	7	0.00
34	10	11	10.00
35	5	5	0.00
36	6	6	0.00
37	7	7	0.00
38	7	7	0.00
39	3	3	0.00
40	5	6	20.00
41	11	11	0.00
42	11	11	0.00
43	6	6	0.00
44	10	11	10.00
45	9	9	0.00
46	13	14	7.69
47	3	3	0.00
48	12	12	0.00
49	6	5	16.67
50	14	15	7.14
51	7	8	14.29

Cuadro No. 15 Comparación del análisis del laboratorio y el análisis por software para el paciente II.

Especificaciones	Laboratorio	Matlab	Porcentaje de error	Porcentaje de aceptación
Total	491	507	3.26	96.74
Fragmentados	65	63	3.08	96.92
No fragmentados	426	444	4.23	95.77
Porcentaje de Fragmentación	12.4260355	13.23828921	6.54	93.46
Potencial	Excelente	Excelente	-	-

Cuadro No. 16 Comparación del análisis del laboratorio y el análisis por software para el paciente III.

Especificaciones	Laboratorio	Matlab	Porcentaje de error	Porcentaje de aceptación
Total	493	502	1.83	98.17
Fragmentados	47	52	10.64	89.36
No fragmentados	446	450	0.90	99.10
Porcentaje de Fragmentación	9.53346856	9.580838323	0.50	99.50
Potencial	Excelente	Excelente	-	-

Cuadro No. 17. Confiabilidad de resultados del programa implementado.

Descripción	Porcentaje de error	Porcentaje de aceptación
Total de espermas	3.59	96.41
Espermas fragmentados	6.27	93.73
Espermas no fragmentados	3.63	96.37
Índice de fragmentación espermática	2.54	97.46
Programa en general	4.01	95.99

Figura No. 43 Halos de espermias juntos.

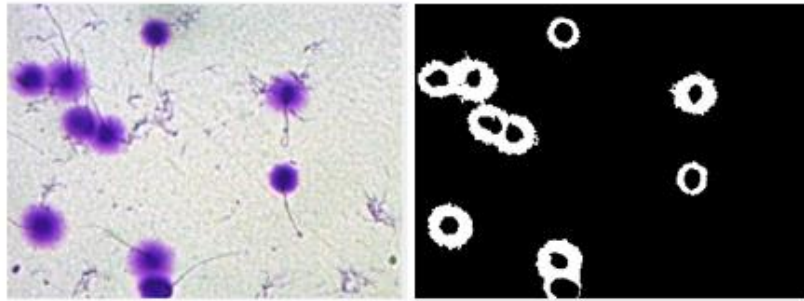


Figura No. 44 Manchas en el ambiente.

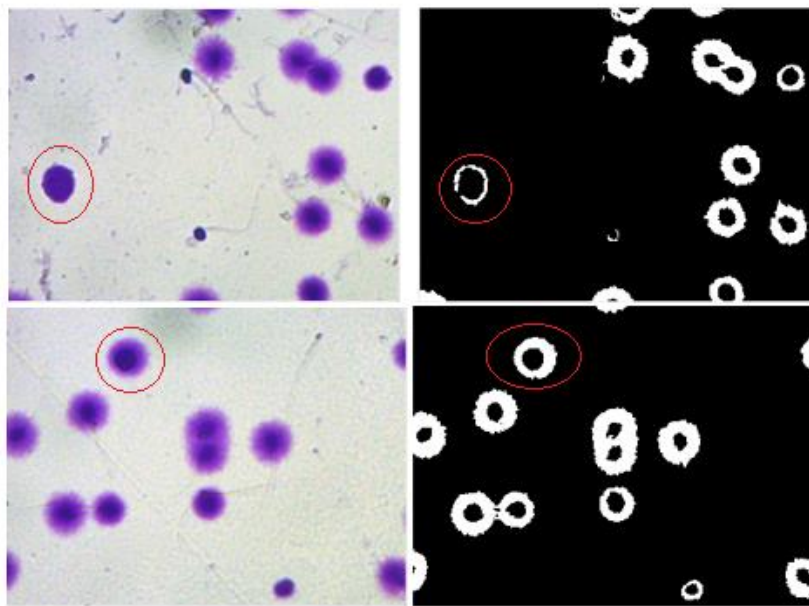


Figura No. 45 Grupos grandes de espermas.

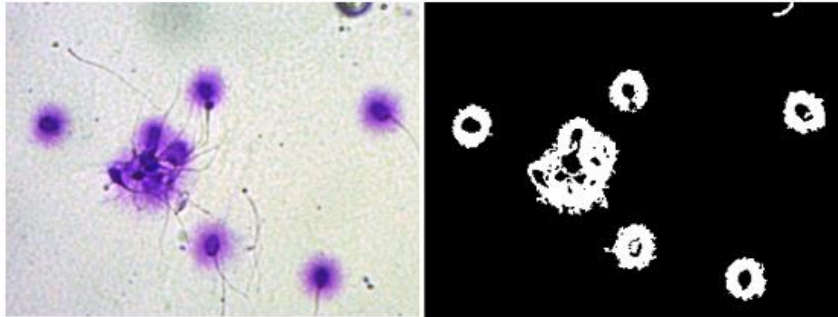
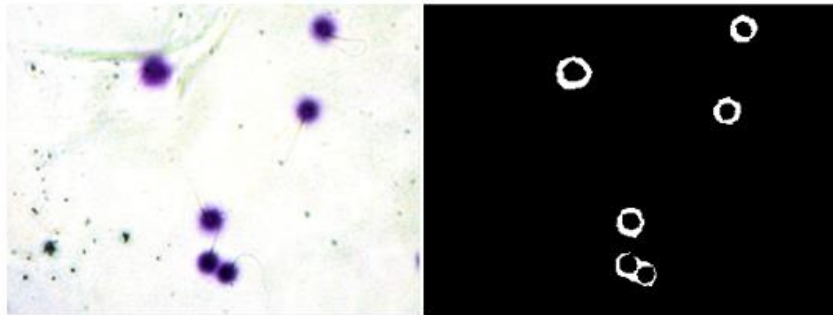


Figura No. 46 Error humano.



VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El presente estudio se implementó para un paciente del cual se contaba con 54 fotografías, las cuales presentaban en conjunto un conteo mayor a los 500 espermias, habiendo suficiente data como para validar los resultados. El primer análisis que se realizó para el set de datos fue en el laboratorio de fertilización in vitro, donde el conteo se llevó a cabo de forma manual utilizando únicamente un estereoscopio y los criterios de clasificación mencionados con anterioridad (Figura No.4).

En el cuadro No.3 se aprecian los resultados del análisis brindado por el laboratorio, el cual indica que se contó un total de 545 espermias en donde 59 tienen el ADN fragmentado, dando como resultado un índice de fragmentación del 10.83% el cual indica que el paciente tiene un excelente potencial fecundante.

El segundo análisis se llevó a cabo por medio del procesamiento de imágenes implementado en Matlab, en la Figura No.38 se observa la interfaz gráfica que permite seleccionar la carpeta de fotografías con extensión .jpg que se desean analizar, cuenta con un área que permite seleccionar una imagen específica para ver el resultado de forma gráfica y numérica ya que al final tiene una tabla en donde muestra los resultados para cada imagen y también muestra un resumen de los resultados de toda la muestra.

Los resultados obtenidos con esta herramienta se muestran en la Figura No.39, con esta se contó un total de 514 espermias de los cuales 56 resultaron fragmentados y 458 se encontraron sin fragmentación, esto da lugar a un índice de fragmentación del 10.89% e indica que el paciente tiene un excelente potencial fecundante.

Para verificar el porcentaje de error del algoritmo que se implementó, se utilizó como base teórica el conteo hecho en el laboratorio. Como resultado se obtuvo un porcentaje de error del 5.69% para el total de espermias contados, 5.08% para el número de fragmentados, 5.76% para los espermias no fragmentados, 0.55% en el cálculo del índice de fragmentación y finalmente se coincidió que el paciente cuenta con un excelente potencial (Cuadro No.4).

El resultado obtenido mediante el procesamiento de imágenes es bastante cercano al análisis realizado por el laboratorio, como se puede ver en el conteo total de espermatozoides, la detección de espermatozoides fragmentados y no fragmentados tienen un porcentaje de aceptación mayor al 94%. Aunque el análisis realizado por Matlab haya tenido un conteo menor al realizado por el laboratorio, se mantuvo la misma proporción de fragmentación, por lo que el índice de error se encuentra dentro de lo aceptable.

Además de comparar los resultados de la muestra total del paciente, también se comparó el conteo de espermatozoides, la detección de espermatozoides fragmentados y no fragmentados para cada una de las fotos (Cuadro No.5, 6 y 7). Para cada uno de estos se determinó la media y la desviación estándar del porcentaje de error obtenido. Para el conteo total de espermatozoides por foto se obtuvo una media de 3.81%, para la detección de espermatozoides fragmentados se obtuvo un 25.76% y para no fragmentados un 11.02%. El Cuadro No.7 contiene los datos estadísticos ya mencionados, en éste se puede notar que la media y la desviación estándar más alta corresponde a la detección de espermatozoides fragmentados.

Los resultados observados se deben a la cantidad de espermatozoides fragmentados en cada imagen, los porcentajes de error son altos y varían mucho ya que en cada imagen se puede encontrar desde cero hasta cuatro espermatozoides fragmentados. Con un valor máximo tan pequeño, cualquier variación resulta ser de mucha significancia obteniendo porcentajes de error de hasta el 200%.

Para poder visualizar los resultados se realizó un gráfico de dispersión de puntos para la detección de espermatozoides por imagen (Figura No.40), espermatozoides fragmentados (Figura No.41) y espermatozoides no fragmentados (Figura No. 42). Como se puede notar, los resultados obtenidos con Matlab para el total de espermatozoides por imagen y espermatozoides no fragmentados se apegan bastante al resultado del laboratorio, en cuanto a la detección de espermatozoides fragmentados se pueden ver cambios muy bruscos en donde se hace notar la desviación estándar que existe entre los datos debido al tamaño de muestra analizada, pero a pesar de eso el resultado se considera correcto ya que en general determina que el índice de fragmentación del paciente es de 10.89% con una aceptación de 99.45%.

El resultado obtenido tiene un porcentaje de aceptación casi perfecto, pero es importante resaltar que el estudio se probó inicialmente con las muestras de un solo paciente, esto podría dar lugar a que éste no se pueda replicar para otras personas. Por lo tanto, para comprobar que el algoritmo no se apegó únicamente a la muestra de un paciente se hizo el estudio de dos pacientes más.

Los cuadros No. 9 a 11 contienen el análisis por foto del paciente II, como se puede notar la muestra es más grande en comparación al primer paciente, siendo esta de 75 fotos debido a que la población de espermatozoides por foto es muy baja. En el Cuadro No.15 se muestran los porcentajes de aceptación, siendo el más alto de 96.92% para el conteo de espermatozoides fragmentados y el más bajo es de 93.46% para el cálculo del índice de fragmentación espermática.

Los cuadros No. 12 a 14 contienen el análisis por foto del paciente III, el tamaño de esta muestra es muy parecida a la del paciente I en cuanto a cantidad de fotos. En el Cuadro No.16 muestra los porcentajes de aceptación, siendo el más alto de 99.10% para el conteo de espermias no fragmentados y el más bajo es de 89.36% para el conteo y clasificación de espermias fragmentados.

Tomando en cuenta los resultados de cada paciente y los resultados generales del programa (Cuadro No.17), se debe admitir que los resultados fueron un éxito ya que los porcentajes de error están dentro de lo previsto en los objetivos de este estudio ya que todos se encuentran por arriba del 90% de aceptación.

Como se puede observar en los resultados, utilizar el método del umbral combinado con el espacio de color Lab fue bastante positivo ya que permitió detectar los espermias de forma muy acertada sin utilizar algoritmos muy complejos, lo que permite que se pueda replicar de forma fácil en otros ambientes de programación y calibrarlo para otras muestras en dado caso no sea una solución universal como se expresó anteriormente.

El mayor problema que se detectó fue en el análisis de espermias fragmentados, obteniendo un 93.73% de aceptación en el rendimiento general del programa y esto pudo deberse a varios factores en las muestras de los tres pacientes. Como primer lugar se tiene falsos positivos y falsos negativos que se pueden observar en la Figura No.41. Al ver detalladamente los distintos casos de error que se dieron, se logra determinar que los falsos positivos se dan a causa de manchas en la muestra (Figura 44) y esto es muy ambiguo ya que podría ser una mancha debido a su gran tamaño o bien podrían ser espermias con defectos de morfología. Por otro lado, se tiene a los falsos negativos los cuales se pueden dar al momento de tener un espermia fragmentado muy cerca de un espermia no fragmentado en donde se juntarían sus halos y da lugar a una mala interpretación por parte del programa, esto se puede verificar en la Figura 43 en donde se ven varios espermias con sus respectivos halos de forma que estos se juntan e impide identificar el tamaño real de cada uno de ellos. Otra de las complicaciones encontradas al realizar el estudio fueron los grupos con gran cantidad de espermias y que se encontraban muy cerca, como es el caso de la Figura 45, para evitar que el estudio se alterara demasiado se optó por eliminar la toma de fotos en regiones como esta, ya que es imposible realizar un conteo tanto de forma manual como para el software. También se encontró el caso de la Figura 46 en donde se muestra el error humano, dando un punto a favor del análisis por software ya que este es capaz de encontrar en donde termina el área del espermia y en donde empieza el halo, mientras que al hacerlo a simple vista es muy difícil por cuestiones de pigmentación.

Estos problemas de conteo se acarrearán al resto del conteo ya que por lógica si se cuenta un espermia de forma errónea altera todos los conteos y los resultados. Estos errores trabajaron de forma sistematizada ya que los falsos positivos se contrarrestaban con los falsos negativos, es por esto que los porcentajes de error salieron tan bajos, ya que los mismos errores se compensaron. Este mismo fenómeno se percibió también para el conteo de espermias no fragmentados y por ende en el conteo total.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se determinó que el método de umbrales combinado con el modelo de color Lab es un algoritmo simple y acertado al realizar el procesamiento de imágenes microscópicas para la detección de fragmentación en el ADN espermático, ya que permite segmentar y acentuar las características distintivas de los espermias y sus halos.
2. Por medio de la utilización de los algoritmos mencionados, se logró identificar espermias en las imágenes de muestra con una certeza del 96.41%.
3. Se logró diferenciar los espermias con halos y sin halos de color con una certeza mayor a 92% utilizando los umbrales que mejor destacaron dichas características.
4. Mediante ecuaciones matemáticas y relación de diámetro halo-esperma se determinó una proporción representativa al criterio de clasificación espermática utilizada en el laboratorio, con la cual se logró determinar la cantidad de espermias fragmentados y no fragmentados con una certeza del 93.73% y 96.37%.
5. Mediante el procesamiento de imágenes se logró detectar el índice de fragmentación espermática de un paciente con una certeza del 97.46%.

IX. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda utilizar una cámara microscópica con resolución mayor o igual a 5MP.
2. Se recomienda realizar la toma de muestras fotográficas con un campo de visión de 40x para reducir el ruido y mejorar la visibilidad de los espermatozoides.
3. Se recomienda realizar este análisis con otros algoritmos más complejos que permitan mejorar el estudio reduciendo los falsos positivos y falsos negativos.
4. Se recomienda diversificar las muestras con más de un paciente para poder determinar los resultados de forma más congruente y concluir de una forma más general.

X. BIBLIOGRAFÍA

Alice Longobardi. 2001. «Flow Cytometry: First Principles.». *SciTech Book News*. Segunda Edición: ISSN: 978-0-471-38224-9.

Atienza, Vicente. 2011. *El histograma de una imagen digital*. Tesis Universidad Politécnica de Valencia, España.: Fondo de Cultura Económica. 109 págs.

Benito, Darío. 2005. *Detección Automática del color de la piel en imágenes bidimensionales basado en el análisis de regiones*. Tesis Universidad Rey Juan Carlos, España.: Fondo de Cultura Económica. 56 págs.

Cortés Osorio, *et al.* 2011. «Técnicas Alternativas Para la Conservación de Imágenes a Color a Escala de Grises en el Tratamiento Digital de Imágenes». *Revista Scientia Et Technica*.207-212.

Dpreview Fujifilm. *RGB histogram*. <https://www.dpreview.com/forums/post/50801193> [26-07-2017].

EcuRed. *Modelo HSV*. https://www.ecured.cu/Modelo_HSV. [17-08-2017].

Golden Lab. *SpermFunc DNAf-Kit for determination of DNA fragment in spermazotoa*. <http://goldenlab.co.id/SpermFunc%20DNA%20Fragmentation%20kit.html> [15-08-2017].

Góngora, Alfredo y D. Fontanilla. 2010. «The Influence of sperm DNA fragmentation on assisted reproduction techniques and embryo quality». *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. Vol.61 No.2: 160-164.

Instituto Bernabeu. *Parámetros de Calidad Seminal según la Organización Mundial de la Salud*. <https://www.institutobernabeu.com/foro/2012/09/07/calidad-seminal-segun-la-organizacion-mundial-de-la-salud-oms/> [15-07-2017].

Mathworks. *Image Processing Toolbox*. <http://es.mathworks.com/products/image/features.html>. [1-10-2017].

Matlab Typ. *Conversión de imagen a escala de grises*. <http://matlab-typ.blogspot.com/2016/08/convertir-una-imagen-escala-de-grises.html> [26-07-2017].

Mekala Bhaskar; P. Rajashekar y V. Amarnadh. 2012. «Evaluation of Stopping Criterion in Contour Tracing Algorithms.». *International Journal of Computer Science and Information Technologies*. Vol.3 No.3: ISSN: 0975-9646.

Platero, Carlos. 2010. «Técnicas de procesado». *Revista Visión Artificial*. Vol.61 No.2: 115-150.

Quintero, Gabriela; R. Bermúdez y J. Castillo. 2015. «Infertilidad Masculina y Fragmentación del ADN espermático: Un Problema Actual.». *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. Vol.18 No.2: 144-152.

Rajeev SK, Reddy KV. 2004. *Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen*. *Hum Reprod*. 19: 234-242

Real Academia Española. *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?w=diccionario>. [1-10-2017].
Illán, Morales. *Electroforesis*. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Exposicion_electroforesis_5087.pdf. [1-10-2017].

Rodrigo, Andrea. *La calidad del esperma: cómo se mide y qué podemos hacer para mejorar*. <https://www.reproduccionasistida.org/calidad-seminal/#valores-normales-de-calidad-espermatologica> [15-07-2017].

Rodríguez, Francisco. 2002. «Fundamentos de Procesamiento de imágenes». Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Tijuana. 50 págs.

Valero, Antonio. 2013. *Principios de color y holopintura*. Alicante: Editorial Club Universitario. 418 págs.

XI. ANEXOS

A. ESPECIFICACIONES SOBRE TRATAMIENTO SpermFunc DNAf.

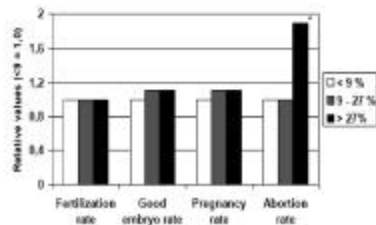


SpermFunc® DNAf - Kit for Determination of the DNA Fragmentation Level in Spermatozoa (Sperm Chromatin Dispersion Method)

It was reported that the rate of abortion caused by sperm DNA fragmentation was higher than other factors in the process of IVF or ICSI treatment.

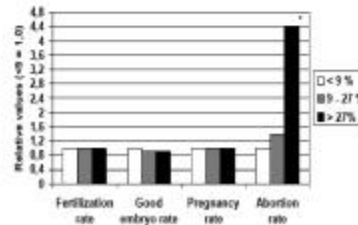


DNA fragmentation index and IVF



Adapted from Lin MH et al. 2009

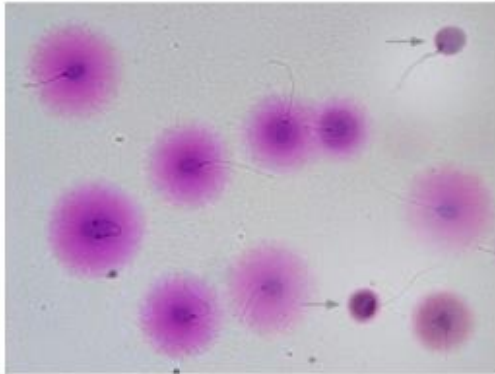
DNA fragmentation index ICSI



Adapted from Lin MH et al. 2009

Studies have shown that sperm DNA fragmentation may result from the aberrant assembly of chromosome and excessive production of reactive oxygen species (ROS) or pathological apoptosis. Fertilization by fragmented -DNA sperm may cause sterility, habitual abortion and lower pregnancy rate in Assisted Reproductive Technology (ART) treatment.

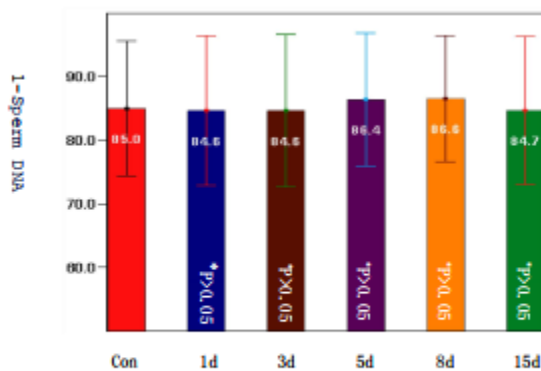

BRED Life Science
SpermFunc® DNAf test results:



The Pre-coated slides with thicker gel coat are good for sperm chromatin dispersion, improving the sensitivity.

Features:

- Using the optimizational method, the results of testing are more specific, and have the distinct configuration of sperm tail, easy to identify.
- Various appliances outfitted in the kit, easy to operate.
- Quick operating within one hour, the result is observed under the ordinary microscope without any other special instrument, easy to apply in clinic.
- 40T/Kit. Economical price but more efficient than the competitive products in the market.
- Made by the special advanced technics, the reagents are stable and reliable with a shelf life of two years.
- The unique preservable technology for specimen makes it possible that the specimen stored for at least 15 days, which can reproduce results as the fresh one. It is great for testing in batch in clinic.
- CE approved



The integrity transformation of sperm DNA fragmentation stored in SpermFunc® DNAf preservative fluid (n = 10)

B. ESPECIFICACIONES DE CÁMARA AmScope MA500-CK.



Specifications:

- Image Sensor: 1/2.5" Color CMOS (Micron)
- Pixel Size: 2.2 micron x 2.2 micron
- Hardware Resolution: 2592x1944 pixels
- Imaging Resolution: 5.0 MP
- File Format: BMP, TIFF, JPG and others
- Frame Rate: 30 f/s @ 640x480, 8 f/s @ 2592x1944 pixels
- Sensitivity: 0.53V/lux-sec @ 550nm
- Speed: Low/high adjustable
- White Balance: Auto/Manual
- Exposure Time: 1ms to 0.3s
- Exposure Control: Auto/Manual
- Scan Mode: Progressive
- Shutter: Electronic Rolling Shutter
- S/N Ratio: 40.5 dB
- Dynamic Range: 60 dB
- Filter: RGB Bayer Pattern
- Parameter: Gain (1~40), Gamma (0.1~2.50)
- Mount: 23mm Photo Port, C CS-Mount (Ring Adapter Included)
- Camera Body: Cast Aluminum
- Power Supply: Via USB 2.0 connector
- System Required: Windows 2000/XP/Vista/7/8 and Mac OS 10.6 & up with USB 2.0 port
- Dimension: 2.5" x 3-3/8" x 1-7/16" (65 x 86 x 37 mm)
- Net Weight: 0.48 lbs (220g)
- Shipping Weight: 2 lbs

http://www.amscope.com/5-0mp-microscope-digital-camera-compatible-w-windows-mac-os-4-scale-calibration-kit.html#product_tabs_description_tabbed

XII. GLOSARIO

- Citometría
Es el análisis mediante microscopio las propiedades y características de las células (Longobardi, 2001).
- Electroforesis
Técnica de desplazamiento o separación de sustancias mediante la acción de un campo magnético o mediante el fenómeno de electroforesis (Morales, 2017).
- Estereoscopio
Aparato de visión de imágenes que produce una sensación de relieve al observar con ambos ojos debido a la diferencia de ángulo que existe en cada ojo (RAE, 2017).
- Fragmentación
División en partes o fragmentos (RAE, 2017).
- Microscopio
Instrumento que permite observar objetos muy pequeños (RAE, 2017).
- Umbralización
Es una técnica muy utilizada en la segmentación de imágenes, esta se emplea cuando existe una diferencia entre los objetos a extraer respecto del fondo (Rodríguez, 2002).