



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LA COMPUTACIÓN

ANÁLISIS Y CLASIFICACIÓN DE LOS PATRONES DE BATIDO DEL
FLAGELO DEL ESPERMATOZOIDE MEDIANTE IMAGENOLOGÍA EN
3D+T

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LA COMPUTACIÓN

PRESENTA:
M. C. HAYDEE OLINCA HERNÁNDEZ AVIÑA

TUTOR DE TESIS:
DR. GABRIEL CORKIDI BLANCO (IBT, UNAM)

CO-TUTOR DE TESIS:
DR. BORIS ESCALANTE RAMÍREZ (FI, UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, MARZO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

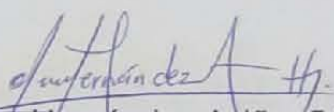
**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado Análisis y clasificación de los patrones de batido del flagelo del espermatozoide mediante imagenología en 3D+t, que presenté para obtener el grado de Doctora en Ciencia e Ingeniería de la Computación, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Programa de Posgrado, citando las fuentes, ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad e los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación

Atentamente


Haydee Olíncá Hernández Aviña, 519022865

Agradecimientos

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM PAPIIT:

- IN105222, “Análisis tridimensional del batido flagelar del espermatozoide humano activado e hiperactivado: desarrollo de nuevos métodos y algoritmos de rastreo y análisis en microscopía tridimensional”
- IV100420, “Análisis de imágenes médicas para la detección y el seguimiento de COVID-19”

Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida. También quisiera agradecer a CONACYT, por otorgarme la beca para realizar los estudios de doctorado con el CVU 700563.

Resumen

El presente documento titulado “Análisis y clasificación de los patrones de batido del flagelo del espermatozoide mediante imagenología en 3D+t” aborda una investigación detallada sobre el movimiento del flagelo del espermatozoide, utilizando técnicas de reconocimiento de patrones y clasificación no supervisada. El estudio se diferencia de los métodos tradicionales, como el análisis CASA, al ofrecer un enfoque más profundo y detallado del movimiento flagelar en 3D, proporcionando así una comprensión más completa de la fertilidad masculina.

El documento profundiza en los detalles técnicos y teóricos del reconocimiento de patrones, cubriendo los enfoques estadístico, estructural, de comparación de plantillas y redes neuronales artificiales. Se enfoca en cómo estas técnicas se pueden aplicar específicamente para identificar y clasificar los patrones de movimiento del flagelo del espermatozoide, un aspecto crucial para entender la fertilidad masculina.

En el capítulo sobre la infertilidad, se proporciona un contexto global sobre este problema de salud y se destaca la importancia de la motilidad espermática en la fertilidad. El documento vincula esta problemática con la necesidad de técnicas de análisis más avanzadas y precisas.

En cuanto al espermatozoide humano, se describe su estructura y función, enfatizando cómo el flagelo impulsa el movimiento del espermatozoide. Se resalta la importancia de entender estos movimientos para evaluar la fertilidad masculina y se discuten las implicaciones clínicas de los patrones de movimiento anormales.

El análisis de semen asistido por computadora (CASA) se presenta como una técnica existente, y se contrasta con la nueva metodología propuesta en el documento. Se argumenta que, aunque CASA es útil, el nuevo enfoque en 3D proporciona una visión más detallada y completa de la motilidad espermática, lo que podría mejorar significativamente la evaluación de la fertilidad masculina.

En general, el documento presenta un estudio innovador en el campo de la biología reproductiva, proponiendo métodos avanzados para el análisis detallado de la motilidad espermática, con el objetivo de mejorar la comprensión y el tratamiento de la infertilidad masculina.

Índice general

Índice de figuras	VII
Índice de tablas	XII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
2.1. Reconocimiento de patrones	5
2.1.1. Extracción de características	6
2.2. Clasificación	7
2.2.1. Clasificación supervisada	7
2.2.2. Clasificación no supervisada	8
2.2.2.1. Matrices de disimilitud	9
2.2.2.2. Agrupamiento jerárquico	10
2.3. Infertilidad	11
2.3.1. Espermatozoide humano	12
2.3.2. Hiperactivación	14
2.3.3. Análisis de semen asistido por computadora, CASA	16
2.3.3.1. CASAnova	18
2.3.3.2. Sistemas de análisis del flagelo	19
3. Datos	23
3.1. Configuración experimental	25
4. Metodologías para la Caracterización del Batido del Flagelo	27
4.1. Clasificación supervisada con datos canónicos	27
4.2. Clasificación supervisada con vectores de movimiento	29
4.3. Clasificación supervisada con características estructurales del flagelo (GRU, RNN)	33
4.4. Clasificación no supervisada para proyección de distribuciones	35
4.5. Clasificación no supervisada para el análisis de trayectorias en 3D+t	39
4.6. Clasificación no supervisada para histogramas circulares	47
4.7. Clasificación no supervisada para la envolvente de elipses	48
4.7.1. Ajuste de elipses	48
5. Resultados	52
5.1. Ajuste de elipses	52
5.2. Agrupamiento no supervisado	56

5.3. Clasificación	56
5.4. Validación de los resultados	58
6. Conclusiones y Discusión	63
Bibliografía	66
A. Tabla de identificación de espermatozoides	71
B. Figuras de las Metodologías para la Caracterización del Batido del Flagelo	76
B.1. Figuras de las funciones de densidad	76
B.2. Figuras de histograma circular	76
B.3. Figuras de primitivas	77
B.4. Figuras de envolventes de elipses	78
C. Publicaciones	81

Índice de figuras

2.1.	Diagrama de un sistema de reconocimiento de patrones. Imagen basada en [39].	6
2.2.	Diagrama de flujo de la clasificación supervisada. Imagen basada en [18].	8
2.3.	Representación de los clústeres particionales y jerárquicos. i) Representación de dos clústeres particionales que no se sobreponen. ii) Representación de 4 clústeres anidados con su representación en forma de dendrograma en iii). Imagen basada en [18].	9
2.4.	Morfología del espermatozoide humano sano. Imagen basada en [21].	13
2.5.	Roles de la motilidad hiperactivada en la fertilización. Imagen basada en [44]. (i) Tipos de motilidad en baja viscosidad, activada e hiperactivada. (ii) Procesos (cuatro) por lo que la motilidad hiperactivada es necesaria para la fecundación: a) generar una fuerza de propulsión en medios viscosos, b) escapar de la zona “depósito de espermatozoides”, c) nadar en contra del flujo del fluido y d) penetrar la matriz extracelular del óvulo.	14
2.6.	Patrones flagelares del espermatozoide de suncus. Basada en [33]. Batidos flagelares de espermatozoides activados (i, iii) e hiperactivados (ii, iv). Las gráficas muestran el análisis de curvatura (i, ii) y el ángulo de corte a lo largo del flagelo desde la unión cabeza-pieza media (iii, iv).	15
2.7.	Patrones de las trayectorias de espermatozoides de ratón. Imagen basada en [5, 24]. (i, ii) Patrones de espermatozoides de ratón observados y descritos en [24], i) muestra una trayectoria de un espermatozoide a los 0 minutos de incubación y ii) muestra la trayectoria después de 90 min de incubación. (iii-v) Muestran las 3 categorías descritas en [5] para las trayectorias de la cabeza del espermatozoide: motilidad progresiva, intermedia e hipertivada, respectivamente.	16
2.8.	Patrones observados en trayectorias de espermatozoides de humanos. Imagen basada en [23]. Son ejemplos de patrones de motilidad identificados durante la capacitación <i>in vitro</i> . Las trayectorias de CASA (ver Sección 2.3.3) muestran patrones de motilidad vigorosa (i-v) después de 3 horas en medio capacitivo se clasificaron visualmente como progresivas (i), intermedias (ii) o hiperactivadas (iii-v). Las trayectorias que muestran motilidad no vigorosa se clasificaron como lentas o débilmente móviles (vi-vii).	16
3.1.	Representación gráfica del tiempo 10 del batido flagelar de un espermatozoide (ID: Cap 024). La línea roja se conforma por los puntos extraídos de la segmentación de la línea central. La línea azul es el suavizado de los datos originales con una interpolación de $\sim 100nm$. El punto negro representa el primer punto que corresponde al punto en la cabeza.	24

3.2.	Representación gráfica resultante de la alineación de los datos para un espermatozoide (ID: Cap 024) con el eje X . Los puntos negros representan el centroide de la cabeza, mientras que los otros colores se conforman por una serie de puntos que en conjunto representan al flagelo en diferente tiempo.	25
3.3.	Diagrama de la configuración experimental para la adquisición de imágenes. Imagen basada en [11].	26
4.1.	Esquema de una red LSTM. La celda de una red neuronal recurrente LSTM se compone de una celda de memoria, una puerta de entrada (\mathbf{x}), una puerta de salida (\mathbf{h}) y una puerta de olvido. La celda de memoria almacena información a lo largo del tiempo (\mathbf{c}), procesa la información de entrada y genera salidas basadas en su estado de memoria y las entradas recibidas. Las puertas de entrada, salida y olvido regulan el flujo de información en la celda de LSTM. Imagen basada en [45].	28
4.2.	Matrices de confusión del lado izquierdo y gráficas del entrenamiento y validación de la red LSTM del lado derecho. (i) Muestra los resultados obtenidos utilizando únicamente las coordenadas del flagelo. (ii) Presenta los resultados obtenidos utilizando las coordenadas del flagelo, la magnitud de desplazamiento y el ángulo.	30
4.3.	(i) La gráfica en 3D muestra los vectores de movimiento de todos los puntos en el flagelo en tres tiempos consecutivos para un espermatozoide i . Los puntos verdes representan \mathbf{p}_{0n}^i , los amarillos representan \mathbf{p}_{1n}^i y los azules representan \mathbf{p}_{2n}^i . Las líneas representan los vectores reconstruidos para cada punto entre los diferentes tiempos utilizando la dirección y magnitud calculadas previamente. (ii-iv) Las gráficas muestran las proyecciones en los diferentes planos $X - Y$, $Y - Z$ y $X - Z$, respectivamente.	31
4.4.	Gráfica que muestra los valores promedio de exactitud obtenidos en las pruebas de variación de los hiperparámetros (ver Tabla 4.1). Se incluye la desviación estándar en las líneas de error. Cada columna representa una configuración diferente de hiperparámetros.	33
4.5.	Representaciones gráficas de las características del flagero. i) Ángulos de la recta paramétrica. ii) Ángulos de la RDO. iii) Distancia máxima de los puntos del flagelo a la recta paramétrica. iv) Distancia máxima de los puntos del flagelo a la RDO. v) Ángulos entre dos rectas paramétricas. vi) Ángulos entre dos RDOS que definen el flagelo. vii) Razón de curvatura total. Imágenes tomadas de [37].	34
4.6.	Diagrama de la arquitectura de la red. Los vectores de características pasan por las celdas (RNN, GRU o LSTM). Cuenta con una capa densa y al final pasa por una función de activación sigmoide para la clasificación.	35
4.7.	Gráfica de los mejores resultados obtenidos con la red. El eje horizontal son las épocas. Las líneas superiores muestran el error de la clasificación. Las líneas de la parte inferior muestran el porcentaje de exactitud obtenido. La roja muestra los resultados para las celdas GRU, las verdes para las celdas RNN y las azules de las celdas LSTM.	35
4.8.	Gráfica de agrupamiento mediante el modelo de MG para las proyecciones de los puntos en un plano. En la parte superior la agrupación para $K = 3$ y en la parte inferior la agrupación para $K = 4$	38
4.9.	Representación gráfica de las primitivas para el análisis de trayectorias. Imagen basada en [59]. i) Línea recta (A), ii) Curva plana (B), iii) Hélice derecha (C) y iv) Hélice izquierda (D).	39

4.10. Análisis de trayectorias en el tiempo. En la parte superior se muestra el análisis de trayectorias del espermatozoide no capacitado (experimento 1). En la parte inferior se muestra el análisis de trayectorias del espermatozoide inducido a capacitación (experimento 5). Las gráficas de lado izquierdo representan la codificación de las trayectorias en las primitivas: negro (línea recta), verde (curva plana), azul (hélice derecha), y rojo (hélice izquierda). 41

4.11. Análisis de trayectorias en el espacio. En la parte superior se muestra el análisis de trayectorias del espermatozoide no capacitado (experimento 1). En la parte inferior se muestra el análisis de trayectorias del espermatozoide inducido a capacitación (experimento 5). Las gráficas de lado izquierdo representan la codificación de las trayectorias en las primitivas: negro (línea recta), verde (curva plana), azul (hélice derecha), y rojo (hélice izquierda). 42

4.12. Gráfica de la frecuencia promedio de los 30 q-gramas más frecuentes en las secuencias de primitivas. 43

4.13. Dendrogramas en representación circular para cada una de las distancias ($d_1 - d_6$) de la matriz de disimilitud. 44

4.14. Dendrogramas en representación circular para cada una de las distancias ($d_7 - d_{12}$) de la matriz de disimilitud. 45

4.15. Dendrogramas en representación circular para cada una de las distancias ($d_{13} - d_{18}$) de la matriz de disimilitud. 46

4.16. Representación gráfica para la obtención de la distribución de densidad de los puntos que conforman a los flagelos. La línea verde es la recta paramétrica. Los puntos negros son los puntos de referencia trasladados sobre la recta paramétrica para formar los vectores de referencia con los puntos magenta. Las líneas punteadas son los vectores conformados por los puntos en el flagelo y la recta paramétrica. Se busca encontrar el ángulo entre la línea roja y la línea morada para cada uno de los puntos. 48

4.17. Matriz de los valores de la distribución de densidad, cada fila representa un experimento, las primeras 360 columnas cuantifican los grados de la circunferencia y la última columna la circunferencia promedio. La intensidad depende de la cantidad de puntos que tenían un ángulo similar, a mayor proporción de puntos el color es blanco. 49

4.18. Dendrograma de las distribuciones de densidad de todos los puntos del flagelo. 49

5.1. Esquema de ajuste de una elipse a un flageloide. La subgráfica inferior muestra la representación del espermatozoide ID: Cap 024 segmentado y rastreado, al igual que en la Figura 3.2; se muestran 11 planos de corte (grises) correspondientes a 10 intervalos ($\approx 0.21\mu m$ cada uno). La subgráfica superior muestra un acercamiento de un solo intervalo, los puntos rojos corresponden a los puntos de los flagelos que pertenecen al intervalo. A la derecha se muestra la proyección ortogonal de los puntos rojos formando un flageloide (línea negra) con su elipse ajustada (línea punteada morada). 53

5.2.	Envolvente de elipses (líneas moradas) para un espermatozoide, y sus proyecciones sobre XY , XZ y YZ (líneas gris claro). Cada elipse corresponde al ajuste a un intervalo, de tal manera que la envolvente completa está compuesta por todas las elipses ajustadas al batido del espermatozoide. La envolvente de elipses se utilizó para analizar la dinámica del batido flagelar del espermatozoide y extraer características relevantes. La figura muestra cómo las elipses se ajustan a la forma curva del espermatozoide, lo que permite obtener información sobre la orientación y forma del flagelo a lo largo del tiempo. Las proyecciones en XY , XZ y YZ permiten a visualizar la forma del batido flagelar del espermatozoide en diferentes perspectivas. . . .	55
5.3.	El dendrograma en representación circular muestra el agrupamiento jerárquico con enlace promedio; las líneas rojas corresponden al Grupo 1 y las líneas verdes al Grupo 2. Las identificaciones de cada experimento, donde “Cap” se refiere a los espermatozoides inducidos a la capacitación y “No Cap” pertenece al grupo de control.	57
5.4.	Diagrama de flujo que ilustra los pasos realizados en el análisis y agrupamiento de los espermatozoides. Este diagrama de flujo proporciona una representación visual de la metodología utilizada en el estudio y ayuda a comprender el flujo de trabajo seguido para obtener los resultados presentados.	59
5.5.	Las gráficas superiores muestran el batido flagelar de un espermatozoide clasificado como motilidad no capacitada (lado izquierdo) y un espermatozoide clasificado como motilidad hiperactivada (lado derecho). Ambos están alineados y rotados con respecto al eje X (línea negra) a lo largo de los primeros $\sim 2.5 \mu m$ de longitud de arco, correspondientes a la mitad de la cabeza del espermatozoide (marco de referencia fijo del cuello). La elipse al final del eje x muestra la elipse promedio ajustada al batido flagelar, indicando la anisotropía promedio del batido. Las gráficas inferiores muestran la suma del espectro de amplitud de todos los puntos. Los puntos rojos en estas gráficas representan el valor máximo del espectro, asociado con la frecuencia de batido de los espermatozoides, ω_b^i	61
5.6.	Diagramas de caja de los valores de frecuencia, amplitud y anisotropía para cada grupo de motilidad identificado (hiperactivado y no capacitado). El valor p - para la prueba de Wilcoxon para cada característica es: 0.009, 0.01 and 0.0476 respectivamente $*P < 0.05$	62
B.1.	Ajuste de funciones de densidad de probabilidad para el batido flagelar del espermatozoide humano. En la parte superior se muestra el ajuste para el espermatozoide no capacitado (experimento 88), mientras que en la parte inferior se presenta el ajuste de funciones de densidad del espermatozoide inducido a capacitación (experimento 5).	77
B.2.	Histogramas circulares de la distribución de puntos del batido flagelar. En la parte izquierda se muestra el histograma circular del espermatozoide no capacitado (experimento 88). En la parte derecha se muestra el histograma del espermatozoide inducido a capacitación (experimento 5).	78

B.3. Segmentación de las trayectorias en primitivas para los espermatozoides 88 (no capacitado) y 5 (inducido a capacitación), mostrando mapas de curvatura normalizada y torsión, así como la representación de primitivas en colores. Los colores magenta, verde, azul y rojo representan líneas rectas, curvas planas, hélices derechas y hélices izquierdas, respectivamente. El eje X representa el tiempo, mientras que el eje Y corresponde al conjunto de puntos que describen un flagelo. 79

B.4. Envoltente de elipses para los espermatozoides 88 (no capacitado) y 5 (inducido a capacitación). Las figuras muestran la envoltente de elipse generada para cada uno de los espermatozoides mostrados, utilizando toda la información del batido del espermatozoide. 80

Índice de tablas

2.1.	Comparación entre el análisis cuantitativo y cualitativo del semen.	12
2.2.	Definición y clasificación de las categorías de motilidad del espermatozoide humano [42].	14
2.3.	Factores que afectan los resultados de CASA [14].	17
2.4.	Tabla de los nombres, definiciones y símbolos estándares para las variables cinemáticas medidas por CASA con su respectiva fórmula [2, 5, 14]. Sea $\{p_t\}_{t=1}^N$ una trayectoria de N puntos, $D(p, q)$ la distancia Euclídeana entre p y q , μ el factor de escala ($\mu m/\text{pixel}$).	22
4.1.	Variaciones de experimentos para entrenar una red. Se muestran los hiperparámetros utilizados en cada experimento, incluyendo el número de capas, el número de celdas en cada capa, la tasa de aprendizaje, la pérdida lambda, el tamaño del lote (batch size) y el sesgo de olvido (forget bias) para cada capa.	32
5.1.	Detalles del análisis de componentes principales obtenidos a partir del vector de características de la envolvente de elipses. El elemento $[j, k]$ es la contribución de la característica j al k -ésimo componente principal (PC). La característica dominante para cada componente principal se muestran en negrita.	56
A.1.	Lista de nombres de los experimentos para cada espermatozoide y sus identificadores.	75

Introducción

El reconocimiento de patrones, fundamental en nuestro estudio, implica la extracción y selección de características específicas para clasificar datos en diversas categorías. Esta técnica es crucial en el procesamiento de señales e imágenes digitales, como las utilizadas para analizar los patrones de movimiento del espermatozoide. Existen dos tipos de clasificación, supervisada y no supervisada. La clasificación supervisada se realiza con datos que tienen una clase o categoría predefinida, mientras que la clasificación no supervisada utiliza datos sin etiquetas, es decir, que no tienen clase o categoría predefinida. En el contexto de imágenes biomédicas, el procesamiento de imágenes se realiza en dos pasos, el procesamiento de bajo nivel y de alto nivel. Según Meyer et al. [39], el procesamiento de imágenes en el contexto biomédico implica tanto el procesamiento de bajo nivel, que incluye el preprocesamiento, la segmentación y el filtrado de imágenes, como el procesamiento de alto nivel, que se aplica a los datos obtenidos para su clasificación. Sin embargo, es importante destacar que la integración simultánea de múltiples niveles de procesamiento de imágenes es un tema de investigación activo en el campo del procesamiento de imágenes. Tanto el reconocimiento de patrones, como el procesamiento de imágenes y la clasificación de datos se han utilizado en diversas áreas científicas, una de ellas es en fisiología en el análisis de fertilidad.

En la biología reproductiva, los gametos se dividen en dos categorías principales: los espermatozoides en los organismos masculinos y los óvulos (u ovocitos) en los organismos femeninos. Los gametos son células especializadas que desempeñan un papel fundamental en la reproducción sexual de los organismos. Estas células haploides, es decir, que tienen la mitad del número normal de cromosomas, son esenciales para la formación de nuevos individuos durante la fertilización. El espermatozoide, es la célula especializada responsable de la fertilización en los organismos masculinos, se compone de dos partes principales: la cabeza y el flagelo (ver Figura 2.4). La cabeza contiene el material genético necesario para la fertilización, mientras que el flagelo proporciona la motilidad necesaria para desplazarse hacia el óvulo.

La fertilidad humana es una de las áreas científicas de gran interés y desarrollo, tanto para promover la concepción como para inhibirla. La motilidad de los espermatozoides en mamíferos es un tema de gran importancia debido a la creciente tasa de infertilidad humana y la posible mejora de la progenie animal [21]. En este sentido, desde hace más de dos décadas se utiliza el procesamiento de imágenes de espermatozoides para obtener parámetros de fertilidad utilizando medidas cuantitativas asociadas a su nado [42]. En la reproducción de mamíferos, los espermatozoides deben de viajar a través del tracto

femenino (oviducto) para fecundar al óvulo; a pesar de la gran cantidad de espermatozoides que arriban al sitio de fertilización sólo un espermatozoide logra fecundar al óvulo [14]. El transporte del espermatozoide a través del oviducto puede durar desde minutos hasta horas, no obstante, este tiempo no es necesariamente para la acumulación de espermatozoides ni tampoco asegura la fecundación del óvulo [8]. Durante este trayecto, el espermatozoide es sometido a una serie de reacciones bioquímicas que en conjunto se conocen como **capacitación**. La hiperactivación (HA) de la motilidad del espermatozoide, es una de las consecuencias de la capacitación, la cual implica cambios en el patrón del batido flagelar [28, 33, 57]. Este cambio es producido por variaciones fisiológicas que le permiten al espermatozoide obtener la capacidad de arribar y fecundar al óvulo [8]. Hoy en día la información que se tiene sobre cómo el espermatozoide viaja a través del tracto femenino hasta la zona de fecundación es limitada [52].

Desde hace 60 años, el estudio de la infertilidad masculina se realiza mediante el análisis de semen [7]. En sus inicios, dicho estudio se realizaba únicamente por un análisis visual de la muestra. Actualmente, en los laboratorios de investigación, así como en clínicas de fertilidad el semen se somete a un análisis cualitativo por expertos del tema, y recientemente con el uso del procesamiento imágenes en dos dimensiones (2D). Los análisis de semen proveen información clínica importante sobre el potencial de fertilidad, específicamente la función testicular (ver Cuadro 2.1). No obstante, las mediciones visuales como el conteo de espermatozoides, porcentajes de motilidad y morfología, son subjetivas e imprecisas. Davis et al. [14] discuten un estudio en el que 26 técnicos analizaron visualmente una muestra para determinar los porcentajes de motilidad de los espermatozoides, los resultados variaron de un 30 % hasta un 80 %.

El “Análisis de Semen Asistido por Computadora” (CASA, por sus siglas en inglés) es un *software* desarrollado para el estudio de infertilidad que ha constituido una referencia a nivel mundial. Con el uso de esta tecnología se mostró que los sistemas computarizados son más objetivos que el análisis visual [14]. CASA, clasifica la muestra mediante parámetros definidos respecto al movimiento de la cabeza del espermatozoide en imágenes 2D. A pesar de que el flagelo del espermatozoide es el que rige el movimiento de la cabeza, debido a su rápido batido, ha sido complicado establecer los parámetros asociados a éste. Los parámetros que se obtienen del análisis CASA, son valores estandarizados en un marco de referencia que determinan si un espermatozoide es capaz de fecundar al óvulo, es decir se encuentra en un estado hiperactivado. Sin embargo, Niederberger et al. [43] menciona que no se debe considerar a un hombre fértil o infértil basándose en un rango de referencia, ni ser colocado en el contexto de los rangos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a que todos los datos están “sujetos a interpretación en el contexto del cuadro clínico”.

Existen trabajos publicados que utilizan aprendizaje automático sobre la morfología del espermatozoide. Recientemente, se publicó el sistema CASAnova que utiliza aprendizaje automático supervisado usando máquinas de soporte vectorial (SVM, por sus siglas en inglés) para mejorar y automatizar la clasificación en 2D, de varios de los patrones de motilidad del espermatozoide de humano durante la capacitación *in vitro* [23]. Este sistema, se basa en los parámetros clásicos 2D del sistema CASA y no incluye parámetros del movimiento flagelar que podrían contener información sobre el estado de fertilidad del espermatozoide. En Javadi et al. [31] utilizaron una red neuronal convolucional (CNN, por sus siglas en inglés) para clasificar espermatozoides en normales y anormales para detectar diferentes características morfológicas en diferentes partes del espermatozoide humano.

Para evaluar la precisión de los resultados utilizaron la medida F_β^1 (conocida también como F-score) que se calcula mediante la precisión y la sensibilidad, que de igual manera son métricas de rendimiento del clasificador. La red logró puntajes $F_{0.5}$ de 84.74 %, 83.86 % y del 94.65 % en la detección de anomalías en el acrosoma, la cabeza y vacuola, respectivamente. Sin embargo, este sistema no mide la motilidad del flagelo del espermatozoide. Un trabajo similar, el de Riordon et al. [47] donde utiliza una red VGG16, red convolucional profunda, para la categorización de formas de la cabeza del espermatozoide definidas por la OMS.

En la investigación de imágenes de espermatozoides existen tres problemas computacionales principales: la detección, el seguimiento y la clasificación [50]. En los últimos años se ha progresado significativamente en la tecnología requerida para analizar los espermatozoides en un entorno tridimensional empleando microscopía holográfica digital para la detección de múltiples espermatozoides [12, 13, 32] y mediante microscopía de fluorescencia [11]. Corkidi et al. [11], desarrollaron un sistema para el rastreo y el análisis de múltiples trayectorias de espermatozoides en 3 dimensiones (3D) capaz de adquirir el batido flagelar en 3D a lo largo del tiempo, 3D+t. Silva et al. [51] reportaron las primeras segmentaciones en 3D del flagelo del espermatozoide. En el 2017, se desarrolló un sistema de microscopía de fluorescencia con una tasa de adquisición suficientemente alta para capturar el movimiento flagelar de los espermatozoides en 3D+t [10]. Los datos generados alcanzan miles de imágenes por experimento, para una condición se pueden obtener 8,000 imágenes por segundo, hasta por 5.46 segundos, resultando en una gran cantidad de datos para procesar. Comparado con el número de imágenes necesarias para el análisis CASA (ver Secc. 2.3.3) que requiere de por lo menos 1 segundo de imágenes adquiridas, no obstante dependen de la tasa de adquisición del sistema (60 Hz, 90 Hz, 100 Hz). Hernández-Herrera et al. [27], desarrollaron un algoritmo iterativo para la segmentación del flagelo del espermatozoide a partir de imágenes 3D+t de fluorescencia con una relación de señal-ruido (SNR, por sus siglas en inglés) tan bajas como 1.8. Este valor de señal-ruido en microscopía de fluorescencia es bajo comparado con los requerimientos de otros algoritmos para la segmentación de imágenes en estas técnicas. Estos resultados proporcionan información de cada espermatozoide en 3D, pero aún más importante con la descripción de su flagelo a lo largo del tiempo. En comparación con CASA (ver Secc. 2.3.3), este algoritmo analiza una célula a la vez. Davis et al. [14] menciona que estudiar células individualmente, proporciona resultados más precisos de una población que los métodos de evaluación cualitativa y cuantitativa de la examinación del semen. Debido a que son subjetivos y están sujetos a diferentes factores biológicos, como la preparación de la muestra, la adquisición de las imágenes y el sistema de análisis; además que es más importante estudiar la motilidad y los patrones de movimiento de los espermatozoides ya que es un reflejo de los mecanismos biológicos.

Como se mencionó anteriormente, el análisis de la motilidad de los espermatozoides humanos se realiza en imágenes 2D, tomando únicamente como referencia la trayectoria de la cabeza y clasificándolos basándose en un marco de referencia preestablecido. Sin embargo, este enfoque limita la información que se puede obtener y hace que los resultados dependan del experto que los analice, lo que conlleva a una clasificación sesgada y subjetiva. Cabe mencionar que, aunque existen análisis del batido flagelar en 2D, no hay un sistema que clasifique los patrones de motilidad de los espermatozoides ni en 2D ni en 3D

1

$$F_\beta = (1 + \beta) \cdot \frac{(\text{precisión})(\text{sensibilidad})}{(\beta^2)(\text{precisión}) + \text{sensibilidad}} \quad (1.1)$$

basado en el flagelo, lo que dificulta la caracterización de los mismos. Es por ello que el presente proyecto se enfocó en alcanzar diversos objetivos para avanzar en la caracterización y clasificación del batido flagelar en 3D. El objetivo principal consistió en determinar descriptores representativos del patrón de movimiento flagelar. Para lograrlo, se llevaron a cabo análisis exhaustivos y se identificaron atributos relevantes para la clasificación no supervisada para espermatozoides hiperactivados.

Este estudio se centra en el reconocimiento de patrones aplicado específicamente al análisis del movimiento del flagelo del espermatozoide, una técnica esencial en el estudio avanzado de la fertilidad masculina. Como resultado de este estudio, se lograron exitosamente los objetivos planteados:

- Identificar descriptores representativos del batido flagelar del espermatozoide.
- Establecer atributos adecuados para la clasificación del batido flagelar.
- Generar un valioso conjunto de información sobre los patrones de movimiento flagelar presentes en la base de datos utilizada.

Estas contribuciones representan avances significativos en el campo de la caracterización del batido flagelar en 3D y sus implicaciones en la biología reproductiva.

Antecedentes

El análisis de las trayectorias en 3D+t es complejo debido a la gran cantidad de información que contienen comparado con los datos en 2D+t. Sin embargo, la capacidad de analizar trayectorias en 3D+t es relevante para una variedad de aplicaciones, como el análisis de movimiento de células o microorganismos. En este trabajo nos enfocamos en el análisis de trayectorias de espermatozoides, específicamente para la evaluación de su motilidad.

En el reconocimiento de patrones y visión por computadora, el ajuste de modelos primitivos a imágenes es una tarea básica que permite la reducción y simplificación de los datos para su procesamiento posterior [19]. En este capítulo se describen las bases del reconocimiento de patrones, la clasificación así como de los métodos utilizados para la extracción de características y la clasificación de los datos.

2.1. Reconocimiento de patrones

El reconocimiento de patrones es el proceso de identificar y clasificar un conjunto de datos. En el contexto de nuestra investigación, se centra en identificar y clasificar patrones específicos en el movimiento del flagelo del espermatozoide, una técnica innovadora en el campo de la fisiología. En el reconocimiento de patrones, el término patrón se interpreta de manera amplia y no necesariamente implica una repetición [18]. Es la entidad que se busca reconocer o identificar en un conjunto de datos; ejemplos de ello, son texturas en imágenes, formas en 2D o 3D, el reconocimiento de números, por mencionar algunos.

Un sistema de reconocimiento de patrones, en general, conlleva dos tareas principales, 1) el pre-procesamiento de los datos y la extracción de características y 2) la clasificación o reconocimiento de los patrones utilizando la información obtenida de la primera fase (ver Figura. 2.1) [36]. Algunas de las aplicaciones del reconocimiento de patrones son: minería de datos, biometría, visión por computadora, reconocimiento de caracteres, reconocimiento de documentos, diagnóstico asistido por computadora, procesamiento de imágenes médicas, reconocimiento de voz, bioinformática, detección remota, astronomía, entre otras [18].

La dimensión de la señal a reconocer depende de la aplicación; señales 1D ($f(t)$, por ejemplo señales eléctricas), 2D ($f(x, y)$, por ejemplo imágenes), 3D ($f(x, y, t)$, por ejemplo vídeos) y multidimensionales (dependen de n - variables) [49]. La extracción de las características

depende del tipo de señal y del tipo de patrones que se quiere reconocer. Para ello existen un conjunto de técnicas para la extracción de características de los datos.



Figura 2.1: Diagrama de un sistema de reconocimiento de patrones. Imagen basada en [39].

2.1.1. Extracción de características

La etapa de extracción de características reduce el tamaño de los datos, identificando y midiendo ciertas propiedades o características como el tamaño, la forma y la textura [18]. Los cuatro enfoques más utilizados en el reconocimiento de patrones son [30]:

- Enfoque estadístico. Es uno de los más utilizados por su simplicidad. Cada patrón representa por un conjunto de mediciones o atributos (d -atributos). El objetivo de este enfoque es encontrar los atributos o características que permitan diferenciar las clases en un espacio de atributos d -dimensional.
- Enfoque estructural. Este enfoque se utiliza generalmente cuando existen patrones complejos, adoptando una perspectiva jerárquica en la que un patrón se compone de subpatrones más simples (primitivas). El enfoque estructural de reconocimiento de patrones tiene una analogía formal que se hace entre estructuras de patrones con la sintáctica de un lenguaje, donde las primitivas son el alfabeto del lenguaje y los patrones (conjunto de primitivas) son oraciones del lenguaje. Por lo que un conjunto de patrones se describe mediante primitivas y reglas gramaticales, la gramática se infiere de los datos de entrenamiento. Además, este enfoque proporciona información de cómo se construye el patrón a partir de primitivas.
- Enfoque de comparación de plantillas. Este enfoque realiza comparaciones con plantillas preexistentes entre dos entidades del mismo tipo, como pueden ser puntos, curvas o formas. El reconocimiento de un patrón se compara con las plantillas tomando en cuenta todas las combinaciones posibles. El problema de este enfoque radica en que puede fallar cuando los patrones están distorsionados por el proceso de adquisición, ángulo de vista, o por variaciones intraclases entre los patrones.
- Redes neuronales artificiales. El enfoque reconoce patrones a través de una serie de “neuronas” interconectadas, con datos previamente etiquetados. Las principales características de las redes neuronales son que tienen la capacidad de aprender relaciones complejas de entrada y salida no lineales, utilizar procedimientos de entrenamiento secuenciales y adaptarse a los datos.

Estos modelos no son necesariamente independientes y, a veces, existe el mismo método de reconocimiento de patrones con diferentes interpretaciones. La calidad de las características está relacionada con su capacidad para discriminar ejemplos de diferentes clases. Los datos de una misma clase deben tener valores de características similares, mientras que los datos de diferentes clases deben tener valores de características diferentes, es decir,

las buenas características deben tener pequeñas variaciones dentro de la clase y grandes variaciones entre clases [18].

El vector de características \vec{x} de cada una de las muestras, es el resultado de la extracción de características, el cual contiene $x_1, x_2, x_3, \dots, x_d$ atributos. Para d -atributos, el espacio de características es d -dimensional, donde cada atributo constituye una dimensión. Mientras mayor sea el número de características, las dimensiones del espacio de atributos aumentan lo que implica una complejidad mayor para la clasificación de los datos, esto es denominado la “maldición de la dimensionalidad”. No obstante, es prudente obtener un mayor número de características que podrían ser necesarias, y después (1) aplicar métodos de reducción de dimensionalidad o (2) seleccionar el subconjunto de atributos que aporten más información quitando características irrelevantes o redundantes [18].

2.2. Clasificación

Una vez realizada la fase uno del sistema de reconocimiento de patrones, donde se han extraído los atributos de los datos; el siguiente paso consiste en la clasificación de los patrones. En nuestra investigación, la clasificación juega un papel vital al separar los datos del movimiento del flagelo en distintas categorías, lo que permite una comprensión más profunda de sus patrones y características únicas. Las clases son una colección de objetos similares que no necesariamente son idénticos, pero si son distinguibles de otras clases dependiendo de las características extraídas [18]. Existen dos tipos de clasificación de los datos, clasificación supervisada y clasificación no supervisada.

2.2.1. Clasificación supervisada

La clasificación supervisada consta de un conjunto de datos separados en el conjunto de entrenamiento y el conjunto de prueba o validación. Los datos están etiquetados, es decir, *a priori* se conoce la clase o categoría a la que pertenecen los datos de entrenamiento y la clasificación se prueba con los datos de validación. El entrenamiento del clasificador es el proceso de determinar el mejor conjunto de atributos para la clasificación de los datos, utilizando métricas de rendimiento como son: la sensibilidad, la precisión, la especificidad, el F-score, entre otras.

La métrica más utilizada es la exactitud, la cual se define como el porcentaje de predicciones correctas, representadas por los Verdaderos Positivos (VP) y los Verdaderos Negativos (VN), en relación con el número total de predicciones, incluyendo los Falsos Positivos (FP) y los Falsos Negativos (FN). Matemáticamente, se expresa como:

$$\text{exactitud} = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN} (100).$$

Esta métrica evalúa la capacidad del modelo para predecir correctamente tanto los casos positivos como los negativos, proporcionando una medida general de su desempeño.

La precisión o sensibilidad mide el porcentaje de valores positivos verdaderos predichos sobre el total de los valores positivos predichos

$$\text{precisión} = \frac{VP}{VP + FP} (100).$$

La exhaustividad calcula el porcentaje de los positivos verdaderos captura el modelo al etiquetarlo como positivo (VP),

$$\text{exhaustividad} = \frac{VP}{VP + FN}(100).$$

El proceso de aprendizaje es adaptar el algoritmo de clasificación para mejorar las métricas de rendimiento (ver Figura 2.2).

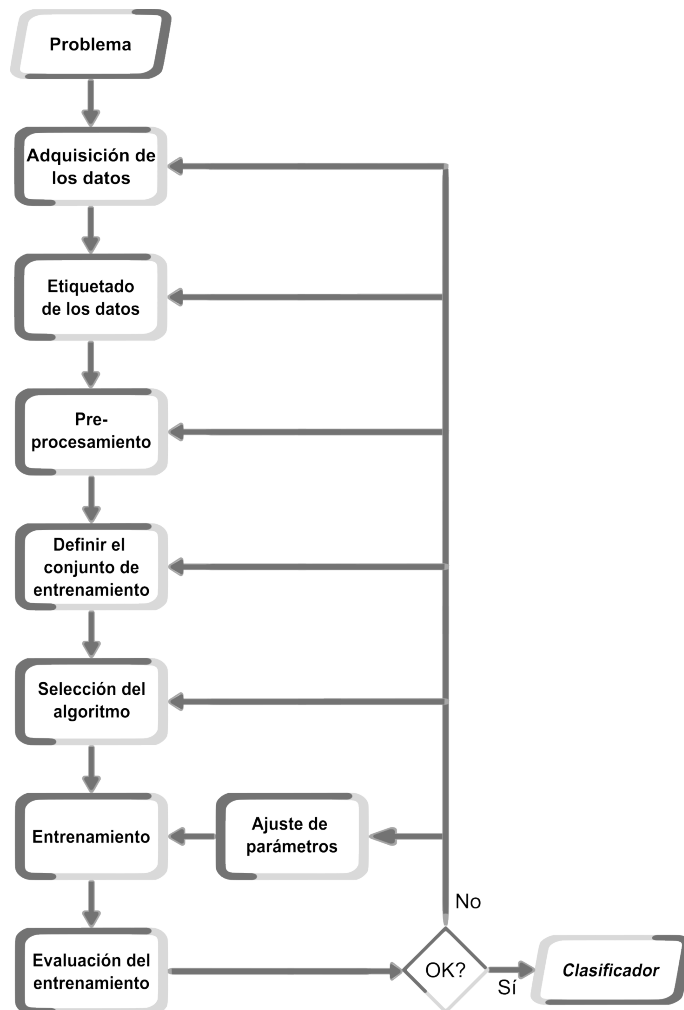


Figura 2.2: Diagrama de flujo de la clasificación supervisada. Imagen basada en [18].

2.2.2. Clasificación no supervisada

En la clasificación no supervisada se desconoce la clase o categoría a la que pertenecen las características o patrones extraídos, ya que puede ser extremadamente difícil o costoso, incluso imposible identificar de una manera confiable el conjunto de datos. Este tipo de clasificación se ha utilizado en una variedad de campos como son:

- En biología, para encontrar genes que tienen funciones similares.
- En medicina, para identificar variantes de enfermedades.
- En el procesamiento de imágenes, para segmentar imágenes.

La clasificación no supervisada también conocida como agrupamiento de datos se basa en medidas de similitud entre los patrones, los datos se agrupan en “clústeres”. La medición de similitud, o disimilitud, es una medida de proximidad, que dependiendo de la aplicación, puede ser la norma L_1 (distancia Manhattan o city-block), la norma L_2 (distancia Euclidiana) o la norma L_∞ (distancia de Chebyshev). Los clústeres pueden ser particionales o jerárquicos (ver Figura 2.3). En los particionales los datos se agrupan en subconjuntos que no se superponen entre ellos; mientras que en los jerárquicos los subconjuntos están anidados (representados por árboles jerárquicos o dendrogramas). Algunos de los algoritmos de agrupamiento más utilizados son: k -medias (k -means en inglés), Modelo de Gaussianas Mixtas (GMM, por sus siglas en inglés) y agrupamiento jerárquico. El problema principal que se presenta en el agrupamiento particional es como se define el número de clústeres; mientras que para el agrupamiento jerárquico, es como se determina el punto de paro en un algoritmo de agrupación [18].

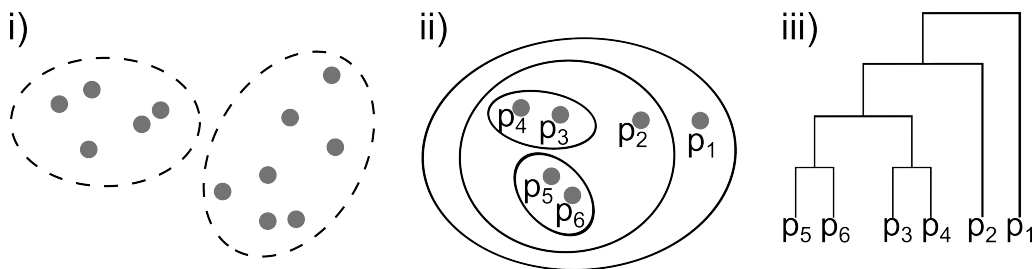


Figura 2.3: Representación de los clústeres particionales y jerárquicos. i) Representación de dos clústeres particionales que no se sobreponen. ii) Representación de 4 clústeres anidados con su representación en forma de dendrograma en iii). Imagen basada en [18].

2.2.2.1. Matrices de disimilitud

Las matrices de disimilitud se utilizan en una amplia variedad de aplicaciones, como la clasificación, la agrupación y el análisis de similitud. Se pueden utilizar en diferentes campos como la biología, la psicología, la sociología, la informática, entre otros. Es importante destacar que las matrices de disimilitud se calculan utilizando diferentes tipos de variables, como variables continuas, variables categóricas o variables binarias. Además, existen diferentes técnicas para el cálculo de estas matrices, algunas de las cuales pueden ser más adecuadas para ciertos tipos de datos que otras. Una matriz de disimilitud también se puede utilizar como entrada para otras técnicas estadísticas, como análisis de correspondencia, análisis de conglomerados, análisis de componentes principales, análisis de discriminante, entre otros. Por lo tanto, su importancia es muy significativa en el análisis exploratorio de datos. Cabe señalar que una matriz de disimilitud representa la similitud entre más de dos conjuntos. Esto se logra a través de la creación de una matriz de disimilitud cuadrada, donde cada elemento representa la disimilitud entre dos conjuntos diferentes. En resumen, las matrices de disimilitud son una herramienta fundamental para el análisis de datos en diversos campos, ya que permiten representar y cuantificar la similitud o disimilitud entre dos o más conjuntos.

La similitud de las muestras se puede medir como las diferencias que existen entre sus componentes. Para ello existen una gran cantidad de métricas de disimilitud, aunque la mayoría se basa en distancias. Sea \mathbf{A} una matriz de datos con n filas (muestras) y m columnas (variables), la disimilitud entre las muestras i y j se calcula como una función

d de las diferencias entre las observaciones correspondientes en cada columna de \mathbf{A} [29]. Formalmente, la disimilitud d_{ij} entre las muestras i y j se puede expresar como:

$$d_{ij} = d(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j),$$

donde \mathbf{x}_i y \mathbf{x}_j son los vectores de datos correspondientes a las muestras i y j , respectivamente. La función de disimilitud d debe cumplir con las siguientes propiedades:

- $d_{ij} = 0$ si $i = j$.
- $d_{ij} = d_{ji}$, simetría.
- $d_{ij} \geq 0$, no negatividad.
- $d_{ij} + d_{jk} \geq d_{ik}$, desigualdad triangular (solo con distancia Euclidiana).

Algunas de las distancias más comunes para calcular la disimilitud son: la distancia Euclidiana, la distancia de Mahalanobis y la distancia Manhattan.

2.2.2.2. Agrupamiento jerárquico

El agrupamiento jerárquico es un método de clasificación no supervisada para la agrupación de datos, existen dos tipos:

- Aglomerativo: la formación de grupos es de manera ascendente.
- Divisivo: la formación de grupos es de manera descendente.

El agrupamiento jerárquico se utiliza ampliamente en diferentes campos, como la biología, la psicología, la economía y otros. Por ejemplo, en biología se utiliza para agrupar genes o proteínas que tienen patrones de expresión similares, mientras que en psicología se puede utilizar para agrupar a los participantes de un estudio según sus respuestas a diferentes preguntas. En economía, se utiliza para agrupar diferentes países o regiones según sus patrones de comercio o actividad económica.

Para la agrupación es necesario tener una métrica de disimilitud entre los datos para compararlos. Para ello se utiliza la matriz de disimilitud (ver Secc. 2.2.2.1). Cabe resaltar que la elección de la distancia para medir la disimilitud es de vital importancia ya que influye en el agrupamiento de los datos. Asimismo, es necesario un criterio de enlace que justifique la unión entre dos observaciones. Los criterios de enlace más utilizados son:

- Enlace simple, utiliza la distancia mínima entre los objetos,

$$\min\{d_{ij}\}. \tag{2.1}$$

- Enlace completo, utiliza la distancia máxima entre los objetos,

$$\max\{d_{ij}\}. \tag{2.2}$$

- Enlace promedio, utiliza la media entre todos los pares de objetos,

$$\frac{1}{n_i n_j} \sum_{i=1}^{n_i} \sum_{j=1}^{n_j} d_{ij}, \quad (2.3)$$

donde d_{ij} es la métrica de disimilitud entre los objetos i y j , n_i y n_j son el número de elementos en los clústeres.

La representación de los resultados del agrupamiento es mediante un dendrograma. Un dendrograma es un diagrama que representa de manera gráfica la relación jerárquica entre los objetos. La altura de sus ramas depende de la disimilitud/distancia entre los nodos (los objetos).

En general, no existe una forma única de determinar el número óptimo de agrupar y depende en gran medida del contexto específico. Una forma común es observar el dendrograma y buscar la altura en la que se observan las mayores diferencias en la distancia entre los grupos. Además, una limitación importante del método es que puede ser computacionalmente costoso para grandes conjuntos de datos y que puede ser sensible a la elección de la métrica de disimilitud y el criterio de enlace utilizados.

Es importante tener en cuenta que en el agrupamiento jerárquico, la elección de la distancia y el criterio de enlace puede afectar significativamente los resultados del agrupamiento, lo que requiere cierta experiencia y conocimiento de dominio. Finalmente, el agrupamiento jerárquico no siempre es adecuado para conjuntos de datos con estructuras complejas, como grupos superpuestos o en forma de anillo.

2.3. Infertilidad

En el 2010, la OMS encontró que más de 4.8 millones de parejas en el mundo tienen dificultades para concebir [38]. Hoy en día, más del 1% de los nacimientos en los países en desarrollo se realizan con técnicas de reproducción asistida [35]. La infertilidad se define como la falta de concepción, después de 12 meses que una pareja ha tenido relaciones sexuales sin protección. Actualmente 1 de cada 4 parejas en los países en desarrollo se ven afectadas por la infertilidad, de las cuales el 30-40% es causado por algún factor masculino [7, 31].

La primera prueba que se realiza para diagnosticar la infertilidad en la pareja es el análisis de semen [7] (ver Tabla 2.1). Algunos factores que determinan la infertilidad son: la viscosidad del semen, la morfología, concentración y motilidad de los espermatozoides [31]. Para el estudio cuantitativo, se hace un análisis de semen que puede contener de cientos a miles de espermatozoides, los aspectos que se analizan son:

- Conteo de espermatozoides, medición de la concentración de espermatozoides y el volumen de la muestra (semen) para el cálculo de producción.
- Morfología, medición de la deformación y reconocimiento de los defectos.
- Motilidad, medición del movimiento de los espermatozoides.

Cualitativo	Cuantitativo
Apariencia y color de la muestra	Volumen de la muestra
Licuefacción del semen	Evaluación de la motilidad de los espermatozoides y la calidad del movimiento
Viscosidad del semen	Estimación de la concentración de espermatozoides
	Presencia de escombros, bacterias y contaminación celular
	Conteo de espermatozoides (millones/mL)
	Determinación del porcentaje de espermatozoides móviles
	Morfología del espermatozoide

Tabla 2.1: Comparación entre el análisis cuantitativo y cualitativo del semen.

En teoría, todos los laboratorios clínicos de andrología siguen la metodología del análisis de semen aceptada como “*Gold Standard*” siguiendo las directrices de la OMS o del grupo de interés especial de andrología de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE Andrology SIG, en inglés), con el personal capacitado en todos los protocolos y sistemas de control de calidad. A pesar de ello un estudio en 40 laboratorios en 22 países reveló que más del 90% tenían discordancia en el uso correcto del microscopio, control de temperatura, la estandarización general del protocolo, el control de calidad analítico o el cumplimiento de las directrices de la OMS [42].

En el análisis de la motilidad comúnmente se utilizan sistemas que hacen una evaluación de la trayectoria del movimiento de la cabeza del espermatozoide en 2D. La manera más común para evaluar la calidad del semen, es realizada por expertos (fisiólogos o embriólogos) basándose en su propio juicio; con observaciones subjetivas de los expertos lo cual hace que sea un método inexacto, irreplicable y difícil de enseñar [31] ya que requiere de gran cantidad de tiempo y experiencia [4]. Aunado a ello, se describe que las anomalías en la cabeza del espermatozoide son difíciles de detectar en 2D aunque el movimiento del flagelo y la pieza media son fáciles de observar para los expertos [31], sin embargo esto no permite una visión causal o mecánica porque carece de detalles sobre el movimiento del flagelo [22]. La obtención de imágenes en 3D de espermatozoides permitirá evaluar la motilidad del flagelo dando detalles del movimiento, el inconveniente es que la captura como el procesamiento en 3D es muy complicado por la velocidad de nado de dichas células.

El flagelo eucariota es típicamente un organelo largo y delgado que desempeña una variedad de funciones biológicas en toda la naturaleza, quizás más notablemente en espermatozoides, donde el batido de uno o más flagelos puede dar lugar a gametos móviles [58]. El conocimiento de este batido podría proporcionar información, aún sin explorar, para la estimación de atributos no visibles, como la contribución de diferentes vías metabólicas y la modulación en respuesta a los entornos físicos y bioquímicos [22], como respuesta a la capacitación (serie de reacciones bioquímicas).

2.3.1. Espermatozoide humano

El análisis de semen emerge como una herramienta invaluable en la investigación de la fertilidad, permitiendo evaluar la calidad y motilidad de los espermatozoides, aspectos esenciales para comprender y abordar las posibles causas de la infertilidad humana. El espermatozoide humano es el gameto masculino compuesto por dos partes principales: la

cabeza y el flagelo (ver Figura 2.4). El flagelo funciona como el motor del espermatozoide, este se divide en tres: la pieza media, la pieza central y la pieza final. Típicamente, en el espermatozoide humano, la cabeza mide $\approx 5\mu m$, mientras que la longitud del flagelo es $\approx 55\mu m$. Existen algunos factores fisiológicos que afectan estas medidas, como la viscosidad. La frecuencia de batido flagelar del espermatozoide de humano es de 10 – 20 Hz aproximadamente [21].

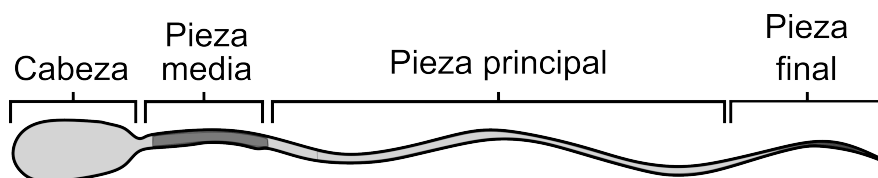


Figura 2.4: Morfología del espermatozoide humano sano. Imagen basada en [21].

La descripción de los patrones de movimiento de los espermatozoides anormales puede ser un indicativo de trastornos del metabolismo energético o de una estructura fina que refleja anomalías genéticas, tóxicas o del desarrollo. Estas alteraciones en el patrón y el vigor del movimiento de los espermatozoides puede traducirse en trastornos clínicos en su transporte e interacción con el ovocito, lo que conduce a subfertilidad o esterilidad [14, 15]. El estudio del movimiento de los espermatozoides es un excelente modelo para evaluar todos los aspectos de los procesos de motilidad celular.

Para que un espermatozoide sea capaz de fertilizar al óvulo, son necesarios algunos cambios que se llevan a cabo en el tracto femenino o *in vitro* en medios apropiados. Este proceso se llama capacitación e incluye cambios en la motilidad del espermatozoide [24].

Existe una diferencia entre los espermatozoides en el epidídimo a los espermatozoides eyaculados [8], ya que en el tránsito a través del epidídimo los espermatozoides desarrollan dos cambios de maduración necesarios para la fecundación, la capacidad de motilidad progresiva además de unirse a la zona pelúcida [24, 33]. Uno de los principales factores que afecta la infertilidad masculina es la astenoospermia, la cual es una condición que se caracteriza por trastornos en la motilidad de los espermatozoides [15]. El patrón de motilidad y la velocidad de nado se puede clasificar como progresivamente móvil (desplazamiento lineal con velocidad alta), no progresiva (muestra desplazamiento lateral de la cabeza) e inmóvil (sin desplazamiento)[15, 23]. La clasificación general de la motilidad del espermatozoide capacitado se divide en:

- Activado.
- Hiperactivado.

En particular se han definido cinco categorías de motilidad de los espermatozoides humanos con respecto al batido flagelar (ver Tabla 2.2). Las categorías se pueden dividir en dos grupos principales, inmóviles y móviles donde la motilidad no progresiva pertenece a la clase de inmóviles, mientras que la clase progresiva y progresiva rápida pertenecen a móviles.

Un espermatozoide eyaculado tiene un batido flagelar simétrico con frecuencia alta, llamada motilidad activada. A diferencia de la motilidad hiperactivada que se caracteriza por un batido flagelar asimétrico de baja frecuencia (ver Figura 2.5(i)).

Categoría	Definición
Inmóvil	No se observa batido flagelar
Móvil	Se observa batido flagelar
Motilidad no progresiva	Se observa batido flagelar con desplazamiento $< 5\mu\text{m/s}$
Motilidad progresiva	Desplazamiento $\geq 5\mu\text{m/s}$ pero $< 25\mu\text{m/s}$
Motilidad progresiva rápida	Desplazamiento $\geq 25\mu\text{m/s}$

Tabla 2.2: Definición y clasificación de las categorías de motilidad del espermatozoide humano [42].

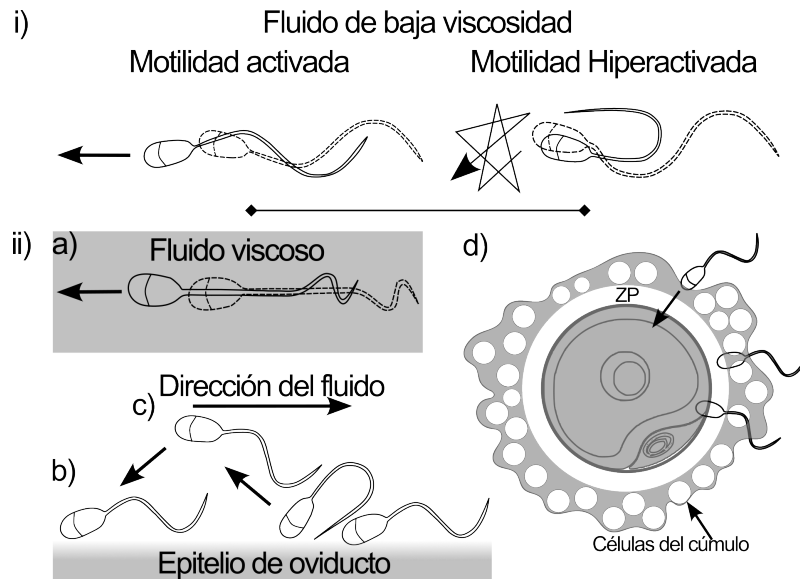


Figura 2.5: Roles de la motilidad hiperactivada en la fertilización. Imagen basada en [44]. (i) Tipos de motilidad en baja viscosidad, activada e hiperactivada. (ii) Procesos (cuatro) por lo que la motilidad hiperactivada es necesaria para la fecundación: a) generar una fuerza de propulsión en medios viscosos, b) escapar de la zona “depósito de espermatozoides”, c) nadar en contra del flujo del fluido y d) penetrar la matriz extracelular del óvulo.

2.3.2. Hiperactivación

La hiperactivación (HA) de la motilidad del espermatozoide es resultado de la capacitación. Al inducir a los espermatozoides al proceso de capacitación, solamente entre 10-20% realmente se capacita, es decir se hiperactiva [53]. En los mamíferos es necesaria la HA para cuatro procesos de la fertilización [44] (ver Figura 2.5 (ii)):

- I. Generar una fuerza de propulsión en medios viscosos (ver Figura 2.5 (ii. a)).
- II. Escapar de la zona “depósito de espermatozoides” del oviducto (ver Figura 2.5 (ii. b)).
- III. Nadar en contra del flujo del fluido (ver Figura 2.5 (ii. c)).
- IV. Penetrar la matriz extracelular del óvulo, la fecundación del óvulo (ver Figura 2.5 (ii. d)).

dando lugar a un movimiento vigoroso no lineal para avanzar a través del oviducto.

Se ha demostrado que la HA es de gran importancia para el transporte a través del tracto

reproductivo femenino y facilita la penetración de la zona pelúcida (ZP) [5, 33]. Por lo tanto, mediciones objetivas y precisas de la HA son esenciales para evaluar las capacidades funcionales de los espermatozoides [5]. Esto permitirá determinar su calidad y capacidad de fertilización de manera más precisa y confiable. Si los espermatozoides no se hiperactivan, esto conlleva a una fertilidad reducida [42].

Durante la HA en un medio acuoso, el vigor y el patrón de la trayectoria de los espermatozoides de rata, suncus y humano tienen cambios significativos, caracterizados por trayectorias aleatorias resultando en un movimiento circular no progresivo, el patrón se describe como “latigazo” o de “figura 8” [5, 33, 42].

En suncus se ha observado que las curvas del flagelo de los espermatozoides muestran una asimetría sobre el eje más largo. Esta asimetría decreta gradualmente después de la HA. Para esta especie el cambio más esencial en el batido flagelar durante la HA es el incremento en la curvatura del flagelo, principalmente en la pieza media, y el decremento frecuencia del batido (ver Figura 2.6). Esta descripción se observa en los espermatozoides de mamífero [33].

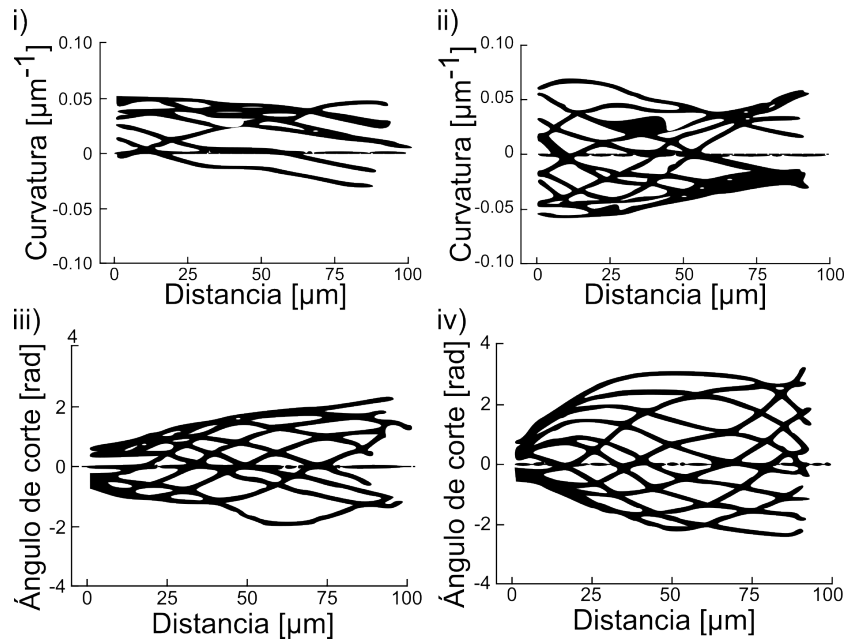


Figura 2.6: Patrones flagelares del espermatozoide de suncus. Basada en [33]. Batidos flagelares de espermatozoides activados (i, iii) e hiperactivados (ii, iv). Las gráficas muestran el análisis de curvatura (i, ii) y el ángulo de corte a lo largo del flagelo desde la unión cabeza-pieza media (iii, iv).

Asimismo, en los espermatozoides hiperactivados de ratón se observa el patrón de “latigazo” donde existe un cambio entre el movimiento transicional e hiperactivado, haciendo la clasificación visual de los patrones intermedios, como el “latigazo”, demasiado estricta (ver Figura 2.7) [5, 24]. En CASA (ver Sección 2.3.3), el análisis de la HA en espermatozoides de ratón ha mostrado que los espermatozoides hiperactivados tienen un incremento en su amplitud lateral del desplazamiento de la cabeza (ALH, por sus siglas en inglés) y la velocidad curvilínea (VCL, por sus siglas en inglés), con un decremento de linealidad (LIN, por sus siglas en inglés) [5].

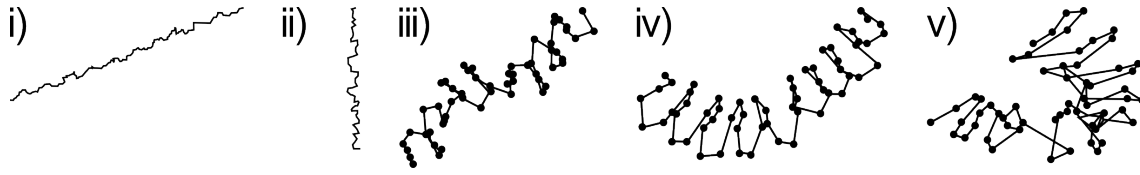


Figura 2.7: Patrones de las trayectorias de espermatozoides de ratón. Imagen basada en [5, 24]. (i, ii) Patrones de espermatozoides de ratón observados y descritos en [24], i) muestra una trayectoria de un espermatozoide a los 0 minutos de incubación y ii) muestra la trayectoria después de 90 min de incubación. (iii-v) Muestran las 3 categorías descritas en [5] para las trayectorias de la cabeza del espermatozoide: motilidad progresiva, intermedia e hipertivada, respectivamente.

En los espermatozoides de humano, se observa en gran medida un patrón de motilidad transicional. La clasificación como HA se basa en los patrones de nado, estos exhiben un patrón de estrella rotándose (ver Figura 2.8) [16, 42]. Transcurrida la capacitación, la motilidad de los espermatozoides se vuelve menos vigorosa [24]. Actualmente, no existe

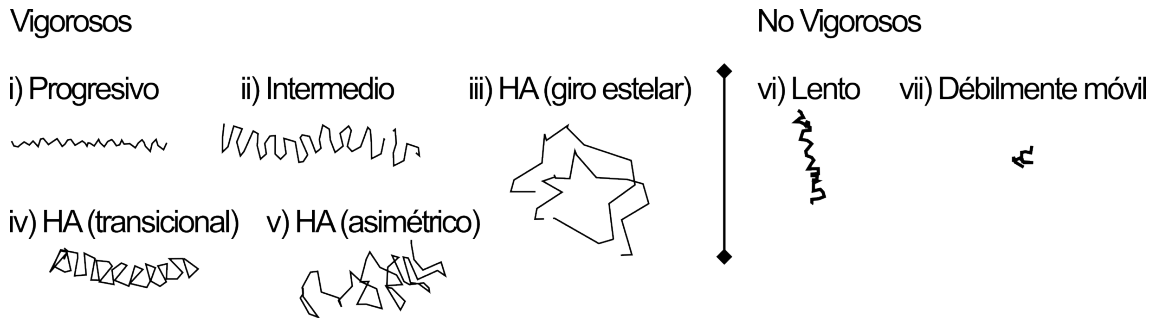


Figura 2.8: Patrones observados en trayectorias de espermatozoides de humanos. Imagen basada en [23]. Son ejemplos de patrones de motilidad identificados durante la capacitación *in vitro*. Las trayectorias de CASA (ver Sección 2.3.3) muestran patrones de motilidad vigorosa (i-v) después de 3 horas en medio capacitivo se clasificaron visualmente como progresivas (i), intermedias (ii) o hiperactivadas (iii-v). Las trayectorias que muestran motilidad no vigorosa se clasificaron como lentas o débilmente móviles (vi-vii).

una base fisiológica precisa para determinar la HA inequívocamente [42], ni un consenso que la defina mejor [24]. Mortimer et al. [42] menciona que realizar el análisis de la HA del espermatozoide, así como la determinación del porcentaje de espermatozoides con nado progresivo y la evaluación de su funcionalidad permitirá determinar de manera robusta el tipo de tratamiento de fertilidad que requiere la pareja. Esta información es importante en el diagnóstico y tratamiento de parejas con problemas de infertilidad.

2.3.3. Análisis de semen asistido por computadora, CASA

CASA, por siglas en inglés, es un sistema compuesto por un *software* y un microscopio utilizado para analizar la trayectoria y las propiedades de movimiento de los espermatozoides en una muestra de semen (ver Tabla 2.4) [14]. Proporciona mediciones cuantitativas para cada trayectoria, incluyendo las velocidades y otros parámetros cinemáticos, junto con medidas de la población [24] y la morfología del espermatozoide [31].

En sus inicios el sistema no era tan exitoso debido a las limitaciones fundamentales de

la tecnología de análisis de imágenes, en comparación con las evaluaciones realizadas por observadores entrenados [42]. Aunado a ello no se había definido un protocolo ni se habían fijado estándares operativos para CASA [14]. Las directrices para este sistema que se publicaron en el manual de la OMS se establecieron por un consenso al que llegaron todos los que trabajan en el campo [42]. Lo anterior contribuyó a crear el “*Gold Standard*”; un conjunto de parámetros subjetivos para examinar y determinar la categoría de los espermatozoides mediante CASA.

Hasta 1996, existían más de 120 artículos que verificaban o aplicaban CASA en investigación o en clínica, sin embargo los experimentos realizados eran difíciles de verificar, repetir e interpretar [14]. Existen algunos problemas con CASA para obtener un conteo preciso de espermatozoides y porcentajes de motilidad cuando las condiciones sobrepasan una concentración de $50 \times 10^6 \frac{sperm}{ml}$ o es menor a $20 \times 10^6 \frac{sperm}{ml}$, cuando la muestra contiene escombros o cuando la trayectoria de dos espermatozoides se cruzan. En la detección de células que se mueven por debajo de la velocidad mínima, es difícil discernir entre escombros y espermatozoide inmóvil [14, 42]. Además de estas desventajas los resultados experimentales de CASA pueden verse afectados por los factores descritos en el Tabla 2.3. Es por ello que aunque CASA se ha utilizado con gran éxito para medir características seminales en muchas especies, para el análisis de muestras de humanos tiene poco éxito por las dificultades de la muestra, ya que sólo se basa en el movimiento de la cabeza del espermatozoide y no mide el batido flagelar [42]. Las medidas obtenidas por CASA

Precisión de los instrumentos
Exactitud de los instrumentos
Microscopio
Cámara de conteo
Dilución
Tasa de adquisición del vídeo
Estado fisiológico del espermatozoide
Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de motilidad (MOT) y velocidad curvilínea (VCL)
Concentración del espécimen
Presencia de escombros en la muestra
Ajuste de parámetros del instrumento
Umbral de digitalización
Número de puntos por trayectoria
Número de imágenes de seguimiento
Número de campos (o espermatozoides) analizados
Algoritmos para calcular la trayectoria promedio y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
Métodos estadísticos
Suministros de laboratorio
Variación de cámara
Variación entre alícuotas (volumen de la muestra)

Tabla 2.3: Factores que afectan los resultados de CASA [14].

descritas en la Tabla 2.4 se han comparado con un análisis visual, sin embargo las definiciones en esta comparativa varían. Para CASA, un espermatozoide tiene que alcanzar la velocidad mínima en línea recta (VSL, por sus siglas en inglés) para clasificarse como móvil, mientras que en el análisis visual se considera móvil si el flagelo se contrae aunque

no muestre movimiento progresivo [14].

En el último manual de la OMS [46], se describen los lineamientos para la preparación, adquisición y procesamiento de los datos. Sin embargo, las mediciones de CASA se ven afectadas directamente por la tasa de adquisición del equipo. Además, la VCL es un valor promedio de seguimiento, lo que significa que si el patrón de movimiento de los espermatozoides cambia entre hiperactivado y no hiperactivado durante la ventana de análisis, el valor de VCL puede caer por debajo del nivel de umbral requerido para que una trayectoria sea definida como hiperactiva. Otro parámetro que define la HA es el ALH. Sin embargo, el valor de esta medida es dependiente del algoritmo de suavizado utilizado para la obtención de la trayectoria promedio [41]. La tasa de adquisición de CASA puede variar entre 20 a 100 imágenes por segundo.

Mortimer et al. [41] realizaron un estudio sobre la variación de los valores de CASA en función de la tasa de adquisición. Aunque analizan frecuencias de entre 25 a 100 Hz, los umbrales solo se definieron entre 25 a 66.7 Hz. Un estudio similar se realizó en [6] en el que se compararon los valores del sistema CASA para diferentes especies con una tasa de muestreo de 12-200 imágenes/segundo, sin embargo no muestran comparaciones para trayectorias HA. Por ejemplo, la trayectoria de un espermatozoide con una tasa de adquisición de 60 Hz se clasifica como HA si: su velocidad curvilínea ($VCL \geq 150 \mu m/s$), linealidad ($LIN \leq 50\%$) y amplitud lateral del desplazamiento de la cabeza ($ALH \geq 7$) [3]. Debido a dicha problemática, en 1996 se propuso la dimensión fractal como una medida robusta para clasificación de las trayectorias ya que esta no era dependiente de la frecuencia de adquisición de las imágenes ni de los métodos de análisis. La dimensión fractal (D) es una expresión del grado que una línea abarca en el plano. Sean $\{p_{t_{i=1}}^N\}$ un conjunto de N puntos que definen la trayectoria de la cabeza de un espermatozoide, la dimensión fractal se define como:, la dimensión fractal se define como:

$$D = \frac{\log(n-1)}{\log(n-1) + \log(d/L)}, \quad (2.4)$$

donde $d = \max_{i=1}^n \sqrt{(x_i - x_1)^2 + (y_i - y_1)^2}$ y $L = \sum_{i=2}^n \sqrt{(x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2}$ [40]. Sin embargo, esta medida no fue un factor determinante para clasificar una trayectoria como HA.

Por lo antes mencionado, se ha descrito en la literatura que en el futuro el sistema CASA debe de ser comparado rigurosamente y ajustarse a las diferentes necesidades de los laboratorios clínicos de andrología. Específicamente en el caso de la evaluación de semen humano, deberíamos dejar de intentar utilizar CASA para aplicaciones que son inherentemente problemáticas para la tecnología subyacente hasta que la tecnología haya sido mejorada y validada definitivamente [42].

2.3.3.1. CASAnova

CASAnova es un *software* para el análisis automatizado de la motilidad del espermatozoide basado en las trayectorias de las cabezas. Se ha utilizado para clasificar espermatozoide de ratón y recientemente de humano. CASAnova conjunta las métricas utilizadas en CASA con máquinas de soporte vectorial para hacer un sistema de clasificación supervisada de espermatozoides. Goodson et al. [23, 24] clasifica la motilidad de los espermatozoides en:

- Vigoroso: progresivo, intermedio e hiperactivado.

- No vigoroso: lento y débilmente móvil.

Los espermatozoides de ratón clasificados como progresivos mostraron trayectorias rectas, los intermedios presentaron un movimiento más vigoroso con oscilaciones respecto a trayectoria neta, mientras tanto los hiperactivados mostraron una motilidad altamente vigorosa acompañada de giros de más de 90° entre puntos consecutivos de la trayectoria, los lentos cubrieron una distancia menor que los progresivos y por último los débiles son los espermatozoides móviles pero no vigorosos y su movimiento hacia adelante era insignificante (ver Figura 2.7). CASAnova tuvo un rendimiento general de 88.2%, en todas las clases tuvo un rendimiento mayor al 83%, excepto en la clase de intermedios. Sólo un poco más de la mitad de los espermatozoides intermedios identificados visualmente en este conjunto (52.1%) coincidieron con la clasificación del modelo [24].

Recientemente se utilizó esta misma técnica para hacer un modelo de clasificación de espermatozoides de humano. Cada una de las trayectorias de los espermatozoides se clasificaron por al menos dos observadores entrenados. De la misma manera que se utilizó CASAnova en el espermatozoide de ratón, se clasificaron en 5 categorías aunque el estado hiperactivado tiene 3 subclases. La precisión general del modelo es 89.92%, con precisiones individuales de 90.19% para progresivos, 89.87% de intermedios, 95.3% hiperactivados, 85.83% lentos y 92.02% de débiles [23].

2.3.3.2. Sistemas de análisis del flagelo

El flagelo es una estructura esencial para el movimiento de diferentes tipos de células, incluyendo los espermatozoides. Por lo tanto, el análisis del flagelo es crucial para la comprensión de la función y la salud reproductiva. En los últimos años, se han desarrollado varios sistemas de análisis del flagelo para automatizar la medición y el procesamiento de los datos de las imágenes obtenidas por microscopía. En este sentido, el presente texto proporciona una breve descripción de algunos de estos sistemas, incluyendo sus características principales y métricas.

SpermQ

SpermQ es un *software* de análisis automatizado que se desarrolló sobre la plataforma ImageJ [48] para imágenes 2D. Utiliza microscopía de campo oscuro tomando 500 imágenes por segundo, además de ello, requiere de una cámara de observación donde se deposita la muestra [25].

El algoritmo de SpermQ:

1. Localiza el flagelo en cada imagen de la secuencia de imágenes.
2. La imagen sin procesar se filtra con un filtro gaussiano, se segmenta y se “esqueletiza” para obtener una trayectoria aproximada del flagelo.
3. Se construyen líneas normales respecto a la trayectoria flagelar detectada.
4. Las intensidades de imagen a lo largo de cada línea normal se ajustan a una curva gaussiana.
5. La traza flagelar detectada se ajusta al centro de la curva Gaussiana.
6. Después de reconstruir el flagelo (pasos anteriores) se determina los parámetros de la cabeza y los parámetros del flagelo.

- Parámetros de la cabeza
 - Posición de la cabeza en el espacio a lo largo del tiempo.
 - θ , es el ángulo entre la pieza media y el eje X .
 - La intensidad máxima en una línea de corte transversal a través del centro de la cabeza que describe a los espermatozoides rotando alrededor de su eje longitudinal.
- Parámetros del flagelo
 - Coordenadas x, y de los puntos en el flagelo.
 - Ángulos tangenciales para cada punto respecto al eje X .
 - La curvatura para cada punto, se determina con la curvatura geométrica y utilizando los vectores tangentes a una distancia definida d .
 - Ángulo de curvatura, se calcula por el ángulo entre el vector tangente dado un punto y el vector tangente de otro punto a una distancia definida.
 - Parámetro relativo a la posición z del flagelo.
 - La intensidad máxima se mide para cada punto del flagelo para generar un perfil de intensidades a lo largo de este.

Este *software* sólo calcula los valores antes mencionados, sin embargo no realiza ningún tipo de clasificación o análisis del batido.

FAST

El análisis flagelar y seguimiento de espermatozoides (FAST, por sus siglas en inglés) se desarrolló para la extracción y el análisis del movimiento y batido del flagelo asociado a los espermatozoides [22].

FAST caracteriza la onda flagelar en términos del ángulo tangente $\theta(s, t)$, en función de la longitud del arco a lo largo del flagelo s y el tiempo t . Se restringe la región de análisis a una sección del flagelo de entre $10\mu m < s < 30\mu m$, que mencionan que es lo suficientemente grande para contener toda la información relevante y lo suficientemente pequeña para permitir comparaciones justas. Las mediciones que se obtienen con FAST son las siguientes:

- Frecuencia del batido flagelar.
- Velocidad de onda de arco flagelar.
- Longitud de onda de arco flagelar.
- Cálculos de disipación de potencia flagelar.
- Se realizan los cálculos estándares hechos por CASA, sin embargo con la definición del manual de la OMS.
 - Velocidad curvilínea (VCL).
 - Velocidad en línea recta (VSL).
 - Velocidad promedio de trayectoria (VAP, por sus siglas en inglés)
 - Amplitud máxima de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH_{max}).

- Amplitud promedio de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH_{avg}).
- Linearidad de la trayectoria curvilínea (LIN).
- Una medida de la oscilación de la trayectoria curvilínea sobre la trayectoria promedio, “wobble” (WOB, por sus siglas en inglés).
- Rectitud de la trayectoria promedio (STR, por sus siglas en inglés).
- Frecuencia de batido (BCF, por sus siglas en inglés).
- Promedio de desplazamiento angular absoluto (MAD, por sus siglas en inglés).
- Velocidad del centroide, se propone esta nueva métrica.

En general, FAST proporciona una variedad de métricas para cuantificar el movimiento y batido del flagelo asociado a los espermatozoides y puede ser una herramienta valiosa en la evaluación de la calidad del esperma y en la investigación de la fertilidad masculina.

Los métodos y *softwares* mencionados realizan un análisis de vídeos 2D. Los *softwares* que analizan únicamente la cabeza han presentado una eficiente clasificación de los espermatozoides. Sin embargo, estos resultados están sesgados por dos motivos. En primer lugar, únicamente evalúan los datos en 2D y en basado en la trayectoria de la cabeza. No obstante, como se mencionó anteriormente, el flagelo que es el motor del espermatozoide se desenvuelve en un espacio tridimensional. En segundo lugar, estos métodos utilizan un marco de referencia definido desde hace unos años por un consenso basado en el análisis visual.

Los vídeos en 3D de los espermatozoides, con una duración entre 1 – 4 segundos, son difíciles de capturar debido a la velocidad del batido flagelar, lo cual ha sido el principal impedimento para rastrearlos en condiciones realistas [11]. No obstante, la hipótesis es que utilizar sistemas de adquisición en 3D para observar la HA del flagelo es crucial para una buena clasificación de la motilidad-fertilidad.

Uno de los problemas principales que ha persistido en el desarrollo de técnicas y sistemas de análisis de imágenes automáticos es el establecimiento de controles de referencia (“*ground truth*”) que permitan comparar los resultados de los algoritmos desarrollados. En este sentido, los “expertos” que establecen los valores de estandarización siempre tienen diferencias entre grupos de investigación. Es por ello que el objetivo del presente trabajo es clasificar el batido flagelar de los espermatozoides en 3D mediante la extracción de características que permitan agrupar los datos sin el sesgo asociado al experto clasificador. Como se mencionó anteriormente, la clasificación no supervisada es necesaria cuando no existen datos etiquetados. En el caso del estudio la motilidad de los espermatozoides de humano en 3D+t, etiquetar o tener una clasificación previa de los datos es una labor complicada, ya que no existe un marco referencia para datos 3D+t. Además, para los expertos es una tarea complicada clasificarlos visualmente debido a la corta duración de los vídeos y a la falta de conocimiento sobre las diferencias entre el batido flagelar de espermatozoides no capacitados e hiperactivados.

Nombre (Abrev)	Definición	Fórmula
Velocidad en línea recta (VSL)	Velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta desde su primera posición a su última posición	$D(p_1, p_N) \times \frac{FR}{N-1} \times \mu$
Velocidad curvilínea (VCL)	Velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide sobre la trayectoria actual	$\sum_{t=1}^{N-1} D(p_t, p_{t+1}) \times \frac{FR}{N-1} \times \mu$
Velocidad promedio de la trayectoria (VAP)	Velocidad promedio de la cabeza de espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio	$\sum_{t=1}^{N-w} D(p_t, p_{t+1}) \times \frac{FR}{N-1} \times \mu$
Linealidad (LIN)	Linealidad de la trayectoria multiplicada por 100 (VSL/VCL)	$100 \times \left(\frac{VSL}{VCL}\right)$
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)	Máxima distancia de cualquier punto en la trayectoria actual de la cabeza de espermatozoide respecto a su trayectoria promedio, multiplicada por 2	Sea S_t un segmento formado por dos puntos consecutivos p_t y p_{t+w-1} el segmento más cercano al segmento $S(q_t, q_{t+1})$ relativo a su punto medio $q_{m_t} = \frac{q_t + q_{t+1}}{2}$, $ALH_{max} = 2 \times \max_{t=2}^{N-w} [F(D(q_{m_t}, S_t))] \times \mu$, donde F es la función de máximo local.
Frecuencia de cruce del batido (BCF)	Frecuencia a la que la trayectoria del espermatozoide actual cruza la trayectoria promedio	Sea $S(p_1, p_2)$ la función que regresa el segmento formado por p_1 y p_2 y sean s_1 y s_2 dos segmentos diferentes se define $\delta = \begin{cases} 1 & s_1 \cap s_2 \\ 0 & \text{en otro caso} \end{cases}$
Concentración de la muestra (CON)	Concentración de espermatozoides en una muestra (millones por mililitro de plasma o medio)	Conteo de cabezas por muestras
Porcentaje de motilidad (MOT)	Porcentaje de espermatozoides en suspensión que son móviles (el mínimo VSL para cada espermatozoide)	Número de espermatozoides móviles entre el total de espermatozoides

Tabla 2.4: Tabla de los nombres, definiciones y símbolos estándares para las variables cinemáticas medidas por CASA con su respectiva fórmula [2, 5, 14]. Sea $\{p_t\}_{t=1}^N$ una trayectoria de N puntos, $D(p, q)$ la distancia Euclideana entre p y q , μ el factor de escala ($\mu m/\text{pixel}$).

Datos

Los datos de los espermatozoides para este trabajo se adquirieron con el sistema desarrollado por Corkidi et al. [11]. El sistema adquiere imágenes en diferentes planos focales para recolectar la información de un instante de tiempo, este proceso se realiza hasta que el espermatozoide sale del campo de visión (ver Sección 3.1). La serie de imágenes capturadas se guarda en formato TIFF mediante el *software* de la cámara. Un programa desarrollado en Java, con anterioridad, vincula cada imagen con la altura específica en la que fue capturada, permitiendo su visualización en la interfaz gráfica. Este *software* ofrece la flexibilidad de elegir entre las secuencias de pilas durante la fase de subida o bajada del piezoeléctrico, y permite al usuario ajustar de manera independiente el plano focal, la altura y el tiempo según sus preferencias. Además, el programa proporciona diversas opciones de almacenamiento, incluyendo la creación de *hyperstacks* para su visualización en otros programas, y guarda las alturas de las imágenes en archivos de texto en micras. Esta información se procesa para segmentar el flagelo como se describe en Hernández-Herrera et al. [27]. El pre-procesamiento de los datos genera las coordenadas en 3D para cada punto que conforma al flagelo en diferentes tiempos. El primer punto corresponde al centroide de la cabeza del espermatozoide para cada tiempo.

En la Figura 3.1 se muestra una representación de los archivos, donde el punto magenta corresponde al primer punto (la cabeza), la línea azul es la representación de las coordenadas obtenidas de la segmentación y la línea negra son los datos suavizados mediante *splines*, que no necesariamente se encuentran a la misma distancia. La frecuencia de adquisición de imágenes en el plano $X - Y$ es de 90 imágenes por segundo con un tamaño del píxel de 184.375 nm.

Sea un espermatozoide i del conjunto de datos, la línea central de flagelo se rastreó durante T -tiempos y se describe por N_T -puntos. Cada punto p_{tn}^i se encuentra en el marco de referencia del laboratorio (LRF - Laboratory Reference Frame, por sus siglas en inglés) y está descrito por sus coordenadas en 3D $p_{tn}^{iLFR} = \{x_{tn}^{iLFR}, y_{tn}^{iLFR}, z_{tn}^{iLFR}\}$, donde n corresponde a la n -ésima posición de la línea central del flagelo en el tiempo t para el espermatozoide i , $t \in 1, 2, \dots, T$ y $n \in 1, 2, \dots, N$. El número de puntos N que describe al flagelo varía para cada uno de los T -tiempos. Debido al proceso de segmentación el número de puntos detectados por flagelo, así como el número de flagelos por espermatozoides pueden variar.

El conjunto de experimentos de espermatozoides se divide entre **inducidos a capacitación** y **no inducidos a capacitación**. Los espermatozoides inducidos a capacitación se les añade un medio capacitante durante seis horas antes de adquirir las imágenes. La base de

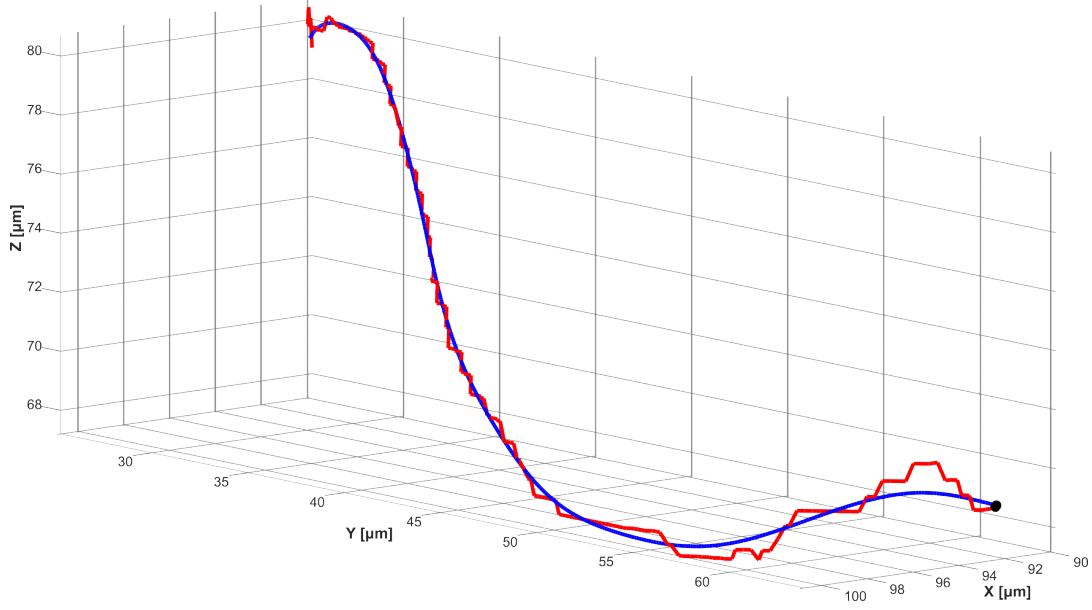


Figura 3.1: Representación gráfica del tiempo 10 del batido flagelar de un espermatozoide (ID: Cap 024). La línea roja se conforma por los puntos extraídos de la segmentación de la línea central. La línea azul es el suavizado de los datos originales con una interpolación de $\sim 100nm$. El punto negro representa el primer punto que corresponde al punto en la cabeza.

datos cuenta con: 60 experimentos de espermatozoides no capacitados y 87 experimentos de espermatozoides inducidos a capacitación que han sido segmentados.

Transformamos los datos de cada experimento para alinear las trayectorias con el eje X (ver Figura 3.2) y que los datos inicien en el origen, de la siguiente manera.

1. Centrar los datos:

$$\bar{x} = \frac{1}{\sum_{t=1}^T N_t} \sum_{t=1}^T \sum_{n=1}^N x_{tn}^i, \quad \bar{y} = \frac{1}{\sum_{t=1}^T N_t} \sum_{t=1}^T \sum_{n=1}^N y_{tn}^i, \quad \bar{z} = \frac{1}{\sum_{t=1}^T N_t} \sum_{t=1}^T \sum_{n=1}^N z_{tn}^i$$

$$x_{tn}^i = x_{tn}^i - \bar{x}, \quad y_{tn}^i = y_{tn}^i - \bar{y}, \quad z_{tn}^i = z_{tn}^i - \bar{z}$$

donde x_n, y_n, z_n son las coordenadas del punto n , N es el número total de puntos.

2. Buscar la dirección de máxima variación, mediante la descomposición en valores singulares.

$$\mathbf{A} = \mathbf{U}\mathbf{\Sigma}\mathbf{V}^T$$

donde:

- \mathbf{A} es una matriz de $N \times 3$ con las coordenadas 3D,
- \mathbf{U} es una matriz de $N \times 3$,
- $\mathbf{\Sigma}$ es una matriz diagonal con los valores singulares de \mathbf{A} ,
- \mathbf{V} es la matriz de rotación ortogonal de 3×3 .

3. Rotar todos los puntos (los flagelos) respecto al ángulo encontrado en el paso anterior:

$$\begin{bmatrix} x_{t1}^i & y_{t1}^i & z_{t1}^i \\ x_{t2}^i & y_{t2}^i & z_{t2}^i \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{tN}^i & y_{tN}^i & z_{tN}^i \end{bmatrix} = \mathbf{AV}^T$$

4. Trasladar los datos al origen, $x_{tn}^i - \min\{x^i\}$.

La transformación se realizó para tener los datos alineados y tener el mismo marco de referencia para todos los experimentos. En la Figura 3.2 se muestra el conjunto de datos

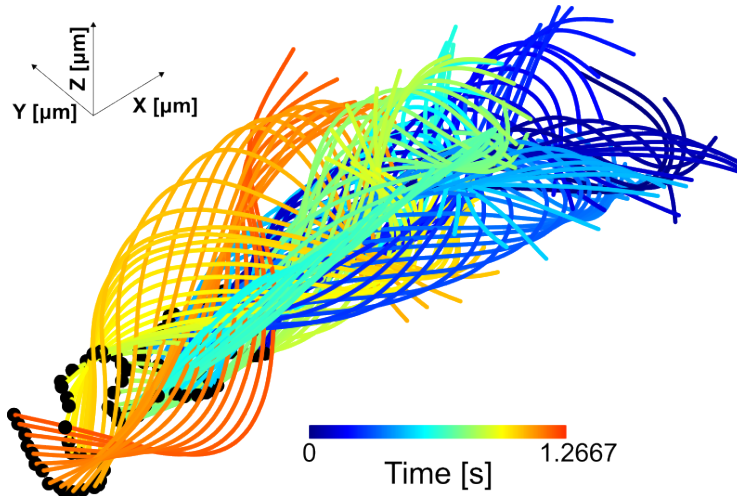


Figura 3.2: Representación gráfica resultante de la alineación de los datos para un espermatozoide (ID: Cap 024) con el eje X . Los puntos negros representan el centroide de la cabeza, mientras que los otros colores se conforman por una serie de puntos que en conjunto representan al flagelo en diferente tiempo.

que describen al flagelo transformados y alineados con el eje x . El desplazamiento a lo largo del tiempo del espermatozoide es hacia $x \rightarrow 0$. Del conjunto de datos de espermatozoides, cada uno cuenta con diferente número de tiempos (flagelos) y la cantidad de puntos que definen a cada flagelo también puede variar entre tiempos y experimentos.

3.1. Configuración experimental

La configuración experimental 3D+t fue específicamente concebido para capturar imágenes detalladas del batido flagelar del espermatozoide en campo claro, tal y como se describe en Corkidi et. al. [11], lo cual requiere un control preciso y dinámico de varias variables. En este contexto, la elección estratégica de componentes y ajustes se convierte en un aspecto crucial para asegurar la obtención de datos.

El sistema de adquisición 3D+t, consiste en un microscopio Olympus IX71 invertido montado sobre una mesa óptica TMC (GMP SA, Suiza). Se utilizó un objetivo de inmersión en agua 60X con $N.A. = 1.00$ (Olympus UIS2 LUMPLFLN 60X W) conectado a un dispositivo piezoeléctrico P-725 (Physik Instruments, MA, EE. UU.). La integración del dispositivo

piezoeléctrico P-725 fue con el objetivo de inducir oscilaciones específicas necesarias para capturar el batido flagelar del espermatozoide. Se configuró el piezoeléctrico para oscilar a una frecuencia de 90 Hz y una amplitud de $20 \mu\text{m}$ (ver Figura 3.3).

Para ajustar con precisión las oscilaciones piezoeléctricas, se utilizó un servocontrolador E501 a través de un amplificador de corriente alta E-55 (Physik Instruments, MA, EE. UU.). La adquisición de imágenes se realizó con una cámara de alta velocidad NAC Q1v, con 8 GB de memoria interna. La sincronización del sistema de adquisición se logró mediante un generador de funciones E-506 (NI USB-6211, National Instruments, EE. UU.).

Finalmente, para mantener las células espermáticas vivas durante las observaciones, se utilizó un termocontrolador (Warner Instruments, TCM/CL100) para mantener la temperatura constante a 37°C .

La muestra se posiciona en un soporte externo para evitar la exposición a las vibraciones del piezoeléctrico. El conjunto completo se encuentra montado en una mesa óptica (TMC), que lo aísla de las vibraciones externas. Posteriormente, una computadora Pentium IV (1.8 GHz) adquiere la serie de imágenes (vídeo) capturadas por la cámara, almacenándolas temporalmente en su búfer interno mediante un puerto USB en formato AVI. Además, registra las coordenadas digitalizadas de cada imagen en un archivo de texto (formato txt).

La configuración experimental está diseñada para adquirir 28,000 imágenes durante un periodo de 3.5 segundos. Con una frecuencia en el piezoeléctrico de 90 Hz y una amplitud de $18\text{-}25 \mu\text{m}$, este oscila iterativamente, acercando y alejando el lente de la cámara. Este movimiento desplaza el plano focal en cada instante y captura 8,000 imágenes por segundo, con 88 en cada periodo de la función triangular. Dado que la adquisición es lo suficientemente rápida como para considerar que el espermatozoide permaneció casi estático entre una imagen y otra, cada pila de 44 imágenes adquiridas en la subida o bajada se trata como una sola imagen tridimensional en un tiempo. Esto proporciona una resolución en la coordenada z de $0.41\text{-}0.57 \mu\text{m}$. Cabe destacar que algunos vídeos muestran que la célula de interés se desplaza o desaparece parcial o completamente de la imagen. Dichos vídeos se recortan para conservar solo la parte útil, donde la célula permanece visible, lo que introduce variabilidad en la longitud del vídeo de cada muestra.

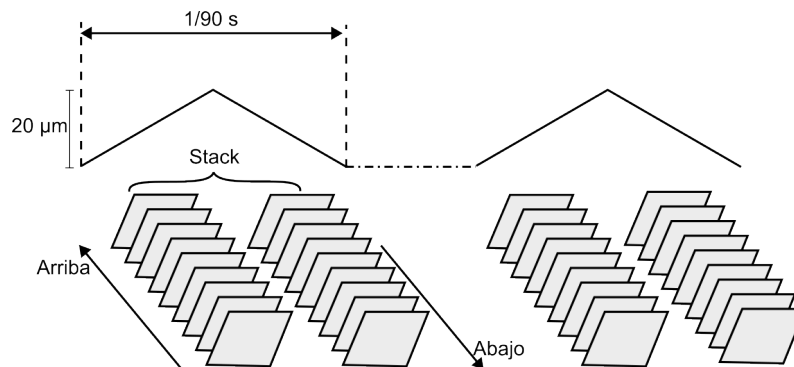


Figura 3.3: Diagrama de la configuración experimental para la adquisición de imágenes. Imagen basada en [11].

Metodologías para la Caracterización del Batido del Flagelo

El análisis de las trayectorias en 3D+t es complejo debido a la gran cantidad de información que contienen comparado con los datos en 2D+t. Sin embargo, la capacidad de analizar trayectorias en 3D+t es relevante para una variedad de aplicaciones, como el análisis de movimiento de células o microorganismos. En este trabajo se presenta el análisis de trayectorias de espermatozoides, específicamente para la evaluación de su motilidad.

En el reconocimiento de patrones y visión por computadora, el ajuste de modelos primitivos a imágenes es una tarea básica que permite la reducción y simplificación de los datos para su procesamiento posterior [19]. En este capítulo se describen los métodos utilizados para la extracción de características y la clasificación de los datos. Es importante tener en cuenta que la base de datos utilizada en estos métodos difiere de la presentada en este documento, a excepción de la última sección, pero se presenta esta descripción con el propósito de brindar información relevante para futuros trabajos.

Cabe mencionar, que los métodos adicionales no se exploraron ampliamente debido a las limitaciones mencionadas anteriormente. Sin embargo, se considera que podrían ser prometedores en el análisis de patrones de batidos flagelares en futuros trabajos. La elección de un método específico dependerá de las características y requisitos específicos de la base de datos y del objetivo de la investigación.

4.1. Clasificación supervisada con datos canónicos

En esta sección se describe el enfoque de clasificación supervisada utilizado al inicio del proyecto, donde el conjunto de datos estaba previamente etiquetado visualmente. Para este propósito, se implementó un clasificador supervisado basado en una red de memoria a corto y largo plazo (LSTM, por sus siglas en inglés) inspirada en el artículo de Chen et al. [9], originalmente diseñado para clasificar movimientos corporales humanos.

Las redes de LSTM son una variante de las Redes Neuronales Recurrentes (RNN, por sus siglas en inglés) que permiten capturar información contextual a largo plazo. En este caso, una red LSTM recuerda información durante largos períodos de tiempo [45] utilizando

cuatro unidades básicas interconectadas (representadas por las cajas amarillas en la Figura 4.1), que interactúan de manera dinámica.

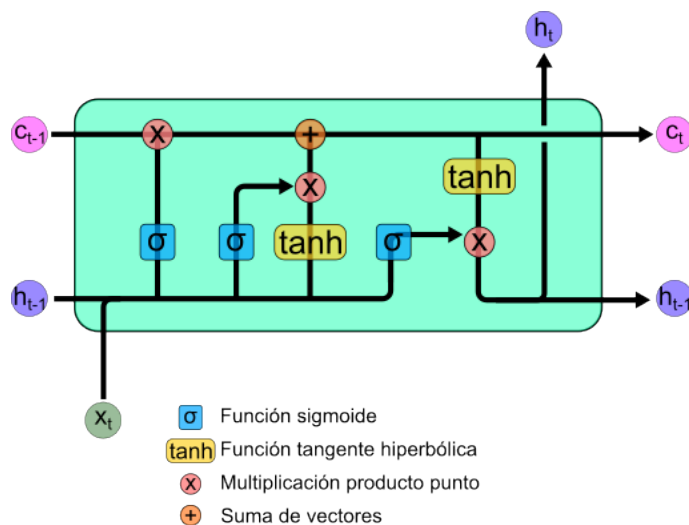


Figura 4.1: Esquema de una red LSTM. La celda de una red neuronal recurrente LSTM se compone de una celda de memoria, una puerta de entrada (\mathbf{x}), una puerta de salida (\mathbf{h}) y una puerta de olvido. La celda de memoria almacena información a lo largo del tiempo (\mathbf{c}), procesa la información de entrada y genera salidas basadas en su estado de memoria y las entradas recibidas. Las puertas de entrada, salida y olvido regulan el flujo de información en la celda de LSTM. Imagen basada en [45].

La primera capa, conocida como la capa de olvido, emplea una función de activación sigmoide para decidir qué información debe mantenerse en la celda de estado. La salida de esta capa, un valor entre 0 y 1, determina la cantidad de información que se conserva, considerando tanto la entrada actual como la salida del estado anterior. Un valor de 0 indica que se descarta la información, mientras que un valor de 1 indica que se retiene toda la información. La segunda etapa de la red LSTM consta de dos capas adicionales que deciden qué información se almacenará en la celda de estado. Por último, se encuentra la capa que determina la salida final. Primero, una capa de función de activación (sigmoide) decide qué parte de la celda de estado debe ser emitida, y luego se filtra la celda de estado a través de la función tangente hiperbólica (\tanh) [45].

En este trabajo, se implementaron dos capas de redes LSTM con una arquitectura “muchos a uno”, lo que significa que la red tiene múltiples entradas pero produce una única salida. Para la clasificación de los espermatozoides, se modificó la función de activación softmax (para clasificación de múltiples clases) por una función sigmoide (clasificación binaria).

El conjunto de datos utilizado consistió únicamente de espermatozoides inducidos a capacitación los cuales estaban etiquetados visualmente. Este conjunto se dividió en un conjunto de entrenamiento (136 experimentos) y un conjunto de prueba (38 experimentos), cada uno de ellos con 32 flagelos y 261 puntos. Se tomaron 261 puntos, ya que era el número mínimo de puntos que tenían los experimentos. Las coordenadas de los puntos que describen los espermatozoides se utilizaron como entrada para el clasificador. Los resultados obtenidos por la red utilizando únicamente las coordenadas fueron los siguientes:

- Exactitud en la prueba: aproximadamente 57.89%.
- Precisión: aproximadamente 76.07%.

- Sensitividad: aproximadamente 57.89 %.
- Puntuación F_1 : aproximadamente 57.8 %.

Además, se agregó la magnitud de desplazamiento y el ángulo para un mismo punto en dos instantes de tiempo consecutivos, lo que arrojó los siguientes resultados:

- Exactitud en la prueba: aproximadamente 44.7 %.
- Precisión: aproximadamente 79.9 %.
- Sensitividad: aproximadamente 44.73 %.
- Puntuación F_1 : aproximadamente 38.91 %.

Los resultados indicaron que añadir la magnitud y el ángulo no aportó información significativa para la clasificación de los datos. La eficacia del clasificador fue baja, posiblemente debido al tamaño reducido del conjunto de datos o a que las características extraídas no reflejaron adecuadamente la variación en los datos.

La Figura 4.2 muestra las matrices de confusión obtenidas durante el entrenamiento y validación de la red utilizando únicamente las coordenadas del flagelo y las matrices de confusión correspondientes al entrenamiento y validación con las coordenadas del flagelo, la magnitud de desplazamiento y el ángulo. Además, se incluyen las gráficas que representan las iteraciones necesarias para entrenar la red.

Los resultados indican que la adición de la magnitud y el ángulo como características no aporta información significativa para la clasificación de los datos.

4.2. Clasificación supervisada con vectores de movimiento

En este enfoque de clasificación supervisada, utilizamos vectores de movimiento para estimar el desplazamiento de un punto en el flagelo de un espermatozoide a través del tiempo. Los vectores de movimiento representan la dirección y magnitud del desplazamiento de un punto entre dos instantes de tiempo consecutivos.

Dado un punto \mathbf{p}_{tn}^i del espermatozoide i en el tiempo t y su correspondiente punto $\mathbf{p}_{(t+1)n}^i$ en el tiempo $t+1$, las coordenadas de estos puntos en 3D se representan como $\{x_{tn}^i, y_{tn}^i, z_{tn}^i\}$. A partir de estas coordenadas, se puede calcular el vector de desplazamiento $\mathbf{p}_{(t+1)n}^i$ utilizando la siguiente fórmula:

$$\mathbf{p}_{(t+1)n}^i = \mathbf{p}_{(t+1)n}^i - \mathbf{p}_{tn}^i \quad (4.1)$$

$$= \langle x_{(t+1)n}^i - x_{tn}^i, y_{(t+1)n}^i - y_{tn}^i, z_{(t+1)n}^i - z_{tn}^i \rangle. \quad (4.2)$$

Una vez obtenido el vector de desplazamiento, se puede calcular su magnitud $\|\mathbf{p}\|$ utilizando la fórmula:

$$\|\mathbf{p}\| = \sqrt{p_{x_{(t+1)n}^i}^2 + p_{y_{(t+1)n}^i}^2 + p_{z_{(t+1)n}^i}^2}, \quad (4.3)$$

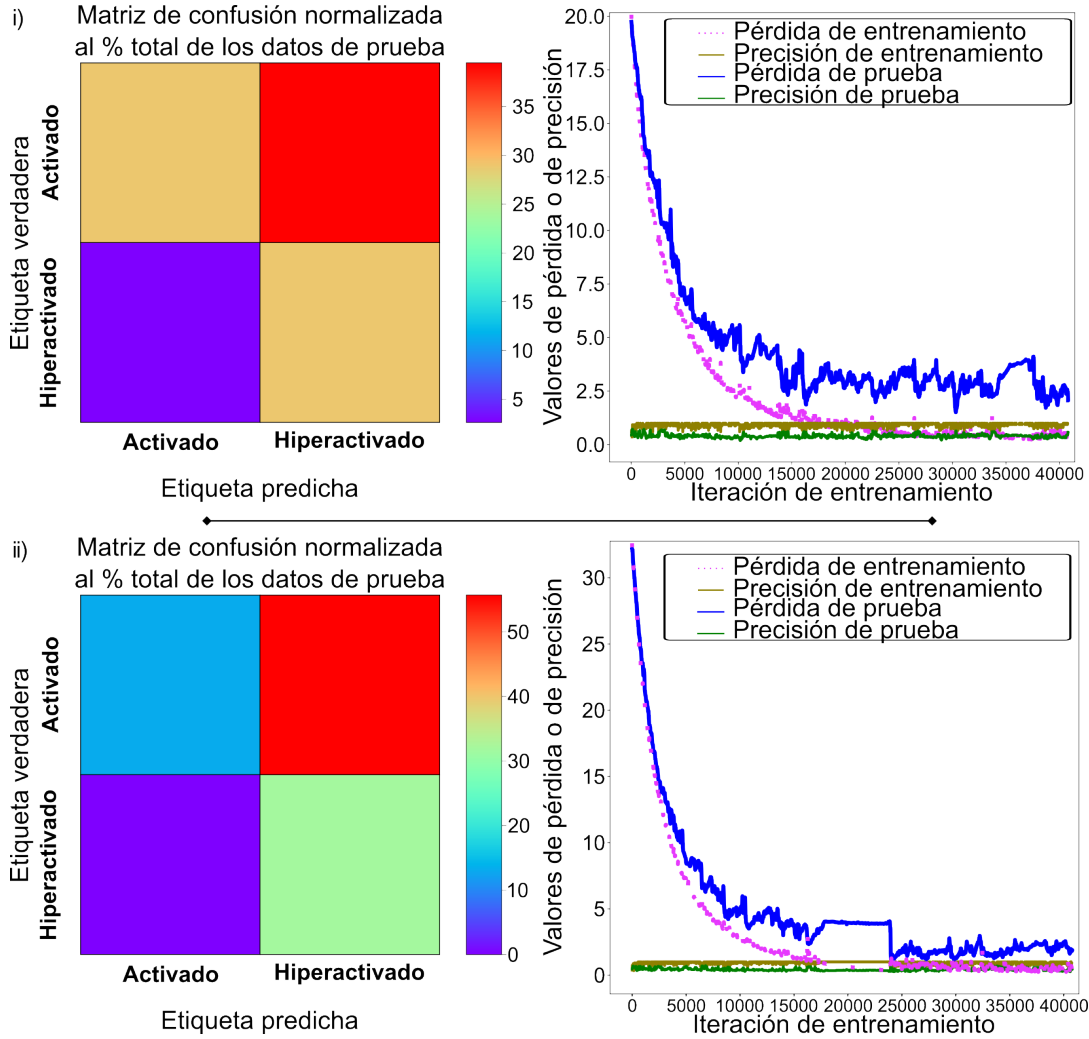


Figura 4.2: Matrices de confusión del lado izquierdo y gráficas del entrenamiento y validación de la red LSTM del lado derecho. (i) Muestra los resultados obtenidos utilizando únicamente las coordenadas del flagelo. (ii) Presenta los resultados obtenidos utilizando las coordenadas del flagelo, la magnitud de desplazamiento y el ángulo.

Además, se puede calcular el vector director $\hat{\mathbf{p}}$ utilizando la fórmula:

$$\hat{\mathbf{p}} = \frac{\mathbf{p}}{\|\mathbf{p}\|}. \quad (4.4)$$

Con estos cálculos, podemos reconstruir las coordenadas del punto $\mathbf{p}_{(t+1)n}^i$ utilizando las coordenadas del punto \mathbf{p}_{tn}^i y la dirección y magnitud del vector de desplazamiento:

$$\mathbf{p}_{(t+1)n}^i = \langle x_{tn}^i + \|\vec{p}\| \|\hat{p}_x, y_{tn}^i + \|\vec{p}\| \|\hat{p}_y, z_{tn}^i + \|\vec{p}\| \|\hat{p}_z \rangle.$$

Estos cálculos se realizan para todos los puntos en el flagelo entre tiempos consecutivos, lo que nos proporciona los vectores de movimiento. La Figura 4.3 muestra un ejemplo de los vectores de movimiento obtenidos para todos los puntos en el flagelo de un espermatozoide entre tres tiempos consecutivos.

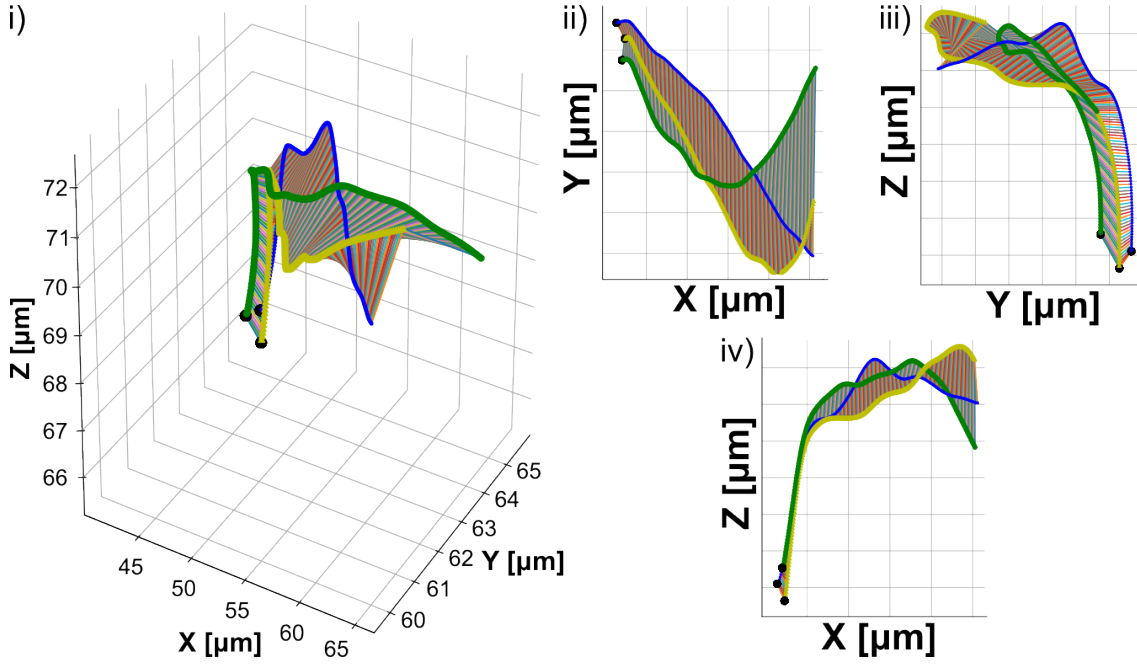


Figura 4.3: (i) La gráfica en 3D muestra los vectores de movimiento de todos los puntos en el flagelo en tres tiempos consecutivos para un espermatozoide i . Los puntos verdes representan \mathbf{p}_{0n}^i , los amarillos representan \mathbf{p}_{1n}^i y los azules representan \mathbf{p}_{2n}^i . Las líneas representan los vectores reconstruidos para cada punto entre los diferentes tiempos utilizando la dirección y magnitud calculadas previamente. (ii-iv) Las gráficas muestran las proyecciones en los diferentes planos $X - Y$, $Y - Z$ y $X - Z$, respectivamente.

Utilizamos estos vectores de movimiento como características de los experimentos para entrenar una red LSTM. La arquitectura de la red consta de dos capas LSTM, con 32 celdas en cada capa, seguidas de una función de activación sigmoide para la clasificación binaria. Los datos de entrenamiento y validación se dividieron de la siguiente manera: 70 muestras activadas y 70 muestras hiperactivadas para entrenamiento, y 26 muestras activadas y 8 muestras hiperactivadas para validación.

Inicialmente, se observó que la red tenía inestabilidad en los valores de exactitud y mostraba signos de sobreajuste, ya que obtenía una exactitud del 100% tanto en los datos de entrenamiento como en los de validación. Por lo tanto, se realizaron ajustes en los hiperparámetros y en la arquitectura de la red para mejorar la clasificación y evitar el sobreajuste.

Los hiperparámetros que se variaron fueron el número de capas LSTM (1-3), el número de celdas en cada capa (32 o 64), la tasa de aprendizaje y el valor de lambda (λ) utilizado en la regularización. Se realizaron tres ejecuciones de entrenamiento de la red y se obtuvo el valor promedio de la exactitud para evaluar los diferentes ajustes de hiperparámetros.

La Figura 4.4 muestra los resultados promedio de la exactitud obtenidos en las pruebas de variación de hiperparámetros, con la desviación estándar indicada en las líneas de error. El enfoque de clasificación supervisada con vectores de movimiento permitió mejorar la eficiencia de la red y evitar el sobreajuste. La red LSTM con la configuración de tres capas, 32 celdas en cada capa, una tasa de aprendizaje de 0.009 y un valor de lambda de 0.0015 proporcionó los mejores resultados en términos de exactitud, precisión, sensibilidad y puntuación F_1 .

No. Exp.	Número de capas	No. Celdas capa 1	No. Celdas capa 2	No. Celdas capa 3	Learning rate	Lambda lost	Batch size	Forget bias capa 1	Forget bias capa 2	Forget bias capa 3
1	3	64	64	64	0.005	0.0015	8	1	1	1
2	2	64	64	nan	0.005	0.0015	8	1	1	nan
3	1	64	nan	nan	0.005	0.0015	8	1	nan	nan
4	3	32	32	32	0.005	0.0015	8	1	1	1
5	2	32	32	nan	0.005	0.0015	8	1	1	nan
6	1	32	nan	nan	0.005	0.0015	8	1	nan	nan
7	3	32	32	32	0.001	0.0015	8	1	1	1
8	3	32	32	32	0.009	0.0015	8	1	1	1
9	3	32	32	32	0.007	0.0015	8	1	1	1
10	3	32	32	32	0.008	0.0015	8	1	1	1
11	3	32	32	32	0.01	0.0015	8	1	1	1
12	3	32	32	32	0.0085	0.0015	8	1	1	1
13	3	32	32	32	0.009	0.001	8	1	1	1
14	3	32	32	32	0.009	0.00125	8	1	1	1
15	3	32	32	32	0.009	0.00175	8	1	1	1

Tabla 4.1: Variaciones de experimentos para entrenar una red. Se muestran los hiperparámetros utilizados en cada experimento, incluyendo el número de capas, el número de celdas en cada capa, la tasa de aprendizaje, la pérdida lambda, el tamaño del lote (batch size) y el sesgo de olvido (forget bias) para cada capa.

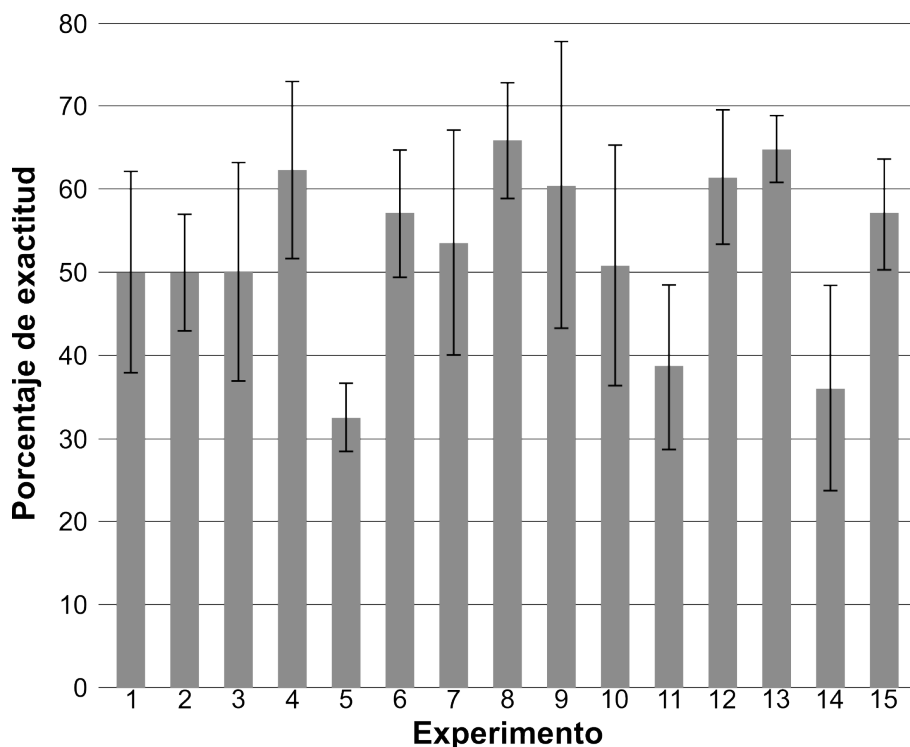


Figura 4.4: Gráfica que muestra los valores promedio de exactitud obtenidos en las pruebas de variación de los hiperparámetros (ver Tabla 4.1). Se incluye la desviación estándar en las líneas de error. Cada columna representa una configuración diferente de hiperparámetros.

4.3. Clasificación supervisada con características estructurales del flagelo (GRU, RNN)

Debido al bajo rendimiento (menor al 75 %) obtenido al utilizar los vectores de movimiento como atributos en la red LSTM, se decidió explorar el uso de características estructurales del flagelo. Estas características se basan en el trabajo previo realizado por López et al. [37]. Se centran en la geometría del flagelo y cuantifican las variaciones de su forma a lo largo del tiempo.

En este estudio, cada flagelo de cada experimento se trasladó al origen. Para cada tiempo t , se describió el flagelo utilizando 11 características basadas en [37]:

- Ángulos de la recta paramétrica (3 características) (ver Figura 4.5 a): Se calcula la línea paramétrica entre el punto inicial y el punto final del flagelo, y se obtienen los cosenos directores de esta línea.
- Distancia máxima a la recta paramétrica (1 característica) (ver Figura 4.5 c): Se calcula la distancia máxima entre los puntos del flagelo y la recta paramétrica.
- Ángulos a la RDO (Regresión de Distancia Ortogonal) (3 características) (ver Figura 4.5 b): Se realiza una regresión de distancia ortogonal en los puntos del flagelo y se obtienen los cosenos directores de esta regresión.
- Distancia máxima a la RDO (1 característica) (ver Figura 4.5 d): Se calcula la

distancia máxima entre los puntos del flagelo y la regresión de distancia ortogonal.

- Ángulo entre dos rectas paramétricas (1 característica) (ver Figura 4.5 e): Se calculan las rectas paramétricas entre el punto inicial y el punto medio, y entre el punto medio y el punto final del flagelo, y se obtiene el ángulo entre estas dos rectas.
- Ángulo entre dos RDO (1 característica) (ver Figura 4.5 f): Se realizan regresiones de distancia ortogonal en la mitad del flagelo y la otra mitad, y se obtiene el ángulo entre estas dos regresiones.
- Razón de curvatura total (RCT) (1 característica) (ver Figura 4.5 g): Se calcula la longitud total del flagelo y la distancia del punto inicial al punto final, y se obtiene la RCT como la proporción entre estas dos distancias.

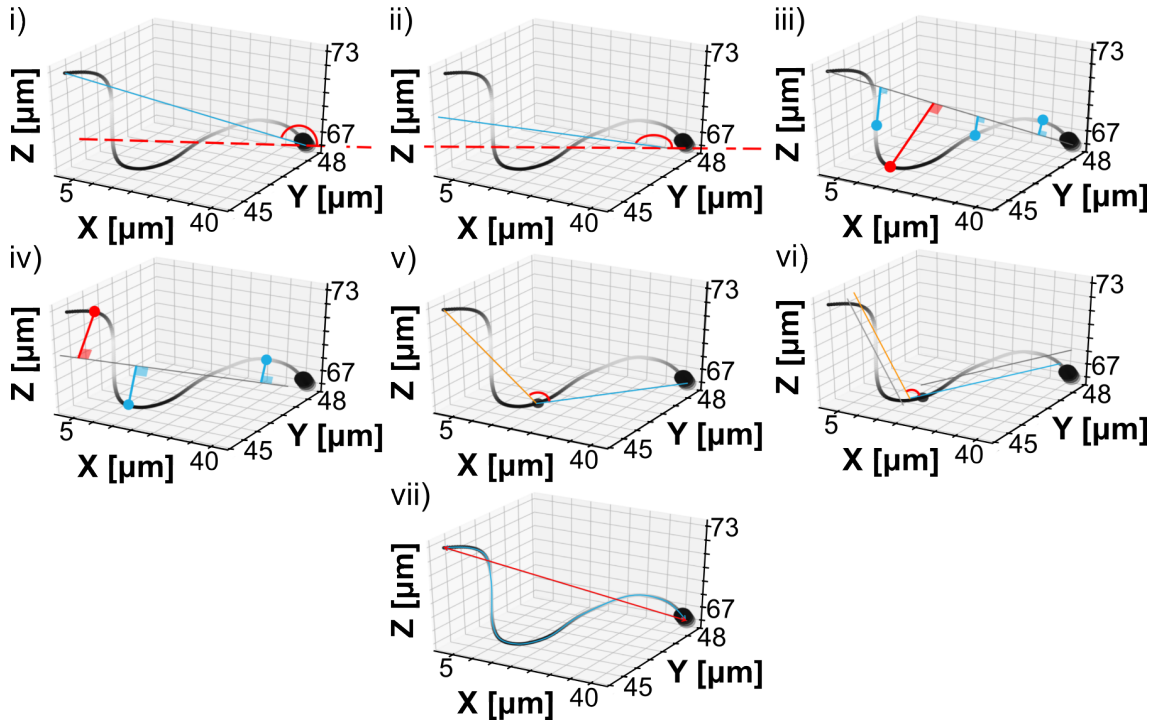


Figura 4.5: Representaciones gráficas de las características del flagero. i) Ángulos de la recta paramétrica. ii) Ángulos de la RDO. iii) Distancia máxima de los puntos del flagelo a la recta paramétrica. iv) Distancia máxima de los puntos del flagelo a la RDO. v) Ángulos entre dos rectas paramétricas. vi) Ángulos entre dos RDOS que definen el flagelo. vii) Razón de curvatura total. Imágenes tomadas de [37].

Estas características se obtienen para cada flagelo en cada tiempo, lo que resulta en una matriz de tamaño 32×11 para cada espermatozoide. Estas nuevas características se utilizaron para entrenar una red neuronal con la arquitectura que se muestra en la Figura 4.6. La arquitectura se probó con celdas recurrentes, Red Neuronal Recurrente (RNN, por sus siglas en inglés), Unidad Recurrente Cerrada (GRU, por sus siglas en inglés) y LSTM. Son llamadas así, debido a su capacidad para mantener y utilizar la información previa en la toma de decisiones actuales. Las celdas GRU controlan el flujo de información que pasará a la siguiente celda de manera similar a las LSTM's, sin utilizar la unidad de memoria. Combina la unidad de olvido y la unidad de entrada en la unidad de actualización. Así como el estado interno (memoria de la red) y el estado de la celda en una unidad de reinicio. Mientras que una RNN es un tipo de red neuronal artificial donde las conexiones entre

nodos forman un grafo dirigido a lo largo de una secuencia temporal, lo que permite tener el comportamiento temporal dinámico de los datos. Las RNN's utilizan un estado interno (memoria) para procesar secuencias de entradas, de tal manera que van teniendo un contexto del procesamiento. En esta etapa, se probaron diferentes tipos de celdas recurrentes en una red de una capa con 32 celdas. Las salidas de cada celda se conectaron a la siguiente y, al final, se pasaron a una capa densa para la clasificación de los datos (ver Figura 4.6). Los vectores de características ($C_n, n \in [0, 31]$) descritos anteriormente entran a la red por pasos de tiempo. Sin embargo, los resultados obtenidos nuevamente mostraron poca

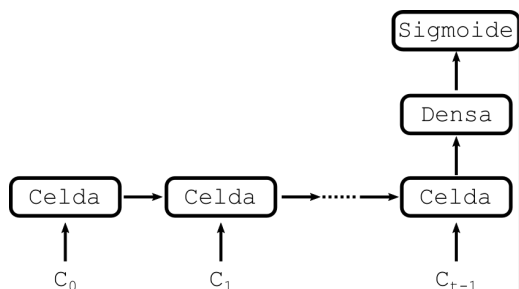


Figura 4.6: Diagrama de la arquitectura de la red. Los vectores de características pasan por las celdas (RNN, GRU o LSTM). Cuenta con una capa densa y al final pasa por una función de activación sigmoide para la clasificación.

eficiencia, como se muestra en la Figura 4.7. Las redes implementadas para los diferentes atributos mostraron dificultades para clasificar los datos, lo que sugiere que los problemas pueden deberse a factores como (1) los datos eran insuficientes, (2) los datos están mal etiquetados o que (3) la red seleccionada no era la correcta. Dado que el etiquetado de los datos se realizó de manera visual y no se dispone de un sistema de referencia para verificar las etiquetas, se decidió cambiar el enfoque y explorar la clasificación no supervisada con una nueva base de datos.

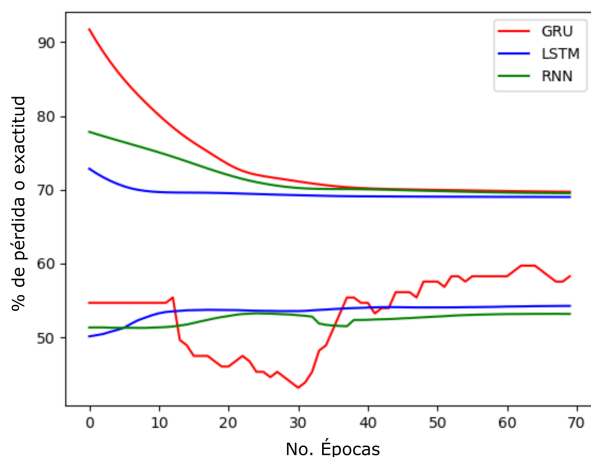


Figura 4.7: Gráfica de los mejores resultados obtenidos con la red. El eje horizontal son las épocas. Las líneas superiores muestran el error de la clasificación. Las líneas de la parte inferior muestran el porcentaje de exactitud obtenido. La roja muestra los resultados para las celdas GRU, las verdes para las celdas RNN y las azules de las celdas LSTM.

4.4. Clasificación no supervisada para proyección de distribuciones

Los conjuntos de datos a partir de este punto no están etiquetados. Sin embargo, debido a la naturaleza experimental, sabemos que los espermatozoides no capacitados no pueden

hiperactivarse, mientras que solo un porcentaje (entre el 10 % y el 20 %) de los espermatozoides inducidos a capacitación pueden mostrar una motilidad hiperactividad. Dado que los datos no están etiquetados y no existe un sistema de clasificación disponible, no es posible etiquetarlos ni visualmente por la corta duración de los vídeos.

Una forma de capturar el patrón de batido es mediante la proyección de todos los puntos sobre un plano para observar su distribución (ver Sección B.1). Para ello, se proyectan ortogonalmente todos los puntos de todos los flagelos en el plano ($Y - Z$) dado que los datos están alineados con el eje X y nos interesa conocer la distribución de los puntos que conforman al flagelo.

A los puntos proyectados se les ajusta una función de densidad para Y y Z por separado (panel izquierdo inferior de las figuras en la Sección B.1, en rojo para Y y en azul para Z) para así obtener la función de densidad de los puntos proyectados sobre el plano (el plano sobre $Y - Z$ de panel izquierdo inferior de las figuras en la Sección B.1). Esto se traduce en una función de densidad 2D con altura y anchos que definen la distribución de los puntos. Con el fin de caracterizar la ubicación de la mayor densidad de puntos en un experimento, se obtienen los máximos locales de la distribución (marcados con un asterisco en el panel izquierdo inferior y en el panel derecho de las figuras). Para la proyección de los puntos, se ajusta una elipse (línea roja en el panel derecho) a partir de la cual se obtienen el valor de los semi-ejes, el ángulo de rotación y la excentricidad. Por último, para determinar la forma del perímetro que delimita la proyección, se calcula el número de picos que tiene este perímetro.

Por ejemplo, para el espermatozoide 5, la forma de la proyección es una estrella. Si tomamos la distancia de los puntos que definen el perímetro hacia el centroide y obtenemos los picos de dicho cálculo, encontramos que la proyección tiene 7 picos, lo cual concuerda con la forma de estrella observada. Otra medida obtenida es la redondez, cuya fórmula es: $(4 \times A \times \pi) / P^2$, donde A es el área y P es el perímetro. En resumen, las características obtenidas son las siguientes:

- Ancho de la función de densidad sobre el eje Y .
- Ancho de la función de densidad sobre el eje Z .
- Máximo de la función de densidad en 2D.
- Número de máximos locales (mayor densidad de puntos en la proyección).
- Redondez.
- Semi-eje mayor.
- Semi-eje menor.
- Excentricidad.
- Ángulo de rotación.

Esto da un total de 9 atributos para la agrupación de los datos. Se analizó la covarianza de dichos atributos para obtener los más relevantes. Como resultado, se seleccionaron los atributos: ancho de la función de densidad en el eje Z , redondez de la proyección, semi-eje mayor, semi-eje menor y excentricidad del ajuste de la elipse. Luego, se aplicó el método de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para reducir la dimensionalidad.

Para la clasificación no supervisada se utilizó un Modelo de Gaussianas Mezcladas (GMM,

por sus siglas en inglés). Este tipo de clasificación se utiliza para representar la presencia de subpoblaciones dentro de una misma población y para estimar la distribución de probabilidad de observaciones en la población en general. Este modelo es útil para crear inferencias estadísticas, aproximaciones y predicciones sobre las propiedades de las subpoblaciones a partir de observaciones o datos adquiridos de la población estudiada, sin necesidad de información que identifique a la subpoblación específica. Es un método en el cual se busca definir una o más distribuciones Gaussianas ($k \in 1, \dots, K$) sobre los datos.

Existen dos tipos de agrupación con este método: la suave y la dura. En la asignación suave un dato puede pertenecer a más de un grupo, de hecho, cada dato tiene ciertas probabilidades de pertenecer a cada uno de los posibles grupos. En la asignación dura, así como en el método de $k - means$, cada dato sólo pertenece a un grupo. A diferencia del agrupamiento por $k - means$, los grupos pueden tener diferente forma, es decir, la formación de los grupos depende de la varianza en los datos. Para definir las distribuciones de probabilidad, este método se convierte en un problema de inferencia.

Utilizamos un Modelo de Gaussianas Mezcladas “duro”, con $K = 3$ y $K = 4$ y se consideraron las dos componentes principales que representan más del 80% de la varianza total. Los resultados obtenidos son consistentes con los obtenidos mediante el algoritmo $k - means$. En la figura 4.8 se observa que las distribuciones a los datos se ajustan mejor con $K = 4$. En ese caso, los grupos quedan de la siguiente manera:

- G_1 : 5, 12, 13, 24, 39 y 42.
- G_2 : 2, 8, 14, 15, 19, 20, 21, 25, 26, 27, 28, 31, 33, 36, 38, 43, 45, 47, 48, 50, 52, 56, 57, 62, 64, 68, 70, 73, 74, 76, 79, 80, 81, 82, 86, 87, 88, 92, 93, 94, 95 y 97,
- G_3 : 4, 9, 11, 18, 22, 40, 41, 44, 46, 54, 59, 60, 77 y 83.
- G_4 : 1, 3, 6, 7, 10, 16, 17, 23, 29, 30, 32, 34, 35, 37, 49, 51, 53, 55, 58, 61, 63, 65, 66, 67, 69, 71, 72, 75, 78, 84, 85, 89, 90, 91, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105 y 106.

Después realizamos una agrupación con el algoritmo de $k - means$ con $k = 4$. De esta manera, se formaron 4 grupos de espermatozoides:

- G_1 : 9, 14, 18, 26, 27, 28, 31, 40, 41, 43, 44, 46, 47, 48, 54, 56, 57, 59, 60, 62, 63, 68, 70, 73, 77, 80, 81, 87, 88, 90, 93, 95 y 97.
- G_2 : 4, 6, 7, 10, 11, 17, 19, 20, 23, 25, 29, 36, 38, 49, 55, 61, 65, 67, 69, 71, 74, 76, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 91, 92, 94, 96, 101, 103, 104, 105 y 106.
- G_3 : 5, 12, 13, 22, 24, 39, 42 y 45.
- G_4 : 1, 2, 3, 8, 15, 16, 21, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 50, 51, 52, 53, 58, 64, 66, 72, 75, 89, 98, 99, 100 y 102.

En conclusión, se ha demostrado que los datos presentan características distintivas que permiten su agrupación con una alta varianza entre las clases.

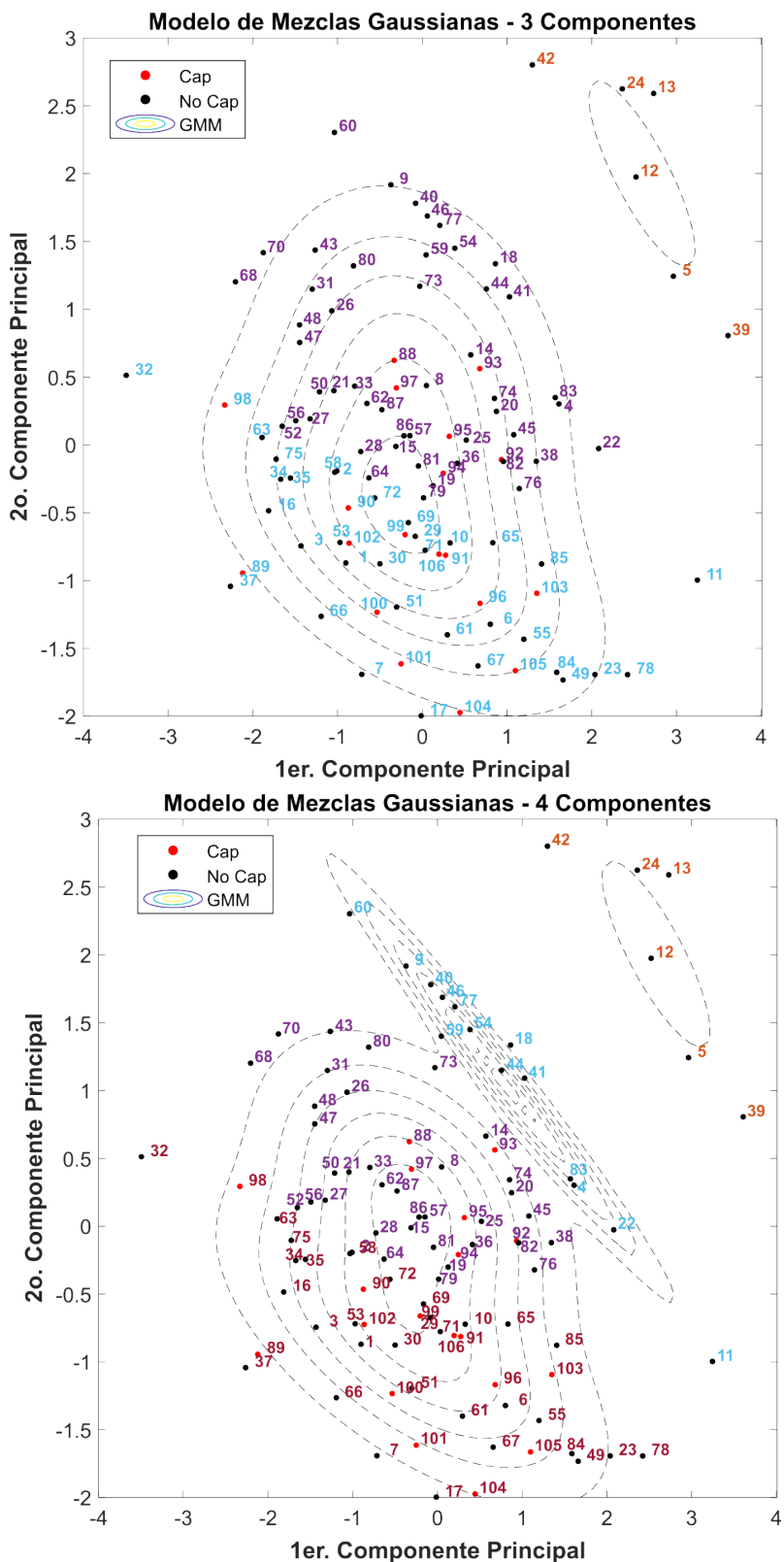


Figura 4.8: Gráfica de agrupamiento mediante el modelo de MG para las proyecciones de los puntos en un plano. En la parte superior la agrupación para $K = 3$ y en la parte inferior la agrupación para $K = 4$.

4.5. Clasificación no supervisada para el análisis de trayectorias en 3D+t

Una forma alternativa de obtener características estructurales de la forma de los flagelos es utilizar el análisis de las trayectorias en el tiempo y en el espacio en el marco de referencia original. Este método es muy utilizado para el reconocimiento de gestos, aunque en la literatura no se ha aplicado a el análisis de trayectorias en el tiempo. El análisis de trayectorias en 3D se basó en [59] que utilizan cuatro tipos de primitivas en 3D (ver Figura 4.9).

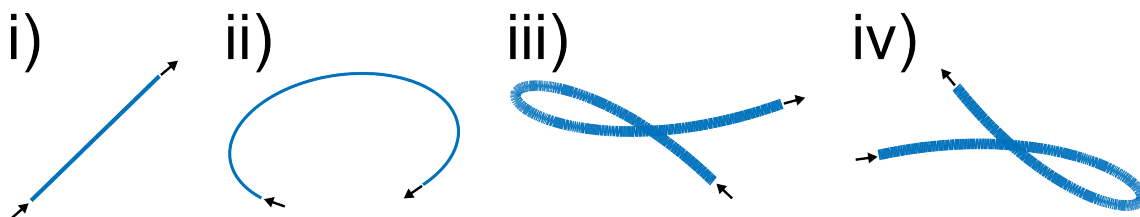


Figura 4.9: Representación gráfica de las primitivas para el análisis de trayectorias. Imagen basada en [59]. i) Línea recta (A), ii) Curva plana (B), iii) Hélice derecha (C) y iv) Hélice izquierda (D).

Estas primitivas pueden representarse en forma de letras del abecedario o por color.

- Una línea recta (A) representada en color negro.
- Una curva plana (B) representada en color verde.
- Una hélice derecha (C) representada en azul.
- Una hélice izquierda (D) representada en rojo.

En las figuras 4.10 y 4.11 se muestran los análisis de trayectorias de espermatozoides inducidos a capacitación y no inducidos a capacitación del conjunto de datos.

De esta manera, las trayectorias de los flagelos de los espermatozoides (análisis temporal) y las trayectorias de movimiento (análisis espacial) se describen en términos de primitivas. Por ejemplo, un flagelo descrito por 10 puntos se representaría como una cadena de primitivas “BBBCCABB”. El análisis espacial se realiza en relación con la curvatura de los flagelos y, de manera similar al análisis temporal, se representa utilizando primitivas.

El análisis de trayectorias reduce la información en 3D a una cadena de caracteres, además de la curvatura y torsión. Esto permite diferenciar dos curvas que sean sintácticamente iguales. Siguiendo la analogía con las cadenas de ADN, nos basamos en el artículo [56], donde clasifican cadenas de ADN mediante agrupamiento jerárquico basado en q-gramas.

Consideremos una secuencia $S = s_1, s_2, \dots, s_{Q+(q-1)}$ compuesta por símbolos pertenecientes a un alfabeto \mathcal{A} conformado por las primitivas descritas anteriormente (A, B, C, D). Un q-grama de la secuencia S se define como una subsecuencia de símbolos consecutivos de longitud q . En el artículo, se proponen diversas medidas de distancia para cuantificar la disparidad entre dos secuencias S_1 y S_2 .

En el ejemplo anterior, la secuencia sería $S=BBBCCABB$ y podemos obtener la frecuencia del q-grama = BB, sería $f(BB) = 3$.

- $d_1(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{2(f_1(q) - f_2(q))}{f_1(q) + f_2(q)} \right)^2$;
- $d_2(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{2|f_1(q) - f_2(q)|}{f_1(q) + f_2(q)} \right)$;
- $d_3(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{f_1(q) - f_2(q)}{\sqrt{f_1(q)f_2(q)+1}} \right)^2$;
- $d_4(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{|f_1(q) - f_2(q)|}{\sqrt{f_1(q)f_2(q)+1}} \right)$;
- $d_5(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{(f_1(q) - f_2(q))(f_1(q) + f_2(q))}{2f_1(q)f_2(q)} \right)^2$;
- $d_6(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{|f_1(q) - f_2(q)|(f_1(q) + f_2(q))}{2f_1(q)f_2(q)} \right)$;
- $d_7(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{f_1(q) - f_2(q)}{\sqrt{f_1(q)f_2(q)}} \right)^2$;
- $d_8(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{|f_1(q) - f_2(q)|}{\sqrt{f_1(q)f_2(q)}} \right)$;
- $d_9(S_1, S_2) = \sum (\alpha |f_1(q) - f_2(q)| + \beta |f_1(q)^2 - f_2(q)^2|)$ donde $\alpha = 100$ y $\beta = 1$;
- $d_{10}(S_1, S_2) = \sum (A |f_1(q) - f_2(q)| + B |f_1(q)^2 - f_2(q)^2|)$ donde $\alpha = 1000$ y $\beta = 0.1$;
- $d_{11}(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{\sqrt{2}(f_1(q) - f_2(q))}{\sqrt{f_1(q)^2 + f_2(q)^2}} \right)^2$;
- $d_{12}(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{\sqrt{2}|f_1(q) - f_2(q)|}{\sqrt{f_1(q)^2 + f_2(q)^2}} \right)$;
- $d_{13}(S_1, S_2) = \sum \left(\frac{f_1(q) - f_2(q)}{\sqrt{f_1(q)f_2(q)+10}} \right)^2$;
- $d_{14}(S_1, S_2) = \sqrt{\sum (f_1(q) - f_2(q))^2}$;
- $d_{15}(S_1, S_2) = \sum (|f_1(q) - f_2(q)|)$;
- $d_{16}(S_1, S_2) = 1 - \frac{2 \sum f_1(q)f_2(q)}{\sum f_1(q)^2 + \sum f_2(q)^2}$;
- $d_{17}(S_1, S_2) = 1 - \frac{\sum f_1(q)f_2(q)}{\sum f_1(q)^2 + \sum f_2(q)^2 - \sum f_1(q)f_2(q)}$;
- $d_{18}(S_1, S_2) = 1 - \frac{\sum f_1(q)f_2(q)}{\sqrt{(\sum f_1(q)^2)(\sum f_2(q)^2)}}$;
- $d_{19}(S_1, S_2) = 1 - \frac{\sum f_1(q)f_2(q)}{\min(\sum f_1(q)^2)(\sum f_2(q)^2)}$,

donde $f_1(q)$ y $f_2(q)$ son las frecuencias de un q-grama en la secuencia S .

Para el análisis de trayectorias, se utilizó un alfabeto compuesto por las primitivas B, C, y D, ya que no se encontró la primitiva “A” en ninguna de las cadenas generadas. Por lo tanto, se excluyó “A” al crear las combinaciones de gramas. Primero se generaron todas las combinaciones posibles para $q = 1, \dots, 10$. A continuación, se buscaron las frecuencias de cada q-grama en las cadenas de primitivas. Debido a que el tiempo no se consideró en esta agrupación, se calculó la frecuencia promedio de cada q-grama. Por ejemplo, si el 4-grama “DDCC” aparece 10 veces en un flagelo, 50 veces en otro y 28 veces en otro, se toma el promedio de la frecuencia de aparición en todos los experimentos. Esto también resuelve el problema de las diferencias de tiempo entre los experimentos.

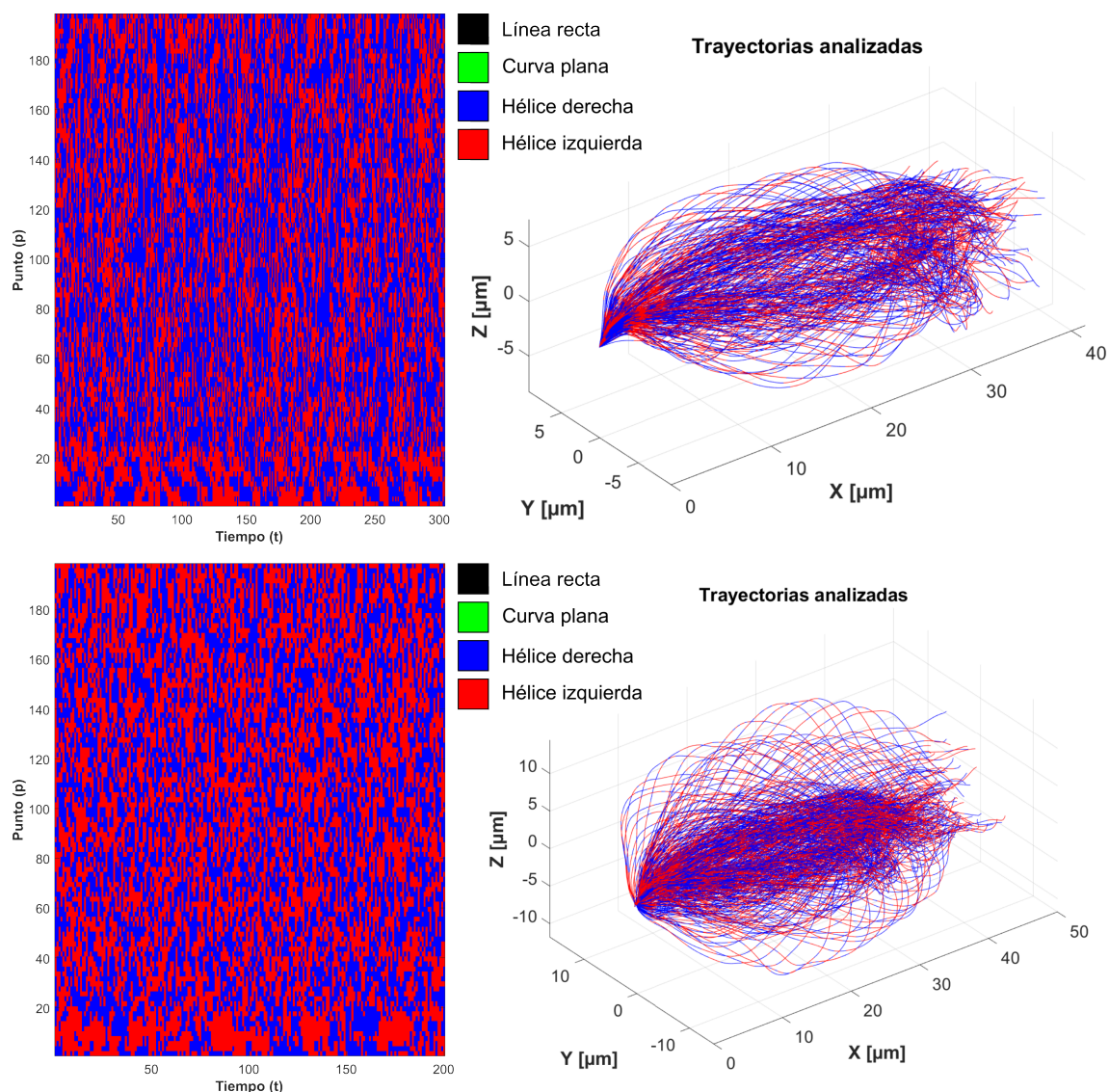


Figura 4.10: Análisis de trayectorias en el tiempo. En la parte superior se muestra el análisis de trayectorias del espermatozoide no capacitado (experimento 1). En la parte inferior se muestra el análisis de trayectorias del espermatozoide inducido a capacitación (experimento 5). Las gráficas de lado izquierdo representan la codificación de las trayectorias en las primitivas: negro (línea recta), verde (curva plana), azul (hélice derecha), y rojo (hélice izquierda).

La Figura 4.12 muestra los q-gramas más frecuentes en las secuencias de primitivas de los espermatozoides.

A continuación, se calcularon las matrices de disimilitud utilizando las distancias mencionadas anteriormente, para un valor de q igual a 10. Se aplicó un agrupamiento jerárquico a estas matrices de disimilitud utilizando un enlace completo. Los resultados se muestran en los dendrogramas de la Figura 4.13 a la Figura 4.15. Sin embargo, las distancias utilizadas no muestran las características distintivas de las secuencias de primitivas. Esto puede ser debido a que la temporalidad está presente en los datos de los espermatozoides, a diferencia de la clasificación de ADN. Por lo tanto, es de vital importancia encontrar una distancia o métrica que incluya el tiempo o la frecuencia temporal de los q-gramas.

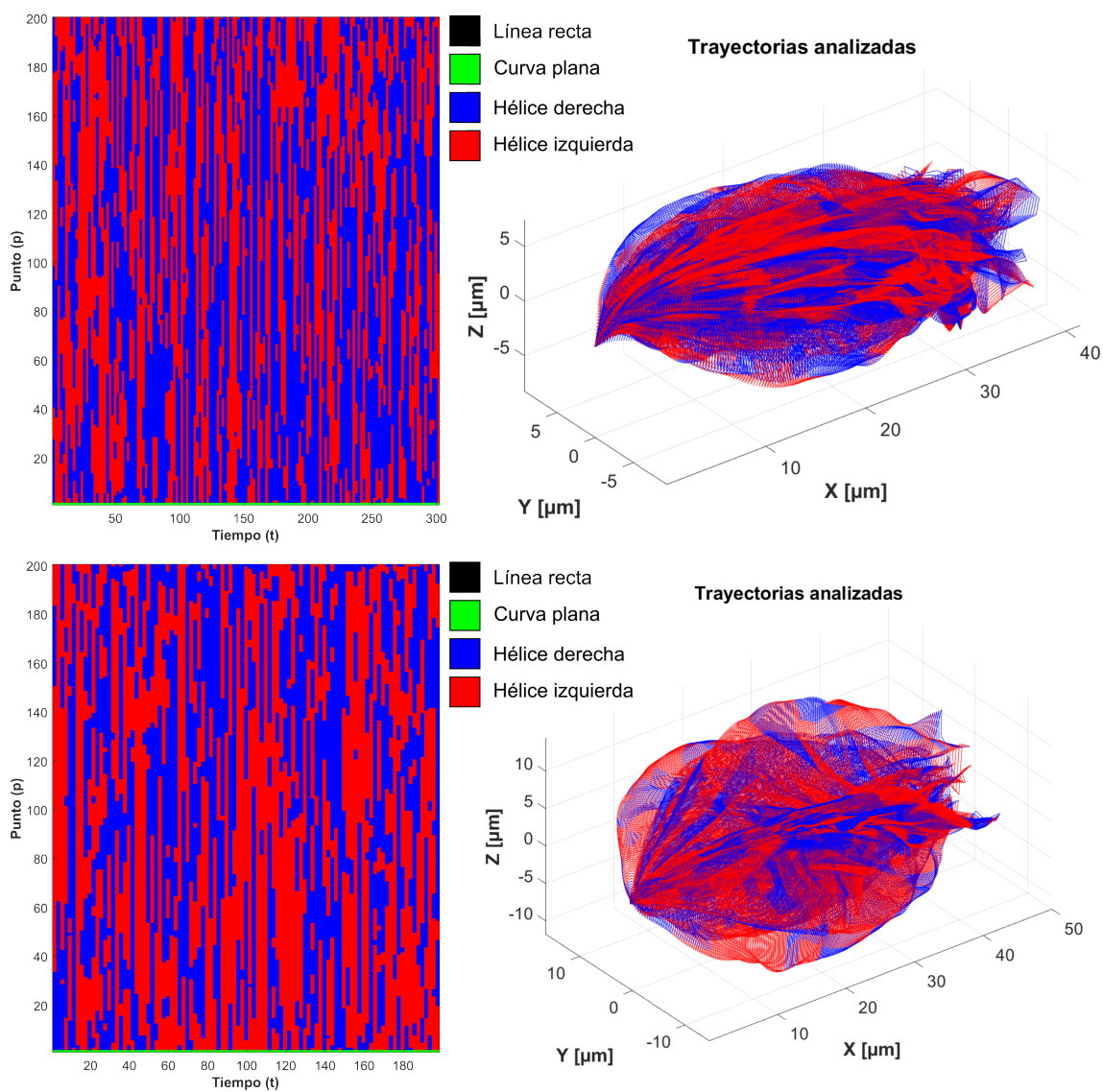


Figura 4.11: Análisis de trayectorias en el espacio. En la parte superior se muestra el análisis de trayectorias del espermatozoide no capacitado (experimento 1). En la parte inferior se muestra el análisis de trayectorias del espermatozoide inducido a capacitación (experimento 5). Las gráficas de lado izquierdo representan la codificación de las trayectorias en las primitivas: negro (línea recta), verde (curva plana), azul (hélice derecha), y rojo (hélice izquierda).

Otra opción sería realizar la alineación de las secuencias para buscar patrones o utilizar q-gramas con valores de q mayores a 10.

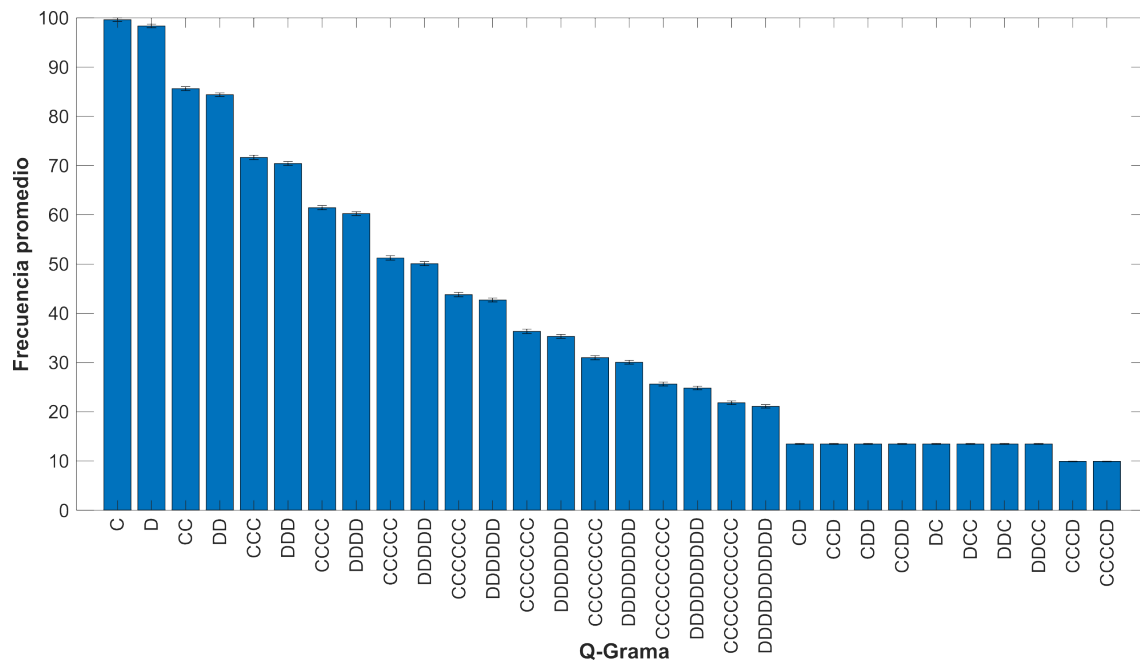


Figura 4.12: Gráfica de la frecuencia promedio de los 30 q-gramas más frecuentes en las secuencias de primitivas.

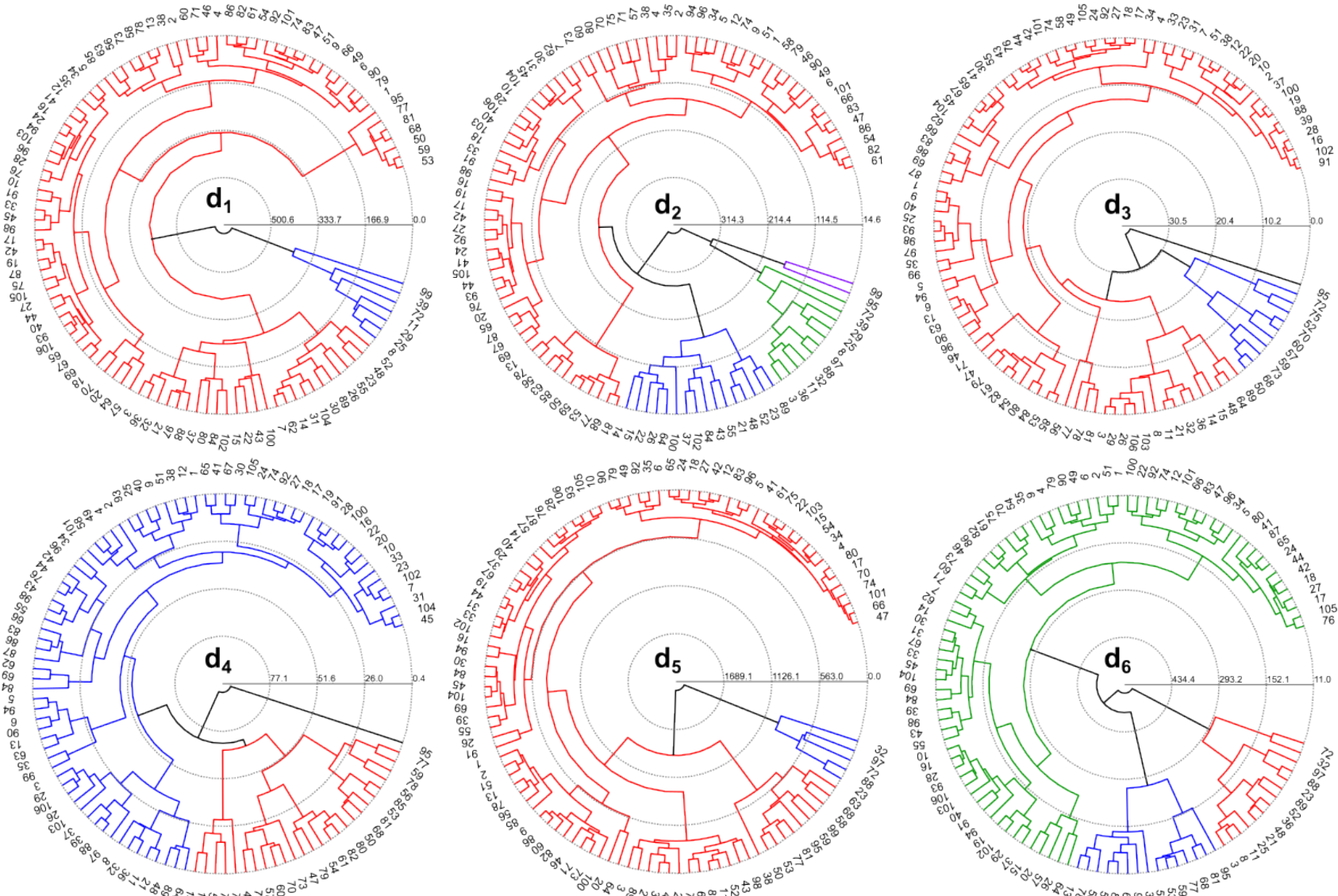


Figura 4.13: Dendrogramas en representación circular para cada una de las distancias ($d_1 - d_6$) de la matriz de disimilitud.

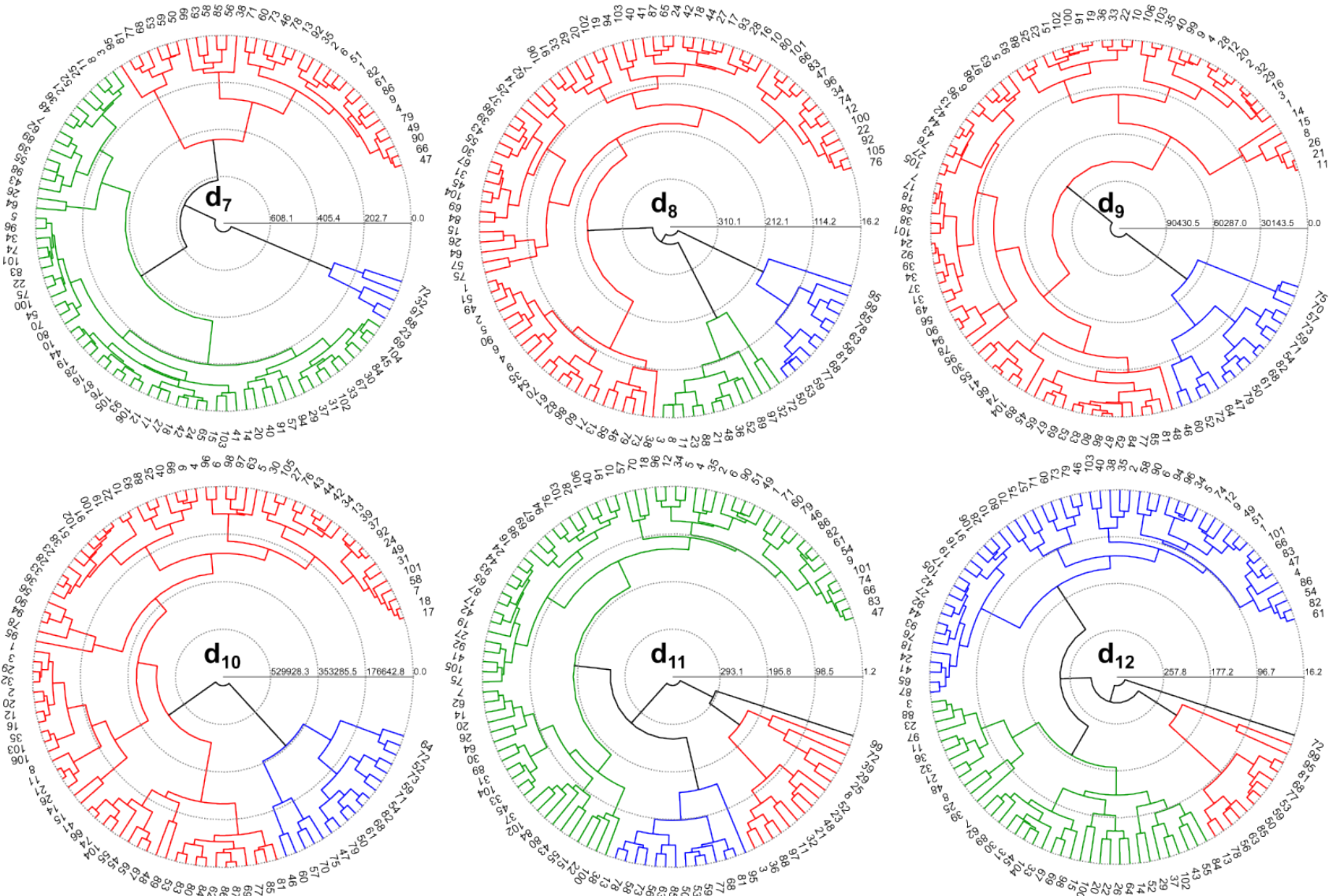


Figura 4.14: Dendrogramas en representación circular para cada una de las distancias ($d_7 - d_{12}$) de la matriz de disimilitud.

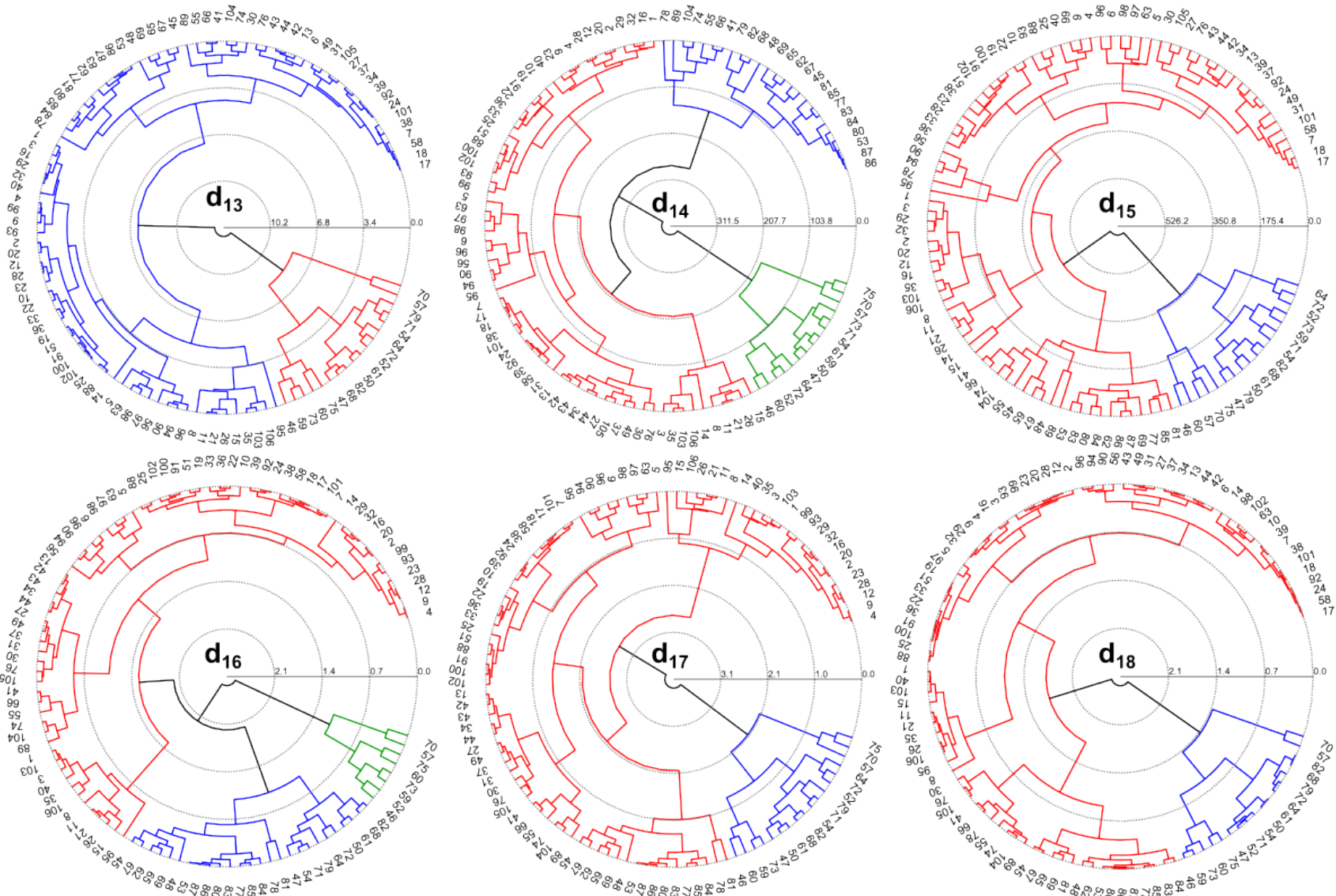


Figura 4.15: Dendrogramas en representación circular para cada una de las distancias ($d_{13} - d_{18}$) de la matriz de disimilitud.

4.6. Clasificación no supervisada para histogramas circulares

En el contexto de la forma de la distribución de puntos que describen a los flagelos empleamos histogramas circulares. La distribución de los puntos que describen al flagelo en los diferentes tiempos se puede representar como una distribución circular del conjunto de datos. El enfoque propuesto se describe a continuación:

Para cada espermatozoide con un conjunto de flagelos conformados por 200 puntos, el proceso se describe de la siguiente manera:

1. Se calcula la recta paramétrica como se describe en la Sección 4.3.

$$r(t) = x_i + t\vec{v}$$

2. Se elige el punto pivote $p_p = (0, 1, 0)$.
3. Se encuentra el punto correspondiente al punto pivote en la recta paramétrica para determinar el vector pivote.
4. Para cada punto $p_{tn}^t = \{x_{tn}^i, y_{tn}^i, z_{tn}^i\}$, se resuelve la ecuación $(p_{tn}^t - r(t)) \cdot \vec{v} = 0$ para encontrar el punto correspondiente en la recta paramétrica.
5. Se traslada el vector pivote a lo largo de la línea paramétrica para que esté a la misma distancia que p_{tn}^t .
6. Se calcula el ángulo entre el vector pivote y el vector actual, denotado como θ , utilizando la función arcotangente:

$$\theta = \arccos \left(\frac{\vec{v} \cdot \vec{v}_{\text{actual}}}{\|\vec{v}\| \cdot \|\vec{v}_{\text{actual}}\|} \right).$$

Los datos que se obtienen de este procedimiento son: la cantidad de puntos en los flagelos que forman un ángulo $\alpha | \alpha \in [0^\circ, 360^\circ)$ con respecto al vector pivote, y la suma de las distancias de dichos puntos. Esto permite codificar la distribución de los puntos en un círculo (ver Figura 4.16). En la Sección B.2 se muestra la distribución de densidad en forma de histograma circular para cada uno de los espermatozoides. La representación consiste en un círculo con un radio igual al valor promedio de las distancias. El tamaño y la opacidad de los círculos en la circunferencia están relacionados con la proporción de puntos que caen en esa región del círculo. La Figura 4.17 muestra la distribución de puntos en forma lineal para cada experimento (filas). Las columnas de 1 a 360 representan la cantidad de puntos (normalizados) que forman cada ángulo con el vector pivote. La última columna representa, mediante su intensidad, el radio de la circunferencia. Esta matriz de atributos y observaciones se utiliza para agrupar los datos. La agrupación de estos datos se realiza mediante un enfoque de agrupamiento jerárquico. Se obtiene una matriz de disimilitud de los datos mostrados en la Figura 4.17, calculada utilizando la distancia euclidiana. El agrupamiento jerárquico se calcula con enlace completo, lo que resulta en un dendrograma mostrado en la Figura 4.18. En el dendrograma se pueden observar dos grupos generales:

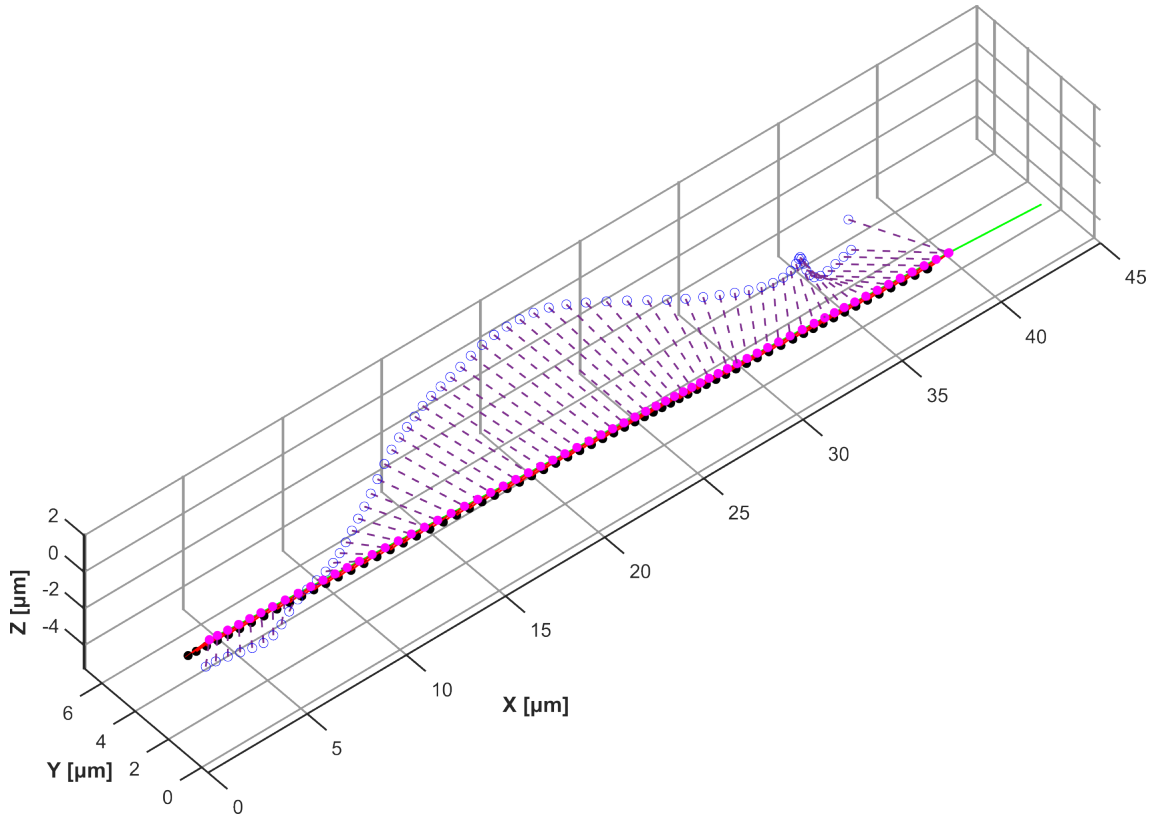


Figura 4.16: Representación gráfica para la obtención de la distribución de densidad de los puntos que conforman a los flagelos. La línea verde es la recta paramétrica. Los puntos negros son los puntos de referencia trasladados sobre la recta paramétrica para formar los vectores de referencia con los puntos magenta. Las líneas punteadas son los vectores conformados por los puntos en el flagelo y la recta paramétrica. Se busca encontrar el ángulo entre la línea roja y la línea morada para cada uno de los puntos.

- G_1 : 5, 12, 13, 22, 24, 39 y 42.
- G_2 : $1, 2, \dots, 87 \notin G_1$.

4.7. Clasificación no supervisada para la envolvente de elipses

4.7.1. Ajuste de elipses

Para un conjunto de puntos en el espacio 2D, es posible ajustar una elipse para obtener información sobre su distribución. Utilizamos el ajuste de una elipse mediante el método de “Ajuste directo de mínimos cuadrados de elipses” descrito en [19].

Sea $F(\mathbf{a}, \mathbf{x})$ la distancia algebraica de un punto a una sección cónica que se describe como:

$$F(\mathbf{a}, \mathbf{x}) = Ax^2 + Bxy + Cy^2 + Dx + Ey + F = 0 \quad (4.5)$$

donde $\mathbf{a} = [A, B, C, D, E, F]^T$ y $\mathbf{x} = [x^2, xy, y^2, x, y, 1]^T$.

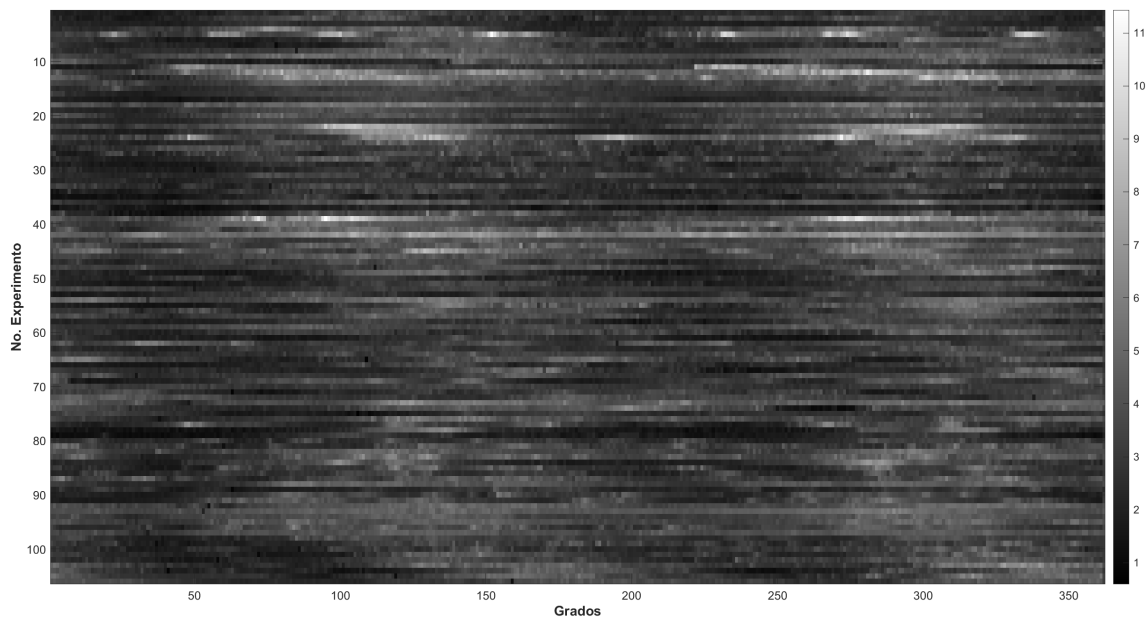


Figura 4.17: Matriz de los valores de la distribución de densidad, cada fila representa un experimento, las primeras 360 columnas cuantifican los grados de la circunferencia y la última columna la circunferencia promedio. La intensidad depende de la cantidad de puntos que tenían un ángulo similar, a mayor proporción de puntos el color es blanco.

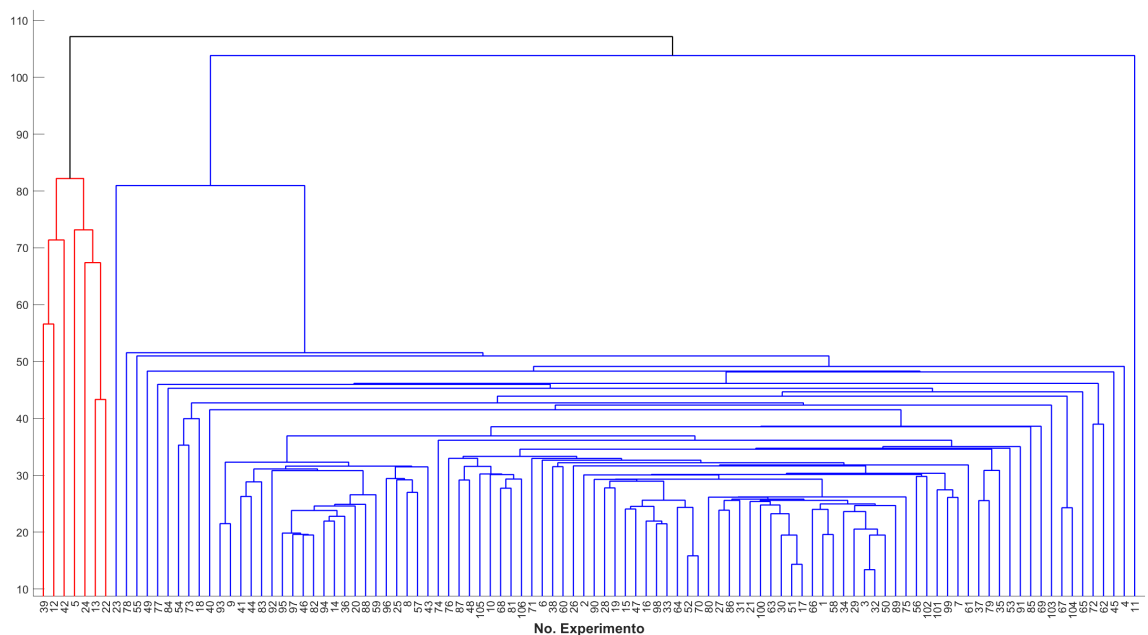


Figura 4.18: Dendrograma de las distribuciones de densidad de todos los puntos del flagelo.

El ajuste a una cónica general se puede realizar minimizando la suma de las distancias algebraicas al cuadrado:

$$\mathcal{D}_A(\mathbf{a}) = \sum_{i=1}^N F(\mathbf{x}_i)^2 \quad (4.6)$$

de una curva a N puntos \mathbf{x}_i . Para evitar la solución trivial $\mathbf{a} = \mathbf{0}$, se restringe el vector

a. La matriz de restricción es una matriz cuadrada de 6×6 , que evita la solución trivial a la minimización y se resuelve con un sistema de valores propios generalizados de rango deficiente:

$$\mathbf{D}^T \mathbf{D} \mathbf{a} = \lambda \mathbf{C} \mathbf{a}, \quad (4.7)$$

donde $\mathbf{D} = [\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_n]^T$ es la matriz de diseño. La restricción que se implementa en [19] es que el discriminante sea $(B^2 - 4AC) < 0$, ya que si el discriminante es:

- **Positivo**, define una hipérbola
- **Cero**, define una parábola
- **Negativo** y $A \neq C$, define una elipse.

Es posible escalar los parámetros de \mathbf{a} por lo que podemos incorporar la escala en la restricción e imponer la restricción de igualdad $4AC - B^2 = 1$. Esta restricción se expresa como: $\mathbf{a}^T \mathbf{C} \mathbf{a} = 1$ donde:

$$\mathbf{C} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad (4.8)$$

obteniendo el sistema a solucionar:

$$\mathbf{S} \mathbf{a} = \lambda \mathbf{C} \mathbf{a} \quad (4.9)$$

$$\mathbf{a}^T \mathbf{C} \mathbf{a} = 1 \quad (4.10)$$

Con este método se reduce la complejidad que existe en el ajuste de las elipses a un conjunto de puntos y está acotada para que la solución siempre sea una elipse.

Una vez ajustada la elipse, se pueden obtener los siguientes parámetros:

- Semieje mayor (a).
- Semieje menor (b).
- Ángulo de rotación de la elipse (θ).
- Centro de la elipse rotada (C_X, C_Y).

Con los valores de la elipse ajustada es posible calcular la excentricidad mediante

$$e = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}} \quad (4.11)$$

donde

- $e = 0$ es un círculo,
- $0 < e < 1$ es una elipse, cuando $e \rightarrow 1$ es una elipse muy alargada y según los datos puede significar un mal ajuste,

- $e = 1$ es una parábola,
- $e > 1$ es una hipérbola.

Resultados

5.1. Ajuste de elipses

El conjunto de datos como se describe en el Capítulo 3, es un conjunto de experimentos no etiquetados. Sin embargo, por la naturaleza experimental sabemos que los espermatozoides que no se inducen a capacitación no pueden hiperactivarse y que de los espermatozoides que fueron inducidos a capacitación tan solo un pequeño porcentaje, entre el 10 al 20 %, se hiperactiva [53]. En esta sección se presenta la extracción de características de los datos. Posteriormente, se describe como se emplea un clasificador no supervisado. Ya que, como se mencionó anteriormente, los datos no están etiquetados debido a que actualmente no existe una clasificación de HA para espermatozoides nadando libremente en 3D+t. Además, para los fisiólogos especialistas, visualmente la clasificación de la motilidad del batido flagelar en 3D+t es una labor complicada debido a la corta duración de los vídeos.

En la Sección 2.3.2 se hace referencia a estudios previos que indican que los espermatozoides de diferentes especies de mamíferos presentan patrones distintivos en su batido flagelar, que van desde un estado no capacitado hasta un hiperactivado pasando por un batido transicional. Basándonos en esta información, se extrajeron características con el objetivo de identificar patrones similares a los descritos en la literatura. La intención era obtener características que capturaran tanto la información espacial como la temporalidad de los datos, permitiendo así distinguir entre los distintos tipos de batido exhibidos por los espermatozoides. Para lograr esto, se desarrolló un método que emplea una envolvente de elipses ajustadas a lo largo del batido flagelar, como se describe más adelante.

La cantidad de flagelos y puntos identificados en cada batido varia debido a limitaciones en el tiempo de captura de la muestra y al proceso de segmentación utilizado.

Sea $(x_{tn}^i, y_{tn}^i, z_{tn}^i)$ con $n = 1, 2, \dots, N$ el conjunto de puntos de la línea central del flagelo alineado al eje x , como se describe en el Capítulo 3 para el tiempo $t = 1, 2, \dots, T$ de cada espermatozoide, i , del conjunto de datos.

Para generar la envolvente de un espermatozoide i , se realiza el siguiente procedimiento:

1. Seccionamiento transversal: El batido flagelar del espermatozoide i se divide en secciones transversales de igual grosor a lo largo del eje x , como se muestra en la Figura 5.1. La distancia entre secciones, δ , se define como el doble de la distancia máxima entre los puntos del conjunto de datos. Esto garantiza que haya al menos tres puntos

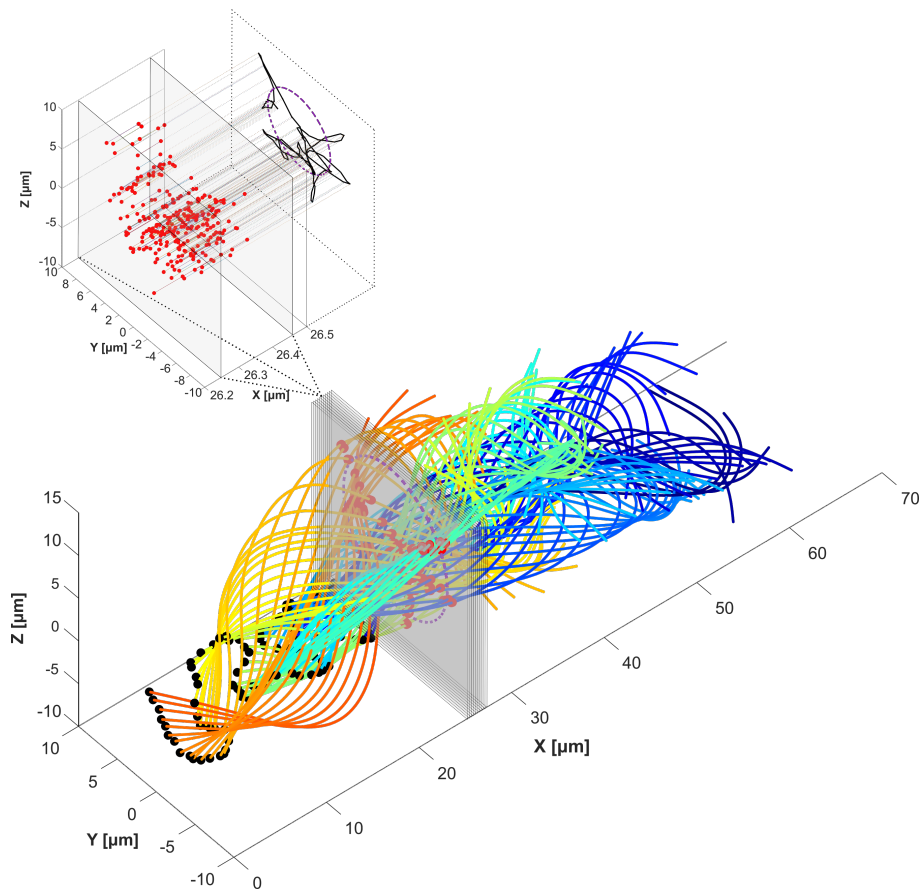


Figura 5.1: Esquema de ajuste de una elipse a un flageloide. La subgráfica inferior muestra la representación del espermatozoide ID: Cap 024 segmentado y rastreado, al igual que en la Figura 3.2; se muestran 11 planos de corte (grises) correspondientes a 10 intervalos ($\approx 0.21\mu m$ cada uno). La subgráfica superior muestra un acercamiento de un solo intervalo, los puntos rojos corresponden a los puntos de los flagelos que pertenecen al intervalo. A la derecha se muestra la proyección ortogonal de los puntos rojos formando un flageloide (línea negra) con su elipse ajustada (línea punteada morada).

en cada sección.

2. Creación de flageloides: Se define un flageloide F_l^i [20] como el conjunto de puntos proyectados ortogonalmente que pertenecen a la sección $I_l = [(l-1) \cdot \delta, l \cdot \delta)$, donde l representa los planos de corte $l = 1, 2, \dots, L^i$ y $L^i = \lceil \frac{\max\{x_{in}^i\}}{\delta} \rceil$.
3. Verificación de condiciones: Cada F_l^i debe cumplir dos condiciones para ser considerado en el ajuste de una elipse:
 - Que contenga al menos tres puntos: $|F_l^i| > 2$.
 - Que los puntos no sean colineales: Se verifica utilizando el rango de la matriz (y_{in}^i, z_{in}^i) . Si el rango es menor o igual a uno, los puntos son colineales y no se ajusta la elipse en ese intervalo o flageloide.
4. Ajuste de la elipse: Si se cumplen ambas condiciones, se ajusta una elipse, e_l^i , utilizando el método descrito en la subsección 4.7.1. Los parámetros que se obtienen de cada elipse son:
 - Dimensión del semieje mayor (a_l^i).
 - Dimensión del semieje menor (b_l^i).
 - Ángulo de rotación de la elipse respecto al eje x y el semieje mayor (θ_l^i).
 - Excentricidad de la elipse (ε_l^i).

Al final, se obtiene un conjunto de elipses que definen la forma y la trayectoria del espermatozoide, formando así una envolvente. Una vez generada dicha envolvente, se llevan a cabo dos pasos adicionales:

1. Corrección del ángulo de rotación de la elipse: El ángulo de rotación de la elipse es el ángulo que se forma entre el eje x y el semieje mayor de la elipse. Aunque el valor de θ_l^i , está limitado al rango $[0, \pi)$ los valores oscilan abruptamente entre planos consecutivos, lo que no permite una descripción adecuada de la rotación de las elipses. Para reducir estas oscilaciones, se realiza el siguiente procedimiento:

$$\theta_l^i = \min(|\theta_l^i \pm 2\pi - \theta_{l-1}^i|, |\theta_l^i - \theta_{l-1}^i|, |\theta_l^i \pm \pi - \theta_{l-1}^i|).$$

Este procedimiento suaviza los cambios abruptos entre los ángulos para que la diferencia sea la menor.

2. Eliminación de valores atípicos: Es posible que el método de ajuste de elipses fallé o que los datos estén muy dispersos por su propia naturaleza. Por esta razón, se eliminan las elipses que tienen valores atípicos. Específicamente, se eliminan los valores que se encuentran por debajo del percentil 1 y por encima del percentil 99. Después de descartar los valores atípicos, se obtienen E^i elipses, con $E^i \leq L^i$, ajustadas correctamente.

Para describir las variaciones espaciales y temporales de la envolvente de elipses, proponemos un vector de cuatro características basadas en el análisis de los datos obtenidos (semieje mayor, semieje menor, ángulo de rotación y excentricidad) de cada elipse:

1. Foco promedio ($C_1^i = \mu \left(\left\{ \sqrt{a_l^i{}^2 - b_l^i{}^2} \right\}_{l=1}^{E^i} \right)$): Esta característica representa la distancia promedio desde el centro de cada elipse hasta sus focos. Se calcula tomando

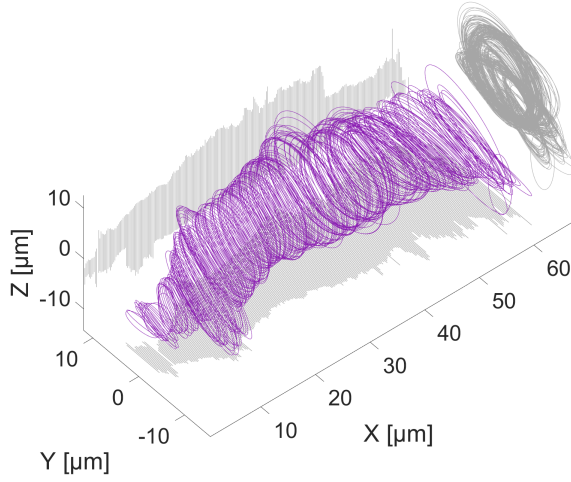


Figura 5.2: Envolvente de elipses (líneas moradas) para un espermatozoide, y sus proyecciones sobre XY , XZ y YZ (líneas gris claro). Cada elipse corresponde al ajuste a un intervalo, de tal manera que la envolvente completa está compuesta por todas las elipses ajustadas al batido del espermatozoide. La envolvente de elipses se utilizó para analizar la dinámica del batido flagelar del espermatozoide y extraer características relevantes. La figura muestra cómo las elipses se ajustan a la forma curva del espermatozoide, lo que permite obtener información sobre la orientación y forma del flagelo a lo largo del tiempo. Las proyecciones en XY , XZ y YZ permiten a visualizar la forma del batido flagelar del espermatozoide en diferentes perspectivas.

la media de las distancias para todas las E^i elipses.

2. Diferencia angular promedio ($C_2^i = \mu \left(\left\{ \phi_{l-1}^i - \phi_l^i \right\}_{l=2}^{E^i} \right)$): Esta característica captura el cambio promedio de los ángulos de las elipses ajustadas. Se calcula tomando la media de las diferencias entre los ángulos de las E^i elipses.
3. Excentricidad promedio ($C_3^i = \mu \left(\left\{ \varepsilon_l^i \right\}_{l=1}^{E^i} \right)$): Esta característica representa el promedio de las excentricidades de las elipses ajustadas en el conjunto E^i .
4. Desviación del semieje mayor ($C_4^i = \sigma \left(\left\{ a_l^i \right\}_{l=1}^{E^i} \right)$): Esta característica mide la variabilidad del semieje mayor de las elipses ajustadas. Se calcula tomando la desviación estándar todas las elipses en E^i .

En las ecuaciones anteriores, μ representa la media y σ representa la desviación estándar. Estas características nos permiten cuantificar aspectos importantes de la envolvente de elipses. El foco promedio indica la distribución de los focos de las elipses, la diferencia angular promedio refleja la variación en los ángulos de las elipses, la excentricidad promedio describe la forma promedio de las elipses, y la desviación del semieje mayor indica la dispersión de los tamaños de las elipses.

Estas características proporcionan una representación cuantitativa de las variaciones en el espacio y el tiempo de la envolvente de elipses, lo que nos permite analizar y comparar diferentes espermatozoides y sus patrones de movimiento. La reducción de dimensionalidad de los atributos normalizados se llevó a cabo utilizando el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés). Se seleccionaron tres componentes principales que capturan más del 90 % de la variabilidad de los datos (ver Tabla 5.1). Este enfoque permite resumir la información contenida en los atributos originales en un conjunto reducido de variables.

	PC 1	PC 2	PC 3
Valor propio	2.3862	1.0004	0.4616
Característica 1	0.6142	0.0392	-0.1122
Característica 2	-0.0242	0.9990	-0.0191
Característica 3	0.5712	-0.0163	-0.6197
Característica 4	0.5440	0.0172	0.7765

Tabla 5.1: Detalles del análisis de componentes principales obtenidos a partir del vector de características de la envolvente de elipses. El elemento $[j, k]$ es la contribución de la característica j al k -ésimo componente principal (PC). La característica dominante para cada componente principal se muestran en negrita.

5.2. Agrupamiento no supervisado

Teniendo en cuenta que nuestro conjunto de datos consiste en espermatozoides no capacitados (control) y espermatozoides que han sido sometidos a un proceso de capacitación *in vitro*, esperamos que aproximadamente del 10 al 20 % de los espermatozoides capacitados presenten una motilidad hiperactivada. Dado que nuestro conjunto de datos no está etiquetado, no teníamos conocimiento previo sobre el número de grupos en los datos, y el número real de espermatozoides hiperactivados es desconocido.

Decidimos aplicar el agrupamiento jerárquico aglomerativo, ya que no requiere conocer de antemano cuántos grupos existen, no necesita parámetros de entrada y no es sensible a valores atípicos en comparación con otros métodos. El agrupamiento jerárquico aglomerativo es una técnica que agrupa cada uno de los objetos en el conjunto de datos en función de la métrica de disimilitud entre ellos (ver subsección 2.2.2.2). Los grupos se crean a partir de pares de mayor similitud y luego se conectan sucesivamente con los otros pares de menor similitud. Este proceso se representa mediante un dendrograma que muestra la relación jerárquica entre los pares de grupos en el conjunto de datos [29].

Calculamos la distancia Euclidiana como métrica de disimilitud entre los descriptores de cada célula de espermatozoide contra las demás para determinar la disimilitud entre cada par de espermatozoides. Utilizamos el enlace promedio y el criterio de “distancia” para definir los grupos en función de la proximidad entre los objetos. El dendrograma nos permitió identificar visualmente los grupos en el conjunto de datos, y encontramos dos grupos principales (ver Figura 5.3). Estos grupos se denominaron como grupo 1 (G_1) y grupo 2 (G_2) (ver Tabla A). Esta técnica de agrupamiento nos permite identificar patrones y relaciones entre las observaciones, facilitando así el análisis comparativo de los espermatozoides y sus características.

5.3. Clasificación

El dendrograma muestra la distancia Euclidiana entre cada par de espermatozoides, basándose en sus descriptores basados en características (ver Figura 5.3), y muestra cuán similares son los espermatozoides entre sí.

La excentricidad de una elipse (ε) mide cuánto se desvía de un círculo. Esto está relacionado con la tendencia del patrón de movimiento del flagelo, donde un patrón más simétrico corresponde a un elipsoide más circular ($\varepsilon \rightarrow 0$) y un patrón asimétrico corresponde

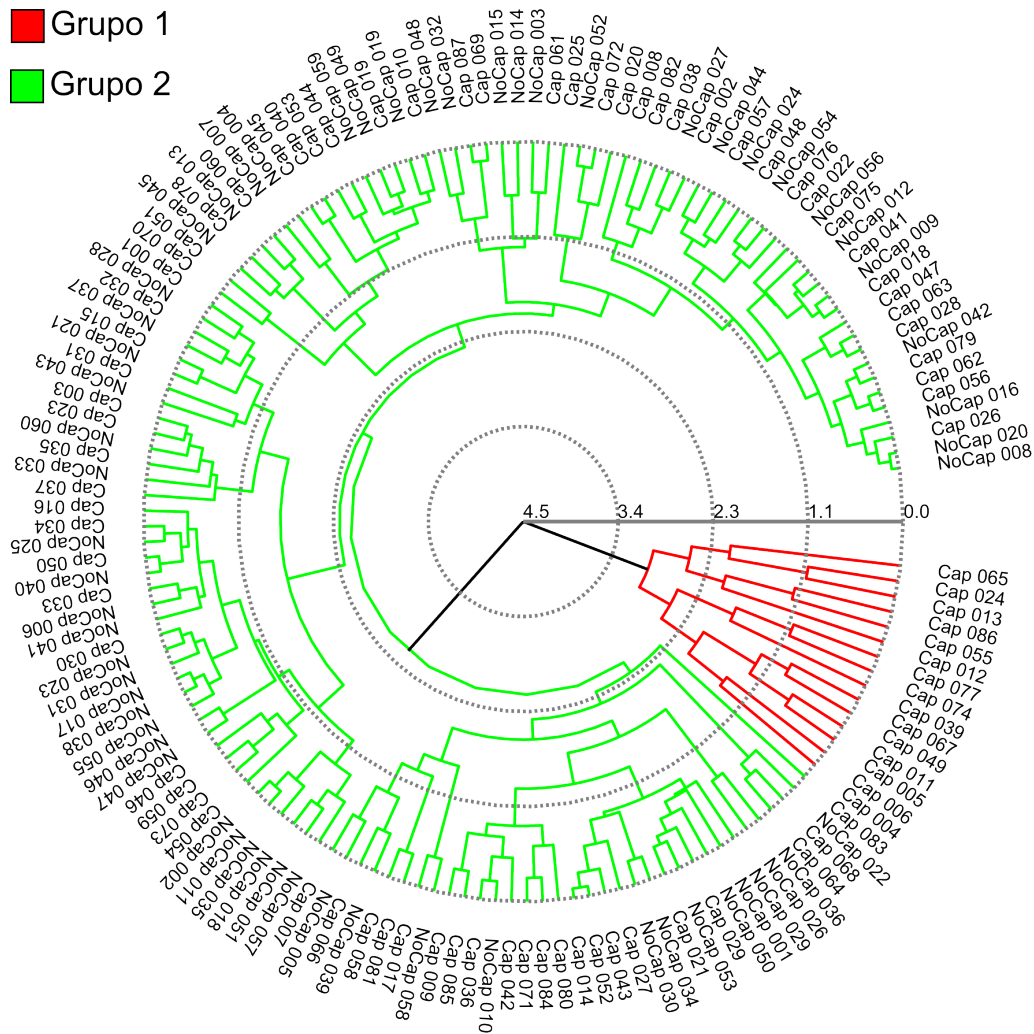


Figura 5.3: El dendrograma en representación circular muestra el agrupamiento jerárquico con enlace promedio; las líneas rojas corresponden al Grupo 1 y las líneas verdes al Grupo 2. Las identificaciones de cada experimento, donde “Cap” se refiere a los espermatozoides inducidos a la capacitación y “No Cap” pertenece al grupo de control.

a un elipsoide más alargado ($\varepsilon \rightarrow 1$). En cuanto a la amplitud del batido flagelar lo relacionamos con el semieje mayor de las elipses ajustadas (a). En el Grupo 2 (cuadrados y líneas verdes en la Figura 5.3) se encuentran las células no capacitadas y una fracción de los espermatozoides inducidos a la capacitación. Los espermatozoides en el Grupo 1 (cuadrados y líneas rojas en la Figura 5.3) tienen elipses ajustadas con semiejes mayores más grandes ($\max(a) > 6.5\mu\text{m}$) en comparación con los del Grupo 2, además de tener $\varepsilon \rightarrow 1$.

Dado el análisis y las consideraciones anteriores, asociamos el Grupo 2 con el patrón de motilidad de los espermatozoides no capacitados, que incluye el grupo de control y un subconjunto de espermatozoides inducidos a la capacitación (aquellos que no lograron capacitarse). El Grupo 1 se asocia al grupo con el patrón de movimiento hiperactivado, que solo incluye células de espermatozoides que fueron inducidas a la capacitación.

El diagrama de flujo en la Figura 5.4 resume los pasos realizados en el análisis y el proceso de agrupamiento de los espermatozoides. Primero, se recopilieron los datos de espermato-

zoides no capacitados y espermatozoides que fueron sometidos a un proceso de capacitación *in vitro*. A continuación, se realizó una extracción de características basadas en el ajuste de elipses en las trayectorias de los espermatozoides.

Posteriormente, se llevó a cabo una normalización de las características y se aplicó el análisis de componentes principales (PCA) para reducir la dimensionalidad de los datos. Se utilizó una matriz de disimilitud para calcular las distancias Euclidianas entre los espermatozoides basadas en sus componentes principales.

Luego, se aplicó el agrupamiento jerárquico aglomerativo utilizando enlace promedio y el criterio de “distancia” para formar los grupos de espermatozoides. Finalmente, se identificaron dos grupos principales: Grupo 1, asociado al patrón de movimiento hiperactivado de los espermatozoides, y el Grupo 2, que incluyó tanto los espermatozoides no capacitados como un subconjunto de los espermatozoides inducidos a capacitación.

El diagrama de flujo proporciona una visión general de los pasos realizados en el análisis y agrupamiento de los espermatozoides, facilitando la comprensión de la metodología utilizada y los resultados obtenidos.

5.4. Validación de los resultados

En la literatura se ha descrito que el batido flagelar de un espermatozoide humano hiperactivado es asimétrico, tiene un aumento en su amplitud y reduce su frecuencia [1, 17, 34, 53, 54, 55, 60]. En 2D, se ha establecido un marco de referencia, sin embargo esto depende de muchos factores como se describe en la Sección 2.3.3. Dado que no existe un “ground truth” para la clasificación del batido flagelar de espermatozoides en 2D, por lo tanto tampoco en 3D.

Nosotros proponemos una generalización de las medidas 2D para validar la clasificación no supervisada. Para ello, medimos amplitud, anisotropía y frecuencia, usados en 2D, en nuestra base de datos en 3D+t.

Inicialmente se alinean las primeras $\sim 2.5 \mu m$ de cada flagelo (marco de referencia fijo del cuello, ver Figura 5.5). Para cada espermatozoide (denotado como i), la línea central de flagelo se rastreó durante T_i –tiempos y se describe por N_T –puntos. Definimos la amplitud como la distancia promedio de cada punto en el flagelo (representado por coordenadas $(x_{tn}^i, y_{tn}^i, z_{tn}^i)$) al eje X :

$$A^i = \mu \left(\left\{ \sqrt{y_{tn}^i{}^2 + z_{tn}^i{}^2} \right\}_{n=1, t=1}^{N_T, T_i} \right). \quad (5.1)$$

Por otra parte, la frecuencia de batido se obtiene mediante el análisis de de la transformada de Fourier en cada punto del flagelo a lo largo del tiempo $\mathcal{F}(y_{tn}^i, z_{tn}^i)$ en cada una de las componentes. Se suma la amplitud del espectro de potencia de cada punto de la suma de las dos componentes y se toma como frecuencia de batido ω_b^i para el espermatozoide i la frecuencia donde la suma es máxima (Figura 5.5):

$$\omega_b^i = \operatorname{argmax}_{\omega} \left(\sum_{n=1}^N |\mathcal{F}\{y_{tn}^i\}| + |\mathcal{F}\{z_{tn}^i\}| \right). \quad (5.2)$$

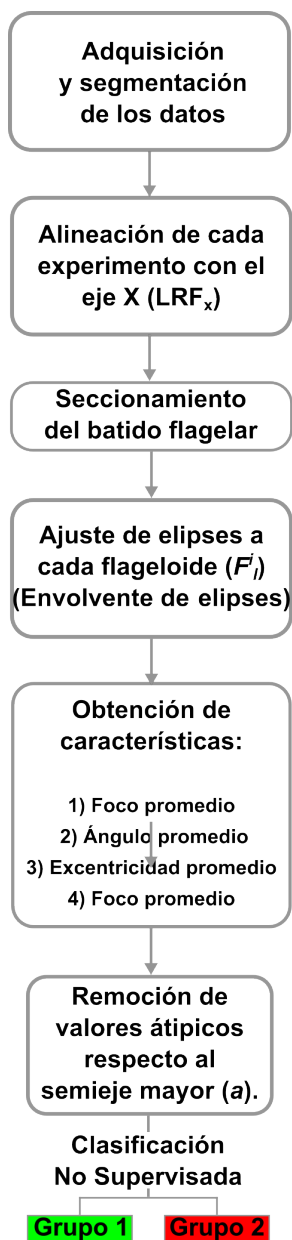


Figura 5.4: Diagrama de flujo que ilustra los pasos realizados en el análisis y agrupamiento de los espermatozoides. Este diagrama de flujo proporciona una representación visual de la metodología utilizada en el estudio y ayuda a comprender el flujo de trabajo seguido para obtener los resultados presentados.

En cuanto a la asimetría, en el análisis 2D, se puede medir fácilmente comparando las diferencias entre los dos lados o mitades del batido flagelar. Sin embargo, en el análisis 3D entran en juego consideraciones geométricas adicionales. El flagelo es una estructura tridimensional y su patrón de batido implica movimientos complejos en el espacio. Medir y cuantificar directamente la asimetría del batido flagelar en 3D se vuelve más desafiante debido a los arreglos espaciales intrínsecos y la naturaleza curva del flagelo. Las variaciones en el patrón de batido a lo largo de los diferentes ejes y las interacciones entre los diferentes segmentos del flagelo dificultan la definición y cuantificación de la asimetría de manera directa. Por lo tanto, mientras que la asimetría es fácilmente observable y cuantificable en el análisis 2D, la transición a 3D requiere un cambio de enfoque hacia la anisotropía para capturar mejor la dinámica intrínseca y las complejidades geométricas del latido flagelar. Ya que la anisotropía captura el grado de direccionalidad o preferencia de orientación en el patrón de batido. Al considerar la forma y las características direccionales de la envoltura del movimiento del flagelo, obtenemos información sobre la naturaleza anisotrópica del batido. Esto nos permite comprender la dirección de preferencia o la orientación de flexión del flagelo en el espacio 3D, que a menudo se asocia con espermatozoides hiperactivados.

La anisotropía se toma como la media de la excentricidad de las elipses ajustadas a cada espermatozoide en el marco de referencia del cuello. En este contexto, la envoltura de elipses en el análisis del batido flagelar de los espermatozoides, un valor de excentricidad más alto indica una forma más alargada o estirada, lo que implica una mayor anisotropía del batido. Esto significa que el flagelo exhibe una dirección u orientación preferida de flexión, lo que lleva a una forma alargada en lugar de una forma circular.

Se realizó la prueba de Wilcoxon para determinar si existen diferencias significativas entre los dos grupos para cada una de las medidas (ver Figura 5.6) antes descritas.

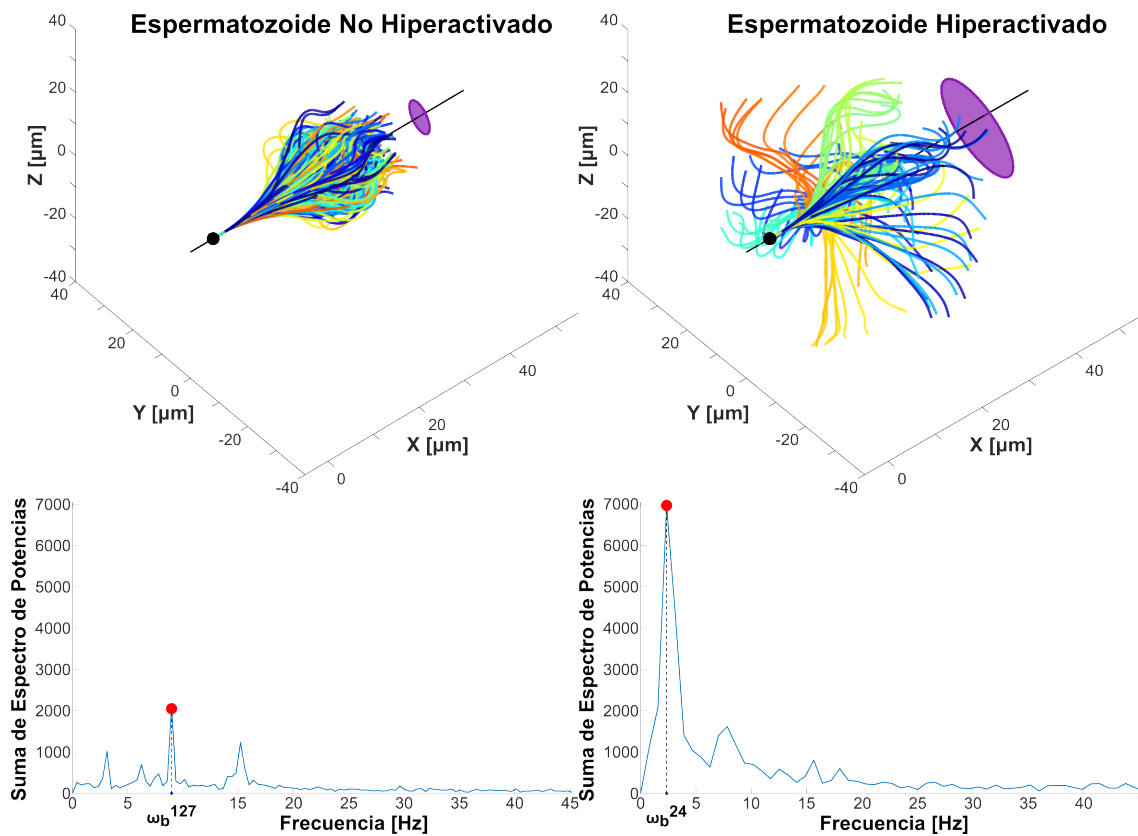


Figura 5.5: Las gráficas superiores muestran el batido flagelar de un espermatozoide clasificado como motilidad no capacitada (lado izquierdo) y un espermatozoide clasificado como motilidad hiperactivada (lado derecho). Ambos están alineados y rotados con respecto al eje X (línea negra) a lo largo de los primeros $\sim 2.5 \mu m$ de longitud de arco, correspondientes a la mitad de la cabeza del espermatozoide (marco de referencia fijo del cuello). La elipse al final del eje x muestra la elipse promedio ajustada al batido flagelar, indicando la anisotropía promedio del batido. Las gráficas inferiores muestran la suma del espectro de amplitud de todos los puntos. Los puntos rojos en estas gráficas representan el valor máximo del espectro, asociado con la frecuencia de batido de los espermatozoides, ω_b^i .

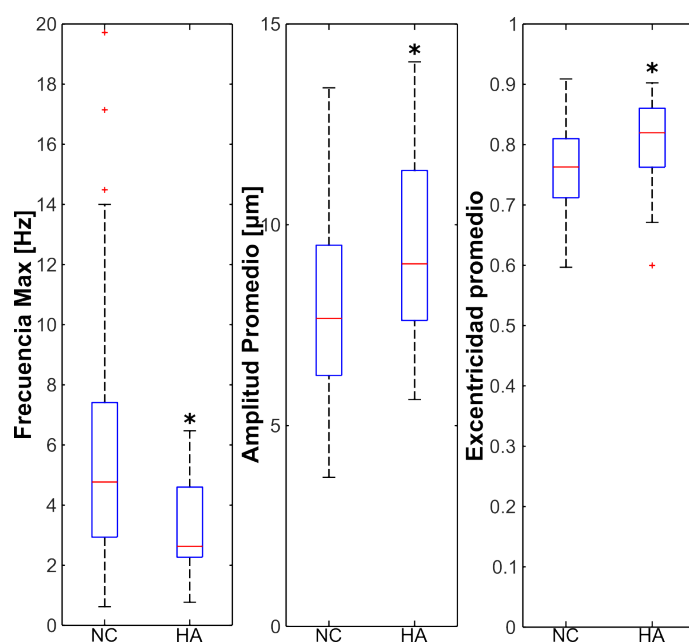


Figura 5.6: Diagramas de caja de los valores de frecuencia, amplitud y anisotropía para cada grupo de motilidad identificado (hiperaactivo y no capacitado). El valor p - para la prueba de Wilcoxon para cada característica es: 0.009, 0.01 and 0.0476 respectivamente $*P < 0.05$.

Conclusiones y Discusión

A lo largo del proyecto, se han explorado diferentes métodos para la extracción de características, tanto estructurales como estadísticas (ver Capítulo 4), con el objetivo de caracterizar el patrón de batido flagelar de los espermatozoides en 3D+t. Asimismo, se han investigado distintos enfoques para su clasificación. Aunque CASA es una herramienta valiosa, nuestro enfoque introduce una metodología más detallada para la caracterización del batido flagelar en 3D, lo que proporciona conocimiento más profundo sobre la motilidad del espermatozoide.

Inicialmente, se planteó un enfoque de clasificación supervisada (ver Sección 4.1, 4.2, 4.3) basado en la extracción de características estadísticas, ya que se disponía de un conjunto de datos que solo contaba con espermatozoides inducidos a capacitación y con etiquetas visuales. Sin embargo, se descubrió que las etiquetas visuales eran incorrectas. Por tanto, se decidió cambiar la estrategia y utilizar una base de datos donde las etiquetas se definían de forma experimental, distinguiendo entre espermatozoides no capacitados e inducidos a capacitación.

Considerando la información previamente mencionada, que los espermatozoides no capacitados no presentan motilidad hiperactivada y que solo un porcentaje de los espermatozoides inducidos a capacitación exhiben esta motilidad [53] (sin conocer cuáles son en nuestro conjunto de datos), se optó por emplear un enfoque de clasificación no supervisada. Esta decisión nos permitió explorar los patrones intrínsecos de los datos y descubrir posibles agrupamientos sin depender de etiquetas erróneas o incompletas.

Cabe destacar que uno de los retos más importantes del proyecto fue lidiar con la diversidad de información en 3D+t, ya que los experimentos diferían en términos de duración y cantidad de puntos que definían a cada flagelo.

Para la clasificación no supervisada, se exploraron diferentes enfoques para la extracción de características y la clasificación del patrón de batido flagelar de los espermatozoides en 3D+t. Se investigaron metodologías como la proyección de distribuciones (ver Sección 4.4), el análisis de trayectorias (ver Sección 4.5) y los histogramas circulares (ver Sección 4.6). Cada una de estas metodologías proporcionó resultados prometedores para la caracterización del batido flagelar. Además, es importante destacar que los resultados de agrupamiento obtenidos mediante las diferentes metodologías fueron consistentes entre sí. Esta consistencia sugiere la presencia de diferencias intrínsecas en los datos y demuestra la capacidad de los métodos de extracción de características utilizados para identificar y

capturar estos patrones. Estos hallazgos refuerzan la validez y la robustez de las metodologías empleadas en la caracterización del patrón de batido flagelar, respaldando aún más la elección del enfoque de ajuste de elipses a lo largo del tiempo con clasificación no supervisada. Sin embargo, es importante señalar que estos enfoques se basaron en el uso del marco de referencia de movimiento conjunto (comoving frame of reference), lo cual limita la consideración de la información temporal en el análisis. Además, algunas de estas metodologías requerían recortar el número de puntos en cada flagelo. Esta reducción de puntos puede implicar la pérdida de información valiosa en la caracterización del patrón de batido flagelar. En vista de estas limitaciones y considerando la importancia de capturar la información temporal completa, se tomó la decisión de utilizar el ajuste de elipses a lo largo del tiempo como enfoque principal, aplicando una clasificación no supervisada. Este enfoque permitió capturar tanto la información espacial como la temporal de manera integral, sin depender de etiquetas erróneas o incompletas.

El ajuste de elipses a lo largo del tiempo ofrece una representación más completa del patrón de batido flagelar, ya que mantiene la información temporal y permite el análisis global de la forma y los cambios en el tiempo. Además, al emplear la clasificación no supervisada, se exploraron los patrones intrínsecos de los datos y se descubrieron posibles agrupamientos sin la necesidad de etiquetas predefinidas, incluso cuando los datos presentan variaciones en su cantidad.

La envolvente de elipses proporciona una representación del patrón del batido flagelar en el tiempo y en el espacio. En el contexto del análisis de la motilidad de los espermatozoides, estudios previos han observado que los espermatozoides hiperactivados exhiben un patrón de batido asimétrico en comparación con los no capacitados [57]. En base a esta observación, la envolvente de elipses propuesta permite la generalización de esta descripción al caso 3D. Esto simplifica el movimiento 3D a una superficie que envuelve el batido flagelar. Aquí probamos la hipótesis de que la forma de esta envoltura se correlaciona con la forma de onda de los espermatozoides en estados capacitados y no capacitados. Las elipses con excentricidades cercanas a uno corresponden a formas alargadas, indicativas de una envolvente anisótropa, mientras que las elipses con excentricidades cercanas a cero representan envolventes más simétricas. Además, esta caracterización permite cuantificar el equivalente 3D de la amplitud de la envolvente de movimiento a través del descriptor del foco promedio de las elipses. Significativamente, se encontró que la característica de amplitud es más pequeña para el grupo no capacitado en comparación con el grupo hiperactivado.

Además de capturar la anisotropía y la amplitud de la envolvente, el vector basado en características propuesto proporciona una representación sin parámetros de la dinámica del batido flagelar, lo que permite una clasificación objetiva. Mediante el uso de este enfoque, clasificamos todo el conjunto de espermatozoides no capacitados, junto con los espermatozoides que no se lograron capacitar del grupo inducido a capacitación, en el grupo verde (Figura 5.3). Como esperábamos, aproximadamente el 17% de los espermatozoides inducidos a capacitados pertenecen al grupo de los hiperactivados, como se menciona en [53].

Dada la ausencia de un “*ground truth*” para la clasificación 3D, inicialmente comparamos los resultados de la clasificación no supervisada utilizando las características 2D más comunes de la motilidad de hiperactivación: frecuencia y amplitud, medidas en 3D. Sin embargo, medir la asimetría en un contexto 3D no es sencillo. La asimetría del batido flagelar se refiere a las diferencias o variaciones entre los dos lados o mitades del

flagelo. En cambio, en este estudio, utilizamos la excentricidad como una medida de anisotropía, que captura la dirección preferida de las envolventes del latido. Si bien la excentricidad cuantifica principalmente la anisotropía en lugar de la asimetría directa, aún puede proporcionar información valiosa sobre los patrones de batido. Los valores de excentricidad más altos indican una forma más alargada del tiempo, lo que sugiere un mayor grado de anisotropía. Esta medida de anisotropía sirve como medida indirecta de la asimetría del latido flagelar. A través de estas comparaciones, observamos que el grupo hiperactivado exhibió una frecuencia más baja, una amplitud media más alta y una anisotropía mayor de la trayectoria de la forma de onda en comparación con el grupo no capacitado. Estos hallazgos sugieren que estas características 2D, junto con la medida de anisotropía, pueden servir como características informativas para distinguir entre espermatozoides hiperactivados y no capacitados. La prueba de Wilcoxon confirmó que los dos grupos eran estadísticamente diferentes en términos de cada atributo (frecuencia, amplitud y anisotropía).

Los hallazgos presentados en este trabajo se alinean con los estudios publicados previamente [26], lo que corrobora aún más la confiabilidad de nuestros descriptores basados en características para caracterizar los patrones de motilidad. Para mejorar la precisión y la validación de estos resultados, el trabajo futuro implicará el uso de marcadores fluorescentes para establecer una referencia de verdad sobre el terreno para el esperma humano hiperactivado en 3D.

La contribución única de este trabajo radica en el desarrollo de una metodología de clasificación no supervisada para datos del batido flagelar de espermatozoides en 3D+t. Además, al simplificar los intrincados datos espacio-temporales en tres dimensiones, transformamos cada punto del flagelo, que esencialmente representa una serie de tiempo, en un análisis de forma que considera tanto la forma del flagelo como el movimiento acumulado de los espermatozoides en 3D a través del movimiento. Los resultados de clasificación obtenidos con nuestros descriptores basados en características puede servir como etiquetas potenciales para trabajos futuros que involucren redes neuronales profundas. Al usar los resultados de la clasificación como etiquetas, sería posible entrenar una red neuronal profunda para clasificar automáticamente los espermatozoides en función de sus patrones de latido flagelar. Esta combinación de descriptores basados en características y redes neuronales profundas promete mejorar aún más la precisión y la eficiencia de las tareas de clasificación. En conclusión, este estudio aborda una brecha crítica al describir los patrones de latidos flagelares en 3D de los espermatozoides de humano y presenta un marco de clasificación simple y confiable. Al superar las limitaciones del análisis subjetivo basado en expertos, nuestro enfoque ofrece un medio sólido para caracterizar los patrones de motilidad.

Aunque este trabajo presenta un sólo método de los que hemos explorado, continuamos seguido explorando otras formas de extracción de características como son los contextos de forma y los histogramas circulares esperando desarrollar estos métodos más adelante para realizar comparaciones con los resultados aquí presentados.

Bibliografía

- [1] Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., y Du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1):1–17.
- [2] Alquézar-Baeta, C., Gimeno-Martos, S., Miguel-Jiménez, S., Santolaria, P., Yániz, J., Palacín, I., Casao, A., Cebrián-Pérez, J. I., Muñio-Blanco, T., y Pérez-Pé, R. (2019). Opencasa: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Computational Biology*, 15(1):1–18.
- [3] Baker, B. M. y Chen, C. S. (2012). Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*, 125(13):3015–3024.
- [4] Bompart, D., García-Molina, A., Valverde, A., Caldeira, C., Yániz, J., de Murga, M. N., y Soler, C. (2018). Casa-mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6):810–819.
- [5] Cancel, A. M., Lobdell, D., Mendola, P., y Perreault, S. D. (2000). Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Human Reproduction*, 15(6):1322–1328.
- [6] Castellini, C., Dal Bosco, A., Ruggeri, S., y Collodel, G. (2011). What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertility and Sterility*, 96(1):24–27.
- [7] Centola, G. M. (2014). Semen assessment. *Urologic Clinics*, 41(1):163–167.
- [8] Chang, M. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277):697–698.
- [9] Chen, Y., Zhong, K., Zhang, J., Sun, Q., y Zhao, X. (2016). Lstm networks for mobile human activity recognition. En *2016 International conference on artificial intelligence: technologies and applications*, pp. 50–53. Atlantis Press.
- [10] Corkidi, G., Montoya, F., Hernández-Herrera, P., Ríos-Herrera, W., Müller, M., Treviño, C., y Darszon, A. (2017). Are there intracellular Ca²⁺ oscillations correlated with flagellar beating in human sperm? A three vs. two-dimensional analysis. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 23(9):583–593.
- [11] Corkidi, G., Taboada, B., Wood, C., Guerrero, A., y Darszon, A. (2008). Tracking sperm in three-dimensions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(1):125–129.

-
- [12] Daloglu, M. U., Luo, W., Shabbir, F., Lin, F., Kim, K., Lee, I., Jiang, J.-Q., Cai, W.-J., Ramesh, V., Yu, M.-Y., y Ozcan, A. (2018). Label-free 3D computational imaging of spermatozoon locomotion, head spin and flagellum beating over a large volume. *Light: Science & Applications*, 7(1):17121–17121.
- [13] Dardikman-Yoffe, G., Mirsky, S. K., Barnea, I., y Shaked, N. T. (2020). High-resolution 4-D acquisition of freely swimming human sperm cells without staining. *Science Advances*, 6(15).
- [14] Davis, R. O. y Katz, D. F. (1996). Computer-aided sperm analysis: a critical review. En *Evaluation and Treatment of the Infertile Male*, pp. 30–41. Cambridge University Press, New York.
- [15] Dcunha, R., Hussein, R. S., Ananda, H., Kumari, S., Adiga, S. K., Kannan, N., Zhao, Y., y Kalthur, G. (2022). Current insights and latest updates in sperm motility and associated applications in assisted reproduction. *Reproductive Sciences*, 29(1):7–25.
- [16] de Lamirande, E., Leclerc, P., y Gagnon, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*, 3:175–94.
- [17] De Lamirande, E., Leclerc, P., y Gagnon, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*, 3(3):175–194.
- [18] Dougherty, G. (2012). *Pattern recognition and classification: an introduction*. Springer Science & Business Media.
- [19] Fitzgibbon, A., Pilu, M., y Fisher, R. B. (1999). Direct least square fitting of ellipses. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 21(5):476–480.
- [20] Gadêlha, H., Hernandez-Herrera, P., Montoya, F., Darszon, A., y Corkidi, G. (2020). Human sperm uses asymmetric and anisotropic flagellar controls to regulate swimming symmetry and cell steering. *Science Advances*.
- [21] Gaffney, E. A., Gadêlha, H., Smith, D., Blake, J., y Kirkman-Brown, J. (2011). Mammalian sperm motility: observation and theory. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 43:501–528.
- [22] Gallagher, M. T., Cupples, G., Ooi, E. H., Kirkman-Brown, J., y Smith, D. (2019). Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Human Reproduction*, 34(7):1173–1185.
- [23] Goodson, S. G., White, S., Stevans, A. M., Bhat, S., Kao, C.-Y., Jaworski, S., Marlowe, T. R., Kohlmeier, M., McMillan, L., Zeisel, S. H., y O'Brien, D. A. (2017). CASA-nova: a multiclass support vector machine model for the classification of human sperm motility patterns. *Biology of Reproduction*, 97(5):698–708.
- [24] Goodson, S. G., Zhang, Z., Tsuruta, J. K., Wang, W., y O'Brien, D. A. (2011). Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biology of Reproduction*, 84(6):1207–1215.
- [25] Hansen, J., Rassmann, S., Jikeli, J., y Wachten, D. (2019). Spermq—a simple analysis software to comprehensively study flagellar beating and sperm steering. *Cells*, 8(1):10.

-
- [26] Hernández, H. O., Hernández-Herrera, P., Montoya, F., Olveres, J., Bloomfield-Gadêlha, H., Darszon, A., Escalante-Ramírez, B., y Corkidi, G. (2022). 3D+ t feature-based descriptor for unsupervised flagellar human sperm beat classification. En *2022 44th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)*, pp. 488–492. IEEE.
- [27] Hernandez-Herrera, P., Montoya, F., Rendón-Mancha, J. M., Darszon, A., y Corkidi, G. (2018). 3-D +t Human Sperm Flagellum Tracing in Low SNR Fluorescence Images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 37(10):2236–2247.
- [28] Itach, S. B.-S., Finklestein, M., Etkovitz, N., y Breitbart, H. (2012). Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by phospholipase D-dependent actin polymerization. *Developmental Biology*, 362(2):154–161.
- [29] Jain, A. K. y Dubes, R. C. (1988). *Algorithms for clustering data*. Prentice-Hall, Inc.
- [30] Jain, A. K., Duin, R. P. W., y Mao, J. (2000). Statistical pattern recognition: A review. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 22(1):4–37.
- [31] Javadi, S. y Mirroshandel, S. A. (2019). A novel deep learning method for automatic assessment of human sperm images. *Computers in Biology and Medicine*, 109:182–194.
- [32] Jikeli, J. F., Alvarez, L., Friedrich, B. M., Wilson, L. G., Pascal, R., Colin, R., Pichlo, M., Rennhack, A., Brenker, C., y Kaupp, U. B. (2015). Sperm navigation along helical paths in 3D chemoattractant landscapes. *Nature Communications*, 6(1):1–10.
- [33] Kaneko, T., Mōri, T., e Ishijima, S. (2007). Digital image analysis of the flagellar beat of activated and hyperactivated suncus spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 74(4):478–485.
- [34] Kay, V. y Robertson, L. (1998). Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Human Reproduction Update*, 4(6):776–786.
- [35] Koh, J. B. Y., Shen, X., y Marcos (2018). Supervised learning to predict sperm sorting by magnetophoresis. *Magnetochemistry*, 4(3):31.
- [36] Kpalma, K. y Ronsin, J. (2007). An overview of advances of pattern recognition systems in computer vision. *Vision Systems*, p. 26.
- [37] López, H. P. E. (2019). Clasificación automática del tipo de batido flagelar del espermatozoide de humano: activado vs. hiperactivado. Tesis de licenciatura.
- [38] Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., y Stevens, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Medicine*, 9(12):e1001356.
- [39] Meyer-Baese, A., Meyer-Baese, A., y Schmid, V. J. (2004). *Pattern Recognition and Signal Analysis in Medical Imaging*. Academic Press.
- [40] Mortimer, S., Swan, M., y Mortimer, D. (1996). Fractal analysis of capacitating human spermatozoa. *Human Reproduction*, 11(5):1049–1054.
- [41] Mortimer, S. T. y Swan, M. A. (1999). Effect of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. *Human Reproduction*, 14(4):997–1004.

-
- [42] Mortimer, S. T., van der Horst, G., y Mortimer, D. (2015). The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, 17(4):545.
- [43] Niederberger, C. S. (2011). Semen and the curse of cutoffs. *The Journal of Urology*, 2(185):381–382.
- [44] Nishigaki, T., González-Cota, A., y Orta, G. (2014). Catsper in male infertility. *Pathologies of Calcium Channels*, pp. 713–728.
- [45] Olah, C. (2015). Understanding LSTM networks. <http://colah.github.io/posts/2015-08-Understanding-LSTMs/>. Accedido: 15-12-2023.
- [46] Organization, W. H. (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. Nonserial Publications Series. World Health Organization.
- [47] Riordon, J., McCallum, C., y Sinton, D. (2019). Deep learning for the classification of human sperm. *Computers in Biology and Medicine*, 111:103342.
- [48] Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., y Eliceiri, K. W. (2017). Imagej2: Imagej for the next generation of scientific image data. *BMC bioinformatics*, 18:1–26.
- [49] Shih, F. Y. (2010). *Image processing and pattern recognition: fundamentals and techniques*. John Wiley & Sons.
- [50] Silva, P. Â. P. d. (2011). *Supervised and unsupervised spermatozoa detection, classification and tracking in imaging data*. Tesis doctoral.
- [51] Silva-Villalobos, F., Pimentel, J., Darszon, A., y Corkidi, G. (2014). Imaging of the 3D dynamics of flagellar beating in human sperm. En *2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, pp. 190–193. IEEE.
- [52] Suarez, S. (2010). How do sperm get to the egg? bioengineering expertise needed! *Experimental mechanics*, 50(9):1267–1274.
- [53] Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, 14(6):647–657.
- [54] Suarez, S. S. y Pacey, A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12(1):23–37.
- [55] Sukcharoen, N., Keith, J., Irvine, D. S., y Aitken, R. J. (1995). Definition of the optimal criteria for identifying hyperactivated human spermatozoa at 25 Hz using in-vitro fertilization as a functional end-point. *Human Reproduction*, 10(11):2928–2937.
- [56] Tomovic, A., Janicic, P., y Keselj, V. (2006). *n*-Gram-based classification and unsupervised hierarchical clustering of genome sequences. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 81(2):137–153.
- [57] Waberski, D., Suarez, S. S., y Henning, H. (2022). Assessment of sperm motility in livestock: Perspectives based on sperm swimming conditions in vivo. *Animal Reproduction Science*, 246:106849.
- [58] Walker, B. J., Ishimoto, K., y Wheeler, R. J. (2019). Automated identification of flagella from videomicroscopy via the medial axis transform. *Scientific Reports*, 9(1):5015.

- [59] Yang, J., Yuan, J., y Li, Y. (2016). Parsing 3D motion trajectory for gesture recognition. *Journal of Visual Communication and Image Representation*, 38:627–640.
- [60] Zaferani, M., Suarez, S. S., y Abbaspourrad, A. (2021). Mammalian sperm hyperactivation regulates navigation via physical boundaries and promotes pseudo-chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(44):e2107500118.

Tabla de identificación de espermatozoides

No.	ID	Nombre del experimento	Grupo
1	Cap 001	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp10_unique	2
2	Cap 002	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp12_unique	2
3	Cap 003	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp15_unique	2
4	Cap 004	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp16_unique	1
5	Cap 005	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp18_unique	1
6	Cap 006	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp21_unique	1
7	Cap 007	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp23_unique	2
8	Cap 008	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp24_unique	2
9	Cap 009	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp27_unique	2
10	Cap 010	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp30_unique	2
11	Cap 011	170601 NAC Sperm Capac 6hr 30 Mayo 2017_Exp9_unique	1
12	Cap 012	170601 NAC Sperm Capac T0 31 Mayo 2017_EXP10_unique	1
13	Cap 013	170601 NAC Sperm Capac T0 31 Mayo 2017_EXP3_unique	1
14	Cap 014	170602 NAC Sperm Capac 6hr 2 Junio 2017_Exp10_unique	2
15	Cap 015	170602 NAC Sperm Capac 6hr 2 Junio 2017_Exp12_unique	2
16	Cap 016	170602 NAC Sperm Capac 6hr 2 Junio 2017_Exp14_unique	2
17	Cap 017	170602 NAC Sperm Capac 6hr 2 Junio 2017_Exp17_unique	2
18	Cap 018	170602 NAC Sperm Capac 6hr 2 Junio 2017_Exp4cell1	2
19	Cap 019	170602 NAC Sperm Capac 6hr 2 Junio 2017_Exp4cell2	2
20	Cap 020	170602 NAC Sperm Capac 6hr 2 Junio 2017_Exp4cell3	2
21	Cap 021	170602 NAC Sperm Capac 6hr 2 Junio 2017_Exp6_unique	2

No.	ID	Nombre del experimento	Grupo
22	Cap 022	170602 NAC Sperm Capac 6hr 2 Junio 2017_Exp9.unique	2
23	Cap 023	170607 NAC Sperm Capac 6hr 7 junio 2017_Exp2.unique	2
24	Cap 024	170607 NAC Sperm Capac T0 7Junio 2017_Exp3.unique	1
25	Cap 025	170607 NAC Sperm Capac T0 7Junio 2017_Exp6.unique	2
26	Cap 026	170607 NAC Sperm Capac T0 7Junio 2017_Exp7.unique	2
27	Cap 027	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp11.unique	2
28	Cap 028	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp12.unique	2
29	Cap 029	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp13.unique	2
30	Cap 030	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp15cell1	2
31	Cap 031	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp15cell2	2
32	Cap 032	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp18cell1	2
33	Cap 033	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp18cell2	2
34	Cap 034	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp2cell1	2
35	Cap 035	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp2cell2	2
36	Cap 036	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp3.unique	2
37	Cap 037	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp9cell1	2
38	Cap 038	170815 NAC Sperm Capac 6hr 6 Junio 2017_Exp9cell2	2
39	Cap 039	171108 NAC Capac Campo Claro 08 Nov 17_Exp10.unique	1
40	Cap 040	171108 NAC Capac Campo Claro 08 Nov 17_Exp11.unique	2
41	Cap 041	171108 NAC Capac Campo Claro 08 Nov 17_Exp15.unique	2
42	Cap 042	171108 NAC Capac Campo Claro 08 Nov 17_Exp17cell1	2
43	Cap 043	171108 NAC Capac Campo Claro 08 Nov 17_Exp17cell2	2
44	Cap 044	171108 NAC Capac Campo Claro 08 Nov 17_Exp18.unique	2
45	Cap 045	171108 NAC Capac Campo Claro 08 Nov 17_Exp9.unique	2
46	Cap 046	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp13.unique	2
47	Cap 047	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp14.unique	2
48	Cap 048	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp16.unique	2
49	Cap 049	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp17cell1	1
50	Cap 050	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp17cell2	2
51	Cap 051	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp22.unique	2
52	Cap 052	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp23.unique	2
53	Cap 053	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp24cell1	2
54	Cap 054	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp24cell2	2

No.	ID	Nombre del experimento	Grupo
55	Cap 055	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp26_unique	1
56	Cap 056	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp27_unique	2
57	Cap 057	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp28_unique	2
58	Cap 058	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp6cell1	2
59	Cap 059	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp6cell2	2
60	Cap 060	20181026 Capacitados 26 oct 2018_Exp9_unique	2
61	Cap 061	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp11_unique	2
62	Cap 062	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp15_unique	2
63	Cap 063	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp20_unique	2
64	Cap 064	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp22_unique	2
65	Cap 065	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp24cell1	1
66	Cap 066	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp24cell2	2
67	Cap 067	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp25_unique	1
68	Cap 068	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp26_unique	2
69	Cap 069	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp27_unique	2
70	Cap 070	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp4_unique	2
71	Cap 071	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp7_unique	2
72	Cap 072	20181030 Capacitados 30 oct 2018_Exp9_unique	2
73	Cap 073	20181031 Capacitados 31 oct 2018_Exp12_unique	2
74	Cap 074	20181031 Capacitados 31 oct 2018_Exp20_unique	1
75	Cap 075	20181031 Capacitados 31 oct 2018_Exp21_unique	2
76	Cap 076	20181031 Capacitados 31 oct 2018_Exp7_unique	2
77	Cap 077	20190326 Capacitados_Exp12_unique	1
78	Cap 078	20190326 Capacitados_Exp3_unique	2
79	Cap 079	20190326 Capacitados_Exp7cell1	2
80	Cap 080	20190326 Capacitados_Exp8cell2	2
81	Cap 081	20190326 Capacitados_Exp9_unique	2
82	NoCap 001	2017_05_17_SPERM_FREE_18_unique	2
83	NoCap 002	2017_05_17_SPERM_FREE_21_unique	2
84	NoCap 003	2017_05_17_SPERM_FREE_25_unique	2
85	NoCap 004	2017_05_17_SPERM_FREE_28_unique	2
86	NoCap 005	2017_05_18_SPERM_FREE_16_unique	2
87	NoCap 006	2017_05_18_SPERM_FREE_18trace_micras_cell1	2

No.	ID	Nombre del experimento	Grupo
88	NoCap 007	2017_05_18_SPERM_FREE_18trace_micras_cell2	2
89	NoCap 008	2017_05_18_SPERM_FREE_5_unique	2
90	NoCap 009	2017_05_18_SPERM_FREE_6_unique	2
91	NoCap 010	2017_05_18_SPERM_FREE_7_unique	2
92	NoCap 011	2017_05_18_SPERM_FREE_9_unique	2
93	NoCap 012	2017_05_19_SPERM_FREE_19trace_micras_cell1	2
94	NoCap 013	2017_05_19_SPERM_FREE_19trace_micras_cell2	2
95	NoCap 014	2017_05_19_SPERM_FREE_25_unique	2
96	NoCap 015	2017_05_19_SPERM_FREE_26trace_micras_cell1	2
97	NoCap 016	2017_05_19_SPERM_FREE_26trace_micras_cell2	2
98	NoCap 017	2017_05_19_SPERM_FREE_4_unique	2
99	NoCap 018	2017_05_19_SPERM_FREE_8_unique	2
100	NoCap 019	2017_05_19_SPERM_FREE_9_unique	2
101	Cap 082	20190326 Capacitados_Exp10_unique	2
102	Cap 083	20190326 Capacitados_Exp2cell1	2
103	Cap 084	20190326 Capacitados_Exp2cell2	2
104	Cap 085	20190326 Capacitados_Exp5_unique	2
105	Cap 086	20190326 Capacitados_Exp7cell2	1
106	Cap 087	20190326 Capacitados_Exp8cell1	2
107	NoCap 020	20210702_Exp 4_stacks_cell1	2
108	NoCap 021	20210702_Exp 4_stacks_cell2	2
109	NoCap 022	20210702_Exp 6_stacks	2
110	NoCap 023	20210702_Exp 7_stacks_cell1	2
111	NoCap 024	20210702_Exp 7_stacks_cell2	2
112	NoCap 025	20210702_Exp 8_stacks	2
113	NoCap 026	20210702_Exp 11_stacks_cell1	2
114	NoCap 027	20210702_Exp 11_stacks_cell2	2
115	NoCap 028	20210702_Exp 15_stacks_cell1	2
116	NoCap 029	20210702_Exp 15_stacks_cell2	2
117	NoCap 030	20210702_Exp 17_stacks	2
118	NoCap 031	20210702_Exp 20_stacks	2
119	NoCap 032	20210702_Exp 21_stacks_cell1	2
120	NoCap 033	20210702_Exp 21_stacks_cell2	2

No.	ID	Nombre del experimento	Grupo
121	NoCap 034	20210702_Exp 25_stacks	2
122	NoCap 035	20210702_Exp 27_stacks	2
123	NoCap 036	20210702_Exp 28_stacks	2
124	NoCap 037	20210702_Exp 29_stacks	2
125	NoCap 038	20210702_Exp 32_stacks	2
126	NoCap 039	20210702_Exp10_stacks_cell1	2
127	NoCap 040	20210702_Exp10_stacks_cell2	2
128	NoCap 041	20210704_Exp 2_stacks	2
129	NoCap 042	20210704_Exp 4_stacks	2
130	NoCap 043	20210704_Exp 6_stacks	2
131	NoCap 044	20210704_Exp 7_stacks	2
132	NoCap 045	20210704_Exp 9_stacks	2
133	NoCap 046	20210704_Exp 10_stacks	2
134	NoCap 047	20210704_Exp 11_stacks	2
135	NoCap 048	20210704_Exp 16_stacks	2
136	NoCap 049	20210704_Exp 17_stacks	2
137	NoCap 050	20210704_Exp 18_stacks	2
138	NoCap 051	20210704_Exp 20_stacks	2
139	NoCap 052	20210704_Exp 21_stacks	2
140	NoCap 053	20210704_Exp 22_stacks	2
141	NoCap 054	20210705_Exp 28 Bolita_stacks	2
142	NoCap 055	20210706_Exp 29_stacks	2
143	NoCap 056	20210730_Exp5_stacks	2
144	NoCap 057	20210730_Exp8_stacks	2
145	NoCap 058	20210730_Exp10_stacks	2
146	NoCap 059	20210730_Exp20_stacks	2
147	NoCap 060	20210730_Exp25_stacks	2

Tabla A.1: Lista de nombres de los experimentos para cada espermatozoide y sus identificadores.

Figuras de las Metodologías para la Caracterización del Batido del Flagelo

En este apéndice se presentan las figuras correspondientes a dos muestras de espermatozoides, las cuales resultaron de la aplicación de diferentes metodologías para la extracción de características, como se menciona en el Capítulo 4. En cada sección se describe brevemente la figura y su método de obtención, además de proporcionar un enlace donde se encuentran disponibles todas las figuras para todos los experimentos.

B.1. Figuras de las funciones de densidad

En esta sección se presentan las figuras del ajuste de las funciones de densidad de probabilidad para dos espermatozoides (el espermatozoide 88, no capacitado, y el espermatozoide 5, inducido a capacitación) presentados en las metodologías de extracción de características. Por motivos de visualización, las figuras de todo el conjunto de experimentos están disponibles en el siguiente repositorio de GitHub: [Figuras de funciones de densidad](#).

En el lado izquierdo de las figuras se muestra la función de densidad de probabilidad (fdp) ajustada a los puntos de las trayectorias proyectados en el plano $Y - Z$. En color rojo se muestra la fdp ajustada a los datos en el eje Y , y en color azul para el eje Z . Además, se muestra la superficie resultante (en el plano $Y - Z$) que representa la multiplicación de las fdp, asumiendo que la fdp en el eje Y y la fdp en el eje Z son independientes.

En el panel derecho de las figuras se muestran las proyecciones de los puntos de las trayectorias. Los asteriscos marcan las regiones de mayor densidad, los puntos negros representan los picos de la forma de los puntos proyectados. Además, la línea roja muestra la elipse que fue ajustada a los puntos proyectados, y el punto cian indica el centro de la elipse.

B.2. Figuras de histograma circular

En esta sección se presentan las figuras del histograma circular de la distribución de los puntos respecto a la recta obtenida por regresión ortogonal y el vector unitario sobre el eje Y para los espermatozoides 88 (no capacitado) y 5 (inducido a capacitación). Por motivos

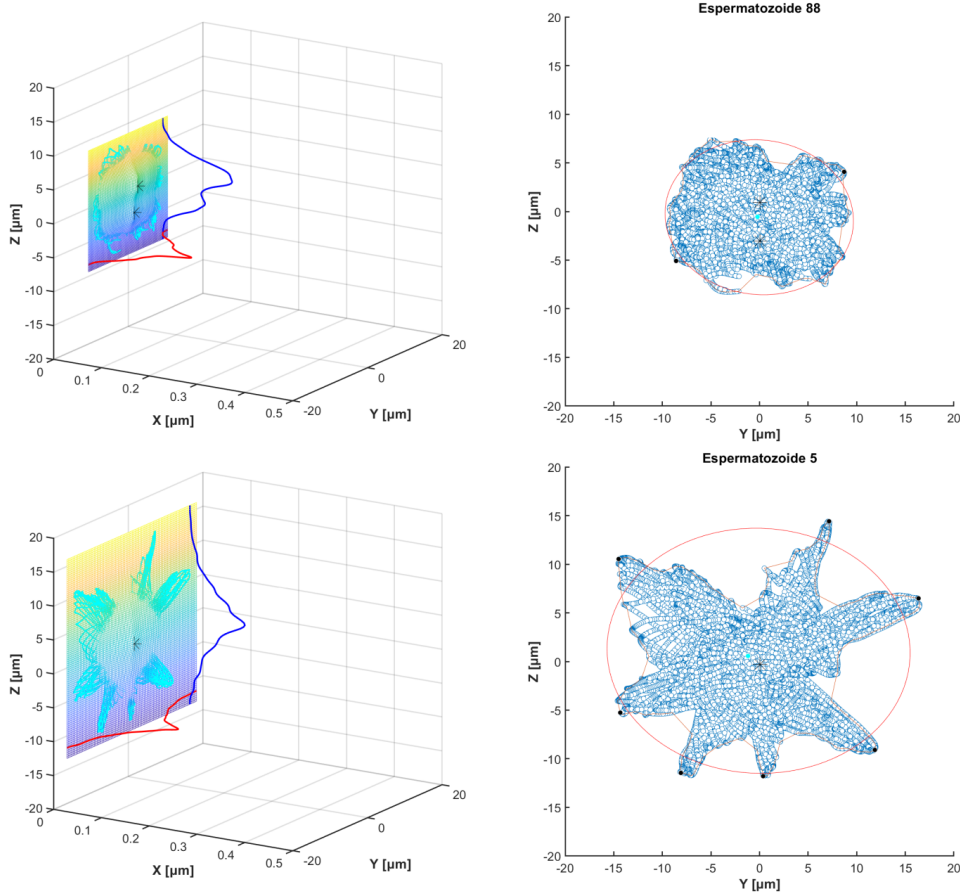


Figura B.1: Ajuste de funciones de densidad de probabilidad para el batido flagelar del espermatozoide humano. En la parte superior se muestra el ajuste para el espermatozoide no capacitado (experimento 88), mientras que en la parte inferior se presenta el ajuste de funciones de densidad del espermatozoide inducido a capacitación (experimento 5).

de visualización, las figuras de los otros experimentos pueden ser accedidas en el siguiente repositorio de GitHub: [Figuras de histogramas circulares](#).

Se lleva a cabo un cálculo de la recta mediante regresión ortogonal a partir de todas las trayectorias de un espermatozoide. Utilizando el vector unitario en el eje Y , se determina la distancia de cada punto de las trayectorias a la recta, así como el ángulo que forma con el vector unitario. En la imagen, se muestra una circunferencia con un radio igual al promedio de las distancias de todos los puntos a la recta. Los círculos presentes en la circunferencia tienen un tamaño y una opacidad que corresponden a la proporción de puntos que poseen un ángulo similar con el vector unitario. Es decir, a medida que un círculo sea más grande y tenga una mayor opacidad, indica que hay una mayor cantidad de puntos con un ángulo similar al vector unitario.

B.3. Figuras de primitivas

En esta sección se presentan las figuras de la segmentación de las trayectorias en primitivas para dos espermatozoides: el espermatozoide 88, no capacitado, y el espermatozoide 5, inducido a capacitación, tal como se detalla en las metodologías de extracción de carac-

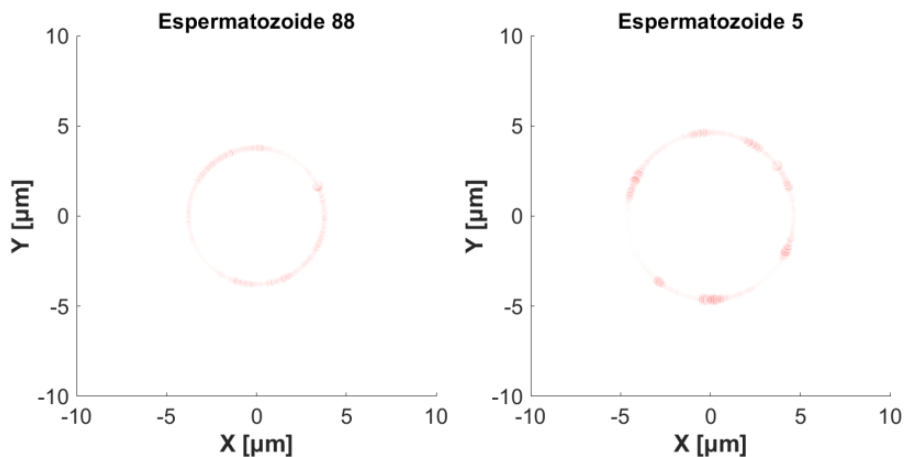


Figura B.2: Histogramas circulares de la distribución de puntos del batido flagelar. En la parte izquierda se muestra el histograma circular del espermatozoide no capacitado (experimento 88). En la parte derecha se muestra el histograma del espermatozoide inducido a capacitación (experimento 5).

terísticas. Las figuras de todos los experimentos están disponibles en el siguiente repositorio de GitHub: [Figuras de primitivas](#).

En cada experimento, en el panel izquierdo superior se muestra el mapa de la curvatura normalizada, en el panel izquierdo central se presenta el mapa de la torsión, y en la parte inferior se muestra la representación de las primitivas en colores, donde el magenta representa las líneas rectas, el verde las curvas planas, el azul las hélices derechas y el rojo las hélices izquierdas. Los ejes X en estos mapas representan el tiempo (cada columna corresponde a un flagelo), mientras que el eje Y corresponde al conjunto de puntos que describen un flagelo. En el panel derecho se muestran las trayectorias representadas en sus respectivos colores de primitivas.

B.4. Figuras de envolventes de elipses

Esta sección presenta las figuras de la envolvente de elipses para los espermatozoides 88 (no capacitado) y 5 (inducido a capacitación). Por motivos de visualización, las figuras de los otros experimentos pueden ser accedidas en el siguiente repositorio de GitHub: [Figuras de envolventes de elipses](#).

Las figuras muestran la envolvente de elipse generada para cada uno de los espermatozoides muestra. Esta envolvente se genera con toda la información del batido del espermatozoide.

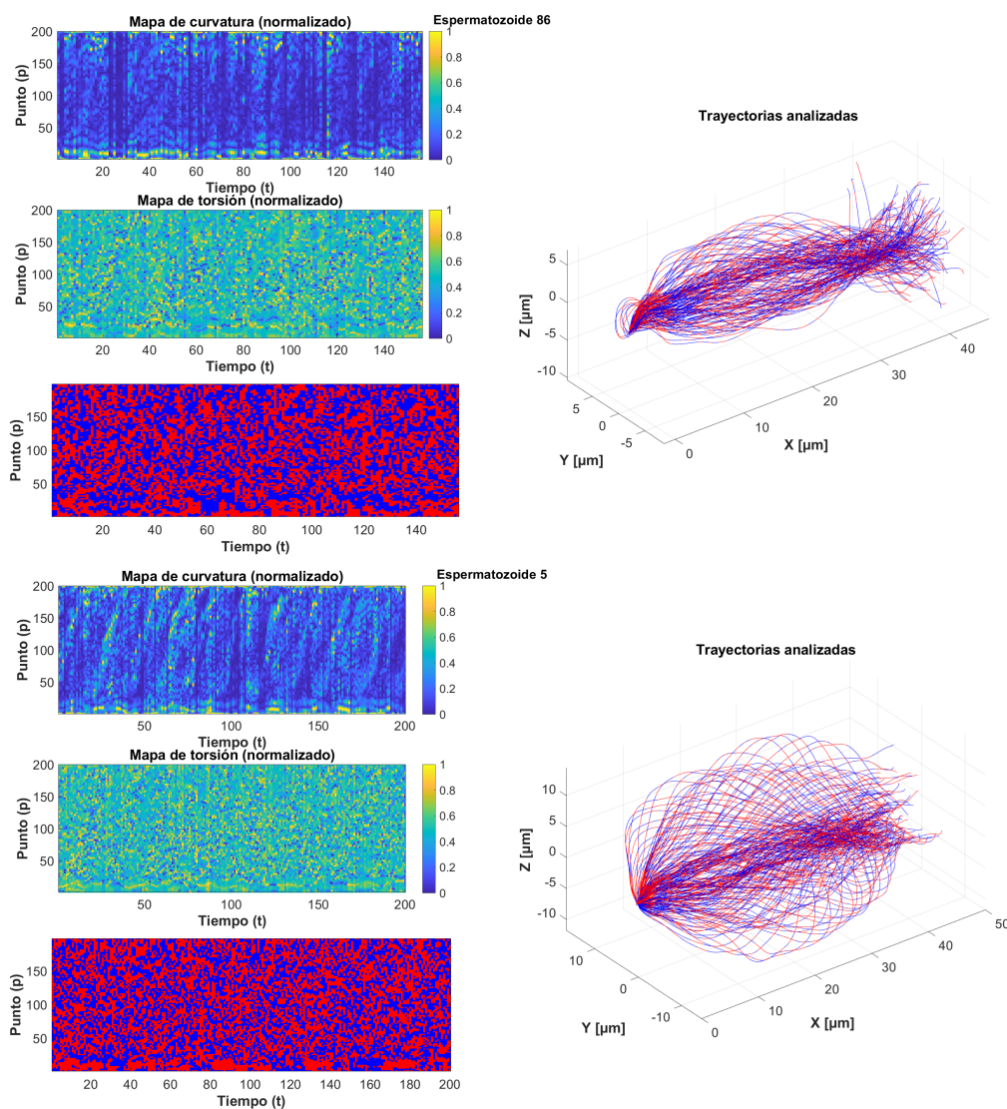


Figura B.3: Segmentación de las trayectorias en primitivas para los espermatozoides 88 (no capacitado) y 5 (inducido a capacitación), mostrando mapas de curvatura normalizada y torsión, así como la representación de primitivas en colores. Los colores magenta, verde, azul y rojo representan líneas rectas, curvas planas, hélices derechas y hélices izquierdas, respectivamente. El eje X representa el tiempo, mientras que el eje Y corresponde al conjunto de puntos que describen un flagelo.

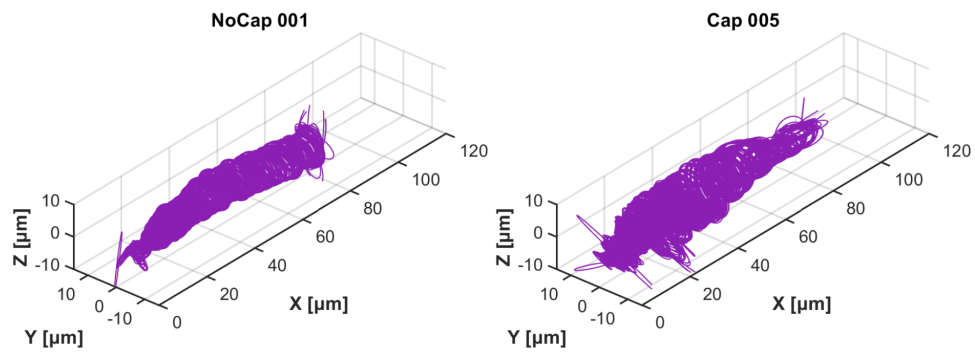


Figura B.4: Envoltura de elipses para los espermatozoides 88 (no capacitado) y 5 (inducido a capacitación). Las figuras muestran la envoltura de elipse generada para cada uno de los espermatozoides mostrados, utilizando toda la información del batido del espermatozoide.

Publicaciones

En este capítulo, se presentan las publicaciones derivadas del presente trabajo. La primera publicación fue presentada en el 44° Congreso Internacional de Ingeniería en Medicina y Biología en Glasgow, del 11 al 15 de julio de 2022. La segunda publicación fue el artículo que se sometió a la revista Heliyon de acceso libre.

3D+t feature-based descriptor for unsupervised flagellar human sperm beat classification

Haydee O. Hernández^{1,2,4}, Paul Hernández-Herrera^{2,3}, Fernando Montoya², Jimena Olveres⁴, Hermes Bloomfield-Gadêlha⁵, Alberto Darszon⁶, Boris Escalante-Ramírez⁴ and Gabriel Corkidi²

Abstract— Human spermatozoa must swim through the female reproductive tract, where they undergo a series of biochemical reactions called capacitation, a necessary step to fertilize the egg. Capacitation promotes changes in the motility pattern. Historically, a two-dimensional analysis has been used to classify sperm motility and clinical fertilization studies. Nevertheless, in a natural environment sperm motility is three-dimensional (3D). Imaging flagella of freely swimming sperm is a difficult task due to their high beating frequency of up to 25 Hz. Very recent studies have described several sperm flagellum 3D beating features (curvature, torsion, asymmetries, etc.). However, up to date, the 3D motility pattern of hyperactivated spermatozoa has not been characterized. The main difficulty in classifying these patterns in 3D is the lack of a ground truth reference since differences in flagellar beat patterns are very difficult to assess visually. Moreover, only around 10-20% of induced to capacitate spermatozoa are truly capacitated, i.e., hyperactivated. We used an image acquisition system that can acquire, segment, and track spermatozoa flagella in 3D+t. In this work, we propose an original three-dimensional feature vector formed by ellipses describing the envelope of the 3D+t spatio-temporal flagellar sperm motility patterns. These features allowed compressing an unlabeled 3D+t dataset to separate hyperactivated cells from others (capacitated from non-capacitated cells) using unsupervised hierarchical clustering. Preliminary results show three main clusters of flagellar motility patterns. The first principal component of these 3D flagella measurements correlated with 2D OpenCASA head determinations as a first approach to validate the unsupervised classification, showing a reasonable correlation coefficient near to 0.7.

Clinical relevance— The novelty of this work is defining a 3D+t feature-based descriptor consisting of a set of ellipses enveloping the flagellar motion of human sperm for its unsupervised classification. This is a new promising tool to determine the viability of human sperm to fertilize the egg.

I. INTRODUCTION

Fertilization requires spermatozoa to swim through the female tract to reach the egg. During their journey, sperm undergoes a capacitation process involving important biochemical changes necessary to fertilize the egg. Clinical analysis

¹Posgrado en Ciencia e Ingeniería de la Computación, UNAM, Mexico City, Mexico

²Laboratorio de Imágenes y Visión por Computadora, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mexico

³Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mexico

⁴Departamento de Procesamiento de Señales, Facultad de Ingeniería, UNAM, Mexico City, Mexico

⁵Department of Engineering Mathematics and Bristol Robotics Laboratory, University of Bristol, Bristol, UK

⁶Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Mexico City, Mexico

performed in two-dimensional images has shown that sperm induced to capacitate present different types of motility, notably the hyperactivated one. Hyperactivated motility in 2D is characterized by a high flagellar asymmetrical amplitude bend [1]. From millions of ejaculated spermatozoa, only an average of 10-20% are capacitated (able to fertilize), presenting an hyperactivated motility [2]. Semen analysis is the first test indicated to determine the infertility of a couple, including the analysis of sperm morphology, concentration, motility, and semen viscosity. For three decades, the analysis of sperm motility has been performed by tracking the sperm heads in 2D images. Historically, this study was carried out by experts (physiologists or embryologists) based on their own judgment, making results inaccurate, subjective, and irreproducible [3, 4]. Computer Assisted Semen Analysis (CASA) has become the reference analysis system since it uses quantitative parameters to classify sperm motility [4]. Recently, a great effort has been made to automate and remove subjectivity in this type of analysis by applying machine learning and deep learning techniques to classify sperm motility and morphology [5-8]. However, most determinations have been based only on the sperm head trajectory and CASA parameters from 2D images, excluding flagellar movement. 3D imaging sperm flagella kinematics faces important computational problems such as acquisition, detection, segmentation, tracking and classification [9]. In the last years, important contributions have arisen to solve part of these problems and to obtain information on single sperm in 3D, particularly the description of its flagella kinematics [9-13]. Nevertheless, the classification of 3D flagellar beating patterns of capacitated sperm remains as an open research field.

Multiple methods to classify 3D dynamic patterns have been reported [14, 15] however, the comparison between shapes varying over time is a complicated task, especially in motion recognition or video classification [16]. In this work, we propose an original dynamic motility descriptor consisting of a set of ellipses enveloping the flagella from which a set of features are derived. This descriptor feature-based vector allows to compact the flagellar beat information from the acquired 3D+t data of variable size (number of points per flagellum and acquisition time per sperm). Our experimental dataset consisted of 100 free swimming sperm acquired in 3D with a system as described in [9], beating during 1 to 3 seconds. The set was composed of non-capacitated sperm (control) and sperm pharmacologically induced to capacitate, where a fraction may be hyperactivated. It is important to

emphasize that our dataset is unlabeled, it is not possible to identify visually the different beating patterns. Thanks to the proposed dynamic flagella descriptor, we were able to use hierarchical clustering, a simple unsupervised classification technique, to group non-capacitated sperm, from those truly capacitated (hyperactivated), describing the shape and similarities between the samples to cluster into different types of beating.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Biological preparations

Sperm were obtained from healthy donors after a minimum abstinence of 48 hours. From the collected human spermatozoa samples, highly motile cells were selected by a 1 hour swim-up protocol. Half of these highly motile cells were centrifugated during 5 minutes and resuspended at a concentration of 10^7 cells/ml in a non-capacitating solution. Capacitation was induced in the other half of the highly motile cells resuspending them in a capacitation solution and incubating for six hours.

B. Experimental set-up

An inverted Olympus IX71 microscope mounted on an optical table with a 60x water immersion objective with a $N.A. = 1.00$ oscillates on a piezoelectric device P-725 controlled by a servo-controller E-501 via a high current amplifier E-505 (hardware from Physik Instruments, MA, USA). The servo-controller is triggered with a ramp signal from the E-506 function generator, the TTL pulse from the servo-controller triggers the high speed camera NAC Q1v with 8 Gigabyte RAM (recording up to 8000 images per second of 640 x 480 pixels during 3.5 seconds). Temperature of biological samples was preserved at $37^\circ C$ with a thermal controller.

C. Dataset

Data were collected with the system described by Corkidi et al. [9] and the segmentation process to reconstruct the flagellum centerline as described by Hernández-Herrera et al. [11].

The dataset consisted of 100 human spermatozoa, from which 81 sperm underwent an *in-vitro* capacitation process (induced to capacitate) and 19 were non-capacitated. A fraction of 10-20% of sperm induced to capacitate is expected to be hyperactivated [2]. Given a sperm i from the dataset, the flagellum's centerline was tracked during T -times and described by N_T -points in 3D coordinates where $\{x_{tn}^i, y_{tn}^i, z_{tn}^i\}$ correspond to the n -th position of the flagellum's centerline at time point t for sperm i , $t \in 1, 2, \dots, T$ and $n \in 1, 2, \dots, N$. Due to the segmentation process, the number of detected flagella and points per single beat are different over time. Flagella were rotated and translated to align with the x -axis starting from the origin.

D. Ellipse fitting

Fig. 1 shows a reconstructed flagella aligned with x -axis. We define a flagelloid F_l^i for sperm i to be the orthogonally projected points in the interval $[l, l+1)$ (Fig. 2);

$$F_l^i = (y_{tn}^i, z_{tn}^i) | x_{tn}^i \in I_{l,l+1} \quad (1)$$

where $I_{l,l+1}$ are the cutting planes of the interval $[l, l+1)$, $l \in \{0\mu m, 0.2\mu m, \dots, 120\mu m\}$. Fig. 2 shows the fitting of an ellipse to the points belonging to the flagelloid (1), using the method of "Direct fit of least squares of ellipses" as described in [17]. Doing this for each flagelloid l , a set of transverse ellipses on the x -axis are obtained describing the motility shape of the sperm (Fig. 3). Ellipses are only fitted where the flagelloid has at least 3 points, to prevent that $\epsilon \rightarrow 1$. From each ellipse we obtain four parameters:

- Semi-major axis (a)
- Semi-minor axis (b)
- Rotation angle of the ellipse (ϕ)
- Eccentricity (ϵ).

To describe the envelope of ellipse variations, we applied simple linear regression to the cumulative sum for a , b , and ϕ ; in addition of the mean of a , b , and ϵ . Thus, having the feature-based vector with six components:

$$\mathbf{v} = [\text{slope}(\text{cumsum}(a)), \text{slope}(\text{cumsum}(b)), \text{slope}(\text{cumsum}(\phi)), \text{mean}(a), \text{mean}(b), \text{mean}(\epsilon)].$$

We performed dimensionality reduction, applying Principal Component Analysis, to three principal components (more than 90% of the variance in the dataset). The dominant features for each principal component are: $\text{mean}(b)$, $\text{slope}(\text{cumsum}(\phi))$ and $\text{mean}(\epsilon)$, respectively.

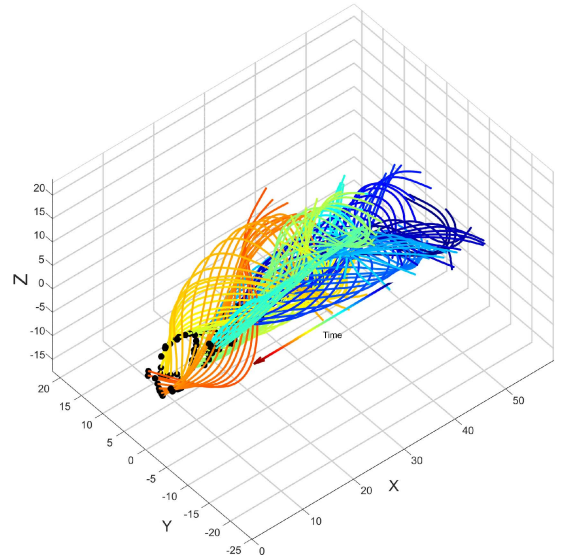


Fig. 1. Representation of the segmented and tracked spermatozoon. Data are aligned with x -axis, each line corresponds to a flagellum reconstruction at time t and the black dots represent the sperm head position at each time. The progression of swimming is from $+x \rightarrow 0$.

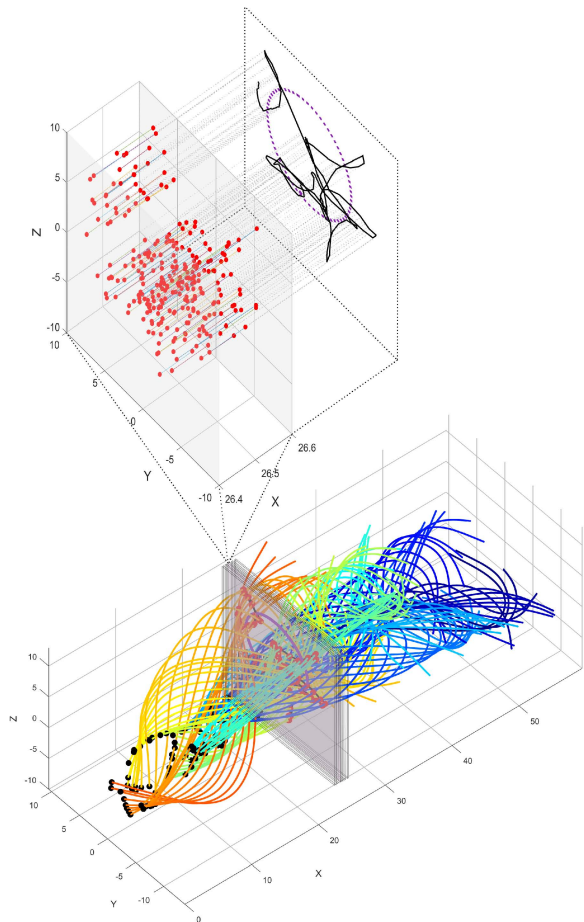


Fig. 2. Scheme to fit an ellipse to the flagelloid. The bottom subplot shows the representation of the segmented and tracked spermatozoon from Fig. 1; 10 from 298 gray planes (only for observation purposes) corresponding to 5 intervals ($0.2\mu\text{m}$ each) are shown. The upper subplot shows a zoom of a single $0.2\mu\text{m}$ selected interval, the red dots corresponding to the flagellum points within that interval. The right upper side shows the orthogonal projection of the red dots forming a flagelloid (black line) with its corresponding fitted ellipse (purple-dotted line).

E. Clustering

Our dataset contains non-capacitated sperm (control) and induced to capacitate sperm. From these last, we know that a small fraction should be hyperactivated (10 to 20%). Due to the fact that hyperactivated sperm are not labeled, we applied agglomerative hierarchical clustering. We calculate the Euclidean distance between each pair of sperm for the three principal components to find the dissimilarity. The proximity between objects was carried out with an average linkage, using ‘distance’ as the criterion for defining 3-clusters. We have defined three clusters, control cells (non-capacitated), hyperactivated cells (truly capacitated) and as mentioned by Mortimer et al. [4] and de Lamirande et al. [18], spermatozoa present a transitional state conforming the third cluster.

III. PRELIMINARY RESULTS

Fig. 4 shows preliminary results of hierarchical clustering. Cluster 1 (green lines) contains the non-capacitated cells and

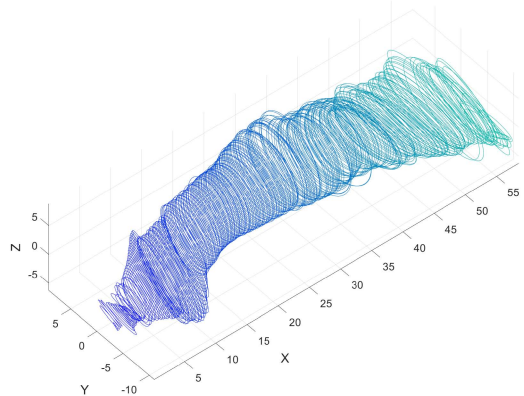


Fig. 3. Ellipse envelope for a spermatozoon. Each ellipse corresponds to an interval along the flagellum.

a subset of the induced to capacitate (not hyperactivated) sperm. Cluster 2 (red lines) is constituted by sperm whose fitted ellipses had a semi-major axis with a value larger than ($a > 5\mu\text{m}$) compared with cluster 1, in addition $\epsilon \rightarrow 1$ (see Discussion for the interpretation). Cluster 3 (blue lines) contains those spermatozoa that, like cluster 2, present the semi-major axis with a value larger than cluster 1, however the eccentricity tends to 0.7.

Hierarchical clustering formed three main groups: non-capacitated, transitional and hyperactivated sperm (Fig. 5). The non-capacitated motility group corresponds to cluster 1, with the complete set of non-capacitated sperm and a subset of induced to capacitate sperm. Sperm with a transitional motility correspond to cluster 3 and to hyperactivated motility to cluster 2.

We used OpenCASA as a preliminary approach to validate our results, with the sperm head trajectory (ALH Amplitude of Lateral Head Displacement). OpenCASA is an open-source software that computes CASA measurements in 2D images [19]. We projected the 3D sperm head coordinates in $x - y$ plane to obtain the head trajectory. The correlation between the ALH value and the first component of principal component analysis showed a reasonable correlation coefficient near 0.7.

IV. CONCLUSIONS AND DISCUSSION

The novelty of the feature-based vector that we propose in this work encompasses the flagella beating pattern of sperm. Thanks to the performance of these features to describe the flagella dynamics, it was possible to use a simple unsupervised classification technique to group non-capacitated sperm, from those truly capacitated (hyperactivated). An ellipse eccentricity close to 1, means that the ellipse is elongated (corresponding to an asymmetric beating pattern trend), while when eccentricity tends to 0 it is more circular (symmetric beating pattern trend). It is known that the beating pattern of non-capacitated spermatozoa is more symmetric than that for hyperactivated ones [1]. Given the previous considerations, the first cluster (green lines) corresponds to the motility pattern of non-capacitated sperm

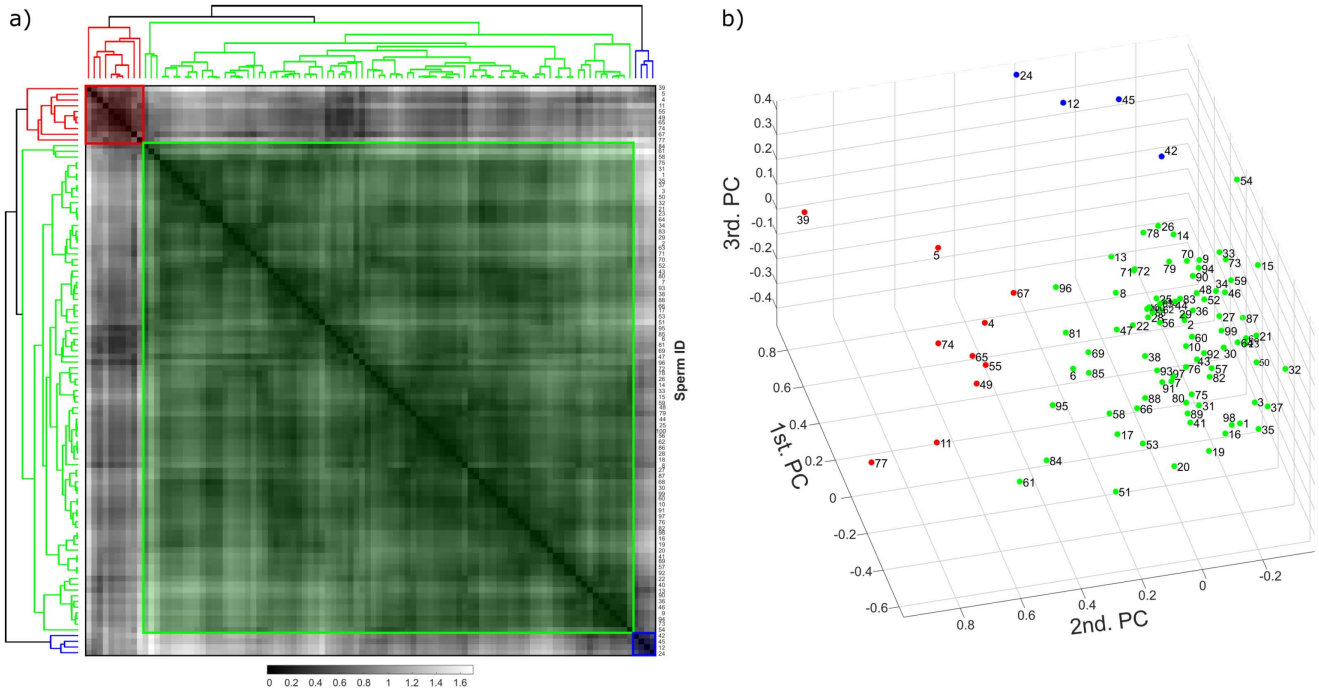


Fig. 4. a) Dissimilarity matrix from the Euclidean distance of the three principal components between each pair of sperms. Sperm IDs correspond to the number of the experiment, where 1-81 correspond to sperm induced to capacitate and 82-100 are the non-capacitated ones. The dendrogram shows the hierarchical clustering with average linkage; green lines correspond to cluster 1 (4, 5, 11, 39, 49, 55, 65, 67, 74 and 77), red lines to cluster 2 (12, 24, 42 and 45) and blue lines to cluster 3. b) Clustering of flagellar motility for the dataset. The labels of the dots correspond to the number of the experiment. Green dots correspond to cluster 1, red dots to cluster 2 and blue dots to cluster 3.

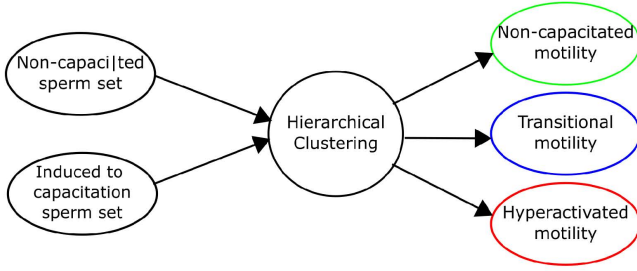


Fig. 5. Clustering diagram resulting from the proposed method. The input data are non-capacitated and induced to capacitate spermatozoa. When clustering is applied, three main groups of motility patterns are obtained: non-capacitated, transitional and hyperactivated.

(control sperm + those induced that failed to capacitate) given that the semi-major axis of the fitted ellipses are smaller compared to the other clusters, in addition, the mean eccentricity is smaller, tending to 0.5. We consider the third cluster (blue lines) as being a transitional beating pattern from non-capacitated to capacitated (hyperactivated) spermatozoa; since the amplitude of the semi-major axis increases relative to cluster 1 and the average eccentricity also increases, tending to 0.7, i.e., the flagellar beat has an increasing amplitude and sperm begin to display an asymmetrical beat. We infer that the second cluster (red lines) corresponds to the hyperactivated beating pattern, since its average eccentricity tends to 1, with a larger amplitude compared to cluster 1, implying an asymmetric motility

pattern, as mentioned previously. Furthermore, as expected, $\approx 12\%$ of the induced to capacitate spermatozoa belong to this cluster as mentioned in [2]. It is important to mention that the whole set of non-capacitated sperm was correctly classified in the green cluster together with the failed-to-capacitate from the induced group.

As we mentioned before, no ground-truth exists for 3D classification purposes, thus the correlation coefficient of the first principal component with the ALH value for all spermatozoa was a first approach to validate the unsupervised classification results. Although some experiments agree with their ALH value and clustering, the comparison with CASA values is limited since it is based on the head movement, while in this work, we are measuring the 3D flagellar dynamics. Further analysis is required to establish a truth reference in order to have a better way to measure the performance of the proposed method; additionally, it is required to collect more data of non-capacitated spermatozoa to balance the dataset. The obtained results are promising given that flagella hyperactivation has never been described in 3D, which will allow to define the parameters for the classification of the hyperactivated motility pattern.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

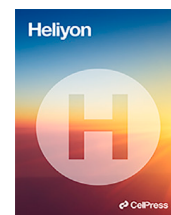
This work was approved by the Bioethics Committee permit for project IN200919. Signed written informed consent forms were signed by all healthy donors.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by UNAM (PAPIITs IN200919, TA101121, IV100420, IN105222) and CONACyT (CVU 700563).

REFERENCES

- [1] Dagmar Waberski, Susan S Suarez, and Heiko Henning, "Assessment of sperm motility in livestock: perspectives based on sperm swimming conditions in vivo," *Animal Reproduction Science*, p. 106849, 2021.
- [2] Susan S Suarez, "Control of hyperactivation in sperm," *Human reproduction update*, vol. 14, no. 6, pp. 647–657, 2008.
- [3] Daznia Bompert, Almudena García-Molina, Anthony Valverde, Carina Caldeira, Jesús Yániz, Manuel Núñez de Murga, and Carles Soler, "Casa-mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber," *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 30, no. 6, pp. 810–819, 2018.
- [4] Sharon T Mortimer, Gerhard van der Horst, and David Mortimer, "The future of computer-aided sperm analysis," *Asian journal of andrology*, vol. 17, no. 4, pp. 545, 2015.
- [5] Soroush Javadi and Seyed Abolghasem Mirroshandel, "A novel deep learning method for automatic assessment of human sperm images," *Computers in biology and medicine*, vol. 109, pp. 182–194, 2019.
- [6] Pedro Ângelo Pereira da Silva, *Supervised and unsupervised spermatozoa detection, classification and tracking in imaging data*, Ph.D. thesis, 2011.
- [7] Summer G Goodson, Sarah White, Alicia M Stevans, Sanjana Bhat, Chia-Yu Kao, Scott Jaworski, Tamara R Marlowe, Martin Kohlmeier, Leonard McMillan, Steven H Zeisel, et al., "Casanova: a multiclass support vector machine model for the classification of human sperm motility patterns," *Biology of reproduction*, vol. 97, no. 5, pp. 698–708, 2017.
- [8] Jason Riordon, Christopher McCallum, and David Sinton, "Deep learning for the classification of human sperm," *Computers in biology and medicine*, vol. 111, pp. 103342, 2019.
- [9] G Corkidi, B Taboada, CD Wood, A Guerrero, and A Darszon, "Tracking sperm in three-dimensions," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 373, no. 1, pp. 125–129, 2008.
- [10] G Corkidi, F Montoya, P Hernández-Herrera, WA Ríos-Herrera, MF Müller, CL Treviño, and A Darszon, "Are there intracellular ca^{2+} oscillations correlated with flagellar beating in human sperm? a three vs. two-dimensional analysis," *MHR: Basic science of reproductive medicine*, vol. 23, no. 9, pp. 583–593, 2017.
- [11] Paul Hernandez-Herrera, Fernando Montoya, Juan Manuel Rendón-Mancha, Alberto Darszon, and Gabriel Corkidi, "3-d+t human sperm flagellum tracing in low snr fluorescence images," *IEEE transactions on medical imaging*, vol. 37, no. 10, pp. 2236–2247, 2018.
- [12] Hermes Gadêlha, Paul Hernández-Herrera, Fernando Montoya, Alberto Darszon, and Gabriel Corkidi, "Human sperm uses asymmetric and anisotropic flagellar controls to regulate swimming symmetry and cell steering," *Science advances*, vol. 6, no. 31, pp. eaba5168, 2020.
- [13] A Gong, Sebastian Rode, G Gompper, Ulrich Benjamin Kaupp, J Elgeti, BM Friedrich, and Luis Alvarez, "Reconstruction of the three-dimensional beat pattern underlying swimming behaviors of sperm," *The European Physical Journal E*, vol. 44, no. 7, pp. 1–12, 2021.
- [14] Antonios Danelakis, Theoharis Theoharis, Ioannis Pratikakis, and Panagiotis Perakis, "An effective methodology for dynamic 3d facial expression retrieval," *Pattern Recognition*, vol. 52, pp. 174–185, 2016.
- [15] Marcel Körtgen, Gil-Joo Park, Marcin Novotni, and Reinhard Klein, "3d shape matching with 3d shape contexts," in *The 7th central European seminar on computer graphics*. Citeseer, 2003, vol. 3, pp. 5–17.
- [16] Peng Huang, Jonathan Starck, and Adrian Hilton, "Temporal 3d shape matching," in *4th European Conference on Visual Media Production*. IET, 2007, pp. 1–10.
- [17] Eliseo Stefano Maini, "Enhanced direct least square fitting of ellipses," *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence*, vol. 20, no. 06, pp. 939–953, 2006.
- [18] Eve de Lamirande, Pierre Leclerc, and C Gagnon, "Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization," *Molecular human reproduction*, vol. 3, pp. 175–94, 04 1997.
- [19] Carlos Alquézar-Baeta, Silvia Gimeno-Martos, Sara Miguel-Jiménez, Pilar Santolaria, Jesús Yániz, Inmaculada Palacín, Adriana Casao, José Álvaro Cebrián-Pérez, Teresa Muiño-Blanco, and Rosaura Pérez-Pé, "Opencasa: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis," *PLoS computational biology*, vol. 15, no. 1, pp. e1006691, 2019.



Research article

Feature-based 3D+t descriptors of hyperactivated human sperm beat patterns

Haydee O. Hernández^{a,b}, Fernando Montoya^b, Paul Hernández-Herrera^{b,c},
Dan S. Díaz-Guerrero^b, Jimena Olveres^d, Hermes Bloomfield-Gadêlha^e,
Alberto Darszon^f, Boris Escalante-Ramírez^d, Gabriel Corkidi^{b,*}

^a Posgrado en Ciencia e Ingeniería de la Computación, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Ciudad de México, Mexico

^b Laboratorio de Imágenes y Visión por Computadora, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mexico

^c Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

^d Departamento de Procesamiento de Señales, Facultad de Ingeniería, UNAM, Ciudad de México, Mexico

^e Department of Engineering Mathematics and Technology, Bristol Robotics Laboratory, University of Bristol, Bristol, United Kingdom

^f Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

3D+t human sperm motility
Hyperactivated sperm
Sperm flagella
Spatio-temporal patterns
Unsupervised classification
Multi-plane imaging
3D microscopy

ABSTRACT

The flagellar movement of the mammalian sperm plays a crucial role in fertilization. In the female reproductive tract, human spermatozoa undergo a process called capacitation which promotes changes in their motility. Only capacitated spermatozoa may be hyperactivated and only those that transition to hyperactivated motility are capable of fertilizing the egg. Hyperactivated motility is characterized by asymmetric flagellar bends of greater amplitude and lower frequency. Historically, clinical fertilization studies have used two-dimensional analysis to classify sperm motility, despite the inherently three-dimensional (3D) nature of sperm motion. Recent research has described several 3D beating features of sperm flagella. However, the 3D motility pattern of hyperactivated spermatozoa has not yet been characterized. One of the main challenges in classifying these patterns in 3D is the lack of a ground-truth reference, as it can be difficult to visually assess differences in flagellar beat patterns. Additionally, it is worth noting that only a relatively small proportion, approximately 10-20% of sperm incubated under capacitating conditions exhibit hyperactivated motility. In this work, we used a multifocal image acquisition system that can acquire, segment, and track sperm flagella in 3D+t. We developed a feature-based vector that describes the spatio-temporal flagellar sperm motility patterns by an envelope of ellipses. The classification results obtained using our 3D feature-based descriptors can serve as potential label for future work involving deep neural networks. By using the classification results as labels, it will be possible to train a deep neural network to automatically classify spermatozoa based on their 3D flagellar beating patterns. We demonstrated the effectiveness of the descriptors by applying them to a dataset of human sperm cells and showing that they can accurately differentiate between non-hyperactivated and hyperactivated 3D motility patterns of the sperm cells. This work contributes to the understanding of 3D flagellar hyperactive motility patterns and provides a framework for research in the fields of human and animal fertility.

* Corresponding author.

E-mail address: gabriel.corkidi@ibt.unam.mx (G. Corkidi).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26645>

Received 24 April 2023; Received in revised form 23 November 2023; Accepted 16 February 2024

Available online 23 February 2024

2405-8440/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

1. Introduction

Human fertilization requires that sperm move and swim through the female reproductive tract to reach the egg [1–3]. This journey is accompanied by a crucial physiological process known as capacitation, involving intricate biochemical and biophysical alterations that render sperm capable of fertilization [4,5]. While sperm exhibit three-dimensional (3D) motion during this journey [6], both research and clinical analyses have predominantly been confined to capturing their movement in two-dimensional (2D) images [7–11]. Previous 2D analyses have unveiled the diverse motility patterns [12] of capacitated sperm, with one of the notable phenomena being hyperactivation. Hyperactivation is a motility pattern characterized by highly asymmetrical flagellar bends, also by an increase in amplitude and by a decrease in the frequency of beating [13–17]. Only a small percentage (around 10–20%) of the millions of ejaculated sperm are found to be capacitated after being incubated in capacitating media and consequently, exhibit non-constant hyperactivated motility [13,18]. This limited occurrence can be attributed to the asynchronous nature of the capacitating process [13,19].

It is crucial to distinguish between hyperactivation and capacitation as they represent distinct facets of sperm behavior. Capacitation refers to the functional maturation of spermatozoa, while hyperactivation refers to a specific motility pattern associated with capacitation [13]. Understanding, characterizing, and classifying hyperactivated sperm movement in 3D holds significance for male infertility diagnosis and treatment. Established methods for classifying hyperactivation motility in 2D analyses often rely on tracking sperm head trajectories, giving indirect information about the motion of the flagellum. Nevertheless, 3D flagellar hyperactivated motion has never been described.

Computer Assisted Semen Analysis (CASA) has become the gold-standard method for analyzing and classifying sperm motility in 2D. Nevertheless, it has been shown that it can produce inconsistent and subjective results as it depends largely on the expertise and training of the user [7,8]. The identification of hyperactivated human sperm used in CASA involves a combination of kinematic parameters, for sperm recorded at 60 fps: Curvilinear Velocity (VCL) $\geq 150 \mu\text{m/s}$, Linearity (LIN) $\leq 50\%$, and Lateral Amplitude of Head Displacement (ALH) $\geq 7 \mu\text{m}$ [12]. However, these parameters may vary depending on the CASA system, frame rate and software used [8,20–22]. As an example, one subjective parameter is the ALH due to the many ways of calculating the average path. In [23], the fractal dimension (D) was proposed as an alternative to ALH. Fractal dimension indicates how much of the plane is filled by a meandering curve. If the head trajectory of a sperm's fractal dimension exceeds a threshold and satisfies the conditions for VCL and LIN , then it is considered hyperactivated.

In recent years, efforts have been made to automate and remove subjectivity from this type of analysis using machine learning and deep learning techniques [12,24–27]. However, most of these efforts have focused on analyzing sperm head trajectory and CASA parameters extracted from 2D images, leaving the analysis of 3D flagella movement largely unexplored. Recently, it has been possible to acquire images of the flagellum, for which software systems have been developed to analyze it [27–29], as is the Computer-Assisted Beat-pattern Analysis (CABA) [30]. Despite this progress, they are not capable of classifying sperm motility even in 2D. The 3D imaging and analysis of sperm flagella kinematics involves several computational challenges, including acquisition, detection, segmentation, tracking, and classification [6], but it provides more information that can help remove subjectivity in the analysis. Despite some recent progress in understanding the 3D flagellar kinematics of single sperm, the classification of 3D flagellar beating patterns in capacitated sperm remains a large gap in the literature [6,27,31–34].

Different methods have been developed to classify 3D dynamic patterns [35,36]. These include traditional machine learning techniques like decision trees and support vector machines, as well as more recent approaches based on deep learning, such as convolutional neural networks (CNNs) [37,38]. These methods rely on extensive labeled data for training, which can be a limiting factor in many cases. When labeled data are not available, unsupervised learning techniques can be employed to extract patterns or correlations from images. Unsupervised learning aims to discover inherent structures or relationships in the data without relying on prior knowledge or labeled examples. It encompasses tasks such as clustering, dimensionality reduction, and generative modeling [39,40]. In the context of classifying 3D dynamic patterns, it becomes particularly challenging to compare waveforms that change over time, such as in motion recognition or video classification [41]. The classification of 3D dynamical patterns requires a deep understanding of the temporal and spatial movement and behavior of objects, making it a complex task.

In this study, our foremost objective is to explore into the complex dynamics of sperm flagellar beating in a three-dimensional space, aiming to uncover previously unexplored patterns and characteristics of hyperactivated spermatozoa. We introduce novel descriptors for dynamic motility that are based on a set of properties displayed by ellipses enveloping the flagella, which allows to compactly describe the beating information of the flagella from 3D+t. The methodology employed in the work resulted in the identification of two distinct clusters of beating patterns through unsupervised classification. These groups were subsequently validated to distinguish between non-hyperactivated and hyperactivated entities. This validation has been accomplished by correlating these groups with established biological characteristics, such as beating amplitude, frequency, and asymmetry. Significantly, this study represents the first description of hyperactivation in 3D, laying the foundation for future 3D investigations.

2. Materials and methods

2.1. Sperm samples and media

Under informed written consent and the supervision of the Bioethics committee of the Instituto de Biotecnología, UNAM, young healthy donors supplied human spermatozoa samples by masturbation, after at least 48 hours of sexual abstinence.

The semen samples fulfilled the World Health Organization (WHO) requirements [16]. In total, there were 18 samples collected from 8 different donors. Through a swim up separation, highly motile cells were recovered from the sample that was incubated for 1 hour in Ham's F-10 medium at 37 °C in a humidified chamber with a 5% CO₂ concentration. After recovery, cells were centrifuged 5 min at 3000 rpm and half of them were resuspended in a non-capacitating media and the other half in capacitating media. The non-capacitating physiological media consisted of 94 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM Na pyruvate, 25 mM NaHCO₃, 5 mM glucose, 30 mM Hepes, and 10 mM lactate at pH 7.4. Five mg/ml of Bovine Serum Albumin (BSA) and 2 mg/ml NaHCO₃ were added to obtain the capacitating media.

2.2. 3D+t image acquisition

The 3D + t acquisition system consisted of an inverted Olympus IX71 microscope mounted on an optical table [TMC (GMP SA, Switzerland)]. A 60X water immersion objective with $N.A. = 1.00$ (Olympus UIS2 LUMPLFLN 60X W) attached to a piezoelectric device P-725 (Physik Instruments, MA, USA) mounted on the microscope. The piezoelectric along with the objective oscillated with a frequency of 90 Hz and an amplitude of 20 μm. A servo-controller E501 via a high current amplifier E-55 (Physik Instruments, MA, USA) was used to fine tune the piezoelectric oscillations. A high speed camera (NAC Q1v) with 8 GB of internal memory was set to record at 5000/8000 fps with a resolution of 640 x 480 pixels. At this speed and resolution, the camera was able to acquire 27,000 images in 5.4/3.4 seconds respectively. The acquisition system was synchronized via an E-506 function generator (NI USB-6211, National Instruments, USA). Temperature of the samples was maintained constant at 37 °C with a thermal controller (Warner Instruments, TCM/CL100).

2.3. 3D waveform segmentation

The dataset consisted of 147 human spermatozoa, 60 were exposed to a non-capacitating media and 87 to capacitating media. The data were collected using the system described by Corkidi et al. [6] and the flagellum centerline was reconstructed using the segmentation process described by Hernández-Herrera et al. [32]. From the experimental conditions, it is expected that 10 – 20% of sperm exposed to a capacitating media may display hyperactivated motility [18]. Let $(x_{in}^i, y_{in}^i, z_{in}^i)$, $n = 1, 2, \dots, N_T$, be a set of points of the flagellum's centerline in a 3D coordinate system at time $t = 1, 2, \dots, T_i$ for each spermatozoa, i , in the dataset. The number of detected flagella and points per single beat may vary over time due to the segmentation process. A complete set of these points for an experiment i in the laboratory frame of reference are shown in Fig. 1A, each colored line corresponds to a flagellum reconstruction at a given time, and the black dots represent the head of the spermatozoon. The temporal evolution is represented within the color scale shown in the figure. Every flagellum corresponds to a single temporal point and therefore each one is depicted with a single color. To place all sperm trajectories within the same comoving frame of reference, the data were both rotated and translated to align the head's main axis with the x -axis.

2.4. 3D waveform ellipse envelope

We define a flagelloid F_l^i [33] for sperm i as the set of points that belong to the flagella orthogonally projected onto the YZ plane whose x -coordinate lie in the interval $I_l = [(l - 1) \cdot \delta, l \cdot \delta]$ where $l = 1, 2, \dots, L^i$, $L^i = \lceil \frac{\max\{x_{in}^i\}}{\delta} \rceil$ (the symbols $\lceil \cdot \rceil$ denote the ceiling function, e.g., $\lceil \pi \rceil = 4$) and δ is the interval size (as shown in Fig. 1B).

$$F_l^i = \{(y_{in}^i, z_{in}^i) | x_{in}^i \in I_l\}. \quad (1)$$

Fig. 1B illustrates the fitting of an ellipse (dashed purple) to the points belonging to the flagelloid (1) using the “Direct fit of least squares of ellipses” method presented in [42]. By performing this process for each flagelloid, a set of transverse ellipses to the x -axis are obtained, which describe the motility shape of the sperm (as shown in Fig. 1C). The interval size (δ) is set to ~ 0.21 μm; this value was imposed to ensure that each interval contains at least three points. Ellipses are fitted to the flagelloid only when it has at least this number of points and they are not collinear to avoid fitting a hyperbola or a parabola (eccentricity, $\epsilon \geq 1$). The number of ellipses $E^i | E^i \leq L^i$ are the ellipses that were fitted correctly for spermatozoon i .

From each ellipse e_l^i , we obtain four parameters:

1. The semi-major axis (a_l^i).
2. The semi-minor axis (b_l^i).
3. The angle of the ellipse (ϕ_l^i) with respect to the y -axis.
4. The eccentricity (ϵ_l^i).

To describe the variations in the envelope of ellipses, we propose a feature-based vector with the following four components based on an analysis of the obtained data:

- Feature 1: $\mu \left(\left\{ \sqrt{a_l^i{}^2 - b_l^i{}^2} \right\}_{l=1}^{E^i} \right)$,

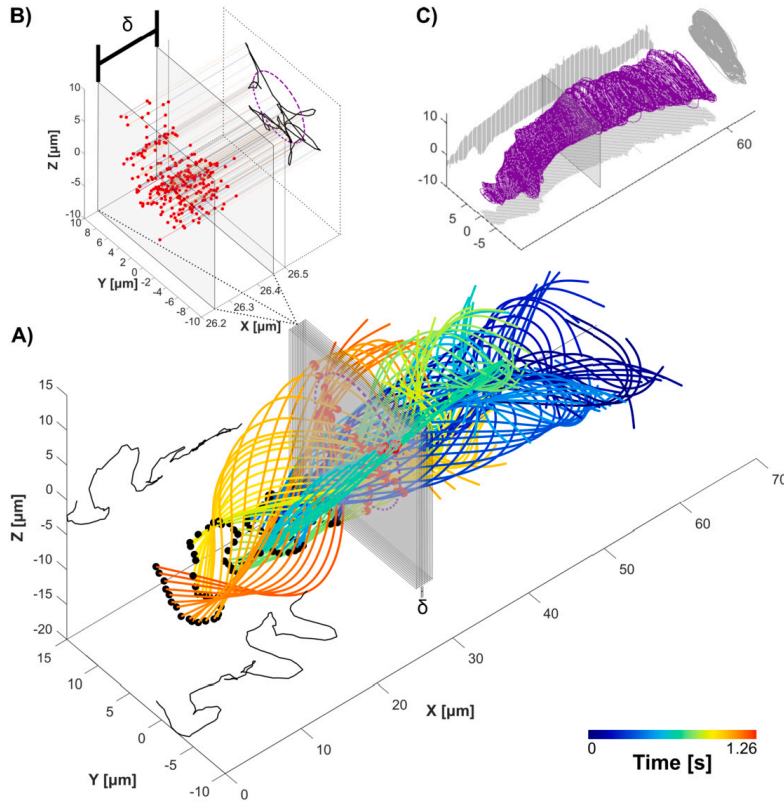


Fig. 1. A) Representation of a tracked and segmented spermatozoon, with the laboratory frame of reference data aligned along the x-axis. Each line corresponds to a flagellum reconstruction at a specific time, and the black dots represent the first point of the flagella at each time. The temporal evolution is represented within the color scale shown in the figure. Every flagellum corresponds to a single temporal point and therefore each one is depicted with a single color. The projections of the 2D head trajectories are shown in the XY and XZ planes (black lines). The process of fitting an ellipse to a flagelloid is shown with a sample out of 292 gray planes (for visualization purposes) corresponding to 10 intervals of δ each. B) Zoomed-in view of a single δ -length interval, with red dots representing the flagellum points within that interval. At the right side, the orthogonal projection of the red dots are displayed, forming a flagelloid (black line) and its fitted ellipse (purple dotted line). C) Envelope of ellipses (purple lines) and their XY, XZ, and YZ projections (light gray lines) for a spermatozoon. Each ellipse was fitted to an interval, the complete envelope is composed with all the ellipses fitted to the sperm's beating.

Table 1
Detailed table of the principal component analysis.

	PC 1	PC 2	PC 3
Eigenvalue	2.3862	1.0004	0.4616
Feature 1	0.6142	0.0392	-0.1122
Feature 2	-0.0242	0.9990	-0.0191
Feature 3	0.5712	-0.0163	-0.6197
Feature 4	0.5440	0.0172	0.7765

Details of the principal component analysis obtained from the feature-based vector of the envelope of ellipses. The element $[j, k]$ is the contribution of the Feature j to the k -th PC. The dominant features for each principal component are shown in bold.

- Feature 2: $\mu \left(\left\{ \phi_{l-1}^i - \phi_l^i \right\}_{l=2}^{E^i} \right)$,
- Feature 3: $\mu \left(\left\{ \varepsilon_l^i \right\}_{l=1}^{E^i} \right)$,
- Feature 4: $\sigma \left(\left\{ a_l^i \right\}_{l=1}^{E^i} \right)$,

where μ is the average and σ is the standard deviation. Feature 1 is the average distance from the center of the ellipse to the focus of every ellipse, Feature 2 is the average of the difference between angles of the major axis of consecutive ellipses, Feature 3 is the average value of the eccentricity and Feature 4 is the standard deviation of the semi-major axis. Then we reduce the dimensionality of the vector using Principal Component Analysis (PCA), resulting in three principal components that account for more than 90% of the variance in the dataset (see Table 1).

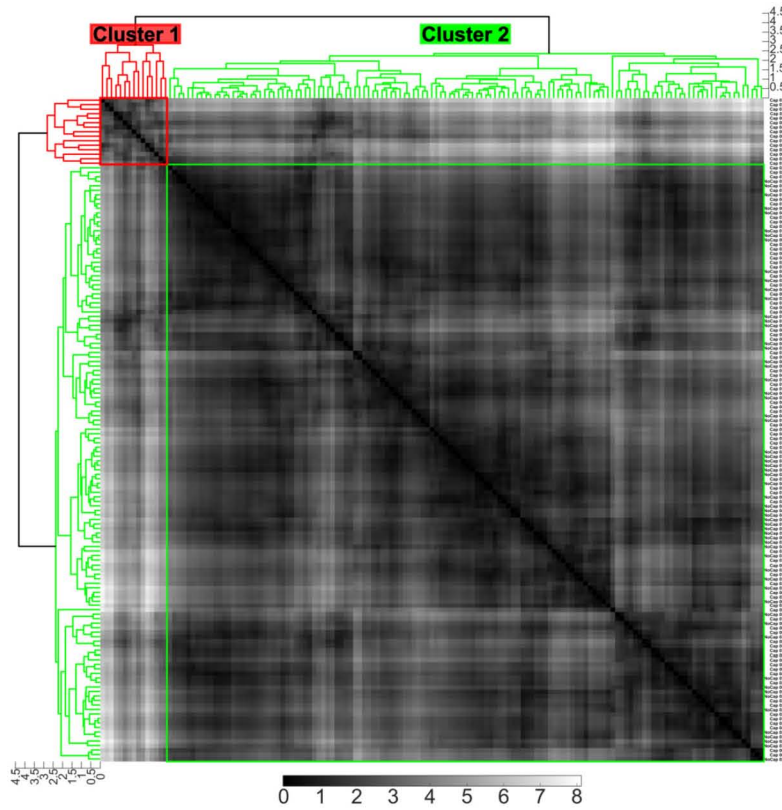


Fig. 2. The dissimilarity matrix shows the Euclidean distance between each pair of sperm cells based on their four principal components. The pixel intensity in the matrix corresponds to the distance value. On the right, the IDs of each experiment are displayed, where “No Cap” belongs to the control group and “Cap” refers to the spermatozoa exposed to capacitating conditions. The dendrogram shows the hierarchical clustering with average linkage; red lines correspond to Cluster 1 and green lines to Cluster 2.

2.5. Clustering

Our dataset consists of samples incubated in non-capacitated media (control) and sperm that have been incubated under capacitating conditions, we expect that around 10 - 20% of the capacitated sperm at most, will exhibit an hyperactivated motility pattern. Since our dataset cannot be labeled, we did not have prior knowledge of the number of clusters in the data, and the actual number of hyperactivated sperm cells is unknown. We choose to apply agglomerative hierarchical clustering, since it does not require knowing a priori how many clusters there are, does not need input parameters, and is less sensitive to outliers compared to other methods. Agglomerative hierarchical clustering [43] is a technique that clusters each of the objects in the dataset based on the dissimilarity metric between them. The clusters are created between pairs of greater similarity and then, they are successively connected with the other pairs of less similarity. This process is represented through a dendrogram that shows the hierarchical relationship between group-pairs in the dataset [43]. We used the Euclidean distance as the dissimilarity metric between the descriptors of each sperm cell with all the others to determine the dissimilarity between each pair of spermatozoa. We used average linkage and “distance” as the criterion to define the clusters based on proximity between the objects. The dendrogram enabled us to visually identify the number of main groups in the dataset, and we identified two main clusters.

3. Results

The dissimilarity matrix of the Euclidean distance between each pair of spermatozoa is depicted in Fig. 2, illustrating how similar they are based on their feature-based descriptors. The diagonal of the matrix is black since a feature-based descriptor’s distance from itself is 0 (high similarity), while pairs of sperm with higher distances are represented with white (low similarity). The cells that were incubated under non-capacitating conditions and a fraction of the incubated under capacitating conditions sperm are found in Cluster 2 (green square and lines in Fig. 2). Spermatozoa in Cluster 1 (red squares and lines in Fig. 2) have fitted ellipses with semi-major axes that are larger ($max(a) > 6.5 \mu m$) than those in cluster 2 in addition to having $\epsilon \rightarrow 1$. The ellipse’s eccentricity (ϵ) measures how much it deviates from a circle. This is related to the tendency of the flagellum’s beating pattern, with a more isotropic pattern corresponding to a more circular ellipse ($\epsilon \rightarrow 0$) and an anisotropic pattern corresponding to a more elongated ellipse ($\epsilon \rightarrow 1$). Given the previous analysis and considerations, we associate Cluster 2 to the motility pattern of non-hyperactivated sperm, which includes the control group and a subset of spermatozoa incubated under capacitating conditions (those exposed to a capacitating media, not showing hyperactivated motility), as shown in the next validating section. Cluster 1 is then associated with the hyperactivated beating pattern group, which only includes sperm cells that were exposed to capacitating conditions.

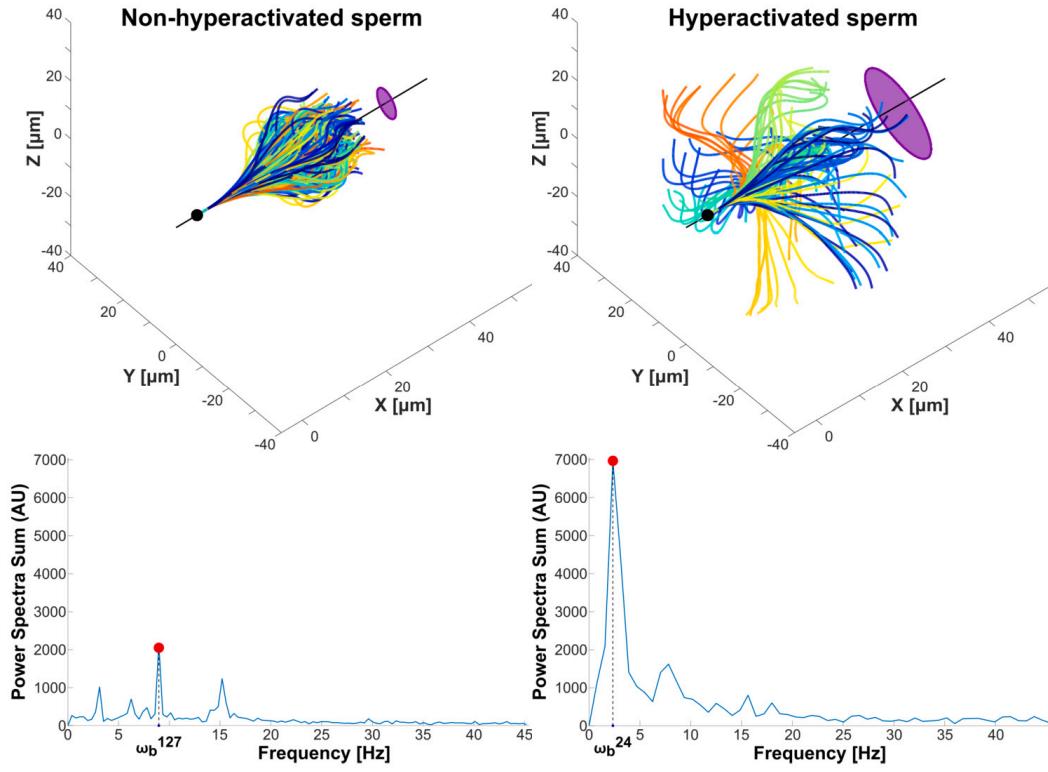


Fig. 3. The upper graphs show the flagellar beat of a sperm classified as non-hyperactivated (left side) and one classified as hyperactivated (right side). Both are aligned and rotated with respect to the x-axis (black line) along the first $\sim 2.5 \mu\text{m}$ of arclength, corresponding to the mid-head of the sperm. The ellipse at the end of the x-axis shows the average ellipse fitted to the flagellar beat, indicating the average anisotropy of the beat. The lower graphs, as instances of the examples in the upper ones, display the sum of the amplitude spectrum of all points. The red dots on these plots represent the maximum value of the spectrum, associated with the sperm beat frequency, ω_b^i .

3.1. Validating the classification of the 3D sperm beating patterns

In the literature, it has been described that hyperactivated motility in human spermatozoa is characterized by asymmetric flagellar beating, an increase in amplitude, and a decrease in the frequency of beating [1,14,18,20,44–46]. To validate our unsupervised classification of motility patterns, we have measured these features (amplitude, frequency, and asymmetry) in 3D+t from our database and proposed some 3D generalizations of the 2D well-known measures. For this purpose, the first $\sim 2.5 \mu\text{m}$ of arclength of each flagellum was aligned and rotated with respect to the x-axis (see Fig. 3).

For each individual sperm (denoted as i), we defined the amplitude as the average distance of each point on the flagellum (represented by coordinates $(x_{in}^i, y_{in}^i, z_{in}^i)$) to the x-axis:

$$A^i = \mu \left(\left\{ \sqrt{y_{in}^i{}^2 + z_{in}^i{}^2} \right\}_{n=1, t=1}^{N_T, T_i} \right). \quad (2)$$

The beat frequency is obtained through the analysis of the Fourier transform on each point of the flagellum over the time $F(y_{in}^i, z_{in}^i)$. The power spectrum amplitude of each point of the sum of the two components are summed and the frequency with peak amplitude is taken as the maximum frequency (Fig. 3):

$$\omega_b^i = \operatorname{argmax}_{\omega} \left(\sum_{n=1}^N |F\{y_{in}^i\}| + |F\{z_{in}^i\}| \right). \quad (3)$$

While the increase in asymmetry for hyperactivated spermatozoa is clearly observable in 2D analysis, it becomes more challenging to measure and generalize this asymmetry directly in 3D data. However, an alternative approach in the 3D context is to consider anisotropy. The anisotropy is taken as the mean of the eccentricity of the ellipses fitted to each spermatozoon. Anisotropy captures the directional preference or orientation of the envelope of ellipses in 3D, providing valuable insights into the movement patterns of hyperactivated spermatozoa. In the context of measuring the eccentricity of the envelope of ellipses in sperm flagellar beat analysis, a higher eccentricity value indicates a more elongated or stretched shape, which implies a higher anisotropy of the beat. This means that the flagellum exhibits a preferred direction or orientation of bending, leading to an elongated shape rather than a circular shape.

We performed the Wilcoxon Rank Sum Test to determine if there were differences between the two clusters for each measure described above (Fig. 4), this test is used when the sizes of the samples are relatively small and they are not normally distributed, showing a significant difference.

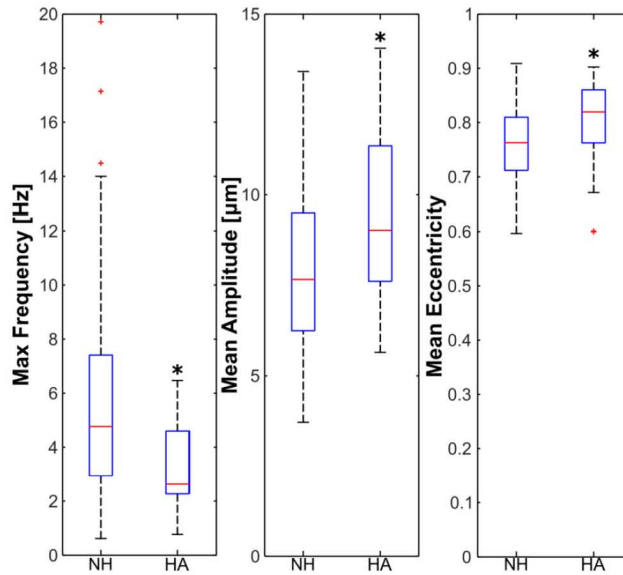


Fig. 4. Boxplots of the frequency, amplitude, and, anisotropy values for each motility group identified (non-hyperactivated: NH, and hyperactivated: HA). The p -value for the Wilcoxon test for each feature is: 0.009, 0.01 and 0.0476 respectively * $P < 0.05$.

4. Discussion

This work introduces a feature-based vector that captures the average dynamics of the flagellar beat in 3D+t. Leveraging these descriptors, we successfully achieved the unsupervised classification of human spermatozoa flagellar beating into non-hyperactivated and hyperactivated classes. Notably, this unsupervised approach circumvents the need for labeled training data and offers a robust methodology.

In the context of sperm motility analysis, previous studies have observed that hyperactivated spermatozoa exhibit an asymmetrical beating pattern compared to non-hyperactivated ones [17]. Building upon this observation, our proposed envelope of ellipses allows the generalization of this description to the 3D case. This simplifies 3D movement to a surface that fits the flagellar beat. Here we test the hypothesis that the shape of this envelope is correlated with the waveform of sperm non-hyperactivated and hyperactivated states. Ellipses with eccentricities close to one correspond to elongated shapes, indicative of an anisotropic envelope, while ellipses with eccentricities close to zero represent more symmetrical envelopes. Moreover, this characterization enables the quantification of the 3D equivalent of the movement envelope amplitude through the descriptor of the foci average of the ellipses. Significantly, the amplitude feature is found to be smaller for the non-hyperactivated group compared to the hyperactivated group.

In addition to capturing anisotropy and amplitude of the envelope, the proposed feature-based vector provides a parameter-free representation of flagellar beat dynamics, allowing an objective classification. By using this approach, we accurately classified the entire set of the exposed to a non-capacitating media sperm, along with the non-hyperactivated sperm from the incubated under capacitating conditions group, into the green cluster (Fig. 2). As we expected, approximately 17% of the incubated under capacitating conditions spermatozoa belong to the hyperactivated group, as mentioned in [18].

Given the absence of a ground truth for 3D classification, we initially compared the unsupervised classification results using the most common 2D characteristics of hyperactivated motility: frequency and amplitude, measured in 3D. However, measuring asymmetry in a 3D context is not straightforward. Asymmetry in the flagellar beat refers to the differences or variations between the two sides or halves of the flagellum. Instead, in this study, we utilized the eccentricity as a measure of anisotropy, which captures the preferred direction of the beat's envelopes. While eccentricity primarily quantifies anisotropy rather than direct asymmetry, it can still provide valuable insights into the beat patterns. Higher eccentricity values indicate a more elongated shape of the beat, suggesting a higher degree of anisotropy. This measure of anisotropy serves as an indirect measure of the asymmetry of the flagellar beat. Through these comparisons, we observed that the hyperactivated group exhibited lower frequency, higher mean amplitude, and greater anisotropy of the waveform path compared to the non-hyperactivated group. These findings suggest that these 2D characteristics, along with the measure of anisotropy, can serve as informative features in distinguishing between non-hyperactivated and hyperactivated spermatozoa. The Wilcoxon test confirmed that the two groups were statistically different in terms of each attribute (frequency, amplitude, and anisotropy).

Alternative measurements to describe the motility patterns of the cell have been explored. One relevant example is the fractal dimension of the 2D trajectory of the cell head. It has been shown that 2D trajectories with a fractal dimension greater than 1.3 could be an hyperactivated motility pattern [23]. How this 2D head trajectory measurement could be correlated to our present 3D flagellar approach surges as a research venue.

The findings presented in this work align with our previous studies [47], further substantiating the reliability of our feature-based descriptors in characterizing motility patterns. To enhance the accuracy and validation of these results, future work will involve using fluorescent markers to establish a ground truth reference for hyperactivated human sperm in 3D.

5. Conclusions

This study addresses the critical need for describing the 3D flagellar beating patterns of human spermatozoa and presents a reliable and simple classification framework. By overcoming the limitations of subjective expert-based analysis, our approach offers a robust means of characterizing motility patterns.

The unique contribution of this work lies in the development of a robust classification methodology that does not rely on deep neural networks. This is particularly significant because deep learning approaches are not viable due to the lack of labeled 3D+t beating data. Furthermore, by simplifying the intricate spatio-temporal data in three dimensions, we transform each flagellum point, which essentially represents a time series, into a shape analysis that considers both the flagellum's shape and the accumulated movement of the sperm in 3D through the waving movement envelope. The classification results obtained using our feature-based descriptors can serve as potential labels for future work involving deep neural networks. By using the classification results as labels, it will be possible to train a deep neural network to automatically classify spermatozoa based on their flagellar beating patterns. This combination of feature-based descriptors and deep neural networks holds promise for further improving the accuracy and efficiency of classification tasks in reproductive biology and fertility research.

Funding

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM-PAPIIT) under the Grant TA101121, Grant IV100420, Grant IN204922 and Grant IN105222. Paul Hernández-Herrera was supported by the Chan Zuckerberg Initiative DAF under the Grant 2023-329644. Dan S. Díaz-Guerrero was supported by a Postdoctoral fellowship from Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, CONAHCYT–México CVU 289856 and the work of Haydee O. Hernández was supported by a Ph.D. scholarship from CONAHCYT–México CVU 700563.

Compliance with ethical standards

This work was approved by the Bioethics Committee permit for project IN200919. Signed written informed consent forms were signed by all healthy donors.

CRediT authorship contribution statement

Haydee O. Hernández: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Fernando Montoya:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Paul Hernández-Herrera:** Data curation, Investigation, Methodology, Software, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Dan S. Díaz-Guerrero:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Jimena Olveres:** Investigation, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Hermes Bloomfield-Gadêlha:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Alberto Darszon:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Boris Escalante-Ramírez:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Gabriel Corkidi:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

The data underlying this article will be shared upon reasonable request to the corresponding author.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the authors used ChatGPT in order to assist in refining the language. After using this tool, the authors reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of the publication.

References

- [1] S.S. Suarez, A. Pacey, Sperm transport in the female reproductive tract, *Hum. Reprod. Updat.* 12 (1) (2006) 23–37.

- [2] M.J. Freitas, S. Vijayaraghavan, M. Fardilha, Signaling mechanisms in mammalian sperm motility, *Biol. Reprod.* 96 (1) (2017) 2–12.
- [3] E.A. Gaffney, H. Gadêlha, D.J. Smith, J.R. Blake, J.C. Kirkman-Brown, Mammalian sperm motility: observation and theory, *Annu. Rev. Fluid Mech.* 43 (2011) 501–528.
- [4] R. Yanagimachi, Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization?, *Biol. Reprod.* 85 (1) (2011) 4–5.
- [5] G. Corkidi, P. Hernández-Herrera, F. Montoya, H. Gadêlha, A. Darszon, Long-term segmentation-free assessment of head–flagellum movement and intracellular calcium in swimming human sperm, *J. Cell Sci.* 134 (3) (2021) jcs250654.
- [6] G. Corkidi, B. Taboada, C. Wood, A. Guerrero, A. Darszon, Tracking sperm in three-dimensions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 (1) (2008) 125–129.
- [7] S.T. Mortimer, G. Van der Horst, D. Mortimer, The future of computer-aided sperm analysis, *Asian J. Androl.* 17 (4) (2015) 545.
- [8] D. Bompert, A. García-Molina, A. Valverde, C. Caldeira, J. Yániz, M.N. de Murga, C. Soler, Casa-mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber, *Reprod. Fertil. Dev.* 30 (6) (2018) 810–819.
- [9] C. Alquézar-Baeta, S. Gimeno-Martos, S. Miguel-Jiménez, P. Santolaria, J. Yániz, I. Palacín, A. Casao, J.Á. Cebrián-Pérez, T. Muíño-Blanco, R. Pérez-Pé, Opencasa: a new open-source and scalable tool for sperm quality analysis, *PLoS Comput. Biol.* 15 (1) (2019) e1006691.
- [10] R. Dcunha, R.S. Hussein, H. Ananda, S. Kumari, S.K. Adiga, N. Kannan, Y. Zhao, G. Kalthur, Current insights and latest updates in sperm motility and associated applications in assisted reproduction, *Reprod. Sci.* (2020) 1–19.
- [11] J.-w. Choi, L. Alkhoury, L.F. Urbano, P. Masson, M. VerMilyea, M. Kam, An assessment tool for computer-assisted semen analysis (casa) algorithms, *Sci. Rep.* 12 (1) (2022) 16830.
- [12] S.G. Goodson, S. White, A.M. Stevans, S. Bhat, C.-Y. Kao, S. Jaworski, T.R. Marlowe, M. Kohlmeier, L. McMillan, S.H. Zeisel, et al., Casanova: a multiclass support vector machine model for the classification of human sperm motility patterns, *Biol. Reprod.* 97 (5) (2017) 698–708.
- [13] A. Cohen-Dayag, I. Tur-Kaspa, J. Dor, S. Mashiach, M. Eisenbach, Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (24) (1995) 11039–11043.
- [14] N. Sukcharoen, J. Keith, D.S. Irvine, R.J. Aitken, Definition of the optimal criteria for identifying hyperactivated human spermatozoa at 25 hz using in-vitro fertilization as a functional end-point, *Hum. Reprod.* 10 (11) (1995) 2928–2937.
- [15] H. Chang, S.S. Suarez, Two distinct ca^{2+} signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice, *Biol. Reprod.* 85 (2) (2011) 296–305.
- [16] W.H. Organization, et al., WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, World Health Organization, 2021.
- [17] D. Waberski, S.S. Suarez, H. Henning, Assessment of sperm motility in livestock: perspectives based on sperm swimming conditions in vivo, *Anim. Reprod. Sci.* 246 (2022) 106849.
- [18] S.S. Suarez, Control of hyperactivation in sperm, *Hum. Reprod. Updat.* 14 (6) (2008) 647–657.
- [19] S. Pérez-Cerezales, S. Boryshpolets, M. Eisenbach, Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance, *Asian J. Androl.* 17 (4) (2015) 628.
- [20] V. Kay, L. Robertson, Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction, *Hum. Reprod. Updat.* 4 (6) (1998) 776–786.
- [21] S.T. Mortimer, A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals, *Hum. Reprod. Updat.* 3 (5) (1997) 403–439.
- [22] C. Castellini, A. Dal Bosco, S. Ruggeri, G. Collodel, What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis?, *Fertil. Steril.* 96 (1) (2011) 24–27.
- [23] S.T. Mortimer, M.A. Swan, D. Mortimer, Fractal analysis of capacitating human spermatozoa, *Hum. Reprod.* 11 (5) (1996) 1049–1054.
- [24] S. Javadi, S.A. Mirroshandel, A novel deep learning method for automatic assessment of human sperm images, *Comput. Biol. Med.* 109 (2019) 182–194.
- [25] P.Á.P. da Silva, Supervised and Unsupervised Spermatozoa Detection, Classification and Tracking in Imaging Data, PhD thesis, Universidade de Lisboa, Portugal, 2011.
- [26] J. Riordon, C. McCallum, D. Sinton, Deep learning for the classification of human sperm, *Comput. Biol. Med.* 111 (2019) 103342.
- [27] J.B. You, C. McCallum, Y. Wang, J. Riordon, R. Nosrati, D. Sinton, Machine learning for sperm selection, *Nat. Rev. Neurol.* 18 (7) (2021) 387–403.
- [28] J.N. Hansen, S. Rassmann, J.F. Jikeli, D. Wachten, Spermq—a simple analysis software to comprehensively study flagellar beating and sperm steering, *Cells* 8 (1) (2018) 10.
- [29] M.T. Gallagher, G. Cupples, E.H. Ooi, J. Kirkman-Brown, D. Smith, Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis, *Hum. Reprod.* 34 (7) (2019) 1173–1185.
- [30] B.J. Walker, S. Phuyal, K. Ishimoto, C.-K. Tung, E.A. Gaffney, Computer-assisted beat-pattern analysis and the flagellar waveforms of bovine spermatozoa, *R. Soc. Open Sci.* 7 (6) (2020) 200769.
- [31] G. Corkidi, F. Montoya, P. Hernández-Herrera, W. Ríos-Herrera, M. Müller, C. Treviño, A. Darszon, Are there intracellular ca^{2+} oscillations correlated with flagellar beating in human sperm? A three vs. two-dimensional analysis, *Mol. Hum. Reprod.* 23 (9) (2017) 583–593.
- [32] P. Hernandez-Herrera, F. Montoya, J.M. Rendón-Mancha, A. Darszon, G. Corkidi, 3-d +t human sperm flagellum tracing in low snr fluorescence images, *IEEE Trans. Med. Imaging* 37 (10) (2018) 2236–2247.
- [33] H. Gadêlha, P. Hernández-Herrera, F. Montoya, A. Darszon, G. Corkidi, Human sperm uses asymmetric and anisotropic flagellar controls to regulate swimming symmetry and cell steering, *Sci. Adv.* 6 (31) (2020) eaba5168.
- [34] A. Gong, S. Rode, G. Gompper, U.B. Kaupp, J. Elgeti, B. Friedrich, L. Alvarez, Reconstruction of the three-dimensional beat pattern underlying swimming behaviors of sperm, *Eur. Phys. J. E* 44 (7) (2021) 87.
- [35] A. Danelakis, T. Theoharis, I. Pratikakis, P. Perakis, An effective methodology for dynamic 3d facial expression retrieval, *Pattern Recognit.* 52 (2016) 174–185.
- [36] M. Körtgen, G.-J. Park, M. Novotni, R. Klein, 3d shape matching with 3d shape contexts, in: *The 7th Central European Seminar on Computer Graphics*, vol. 3, Budmerice Slovakia, 2003, pp. 5–17.
- [37] H.-C. Shin, H.R. Roth, M. Gao, L. Lu, Z. Xu, I. Nogues, J. Yao, D. Mollura, R.M. Summers, Deep convolutional neural networks for computer-aided detection: Cnn architectures, dataset characteristics and transfer learning, *IEEE Trans. Med. Imaging* 35 (5) (2016) 1285–1298.
- [38] Z. Che, S. Purushotham, K. Cho, D. Sontag, Y. Liu, Recurrent neural networks for multivariate time series with missing values, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 6085.
- [39] Z. Ghahramani, Unsupervised learning, in: *Advanced Lectures on Machine Learning: ML Summer Schools 2003*, Canberra, Australia, February 2-14, 2003, Tübingen, Germany, August 4-16, 2003, Revised Lectures, 2004, pp. 72–112.
- [40] S. Badillo, B. Banfai, F. Birzele, I.I. Davydov, L. Hutchinson, T. Kam-Thong, J. Siebourg-Polster, B. Steiert, J.D. Zhang, An introduction to machine learning, *Clin. Pharmacol. Ther.* 107 (4) (2020) 871–885.
- [41] P. Huang, J. Starck, A. Hilton, Temporal 3d shape matching, in: *4th European Conference on Visual Media Production*, IET, 2007, pp. 1–10.
- [42] E.S. Maini, Enhanced direct least square fitting of ellipses, *Int. J. Pattern Recognit. Artif. Intell.* 20 (06) (2006) 939–953.
- [43] A.K. Jain, R.C. Dubes, *Algorithms for Clustering Data*, Prentice-Hall, Inc., 1988.
- [44] E. De Lamirande, P. Leclerc, C. Gagnon, Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization, *Mol. Hum. Reprod.* 3 (3) (1997) 175–194.
- [45] M. Zaferani, S.S. Suarez, A. Abbaspourrad, Mammalian sperm hyperactivation regulates navigation via physical boundaries and promotes pseudo-Chemotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118 (44) (2021) e2107500118.
- [46] A. Agarwal, G. Virk, C. Ong, S.S. Du Plessis, Effect of oxidative stress on male reproduction, *World J. Men's Health* 32 (1) (2014) 1–17.
- [47] H.O. Hernández, P. Hernández-Herrera, F. Montoya, J. Olveres, H. Bloomfield-Gadêlha, A. Darszon, B. Escalante-Ramírez, G. Corkidi, 3d+ t feature-based descriptor for unsupervised flagellar human sperm beat classification, in: *2022 44th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)*, IEEE, 2022, pp. 488–492.