

SEGMENTACIÓN DE CABEZAS DE ESPERMATOZOIDES DE VERRACO MEDIANTE COMBINACIÓN DE UMBRALIZACIÓN Y TRANSFORMADA WATERSHED

Víctor González

Dpto. Ing. Eléctrica y de Sistemas y Automática. Univ. de León, victor.gonzalez@unileon.es

Enrique Alegre

Dpto. Ing. Eléctrica y de Sistemas y Automática. Univ. de León, enrique.alegre@unileon.es

Patricia Morala-Argüello

Dpto. Ing. Eléctrica y de Sistemas y Automática. Univ. de León, patricia.morala@estudiantes.unileon.es

Sir Alexci Suárez Castrillón

Dpto. Ing. Eléctrica y de Sistemas y Automática. Univ. de León, sir_alexci@hotmail.com

Resumen

Se ha desarrollado un nuevo método que permite segmentar imágenes de cabezas de espermatozoides vivos y muertos. Las imágenes se han adquirido utilizando una cámara AVT Oscar F-810C y un microscopio de epifluorescencia Nikon E-600. La segmentación se realizó sobre imágenes obtenidas en escala de grises y se utilizaron las imágenes de fluorescencia para etiquetar cada cabeza para evaluar el método. Éste consiste en segmentar la mayor parte de las imágenes mediante un preprocesamiento y umbralización basada en Otsu y las imágenes que resulten mal segmentadas procesarlas mediante una transformada Watershed. Se evalúa automáticamente si la segmentación es correcta tras realizar la segmentación. De esta manera se consigue segmentar correctamente un 97.39 % de los espermatozoides vivos y un 82.99 % de los espermatozoides muertos.

Palabras clave: Segmentación, umbralización, Watershed, semen de verraco.

1. INTRODUCCIÓN

La evaluación de la calidad seminal es un aspecto clave en la investigación de la fertilidad en veterinaria. Un indicador de la posible fertilidad del semen es el número de espermatozoides vivos y muertos que hay en la muestra y también el estado del acrosoma del espermatozoide, íntegro o dañado. Una muestra con un gran número de espermatozoides muertos induce a pensar que dicha muestra no será viable para la fecundación.

Existen algunos sistemas software que se utilizan

para evaluar la calidad de las muestras de semen [3]. El grupo de investigación VARP (Visión Artificial y Reconocimiento de Patrones) de la Universidad de León, en colaboración con CENTROTEC, lleva varios años trabajando en la aplicación del procesamiento digital de imágenes para la evaluación de la calidad del semen de verraco, concretamente en la discriminación entre acrosomas íntegros y dañados [6][2] o vivos y muertos de una muestra basándose en la textura de la cabeza en imágenes en escala de grises. Con los nuevos métodos que están desarrollando se pretende sustituir las técnicas de laboratorio utilizadas habitualmente, que emplean tinciones y un posterior conteo manual de las cabezas en una serie de muestras. Estas técnicas tradicionales tienen los inconvenientes de que son lentas, subjetivas, y requieren equipos costosos, como los microscopios de fluorescencia o personal altamente especializado.

Para poder llevar a cabo estos estudios [7][8] es necesario contar con una colección de imágenes de cabezas de espermatozoides etiquetadas lo más grande posible. Para ello es necesario tanto la adquisición de un amplio conjunto de imágenes, como realizar una segmentación que preserve lo mejor posible la información de cada una de las imágenes originales.

Las imágenes que hemos utilizado en este trabajo están compuestas por la cabeza del espermatozoide sin la cola sobre fondo negro enmascarada para que contenga los niveles de gris de la imagen original (Fig. 1).

Uno de los problemas que es necesario resolver es la correcta segmentación de la cabeza del espermatozoide ya que dicha segmentación es necesaria para realizar el procesamiento que hemos comentado anteriormente. La incorrecta segmentación

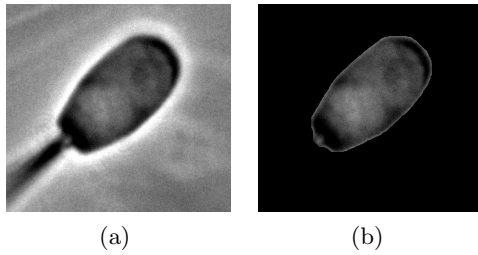


Figura 1: Imagen original y su correspondiente segmentada y enmascarada, que se utilizará en el procesamiento

supone una pérdida de tiempo en el procesamiento de la muestra, ya que cuando se detecta que la forma resultante no es correcta ha de deshecharse la correspondiente imagen. Un ejemplo de segmentación incorrecta puede verse en la Fig. 2.

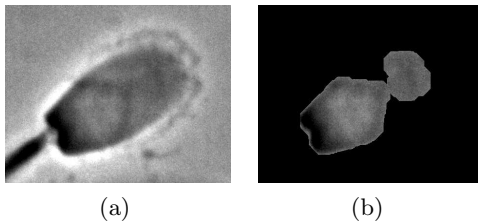


Figura 2: Ejemplo de imagen mal segmentada no válida para su procesamiento

En este trabajo se aborda el problema de la segmentación de las imágenes de espermatozoides, presentando un método que permite alcanzar un porcentaje mayor de imágenes bien segmentadas gracias a la utilización de la transformada Watershed para segmentar las imágenes mal procesadas con el método básico empleado que utiliza una combinación de diferentes técnicas de preprocesamiento y una umbralización final. En la sección 2 se describe brevemente cómo se realiza la adquisición de las imágenes. A continuación se presentan los diferentes métodos de segmentación y el método de discriminación de las imágenes bien y mal segmentadas. La sección 4 muestra los experimentos realizados y los resultados obtenidos. Finalmente se presentan las conclusiones del trabajo y los trabajos futuros.

2. OBTENCIÓN DE LAS IMÁGENES

Para adquirir las imágenes de semen de porcino para su posterior estudio se prepararon las muestras con una tinción combinada de Ioduro de Propidio (IP) y Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) que permite, bajo iluminación fluorescente, ver los espermatozoides vivos teñidos de color

verde y los muertos de color rojo. Se remite al lector interesado en la preparación de la muestra a [1].

Para adquirir las imágenes se ha utilizado una cámara Oscar F-810C conectada a un microscopio epifluorescente Nikon E-600. La captura de las imágenes se realizó observando la muestra bajo fluorescencia y, una vez localizados y focalizados los espermatozoides se obtuvo una imagen en color real del campo de visión. Posteriormente, y sin mover la preparación, se suprimió la iluminación fluorescente y se abrió el diafragma de luz convencional para tomar otra fotografía de los mismos espermatozoides, esta vez en escala de grises, en contraste de fases positivo. Este proceso se repitió hasta conseguir todas las imágenes deseadas. Por lo tanto, para cada muestra tendremos dos imágenes, una en escala de grises y otra en color, correspondientes a la muestra en contraste de fases y en fluorescencia, respectivamente, ambas capturadas con una resolución de 3272x2469 píxeles.

Posteriormente, se recortan las imágenes de manera que quede un espermatozoide por imagen y se etiquetan como vivos o muertos en función del color que presente en la imagen fluorescente.

3. MÉTODOS DE SEGMENTACIÓN

Nuestro método propone combinar dos técnicas diferentes para segmentar las imágenes. Por un lado una umbralización mediante el método de Otsu, previo procesamiento utilizando, diversas operaciones morfológicas, entre otras, y por otro lado una segmentación empleando la transformada Watershed. Los pasos que se han seguido son: Inicialmente se segmentan todas las imágenes con la umbralización. Después se determina automáticamente las imágenes que están mal segmentadas utilizando el criterio que exponemos posteriormente. Finalmente se realiza la segmentación de éstas mediante la transformada Watershed. Esta segunda segmentación se realiza sobre el conjunto reducido de las mal segmentadas por el primer método lo que supone que en este caso sea aceptable el alto coste computacional de esta transformada.

A continuación se describen cada uno de los métodos de segmentación utilizados, el método para distinguir las imágenes mal segmentadas y el método combinado propuesto.

3.1. DISCRIMINACIÓN DE LAS IMÁGENES

Una de las partes fundamentales en el método de segmentación que se propone consiste en los criterios utilizados para distinguir una imagen de una cabeza de espermatozoide mal segmentada. Para cada una de las imágenes de cabezas segmentadas se comprueba y se descartan automáticamente:

1. las imágenes cuya área, en píxeles, es menor que el 70 % de la media de las áreas de las cabezas de todo el conjunto de imágenes. Si el sistema de visión utilizado se mantiene constante en cuanto a resolución de la cámara, microscopio y óptica utilizada, este valor no varía.
2. las imágenes cuya relación entre el eje mayor y el eje menor de la elipse que encierra el área no está entre 1.4 y 2.6. Estos valores han sido obtenidos experimentalmente.

3.2. SEGMENTACIÓN POR UMBRALIZACIÓN

El primer método de segmentación se basa en un preprocesamiento de la imagen y posterior umbralización. Se convierte la imagen a escala de grises, se ajusta el histograma para mejorar su contraste y se calcula su umbral mediante el método de Otsu [5] obteniendo una imagen binaria a la que posteriormente se aplica el negativo (Fig. 3(b)). A continuación se deja solamente la región mayor eliminando todas las regiones cuya área sea inferior a la que tenga mayor número de píxeles, que corresponde con la cabeza del espermatozoide.

Posteriormente, mediante una erosión y una posterior dilatación de la imagen con un elemento estructurante en forma de disco de radio 22, se elimina automáticamente la cola, o se separa de la cabeza. Después se quitan las regiones que están en contacto con el borde de la imagen, para que quede una imagen binaria con la cabeza del espermatozoide únicamente (Fig. 3(c)).

Finalmente se enmascara la cabeza, para lo que se realiza una multiplicación píxel a píxel de la imagen resultante con la original para que queden los niveles de gris originales de la cabeza sobre fondo negro, y la imagen se recorta de forma que quede la cabeza contenida en su bounding box (Fig. 3(d)).

3.3. SEGMENTACIÓN MEDIANTE TRANSFORMADA WATERSHED

La transformada Watershed considera el gradiente de una imagen en nivel de gris como una superficie topográfica, en el que los valores máximos de los

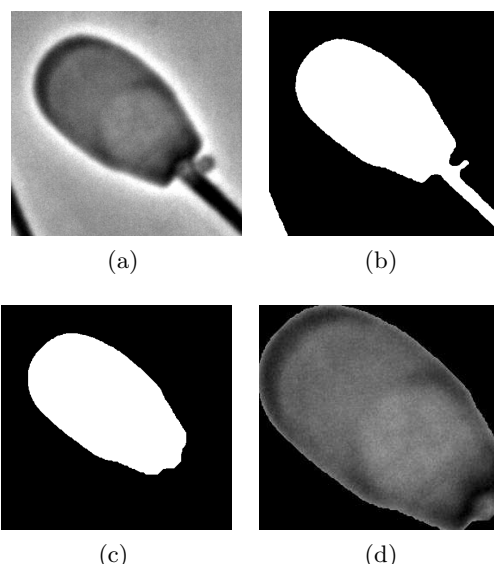


Figura 3: Proceso de segmentación por umbralización

píxeles corresponden a sus puntos más altos. Dicha superficie se comienza a inundar desde los puntos mínimos a velocidad constante. Para prevenir que el agua que proviene de dos regiones diferentes se mezcle, se particiona la imagen en dos zonas distintas, levantando una pared que las separa, llamada línea watershed. El resultado de ese proceso es habitualmente una sobresegmentación (Fig. 4), que se debe a que el gradiente de una imagen es muy sensible al ruido presente en la misma.

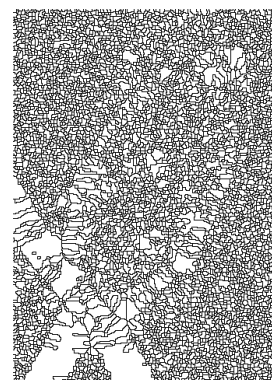


Figura 4: Ejemplo de sobresegmentación con la transformada Watershed.

Para evitar este efecto indeseado, Meyer y Beucher [4] propusieron utilizar marcadores que indicaran los mínimos de la superficie topográfica por los cuales comenzar la inundación. Estos marcadores corresponden al primer plano y al fondo de la imagen.

En nuestro método, los marcadores del primer plano (la cabeza del espermatozoide) se obtienen mediante el método descrito en la sección 3.2. En

caso de que este método no devolviera ninguna región de interés se utiliza un cuadrado situado en el centro de la imagen cuyos lados son el 30 % del tamaño del lado correspondiente de la imagen.

Los marcadores del fondo se obtienen calculando la transformada Watershed de la transformada de la distancia del marcador del primer plano con cada una de las esquinas de la imagen.

Finalmente, se calcula la transformada Watershed de la imagen del gradiente de la original reconstruida morfológicamente de forma que tenga mínimos locales en las zonas indicadas por los marcadores obtenidos (Fig. 5). La cabeza segmentada corresponderá al área de dicha transformada en la que estuviera contenido el marcador del primer plano, y con ella se enmascara la imagen original para finalmente obtener la cabeza con los niveles de gris originales.

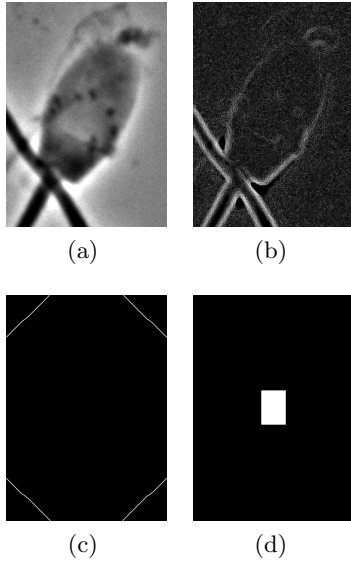


Figura 5: Imagen original (a), su gradiente (b), marcadores del fondo (c), y marcador del primer plano (d)

3.4. SEGMENTACIÓN MIXTA

El método que se propone en este trabajo consiste en combinar el método de segmentación explicado en primer lugar que utiliza fundamentalmente la umbralización de Otsu y el basado en la transformada Watershed.

Inicialmente se segmentan todas las imágenes con el primer método (sección 3.2). Posteriormente se detectan las imágenes mal segmentadas siguiendo los criterios presentados en la sección 3.1 y se aplica sobre ellas este mismo método con un umbral más alto. A continuación se aplica el método de segmentación basado en la transformada Watershed sobre las imágenes que continúen estando

mal segmentadas.

Al final se realiza de nuevo la inspección automática para descartar del conjunto segmentado final las imágenes que detecte como mal segmentadas.

Se aplica primero el método basado en umbralización para segmentar con él la mayor parte de las imágenes, debido a que es más eficiente computacionalmente.

4. EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

Se ha realizado un experimento para evaluar cada uno de los métodos descritos, que consiste en la segmentación de un conjunto de imágenes de cabezas de espermatozoide, recortadas y etiquetadas a partir de la correspondiente imagen de fluorescencia. Concretamente, el conjunto consta de 422 imágenes de vivos y 341 de muertos. Después de segmentar las imágenes se ha realizado una inspección manual del conjunto segmentado para detectar posibles irregularidades en el método, como imágenes que sigan estando mal segmentadas, o las que se detecten como mal segmentadas cuando realmente están bien. Es importante decir que no hemos realizado ningún tipo de selección previa de las imágenes.

Respecto a los resultados, se van a mostrar los siguientes parámetros, utilizados para calcular la matriz de confusión:

- Número de imágenes bien segmentadas identificadas automáticamente como bien segmentadas (TP).
- Número de imágenes mal segmentadas identificadas automáticamente como bien segmentadas (FP).
- Número de imágenes bien segmentadas identificadas automáticamente como mal segmentadas (FN).
- Número de imágenes mal segmentadas identificadas automáticamente como mal segmentadas (TN).

Además, la matriz de confusión permite calcular algunas medidas para evaluar las prestaciones de cada método:

- **Eficiencia.**

Número de imágenes bien segmentadas.

$$E = \frac{TP + FN}{TP + FP + FN + TN} 100 \quad (1)$$

- **Pérdida.**

Número de imágenes mal segmentadas.

$$P = \frac{TN + FP}{TP + FP + FN + TN} 100 = 100 - E \quad (2)$$

- **Proporción de verdaderos positivos.**

Porcentaje del total de imágenes bien segmentadas detectadas como bien segmentadas.

$$TPR = \frac{TP}{TP + FP + FN + TN} 100 \quad (3)$$

- **Proporción de falsos positivos.**

Porcentaje del total de imágenes mal segmentadas detectadas como bien segmentadas.

$$FPR = \frac{FP}{TP + FP + FN + TN} 100 \quad (4)$$

- **Proporción de verdaderos negativos.**

Porcentaje del total de imágenes mal segmentadas detectadas como mal segmentadas.

$$FNR = \frac{TN}{TP + FP + FN + TN} 100 \quad (5)$$

4.1. RESULTADOS DE LA SEGMENTACIÓN POR UMBRALIZACIÓN

Cuadro 1: Resultados de la segmentación de los espermatozoides vivos basada en umbralización

| | | Automático | |
|------|------|------------|-----|
| | | Bien | Mal |
| Real | Bien | 410 | 0 |
| | Mal | 9 | 3 |

Cuadro 2: Resultados de la segmentación de los espermatozoides muertos basada en umbralización

| | | Automático | |
|------|------|------------|-----|
| | | Bien | Mal |
| Real | Bien | 269 | 0 |
| | Mal | 41 | 31 |

Utilizando el método basado en umbralización las diferencias entre las cabezas de vivos y de muertos son muy apreciables. Con este método se consigue segmentar bien un 97.16 % de los espermatozoides vivos, y un 78.89 % de los muertos. Además, la

proporción de cabezas mal segmentadas es mayor en la clase de los muertos que en la de los vivos, tanto los detectados correctamente como malos (9.09 % contra 0.71 % respectivamente), como los que se detectan como buenos (12.02 % contra 2.13 %).

4.2. RESULTADOS DE LA SEGMENTACIÓN WATERSHED

Cuadro 3: Resultados de la segmentación de los espermatozoides vivos basada en Watershed

| | | Automático | |
|------|------|------------|-----|
| | | Bien | Mal |
| Real | Bien | 409 | 0 |
| | Mal | 13 | 0 |

Cuadro 4: Resultados de la segmentación de los espermatozoides muertos basada en Watershed

| | | Automático | |
|------|------|------------|-----|
| | | Bien | Mal |
| Real | Bien | 280 | 0 |
| | Mal | 43 | 18 |

El método de segmentación mediante Watershed resulta ser más eficiente que el anterior, segmentando las imágenes de espermatozoides muertos, consiguiendo segmentar un 82.11 %, mientras que en el caso de los vivos, se muestra un poco peor, con una eficiencia del 96.92 %. Por tanto, este método es más fiable al segmentar espermatozoides muertos, pues es más robusto ante imágenes en que la región de interés presenta poco contraste con el fondo.

Llama la atención que, a pesar de que se pierden menos espermatozoides con este método que con el método basado en umbralización, la proporción de verdaderos negativos es menor (0 contra el 3 en el caso de los vivos y 18 contra 31, respectivamente).

4.3. RESULTADOS DE LA SEGMENTACIÓN MIXTA

Cuadro 5: Resultados de la segmentación de los espermatozoides vivos con el método mixto

| | | Automático | |
|------|------|------------|-----|
| | | Bien | Mal |
| Real | Bien | 411 | 0 |
| | Mal | 11 | 0 |

El método propuesto es más eficiente que los dos métodos anteriores, alcanzando una proporción del 97.39 % de vivos y un 82.99 % de muertos bien

Cuadro 6: Resultados de la segmentación de los espermatozoides muertos con el método mixto

| | | Automático | |
|------|------|------------|-----|
| | | Bien | Mal |
| Real | Bien | 283 | 0 |
| | Mal | 46 | 12 |

segmentados. Esto representa una mejora, puesto que se pierden menos, que utilizando cualquiera de los dos métodos anteriores, sobre todo de la clase de los muertos.

5. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

En este trabajo hemos propuesto un método de segmentación que combina un método de umbralización y otro basado en la transformada Watershed, de forma que se aplica el segundo sobre las imágenes mal segmentadas con el primero, en base a un criterio para detectar automáticamente cabezas mal segmentadas.

Este método permite que se puedan aprovechar más imágenes para su posterior análisis debido a que se muestra más eficiente tanto para las de espermatozoides vivos como de muertos (respectivamente, un 97.39% contra un 96.92% obtenido con Watershed y un 82.99% contra un 78.89% con umbralización). Los tres presentan una proporción de falsos positivos similar, de aproximadamente el 2% en el caso de los espermatozoides vivos y un 12% en el caso de los muertos. Este desequilibrio se produce debido a que los espermatozoides muertos están más difuminados con respecto al fondo de la imagen que los vivos, lo cual dificulta su segmentación.

Llama la atención que tanto en el método propuesto como en los dos estudiados no hay ninguna imagen detectada como mal segmentada que en realidad esté bien, lo cual permite confiar en que el criterio de discriminación de imágenes mal segmentadas no va a perder cabezas buenas.

En sucesivos trabajos se intentará mejorar el método de detección de espermatozoides mal segmentados, para reducir la proporción de falsos positivos, e intentar encontrar un método para determinar a priori con qué método se debe segmentar la imagen.

Agradecimientos

Este trabajo está parcialmente subvencionado por el proyecto de investigación DPI2006-02550 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Damos las gracias a CENTROTEC, por facili-

arnos las muestras de semen y su colaboración en la toma de imágenes.

Referencias

- [1] Tomás Alonso, Enrique Alegre, Lidia Sánchez, Fernando Tejerina, and Juan Carlos Domínguez. Segmentación y etiquetado automático de cabezas de espermatozoides de verraco. In *XXVII Jornadas de Automática 2006*, 2006.
- [2] M. González, E. Alegre, R. Alaiz, and L. Sánchez. Acrosome integrity classification of boar spermatozoon images using dwt and texture techniques. In *VipIMAGE - Computational Vision and Medical Image Processing*, pages 165–168. Taylor and Francis, 2007.
- [3] C. Linneberg, P. Salamon, C. Svarer, L.K. Hansen, and J. Meyrowitsch. Towards semen quality assessment using neural networks. In *Proc. IEEE Workshop Neural Networks for Signal Processing [1994] IV*, pages 509–517, 1994.
- [4] F. Meyer and S. Beucher. Morphological segmentation. *Journal of Visual Communication and Image Representation*, 1(1):21–46, September 1990.
- [5] N. Otsu. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, 9(1):62–66, 1979.
- [6] N. Petkov, E. Alegre, M. Biehl, and L. Sánchez. LVQ acrosome integrity assessment of boar sperm cells. In J.M.R.S. Tavares and R.M. Natal Jorge, editors, *COM-PIImage - Computational Modelling of Objects Represented in Images*, pages 337–342. Taylor and Francis Group London, 2007.
- [7] Lidia Sánchez, Víctor González, Enrique Alegre, and Rocío Alaiz. Classification and quantification based on image analysis for sperm samples with uncertain damaged/intact cell proportions. In *ICIAR 2008, LNCS 5112*, pages 827–836, 2008.
- [8] S. Suarez, E. Alegre, M. Castejón, and L. Sánchez. Use of statistic texture descriptors to classify boar sperm images applying discriminant analysis. In *VipIMAGE - Computational Vision and Medical Image Processing*, pages 197–201. Taylor and Francis, 2007.