

Reconhecimento de Células Reprodutoras Masculinas em Imagens de Microscopia sem Lentes

André Brasil Vieira Wyzykowski¹, Eros Comunello² e Antonio Carlos Sobieranski²

Resumo—A técnica de holografia digital *in-line*, aliada aos novos sensores de captura de imagens CMOS, tornou possível o barateamento do imageamento a nível microscópico de estruturas biológicas. Isso é possível devido ao baixo custo desses sensores de captura de imagem, aliada com a desnecessidade de um complexo sistema de lentes para a obtenção das imagens. Com isso, é possível elaborar dispositivos acessíveis e portáteis para exames laboratoriais como o espermograma. Desta forma, este artigo criou um software de reconhecimento de células reprodutivas masculinas, utilizando imagens capturadas através da técnica de holografia digital *in-line*. O sistema desenvolvido no presente trabalho reconheceu em média 93.33% dos espermatozoides em três imagens holográficas.

Palavras-Chave—Holografia Digital In-line, Espermograma, Imagens Médicas.

Abstract—The digital holography technique *in-line*, together with the new CMOS imaging sensors, became possible the cheapening the imaging of biological structures at the microscopic level. This is possible due to the low cost of these image capture sensors, coupled with no need for a complex system of lenses to obtain the images. With these facts, it's possible to develop affordable and portable devices for laboratory tests such as semen analysis. With all these facts, we created male reproductive cell recognition software, using images captured by digital holography technique *in-line*. The system developed in this work recognized on average 93.33% of sperm in three holographic images.

Keywords—Digital Holography In-line, Spermogram, Medical Imaging.

I. INTRODUÇÃO

O microscópio é uma ferramenta essencial na análise de estruturas em que o olho humano não consegue enxergar. A história da sua evolução está diretamente ligada com a necessidade de observação de estruturas celulares, importantes para estudos nas áreas da biologia celular e na medicina. Somente com o poder da observação dessas estruturas e objetos em micro escala, durante a segunda metade do século XVII, puderam-se realizar estudos sobre a reprodução humana, observando, por exemplo, a movimentação e morfologia de células reprodutivas masculinas [6]. Por consequência, equipamentos de observação em micro escala, por meio da ótica geométrica, também possibilitaram estudos envolvendo problemas na reprodução humana.

A análise do sêmen ou espermograma é um teste laboratorial que avalia a taxa de fertilidade em uma amostra colhida de

André Brasil Vieira Wyzykowski¹, Eros Comunello² e Antonio Carlos Sobieranski², ¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, E-mail: andre.brasil@posgrad.ufsc.br | ² Universidade do Vale do Itajaí, São José, Santa Catarina, Brasil, E-mails: eros.com@univali.br, asobieranski@univali.br

um homem. Com ele é possível determinar a qualidade do sêmen a partir de parâmetros como o número de células reprodutivas presentes na amostra, e a alteração do seu formato convencional [1]. Além disso, o espermograma consiste em procedimentos realizados de forma lenta e manual, além de depender de caros e pesados equipamentos de microscopia utilizando lentes capazes de enxergar ao nível celular.

Dentro do contexto de possíveis soluções para o problema citado anteriormente, os princípios da holografia, criada por Dennis Gabor [3], permitem a criação de um equipamento de imageamento de alta resolução sem o uso de lentes, o que impactaria diretamente no valor do dispositivo e consequentemente no exame de espermograma. Além disso, o atual cenário de sensores de captura de imagem CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor) está permitindo o barateamento da tecnologia, aliado a constantes avanços na qualidade da imagem.

A partir dos conceitos de holografia de Dennis Gabor [3] e da tecnologia de captação utilizando um sensor de imagem é possível à construção de um equipamento que realize uma investigação biológica microscópica em uma amostra. Isso é viabilizado por meio da emissão de um feixe de luz utilizando um LED (Light Emitting Diode) sobre o material biológico, projetando desta forma sombras da amostra diretamente sobre a superfície do sensor. Com isso, é possível gerar assinaturas holográficas do material a ser estudado, possibilitando a obtenção de imagens da amostra biológica [7]. Essas imagens são obtidas através da técnica de holografia digital *in-line*, na qual o feixe de luz emitido pelo LED, apontado a um pequeno orifício (pinhole), gera o fenômeno de difração da luz. [4]. A Figura 1 exemplifica o sistema de imageamento.

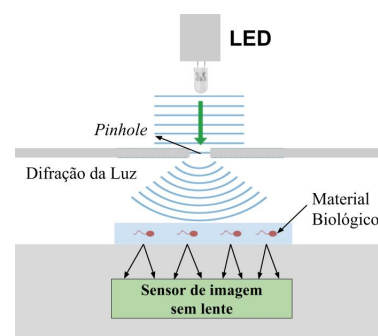


Fig. 1: Funcionamento de um sistema de captura de imagens através da técnica de holografia digital *in-line*.

O desenvolvimento em equipamentos para diagnóstico de pronto atendimento, com a finalidade de utilização em países

em desenvolvimento ou áreas limitadas em recursos, está sendo bastante ativa e abordada por pesquisadores e entidades governamentais [8]. Estes aparelhos são chamados de POC (Point-of-Care), e precisam atender requisitos como robustez, baixo custo e de facilidade de uso. A vantagem de se obter diagnósticos com dispositivos POC está na rapidez da obtenção de resultados, não sendo necessário o transporte das amostras para um laboratório de análise. Além disso, eles permitem com maior facilidade a realização da análise, que pode ser feita por médicos, enfermeiros, auxiliares, ou até mesmo pelo paciente [5].

Nesse sentido, a pesquisa proposta tem relevância por ser uma solução com potencial de reduzir custos do tradicional exame de espermograma, além de agilizar e simplificar o processo de obtenção de dados a respeito da fertilidade masculina.

II. DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento do reconhecedor de espermatozoides foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consiste na remoção das ondas gêmeas ao redor dos mesmos. Estas ondas gêmeas são comuns nas imagens holográficas [2]. A segunda etapa consiste no método radial de reconhecimento de espermatozoides, a qual é realizada uma análise dos possíveis espermatozoides presentes na imagem. Segunda etapa depende do resultado da primeira etapa para obter melhores resultados.

A remoção das ondas gêmeas foi necessário devido à dificuldade encontrada para classificar os espermatozoides com esse ruído presente ao redor do material biológico destacado na Figura 2.

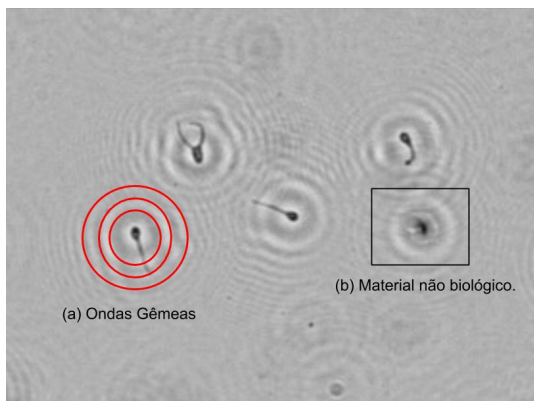


Fig. 2: (a) Ondas gêmeas ao redor do material biológico. (b) Material não biológico.

Para fins de validação no desenvolvimento deste trabalho, considera-se que uma imagem obtida através de microscópios geométricos sendo como ideal para o reconhecimento dos espermatozoides. Esta imagem obtida através de um microscópio é útil para comparar o quanto o método de remoção das ondas gêmeas foi efetivo ao remover ou amenizar os ruídos presentes na imagem holográfica. Além disso, esta imagem sem os ruídos das ondas gêmeas se mostra ideal para o método radial de reconhecimento, não gerando alterações secundárias no gráfico de análise.

Neste trabalho, os espermatozoides capturados pela técnica de holografia em linha tem cerca de $1/4$ da resolução de um espermatozoide capturado por microscópios tradicionais. Além disso, os detalhes da região do acrossoma situado na cabeça e da região secundária do espermatozoide podem ser vistos na imagem obtida com microscópios geométricos, o qual não é possível de se verificar na imagem holográfica. Por último, os valores de intensidade dos pixels da imagem microscópica tendem a serem maiores do que os da imagem holográfica. A comparação entre a resolução das imagens está presente na Figura 3.

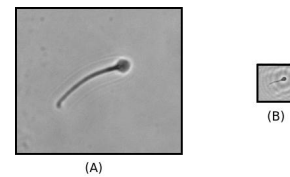


Fig. 3: a) Tamanho da imagem obtida através de um microscópio geométrico. (b) Tamanho da imagem obtida através da técnica de imageamento de holografia em linha.

A. Remoção das ondas gêmeas (twins) presentes nas imagens holográficas

Desde os primeiros experimentos na reconstrução de hologramas por Denis Gabor em 1951 até os mais recentes métodos de difração escalar para resolver problema da fase de uma onda de luz no holograma, a imagem obtida após o processo de reconstrução contém ondas gêmeas dos objetos capturados com o sistema de imageamento holográfico. Estas ondas gêmeas estão dispostas ao redor dos objetos capturados nas imagens. Em um sistema de imageamento holográfico em linha (in-line) a curta distância entre a fonte de luz, e o objeto de análise implica em ondas gêmeas bem próximas ao objeto capturado na imagem reconstruída. A proximidade entre as ondas gêmeas e o objeto capturado podem gerar ruídos prejudiciais na imagem reconstruída [2].

Tentativas para amenizar ou remover essas ondas gêmeas foram propostas por diversos autores, inclusive o próprio criador da holografia, Denis Gabor. Essas propostas são baseadas na modificação do equipamento de captura holográfico, em modificações nos métodos de difração escalar e em um pós-processamento nas imagens holográficas já reconstruídas. Para o presente trabalho, o esforço para a remoção das ondas gêmeas está situado em filtragens após o resultado de um método escalar de difração.

Para a remoção das ondas gêmeas no presente trabalho desenvolvido, foram realizadas seis etapas para conseguir o resultado desejado. As etapas no algoritmo são as seguintes:

- 1) Aplicação do algoritmo de *Mean-Shift*: este algoritmo consiste em identificar áreas com uma maior densidade. Esta é a principal e mais efetiva etapa na remoção das ondas gêmeas no trabalho desenvolvido.
- 2) Realce da imagem: nesta etapa, a imagem é realçada a fim de destacar a intensidade dos pixels dos espermatozoides.

- 3) Dilatação seguida de erosão: esta etapa consiste em corrigir alguns espaços vazios no espermatozoide, vazios os quais foram criados pelo algoritmo de *Mean-Shift*. Espaços vazios provocados são dilatados e erodidos, desta forma esta etapa provoca a união de partes soltas dos espermatozoides.
- 4) Remoção de partes das ondas gêmeas que não foram removidas na primeira etapa através de filtragens na intensidade de alguns pixels.
- 5) Nova dilatação seguida de erosão: esta etapa consiste em corrigir os espaços vazios nos espermatozoides criados pela etapa quatro. Esses espaços são ocasionados pela próxima similaridade dos valores de pixels das caudas dos espermatozoides com as ondas gêmeas.
- 6) Remoção dos ruídos remanescentes: esta etapa consiste em remover todos os ruídos que as cinco etapas anteriores não conseguiram remover. Ela é feita através da detecção dos contornos presentes na imagem, e dependendo do tamanho da sua área, elas são eliminadas.

A Figura 4 contém a imagem original holográfica juntamente com a imagem obtida através dos procedimentos realizados nas seis etapas, demonstrando desta forma os resultados obtidos deste algoritmo desenvolvido.

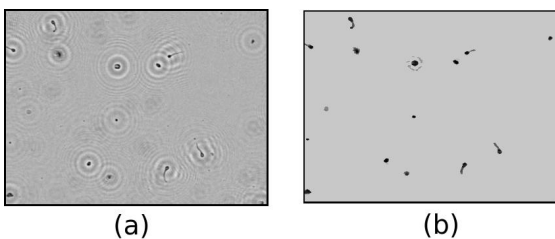


Fig. 4: (a) Imagem holográfica de entrada. (b) Resultado do processamento na remoção das ondas gêmeas.

B. Método de análise radial

Este método tem como objetivo analisar as imagens determinando se o objeto de análise presente é um espermatozoide. Para isto, foi desenvolvido um método que realiza uma análise radial, tendo como centro dos círculos de análise a região intermediária do espermatozoide situada entre a cabeça e a cauda. Este método cria um gráfico, empregando regressão polinomial, a fim de se obter as equações dos gráficos gerados, permitindo desta forma uma análise das equações obtidas.

A primeira etapa do algoritmo desenvolvido para esta Seção do documento se encarrega de detectar e armazenar possíveis cabeças de espermatozoides distribuídas em imagem holográfica de entrada, processada pelo método de remoção das ondas gêmeas. Esta etapa foi considerada importante, pois a cabeça de uma célula reprodutiva masculina contém um formato circular, o qual auxilia na detecção e reconhecimento pelo algoritmo desenvolvido.

Para julgar se os contornos obtidos na imagem contém a cabeça de um espermatozoide, assume-se que a cabeça da célula reprodutiva seja uma elipse, ou seja, um formato geométrico onde a soma das distâncias entre dois pontos fixos em plano é uma constante. Uma elipse e seus elementos são

comparados ao lado de uma cabeça de um espermatozoide na Figura 5.

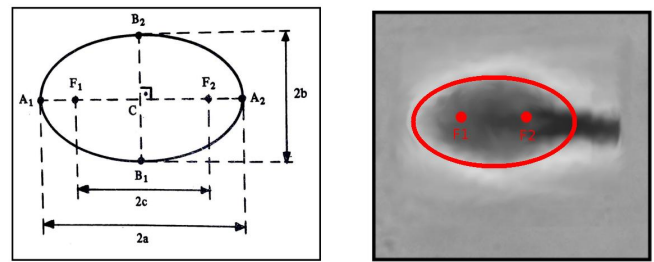


Fig. 5: (a) Elipse (b) Cabeça de um espermatozoide apresentando um formato semelhante a uma elipse.

A terceira e última etapa do algoritmo de reconhecimento de espermatozoides, tem como objetivo, gerar um gráfico a partir do objeto de análise, o qual será utilizado para reconhecer se aquele objeto é um espermatozoide. Para gerar este gráfico, era importante que fosse elaborado um método que evidenciasse as características morfológicas de um espermatozoide, as quais poderiam ser analisadas matematicamente posteriormente. Para isso, imaginou-se um segmento de reta com um valor de comprimento k o qual seria rotacionado a partir do ponto de coordenadas (x,y) estabelecido na segunda etapa deste algoritmo, um ponto próximo à parte intermediária do espermatozoide. Na ponta deste segmento de reta, é colocado um retângulo possuindo uma área fixa e previamente estabelecida, que será utilizada para extrair a média dos valores de pixels. Este retângulo juntamente com o segmento de reta é rotacionado 360° graus ao redor do espermatozoide a partir da coordenada (x,y) previamente estabelecida, colidindo em áreas como a cabeça e como a flagelo. A cada passo que o algoritmo realiza na rotação ele gera uma média de intensidade dos pixels dentro do retângulo, e este valor é colocado em um gráfico. A rotação é constituída de passos constantes, em um valor de 5° graus por iteração. Este valor de passo foi escolhido por manter as características necessárias para julgamento e pra manter performance aceitável do algoritmo. A Figura 6 exemplifica a rotação que o algoritmo realiza ao redor dos objetos analisados.

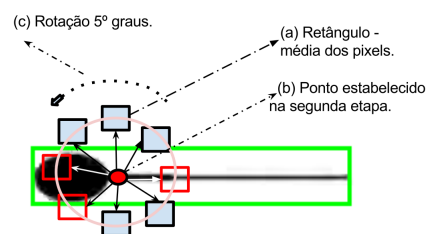


Fig. 6: Método radial de reconhecimento de espermatozoides.

Para gerar um gráfico, ao decorrer das iterações, é *plotado* no eixo y o valor da média encontrada no retângulo previamente estabelecido. O eixo x deste gráfico representa o valor de 0° a 360° graus. Este algoritmo irá gerar um gráfico, o qual está presente na Figura 7.

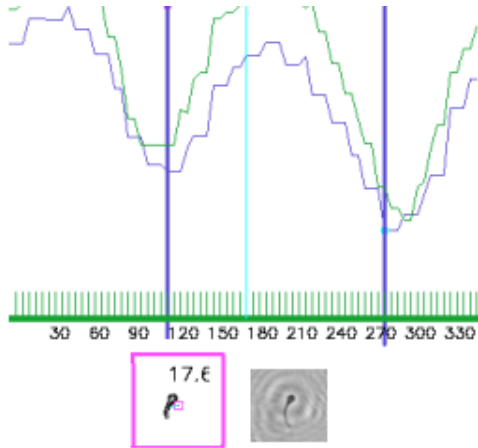


Fig. 7: Método radial de reconhecimento de espermatozoides.

Devido ao fato que o espermatozoide fica em posições aleatórias em uma imagem, teve-se a ideia de gerar dois gráficos diferentes para o mesmo espermatozoide. Para isso, o tamanho do segmento de reta que liga o ponto da região intermediária do espermatozoide ao retângulo de análise é aumentado em 20% na segunda geração de gráfico. Estes dois gráficos irão conter diferenças, pois irão atingir regiões diferentes da cabeça e da cauda do espermatozoide. As colisões que acontecem na cauda determinam como que esta cauda está orientada em relação à cabeça do espermatozoide. Nota-se com isso um deslocamento das parábolas geradas no segundo gráfico em relação ao primeiro gerado. Esse deslocamento das parábolas evidencia que a cauda está em um formato contendo dobramentos. Este exemplo de formato de cauda e a geração do novo gráfico no mesmo espermatozoide podem ser visto na Figura 8.

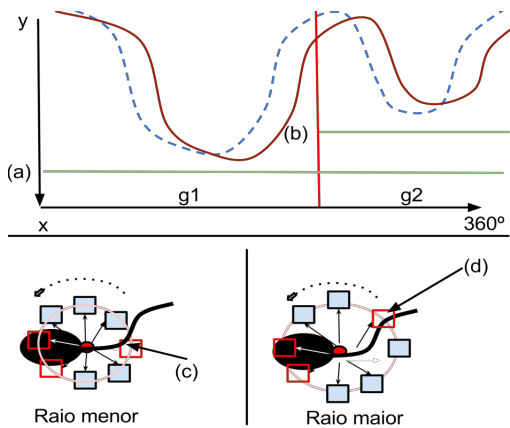


Fig. 8: Gráficos gerados, o primeiro tracejado é gerado com um menor segmento de reta entre a região intermediária da célula com o retângulo de análise, o segundo gráfico com uma linha uniforme contém um maior segmento de reta.

Na Figura 8 nota-se que aumentando o segmento de reta, o retângulo de análise irá passar por regiões as quais não passou pelo primeiro gráfico. Como a cauda do espermatozoide de exemplo está curvada, ela também irá gerar um padrão di-

ferenciado do que o primeiro gráfico. Essas informações são úteis para realizar uma correta identificação.

Com a obtenção das coordenadas destes dois gráficos, estes são repartidos ao meio para gerar quatro parábolas, duas do primeiro gráfico com uma possível cabeça e cauda e duas do segundo gráfico também tendo uma possível cauda.

Tendo estas quatro equações quadráticas o algoritmo chama um método matemático de regressão polinomial implementada pela biblioteca GNU Scientific Library (GSL). O método de regressão polinomial irá encontrar uma equação de segundo grau que tente representar ao máximo os pontos das coordenadas dos objetos de análise. Desta forma, como o algoritmo gerou quatro parábolas, quatro regressões polinomiais deverão ser realizadas e quatro funções quadráticas distintas são obtidas.

Com as funções obtidas pelo método de regressão polinomial, para cada uma dessas equações é realizado um cálculo de ponto máximo no eixo x e y , as quais estão destacadas nas linhas azuis na Figura 7. Estes valores serão utilizados para analisar a distância que eles possuem um dos outros. Os máximos muito próximos ou muito longes podem indicar que o objeto analisado não é um espermatozoide. Desta forma estes valores de máximos obtidos são utilizados para descartar o reconhecimento do objeto ali presente. Além de verificar a diferença entre os pontos máximos, o algoritmo se encarrega de verificar se o tamanho dos pontos máximos possuem alguma similaridade. A Figura 9 exemplifica essa distância que ocorre entre os máximos das equações.

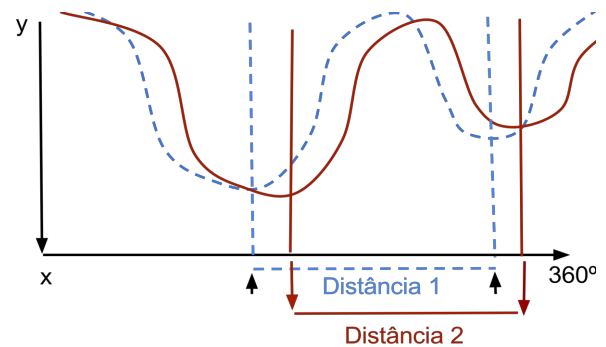


Fig. 9: Distância entre os máximos das equações em um gráfico de um espermatozoide.

Quando o método radial analisa um espermatozoide, gerando um gráfico como o da Figura 9, nota-se certa similaridade entre os gráficos. Desta forma o algoritmo desenvolvido atribui diversos valores para x nas funções obtidas pela regressão polinomial e os compara com os valores reais obtidos. Quando os valores são demasiadamente diferentes eles são descartados como um espermatozoide. Um espermatozoide é reconhecido se passar por todos estes critérios apresentados nesta seção do documento.

III. EXPERIMENTOS E RESULTADOS

Para a avaliação do trabalho desenvolvido, foi realizado um experimento contendo três imagens holográficas obtidas por imageamento em linha, realizando uma comparação com

imagens obtidas por microscópios convencionais. As imagens estão presentes na Figura 10.

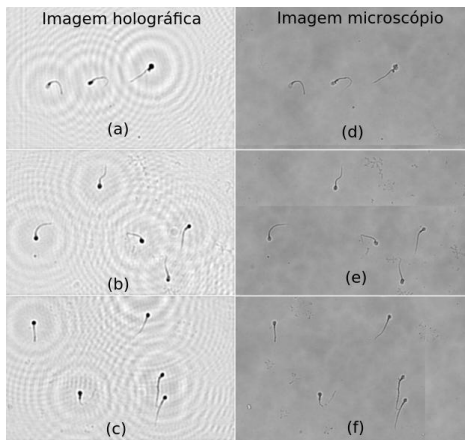


Fig. 10: (a), (b) e (c) são imagens holográficas de autoria [8]. Os itens (d), (e) e (f) são imagens microscópicas obtidas de um microscópio convencional [8].

Nas três imagens utilizadas no experimento, notou-se que a perda de informação foi mais acentuada nas caudas das células reprodutivas. Pouco se notou em perda de informação na cabeça dos espermatozoides. Além disso, notou-se uma maior degradação de informação em espermatozoides com menores quantidades de pixels para representá-los.

A Figura 11 apresenta o resultado do método proposto, evidenciando um acerto de 93.33% no reconhecimento dos espermatozoides presentes nas imagens holográficas. Utilizando as imagens imageadas pelo microscópio convencional, o método reconheceu todos os espermatozoides ali presentes.

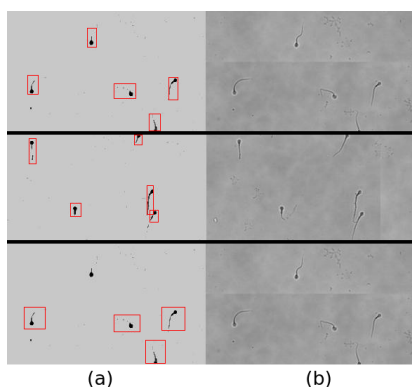


Fig. 11: (a) Imagem holográfica com as ondas gêmeas removidas. (b) Imagem de um microscópio convencional. Retângulos em vermelho indicam o reconhecimento do método radial de reconhecimento.

A média de acerto do algoritmo caiu na terceira imagem, onde os espermatozoides continham uma quantidade menor de pixels, ou seja, uma menor área. Uma das possíveis causas dessa diminuição na taxa de acerto na terceira imagem se deve

pela degradação de informação nas caudas dos espermatozoides na remoção das ondas gêmeas.

IV. CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido reconheceu 93.33% dos espermatozoides nas imagens holográficas, e 100% das imagens de um microscópio convencional. O método radial de reconhecimento de espermatozoides evidenciou padrões semelhantes dos espermatozoides através dos gráficos que o sistema gera. Estes gráficos, e as suas funções obtidas por meio de regressão polinomial, além de parcialmente reconhecer os espermatozoides presentes nas imagens, conseguem diferenciar do que é um objeto a ser analisado e o que é informação de *background* na imagem. Este fato permite a obtenção de um *ground truth*, o qual pode ser utilizado em outros trabalhos.

Além disso, o método radial de reconhecimento foi capaz de gerar gráficos que evidenciam problemas na morfologia padrão de um espermatozoide. Os gráficos gerados refletem características como uma dupla cauda, ou uma proporção inesperada da morfologia padrão. Nestes cenários de problemas na morfologia, o algoritmo desenvolvido não reconhece estes espermatozoides.

As informações geradas pelo método desenvolvido neste trabalho poderão ser utilizados em novas interpretações e abordagens para o reconhecimento e análise morfológica dos espermatozoides. Além disso, futuros trabalhos poderão abordar o tema da remoção das ondas gêmeas presentes no imageamento holográfico digital *in-line*. Este trabalho poderá ser realizado na etapa de aplicação dos métodos de difração escalar na imagem holográfica e/ou através de um pós-processamento da imagem reconstruída por um método de difração escalar.

REFERÊNCIAS

- [1] Tatiana Moreira da Silva. *Efeito do Ácido Fólico nos Principais parâmetros do Spermograma de Homens Subférteis*. PhD thesis, Universidade Federal de Goiás, 2012.
- [2] Hennelly et. al. Review of twin reduction and twin removal techniques in holography. 2009.
- [3] D. GABOR. A new microscopic principle. *Nature*, 161(4098):777–778, may 1948.
- [4] Jorge Garcia-Sucerquia, Wenbo Xu, Stephan K. Jericho, Peter Klages, Manfred H. Jericho, and H. Jürgen Kreuzer. Digital in-line holographic microscopy. *Appl. Opt.*, 45(5):836–850, Feb 2006.
- [5] Vladimir Gubala, Leanne F. Harris, Antonio J. Ricco, Ming X. Tan, and David E. Williams. Point of care diagnostics: Status and future. *Analytical Chemistry*, 84(2):487–515, jan 2012.
- [6] Barry R Masters. *History of the Optical Microscope in Cell Biology and Medicine*. John Wiley Sons, Ltd, 2001.
- [7] SangJun Moon, Umut Atakan Gurkan, Jeffrey Blander, Wafaie W. Fawzi, Said Aboud, Ferdinand Mugusi, Daniel R. Kuritzkes, and Utkan Demirci. Enumeration of cd4+ t-cells using a portable microchip count platform in tanzanian hiv-infected patients. *PLOS ONE*, 6(7):1–8, 07 2011.
- [8] Antônio Carlos SOBIERANSKI. *Proposta de uma Plataforma de Imageamento Microscópico Portátil sem Lentes de Amplo Campo de Visão Baseado em Holografia Digital In-line e Resolução por Multi-Frame*. PhD thesis, Universidade Federal do Paraná, 2015.