Segmentación y seguimiento de objetos móviles en secuencias de imágenes biomédicas.

Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ingeniería
Tesis para optar al título de Doctor en Ingeniería, orientación Electrónica
Ing. Francisco Javier Buchelly Imbachí
Directora: Dra. Virginia Laura Ballarin
Codirector: Dr. Juan Ignacio Pastore
Año 2020

RINFI

REPOSITORIO INSTITUCIONAL

INTEMA | FACULTAD DE INGENIERÍA | UNMDP

RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

Segmentación y seguimiento de objetos móviles en secuencias de imágenes biomédicas.

Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ingeniería
Tesis para optar al título de Doctor en Ingeniería, orientación Electrónica
Ing. Francisco Javier Buchelly Imbachí
Directora: Dra. Virginia Laura Ballarin
Codirector: Dr. Juan Ignacio Pastore
Año 2020

Agradezco por el apoyo recibido durante el desarrollo de mi carrera:

- A mis directores, Virginia y Juan. Ellos compartieron conmigo sus conocimientos y su experiencia en contextos académicos y de investigación. Además, orientaron mi trabajo de forma ética, y mostraron una actitud comprensiva y humana frente a diferentes situaciones personales.

- A mis padres, Angélica y Francisco. Desde el principio, ellos han manifestado su aprobación sobre las decisiones que he tomado para mi desarrollo personal, y siempre están pendientes de mi bienestar. De igual forma a mis hermanos, Diana y Jhon, quienes refuerzan las intenciones de mis padres con muy buena disposición.

- A Marinela, mi amor, quien me acompaña en este proceso con la mejor energía. Tú me brindas la motivación diaria para llevar a cabo mis actividades con actitud positiva, y la confianza que necesito para valorar mis aprendizajes. Este es un logro compartido.

- A Estefany y Ramiro. Ellos dieron un valor agregado a la palabra “amistad” y representaron una extensión de mi familia en Argentina.

- A los integrantes del Laboratorio de Procesamiento Digital de Imágenes y a las demás personas que aportaron a la realización de esta tesis: la comisión de seguimiento, el tribunal evaluador y los docentes e investigadores de los diferentes grupos involucrados.

Tabla de contenido

Pág.

Capítulo 1. Introducción 7
1.1. Presentación del problema 8
1.2. Estructura de la tesis 9
1.3. Referencias 10

Capítulo 2. Estado del arte 11
2.1. Detección de objetos 13
2.2. Modelado y caracterización de los objetos 20
2.3. Métodos de seguimiento 24
2.4. Análisis de movimiento 28
2.5. Referencias 30

Capítulo 3. Métodos de detección 41
3.1. Detectores de puntos 43
3.2. Técnicas de segmentación 44
3.2.1. Aplicación de umbrales 44
3.2.2. Detección de bordes 45
3.2.3. Segmentación por *clustering* 47
3.3. Modelado y substracción del fondo 49
3.4. Uso de clasificadores 51
3.5. Métodos basados en movimiento 51
3.5.1. Substracción de cuadros sucesivos 51
3.5.2. Flujo óptico 52
3.6. Comentarios finales 55
3.7. Referencias 55

Capítulo 4. Representación de los objetos 60
4.1. Modelos basados en forma 61
4.1.1. Representación mediante puntos 62
4.1.2. Representación mediante formas geométricas simples 63
4.1.4. Modelos articulados, múltiples y esqueléticos 63
4.2. Modelos basados en apariencia 64
4.3. Variables y modelos de estado 64
4.4. Comentarios finales 66
4.5. Referencias 67

Capítulo 5. Métodos de seguimiento…….. 71
5.1. Enfoque probabilístico para el seguimiento…… 73
5.1.1. Modelos de la dinámica y modelos de medición …… 74
5.2. Métodos de predicción …….. 75
5.2.1. Predicción por Filtro de Kalman …… 75
5.2.3. Predicción basada en flujo óptico …….. 76
5.3. Método propuesto para la asociación y el tratamiento de las oclusiones …….. 77
5.3.1. Referentes teóricos que dan soporte al método propuesto …..…… 77
5.3.2. Método de asociación o correspondencia temporal …… 78
5.3.3. Tratamiento de las oclusiones ……. 80
5.3.4. Parámetros de ajuste para el método …….. 81
5.5. Comentarios finales…… 84
5.6. Referencias …… 84

Capítulo 6. Análisis de motilidad espermática …… 87
6.1. Análisis de semen asistido por computador ……. 88
6.2. Trabajos relacionados …… 90
6.3. Método propuesto para la detección y representación de espermatozoides…… 92
6.3.1. Método de detección…… 92
6.3.2. Representación de la forma y de la apariencia…… 93
6.4. Seguimiento de células espermáticas ……. 94
6.4.1. Predicción mediante Filtros de Kalman …….. 94
6.4.2. Método de asociación y tratamiento de las oclusiones…… 94
6.5. Análisis de las trayectorias …… 95
6.5.1. Cálculo de los parámetros de motilidad …….. 95
6.5.2. Identificación de subpoblaciones espermáticas de motilidad ……. 98
6.6. Resultados ……. 101
6.6.1. Métodos de detección y seguimiento …….. 102
6.6.2. Elaboración de un software CASA para el análisis de motilidad ……... 108
6.6.3. Análisis de motilidad espermática …….. 108
6.6.4. Identificación de subpoblaciones espermáticas de motilidad ……. 112
6.6.5. Clasificación de muestras…… 112
6.7. Conclusiones para esta aplicación…….. 114
6.8. Referencias…… 115

Capítulo 7. Otras aplicaciones…… 121
7.1. Análisis de los movimientos bacterianos…… 121
7.1.1. Detección y representación de los cuerpos bacterianos …….. 122
7.1.2. Ensayo de rotación flagelar…… 123
7.1.3. Análisis del movimiento de traslación ……..…….. 126
7.1.4. Resultados…… 128
7.1.5. Conclusiones para esta aplicación …….. 131
7.2. Estudio de la degradación de aleaciones de magnesio……132
7.2.1. Preparación de las muestras y adquisición de las secuencias de video……134
7.2.2. Detección y representación de las burbujas de hidrógeno …….. 134

7.2.3. Seguimiento de las burbujas…… 136
7.2.4. Cuantificación de la tasa de generación de hidrógeno …… 138
7.2.5. Resultados …….. 139
7.2.6. Conclusiones para esta aplicación ……. 141
7.3. Referencias …… 141

Conclusiones generales y trabajos futuros…… 144

Anexo I. Uso del software *Sperm Motility Tracker* ……..……. 147

Anexo II. Licencia y registro del software *Sperm Motility Tracker* …… 153

Esta tesis se enmarca dentro de los proyectos de investigación "***Diseño de operadores para la segmentación y clasificación de imágenes biomédicas***" y "***Segmentación, análisis y detección de objetos y texturas en imágenes y secuencias de videos***" desarrollados en el Laboratorio de Procesamiento Digital de Imágenes del Instituto de Investigaciones Científicas y Tecnológicas en Electrónica (ICyTE), dependiente de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata y CONICET.

Todos los aportes de esta tesis se sustentan en los siguientes trabajos:

- **Buchelly Imbachí, F.**, Isa Jara, R., Zalazar, L., Cesari, A., Pastore, J., & Ballarin, V. (2020). **Comparative Analysis of Different Techniques to Determine Motility Parameters in Video Sequences of Ram and Buck Sperm.** En *VIII Latin American Conference on Biomedical Engineering and XLII National Conference on Biomedical Engineering. CLAIB 2019. IFMBE Proceedings, vol 75.* (pp. 385-392). https://doi.org/10.1007/978-3-030-30648-9_50

- **Buchelly Imbachí, F.**, Gomez, M., Cere, S., Ballarre, J., Ballarin, V., & Pastore, J. (2020). **Measurement of the Degradation Rate of Anodized AZ91 Magnesium Temporary Implants Using Digital Image Processing Techniques.** En *VIII Latin American Conference on Biomedical Engineering and XLII National Conference on Biomedical Engineering. CLAIB 2019. IFMBE Proceedings, vol 75.* (pp. 290-297). https://doi.org/10.1007/978-3-030-30648-9_37

- **Buchelly Imbachí, F.**, Zalazar, L., Pastore, J., Cesari, A., & Ballarin, V. (2019). **Desarrollo de un módulo para el estudio de subpoblaciones de motilidad espermática integrado a un software CASA.** En *VIII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica CLAIB 2019*. Cancún, Mexico.

- Ledesma, A., Zalazar, L., **Buchelly Imbachi, F.**, Pastore, J., Brown, P., Eddy, E., Hozbor, F., & Cesari, A. (2019). **Recombinant peptide reverses cryo-capacitation in ram sperm and improves in vitro fertilization.** *Animal reproduction science*, *207*(May), 61-72. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.016

- **Buchelly Imbachí, F.**, Zalazar, L., Pastore, J., Greco, M., Iniesta-Cuerda, M., Garde, J., Soler, A. Ballarin, V. & Cesari, A. (2018). **Objective evaluation of ram and buck sperm motility by using a novel sperm tracker software.** *Reproduction*, *156*(1), 11-21. https://doi.org/10.1530/REP-17-0755

- Gomez, M., Ballarre, J., Gomez Sanchez, A., **Buchelly Imbachí, F.**, Pastore, J., & Ceré, S. (2018). **Estudio in vitro de implantes temporarios de aleación de magnesio (AZ91) modificados superficialmente mediante anodizado.** En *10° COLAOB Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*.

- **Buchelly Imbachí, F.**, Zalazar, L., Pastore, J., Soler, A., Cesari, A., & Ballarin, V. (2017). **Evaluation of motility quality in ram sperm by using a novel open - source suite of algorithms.** En *Congreso Argentino de Bioingeniería - SABI 2017*. Córdoba, Argentina.

- Zalazar, L., **Buchelly Imbachí, F.**, Greco, M., López, A., Radonic, M., Pastore, J., Aristizábal, E, Cesari, A., & Ballarin, V. (2017). **Preliminary semen sample management from Paralichthys Orbignyanus for sperm motility objective analysis by using a novel open-source suite of algorithms.** En *Medicina Supl. I* (Vol. 77). Buenos Aires, Argentina.

- Isa Jara, R., **Buchelly Imbachí, F.**, Meschino, G., & Ballarin, V. (2017). **Improved Particle Swarm Optimization algorithm applied to rigid registration in medical images.** En *IFMBE Proceedings* (Vol. 60, pp. 161-164). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4086-3_41

- **Buchelly Imbachí, F.**, Pedetta, A., Pastore, J., Herrera, K., & Ballarin, V. (2016). **Automatic tracking of flagellar rotation of bacteria.** En *VII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica – CLAIB 2016*. Bucaramanga, Colombia: Colombian Association of Bioengineering and Medical Electronics (ABIOIN).

- **Buchelly Imbachí, F.**, Pastore, J., Passoni, I., & Ballarin, V. (2016). **Identificación de rasgos faciales mediante técnicas de procesamiento de imágenes.** En *IEEE ARGENCON 2016 - El congreso bienal de IEEE Argentina* (pp. 1-5). Buenos Aires, Argentina. https://doi.org/10.1109/argencon.2016.7585362

- **Buchelly Imbachí, F.**, Mayorca, D., Ballarin, V., & Pastore, J. (2016). **Digital image processing techniques applied to pressure analysis and morphological features extraction in footprints.** *Journal of Physics: Conference Series*, *705*(1). https://doi.org/10.1088/1742-6596/705/1/012020

A partir del trabajo de investigación desarrollado durante la presente tesis surgió un desarrollo tecnológico de un software para el estudio de la motilidad espermática, el cual cuenta con un **registro de propiedad intelectual como obra inédita** número RE-2018-56090078-APN-DNDA#MJ, emitido por el Poder Ejecutivo Nacional de la República Argentina. Este software lleva a cabo el análisis estándar de motilidad mediante métodos de seguimiento de objetos, y aplica técnicas de reconocimiento de patrones para la identificación de subpoblaciones espermáticas.

Capítulo 1. Introducción

Una imagen médica es aquella que procede del conjunto de técnicas y procesos usados para crear imágenes del cuerpo humano, o partes de él, con propósitos clínicos, esto es, procedimientos médicos que buscan revelar, diagnosticar o examinar enfermedades, o bien con propósitos científicos médicos, tales como el estudio de la anatomía física y metabólica (García-Fenoll 2010). En su sentido más amplio, las imágenes médicas son un conjunto particular de las imágenes biológicas, de tal forma que en varios contextos puede referirse indistintamente a las imágenes biológicas o a las imágenes médicas como imágenes biomédicas.

Al grupo de imágenes biomédicas pertenecen las imágenes ópticas (microscopía, endoscopía, etc.), las imágenes por resonancia magnética, tomografías, imágenes por rayos X, imágenes de ultrasonido, de medicina nuclear, entre otras (NIH 2019). Actualmente se realizan análisis computarizados de cada una de las técnicas de adquisición mencionadas, que abordan el análisis de imágenes estáticas y el estudio de su evolución temporal. En este último aspecto, una técnica útil para el análisis de movimiento en secuencias de imágenes biomédicas es el seguimiento o *tracking* de objetos, la cual se utiliza en distintas aplicaciones como la cardiología (McEachen II et al. 1994), el estudio de la dinámica de órganos y tejidos (Paredes 2016), análisis de la marcha (Mihradi et al. 2013), análisis de movimiento de organismos unicelulares (Arasteh et al. 2018; Hook et al. 2019), etc.

Por lo anterior, existen esquemas de seguimiento aplicados a secuencias de imágenes biomédicas que utilizan diferentes técnicas y procedimientos para estudiar la evolución de los objetos de interés, respecto a su ubicación en la escena o cualquier otra característica que cambie en el transcurso del tiempo. Estos métodos dependen de modelos de representación de los objetos, los cuales contemplan tanto su forma como su apariencia. Así, existen métodos de seguimiento que estudian, por una parte, los cambios cuadro a cuadro que sufre un punto, una región rectangular, un entorno circular, una silueta o un modelo de forma más compleja, y, por otra parte, analizan el contenido de las imágenes en el interior de esas formas, por medio de características de color, textura, distribuciones estadísticas, etc. Por tal razón, existe una gran variedad de métodos de seguimiento que pueden utilizarse para abordar cada aplicación particular.

Finalmente, en una fase posterior o simultánea al seguimiento se encuentra el análisis del movimiento, el cual requiere de la extracción de características de las trayectorias y con frecuencia se lleva a cabo el reconocimiento de patrones.

1.1. Presentación del problema

Para elaborar un esquema de seguimiento debe tenerse en cuenta que todas sus etapas sean acordes a la aplicación en la cual se va a utilizar. En primer lugar, debe considerarse si se utiliza o se descarta el uso de un mecanismo de predicción en función del conocimiento de la previsibilidad de las trayectorias, es decir, si se observa una tendencia en los movimientos o si ellos sufren cambios impredecibles. En segundo lugar, se requiere un método de detección o localización de los objetos acorde al modelo de forma y a la calidad de las imágenes, que permita obtener mediciones representativas de los mismos. Por último, y uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta, es necesario contar con un método de asociación entre los estados de los objetos en los instantes previos y las mediciones actuales, para llevar a cabo una correcta actualización de los estados.

Sin embargo, cada representación de forma restringe los métodos a elegir en cada situación, de tal forma que un método de seguimiento de puntos no siempre es adaptable a un esquema en el cual los objetos se representan mediante modelos complejos, por ejemplo de contornos o articulados; de la misma manera, los parámetros utilizados en los modelos diseñados para el seguimiento de formas complejas deben restringirse demasiado para hacer el seguimiento con representaciones muy simples y terminan siendo, en muchas ocasiones, casos particulares de otros métodos. Así, puede decirse que al cambiar de aplicación frecuentemente debe utilizarse un esquema distinto de seguimiento.

Para el desarrollo de la presente tesis se analizaron secuencias de imágenes biomédicas que contienen el movimiento de organismos unicelulares y partículas suspendidas en fluidos, adquiridas mediante técnicas de microscopía. En este ámbito particular, la detección se simplifica debido a la presencia de condiciones controladas de iluminación, y se centra la atención en los métodos de seguimiento y análisis de movimiento. Por otra parte, los distintos tipos de objetos analizados en las secuencias permiten el uso de diferentes representaciones, y además ellos describen distintos tipos de movimiento, por lo cual es deseable que el método de seguimiento a utilizar sea adaptable a diferentes situaciones.

En vista de lo anterior, la presente tesis propone como objetivo general **desarrollar métodos de visión por computador que permitan realizar la detección y el seguimiento de organismos unicelulares en secuencias de imágenes, de manera independiente a las representaciones utilizadas**.

Llevar a cabo el objetivo propuesto implica la solución de problemas específicos que se presentan en este tipo de secuencias de imágenes. En primer lugar, si bien la detección no representa un reto mayor gracias al contraste entre los objetos de interés y el fondo, con frecuencia es necesario determinar la representación más adecuada para los mismos que permita diferenciar un objeto particular de los demás. En general, cada imagen contiene una alta densidad de objetos de interés, del orden de las decenas o centenas, y la mayoría son indistinguibles en cuanto a su apariencia. Esto lleva a elegir representaciones de forma simples en la mayoría de los casos. En segundo lugar, el seguimiento de múltiples objetos trae consigo dos dificultades importantes: la asociación adecuada en una escena en la cual la

cantidad de objetos cambia con el tiempo, y el tratamiento de las oclusiones debidas a superposición de dos o más células o al cambio del plano de movimiento en profundidad.

1.2. Estructura de la tesis

A continuación, se detalla el contenido de cada uno de los capítulos que conforman la presente tesis:

- En el ***Capítulo 2*** se exponen los conceptos generales sobre los sistemas de seguimiento de objetos en video, sus usos en distintos contextos y una descripción general de las fases que intervienen en dichos sistemas.

- En el ***Capítulo 3*** se resumen los métodos evaluados para la detección de objetos, que comprenden métodos independientes y métodos dependientes de la dimensión temporal. Se muestra el uso de dichos métodos para localizar los objetos de interés presentes en las secuencias analizadas y se concluye sobre cuáles de ellos son adecuados para las aplicaciones desarrolladas en esta tesis.

- En el ***Capítulo 4*** se mencionan los modelos de la forma de los objetos analizados y cómo se pueden representar mediante vectores de estado, los cuales constituyen la entrada a los métodos propuestos en el capítulo 5. De igual forma, se mencionan algunos modelos de apariencia y su utilidad en las fases de asociación y resolución de oclusiones.

- En el ***Capítulo 5*** se describen las etapas de predicción de estados y la correspondencia temporal desde el enfoque probabilístico. Posteriormente, se propone el método de seguimiento que será utilizado en las aplicaciones desarrolladas en los capítulos 6 y 7, el cual consta de mecanismos de correspondencia temporal y el tratamiento de las oclusiones.

- En el ***Capítulo 6*** se describe la aplicación del método de seguimiento propuesto en el análisis de motilidad espermática. Aquí se presentan los métodos utilizados para obtener las características de movimiento de las células espermáticas, y se aplican técnicas supervisadas y no supervisadas de reconocimiento de patrones para identificar subpoblaciones espermáticas a partir de los parámetros de motilidad. Finalmente, se exponen los resultados obtenidos y su impacto en áreas relacionadas con la biología reproductiva.

- En el ***Capítulo 7*** se describe el uso del método de seguimiento propuesto en dos aplicaciones adicionales de diferentes ámbitos biológicos. La primera consiste en el estudio de la motilidad bacteriana mediante la obtención de descriptores de la rotación y de la traslación de las células. La segunda se refiere a la cuantificación de la tasa de

degradación de aleaciones de magnesio en una reacción química a partir del registro de la emisión de burbujas de gas que se desprenden de su superficie.

- Finalmente, en el apartado ***Conclusiones*** se resumen de manera general los aportes de la presente tesis, su impacto en las aplicaciones desarrolladas, y en el apartado ***Trabajos Futuros*** se realiza una proyección de aquellos aspectos en los cuales se puede avanzar a partir del conocimiento generado.

1.3. Referencias

Arasteh, A., Vosoughi Vahdat, B., Salman Yazdi, R.: Multi-Target Tracking of Human Spermatozoa in Phase-Contrast Microscopy Image Sequences using a Hybrid Dynamic Bayesian Network. Sci. Rep. 8, 5068 (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-23435-x

García-Fenoll, I.: Aportaciones a la Segmentación y Caracterización de Imágenes Médicas 3D, (2010)

Hook, A.L., Flewellen, J.L., Dubern, J., Carabelli, A.M., Zaid, I.M., Berry, R.M., Wildman, R.D., Russell, N., Williams, P., Alexander, M.R.: Simultaneous Tracking of Pseudomonas aeruginosa Motility in Liquid and at the Solid-Liquid Interface Reveals Differential Roles for the Flagellar Stators. mSystems. 4, 1-18 (2019). https://doi.org/10.1128/mSystems.00390-19

McEachen II, J.C., Nehorai, A., Duncan, J.S.: Analysis of cardiac motion with recursive comb filtering. En: Bookstein, F.L., Duncan, J.S., Lange, N., y Wilson, D.C. (eds.) Mathematical Methods in Medical Imaging III. pp. 46-57. SPIE (1994)

Mihradi, S., Ferryanto, Dirgantara, T., Mahyuddin, A.I.: Tracking of markers for 2D and 3D gait analysis using home video cameras. Int. J. E-Health Med. Commun. 4, 36-52 (2013). https://doi.org/10.4018/jehmc.2013070103

NIH, N.I. of H.: Temas Científicos, https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos

Paredes, L.: Template matching with phase dependent multiple templates for 3D tracking using cine MRI, (2016)

Capítulo 2. Estado del arte

El seguimiento de objetos es una tarea muy importante dentro del campo de la visión por computador. En la literatura se mencionan diversos usos del seguimiento en video (Forsyth y Ponce 2003; Hammoud 2006; Yilmaz et al. 2006) relacionados con la navegación de vehículos, seguridad y vigilancia, control de tráfico, interacción humano-computador, entre otros, aunque también es popular en áreas científicas como la biología y la medicina (Kang 2007). Por ejemplo, dentro de la ingeniería biomédica se analizan secuencias de imágenes para estudiar la evolución de tejidos, el crecimiento de películas, el movimiento de organismos unicelulares, entre otras aplicaciones (Li 2016). De esta forma, un objeto puede definirse en el ámbito de la visión por computador como todo aquello que aparezca en una secuencia de video y que sea de interés para un análisis posterior (Challa et al. 2011).

Los objetos pueden tener diferentes características y se puede afirmar que, en un sentido general, hacer seguimiento consiste en medir, registrar y analizar en cada instante el valor de las características que describen la dinámica de cada objeto, es decir, que evolucionan en el tiempo. Según Yilmaz et al. (Yilmaz et al. 2006) seguir un objeto consiste, en términos simples, en determinar la trayectoria que describe el objeto en el plano de la imagen cuando se mueve en un escenario del mundo real. No obstante, el seguimiento se puede realizar sobre cualquier característica dinámica del objeto y no exclusivamente sobre aquellos parámetros que describen su movimiento. Así, al seguir un objeto no solamente se puede describir la trayectoria de uno o varios puntos representativos del mismo, sino también se puede analizar la evolución de su forma, su color, su textura, etc.

Por otra parte, seguir objetos en secuencias de imágenes digitales usualmente no se considera como una tarea sencilla. Existen varios aspectos que limitan el desempeño de un sistema de seguimiento y pueden significar fuentes de error o dificultades a superar (Li et al. 2013; Yilmaz et al. 2006) como los siguientes:

- **Presencia de oclusiones.** Las imágenes digitales se forman a partir de la proyección en un plano bidimensional de eventos que ocurren en un mundo tridimensional, lo cual implica prescindir de la dimensión profundidad y, por lo tanto, una pérdida significativa de información. Esto puede evidenciarse en la presencia de oclusiones entre distintos objetos de la escena, es decir, cuando un objeto pasa por detrás de otro y temporalmente se tiene una vista parcial del mismo o se oculta por completo.

- **Fuentes de ruido.** Los sistemas de adquisición de las imágenes siempre están acompañados de fuentes de ruido interno (fluctuaciones en los componentes electrónicos) o externo (cambios no previstos de iluminación) que generan variaciones en los niveles de intensidad distribuidos aleatoriamente en el plano

imagen y fluctuantes en el tiempo. El ruido en cada imagen supone dificultades para la detección de los objetos de interés, para identificar su posición, encontrar sus bordes, determinar su forma o medir cualquier otra característica. Por otra parte, las fluctuaciones temporales pueden generar movimientos aparentes, por ejemplo, al desplazarse los patrones de brillo o sombra que se observen en las superficies presentes en la escena.

- **Aleatoriedad de los movimientos.** Los objetos a seguir no siempre se mueven de manera predecible. El ruido de las imágenes y la naturaleza de los objetos a seguir proporcionan fluctuaciones e incertidumbre en la localización de los mismos. Por ejemplo, es poco probable que un automóvil se mueva en una autopista con variaciones significativas en su rapidez y en su dirección entre cuadro y cuadro en un video, pero diversos tipos de bacterias o partículas microscópicas suspendidas en fluidos presentan movimientos aleatorios (movimiento browniano) o cuasi-aleatorios.

- **Complejidad de los objetos.** Las formas complejas de los objetos o la presencia de partes articuladas pueden dificultar su detección completa o puede requerir de modelos muy complejos para describir su evolución en el tiempo. En muchas ocasiones, disponer de una detección parcial del objeto no garantiza conocer el estado de la porción oculta del modelo, lo cual puede acarrear ambigüedades al momento de realizar el análisis de su dinámica.

- **Requerimientos de procesamiento en tiempo real.** Si bien las tecnologías actuales de procesamiento de información permiten realizar operaciones muy complejas en pequeñas fracciones de segundo, aún se requiere aplicar métodos para la optimización de recursos computacionales, gestión de memoria o simplificar los modelos matemáticos empleados con el fin de detectar, rastrear y analizar el movimiento desde uno hasta cientos o miles de objetos a la vez en numerosas aplicaciones que precisan de un procesamiento *online.*

En conclusión, cualquier aplicación que realice seguimiento en video debe llevar a cabo tres etapas importantes: detectar los objetos de interés presentes en la escena y modelarlos matemáticamente; seguir o rastrear tales objetos cuadro a cuadro para determinar su trayectoria o camino al moverse; y analizar las trayectorias obtenidas para obtener características de interés y realizar reconocimiento de patrones. Algunos autores como Ragland y Tharcis (Ragland y Tharcis 2014) agregan una subetapa de clasificación de objetos posterior a la detección, la cual es útil cuando se realizan análisis semánticos, por ejemplo, al estudiar las interacciones entre objetos. Cada etapa trae sus propias dificultades y se debe elegir la técnica más adecuada para abordar cada problemática según la aplicación en la cual se desarrolle el sistema de seguimiento.

En las siguientes secciones se presentan técnicas representativas de cada una de las etapas mencionadas, y en los capítulos posteriores se evaluarán los posibles usos de dichas técnicas en las aplicaciones biomédicas desarrolladas.

2.1. Detección de objetos

El método a elegir para la detección depende en gran medida del tipo de objeto a seguir y sus características en la secuencia de video: tamaño, forma, color, textura, tipo de movimiento, etc. No obstante, también existen otras consideraciones que deben tenerse en cuenta para su elección. Por ejemplo, Hammoud (Hammoud 2006) menciona dos condiciones deseables para la detección de objetos: la detección debe hacerse de forma automática en vez de interactiva y la cámara debe permanecer fija o realizar movimientos simples, controlados y conocidos, que fácilmente se puedan restar al analizar el movimiento de los objetos de interés.

Existen diferentes técnicas para detectar objetos en una secuencia de video (Sukanya et al. 2016; Yilmaz et al. 2006), que incluyen métodos de detección estáticos (cuadro a cuadro) o aquellos que relacionan el cuadro actual con los cuadros de los instantes previos. A continuación, se exponen las categorías contempladas:

- **Detectores de puntos:** Estos métodos se enfocan en localizar puntos de interés que tienen características expresivas de sus vecinos. Una cualidad deseable de un punto de interés es su invariancia a cambios en la iluminación y punto de vista de la cámara. A continuación, se presenta una síntesis de algunos métodos representativos de esta categoría.

  El algoritmo de Moravec busca variaciones de intensidad en cuatro direcciones: horizontal, vertical y diagonales, mediante una ventana deslizante (Moravec 1979). Se calculan similitudes mediante la suma de diferencias cuadradas (SDC). Luego se toma el mínimo entre las cuatro SDC y se dice que existe un punto interesante si dicho valor es un máximo local en un vecindario. Este método presenta algunos inconvenientes con su respuesta anisotrópica debido a que se considera un conjunto discreto de orientaciones cada 45 grados.

  El método de Harris y Stephens, basado en el de Moravec, expande analíticamente la expresión de la similitud y aproxima derivadas parciales con el fin de asegurar la isotropía (Harris y Stephens 1988). También utiliza una ventana Gaussiana y circular para hacer suavizado y atenuar el ruido en lugar de una ventana binaria y rectangular. Finalmente, reformula la expresión de la similitud y el problema de optimización se puede resolver mediante valores propios. En función de dichos valores propios, la región detectada será una zona uniforme, un borde o una esquina.

  Mikolajczyk y Schmid presentan un método para detectar puntos invariantes a transformaciones afines, que pueden sufrir cambios tanto en la localización como en

la escala y la forma del vecindario de un punto (Mikolajczyk y Schmid 2002). Un detector de Harris adaptado a transformaciones afines determina la localización de puntos de interés. Se usa una versión multiescala de este detector como inicialización. Luego, un algoritmo iterativo modifica la posición, la escala y vecindario de cada punto y converge a puntos invariantes a transformaciones afines.

Lowe presenta el método SIFT (*Scale Invariant Features Transform* – en inglés) para extraer puntos característicos, invariantes a la escala y la rotación, distintivos en imágenes, que se pueden utilizar para llevar a cabo un emparejamiento robusto entre diferentes vistas de un objeto o escena a través de un rango sustancial de distorsiones afines, cambios en los puntos de vista en tres dimensiones, adición de ruido, y cambios en la iluminación (Lowe 2004).

Feichtenhofer y Pinz propusieron una metodología para evaluar si la trayectoria de cada punto se sigue adecuadamente cuadro a cuadro mediante su algoritmo denominado Monitor Espacio Temporal (Feichtenhofer y Pinz 2013). La trayectoria se obtiene mediante técnicas de emparejamiento de puntos por descriptores invariantes (por ejemplo, SIFT o basados en flujo óptico), pero sus resultados presentan mejor desempeño con el método que ellos proponen en el mismo trabajo, denominado Histograma de Magnitudes Orientadas (HOM, en inglés). El descriptor de HOM tolera ligeras deformaciones y rotaciones del objetivo de seguimiento, debido a los ajustes flexibles de los filtros utilizados.

- **Técnicas de segmentación:** Segmentar una imagen consiste en dividirla en regiones para poder analizarlas por separado, lo cual permite en varias ocasiones separar los objetos de interés que se encuentran en la escena. La partición de la imagen puede realizarse usando diferentes técnicas: por aplicación de umbrales, por detección de bordes, mediante métodos de *clustering*, entre otros.

  La aplicación de umbrales homogéneos o adaptativos representa un conjunto de técnicas en las cuales se obtiene una imagen binaria a partir de una imagen en niveles de gris preprocesada, en la cual se resaltan los objetos de interés. Se tiene como referencia el método de Otsu (Otsu 1979), el cual permite seleccionar automáticamente el umbral óptimo uniforme de una imagen en escala de grises (Di Caprio et al. 2014; Zhao et al. 2015). No obstante, algunos trabajos fijan el umbral sin buscar un valor óptimo, por la simplicidad del problema (Buchelly Imbachí et al. 2011; Gárate 2015; Hidayatullah et al. 2015) o por minimizar el costo computacional (Ferrin Bolaños y Buchelly Imbachí 2010), y en otras aplicaciones se utiliza un umbral adaptativo en lugar de un umbral uniforme (Zhu et al. 2007). También se pueden utilizar técnicas de umbralado con imágenes a color, aplicando un procesamiento marginal, es decir, procesando cada canal por separado y combinando mediante operaciones lógicas las imágenes binarias obtenidas (Buchelly Imbachí et al. 2016a).

También es común detectar bordes para segmentar los objetos en el ámbito de los sistemas de seguimiento. Existen detectores clásicos de bordes cuadro a cuadro basados en umbrales (Canny 1986; Giai-Checa et al. 1994), o enfoques más complejos como los *snakes* o contornos activos. Estos últimos consisten en curvas definidas matemáticamente, denominadas *splines*, y tienen la capacidad de deformarse de acuerdo con los campos de fuerza que actúen sobre ellos, bajo una condición de mínima energía. A este grupo pertenece el método de Caselles *et al*. (Caselles et al. 1997), que se basa en la relación entre los contornos activos y el cómputo de geodésicas o curvas de mínima distancia; también se tiene el modelo de fuerza externa llamada Flujo Vectorial del Gradiente para contornos activos (Xu y Prince 1998) que ofrece un buen manejo a la inicialización de los contornos y a su adaptación a las concavidades; y el método de segmentación de secuencias de imágenes de Fekir y Benamrane (Fekir y Benamrane 2014), en el cual se define un funcional de energía para detectar el objeto de interés en el primer cuadro, y el snake final se utiliza como el snake inicial para la siguiente imagen, entre otros métodos.

Los métodos de *clustering* también se pueden utilizar para segmentar imágenes, mediante la búsqueda de diferentes grupos en un conjunto de datos y sus prototipos o valores representativos (Bigun 2006). Para esto se debe definir una medida de similitud (o disimilitud), como se describe en el capítulo 3, y se debe elegir un criterio para el agrupamiento con el fin de encontrar una partición del espacio de características de la imagen (color, textura, etc.) en subconjuntos que representan regiones bidimensionales. En este contexto son usuales las técnicas particionales como *k*-medias (Kompatsiaris et al. 2000), métodos basados en grafos (Shi y Malik 2000), *clustering* difuso (Comas et al. 2017; Comas 2016); o técnicas basadas en kernel (Comaniciu y Meer 2002), entre otros.

Finalmente, existen otras técnicas de segmentación de imágenes estáticas; por ejemplo, Kirubarajan *et al*. (Kirubarajan et al. 1997) hacen la detección de células de ojo y del cerebro en secuencias de imágenes mediante el método *Split and Merge*. Sin embargo, no todas las técnicas de segmentación son aplicables para los sistemas de seguimiento debido a su alto costo computacional. Además, el grado de automatización debe ser alto, sobre todo para la identificación inicial de los objetos de interés en la secuencia, por ejemplo, la técnica *Watershed* puede utilizarse con selección automática de marcadores (Gonzalez 2008), en contraste con la selección manual (Ravanfar y Moradi 2011).

- **Modelado y sustracción del fondo:** La técnica general consiste en determinar un modelo del fondo o un fondo promedio, y obtener la distancia o diferencia entre la imagen en el instante actual y dicho modelo. Es usual que se actualice a cada instante el modelo del fondo en las zonas donde no se detectan objetos para que el método sea robusto frente a cambios de iluminación. Existen diferentes enfoques para modelar el fondo en una escena y diferenciarlo de los objetos móviles, de los cuales se resumen algunos a continuación.

Stauffer y Grimson (Stauffer y Grimson 2000) desarrollaron el método de mezcla de Gaussianas para la segmentación de movimiento: cada píxel genera una serie temporal de escalares o vectores según si la imagen es en escala de grises o en color; así, ese píxel puede generar uno o varios clústeres según la cantidad de modas que se presenten. La distribución de probabilidad para dicha señal se puede modelar como la combinación lineal de las distribuciones Gaussianas encontradas y un valor presentado en la posición del píxel se clasificará como fondo u objeto móvil de acuerdo con la moda más cercana.

Oliver *et al*. (Oliver et al. 2000) presentan la técnica *Eigenbackground substraction* (sustracción del fondo propio). En ella se toman N cuadros y se calcula la media del fondo y su matriz de covarianza. Esta matriz de covarianza se puede diagonalizar por medio de la descomposición en valores propios. Con el fin de reducir la dimensionalidad del espacio, en análisis de componentes principales (PCA) se conservan solamente M vectores propios (fondos propios) correspondientes a los M valores propios más grandes. Debido a que los objetos móviles no aparecen en el mismo lugar y ellos típicamente son pequeños no contribuyen significativamente a este modelo. En consecuencia, las regiones que contienen objetos móviles no pueden ser bien descritas, mientras que las porciones estáticas se pueden describir con precisión. Posteriormente, la detección de los objetos se realiza mediante la sustracción entre las imágenes y el modelo del fondo, y se aplica un umbral para generar una máscara.

Elgammal *et al*. (Elgammal et al. 2002) utilizan un estimador no paramétrico de densidad de probabilidad del valor de la señal de cada píxel mediante un kernel Gaussiano. En este método, se toman las últimas N imágenes de la secuencia y se evalúa la probabilidad de ocurrencia de dicho valor mediante la aplicación de un umbral. Teniendo en cuenta que la mayor parte del tiempo debe ocurrir algún valor de nivel de gris o de color correspondiente al fondo, entonces un valor muy bajo de la probabilidad calculada hará referencia a que dicho valor corresponde a una región en movimiento.

Monnet *et al*. (Monnet et al. 2003) presentan un mecanismo de predicción que determina el cuadro actual usando las últimas k imágenes observadas. Tal mecanismo se ejecuta en el espacio de estados, donde los vectores base de dichos estados corresponden a la convolución entre filtros lineales y la imagen actual. De esta forma, la imagen esperada se determina mediante una combinación lineal de los k estados previos. Algunos cambios en la iluminación local o global, cambios de posición de las fuentes de luz, entre otros pueden manejarse actualizando dinámicamente el modelo predictivo de acuerdo con los cambios en la escena. Dicha actualización se lleva a cabo calculando una media amnésica, la cual tiene como objetivo reducir el efecto de las muestras pasadas. Finalmente, la detección se realiza comparando la imagen resultado de la predicción y la imagen actual.

Kim *et al*. (Kim et al. 2005) proponen el método de *codebooks*. El algoritmo adopta una técnica de cuantización para construir un modelo de fondo en secuencias de observación largas. Para cada píxel, el algoritmo construye un *codebook* o libro de códigos el cual consta de una o más *codewords* o palabras clave. Las muestras en cada píxel se agrupan en las palabras clave de acuerdo con una métrica de distorsión de color junto con unos límites de brillo. No todos los píxeles tienen el mismo número de palabras clave. Los grupos representados por palabras clave no necesariamente corresponden a una única Gaussiana o a otra distribución paramétrica. Aun si la distribución en un píxel fuera normal, podría haber varias palabras clave para ese píxel. El fondo se codifica en una base píxel a píxel. La detección involucra evaluar la diferencia de la imagen actual con el modelo del fondo respecto a diferencias de color y brillo. Si un nuevo píxel entrante cumple dos condiciones, es clasificado como fondo: la distorsión del color respecto a alguna palabra clave es menor que el umbral de detección, y su brillo está comprendido en el rango de brillo de esa palabra clave. En otro caso, se clasifica como objeto móvil.

En el método de Xue *et al*. (Xue et al. 2012) cada imagen de la secuencia se convoluciona con un banco de filtros de Gabor con el fin de obtener información sobre la fase de la señal temporal de cada píxel. Posteriormente, se obtiene la estadística del fondo en la secuencia respecto a la característica de fase y se aplica un umbral a la diferencia entre la fase de la imagen actual y la estadística del fondo para obtener una imagen binaria con la detección de los movimientos. Finalmente, la detección se refina aplicando una transformación distancia a los *blobs* encontrados para eliminar falsos positivos y falsos negativos productos del ruido.

- **Uso de clasificadores:** Con frecuencia se entrenan clasificadores pertenecientes al paradigma de los métodos supervisados para reconocer elementos de interés. Entre los clasificadores tradicionales más utilizados para detección de objetos se encuentran las máquinas de soporte vectorial (siglas SVM en inglés), las redes neuronales o los clasificadores basados en *boosting* adaptativo. Un enfoque común consiste en la clasificación de cada píxel como perteneciente al objeto de interés o al fondo, al conocerse previamente la apariencia del objeto a identificar, es decir, los patrones de características de color y textura, entre otras, que se encuentran en su interior. Como ejemplo, Khan presenta una compilación de aplicaciones de detección mediante redes neuronales para segmentación (Khan 2014).

  La ventana de entrada del clasificador generalmente tiene un tamaño fijo. Por ejemplo, Sowmiya *et al*. presentan un método que obtiene descriptores de la imagen a partir del histograma de gradientes orientados y detecta zonas rectangulares que contienen a una persona mediante una ventana fija deslizante y una máquina de soporte vectorial (Sowmiya et al. 2013). Sin embargo, diversos clasificadores realizan una detección multiescala al redimensionar la imagen de forma reiterada. A continuación, se mencionan algunos trabajos que utilizan esta metodología.

Rowley *et al*. utilizan una metodología basada en redes neuronales artificiales para la detección de rostros (Rowley et al. 1998). La imagen original se escala iterativamente, se muestrean regiones cuadradas de tamaño fijo (20 x 20 píxeles) y luego dichas regiones se procesan hasta obtener un histograma ecualizado. En la capa de entrada de la red neuronal se toman todos los datos y se distribuyen a diferentes capas ocultas que analizan bloques de diferente tamaño.

Papageougiou y Oren presentan un método para detectar objetos en varias escalas en escenas con fondo aleatorio, en el cual se obtienen descriptores de Haar de la imagen y se clasifican utilizando una máquina de soporte vectorial (Papageorgiou y Oren 1998). El método se aplicó en detección de rostros y personas en imágenes estáticas. Los autores presentan una generalización del método para aplicarse en secuencias de video: en ella se utiliza la información de la detección en los cuadros previos para localizar de manera más robusta los objetos de interés en los instantes posteriores.

Viola y Jones proponen el método de *boosting* adaptativo (*AdaBoost*) para la detección de objetos, el cual consiste en tomar un conjunto de clasificadores "débiles" en cascada para conformar un clasificador robusto y efectivo (Viola et al. 2003; Viola y Jones 2001). De manera similar al método de Papageorgiou y Oren, el método de Viola y Jones analiza la imagen integral mediante características de Haar direccionales, que se toman como entrada a la cascada de clasificadores. En la actualidad, este método es uno de los más empleados a nivel mundial para la detección de objetos.

- **Detectores basados en movimiento:** La sustracción temporal detecta regiones de movimiento mediante la diferencia entre cuadros consecutivos. Además, suele acompañarse de métodos para eliminar falsas detecciones cuando se toma el valor absoluto de la diferencia de los cuadros (Abdelli y Choi 2017; Jeong et al. 2014; Lipton et al. 1998). Este método es altamente adaptable a los ambientes dinámicos, pero generalmente falla al intentar extraer formas completas de ciertos tipos de objetos. Con frecuencia se utiliza este método como etapa previa para el cálculo del flujo óptico (Lu et al. 2008).

  Por otra parte, los métodos que calculan el flujo óptico permiten determinar por separado las componentes del campo de velocidades del desplazamiento de los patrones de brillo en la escena. En el capítulo 3 se mencionan las consideraciones físicas y computacionales comunes para el cálculo de los vectores de flujo óptico y su uso en los métodos de detección y seguimiento de objetos. A continuación, se mencionan algunos métodos para determinar los vectores de flujo:

  Horn y Shunck establecen restricciones de suavidad, es decir que el campo de velocidad varía suavemente en casi toda la imagen (Horn y Schunck 1981). En una escena se observan comúnmente objetos opacos de tamaño finito que experimentan movimientos rígidos o deformaciones, en lugar de píxeles aislados con variaciones de brillo independientes. El proceso de cálculo del flujo óptico se hace de manera

iterativa minimizando una medida de error del flujo en cada punto respecto a la media en una vecindad. En algunas regiones no se puede determinar el flujo y debe completarse por medio de interpolaciones, por ejemplo, en los puntos donde el gradiente del brillo es cero. Se pueden presentar discontinuidades en el flujo donde un objeto ocluya a otro. Se espera que el algoritmo basado en la restricción de suavidad tenga dificultades para determinar el flujo en los bordes en oclusión.

Lucas y Kanade proponen un método de registración en el cual se encuentra una expresión general para la disparidad de cada dato entre dos señales en un espacio *n*-dimensional (Lucas y Kanade 1981). Para el caso de las imágenes el espacio es bidimensional y se puede interpretar la disparidad como un desplazamiento local.

Le *et al*. presentan una técnica para estimar el flujo óptico en una secuencia de imágenes basada en un modelo afín a trozos (Le et al. 2003). Inicialmente se localizan puntos de interés tomando como candidatos los bordes obtenidos con el detector de Canny. Luego se hace la correspondencia cuadro a cuadro entre los puntos seleccionados. Posteriormente, se forma una red de triángulos con los puntos encontrados. El campo de velocidad dentro de cada sector triangular se parametriza por una función afín. Se incrementa la robustez del método y la precisión del flujo óptico al repetirse el procedimiento en múltiples escalas. Finalmente, se aplica un filtro adaptativo para refinar el campo del flujo, es decir, para reducir el ruido y evitar discontinuidades.

Lu *et al*. muestran una aplicación del método de Lucas y Kanade en la cual calculan el flujo óptico como el mapa de disparidad generado por la registración de dos imágenes consecutivas en una secuencia de video (Lu et al. 2008). Para encontrar las dos componentes de la velocidad, se analiza una vecindad de cada píxel de la imagen y se resuelve un sistema sobredeterminado de ecuaciones bajo la hipótesis que todos los puntos de esa vecindad presentan un flujo uniforme, obteniéndose una solución por mínimos cuadrados.

Dependiendo del método de detección elegido, se pueden conocer todos los puntos de la imagen que corresponden a un objeto o, por lo menos, se puede conocer un punto representativo del mismo y una vecindad, de tal forma que sea posible identificarlo en los cuadros sucesivos. Cabe mencionar que la detección de los objetos no siempre es el primer paso en todos los casos; el orden puede variar dependiendo de la aplicación, siendo primero la detección del objeto y luego el análisis del movimiento o viceversa, pero en las aplicaciones estudiadas en esta tesis se utilizó el enfoque clásico de seguimiento por detección (*tracking by detection*).

En el capítulo 3 se discutirá sobre el uso potencial de diferentes técnicas de detección aplicadas al análisis de movimiento en las diferentes secuencias e imágenes biomédicas estudiadas.

2.2. Modelado y caracterización de los objetos

Luego de detectar los objetos de interés presentes en la escena es necesario determinar cómo se van a representar o qué tipo de modelo es el más adecuado para llevar a cabo su seguimiento. La representación de los objetos puede ser simple o compleja dependiendo de la aplicación. También se debe tener en cuenta que la representación de los objetos está dada tanto por su forma como por su apariencia.

Según la forma, es común encontrar los siguientes modelos de representación (Yilmaz et al. 2006):

- **Puntos:** Se puede obtener una nube de puntos en la imagen mediante algún detector y agruparlos en clústeres según su similitud en sus trayectorias para definir cuáles puntos corresponden a cada objeto (Sadeghi-Tehran et al. 2014). Sin embargo, es más frecuente la representación de cada objeto mediante un único punto representativo, generalmente su centroide o centro de masa (Ferrin Bolaños y Buchelly Imbachí 2010; Gárate et al. 2015; Lei et al. 2016).

- **Formas geométricas simples:** Es frecuente representar la forma de los objetos mediante formas geométricas básicas cuando la aplicación no requiere una información precisa de la silueta del objeto, sino que busca algunas características generales como su ubicación en la imagen y su tamaño, con el fin de evaluar su dinámica respecto a transformaciones afines como traslaciones, rotaciones o cambios de escala. Usualmente se modelan los objetos como rectángulos (Blasch et al. 2013; Elafi et al. 2018; Jiancheng et al. 2013; Yu-bing et al. 2013), bien sea porque el método de detección, generalmente un clasificador, localiza las ventanas rectangulares que los contiene, o porque el esquema de seguimiento requiere esta representación para hacer localización de *kernel* mediante su apariencia. Los objetos también suelen representarse como elipses cuando se requiere determinar su orientación (Karthikeyan et al. 2012).

- **Contornos y siluetas:** Estas representaciones son adecuadas para modelar objetos con una forma compleja que cambia en el tiempo, es decir, su dinámica puede corresponder a la de cuerpos deformables no-rígidos. En particular, se pueden citar métodos que hacen una detección y actualización de los contornos cuadro a cuadro (Fekir y Benamrane 2014; Isard y Blake 1998; Lucena 2003). Tales objetos son detectados generalmente mediante alguna técnica de segmentación o sustracción de fondo, de tal forma que su silueta quede bien definida en cada cuadro de la secuencia de video (Priyadharshini et al. 2013).

- **Modelos articulados y modelos múltiples:** En algunos sistemas de seguimiento se requiere identificar en cada instante la posición relativa de las partes que constituyen un objeto, las cuales se unen entre sí mediante articulaciones (Lucena 2003; Yang

et al. 2014). Tales segmentos se modelan como objetos rígidos y los grados de libertad de sus movimientos están limitados.

También existen alternativas a los modelos articulados con el fin de estudiar el movimiento de las partes rígidas del objeto por separado sin tener en cuenta la interacción entre ellas o las restricciones debidas a sus grados de libertad. Entre los métodos alternativos están los modelos múltiples (Jepson et al. 2002; Lucena et al. 2009), en los cuales cada segmento se modela como una forma simple que se sigue independientemente de las demás.

- **Modelos esqueléticos:** A diferencia de los modelos articulados o los modelos múltiples, con un modelo esquelético se pueden representar, por ejemplo, objetos que tienen una cantidad de extremidades, apéndices o ramas determinada, pero estas partes no son necesariamente rígidas (Buchelly Imbachí y Pencue Fierro 2009). El esqueleto de un objeto se puede obtener a partir de su silueta mediante las transformaciones de esqueletización o adelgazamiento (Serra 1982).

Por otra parte, se puede definir la apariencia de los objetos como el conjunto de características que describen su contenido visual, es decir, sus patrones internos de color, textura, gradiente, puntos de interés, etc.

La representación de la apariencia de los objetos en los sistemas de seguimiento requiere de dos elementos: la representación visual de los objetos y su modelado estadístico (Li et al. 2013). El primero hace referencia a qué tipo de rasgos visuales se debe utilizar para describir la apariencia: los rasgos locales están definidos por puntos o bordes que constituyen una distribución espacial definida, mientras que los rasgos globales generalmente representan las variaciones de alguna característica de la imagen. En la literatura se encuentran diferentes representaciones de apariencia de objetos mediante rasgos locales como: múltiples puntos (Dufrenois y Hamad 2007; Sadeghi-Tehran et al. 2014; Shin et al. 2005) o segmentos de recta (Giai-Checa et al. 1994). Por otra parte, el segundo elemento se refiere a la construcción de modelos matemáticos para la descripción estadística de los objetos, generalmente mediante rasgos globales.

A menudo, el modelo elegido para representar la apariencia de los objetos se determina por el modelo de la forma, puesto que algunas representaciones de forma permiten apreciar mayor contenido visual que otros. Por lo anterior, la representación de la apariencia puede realizarse desde diferentes enfoques, de los cuales se pueden destacar los siguientes:

- **Plantillas:** Se toma una ventana de la imagen original, generalmente rectangular, que contiene al objeto de interés, el cual puede estar representado por rectángulos, elipses o siluetas (Yilmaz et al. 2006). Las plantillas pueden contener los valores de los píxeles sin procesar de la ventana completa (Lipton et al. 1998; Yang et al. 2014; Yu-bing et al. 2013), los píxeles sin procesar del interior de su silueta (Azari et al. 2011),

píxeles sin procesar pesados por alguna distribución de probabilidad (Tao et al. 2002; Zhou y Tao 2004), entre otros.

Las plantillas pueden compararse mediante medidas de similitud píxel a píxel. No obstante, el uso directo de los niveles de gris o de las componentes de color sin procesar puede traer consigo dificultades cuando hay cambios de escala, de orientación del objeto o cuando la escena sufre diferentes transformaciones geométricas. Para tratar con estas dificultades, suele describirse el contenido de la plantilla mediante matrices de coocurrencia en niveles de gris o en color (Elafi et al. 2018), las cuales son un resumen de la forma en que los valores de los píxeles ocurren al lado de otro valor en una pequeña ventana. De esta forma, las matrices de coocurrencia pueden utilizarse para obtener descriptores de la textura presente en dicha ventana (Presutti 2004).

- **Funciones Densidad de Probabilidad (*fdp*):** estos modelos cuantifican la probabilidad de ocurrencia de un determinado valor dentro de la vecindad de un punto, en una ventana rectangular o elíptica, o en el interior del objeto delimitado por su silueta o contorno. Generalmente, las *fdp* se modelan como histogramas de brillo (Xie et al. 2009) o de color (Comaniciu et al. 2003; Jaward et al. 2006; Oliver et al. 2000; Santhoshkumar et al. 2013). Los histogramas de los valores de la imagen en una ventana o región, al igual que las matrices de coocurrencia, poseen propiedades de invariancia ante algunas transformaciones geométricas, lo cual los hace útiles para localizar objetos en diferentes escalas u orientaciones.

- **Modelos discriminativos:** se utilizan para señalar los puntos de la imagen donde se encuentran los objetos de interés y diferenciarlos del fondo, independientemente de su modelo de forma (Bunyak et al. 2007; Jeong et al. 2014; Kirubarajan et al. 1997; Liu et al. 2011; Liu et al. 2013). Su representación usual es mediante imágenes binarias y se puede obtener mediante alguna técnica de segmentación, como las mencionadas en el capítulo 3, o como producto del uso de algún clasificador para la detección. Este modelo es frecuentemente utilizado como herramienta para la detección y solución de casos de oclusión, mediante el análisis de la fusión o la separación de las siluetas.

- **Modelos generativos de subespacios:** permiten descomponer una plantilla de referencia en una combinación de plantillas base. De esta forma, mediante algún método de reducción de dimensionalidad es posible modelar el objeto, no por su apariencia completa sino por alguno de sus subespacios subyacentes (Li et al. 2013; Yilmaz et al. 2006).

- **Fusión de múltiples modelos:** esta metodología tiene como objetivo mejorar la robustez de los sistemas de seguimiento, es decir, obtener una representación de los objetos más completa y una localización más confiable de los mismos. Así, por ejemplo, pueden mencionarse combinaciones entre distribuciones espaciales de color

y características locales (Priyadharshini et al. 2013), distribuciones de color y vectores de descriptores de textura (Brasnett et al. 2005), valores de los píxeles de la imagen e histogramas (Prokaj et al. 2011), y fusión de mapas de características de diferente naturaleza: plantilla e histograma de intensidad, descriptores de magnitud y orientación del gradiente, autovalores y auto vectores descriptores locales de forma, histograma de descriptores de textura, mapa discriminativo obtenido mediante clasificador, etc. (Palaniappan et al. 2010; Pelapur et al. 2012a; Pelapur et al. 2012b)

También es importante conocer las características de los objetos en los sistemas de seguimiento, las cuales se extraen de acuerdo con los modelos de representación de forma y apariencia. Algunas características serán útiles para analizar la evolución del modelo dinámico (variables de estado), para estimar el estado del objeto en un instante futuro (predicción) y otras características permitirán llevar a cabo la correspondencia entre los objetos conocidos y las nuevas medidas (asociación). De esta manera se puede afirmar que las características extraídas deben ser representativas de los objetos, es decir, deben permitir diferenciar cada objeto de los demás (Yilmaz et al. 2006).

Las características de los objetos ya detectados serán subconjuntos de las características presentes en el dominio de la imagen, como lo menciona Kang (Kang 2007), limitados por la forma de los mismos, que a menudo se representa por puntos aislados, curvas continuas o regiones conexas, como se explicó en la sección anterior. De esta manera, se mencionan algunas características que pueden ser útiles para identificar y rastrear los objetos de interés en los sistemas de seguimiento (Bigun 2006; Lucena 2003; Yilmaz et al. 2006):

- **Descriptores de forma:** Se pueden obtener valores que permiten caracterizar la forma de los objetos, ya sean descriptores simples como el área, perímetro, circularidad o compacidad, entre otros, o también se pueden calcular momentos estadísticos más complejos que pueden tener propiedades interesantes como la invariancia a transformaciones geométricas.

- **Gradiente:** El cálculo del gradiente de la intensidad como campo vectorial permite identificar la presencia de contornos de los objetos o caracterizar la apariencia de su interior al detectarse valores altos en el mapa de magnitudes, o también se puede conocer la orientación de dichos bordes al obtener su dirección.

- **Color:** Para describir el color en las imágenes, se utiliza un vector de tres componentes para cada píxel. La elección de un espacio de color depende de la aplicación específica. El espacio de color RGB (*Red, Green, Blue*, en inglés) es el más utilizado para representar el color. Sin embargo, las diferencias de color en este espacio no corresponden a las diferencias de color percibidas por los seres humanos. En contraste, existen espacios de color perceptualmente uniformes como el espacio L*u*v* y el espacio L*a*b*, o aproximadamente uniformes como el espacio HSV (*Hue, Saturation, Value,* en inglés). Sin embargo, estos espacios de color son sensibles al ruido.

- **Desplazamiento:** Esta información se obtiene de los mapas de flujo óptico y puede ser útil para determinar regiones en la imagen donde ocurren movimientos, para hacer la predicción de posiciones futuras de los objetos o para establecer correspondencias entre los objetos conocidos y las detecciones actuales.

- **Textura:** Es una medida de la variación de intensidad de una superficie, cuantificando propiedades como la suavidad y la regularidad. Existen diferentes enfoques para la descripción de la textura, que difieren en su fundamento matemático y en su costo computacional, que pueden emplearse como características para el seguimiento.

En el capítulo 4 se mencionarán las representaciones de los objetos en las aplicaciones desarrolladas y se describirán algunas características extraídas a partir de los modelos de forma y apariencia utilizados.

2.3. Métodos de seguimiento

Los vectores de estado obtenidos para cada objeto se pueden utilizar para los propósitos del seguimiento, al llevar a cabo la predicción de los estados actuales y al realizar la asociación entre el estado estimado en el instante anterior y las nuevas medidas. En general, el seguimiento es más fácil y más rápido que la detección de objetos, ya que el estado del objeto se conoce en el cuadro anterior, y el procedimiento para realizar la búsqueda en el cuadro actual es generalmente local (en un entorno del objeto) en lugar de global (Hammoud 2006). En el capítulo 5 se adoptará un enfoque probabilístico para formalizar los métodos de seguimiento utilizados.

En primer lugar, los métodos de predicción se utilizan para estimar de forma precisa las regiones donde se localizan los objetos de interés cuando el nivel de aleatoriedad de los movimientos no afecta significativamente la tendencia que ellos describen en sus trayectorias. Desde el enfoque probabilístico, existen numerosas técnicas de predicción del estado de cada objeto en la escena, entre las cuales se destacan los filtros de Kalman (Hong et al. 2018; Rodríguez-Montaña y Roa-Guerrero 2017), los filtros de partículas (Amrouche et al. 2017; Blasch et al. 2013; Elafi et al. 2018), flujo óptico (Cheng y Ting 2012; Sadeghi-Tehran et al. 2014; Shin et al. 2005), entre otros. En las siguientes secciones se describirán brevemente los métodos de filtrado más comunes y también se hará mención al uso del flujo óptico como característica que permite estimar las posiciones de los objetos.

Debe recordarse que en la literatura también se encuentran sistemas de seguimiento que prescinden de modelos explícitos de predicción por diferentes razones, entre ellas:

- Se cuenta con condiciones favorables para detectar y seguir un único objeto (Buchelly Imbachí et al. 2011; Fekir y Benamrane 2014; Ordoñez et al. 2017).

- La apariencia de los objetos permite localizarlos de forma fácil, generalmente en seguimiento de kernel (Cai et al. 2016; Chi et al. 2017).

- La predicción se lleva a cabo de forma simultánea con la correspondencia temporal, o como parte de algún proceso de optimización (Karthikeyan et al. 2012; Magnant et al. 2016).

- La variabilidad en la dirección del movimiento genera alta incertidumbre en la estimación de los estados (Arasteh et al. 2018).

En segundo lugar, los sistemas de seguimiento tradicionales tienen en cuenta los modelos de representación de los objetos, ya que el modelo de la forma limita los tipos de movimientos que pueden llevar a cabo (Yilmaz et al. 2006). Así, usualmente se consideran métodos de seguimiento de puntos, seguimiento de *kernel* y seguimiento de siluetas como se describe a continuación:

- **Seguimiento de puntos:** Estos esquemas de seguimiento utilizan la información sobre la localización de los puntos que componen el modelo y sus características de movimiento. De esta forma, pueden encontrarse métodos de correspondencia que utilizan distintos criterios para asignar un único vector de medidas a cada trayectoria, entre los cuales se pueden mencionar los siguientes:

  Los métodos de correspondencia de puntos se aplican para localizar puntos correspondientes cuando se tiene en cuenta la información completa de las imágenes. Usualmente, se toma un vecindario de cada punto en el cuadro anterior y se busca la región más parecida en el cuadro actual, bien sea mediante correlación (Di Caprio et al. 2014), búsqueda de puntos de interés (Sadeghi-Tehran et al. 2014), flujo óptico (Shin et al. 2005), e incluso técnicas frecuenciales (Cheng y Ting 2012).

  El Algoritmo Húngaro genera una matriz de emparejamientos entre trayectorias y medidas a partir de una matriz de costos obtenida por todas las posibles asignaciones (Karthikeyan et al. 2012; Lei et al. 2016; Sahbani y Adiprawita 2016; Santhoshkumar et al. 2013).

  Los métodos basados en mínima distancia utilizan alguna métrica, generalmente la distancia Euclídea, para encontrar la posición de las observaciones actuales más cercanas a las predicciones o a los puntos anteriores de cada trayectoria (Ferrin Bolaños y Buchelly Imbachí 2010; Liu et al. 2013; Rojas et al. 2012; Shin et al. 2017).

  Los métodos que buscan mínimos cambios de velocidad son frecuentes en sistemas de seguimiento en los cuales se suponen trayectorias con movimientos suaves (Leung et al. 2010; Shapiro y Stockman 2000).

Los métodos que utilizan técnicas de optimización requieren de criterios para minimizar una función de costo o función de *fitness* (Aprinaldi et al. 2016; Gárate et al. 2015; Isa-Jara et al. 2017). Tal función de costo generalmente contempla alguna medida de distancia o la comparación de parámetros como velocidad o dirección de movimiento.

Los métodos probabilísticos generan y analizan *fdp* basadas en métricas que comparan la posición de las observaciones actuales y la posición de los objetos en el instante anterior o sus predicciones (Amrouche et al. 2017; Arasteh et al. 2018; Magnant et al. 2016).

- **Seguimiento de *kernel*:** El seguimiento de *kernel* se lleva a cabo típicamente al analizar el movimiento de un objeto que se representa por una forma primitiva contenida en una región o ventana. Estos métodos generalmente hacen uso de la información de la apariencia de los objetos para localizarlos en la imagen. La comparación de los patrones que describen el objeto de interés en una región de la escena puede realizarse de manera tradicional a partir de los valores originales de color o brillo, o también mediante sus histogramas, como se menciona a continuación:

  Cuando se realiza *comparación de plantillas* se obtiene alguna medida de similitud entre el *kernel* que representa el objeto de interés y una región de búsqueda en la imagen original. Para encontrar el punto de mayor coincidencia se utilizan diferentes criterios, como la mínima diferencia absoluta (Borş y Pitas 2000), máxima correlación (Lipton et al. 1998; Paredes 2016; Yu-bing et al. 2013), similitud de matrices de coocurrencia (Elafi et al. 2018), o fusión de múltiples características (Palaniappan et al. 2010; Pelapur et al. 2012a).

  De igual forma, cuando se realiza *comparación de histogramas*, las *fdp* correspondientes a las características de apariencia del objeto se pueden comparar aplicando medidas de similitud entre vectores de datos. Son frecuentes en este ámbito la diferencia absoluta de histogramas (Comaniciu et al. 2003; Xie et al. 2009), la distancia de Mahalanobis (Oliver et al. 2000), y el coeficiente de Bhattacharyya (Brasnett et al. 2005; Jiancheng et al. 2013; Lucena et al. 2009).

- **Seguimiento de siluetas:** El objetivo de un seguidor basado en siluetas es encontrar la región donde se encuentra el objeto en cada cuadro, generalmente por medio de un modelo de representación de contornos o siluetas (Fekir y Benamrane 2014; Lucena et al. 2015; Yang et al. 2014). Los métodos contemplados se refieren principalmente al seguimiento de objetos que, en general, cambian su forma en el transcurso del tiempo. La correspondencia temporal se puede modelar de diferentes formas según la característica utilizada para el emparejamiento:

  En los métodos basados en medidas de distancia se puede asociar una nueva observación a una trayectoria existente mediante el uso de una o varias métricas

(Bunyak et al. 2007) que comparan la distancia entre centroides, determinan el grado de solapamiento de las siluetas, entre otras métricas.

Los métodos basados en la forma hacen uso de *fdp* que se optimizan en función de parámetros que describen la localización y la forma de los objetos (Isard y Blake 1998; Yang et al. 2014).

Los métodos que buscan minimizar la energía modelan un campo de energía y se busca sus valores mínimos en el vecindario de cada objeto, ajustando las nuevas posiciones de los puntos de los contornos en cada instante (Fekir y Benamrane 2014; Yilmaz et al. 2004).

En los *métodos basados en movimiento* se determinan las características cinemáticas de cada punto del contorno, de la silueta, o de cada parte que constituye el objeto y se hace la correspondencia de cada una (Giai-Checa et al. 1994; Jepson et al. 2002). Una forma eficiente para realizar dicha asociación consiste en el uso del métodos de flujo óptico (Lucena et al. 2015; Lucena 2003).

Además, una forma de medir el desempeño de los algoritmos de seguimiento consiste en determinar su robustez frente al tratamiento de las oclusiones, es decir, frente a situaciones en las cuales existe superposición de los objetos o cuando el objetivo de interés desaparece en el interior de la escena. La mayoría de los sistemas de seguimiento utilizan mecanismos para abordar tales situaciones dependiendo de la aplicación:

- **Nunca se produce oclusión:** Algunas aplicaciones tienen en cuenta los estados de presencia o ausencia de los objetos en la escena para tomar decisiones, de tal manera que el seguimiento se realiza únicamente cuando ellos están presentes (Fekir y Benamrane 2014; Ordoñez et al. 2017; Paredes 2016). Además, cuando el sistema estudia múltiples objetivos presentes en la escena, es imposible que ellos se superpongan al acercarse (Ferrin Bolaños y Buchelly Imbachí 2010; Magnant et al. 2016).

- **Tiempo de espera para reaparición:** los mecanismos de seguimiento, generalmente de puntos, pueden disponer de estrategias para estimar dónde reaparecerán los objetos que desaparecieron de la escena por fallas en la detección o que se encuentran totalmente cubiertos. En la mayoría de los casos, se estiman los estados de los objetos ocultos hasta un tiempo límite mediante el uso de los métodos de predicción (Cheng y Ting 2012; Pelapur et al. 2012b; Santhoshkumar et al. 2013; Shin et al. 2017).

- **Separación de siluetas superpuestas:** se puede detectar situaciones de superposición de dos objetos cuando se observa un incremento significativo en el tamaño de su silueta (Jeong et al. 2014; Kirubarajan et al. 1997; Sahbani y Adiprawita 2016). En vista de lo anterior, se pueden aplicar diferentes técnicas de segmentación

para dividir la silueta compuesta cuando existe superposición parcial (Priyadharshini et al. 2013; Ravanfar y Moradi 2011).

- **Localización mediante la apariencia:** al contar con un modelo de apariencia de los objetos, éstos se pueden localizar en la escena bajo situaciones de oclusión parcial mediante la búsqueda de similitudes de sus plantillas o histogramas con las regiones candidatas en la escena (Cai et al. 2016; Chi et al. 2017; Elafi et al. 2018; Jiancheng et al. 2013), o estimar rasgos locales no visibles mediante el uso de su distribución espacial y el su registro temporal (Dufrenois y Hamad 2007; Sadeghi-Tehran et al. 2014).

- **Modelado de la escena mediante capas:** En algunas aplicaciones, la escena se modela mediante capas ordenadas desde el fondo hacia el frente, y cada capa contiene la información de la apariencia de un único objeto (Jepson et al. 2002; Tao et al. 2002; Zhou y Tao 2004). El método es eficaz cuando se tiene un registro temporal suficiente para determinar la apariencia de cada objeto y del fondo, y que dicha apariencia no varíe durante la oclusión.

- **Uso de información sobre la profundidad:** Se pueden resolver situaciones de superposición de objetos en la escena bidimensional cuando el sistema de adquisición de las imágenes permite determinar su ubicación tridimensional (Di Caprio et al. 2014; Chan et al. 1994).

Para finalizar, se debe mencionar el surgimiento reciente de métodos que utilizan técnicas de aprendizaje profundo para localizar de forma eficiente los objetos de interés. Tales mecanismos permiten aproximar las capacidades de la visión por computador al reconocimiento de patrones del sistema de visión humano (Cai et al. 2016) y, en la mayoría de los casos, evitar la etapa de extracción de características previa al seguimiento (Chi et al. 2017).

En el capítulo 5 se describirán de manera general los métodos propuestos para el seguimiento de objetos con diferentes representaciones en las aplicaciones desarrolladas, que involucran métodos de correspondencia temporal para escenas con múltiples objetos y tratamiento de las oclusiones.

2.4. Análisis de movimiento

Como se ha mencionado, los métodos de seguimiento se utilizan para determinar en cada instante el estado de los objetos que evolucionan durante un intervalo de tiempo en una escena, y generalmente se centra en encontrar los puntos que pertenecen a la trayectoria que el objeto dibuja cuando se mueve. De cada trayectoria se pueden obtener varios descriptores o características y realizar diferentes análisis según lo requiera la aplicación específica, e incluso identificar o reconocer patrones de movimiento.

Las características que describen el movimiento de los objetos pueden ser individuales o colectivas, y se pueden medir de forma instantánea o pueden representar el valor promedio en un intervalo de tiempo. Si se considera cada objeto por separado, algunas características que se pueden extraer de su movimiento son las siguientes:

- **Cinemáticas de traslación o desplazamiento:** velocidad promedio (Duffy et al. 2015), puntos de inflexión (Ferrin Bolaños y Buchelly Imbachí 2010).

- **Cinemáticas de rotación sobre su eje:** ángulo promedio y sentido de giro (Buchelly Imbachí et al. 2016c).

- **Cinemáticas de oscilación:** amplitud (Hidayatullah et al. 2015), frecuencia (Buchelly Imbachí et al. 2020b).

- **Forma de la trayectoria:** factor de forma (Ferrin Bolaños y Buchelly Imbachí 2010), descriptores de curvatura (Ferrin Bolaños y Buchelly Imbachí 2010), linealidad (Gárate et al. 2015; Rojas et al. 2012)

Por otra parte, las características colectivas pueden expresar variables estadísticas, como los promedios o las varianzas de las características individuales de todos los objetos o de un subconjunto (Giaretta et al. 2017); también pueden representar valores que caractericen el conjunto como una entidad o sistema, por ejemplo, medidas de densidad y concentración en una región (Buchelly Imbachí et al. 2017); o pueden señalar la interacción entre algunos objetos, por ejemplo, descriptores de proximidad entre pares (Blasch et al. 2013; Ferrin Bolaños y Buchelly Imbachí 2010).

Son numerosas las características que se pueden extraer de la trayectoria de cada objeto o conjunto de objetos, por lo tanto, a menudo es necesario reducir la dimensionalidad del vector de características o elegir aquellas que sean representativas del conjunto para llevar a cabo las operaciones de análisis de movimiento de forma más rápida. Existen diferentes métodos que se pueden utilizar para llevar a cabo dicho propósito: análisis de correlación entre variables (Buchelly Imbachí et al. 2019), Análisis de Componentes Principales (Bigun 2006), análisis de la entropía (Friedman y Kandel 1999), análisis de la información mutua (Mackay 2005), uso de aproximaciones funcionales (Friedman y Kandel 1999), entre otros.

Existen varios métodos que se pueden utilizar para llevar a cabo el análisis global o individual de los movimientos. Son comunes los enfoques supervisados y los no supervisados, ya sea para analizar eventos instantáneos en tiempo real (análisis *online*) o para analizar las características de la trayectoria completa al finalizar el movimiento (análisis *offline*). En los enfoques supervisados son comunes, por ejemplo, los clasificadores probabilísticos (Blasch et al. 2013; Oliver et al. 2000; Stauffer y Grimson 2000), las redes neuronales artificiales (Ferrin Bolaños y Buchelly Imbachí 2010; Rojas et al. 2012), entre otros, para identificar eventos o tipos de movimientos conocidos previamente aprendidos mediante entrenamiento.

En contraste, los métodos no supervisados permiten identificar patrones de comportamiento a partir de la matriz de características de las trayectorias, sin necesidad de disponer de información previa sobre el movimiento de los objetos. Esta labor se lleva a cabo utilizando técnicas de agrupamiento o *clustering* (Friedman y Kandel 1999; Xu y Wunsch 2009) que pueden ser jerárquicas, particionales, basadas en redes neuronales, basadas en grafos, entre otras. Así, con el enfoque no supervisado se pueden obtener grupos de objetos con comportamiento similar de forma autónoma, pero una comparación con los patrones identificados en otra muestra usualmente no se realizaría de forma tan fácil y directa como se haría con los métodos supervisados.

Finalmente, se pueden llevar a cabo actividades más avanzadas de reconocimiento de patrones dependiendo de la aplicación específica en la cual se desarrolle el esquema de seguimiento y análisis de movimiento. Por ejemplo, existen diferentes trabajos que estudian el movimiento de las personas en diferentes escenarios: el trabajo de Bodor *et al*. (Bodor et al. 2003) presenta métodos para identificar comportamientos de una persona al moverse: caminar, correr, merodear, caer, etc.; en el trabajo de Oliver *et al*. (Oliver et al. 2000) se detectan interacciones entre personas: encontrarse, caminar juntos, perseguir, etc.; o también, Blasch *et al*. (Blasch et al. 2013) presentan métodos para reconocer eventos y actividades de personas interactuando entre sí o con objetos, entrando o saliendo de vehículos, desplazándose por distintos lugares por un tiempo largo, medio o corto.

En el capítulo 6 se describen algunas técnicas utilizadas en el análisis de movimiento, desde cada una de las aplicaciones biomédicas desarrolladas.

2.5. Referencias

Abdelli, A., Choi, H.J.: A four-frames differencing technique for moving objects detection in wide area surveillance. En: 2017 IEEE International Conference on Big Data and Smart Computing, BigComp 2017. pp. 210-214 (2017)

Amrouche, N., Khenchaf, A., Berkani, D.: Multiple target tracking using track before detect algorithm. En: Proceedings of the 2017 19th International Conference on Electromagnetics in Advanced Applications, ICEAA 2017. pp. 692-695 (2017)

Aprinaldi, Jati, G., Gunawan, A.A.S., Bowolaksono, A., Lestari, S.W., Jatmiko, W.: Human Sperm tracking using Particle Swarm Optimization combined with Smoothing Stochastic sampling on low frame rate video. 2015 Int. Symp. Micro-NanoMechatronics Hum. Sci. MHS 2015. (2016). https://doi.org/10.1109/MHS.2015.7438308

Arasteh, A., Vosoughi Vahdat, B., Salman Yazdi, R.: Multi-Target Tracking of Human Spermatozoa in Phase-Contrast Microscopy Image Sequences using a Hybrid Dynamic

Bayesian Network. Sci. Rep. 8, 5068 (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-23435-x

Azari, M., Seyfi, A., Rezaie, A.H.: Real Time Multiple Object Tracking and Occlusion Reasoning Using Adaptive Kalman Filters. En: Machine Vision and Image Processing (MVIP), 2011 7th Iranian. IEEE (2011)

Bigun, J.: Vision with Direction. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2006)

Blasch, E., Wang, Z., Ling, H., Palaniappan, K., Chen, G., Shen, D.: Video-Based Activity Analysis Using the Ll Tracker on VlRAT Data. Proc. - Appl. Imag. Pattern Recognit. Work. (2013)

Bodor, R., Jackson, B., Papanikolopoulos, N.: Vision-Based Human Tracking and Activity Recognition. 11th Mediterr. Conf. Control Autom. - MED'03. 18-20 (2003). https://doi.org/10.1.1.116/9664

Borş, A., Pitas, I.: Prediction and tracking of moving objects in image sequences. IEEE Trans. Image Process. 9, 1441-5 (2000). https://doi.org/10.1109/83.855440

Brasnett, P., Mihaylova, L., Canagarajah, N., Bull, D.: Particle filtering with multiple cues for object tracking in video sequences. Image Video Commun. Process. 2005. 5685, 430 (2005). https://doi.org/10.1117/12.585882

Buchelly Imbachí, F., Bravo Montenegro, D., Pencue Fierro, L., Ferrin Bolaños, D.: Sistema De Seguimiento Bidimensional Mediante Técnicas De Control Digital Y Visión Computacional - Two-Dimensional Tracking System Through Digital Control And Artificial Vision Techniques. Rev. Colomb. Física. 43, 1-4 (2011)

Buchelly Imbachí, F., Isa-Jara, R., Zalazar, L., Cesari, A., Pastore, J., Ballarin, V.: Comparative Analysis of Different Techniques to Determine Motility Parameters in Video Sequences of Ram and Buck Sperm. En: VIII Latin American Conference on Biomedical Engineering and XLII National Conference on Biomedical Engineering. CLAIB 2019. IFMBE Proceedings, vol 75. pp. 385-392 (2020)

Buchelly Imbachí, F., Mayorca, D., Ballarin, V., Pastore, J.: Digital image processing techniques applied to pressure analysis and morphological features extraction in footprints. J. Phys. Conf. Ser. 705, (2016)(a). https://doi.org/10.1088/1742-6596/705/1/012020

Buchelly Imbachí, F., Pedetta, A., Pastore, J., Herrera, K., Ballarin, V.: Automatic tracking of flagellar rotation of bacteria. En: VII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica – CLAIB 2016. Colombian Association of Bioengineering and Medical Electronics (ABIOIN), Bucaramanga, Colombia (2016)(b)

Buchelly Imbachí, F., Pencue Fierro, L.: Clasificación E Identificación De Artrópodos Mediante Procesamiento Digital De Imágenes. Bistua Rev. la Fac. Ciencias Básicas. 7, 1-6 (2009)

Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J., Cesari, A., Ballarin, V.: Desarrollo de un módulo para el estudio de subpoblaciones de motilidad espermática integrado a un software CASA. En: VIII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica CLAIB 2019. , Cancún, Mexico (2019)

Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J., Soler, A., Cesari, A., Ballarin, V.: Evaluation of motility quality in ram sperm by using a novel open - source suite of algorithms. En: Congreso Argentino de Bioingeniería - SABI 2017. , Córdoba, Argentina (2017)

Bunyak, F., Palaniappan, K., Nath, S.K., Seetharaman, G.: Geodesic active contour based fusion of visible and infrared video for persistent object tracking. Proc. - IEEE Work. Appl. Comput. Vision, WACV 2007. (2007). https://doi.org/10.1109/WACV.2007.26

Cai, B., Xu, X., Xing, X., Jia, K., Miao, J., Tao, D.: BIT: Biologically Inspired Tracker. IEEE Trans. Image Process. 25, 1327-1339 (2016). https://doi.org/10.1109/TIP.2016.2520358

Canny, J.: A Computational Approach to Edge Detection. (1986)

Di Caprio, G., El Mallahi, A., Ferraro, P., Dale, R., Coppola, G., Dale, B., Coppola, G., Dubois, F.: 4D tracking of clinical seminal samples for quantitative characterization of motility parameters. Biomed. Opt. Express. 5, 690 (2014). https://doi.org/10.1364/boe.5.000690

Caselles, V., Kimme, R., Sapiro, G.: Geodesic Active Contours. Int. J. Comput. Vis. 22, 61-79 (1997)

Challa, S., Morelande, M.R., Mušicki, D., Evans, R.J.: Fundamentals of object tracking. (2011)

Chan, M., Metaxas, D., Dickinson, S.: Physics-Based Tracking of 3D Objects in 2D Image Sequences. 432-436 (1994)

Cheng, C.-C., Ting, S.-H.: Robust Visual Tracking Using Spatio-temporal Approach with Optical Flow. 2012 IEEE Fifth Int. Conf. Adv. Comput. Intell. 553-557 (2012)

Chi, Z., Li, H., Lu, H., Yang, M.-H.: Dual Deep Network for Visual Tracking. IEEE Trans. Image Process. 26, 2005-2015 (2017). https://doi.org/10.1109/TIP.2017.2669880

Comaniciu, D., Meer, P.: Mean Shift: A Robust Approach Toward Feature Space Analysis. IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 24, 1-18 (2002)

Comaniciu, D., Ramesh, V., Meer, P.: Kernel-based object tracking. IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 25, 564-577 (2003). https://doi.org/10.1109/TPAMI.2003.1195991

Comas, D.: Lógica Difusa Tipo 2 de Intervalos en Segmentación de Imágenes Médicas, (2016)

Comas, D., Pastore, J., Bouchet, A., Ballarin, V., Meschino, G.: Interpretable interval type-2 fuzzy predicates for data clustering: A new automatic generation method based on self-organizing maps. Knowledge-Based Syst. 133, 234-254 (2017). https://doi.org/10.1016/j.knosys.2017.07.012

Duffy, B., Thiyagalingam, J., Walton, S., Smith, D.J., Trefethen, A., Kirkman-Brown, J.C., Gaffney, E.A., Chen, M.: Glyph-Based Video Visualization for Semen Analysis. IEEE Trans. Vis. Comput. Graph. 21, 980-993 (2015). https://doi.org/10.1109/TVCG.2013.265

Dufrenois, F., Hamad, D.: Fuzzy weighted support vector regression for multiple linear model estimation: Application to object tracking in image sequences. En: IEEE International Conference on Neural Networks - Conference Proceedings. pp. 1289-1294 (2007)

Elafi, I., Jedra, M., Zahid, N.: Tracking occluded objects using chromatic co-occurrence matrices and particle filter. Signal, Image Video Process. 12, 1227-1235 (2018). https://doi.org/10.1007/s11760-018-1273-1

Elgammal, A., Duraiswami, R., Harwood, D., Davis, L.: Background and foreground modeling using nonparametric kernel density estimation for visual surveillance. Proc. IEEE. 90, 1151-1162 (2002). https://doi.org/10.1109/JPROC.2002.801448

Feichtenhofer, C., Pinz, A.: Spatio-temporal good features to track. En: Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision. pp. 246-253 (2013)

Fekir, A., Benamrane, N.: Fast active contour for object tracking in image sequence. Proc. IEEE/ACS Int. Conf. Comput. Syst. Appl. AICCSA. 2014, 184-189 (2014). https://doi.org/10.1109/AICCSA.2014.7073197

Ferrin Bolaños, D., Buchelly Imbachí, F.: Diseño y construcción de plataformas multitoque de tipo óptico, utilizando técnicas de visión artificial en tiempo real para facilitar la interacción de los usuarios con el computador, (2010)

Forsyth, Ponce: Computer Vision. , Paris (2003)

Friedman, M., Kandel, A.: Introduction To Pattern Recognition_ Statistical, Structural, Neural and Fuzzy Logic Approaches. (1999)

Gárate, D., Medina, R., Incahuanaco, F., Beltrán, C.: A heuristic model for determining the sperm motility grade by video. En: Proceedings - 2015 41st Latin American Computing Conference, CLEI 2015 (2015)

Gárate, D.A.: Modelo heurístico para la determinación de la motilidad en células espermáticas mediante el análisis automático de tracking en video, (2015)

Giai-Checa, B., Bouthemy, P., Vieville, T.: Segment-based detection of moving objects in a sequence of images. 384-389 (1994). https://doi.org/10.1109/icpr.1994.576304

Giaretta, E., Munerato, M., Yeste, M., Galeati, G., Spinaci, M., Tamanini, C., Mari, G., Bucci, D.: Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. Anim. Reprod. Sci. 176, 11-19 (2017). https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.11.003

Gonzalez, M.: SEGMENTACIÓN MORFOLÓGICA WATERSHED EN IMÁGENES MÉDICAS: MÉTODOS DE SELECCIÓN DE MARCADORES, (2008)

Hammoud, R.I.: Interactive Video Algorithms and Technologies. Springer-Verlag, Berlin Hedelberg (2006)

Harris, C., Stephens, M.: A Combined Corner and Edge Detector. En: Procedings of the Alvey Vision Conference 1988. pp. 23.1-23.6. The Plessey Company pic, United Kingdom (1988)

Hidayatullah, P., Awaludin, I., Kusumo, R.D., Nuriyadi, M.: Automatic sperm motility measurement. En: 2015 International Conference on Information Technology Systems and Innovation (ICITSI). pp. 1-5. IEEE (2015)

Hong, S., Peng, D., Shi, Y.: Track-to-track association using fuzzy membership function and clustering for distributed information fusion. En: Chinese Control Conference, CCC. pp. 4028-4032. Technical Committee on Control Theory, Chinese Association of Automation (2018)

Horn, B.K.P., Schunck, B.G.: Determining Optical Flow. Artif. Intell. 17, 185-203 (1981). https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0004-3702(81)90024-2

Isa-Jara, R., Buchelly Imbachí, F., Meschino, G., Ballarin, V.: Improved Particle Swarm Optimization algorithm applied to rigid registration in medical images. En: IFMBE Proceedings. pp. 161-164. Springer Verlag (2017)

Isard, M., Blake, A.: CONDENSATION-conditional density propagation for visual tracking. Int. J. Comput. Vis. 29, 5-28 (1998)

Jaward, M., Mihaylova, L., Canagarajah, N., Bull, D.: Multiple Object Tracking Using Particle Filters. En: 2006 IEEE Aerospace Conference. pp. 1-8 (2006)

Jeong, J., Yoon, T., Park, J.: Kalman Filter Based Multiple Objects Detection-Tracking Algorithm Robust to Occlusion. En: SICE Annual Conference 2014. pp. 941-946. IEEE, Sapporo, Japan (2014)

Jepson, A., Fleet, D., Black, M.: A Layered Motion Representation with Occlusion and Compact Spatial Support. En: Lecture Notes in Computer Science. pp. 128-142 (2002)

Jiancheng, L., Xingmiao, L., Fulai, X., Jing, L., Hongjun, L.: Infrared target tracking algorithm based on adaptive bandwidth of Mean Shift. En: Proceedings of the 32nd Chinese Control Conference (2013)

Kang, B.: A Review on Image and Video processing. Int. J. Multimed. Ubiquitous Eng. 2, 49-63 (2007)

Karthikeyan, S., Delibaltov, D., Gaur, U.: Unified probabilistic framework for simultaneous detection and tracking of multiple objects with application to bio-image sequences. En: Image Processing (ICIP), 2012 19th IEEE International Conference on. pp. 1349-1352. IEEE, Orlando, FL, USA (2012)

Khan, M.W.: A Survey : Image Segmentation Techniques. Int. J. Futur. Comput. Commun. 3, (2014). https://doi.org/10.7763/IJFCC.2014.V3.274

Kim, K., Chalidabhongse, T., Harwood, D., Davis, L.: Real-time foreground-background segmentation using codebook model. Real-Time Imaging. 11, 172-185 (2005). https://doi.org/10.1016/j.rti.2004.12.004

Kirubarajan, T., Bar-Shalom, Y., Pattipati, K., Loew, L.: Interacting segmentation and tracking of overlapping objects from an image sequence. Decis. Control. 1997., Proc. 36th IEEE Conf. 4, 3120-3125 vol.4 (1997)

Kompatsiaris, I., Mantzaras, G., Strintzis, M.: Spatiotemporal segmentation and tracking of objects in color image sequences. IEEE Int. Symp. Circuits Syst. 155-158 (2000)

Le, H.V., Seetharaman, G., Zavidovique, B.: A Multiscale Technique for Optical Flow Computation Using Piecewise Affine Approximation. 2003 IEEE Int. Work. Comput. Archit. Mach. Percept. 221-230 (2003). https://doi.org/10.1109/CAMP.2003.1598167

Lei, Z., Wang, M., Lei, T., Li, D.: Tracking moving weak objects in celestial image sequences. IEEE Trans. Aerosp. Electron. Syst. 52, 1257-1266 (2016). https://doi.org/10.1109/TAES.2015.150110

Leung, C., Lu, Z., Esfandiari, N., Casper, R.F., Sun, Y.: Detection and tracking of low contrast human sperm tail. Autom. Sci. Eng. (CASE), 2010 IEEE Conf. 263-268 (2010). https://doi.org/10.1109/COASE.2010.5584613

Li, M.: Detecting , segmenting and tracking bio-medical objects, (2016)

Li, X., Hu, W., Shen, C., Zhang, Z., Dick, A., Hengel, A. van den: A Survey of Appearance Models in Visual Object Tracking. ACM Trans. Intell. Syst. Technol. (2013). https://doi.org/10.1145/2508037.2508039

Lipton, A.J., Fujiyoshi, H., Patil, R.S.: Moving target classification and tracking from real-time video. En: Proceedings Fourth IEEE Workshop on Applications of Computer Vision. WACV'98 (Cat. No.98EX201). pp. 8-14 (1998)

Liu, D., Shyu, M.L., Zhu, Q., Chen, S.C.: Moving object detection under object occlusion situations in video sequences. Proc. - 2011 IEEE Int. Multimedia, ISM 2011. 271-278 (2011). https://doi.org/10.1109/ISM.2011.50

Liu, J., Leung, C., Lu, Z., Sun, Y.: Quantitative analysis of locomotive behavior of human sperm head and tail. IEEE Trans. Biomed. Eng. 60, 390-396 (2013). https://doi.org/10.1109/TBME.2012.2227319

Lowe, D.G.: Distinctive Image Features from. Int. J. Comput. Vis. 60, 91-110 (2004). https://doi.org/10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94

Lu, N., Wang, J., Wu, Q.H., Yang, L.: An Improved Motion Detection Method for Real-Time Surveillance. IAENG Int. J. Comput. Sci. 35, 1-10 (2008)

Lucas, B.D., Kanade, T.: An iterative image registration technique with an application to stereo vision. En: IJCAI'81 Proceedings of the 7th international joint conference on Artificial intelligence. pp. 674-679 (1981)

Lucena, M.: Uso del flujo óptico en algoritmos probabilístocos de seguimiento, (2003)

Lucena, M., Fuertes, J., De La Blanca, N.: Optical flow-based observation models for particle filter tracking. Pattern Anal. Appl. 18, 135-143 (2015). https://doi.org/10.1007/s10044-014-0409-3

Lucena, M., Fuertes, J., De La Blanca, N., Marín-Jiménez, M.: Tracking people in video sequences using multiple models. Multimed. Tools Appl. 49, 371-403 (2009). https://doi.org/10.1007/s11042-009-0376-7

Mackay, D.J.C.: Information Theory, Inference, and Neural Networks. (2005)

Magnant, C., Giremus, A., Grivel, E., Ratton, L., Joseph, B.: Multi-Target tracking using a PHD-based joint tracking and classification algorithm. En: 2016 IEEE Radar Conference, RadarConf 2016. pp. 1-6. IEEE (2016)

Mikolajczyk, K., Schmid, C.: An affine invariant interest point detector. En: European Conference on Computer Vision (ECCV '02). pp. 128-142. Springer- Verlag, Copenhagen (2002)

Monnet, A., Mittal, A., Paragios, N., Ramesh, V.: Background modeling and subtraction of dynamic scenes. En: Proceedings Ninth IEEE International Conference on Computer Vision. pp. 1305-1312 (2003)

Moravec, H.: Visual mapping by a robot rover. En: Proceedings of the 6th international joint conference on Artificial intelligence - Volume 1. pp. 598-600. Morgan Kaufmann Publishers Inc., Tokyo, Japan (1979)

Oliver, N.M., Rosario, B., Pentland, A.P.: A Bayesian Computer Vision System for Modeling Human Interactions. En: IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence. pp. 831-843 (2000)

Ordoñez, C., Dai Pra, L., Blotta, E., Pastore, J., Passoni, I.: Real-Time Pupil-Tracking embedded-system based on neural networks. En: 2017 XVII Workshop on Information Processing and Control (RPIC). pp. 1-6. IEEE (2017)

Otsu, N.: A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. IEEE Trans. Syst. Man. Cybern. 9, 62-66 (1979). https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076

Palaniappan, K., Bunyak, F., Kumar, P., Ersoy, I., Jaeger, S., Ganguli, K., Haridas, A., Fraser, J., Rao, R., Seetharaman, G.: Efficient feature extraction and likelihood fusion for vehicle tracking in low frame rate airborne video. En: 2010 13th International Conference on Information Fusion. pp. 1-8 (2010)

Papageorgiou, C.P., Oren, M.: A general framework for object detection. En: IEEE International Conference on Computer Vision. pp. 555-562 (1998)

Paredes, L.: Template matching with phase dependent multiple templates for 3D tracking using cine MRI, (2016)

Pelapur, R., Candemir, S., Bunyak, F., Poostchi, M., Seetharaman, G., Palaniappan, K.: Persistent target tracking using likelihood fusion in wide-area and full motion video sequences. En: 2012 15th International Conference on Information Fusion (FUSION). pp. 2420-2427 (2012)(a)

Pelapur, R., Palaniappan, K., Seetharaman, G.: Robust orientation and appearance adaptation for wide-area large format video object tracking. En: Proceedings - 2012

IEEE 9th International Conference on Advanced Video and Signal-Based Surveillance, AVSS 2012. pp. 337-342 (2012)(b)

Presutti, M.: La matriz de co-ocurrencia en la clasificación multiespectral: tutorial para la enseñanza de medidas texturales en cursos de grado universitario. En: 4a Jornada de Educação em Sensoriamento Remoto no Âmbito do Mercosul. p. 9 (2004)

Priyadharshini, K., Vishnupriya, S., Saranya, P.: Automatic vehicle detection and tracking in aerial surveillance using DBN and Graph cut model. En: 2013 IEEE International Conference on Emerging Trends in Computing, Communication and Nanotechnology, ICE-CCN 2013. pp. 152-157 (2013)

Prokaj, J., Duchaineau, M., Medioni, G.: Inferring tracklets for multi-object tracking. IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit. Work. (2011). https://doi.org/10.1109/CVPRW.2011.5981753

Ragland, K., Tharcis, P.: A Survey on Object Detection and Tracking. Int. J. Adv. Eng. Res. Dev. 3, 622-628 (2014). https://doi.org/10.21090/ijaerd.030144

Ravanfar, M.R., Moradi, M.H.: Low contrast sperm detection and tracking by Watershed algorithm and Particle filter. En: 2011 18th Iranian Conference of Biomedical Engineering, ICBME 2011. pp. 260-263 (2011)

Rodríguez-Montaña, D., Roa-Guerrero, E.: Objective assessment of bull sperm motility parameters using computer vision algorithms. African J. Biotechnol. 16, 1871-1881 (2017). https://doi.org/10.5897/ajb2017.16122

Rojas, H.A., Rojas, J.A., Zuleta, G.A., Madrigal, C.A.: Extraction of new features for classification of porcine sperm motility. En: STSIVA 2012 - 17th Symposium of Image, Signal Processing, and Artificial Vision. pp. 323-327 (2012)

Rowley, H., Baluja, S., Kanade, T.: Neural Network-Based Face Detection. IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 20, 23-38 (1998)

Sadeghi-Tehran, P., Clarke, C., Angelov, P.: A real-time approach for autonomous detection and tracking of moving objects from UAV. En: IEEE SSCI 2014 - 2014 IEEE Symposium Series on Computational Intelligence - EALS 2014: 2014 IEEE Symposium on Evolving and Autonomous Learning Systems, Proceedings. pp. 43-49 (2014)

Sahbani, B., Adiprawita, W.: Kalman Filter and Iterative-Hungarian Algorithm Implementation for Low Complexity Point Tracking as Part of FastMultiple Object Tracking System. En: 2016 IEEE 6th International Conference on System Engineering and Technology (ICSET). pp. 109-115. IEEE, Bandung – Indonesia (2016)

Santhoshkumar, S., Karthikeyan, S., Manjunath, B.S.: Robust Multiple Object Tracking By Detection With Interacting Markov Chain Monte Carlo. IEEE Int. Conf. Image Process. 2953-2957 (2013)

Serra, J.: Image Analysis and Mathematical Morphology. ACADEMIC PRESS, Orlando, FL, USA (1982)

Shapiro, L., Stockman, G.: Computer Vision. (2000)

Shi, J., Malik, J.: Normalized cuts and image segmentation. IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 22, 888-905 (2000). https://doi.org/10.1109/34.868688

Shin, J., Kim, S., Kang, S., Lee, S.W., Paik, J., Abidi, B., Abidi, M.: Optical flow-based real-time object tracking using non-prior training active feature model. Real-Time Imaging. 11, 204-218 (2005). https://doi.org/10.1016/j.rti.2005.03.006

Shin, S.G., Ahn, D.R., Lee, H.K.: Occlusion handling and track management method of high-level sensor fusion for robust pedestrian tracking. IEEE Int. Conf. Multisens. Fusion Integr. Intell. Syst. 2017-Novem, 233-238 (2017). https://doi.org/10.1109/MFI.2017.8170434

Sowmiya, D., Harita, M., AnandhaKumar, P.: Human Detection in Public Environment using GHOG: Gaussian of Mixtures &Histogram of Oriented Gradients. En: Fifth International Conference on Advanced Computing (ICoAC) Human. pp. 1-6 (2013)

Stauffer, C., Grimson, W.: Learning Patterns of Activity Using Real-Time Tracking. IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 22, 747-757 (2000). https://doi.org/10.1109/34.868677

Sukanya, C.M., Gokul, R., Paul, V.: A Survey on Object Recognition Methods. Ijcset. 6, 48-52 (2016). https://doi.org/10.15680/IJIRCCE.2015.

Tao, H., Sawhney, H.S., Kumar, R.: Object tracking with bayesian estimation of dynamic layer representations. IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 24, 75-89 (2002). https://doi.org/10.1109/34.982885

Viola, P., Jones, M.: Rapid object detection using a boosted cascade of simple features. Proc. 2001 IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognition. CVPR 2001. 1, 1-9 (2001). https://doi.org/10.1109/CVPR.2001.990517

Viola, P., Jones, M., Snow, D.: Detecting pedestrian using patterns of motion and appearance. Int. J. Comput. Vision. 63, 153-161 (2003). https://doi.org/10.1109/ICCV.2003.1238422

Xie, J., Khan, S., Shah, M.: Automatic tracking of escherichia coli in phase-contrast microscopy video. IEEE Trans. Biomed. Eng. 56, 390-399 (2009). https://doi.org/10.1109/TBME.2008.2005956

Xu, C., Prince, J.L.: Snakes, shapes, and gradient vector flow. IEEE Trans. Image Process. 7, 359-369 (1998). https://doi.org/10.1109/83.661186

Xu, R., Wunsch, D.C.: Clustering. (2009)

Xue, G., Sun, J., Song, L.: Background subtraction based on phase feature and distance transform. Pattern Recognit. Lett. 33, 1601-1613 (2012). https://doi.org/10.1016/j.patrec.2012.05.009

Yang, H.-F., Descombes, X., Prigent, S., Malandain, G., Druart, X., Plouraboue, F.: Head tracking and flagellum tracing for sperm motility analysis. 2014 IEEE 11th Int. Symp. Biomed. Imaging. 310-313 (2014). https://doi.org/10.1109/ISBI.2014.6867871

Yilmaz, A., Javed, O., Shah, M.: Object tracking. ACM Comput. Surv. 38, 13-es (2006). https://doi.org/10.1145/1177352.1177355

Yilmaz, A., Li, X., Shah, M.: Contour-based object tracking with occlusion handling in video acquired using mobile cameras. IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 26, 1531-1536 (2004). https://doi.org/10.1109/TPAMI.2004.96

Yu-bing, D., Ming-jing, L., Xue-jun, L.: An Improved Tracking Algorithm Based on Related Matching. 2013 2nd Int. Conf. Meas. Inf. Control. 673-676 (2013)

Zhao, Y., Xu, X., Liao, M., Dai, P., Zou, B., Li, X., Zhang, J.: Automatic segmentation for cell images based on bottleneck detection and ellipse fitting. Neurocomputing. 173, 615-622 (2015). https://doi.org/10.1016/j.neucom.2015.08.006

Zhou, Y., Tao, H.: A background layer model for object tracking through occlusion. En: Ninth IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV'03). pp. 1079-1085 vol.2 (2004)

Zhu, S., Xia, X., Zhang, Q., Belloulata, K.: An Image Segmentation Algorithm in Image Processing Based on Threshold Segmentation. En: Third International IEEE Conference on Signal-Image Technologies and Internet-Based System. pp. 673-678 (2007)

Capítulo 3. Métodos de detección

Como se mencionó en el capítulo anterior, los sistemas de seguimiento de objetos llevan a cabo tres procesos generales: detectar y modelar matemáticamente los objetos de interés, seguir o rastrear tales objetos cuadro a cuadro para determinar su trayectoria, y analizar las trayectorias para obtener características e identificar patrones de movimiento. En el esquema típico de seguimiento a partir de la detección, el proceso de localización de los objetos de interés en la escena constituye el punto de partida para los sistemas de análisis de movimiento.

La complejidad de los métodos de detección de los objetos en la escena depende de las características de la adquisición de las imágenes. Por otra parte, los resultados de dichos métodos pueden ser una colección de todos los puntos de la imagen que pertenecen a los objetos, o bien algunos puntos representativos de los mismos, acompañados por una vecindad. Cabe recordar que existen métodos estáticos, es decir, métodos de detección cuadro a cuadro, y métodos que tienen en cuenta las variaciones temporales de las escenas. En la tabla 3.1 se mencionan algunas técnicas representativas de cada categoría descritas en el capítulo anterior.

En los métodos estacionarios, la localización de los objetos de interés no tiene en cuenta relaciones entre cuadros consecutivos. De esta forma, únicamente el experto conoce cuáles regiones en la imagen contienen al objeto de estudio y cuáles regiones pertenecen al fondo. No tener en cuenta la evolución de las escenas en el tiempo requiere restringir, en la mayoría de los casos, las aplicaciones de los métodos empleados a aquellas en las cuales las condiciones de iluminación sean controladas. En contraste, mediante las técnicas que hacen uso de la dimensión temporal, es común analizar las diferencias entre las imágenes sucesivas de la secuencia de video para determinar las regiones donde se produce el movimiento.

En el presente capítulo se evalúan diferentes técnicas para localizar objetos de interés en las aplicaciones biomédicas desarrolladas, como punto de partida para los sistemas de seguimiento propuestos en capítulos posteriores. Así, los métodos estudiados contemplan algunos detectores de puntos, técnicas de segmentación, modelado y sustracción de fondo, uso de clasificadores y métodos de detección basados en movimiento.

Tabla 3.1. Técnicas para la detección de objetos.
Tomado y adaptado de Yilmaz *et al.* (Yilmaz et al. 2006)

Categorías	Trabajos representativos
Detectores de puntos	Detector de Moravec (Moravec 1979) Detector de Harris (Harris y Stephens 1988) Puntos invariantes a transformaciones afines (Mikolajczyk y Schmid 2002) Transformación de características invariantes a la escala – *SIFT* (Lowe 2004) Histograma de Magnitudes Orientadas – HOM (Feichtenhofer y Pinz 2013)
Técnicas de segmentación	Umbral de Otsu (Otsu 1979) *Mean-shift* (Comaniciu y Meer 1999) *Graph-cut* (Shi y Malik 2000) Contornos activos (Caselles et al. 1997)
Modelado y sustracción del fondo	Mezcla de Gaussianas (Stauffer y Grimson 2000) *Eigenbackground* (Oliver et al. 2000) *Wall flower* (Toyama et al. 1999) Fondo de textura dinámica (Monnet et al. 2003)
Uso de clasificadores	*Support Vector Machines*(Papageorgiou y Oren 1998) Redes neuronales (Rowley et al. 1998) *Boosting* Adaptativo (Viola y Jones 2001)
Detectores basados en movimiento	Diferencia de cuadros sucesivos (Abdelli y Choi 2017; Lipton et al. 1998) Flujo óptico: Horn y Schunck (Horn y Schunck 1981) Flujo óptico: Lucas y Kanade (Lucas y Kanade 1981) Flujo óptico: Tao et al. (Tao et al. 2012)

El éxito de cualquier método de detección también depende del sistema de adquisición de imágenes y de las condiciones de iluminación presentes en el entorno. La mayoría de las secuencias de video analizadas en esta tesis provienen de microscopios de contraste de fase y las imágenes obtenidas muestran diferencias de intensidad significativas entre el fondo y las regiones que corresponden a los organismos unicelulares de interés. Esta característica favorece la evaluación de varias de las técnicas de la tabla 3.1, como se muestra en las siguientes secciones.

También se debe mencionar que la mayoría de los análisis biológicos y médicos relacionados con motilidad espermática centran su interés en el movimiento de la cabeza de los espermatozoides. De esta forma, la mayoría de los métodos de detección mencionados en este capítulo omiten la detección del flagelo, lo cual permite representar posteriormente las células mediante formas simples, como se mencionará en el capítulo 4.

De igual forma, se probaron algunos métodos de detección en otras aplicaciones desarrolladas, las cuales obtienen sus imágenes con diferentes técnicas como microscopía óptica, sistemas de iluminación adaptados especialmente para la situación específica, y entornos con luz natural o iluminación no controlada.

3.1. Detectores de puntos

El propósito de estos métodos consiste en localizar puntos de interés que tienen características expresivas de sus vecinos, generalmente aquellos que presentan variaciones espaciales significativas de intensidad. En la Figura 3.1 se observa la aplicación del detector de Harris a una secuencia de imágenes de movimiento espermático obtenidas mediante microscopía de contraste de fase a una tasa de 30 cuadros por segundo.

El uso de los detectores de puntos está limitado por la composición visual de las imágenes, y se consideran útiles para la detección de objetos rígidos con bordes rectos y esquinas bien definidas. La aplicación de estos detectores en secuencias de organismos unicelulares, a menudo genera un conjunto de puntos que no persisten con el tiempo, debido a los bordes de las células difuminados por el movimiento.

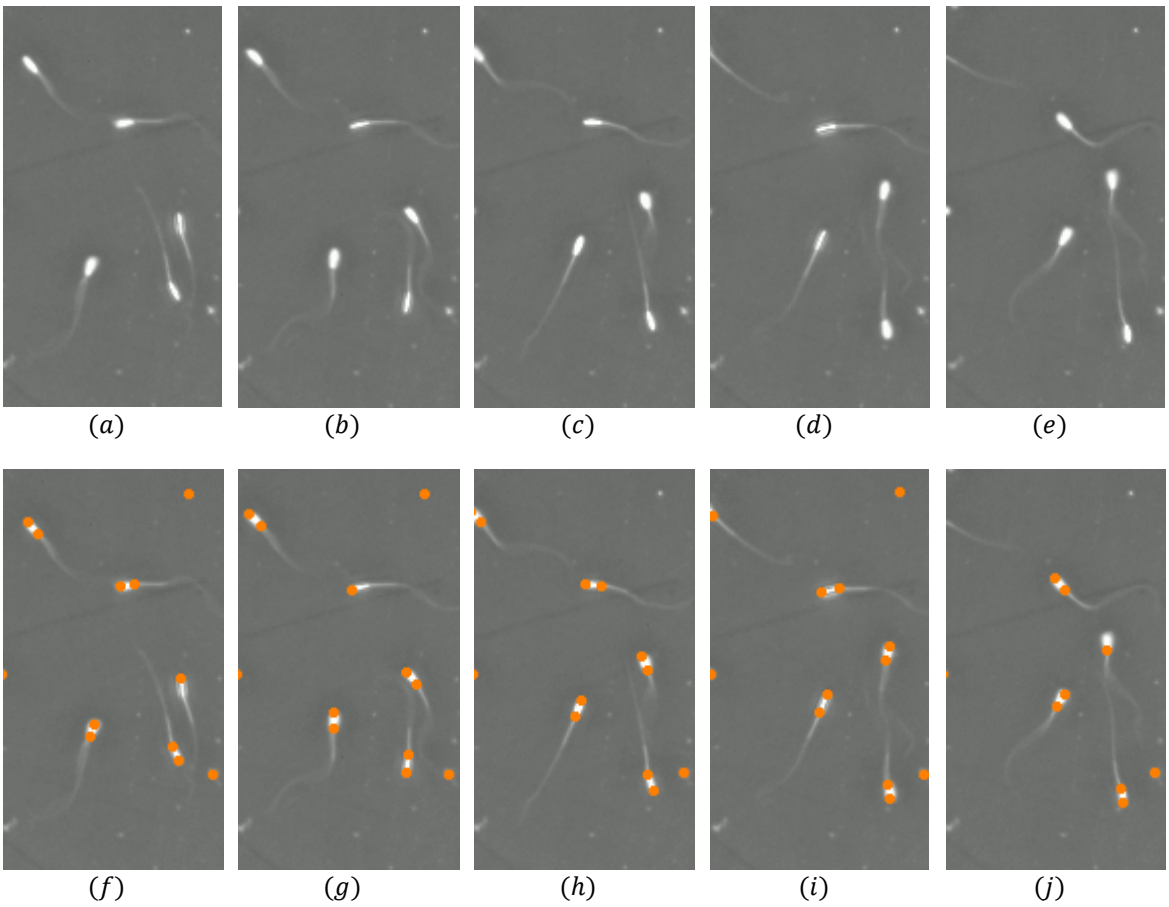


Figura 3.1. Aplicación del detector de Harris a una secuencia de movimiento espermático. En (a) hasta (e) se muestra la secuencia original. En (f) a (j) se muestra la aplicación del detector de Harris a cada imagen con los mismos parámetros. Se puede apreciar la pérdida y reaparición de algunos puntos. Fuente: imagen propia.

En general, la detección de puntos se lleva a cabo de manera no supervisada, es decir, no se tiene información previa sobre la cantidad de puntos a obtener ni tampoco sobre la distribución de los mismos, por lo que se requiere de un posterior análisis para establecer una correspondencia entre los puntos detectados y los objetos a los cuales pertenecen (Dufrenois y Hamad 2007; Sadeghi-Tehran et al. 2014).

Los detectores de puntos generalmente constituyen un paso inicial o intermedio dentro de algún método más complejo para la detección de objetos, para el seguimiento o el análisis de movimiento. Por ejemplo, se puede utilizar el detector de Harris acompañado de un método de regresión para encontrar los parámetros de una transformación afín cuadro a cuadro y seguir objetos (Dufrenois y Hamad 2007); o también se puede utilizar un detector de puntos para la creación de un mapa de flujo óptico denso a partir del emparejamiento cuadro a cuadro (Sadeghi-Tehran et al. 2014).

3.2. Técnicas de segmentación

Como se mencionó en el capítulo anterior, la partición o división de la imagen en varias regiones puede realizarse según diferentes criterios. A continuación, se describen las técnicas evaluadas para segmentar los objetos en las secuencias de imágenes analizadas.

3.2.1. Aplicación de umbrales

El uso de umbrales para segmentar imágenes requiere de un buen contraste entre los objetos y el fondo. Además, es frecuente utilizar técnicas de preprocesamiento para adecuar los niveles de brillo antes de la aplicación de los umbrales. La Figura 3.2 muestra la aplicación de umbrales uniformes a imágenes que contienen organismos unicelulares, luego de una etapa de preprocesamiento. En estas imágenes, el preprocesamiento y la aplicación de umbrales no presentan mayor dificultad gracias a la técnica de microscopía de contraste de fase utilizada para la adquisición.

Por otra parte, en otra aplicación desarrollada sobre el estudio de la tasa de degradación de superficies metálicas (Buchelly Imbachí et al. 2020a) se utilizó una técnica de umbral adaptativo para la detección de burbujas generadas por el material en una reacción química. En primer lugar, se transformaron las imágenes de la secuencia de video a escala de grises y se aplicó un suavizado con un kernel Gaussiano. Posteriormente, se sustrajo las imágenes originales de las imágenes suavizadas con el fin de obtener el realce de las burbujas, las cuales se evidenciaron por la sombra que se forma en su contorno. Luego se aplicó el umbral adaptativo, el cual también usa un kernel Gaussiano para evaluar el entorno de cada píxel y generar la imagen binaria. Finalmente, se aplicó un filtrado morfológico para remover ruido y suavizar los bordes de las siluetas obtenidas. En el capítulo 6 se presentan los detalles de la implementación del método mencionado.

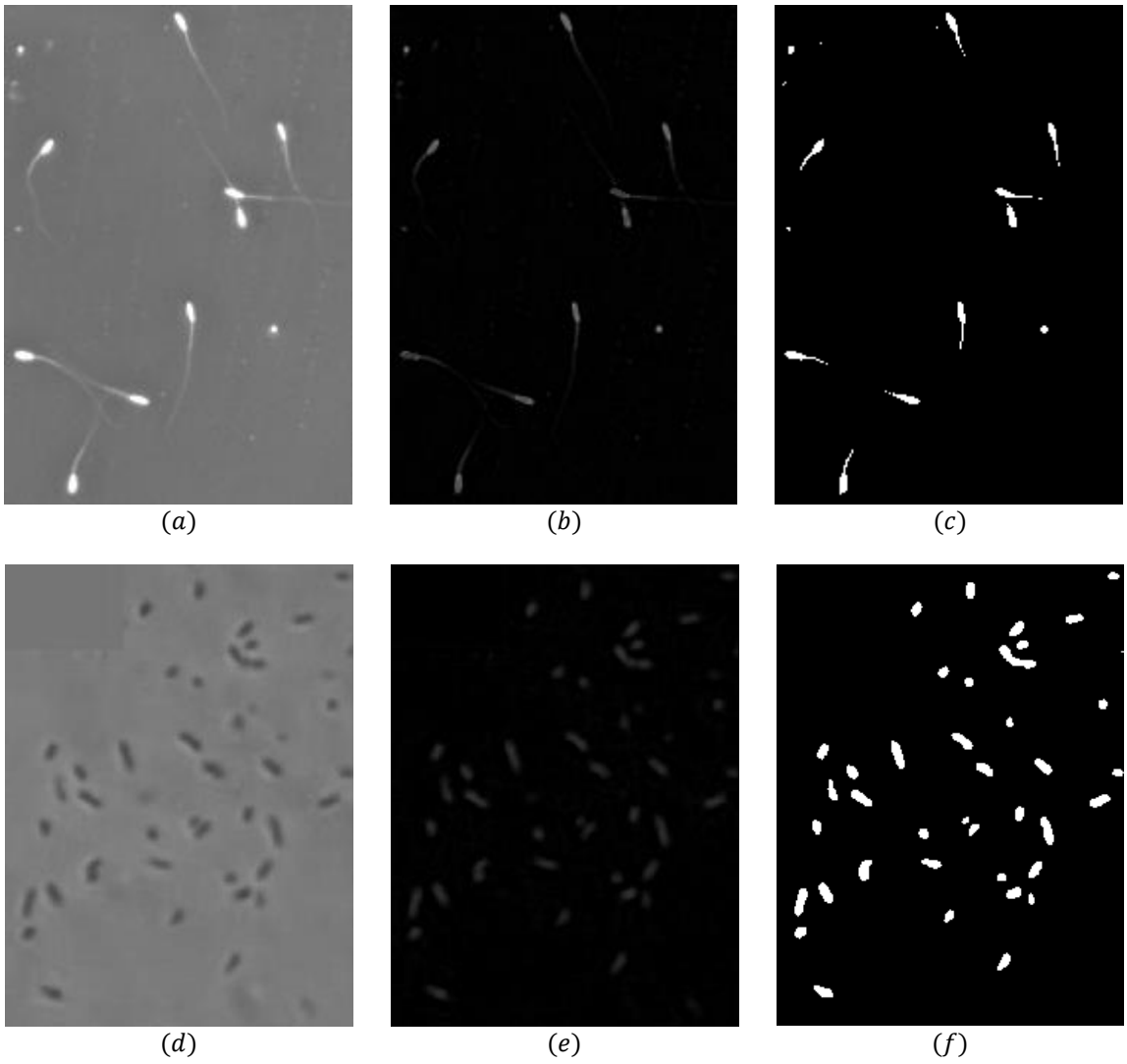


Figura 3.2. Aplicación de umbrales para la detección de células espermáticas y bacterias. En (a) y (d) se muestran las imágenes originales de espermatozoides y bacterias *E. Coli* en niveles de gris; en (b) y (e), el realce de las células mediante operaciones de morfología; y en (c) y (f), las imágenes binarias generadas por la aplicación de umbrales uniformes. Fuente: imagen propia.

3.2.2. Detección de bordes

Las técnicas de detección de contornos permiten segmentar los objetos de interés y estudiar la evolución temporal de su forma. En la Figura 3.3 se muestra la detección del contorno de células espermáticas mediante técnicas de morfología matemática aplicadas a videos de microscopía de contraste de fase, a una tasa de 30 cuadros por segundo.

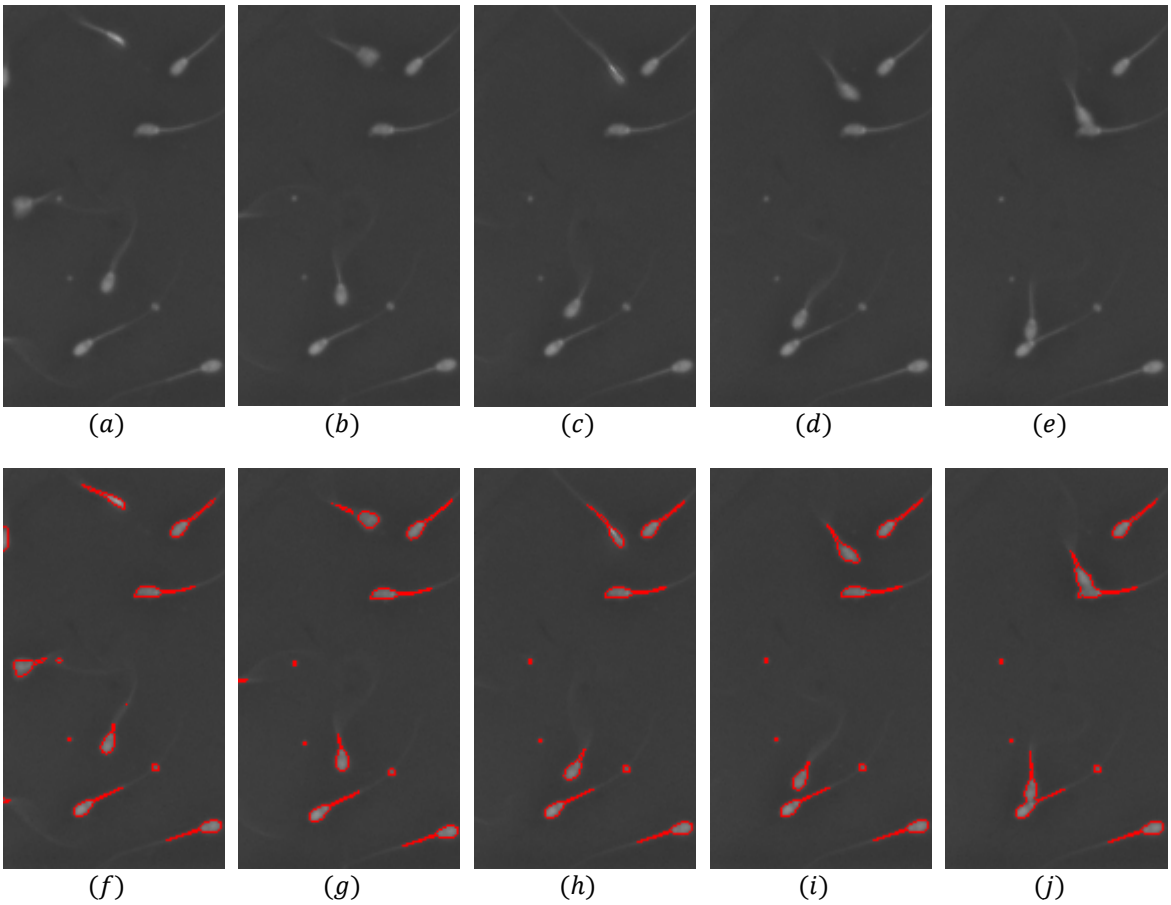


Figura 3.3. Detección de contornos para una secuencia de movimiento espermático. En (a) a (e) se muestra la secuencia de imágenes original obtenida mediante microscopía de contraste de fase. En (f) a (j) se dibujan los contornos detectados por medio de técnicas de morfología matemática. Fuente: imagen propia.

Los métodos basados en contornos son útiles en aplicaciones como el análisis de secuencias biológicas (Fekir y Benamrane 2014), el seguimiento de partes del cuerpo (Lucena 2003) o el seguimiento de personas (Bunyak et al. 2007), siempre y cuando se puedan extraer los bordes de forma clara. No obstante, existen inconvenientes comunes asociados a estos modelos, tales como la inicialización y la convergencia hacia las concavidades de los bordes, sobre todo cuando la secuencia de video contempla múltiples objetos y cuando se presentan situaciones de oclusión.

En el caso de las secuencias que contienen células espermáticas, a menudo se observan porciones cortas e incompletas de los flagelos, y en algunos casos se detectan partes de los mismos, desarticuladas de las cabezas correspondientes.

3.2.3. Segmentación por *clustering*

En el contexto del procesamiento de imágenes, se pueden obtener distintos característicos que se representan mediante datos numéricos, los cuales pueden ser desde niveles de gris, coordenadas de objetos, descriptores de textura, hasta característicos de movimiento. Dichos datos se pueden agrupar mediante métodos de *clustering*, con el fin de segmentar las imágenes. Una característica importante de los algoritmos de *clustering* es la elección de una métrica que permita determinar la proximidad de los datos. En este contexto, es común evaluar la distancia entre dos datos numéricos x e y en el dominio de la imagen, mediante la familia de métricas definidas por la distancia de Minkowski, o norma L_p, de la siguiente forma (Xu y Wunsch 2009):

$$d(x,y) = \left(\sum_{i=1}^{h} |x_i - y_i|^{\frac{1}{p}} \right)^p \qquad 3.1.$$

En la ecuación 3.1, el valor h corresponde a la dimensionalidad de los datos. De esta expresión se pueden mencionar tres métricas particulares que se utilizan en métodos de agrupamiento comunes: La distancia Manhattan o norma L_1 ($p = 1$), la distancia Euclídea o norma L_2 ($p = 2$) o la norma L_∞ ($p \to \infty$).

En general, existen varios criterios para llevar a cabo el agrupamiento de datos (Xu y Wunsch 2009): métodos jerárquicos, métodos particionales, métodos basados en kernel, métodos basados en redes neuronales, *clustering* de datos a gran escala, entre otros. En la presente tesis se probaron algunos métodos de agrupamiento para realizar tareas de reconocimiento de patrones descritas en el capítulo 6, y con el fin de segmentar imágenes, como se menciona a continuación.

En la Figura 3.4 se evalúan los métodos *k-means* y *Mean-Shift* para la segmentación de una imagen que muestra una población bacteriana, aplicados a los niveles de gris originales. La imagen fue adquirida mediante microscopía de contraste de fase y transformada a escala de grises. Los métodos de *clustering* estudiados para la segmentación de células en imágenes de microscopía se describen a continuación:

- El método de *k*-medias (o *k-means*, del inglés) es un método particional que toma como parámetro de entrada la cantidad de grupos k a formar en un conjunto de datos de la población a dividir (Comas 2016; Xu y Wunsch 2009). En primer lugar, se debe elegir una partición inicial, bien sea aleatoria o basada en algún conocimiento previo. En segundo lugar, se asigna a cada dato de la muestra el centro de clúster más cercano. Luego se recalculan los k centros de clúster como la media de los datos asignados a cada grupo. Se toma esta partición como inicial y se reitera el procedimiento anterior hasta que no se generen cambios para cada clúster.

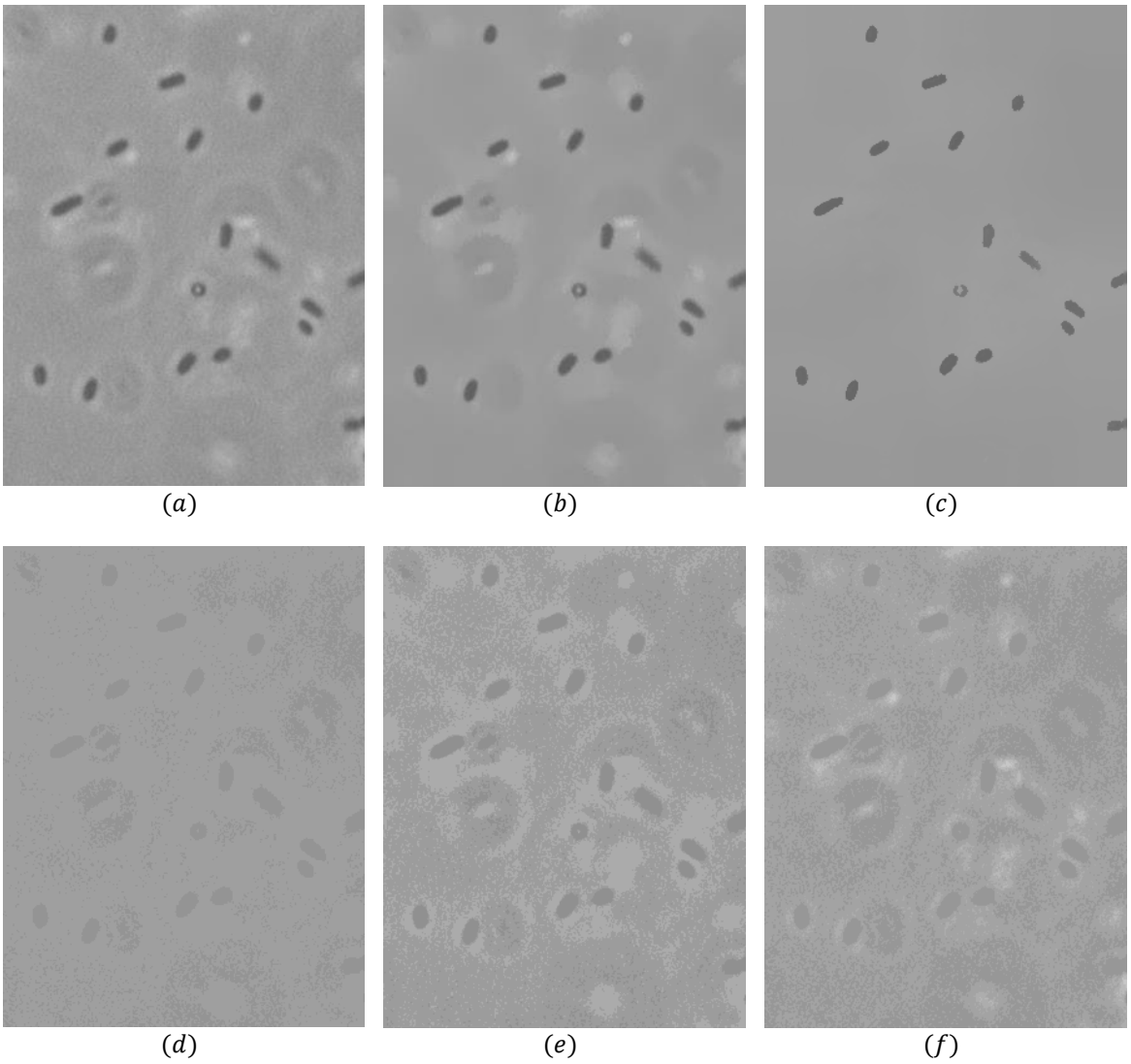


Figura 3.4. Segmentación de bacterias mediante las técnicas *Mean-Shift* y *k-means*. (a) Imagen original de una población bacteriana, adquirida por microscopía de contraste de fase. (b) Salida del método *Mean-Shift* con radio espacial de 10 píxeles y radio de color de 10 niveles. (c) Salida del método *Mean-Shift* con radio espacial 30 y radio de color 30. (d) a (f) Salida del método *k-means* con 2, 3, y 5 clústeres de salida, respectivamente. Fuente: imagen propia.

- El método *Mean-Shift* (Comaniciu y Meer 1999) está basado en kernel y requiere como parámetros de entrada de un valor de resolución espacial en píxeles y un valor de resolución en rangos de intensidad. Primero se obtiene un mapa de densidad usando una ventana en un dominio multidimensional (hiper-esfera en el espacio Euclídeo), compuesto por coordenadas espaciales y valores de intensidad en cada canal de los píxeles. Posteriormente se asocia a cada punto el máximo local de densidad más cercano mediante el ascenso por el gradiente, lo cual puede utilizarse

como método de filtrado preservador de discontinuidades. Finalmente, se obtiene la segmentación mediante la fusión de las regiones cuyos modos sean cercanos.

Para el caso específico de las imágenes de microscopía de contraste de fase, se pueden obtener resultados satisfactorios para una imagen individual con el método *Mean-Shift*, como lo muestra la Figura 3.4, pero no se tiene el control de la cantidad de grupos y de su persistencia cuando se aplique el método a una secuencia de video, además de los aspectos que se vean afectados por la dinámica de la distribución de intensidades en la escena.

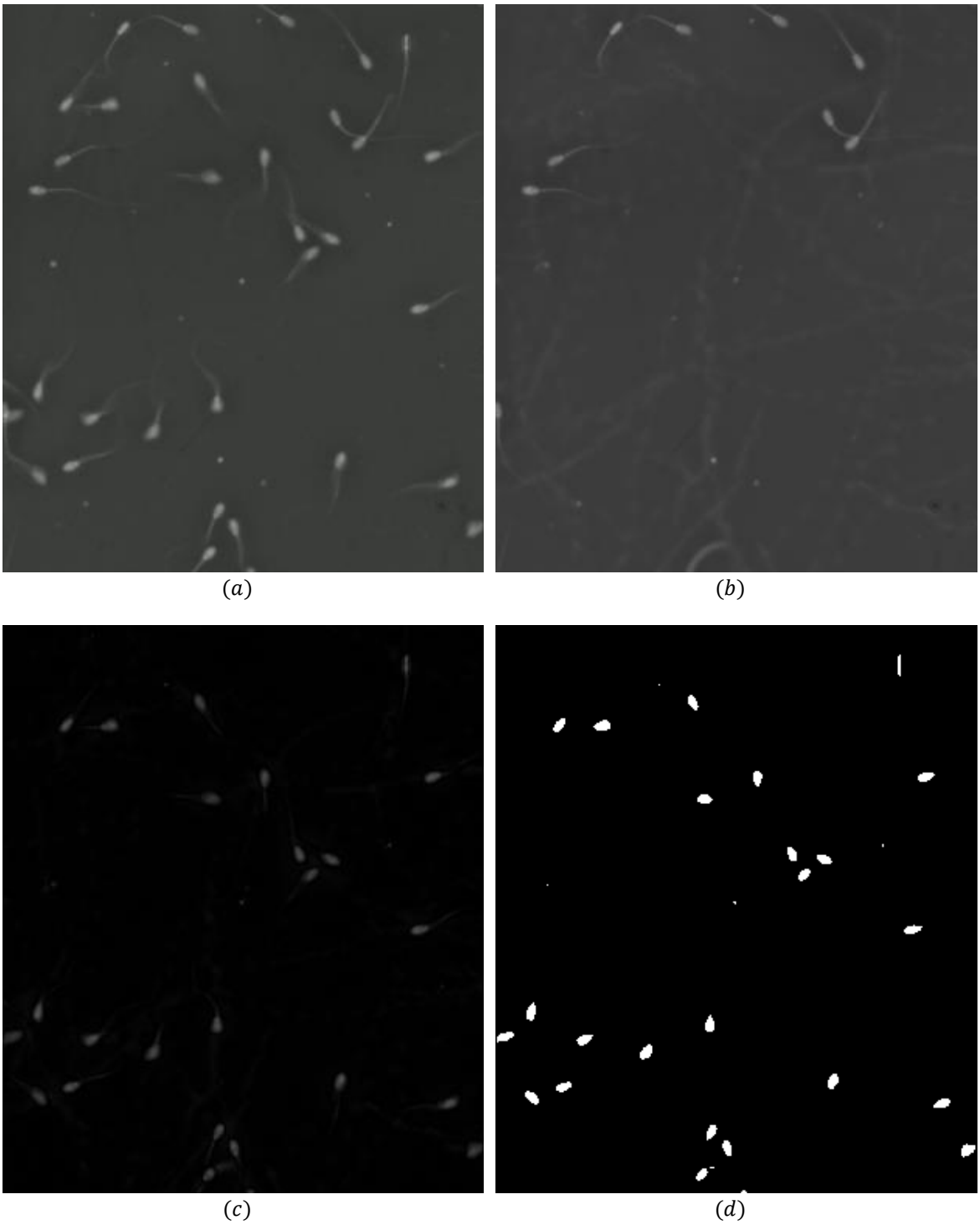
Según la literatura, con el uso de métodos de *clustering* para la detección de objetos se obtienen buenos desempeños en secuencias de imágenes biomédicas, dependiendo de las características de las imágenes adquiridas. Por ejemplo, Chang *et al*. (Chang et al. 2014), aplican la técnica *k-means* a descriptores de color para la detección de cabezas de células espermáticas en imágenes estáticas, estableciendo como parámetro de entrada la cantidad deseada de clústeres para dividir la imagen en regiones pertenecientes a las células y el fondo. Sin embargo, el costo computacional de las técnicas de *clustering* en la segmentación de imágenes generalmente es alto, dependiendo de la resolución espacial, del criterio de agrupamiento o de la precisión requerida, como lo muestran Keuper y Brox (Keuper et al. 2015). Por esta razón, su uso debe limitarse a aplicaciones de análisis de movimiento *offline*.

3.3. Modelado y substracción del fondo

La técnica general consiste en determinar un modelo del fondo o fondo promedio y obtener la distancia o diferencia entre cada imagen de la secuencia y el modelo del fondo. Comúnmente se aplican umbrales para obtener la silueta de los objetos móviles con apariencia distinta al fondo.

La Figura 3.5 ilustra el uso de un método de sustracción de fondo aplicado a una secuencia de imágenes de movimiento espermático. Se puede apreciar que la detección de las células mótiles[1] es adecuada pero las células estáticas permanecen en fondo. Este hecho puede traer dos dificultades: una de tipo biológico, puesto que interesa hacer la estadística de la cantidad de células mótiles y estáticas en la muestra; y una dificultad técnica, ya que una célula mótil puede pasar sobre una célula estática y es posible que no sea detectada por poseer una apariencia similar al fondo.

[1] Si bien no existe en la lengua castellana, el término *mótil* se utiliza en el lenguaje biológico para describir una célula u otro objeto que tiene la facultad de moverse (*motilidad*).



(a) (b)

(c) (d)

Figura 3.5. Aplicación de un método de sustracción de fondo a una secuencia de imágenes de movimiento espermático. (a) Un cuadro del video en escala de grises. (b) Modelo del fondo correspondiente a la media aritmética de la secuencia. (c) Diferencia absoluta entre la imagen y el modelo de fondo. (d) Silueta de los objetos obtenida por un umbral uniforme aplicado a la diferencia absoluta. Fuente: imagen propia.

3.4. Uso de clasificadores

Con frecuencia se emplean clasificadores para reconocer elementos de interés con una estructura definida en una escena, como vehículos, personas, entre otros. Así, estos métodos son útiles para detectar tales objetos en ambientes naturales con diversas condiciones de iluminación, con fondos no uniformes e incluso en presencia de cámaras en movimiento.

Al utilizar un enfoque supervisado, los clasificadores se entrenan previamente con muestras positivas y negativas, es decir, con ejemplos de imágenes que contienen y que no contienen los objetivos a localizar. Como se mencionó en el capítulo anterior, cuando se utilizan clasificadores para la detección de objetos, es importante que la forma y la apariencia de los objetos de interés no cambie demasiado respecto a las muestras de entrenamiento cuadro a cuadro. En ese sentido, la flexibilidad de los detectores está limitada por las características de los objetos, por ejemplo, su ángulo de rotación o su estado de oclusión. Generalmente, el resultado de la detección se presenta como una región rectangular o elíptica que circunscribe el objetivo buscado, o como un mapa de probabilidades.

En una aplicación complementaria desarrollada en el marco de esta tesis (Buchelly Imbachí et al. 2016b) se utilizó el método *AdaBoost* (Viola y Jones 2001) para la detección de rostros en una escena sin restricciones en la iluminación, con el fin de identificar los principales rasgos faciales de cada persona.

3.5. Métodos basados en movimiento

3.5.1. Substracción de cuadros sucesivos

La sustracción temporal detecta regiones donde ocurre movimiento mediante la diferencia entre cuadros consecutivos, generalmente dos o tres. En la Figura 3.6 se aplica este método a una secuencia de imágenes que muestra la generación de burbujas de hidrógeno a partir de una reacción química entre una aleación de magnesio y un fluido corporal simulado. La secuencia de imágenes se capturó mediante la técnica de microscopía óptica a una tasa de 30 cuadros por segundo.

Este método es altamente adaptable a los ambientes dinámicos, pero generalmente falla al intentar extraer formas completas de ciertos tipos de objetos. Los usos de esta técnica están limitados también por su capacidad de detectar únicamente objetos en movimiento, y también se producen detecciones erróneas o no se produce detección cuando dos o más objetos de apariencia similar se superponen. En general, la diferencia de cuadros sucesivos se utiliza como parte de alguna técnica de detección de movimiento más compleja y más robusta como algunos métodos de flujo óptico.

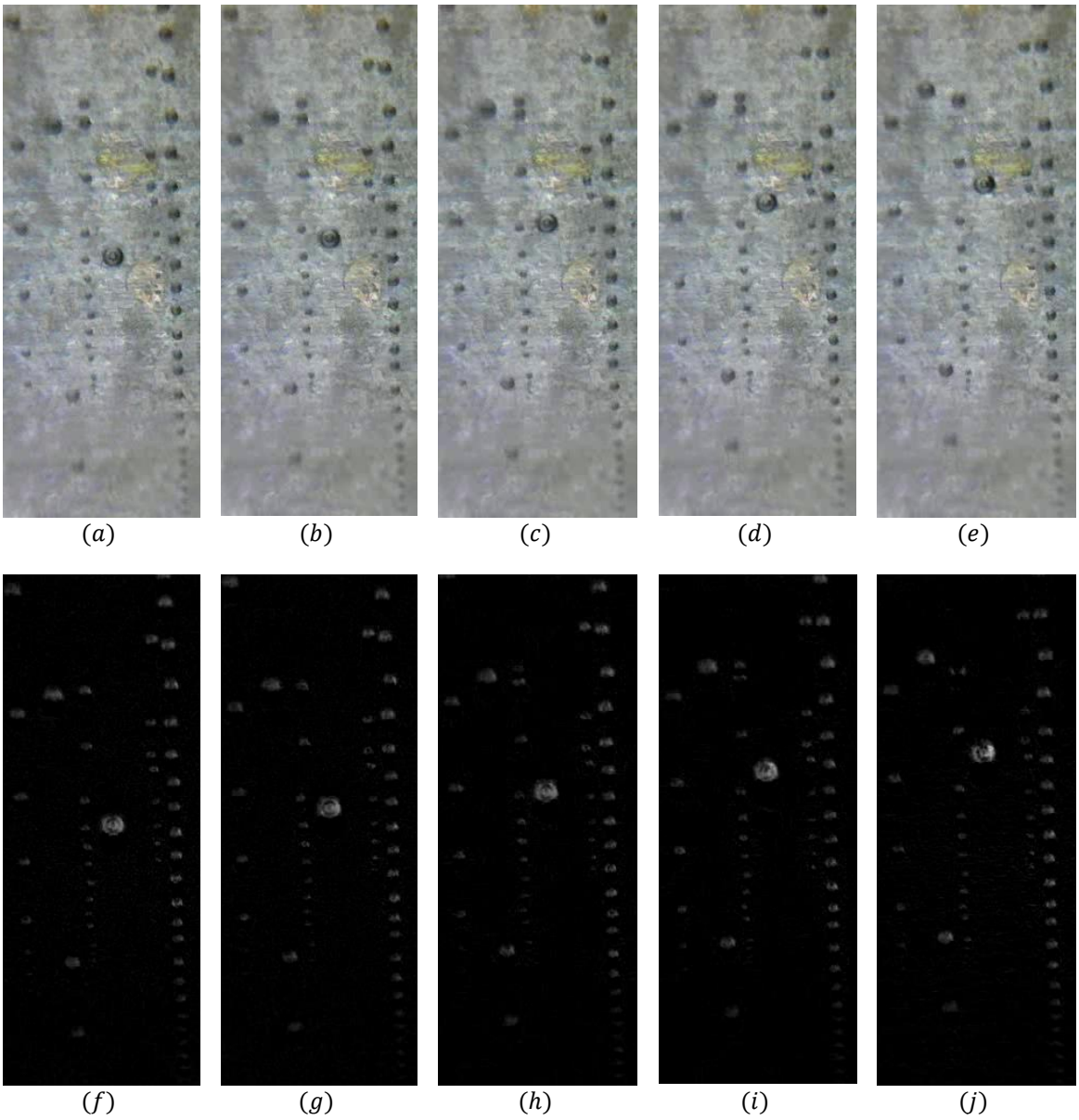


Figura 3.6. Diferencia de cuadros sucesivos en una secuencia de movimiento de burbujas generadas en una superficie metálica. (a) a (e) Secuencia de video original. (f) a (j) Burbujas móviles detectadas mediante la diferencia de cuadros sucesivos. Fuente: imagen propia.

3.5.2. Flujo óptico

El flujo óptico corresponde a las velocidades aparentes de movimiento de los patrones de brillo en una imagen y puede surgir del movimiento relativo entre los objetos presentes en la escena y el observador, o debido a cambios de iluminación en la escena (Horn y Schunck

1981). De esta forma, la relación entre el flujo óptico en el plano imagen y las velocidades de los objetos en el mundo tridimensional no es necesariamente obvia. La iluminación, la presencia de sombras, la dirección del movimiento respecto a la iluminación, las reflexiones, entre otros fenómenos muy comunes en escenas naturales pueden complejizar dicha relación (Bigun 2006; Lucena 2003).

Usualmente se consideran escenarios simples, en los cuales la velocidad aparente de los patrones de brillo en la imagen se puede identificar directamente con el movimiento de las superficies en la escena real (Forsyth y Ponce 2003). También es frecuente considerar que la iluminación incidente sobre la escena es uniforme, el brillo en un punto de la imagen es proporcional a la reflectividad de la superficie en el punto correspondiente del objeto y las discontinuidades en la reflectividad se deben únicamente a los bordes de los objetos (Shapiro y Stockman 2000). En consecuencia, el flujo óptico puede brindar información importante sobre la distribución espacial de los objetos móviles y la forma cómo cambia dicha distribución, al igual que la presencia de discontinuidades en el flujo óptico puede ayudar en la segmentación de la imagen en regiones que correspondan a diferentes objetos (Horn y Schunck 1981; Lucena 2003).

Dado lo anterior, se puede plantear una ecuación que relaciona el cambio en el brillo de la imagen con el movimiento del patrón de brillo. Sea $E(x, y, t)$ el patrón de brillo en el punto (x, y) de la imagen en el instante t, entonces el brillo del mismo punto físico en un instante posterior $t + \delta t$ que se ha desplazado en un vector $\vec{v} = (\delta x, \delta y)$ se considera constante, es decir:

$$E(x, y, t) = E(x + \delta x, y + \delta y, t + \delta t) \qquad 3.2$$

La ecuación 3.2 se puede expandir en una serie de Taylor para relacionar los cambios de posición de los objetos con los cambios de brillo en la imagen (Horn y Schunck 1981; Shapiro y Stockman 2000):

$$E(x, y, t) = E(x, y, t) + \frac{\partial E}{\partial x}\delta x + \frac{\partial E}{\partial y}\delta y + \frac{\partial E}{\partial t}\delta t + T.O.S. \qquad 3.3$$

En la ecuación 3.3, los términos de orden superior (T.O.S.) pueden ignorarse, siempre y cuando los desplazamientos de los objetos cuadro a cuadro sean suaves. Bajo esta restricción en la velocidad, la ecuación de flujo óptico se puede escribir de la siguiente manera:

$$-\frac{\partial E}{\partial t}\delta t = \frac{\partial E}{\partial x}\delta x + \frac{\partial E}{\partial y}\delta y = \left[\frac{\partial E}{\partial x}, \frac{\partial E}{\partial y}\right] * [\delta x, \delta y] = \overrightarrow{\nabla E} * \vec{v} \qquad 3.4$$

En síntesis, la ecuación 3.4 relaciona el campo de flujo óptico $\vec{v}$ con el gradiente espacial de iluminación $\overrightarrow{\nabla E}$, y con la tasa de variación local de iluminación. En 3.4, el operador $*$ corresponde al producto interno de vectores. De esta forma, es posible determinar el movimiento en la dirección del gradiente, pero no en las direcciones de igual brillo, es decir,

en ángulo recto a dicho gradiente. Esto se conoce como “el problema de la apertura” y se debe a que el campo de velocidades de cada punto de la imagen tiene dos componentes mientras que el cambio en el brillo en un punto en el plano imagen genera un escalar (Horn y Schunck 1981; Lucena 2003). Lo anterior conduce a introducir restricciones adicionales para determinar el campo de flujo óptico $\vec{v}$, que dan lugar a diferentes enfoques y métodos para su cálculo (Bigun 2006; Horn y Schunck 1981), como se mencionó en el capítulo 2.

El flujo óptico se puede utilizar para la detección de objetos en movimiento en secuencias de imágenes (Lu et al. 2008; Shin et al. 2005). En la Figura 3.7 se grafican los vectores de flujo óptico para la secuencia de imágenes mostrada en la Figura 3.6. El campo de flujo óptico se determinó con el algoritmo de Gunnar Farneback (Farnebäck 2003).

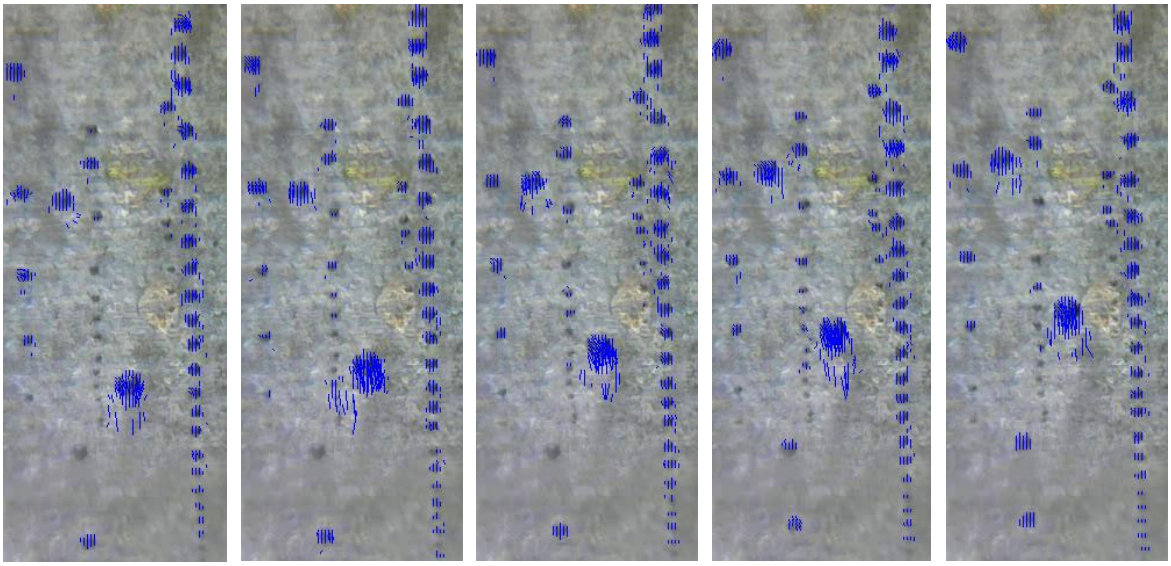


Figura 3.6. Detección de zonas de movimiento mediante el campo de flujo óptico. Se grafican los vectores de flujo óptico para la secuencia de imágenes mostrada en la Figura 3.6. Fuente: imagen propia.

La aproximación de la forma del objeto detectado mediante métodos de flujo óptico generalmente no es tan exacta como la obtenida con otros métodos. Por esta razón, la utilidad del flujo óptico se puede evidenciar principalmente en otras etapas de los esquemas de seguimiento: puede utilizar como una característica que describe la apariencia de los objetos (Li et al. 2013), como una herramienta que ayude a predecir la posición de los objetos cuadro a cuadro (Cheng y Ting 2012; Shin et al. 2005), como criterio para la asociación (Lucena et al. 2015; Lucena 2003), o como herramienta para el análisis de movimiento (Lucena et al. 2010).

3.6. Comentarios finales

En las secciones anteriores se evaluaron algunos métodos de detección de objetos en secuencias de imágenes, ya sea de forma estática, es decir, cuadro a cuadro, o de forma dinámica, mediante la comparación de un cuadro con los anteriores.

Para la mayoría de las categorías mencionadas se presentaron figuras que ilustran técnicas aplicadas a la detección de objetos en secuencias de imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fase, técnica muy utilizada para la visualización y el estudio del comportamiento de organismos celulares en el ámbito biológico y clínico. Se puede concluir que la elección del método más apropiado depende del problema específico a solucionar. Por ejemplo, el uso de métodos de sustracción de fondo permite una buena detección de células espermáticas mótiles, pero se descartan aquellas que permanecen estáticas, las cuales son de alta importancia para análisis biológicos. Lo mismo ocurre con los métodos que analizan las variaciones temporales.

En las aplicaciones del seguimiento desarrolladas en los capítulos 6 y 7 se mencionan los métodos de detección utilizados, principalmente el uso de umbrales fijos o adaptativos combinados con el procesamiento de las imágenes mediante técnicas de morfología matemática. En algunos trabajos complementarios también se utilizaron técnicas de detección relacionadas con la segmentación basada en el análisis del color y el uso de clasificadores (Buchelly Imbachí et al. 2016a; Buchelly Imbachí et al. 2016b).

En el próximo capítulo se exponen diferentes modelos de representación para los objetos detectados, tanto para su forma como para su apariencia, características que son importantes para llevar a cabo el seguimiento de los mismos, como se mencionó en el capítulo 2.

3.7. Referencias

Abdelli, A., Choi, H.J.: A four-frames differencing technique for moving objects detection in wide area surveillance. En: 2017 IEEE International Conference on Big Data and Smart Computing, BigComp 2017. pp. 210-214 (2017)

Bigun, J.: Vision with Direction. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2006)

Buchelly Imbachí, F., Gomez, M., Cere, S., Ballarre, J., Ballarin, V., Pastore, J.: Measurement of the Degradation Rate of Anodized AZ91 Magnesium Temporary Implants Using Digital Image Processing Techniques. En: VIII Latin American Conference on Biomedical Engineering and XLII National Conference on Biomedical Engineering. CLAIB 2019. IFMBE Proceedings, vol 75. pp. 290-297 (2020)

Buchelly Imbachí, F., Mayorca, D., Ballarin, V., Pastore, J.: Digital image processing techniques applied to pressure analysis and morphological features extraction in

footprints. J. Phys. Conf. Ser. 705, (2016)(a). https://doi.org/10.1088/1742-6596/705/1/012020

Buchelly Imbachí, F., Pastore, J., Passoni, I., Ballarin, V.: Identificación de rasgos faciales mediante técnicas de procesamiento de imágenes. En: IEEE ARGENCON 2016 - El congreso bienal de IEEE Argentina. pp. 1-5. , Buenos Aires, Argentina (2016)(b)

Bunyak, F., Palaniappan, K., Nath, S.K., Seetharaman, G.: Geodesic active contour based fusion of visible and infrared video for persistent object tracking. Proc. - IEEE Work. Appl. Comput. Vision, WACV 2007. (2007). https://doi.org/10.1109/WACV.2007.26

Caselles, V., Kimme, R., Sapiro, G.: Geodesic Active Contours. Int. J. Comput. Vis. 22, 61-79 (1997)

Chang, V., Saavedra, J.M., Castañeda, V., Sarabia, L., Hitschfeld, N., Härtel, S.: Gold-standard and improved framework for sperm head segmentation. Comput. Methods Programs Biomed. 117, 225-237 (2014). https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2014.06.018

Cheng, C.-C., Ting, S.-H.: Robust Visual Tracking Using Spatio-temporal Approach with Optical Flow. 2012 IEEE Fifth Int. Conf. Adv. Comput. Intell. 553-557 (2012)

Comaniciu, D., Meer, P.: Mean shift analysis and applications. En: Proceedings of the Seventh IEEE International Conference on Computer Vision. pp. 1197-1203 (1999)

Comas, D.: Lógica Difusa Tipo 2 de Intervalos en Segmentación de Imágenes Médicas, (2016)

Dufrenois, F., Hamad, D.: Fuzzy weighted support vector regression for multiple linear model estimation: Application to object tracking in image sequences. En: IEEE International Conference on Neural Networks - Conference Proceedings. pp. 1289-1294 (2007)

Farnebäck, G.: Two-Frame Motion Estimation Based on Polynomial Expansion. Presentado en (2003)

Feichtenhofer, C., Pinz, A.: Spatio-temporal good features to track. En: Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision. pp. 246-253 (2013)

Fekir, A., Benamrane, N.: Fast active contour for object tracking in image sequence. Proc. IEEE/ACS Int. Conf. Comput. Syst. Appl. AICCSA. 2014, 184-189 (2014). https://doi.org/10.1109/AICCSA.2014.7073197

Forsyth, Ponce: Computer Vision. , Paris (2003)

Harris, C., Stephens, M.: A Combined Corner and Edge Detector. En: Procedings of the Alvey Vision Conference 1988. pp. 23.1-23.6. The Plessey Company pic, United Kingdom (1988)

Horn, B.K.P., Schunck, B.G.: Determining Optical Flow. Artif. Intell. 17, 185-203 (1981). https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0004-3702(81)90024-2

Keuper, M., Andres, B., Brox, T.: Motion trajectory segmentation via minimum cost multicuts. En: Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision. pp. 3271-3279 (2015)

Li, X., Hu, W., Shen, C., Zhang, Z., Dick, A., Hengel, A. van den: A Survey of Appearance Models in Visual Object Tracking. ACM Trans. Intell. Syst. Technol. (2013). https://doi.org/10.1145/2508037.2508039

Lipton, A.J., Fujiyoshi, H., Patil, R.S.: Moving target classification and tracking from real-time video. En: Proceedings Fourth IEEE Workshop on Applications of Computer Vision. WACV'98 (Cat. No.98EX201). pp. 8-14 (1998)

Lowe, D.G.: Distinctive Image Features from. Int. J. Comput. Vis. 60, 91-110 (2004). https://doi.org/10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94

Lu, N., Wang, J., Wu, Q.H., Yang, L.: An Improved Motion Detection Method for Real-Time Surveillance. IAENG Int. J. Comput. Sci. 35, 1-10 (2008)

Lucas, B.D., Kanade, T.: An iterative image registration technique with an application to stereo vision. En: IJCAI'81 Proceedings of the 7th international joint conference on Artificial intelligence. pp. 674-679 (1981)

Lucena, M.: Uso del flujo óptico en algoritmos probabilístocos de seguimiento, (2003)

Lucena, M., Fuertes, J., De La Blanca, N.: Optical flow-based observation models for particle filter tracking. Pattern Anal. Appl. 18, 135-143 (2015). https://doi.org/10.1007/s10044-014-0409-3

Lucena, M., Pérez De La Blanca, N., Fuertes, J.: Human action recognition based on aggregated local motion estimates. Mach. Vis. Appl. 23, 135-150 (2010). https://doi.org/10.1007/s00138-010-0305-9

Mikolajczyk, K., Schmid, C.: An affine invariant interest point detector. En: European Conference on Computer Vision (ECCV '02). pp. 128-142. Springer- Verlag, Copenhagen (2002)

Monnet, A., Mittal, A., Paragios, N., Ramesh, V.: Background modeling and subtraction of dynamic scenes. En: Proceedings Ninth IEEE International Conference on Computer Vision. pp. 1305-1312 (2003)

Moravec, H.: Visual mapping by a robot rover. En: Proceedings of the 6th international joint conference on Artificial intelligence - Volume 1. pp. 598-600. Morgan Kaufmann Publishers Inc., Tokyo, Japan (1979)

Oliver, N.M., Rosario, B., Pentland, A.P.: A Bayesian Computer Vision System for Modeling Human Interactions. En: IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence. pp. 831-843 (2000)

Otsu, N.: A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. IEEE Trans. Syst. Man. Cybern. 9, 62-66 (1979). https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076

Papageorgiou, C.P., Oren, M.: A general framework for object detection. En: IEEE International Conference on Computer Vision. pp. 555-562 (1998)

Rowley, H., Baluja, S., Kanade, T.: Neural Network-Based Face Detection. IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 20, 23-38 (1998)

Sadeghi-Tehran, P., Clarke, C., Angelov, P.: A real-time approach for autonomous detection and tracking of moving objects from UAV. En: IEEE SSCI 2014 - 2014 IEEE Symposium Series on Computational Intelligence - EALS 2014: 2014 IEEE Symposium on Evolving and Autonomous Learning Systems, Proceedings. pp. 43-49 (2014)

Shapiro, L., Stockman, G.: Computer Vision. (2000)

Shi, J., Malik, J.: Normalized cuts and image segmentation. IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 22, 888-905 (2000). https://doi.org/10.1109/34.868688

Shin, J., Kim, S., Kang, S., Lee, S.W., Paik, J., Abidi, B., Abidi, M.: Optical flow-based real-time object tracking using non-prior training active feature model. Real-Time Imaging. 11, 204-218 (2005). https://doi.org/10.1016/j.rti.2005.03.006

Stauffer, C., Grimson, W.: Learning Patterns of Activity Using Real-Time Tracking. IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 22, 747-757 (2000). https://doi.org/10.1109/34.868677

Tao, M., Bai, J., Kohli, P., Paris, S.: SimpleFlow: A non-iterative, sublinear optical flow algorithm. Comput. Graph. Forum. 31, 345-353 (2012). https://doi.org/10.1111/j.1467-8659.2012.03013.x

Toyama, K., Krumm, J., Brumitt, B., Meyers, B.: Wallflower: principles and practice of background maintenance. En: Proceedings of the Seventh IEEE International Conference on Computer Vision. pp. 255-261 vol.1 (1999)

Viola, P., Jones, M.: Rapid object detection using a boosted cascade of simple features. Proc. 2001 IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognition. CVPR 2001. 1, 1-9 (2001). https://doi.org/10.1109/CVPR.2001.990517

Xu, R., Wunsch, D.C.: Clustering. (2009)

Yilmaz, A., Javed, O., Shah, M.: Object tracking. ACM Comput. Surv. 38, 13-es (2006). https://doi.org/10.1145/1177352.1177355

Capítulo 4. Representación de los objetos

Los sistemas de seguimiento evalúan los cambios que presentan las características de los objetos presentes en una escena a medida que transcurre el tiempo. Para analizar el estado de cada objeto cuadro a cuadro se debe contar con métodos de detección robustos y confiables, acordes a la aplicación en la cual se desempeña el sistema de seguimiento, y con modelos apropiados para representar dichos objetos.

En el capítulo anterior se presentaron diferentes enfoques para la localización de los objetos de interés en una secuencia de video, que abarcan métodos como los detectores de puntos, técnicas de segmentación, modelado y sustracción de fondo, uso de clasificadores y métodos basados en las variaciones temporales de los patrones de intensidad.

Es importante llevar a cabo una representación adecuada de los objetos a seguir. Por una parte, las representaciones de la forma permiten modelar el estado de cada objeto para llevar a cabo las tareas de predicción y comparación mediante métricas, mientras que la representación de la apariencia permite localizar en la escena los objetos que ya tienen un registro temporal o trayectoria, y en muchos casos también ayuda a solucionar situaciones de oclusión. La Figura 4.1 ilustra el uso de los distintos modelos de representación y su papel en los sistemas de seguimiento.

El presente capítulo menciona las representaciones de forma y de apariencia utilizadas para modelar organismos unicelulares en imágenes adquiridas mediante técnicas de microscopía de contraste de fase. También se mencionan las representaciones de los objetos detectados en las aplicaciones complementarias y en trabajos relacionados con los métodos propuestos.

Finalmente, se resalta la utilidad de los modelos de estado como herramientas que permiten asignar una representación matemática a diferentes objetos de forma independiente a su representación, lo cual constituye uno de los principales aspectos a tener en cuenta para alcanzar el objetivo central de esta tesis.

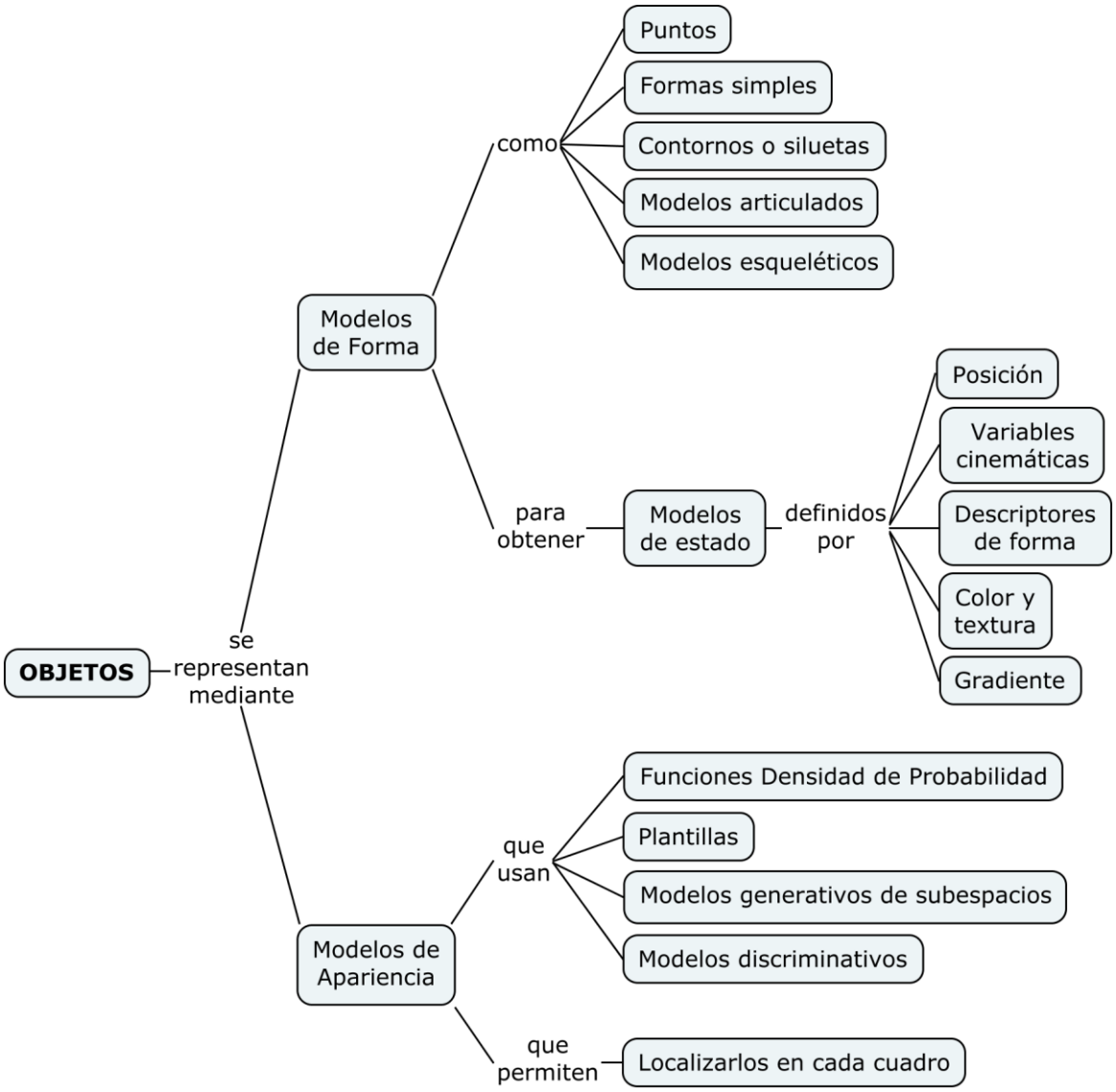


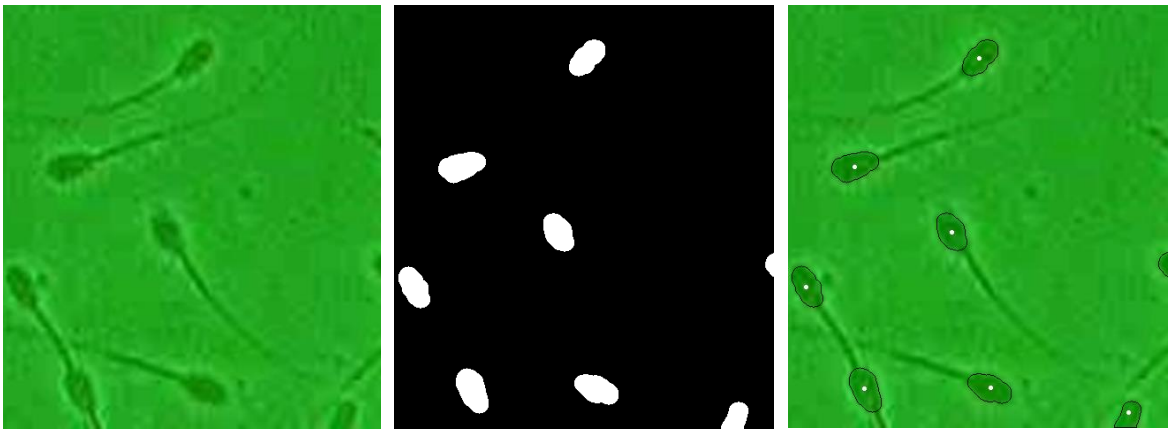
Figura 4.1. Modelos de representación para los objetos y su papel en los esquemas de seguimiento. Fuente: imagen propia

4.1. Modelos basados en forma

En el capítulo 2 se mencionaron los modelos de representación de forma más comunes. Cada representación es más adecuada respecto a las demás dependiendo de la aplicación particular en la cual se utilice (Yilmaz et al. 2006). A continuación, se menciona la utilidad de cada modelo de forma en las aplicaciones desarrolladas y en trabajos relacionados.

4.1.1. Representación mediante puntos

Debido a su corto tamaño en la escena, a sus rápidos movimientos y a su alta concentración, las células espermáticas se modelan mediante un punto representativo, generalmente su centroide, como se ilustra en la Figura 4.2. La imagen corresponde a una región de un cuadro en una secuencia de movimiento espermático obtenida mediante microscopía de contraste de fase.



(a) (b) (c)

Figura 4.2. Representación de células espermáticas de carnero mediante sus centroides. (a) Imagen original, (b) Imagen binaria con la segmentación de las cabezas de los espermatozoides, y (c) Superposición de los contornos y los centroides en la imagen original, obtenidos a partir de la imagen binaria. Fuente: imagen propia.

Para determinar el centroide de un objeto se debe disponer de un mapa de niveles de intensidad con regiones de mayor brillo donde están los objetos de interés, ya sea en niveles de gris o en una imagen binaria, obtenido mediante alguna técnica de detección cómo las que se mencionaron en el capítulo anterior. Cada región de la imagen que contiene a un objeto se analiza por separado mediante la determinación de sus momentos estadísticos (OpenCV 2019a). Sean $f(x, y)$ el mapa de realce o una imagen binaria con la localización de los objetos y R una región del dominio de f que contiene a un objeto particular, entonces, sus momentos estadísticos se definen de la siguiente forma:

$$m_{ij} = \sum_{(x,y)\in R} f(x,y)\, x^i\, y^j \qquad 4.1$$

El centroide C del objeto se obtiene como el valor esperado de x e y:

$$C = (\bar{x}, \bar{y}) = \left(\frac{m_{10}}{m_{00}}, \frac{m_{01}}{m_{00}}\right) \qquad 4.2$$

4.1.2. Representación mediante formas geométricas simples

Como se mencionó en el capítulo 2, las formas simples se utilizan para representar objetos cuando se estudia la evolución de características como su tamaño y su orientación.

En la Figura 4.3 se muestran dos representaciones utilizadas en esta tesis. La primera consiste en una población de bacterias *Escherichia Coli* de tamaño invariable, girando sobre su eje en posiciones fijas, en una secuencia de imágenes adquirida mediante microscopía de contraste de fase. La segunda situación corresponde a la representación de burbujas de hidrógeno adquiridas mediante microscopía óptica y modeladas como círculos, las cuales se generan por una reacción química que ocurre en una superficie metálica, y que pueden aumentar su tamaño con el tiempo.

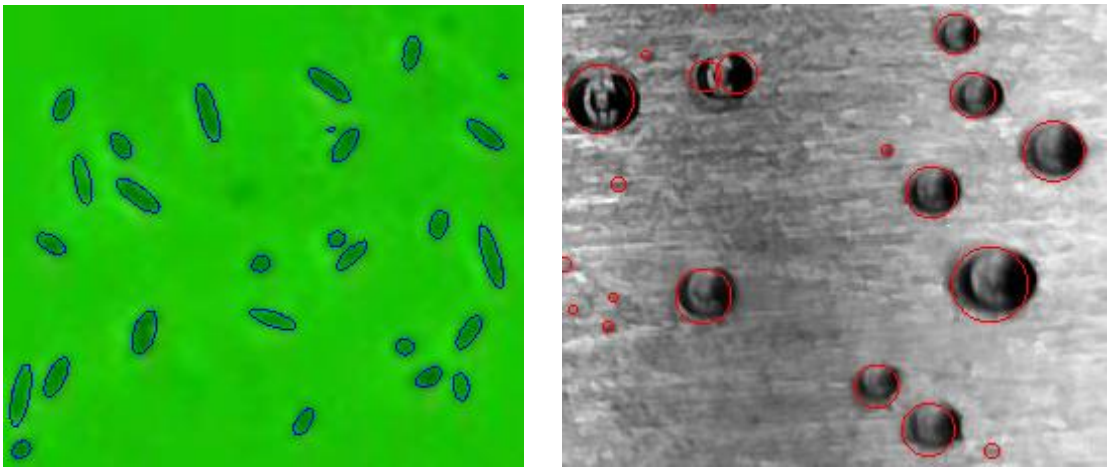


Figura 4.3. Representación de bacterias mediante elipses y burbujas de hidrógeno mediante círculos. Fuente: imagen propia.

4.1.3. Modelos articulados, múltiples y esqueléticos

En algunos trabajos se reporta el uso de modelos articulados para modelar la forma completa de las células espermáticas, al representar la cabeza mediante una elipse y el flagelo mediante un conjunto círculos consecutivos (Yang et al. 2014). La principal limitación de las técnicas utilizadas en la presente tesis para representar de forma completa los espermatozoides mediante modelos articulados, modelos múltiples o modelos esqueléticos tiene que ver con su rápido movimiento respecto a la tasa de adquisición y la resolución espacial utilizada. De esta forma, el estudio dinámico del flagelo de la célula espermática se contempla para un trabajo futuro.

4.2. Modelos basados en apariencia

La apariencia puede ser útil en los sistemas de seguimiento para localizar el objetivo en la escena durante la etapa de detección, o para llevar a cabo la correspondencia temporal. No obstante, un sistema de seguimiento siempre requiere modelar la forma de los objetos, pero no siempre tiene en cuenta su apariencia, ya sea por su corto tamaño (Lei et al. 2016; Reilly et al. 2010) o por el uso de métodos de asociación basados en otras características como el movimiento o la forma (Lucena et al. 2015).

Para la mayoría de las aplicaciones desarrolladas en esta tesis se modeló la forma de los objetos mediante un único punto por célula detectada. Sin embargo, se consideran sus siluetas para poder resolver las situaciones de oclusión. Por la naturaleza de los métodos de detección utilizados, las pequeñas siluetas de las células pueden fusionarse y dar lugar a siluetas de diferente forma y de mayor tamaño. De esta forma, los métodos de seguimiento que se proponen en el capítulo 6 requieren de esta información para poder identificar si un objeto está o no está presente en la escena, es decir, se recurre a un modelo discriminativo.

4.3. Variables y modelos de estado

Modelar el estado de los objetos consiste en determinar características representativas de los mismos, que brinden información respecto a su dinámica, es decir, que expliquen cómo evoluciona su forma y sus movimientos en el tiempo. La complejidad del modelo estará definida por la cantidad de características físicas de los objetos presentes en la escena y las características que puedan extraerse de las imágenes (Challa et al. 2011; Lucena 2003). Acorde a lo anterior, el estado del objeto vendrá representado por un vector X que contiene N_X componentes llamadas variables de estado. Cada variable de estado corresponde a un descriptor de forma, tamaño, movimiento, color, u otra característica de la imagen correspondiente al objeto, que permitan estimar o predecir cuadro a cuadro su localización, es decir, obtener su trayectoria (Li et al. 2013). Entre las características que se pueden obtener de las imágenes para definir el estado de un objeto se encuentran las siguientes:

- **Descriptores de forma:** los momentos espaciales para una imagen binaria que contiene la silueta del objeto, definidos previamente en la Ecuación 4.1, permiten obtener diferentes características sobre la forma del objeto. Si por conveniencia asumimos que el valor de la imagen es $f(x, y) = 1$ en el interior del objeto y $f(x, y) = 0$ fuera de él, entonces el momento m_{00} corresponde al área del objeto. Por otra parte, si la imagen no contiene la silueta sino el contorno del objeto, entonces el momento m_{00} corresponde al perímetro. Así, se puede expresar el factor de forma del objeto como el cociente entre su área y el cuadrado de su perímetro, y la compacidad o circularidad como el recíproco del factor de forma.

A partir de los momentos espaciales de la silueta o del contorno también se pueden determinar siete características conocidas como invariantes de Hu (Bigun 2006), las cuales no cambian frente a traslaciones, rotaciones y escalamientos.

Existen otros descriptores comunes de la forma de los objetos como la relación de aspecto de ventanas rectangulares (Lipton et al. 1998), la colección completa de los puntos de los contornos (Fekir y Benamrane 2014) o parametrizaciones de los mismos (Isard y Blake 1998), descriptores de la cantidad de extremidades o apéndices (Buchelly Imbachí y Pencue Fierro 2009), entre otros.

- **Descriptores de movimiento:** según la aplicación, las razones de cambio de los desplazamientos pueden variar uniformemente o de forma no determinada. En vista de eso, se pueden requerir descriptores de primer orden si los desplazamientos cuadro a cuadro son constantes, o de un orden superior si existe aceleración en los movimientos. Como ejemplo, los descriptores de velocidad lineal $\vec{v}_k$ y aceleración $\vec{a}_k$ de un objeto puntual en cada instante discreto k se pueden estimar a partir del conocimiento de las posiciones $\overrightarrow{p_k} = (x_k, y_k)$ del objeto cuadro a cuadro (Brasnett et al. 2005; Sahbani y Adiprawita 2016):

$$\vec{v}_k = \vec{p}_k - \vec{p}_{k-1} \qquad 4.3$$

$$\vec{a}_k = \vec{v}_k - \vec{v}_{k-1} \qquad 4.4$$

No obstante, es posible obtener descriptores de rapidez y dirección de movimiento de los objetos por otros métodos, por ejemplo, mediante la Ecuación 3.4 que define el flujo óptico (Cheng y Ting 2012; Shin et al. 2005), o mediante transformaciones afines durante algún proceso de registración cuadro a cuadro (Dufrenois y Hamad 2007; Giai-Checa et al. 1994).

Los descriptores de movimiento comúnmente se determinan para caracterizar el movimiento de traslación de los objetos; sin embargo, también es usual analizar el movimiento angular de los objetos, es decir, su cambio de orientación en el tiempo (Karthikeyan et al. 2012; Yang et al. 2014; Zhou y Tao 2004).

- **Descriptores de la imagen:** existen características de la imagen tales como el brillo, el color, la textura, el gradiente, entre otras, que pueden utilizarse en el modelo de estado del objeto, siempre que ellas sean representativas del mismo. Para esto, es necesario obtener descriptores que identifiquen al objeto de manera global respecto a esas características, como valores promedio o varianzas. Por ejemplo, en la literatura se pueden encontrar sistemas de seguimiento que consideran el brillo promedio del objeto como una variable de estado de cada objeto (Beresford-Smith y Van Helden 1994; Borş y Pitas 2000). No obstante, es más usual emplear estas características para formar mapas o patrones que definen la apariencia de los objetos, en lugar de descriptores generales de los mismos.

La cantidad de variables de estado del modelo de estado X depende de la representación de forma del objeto y de la aplicación en la cual se utiliza el esquema de seguimiento. Por ejemplo, al representar los objetos mediante su centroide se puede precisar un modelo de estado que contemple la posición del objeto (Aprinaldi et al. 2016; Buchelly Imbachí et al. 2011), o también su velocidad (Jeong et al. 2014; Prokaj et al. 2011; Ravanfar y Moradi 2011), o incluso su aceleración (Brasnett et al. 2005; Sahbani y Adiprawita 2016). En la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos de vectores de estado según las distintas representaciones de los objetos.

Para las aplicaciones desarrolladas en esta tesis, los vectores de estado contemplan las posiciones de puntos representativos (Isa-Jara et al. 2017), coordenadas del centroide y parámetros cinemáticos de primer orden (Buchelly Imbachí et al. 2018; Buchelly Imbachí et al. 2017), centroide y parámetros de tamaño (Buchelly Imbachí et al. 2020a; Buchelly Imbachí et al. 2016b), centroide con parámetros de tamaño y orientación (Buchelly Imbachí et al. 2016c).

Tabla 4.1. Ejemplos de vectores de estado para algunas representaciones de forma.

Representación	**Vector de estado**	**Características**
Punto	$X = [x, y, v_x, v_y, a_x, a_y]$	Posición, velocidad y aceleración.
Rectángulo	$X = [x, y, v_x, v_y, w, h]$	Posición, velocidad y tamaño de la ventana.
Elipse	$X = [x, y, a, b, \theta]$	Posición del centro, longitud de sus ejes e inclinación.
Contorno	$X = [x_1, y_1, x_2, y_2, \dots, x_n, y_n]$	Puntos del contorno o una parametrización del mismo.
Silueta	$X = [x, y, \bar{R}, \bar{G}, \bar{B}, h_0, \dots, h_6]$	Centroide, color promedio y las invariantes de Hu.
Esqueleto	$X = [x_1, y_1, x_2, y_2, \dots, x_n, y_n]$	Puntos de interés como intersecciones y terminaciones.

4.4.Comentarios finales

En las secciones previas se describió cómo se representó la forma y la apariencia de los objetos de interés. Para las aplicaciones médicas estudiadas en esta tesis se utilizaron las representaciones de puntos y de elipses, por la simplicidad de la forma de los objetos detectados, por su tamaño en la imagen y por las características de movimiento que se requieren para su análisis. En trabajos futuros se pueden utilizar modelos articulados o esqueléticos para analizar, por ejemplo, el batido del flagelo de las células espermáticas.

Por otra parte, se mencionaron las variables o características que se tuvieron en cuenta para los vectores de estado en cada sistema de seguimiento. En el capítulo 5 se describirán los métodos utilizados para llevar a cabo la correspondencia temporal mediante la comparación de las variables seleccionadas en cada aplicación.

4.5. Referencias

Aprinaldi, Jati, G., Gunawan, A.A.S., Bowolaksono, A., Lestari, S.W., Jatmiko, W.: Human Sperm tracking using Particle Swarm Optimization combined with Smoothing Stochastic sampling on low frame rate video. 2015 Int. Symp. Micro-NanoMechatronics Hum. Sci. MHS 2015. (2016). https://doi.org/10.1109/MHS.2015.7438308

Beresford-Smith, B., Van Helden, D.F.: Applications of RADAR tracking algorithms to motion analysis in biomedical images. 411-415 (1994)

Bigun, J.: Vision with Direction. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2006)

Borş, A., Pitas, I.: Prediction and tracking of moving objects in image sequences. IEEE Trans. Image Process. 9, 1441-5 (2000). https://doi.org/10.1109/83.855440

Brasnett, P., Mihaylova, L., Canagarajah, N., Bull, D.: Particle filtering with multiple cues for object tracking in video sequences. Image Video Commun. Process. 2005. 5685, 430 (2005). https://doi.org/10.1117/12.585882

Buchelly Imbachí, F., Bravo Montenegro, D., Pencue Fierro, L., Ferrin Bolaños, D.: Sistema De Seguimiento Bidimensional Mediante Técnicas De Control Digital Y Visión Computacional - Two-Dimensional Tracking System Through Digital Control And Artificial Vision Techniques. Rev. Colomb. Física. 43, 1-4 (2011)

Buchelly Imbachí, F., Gomez, M., Cere, S., Ballarre, J., Ballarin, V., Pastore, J.: Measurement of the Degradation Rate of Anodized AZ91 Magnesium Temporary Implants Using Digital Image Processing Techniques. En: VIII Latin American Conference on Biomedical Engineering and XLII National Conference on Biomedical Engineering. CLAIB 2019. IFMBE Proceedings, vol 75. pp. 290-297 (2020)

Buchelly Imbachí, F., Pastore, J., Passoni, I., Ballarin, V.: Identificación de rasgos faciales mediante técnicas de procesamiento de imágenes. En: IEEE ARGENCON 2016 - El congreso bienal de IEEE Argentina. pp. 1-5. , Buenos Aires, Argentina (2016)(a)

Buchelly Imbachí, F., Pedetta, A., Pastore, J., Herrera, K., Ballarin, V.: Automatic tracking of flagellar rotation of bacteria. En: VII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica – CLAIB 2016. Colombian Association of Bioengineering and Medical Electronics (ABIOIN), Bucaramanga, Colombia (2016)(b)

Buchelly Imbachí, F., Pencue Fierro, L.: Clasificación E Identificación De Artrópodos Mediante Procesamiento Digital De Imágenes. Bistua Rev. la Fac. Ciencias Básicas. 7, 1-6 (2009)

Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J., Greco, M., Iniesta-Cuerda, M., Garde, J., Soler, A., Ballarin, V., Cesari, A.: Objective evaluation of ram and buck sperm motility by using a novel sperm tracker software. Reproduction. 156, 11-21 (2018). https://doi.org/10.1530/REP-17-0755

Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J., Soler, A., Cesari, A., Ballarin, V.: Evaluation of motility quality in ram sperm by using a novel open - source suite of algorithms. En: Congreso Argentino de Bioingeniería - SABI 2017. , Córdoba, Argentina (2017)

Challa, S., Morelande, M.R., Mušicki, D., Evans, R.J.: Fundamentals of object tracking. (2011)

Cheng, C.-C., Ting, S.-H.: Robust Visual Tracking Using Spatio-temporal Approach with Optical Flow. 2012 IEEE Fifth Int. Conf. Adv. Comput. Intell. 553-557 (2012)

Dufrenois, F., Hamad, D.: Fuzzy weighted support vector regression for multiple linear model estimation: Application to object tracking in image sequences. En: IEEE International Conference on Neural Networks - Conference Proceedings. pp. 1289-1294 (2007)

Fekir, A., Benamrane, N.: Fast active contour for object tracking in image sequence. Proc. IEEE/ACS Int. Conf. Comput. Syst. Appl. AICCSA. 2014, 184-189 (2014). https://doi.org/10.1109/AICCSA.2014.7073197

Giai-Checa, B., Bouthemy, P., Vieville, T.: Segment-based detection of moving objects in a sequence of images. 384-389 (1994). https://doi.org/10.1109/icpr.1994.576304

Isa-Jara, R., Buchelly Imbachí, F., Meschino, G., Ballarin, V.: Improved Particle Swarm Optimization algorithm applied to rigid registration in medical images. En: IFMBE Proceedings. pp. 161-164. Springer Verlag (2017)

Isard, M., Blake, A.: CONDENSATION-conditional density propagation for visual tracking. Int. J. Comput. Vis. 29, 5-28 (1998)

Jeong, J., Yoon, T., Park, J.: Kalman Filter Based Multiple Objects Detection-Tracking Algorithm Robust to Occlusion. En: SICE Annual Conference 2014. pp. 941-946. IEEE, Sapporo, Japan (2014)

Karthikeyan, S., Delibaltov, D., Gaur, U.: Unified probabilistic framework for simultaneous detection and tracking of multiple objects with application to bio-image sequences. En:

Image Processing (ICIP), 2012 19th IEEE International Conference on. pp. 1349-1352. IEEE, Orlando, FL, USA (2012)

Lei, Z., Wang, M., Lei, T., Li, D.: Tracking moving weak objects in celestial image sequences. IEEE Trans. Aerosp. Electron. Syst. 52, 1257-1266 (2016). https://doi.org/10.1109/TAES.2015.150110

Li, X., Hu, W., Shen, C., Zhang, Z., Dick, A., Hengel, A. van den: A Survey of Appearance Models in Visual Object Tracking. ACM Trans. Intell. Syst. Technol. (2013). https://doi.org/10.1145/2508037.2508039

Lipton, A.J., Fujiyoshi, H., Patil, R.S.: Moving target classification and tracking from real-time video. En: Proceedings Fourth IEEE Workshop on Applications of Computer Vision. WACV'98 (Cat. No.98EX201). pp. 8-14 (1998)

Lucena, M.: Uso del flujo óptico en algoritmos probabilístocos de seguimiento, (2003)

Lucena, M., Fuertes, J., De La Blanca, N.: Optical flow-based observation models for particle filter tracking. Pattern Anal. Appl. 18, 135-143 (2015). https://doi.org/10.1007/s10044-014-0409-3

OpenCV: OpenCV: cv::Moments Class Reference, https://docs.opencv.org/3.0.0/d8/d23/classcv_1_1Moments.html

Prokaj, J., Duchaineau, M., Medioni, G.: Inferring tracklets for multi-object tracking. IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit. Work. (2011). https://doi.org/10.1109/CVPRW.2011.5981753

Ravanfar, M.R., Moradi, M.H.: Low contrast sperm detection and tracking by Watershed algorithm and Particle filter. En: 2011 18th Iranian Conference of Biomedical Engineering, ICBME 2011. pp. 260-263 (2011)

Reilly, V., Idrees, H., Shah, M.: Detection and tracking of large number of targets in wide area surveillance. Lect. Notes Comput. Sci. (including Subser. Lect. Notes Artif. Intell. Lect. Notes Bioinformatics). 6313 LNCS, 186-199 (2010). https://doi.org/10.1007/978-3-642-15558-1_14

Sahbani, B., Adiprawita, W.: Kalman Filter and Iterative-Hungarian Algorithm Implementation for Low Complexity Point Tracking as Part of FastMultiple Object Tracking System. En: 2016 IEEE 6th International Conference on System Engineering and Technology (ICSET). pp. 109-115. IEEE, Bandung – Indonesia (2016)

Shin, J., Kim, S., Kang, S., Lee, S.W., Paik, J., Abidi, B., Abidi, M.: Optical flow-based real-time object tracking using non-prior training active feature model. Real-Time Imaging. 11, 204-218 (2005). https://doi.org/10.1016/j.rti.2005.03.006

Yang, H.-F., Descombes, X., Prigent, S., Malandain, G., Druart, X., Plouraboue, F.: Head tracking and flagellum tracing for sperm motility analysis. 2014 IEEE 11th Int. Symp. Biomed. Imaging. 310-313 (2014). https://doi.org/10.1109/ISBI.2014.6867871

Yilmaz, A., Javed, O., Shah, M.: Object tracking. ACM Comput. Surv. 38, 13-es (2006). https://doi.org/10.1145/1177352.1177355

Zhou, Y., Tao, H.: A background layer model for object tracking through occlusion. En: Ninth IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV'03). pp. 1079-1085 vol.2 (2004)

Capítulo 5. Métodos de seguimiento

Se han mencionado las etapas generales que tienen lugar en los sistemas de seguimiento: la detección de los objetos, el seguimiento y el análisis del movimiento. En el capítulo 2 se resumieron métodos tradicionales para llevar a cabo dichas tareas en distintos ámbitos. En el capítulo 3 se evaluaron algunos métodos para localizar los objetos de interés en las aplicaciones desarrolladas. En el capítulo 4 se mencionaron las diferentes representaciones de la forma y de la apariencia para los objetos de interés y las características que se pueden extraer de cada objeto según el modelo utilizado. Tales característicos se expresan mediante vectores de estado para poder llevar a cabo las operaciones de predicción y de correspondencia temporal.

En el presente capítulo se describen las fases que conforman el proceso de seguimiento en los trabajos desarrollados: la predicción de los estados actuales, la asociación o correspondencia temporal y la actualización de los modelos (Challa et al. 2011; Forsyth y Ponce 2003; Hammoud 2006). En la Figura 5.1 se ilustra un esquema típico de seguimiento que contempla las fases mencionadas. En la sección 5.1 se realiza una descripción general del proceso de seguimiento mediante el enfoque probabilístico. Como resultado del seguimiento, en cada instante se almacenan nuevos puntos de las trayectorias existentes, se generan nuevas trayectorias cuando los objetos ingresan a la escena, o se finalizan si estos la abandonan.

En la fase de predicción se estima el estado de cada objeto en el instante actual, según el modelo de la dinámica, antes de obtener las mediciones de las variables que permiten la correspondencia temporal. En las aplicaciones desarrolladas para esta tesis, se utilizaron filtros de Kalman para la estimación de las posiciones de células espermáticas, y una técnica basada en flujo óptico para estimar el desplazamiento de burbujas ascendentes en un medio acuoso. En la sección 5.2 se describen las técnicas mencionadas para la predicción de los estados de dichos objetos. Estas técnicas tienen como propósito reducir el radio de búsqueda en la imagen y brindar robustez al seguimiento. Por otra parte, para el seguimiento de bacterias fue necesario prescindir de mecanismos de predicción, como se describirá en el capítulo 7.

La fase de correspondencia temporal constituye la esencia del proceso de seguimiento (bloques encerrados por líneas discontinuas en la Figura 5.1). En ella se llevan a cabo procesos de optimización para encontrar los puntos o las regiones más probables donde se

localizan los objetos de interés, mediante la comparación entre los estados estimados por la predicción y las nuevas medidas obtenidas de la secuencia de video.

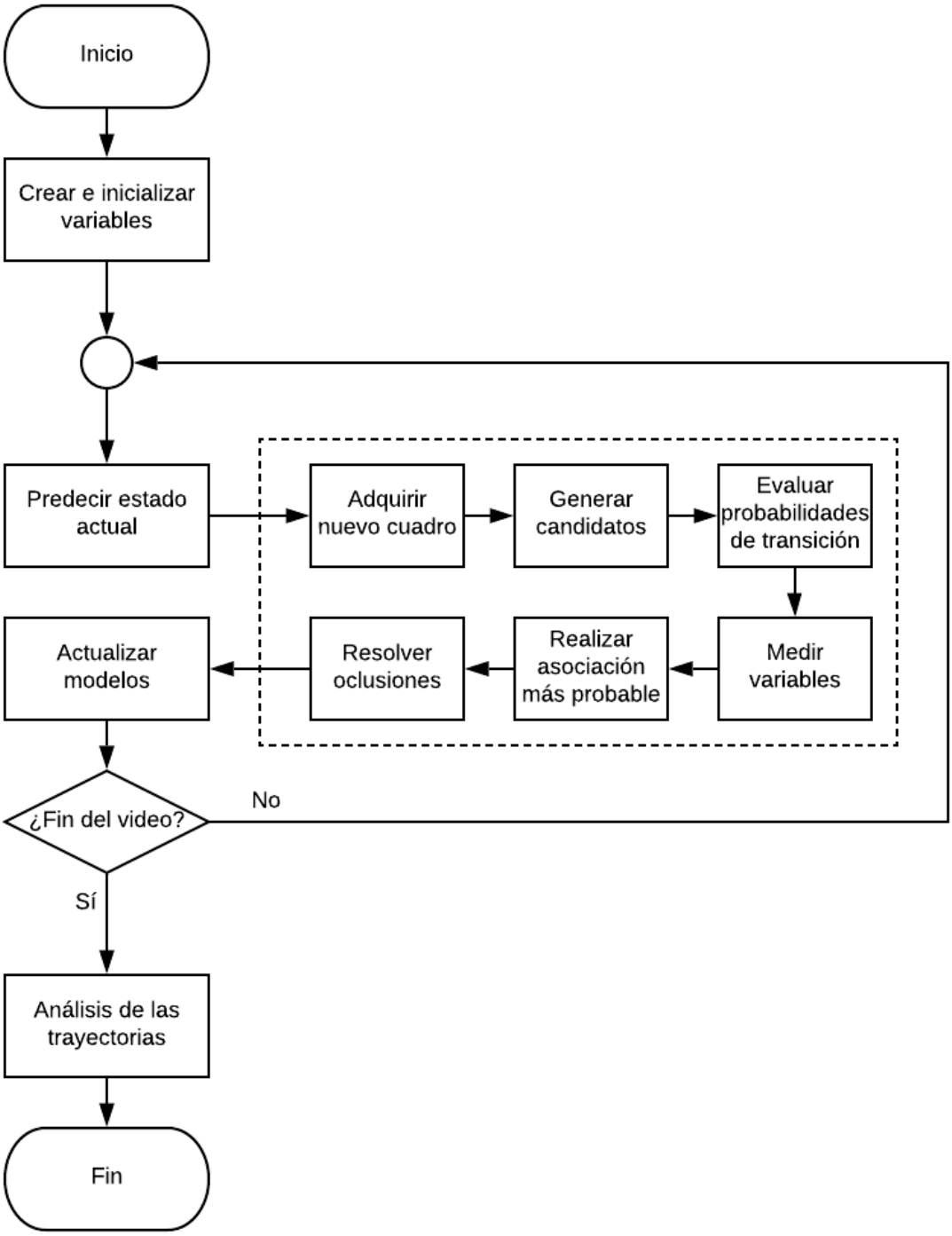


Figura 5.1. Diagrama de flujo de un esquema típico de seguimiento. Fuente: imagen propia.

En la sección 5.3 se describen los métodos generales propuestos para llevar a cabo la asociación, el tratamiento de las oclusiones para escenas con múltiples objetos y la actualización de sus respectivos estados. El método de asociación realiza la minimización conjunta de los cambios en las variables de estado para el seguimiento de múltiples objetos, modelados con alguna de las representaciones de forma mencionadas en el capítulo 4. De igual modo, la información contenida en la apariencia de los objetos se utiliza para para resolver situaciones de oclusión.

5.1. Enfoque probabilístico para el seguimiento

En el capítulo 4 se mencionaron diferentes representaciones para los objetos en los esquemas de seguimiento y cómo ellas conducen al uso de modelos de estado para estudiar la dinámica de los mismos. La evolución de las distintas características que determinan el modelo del objeto, en particular la forma cómo se generan las trayectorias, se lleva a cabo en la fase de seguimiento mediante el enfoque probabilístico descrito a continuación.

El conocimiento de los estados de los objetos presentes en la escena se puede representar mediante la *fdp* conjunta $p(\boldsymbol{S}^n) = p(\boldsymbol{S}_n, \boldsymbol{S}_{n-1}, \dots, \boldsymbol{S}_0)$, donde $\boldsymbol{S}_n$ representa el estado de un objeto o la colección de los estados de los múltiples objetos en el tiempo t_n o en el instante discreto n (Challa et al. 2011). Sea también $\boldsymbol{y}^n = (\boldsymbol{y}_1, \boldsymbol{y}_2, \dots, \boldsymbol{y}_n)$ la colección de las mediciones $\boldsymbol{y}_i$ en todos los instantes i inferiores o iguales a n. Si se conocen las leyes físicas que relacionan a $\boldsymbol{S}^n$ e $\boldsymbol{y}^n$, y también sus *fdp*, entonces se puede utilizar el Teorema de Bayes para actualizar el conocimiento de dichos estados:

$$p(\boldsymbol{S}^n|\boldsymbol{y}^n) = \frac{p(\boldsymbol{y}^n|\boldsymbol{S}^n)p(\boldsymbol{S}^n)}{p(\boldsymbol{y}^n)} \qquad 5.1$$

En la ecuación 5.1, la distribución de probabilidad condicional $p(\boldsymbol{S}^n|\boldsymbol{y}^n)$ es la distribución *a posteriori* del estado de los objetos, la cual depende del conocimiento *a priori* $p(\boldsymbol{S}^n)$ y de la función esperanza $p(\boldsymbol{y}^n|\boldsymbol{S}^n)$. Por otra parte, el denominador $p(\boldsymbol{y}^n)$ es el factor de normalización y asegura que la suma de probabilidades sea 1.

El enfoque Bayesiano utilizado en la ecuación 5.1 se puede expandir para obtener una solución recursiva. Además, es frecuente tener en cuenta algunas consideraciones que facilitan la elección de los métodos que describen los distintos procesos que intervienen en el seguimiento: las mediciones $\boldsymbol{y}_n$ en un instante dado n dependen únicamente del estado de los objetos $\boldsymbol{S}_n$ en el mismo instante, y también son condicionalmente independientes de las mediciones tomadas en instantes anteriores $\leq n-1$. En vista de lo anterior, muchos sistemas del mundo real obedecen la propiedad de Markov (Challa et al. 2011), según la cual el estado presente depende únicamente del estado inmediatamente anterior y no de los previos. Así, se puede comprobar que la *densidad condicional del estado* actual de los objetos se determina de la siguiente manera:

$$p(\boldsymbol{S}_n|\boldsymbol{y}^n) = \frac{1}{p(\boldsymbol{y}_n|\boldsymbol{y}^{n-1})} p(\boldsymbol{y}_n|\boldsymbol{S}_n) \int_{\boldsymbol{S}_{n-1}} p(\boldsymbol{S}_n|\boldsymbol{S}_{n-1}) p(\boldsymbol{S}_{n-1}|\boldsymbol{y}^{n-1}) d\boldsymbol{S}_{n-1} \quad 5.2$$

La solución de la integral en la ecuación 5.2 permite obtener la predicción del estado de los objetos en el instante actual n, dados el estado y las medidas obtenidas hasta el instante anterior $n-1$; de igual forma, la distribución $p(\boldsymbol{y}_n|\boldsymbol{S}_n)$ se maximiza para realizar la correspondencia temporal y se conoce como *modelo de observación* (Aprinaldi et al. 2016; Lucena et al. 2015).

5.1.1. Modelos de la dinámica y modelos de medición

Para llevar a cabo los procesos de predicción y asociación contemplados en las ecuaciones 5.1 y 5.2 es necesario disponer de un modelo de la dinámica de los objetos, es decir, de cómo evolucionan sus estados en el transcurso del tiempo. Muchos procesos físicos, entre ellos el movimiento de los objetos, los cuales se someten a perturbaciones aleatorias y cuyos estados se pueden representar mediante vectores de dimensión finita, pueden modelarse utilizando ecuaciones de diferencias. Si $\boldsymbol{S}_{\mathrm{n}}$ contiene vectores de estado $\boldsymbol{X}$ en el instante actual n, representados como se mencionó en el capítulo anterior, entonces se pueden escribir ecuaciones de diferencias:

$$\boldsymbol{S}_n = \boldsymbol{g}(\boldsymbol{S}_{n-1}, \boldsymbol{v}_n) \quad 5.3$$

En la ecuación 5.3, la función $\boldsymbol{g}$ es real y, en general, no lineal. Además, las perturbaciones $\boldsymbol{v}_{\mathrm{n}}$ representan el ruido o las fluctuaciones aleatorias que afectan al sistema.

De la misma forma, deben considerarse los modelos de medición, en los cuales las mediciones son función del estado de los objetos. Además, como se mencionó previamente, las mediciones realizadas para un instante particular se suponen condicionalmente independientes de las mediciones realizadas en instantes previos. Así, con el fin de utilizar la solución Bayesiana recursiva (ecuación 5.2), los modelos de medición deben tener la siguiente forma:

$$\boldsymbol{y}_n = \boldsymbol{l}(\boldsymbol{S}_n, \boldsymbol{w}_n) \quad 5.4$$

donde $\boldsymbol{w}_n$ representa el ruido blanco debido a los errores de medición.

5.2. Métodos de predicción

En las distintas aplicaciones que surgen del desarrollo de esta tesis, se utilizaron mecanismos de predicción, de acuerdo al tipo de movimiento que describen los objetos a seguir (Buchelly Imbachí et al. 2018; Buchelly Imbachí et al. 2017).

En el caso particular de las células espermáticas, se sabe que ellas mantienen una tendencia lineal o circular acompañada de un movimiento de vaivén lateral (Muiño 2008; World-Health-Organization 2010), similar a una señal de ruido aleatorio, como se describirá en el capítulo 6. De esta forma, el filtro de Kalman se presenta como una herramienta apropiada para predecir las posiciones de cada célula.

En otra aplicación se analizó la dinámica de la liberación de burbujas generadas en la superficie de un material metálico y se hizo el seguimiento de su movimiento ascendente, como se mencionará en el capítulo 7. En este caso, se presenta una condición en la cual la mayoría de los objetos a seguir muestran una tendencia conjunta de movimiento, por lo cual se utilizaron los vectores de flujo óptico como herramienta para la predicción.

Por otra parte, en el seguimiento de algunos tipos de bacterias se presentan movimientos bruscos impredecibles que implican cambios repentinos de rapidez y dirección de movimiento, como se mencionará en el capítulo 7. Por tal razón, en estos casos no se utilizaron métodos de predicción.

5.2.1. Predicción por Filtro de Kalman

Este método es muy utilizado con el fin de predecir el estado de un objeto, para lo cual hace uso de tres suposiciones importantes:

- **S1**: Las ecuaciones de la dinámica y de las mediciones, casos particulares de las ecuaciones 5.3 y 5.4, son lineales, con matrices de transición $\boldsymbol{F}$ y $\boldsymbol{H}$ respectivamente:

$$\boldsymbol{x}_n = \boldsymbol{F}\boldsymbol{x}_{n-1} + \boldsymbol{v}_n \tag{5.5}$$

$$\boldsymbol{y}_n = \boldsymbol{H}\boldsymbol{x}_{n-1} + \boldsymbol{w}_n \tag{5.6}$$

- **S2**: Las señales $\boldsymbol{v}_n$ y $\boldsymbol{w}_n$ corresponden a ruido blanco, no correlacionadas y Gaussianas con media cero y matrices de covarianza $\boldsymbol{Q}_n$ y $\boldsymbol{R}_n$, respectivamente.

- **S3**: La densidad de probabilidad *a posteriori* del estado del objeto $p(\boldsymbol{S}_{n-1}|\boldsymbol{y}^{n-1})$ en el instante $n-1$ es Gaussiano con media $\widehat{\boldsymbol{x}}_{n-1|n-1}$ y covarianza $\boldsymbol{P}_{n-1|n-1}$.

Si la aplicación particular cumple con las suposiciones anteriores, el filtro de Kalman brinda una solución óptima al término integral de la ecuación 5.2. El filtro de Kalman lleva a cabo una secuencia de pasos (Catlin 1989; Challa et al. 2011) que se resumen a continuación:

- **Paso 1**: Calcular la predicción de la media $\widehat{\boldsymbol{x}}_{n|n-1}$ y la matriz de covarianza $\boldsymbol{P}_{n|n-1}$ para el estado del objeto.

- **Paso 2**: Calcular la predicción de las mediciones $\widehat{\boldsymbol{y}}_{n|n-1}$ y parámetros propios del método: matriz de innovación y ganancia de Kalman.

- **Paso 3**: Calcular la media $\widehat{\boldsymbol{x}}_{n|n}$ y la matriz de covarianza $\boldsymbol{P}_{n|n}$ *a posteriori*.

Si bien el filtro clásico de Kalman funciona con los pasos descritos, su uso se limita para un único objeto (Pelapur et al. 2012a; Vinaykumar y Jatoth 2014). No obstante, para el seguimiento de múltiples objetivos es muy común asociar un filtro de Kalman a cada trayectoria y determinar las mediciones correspondientes a cada una mediante algún método de asociación o correspondencia (Hong et al. 2018; Jeong et al. 2014; Sahbani y Adiprawita 2016) como los que se mencionarán en la sección 5.3. De esta forma, se utilizaron filtros de Kalman individuales para la predicción de cada célula espermática en la aplicación que se describirá en el capítulo 6.

5.2.2. Predicción basada en flujo óptico

El mapa de flujo óptico denso para todo el campo de la imagen, o los vectores de movimiento para un conjunto de puntos se determinan mediante la ecuación de flujo óptico, descrita en el capítulo 3: $\overrightarrow{\nabla E} * \vec{v} = -(\partial E/\partial t)\delta t$ (Ecuación 3.4). Para los esquemas de predicción basados en flujo óptico, la posición $\vec{x}_n$ de un objeto en el instante actual n se estima a partir de su vector de desplazamiento $\vec{v}_{n-1}$ de la siguiente forma:

$$\hat{\vec{x}}_n = \vec{x}_{n-1} + \vec{v}_{n-1} \qquad 5.10$$

En particular, los métodos de predicción basados en flujo óptico son útiles cuando los objetos constan de varios puntos (Sadeghi-Tehran et al. 2014; Shin et al. 2005), como vehículos, personas, etc. De esta forma, se pueden estimar de manera confiable la ubicación de los puntos del objeto que se encuentran en oclusión, mediante interpolaciones o promedios con los vectores de flujo óptico de los puntos visibles. En el caso particular de las burbujas generadas por una superficie metálica, uno de los objetos de estudio de esta tesis, el modelo de forma utilizado es circular y se considera el promedio de los vectores de flujo contenidos en el interior de cada burbuja para estimar el próximo estado cuadro a cuadro.

5.3. Método propuesto para la asociación y el tratamiento de las oclusiones

Como se mencionó en la sección 5.1, un modelo de observación corresponde a la distribución de probabilidad $p(\boldsymbol{y}_n|\boldsymbol{S}_n)$, la cual debe maximizarse para indicar la asociación más probable entre las mediciones actuales y los estados de los objetos presentes en la escena. En los enfoques tradicionales para el seguimiento, el proceso de optimización se lleva a cabo de forma diferente según la representación de la forma de los objetos (Yilmaz et al. 2006), como se indicó en el capítulo 2. Así, pueden clasificarse los métodos de correspondencia como métodos de seguimiento de puntos, seguimiento de kernel y seguimiento de siluetas.

A continuación, se mencionan algunos aspectos generales de los métodos propuestos para el seguimiento de objetos y las diferencias respecto a los métodos tradicionales. Posteriormente se describirán los procedimientos para la asociación o correspondencia temporal y para el tratamiento de las oclusiones. Finalmente, se hace una descripción de los parámetros de ajuste de los métodos propuestos, de manera preliminar a su uso en las aplicaciones específicas presentadas en los capítulos 6 y 7.

5.3.1. Referentes teóricos que dan soporte al método propuesto

Como se mencionó en el capítulo 4, cada modelo de forma puede representarse mediante un vector de estado con cierta dimensionalidad determinada por número de características. Así, el método de seguimiento propuesto consiste en la minimización simultánea de varios tipos de características, que pueden ser: la posición de puntos representativos del objeto, descriptores de forma, características cinemáticas o características de la imagen, entre otras. El método propuesto se desarrolla mediante la generación de una lista de candidatos para asociar, que se encuentren dentro de una zona de búsqueda circular centrada en cada medición obtenida del cuadro actual de la secuencia.

La comparación de los estados estimados con las medidas actuales para la generación de candidatos se lleva a cabo mediante el uso de alguna métrica o medida de distancia, por ejemplo, la norma L_p definida en el capítulo 3. En este sentido, el método propuesto tiene su origen en los métodos de asociación por mínima distancia, y el Algoritmo Húngaro, expuestos en el capítulo 2.

En contraste con los métodos de minimización de la distancia (Liu et al. 2013; Shin et al. 2017), en el método propuesto se generaliza la noción de distancia para incluir representaciones más complejas que los puntos. Esto quiere decir que se comparan vectores de estado constituidos por variables de diferente naturaleza, no únicamente posiciones, por lo cual se debe normalizar cada una de sus componentes, escalando sus valores linealmente al rango [0,1].

Por otra parte, el Algoritmo Húngaro realiza asociaciones mediante una función de costo que depende de la distancia entre las trayectorias y las detecciones (Lei et al. 2016; Sahbani y

Adiprawita 2016), y genera una matriz de todas las posibles asociaciones. El método propuesto se diferencia del Algoritmo Húngaro porque cada asociación se restringe a la zona de búsqueda y no a toda la escena, y en este contexto las asociaciones no son uno a uno.

5.3.2. Método de asociación o correspondencia temporal

El método de asociación propuesto toma como referencia los métodos que realizan la búsqueda de candidatos para asociar en entornos circulares. Por ejemplo, Liu *et al*. (Liu et al. 2013) utilizan una zona con radio de búsqueda fijo definido de forma empírica. También, Arasteh *et al*. (Arasteh et al. 2018) utilizan zonas circulares con radios que crecen en múltiplos enteros de la velocidad promedio cuadro a cuadro cuando no se detecta a los objetos de interés. El método de asociación propuesto en esta tesis utiliza un enfoque similar al descripto por Arasteh *et al*., con un planteo superador en el cual el radio de búsqueda en oclusión crece según un promedio temporal de la velocidad, y se actualiza cuando no hay oclusión, a partir del máximo desplazamiento realizado por el objeto entre cuadros consecutivos (Buchelly Imbachí et al. 2017).

A continuación, se describe el método de asociación propuesto. Sea N_n la cantidad de trayectorias presentes y M_n la cantidad de mediciones en el instante actual n. Sea también X el vector de estado de cada objeto, el cual contiene su centroide y las características que sean de interés para describir el modelo según la aplicación, como la velocidad, aceleración, etc. De igual forma, sea Z el vector de mediciones para una detección, el cual tiene la misma dimensión de los vectores de estado. Teniendo en cuenta lo anterior, el método lleva a cabo los siguientes pasos, representados en la Figura 5.2.

- **Paso 1:** Obtener el estado estimado $\hat{X}_{i,n}$ para cada objeto i, con $1 \leq i \leq N_n$, para el instante actual n, mediante algún método de predicción o filtrado como los mencionados en la sección 5.2.

- **Paso 2:** Determinar los centroides y los demás parámetros pertenecientes a los vectores de medición $Z_{a,n}$, para cada detección a ($1 \leq a \leq M_n$) del instante actual n, a partir de una nueva imagen obtenida de la secuencia de video.

- **Paso 3:** Normalizar los estados estimados y los vectores de medición, ya que ellos tienen componentes de diferente naturaleza: coordenadas espaciales, velocidad, etc.

- **Paso 4:** Determinar la distancia entre cada medición $Z_{a,n}$ y los estados estimados $\hat{X}_{i,n}$ del instante actual n, denotada por $d(Z_{a,n}, \hat{X}_{i,n})$.

- **Paso 5:** Generar una lista de candidatos para asociar con la medición $Z_{a,n}$ con aquellos estados estimados $\hat{X}_{i,n}$ que presenten una distancia inferior a un radio de búsqueda $r_{i,n}$ asociado a cada trayectoria, es decir, $d(Z_{a,n}, \hat{X}_{i,n}) < r_{i,n}$. El

comportamiento del radio de búsqueda $r_{i,n}$ se describe en pasos posteriores. En la Figura 5.2 se muestra un ejemplo sobre la generación de candidatos.

- **Paso 6:** Elegir al candidato más probable $c_{a,n}$ para asociar con la medición, como aquel que presente mínima distancia, de la siguiente manera:

$$c_{a,n} = \underset{1 \le i \le N_n}{\operatorname{argmin}} \left\{ d\left(Z_{a,n}, \hat{X}_{i,n}\right) | d\left(Z_{a,n}, \hat{X}_{i,n}\right) < r_{i,n} \right\} \quad 5.11$$

- **Paso 7:** Ordenar las mediciones de manera creciente según la distancia a su candidato más próximo. La asociación se aprueba en el orden que aparece cada medición, de tal forma que si un estado es candidato para dos o más mediciones entonces se asigna únicamente a la primera y se elimina de la lista de candidatos de las demás.

- **Paso 8:** Actualizar el estado $X_{i,n}$ de las trayectorias para las cuales se aprobó la asociación:

$$X_{i,n} = \beta Z_{a,n} + (1 - \beta)\hat{X}_{i,n} \quad con\ i = c_{a,n} \quad 5.12$$

En la ecuación 5.12 se utiliza un parámetro de ajuste $\beta \in [0,1]$ como peso para la medición y la predicción involucradas. El uso de este parámetro se propone como una forma de atenuar el ruido en las coordenadas de la posición del objeto cuando se divide o superpone con otro.

- **Paso 9:** Actualizar el radio de búsqueda de una trayectoria para la cual se aprobó la actualización descrita en el paso anterior

$$r_{i,n+1} = \max_{2 \le n' \le n} \left\{ d\left(X_{i,n'-1}, X_{i,n'}\right) \right\} \quad 5.13$$

- **Paso 10:** Iniciar una nueva secuencia de estados, es decir, crear una nueva trayectoria a partir de cada medición que no tiene candidatos para asociar. Este paso equivale a utilizar la ecuación 5.12 con $\beta = 1$.

- **Paso 11:** Establecer un radio de búsqueda inicial R_{inicio} para aquellas trayectorias creadas en el paso anterior.

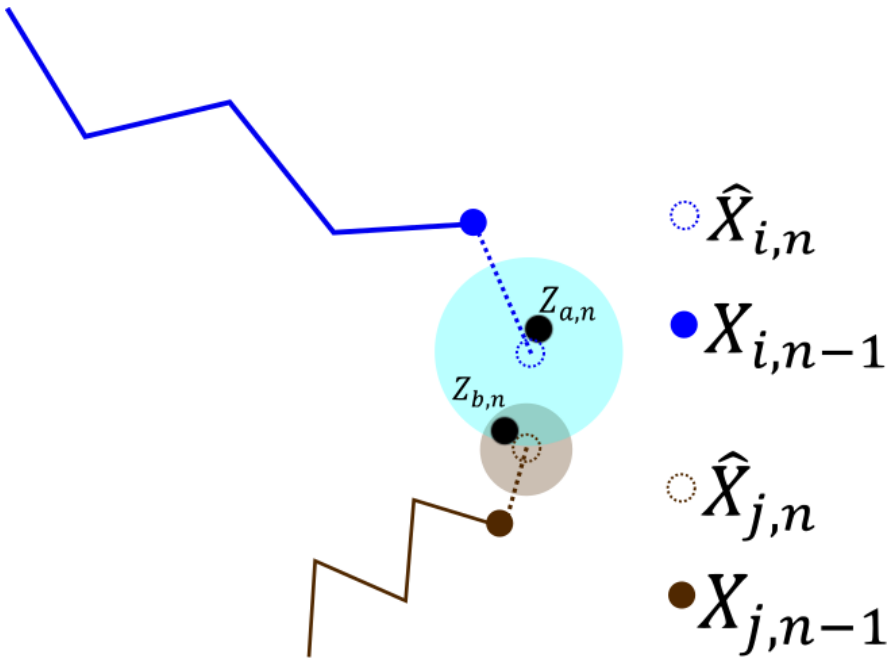


Figura 5.2. Determinación de candidatos para asociar con cada medición según las zonas de búsqueda. En negro se representan dos mediciones $Z_{a,n}$ y $Z_{b,n}$ del instante actual n. En línea continua se representa el rastro de dos trayectorias i y j, y los puntos de color azul y marrón representan las posiciones de cada objeto en el instante anterior $X_{i,n-1}$, $X_{j,n-1}$. En línea punteada se representan las predicciones $\hat{X}_{i,n}$ y $\hat{X}_{j,n}$ para el instante actual n. Los círculos traslúcidos muestran las zonas de búsqueda de cada objeto con radios $r_{i,n}$, $r_{j,n}$. Así, la medición $Z_{a,n}$ tiene una única trayectoria candidata para asociar, mientras que la medición $Z_{b,n}$ tiene dos. Fuente: imagen propia.

5.3.3. Tratamiento de las oclusiones

En las secuencias de imágenes analizadas ocurren distintas situaciones en las cuales los objetos se superponen entre sí. De esta forma, se propone el siguiente procedimiento general para la resolución de oclusiones, el cual tiene continuidad con el método de asociación mostrado anteriormente, como se ilustró en la Figura 5.1.

- **Paso 12:** Actualizar las trayectorias para las cuales no fue posible llevar a cabo la asociación con una detección o vector de mediciones, de la siguiente forma:

  - **12.1:** Se actualiza el estado del objeto a partir de su predicción. Este paso equivale a utilizar la ecuación 5.12 con $\beta = 0$.

  - **12.2:** Se obtiene la posición estimada del objeto $(\hat{x}_{i,n}, \hat{y}_{i,n})$ en la escena a partir de su vector de estado $X_{i,n}$. Luego, se reduce la cantidad de oportunidades $o_{i,n+1}$

para esperar la reaparición del objeto, según la ubicación estimada del mismo en la imagen binaria que contiene las siluetas $B_n(x, y)$, de la siguiente forma:

$$o_{i,n+1} = \begin{cases} o_{i,n+1} - p_1 & B_n(\hat{x}_{i,n}, \hat{y}_{i,n}) > 0 \\ o_{i,n+1} - p_2 & B_n(\hat{x}_{i,n}, \hat{y}_{i,n}) \leq 0 \end{cases} \quad 5.14$$

En la ecuación 5.14, p_1 y p_2 corresponden a las penalizaciones impuestas cuando el objeto se oculta en una silueta o cuando el objeto desaparece de la escena, respectivamente. Por otra parte, la cantidad de oportunidades se restablece a un valor máximo O_{max} cuando la predicción se asocia con un vector de medición.

- **12.2:** Se decide si la trayectoria se elimina ($o_{i,n+1} \leq 0$) o se tiene en cuenta ($o_{i,n+1} > 0$) para la próxima iteración.

- **12.3:** Si la trayectoria se elimina entonces se remueven los estados más recientes del objeto en los cuales no ocurrió ninguna asociación, debido a que son estados inciertos.

- **12.4:** Si la trayectoria se tiene en cuenta para la siguiente iteración, al incrementarse la incertidumbre también se debe incrementar el radio de búsqueda. El método propuesto realiza este incremento en función del desplazamiento promedio en los últimos K instantes, de la siguiente forma:

$$r_{i,n+1} = r_{i,n} + \frac{1}{K} \sum_{m=n-K+1}^{n} d(X_{i,m-1}, X_{i,m}) \quad 5.15$$

Finalmente, cuando una trayectoria se elimina del registro de seguimiento, ya sea al cumplir su tiempo de espera o al terminar el bucle, esta se almacena en algún registro y se transfiere a un módulo de análisis de movimiento que extrae diferentes características según la aplicación.

5.3.4. Parámetros de ajuste para el método

Existen algunos parámetros que se deben configurar en el método antes de utilizarse en una aplicación específica. Tales parámetros son: el radio inicial de búsqueda R_{inicio}, el factor de peso o ponderación para la actualización del estado β, la cantidad máxima de oportunidades para esperar la reaparición de un objeto O_{max}, las penalizaciones p_1 y p_2 en el tiempo de espera, y la cantidad de desplazamientos que se promedian para obtener el incremento del radio de búsqueda en oclusión K. No obstante, la mayoría de ellos puede establecerse fácilmente como hiperparámetros de acuerdo con la aplicación específica, como se verá en los siguientes capítulos.

A continuación, se ilustra en un experimento controlado, el comportamiento del método de seguimiento propuesto respecto a los parámetros β (que representa el factor de peso o ponderación para actualizar el estado actual a partir de la predicción y la medición) y K (la cantidad de desplazamientos más recientes en las trayectorias que se promedian para obtener el incremento del radio de búsqueda en oclusión), con el fin de determinar su influencia en el desempeño del mismo.

En primer lugar, se generó una secuencia de imágenes binarias que contiene las siluetas de varios círculos de diferentes tamaños y que describen distintos patrones de movimiento: circular, oscilatorio y en línea recta, algunos con componentes de ruido y otros sin ruido, como se muestra en la Figura 5.3. Las siluetas de los objetos se fusionan o se superponen en varios instantes, lo cual permite evaluar el método frente a situaciones de oclusión.

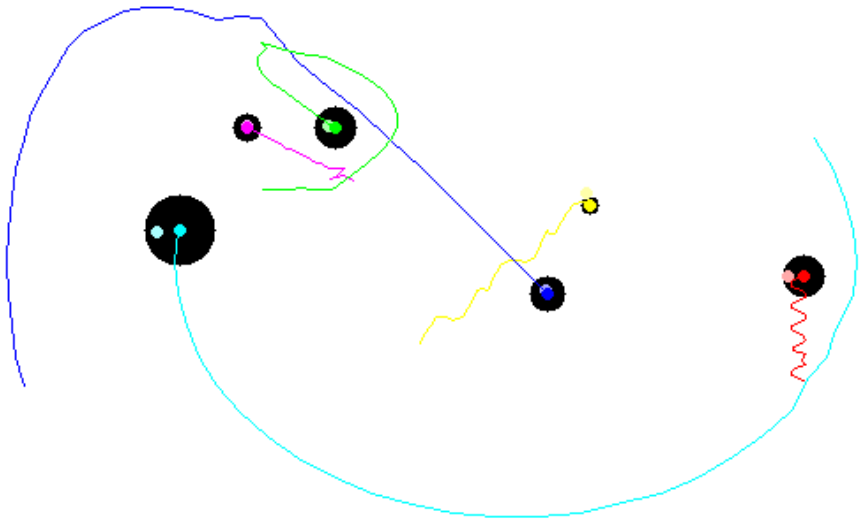


Figura 5.3. Seguimiento de objetos simulados de forma circular utilizando el método propuesto. En los rastros dibujados se puede apreciar cómo los diferentes estados de oclusión deforman temporalmente la trayectoria. Fuente: imagen propia.

Posteriormente, se calculó el error como la distancia promedio entre cada punto de las trayectorias detectadas y las trayectorias reales correspondientes, como se muestra en la Figura 5.4. Se tuvieron en cuenta dos situaciones: el sistema sin mecanismo de predicción y con predicción mediante filtros de Kalman asociados a cada trayectoria. En estos ejemplos, se estableció el valor del radio inicial de búsqueda R_{inicio}, la cantidad máxima de oportunidades para esperar la reaparición de un objeto O_{max} y las penalizaciones p_1 y p_2 en el tiempo de espera como parámetros fijos, y los parámetros restantes se variaron de la siguiente forma:

- La cantidad de desplazamientos a promediar K, tomó valores de 1, 2, 4, 8 y 16.
- El factor de peso o ponderación para la actualización del estado β, se varió desde 0 hasta 1 en incrementos de 0.01.

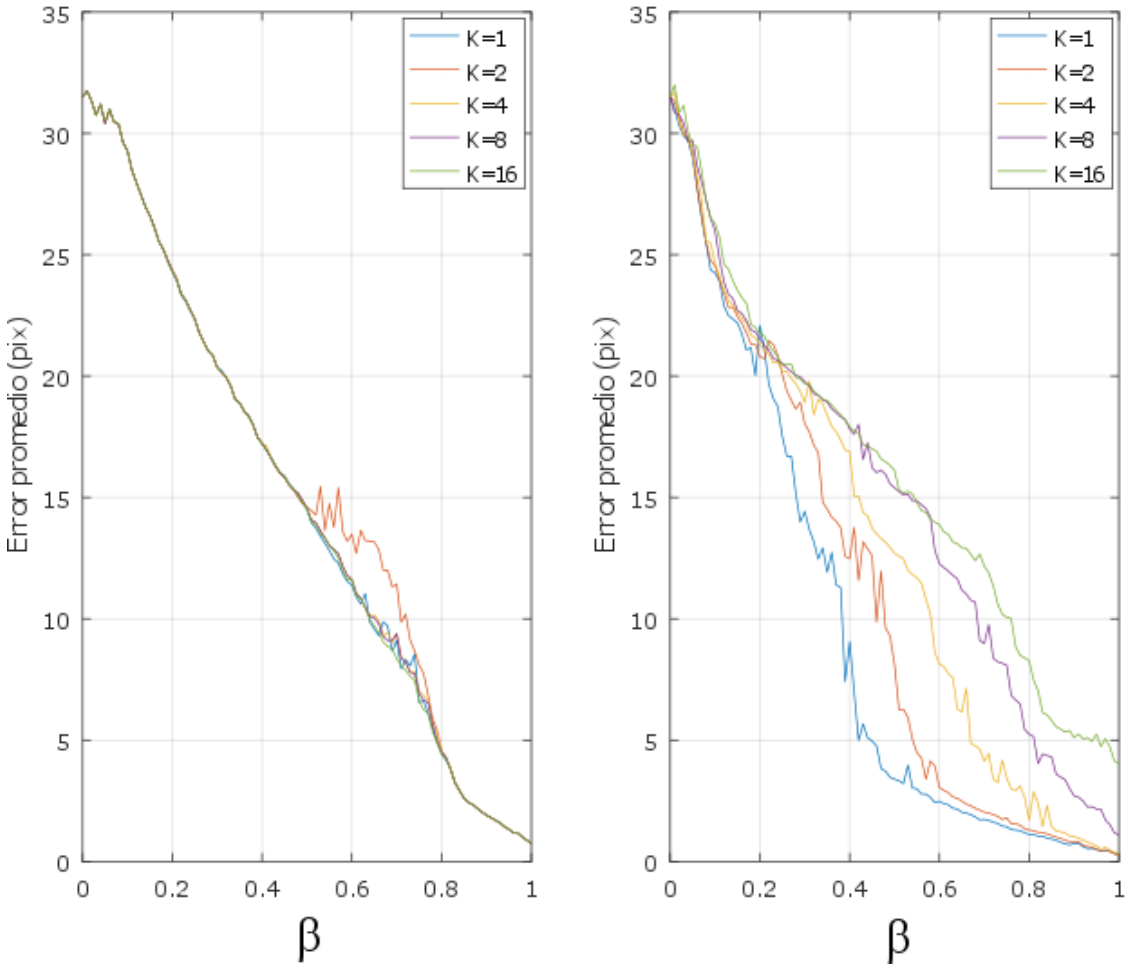


Figura 5.4. Efecto de los parámetros β y K en el desempeño del método propuesto. Se muestra el error promedio para el método sin utilizar predicción (izquierda), y con el uso de filtros de Kalman (Derecha). Fuente: imagen propia.

La caracterización obtenida corresponde a una estimación preliminar del desempeño del método de seguimiento. No obstante, en el capítulo 6 se dará a conocer una evaluación más completa del método de seguimiento desde la aplicación específica.

5.5. Comentarios finales

En el capítulo 2, se mencionó la existencia de diferentes categorías que agrupan los métodos de seguimiento tradicionales, en vista de la variedad de representaciones de forma de los objetos. En contraste, la metodología propuesta para la correspondencia temporal y el tratamiento de las oclusiones presenta flexibilidad para adaptarse a diferentes contextos, como se mencionará en los capítulos siguientes.

En los capítulos 6 y 7 se presentarán los usos de los métodos propuestos anteriormente para el seguimiento de organismos unicelulares y otros objetos de interés en imágenes obtenidas mediante técnicas de microscopía. De esa forma, en cada aplicación se mencionarán las representaciones utilizadas, las técnicas de predicción, y los parámetros de ajuste elegidos para su funcionamiento óptimo.

Para cada aplicación descripta en los siguientes capítulos se analizarán parámetros de desempeño de los métodos utilizados. Se validará el método de seguimiento, o los parámetros obtenidos a partir del análisis de movimiento, o ambos aspectos. Finalmente, se presentarán resultados y el impacto generado en los contextos específicos de la bioingeniería.

5.6. Referencias

Aprinaldi, Jati, G., Gunawan, A.A.S., Bowolaksono, A., Lestari, S.W., Jatmiko, W.: Human Sperm tracking using Particle Swarm Optimization combined with Smoothing Stochastic sampling on low frame rate video. 2015 Int. Symp. Micro-NanoMechatronics Hum. Sci. MHS 2015. (2016). https://doi.org/10.1109/MHS.2015.7438308

Arasteh, A., Vosoughi Vahdat, B., Salman Yazdi, R.: Multi-Target Tracking of Human Spermatozoa in Phase-Contrast Microscopy Image Sequences using a Hybrid Dynamic Bayesian Network. Sci. Rep. 8, 5068 (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-23435-x

Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J., Greco, M., Iniesta-Cuerda, M., Garde, J., Soler, A., Ballarin, V., Cesari, A.: Objective evaluation of ram and buck sperm motility by using a novel sperm tracker software. Reproduction. 156, 11-21 (2018). https://doi.org/10.1530/REP-17-0755

Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J., Soler, A., Cesari, A., Ballarin, V.: Evaluation of motility quality in ram sperm by using a novel open - source suite of algorithms. En: Congreso Argentino de Bioingeniería - SABI 2017. , Córdoba, Argentina (2017)

Catlin, D.E.: Estimation, Control, and the Discrete Kalman Filter. (1989)

Challa, S., Morelande, M.R., Mušicki, D., Evans, R.J.: Fundamentals of object tracking. (2011)

Forsyth, Ponce: Computer Vision. , Paris (2003)

Hammoud, R.I.: Interactive Video Algorithms and Technologies. Springer-Verlag, Berlin Hedelberg (2006)

Hong, S., Peng, D., Shi, Y.: Track-to-track association using fuzzy membership function and clustering for distributed information fusion. En: Chinese Control Conference, CCC. pp. 4028-4032. Technical Committee on Control Theory, Chinese Association of Automation (2018)

Jeong, J., Yoon, T., Park, J.: Kalman Filter Based Multiple Objects Detection-Tracking Algorithm Robust to Occlusion. En: SICE Annual Conference 2014. pp. 941-946. IEEE, Sapporo, Japan (2014)

Lei, Z., Wang, M., Lei, T., Li, D.: Tracking moving weak objects in celestial image sequences. IEEE Trans. Aerosp. Electron. Syst. 52, 1257-1266 (2016). https://doi.org/10.1109/TAES.2015.150110

Liu, J., Leung, C., Lu, Z., Sun, Y.: Quantitative analysis of locomotive behavior of human sperm head and tail. IEEE Trans. Biomed. Eng. 60, 390-396 (2013). https://doi.org/10.1109/TBME.2012.2227319

Lucena, M., Fuertes, J., De La Blanca, N.: Optical flow-based observation models for particle filter tracking. Pattern Anal. Appl. 18, 135-143 (2015). https://doi.org/10.1007/s10044-014-0409-3

Muiño, R.: Evaluación de la Motilidad y Vialidad del Semen Bovino Mediante el Uso de Sistemas CASA y Citometría de Flujo: Identificación de Subpoblaciones Espermáticas, (2008)

Pelapur, R., Candemir, S., Bunyak, F., Poostchi, M., Seetharaman, G., Palaniappan, K.: Persistent target tracking using likelihood fusion in wide-area and full motion video sequences. En: 2012 15th International Conference on Information Fusion (FUSION). pp. 2420-2427 (2012)

Sadeghi-Tehran, P., Clarke, C., Angelov, P.: A real-time approach for autonomous detection and tracking of moving objects from UAV. En: IEEE SSCI 2014 - 2014 IEEE Symposium Series on Computational Intelligence - EALS 2014: 2014 IEEE Symposium on Evolving and Autonomous Learning Systems, Proceedings. pp. 43-49 (2014)

Sahbani, B., Adiprawita, W.: Kalman Filter and Iterative-Hungarian Algorithm Implementation for Low Complexity Point Tracking as Part of FastMultiple Object Tracking System. En: 2016 IEEE 6th International Conference on System Engineering and Technology (ICSET). pp. 109-115. IEEE, Bandung – Indonesia (2016)

Shin, J., Kim, S., Kang, S., Lee, S.W., Paik, J., Abidi, B., Abidi, M.: Optical flow-based real-time object tracking using non-prior training active feature model. Real-Time Imaging. 11, 204-218 (2005). https://doi.org/10.1016/j.rti.2005.03.006

Shin, S.G., Ahn, D.R., Lee, H.K.: Occlusion handling and track management method of high-level sensor fusion for robust pedestrian tracking. IEEE Int. Conf. Multisens. Fusion Integr. Intell. Syst. 2017-Novem, 233-238 (2017). https://doi.org/10.1109/MFI.2017.8170434

Vinaykumar, M., Jatoth, R.K.: Performance Evaluation of Alpha-Beta and Kalman Filter for Object Tracking. En: 2014 IEEE International Conference on Advanced Communication Control and Computing Technologies (ICACCCT). pp. 1369-1373. IEEE, Ramanathapuram, India (2014)

World-Health-Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. (2010)

Yilmaz, A., Javed, O., Shah, M.: Object tracking. ACM Comput. Surv. 38, 13-es (2006). https://doi.org/10.1145/1177352.1177355

Capítulo 6. Análisis de motilidad espermática

Como se mencionó en el capítulo 2, los métodos de seguimiento determinan el estado de los objetos presentes en la escena en cada instante, y permiten encontrar los puntos de la trayectoria dibujada por cada objeto. Según la aplicación particular, se pueden analizar características individuales o colectivas de las trayectorias. A partir de las características extraídas, se pueden utilizar enfoques supervisados o no supervisados, ya sea para identificar eventos en tiempo real (análisis *online*) o para caracterizar la trayectoria al finalizar el movimiento (análisis *offline*).

En el presente capítulo se describen los métodos de detección, seguimiento y análisis de movimiento, utilizados para estudiar el comportamiento de células espermáticas a partir de secuencias de imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fase.

Para analizar la motilidad espermática en primer lugar se detectaron las cabezas de los espermatozoides mediante técnicas de segmentación y se representaron mediante puntos. Luego, se aplicó el método de seguimiento descripto en el capítulo 5 para obtener las trayectorias de cada célula y posteriormente se encontraron características individuales y globales de interés biológico que describen su movimiento. Las características de las trayectorias se obtuvieron *offline*, puesto que las muestras de semen se almacenan y conservan para su análisis posterior.

El análisis de motilidad generalmente es realizado por parte de veterinarios, médicos o investigadores en área de la reproducción con ayuda de Sistemas de Análisis de Semen Asistidos por Computador (CASA, en inglés). Los métodos que se proponen en este capítulo constituyen un nuevo sistema CASA, el cual fue validado para ser utilizado con semen de diferentes especies animales. El sistema CASA propuesto en la presente tesis se comparó con otro sistema comercial de análisis seminal. El software diseñado y validado se registró ante el Poder Ejecutivo Nacional de la República Argentina como un desarrollo tecnológico y representa un aporte significativo de esta tesis.

Posteriormente se incorporaron técnicas de aprendizaje supervisado y no supervisado en el software para reconocer patrones de movimiento. Desde el punto de vista biológico, las técnicas de reconocimiento de patrones permitieron identificar subpoblaciones espermáticas de motilidad presentes en los eyaculados. Estos análisis son de un interés reciente para los expertos en el área, con el fin de realizar diagnósticos clínicos y veterinarios más completos que los análisis tradicionales. De esta forma, se generó un nuevo módulo para el análisis de

subpoblaciones espermáticas, el cual se integró al programa desarrollado y que representa una innovación en el ámbito de los sistemas CASA, puesto que el análisis de subpoblaciones generalmente se realiza mediante el uso de herramientas de análisis estadísticos.

A continuación, se describen los conceptos biológicos involucrados en esta aplicación de los sistemas de seguimiento de objetos y las metodologías utilizadas en cada fase del desarrollo tecnológico.

6.1. Análisis de semen asistido por computador

Los sistemas CASA son un conjunto de herramientas de hardware y software que permiten determinar de forma objetiva la calidad espermática y predecir la fertilidad (Amann y Waberski 2014). Los sistemas CASA se utilizan comúnmente para medir la calidad seminal de varias especies (Giaretta et al. 2017), la efectividad de la crio preservación seminal (Zalazar et al. 2017), la predicción de potencial de fertilidad o la investigación relacionada con biología espermática básica (Muiño 2008).

Los software CASA permiten realizar diferentes análisis como medidas de motilidad y concentración, morfología, vitalidad, fragmentación de ADN, entre otros (MICROPTIC 2019a), pero los estudios clínicos y veterinarios recurren con más frecuencia a los análisis de motilidad. En este ámbito, los sistemas CASA analizan una secuencia de imágenes con el fin de obtener la trayectoria de cada espermatozoide y determinar para cada una sus parámetros de motilidad. A continuación, se definen los parámetros estándar de motilidad (World-Health-Organization 2010), con ayuda de la Figura 6.1:

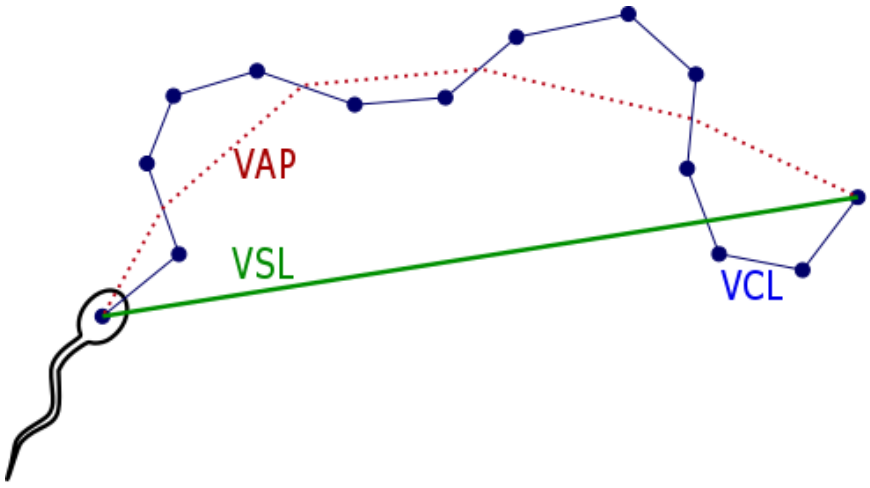


Figura 6.1. Descriptores de velocidad para la trayectoria de un espermatozoide: velocidad curvilínea (VCL), velocidad a través del camino promedio (VAP) y velocidad rectilínea (VSL). Fuente: imagen propia.

- **Velocidad curvilínea (VCL)**: promedio temporal de la velocidad de la cabeza de un espermatozoide a lo largo de su trayectoria curvilínea real, como se percibe en dos dimensiones mediante el microscopio. Se mide en micras por segundo ($\mu m/s$).

- **Velocidad rectilínea (VSL)**: promedio temporal de la velocidad de la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta que une su posición inicial con su posición final. Se mide en micras por segundo ($\mu m/s$).

- **Velocidad a través del camino promedio (VAP)**: promedio temporal de la velocidad de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su camino promedio. Este camino se determina mediante algún método de suavizado de acuerdo con los algoritmos del sistema CASA. Se mide en micras por segundo ($\mu m/s$).

- **Desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)**: magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza de un espermatozoide respecto a su camino promedio. Se puede expresar como un valor máximo o un valor promedio de tales desplazamientos. Se expresa en micras (μm).

- **Linealidad (LIN):** la linealidad del camino curvilíneo, expresada como VSL/VCL.

- **Oscilación (WOB):** una medida de oscilación del camino real respecto al camino promedio, expresada como VAP/VCL.

- **Rectitud (STR):** linealidad del camino promedio, es decir VSL/VAP.

- **Frecuencia de batido (BCF):** la tasa promedio a la cual la trayectoria real cruza por la trayectoria suavizada. Se expresa en Hertz (Hz).

Para que las medidas realizadas sean reproducibles, las metodologías de preparación de las muestras y las especificaciones técnicas de los equipos empleados deben ser descritas claramente. No obstante, existen varios factores que afectan directamente el desempeño de todos los sistemas CASA: la exactitud de los resultados es intrínsecamente dependiente de la concentración de espermatozoides analizados (Talarczyk-Desole et al. 2017), la tasa de adquisición del video afecta la medida de varios parámetros cinéticos (Verstegen et al. 2002), y la cantidad de parámetros de configuración en el software afecta la variabilidad inter observador (Kime et al. 2001), entre otros aspectos. Por tal razón, la forma de afrontar estas dificultades se puede considerar como una medida de desempeño de los algoritmos de detección y seguimiento involucrados.

Por otra parte, existe gran variabilidad entre las características del semen de diferentes machos de la misma especie, por lo cual es posible profundizar en la existencia de diferentes subpoblaciones espermáticas dentro del mismo eyaculado (Santolaria et al. 2016). Sin embargo, los análisis tradicionales de motilidad realizados mediante el uso de sistemas

CASA contemplan únicamente la determinación de parámetros cinéticos y usualmente se deja el estudio de subpoblaciones espermáticas para fines de investigación.

Actualmente, se ha incrementado el interés en incorporar estudios de subpoblaciones espermáticas en los reportes clínicos y veterinarios, con el objetivo de ofrecer diagnósticos más completos sobre las características de las muestras, pero aún no se reportan paquetes comerciales incorporados a los sistemas CASA que permitan realizar dichos análisis. Así, el estudio estadístico multivariante de subpoblaciones se realiza de forma manual o utilizando herramientas independientes de los sistemas CASA.

En vista de lo anterior, en las siguientes secciones se presenta una revisión bibliográfica de los trabajos relacionados; luego, se describen métodos propuestos en el ámbito de esta tesis, para el seguimiento y el análisis de movimiento de células espermáticas en secuencias de video obtenidas mediante microscopía de contraste de fase. En la etapa de seguimiento se utiliza un método de predicción de múltiples objetivos basado en filtros de Kalman y se utiliza el método de correspondencia temporal descrito en el capítulo 5. En la etapa de análisis de movimiento se proponen técnicas para procesar el conjunto de trayectorias y la identificación de subpoblaciones espermáticas mediante métodos no supervisados. Finalmente, se presentan los resultados obtenidos y las medidas de desempeño para cada etapa. Como valor agregado, se menciona cómo la encapsulación de los métodos utilizados dio origen a la elaboración de un software CASA.

6.2. Trabajos relacionados

De la literatura se conocen diferentes métodos para determinar la motilidad espermática en secuencias de video mediante técnicas de procesamiento de imágenes. Entre los sistemas de uso gratuito se encuentra el complemento para ImageJ desarrollado por National Institutes of Health (Wilson-Leedy y Ingermann 2007), el cual fue validado para su uso con semen de pez cebra. Algunos trabajos han utilizado y modificado este complemento para utilizarse con semen de otras especies, por ejemplo de mamíferos (Boryshpolets et al. 2015; Giaretta et al. 2017).

Por otra parte, varias empresas o institutos de investigación utilizan sistemas CASA comerciales en vista de sus numerosas prestaciones, la confiabilidad en sus resultados y el acceso a soporte técnico. Tal es el caso del conocido sistema *Sperm Class Analyzer*® de MICROPTIC (MICROPTIC 2019a), el cual es ampliamente utilizado por la comunidad científica (Buzón 2013; Muiño et al. 2008).

Los sistemas computarizados para el análisis de motilidad utilizan diferentes técnicas de visión por computador para llevar a cabo la detección y el seguimiento de las células espermáticas. Las imágenes adquiridas, generalmente mediante microscopía de contraste de fase, permiten aplicar umbrales fácilmente para detectar los espermatozoides (Rojas et al. 2012), aunque se pueden incluir técnicas más robustas para refinar la detección y evitar falsos positivos (Mostajer Kheirkhah et al. 2018; Yang et al. 2014).

Si bien los espermatozoides se mueven con cierto grado de vaivén o de oscilación lateral, la tendencia de su dirección es clara, lo cual posibilita el uso de técnicas de predicción. Por ejemplo, es común utilizar filtros de Kalman (Jati et al. 2016; Rodríguez-Montaña y Roa-Guerrero 2017) asociados a cada célula, y con menos frecuencia los filtros de partículas (Gárate 2015; Ravanfar y Moradi 2011) para estimar las posiciones futuras en cada instante. Al representarse las cabezas de las células espermáticas mediante puntos, para la correspondencia temporal se utilizan criterios como el de mínima distancia (Liu et al. 2013), mínimo cambio de velocidad (Leung et al. 2010), métodos probabilísticos (Arasteh et al. 2018), el Algoritmo Húngaro (Rodríguez-Montaña y Roa-Guerrero 2017), técnicas de optimización (Aprinaldi et al. 2016), entre otros.

Contando con un sistema apropiado de detección y seguimiento, las características de motilidad VCL, VSL y LIN se pueden medir de forma objetiva y reproducible, puesto que no dependen del método empleado para obtenerlas. No obstante, los protocolos utilizados actualmente para medir los otros parámetros no están estandarizados y cada método adopta una técnica de filtrado pasabajos diferente, por ejemplo, filtros de media móvil con ventana de tamaño fijo (Hidayatullah et al. 2015), filtros de media móvil con tamaño dependiente de la frecuencia de adquisición del video (Wilson-Leedy y Ingermann 2007), submuestreo de la trayectoria real y uso del método de curvas de Bézier (Rojas et al. 2012), y algunos sistemas como el módulo de motilidad del sistema *Sperm Class Analyzer* (MICROPTIC 2019b) permiten al usuario elegir el grado de suavizado deseado para las trayectorias.

Al obtener los ocho parámetros de motilidad estándar, los sistemas CASA generan una tabla de datos que puede ser exportada en diferentes formatos. De esta manera, los investigadores del área de la reproducción realizan el análisis estadístico multivariante a partir de la matriz generada mediante el uso de algún software estadístico como el SAS (Quintero-Moreno et al. 2003), SPSS (Bravo et al. 2011; Muiño 2008; Santolaria et al. 2016), el paquete estadístico de R (Martínez-Pastor et al. 2008; Ramón et al. 2012), entre otros, y así poder identificar subpoblaciones espermáticas en el eyaculado.

La identificación de subpoblaciones en la muestra se puede hacer de forma simple mediante el análisis del histograma de las variables individuales, pero es común estudiar la forma en cómo se agrupan los espermatozoides según sus características mediante métodos de agrupamiento o *clustering*. La elección de las características adecuadas para el agrupamiento también se encuentra en discusión y existen diferentes métodos que se pueden utilizar: eliminación de características linealmente dependientes (Ramón et al. 2012), Análisis de Componentes Principales (PCA) (Buzón 2013; Fernández-Gago et al. 2013; Santolaria et al. 2016), análisis variable de grupos (Maroto-Morales et al. 2012), análisis de correlación entre variables (Maroto-Morales et al. 2012), o simplemente utilizando todos los descriptores disponibles (Bravo et al. 2011; Ferraz et al. 2014; Muiño 2008).

Finalmente, el agrupamiento se realiza mediante métodos jerárquicos (Fernández-Gago et al. 2013; Martínez-Pastor et al. 2008; Ramón et al. 2012), métodos no jerárquicos como el tradicional *k*-medias (Martínez-Pastor et al. 2008; Ramón et al. 2012) o combinados (Ferraz

et al. 2014; Maroto-Morales et al. 2012), o se pueden utilizar clasificadores (Goodson et al. 2011; Ramón et al. 2012), conociendo previamente algunas muestras representativas de cada grupo para realizar el entrenamiento.

6.3. Método propuesto para la detección y representación de espermatozoides

6.3.1. Método de detección

La microscopía de contraste de fase facilita la detección de organismos unicelulares mediante la aplicación de técnicas estándar de binarización, como se describió en el capítulo 3. No obstante, también es común encontrar fondos no uniformes con patrones de brillo de baja frecuencia espacial sobre los cuales se superponen las variaciones de brillo de alta frecuencia espacial debidas a la presencia de las células o de otros cuerpos presentes en el medio. Para dar solución a esta problemática, se decidió utilizar las técnicas de la Morfología Matemática (Serra 1982; Shih 2009). Los operadores de esta teoría permiten elegir el tamaño del elemento estructurante dependiendo del tamaño de los objetos en la escena con el fin de resaltar las células de interés. En vista de la forma elíptica de las cabezas de las células espermáticas, para la presente aplicación se eligió un elemento estructurante circular y se llevaron a cabo transformaciones Top-Hat por apertura y por cierre para el realce de las células según su contraste, como se describe a continuación (Shih 2009).

Sea $f(x,y)$ un cuadro de la secuencia de video en escala de grises, y $e(m,n)$ un elemento estructurante con forma de disco. Así, las operaciones Top-Hat por apertura $T_e(x,y)$ y por cierre $\widetilde{T_e}(x,y)$, para el realce de células brillantes y oscuras respectivamente, se definen de la siguiente forma:

$$T_e(x,y) = f(x,y) - (f \circ e)(x,y) \qquad 6.1$$

$$\widetilde{T_e}(x,y) = (f \bullet e)(x,y) - f(x,y) \qquad 6.2$$

En las Ecuaciones 6.1 y 6.2, las operaciones $(f \circ e)(x,y)$ y $(f \bullet e)(x,y)$ corresponden a la apertura y el cierre morfológicos en niveles de gris mediante el elemento estructurante e.

Posterior a la obtención del nuevo mapa de brillo definido por $T_e(x,y)$ o $\widetilde{T_e}(x,y)$ se aplicaron umbrales uniformes para obtener una imagen binaria con las células detectadas. En un primer ensayo se utilizó un elemento estructurante de radio fijo de 5 píxeles y un umbral uniforme de 30 niveles de gris (Buchelly Imbachí et al. 2017), pero posteriormente se establecieron estos parámetros, en una interfaz gráfica (ver Anexo I), como modificables dependiendo de las características de los videos adquiridos (Buchelly Imbachí et al. 2018).

Luego, se aplicó un proceso de filtrado con el fin de eliminar ruido y cerrar huecos internos a las células mediante la aplicación de operaciones morfológicas de apertura y cierre para

imágenes binarias con un elemento estructurante de forma circular. Finalmente, se obtuvo el centroide de cada célula como se definió en el capítulo 4 (Ecuación 4.2). La Figura 6.2 ilustra el proceso de detección de células espermáticas mencionado.

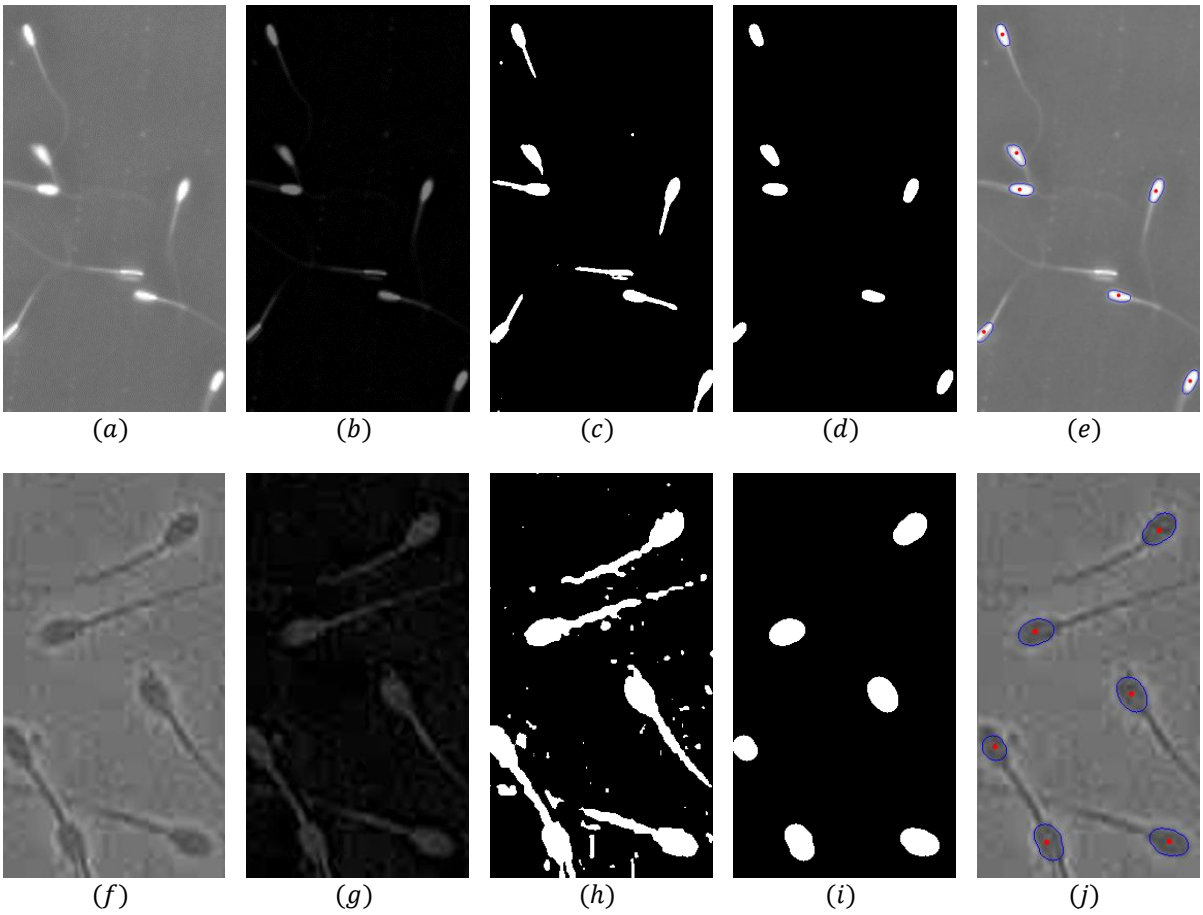


Figura 6.2. Detección de células espermáticas en imágenes adquiridas por microscopía de contraste de fase. En (a) y (f) se muestra la imagen original en escala de grises, en (b) y (g) la transformada Top-Hat correspondiente, en (c) y (h) la aplicación de umbral uniforme, en (d) e (i) el filtrado morfológico para las imágenes binarias, y en (e) y (j) los centroides de las siluetas finales. Fuente: imagen propia.

6.3.2. Representación de la forma y de la apariencia

Como se muestra en la Figura 6.2, la cabeza de cada célula detectada se modela mediante un único punto para representar su forma. Así, el vector de estado de cada célula contiene las coordenadas de su centro de masa y las componentes de su velocidad en cada instante:

$$X = [x, y, v_x, v_y]^T \qquad 6.3$$

De igual forma, cada vector de medición Z se obtiene en la etapa de detección y tiene las mismas dimensiones de los vectores de estado.

Por otra parte, la apariencia de las células se representa mediante las siluetas obtenidas (modelo discriminativo), y se utilizan posteriormente como apoyo al tratamiento de las oclusiones.

6.4. Seguimiento de células espermáticas

6.4.1. Predicción mediante filtros de Kalman

En vista de la tendencia que presenta el movimiento de las células espermáticas, la predicción de las posiciones se lleva a cabo mediante la asignación de un filtro de Kalman a cada trayectoria, el cual se actualiza cuadro a cuadro. En este sentido, los modelos de la dinámica $X_n = \boldsymbol{F}X_{n-1} + v_n$(Ecuación 5.5) y de las mediciones $Z_n = \boldsymbol{H}X_{n-1}+w_n$ (Ecuación 5.6) se expresan como se definieron en el capítulo 5.

En la presente aplicación (Buchelly Imbachí et al. 2018; Buchelly Imbachí et al. 2017) se utilizó un modelo de la dinámica de primer orden con la siguiente matriz de transición:

$$\boldsymbol{F} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \qquad 6.4$$

De igual forma, la matriz de medición $\boldsymbol{H}$ corresponde a la matriz identidad $\boldsymbol{I} \in R^{4\times4}$.

6.4.2. Método de asociación y tratamiento de las oclusiones

La representación de las células mediante sus centroides para modelar la forma, y mediante una imagen binaria para modelar su apariencia, permiten utilizar el método de seguimiento propuesto en el capítulo anterior, como se muestra en los artículos que soportan esta aplicación (Buchelly Imbachí et al. 2018; Buchelly Imbachí et al. 2017).

Debe tenerse en cuenta que las secuencias capturadas a distintas escalas cuentan con distintos desplazamientos promedio de las células entre cuadro y cuadro. Por esta razón, se puede asociar empíricamente el radio inicial de búsqueda con el radio del elemento estructurante R_e utilizado para la detección, de la siguiente forma:

$$R_{inicio} = 5 \times R_e \qquad 6.5$$

No obstante, la mayoría de los parámetros de funcionamiento del método se pueden establecer como valores fijos, teniendo en cuenta las características del movimiento espermático:

- La cantidad de desplazamientos a promediar para el incremento del radio de búsqueda en oclusión: Se fija el valor par $K = 4$, debido al movimiento de vaivén de la cabeza.

- Penalizaciones para el tiempo de espera: Cuando la posición estimada corresponde a un punto perteneciente a las siluetas, la reducción de oportunidades es $p_1 = 1$; y cuando no existe una detección en la posición estimada, la reducción es $p_2 = 2$.

- La cantidad máxima de oportunidades para esperar la reaparición de un objeto: Se establece $O_{max} = 6$ como un tiempo suficiente para esperar la reaparición de la célula y atender a las penalizaciones.

- El factor de peso o ponderación para la actualización del estado se establece en $\beta = 1$, es decir, el estado de cada objeto se toma directamente como el vector de medición de la detección asociada.

Para los cálculos de distancia se tiene en cuenta la norma L_2 o distancia Euclídea, definida en el capítulo 3.

6.5. Análisis de las trayectorias

6.5.1. Cálculo de los parámetros de motilidad

Los ocho parámetros estándar de motilidad se determinan a partir de las trayectorias espermáticas obtenidas con el método de seguimiento. Como soporte de la presente aplicación, se elaboró un artículo (Buchelly Imbachí et al. 2020b) que muestra la metodología propuesta para determinar los parámetros de motilidad, como se describe a continuación:

Sean: N la cantidad total de puntos de la trayectoria, $\vec{p}_n = (x_n, y_n)$ la posición del centroide de una célula en un instante discreto n ($1 \leq n \leq N$), F la tasa de adquisición de la secuencia de video medida en cuadros por segundo, y L el factor de conversión de longitud de píxeles a micrómetros; entonces, se utilizan los métodos estándar que presenta la literatura para determinar los parámetros de motilidad que no dependen del método de suavizado de la trayectoria (Buchelly Imbachí et al. 2018; Gárate et al. 2015; Rojas et al. 2012):

$$VCL = \frac{L \times F}{(N-1)} \sum_{n=2}^{N} d(\vec{p}_n\,, \vec{p}_{n-1}) \tag{6.6}$$

$$SL = \frac{L \times F}{(N-1)} d(\vec{p}_0\,, \vec{p}_{N-1}) \tag{6.7}$$

$$LIN = \frac{VSL}{VCL} \tag{6.8}$$

Para determinar los parámetros restantes es necesario elegir un método de suavizado de las trayectorias. En el presente trabajo se utilizó un filtro pasa bajos de media móvil, aplicado a los puntos de la trayectoria original $\vec{p}_n$ para obtener puntos del camino promedio $\vec{s}_n$, con un parámetro r que determina el tamaño del filtro, de la siguiente forma:

$$\vec{s}_n = \frac{1}{2\mathrm{r}+1} \sum_{i=n-\mathrm{r}}^{n+\mathrm{r}} \vec{p}_n\,, \qquad n = 1, \dots, N \tag{6.9}$$

A continuación, se plantean métodos para medir cada uno de los parámetros restantes:

- **Velocidad a través del camino promedio:** se determina de forma similar a la velocidad curvilínea:

$$VAP = \frac{L \times F}{(N-1)} \sum_{n=2}^{N} d(\vec{s}_n\,, \vec{s}_{n-1}) \tag{6.10}$$

  En la sección de resultados se evaluará el desempeño de un filtro de tamaño fijo ($r = 2$) y un filtro de tamaño variable según la tasa de adquisición ($r = F/5$).

- **Porcentajes de rectitud y oscilación.** Se determinan como se definieron en la introducción:

$$STR = \frac{VSL}{VAP} \tag{6.11}$$

$$WOB = \frac{VAP}{VCL} \tag{6.12}$$

  De igual forma, se comparan los valores obtenidos con el uso de los dos filtros mencionados en el ítem anterior.

- **Amplitud y frecuencia del batido lateral de la cabeza (primer enfoque propuesto).** A partir del camino promedio obtenido con el primer filtro ($r = 2$), se determinan n_a arcos de la trayectoria entre puntos de inflexión consecutivos, cada uno con una amplitud máxima a_i. De esta forma, los parámetros de desplazamiento lateral y frecuencia de batido se calculan como se describe a continuación:

$$ALH = \frac{L}{n_a}\sum_{i=1}^{n_a} a_i \tag{6.13}$$

$$BCF = \left(\frac{n_a - 1}{N - 1}\right)F \tag{6.14}$$

- **Amplitud y frecuencia del batido lateral de la cabeza (segundo enfoque propuesto).** Se determina la separación punto a punto $\tilde{d}(n)$ entre la trayectoria original y la trayectoria suavizada con el segundo filtro ($r = F/5$):

$$\tilde{d}(\mathrm{n}) = \mathrm{d}(\vec{p}_n, \vec{s}_n)\ \cos\alpha_n \tag{6.15}$$

El factor $\cos\alpha_n$ se utiliza para obtener la proyección de la separación $\mathrm{d}(\vec{p}_n, \vec{s}_n)$ de forma perpendicular a la trayectoria suavizada. Adicionalmente, se puede definir una función proximidad $g(\mathrm{n})$ entre las dos trayectorias:

$$g(\mathrm{n}) = \max_{0\le n<N}\{\tilde{d}(n)\} - \tilde{d}(n) \tag{6.16}$$

Teniendo en cuenta lo anterior, los parámetros de motilidad ALH y BCF se determinan de la siguiente forma:

$$ALH = \frac{L}{N}\sum_{n=1}^{N} \tilde{d}(n) \tag{6.17}$$

$$BCF = \frac{F}{N-1}\underset{0\le k\le N-1}{argmax}(|\mathcal{F}\{g(n)\}|) \tag{6.18}$$

En la Ecuación 6.18, el término $\mathcal{F}\{g(n)\}$ corresponde a la Transformada de Fourier de la función proximidad, con índice de frecuencia k.

6.5.2. Identificación de subpoblaciones espermáticas de motilidad

Esta sección presenta un método para la identificación y el análisis de grupos o subpoblaciones a partir de los parámetros de motilidad obtenidos, el cual se soporta en un trabajo expuesto en conferencia internacional (Buchelly Imbachí et al. 2019).

Los parámetros de motilidad tienen distintos rangos de valores porque miden magnitudes diferentes (velocidad, porcentaje, longitud y frecuencia). Por tal razón, fue necesario normalizar su valor antes de llevar a cabo el agrupamiento para asignarles igual peso en el cálculo de la distancia. En esta aplicación se utilizó la distancia Euclídea como medida de separación de datos.

La identificación de grupos puede realizarse con todas o con algunas de las características extraídas de las trayectorias, y tales característicos pueden elegirse de forma manual o mediante algoritmos de selección de características. Por tal razón, se utilizaron los criterios de correlación y de información mutua entre variables para sugerir la selección de dos características.

Posteriormente, se utilizó el enfoque no supervisado para conformar los grupos en una secuencia de video de movimiento espermático. Se eligió un agrupamiento jerárquico por pares sin peso con media aritmética (UPGMA, en inglés) para observar con detalle los emparejamientos realizados en cada iteración y poder elegir el corte deseado para determinar la cantidad de grupos con ayuda del dendrograma generado.

Cuando se busca comparar las subpoblaciones presentes en varias muestras, es necesario contar con las mismas condiciones, es decir, se deben elegir los mismos característicos para el agrupamiento y los mismos rangos de valores de cada característico en cada grupo. Para atender estos requerimientos y llevar a cabo la comparación de varias muestras se adoptó un enfoque híbrido (no supervisado + supervisado) de la siguiente manera: primero se identifican las subpoblaciones para una muestra de referencia mediante el método de agrupamiento mencionado (enfoque no supervisado), luego se eligieron datos representativos de cada grupo presente en la muestra de referencia y se aplica el método k vecinos más próximos para clasificar las trayectorias de las nuevas muestras (enfoque supervisado).

A continuación, se exponen los detalles de los métodos utilizados para la identificación de subpoblaciones de motilidad espermática:

- **Selección de características para el agrupamiento:** El método de análisis de subpoblaciones sugiere la elección de dos características, teniendo en cuenta los siguientes criterios:

    - **Correlación entre variables:** la matriz de correlación se obtiene a partir de la matriz de covarianza, de la siguiente forma: sean X e Y dos variables o

parámetros de motilidad, entonces su coeficiente de correlación (Alberola López 2004) está dado por la ecuación:

$$\rho_{XY} = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \sigma_Y} \qquad 6.19$$

En la Ecuación 6.19, σ_X y σ_Y son las desviaciones estándar de X e Y, y σ_{XY} corresponde a su covarianza. Si se toma el valor absoluto de la matriz de correlación, una característica elegida para el agrupamiento será aquella correspondiente a la fila (o columna) cuya suma de valores sea mínima.

- **Información mutua entre variables:** La información mutua de dos características de motilidad X e Y, denotada por $I(X;Y)$, es una cantidad que mide la dependencia mutua de las dos variables; es decir, mide la reducción de la incertidumbre (entropía) de una característica, X, debido al conocimiento del valor de otra característica, Y (Mackay 2005). La información mutua puede hallarse si se conocen las funciones densidad de probabilidad de cada variable $p(x)$, $p(y)$, y la fdp conjunta $p(x,y)$, de la siguiente forma:

$$I(X;Y) = \int_0^1 \int_0^1 p(x,y) log\left(\frac{p(x,y)}{p(x)p(y)}\right) dxdy \qquad 6.20$$

La elección de una característica mediante la información mutua se hace de forma similar al criterio anterior: se genera una matriz con la información mutua entre pares de características y se obtiene la fila (o columna) cuya suma de valores sea máxima.

- **Agrupamiento jerárquico:** El agrupamiento de las muestras con las características seleccionadas se realizó de forma jerárquica con el algoritmo UPGMA (Garcia-Vallvé y Puigbò 2016; Xu y Wunsch 2009), que se describe en forma resumida a continuación:

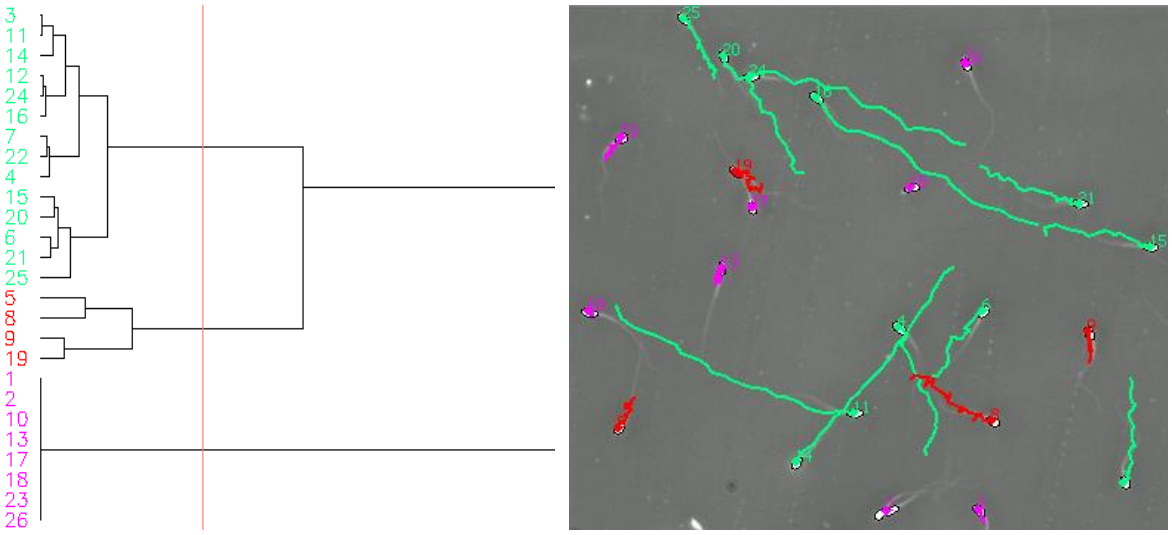
  - **Paso 1.** Se genera una matriz de distancias de las características entre pares de células y se elige la pareja que presente menor distancia (mayor similitud).

  - **Paso 2.** Para la elaboración del dendrograma, las dos células elegidas se representan como nodos que se unen con segmentos de longitud proporcional a su distancia.

  - **Paso 3.** Se eliminan las filas de datos pertenecientes a las dos células agrupadas y se agrega una fila con la media aritmética de sus valores.

  - **Paso 4.** Se repiten los pasos 1 a 3 hasta que ya no queden células para emparejar.

El número de grupos se define entonces por un umbral que se establece con ayuda del dendrograma. La Figura 6.3 ilustra el método de agrupamiento con un ejemplo.



(a) (b)

Figura 6.3. Uso del agrupamiento jerárquico para la identificación de subpoblaciones espermáticas de motilidad. (a) Dendrograma que muestra el agrupamiento por parejas para una muestra que contiene 26 células espermáticas, mediante la selección automática de las variables LIN y WOB. La línea roja vertical indica el umbral establecido y determina la cantidad de grupos. (b) Visualización de las trayectorias pertenecientes a cada grupo. Fuente: imagen propia.

De forma complementaria, se utiliza el Índice de Silhouette (Pagnuco et al. 2016; Rousseeuw 1987) como criterio para evaluar la calidad del agrupamiento en función de las variables seleccionadas y del umbral del corte en el dendrograma. Para determinar el índice de Silhouette de una célula i se deben obtener los siguientes parámetros: la distancia promedio de i a los otros elementos del mismo grupo, denominada $a(i)$, y la distancia entre los parámetros de la célula i y el grupo más cercano que no contiene a i, denominada $b(i)$. El índice de Silhouette para la célula i se calcula mediante la expresión:

$$\mathrm{s(i)} = \frac{\mathrm{b(i)} - \mathrm{a(i)}}{\max\{\,\mathrm{a(i)},\ \mathrm{b(i)}\,\}} \qquad 6.21.$$

De la Ecuación 6.21se infiere que $-1 \leq s(i) \leq 1$. Esto implica que el resultado será positivo para un buen agrupamiento y su calidad mejora a medida que su valor tiende a 1. La medida global de la calidad del agrupamiento será la media aritmética de los índices de Silhouette de todas las células.

- **Clasificación de muestras:** el agrupamiento jerárquico de una muestra base proporciona una referencia para comparar nuevas muestras a partir de los mismos clústeres. Cuando se carga un archivo de datos que contiene los parámetros de motilidad de una nueva muestra se realiza una clasificación mediante el método supervisado *k* vecinos más próximos (*k*NN, en inglés), descrito a continuación:

    - **Paso 1.** Elegir N_p datos prototipos de la muestra base, cada una etiquetada en uno de los N_g grupos en los cuales se clasificarán los nuevos datos. Sea $X_p = \left\{x_{p_i}\right\}_{i=1,2,\dots N_p}$ el conjunto de vectores prototipos.

    - **Paso 2.** Encontrar los k vecinos más próximos para cada vector de datos $x \in X$ de la nueva muestra X, respecto a los datos prototipos X_p, de acuerdo con la función distancia utilizada.

    - **Paso 3.** La clase asignada al vector de datos $x \in X$ corresponde a aquella que ocurra más frecuentemente entre los k vecinos más próximos obtenidos en el paso anterior.

Se puede notar que el método de clasificación *k*NN requiere como entrada el número de vectores prototipos de datos N_p y el número de vecinos k a evaluar. El conjunto de vectores prototipos para esta situación corresponde al total de las células presentes en la muestra de referencia, es decir, $N_p = N$ y el número de vecinos más próximos a encontrar es $k = 3$.

6.6. Resultados

Para que los métodos propuestos produzcan resultados confiables de acuerdo con la validación realizada a los mismos, es indispensable que se adquieran secuencias de video adecuadas, es decir, se deben utilizar imágenes que cuenten con la calidad óptima en cuanto al contraste entre las células y el fondo, y con la concentración apropiada de células por cuadro. La primera característica depende del equipo de microscopía empleado y de la experiencia del operario para su manipulación. Por otra parte, la concentración debe ser inferior a 200 células por cuadro, y puede regularse al momento de preparar la muestra.

Los resultados que se presentan en las siguientes secciones se obtuvieron a partir de una interfaz gráfica desarrollada para configurar los parámetros de funcionamiento de los métodos propuestos, Por una parte, se ajustaron los parámetros que describen el esquema experimental: objetivo del microscopio, profundidad de la cámara en la cual se deposita la muestra y arista de los cuadros de una grilla que sirve como referencia de longitud para la conversión de píxeles a micras. De igual forma, se establecieron los parámetros que permiten sintonizar los métodos de detección y el seguimiento de las células: el radio del elemento estructurante para el realce en escala de grises y el umbral para generar las imágenes binarias.

Una vez ajustados los parámetros, los métodos propuestos para la detección, el seguimiento y el análisis de movimiento se llevan a cabo de forma automática.

En las siguientes secciones se denominará con el término "usuario" a los expertos que participaron en la evaluación del desempeño de los mismos, como también a los usuarios finales de un producto tecnológico desarrollado (ver Anexo I), quienes generalmente son biólogos, veterinarios, y otros investigadores en áreas de la reproducción.

A continuación, se presenta la evaluación de cada uno de los métodos propuestos.

6.6.1. Métodos de detección y seguimiento

La evaluación de los métodos de detección y seguimiento fue supervisada por parte de un grupo de expertos en el área de biología reproductiva. Los expertos determinaron diferentes medidas de desempeño para los métodos propuestos y para el sistema CASA comercial *Sperm Class Analyzer* de Microptic® (MICROPTIC 2019b), ampliamente utilizado por profesionales e investigadores de la reproducción. La comparación de las medidas de desempeño de los dos sistemas se llevó a cabo en dos etapas, como se describe a continuación.

En la primera etapa (Buchelly Imbachí et al. 2017), un biólogo experto analizó 15 videos de muestras de semen de carnero con distintas concentraciones y con tres tasas de adquisición: 25, 50 y 75 cuadros por segundo. Durante este análisis, el experto evaluó visualmente cada uno de los trayectos obtenidos con los dos métodos de seguimiento (el método propuesto y el método que utiliza el software comercial), y se determinó si el trayecto es correcto o incorrecto en cuanto a su correspondencia temporal. El porcentaje de trayectos con seguimiento correcto determinan la precisión de cada método frente al video analizado. También se determinó si la trayectoria obtenida está completa o si corresponde a un fragmento de una trayectoria más larga, y se determinó el porcentaje de fragmentos de trayectorias obtenidos para el video. La medida de estos descriptores de desempeño se muestra en la Tabla 6.1. En ella se puede observar que los métodos propuestos para la detección y el seguimiento tienen, en general, un mejor desempeño que los métodos utilizados en el software de referencia, en vista de los mayores valores de precisión y menores porcentajes de fragmentaciones determinados. En la Figura 6.4 se ilustran estos indicadores.

Como un indicador complementario, se determinó el porcentaje de motilidad total para cada video según las trayectorias obtenidas con los dos métodos evaluados. El porcentaje de motilidad es un parámetro biológico que indica la proporción de células espermáticas con una velocidad curvilínea superior o igual a 10 micras por segundo. El porcentaje de motilidad para las muestras analizadas se presenta en la Tabla 6.2. Este valor confirma el desempeño del método de seguimiento propuesto, ya que el aumento de la cantidad de trayectorias detectadas se debe a la detección de una mayor cantidad de células mótiles de alta velocidad que el sistema comercial no puede seguir adecuadamente, y no solamente de células estáticas.

Tabla 6.1. Desempeño de los métodos propuestos y los métodos utilizados en el software *Sperm Class Analyzer* frente al porcentaje de trayectorias fragmentadas y la precisión de los métodos de seguimiento, con videos de semen ovino.

Tasa de adquisición (cuadros por segundo)	**Densidad D** (partículas/mm^2)	**Métodos propuestos**			**Sperm Class Analyzer**		
		Trayectorias evaluadas	**Fragmentos** (%)	**Precisión** (%)	**Trayectorias evaluadas**	**Fragmentos** (%)	**Precisión** (%)
25	280,4	**128**	**0,00**	**83,6**	76	2,63	73,25
	354,6	**162**	**0,00**	**87,8**	60	1,67	66,97
	305,1	**170**	**0,00**	**86,8**	51	0,00	82,81
	270,6	**156**	**0,00**	**92,0**	60	3,33	91,00
	233,2	**118**	**0,00**	**94,1**	69	2,90	85,00
50	226,4	**73**	1,37	**90,8**	53	**0,00**	80,95
	248,5	**87**	**2,30**	**94,1**	59	5,08	74,28
	286,1	**100**	**1,00**	**96,7**	75	1,33	69,89
	297,4	**112**	**0,00**	**87,0**	76	3,95	70,00
	245,2	**90**	**1,11**	**95,7**	60	5,00	80,82
75	248,4	**109**	1,83	**94,3**	63	**0,00**	74,29
	331,3	**140**	2,14	**91,9**	92	**1,09**	72,28
	288,6	**114**	**0,00**	**91,4**	88	0,00	72,73
	258,9	**105**	1,90	**88,5**	72	**0,00**	82,19
	288,4	**108**	5,56	**93,6**	85	**0,00**	82,56

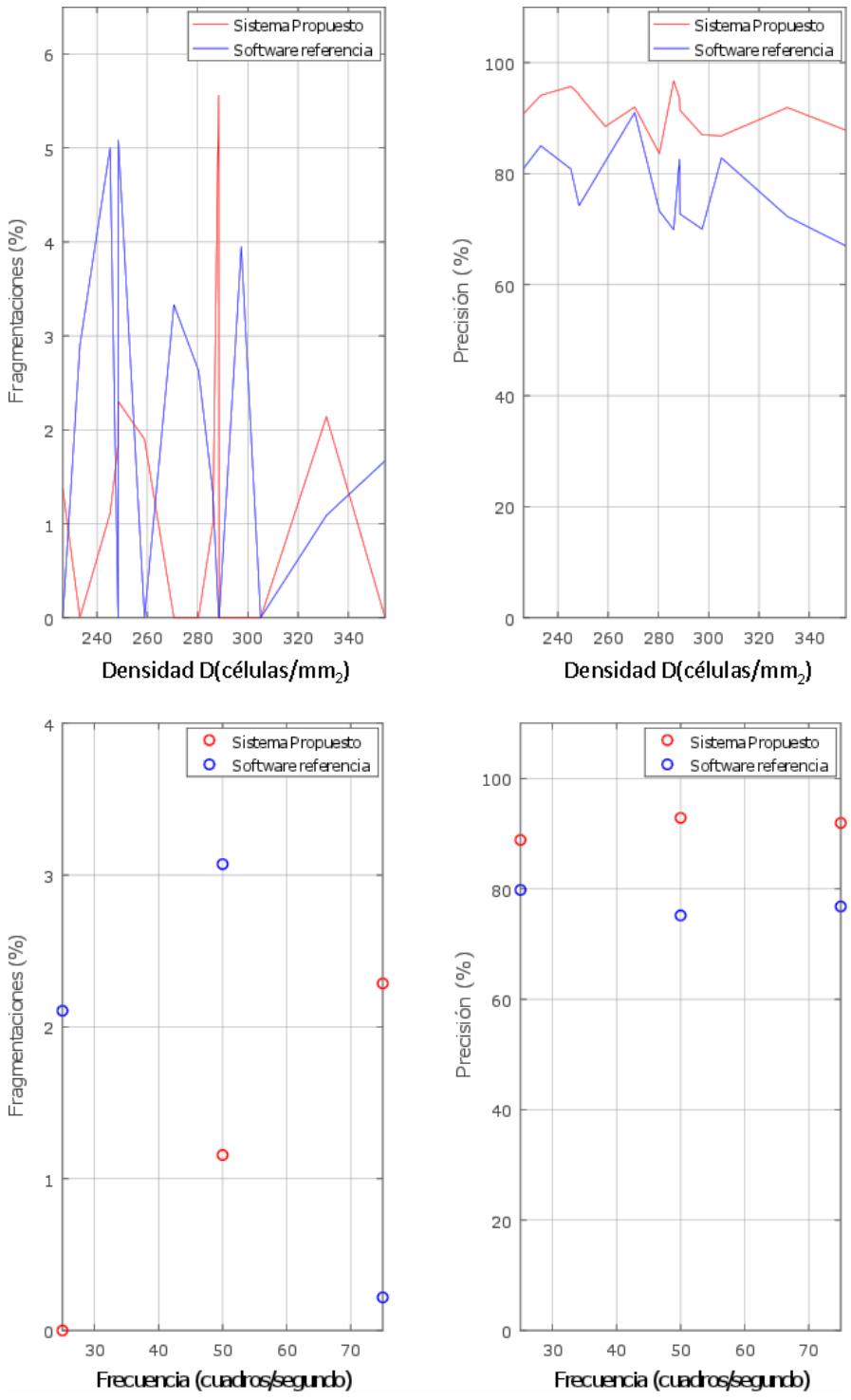


Figura 6.4. Desempeño de los métodos propuestos frente al software de referencia para la detección y el seguimiento de células espermáticas. Fuente: imagen propia.

Tabla 6.2. Porcentajes de motilidad determinados para las trayectorias obtenidas con el método propuesto y el software de referencia.

Muestra	Métodos Propuestos (%)	*Sperm Class Analyzer* (%)
1	0,9149	0,7434
2	0,9402	0,8346
3	0,9314	0,8217
4	0,9643	0,8416
5	0,9130	0,6915
6	0,8022	0,4783
7	0,8763	0,5122
8	0,8889	0,6117
9	0,8846	0,6122
10	0,8889	0,5135
11	0,9167	0,5517
12	0,8924	0,5714
13	0,8740	0,5046
14	0,8974	0,5632
15	0,9008	0,5773

En la segunda etapa (Buchelly Imbachí et al. 2018), se midió nuevamente el desempeño de los dos métodos de seguimiento con 20 muestras diferentes (10 de semen ovino y 10 de semen caprino), todas adquiridas a una tasa constante de 25 cuadros por segundo. Se realizó la validación con la participación de tres expertos en el área, quienes emitieron sus resultados de forma unánime para cada medida de desempeño. Se determinaron los porcentajes de fragmentación de trayectorias y de precisión, al igual que en la validación anterior. También se midió el porcentaje de detecciones correctas, es decir, de detección de espermatozoides y no de otros objetos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.3.

La Figura 6.5 permite comparar visualmente el desempeño de los métodos de seguimiento frente a los dos tipos de muestras. Para las muestras de semen ovino se tiene un desempeño del método propuesto mejor que el desempeño del método utilizado en el software de referencia, respecto a los porcentajes de objetos correctamente detectados y la precisión. Los dos métodos presentan un desempeño similar en cuanto al porcentaje de trayectorias fragmentadas. Por otra parte, para las muestras de semen caprino, se tiene un desempeño similar de los dos métodos respecto a la tasa de verdaderos positivos y la precisión del seguimiento, pero el método propuesto presenta un desempeño inferior en cuanto al porcentaje de fragmentaciones.

Tabla 6.3. Desempeño de los métodos propuestos y los métodos del software *Sperm Class Analyzer* frente al porcentaje de detecciones correctas, el porcentaje de trayectorias fragmentadas y la precisión del método de seguimiento con muestras de semen ovino y caprino.

Tipo	Video	Concentración (10^6 células/ml)	Métodos propuestos				*Sperm Class Analyzer*			
			Trayectorias evaluadas	Detecciones correctas (%)	Fragmentaciones (%)	Precisión (%)	Trayectorias evaluadas	Detecciones correctas (%)	Fragmentaciones (%)	Precisión (%)
Ovino	1	32,49	**158**	**100**	**4,2**	**82,3**	102	84,0	6,5	66,1
	2	28,99	**131**	**93,1**	**1,3**	**85,1**	84	74,3	5,7	76,9
	3	36,99	**165**	**89,7**	**1,8**	**82,8**	93	73,5	5,0	74,3
	4	32,60	**155**	**88,4**	**3,1**	**82,5**	84	64,9	5,8	81,8
	5	29,45	**151**	**89,9**	**3,4**	**86,8**	72	71,6	5,8	85,9
	6	35,40	**179**	**99,6**	12,7	**86,8**	108	82,2	**8,9**	69,2
	7	31,80	**152**	**98,7**	9,4	**85,1**	95	79,4	**6,2**	67,8
	8	32,92	**157**	**98,1**	11,7	**79,4**	92	76,0	**11,1**	69,1
	9	30,82	**150**	**98,5**	**13,1**	**90,9**	99	82,9	14,9	68,0
	10	25,70	**118**	**85,3**	**6,5**	**88,2**	74	78,7	8,5	79,6
Caprino	1	19.82	**65**	82.7	6.5	90.8	54	**92.1**	**0.6**	**94.4**
	2	21.41	**83**	**96.5**	4.4	92.8	60	90.0	**1.1**	**97.9**
	3	42.29	**165**	**98.2**	9.9	85.1	127	92.0	**1.8**	**89.4**
	4	33.81	**123**	93.2	6.4	85.3	102	**96.8**	**5.4**	**93.9**
	5	34.28	**114**	**93.2**	8.3	90.6	97	92.9	**3.8**	**91.5**
	6	12.64	**44**	**98.5**	**4.5**	**97.8**	40	96.7	6.7	91.6
	7	14.7	**54**	**98.8**	7.3	**92.1**	49	94.2	**2.7**	91.9
	8	14.09	**59**	**99.4**	17.5	**89.8**	50	92.0	**0.0**	85.8
	9	19.1	**88**	93.4	14.2	87.2	69	**95.4**	**1.4**	**94.6**
	10	23.59	**107**	**93.6**	20.9	83.1	80	89.5	**3.4**	**89.1**

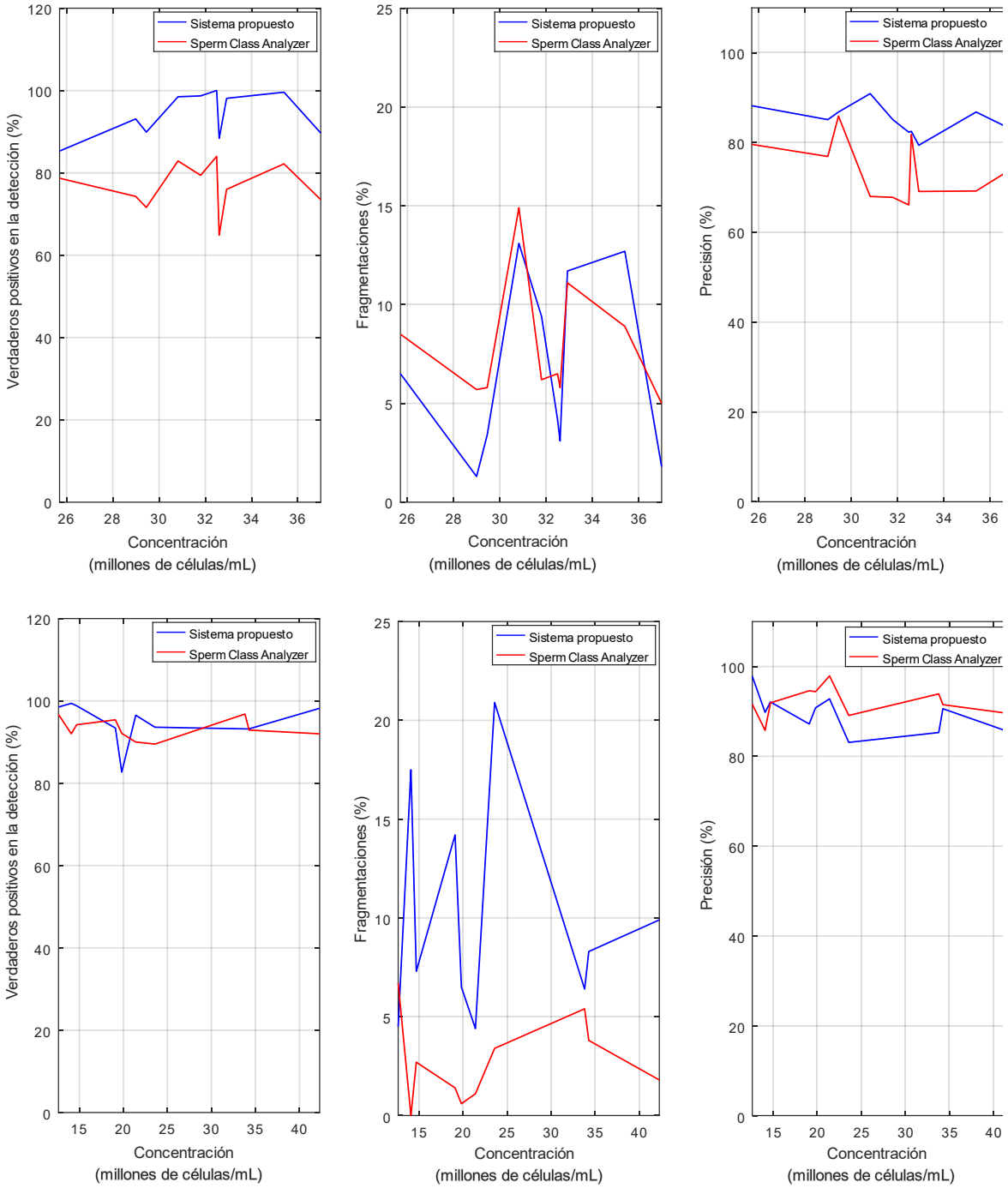


Figura 6.5. Desempeño de los métodos propuestos de detección y seguimiento de células espermáticas en semen ovino (fila superior) y semen caprino (fila inferior) frente al software de referencia. Fuente: imagen propia.

Del análisis realizado se desprende que, según el tipo de muestra, el método propuesto presenta un desempeño general igual o mejor que el software comercial. Debe tenerse en cuenta, que según los valores registrados en la Tabla 6.3, la cantidad promedio de trayectorias obtenidas con el método propuesto es 67,9% mayor que la cantidad obtenida con el software de referencia para muestras de semen ovino, y 23,9% mayor para muestras de semen caprino. Este hecho refuerza la confiabilidad del método propuesto.

6.6.2. Elaboración de un software CASA para el análisis de motilidad

A partir de los métodos validados para la detección y el seguimiento de células espermáticas, se generó un software CASA de uso libre que permite realizar la detección, el seguimiento y el análisis de motilidad de células espermáticas en videos obtenidos mediante microscopía de contraste de fase. El software se denominó *Sperm Motility Tracker* (siglas SMT), y cuenta con una interfaz gráfica amigable, la cual se describe detalladamente en el Anexo I.

Si bien el software se validó inicialmente con semen ovino y caprino, su uso se puede extender fácilmente a otras especies. De hecho, un trabajo complementario de esta tesis (Zalazar et al. 2017), en el cual se analizaron muestras de semen de pez lenguado (*Paralichthys Orbignyanus*), confirmó que las velocidades medidas con el software son consistentes con otras medidas reportadas en la literatura. De igual forma, se han realizado otros trabajos de alto impacto en áreas relacionadas con la biología reproductiva, en los cuales se utiliza el software para análisis de motilidad espermática (Ledesma et al. 2019).

Para la protección de la propiedad intelectual, el software se registró como obra inédita ante el Poder Ejecutivo Nacional de la República Argentina. El registro de propiedad intelectual fue expedido el día 2 de noviembre de 2018 y tiene como número: RE-2018-56090078-APN-DNDA#MJ. El documento que describe los detalles del registro se presenta en el Anexo II.

Actualmente, se distribuye una versión de prueba del software a investigadores de diferentes universidades y centros de investigación del ámbito nacional y de otros países como Colombia, Estados Unidos y Nueva Zelanda. Para adquirir el software, los investigadores interesados diligenciaron un formulario en el cual registraron sus datos personales y la aplicación en la cual utilizarán el programa. Se destaca, por ejemplo, el uso del programa para el análisis de muestras de semen de diferentes especies, incluyendo seres humanos.

6.6.3. Análisis de motilidad espermática

En la sección 6.1.3 se definieron los métodos para determinar los parámetros estándar de motilidad. Por una parte, los parámetros VCL, VSL y LIN se miden a partir de la trayectoria obtenida por el método de seguimiento y se calculan utilizando las Ecuaciones 6.6 a 6.8. Por otro lado, los parámetros restantes requieren de un método suavizado de la trayectoria para determinar su valor. En la Tabla 6.4 se resumen los métodos propuestos para calcular dichos parámetros:

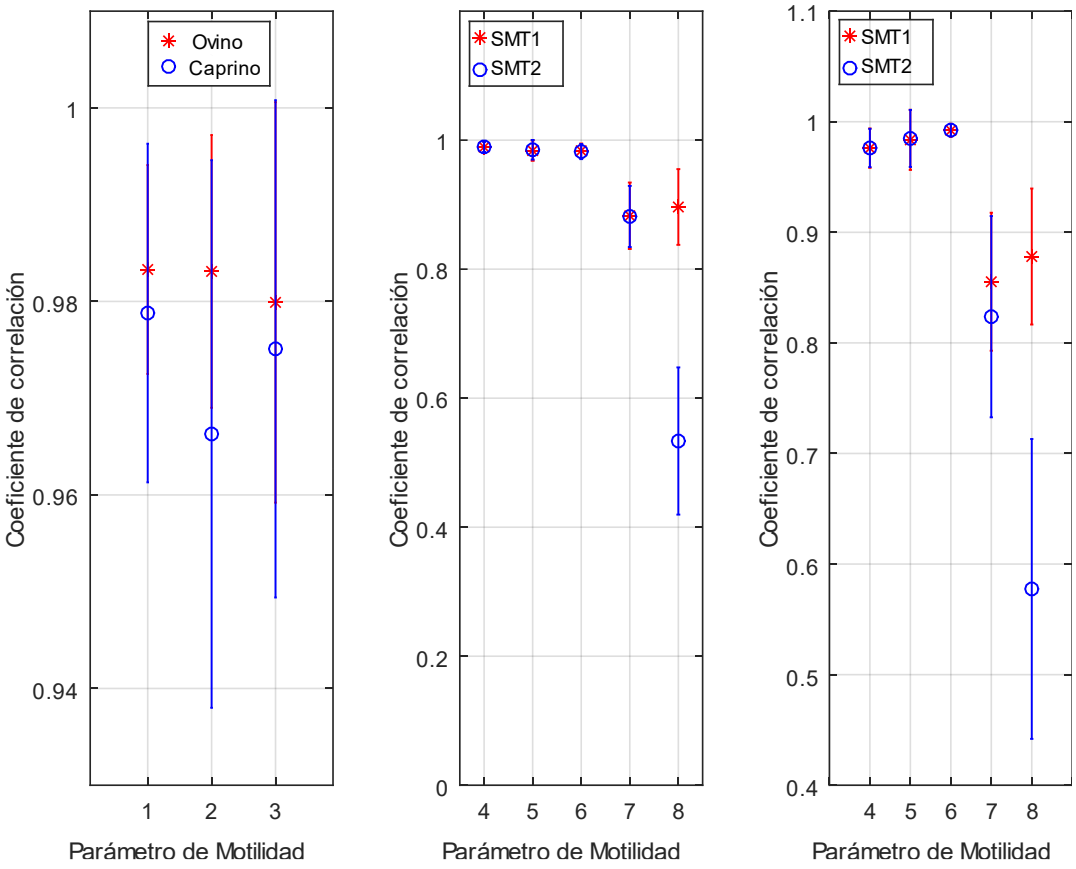
Tabla 6.4. Resumen de los métodos propuestos para calcular los parámetros estándar de motilidad.

Parámetro	Primer enfoque (SMT1)	Segundo enfoque (SMT2)
Velocidad a través del camino promedio, VAP	Se suaviza la trayectoria con un filtro de media móvil de 5 elementos (Ecuación 6.10)	Filtro de media móvil de tamaño variable según la frecuencia de adquisición (Ecuación 6.10)
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, ALH	Promedio de las amplitudes máximas de oscilación entre puntos de inflexión consecutivos de la trayectoria original (Ecuación 6.13)	Se genera una función distancia entre la trayectoria suavizada y la trayectoria original. Luego se toma el valor promedio (Ecuación 6.17)
Frecuencia de batido de la cabeza, BCF	Frecuencia de ocurrencia de puntos de inflexión en la trayectoria suavizada por un filtro débil (Ecuación 6.14)	Se obtiene la frecuencia a la cual ocurre el pico máximo en el espectro de Fourier para una función de proximidad entre curvas (Ecuación 6.18)

Los métodos propuestos se evaluaron mediante dos pruebas, en las cuales se tomó como referencia el sistema *Sperm Class Analyzer* (SCA), como se reportó en el correspondiente trabajo publicado (Buchelly Imbachí et al. 2020b).

En la primera prueba, se analizaron 10 muestras de semen ovino y 10 muestras de semen caprino con los sistemas SMT y SCA, adquiridas a una tasa constante de 25 cuadros por segundo. Luego se establecieron correspondencias manualmente entre las trayectorias obtenidas con los dos sistemas, y finalmente se calculó el coeficiente de correlación lineal para los parámetros de motilidad obtenidos con cada software.

La Figura 6.6 muestra el valor promedio y la desviación estándar de los coeficientes de correlación calculados. Los parámetros de motilidad se etiquetaron con números, de la siguiente forma: 1 para VCL, 2 para VSL, 3 para LIN, 4 para VAP, 5 para STR, 6 para WOB, 7 para ALH y 8 para BCF. Los primeros tres coeficientes de correlación promedio muestran una buena correspondencia y, por lo tanto, confirman la confiabilidad del método de seguimiento del sistema SMT tomando como referencia el sistema SCA. Para los demás parámetros, no se encontraron diferencias significativas entre los dos enfoques, excepto para el parámetro BCF.



(a) (b) (c)

Figura 6.6. Coeficientes de correlación promedio entre los parámetros de motilidad calculados con cada uno de los métodos propuestos, y los calculados por el sistema SCA. (a) Parámetros que no dependen del método de suavizado, (b) Resultados para las muestras de semen ovino, y (c) Resultados para las muestras de semen caprino. Fuente: imagen propia.

En la segunda prueba, se analizaron 15 muestras de semen ovino con los dos enfoques propuestos y con el sistema SCA. Se analizaron los cambios en los valores de los parámetros VAP, ALH y BCF frente al incremento en la frecuencia de adquisición. Así, se adquirieron 5 muestras con cada una de las siguientes frecuencias: 25, 50 y 75 cuadros por segundo. En esta prueba únicamente se consideraron los espermatozoides mótiles (no estáticos) con el fin de evaluar el comportamiento del método de suavizado. En la Figura 6.7 se muestran los valores promedio de los parámetros mencionados, obtenidos con cada método y para cada una de las frecuencias de adquisición.

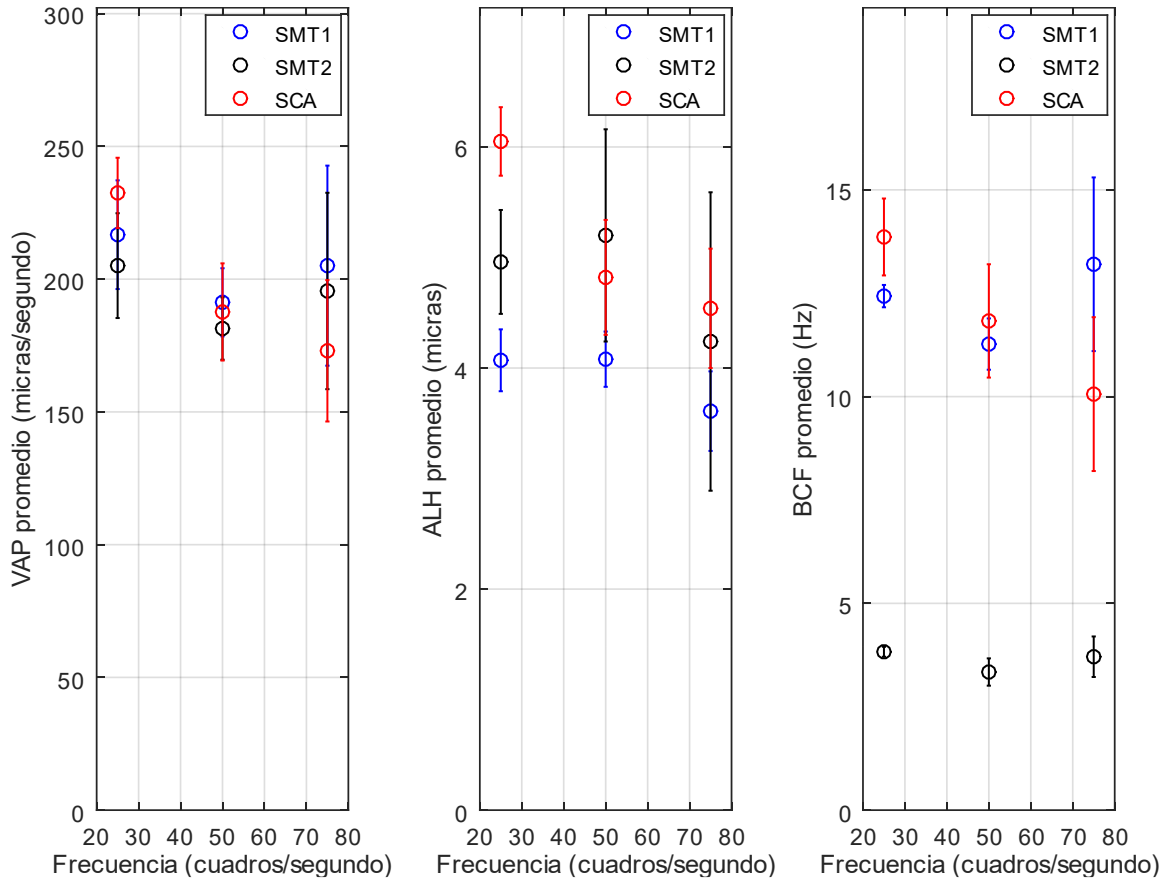


Figura 6.7. Efecto de la frecuencia de adquisición en los parámetros que dependen del suavizado de la trayectoria. Fuente: imagen propia.

A partir de la Figura 6.7 se puede observar cuál de los métodos propuestos genera resultados más cercanos a los que produce el sistema SCA. Para el parámetro VAP no se observaron variaciones significativas entre los dos métodos propuestos. Para el parámetro ALH, el segundo enfoque (SMT2) produce valores más cercanos a los obtenidos con el sistema SCA. Finalmente, se observa claramente que el primer enfoque (SMT1) produce resultados más cercanos a los valores de referencia, obtenidos con el software SCA.

Con base en los resultados anteriores, se implementaron los métodos del enfoque 2 para el cálculo de los parámetros VAP (Ecuación 6.10 con r variable) y ALH (Ecuación 6.17) y el método del enfoque 1 para calcular BCF (Ecuación 6.14). No obstante, debe considerarse el método propuesto para calcular el parámetro BCF del segundo enfoque (Ecuación 6.18) para un posterior análisis y una posible corrección, debido a que selecciona únicamente la frecuencia predominante en el espectro de Fourier, pero no descarta la existencia de diferentes armónicos en el patrón de oscilación de la célula.

6.6.4. Identificación de subpoblaciones espermáticas de motilidad

Como una prueba preliminar (Buchelly Imbachí et al. 2019), se probó el método propuesto de agrupamiento con muestras de semen de tres especies animales: mamíferos (caprinos y ovinos) y peces (lenguado). En la Tabla 6.5 se presentan los datos de cuatro muestras de semen de cada especie: cantidad de células, la cantidad de subpoblaciones que se pueden formar con muy buen agrupamiento (índice de Silhouette mínimo de 0,5) y las dos variables elegidas de forma automática para el agrupamiento. La cantidad de grupos que se pueden conformar varía entre 2 y la cantidad total de células detectadas. Para la presente prueba se limitó el número de grupos a un máximo de diez, puesto que el análisis de una alta cantidad de subpoblaciones espermáticas carece de significado biológico.

Tabla 6.5. Ejemplos de muestras de cada especie analizadas con el módulo de agrupamiento

Tipo	No. Células	Características seleccionadas	No. Grupos*
Caprino	88	VCL-BCF	2,3 y 5
Caprino	85	VCL-BCF	2-10
Caprino	105	VCL-BCF	2-10
Caprino	118	VCL-BCF	2-10
Ovino	125	LIN-BCF	2-9
Ovino	138	WOB-BCF	2-10
Ovino	84	STR-BCF	2-10
Ovino	97	LIN-BCF	2-10
Pez	48	LIN-ALH	2-10
Pez	32	WOB-BCF	3-10
Pez	40	WOB-ALH	2-10
Pez	34	WOB-BCF	2-4 y 6-10

* Grupos conformados con Índice de Silhouette mayor que 0,5

Debido a las características del método jerárquico de agrupamiento UPGMA, en el cual se parte de la similitud de las características de células individuales hasta llegar al grupo completo, las subpoblaciones espermáticas de motilidad de cualquier tipo de muestra se forman obteniéndose siempre índices de Silhouette no negativos, es decir, siempre se logra un agrupamiento bueno con Índice de Silhouette positivo, o a lo sumo regular (Índice de Silhouette igual a cero) cuando los grupos están conformados por una única célula.

6.6.5. Clasificación de muestras

Como se mencionó anteriormente, se incluyó un método supervisado para clasificar trayectorias de células espermáticas en el software *Sperm Motility Tracker*. La técnica *k*NN se utiliza sobre la tabla de parámetros de motilidad de una nueva muestra, cuando previamente se identificaron los grupos o subpoblaciones en una muestra de referencia.

Dichos grupos, obtenidos mediante el método no supervisado de agrupamiento jerárquico, proporcionan las etiquetas para las nuevas células sin clasificar.

Para probar el sistema híbrido de agrupamiento/clasificación se descongelaron muestras de semen ovino que fueron crio preservadas con dos protocolos distintos, es decir, utilizando dos extensores de diferente composición química. En un conjunto de 16 muestras se utilizó un extensor a base de yema de huevo y en el otro conjunto de 16 muestras se utilizó un extensor a base de lecitina de soya. Por medio de criterios biológicos se eligió una muestra de cada conjunto y se realizó la identificación de subpoblaciones espermáticas en cada una, con el fin de identificar cuál de ellas sería la muestra base para la comparación o clasificación. Para la muestra con extensor a base de yema de huevo se obtuvo un agrupamiento con Índice de Silhouette máximo de 0,77, con una partición en 3 grupos y la selección sugerida de las variables VCL y ALH. Para la otra muestra, el índice de Silhouette máximo obtenido fue similar (0,71), con partición en 2 grupos y las mismas variables sugeridas. De esta forma, se eligió la muestra con extensor a base de yema como muestra base o referencia para comparación.

En la Tabla 6.6 se muestran las estadísticas relacionadas con los grupos identificados en la muestra seleccionada.

Tabla 6.6. Valor promedio y desviación estándar de las características seleccionadas en cada una de las subpoblaciones de la muestra de referencia.

Clúster	Conteo	%	VCL promedio (µm/s)	Desviación Estándar VCL (µm/s)	ALH promedio (µm)	Desviación Estándar ALH (µm)
0	17	18,68	95,4870	26,1067	0,7088	0,5109
1	21	23,08	176,2400	25,9211	2,6038	0,5556
2	53	58,24	3,0196	8,8005	0,0513	0,1466

Con la elección de la muestra base, se clasificaron las células de las 31 muestras restantes. El resultado de la clasificación será la asignación de la etiqueta del clúster más cercano a los datos de cada trayectoria. Sin embargo, en el ensayo propuesto no puede llevarse a cabo un análisis de error, dado que la formación de los grupos de referencia se hace de manera no supervisada.

La Tabla 6.7 permite comparar los rangos de valores de las variables seleccionadas para cada grupo, en cada una de las condiciones de crio preservación.

Tabla 6.7. Rangos de valores de los parámetros clasificadores en cada clúster de los dos tipos de muestras.

Extensor	Rango de VCL (µm/s)			Rango de ALH (µm)		
	Clúster 1	**Clúster 2**	**Clúster 3**	**Clúster 1**	**Clúster 2**	**Clúster 3**
A base de yema de huevo	35,61-206,92	97,66-278,42	0-51,52	0-2,31	0,42-4,65	0-0,88
A base de lecitina de soya	33,67-166,89	97,48-289,19	0-43,9	0-2,55	0,73-4,84	0-0,82

6.7. Conclusiones para esta aplicación

En la presente aplicación se utilizó el método de seguimiento propuesto mediante el establecimiento heurístico de sus parámetros de configuración. Teniendo en cuenta las características de las imágenes y del movimiento de las células espermáticas, algunos de los parámetros se fijaron en valores constantes para cualquier muestra, y otros se establecieron como modificables por el usuario según la calidad de la imagen y el aumento del microscopio Dada la necesidad de establecer dichos parámetros, se desarrolló una interfaz gráfica que permite cargar un video, establecer el umbral de detección y el elemento estructurante utilizado, monitorear el seguimiento cuadro a cuadro, y almacenar los análisis hechos al conjunto de células en diferentes formatos de archivo.

Con base en lo anterior, se realizaron pruebas con varias muestras de semen de diferentes especies, que permitieron evaluar el desempeño de los métodos propuestos en tres fases: evaluación del método de seguimiento, evaluación de las técnicas de análisis de motilidad, y evaluación del módulo de identificación de subpoblaciones espermáticas de motilidad.

En la primera fase se obtuvieron diferentes medidas de desempeño como: cantidad de trayectorias identificadas, precisión en la detección (porcentaje de verdaderos positivos), precisión en el seguimiento (trayectorias obtenidas correctamente) y porcentaje de trayectorias fragmentadas, mediante el análisis de semen ovino y caprino. Para contrastar se evaluaron las mismas medidas de desempeño con el sistema CASA comercial *Sperm Class Analyzer*. Como resultado, el desempeño promedio obtenido para el método propuesto de seguimiento es similar o superior al desempeño del sistema comercial en relación a dichas medidas, obtenidas bajo la supervisión de un grupo de expertos en biología reproductiva.

En vista del buen desempeño obtenido, se elaboró un software CASA de uso libre, denominado *Sperm Motility Tracker*, para la detección, el seguimiento y el análisis de motilidad de células espermáticas. Este es tal vez uno de los resultados más importantes de esta tesis, puesto que se trata de un desarrollo tecnológico accesible y de fácil uso para los investigadores en temas relacionados con la reproducción, y cuenta con un registro de

propiedad intelectual. Además, su uso se puede extender al estudio de muestras de semen de diferentes especies.

En la segunda fase se comparó la confiabilidad de las técnicas propuestas para el cálculo de los parámetros estándar de motilidad con videos de semen ovino y semen caprino, y se utilizaron las medidas obtenidas por el sistema comercial como medidas de referencia. De esta forma, se evaluaron los parámetros que son independientes y los que son dependientes del método de suavizado de las trayectorias. La alta correlación entre los parámetros calculados independientes del suavizado y las medidas obtenidas con el sistema comercial confirman el desempeño adecuado del método de seguimiento. Por otra parte, se propusieron dos enfoques para determinar los parámetros dependientes del suavizado, y se determinó cuál enfoque generó los valores más cercanos a las medidas de referencia.

En la tercera fase, se utilizaron muestras de semen ovino, caprino y de pez con el fin de identificar cuántos grupos de afinidad se pueden formar con un alto índice de Silhouette a partir de las características seleccionadas por los dos criterios utilizados. Como resultado, para cada muestra, se obtuvieron al menos tres agrupamientos satisfactorios, es decir, aquellas que propiciaron un Índice de Silhouette mayor a un umbral establecido. No obstante, todos los agrupamientos posibles, presentan una medida de calidad buena o al menos aceptable de acuerdo al método de *clustering* empleado, ya que el método jerárquico no permite la formación de clústeres cuyas regiones se intersecan. Finalmente, se desarrolló un módulo de clasificación que permite comparar muestras a partir del agrupamiento realizado con una muestra de referencia o muestra base.

Con la incorporación del módulo híbrido (no supervisado + supervisado) de identificación de subpoblaciones espermáticas al software *Sperm Motility Tracker*, se presentó una innovación en el ámbito de los sistemas CASA, puesto que se desconoce la existencia de programas computarizados que realicen seguimiento, análisis de motilidad y análisis de subpoblaciones en un mismo paquete.

6.8. Referencias

Alberola López, C.: Probabilidad, variables aleatorias y procesos estocásticos: una introducción orientada a las Telecomunicaciones. (2004)

Amann, R., Waberski, D.: Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. Theriogenology. 81, 5-17.e3 (2014). https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004

Aprinaldi, Jati, G., Gunawan, A.A.S., Bowolaksono, A., Lestari, S.W., Jatmiko, W.: Human Sperm tracking using Particle Swarm Optimization combined with Smoothing Stochastic sampling on low frame rate video. 2015 Int. Symp. Micro-NanoMechatronics Hum. Sci. MHS 2015. (2016). https://doi.org/10.1109/MHS.2015.7438308

Arasteh, A., Vosoughi Vahdat, B., Salman Yazdi, R.: Multi-Target Tracking of Human Spermatozoa in Phase-Contrast Microscopy Image Sequences using a Hybrid Dynamic Bayesian Network. Sci. Rep. 8, 5068 (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-23435-x

Boryshpolets, S., Pérez-Cerezales, S., Eisenbach, M.: Behavioral mechanism of human sperm in thermotaxis: a role for hyperactivation. Hum. Reprod. 30, 884-892 (2015). https://doi.org/10.1093/humrep/dev002

Bravo, J.A., Montanero, J., Calero, R., Roy, T.J.: Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. Anim. Reprod. Sci. 129, 22-29 (2011). https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.005

Buchelly Imbachí, F., Isa-Jara, R., Zalazar, L., Cesari, A., Pastore, J., Ballarin, V.: Comparative Analysis of Different Techniques to Determine Motility Parameters in Video Sequences of Ram and Buck Sperm. En: VIII Latin American Conference on Biomedical Engineering and XLII National Conference on Biomedical Engineering. CLAIB 2019. IFMBE Proceedings, vol 75. pp. 385-392 (2020)

Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J., Cesari, A., Ballarin, V.: Desarrollo de un módulo para el estudio de subpoblaciones de motilidad espermática integrado a un software CASA. En: VIII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica CLAIB 2019. , Cancún, Mexico (2019)

Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J., Greco, M., Iniesta-Cuerda, M., Garde, J., Soler, A., Ballarin, V., Cesari, A.: Objective evaluation of ram and buck sperm motility by using a novel sperm tracker software. Reproduction. 156, 11-21 (2018). https://doi.org/10.1530/REP-17-0755

Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J., Soler, A., Cesari, A., Ballarin, V.: Evaluation of motility quality in ram sperm by using a novel open - source suite of algorithms. En: Congreso Argentino de Bioingeniería - SABI 2017. , Córdoba, Argentina (2017)

Buzón, A.: Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer, (2013)

Fernández-Gago, R., Domínguez, J., Martínez-Pastor, F.: Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. Theriogenology. 80, 400-410 (2013). https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.003

Ferraz, M.A.M.M., Morató, R., Yeste, M., Arcarons, N., Pena, A.I., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Muiño, R., Mogas, T.: Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm–oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. Theriogenology. 81, 1067-1072 (2014). https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.033

Gárate, D., Medina, R., Incahuanaco, F., Beltrán, C.: A heuristic model for determining the sperm motility grade by video. En: Proceedings - 2015 41st Latin American Computing Conference, CLEI 2015 (2015)

Gárate, D.A.: Modelo heurístico para la determinación de la motilidad en células espermáticas mediante el análisis automático de tracking en video, (2015)

Garcia-Vallvé, S., Puigbò, P.: DendroUPGMA: A dendrogram construction utility, http://genomes.urv.es/UPGMA/DendroUPGMA_Tut.pdf

Giaretta, E., Munerato, M., Yeste, M., Galeati, G., Spinaci, M., Tamanini, C., Mari, G., Bucci, D.: Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. Anim. Reprod. Sci. 176, 11-19 (2017). https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.11.003

Goodson, S.G., Zhang, Z., Tsuruta, J.K., Wang, W., O'Brien, D.A.: Classification of Mouse Sperm Motility Patterns Using an Automated Multiclass Support Vector Machines Model1. Biol. Reprod. 84, 1207-1215 (2011). https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088989

Hidayatullah, P., Awaludin, I., Kusumo, R.D., Nuriyadi, M.: Automatic sperm motility measurement. En: 2015 International Conference on Information Technology Systems and Innovation (ICITSI). pp. 1-5. IEEE (2015)

Jati, G., Gunawan, A.A.S., Lestari, S.W., Jatmiko, W., Hilman, M.H.: Multi-sperm tracking using Hungarian Kalman Filter on low frame rate video. En: 2016 International Conference on Advanced Computer Science and Information Systems (ICACSIS). pp. 530-535. IEEE (2016)

Kime, D.E., Van Look, K.J., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F.: Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 130, 425-33 (2001)

Ledesma, A., Zalazar, L., Buchelly Imbachí, F., Pastore, J., Brown, P., Eddy, E., Hozbor, F., Cesari, A.: Recombinant peptide reverses cryo-capacitation in ram sperm and improves in vitro fertilization. Anim. Reprod. Sci. 207, 61-72 (2019). https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.016

Leung, C., Lu, Z., Esfandiari, N., Casper, R.F., Sun, Y.: Detection and tracking of low contrast human sperm tail. Autom. Sci. Eng. (CASE), 2010 IEEE Conf. 263-268 (2010). https://doi.org/10.1109/COASE.2010.5584613

Liu, J., Leung, C., Lu, Z., Sun, Y.: Quantitative analysis of locomotive behavior of human sperm head and tail. IEEE Trans. Biomed. Eng. 60, 390-396 (2013).

https://doi.org/10.1109/TBME.2012.2227319

Mackay, D.J.C.: Information Theory, Inference, and Neural Networks. (2005)

Maroto-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Soler, A., Fernández-Santos, M., Roldan, E., Gomendio, M., Pérez-Guzmán, M., Garde, J.: Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in Ram ejaculates: Intra- and interindividual variation. Theriogenology. 77, 1529-1539 (2012). https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.020

Martínez-Pastor, F., Cabrita, E., Soares, F., Anel, L., Dinis, M.: Multivariate cluster analysis to study motility activation of Solea senegalensis spermatozoa: A model for marine teleosts. Reproduction. 135, 449-459 (2008). https://doi.org/10.1530/REP-07-0376

MICROPTIC: Sperm Class Analyzer® CASA System, https://www.micropticsl.com/products/sperm-class-analyzer-casa-system/

MICROPTIC: SCA® Motility and concentration module, https://www.micropticsl.com/products/sperm-class-analyzer-casa-system/main-modules/sca-motility-concentration/

Mostajer Kheirkhah, F., Sadegh Mohammadi, H.R., Shahverdi, A.: Modified histogram-based segmentation and adaptive distance tracking of sperm cells image sequences. Comput. Methods Programs Biomed. 154, 173-182 (2018). https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2017.11.005

Muiño, R.: Evaluación de la Motilidad y Vialidad del Semen Bovino Mediante el Uso de Sistemas CASA y Citometría de Flujo: Identificación de Subpoblaciones Espermáticas, (2008)

Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Peña, A.I.: Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. Anim. Reprod. Sci. 109, 27-39 (2008). https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.10.007

Pagnuco, I., Pastore, J., Abras, G., Brun, M., Ballarin, V.: Analysis of genetic association in Listeria and Diabetes using Hierarchical Clustering and Silhouette Index. J. Phys. Conf. Ser. 705, (2016). https://doi.org/10.1088/1742-6596/705/1/012002

Quintero-Moreno, A., Miró, J., Teresa Rigau, A., Rodríguez-Gil, J.E.: Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. Theriogenology. 59, 1973-1990 (2003). https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01297-9

Ramón, M., Martínez-Pastor, F., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Soler, A.,

Jiménez-Rabadán, P., Fernández-Santos, M., Bernabéu, R., Garde, J.: Taking advantage of the use of supervised learning methods for characterization of sperm population structure related with freezability in the Iberian red deer. Theriogenology. 77, 1661-1672 (2012). https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.011

Ravanfar, M.R., Moradi, M.H.: Low contrast sperm detection and tracking by Watershed algorithm and Particle filter. En: 2011 18th Iranian Conference of Biomedical Engineering, ICBME 2011. pp. 260-263 (2011)

Rodríguez-Montaña, D., Roa-Guerrero, E.: Objective assessment of bull sperm motility parameters using computer vision algorithms. African J. Biotechnol. 16, 1871-1881 (2017). https://doi.org/10.5897/ajb2017.16122

Rojas, H.A., Rojas, J.A., Zuleta, G.A., Madrigal, C.A.: Extraction of new features for classification of porcine sperm motility. En: STSIVA 2012 - 17th Symposium of Image, Signal Processing, and Artificial Vision. pp. 323-327 (2012)

Rousseeuw, P.: Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. J. Comput. Appl. Math. 20, 53-65 (1987). https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0377-0427(87)90125-7

Santolaria, P., Soler, C., Recreo, P., Carretero, T., Bono, A., Berné, J., Yániz, J.: Morphometric and kinematic sperm subpopulations in the split ejaculate of normozoospermic men. Asian J. Androl. 0, 0 (2016). https://doi.org/10.4103/1008-682x.186874

Serra, J.: Image Analysis and Mathematical Morphology. ACADEMIC PRESS, Orlando, FL, USA (1982)

Shih, F.Y.: Image processing and mathematical morphology. (2009)

Talarczyk-Desole, J., Berger, A., Taszarek-Hauke, G., Hauke, J., Pawelczyk, L., Jedrzejczak, P.: Manual vs. computer-assisted sperm analysis: Can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice? Ginekol. Pol. 88, 56-60 (2017). https://doi.org/10.5603/GP.a2017.0012

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K.: Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 57, 149-179 (2002). https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1

Wilson-Leedy, J., Ingermann, R.: Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology. 67, 661-672 (2007). https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003

World-Health-Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. (2010)

Xu, R., Wunsch, D.C.: Clustering. (2009)

Yang, H.-F., Descombes, X., Prigent, S., Malandain, G., Druart, X., Plouraboue, F.: Head tracking and flagellum tracing for sperm motility analysis. 2014 IEEE 11th Int. Symp. Biomed. Imaging. 310-313 (2014). https://doi.org/10.1109/ISBI.2014.6867871

Zalazar, L., Buchelly Imbachí, F., Greco, M., López, A., Radonic, M., Pastore, J., Aristizabal, E., Cesari, A., Ballarin, V.: Preliminary semen sample management from Paralichthys Orbignyanus for sperm motility objective analysis by using a novel open-source suite of algorithms. En: Medicina Supl. I. , Buenos Aires, Argentina (2017)

Capítulo 7. Otras aplicaciones

En el capítulo anterior, se aplicó el método de seguimiento propuesto en el Capítulo 5 al análisis de motilidad espermática en semen de diferentes especies, y se evaluó su desempeño mediante diferentes medidas. Para esa aplicación, la representación de forma utilizada para el seguimiento de las células fue la de puntos. De esta forma, los vectores de estado se constituyeron por parámetros que definen la posición y la velocidad de cada objeto y la asociación se realizó mediante minimización de la distancia y del cambio de velocidad.

En el presente capítulo se presentan dos diferentes tipos de objetos en movimiento en secuencias de video adquiridas por microscopía, que se representan mediante formas geométricas en lugar de un único punto. El primer tipo consiste en bacterias que se modelan mediante elipses, las cuales pueden trasladarse y rotar sobre su eje, y se observan por microscopía de contraste de fase. En el segundo caso se analiza el desprendimiento de burbujas de hidrógeno circulares, que pueden desplazarse y aumentar su tamaño. En ambos casos se describen las variables que caracterizan el estado de cada objeto con el fin de llevar a cabo su seguimiento.

Por otra parte, los métodos de predicción utilizados en cada una de las aplicaciones son diferentes al mecanismo basado en filtros de Kalman, empleado para el seguimiento de células espermáticas. En el caso del movimiento bacteriano, se prescinde de un método de predicción, puesto que sus desplazamientos pueden contener cambios aleatorios de dirección. En el caso del seguimiento de burbujas, se propone el uso de un mecanismo de predicción basado en flujo óptico debido a la tendencia general de movimiento ascendente del conjunto de objetos.

Finalmente, en cada aplicación se utilizaron técnicas de análisis de movimiento con el fin de obtener descriptores de interés, según el contexto particular, y se dan a conocer los resultados obtenidos en cada fase desarrollada.

7.1. Análisis de los movimientos bacterianos

Al igual que las células espermáticas, existen numerosos tipos de bacterias que se pueden observar mediante microscopía de contraste de fase. Los microorganismos analizados están constituidos por un cuerpo con forma aproximadamente elíptica y varios flagelos que usan para su locomoción, pero que no son visibles con el aumento utilizado. Por esta razón, los métodos de detección son similares a los utilizados para la localización de células espermáticas, descritos en el Capítulo 6.

El análisis de la motilidad bacteriana se hizo desde dos enfoques: el primero consiste en el método de *tethering* o de sujetado flagelar en el sustrato, con el fin de evaluar el sentido de giro de cada bacteria (Qian et al. 2013); y el segundo consiste en la evaluación de los desplazamientos de las células libres en diferentes medios para determinar la presencia de intervalos de movimiento, cambios bruscos de dirección y otros patrones de movimiento (Di Salvo 2013). Estos dos ensayos aportan descriptores que se complementan entre sí para obtener información biológica y ambiental de interés, por ejemplo, para analizar la toxicidad de algún medio.

Para el ensayo de sujetado o de rotación flagelar se observaron secuencias de video con bacterias *Escherichia Coli.* Esta bacteria es un organismo modelo que se utiliza para estudiar la motilidad bacteriana y la quimiotaxis. Cada célula puede nadar al rotar sus filamentos flagelares, los cuales se distribuyen por todo su cuerpo (Martinko et al. 2004). El ensayo de rotación flagelar es un método ampliamente utilizado para analizar cambios en la motilidad bajo diferentes condiciones del ambiente (Qian et al. 2013). Para esto, un operador tiene que observar cientos de células individuales y debe asignarles una categoría de entre 5 posibles según sus patrones de movimiento de rotación, de manera repetida para cada condición experimental. Así, esta técnica manual requiere mucho tiempo para su realización y el análisis de muchos datos puede estar sujeto a errores de percepción subjetiva. En contraste, la aplicación del método de seguimiento propuesto y algunas técnicas de análisis de movimiento permiten la automatización de este ensayo y la reducción de la variabilidad inter observador (Buchelly Imbachí et al. 2016c).

Por otra parte, se estudiaron secuencias de imágenes que muestran los desplazamientos libres de bacterias *Halomonas*. Los movimientos realizados por estos microorganismos pueden presentar diferentes eventos como: intervalos de desplazamientos rectilíneos o curvos, oscilaciones, cambios bruscos de dirección, entre otros, dependiendo del medio circundante (Hook et al. 2019; Di Salvo 2013). De esta manera, se analizaron las trayectorias obtenidas con el método de seguimiento propuesto y se obtuvieron descriptores de velocidad, oscilación y de dirección de movimiento. Finalmente, se aplicaron técnicas de *clustering* para la identificación de patrones de movimiento en las muestras bacterianas.

A continuación, se describen los métodos utilizados en cada uno de los casos de éxito descritos y algunos resultados que generaron un impacto positivo en los contextos biológicos de estudio. Esta aplicación se realizó en conjunto entre el Laboratorio de Procesamiento Digital de Imágenes y el Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

7.1.1. Detección y representación de los cuerpos bacterianos

Como ya se mencionó, el método de detección para las bacterias analizadas es similar al utilizado para espermatozoides, descrito en el Capítulo 6. De esta manera, se transforma cada cuadro de la secuencia de video a escala de grises. Los cuerpos bacterianos son realzados mediante transformaciones Top-Hat por cierre para células más oscuras, o por apertura, para

células más brillantes que el fondo, según el tipo de contraste utilizado en el microscopio. A partir de la imagen resultado, se obtiene una imagen binaria mediante la aplicación de un umbral uniforme. Finalmente se aplican filtros morfológicos y se obtienen las mediciones o características de cada bacteria para el seguimiento (Buchelly Imbachí et al. 2016c). En la Figura 7.1 se ilustran los pasos del algoritmo empleado.

La representación de las bacterias como elipses, ilustrada en la Figura 7.1, permite llevar a cabo el seguimiento de la posición y de la orientación de sus cuerpos. De esta forma, los parámetros generales a considerar en los vectores de estado estarán compuestos por las coordenadas del centroide de la bacteria, la longitud del eje mayor de la elipse y las componentes de un vector unitario que indican la orientación del cuerpo:

$$X = [x, y, a, u_x, u_y]^T \qquad 7.1$$

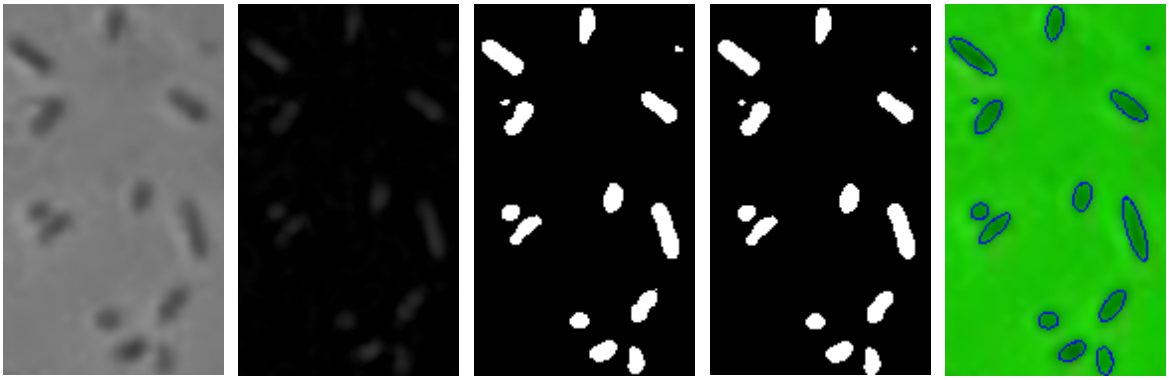


Figura 7.1. Detección y representación de cuerpos bacterianos en imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fase. (a) Imagen original en escala de grises, (b) Operaciones de morfología matemática para el realce de las células, (c) Binarización, (d) Filtrado morfológico, (e) Representación mediante elipses. Fuente: Imagen propia.

7.1.2. Ensayo de rotación flagelar

Las células *E. Coli* nadan al rotar sus filamentos flagelares, los cuales se distribuyen a lo largo de su cuerpo. Cada flagelo tiene un motor rotativo en su base que puede hacer girar al flagelo en ambas direcciones: al girar en sentido contrario a las manecillas del reloj (CCW, en inglés) los flagelos forman un grupo coherente que impulsa a la célula hacia adelante, mientras que el giro en sentido de las manecillas del reloj (CW, en inglés) interrumpe la coherencia entre flagelos y la célula se reorienta en una nueva dirección al azar para realizar otro desplazamiento (Manson 1990; Di Salvo 2013).

El ensayo de rotación flagelar es un método ampliamente utilizado para analizar cambios en la motilidad bajo diferentes condiciones ambientales utilizando un sustrato, generalmente vidrio, de manera tal que al menos un flagelo de las células se adhieran al sustrato, con lo cual se evitan los movimientos de traslación para estudiar el comportamiento rotacional de la bacteria (Qian et al. 2013). Para este ensayo, un experto, generalmente un biólogo, debe observar cientos de individuos durante 15 segundos y asignarles una de las siguientes 5 categorías, de manera cualitativa teniendo en cuenta: si gira completamente en sentido anti horario (100% CCW), si gira mayoritariamente en sentido anti horario (CCW), si gira aproximadamente la misma cantidad de tiempo en ambos sentidos (50% CCW – 50% CW), si gira mayoritariamente en sentido horario (CW) o gira completamente en sentido horario (100% CW). Este procedimiento se repite para cada muestra. Por tratarse de un análisis manual involucra una gran subjetividad además del alto tiempo demandado.

Con la aplicación del método de seguimiento propuesto se obtienen las trayectorias de los centroides y la evolución de la orientación de los cuerpos bacterianos (Buchelly Imbachí et al. 2016c). Desde el punto de vista biológico, el parámetro más importante para estudiar en el seguimiento es la evolución de la orientación del cuerpo bacteriano. Para este análisis no es necesario parametrizar el tamaño de las partículas dado que las bacterias se mueven en el mismo plano de profundidad, sin ocasionar una variación aparente del tamaño de la bacteria en la representación de la imagen.

En la presente aplicación se prescinde de mecanismo de predicción, en vista de los movimientos a estudiar. Por una parte, la correspondencia temporal se realiza eficientemente porque los centroides no se desvían significativamente del punto en el cual se sujetan los flagelos al sustrato. Por otro lado, los cambios de dirección de giro pueden realizarse repentinamente. De esta forma, la búsqueda de los candidatos para asociar se hace con las posiciones en el instante inmediato anterior.

A continuación, se describen los parámetros utilizados para el método de seguimiento:

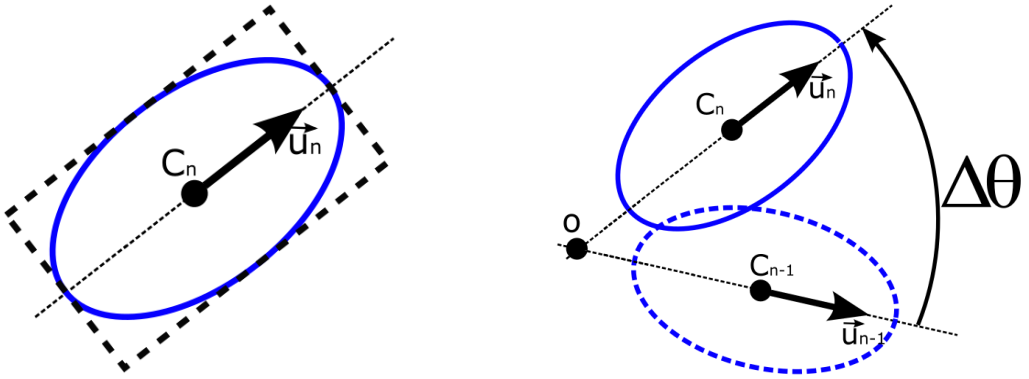
- El radio inicial de búsqueda R_{inicio} se estableció en un valor constante para cada video, debido a que las bacterias giran en torno a un punto. Este valor no supera el triple del radio del elemento estructurante utilizado R_e (establecido empíricamente).

Teniendo en cuenta que las células se fijan al sustrato, las oclusiones no representaron una dificultad en este contexto. Por esta razón, los otros parámetros quedan preestablecidos:

- Desplazamientos a promediar para el incremento del radio de búsqueda $K = 1$.
- Penalizaciones para el tiempo de espera: $p_1 = 1$ y $p_2 = 2$.
- La cantidad máxima de oportunidades para esperar la reaparición $O_{max} = 6$.
- El factor de ponderación para la actualización del estado se establece en $\beta = 0.9$.

Finalmente, el análisis de movimiento se realizó de manera *offline* y consiste en determinar los siguientes parámetros:

- **La fracción de tiempo en la cual la bacteria gira en cada sentido o permanece en reposo**, a partir de los desplazamientos angulares del cuerpo bacteriano. El procedimiento para calcular el desplazamiento angular del cuerpo de la bacteria entre cuadros consecutivos se ilustra en la Figura 7.2 y se describe a continuación:



(a) (b)

Figura 7.2. Determinación de la inclinación y el desplazamiento angular de un cuerpo bacteriano en el ensayo de rotación flagelar. En (a) se muestra el rectángulo de menor área que contiene a la bacteria. En (b) se ilustra el procedimiento para determinar el ángulo de giro respecto a la intersección de sus vectores de orientación en cuadros consecutivos. Fuente: imagen propia.

Paso 1: Determinar el rectángulo de mínima área que contenga el cuerpo de la bacteria.

Paso 2: Encontrar el punto de intersección O de la línea recta que pasa por el centroide actual de la bacteria $C_n = (x_n, y_n)$ y tiene vector de dirección $\vec{u}_n = (u_{x_n}, u_{y_n})$, con la linea recta que pasa por el centroide C_{n-1} y tiene vector de dirección $\vec{u}_{n-1}$. Con esto se satisface la condición:

$$\mathrm{C_{n-1}} + \mathrm{a}\,\vec{\mathrm{u}}_{\mathrm{n-1}} = \mathrm{C_n} + \mathrm{b}\,\vec{\mathrm{u}}_{\mathrm{n}} \qquad 7.2$$

En la Ecuación 7.2, a y b son valores que deben determinarse para encontrar el punto de intersección O.

Paso 3: Calcular el desplazamiento angular $\Delta\theta$ desde la orientación inicial $\overrightarrow{OC}_{n-1}$ hasta la orientación final $\overrightarrow{OC}_n$ mediante la Ecuación 7.3:

$$|\Delta\theta| = \sin^{-1}\left(\frac{\left\|\overrightarrow{OC}_{n-1} \times \overrightarrow{OC}_n\right\|}{\left\|\overrightarrow{OC}_{n-1}\right\| . \left\|\overrightarrow{OC}_n\right\|}\right) \quad 7.3$$

Y el sentido de giro se determina mediante el signo del vector $\overrightarrow{OC}_{n-1} \times \overrightarrow{OC}_n$.

- **El porcentaje de actividad de la muestra**, correspondiente al porcentaje de células mótiles sobre el total de células. Este porcentaje se obtiene al aplicar un umbral al promedio de los valores absolutos de velocidad angular, los cuales se determinaron cuadro a cuadro con el procedimiento anterior.

7.1.3. Análisis del movimiento de traslación

En estos experimentos, se observaron los desplazamientos de bacterias *Halomonas*. Así, en las secuencias de imágenes se podrían observar movimientos que constan de: corridas, tumbos, frenados, reorientaciones, entre otros patrones de los cuales aún no se tiene un amplio conocimiento (Herrera 2019). Al variar la composición química del medio circundante, las características de dichos patrones de movimiento se ven alteradas, por lo cual se pueden utilizar los resultados del análisis de motilidad bacteriana como indicador ambiental (Hook et al. 2019; Nisenbaum et al. 2016).

Para la aplicación de los métodos que se describen en esta sección, debe mencionarse que la detección se realizó mediante operación lógica entre siluetas de objetos más brillantes y objetos más oscuros que el fondo. Esto se hizo en vista de los frecuentes cambios de profundidad de las bacterias al desplazarse, en contraste con el ensayo de rotación flagelar.

Dadas las características de concentración de las muestras y de los diferentes patrones de movimiento que pueden observarse en una secuencia de imágenes, es importante configurar adecuadamente los métodos de seguimiento. En esta aplicación se prescindió de un mecanismo de predicción debido a los cambios bruscos que pueden darse cuando ocurren tumbos, frenados o retrocesos. Para los métodos de asociación y tratamiento de las oclusiones se establecieron los siguientes parámetros de forma empírica:

- El radio inicial de búsqueda R_{inicio} se estableció en un valor igual al triple del radio del elemento estructurante para la detección R_e.

- Desplazamientos a promediar para el incremento del radio de búsqueda $K = 1$.

- Penalizaciones para el tiempo de espera: $p_1 = 1$ y $p_2 = 2$.

- La cantidad máxima de oportunidades para esperar la reaparición $O_{max} = 6$.

- El factor de ponderación para la actualización del estado se establece en $\beta = 1$.

Tras obtener las trayectorias de las células con el método de movimiento, se obtuvieron los siguientes parámetros cinemáticos de manera *offline*:

- Velocidad promedio de la bacteria (V): Se utiliza la Ecuación 6.6 para determinar la velocidad curvilínea, como se hizo para células espermáticas.

- Linealidad de la trayectoria (L): Se utiliza la Ecuación 6.8 para determinar el porcentaje de linealidad de la trayectoria, como se hizo para células espermáticas.

- Frecuencia de reorientación (R): Tasa de ocurrencia de reorientaciones N_R del movimiento bacteriano en el tiempo evaluado (T):

$$\mathrm{R} = \frac{N_R}{\mathrm{T}} \qquad 7.4$$

- Tiempo que tarda la bacteria en reposo o realizar una reorientación (T_R) antes de continuar desplazándose.

- Ángulo promedio de reorientación (θ_R). giro o desplazamiento angular realizado luego de detenerse la bacteria para reorientar su movimiento.

- Distancia promedio entre reorientaciones (D_s). Es la longitud de arco promedio de los segmentos de trayectoria entre dos reorientaciones sucesivas.

- Tiempo promedio que tarda la bacteria en recorrer un segmento de trayectoria (T_s) entre dos reorientaciones consecutivas.

- Amplitud de oscilación en la trayectoria (A_o): se calcula mediante la Ecuación 6.13, como se describió para células espermáticas.

- Frecuencia de oscilación predominante en la trayectoria (F_o): calculada mediante la Ecuación 6.14, como se hizo para células espermáticas.

Con el fin de evaluar si existen subpoblaciones bacterianas diferenciadas por sus características de motilidad, se aplicó el método de agrupamiento jerárquico descrito en la sección 6.5.2 a la matriz de datos obtenida para cada muestra.

7.1.4. Resultados

En ensayo de rotación flagelar se llevó a cabo la automatización del seguimiento y de la obtención de estadísticas relacionadas con el porcentaje de tiempo en el cual cada bacteria rota sobre su eje en sentido horario, anti horario o permanece en reposo. En esta prueba se analizaron cuatro muestras con 71, 67, 93 y 57 células respectivamente, y también la totalidad de las células (288 bacterias). Se identificó el porcentaje de actividad de las cinco muestras, como se indica en la Figura 7.3. Para clasificar una célula como estática o móvil se utilizó el umbral de 3 grados como mínimo ángulo promedio de giro, el cual se estableció de forma empírica y corresponde al ángulo en el cual no se aprecian giros entre dos cuadros consecutivos.

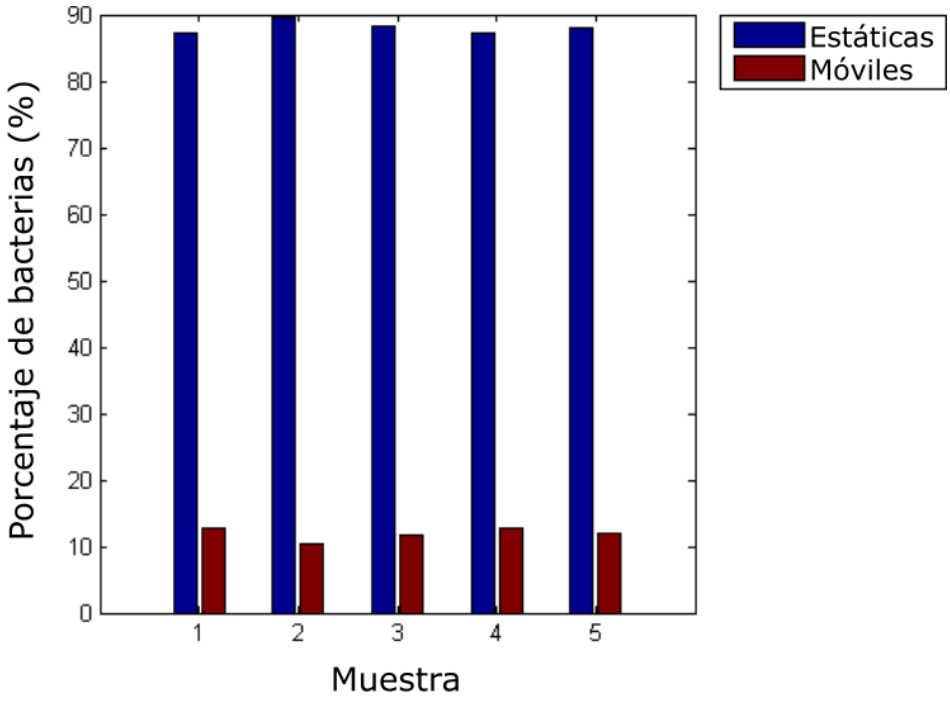


Figura 7.3. Porcentaje de actividad de muestras con bacterias *E. Coli* en el ensayo de rotación flagelar. En los 5 casos, el porcentaje de células mótiles es cercano al 11%. Fuente: imagen propia.

Las células móviles de todas las muestras tienen las características de movimiento angular que se describen en la Tabla 7.1. En ella se organizan las células según su velocidad angular, de la más rápida a la más lenta.

Por otra parte, se realizó el análisis de movimiento de traslación de bacterias *Halomonas* en diferentes condiciones ambientales. Para cada célula se calculan los 9 descriptores de movimiento mencionados en la sección 7.1.3, a partir de la trayectoria obtenida mediante el método de seguimiento.

Tabla 7.1. Descriptores de movimiento rotacional para las 32 células móviles de la muestra.

Ángulo promedio |Δθ|	Giro CW (%)	Giro CCW (%)	Reposo (%)
40,37	87,58	11,74	0,67
23,00	72,15	21,81	6,04
22,53	53,69	36,91	9,40
21,92	33,22	57,38	9,40
15,37	37,58	43,29	19,13
14,38	49,33	27,85	22,82
13,82	49,66	29,53	20,81
13,13	46,64	34,56	18,79
12,18	37,92	31,21	30,87
11,29	33,89	31,21	34,90
10,91	31,21	35,57	33,22
9,15	23,49	30,87	45,64
6,62	28,19	26,51	45,30
5,79	34,90	23,83	41,28
5,77	17,59	34,83	47,59
4,97	26,51	24,50	48,99
4,91	23,69	29,97	46,34
4,48	22,48	28,19	49,33
4,37	20,13	16,44	63,42
4,29	30,87	27,52	41,61
4,25	8,05	18,79	73,15
4,19	9,40	34,90	55,70
4,19	12,15	15,63	72,22
4,06	14,09	26,17	59,73
3,63	33,56	28,86	37,58
3,48	12,00	18,55	69,45
3,40	16,33	24,90	58,78
3,39	16,44	24,50	59,06
3,38	33,89	29,19	36,91
3,30	14,43	22,15	63,42
3,19	11,41	10,07	78,52
3,08	18,79	15,77	65,44

Las muestras analizadas tienen las características que se mencionan a continuación:

- 2 muestras de bacterias del cultivo sin ningún agregado (original), nadando en el medio en el que crecieron.

- 2 muestras de control, es decir, son células en condiciones como las anteriores, pero con agregado de 1 microlitro del medio de cultivo sin atrayentes ni repelentes.

- 2 muestras del cultivo original con agregado de Benzoato (compuesto al cual responden las células en los ensayos de quimiotaxis) con concentración final 14 mM.

- 2 muestras del cultivo original con agregado de Benzoato hasta alcanzar la concentración final de 70 mM.

- 2 muestras del cultivo original con agregado de Benzoato hasta alcanzar la concentración final de 140 mM.

- 2 muestras del cultivo original con agregado de Succinato, concentración de 14 mM.

- 2 muestras del cultivo original con agregado de Hierro, con concentración final de 0.07%.

Como puede apreciarse, el objetivo biológico de los estudios de los desplazamientos bacterianos consiste en determinar diferencias en la movilidad como respuesta a los cambios de concentración y de tipo de compuestos agregados para ensayos de quimiotaxis. Una visión general de estos resultados muestra que el uso de agregados modifica significativamente los rangos de los parámetros cinemáticos. En la Tabla 7.2 se exponen los valores promedio y las desviaciones estándar de los parámetros cinemáticos para algunas de las muestras analizadas. Se muestra, por ejemplo, que el uso de Benzoato estimula el incremento de la velocidad de nado de las células, el aumento de la linealidad de sus trayectorias, reduce la amplitud y aumenta la frecuencia de las oscilaciones, en contraste con los resultados obtenidos para las muestras control H1, para las cuales ocurre lo contrario.

Tabla 7.2. Media y desviación estándar de las características cinemáticas para algunas muestras bacterianas con diferentes agregados.

Característica		**Muestra**		
		Control sin agregado	**Control H1**	**Benzoato 14 mM**
V	**Media**	**31,9454**	**17,9552**	**45,1210**
	Desv.	27,9654	26,2228	23,7036
L	**Media**	**49,2809**	**23,1282**	**77,5215**
	Desv.	40,3879	36,6060	35,7824
R	**Media**	**0,1993**	**0,0785**	**0,0656**
	Desv.	0,5466	0,3061	0,2380
T_R	**Media**	**0,0108**	**0,0056**	**0,0024**
	Desv.	0,0487	0,0365	0,0168
θ_R	**Media**	**3,5994**	**1,6975**	**0,1440**
	Desv.	14,7926	12,3438	1,1787
D_s	**Media**	**1,2222**	**0,0146**	**1,1197**
	Desv.	8,3747	0,1330	9,0060
T_s	**Media**	**0,0431**	**0,0076**	**0,0319**
	Desv.	0,2517	0,0602	0,2185
A_o	**Media**	**1,0431**	**0,8162**	**0,6922**
	Desv.	0,5459	0,6727	0,4329
F_o	**Media**	**8,3870**	**4,3537**	**11,7444**
	Desv.	5,8362	4,7383	5,0294

Un hecho particular presente en todas las muestras analizadas es la obtención de desviaciones estándar del mismo orden o mayores a los valores promedio de varios parámetros, como se observa en la Tabla 7.2. Se conoce de la estadística que, si la desviación estándar es más grande que la media, esto probablemente indica un sesgo, es decir, la presencia de valores extremos u otra peculiaridad en la forma de la distribución (Camacho 2009). En efecto, las muestras analizadas presentan una distribución de los parámetros que no es normal y tampoco unimodal. Para el caso de la velocidad promedio, la distribución obtenida es, en principio, bimodal en vista de los valores de velocidad cercanos a cero que corresponden a valores extremos con una alta probabilidad de ocurrencia, y los demás valores que corresponden a la distribución de velocidades de las células móviles.

Como información complementaria, se realizó el agrupamiento de las trayectorias usando todos los parámetros cinemáticos. El criterio utilizado para dividir las muestras con ayuda del dendrograma consiste en la maximización del Índice de Silhouette, como se hizo en el Capítulo 6. La aplicación del método de agrupamiento a las matrices de datos de las muestras analizadas evidencia de manera preliminar la generación de subpoblaciones bacterianas cuando se utilizan agregados. En cada una de las muestras analizadas, uno de los grupos identificados corresponde a las células estáticas, lo cual confirma la presencia de valores extremos que generan el sesgo en la distribución estadística de dichas células, como se expresó anteriormente. A continuación, se mencionan los Índices de Silhouette promedio obtenidos para las muestras mencionadas en la Tabla 7.2:

- Muestras de control sin agregado: el máximo valor fue de 0,68 con 3 grupos.
- Muestras de control H1: el máximo valor fue de 0,82 con 3 grupos.
- Muestras con Benzoato 14 mM: el máximo valor fue de 0,73 con 5 grupos.

La presente aplicación surgió por colaboración entre el Laboratorio de Procesamiento Digital de Imágenes y el Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Nacional de Mar del Plata mediante un proyecto PICT (Herrera 2019). Este proyecto se encuentra en un estadio preliminar, por tal razón los resultados aún no han sido validados por parte de biólogos expertos. En la actualidad se desarrollan investigaciones sobre el movimiento de *Halomonas* y sus mutaciones, y se desconocen muchos aspectos sobre el comportamiento de estas bacterias. De esta forma, los métodos propuestos se pueden utilizar como herramienta para dar soporte a dichas investigaciones.

7.1.5. Conclusiones para esta aplicación

En esta aplicación complementaria se mostró el uso del método de seguimiento propuesto en el Capítulo 5 para la obtención de las trayectorias de algunas especies de bacterias. Estos organismos unicelulares presentan diferentes patrones de movimiento de alto interés para la investigación en diferentes áreas de la bioingeniería y la biología en general. Para cada uno

de los ensayos descritos se utilizó una bacteria específica como modelo; sin embargo, su uso puede extenderse a otras especies.

Por una parte, se presentó un método para cuantificar la rotación flagelar en secuencias de imágenes de bacterias *E. Coli*. La metodología propuesta permite obtener resultados precisos y rápidos al determinar el sentido de giro de muchos cuerpos bacterianos en contraste con la forma manual. Como indicador estadístico se calcula el porcentaje de tiempo que permanece la bacteria girando en cada sentido o en reposo. El método propuesto es totalmente automático, por lo tanto, mejora significativamente la velocidad de procesamiento y la precisión respecto al método manual. De esta forma, se elimina la subjetividad en la obtención de la estadística final, puesto que el ojo humano no puede determinar intervalos cortos en los cuales la bacteria descansa antes de cambiar de sentido de giro, que en suma constituyen un porcentaje importante del tiempo.

Por otro lado, mediante el estudio de los desplazamientos libres de bacterias *Halomonas* se midieron diferentes características cinemáticas a partir de la trayectoria de cada célula. Se calcularon descriptores de velocidad, linealidad, cambios de dirección y oscilación. Tales descriptores permitieron diferenciar los comportamientos de esta especie de bacteria al estar expuesta a diferentes ambientes químicos. Adicionalmente, se aplicó el método de agrupamiento jerárquico descrito en el capítulo anterior y se concluye que los distintos agregados promueven la formación de subpoblaciones de bacterias según sus características de movimiento. De esta forma, los resultados obtenidos permiten afirmar que los métodos propuestos constituyen una herramienta útil para llevar a cabo análisis biológicos en distintas áreas de investigación.

7.2. Estudio de la degradación de aleaciones de magnesio

El método de seguimiento propuesto en el Capítulo 5 puede utilizarse en distintos ámbitos de la ingeniería biomédica, y no únicamente en el estudio de la motilidad de organismos unicelulares. De esta forma, se aplicó el método al estudio de biomateriales, con el fin de analizar la dinámica de la superficie en una aleación que se somete a una reacción química por medio de secuencias de imágenes. Esta reacción produce burbujas de hidrógeno que se siguen cuadro a cuadro, y se estima la tasa de degradación instantánea del material a partir de las variaciones del volumen de gas generado, tal como se describe a continuación.

Algunas aleaciones de magnesio proporcionan ventajas potenciales como materiales biodegradables para la osteosíntesis, porque presentan una alta biocompatibilidad y una estabilidad primaria alta, lo cual evita el fenómeno *stress shielding* o reducción de la densidad ósea debida al uso de implantes (Zhuang et al. 2016). El principal interés para el uso de estas aleaciones es su habilidad para biodegradarse y la capacidad funcional de los productos de la degradación para influenciar la osteoconductividad y la osteogénesis.

Para poder utilizar estas aleaciones como biomateriales se requiere de un control adecuado de la tasa de corrosión, en la cual la degradación acompañe la formación de tejido óseo ya

que se espera que el material mantenga sus propiedades mecánicas hasta cumplir completamente con su función y luego se degrade en el cuerpo. El magnesio y sus aleaciones muestran una buena resistencia a la corrosión en ausencia de agua. Sólo una capa delgada de óxido de Magnesio (MgO) crece en contacto con el aire. Pero cuando el agua está presente, una reacción rápida y espontánea con el óxido genera hidróxido de magnesio ($Mg(OH)_2$) y libera sus iones en solución (Esmaily et al. 2017).

Para llevar a cabo tal control de la degradación del magnesio, se pueden hacer cambios en la metalurgia, microestructura o realizar tratamientos en la superficie. Sin embargo, aún persisten retos importantes para los biomateriales, debidos a la inflamación aguda producida por la liberación de hidrógeno gaseoso durante la reacción (Heublein 2003). Una de las estrategias para la modificación de la superficie y para inhibir la corrosión es a través de los tratamientos mediante anodizado. En estos tratamientos, se han desarrollado y perfeccionado capas pasivas para usar en implantología, y se espera que la generación de las capas en un medio básico genere una barrera parcial para la degradación del magnesio y limite la generación de hidrógeno, con el fin de mejorar su respuesta bioactiva (Blawert et al. 2006; Cere et al. 2016). En particular, un trabajo previo en el marco de esta tesis (Gomez et al. 2018) mostró que el proceso de anodizado reduce la corrosión superficial en los estados iniciales de inmersión en fluido corporal simulado (SBF, en inglés) y favorece la formación de algunos compuestos importantes para la biocompatibilidad de los implantes.

Para los implantes temporarios, se debe estimar el tiempo de vida en servicio y los tiempos de fijación temprana. De esta forma, debe llevarse a cabo la medición de la tasa de degradación de los metales. Para las aleaciones de magnesio, las evaluaciones típicas de la evolución de la generación de hidrógeno se relacionan con el cálculo experimental de los cambios en la presión de gas liberado (Song y Atrens 2003). Esta medida está influenciada por diferentes errores que ocurren durante los procesos que tienen lugar durante el procedimiento. Esto se debe a que la mayoría de dichos procesos requieren ajustes manuales y éstos no son muy precisos.

Dada la necesidad de caracterizar dichos materiales, las técnicas de procesamiento digital de imágenes se presentan como una herramienta alternativa y prometedora para evaluar la liberación del hidrógeno de la superficie metálica en secuencias de video, cuadro a cuadro, como se mencionó en el trabajo previo (Gomez et al. 2018). Sin embargo, existen algunas limitaciones para la detección de las burbujas de hidrógeno cuando ellas crecen o se mueven sobre la superficie metálica, tales como: reflexiones en las superficies, áreas brillantes y con sombras, transparencia de las sustancias, etc. Algunos trabajos relacionados (Nand et al. 2014; Tan et al. 2017) utilizan métodos de segmentación para detectar irregularidades como ampollas o rasguños, asumiendo que la superficie metálica debe ser lisa.

La técnica de detección de burbujas desarrollada (sección 7.2.1) puede lidiar parcialmente con algunos defectos de la superficie metálica, puesto que los tratamientos de pulido y anodizado no aseguran que la superficie se vea completamente lisa en un microscopio óptico. De esta forma, se captura una secuencia de video a partir de la inmersión de la pieza metálica y se contabiliza el volumen de todas las burbujas que se generan en una región de interés

mediante la aplicación del método de seguimiento propuesto (sección 7.2.2). Como resultado se obtiene la evolución de la cantidad de gas producido por dicha región (sección 7.2.3), la cual sirve como indicador de la tasa de degradación de la superficie metálica. Los resultados (sección 7.2.4) permiten comparar las diferencias en la cantidad de gas producido por superficies metálicas con tratamientos superficiales y sin tratamiento.

Esta aplicación se desarrolló entre el Laboratorio de Procesamiento Digital de Imágenes y la División de Electroquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

7.2.1. Preparación de las muestras y adquisición de las secuencias de video

En este trabajo, se utilizaron piezas de aleación de magnesio AZ91 como material degradable. Su composición consta de 9% de aluminio en peso, 1% de circonio y el balance es magnesio. Se evaluaron 8 muestras, de las cuales 4 fueron tratadas mediante anodizado y cuatro se mantuvieron sin tratamiento. Cada muestra consiste en una pieza rectangular de dimensiones: 50 mm x 10 mm x 5 mm. Para el proceso de anodizado, primero se pulió cada muestra con papel de lija número 1000. Luego se sumergieron en una solución de KOH a 5 mol/L de concentración y se aplicó un voltaje constante de 3 V durante 40 minutos. Finalmente, las muestras se dejaron secar antes de ser usadas.

Para su análisis, cada pieza se sostuvo con un soporte universal en dirección vertical dentro de un contenedor vacío de vidrio. Luego, el operario llenó el recipiente con fluido corporal simulado (Kokubo et al. 1990), y se inició la captura del video. Se dispuso una cámara digital para microscopía (Andonstar 2019) con su eje óptico horizontal y se adquirió cada video con una tasa de 30 cuadros por segundo. Se utilizó una fuente de iluminación fija alrededor de la cámara para asegurar una distribución de intensidad luminosa aproximadamente uniforme y que permita una buena detección de las burbujas. La captura finalizó cuando no se observaron cambios considerables, según la muestra (~1 min para superficies anodizadas y ~3 min para superficies sin tratar).

7.2.2. Detección y representación de las burbujas de hidrógeno

Debido a las características de las secuencias de video adquiridas mediante una cámara de microscopía óptica, la detección de las burbujas se llevó a cabo como se menciona a continuación (Buchelly Imbachí et al. 2020a):

- **Paso 1: Conversión a escala de grises**. Cada cuadro se transforma a escala de grises debido a que la información de color no es relevante para la detección (Figura 7.3 a).

- **Paso 2: Realce de las burbujas.** El sistema de iluminación produce una sombra dentro de cada burbuja. La sustracción entre la imagen en escala de grises y una imagen suavizada realza tales sombras circulares (Figura 7.3 b). Se utilizó un kernel

Gaussiano cuadrado (OpenCV 2019b) para obtener la imagen suavizada, el cual tiene 101 píxeles de ancho y 25 píxeles de desviación estándar.

- **Paso 3: Umbral adaptativo.** Se aplicó un método estándar de umbral adaptativo (OpenCV 2019b) mediante una ventana Gaussiana cuadrada (49 píxeles de ancho y 7.7 píxeles de desviación estándar) con el fin de obtener una imagen binaria con la segmentación de las sombras de las burbujas (Figura 7.3 c).

- **Paso 4: Filtrado morfológico.** Se aplicaron filtros morfológicos para imágenes binarias (Shih 2009) luego de aplicar el umbral: primero una apertura removió ruido y luego un cierre juntó regiones correspondientes al mismo objeto (Figura 7.3 d). El elemento estructurante utilizado fue una cruz (kernel de 3x3).

- **Paso 5: Estimación de los centroides y del radio.** Para cada objeto binario i, se determinaron los momentos espaciales del contorno (Bigun 2006) y se calculó el centroide del objeto. Posteriormente se obtuvo el radio r_i para cada objeto como el promedio entre dos distancias: la distancia promedio y la máxima distancia entre cada punto del contorno y el centroide. En la Figura 7.3 e se muestra un ejemplo de la representación de las burbujas detectadas mediante círculos.

La representación de las burbujas como círculos ilustrada en la Figura 7.3 permite llevar a cabo el seguimiento de la posición y del tamaño de las mismas. De esta forma, los parámetros generales a considerar en los vectores de estado estarán compuestos por las coordenadas del centroide y el radio de la circunferencia:

$$X = [x, y, r]^T \qquad 7.5$$

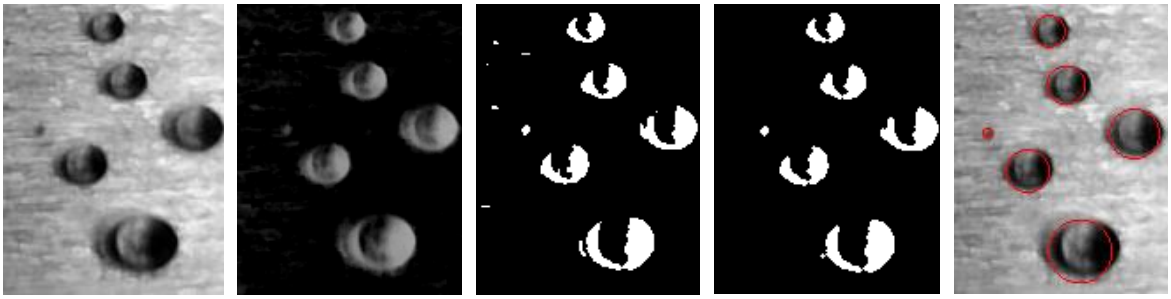


Figura 7.3. Detección y representación de burbujas de hidrógeno en una aleación de magnesio inmersa en fluido corporal simulado. (a) Imagen adquirida en niveles de gris, (b) Realce de las burbujas, (c) Umbral adaptativo, (d) Filtrado morfológico y eliminación de ruido, (e) Aproximación circular de la forma de las burbujas. Fuente: imagen propia.

7.2.3. Seguimiento de las burbujas

La Figura 7.4 ilustra el seguimiento de burbujas para una secuencia de video de una aleación de magnesio tratada con anodizado, inmersa en SBF. En vista de la tendencia general de las burbujas a ascender se propuso un mecanismo de predicción basado en flujo óptico. El mecanismo de predicción propuesto es el siguiente:

- Se calcula el campo de flujo óptico entre la imagen del instante anterior y del instante actual mediante el método de Lukas-Kanade piramidal (Bouguet 2000).

- Se obtiene el vector de flujo óptico promedio $\vec{\bar{v}}_{n-1}$ para toda la región rectangular analizada. Este vector señala la dirección de la tendencia general del movimiento.

- Se determina el vector promedio del flujo óptico $\vec{v}_{n-1}$ en el interior de cada burbuja.

- Se hace la corrección de la dirección del vector de flujo óptico de cada burbuja al encontrar su proyección sobre el vector de flujo promedio:

$$\overrightarrow{v^*}_{n-1} = \frac{\vec{v}_{n-1} . \vec{\bar{v}}_{n-1}}{\left\|\vec{\bar{v}}_{n-1}\right\|^2} \vec{\bar{v}}_{n-1} \qquad 7.6$$

- Se estima el estado actual mediante la Ecuación 5.10: $\vec{\hat{x}}_n = \vec{x}_{n-1} + \overrightarrow{v^*}_{n-1}$.

Por otro lado, la correspondencia temporal se realiza eficientemente porque la búsqueda de candidatos se realiza en un ángulo reducido. No obstante, la frecuencia de adquisición debe permitir que los desplazamientos cuadro a cuadro sean cortos con el fin de evitar errores en el método que calcula el flujo óptico. A continuación, se describen los parámetros de ajuste utilizados para el método de seguimiento:

- El radio inicial de búsqueda R_{inicio} se estableció en un valor fijo de 50 píxeles para todos los videos. El valor es empírico y no varía porque todas las burbujas se detectan con los mismos kernel en el realce y en el umbral adaptativo sin importar su tamaño.

- Desplazamientos a promediar para el incremento del radio de búsqueda $K = 1$.

- Penalizaciones para el tiempo de espera: $p_1 = 1$ y $p_2 = 2$.

- La cantidad máxima de oportunidades para esperar la reaparición $O_{max} = 3$. Se establece en un valor bajo puesto que el movimiento de las burbujas es muy rápido.

- El factor de ponderación para la actualización del estado se establece en $\beta = 1.0$.

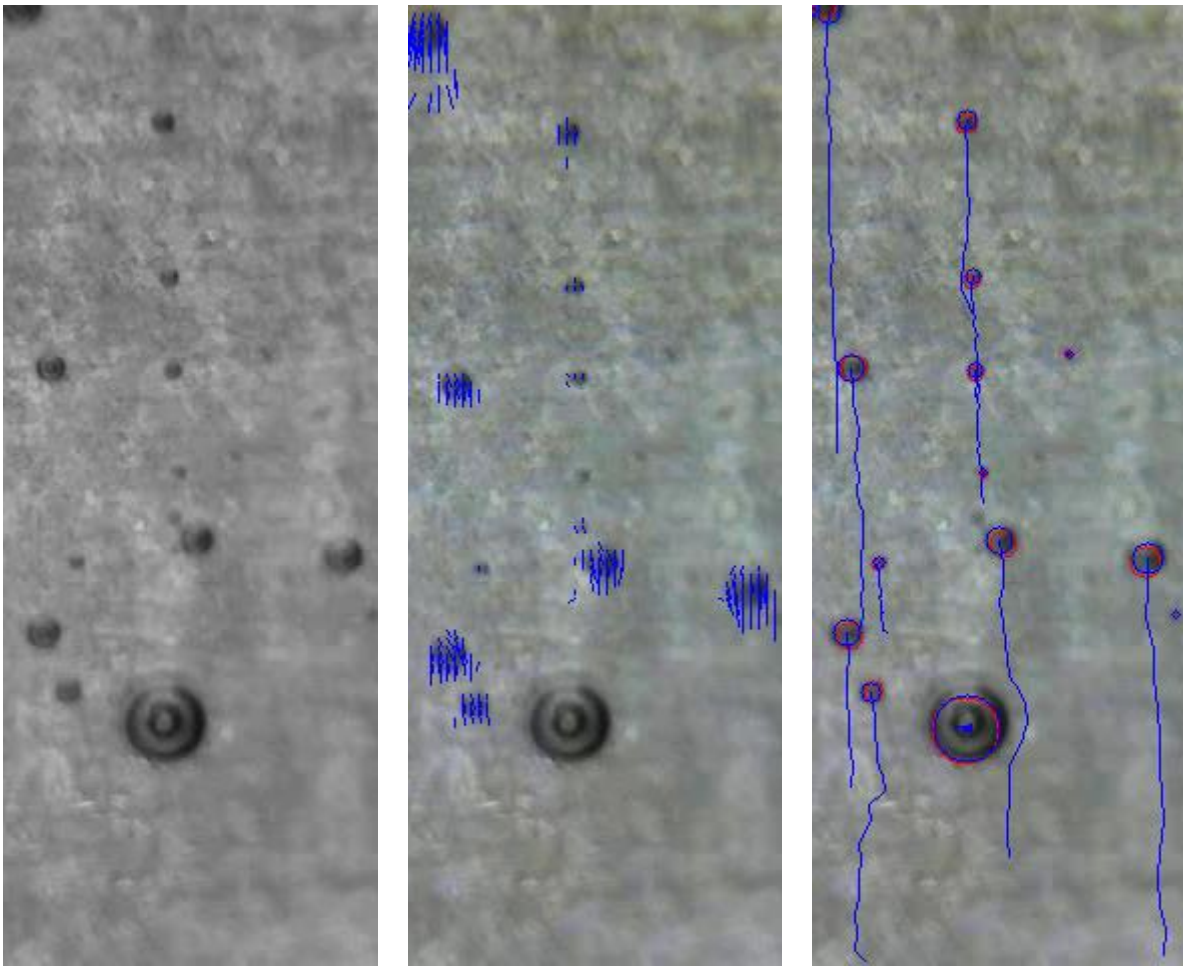


Figura 7.4. Seguimiento de burbujas de hidrógeno producidas por la superficie de una aleación metálica con tratamiento superficial. (a) Imagen adquirida por microscopía óptica en niveles de gris, (b) Líneas de flujo óptico, (c) Trayectoria (líneas azules), localización real (círculos azules) y predicción de la posición actual (círculos rojos) para cada burbuja. Fuente: imagen propia.

De acuerdo con lo anterior, el método de seguimiento propuesto en el Capítulo 5 permite encontrar la trayectoria de las burbujas de hidrógeno generadas en la superficie del material, cuando la aleación es tratada mediante algún procesamiento superficial como el anodizado. Bajo esta condición, la tasa de desprendimiento de dicho gas es baja respecto a las muestras no tratadas, como lo afirman Gomez et al. (Gomez et al. 2018), y el seguimiento se puede realizar de forma eficiente para encontrar los parámetros de interés. Sin embargo, las superficies de las aleaciones no tratadas producen una reacción química de muy alta actividad con el agua o SBF, Por lo tanto, la cantidad de burbujas por cuadro en la secuencia de video bajo esta condición es suficiente para producir falsas asociaciones y no resolver adecuadamente las situaciones de oclusión y reaparición. De esta forma, el análisis de la

evolución de la cantidad de gas generada por la superficie se realiza mediante las aproximaciones que se describen en la siguiente sección.

7.2.4. Cuantificación de la tasa de generación de hidrógeno

El objetivo de esta aplicación consiste en determinar el volumen de hidrógeno producido por la reacción química, lo cual indica la degradación del material. Dicho volumen se obtiene como la sumatoria y la integración en el tiempo de los aportes de gas contenidos en las burbujas que se modelan como esferas. Bajo condiciones de adquisición que permitan realizar de forma adecuada la detección y el seguimiento de las burbujas, el volumen instantáneo generado por una región rectangular de la superficie metálica se puede obtener a partir de la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{\partial V_p}{\partial t} = \frac{\partial V_g}{\partial t} + \frac{\partial V_e}{\partial t} - \frac{\partial V_s}{\partial t} \qquad 7.7$$

En la Ecuación 7.7, relaciona las variables que se describen a continuación:

- V_p corresponde al volumen de gas presente o el volumen que se observa en la región de interés.

- V_g es el volumen de gas generado por la reacción química en la región rectangular analizada. Debe tenerse en cuenta que, al producirse hidrógeno, la burbuja inicia con un tamaño imperceptible y crece hasta alcanzar el tamaño suficiente para desprenderse de la superficie metálica. Luego, la burbuja asciende debido al desbalance en las fuerzas hidrostáticas y abandona la región de interés.

- V_e y V_s corresponden a los volúmenes de entrada y de salida, respectivamente. Así como una burbuja liberada por la región de interés sale de la escena, también otras burbujas que provienen de otras regiones del material a mayor profundidad pueden ingresar y afectan en la medición del volumen presente.

Como se mencionó en la sección anterior, el método de seguimiento se puede aplicar con el fin de obtener los valores instantáneos y acumulados de V_g en el tiempo, siempre y cuando las condiciones de adquisición para el seguimiento sean adecuadas. Esto implica que se pueden analizar las superficies tratadas por su baja tasa de generación de burbujas, pero no las superficies sin tratar. De esta forma, se proponen las siguientes aproximaciones para la medición del volumen de gas liberado (Buchelly Imbachí et al. 2020a):

- Se conoce que la generación de burbujas en la reacción química tiene un comportamiento exponencial decreciente (Buchelly Imbachí et al. 2020a; Gomez et al. 2018). Sin embargo, se observa un descenso significativo en dicha tendencia sólo después de algunos segundos o minutos, según el instante inicial de observación.

Por esta razón, se puede suponer que las tasas de volumen entrante y de volumen saliente de burbujas en una región de poco tamaño son aproximadamente iguales en intervalos muy cortos, como los que ocurren entre cuadro y cuadro, es decir:

$$\frac{\partial V_e}{\partial t} \approx \frac{\partial V_s}{\partial t} \tag{7.8}$$

- Sea v_k el volumen de gas presente en la escena en el instante k de la secuencia de video, es decir, el equivalente discreto de V_p. Se obtiene como la sumatoria de las contribuciones individuales las n_k burbujas, cada una con radio r_i:

$$v_k = \sum_{i=1}^{n_k} \frac{4}{3}\pi r_i^3 \tag{7.9}$$

- La tasa de liberación instantánea (ILR, en inglés) en el instante k, es el equivalente discreto de $\partial V_g/\partial t$, y se puede aproximar de la siguiente manera:

$$ILR_k = \begin{cases} -\left(\dfrac{v_k - v_{k-1}}{\Delta t}\right) & Si\ v_k < v_{k-1} \\ 0 & en\ otro\ caso \end{cases} \tag{7.10}$$

- El volumen total generado por la región de interés V_k, y corresponde al volumen acumulado hasta el instante k, el cual resulta de la integración del parámetro ILR:

$$V_k = \sum_{j=o}^{k} ILR_j \tag{7.11}$$

7.2.5. Resultados

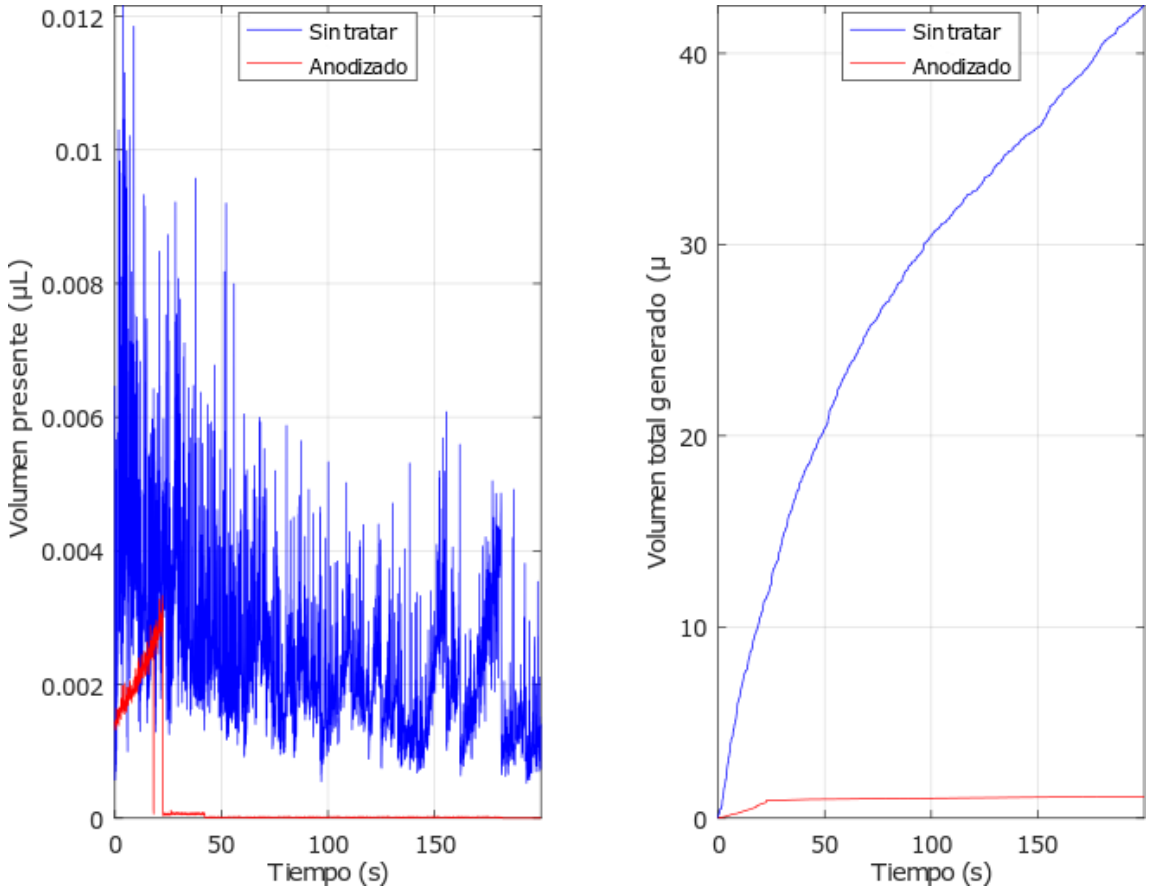
Se analizaron las muestras tratadas mediante anodizado y las muestras sin tratar mediante las aproximaciones propuestas (Ecuaciones 7.9 a 7.11). La descripción del volumen final de gas generado por las superficies (V_k) se muestra en la Tabla 7.3. Para su comparación, se estableció el tiempo de grabación en 200 segundos y el área analizada fue de 1,0 mm^2 para todas las muestras. El aumento del microscopio utilizado fue diferente entre muestras tratadas y muestras sin tratar debido al tamaño de las burbujas: en las muestras tratadas se observaron algunas burbujas pequeñas durante un corto tiempo, las cuales crecían muy lentamente.

Se pueden observar diferencias importantes entre la cantidad de gas generado por los dos tipos de muestras. La Figura 7.5 muestra el registro del volumen presente y del volumen total generado por una región rectangular de una pieza tratada y una pieza sin tratar. Las muestras elegidas corresponden a las primeras de cada tipo de la Tabla 7.3. Se evidencia que el registro del volumen de gas presenta un comportamiento exponencial para las muestras sin tratar,

como se mencionó anteriormente. Por otro lado, las muestras anodizadas únicamente presentaron pequeñas variaciones debidas a la generación de algunas pocas burbujas al inicio de la grabación.

Tabla 7.3. Volumen total de gas generado por muestras tratadas por anodizado y sin tratar.

	Sin tratar				**Tratadas**			
Muestra	1	2	3	4	1	2	3	4
Aumento (pix/mm)	190	190	190	190	309	309	309	309
Volumen total (µL)	42,5	38,77	30,86	31,34	1,12	0,38	0,37	0,37



(a) (b)

Figura 7. 5. Variaciones del volumen de gas en una región de interés para una muestra tratada y una muestra sin tratar. (a) Volumen presente (v_k), y (b) Volumen acumulado (V_k). Fuente: imagen propia.

Para las muestras elegidas, al tomar la razón entre los volúmenes acumulados finales, se puede observar que la cantidad de gas generado por la superficie sin tratar es 37,9 veces el volumen producido por la superficie anodizada. Sin embargo, esta razón crecerá hasta que ocurra la degradación total del material varios minutos u horas después, para las superficies sin tratar, o la eliminación del recubrimiento para las superficies tratadas.

7.2.6. Conclusiones para esta aplicación

En la presente aplicación, se cuantificó la tasa de degradación de piezas metálicas de aleación de magnesio AZ91 con tratamiento anodizado y sin él. Para esto se determinó automáticamente el volumen total de gas generado por una región rectangular de la superficie metálica, y se aplicaron aproximaciones que permiten evaluar las superficies sin recurrir a un método de seguimiento de alto costo computacional por la elevada frecuencia de las situaciones de oclusión y la alta velocidad de ascenso de las burbujas. De esta forma, el uso y del método de seguimiento con cámaras de video de alta velocidad constituye una tarea para abordar en trabajos futuros.

Con los resultados obtenidos, se pudo corroborar el decaimiento exponencial supuesto para la degradación de las aleaciones AZ91 con superficies no tratadas. En esta situación, la mayor tasa de reacción tiene lugar durante los primeros segundos de inmersión de la pieza en SBF. Para el caso de las superficies anodizadas, únicamente una pequeña cantidad de burbujas de hidrógeno se producen al inicio de la inmersión, pero pronto se estabiliza la situación y la superficie no reacciona con el fluido. Así, el volumen final de gas liberado es significativamente menor en relación al que se genera por la superficie sin tratar.

Si bien no se cuenta aún con una validación con los métodos tradicionales de laboratorio (Atrens et al. 2011), los resultados obtenidos aportan información útil para realizar comparaciones entre superficies anodizadas y no tratadas, en cuanto a proporciones de volumen final y medidas de los tiempos que tarda la superficie en estabilizar su producción de gas. De esta forma, el método propuesto se constituye como un ensayo prometedor para cuantificar la liberación de gas, puesto que aún no se han aplicado técnicas de procesamiento digital de secuencias de video para llevar a cabo tales mediciones.

7.3. Referencias

Andonstar: digital microscope A1, http://www.andonstar.com/e_products/digital-microscope-V1-1.html

Atrens, A., Liu, M., Zainal Abidin, N.I.: Corrosion mechanism applicable to biodegradable magnesium implants. Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol. 176, 1609-1636 (2011). https://doi.org/10.1016/j.mseb.2010.12.017

Bigun, J.: Vision with Direction. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2006)

Blawert, C., Dietzel, W., Ghali, E., Song, G.: Anodizing Treatments for Magnesium Alloys and Their Effect on Corrosion Resistance in Various Environments. Adv. Eng. Mater. 8, 511-533 (2006). https://doi.org/10.1002/adem.200500257

Bouguet, J.: Pyramidal implementation of the affine lucas kanade feature tracker. Intel Corp. 1, 1-9 (2000)

Buchelly Imbachí, F., Gomez, M., Cere, S., Ballarre, J., Ballarin, V., Pastore, J.: Measurement of the Degradation Rate of Anodized AZ91 Magnesium Temporary Implants Using Digital Image Processing Techniques. En: VIII Latin American Conference on Biomedical Engineering and XLII National Conference on Biomedical Engineering. CLAIB 2019. IFMBE Proceedings, vol 75. pp. 290-297 (2020)

Buchelly Imbachí, F., Pedetta, A., Pastore, J., Herrera, K., Ballarin, V.: Automatic tracking of flagellar rotation of bacteria. En: VII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica – CLAIB 2016. Colombian Association of Bioengineering and Medical Electronics (ABIOIN), Bucaramanga, Colombia (2016)

Camacho, E.: ¿què indica cuando la desviaciòn estàndar es màs grande que la media?, http://estadisticanorquin1.blogspot.com/2009/09/que-indica-cuando-la-esviacion.html

Cere, S., Gomez, A., Ballarre, J.: Anodisation and Sol–Gel Coatings as Surface Modification to Promote Osseointegration in Metallic Prosthesis. En: Djokić, S. (ed.) Biomedical and Pharmaceutical Applications of Electrochemistry. pp. 197-265. Springer International Publishing, Cham (2016)

Esmaily, M., Svensson, J.E., Fajardo, S., Birbilis, N., Frankel, G.S., Virtanen, S., Arrabal, R., Thomas, S., Johansson, L.G.: Fundamentals and advances in magnesium alloy corrosion. Prog. Mater. Sci. 89, 92-193 (2017). https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.04.011

Gomez, M., Ballarre, J., Gomez, A., Buchelly Imbachí, F., Pastore, J., Cere, S.: Estudio in vitro de implantes temporarios de aleación de magnesio (AZ91) modificados superficialmente mediante anodizado. En: 10° COLAOB Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (2018)

Herrera, K.: Relevancia de la movilidad y la quimiotaxis en la formación de biofilms de especies de Halomonas de interés biotecnológico, (2019)

Heublein, B.: Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology? Heart. 89, 651-656 (2003). https://doi.org/10.1136/heart.89.6.651

Hook, A.L., Flewellen, J.L., Dubern, J., Carabelli, A.M., Zaid, I.M., Berry, R.M., Wildman, R.D., Russell, N., Williams, P., Alexander, M.R.: Simultaneous Tracking of

Pseudomonas aeruginosa Motility in Liquid and at the Solid-Liquid Interface Reveals Differential Roles for the Flagellar Stators. mSystems. 4, 1-18 (2019). https://doi.org/10.1128/mSystems.00390-19

Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T.: Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. J. Biomed. Mater. Res. 24, 721-734 (1990). https://doi.org/10.1002/jbm.820240607

Manson, M.D.: Introduction to bacterial motility and chemotaxis. J. Chem. Ecol. 16, 107-118 (1990). https://doi.org/10.1007/BF01021272

Martinko, J.M., Madigan, M.T., Parker, J.: Brock, biología de los microorganismos. (2004)

Nand, G.K., Noopur, Neogi, N.: Defect detection of steel surface using entropy segmentation. En: 11th IEEE India Conference: Emerging Trends and Innovation in Technology, INDICON 2014 (2014)

Nisenbaum, M., Maldonado, E., Martínez, J., González, J., Passoni, I., Murialdo, S.: Video processing analysis for the determination and evaluation of the chemotactic response in bacterial populations. J. Microbiol. Methods. 127, 146-153 (2016). https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.006

OpenCV: OpenCV 3.0.0 Open Source Computer Vision, https://docs.opencv.org/3.0.0/

Qian, C., Wong, C.C., Swarup, S., Chiam, K.-H.: Bacterial Tethering Analysis Reveals a "Run-Reverse-Turn" Mechanism for Pseudomonas Species Motility. Appl. Environ. Microbiol. 79, 4734-4743 (2013). https://doi.org/10.1128/AEM.01027-13

Di Salvo, M.E.: Energética y dinámica del movimiento de bacterias autopropulsadas en medios acuosos, (2013)

Shih, F.Y.: Image processing and mathematical morphology. (2009)

Song, G., Atrens, A.: Understanding magnesium corrosion. A framework for improved alloy performance. Adv. Eng. Mater. 5, 837-858 (2003). https://doi.org/10.1002/adem.200310405

Tan, W.C., Goh, P.C., Causo, A., Chen, I.M., Tan, H.K.: Automated vision based detection of blistering on metal surface: For robot. En: IEEE International Conference on Automation Science and Engineering. pp. 74-79 (2017)

Zhuang, J., Jing, Y., Wang, Y., Zhang, J., Xie, H., Yan, J.: Degraded and osteogenic properties of coated magnesium alloy AZ31; an experimental study. J. Orthop. Surg. Res. 11, 1-6 (2016). https://doi.org/10.1186/s13018-016-0362-5

Conclusiones generales y trabajos futuros

El seguimiento de objetos constituye actualmente un conjunto de técnicas muy importantes para el análisis de imágenes biomédicas provenientes de diferentes sistemas de adquisición basados en principios ópticos, acústicos, electromagnéticos, de radiación, nucleares, entre otros. De esta manera, el seguimiento de objetos se utiliza para estudiar la dinámica de órganos y tejidos, el comportamiento de organismos unicelulares bajo distintas condiciones, el monitoreo de los cambios que sufren algunos biomateriales en diferentes medios, análisis biomecánicos, entre otras aplicaciones.

Los avances en el desarrollo de tecnologías de la información y el uso de los métodos tradicionales para el seguimiento de objetos han permitido automatizar procesos que se llevan a cabo en distintos contextos de la ingeniería biomédica, de tal forma que se realicen diagnósticos objetivos y se obtengan medidas reproducibles en el menor tiempo posible.

Sin embargo, dada la variedad creciente de tecnologías para la adquisición de las secuencias de imágenes y el interés reciente de investigadores en medicina y biología por estudiar patrones de movimiento que antes no se habían tenido en cuenta, existe la necesidad continua de desarrollar nuevos métodos para hacer el seguimiento de objetos de forma eficiente y robusta, con un desempeño superior a los existentes, junto a nuevas técnicas para el reconocimiento de patrones.

Partiendo de lo anterior, se da cumplimiento al objetivo general de la presente tesis, el cual proponía **desarrollar métodos de visión por computador que permitan realizar la detección y el seguimiento de organismos unicelulares en secuencias de imágenes, de manera independiente a las representaciones utilizadas**. A continuación, se dan a conocer los indicadores del cumplimiento del objetivo central propuesto:

- En primer lugar, se desarrolló un método de seguimiento, el cual recibe como parámetros las mediciones hechas sobre los objetos representadas como vectores de estado y la información sobre su apariencia cuadro a cuadro; luego, lleva a cabo la selección de candidatos para asociar según la elección de una métrica y se actualizan los estados para cada objeto en función de las predicciones y de las mediciones; y finalmente, evalúa los casos en los cuales se presente oclusión. De esta manera, la salida del método consiste en la trayectoria o el registro de las características dinámicas de los objetos durante su existencia en la escena.

- En segundo lugar, se aplicaron pruebas de desempeño del sistema de seguimiento y se elaboraron métodos de análisis de movimiento para cada una de las aplicaciones biomédicas desarrolladas.

Como aplicación principal se tiene el análisis de motilidad de células espermáticas de diferentes especies, en la cual se obtuvieron indicadores de desempeño superiores o iguales respecto a un software de referencia ampliamente conocido en el ámbito de la reproducción. También se desarrollaron métodos para medir los parámetros estándar de motilidad y a partir de ellos se creó un módulo para el análisis de subpoblaciones, en el cual se aplicaron técnicas supervisadas y no supervisadas de reconocimiento de patrones mediante un agrupamiento jerárquico y la aplicación de una técnica de clasificación para comparar muestras.

Respecto a la aplicación mencionada, debe destacarse su alto impacto en el área de la reproducción, ya que los buenos resultados obtenidos permitieron el desarrollo de un software CASA para uso clínico y veterinario, el cual ya se ha distribuido en numerosas instituciones de investigación a nivel internacional. Este desarrollo tecnológico cuenta con un registro de propiedad intelectual como obra inédita, emitido por el Poder Ejecutivo Nacional de la República Argentina. Además, el uso del software se reportó en publicaciones relacionadas con biología reproductiva.

También se desarrollaron aplicaciones complementarias que utilizan el método de seguimiento propuesto: el análisis de movimiento de diferentes especies bacterianas y el estudio in vitro de la tasa de degradación de aleaciones de magnesio. En la primera, se utilizaron representaciones de forma elípticas con el fin de analizar descriptores de rotación, traslación y cambios abruptos en la dirección del movimiento de las células estudiadas. En la segunda, se realizó la detección y el seguimiento de burbujas de hidrógeno, modeladas como formas circulares, para determinar la velocidad de una reacción química por medio del registro de la producción de dicho gas en el transcurso del tiempo. En los dos casos, se obtuvieron resultados muy prometedores en cuanto a las aplicaciones biológicas que pueden desarrollarse a partir de los ensayos realizados, en convenio con distintos grupos de investigación.

Se puede observar que el método de seguimiento propuesto cumple con la condición de adaptabilidad a distintas representaciones de forma de los objetos, es decir, funciona de igual forma sin importar la dimensionalidad de los vectores de estado. Si bien, todas las aplicaciones del método de seguimiento fueron desarrolladas para secuencias de imágenes de microscopía, su uso se puede extender a diferentes contextos de la ingeniería biomédica y de la visión por computador, como sugieren los trabajos adicionales realizados.

Para cada aplicación desarrollada se elaboraron artículos que fueron publicados en revistas, en capítulos de libro, presentados en congresos nacionales y en congresos internacionales. De esta forma, los aportes realizados en el marco de esta tesis tienen el sustento requerido.
Para finalizar, es necesario mencionar que todo proceso de construcción de conocimiento debe tener continuidad, puesto que al responder a una pregunta de investigación se derivan

más preguntas, y este hecho permite el crecimiento de las diferentes áreas del saber. En este sentido, se plantean trabajos a futuro derivados del presente tema de investigación:

- La prueba del método de seguimiento con otras representaciones de la forma, por ejemplo, con contornos activos, modelos esqueléticos, modelos múltiples y modelos articulados. En el ámbito de las imágenes de microscopía, por ejemplo, existen estudios relacionados con el análisis de movimiento del flagelo de los espermatozoides y se utilizan modelos articulados o esqueléticos para su representación. De esta forma, se pueden agregar nuevos módulos y prestaciones para el software desarrollado.

- La evaluación del método de seguimiento con otros tipos de secuencias de imágenes biomédicas obtenidas por diferentes sistemas de adquisición como equipos de ultrasonido, de resonancia magnética, etc., y en contextos diferentes como la vigilancia terrestre, la vigilancia aérea, la robótica y la navegación automática, entre otros.

- La modificación del método propuesto para dar más relevancia a los modelos de apariencia y al uso de las características de las imágenes para la localización de los objetivos.

- La exploración de diferentes y novedosos enfoques para el seguimiento. Se debe resaltar, por ejemplo, el auge reciente del uso de técnicas de aprendizaje profundo en distintos ámbitos de la visión artificial. En la actualidad ya se encuentran numerosos trabajos en la literatura, en los cuales se proponen distintos métodos basados en redes convolucionales y en el uso de modelos de apariencia bio inspirados.

Anexo I. Uso del software *Sperm Motility Tracker*

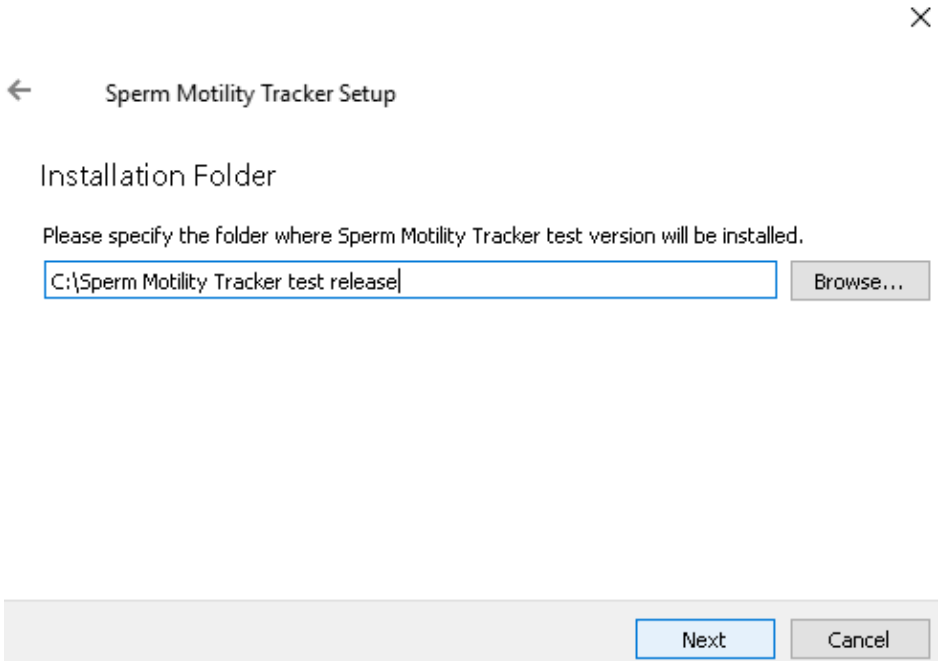
El software *Sperm Motility Tracker* corresponde a un desarrollo tecnológico que se utiliza para evaluar la motilidad espermática en muestras de semen de diferentes especies animales, mediante los métodos descritos en el Capítulo 6 para la detección, el seguimiento, el análisis de movimiento y el reconocimiento de patrones en secuencias de imágenes. El software fue desarrollado en el lenguaje orientado a objetos C++ y las operaciones de procesamiento digital de imágenes se realizaron con ayuda de la biblioteca OpenCV. De igual forma, la interfaz gráfica de usuario fue desarrollada con la librería Qt.

Médicos, veterinarios y otros investigadores de áreas relacionadas con la biología reproductiva pueden obtener una copia del software tras realizar la solicitud a la dirección de correo electrónico *acesari@mdp.edu.ar* y diligenciar un formulario de registro. El software se descarga en un archivo comprimido, el cual contiene información sobre su licencia, las instrucciones de instalación, el manual de usuario y el ejecutable de instalación. En el Anexo II se menciona la información correspondiente con la licencia del software. A continuación, se mencionan las instrucciones generales para la instalación y el uso del programa.

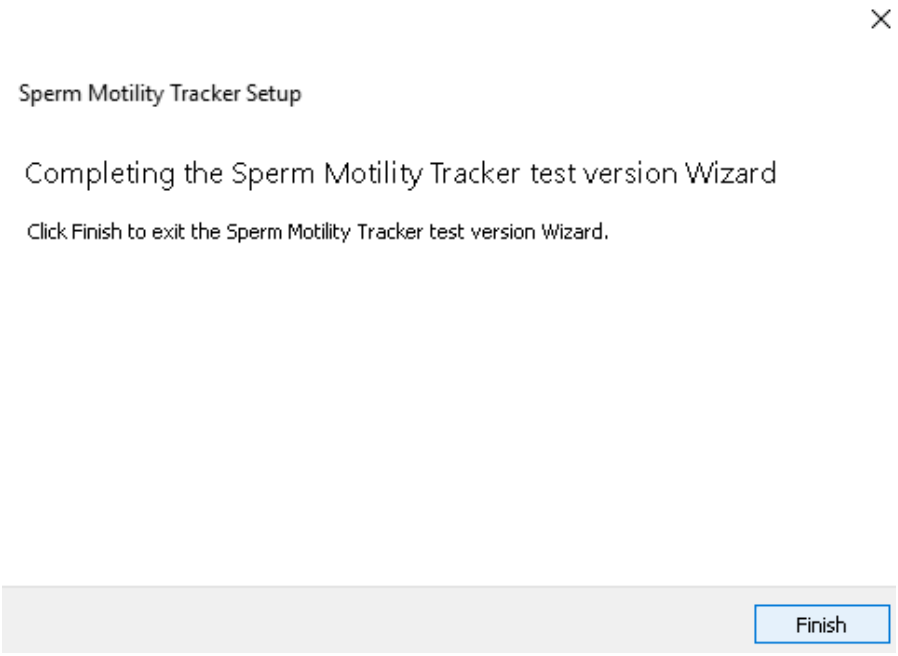
INSTRUCCIONES PARA LA INSTALACIÓN

1. Descomprima el archivo descargado y ejecute el programa de instalación ***SMT1installer.exe***

2. Lea la información mostrada en pantalla y presione el botón ***Next*** para avanzar en cada ventana que presenta el programa de instalación. Verifique el directorio en el cual se instalará el software. Este directorio puede ser modificado por el usuario.

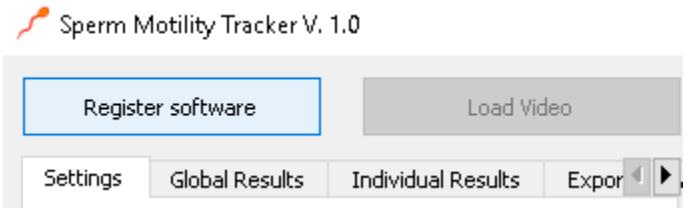


3. Presione el botón ***Finish*** para finalizar la instalación.

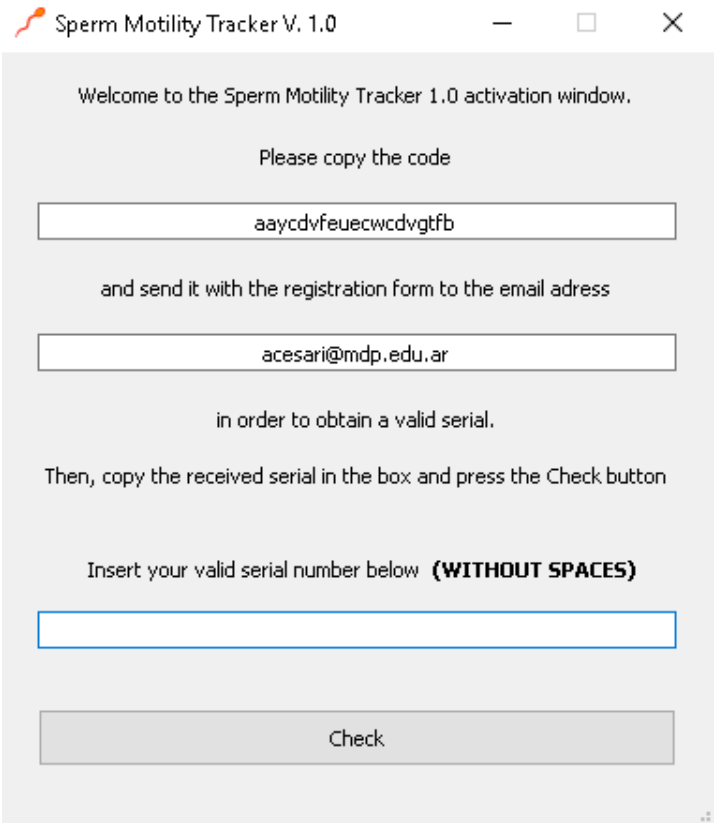


4. Ejecute el software mediante el acceso directo creado en el escritorio.

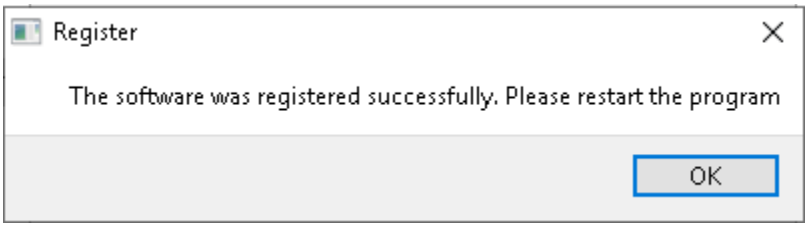
5. Presione el botón ***Register Software*** con el fin de activar el programa.



6. Siga las instrucciones que muestra la ventana de activación y solicite un código de registro en la dirección de correo electrónico que se presenta.



7. Copie el código recibido y péguelo en la tercera casilla de la ventana de activación. Luego presione el botón ***Check*** para finalizar el proceso de activación.



8. Cierre la ventana de activación y la ventana principal. Luego reinicie el programa.

REQUERIMIENTOS PARA LA ADQUISICIÓN Y EL ANÁLISIS DE VIDEOS

Los videos deben adquirirse mediante una cámara digital conectada a un **microscopio de contraste de fase**. La frecuencial de adquisición recomendada está comprendida entre **25 y 30 cuadros por segundo**. Los videos grabados deben almacenarse en formatos **MP4, AVI, MPG o MOV**. El usuario puede adquirir videos de cualquier duración, pero el software **analiza únicamente intervalos de hasta 100 cuadros en cualquier instante inicial del video**.

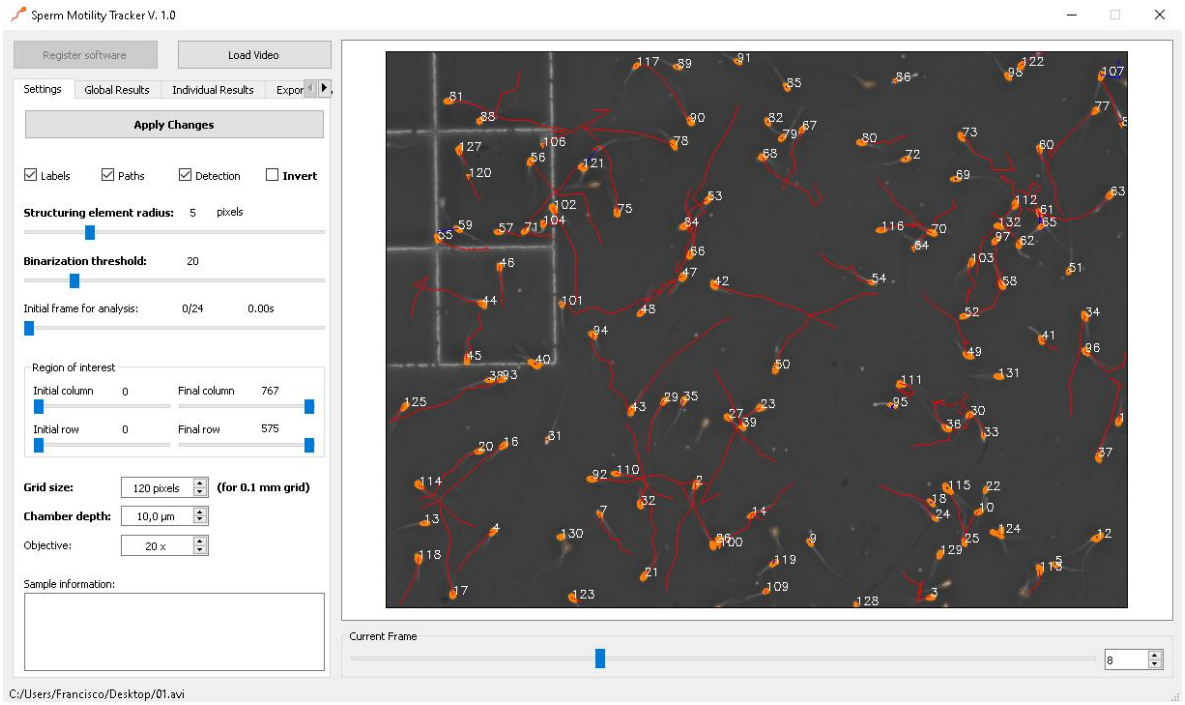
La **concentración máxima recomendada es de 120 células por imagen**, con el fin de asegurar un buen seguimiento, como se mencionó en la publicación:

> Buchelly Imbachí, F. *et al.* (2018) 'Objective evaluation of ram and buck sperm motility by using a novel sperm tracker software', *Reproduction*, 156(1), pp. 11–21. doi: 10.1530/REP-17-0755.

Este parámetro se puede verificar en la pestaña ***Global Results*** del programa.

INSTRUCCIONES PARA EL ANÁLISIS DE VIDEOS

1. Ejecute el programa desde el acceso directo creado en el Escritorio, o mediante el ejecutable *SpermMotilityTrackerV1.exe* presente en el directorio de instalación. A continuación, se muestra la interfaz gráfica del software:



2. Cargue el video que contiene la muestra a analizar haciendo click en el botón ***Load video***.

3. Establezca los parámetros de configuración necesarios en la pestaña ***Settings***, con el fin de realizar la detección y el seguimiento de las células de forma adecuada y para obtener medidas correctas de los parámetros de motilidad.

Parámetros de configuración:

- La casilla ***Invert*** debe seleccionarse si el video presenta espermatozoides oscuros sobre fondo brillante (contraste invertido).

- El control deslizante ***Structuring element*** permite regular el elemento estructurante que se utiliza para la detección de las cabezas y se sintoniza según el tamaño de las mismas.

- El control deslizante ***Binarization threshold*** establece el umbral de brillo con el cual se detectan las células espermáticas.

- El control deslizante ***Initial frame*** permite establecer el instante inicial del video para el análisis.

- Los controles deslizantes del grupo ***Region of interest*** permiten limitar la zona del video a analizar.

- La casilla ***Grid size*** establece la equivalencia entre píxeles y micrómetros. En este control debe introducirse la cantidad de píxeles de longitud que mide una arista de la grilla de 0.1 mm (100 micras) de referencia.

- La casilla ***Chamber depth*** establece la profundidad de la cámara utilizada. Este valor se requiere para obtener las medidas de concentración.

- La pestaña ***Global Results*** muestra la información relacionada con los parámetros globales de motilidad y de concentración de la muestra.

- La pestaña ***Individual Results*** muestra los parámetros de motilidad de cada célula y brinda la posibilidad al usuario de eliminar las trayectorias no deseadas.

- La pestaña ***Export*** permite almacenar los resultados obtenidos en tres diferentes formatos: hoja de cálculo con los parámetros individuales y globales (archivo xls), imagen con las trayectorias (archivo bmp), y un video que muestra el seguimiento de las células (archivo avi). Los archivos generados se almacenan en la misma ruta del video original.

Anexo II. Licencia y registro del software *Sperm Motility Tracker*

El software *Sperm Motility Tracker* fue diseñado para usarse con propósitos educativos y de investigación. No puede copiarse sin un permiso previo o una licencia avalada por los propietarios. Todas las copias, incluidas las versiones de evaluación, se encuentran bajo control. Ellas poseen un código de autorización, proporcionado por los creadores, asociado a su usuario. La copia sin autorización es considerada ilegal. De igual forma, el software *Sperm Motility Tracker* no puede ser distribuido, o modificado, o usado como parte de alguna actividad comercial, o incorporarse a otro software, sin contar con un permiso por escrito.

El software *Sperm Motility Tracker* está disponible únicamente bajo pedido. Se puede solicitar una copia del software a la dirección de correo electrónico *fbuchelly@gmail.com*. Los propietarios no ofrecen garantía alguna, expresa o implícita, concerniente a la calidad de cualquier resultado obtenido por su uso, o cualquier otra información proporcionada a continuación, o cualquier otro asunto, incluyendo, entre otros, su comerciabilidad o idoneidad para algún propósito particular.

Los resultados de investigación derivados de su uso directo o del concepto de su diseño, debe reconocer el software citando las siguientes publicaciones:

- Buchelly Imbachí F, Zalazar L, Pastore JI, Greco MB, Iniesta-Cuerda M, Garde JJ, Soler AJ, Ballarin V, Cesari A. Objective evaluation of ram and buck sperm motility by using a novel sperm tracker software. Reproduction. 2018 Jul;156(1):11-21. doi: 10.1530/REP-17-0755. Epub 2018 May 22. PubMed PMID: 29789440.

- Francisco Javier Buchelly Imbachi, Lucía Zalazar, Juan Ignacio Pastore, Ana Josefa Soler, Andreina Cesari and Virginia Ballarin. Evaluation of motility quality in ram sperm by using a novel open-source suite of algorithms. XXI Congreso Argentino de Bioingeniería y X Jornadas de Ingeniería Clínica - SABI 2017. Organizado por la Sociedad Argentina de Bioingeniería y la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, del 25 al 27 de Octubre de 2017. Ciudad de Córdoba. Argentina. ISBN: 978-950-33-1406-7.

El software *Sperm Motility Tracker* fue diseñado y desarrollado por Francisco Buchelly, Juan Pastore, y Virginia Ballarin, del Laboratorio de Procesamiento de Imágenes, Instituto de Investigaciones Científicas y Tecnológicas en Electrónica (ICyTE), y por Andreina Cesari y Lucía Zalazar del Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB), ambos institutos pertenecientes a la Universidad Nacional de Mar del Plata y CONICET.

El software fue registrado como una obra inédita el día 2 de noviembre de 2018 con el número RE-2018-56090078-APN-DNDA#MJ ante el Poder Ejecutivo Nacional de la República Argentina, como se describe a continuación.

República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2018 - Año del Centenario de la Reforma Universitaria

Obra Inédita – Software

Número: RE-2018-56090078-APN-DNDA#MJ

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Viernes 2 de Noviembre de 2018

Referencia: RL-2018-56089940-APN-DNDA#MJ

Dato para identificación registral. Debe utilizar el mismo número tanto para el depósito como para la renovación.

Documento de referencia: 23888691

Datos de la obra inédita Software

¿Es renovación?: No
Título: SPERM MOTILITY TRACKER
Breve descripción: SIRVE PARA MEDIR EN SIMULTANEO LAS TRAYECTORIAS DE HASTA 120 ESPERMATOZOIDES A PARTIR DE VIDEOS ADQUIRIDOS MEDIANTE UN MICROSCOPIO CON CONTRASTE DE FASE . TAMBIEN IDENTIFICA A QUE VELOCIDAD SE DESPLAZAN Y QUE TIPO DE TRAYECTORIA DESCRIBE .
¿Es obra colectiva?: No
Tipo de obra: Original

Autor/es

Primer nombre: VIRGINIA
Segundo nombre: LAURA
Tercer nombre:
Primer apellido: BALLARIN
Segundo apellido:
Tercer apellido:
Tipo de documento: CUIL
Documento N°: 27132330218
Nacionalidad: Argentina
Estado civil: No declara
Correo electrónico: @
Teléfono de contacto: 0
¿Es titular? : No
Porcentaje de titularidad:

Domicilio del autor

Calle y altura: -
Piso:
Departamento:
Código Postal: -
Pais: Argentina
Provincia: BUENOS AIRES
Localidad: -

Autor/es

Primer nombre: JUAN
Segundo nombre: IGNACIO
Tercer nombre:
Primer apellido: PASTORE
Segundo apellido:
Tercer apellido:
Tipo de documento: CUIL
Documento N°: 20255755340
Nacionalidad: Argentina
Estado civil: No declara
Correo electrónico: @
Teléfono de contacto: 0
¿Es titular? : No
Porcentaje de titularidad:

Domicilio del autor

Calle y altura: -
Piso:
Departamento:
Código Postal: -
Pais: Argentina
Provincia: BUENOS AIRES
Localidad: -

Autor/es

Primer nombre: FRANCISCO
Segundo nombre: JAVIER
Tercer nombre:
Primer apellido: BUCHELLY
Segundo apellido: IMBACHÍ
Tercer apellido:
Tipo de documento: CUIL
Documento N°: 20604363390
Nacionalidad: Argentina
Estado civil: No declara
Correo electrónico: @
Teléfono de contacto: 0
¿Es titular? : No
Porcentaje de titularidad:

Domicilio del autor

Calle y altura: -
Piso:
Departamento:
Código Postal: -
Pais: Argentina
Provincia: BUENOS AIRES
Localidad: -

Autor/es

Primer nombre: LUCIA
Segundo nombre:
Tercer nombre:
Primer apellido: ZALAZAR
Segundo apellido:
Tercer apellido:
Tipo de documento: CUIL
Documento N°: 27326685858
Nacionalidad: Argentina
Estado civil: No declara
Correo electrónico: @
Teléfono de contacto: 0
¿Es titular? : No
Porcentaje de titularidad:

Domicilio del autor

Calle y altura: -
Piso:
Departamento:
Código Postal: -
Pais: Argentina
Provincia: BUENOS AIRES
Localidad: -

Autor/es

Primer nombre: ANDREINA
Segundo nombre:
Tercer nombre:
Primer apellido: CESARI
Segundo apellido:
Tercer apellido:
Tipo de documento: CUIL
Documento N°: 23200446054
Nacionalidad: Argentina
Estado civil: No declara
Correo electrónico: @
Teléfono de contacto: 0
¿Es titular? : No
Porcentaje de titularidad:

Domicilio del autor

Calle y altura: -

Piso:
Departamento:
Código Postal: -
Pais: Argentina
Provincia: BUENOS AIRES
Localidad: -

Coordinador (completar sólo en caso de ser Obra Colectiva)

Tipo de Persona:
Correo electrónico:
Teléfono de contacto:
¿Es titular? :
Porcentaje de titularidad:

Domicilio del coordinador (completar sólo en caso de ser Obra Colectiva)

Calle y altura:
Piso:
Departamento:
Código Postal:
País:

Titular (completar sólo en caso de no ser el autor o el coordinador)

Tipo de persona: Persona Jurídica
CUIT: 30586761729
Razón Social: UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
Correo electrónico: erica.lerner@edlerner.com.ar
Teléfono de contacto: 48569917
Porcentaje de titularidad: 50

Domicilio del titular

Calle y altura: JUAN B ALBERDI 2695
Piso:
Departamento:
Código Postal: 7600
País: Argentina
Provincia: BUENOS AIRES
Localidad: MAR DEL PLATA

Titular (completar sólo en caso de no ser el autor o el coordinador)

Tipo de persona: Persona Jurídica
CUIT: 30546660385
Razón Social: CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS CONICET
Correo electrónico: erica.lerner@edlerner.com.ar
Teléfono de contacto: 48569917
Porcentaje de titularidad: 50

Domicilio del titular

Calle y altura: GODOY CRUZ 2290

Piso:
Departamento:
Código Postal: -
País: Argentina
Provincia: CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES
Localidad: CABA

Aclaraciones

Aclaraciones:

La recepción de la obra no implica su depósito si la presentación no se adecua a la normativa legal vigente. El precio del presente trámite incluye el valor de la tasa correspondiente al Fondo Nacional de las Artes. De no renovarse este depósito dentro de los treinta (30) días de cumplidos los tres (3) años de su vigencia, el sobre y su contenido serán incinerados (dec. 7.616/63). Si el depósito es solicitado por un tercero, deberá presentarse con la correspondiente autorización con firma certificada de el/los autor/es o titular/es. El/los autor/es y/o titular/es de la presente son los únicos que podrán realizar los trámites de renovación del depósito.

Leído: Si

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, c=AR, o=MINISTERIO DE MODERNIZACION, ou=SECRETARIA DE MODERNIZACION ADMINISTRATIVA, serialNumber=CUIT 30715117564
Date: 2018.11.02 12:11:05 -03'00'

Valeria Soledad GALEJCZUK
Asistente administrativo
Dirección Nacional del Derecho de Autor
Ministerio de Justicia y Derechos Humanos

JOSEFINA VACCARO

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, c=AR, o=MINISTERIO DE MODERNIZACION, ou=SECRETARIA DE MODERNIZACION ADMINISTRATIVA, serialNumber=CUIT 30715117564
Date: 2018.11.02 12:11:06 -03'00'