

# Segmentación y descripción automática de espermatozoides humanos a partir de imágenes

Hendry Ferreira<sup>1</sup>, Roberto Casañas<sup>2</sup>, Esmeralda Ramos<sup>1</sup>, Victor Fernández<sup>2</sup>,  
Haydemar Núñez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Inteligencia Artificial, Centro de Ingeniería de Software y Sistemas,  
Escuela de Computación, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela  
hendryferreira@yahoo.com, haydemar.nunez@ciens.ucv.ve,  
esmeralda.ramos@ciens.ucv.ve

<sup>2</sup> Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela  
robertoc@med.ucv.ve, fernandesv@med.ucv.ve

**Abstract.** The morphological analysis of human sperm is a complex test, with high variability and difficulty in replicating results. In order to support health professionals in this activity would be useful to automate this process. This paper presents a human spermatozoa segmentation algorithm from digital images. Samples were prepared to maintain the working conditions of the experts. The algorithm uses classic tools of image processing. In addition, a proposal for a new texture operator is presented. To characterize the heads of sperm segmented ten features similar to those suggested by the World Health Organization were used. The results suggest the possibility of obtaining a robust product that automates this process.

**Keywords.** Sperm morphology, image segmentation, texture operator, feature extraction.

## 1 Introducción

El Análisis de Líquido Seminal (ALS) es un examen que proporciona información para la evaluación del aparato reproductor masculino. Éste consiste de un conjunto de pruebas macroscópicas y microscópicas que se realizan a una muestra de semen para determinar su estado general y potencial fertilizante [7]. Las pruebas macroscópicas determinan características como aspecto, color, licuefacción, volumen, viscosidad y pH del eyaculado, mientras que las microscópicas evalúan la concentración, motilidad, vitalidad aglutinación, agregación y morfología espermática. Particularmente, esta última provee información valiosa para los procedimientos de reproducción asistida [5].

La evaluación morfológica es una actividad que requiere pericia, tiempo y esfuerzo por parte del experto que la realiza, ya que éste debe observar, a través de un microscopio, un número determinado de espermatozoides y clasificarlos según sus características morfológicas. Se trata de un procedimiento vulnerable a la subjetividad de los profesionales, difícil de enseñar, con gran variabilidad y complicación para replicar los resultados [4]. Estos inconvenientes hacen que en la práctica sea deseable

automatizar este proceso, de tal forma que se puedan proveer herramientas de apoyo a la clasificación morfológica a partir de imágenes digitalizadas.

Por esta razón resulta pertinente investigar: ¿Cómo identificar o segmentar los espermatozoides en la imagen? ¿Qué características extraer y cómo, para describir morfológicamente a los espermatozoides segmentados? En este trabajo se intenta dar respuesta a estas interrogantes a través del desarrollo de algoritmos de segmentación y de extracción de características a partir de imágenes.

La organización de este documento es la siguiente: en la Sección 2 se presentan los conceptos básicos del análisis morfológico espermático humano y algunos antecedentes; en la Sección 3, se describen los algoritmos propuestos para la segmentación de los espermatozoides en las imágenes. La extracción de las características a partir de las estructuras segmentadas se presenta en la Sección 4. Finalmente, se presentan las conclusiones y los trabajos futuros.

## **2 Análisis de la morfología de espermatozoide humano**

Para realizar el análisis morfológico, el profesional de la salud prepara la muestra siguiendo las instrucciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [9]. A continuación, la coloca en el microscopio y ubica, identifica y cuenta manualmente los espermatozoides presentes hasta contabilizar doscientos. Para esto, utiliza una técnica de desplazamiento en forma de “S” sobre la escena con el fin de evitar el recuento de una misma estructura, y registra en cuatro contadores manuales la categoría asignada: normal, defecto de cabeza, de pieza intermedia o cuello y de cola.

Los espermatozoides morfológicamente normales se caracterizan por tener: a) cabeza ovalada, única y lisa, acrosoma ocupando entre el 40% y el 70% del área total de la cabeza, 4-5  $\mu\text{m}$  de longitud, 2.5-3.5  $\mu\text{m}$  de ancho, si hay vacuolas, no deberán ocupar más de la mitad del área de la cabeza; b) cuello estrecho, unido axialmente y alineado con la cabeza, sin restos citoplasmáticos y con una longitud inferior a 1/3 de la cabeza; y c) cola uniforme, única, desenrollada, 45  $\mu\text{m}$  de longitud, ligeramente más estrecha que el cuello y sin residuos citoplasmáticos [9].

El solapamiento de estructuras biológicas, los precipitados de la tinción y la variabilidad morfológica de los espermatozoides, dificultan la evaluación de la morfología espermática y, aún cuando se sigan los protocolos establecidos, las clasificaciones son muy complicadas y subjetivas; esto puede producir diferencias de hasta un 7% entre los resultados obtenidos por distintos profesionales sobre la misma muestra, según expertos de los Centros de Salud participantes en esta investigación. Por estas razones, sería de gran ayuda contar con herramientas automatizadas de análisis y clasificación que apoyen la evaluación morfológica.

Son variadas las investigaciones que abordan la evaluación automática de la morfología de los espermatozoides, tanto de humanos como de otras especies. Por ejemplo, en [6] se utiliza una red neuronal con vectores de características obtenidos mediante descriptores de Fourier y reportan un margen de error del 25%; los autores indican que esta diferencia es equivalente a los errores cometidos por los profesionales. En [1], clasifican la morfología espermática de cabezas de espermatozoides de verracos, usando redes neuronales y descriptores basados en

momentos de Hu y Zernike; no reportan el error cometido durante el proceso de clasificación. Otras aproximaciones de solución a este mismo problema, utilizando descriptores de textura y el algoritmo de k-vecinos más cercanos, aparecen en [11], donde reportan una tasa de aciertos “no muy alta” y se indica que los descriptores de textura resultan más efectivos que los descriptores geométricos.

En [2], utilizan el algoritmo *Learning Vector Quantization* para clasificar cabezas de espermatozoides de jabalíes. El preprocesamiento de las imágenes considera la segmentación de la cabeza y la normalización por brillo, contraste y tamaño. La tasa de error reportada en este proceso fue del 20%. Por otra parte, en [3] se presenta la clasificación de las estructuras mediante la conversión entre píxeles y micrómetros, comparando los valores con los rangos descritos como normales por la OMS. Los resultados indican una tasa de acierto de 89,5% para cabezas; sin embargo, el procedimiento utilizado requiere de un factor de magnificación de 600X (por lo general los expertos utilizan 100X) y resolución de 3072x2304. Por esta razón, las imágenes utilizadas en las pruebas correspondieron a escenas que en promedio contenían 1 ó 2 espermatozoides, lo que en la práctica convierte a este procedimiento en semi-automático, ya que la captura funciona como una segmentación inicial.

Se puede observar que la automatización de la clasificación morfológica de espermatozoides es un área de investigación activa y compleja, cuyos productos se sitúan en varios niveles de análisis, entre los cuales figuran el método para identificar las estructuras y la forma cómo se determina el conjunto de características que describan a las células espermáticas.

### **3 Segmentación de los espermatozoides en la imagen**

En este estudio se utilizaron 12 láminas de muestras de semen preparadas siguiendo los procedimientos convencionales de tinción. Las imágenes digitales se capturaron en formato JPEG con una cámara Canon Power Shot S50, resolución de 1600x1200 píxeles, a través de un microscopio Leica modelo DMLS2, y manteniendo las condiciones de iluminación y aumento utilizadas por el experto (objetivo de 100X). Se capturaron imágenes (escenas) suficientes para alcanzar la cantidad de 200 espermatozoides por lámina (criterio de la OMS). La cantidad de escenas osciló entre 6 y 44, dependiendo de la concentración espermática.

Como primer paso se analizó el histograma de cada canal R, G y B, detectándose que los canales rojo y verde aportaban más información. Una vez convertida la imagen original a escala de grises, se aplicó umbralización a dos niveles sobre la imagen del canal rojo, utilizando un umbral calculado a partir del método de Otsu [8]. La imagen binarizada resultante permitió construir una primera estructura matricial denominada Máscara del Área de Procesamiento (MAP), la cual cumple la función de delimitar la región a procesar (Figura 1).

A continuación, se describen los principales pasos del procesamiento digital de imágenes, que permitieron la definición de otras estructuras de datos matriciales.

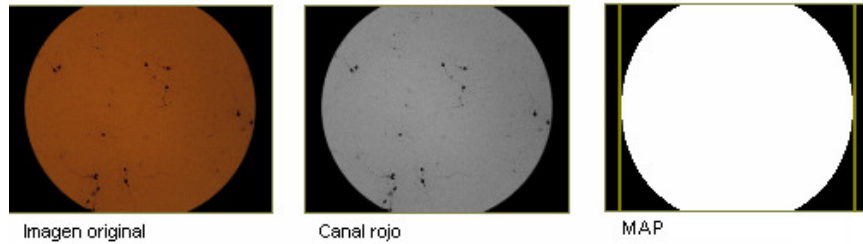


Fig. 1. Máscara del Área de Preprocesamiento

### 3.1 Construcción de la Máscara de Cabezas de Espermatozoides (MCE)

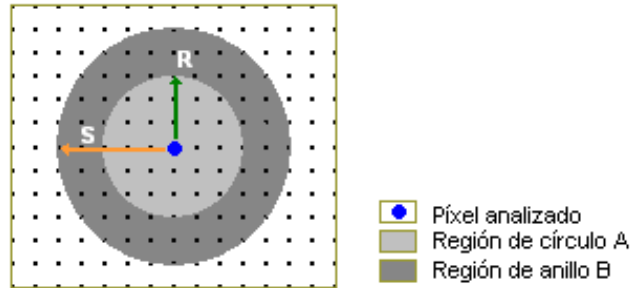
Esta estructura almacena las regiones que podrían corresponder a cabezas de espermatozoides. Para construirla se aplicó el algoritmo de búsqueda en profundidad (DFS) sobre la imagen binarizada del canal rojo. Se descartaron las regiones con dimensiones inferiores a 18x18 píxeles o superiores a 55x55 píxeles (valores calculados de manera heurística), por considerar que no correspondían a estructuras de interés. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de la MCE. El cuadro izquierdo corresponde al canal rojo; se puede observar que la pequeña mancha presente en el cuadro intermedio fue removida en el cuadro derecho.



Fig. 2. Construcción de la Máscara de Cabezas de Espermatozoides.

### 3.2 Construcción de la Máscara de Núcleo de Círculo y Anillo (MNCA)

Para lograr la separación de estructuras que pudieran estar en contacto, se construyó un nuevo operador de textura el cual se define a partir de dos regiones (ver Figura 3). La región “A” está conformada por un círculo de radio  $R$  centrado en el píxel de interés y la “B” por un anillo con radio interno  $R$  y radio externo  $S$ ; la estructura resultante se denominó Núcleo de Círculo y Anillo (NCA). La segmentación se logró mediante el conocimiento heurístico de que los espermatozoides son más oscuros que el fondo, de modo que si el promedio de las intensidades de “A” es menor el de “B”, al píxel central se le asigna el valor 1, en caso contrario se le asigna el valor 0.



**Fig. 3.** Propuesta de Núcleo de Círculo y Anillo

La aplicación del NCA a la imagen en escala de grises correspondiente al canal verde, permitió una mejor separación de los espermatozoides. Como resultado, se construyó una nueva estructura matricial a la que se denominó Máscara de Núcleo de Círculo y Anillo (MNCA), que almacena las regiones que corresponden a posibles espermatozoides (cabeza, cuello y cola). La MNCA se construye realizando dos operaciones: primero se binariza utilizando el NCA con parámetros R y S, de 3 y 5 píxeles, respectivamente; luego, se remueven las regiones con dimensiones inferiores a 25x25 píxeles (estimado de manera heurística) utilizando DFS. La Figura 4 muestra un ejemplo de MNCA. Puede observarse en el cuadro intermedio que este procedimiento resalta algunas regiones del fondo producto de pequeñas variaciones uniformes en la intensidad de gris; éstas no corresponden a espermatozoides y son removidas aplicando el criterio heurístico (cuadro derecho).



**Fig. 4.** Máscara de Núcleo de Círculo y Anillo

### 3.3 Construcción de la Máscara de Contornos de Espermatozoides (MCOE)

Las estructuras MCE y MNCA, almacenan información complementaria acerca de la ubicación y forma de los espermatozoides respectivamente. No obstante, la MCE presenta errores típicos del algoritmo de umbralización a dos niveles que pueden ser corregidos con la información que guarda la MNCA. Para ello, se construyó la

Máscara de Contornos de Espermatozoides (MCOE), la cual mantiene los contornos de las regiones presentes en la MNCA.

El procedimiento se lleva a cabo en tres pasos. Primero, se aplica la operación de convolución sobre la MNCA utilizando el núcleo horizontal, vertical y diagonal de Prewitt de 3x3 (en ambos sentidos) para detectar contornos [10]; a la imagen resultante, se le aplica erosión, y finalmente DFS para eliminar las regiones de la imagen cuyas dimensiones sean inferiores a 25x25 píxeles, ya que corresponden a algunos contornos internos de la cabeza del espermatozoide. En la Figura 5 se muestra, de izquierda a derecha, los pasos descritos para construir la estructura MCOE.

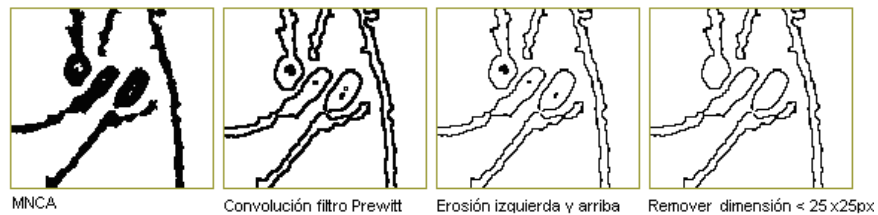


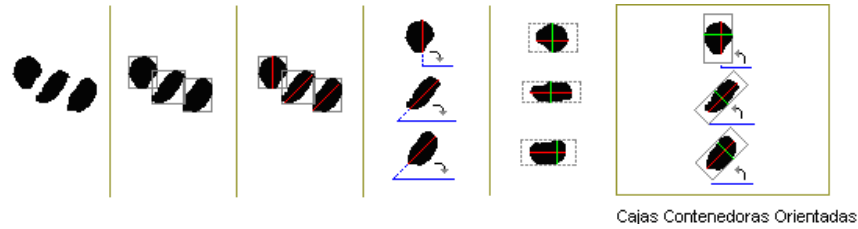
Fig. 5. Construcción de la Máscara de Contornos de Espermatozoides

### 3.4 Extracción de las Cajas Contenedoras Orientadas (CCO)

Una vez que se dispone de las estructuras MCE y MCOE se aplica el operador morfológico XOR entre ambas. En la imagen resultante, se remueven tanto las regiones que contengan menos de 200 píxeles, como aquellas que no son intersecadas por la MNCA. Este procedimiento facilita la depuración y separación de las cabezas de los espermatozoides que se hallan en contacto (Figura 6). Durante la aplicación de DFS para la remoción de las regiones pequeñas, se debe tomar la precaución de guardar los límites (izquierdo, derecho, superior e inferior) de cada región. Estas coordenadas definen un rectángulo que restringe el área de cálculo para la recta de mayor longitud que pase por la cabeza e incluya el centro del rectángulo. Las CCO obtenidas se orientan con el eje de las abscisas.

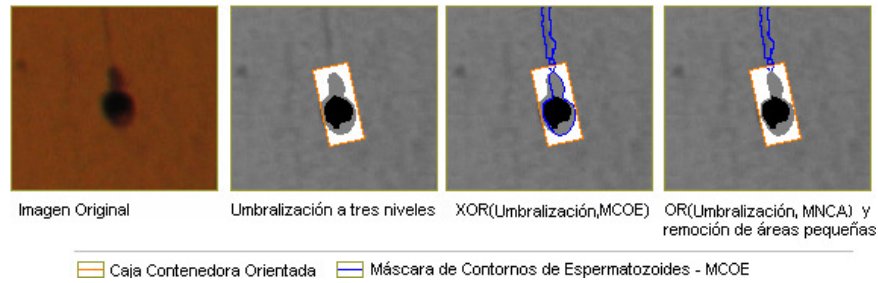
### 3.5 Separación de las estructuras del espermatozoide

Para identificar las estructuras de los espermatozoides contenidos en las regiones delimitadas se aplica nuevamente la técnica de umbralización, pero con dos umbrales locales calculados para cada CCO. Para determinar estos valores se tomó la intensidad de gris promedio en la región delimitada por la CCO y se multiplicó por 0,6 para obtener el umbral 1 y 1,15 para obtener el umbral 2 (criterio heurístico). De este modo, se obtienen regiones definidas a tres niveles de intensidad de gris donde el negro corresponde a la región post-acrosómica, el gris identifica tanto al acrosoma como a cuello y el blanco representa el fondo. Para corregir el efecto de desbordamiento de las regiones, se procede de la siguiente manera: 1) Aplicar el



**Fig 6.** Construcción de las cajas contenedoras orientadas

operador lógico XOR entre la MCOE y la imagen trinarizada, 2) Remover las regiones pequeñas hacia los bordes de las estructuras y 3) Aplicar el operador lógico OR entre la imagen resultante y la MNCA para volver a agregar los píxeles del borde (ver Figura 7).



**Fig. 7.** Umbralización de CCO a tres niveles

Con el objetivo de evaluar el algoritmo de segmentación propuesto, se diseñó un protocolo de prueba que consistió en seleccionar aleatoriamente 89 imágenes (30,3%) de las 294 disponibles y aplicar el algoritmo propuesto a cada una de ellas. A continuación, se determinó el error de segmentación y el de omisión. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Resultados del protocolo de prueba

Parámetro	Valor
Estructuras identificadas	1209
Espermatozoides presentes	1196
Espermatozoides reconocidos	1116
Espermatozoides no reconocidos	80
Falsos reconocimientos	93

Como se observa en esta Tabla, la muestra estaba compuesta por 1196 espermatozoides y el algoritmo identificó 1209 estructuras, de las cuales 1116 correspondieron a espermatozoides y 93 a falsos positivos. El algoritmo no reconoció

80 espermatozoides. El error de segmentación (relativo porcentual) fue de 7,7% y se calculó dividiendo los falsos reconocimientos entre las detecciones totales. El error de omisión (relativo porcentual) fue de 6,7% y se determinó dividiendo el número de espermatozoides no reconocidos entre el número de espermatozoides presentes.

#### 4 Extracción de las características morfológicas

Como resultado del procedimiento de segmentación, se guardan por separado las imágenes de las estructuras a ser consideradas como posibles espermatozoides, contenidas en sus cajas ya alineadas con el eje de las abscisas. El siguiente paso consiste en extraer las características de cada una de éstas.

Esta fase de la investigación está dirigida a la caracterización de las cabezas de los espermatozoides humanos por lo que, siguiendo los criterios de la OMS para la clasificación morfológica, se consideraron como variables el área de la región acrosómica, postacrosómica y total de la cabeza, las cuales se utilizan para determinar la presencia tanto de defectos de tamaño (macrocéfalo o microcéfalo), como defectos relacionados a la proporción entre el área de las regiones. Para estimar problemas de forma de las cabezas, se registraron las longitudes de sus ejes de orientación, horizontal y vertical; la relación entre éstos da una idea de la elipticidad.

Para estimar deformaciones se calculó el perímetro de la cabeza y se comparó con el perímetro de la elipse imaginaria definida a partir de los ejes; mientras mayor sea la diferencia entre ambos, mayor será la deformación de la cabeza. Otra medida que se consideró fue la diferencia en píxeles entre la elipse ideal y el contorno real dibujando la elipse en una matriz auxiliar y contando, en valor absoluto, la distancia de un píxel de la elipse con respecto a su homólogo en el contorno de la cabeza; a menor ajuste del contorno a la elipse ideal mayor será esta cantidad y más irregular la cabeza. En la Figura 8 se ilustran estos procedimientos. En total se definieron 10 variables para construir el vector de características, las cuales se describen en la Tabla 2.



Fig. 8. Características extraídas.



**Tabla 2.** Descripción de las variables extraídas

<b>Característica</b>	<b>Descripción</b>
Área cabeza	Número de píxeles en la cabeza
Área acrosoma	Número de píxeles en región acrosómica
Área post-acrosoma	Número de píxeles en región post-acrosómica
Eje horizontal cabeza	Longitud en píxeles del eje horizontal de la cabeza
Eje vertical cabeza	Longitud en píxeles del eje vertical de la cabeza
Diferencia Ei-Cr	Diferencia en píxeles entre contorno real y contorno de elipse ideal calculada a partir de los ejes de la cabeza
Elipticidad	División entre eje horizontal y eje vertical de la cabeza
Perímetro real	Número de píxeles que conforman el borde de la cabeza
Perímetro ideal	Perímetro elíptico definido por: $p = 2\pi\sqrt{((a^2+b^2)/2)}$
Diferencia Pi - Pr	Diferencia entre perímetro elíptico ideal y perímetro real

## Conclusiones y trabajos futuros

A pesar de la complejidad del proceso, producto de las características del problema y de la calidad de las imágenes, fue posible proponer un algoritmo de segmentación de espermatozoides humanos que presenta un margen de error que, comparado con la dificultad y variabilidad de replicación de los resultados de la evaluación morfológica por parte de los expertos, hacen pensar en la posibilidad real de obtener un algoritmo robusto para realizar esta tarea.

En la actualidad se trabaja en la construcción de una base de datos constituida por las variables obtenidas con el algoritmo de extracción, la cual será utilizada para generar modelos de clasificación morfológica aplicando técnicas de minería de datos. Además, se trabaja en la propuesta de un umbral adaptativo en la generación de las MCE y en la separación de las estructuras del espermatozoide, con el fin de superar los problemas surgidos en la segmentación, como consecuencia de la variabilidad de la tonalidad y coloración de las láminas.

## Referencias

1. Alegre, E., Sánchez, L., Alaiz, R., Domínguez-Fernández, J.: Utilización de momentos estadísticos en la clasificación de cabezas de espermatozoides de verraco. XXV Jornadas de Automática. Ciudad Real. España. (2004)
2. Biehl, M., Pasma, P., Piel, M., Sánchez, L., Petkov, N.: Classification of Boar Sperm Head Images using Learning Vector Quantization. Proc. European Symposium on Artificial Neural Networks (ESANN). 545-550. (2006)

3. Carrillo, H., Villareal, J., Sotaquirá, M., Goelkel, A., Gutiérrez, R: A Computer Aided Tool for the Assessment of Human Sperm Morphology. Proc. 7<sup>th</sup> IEEE International Conference on Bioinformatics and Bioengineering. Boston, USA. 1152-1157 (2007)
4. Katz, D., Overstreet, J., Samuels, S., Nis Wander, P., Bloom, T., Lewis, E.: Morphometric Analysis of Spermatozoa in the Assessment of Human Male Fertility. Journal of Andrology. 7: 203-210 (1986)
5. Kruger, T., Coetzee, K.: The role of sperm morphology in assisted reproduction. Human reproduction update. 5(2):172-178 (1999)
6. Linneberg, C., Salomon, P., Svarer, C., Hanses, L.K, Meyrowitsch, J.: Towards Semen Quality Assessment Using Neural Networks. Proc. of the IV Neural Networks for Signal Processing. IEEE Workshop. 509--517 (1994)
7. Mortimer, D.: Practical Laboratory Andrology. Oxford University Press. (1994)
8. Otsu, N.: A threshold selection method from gray-level histograms IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics. 9: 62-66 (1979)
9. OMS - Organización Mundial de la Salud: Manual de Laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana S.A. Cuarta Edición. (2001)
10. Pratt, W.: Digital Image Processing. Fourth Edition. Wiley Interscience Publications (2007)
11. Sánchez, L., Alegre, E.: Evaluación de descriptores de textura en la clasificación de células espermáticas. XXVI Jornadas de Automática. Alicante. España. (2005)