

SOFTWARE C.A.S.A. PARA BOVINOS

CESAR DAVID GASTELBONDO CALDERON

UNIVERSIDAD DE IBAGUE
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA ELECTRÓNICA

IBAGUE

2013

INFORME DE TESIS
SOFTWARE C.A.S.A. PARA BOVINOS

CESAR DAVID GASTELBONDO CALDERON

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TITULO DE INGENIERO ELECTRÓNICO

MSc. Ing. Luisa Fernanda Gallo – Directora de Trabajo de Grado

UNIVERSIDAD DE IBAGUE
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA ELECTRÓNICA

IBAGUE

2013

II

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Nombre del Jurado

Nombre del Jurado

Ciudad y Fecha (día, mes, año)

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a todas las personas que hicieron posible mi desarrollo profesional y humano, a mi familia, a mis compañeros de estudio, a las empresas interesadas y sus representantes, y a mis tutores que se interesaron en mí como alumno, todos esos excelentes ingenieros que compartieron momentos intensos de enseñanza y sin vacilar dieron todo de sí para formarnos como grandes profesionales y humildes personas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Servicio Nacional de Aprendizaje (S.E.N.A.) y sus representantes por creer en este proyecto.

Agradezco especialmente a la MSc. Ing. Luisa Fernanda Gallo por dirigir este proyecto, asesorarme hasta el último momento y compartirme sus conocimientos y consejos.

Agradezco al programa de Ingeniería Electrónica de la Universidad de Ibagué por las atenciones y el apoyo incondicional en mis proyectos durante toda la carrera.

Agradezco al cuerpo de Ingenieros, profesores y tutores que con mano firme pero con inmensa pasión forjaron las herramientas con las que hoy me hago para seguir adelante.

Agradezco a mi familia por creer en mí y dar todo de ellos para verme culminar este proyecto.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. PLANTEAMIENTO BASICO / FUNDAMENTACION	2
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2 OBJETIVOS	2
1.3 ALCANCE	3
1.4 MARCO DE REFERENCIA	4
1.5 ESTADO DEL ARTE	5
1.6 ALTERNATIVAS DE SOLUCIÓN	7
1.7 SELECCIÓN DE LA MEJOR ALTERNATIVA	8
2. DESARROLLO DEL TRABAJO	9
2.1 DISEÑO DEL PROGRAMA	10
2.1.1 Adquisición de las Imágenes	11
2.1.2 Concentración	14
2.1.2.1 Pruebas	20
2.1.3 Motilidad	21
2.1.3.1 Pruebas	27
2.1.4 Interfaz Gráfica	28
RECOMENDACIONES	31
CONCLUSIONES	32

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de bloques funcional	10
Figura 2. Diagrama general del programa	11
Figura 3. Interfaz imaqttool	11
Figura 4. Espermatozoides Bovinos a 100x	14
Figura 5. Espermatozoides de Carnero a 40x	15
Figura 6. Cámara de Neubauer a 40x sin espermatozoides	16
Figura 7. Pixeles de un espermatozoide a 40x – Imagen aumentada	16
Figura 8. Filtro promedio en una imagen a color	18
Figura 9. Resultado del cálculo de concentración en el video de muestra	21
Figura 10. Gráfica coeficiente de correlación contra pixeles desplazados	23
Figura 11. Gráfica coeficiente de correlación contra pixeles desplazados con regresión exponencial decreciente o logarítmica	24
Figura 12. Pixeles pimienta presentes en la imagen adquirida	26
Figura 13. Interfaz gráfica final del programa	30

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resultados de pruebas de Concentración	21
Tabla 2. Resultados de pruebas de Motilidad	27

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo A	Documentación relacionada al software <i>SpermVision</i> de Minitüb como alternativa de solución	36
Anexo B	Cotización del software <i>SpermVision</i> y equipamiento de Minitüb vendido por Anditecnica (Medellín – Colombia)	38
Anexo C	Tabla del Laboratorio de Reproducción Animal del SENA	41
Anexo D	Manual de instrucciones y recomendaciones del software	42
Anexo E	Código completo del programa	47

GLOSARIO

Algoritmo: Es un conjunto de instrucciones que se realizan de forma sucesiva de manera que cumplan reglas establecidas y a partir de una condición generen una solución.

C.A.S.A.: Análisis de semen asistido por computadora, de sus siglas en inglés (Computer-Assisted Semen Analysis), hace referencia a todo tipo de software que soporta la información requerida en el análisis de las características seminales y aporta datos específicos acerca de dichas características.

Cámara de Bürker: Instrumento usado para recuento de células con medidas definidas visibles claramente bajo microscopio y ecuaciones para cálculo de concentración establecidas.

Cámara de Neubauer: Instrumento usado para recuento de células con medidas definidas visibles claramente bajo microscopio y ecuaciones para cálculo de concentración establecidas, más fácil de conseguir comercialmente que la Cámara de Bürker.

Campo: Zonas que se establecen de la muestra con el microscopio donde se distinguen aglutinaciones de espermatozoides y se determinan características acerca de ellos para luego generalizar.

Características Espermográficas: Jerga utilizada en los laboratorios para referirse a las propiedades gráficas del semen, tanto visibles naturalmente como distinguibles con reactivos (relacionadas al color o composición).

Código: Es el cuerpo del programa como tal, donde se comprenden todas las instrucciones y condiciones además de contenidos interactivos, como la interfaz gráfica con el usuario.

Concentración: Es la proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto (espermatozoides para este caso) y la cantidad de disolvente (líquido seminal o demás partes de la muestra que no sean espermatozoides).

Converger: Llegar al mismo punto o un punto en común.

Correlación: En términos de imágenes, la correlación y el coeficiente que la representa, hablan de qué tan parecida es una imagen a la otra o qué tantos cambios tienen.

Cuadro: Corresponde a la captura de una imagen.

Demo: Ejemplo o demostración.

Discriminador: En términos de imágenes, es un algoritmo que permite separar de manera automática las partes de una imagen que sean de interés de las que no.

Disparo: También denominado *Trigger*, es el momento de inicio de un evento, por ejemplo la captura de un cuadro en medio de un video se dá por un disparo.

Driver: Corresponde a los archivos requeridos para el correcto funcionamiento de un dispositivo.

Estándar: Preestablecido o predeterminado como valor por defecto.

Evento: Hace referencia en el código al cambio de una variable, la finalización de una tarea, el ingreso de nuevas instrucciones o la conclusión de un ciclo.

Exportar: Tomar un tipo de variable de trabajo interno para el código y convertirla en un archivo de uso externo y público con una extensión correspondiente.

Fertilidad: Hace referencia a la capacidad de generar o sustentar una progenie o descendencia numerosa y de buena calidad partiendo de características comúnmente establecidas.

FPS: Cuadros por segundo, de sus siglas en inglés (Frames per Second), es la tasa con la cual se registra o visualiza una señal de video.

Hardware: Componentes físicos de un sistema de cómputo.

Intermediación: En términos de señal, hace referencia a la transducción de la señal.

Interpretador: Persona con conocimientos para usar los datos de apoyo aportados por el programa para hacer una análisis de fertilidad.

Línea: Corresponde a un segmento del código, ya sea instrucción o comentario.

Máscara: En términos de Imágenes, es una matriz que cambiará los componentes de la imagen original pero preservando la estructura al realizar una operación matemática a ellos.

MATLAB: Programa soporte para el diseño de otros programas, el cual cuenta con herramientas y documentación que permiten realizar a alto nivel tareas complejas.

Motilidad: Valor subjetivo asignado a las características de movimiento de los espermatozoides, ya sea individualmente o en campos.

Movimiento Progresivo: Es la capacidad de amplio desplazamiento de un espermatozoide tendiendo al desplazamiento con dirección lineal y con una velocidad notable (según los tipos de movimiento clasificados).

Multiparámetros: Que incluye varias características de interés para su desarrollo.

Operario: Persona que realizará la instalación y ejecución del producto.

Pimienta: Tipo de ruido comúnmente encontrado en el manejo de imágenes que corresponde a puntos negros (de valor 0 o aproximado) que se distribuyen en la imagen sin un patrón determinado.

Pixel: Es la menor unidad en color que conforma una imagen.

Procesamiento de Imágenes: Toda manipulación sobre imágenes que permita obtener resultados específicos que no son posibles sobre la imagen original.

Programar: Escribir líneas de código que después se conviertan en un programa completo.

RCA: Tipo de conector con polo central positivo y anillo negativo que se usa en el mercado audiovisual.

Reactivos: Compuestos químicos que reaccionan en contacto con las muestras haciendo visibles características específicas, por ejemplo pH.

Resolución: Dato en columnas de pixeles contra filas de pixeles que componen una imagen, a mayor resolución más detallada se tendrá la imagen.

RGB: Es un modelo de color con los colores primarios de la luz (rojo, verde y azul) del cual, por proporciones de cada uno se pueden componer los demás colores.

Software: Componentes no físicos o tangibles en un sistema de cómputo.

Tinción: Es una técnica usada en el trabajo con microscopios para mejorar las diferentes características en la imagen vista dependiendo de lo que se busque.

Transductor: Es un dispositivo capaz de convertir un tipo de energía (señal) en otra, por ejemplo el transductor de la cámara de video (luz a imágenes digitales).

Turbulencia: Movimiento no progresivo en un conjunto de espermatozoides cualquiera.

Variable: Es la parte del algoritmo que toma diferentes valores.

RESUMEN

En el centro agropecuario “La Granja” del Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA, Espinal Tolima, con fines educativos se adquirió un microscopio de contraste de fase para estudiar las características que determinan la fertilidad especialmente en Bovinos; Este tipo de microscopio permite imágenes detalladas a grandes ampliaciones (40x) y se complementó con un sistema C.A.S.A. determinando los principales parámetros espermográficos de manera complementaria al método tradicional y en intervalos de tiempo pequeños comparados con los anteriores al uso del programa, además de evitar requerir químicos para mantener los espermatozoides vivos, lo que hace que el proceso sea más completo y dé soporte para obtener resultados más confiables.

ABSTRACT

At the agricultural center named “La Granja” of SENA, Espinal – Tolima, was acquired a phase contrast Microscope for educational purposes allowing the study of some of the features which determinate bull sperm fertility; This kind of Microscope allows to take shots of images at 40x and now is complemented with a Computer Assisted Semen Analysis system (CASA) determining those features in a complementary way, hand in hand with the traditional method and making shorter the required time for those studies, besides avoiding to use chemical substances for keeping spermatozoids alive, which now makes a whole more complex and complete process, supporting the results and being them reliable.

PALABRAS CLAVE: Sistema C.A.S.A, microscopio de contraste de fase, procesamiento de imágenes.

KEYWORDS: Computer Assisted Semen Analysis, phase contrast Microscope, image processing.

INTRODUCCIÓN

Debido a la necesidad originada en el SENA, nodo “La Granja”, por la adquisición de un potente microscopio de contraste de fase el cual no incluía sistema complementario para el análisis de las características de los espermatozoides, se procedió a realizar un software denominado comúnmente C.A.S.A., ofreciendo el uso apropiado al microscopio y sacando mayor provecho que el que podían tener sin un programa complementario.

Las características usadas normalmente para determinar la fertilidad en bovinos en el método tradicional son motilidad, morfología (solo detectable con un análisis profundo y detenido con un experto sobre la forma de cada espermatozoide), viabilidad (implícita en la motilidad) y concentración, de las cuales, en el laboratorio de reproducción animal, se trabaja la motilidad y concentración, que a su vez, requerían procesos químicos de preparación distintos entre cada método, alterando el ambiente natural y hacían que se empleara un tiempo grande entre un análisis y el otro, permitiendo que muchos espermatozoides murieran.^[1]

El método tradicional para la medición de la concentración, consiste en la inmersión en aceite y el uso común de reactivos para tinciones sobre una cámara de Bürker, lo que altera el movimiento de los espermatozoides por haber sido cambiado su medio natural, debido a que el reactivo tiene diferente viscosidad, entonces siguiendo estos pasos, sobre la misma muestra no podría determinarse la motilidad, lo que hace que deba requerirse otra muestra y por tanto no es un proceso preciso.^[2]

El método tradicional para la determinación de la motilidad, es mediante el uso de un microscopio y un analista, en este caso, el valor de la motilidad es subjetivo y obedece a lo que el analista considere respecto al movimiento que ve, es decir, si nota turbulencias, si nota movimientos relativamente rápidos o si ve que nada se mueve, dirá entonces que la motilidad de esa muestra de semen tiene un valor entre 0 y 100 como porcentaje de los espermatozoides que vio moviéndose bien a su concepto.

El software C.A.S.A. debe tener entonces unas características que hagan posible la satisfacción de la necesidad del Laboratorio de Reproducción Animal del SENA de forma rentable y práctica, es por eso que se desarrolló para funcionar con la señal proveniente del microscopio, adaptándola a los procesos desarrollados en el código del software y que determinan las características de motilidad y concentración en la misma muestra, obteniendo los resultados esperados.

1. PLANTEAMIENTO BASICO / FUNDAMENTACION

Es imprescindible conocer de dónde surge la idea y por qué es la solución más apropiada a un problema que tiene alternativas distintas y productos alrededor de todo el mundo.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el centro agropecuario “La Granja” del Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA, Espinal Tolima, con fines educativos se adquirió un microscopio de contraste de fase para estudiar las características que determinan la fertilidad especialmente en Bovinos, como son principalmente la motilidad y la concentración; El microscopio está funcionando simplemente como un microscopio ordinario, y este tipo de microscopio permite imágenes detalladas a grandes amplificaciones (40x) y se están determinando los principales parámetros espermográficos de manera subjetiva, y en intervalos de tiempo grande entre las mediciones, además de requerir químicos para mantener los espermatozoides vivos, lo que hace que el proceso sea impreciso, debido a que se altera el ambiente natural del esperma durante un tiempo considerable para la vida de un espermatozoide y con agentes que varían su funcionamiento.

¿Qué sistema de análisis seminal, como complemento del microscopio, ayudará a determinar los parámetros de motilidad y concentración del semen Bovino, de manera objetiva y óptima?

1.2 OBJETIVOS

GENERAL

Satisfacer la necesidad de dar soporte a las características habituales estudiadas para la determinación de la fertilidad del semen de los Toros Colombianos en el nodo La Granja del SENA, mediante un sistema computarizado de análisis seminal C.A.S.A., que permita el uso apropiado del microscopio de contraste de fase de forma rentable.

ESPECÍFICOS

Adquirir las señales a través de una tarjeta de video externa, conectada a una cámara para microscopio, a través del puerto USB y digitalizarlas para procesarlas como herramienta clave en la determinación del nivel de fertilidad.

Programar un discriminador de imágenes que determine parámetros asociados a motilidad y concentración, características que tienen como resultado la evaluación de la fertilidad para fines educativos.

Establecer una interfaz gráfica con el operario que le permita adquirir las imágenes requeridas y pedir al software los valores de cada característica.

1.3 ALCANCE

El sistema será adaptable a cualquier microscopio de contraste de fase (40x) y trabajará incluso reemplazando cualquier parte del sistema por un símil (por ejemplo: cambiando de computador).

El sistema será un apoyo para la medición de características espermográficas y de forma complementaria, una referencia para la determinación del nivel de fertilidad por parte del experto, ya que debido a impactos sociales (como el desplazamiento del recurso humano en el laboratorio para ser sustituido por computadoras), la medición subjetiva es completamente válida y por tanto éste sistema requerirá de operario e interpretador.

Se garantizará su correcto funcionamiento para el semen Bovino que es el usado para fines educativos en el SENA del Espinal.

Las características que serán apoyadas por el software son: Motilidad colectiva (a partir de la medición de motilidad individual) dada en tipo de espermatozoides que predominan, concentración y promedio de espermatozoides totales eyaculados (basados en dato de volumen ingresado).

Adicionalmente se hará distinción de las muestras de espermatozoides con problemas de motilidad (espermatozoides muertos o que se muevan con problemas), mostrando en ellos una motilidad con la clasificación más baja, indicando así su estado defectuoso.

1.4 MARCO DE REFERENCIA

En 1931, Moench y Holt, establecen nominalmente criterios detectables en el semen humano que garantizaban la fertilidad del hombre, pero en 1945 se redefinieron los valores debido a que pruebas más avanzadas basadas en el ATP de las células, hechas por Harvey y Jackson, sugirieron que los valores nominales debían ser inferiores; en 1951 se empieza a hablar de motilidad como característica de compensación en la fertilidad, donde MacLeod informa que un buen nivel de espermatozoides motiles compensaba una baja densidad en el análisis de fertilidad.^[3]

Hasta este momento, se trabajaba con gráficas, tablas y resultados de estudios como bases de datos, pero con el desarrollo de las computadoras, los sistemas de cálculo, las interfaces gráficas y códigos de procesamiento de imágenes, unas décadas después se presentan los primeros sistemas de apoyo para los laboratorios.

Estos fueron los inicios de los análisis en otras especies y de donde se parte para establecer una herramienta como es hoy el sistema C.A.S.A., del cual, el primer registro de software oficial data de 1977 con la capacidad de determinar motilidad y concentración de forma simultánea, presentado por Liu y Warne.^[4]

El producto, fuera de los dispositivos de intermediación entre señal y equipo (PC), es el software C.A.S.A que será programado para medir y analizar características del semen, para este caso, bovino, bajo los criterios de la documentación y estudios previos trabajados en el SENA “La Granja” del Espinal Tolima, de los cuales se van a tener en cuenta los siguientes criterios:

- TESIS: EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD Y VIALIDAD DEL SEMEN BOVINO MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS CASA Y CITOMETRÍA DE FLUJO: IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS. *Dr. Rodrigo Muiño Otero - Universidad de Santiago de Compostela.*

De la cual principalmente se obtendrán los parámetros de eyaculación y concentración espermática (donde se hace referencia a los posibles errores en la medición manual), la evaluación de la calidad del semen (donde se referencian conclusiones de estudios sobre cómo interpretar la motilidad, la concentración y la morfología de los espermatozoides), evaluación de la motilidad con sistemas C.A.S.A. y conceptualización de motilidad total y progresiva, y sus características (velocidad curvilínea, rectilínea, media, entre otras) que van a ser uso de la creación del algoritmo para medir estos parámetros, y finalmente referencias de algunos de los inconvenientes de los sistemas C.A.S.A. a ser superados en el proyecto.

- Testing of Accubead in: Tomlinson MJ, Pooley K, Simpson T, *et al.* (April 2010). "Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms". *Fertil. Steril.*

Un estudio hecho con la intención de determinar mediante algoritmos de rastreo multiparámetros si se es fértil o no.

Conclusión: El sistema CASA permitió proveer las medidas de calidad del semen en cuanto a concentración de esperma y motilidad que apenas son medibles actualmente por métodos manuales.

Del cual se estudiarán los principios de los algoritmos de procesamiento de imágenes que se mencionan ya que no se dan los algoritmos como tal, sus bases sirven para el diseño de uno nuevo.

- Se usarán los conocimientos obtenidos en el curso de la carrera de Ingeniería Electrónica acerca de procesamiento de imágenes con las herramientas en el software de programación MATLAB (*image acquisition toolbox*), al igual que los estudios de bioelectrónica y electromedicina que servirán de base para el entendimiento y producción del código final.

1.5 ESTADO DEL ARTE

Entre los desarrollos de sistemas de asistencia para el análisis computarizado de semen de animales, especializados en bovinos y con relación al proyecto C.A.S.A. se encuentran los siguientes desarrollos que incluyen las características de diseño de cada empresa debido a cada una de sus investigaciones, avances y algoritmos:

- Software IDA de minitüb de Alemania:

...”El software IDA de laboratorio es un programa computacional flexible y modular para acompañar el proceso de producción de semen bovino. Con la aplicación de este programa, todos los pasos de colección y procesamiento de semen son estandarizados y optimizados, constituyendo un sistema verdaderamente integrado. Este sistema integrado está compuesto por una red de periféricos computacionales, de análisis de semen y sistemas de producción y otros hardwares que facilitan el manejo de datos desde la colección, a través del análisis y producción, hasta los controles de calidad y estadística. IDA es una aplicación basada en Windows con una base de datos de Access.

No sólo está disponible como un paquete completo. Para quienes que encuentran al software IDA demasiado amplio, tienen también disponibles diferentes módulos que pueden complementarse en cualquier momento.

Debido a este concepto flexible, el sistema IDA puede elegirse, combinarse y adaptarse individualmente en forma específica para cada laboratorio. Periódicamente se dispone de actualizaciones del programa y

Minitüb proporciona a sus usuarios el soporte técnico a nivel mundial.

Con el paquete de software completo, el proceso entero es sostenido y documentado por un solo sistema, desde la identificación del toro a los registros de eyaculados, a través de una correcta rotulación de las pajuelas de semen. Reportes específicos a la necesidad del usuario permiten una visión rápida y en cualquier momento durante y después de la producción en cada uno de los equipos periféricos dentro de la red. Los datos de producción son transferidos a los departamentos de venta y administración en tiempo real. Toda la información puede ser transferida a Excel y otras aplicaciones. IDA, a través de esto, mejora la rapidez y eficiencia de la producción y reduce las posibilidades de errores humanos. Mejora la comunicación dentro de la compañía y proporciona en tiempo real información sobre el rendimiento de los toros a cada uno de los conectados al programa de red. La base de datos de Access hace posible la combinación con otras aplicaciones de software.

IDA automatiza el análisis de eyaculados, el dispensado de diluyente, el envasado del semen en pajuelas, como también el manejo de registros de controles de semen descongelado: con el modo de trabajo activo, la lista de colecciones del día y los datos de producción del momento son mostrados en el monitor. Para cada nuevo eyaculado se abre un nuevo archivo de partida.”^[1]

Las mediciones efectuadas por instrumentos integrados al sistema (p. Ej. el fotómetro y la balanza), son automáticamente transferidas al PC e ingresadas al archivo de partida correcto. Dependiendo de las configuraciones individuales de software, pueden ingresarse otros datos manualmente. Luego se efectúa el cálculo de dilución y el proceso continúa con un equipo de dilución automática de semen y la transferencia de información al equipo de envasado.”...^[5]

- Sistema de Software y hardware ISASPsus complementario para microscopios:

...”Los sistemas CASA llevan más de 25 años en el mercado, pero no han conseguido el nivel de implantación que se presupuso al inicio. Ello se debe a su considerable costo y a su escasa versatilidad.

Por ello, el nombre de **Integrated Semen Analysis System (ISAS®)** se escogió con la intención de marcar la voluntad de desarrollar un sistema realmente integrado, que incluya todos los componentes del análisis seminal, adecuándose a las necesidades de cada tipo de usuario.

ISAS es una familia de aplicaciones y componentes de laboratorio.

Las aplicaciones de la familia **ISAS** operan con:

- Cámaras digitales y analógicas
- Ordenadores de escritorio y portátiles
- Windows, MAC OS X y Linux.

ISASPsus es el primero de una serie de productos específicos para el área de la producción ganadera.

Con estos sistemas se puede obtener el cálculo de las dosis de inseminación con un solo clic, incluyendo el análisis automático de:

- Concentración
- Movilidad
- Progresividad
- Morfología normal
- Dosificación

Todo ello se consigue en menos de dos segundos por campo, en un entorno cómodo y con la mayor precisión y repetitividad.

Donde otros equipos hacen cálculos "oscuros", este sistema permite la visualización de todo el proceso de análisis, permitiendo la máxima claridad y objetividad."...^[6]

1.6 ALTERNATIVAS DE SOLUCIÓN

Como solución al problema se plantean las siguientes alternativas:

- Importar el software IDA de minitüb Alemania que requiere adquisición de dispositivos complementarios como un Fotómetro SDM5, un Sistema automático de envasado, sellado e impresión y un SmartDispenser. Costo aproximado incluyendo impuestos y envío: \$50.000.000 COP.
- Comprar a ANDITECNICA de Medellín el software SPERM VISION PRODUCTION PLUS que es importadora directa de minitüb en Colombia, incluye un tasador para poder garantizar la correcta medición pero NO incluye otros elementos necesarios para el desarrollo correcto del software dentro de la venta del mismo, como Pipeta Electrónica, Cargador para Pipeta, Pipeta para llenar cámara de recuento Costo incluyendo envío: \$50.000.000 COP.

- Desarrollar un software puntual basado en procesamiento de imágenes como alternativa económica para la educación, midiendo las mismas características principales que los anteriores, flexible y de lenguaje abierto a trabajos posteriores por parte del cliente sobre el software, que requiere como dispositivos adicionales fuera de lo ordinario (computador, cámara RCA) solo de una tarjeta de adquisición externa (costo comercial de la tarjeta \$50.000 COP).

A su vez, para el software existen diferentes opciones como plataforma para el desarrollo en lenguaje de alto nivel trabajado durante el estudio del programa de Ingeniería Electrónica en la Universidad de Ibagué:

- MATLAB de MathWorks. Trabaja con editor en textos y con interfaz gráfica, incluyendo compatibilidad con la mayoría de las versiones del sistema operativo Windows. Tiene la posibilidad de acceso a periféricos que facilita la inclusión de la tarjeta de video externa; además es un software apto para educacional, y siendo el cliente el centro de aprendizaje del SENA, esto sería favorable. (costo comercial de la licencia profesional de la versión más reciente emitida \$ 4.860.400 COP). Anexo A.
- VisualBasic de Microsoft. Trabaja con interfaz gráfica pero basado en eventos y especial para bases de datos, teniendo la posibilidad de desarrollar el sistema C.A.S.A. por secciones, haciendo necesario un trabajo adicional que es el de enlazar antes de depurar el programa. Entre sus inconvenientes se encuentra el soporte pobre para programación orientada a objetos, y como se va a trabajar con imágenes, esto sería un motivo para descartar esta plataforma.^[7]

1.7 SELECCIÓN DE LA MEJOR ALTERNATIVA

Se selecciona como alternativa de solución la última, que consiste en el diseño de un software propio, ya que no necesita dispositivos exclusivos adicionales, y es la opción que satisface puntualmente la necesidad inmediata, ofrece la posibilidad de funcionar como software educacional, lo cual es una de las actividades desempeñadas en el SENA, y además es la más económica, siendo la óptima en costo/beneficio, además se incluye la asesoría directa por

parte del desarrollador, instalación y tutoría de uso profundo del software, porque por su código abierto puede ser usado para desarrollos futuros individuales como parte de la formación integral de los estudiantes.

La plataforma en la que se decide desarrollar el software es MATLAB por ser fuerte en procesamiento de imágenes, también debido a que no hay restricción en el tipo de software para desarrollar el código como solución del problema, y porque permite hacer parte de la formación de profesionales, que en este caso, relacionarán procesos de laboratorio con tecnología de asistencia por computador y podrán profundizar en cada herramienta usada en el código ya que el software MATLAB incluye documentación explícita y con ejemplos de cada instrucción.

2. DESARROLLO DEL TRABAJO

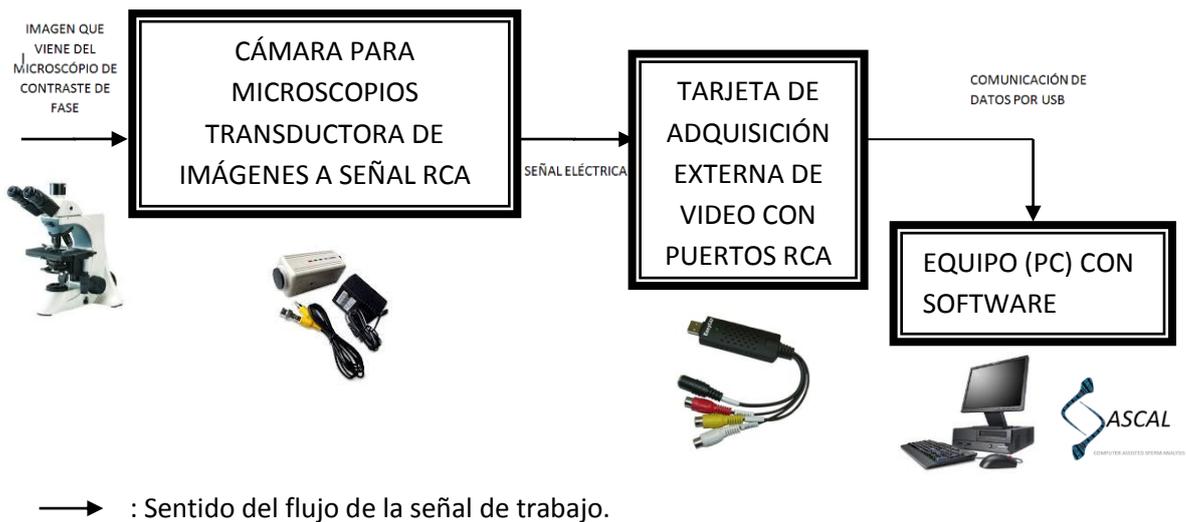
Un microscopio de contraste de fase permite observar células a escalas mayores o iguales 40x, que no estén afectadas por tinciones, y resulta especialmente útil para células vivas. Su funcionamiento, a grandes rasgos, se basa en las pequeñas diferencias de los índices de refracción en las distintas partes de una célula y en distintas partes de una muestra de tejido. La luz que pasa por regiones de mayor índice de refracción experimenta una deflexión y queda fuera de fase con respecto al haz principal de ondas de luz que pasa por la muestra. Empata otras longitudes de onda fuera de fase por medio de una serie de anillos ópticos del objetivo y del condensador, anulando así la amplitud de la porción fuera de fase inicial del haz de luz y produce un contraste útil sobre la imagen. Las partes oscuras de la imagen corresponden a las porciones densas de la muestra; las partes claras de la imagen corresponden a porciones menos densas. Por lo tanto estos microscopios se utilizan para observar células vivas, tejidos vivos y cortes semifinos no coloreados, que para el caso, son células sexuales del macho Bovino y que a esa escala de acercamiento, permite determinar los valores de concentración y motilidad del esperma, lo cual está directamente relacionado con la fertilidad seminal, ya que, a mayor concentración y motilidad en su semen, se considera que un macho es más fértil y capaz de transmitir a su descendencia las características que lo destacan físicamente en el campo de la ganadería.^[8]

El nodo “La Granja” del SENA adquirió una cámara para microscopio genérica, que se ubica sobre un espacio en la parte superior de los lentes de forma que

convierte las imágenes vistas en señales eléctricas por un cable con conector RCA macho.

De esta forma, como se había planteado, debe ser posible conectarlo a cualquier PC dentro de los parámetros establecidos para ejecutar el programa (Windows XP o posterior, entradas USB 2.0, y demás características de los PC comerciales) para lo cual se adquirió una tarjeta de video externa, es decir, si un PC tiene salida de video pues ahora necesitamos una entrada de video, y es ahí cuando la EasyCAP^[3] es la mejor solución.

Figura 1. Diagrama de bloques funcional



Fuente: Anteproyecto de Tesis Software C.A.S.A.

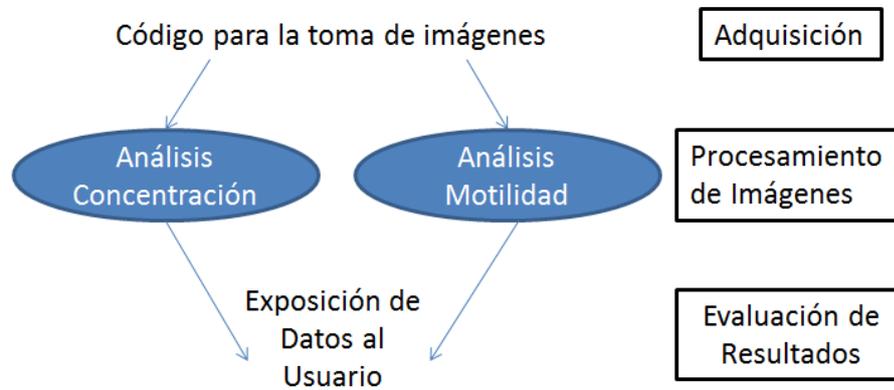
Con los drivers incluidos y la conexión exitosa de la cámara del microscopio al PC como se ve en la Figura 1, se procede a desarrollar el programa (.m) en MATLAB R2011a (funcionando para versiones posteriores), para lo cual se divide en etapas que luego convergen y se reducen a un sistema más sólido que es el software final.

2.1 DISEÑO DEL PROGRAMA

El código debe contener las etapas de adquisición, de análisis de ambas características (motilidad y concentración) y una sección grafica que haga fácil al operario acceder a las diferentes opciones.

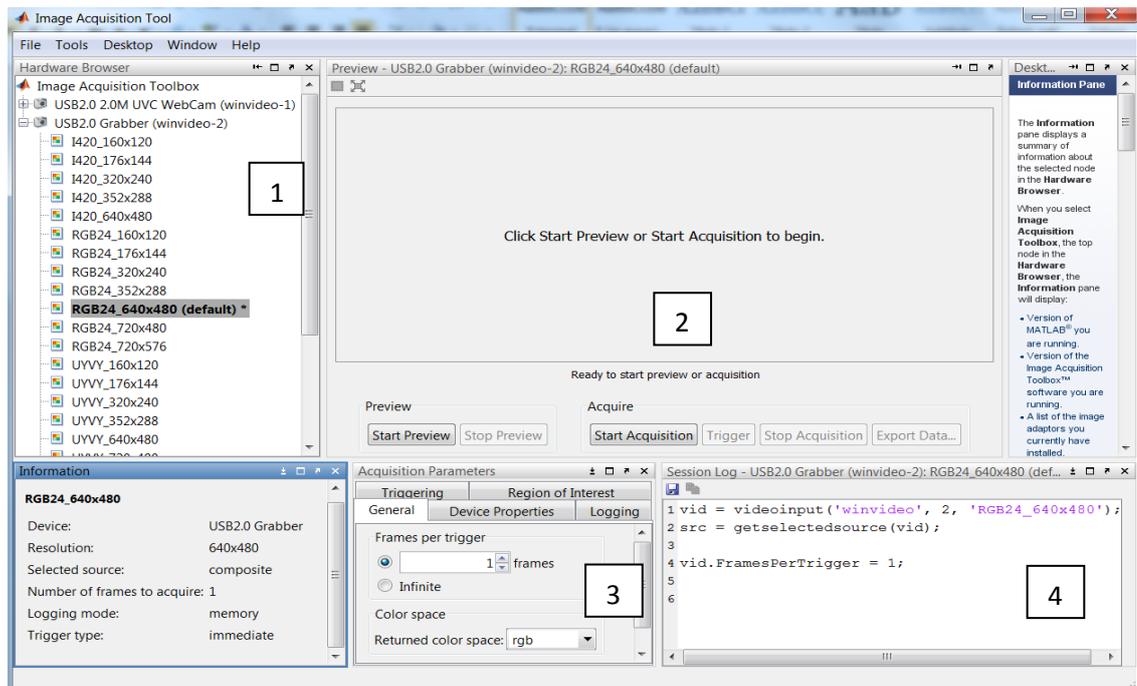
Inicialmente se realiza la etapa de adquisición para tomar muestras en video y poder realizar algoritmos que distingan los parámetros en cada muestra realizando finalmente uno común.

Figura 2. Diagrama general del programa



2.1.1 Adquisición de las imágenes. Para esta etapa se hace uso de la documentación en ayuda del programa MATLAB que recomienda el uso de una herramienta asistida bajo el código **imaqtool** (ver Figura 3), que muestra los dispositivos asociados a imágenes y video conectados en ese momento (webcam, cámaras digitales y en este caso la EasyCAP) y permite adquirir imágenes desde ellos.

Figura 3. Interfaz imaqtool



Fuente: Captura de pantalla desde MATLAB.

Marcados sobre la imagen (Figura2) se encuentran 4 zonas de interés:

La primera corresponde a la identificación de los dispositivos de video conectados en ese momento (webcam y tarjeta de video de entrada se detallan en esta zona), igualmente se puede observar que identifica las resoluciones posibles para la adquisición de las imágenes, en donde se selecciona la resolución estándar VGA (640x480 RGB) que es la más común entre las pantallas de video, garantizando así que se podrá trabajar con cualquier pantalla comercial.

La segunda zona de interés es la de previsualización, en donde se mostrará en vivo lo que percibe la cámara y a su vez se puede iniciar la adquisición, detenerla, hacer un disparo (*trigger*) para captura de imagen en el caso en que se esté capturando un video y finalmente donde se puede exportar la adquisición en varios formatos de los cuales se destacan:

- Imagen .jpg o .png si se programa un solo disparo en la zona 3.
- Video .wmv o .avi si hay más de un disparo.
- Variable .mto M-file si se desea cargar y procesar posteriormente en el espacio de trabajo del programa.

La tercera zona, es la que corresponde a la configuración antes de la adquisición; por defecto se establece en formato de colores RGB, 1 cuadro por disparo lo cual corresponde a una imagen y otras opciones acerca del área de interés, propiedades de dispositivo, registro y tiempos entre disparos que no son de interés para el desarrollo del proyecto.

La cuarta zona es la que corresponde a la conversión de todas las opciones seleccionadas a código de trabajo, es decir, usando esta información registrada en la zona 4 se puede generar un código que adquiera la señal ya sea imagen o video (conjunto de imágenes) sin tener que usar la interfaz de imaqttool y haciendo automático el proceso para que lo use el operario sin cambiar las opciones estándar.

Es aquí donde surge el código para la adquisición, según ese registro las líneas de código que sirven para establecer la configuración son las siguientes:

```
1- vid = videoinput('winvideo', 2, 'RGB24_640x480');
2- src.FrameRate = '30.0000';
3- src = getselectedsource(vid);
```

En la primer línea de código, se encuentra establecido el origen de la señal, donde 1 es la webcam del PC y 2 la EasyCAP.

En la segunda línea de código, se encuentra un parámetro por defecto que es el de la tasa de cuadros por segundo establecida para imágenes como las de la televisión (30FPS), a su vez esto no quiere necesariamente decir que se

tomaran 30 imágenes por segundo sino que la señal de video se procesará bajo esa tasa.

Cabe aclarar, que la tasa por defecto de la captura de imágenes es de 4.95 FPS en MATLAB, lo cual puede ser visto al exportar un video a .avi y observando sus propiedades en el explorador de Windows.

```
4-   vid.FramesPerTrigger = xxxxx;  
5-   preview(vid);  
6-   tic;  
7-   start(vid);  
8-   wait(vid,xxx)  
9-   time=toc;  
10-  stoppreview(vid);  
11-  closepreview(vid);  
12-  m = getdata(vid);  
13-  sqrtime=time/xxxxx;
```

Aquí se configura y personaliza la captura de forma que sea automática al ejecutarse, y en la línea 4 se establece cuantas capturas se realizarán, lo cual obedece a un estudio relacionado en el desarrollo del código para el parámetro de concentración.

En la quinta línea, se inicia una previsualización para que el operario conozca que inició la adquisición de imágenes, a su vez, es necesario conocer el tiempo que toma la adquisición para conocer los intervalos entre cada imagen (debido a que un video es una sucesión de imágenes), así que se hace una ejecución al temporizador interno de MATLAB (tic-toc), de esta forma, se puede usar el tiempo como una variable útil en la motilidad (asociada a la velocidad, que es distancia en tiempo); se inicia la adquisición en la línea 7.

En la línea 8, para evitar ciclos infinitos, se establece un corte a un tiempo un poco mayor a la de la línea 4, en donde se pretende terminar el proceso si ocurre uno de dos eventos de los cuales uno generaría errores, el primero es si se adquirió exitosamente el video (o la imagen) y el segundo es si después de ese tiempo no se completa la adquisición es porque hubo una interrupción externa (como desconectar la EasyCAP) y este corte funcionara como un seguro contra datos erróneos y simplemente terminará el proceso de adquisición.

Se termina la previsualización y se cierra la ventana, volviendo al código donde se asigna la señal adquirida a una variable llamada m.

En la línea 13 se comprueba que los FPS son 4.95 que corresponde al inverso del **sqrtime**.

En este punto, se tiene una variable con xxxxx cantidad de capturas, que puede ser manipulada y analizada para dar como resultado los parámetros que son de interés; el código para la adquisición esta ahora completo.

2.1.2 Concentración. Para el diseño del programa en esta etapa se debe entender el concepto de concentración aplicada en el análisis seminal.

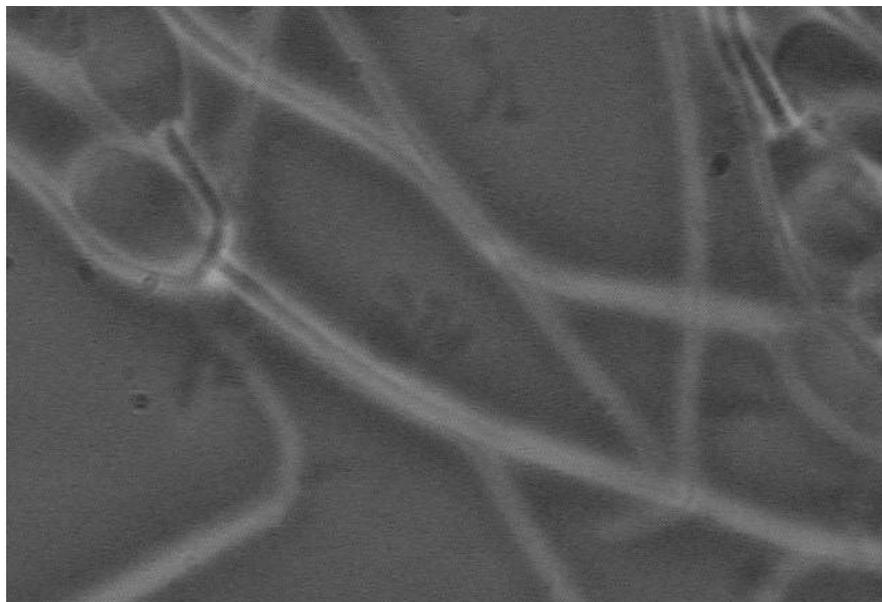
La concentración del semen es la cantidad promedio de espermatozoides que se encuentran por una unidad de volumen determinada, y se expresa comúnmente en millones de espermatozoides por mililitro (esp $\times 10^6$ /ml).

La concentración es una característica propia de cada especie y para esta se establecen rangos, los cuales en Bovinos son de 800 a 1200 esp $\times 10^6$ /ml según la tabla del Laboratorio de Reproducción Animal del SENA, nodo "La Granja" la cual se incluye en el anexo D.^[9]

A su vez hace alusión a qué porcentaje de la muestra son espermatozoides y qué es solamente fluido seminal (donde se incluye todo lo que no sea espermatozoide), de donde se establece que, entre la misma especie, a mayor concentración habrá mayor capacidad de fecundar la hembra Bovina por parte del macho, es decir, el Toro será más fértil.

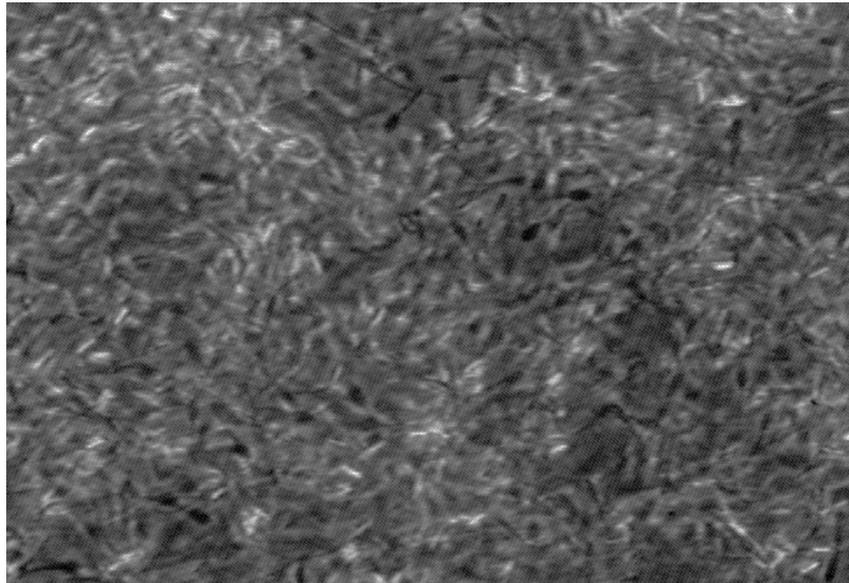
De esta forma la intención del programa será discriminar en la imagen o sucesión de imágenes qué es relevante para la medición de la concentración y qué no.

Figura 4. Espermatozoides Bovinos a 100x



Fuente: Muestras obtenidas con el microscopio de contraste de fase del SENA

Figura 5. Espermatozoides de Carnero a 40x



Fuente: Muestras obtenidas con el microscopio de contraste de fase del SENA

Basándose en las muestras de imágenes tomadas, se puede observar (ver Figura 4 y 5) que los espermatozoides sin importar la especie, se diferencian del líquido seminal por un color más claro (mediante los marcadores de imagen de MATLAB se verifica que varían 2 tonos entre el más claro correspondiente al espermatozoide y el menos claro de los espermatozoides) que los rodea o hace parte de ellos mismos, de hecho, en el software se pueden usar los bordes para discriminar e identificar las áreas de interés e identificar qué área de la imagen son espermatozoides, lo cual es posible aprovechando el principio de índices de refracción del microscopio de contraste de fase.

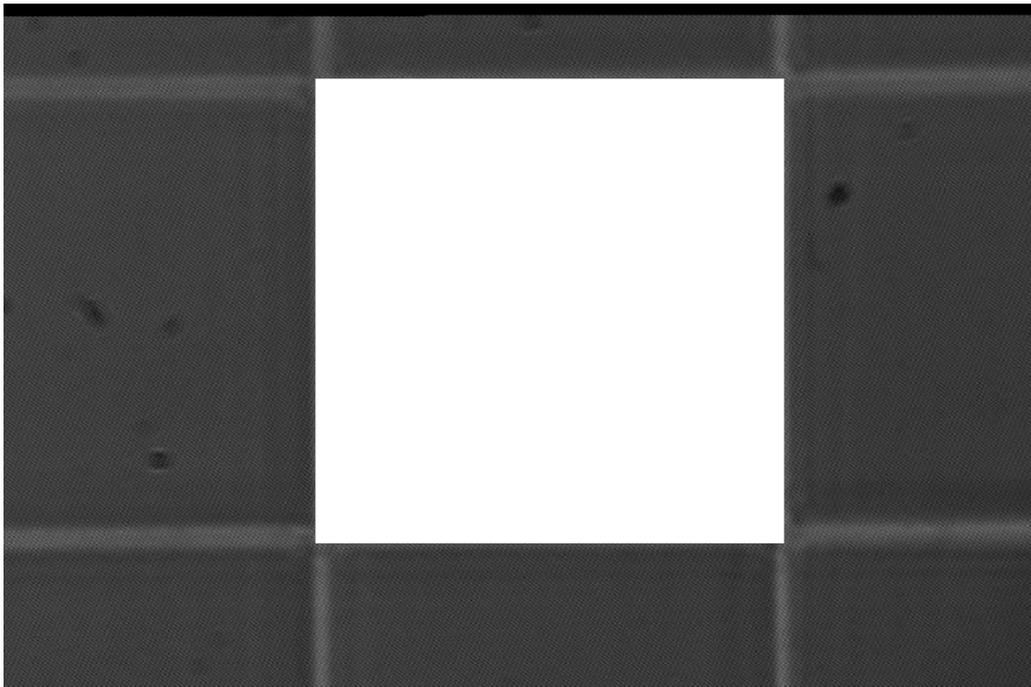
Bajo esta lógica, se procede a desarrollar un algoritmo discriminador que pueda separar los espermatozoides del líquido seminal y a su vez complete las áreas internas de los espermatozoides, luego se hace un conteo de píxeles y se compara con el total de píxeles que contiene la imagen completa, estableciendo una proporción de espermatozoides en la muestra; además se podrá utilizar una herramienta muy útil y comercial en el campo de los laboratorios de análisis seminal, la Cámara de Neubauer.

La Cámara de Neubauer posee un cuadrado primario que contiene nueve cuadrados secundarios cada uno de ellos divididos a su vez en 16 cuadrados terciarios, el cuadrado central contiene 25 cuadrados, cada uno de ellos dividido a su vez en 16 cuadrados cuaternarios, sobre uno de estos cuadrados cuaternarios se trabaja a 40x y se tiene una forma de acotar la medición a valores conocidos ya que este cuadro central mide 0.05mm x 0.05mm (ver Figura 6.^[10])

A este aumento la cámara ocupará un área de 295 píxeles por 295 píxeles (87025 píxeles²) y un espermatozoide bovino 90 píxeles², esto se obtiene de la forma de cabeza ovalada del espermatozoide y la forma de rectángulo si se desenrolla la cola (ver Figura 7) mediante un cálculo de área de un elipse y de un rectángulo.

En la Figura 7 se muestra resaltado en blanco el espacio en píxeles que ocupa un espermatozoide bovino a 40x.

Figura 6. Cámara de Neubauer a 40x sin espermatozoides – Camara.tif



Fuente: Muestras obtenidas con el microscopio de contraste de fase del SENA

Figura 7. Píxeles de un espermatozoide a 40x – Imagen aumentada



Fuente: Muestras obtenidas con el microscopio de contraste de fase del SENA

También se tiene en cuenta para calcular la concentración, un cálculo hecho sobre la Cámara de Neubauer, que será la Ecuación 1.

Se utilizan los cálculos establecidos para el cuadro central (uno de los 9 secundarios).^[10]

Calculamos el Volumen en ml:

$$2,5 * 10^{-4} \text{ cm} \times 2,5 * 10^{-4} \text{ cm} = 6,25 * 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ de superficie}$$

$$6,25 * 10^{-8} \text{ cm}^2 * 0,01 \text{ cm (profundidad)} = 6,25 * 10^{-10} \text{ cm}^3$$

$$6,25 * 10^{-10} \text{ cm}^3 = 6,25 * 10^{-10} \text{ ml}$$

Como se trabaja en uno de los cuadros cuaternarios, hay que dividir la ecuación en 25 (porque el cuadro central se divide en 25) y luego en 16 (porque cada cuadro terciario se divide en 16 cuaternarios y se está trabajando en uno de ellos).

Ecuación 1. Concentración en cuadros cuaternarios de la Cámara de Neubauer^[10]

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Total Células Contadas}}{\text{Número de Cuadrados} \times \text{Volumen}}$$

Para el caso se usa un solo cuadro ya que se acota la imagen o video a los pixeles que equivalen al cuadro cuaternario de la cámara.

Las células contadas, se pueden determinar mediante el total del área que equivale a espermatozoides sobre el área que ocupa un espermatozoide.

Reemplazando en la Ecuación 1 los datos conocidos hasta el momento:

$$\text{Concentración (esp/ml)} = \frac{\text{Total Células Contadas}}{25 * 16 \times 6,25 * 10^{-10}}$$

$$\text{Concentración (esp/ml)} = \text{Total Células Contadas} \times 4 * 10^6$$

Existe un pequeño margen de error que se da cuando un espermatozoide cruza bajo otro y no se tiene en cuenta como otra célula contada o no completamente, lo cual es reducido al realizar varias tomas que al final se promedian dando un resultado de mayor precisión que si se hiciera en una sola imagen.

Éste método tiene un error menor al 9% si se cuentan más de 500 células, lo cual es posible, si se tiene en cuenta que el mínimo contable es de 5 espermatozoides por cámara, tomando 100 imágenes en secuencia y analizándolas.^[11]

Para continuar reduciendo errores, hay que saber que la cámara introduce puntos pimienta que permanecen constantes en las imágenes y pueden ser eliminados mediante el mismo método con el cual se puede ajustar la imagen para la discriminación previamente dicha, así que se usa una máscara borrosa o máscara promedio.^[12]

La máscara funciona como se observa en la Figura 8.

Figura 8. Filtro promedio en una imagen a color



Fuente: <http://www.librow.com/articles/article-5>

Se compone de una matriz con partes que tienen el mismo valor, el cual se ajusta mediante pruebas, aunque una estándar es la matriz 1/9.

$$\text{Average} = \begin{bmatrix} 1/9 & 1/9 & 1/9 \\ 1/9 & 1/9 & 1/9 \\ 1/9 & 1/9 & 1/9 \end{bmatrix}$$

Ahora se desarrolla el código con los puntos planteados anteriormente.

```
1- a=m(65:360,190:485,:);
2- in=size(m);
3- cam1=imread('camara.tif');
4- cam=rgb2gray(cam1(65:360,190:485,:));
5- [f,c,i]=size(cam);
6- for b=1:1:in(4)
7- a(:,:,1,b)=rgb2gray(a(:,:,1,b));
8- end
9- mask=[1/9 1/9 1/9;1/9 1/9 1/9;1/9 1/9 1/9];
10- for b=1:1:in(4)
11- for i=2:1:f-1
12- for j=2:1:c-1
13- a1(i,j)=uint8(a(i-1,j-1,1,b)*mask(1,1) +
14- a(i-1,j,1,b)*mask(1,2) + a(i-1,j+1,1,b)*mask(1,3) +
15- a(i,j-1,1,b)*mask(2,1) + a(i,j,1,b)*mask(2,2) +
16- a(i,j+1,1,b)*mask(2,3) + a(i+1,j-1,1,b)*mask(3,1) +
17- a(i+1,j,1,b)*mask(3,2) + a(i+1,j+1,1,b)*mask(3,3));
18- a2(i,j,1,b)=a1(i,j);
19- end
20- end
21- se = strel('disk',11);
22- tono1 = imerode(a2(:,:,1,b),se);
23- tono2(b)=max(max(tono1))-2;
24- conc(b)=0;
25- for l=1:1:f-1
26- for k=1:1:c-1
```

```

27-  if (a1(l,k)<tono2)
28-    a1(l,k)=0;
29-  end
30-  if (a1(l,k)>=tono2)
31-    a1(l,k)=255;
32-    conc(b)=conc(b)+1;
33-  end
34-  end
35-  end
36-  conc(b)=100*conc(b)/((f-1)*(c-1));
37-  end
38-  o=0;
39-  for g=20:1:80
40-    if ((conc(g)>=mean(conc)))
41-      o=o+1;
42-      conc2(o)=conc(g+1);
43-    end
44-  end
45-  concentracion_porcentaje=mean(conc2);
46-  esp=concentracion_porcentaje*87025/(90*100);
47-  concentracion_ml=esp*4*10^6;

```

En la línea 1 de código, se observa que viene la variable m de una adquisición de video previa con 100 imágenes por disparo y se acota al tamaño de la Cámara de Neubauer para tener control acerca del tamaño y poder establecer la Ecuación 1 de manera apropiada a estas imágenes.

En la línea 4 se convierte a blanco y negro la señal RGB que venía de la adquisición.

En la línea 9 se define la máscara promedio o borrosa de 1/9 y se aplica posteriormente a todos los 100 cuadros del video a través de las líneas 10 a 20.

En las líneas 21 y 22 se utiliza una técnica conocida como erosión para completar las zonas que se encuentren rodeadas por blanco (gris claro) y también determinar el grado de gris que será tomado como espermatozoide (dejando el margen de 2 tonos establecido previamente).^[13]

A partir de esto se evalúan todos los píxeles de cada imagen volviéndolos 1 o 0 lógico (blanco o negro) iniciando en la línea 30, los cuales se suman y equivalen a un porcentaje de la imagen en la línea 36, se deja un margen de 20 imágenes por encima y por debajo, que equivalen a 5 segundos cada una aproximadamente, para evitar movimientos en la cámara y asumir que en estos periodos centrales de tiempo la señal es estable ya que este proceso requiere más estabilidad que la motilidad.

Luego de tener los valores de concentración de cada imagen, se hace una media de los valores y se aceptan valores por encima de esa media (debido a que tenemos en cuenta los espermatozoides que pasan por debajo así que nunca se arrojará por error mayor concentración de la real).

En la línea 45 se tendrá ya un valor de porcentaje promedio referente a la concentración de la muestra que está en video, ahora se procede a dar el equivalente en millones de espermatozoides por mililitro, para lo cual se usa la línea 46 y 47, de las cuales la última equivale a la Ecuación 1.

La concentración es una propiedad independiente del volumen de la muestra o el eyaculado a este punto debido a que se conserva la relación y establece a partir del código, qué tanto porcentaje de espermatozoides tiene la eyaculación del macho Bovino, lo cual brinda el primer paso para determinar qué tan fértil es.

2.1.2.1 Validación. Usando el video de muestra a40x.avi (adjunto como demo) correspondiente a un análisis bajo la Cámara de Neubauer con espermatozoides bovinos se obtiene el siguiente resultado:

Concentración en porcentaje = 23.8422% (ver Figura 9)

Es decir que del tamaño de la cámara de Neubauer el 23.8% son espermatozoides; como la cámara contiene 87025 (como aparece en el código de la concentración), entonces 20749 pixeles, aproximadamente, serán correspondientes a espermatozoides, y un espermatozoide visualmente abarca 785 pixeles, así que dividiendo los 20749 pixeles en los 90 se tendrá como resultado la cantidad de espermatozoides (células contadas) en el cuadro cuaternario de la cámara en ese momento.

Cantidad de espermatozoides (aprox. por encima) = 230 células

En la Ecuación 1 se reemplazan los datos conocidos a este momento y se tiene:

$$\text{Concentración (esp/ml)} = 230 \times 4 \times 10^6$$

Concentración Teórica (esp/ml) = 920 millones de espermatozoides/mililitro

De manera práctica, como se observa en la Figura 9, se tiene una concentración de $922,165 \times 10^6$ esp/ml, dando así un error solo del 0.2% entre el resultado teórico y el práctico (debido a la aproximación en la cantidad de células), comprobando así que se reduce casi a 0 el porcentaje de error al usar el algoritmo sobre al menos 60 de las 100 imágenes que conforman el video.

Bajo la supervisión e interpretación de la experta capacitada, la Doctora María Helena Colmenares (Directora del Laboratorio de Reproducción Animal del SENA nodo La Granja), con 5 ml de la misma muestra usada para el video a40x, usando las tinciones correspondientes para aumentar el contraste, bajo el funcionamiento del colorímetro local, se obtiene un resultado aproximado de 4450 millones de espermatozoides en el conteo, correspondiente entonces a 890×10^6 esp/ml.

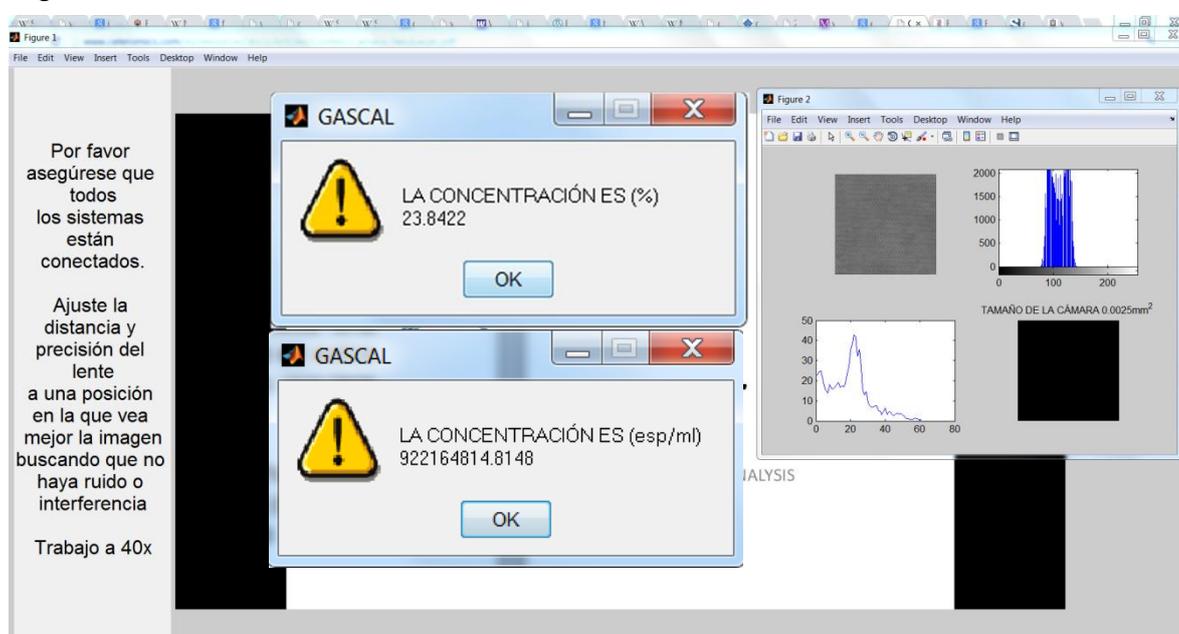
Finalmente, comparando con los datos del laboratorio de reproducción animal del SENA, se obtiene que se encuentra dentro de los márgenes normales para bovinos (de 800 a 1200×10^6 esp/ml en la tabla incluida en el anexo D) y que dentro de estos se encuentra cercano al límite inferior así que no es un macho Bovino que se pueda considerar destacado, en cuanto a fertilidad y capacidad de preñar; así el proceso de determinación de concentración es capaz de asistir en la clasificación de fertilidad en cuanto a esta característica y se considera exitoso y finalizado.^[9]

Tabla 1. Resultado de pruebas de Concentración

EXPERTO	SOFTWARE	RANGO CORRESPONDIENTE	%DIFERENCIA
890 x10 ⁶ esp/ml	920 x10 ⁶ esp/ml	800-1200 x10 ⁶ esp/ml	3,4

El porcentaje de diferencia se debe a que idealmente se asume que la concentración de espermatozoides a lo largo de todo el semen es igual, pero en realidad varía a pequeñas escalas (inferiores al 10%) dependiendo del campo espermático del cual se extrae la muestra.

Figura 9. Resultado del cálculo de concentración en el video de muestra



Fuente: Resultados obtenidos con el video de muestra

2.1.3 Motilidad. Para el diseño del programa en esta etapa se debe entender el concepto de motilidad aplicada en el análisis seminal.

La motilidad es un valor subjetivo que se da alusivo a la cantidad de movimiento de los espermatozoides (ya sea independientemente o en grupo), el tipo de movimiento y la cantidad de espermatozoides que tienen movimiento considerable (lineal y rápido, este, está dividido en categorías establecidas de manera predeterminada dependiendo del movimiento que proporciona la cola:

Tipo A corresponde a los espermatozoides con movimiento rectilíneo a una velocidad mayor de 25 micras/s, frente a las 5-24 micras/s del tipo B los cuales tienen un movimiento sin trayectoria definida, una velocidad inferior a 5 micras/s; los del tipo C, apenas se desplazan aunque sí se detecta movimiento en ellos, y un movimiento nulo para el tipo D. Por tanto, se agrupan en movimientos progresivos (tipo A y B) y no progresivos (C).^[14]

Con estos datos, se establece que un macho Bovino con mayor velocidad en el desplazamiento de sus espermatozoides y con movimiento lineal progresivo será más fértil, en cuanto a motilidad, que uno con características inferiores de velocidad y tipo de movimiento; así la intención del programa será identificar el tipo de movimiento de los espermatozoides que prima en la imagen, basado en la cantidad de movimiento en determinado tiempo (velocidad).

A 4.95 FPS se tiene un tiempo entre imágenes de 0.202 segundos y la idea principal es determinar cuánto movimiento general hubo en el cambio de una imagen a otra y de la misma forma pasar el análisis a todas las imágenes.

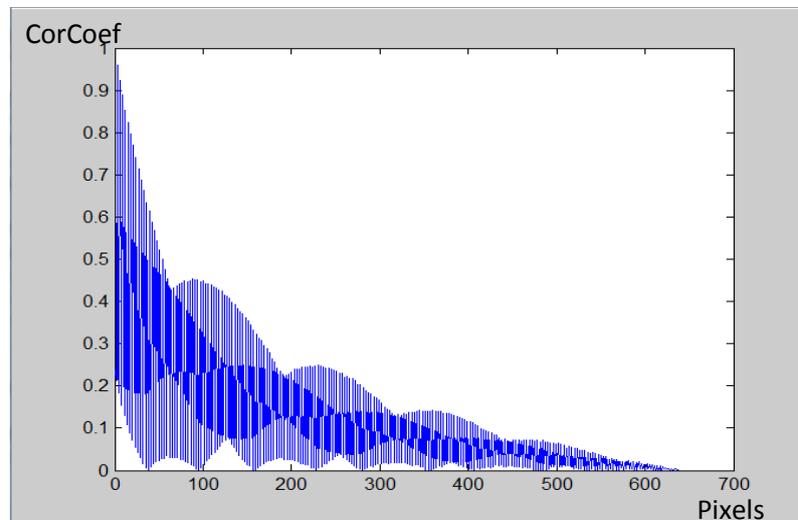
Entre los algoritmos matemáticos que existen para comparación o procesamiento de imágenes, se encuentra la correlación, que aplica de forma óptima al caso ya que genera como resultado un coeficiente que se puede interpretar como qué tan parecida es una imagen a la anterior; de esta forma se pueden generar cambios por cantidad de píxeles en una imagen e ir determinando el coeficiente de correlación entre la nueva imagen (con los píxeles corridos) y la original, dando como resultado una gráfica de píxeles desplazados contra coeficiente de correlación.

Se establece entonces por parte del desarrollador del software, una relación entre correlación y tipo de espermatozoides, a través del procesamiento de imágenes en serie de una muestra, de forma tal que a mayor correlación, hay menor diferencia entre las imágenes, y por tanto, se habrán movido poco los espermatozoides o su movimiento es circular estacionario, brindando esto un apoyo para considerarlos de tipo C o D, mientras que si hay menor correlación entre imágenes, los espermatozoides se habrán desplazado más y su movimiento será aproximadamente lineal de manera que en unas imágenes más adelante, unos cuantos espermatozoide haya salido del cuadro de análisis y a este hayan entrado varios más, pudiendo así clasificarlos entre espermatozoides tipo B y A.

Para hacer posible esto, se toma una (o varias imágenes de forma separada) y se ingresan columnas o filas de nuevos pixeles, indicando que la imagen completa se movió un pixel en alguna dirección, aprovechando el hecho de que la correlación tiene el mismo coeficiente sin importar la dirección, es decir, si se mueve el conjunto de espermatozoides un pixel hacia arriba generará el mismo coeficiente de correlación, o muy aproximado (variación menor al 10%), que si se moviera para abajo o hacia alguno de los lados la misma cantidad de pixeles; al ingresar nuevas columnas, lo cual se hace por concatenación y posterior eliminación de las columnas del otro lado sobrantes, se va ejecutando el comando de correlación de MATLAB que dará un coeficiente para este movimiento.

Realizando las pruebas en las 100 imágenes de los videos muestra, se tiene una gráfica que puede ser ahora generalizada para este nivel de zoom y tipo de señal por medio de una regresión exponencial decreciente o logarítmica.

Figura 10. Gráfica coeficiente de correlación contra pixeles desplazados



Fuente: Modelos y pruebas incluidas en el producto final

La Figura 10 será entonces la gráfica útil para la interpretación de la cantidad de pixeles que se movieron en promedio en las imágenes del video basados en la correlación de estas.

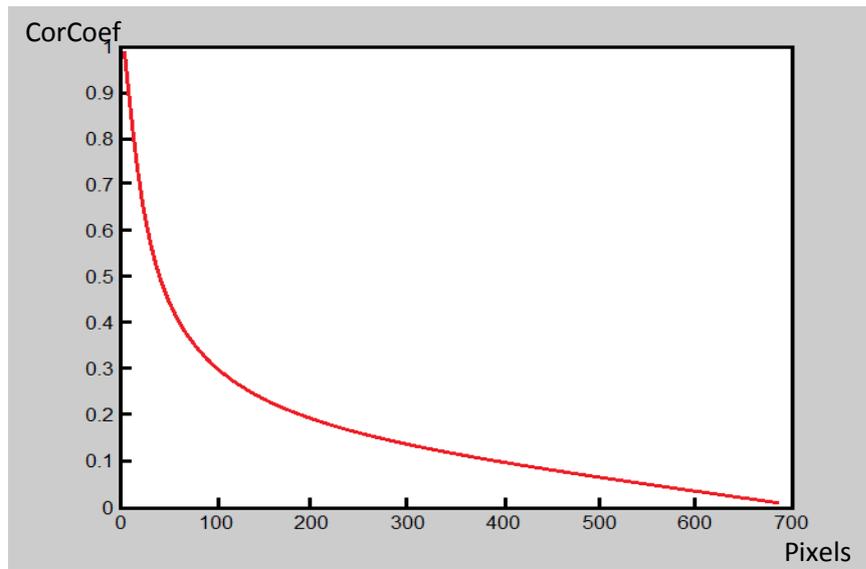
La velocidad promedio será entonces el promedio entre los movimientos en pixeles entre cada una de las imágenes consecutivas de un video.

Ecuación 2. Velocidad promedio de los espermatozoides ($\mu\text{m/s}$)

$$Velocidad = \frac{Pixeles \times 0.05 \times 1000}{295}$$

Fuente: Longitudes de la Cámara de Neubauer

Figura 11. Gráfica coeficiente de correlación contra pixeles desplazados con regresión exponencial decreciente o logarítmica



Fuente: Modelos y pruebas incluidas en el producto final

En la Ecuación 2, se observa relacionada la cantidad de píxeles que se movieron de acuerdo a la interpretación en la gráfica y los 0.05mm de longitud de una de los lados de la Cámara de Neubauer que a su vez, de la sección de concentración, se tiene que corresponden a 295 píxeles; además el dato final de velocidad es en micrómetros por segundo, así que se multiplica por mil.

Teniendo la velocidad ya se puede clasificar el tipo de movimiento de la mayoría de los espermatozoides de acuerdo a las clasificaciones A, B, C y D previamente mencionadas.

Se tiene en cuenta que la gota de muestra se puede estar moviendo por simple efecto interno de fluido en contacto con una superficie así que se agrupa el tipo C y D en uno solo queriendo decir que hay muy poco o nulo movimiento.

Se debe tener en cuenta, que como lo planteado en los alcances y en los impactos sociales, este programa servirá como apoyo para un intérprete operativo, de forma que a partir de los datos de velocidad se da un valor a la motilidad, es decir, si tipo A son los mejores tendrá un valor relativamente alto en una escala de 1 a 100, por ejemplo 80, el tipo B corresponderá a valores aproximados entre 50 y 75 y los tipo C y D a valores inferiores o nulos, de esta forma se sigue cumpliendo la definición de motilidad como un valor dado de forma subjetiva al movimiento de una muestra solo que ahora se tiene un apoyo más para dar ese valor.

Se procede ahora a convertir todos los puntos planteados a código.

```

1-   a=m;
2-   sqrtime=0.202;
3-   in=size(m);
4-   [f,c,i]=size(m(:,:,,:));
5-   for b=1:1:in(4)
6-       a(:,:,1,b)=rgb2gray(a(:,:,,b));
7-   end
8-   cormot=0;
9-   for b=6:1:100
10-      cormot(b-5)=corr2(a(:,:,1,b),a(:,:,1,b-5));
11-   end
12-   load graficamotilidades.mat
13-   correlacion=mean(cormot);
14-   plot(cormot);
15-   imread('corre.jpg');
16-   imshow('corre.jpg')
17-   warndlg({'Correlacion',num2str(correlacion)},'GASCAL')
18-   prompt = {'Píxeles Respectivos'};
19-   dlg_title = 'Valor en Pixels';
20-   num_lines = 1;
21-   def = {'0'};
22-   options.Resize='on';
23-   options.WindowStyle='normal';
24-   options.Interpreter='none';
25-   answer = inputdlg(prompt,dlg_title,num_lines,def,options);
26-   pix=str2num(cell2mat(answer(1)));
27-   vel=pix*50/295;
28-   if vel>100
29-   else
30-   if vel>25
31-       tipo='tipo A con velocidad mayor a 25 micras/s';
32-   else
33-   if vel>5
34-       tipo='tipo B con velocidad de 5 a 24 micras/s';
35-   else
36-       tipo='tipo C o D con velocidad aprox. 0 micras/s';
37-   end
38-   end
39-   end
40-   warndlg({'Tipo de espermatozoides motiles',tipo})
41-   imread('tabla.jpg');
42-   imshow('tabla.jpg')

```

En la línea 1 de código se observa que viene la variable m de una adquisición de video previa con 100 imágenes por disparo (lo cual equivale al número xxxxx) y debido a que aún no se ha incluido la etapa de adquisición aquí pues se debe definir un tiempo entre cuadros que por ser estándar el 4.95 FPS será 0.202 segundos, así para 100 el tiempo total de la toma será de 20.2 segundos

(el número xxx deberá ser un poco mayor, al menos 20% mayor por tanto se establece en 25 segundos).

En la línea 6 se convierte a blanco y negro la señal RGB que venía de la adquisición.

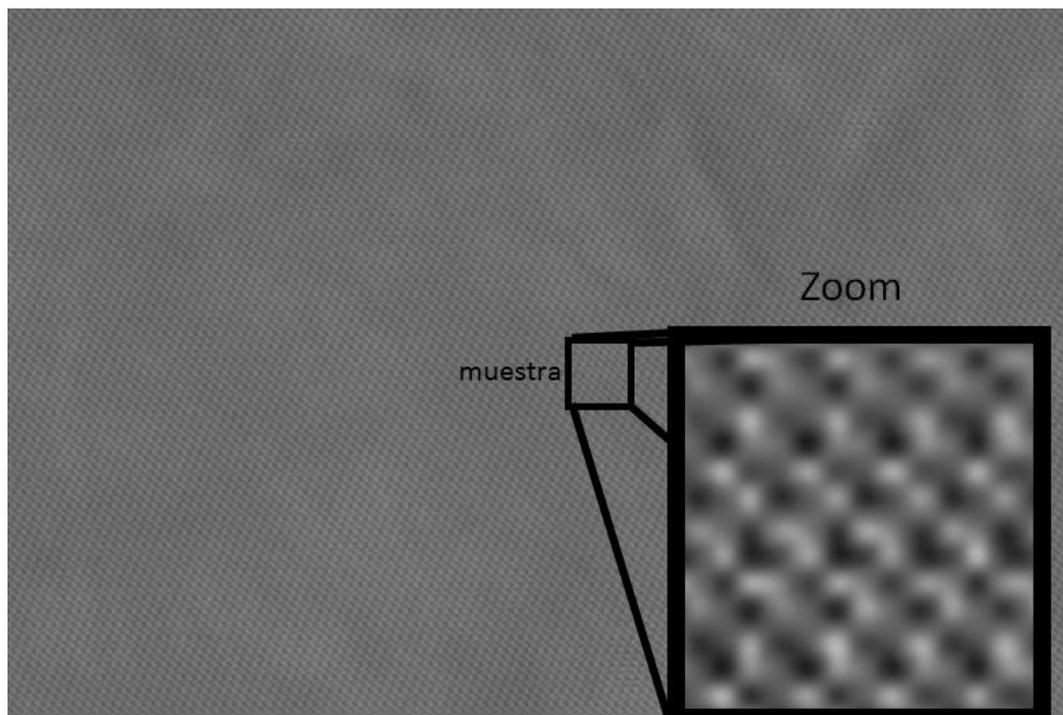
En la línea 9 se inicia el proceso de evaluación de correlaciones entre imágenes que tienen entre si 1 segundo de diferencia, con fines de un dato de velocidad en unidades de distancia sobre segundos, acumulándose en una variable de valores múltiples denominada *cormot*.

Se realiza una carga de la gráfica para la interpretación de píxeles contra coeficientes de correlación en la línea 12 y se pregunta al operario por su interpretación brindándole el promedio de los coeficientes entre las imágenes.

En la línea 25 se encuentra la Ecuación 2 y a partir de ahí se define el tipo de movimiento que tiene la mayoría de espermatozoides.

No se utiliza máscara borrosa en este análisis ya que los píxeles pimienta (con valor de negro cercanos a 0) fijos que hay por la diferencia de resolución predeterminada y la real sirven como puntos de referencia en el comando de correlación.

Figura 12. Píxeles pimienta presentes en la imagen adquirida



Fuente: Muestras obtenidas con el microscopio de contraste de fase del SENA

2.1.3.1 Validación. Para verificar el algoritmo inicialmente, se utilizó el mismo video, a40x.avi, incluido como demo en el producto final, luego se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación promedio de 0.46 lo cual equivalía a 40 pixeles aproximadamente de movimiento, con esto se tiene que la velocidad era de 7µm/s aproximadamente (según Ecuación 2), así que correspondía a espermatozoides del tipo B y a su vez la persona encargada del análisis de motilidad sugirió que correspondía a una motilidad de 70 (considerado previamente como tipo B).

Bajo la supervisión e interpretación de la experta capacitada, la Doctora María Helena Colmenares (Directora del Laboratorio de Reproducción Animal del SENA nodo La Granja), previo al análisis con el software y sobre la misma muestra en pantalla en ese momento, se establece por parte de la Doctora que el valor de motilidad de la muestra es de 80, correspondiente entonces a una clasificación Buena del movimiento espermático.

También se realizó la comparación con los datos del laboratorio de reproducción animal del SENA donde decía que el promedio de la motilidad para bovinos estaba en entre 60 y 100 siendo entre Bueno y Muy Bueno, lo cual indica un buen apoyo para la interpretación.^[9]

Tabla 2. Resultado de pruebas de Motilidad

EXPERTO	SOFTWARE	RANGO CORRESPONDIENTE	%DIFERENCIA
80	70	60-100	12,5

El porcentaje de diferencia se debe a que la valoración del experto es subjetiva y no obedece a un método cuantitativo establecido sino a la experiencia del intérprete.

Se realizan 95 pruebas al video muestra para la motilidad, ya que se correlacionan imágenes cada 5 tomas, luego se avanza a la siguiente toma y se hace correlación con las otras 5 anteriores, por tanto las primeras 5 tomas no tendrán comparación y no son consideradas, pero como se concluyó en la sección de correlación, con al menos 60 pruebas, el error está cercano al 0.2% entre el valor práctico y el esperado, así que con 95, que son las máximas pruebas posibles con 100 tomas, se garantiza un resultado aún más preciso.

En la fase de prueba como producto final, se requiere contrastar los resultados entre el método tradicional y los obtenidos con el software C.A.S.A., es por eso que se procede a realizar un análisis y evaluación en una serie de muestras, teniendo presente el experto (quien realiza los procedimientos tradicionales) y el software ejecutándose bajo las mismas condiciones.

Debido a que el código del programa incluye la previsualización de las imágenes en el microscopio de contraste de fase, se realiza el conteo de células por el método tradicional en una muestra con espermatozoides muertos, ya que si se están moviendo, a 40x no es posible contarlos sin una

herramienta de procesamiento de imágenes, como se puede notar observando el video a40x.avi (incluido en el disco de producto final como Demo), y la interpretación del experto en esa prueba es de una concentración aproximada de 1100 millones de espermatozoides por mililitro; El software es ejecutado y genera como resultado, para una muestra de 1 ml, una concentración de 1059 millones de espermatozoides por mililitro, además de espermatozoides tipo D en cuanto a clasificación para motilidad (correspondiente a muy malos o sin movimiento), lo cual permite observar una coherencia entre la interpretación del experto y el cálculo del programa.

La prueba de la concentración en una muestra entre el método tradicional y la ejecución del software lleva consigo obstáculos para una comparación, debido a que la medición de la concentración se realiza por tinción y recuento con cámaras de conteo de células (uno de los métodos tradicionales), pero esto requiere que se cambien las propiedades naturales de la muestra del semen, matando la mayoría de los espermatozoides y evitando un cálculo de motilidad sobre la misma muestra, y como el software genera resultados tanto de concentración como de motilidad en la misma muestra, no es posible comparar con el método tradicional de una forma 100% precisa.

La determinación del parámetro motilidad en el método clásico incluye la forma en la que el intérprete experto observa el movimiento, dando un valor subjetivo debido a su experiencia en el campo y evitando un cálculo de porcentaje de error entre la determinación de la velocidad y el tipo de espermatozoides, como apoyo a la motilidad brindado por el software, y el valor que el experto propone subjetivamente (ya que este último no pertenece en ese momento a un cálculo matemático o a una medición física, solo a una interpretación); de esta forma se hace imposible contrastar de forma exacta ambos métodos.

Entre las pruebas realizadas, para la determinación del correcto funcionamiento del software, se realiza una relacionada a la motilidad para una muestra de semen bovino que había estado congelado (algo que ya altera la condición natural de los espermatozoides), de lo cual se tienen como resultados del método tradicional un valor de motilidad aproximado del 55% (muy por debajo del 75% promedio sugerido en la tabla incluida en el anexo D) y en el software una clasificación de espermatozoides tipo C (que corresponde a espermatozoides con movimiento pero con deficiencias); de esta prueba se concluye que el software es un apoyo suficiente para la motilidad también.

2.1.4 Interfaz gráfica. Para la unificación de los códigos se utiliza un menú de opciones, en donde se puede previsualizar (etapa de adquisición incluida), determinar concentración (etapa de concentración) o analizar motilidad (etapa de motilidad).

Se realizan mensajes de bienvenida, logotipo y marca del programa, y diálogos que sugieren la correcta conexión antes de realizar los procesos de interés,

incluso se sugiere la previsualización de forma que las imágenes estén visualmente claras.

```
1- boton=0;
2- uiwait(msgbox('BIENVENIDO - HOY SERÉ SU ASISTENTE'))
3- casa=imread('casa.jpg');
4- figure('Position',[1 1 5000 5000]);
5- pos = [10 50 100 10];
6- ht=icontrol('Style','Text','Position',pos,'FontSize',20);
7- string = {'',...
8- 'Por favor asegúrese que todos',...
9- 'los sistemas están conectados.',...
10- 'Ajuste la distancia y precisión del lente',...
11- 'a una posición en la que vea mejor la imagen',...
12- 'buscando que no haya ruido o interferencia',...
13- 'Trabajo a 40x'};
14- colwidth=17;
15- [outstring,newpos] = textwrap(ht,string,colwidth);
16- set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);
17- imshow(casa,'InitialMagnification',400);
18- vid = videoinput('winvideo', 2, 'RGB24_640x480');
19- src.FrameRate = '30.0000';
20- src = getselectedsource(vid);
21- choice = uimenu('Label','Tipo de Análisis');
22- uimenu(choice,'Label','Concentración','Callback','callcon')
23- uimenu(choice,'Label','Motilidad','Callback','callmot')
24- uimenu(choice,'Label','Previsualizar','Callback','preview(vid)')
```

Mediante el comando **callback** se puede acceder a los programas diseñados de concentración y motilidad sin ser visibles en el código del programa principal de forma que no se puedan editar por equivocación las partes de interés del proyecto.

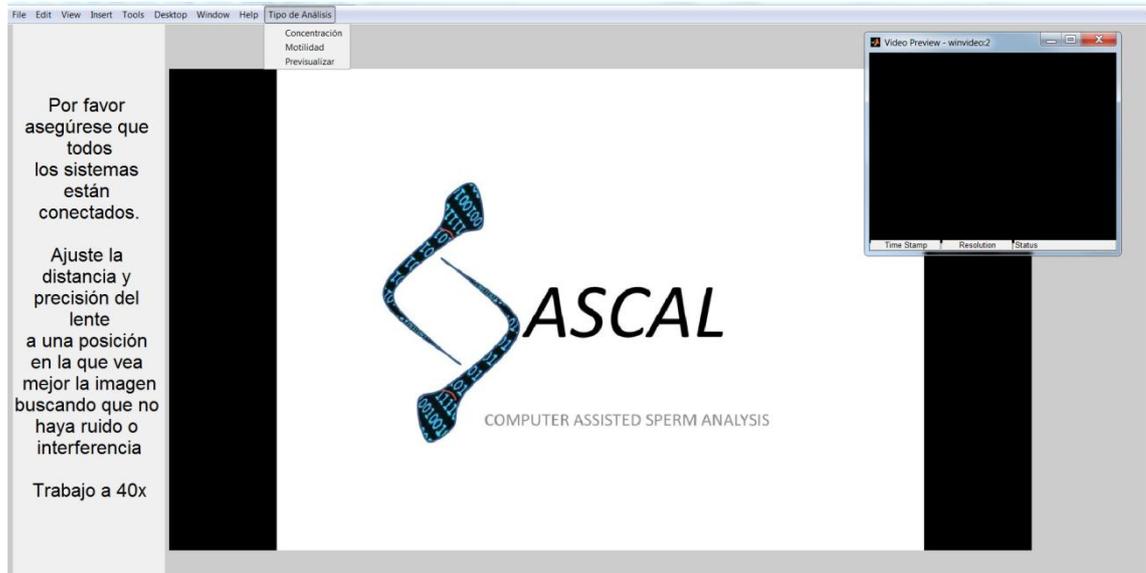
Los comandos relacionados en este código como **uimenu** y **icontrol** pertenecen a la herramienta propia de MATLAB llamada *GUI Development* en la sección de Objetos de Interfaz del Usuario.

De esta forma se adaptan los anteriores códigos para formar un programa principal y dos pertenecientes a la función **callback** concluyendo así la unificación y el proyecto.

De forma global, se puede observar que el sistema sustenta de analíticamente sus resultados pero se acercan a los que brinda el intérprete del laboratorio, por tanto el método tradicional, una vez más, se considera válido; no obstante, a través del desarrollo del sistema, se pueden notar correcciones a los márgenes de error que no se pueden trabajar de manera similar con el método tradicional, como es el analizar varios momentos de la muestra, ya que por

requerir mayor tiempo, el método tradicional depende de la vida promedio de los espermatozoides, y más aún, del tiempo de esta vida en la que aún se consideran óptimos para el análisis, así que no se puede determinar la motilidad, por ejemplo, una cantidad de veces suficientes sobre la misma muestra antes de que todos los espermatozoides mueran, como para hacer el error cercano al 0%.

Figura 13. Interfaz gráfica final del programa



Fuente: Archivo .m entregado en el producto final

RECOMENDACIONES

El software C.A.S.A. desarrollado es de código abierto, por tanto, puede ser complementado editando el mismo programa con intenciones de abarcar campos distintos a los del análisis de semen bovino.

Es posible incluir en los parámetros del programa las características de los espermatozoides de otras especies (píxeles² ocupados por uno de sus espermatozoides, rangos promedio de valores esperados para la concentración y la motilidad) logrando así, un software capaz de medir, de forma simultánea, las condiciones espermográficas clave y sus valores en diferentes especies animales.

Para intenciones industriales y de servicio comercial, el programa puede ser exportado a un ejecutable (.exe) o algún formato compatible que trabaje con código cerrado, evitando de esta forma la manipulación de los datos pero brindando una opción de negocio al ofrecer el análisis de fertilidad y calidad de los animales en el sector pecuario.

CONCLUSIONES

La Cámara de Neubauer o cualquier Cámara de medición, es un elemento indispensable para el cálculo de la concentración y determinación de motilidad espermática en los sistemas C.A.S.A. debido a la posibilidad de tener una referencia de medidas de longitud a una escala de ampliación tan grande como es 40x, así posteriormente al programa no se use debe ser usada como referencia en la programación.

La motilidad y el tipo de movimiento de los espermatozoides son características relacionadas directamente sin ser de forma cuantitativa inicialmente, ya que se les brinda un valor para poder ser interpretadas, así que es imposible medirlas de manera precisa, solamente se puede organizar el resultado de parámetros asociados en rangos determinados como se hizo en el proyecto.

Una interfaz gráfica e instrucciones que recurran a códigos que no son visibles para el usuario regular, son la mejor manera de proteger la integridad del programa, ya que por ser código abierto y ejecutarse sobre la misma plataforma en que fue creada, puede ser editado, lo cual fue intencional debido a que es un software educativo.

Los análisis y la determinación de características espermográficas de forma digital tienen menos errores o un margen más pequeño que la realizada tradicionalmente debido a la cantidad de análisis realizados sobre una secuencia de imágenes, lo que reduce la muerte natural de los espermatozoides entre análisis debido al tiempo entre los mismos, y evita el cambio de ambiente o alteraciones, para ayudar a determinar así de la misma muestra las dos características imprescindibles: concentración y motilidad.

Los sistemas C.A.S.A. proveen soporte a los análisis de fertilidad pero por el contenido subjetivo de estos análisis es necesario un experto que interprete las características y brinde su conocimiento al proceso, por tanto es indispensable el recurso humano.

Se desarrolló un algoritmo capaz de procesar imágenes provenientes de un microscopio de contraste de fase y determinar simultáneamente (sobre la misma muestra) las características de concentración y motilidad, que de forma tradicional se realizaban en ambientes distintos, por métodos distintos y requerían una enorme cantidad de tiempo (comparado al tiempo que le toma al programa) para realizar la medición una sola vez a una sola muestra, además de la necesidad de alterar los ambientes de los espermatozoides para cada evaluación en este sistema tradicional.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Seminograma[Online]. Aavailable: (<http://www.androgen.es/laboratorio/seminograma.html>), 2012, 1 p, Jun 2012.
- [2] Manual de Producción de Dosis Seminales [Online]. Aavailable: (<http://www.magapor.com/images/Ayuda/5.pdf>), 2008, 24 p, Feb 2012.
- [3] A fertility index derived from semen analysis [Online]. Aavailable: (<http://jcp.bmj.com/content/6/3/232.full.pdf>), Apr 1953, 6p, Jun 2012.
- [4] Reflections on C.A.S.A. after 25 years [Online]. Aavailable: (<http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/25/3/317.pdf>), May 2004, 9 p, May 2012.
- [5] Información general del sistema C.A.S.A. Minitübe [Online]. Aavailable: (http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/18500-0000_IDABovine_es_121107.PDF), 2010, 3 p, Dic 2011.
- [6] Información general del sistema C.A.S.A. ISASPSUS [Online]. Aavailable:(<http://www.proiser.com/es/products/aplicaciones/isas/isaspsus/index.php>), 2010, 1 p, Dic 2011.
- [7] Avoid Writing Tedious, Boring Code [Online]. Aavailable: ([http://msdn.microsoft.com/en-us/library/aa227881\(VS.60\).aspx](http://msdn.microsoft.com/en-us/library/aa227881(VS.60).aspx)), Dic 2000, 1 p, Dic 2012.
- [8] PhaseContrastMicroscopy [Online]. Aavailable: (<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/phase.html>), May 2000, 1 p, Ago 2012.
- [9] Manual de evaluación de semen en bovinos [Online]. Aavailable:(<http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/147/1/JOSe%20NICO%20LaS%20ANGELINO%20OLIVERA.pdf>), Jul 2009, 61 p, Oct 2012.
- [10] Fórmula para el conteo con cámara de Neubauer [Online]. Aavailable: (<http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion-1.php>), 2008, 6 p, Ago 2012.
- [11] Error en el conteo celular [Online]. Aavailable: (<http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/cell-counting-error/error-conteo-celular.php>), Ene 2009, 1 p, Jul 2012.

- [12] Filtrado de imágenes [Online]. Aavailable: (http://dmi.uib.es/~ygonzalez/VI/Material_del_Curso/Teoria/Tema5_Filtrado.pdf), 2010, 26 p, Ene 2012.
- [13] Image processing with Matlab [Online]. Aavailable: (<http://www.cs.manchester.ac.uk/ugt/COMP27112/doc/matlab.pdf>), 2004, 26 p, Ene 2012.
- [14] Espermatozoide [Online]. Aavailable: (<http://es.wikipedia.org/wiki/Espermatozoide>), Nov 2007, 1 p, May 2012.
- [15] Fórmula de la Cámara de Neubauer [Online]. Aavailable: (<http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Formula-Camara-Neubauer-Concentracion.pdf>), Ene 2009, 2 p, Jun 2012.
- [16] EasyCAP, referencia para información y soporte [Online]. Aavailable: (<http://easycap.co.uk/>), 2009, 1 p, Dic 2011.
- [17] CASA – Practical Aspects [Online]. Aavailable: (<http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/21/4/515>), Feb 2010, 10 p, Feb 2012.
- [18] Effect of different thawing rates on post-thaw spermviability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen, Anim. Reprod.[Online].Aavailable: ([http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/S0378-4320\(07\)00394-6/abstract](http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/S0378-4320(07)00394-6/abstract)) Dic 2008, 64 p, Feb 2012.
- [19] Evaluación de la motilidad y la viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas [Online]. Aavailable: (dSPACE.usc.es/bitstream/10347/2406/1/9788497509886_content.pdf), Oct 2008, 157 p, Nov 2011.
- [20] Conteo celular con Hematócmetro [Online]. Aavailable: (<http://celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>), Ene 2009, 6 p, Jun 2012.
- [21] Manipulating Images with MATLAB [Online]. Aavailable: (http://www.rpgroup.caltech.edu/courses/PBL/bootcamp2011/protocols_and_references/AdvancedMatlabTutorial.pdf), Jun 2011, 44 p, Jun 2012.
- [22] Error en conteo celular [Online]. Aavailable: (<http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Error-Conteo-Celular-nt.pdf>), Ene 2009, 1 p, Jun 2012.

- [23] Artículo: Seminograma para pacientes [Online].
(<http://www.institutovida.com/articulos/seminograma.asp?ID=29>), 2012,
1 p, Jun 2012.
- [24] Visión Computacional: Correlación y caza de patrones [Online].
Avaliable: (<http://turing.iimas.unam.mx/~elena/PDI-Mast/Convol-VS-Correl.pdf>), 2007, 29 p, Jun 2012.
- [25] Notas de Ingeniería Electrónica, Universidad de Ibagué, 2007-2011.

ANEXOS

ANEXO A. COTIZACIÓN DEL PAQUETE MATLAB CON LAS HERRAMIENTAS (TOOLBOXES) REQUERIDAS



Cotización #. 18543

Ciudad: Medellín

Fecha: 13 de Junio de 2013

Páginas: 4

Ing. Cesar Dvid Gastenboldo
Ingeniero
cdgc21@hotmail.com
SENA NODO LA GRANJA
Celular: -3107679286
Espinal Tolima

PRECIOS ACADÉMICOS. INDIVIDUAL PC ALL PLATFORM

Estimado Ing.
ATENCIÓN. POR VACACIONES, NUESTRA EMPRESA CIERRA DEL 17 DE DICIEMBRE 2013 AL 11 DE ENERO 2014
NO DEJE SU PEDIDO PARA ULTIMA HORA, HÁGALO A TIEMPO.

Nos permitimos cotizarle los siguientes productos de software para ALL PLATFORM - LICENCIA PERPETUA DE UN SOLO USUARIO. ESTE ES EL LENGUAJE DE COMPUTACIÓN TÉCNICA QUE HABLAN MAS DE UN MILLÓN DE PERSONAS EN EL MUNDO. HÁBLELO USTED TAMBIÉN NO SE QUEDE SIN EL, CÓMPRELO AHORA.

Ítem.	Cant.	Descripción.	P/Usuario Pesos	P. Tot. Pesos
1	1	MATLAB	1.904.000	1.904.000
2	1	Statistics Toolbox	762.000	762.000
3	1	Image Processing Toolbox	762.000	762.000
4	1	Image Acquisition Toolbox 10	762.000	762.000

NOTAS MATLAB

10: Requires Image Processing Toolbox

Subtotal	4.190.000,00
Fletes/Seguro.	
Subtotal	4.190.000,00
Iva	670.400,00
Total	4.860.400,00

ATENCIÓN: SI SU ORDEN DE COMPRA O PEDIDO REQUIERE POLIZAS POR FAVOR LEA LAS NOTAS Y OBSERVACIONES ANTES DE REDACTAR SU PEDIDO. IGUALMENTE SI RETIENE EL ICA. SI TIENE PREGUNTAS, NO DUDE EN CONTACTARNOS.

NOTA 1: Nos reservamos el derecho de corregir cualquier error involuntario que se presente en los precios.

Nota 2: NO ACEPTAMOS PEDIDOS EN DÓLARES. POR FAVOR ENVIENOS SU ORDEN O PEDIDO EN PESO

Nota 3: LOS PRODUCTOS DE MATHWORKS SOLO SE LE LICENCIAN AL USUARIO FINAL

NOTA 4: SI "COMPRA" POR MEDIO DE CONTRATO, FAVOR LEER DETENIDAMENTE EL ACUERDO DE LICENCIA ANTES DE REDACTARLO. SI COLOCA UNA ORDEN ES PORQUE HA LEÍDO EL ACUERDO Y ACEPTA LOS TÉRMINOS. SOLICITE UNA COPIA, SI NO LA HA RECIBIDO. FAVOR ENVIARNOS PREVIAMENTE UN BORRADOR DE CONTRATO PARA SER REVISADO Y ACEPTADO EL ÚNICO ACUERDO DE LICENCIA VÁLIDO, BAJO CUALQUIER CIRCUNSTANCIA, ES EL ORIGINAL DE FABRICANTE, QUE ESTÁ EN INGLÉS. NO SE ACEPTAN TRADUCCIONES DE NINGÚN TIPO. LA LICENCIA Y TODA SU DOCUMENTACIÓN SOLO ESTÁ DISPONIBLE EN INGLÉS!

NOTA 5: LAS ORDENES DE COMPRA O CONTRATOS DEBEN SER ENVIADOS A NUESTRA DIRECCIÓN EN MEDELLÍN. NO RECOGEMOS ORDENES DE COMPRA O CONTRATOS EN OTRAS CIUDADES, NI NOS HACEMOS RESPONSABLES DE ORDENES DE COMPRA O CONTRATOS QUE NO LLEGUEN A NUESTRA OFICINA EN MEDELLÍN

NOTA 6: LA LICENCIA (CON TODOS LOS PRODUCTOS QUE LA CONFORMAN) NO ESTÁ EN VENTA.

EL USUARIO CUANDO COMPRA SOLO ADQUIERE UN PERMISO DE USARLA SIEMPRE Y CUANDO CUMPLA Y ACEPTE EL ACUERDO DE LICENCIA.

NOTA 7: TODAS LAS LICENCIAS DE MATHWORKS SE RIGEN POR EL ACUERDO DE LICENCIA, QUE ES DEL FABRICANTE Y ES OBLIGATORIO PARA TODOS LOS USUARIOS.

NOTA 8: TODOS LOS PEDIDOS Y CONTRATOS SE SOMETEN A REVISIÓN PREVIA ANTES DE SER ACEPTADOS.

NOTA 9: NINGÚN CONTRATO PUEDE CONTRADECIR EL ACUERDO DE LICENCIA.

NOTA 10: EL ACUERDO DE LICENCIA OFRECE UNA GARANTÍA DE CALIDAD, CUMPLIMIENTO Y BUEN FUNCIONAMIENTO POR DOCE (12) MESES A PARTIR DE QUE EL FABRICANTE EMITE EL CÓDIGO DE INSTALACIÓN DE LA LICENCIA Y ES DE OBLIGATORIO CUMPLIMIENTO POR PARTE DEL USUARIO.

NOTA 11: EN LO QUE SE REFIERE A LA LICENCIA, EL CONTRATO SE PERFECCIONA DESDE EL MOMENTO QUE EL USUARIO CONFIRMA QUE VA A COMPRAR Y ACEPTA EL ACUERDO DE LICENCIA. ESTAS DOS CONDICIONES SE DAN SIMULTÁNEAMENTE Y LA LICENCIA EMPIEZA A CORRER EN SUS DOCE (12) MESES DESDE QUE EL FABRICANTE EMITE EL CÓDIGO DE INSTALACIÓN.

NOTA 12: EL ACUERDO DE LICENCIA ES EXCLUSIVO DEL FABRICANTE Y NO ADMITE MODIFICACIONES NI CONDICIONAMIENTO ALGUNO POR PARTE DEL USUARIO.

NOTA 13: EL USUARIO ACEPTA EL ACUERDO DE LICENCIA INCONDICIONALMENTE DESDE EL MOMENTO QUE COMPRA.

NOTA 14: EL ACUERDO DE LICENCIA DEBE HACER PARTE INTEGRAL DEL CONTRATO.

NOTA 15: NUESTRA COTIZACIÓN DEBE HACER PARTE INTEGRAL DEL CONTRATO.

NOTA 16: PARA LA NUEVA VERSIÓN, LOS MEDIOS DE INSTALACIÓN LLEGARÁN EN FORMATO VIRTUAL. POR CADA INSTALACIÓN DE LOS PRODUCTOS SE REQUIERE UNA ACTIVACIÓN. EL DVD ES OPCIONAL. EN LA ORDEN DE COMPRA EL CLIENTE DEBE INDICAR SI QUIERE EL DVD O NO. VER DOCUMENTO PD LOS DATOS DEL PROCEDIMIENTO SE LE ENVÍAN ÚNICAMENTE A LA PERSONA QUE INSTALA EL PRODUCTO QUE DEBE SER LA MISMA QUE ESTA EN EL FORMATO FORESPONSABLE.DOC.

NOTA 17: No se ofrece un LICENCIAMIENTO DE SOFTWARE para fin específico ni apto para un servicio determinado. Esta condición o condiciones deben estar plenamente definidas por el usuario final, que mediante la correcta aplicación del mismo (el software) puede obtener resultados específicos o lo pueda adaptar al servicio particular que el usuario requiera. El usuario final debe saber, antes de comprar, si el LICENCIAMIENTO DE SOFTWARE que se ofrece le sirve para el fin específico o que le sea apto para el servicio determinado que el usuario final quiere. Ni el fabricante ni el distribuidor conocen cual será la aplicación del software ni cuales serán los resultados de esa aplicación. Con el LICENCIAMIENTO DE SOFTWARE, que se esta ofreciendo, se pueden obtener muchos fines específicos y adaptar a muchos servicios determinados y ellos dependen del buen uso que el usuario final le de.

NOTA 18: COMPONENTES ELECTRONICAS LTDA puede ofrecerle capacitación en el manejo BÁSICO de las herramientas de MATLAB. Podemos certificar la asistencia a esta capacitación por medio de una carta de la empresa. NO ENTREGAMOS DIPLOMA, NI CERTIFICADO DE ASISTENCIA A NOMBRE DE THE MATWORKS.

Esta Cotización Refleja El Descuento Que Se Le Hace A La Universidad Por Ser Institución Educativa Conducente A Títulos. La Licencia Del Software Quedara A Nombre De La Universidad Previo El Lleno De Los Requisitos Que Exige El Fabricante Como La Certificación De Institución Educativa, Declaración De Uso Exclusivo Para Educación Del Producto, Etc. Que Se Le Entregara Al Confirmar El Pedido.

Si No Se Cumplen Todos Los Requerimientos De Math Works Inc. Los Precios Aquí Anotados No Son Validos Y No Se Podrá Efectuar Despacho. Se Entiende Que El Pedido Queda En Firme Al Cumplimiento De Los Requisitos.

Aclaramos Que Las Condiciones De Entrega Son Exigencias Del Fabricante Y No Nuestras. Las Deben Cumplir Todas Las Entidades..

Los Precios Aquí Dados Son Para Las Cantidades Anotadas, Otras Cantidades Tienen Precios Distintos.

Estos precios son para comprar directamente con la orden de compra. Si se requieren otros documentos y condiciones para efectuar una orden de compra, LOS PRECIOS AQUÍ DADOS NO SON VALIDOS

**QUE EXIGE EL FABRICANTE PARA QUE PUEDA ACTIVAR EL SOFTWARE
LA INSTALACIÓN NO ES COMPLEJA, SIGA CUIDADOSAMENTE LOS PROCEDIMIENTOS Y AYUDAS QUE DA EL
FABRICANTE.
SI REQUIERE QUE UN TÉCNICO NUESTRO HAGA LA INSTALACIÓN, SE LE COBRARÁN LOS VIÁTICOS Y EL
SERVICIO, PREVIA COTIZACIÓN**

Validez De La Oferta: 5 Días A Partir De La Fecha.

Forma De Pago: Contra Entrega. Por Consignación Nacional En Nuestra Cuenta Corriente. No aceptamos Cheques De Otras Plazas. En la orden de compra se debe especificar claramente que la forma de pago es CONTRA ENTREGA

Tiempo De Entrega: 45 Días aproximadamente Después De Recibido El Pedido Y Cumplidas Todas Las Condiciones Que Exige El Fabricante.

IVA: 16%

Fletes / Seguro: Por Cuenta Del Cliente.

RADICACIÓN DE FACTURAS Y DOCUMENTOS CORREN POR CUENTA DEL CLIENTE

Lugar De Entrega: Su Almacén

*** IMPUESTO DE INDUSTRIA Y COMERCIO (ICA)**

Si su empresa o universidad retiene el ICA, favor incluirlo en la orden de compra. Sin esta condición no podemos efectuar despacho y la orden no queda en firme (Solo para Municipios Fuera de Medellín). Si no lo incluyen en la orden o pedido se considerará que no lo retiene y no debe hacer ninguna deducción de la correspondiente factura por este concepto.

PÓLIZAS DE SEGUROS

**SOLO SE CONSTITUYEN SIEMPRE Y CUANDO LAS COMPAÑÍAS ASEGURADORAS LAS EXPIDA
EN TODO LO RELACIONADO CON LA LICENCIA, EL ACUERDO DE LICENCIA PRIMA SOBRE LA PÓLIZA/
LA PÓLIZA DE CALIDAD, CORRECTO FUNCIONAMIENTO Y CUMPLIMIENTO, EN LO QUE TIENE QUE VER CON LA
LICENCIA, NO PREVALECE SOBRE EL ACUERDO DE LICENCIA/
NINGUNA DE LAS PÓLIZAS ES APLICABLE AL ACUERDO DE LICENCIA/**

Estos Productos Son Importados Legalmente Y Tienen El Pleno Respaldo Del Fabricante.

Para cualquier inquietud sobre esta cotización favor contactarme directamente.

Cordialmente,

Sergio Giraldo
Software para Ingeniería
Móvil: 3007875422, 3137323253

componentes@une.net.co VISÍTENOS EN www.compelect.com.co
Componentes Electrónicas Ltda.
Calle 32F No 66C-7, P.O.B. 478, Tel: 351 1049. Fax: 351 1019. Medellín, Colombia.

©2012 MATLAB and Simulink are registered trademarks of The MathWorks, Inc.
See www.mathworks.com/trademarks for a list of additional trademarks.
Other product or brand names may be trademarks or registered trademarks of their respective holders

ANEXO B. DOCUMENTACIÓN SPERM VISION Minitübe



Sperm Vision™ REALIDADES

Minitub Ibérica, S.L.
Pol. Industrial La Dreccera/C/ Meta-Hírgia, 1.
43470 LA SELVA DEL CAMP, TARRAGONA
Tel. +34 977 845 397 / Fax: +34 977 845 398
info@minitub-iberica.com
www.minitub-iberica.com
www.minitube.com

Sperm Vision™ es un sistema de control de calidad para semen y una importante herramienta para laboratorios comerciales y laboratorios orientados a la investigación. Mediante criterios de evaluación objetiva y estandarizada y sus funciones de archivo y documentación, es un medio efectivo para promover la confianza de los clientes por su laboratorio. Sperm Vision™ proporciona configuración de parámetros probados de diversas especies: la motilidad y concentración de eyaculados es rápida y fácilmente analizada, codificando mediante color los espermios en inmóviles, con movimiento local y con movimiento progresivo. Hay también siete subpoblaciones adicionales que pueden analizarse con Sperm Vision™ Professional. Todos los datos, incluyendo secuencias de imágenes, puede ser archivados para propósitos de control y de análisis futuro.

El sistema puede ser plenamente integrado a los programas PRISM/IDA/IDEE para manejo y procesamiento de eyaculados. Sperm Vision™ Production puede ser actualizado a versiones superiores de Sperm Vision™. Siendo pionero en el campo de análisis de semen, Minitub ofrece diversas versiones para satisfacer las diferentes necesidades de su empresa en particular:

..... Sperm Vision™ Production y Production Plus:

El sistema CASA Sperm Vision™ Production para laboratorio de producción provee configuración de parámetros probados para el análisis de una especie (puede ser elevado de categoría). Varios módulos adicionales permiten seleccionar la solución perfecta para requerimientos individuales. Contiene integrado un reporte de análisis del semen.

..... Sperm Vision™ Professional

Sperm Vision™ Professional contiene funciones de exportación amables al usuario y puede interconectarse fácilmente con otros programas de manejo de laboratorio. Los parámetros de análisis son enteramente personalizables para responder a necesidades individuales. La herramienta "Viabilidad" incorporada analiza automáticamente tinciones fluorescentes, como ser la tinción de viabilidad rojo/verde de Yoduro de Propidio/SYBR 14. Reconoce y mide exactamente el porcentaje de células normales y dañadas de los campos analizados. El test de viabilidad puede ayudar a detectar donantes problema y eyaculados de calidad insuficiente antes de su despacho. Combinado con los análisis de motilidad y morfología, el análisis de viabilidad eleva el nivel de seguridad de evaluación de cada dosis de semen. La herramienta de identificación automática de células espermáticas facilita la valoración morfológica, basada en magnificación con objetivo de 100x bajo aceite de inmersión.

..... Sperm Vision™ Automorphology

contiene la completa funcionalidad de Sperm Vision™ Professional, además de una herramienta adicional de detección automática de anomalías espermáticas secundarias: flagelos flectados, gotas citoplasmáticas (proximales y distales). Las anomalías espermáticas secundarias son ampliamente consideradas como causantes de depresión de fertilidad de las dosis de semen. El examen es efectuado en tiempo real de la línea de producción, junto a la medición de motilidad y concentración. Los resultados son luego incluidos automáticamente en el cálculo de las dosis del eyaculado.

..... Sperm Vision™ SAR y EQ

La solución ideal para el veterinario de equinos y animales pequeños: evalúa exactamente la concentración, motilidad y morfología de células espermáticas caninas y equinas. Ofrece funciones extensas de reporte y documentación, siendo el sistema de manejo de calidad perfecto para la clínica animal. Dependiendo de los requerimientos específicos del veterinario, hay disponibles una gama de accesorios.

3000070191 06/2010

www.minitube.com





Sistema CASA SpermVision™ de Minitub y sus especificaciones

Casa Systems	SV Prod	SV Prod Plus	SV Professional	SV Automorph	SV SAR / EQ
Ref.	12520/7000	12520/8000	12520/3502	12520/3650	12520/5000
Especies	enfocado a bovino y porcino	todas las especies	todas las especies	todas las especies	canino y equino
Lenguajes	en, de, es, ru, it, fr, cn	en, de, es, ru, it, fr, cn	en, de, es, ru, it, fr	en, de, es, ru, it, fr	en, de, es, ru, it, fr

Funciones					
Concentración	√	√	√	√	√
Motilidad (Progresiva, Total)	√	√	√	√	√
Motilidad ampliada (7 clasificaciones de análisis adicionales simultáneos)	-	-	√	√	-
Morfología Básica ¹⁾ y Morfología Macro ²⁾	opcional*	√	√	√	√
Morfología (Krüger)	-	-	-	-	√
Morfología automática	-	-	opcional*	√	-
Análisis de tinción fluorescente de Hoechst	-	opcional*	√	√	√
Viabilidad (tinción rojo/verde fluorescente)	-	-	√	√	opcional*
Base de datos animales	√	√	√	√	√
Reportes	√	√	√	√	√
Herramienta de reporte ampliado	-	opcional	√	√	opcional
Todas las especies	opcional	√	√	√	opcional
Modificación de parámetros de clasificación	-	√	√	√	√
Exportación de todos los datos de espermios	-	-	√	√	-
Análisis estadístico	√	√	√	√	opcional
Filtro de partículas	opcional	√	√	√	√
Vínculo con software de laboratorio (PRISM/IDA/IDEE)	√	√	√	√	-
Vínculo con balanza	opcional	√	√	√	√
Platina (de microscopio)	opcional*	opcional*	opcional*	opcional*	opcional*
Vínculo con autodilutor	opcional	√	√	√	√
Elección de microscopio	-	√	√	√	√
Manejo de estanque	-	-	-	-	√
Foco	Producción de semen Evaluación de semen		Producción de semen Evaluación de semen Investigación, ensayo		Evaluación de semen
Confeccionado para...	Laboratorios de producción pequeños	Laboratorios de producción dirigidos a la calidad	Laboratorios profesionales de producción y de investigación	Estaciones profesionales de verracos	Veterinarios de clínica y de terreno

¹⁾ contador manual al tiempo de análisis

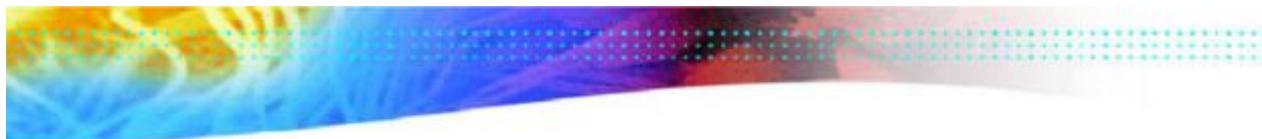
²⁾ evaluación de células espermáticas identificadas automáticamente a magnificación de 1000x

* puede requerir hardware adicional

www.minitube.com



ANEXO C. COTIZACIÓN DEL SOFTWARE SPERMVISION Y EQUIPAMIENTO DE MINITÜB VENDIDO POR ANDITECNICA (MEDELLÍN – COLOMBIA)



COTIZACION No. MV 111106

CLIENTE: Stephanie Gastelbondo
CIUDAD: Ibagué
TELÉFONO: 314 401 95 31
EMAIL: stephigastel23@gmail.com
 sjgc23@fotmail.com
FECHA: Medellín, Noviembre 03 de 2011



En nombre de nuestra representada exclusiva Minitüb tenemos el gusto de cotizarle para <i>Entrega Local</i> :	
DESCRIPCIÓN	
<p>SPERM VISION® PRODUCTION PLUS <i>Ref. 12520/8000</i></p>	
<p>Sistema completo contiene:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Software Sperm Vision Production Plus • Microscopio Zeiss Axio Lab A1 con contraste de fases <i>Ref. 12088/0020</i> • Objetivo Zeiss LD 20x/0.30x, contraste de fase negativo <i>Ref. 12006/0231</i> • Objetivo acromático de fase Ph100x/Oil <i>Ref. 12008/0150</i> • Adaptador para cámara 0.63x Zeiss, para Sperm Vision® <i>Ref. 12018/0004</i> • Mesa para microscopio con calefacción instalada <i>Ref. 12008/0050</i> • Equipo con 2.93 GHz de procesador, 4 GB de memoria RAM y 500 GB de disco duro • Monitor de 19" • Sistema de calefacción HT200 <i>Ref. 12055/0200</i> <p>Sistema computarizado para análisis de células espermáticas altamente eficiente y de fácil manejo. La determinación de la concentración y motilidad puede ser analizada con exactitud, haciendo del Sperm Vision una herramienta esencial y rápida para la evaluación del semen en el laboratorio. Todas las imágenes y datos capturados son almacenados para que estos puedan ser examinados posteriormente. El cálculo automático de las dosis a sacar, hace que el procesamiento del semen sea sencillo, ya que determina exactamente el número de dosis y la cantidad de diluyente necesario</p>	

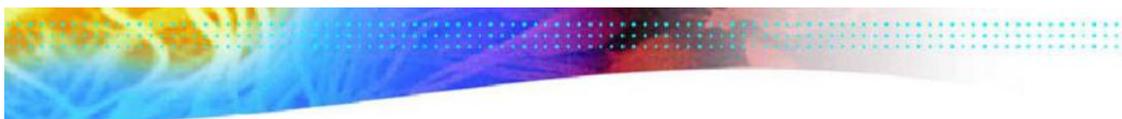


COTIZACION No. MV 111106

CLIENTE: Stephanie Gastelbondo
CIUDAD: Ibagué
TELÉFONO: 314 401 95 31
EMAIL: stephigastel23@gmail.com
 sjgc23@fotmail.com
FECHA: Medellín, Noviembre 03 de 2011



Módulos Incluidos: <ul style="list-style-type: none"> • Modulo de morfología Básica • Modulo Multiespecies • Filtro de Partículas • 	
Accesorios Incluidos <ul style="list-style-type: none"> • (25) Cámara de recuento de 20 ul (4 cámaras de recuento) Ref. 12050/0300 • (1) Bloque calefaccionado para viales Ref. 12055/0510 	
<p align="center"><i>Anexo Cuadro con características de análisis para el Sperm Vision Production Plus</i></p>	
SUBTOTAL (Pesos Colombiano)	\$ 125'650.000
IVA	20'104.000
TOTAL (Pesos Colombiano)	\$ 145'754.000
Accesorios Adicionales Necesarios NO Incluidos: <ul style="list-style-type: none"> • (1) Pipeta Electronica 100 ul – 1 ml (Para preparación precisa de las muestras de semen) Ref. 12050/0510 • (1) Cargador para Pipeta Electronica (tiempo de carga 1 h) Ref. 12050/0514 • (1) Pipeta 0,5 – 10 ul (para llenar cámara de recuento) Ref. 12050/0515 	
SUBTOTAL (Pesos Colombiano)	\$ 6'070.000
IVA	971.200
TOTAL (Pesos Colombiano)	\$ 7'041.200
CONDICIONES COMERCIALES <ul style="list-style-type: none"> • FORMA DE PAGO : 50% Anticipo, 50% Contraentrega • TIEMPO DE ENTREGA: 8 SEMANAS, <i>después de la confirmación del anticipo</i> • GARANTÍA: 1 Año por defectos de fabricación • VALIDEZ DE LA OFERTA: 30 Días 	



COTIZACION No. MV 111106

CLIENTE: Stephanie Gastelbondo
CIUDAD: Ibagué
TELÉFONO: 314 401 95 31
EMAIL: stephigastel23@gmail.com
sjgc23@fotmail.com
FECHA: Medellín, Noviembre 03 de 2011



- *Instalación y entrenamiento por el personal de nuestra empresa.*

Atentamente,

MANUELA VILLA YEPES
Gerente Línea Agropecuaria

ANEXO D. TABLA DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL DEL
SENA

TABLA: CARACTERÍSTICAS DEL EYACULADO - CORTESIA SENA.

	Toro	Carnero	Verraco	Caballo	Hombre	Perro
1.Tipo de eyaculado	Monofásico	Monofásico	Trifásico	Trifásico	Monofásico	Trifásico
2.Duración	1 segundo	< a 1 segundo	5 - 30 minutos	30 - 60 seg	4 segundos	22 minutos
3.Sitio de deposito	Contra cuello uterino.	Contra cuello uterino.	Luz de cuello uterino. Intra-uterina.	Intra-uterina	Contra cuello uterino.	Contra cuello uterino.
4. Volumen del eyaculado (ml)	5 - 15 ml	0,8 - 1,2 ml	150 - 200 ml	40 - 100 ml	2 - 6 ml	3 - 30 ml
5..Concentracion millones esp/ml (10⁶)	800 – 1200	2000 - 3000	200 - 300	200 - 500	50 - 150	200 – 600
6. Espermatozoides totales /eyaculado (10⁹)	Promedio (4 x 5)	Promedio (4 x5)	Promedio (4x 5)	Promedio (4 x 5)	Promedio (4 x 5)	Promedio (4 x 5)
7. Motilidad (%)	75	95	70	70	65	60

ANEXO E. MANUAL DE INSTRUCCIONES Y RECOMENDACIONES DEL SOFTWARE



MANUAL DE USUARIO

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda trabajar con el programa MATLAB de MathWorks en versión 2007a o superior.
2. Asegúrese que todo el sistema esté correctamente conectado entre sí y con la alimentación necesaria.
3. En lo posible, trabaje con muestras tomadas recientemente o congeladas pero con pocas o ninguna alteración en el ambiente de los espermatozoides.
4. El Software está diseñado para trabajo con microscopio de contraste de fase a 40x así que cambiar el lente o el microscopio generará resultados imprecisos.
5. El Software está diseñado para un ambiente educativo y por tanto permite cambios en el código. No altere el código de programación directamente. Es recomendable hacer una copia del archivo para poder editarlo.
6. El Software está diseñado para trabajar con semen bovino (sus características típicas de concentración, motilidad y tamaño de los espermatozoides). No se garantizan resultados precisos al usar semen de otra especie.
7. Evite el movimiento de cualquiera de los equipos relacionados al sistema mientras el programa se está ejecutando.
8. Si desea reemplazar o sustituir alguno de los equipos relacionados con el sistema consulte las características del equipo comparando con el usado previamente y asesórese por un experto.

INSTRUCCIONES DE USO

El sistema completo para el cual funciona el Software C.A.S.A. incluye:

- Microscopio de contraste de fase
- Cámara para microscopio con salida RCA
- Tarjeta de adquisición de video externa
- Computador con MATLAB r2007a (o superior)
- Disco oficial del Software que incluye el programa

1. CONEXIONES BÁSICAS

Se deben realizar las conexiones con los equipos apagados inicialmente.

Con la cámara para microscopio ubicada (siguiendo las instrucciones de cada tipo de cámara), se realiza la conexión de la salida RCA con la tarjeta de video externa que contiene una entrada RCA; si es necesario se sigue el código de colores (conector amarillo con puerto amarillo).



La tarjeta de video externa debe ser conectada por uno de los puertos USB 2.0 del computador, y si se requieren controladores, se inserta el disco con drivers (incluido) de EasyCAP.

Una vez esté la tarjeta correctamente conectada y la cámara fija en el microscopio, se enciende este último.

2. EJECUCIÓN DEL PROGRAMA

Se inserta el disco que contiene el Software.

En Windows, Mac o Linux, se explora la unidad de disco.

Hacer doble clic en el archivo llamado "software CASA.m" en la raíz del disco.

Estando en el editor de MATLAB presionar F5 (clic en "Add to Path si es necesario")

3. MANEJO DEL PROGRAMA

Una vez se está en la pantalla de bienvenida se encuentran diferentes opciones en la pestaña "Tipo de Análisis".

-CONCENTRACIÓN:

Requiere conocer la medida del volumen de la muestra en uso, generará un valor es cantidad de espermatozoides por mililitro. Por defecto el valor es 0 (si no lo conoce recibirá la información de concentración en porcentaje).

Ver RECOMENDACIONES para garantizar el correcto funcionamiento.

-MOTILIDAD:

Generará el valor de velocidad y la clasificación de los espermatozoides según el movimiento. El resultado puede ser de clasificación D (consultar la teoría) si los espermatozoides están muertos. El resultado puede ser clasificación A si se mueve alguno de los equipos o sus componentes durante el análisis.

Ver RECOMENDACIONES para garantizar el correcto funcionamiento.

-PREVISUALIZACIÓN:

Para garantizar un resultado preciso y un apoyo suficiente al intérprete, en esta opción podrá ajustar a un punto visualmente aceptable (según el intérprete) la posición, definición y acercamiento del lente de zoom y de condensador (Lente por defecto 0) del microscopio de análisis de fase.

4. INFORMACIÓN DEL PROGRAMA, EDICIÓN Y EJEMPLOS

Si desea información de las líneas de código del programa o desea usar un ejemplo para observar el funcionamiento sin usar una muestra en el momento, puede ejecutar el archivo "DEMO.m" incluido en el disco de Software y allí encontrará detalles y explicaciones de cada línea según lo requiera.

ANEXO F. CÓDIGO COMPLETO DEL PROGRAMA (Archivos .m)

software CASA.m:

```
1- boton=0;
2- uiwait(msgbox('BIENVENIDO - HOY SERÉ SU ASISTENTE'))
3- casa=imread('casa.jpg');
4- figure('Position',[1 1 5000 5000]);
5- pos = [10 50 100 10];
6- ht=uicontrol('Style','Text','Position',pos,'FontSize',20);
7- string = {"...
8- 'Por favor asegurese que todos',...
9- 'los sistemas están conectados.',...
10- 'Ajuste la distancia y precisión del lente',...
11- 'a una posición en la que vea mejor la imagen',...
12- 'buscando que no haya ruido o interferencia',...
13- 'Trabajo a 40x'};
14- colwidth=17;
15- [outstring,newpos] = textwrap(ht,string,colwidth);
16- set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);
17- imshow(casa,'InitialMagnification',400);
18- vid = videoinput('winvideo', 2, 'RGB24_640x480');
19- src.FrameRate = '30.0000';
20- src = getselectedsource(vid);
21- choice = uimenu('Label','Tipo de Análisis');
22- uimenu(choice,'Label','Concentración','Callback','callcon')
23- uimenu(choice,'Label','Motilidad','Callback','callmot')
24- uimenu(choice,'Label','Previsualizar','Callback','preview(vid)')
```

callcon.m:

```
1- function [boton]=callcon(hObject, eventdata)
2- vid = videoinput('winvideo', 2, 'RGB24_640x480');
3- src.FrameRate = '30.0000';
4- src = getselectedsource(vid);
5- vid.FramesPerTrigger = 100;
6- preview(vid);
7- tic;
8- start(vid);
9- wait(vid,26)
10- time=toc;
11- stoppreview(vid);
12- closepreview(vid);
13- m = getdata(vid);
14- prompt = {'Volumen de la Muestra'};
15- dlg_title = 'Valor en ml';
16- num_lines = 1;
17- def = {'0'};
```

```

18- options.Resize='on';
19- options.WindowStyle='normal';
20- options.Interpreter='none';
21- answer = inputdlg(prompt,dlg_title,num_lines,def,options);
22- vol=str2num(cell2mat(answer(1)));
23- a=m(65:360,190:485,:);
24- fps=15;
25- in=size(m);
26- dur=in(4)/fps;
27- dur1=1/fps;
28- cam1=imread('camara.tif');
29- cam=rgb2gray(cam1(65:360,190:485,:));
30- [f,c,i]=size(cam);
31- for b=1:1:in(4)
32- a(:,:,1,b)=rgb2gray(a(:,:,b));
33- end
34- mask=[1/9 1/9 1/9;1/9 1/9 1/9;1/9 1/9 1/9];
35- h = waitbar(0,'Por favor espere...');
36- for b=1:1:in(4)
37- waitbar(b / in(4))
38- for i=2:1:f-1
39- for j=2:1:c-1
40- a1(i,j)=uint8(a(i-1,j-1,1,b)*mask(1,1)+a(i-1,j,1,b)*mask(1,2)+
a(i-1,j+1,1,b)*mask(1,3)+a(i,j-1,1,b)*mask(2,1)+a(i,j,1,b)*mask(2,2)+
a(i,j+1,1,b)*mask(2,3)+a(i+1,j-1,1,b)*mask(3,1)+a(i+1,j,1,b)*mask(3,2)+
a(i+1,j+1,1,b)*mask(3,3));
41- a2(i,j,1,b)=a1(i,j);
42- end
43- end
44- se = strel('disk',11);
45- tono1 = imerode(a2(:,:,1,b),se);
46- tono2(b)=max(max(tono1))-2;
47- conc(b)=0;
48- for l=1:1:f-1
49- for k=1:1:c-1
50- if (a1(l,k)<tono2)
51- a1(l,k)=0;
52- end
53- if (a1(l,k)>=tono2)
54- a1(l,k)=255;
55- conc(b)=conc(b)+1;
56- end
57- end
58- end
59- conc(b)=100*conc(b)/((f-1)*(c-1));
60- end
61- close(h)
62- figure;

```

```

63- subplot(2,2,1),imshow(a(:,:,1,1));
64- subplot(2,2,2);imhist(a(:,:,1,1));
65- subplot(2,2,3);plot(conc(round(0.2*in(4)):round(0.8*in(4))));
66- subplot(2,2,4);imshow(im2bw(cam)),title('TAMAÑO DE LA CÁMARA
0.0025mm^2')
67- o=0;
68- for g=20:1:80
69- if ((conc(g)>=mean(conc)))
70- o=o+1;
71- conc2(o)=conc(g+1);
72- end
73- end
74- concentracion_porcentaje=mean(conc2);
75- if vol>0
76- esp=concentracion_porcentaje*87025/(90*100
77- concentracion_ml=esp*4*10^6;
78- warndlg({'LA CONCENTRACIÓN ES
(esp/ml)',num2str(concentracion_ml)},'GASCAL')
79- else
80- warndlg({'LA CONCENTRACIÓN ES
(%)',num2str(concentracion_porcentaje)},'GASCAL')
81- end
82- end

```

callmot.m:

```

1- function [boton]=callmot(hObject, eventdata)
2- vid = videoinput('winvideo', 2, 'RGB24_640x480');
3- src.FrameRate = '30.0000';
4- src = getselectedsource(vid);
5- vid.FramesPerTrigger = 100;
6- preview(vid);
7- tic;
8- start(vid);
9- wait(vid,26)
10- time=toc;
11- stoppreview(vid);
12- closepreview(vid);
13- m = getdata(vid);
14- a=m;
15- sqrtime=0.202;
16- in=size(m);
17- [f,c,i]=size(m(:,:,,:));
18- for b=1:1:in(4)
19- a(:,:,1,b)=rgb2gray(a(:,:,b));
20- end
21- h = waitbar(0,'Por favor espere...');

```

```

22- cormot=0;
23- for b=6:1:100
24- waitbar(b / 100)
25- cormot(b-5)=corr2(a(:,:,1,b),a(:,:,1,b-5));
26- end
27- close(h)
28- figure;
29- load graficamotilidades.mat
30- correlacion=mean(cormot);
31- plot(corprom);
32- imread('corre.jpg');
33- imshow('corre.jpg')
34- warndlg({'Correlacion',num2str(correlacion)},'GASCAL')
35- prompt = {'Pixeles Respectivos'};
36- dlg_title = 'Valor en Pixels';
37- num_lines = 1;
38- def = {'0'};
39- options.Resize='on';
40- options.WindowStyle='normal';
41- options.Interpreter='none';
42- answer = inputdlg(prompt,dlg_title,num_lines,def,options);
43- pix=str2num(cell2mat(answer(1)));
44- vel=pix*50/295;
45- if vel>100
46- else
47- if vel>25
48- tipo='tipo A con velocidad mayor a 25 micras/s';
49- else
50- if vel>5
51- tipo='tipo B con velocidad de 5 a 24 micras/s';
52- else
53- tipo='tipo C o D con velocidad aprox. 0 micras/s';
54- end
55- end
56- end
57- imread('tabla.jpg');
58- imshow('tabla.jpg')
59- warndlg({'Tipo de espermatozoides motiles',tipo},'GASCAL')
60- end

```