

SISTEMA DE VISÃO COMPUTACIONAL PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA E DE MOTILIDADE DE POPULAÇÕES DE ESPERMATOZÓIDES

A. Francisco Júnior¹, D. G. Smidt², E. Borges Jr³

RESUMO -- Descreve-se o desenvolvimento e aplicação de um sistema de visão computacional para processar dados visuais de populações de espermatozoides. Com o intuito de guiar o especialista em análise seminal na execução de exames espermáticos, utilizou-se um sistema de visão por computador que atua desde a aquisição em tempo real de imagens até a extração de dados morfológicos e de motilidade. O problema de análise de movimento das células pode ser resumido como o problema de casamento entre conjuntos de pontos (células de dois quadros consecutivos de imagem) de uma população densa de pequenas células movendo-se independentemente. Um algoritmo rápido e efetivo foi utilizado baseado na distância entre quadros e num procedimento de verificação. A avaliação final, cruzando-se os resultados automaticamente obtidos e os valores esperados subjetivamente, foi considerada suficientemente boa para o propósito principal do sistema. Em 52 ciclos de inseminação terapêutica e em 15 ciclos de fertilização *in vitro*, foi notado que os parâmetros de concentração de células, motilidade, velocidade média e linearidade não são consideravelmente diferentes para indicar capacidade de fertilidade, o que não ocorre com o parâmetro de motilidade efetiva. Portanto, a motilidade efetiva medida pelo sistema de visão por computador provou ser um bom indicador de fertilidade masculina nestes experimentos. Os resultados produzidos pelo sistema computadorizado foram reprodutíveis com coeficiente de variação que não excedeu 15%, para todos os parâmetros avaliados. Enfatiza-se que o uso de um sistema de visão computacional para análise de sêmen humano permite de forma rápida e objetiva a obtenção de resultados geralmente impossíveis de serem obtidos por métodos convencionais.

Palavras-chave: Análise Automática de Sêmen, Visão Computacional, Lógica Nebulosa

INTRODUÇÃO

O Sistema Sêmen-Análise, constituído pelo *software* "Seminal-Soft" e por um *hardware* específico, é um sistema de visão por computador (visão computacional) (Horn, 1986) desenvolvido para automatizar exames do tipo espermogramas. Através deste sistema computadorizado é possível

¹ INPE/LAC Av. dos Astronautas, 1758, CEP. 12.210-100, São José dos Campos, SP, tel: +55- 012-325-6825, e-mail: kico@lac.inpe.br

² Atonus Engenharia de Sistemas Ltda, Rua Francisco Paes, 56, POLOVALE 12.242-901 São José dos Campos, SP, tel: +55-012-341-7585 r: 209, e-mail: atonus@polovale.softex.br

³ Fertility - Centro de Fertilização Assistida, Av. Brigadeiro Luís Antônio, 4258, Jd. Paulista, CEP. 01402-002, São Paulo, SP tel: +55- 011-885-6719 / 885-9858

o usuário executar de forma confiável e num prazo de tempo inferior a qualquer processo manual, os exames de concentração de espermatozoides por mililitro, motilidade, velocidade, velocidade efetiva e da morfologia.

Além da execução do exame, o sistema permite a catalogação de pacientes num banco de dados bem como o armazenamento de todas as informações relevantes a um exame de espermograma. Desta forma, o sistema Sêmen-Análise cria um ambiente de trabalho caracterizado pela confiabilidade, versatilidade, facilidade de manuseio e de configuração, velocidade de obtenção de resultados e catalogação, permitindo que seja atingido um alto nível de automação em laboratórios, clínicas, empresas e universidades.

MATERIAIS

O diagrama em blocos do sistema Sêmen-Análise é apresentado na Figura 1.

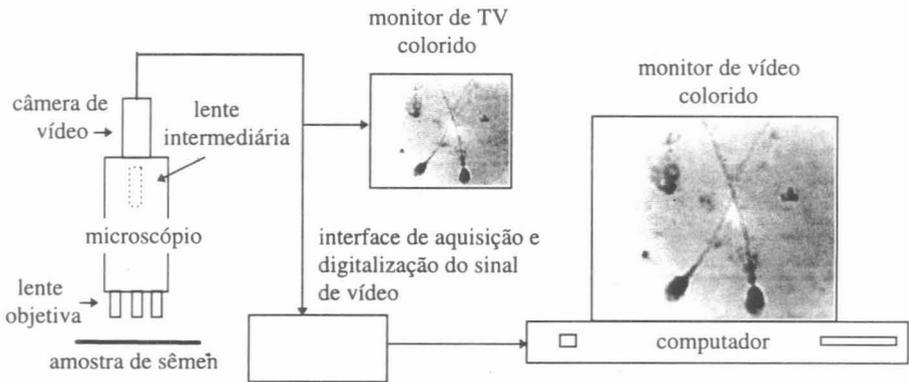


Figura 1. Diagrama em blocos do sistema Sêmen-Análise

Configuração do Sistema (*Hardware*)

Para permitir a completa automação de exames de espermograma, faz-se necessário que se possua um microscópio com as seguintes características: contraste de fase, ajuste manual de luminosidade, saída para câmera fotográfica com aumento intermediário (lente entre a amostra ampliada e a câmera) de 5x, lente objetiva de 20x (para execução de exames de Motilidade), e lente objetiva de 40x (para execução de exames de Morfologia). Além do microscópio, o Sêmen-Análise utiliza os seguintes equipamentos:

- um computador IBM-PC compatível com monitor de vídeo colorido,
- um monitor de TV colorido,
- uma câmera de vídeo,

- uma interface de aquisição e digitalização do sinal de vídeo,
- uma câmara de Makler (Makler-Haifa, Israel).

Note que a interface de aquisição e digitalização do sinal de vídeo converte as imagens geradas pela câmara de vídeo em imagens digitais. Esta interface é capaz de adquirir imagens na taxa de aquisição máxima de 30 quadros/segundo para uma resolução de imagem de 320 x 240 elementos de imagem (*pixels*).

METODOLOGIA

Dentre as diversas áreas da ciência da computação utilizadas no desenvolvimento do *software* Seminal-Soft, parte central do sistema Sêmen-Análise, ressalta-se a visão por computador como a de maior abrangência. Utilizando-se técnicas de visão computacional, são medidos diversos parâmetros relevantes à classificação das células e trajetos a partir das imagens adquiridas pelo sistema. A classificação morfológica e de motilidade das células é feita através de *lógica nebulosa* (Driankov *et alii*, 1993).

Algoritmos de Visão Computacional (Software)

Cada célula possui um *bloco descritor de célula* contendo informações relativas a célula, como por exemplo, a área da cabeça da célula, fator de elipse, identificação, e ponteiros para outras células no próximo quadro de sequência (quando se está analisando o movimento da célula).

Análise de Motilidade -- Para a efetivação deste exame recomenda-se utilizar lentes de 20x para objetiva e lente intermediária de 5x, além da câmara de Makler e microscópio em contraste de fase.

A primeira etapa para a computação dos parâmetros de motilidade, é a aquisição de um filme digital (sequência de diversas imagens digitais) do sêmen em análise. Para se permitir a detecção e rastreo automático de cada célula, este filme deve ser adquirido utilizando-se o microscópio no modo de contraste de fase. Desta forma, a cabeça das células estarão mais claras que o meio onde estas células se encontram (o fundo). O processo de detecção automática das células, denominado *segmentação*, é realizado pelo sistema comparando-se a intensidade da imagem adquirida com um limiar de intensidade pré-estabelecido. Ou seja, pedaços de imagem acima deste limiar são considerados como parte da cabeça da célula, e pedaços da imagem com intensidade abaixo deste limiar são considerados parte do fundo. Após a segmentação da imagem, as células estarão com nível 1 e o fundo com nível 0 de intensidade. Este tipo de imagem (contendo somente zeros e uns) é denominada *imagem binária*. O sistema utiliza esta imagem binária para computar os baricentros das células (Haralick e Shapiro, 1992), os quais serão utilizados no algoritmo de rastreo.

O algoritmo de rastreo seleciona sequencialmente, da esquerda para a direita e de cima para baixo de cada quadro de imagem todo baricentro contido neste quadro, denominando de *baric(i,t)* o baricentro *i* do quadro de imagem *t* da sequência de imagens (o filme). Para cada *baric(i,t)*, o algoritmo de rastreo verifica quais baricentros de células pertencentes ao quadro *t+1* são candidatos a serem correspondentes a mesma célula. O critério utilizado para a busca de baricentros correspondentes é a velocidade máxima esperada para cada célula em movimento. Caso haja apenas

um baricentro candidato, este baricentro $baric(k,t+1)$ é imediatamente conectado ao baricentro $baric(i,t)$, dando origem a um pedaço de trajetória (neste caso entre os quadros t e $t+1$). Caso haja mais de um baricentro candidato a casamento com $baric(i,t)$ no quadro $t+1$, o sistema colocará o baricentro $baric(i,t)$ em uma fila denominada *baricentros indeterminados*, para posterior análise. Portanto a fila de baricentros indeterminados contém todos os baricentros de um quadro que possuem múltiplas possibilidades de casamento no quadro seguinte. Após a análise de todos os demais baricentros, o algoritmo retira os baricentros da fila de baricentros indeterminados de forma a tentar o casamento mais uma vez. Todo baricentro retirado desta fila que possuir apenas um candidato a casamento será considerado casado, e portanto não retornará a fila. Este procedimento se repete até que não haja mais baricentros na fila de baricentros indeterminados ou que não haja casamento em uma iteração. O casamento de baricentros prossegue entre quadros consecutivos até que todos os quadros do filme sejam analisados. Após esta etapa, estão disponíveis no sistema as trajetórias de todas as células cuja imagem está registrada no filme. Os parâmetros de motilidade são então calculados a partir destas trajetórias.

O sistema analisa a trajetória de cada espermatozóide, classificando-a conforme os padrões definidos como: Móvel Não Progressivo, Linear Lento, Linear Rápido e Imóvel. Para um dado trajeto, a análise computadorizada atribui um valor de possibilidade (lógica nebulosa) do trajeto pertencer a uma determinada classe. O trajeto é classificado selecionando-se a classe com maior valor de possibilidade.

O usuário pode adquirir tantos filmes quanto se queira, com o objetivo de colher dados de trajetória de diversos campos do sêmen. O resultado desta análise é armazenado num banco de dados para posterior impressão do mesmo.

Análise Morfológica -- Para a efetivação deste exame recomenda-se utilizar lente objetiva de 40x e lente intermediária de 5x. A lâmina contendo células para análise morfológica deve ter sido corada de forma a possibilitar a boa visualização da cabeça da célula e respectivo acrossoma.

A primeira etapa deste exame consiste na aquisição de uma imagem da lâmina corada contendo as células. Cada célula é selecionada manualmente pelo usuário. O sistema analisa morfolologicamente a cabeça da célula, classificando-a conforme os padrões definidos como: Normal, Afilada, Redonda, Macro, Micro ou Amorfo. Os parâmetros automaticamente obtidos pelo sistema são: área da cabeça, percentual de acrossoma, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e fator de elipse. A obtenção automática destes parâmetros é efetuada supondo que a cabeça da célula tem o formato de uma elipse. Calcula-se a área e os segundos momentos associados a uma região com tal formato. De posse destes momentos, pode-se calcular os tamanhos dos diâmetro máximo e mínimo da elipse, e portanto o fator de elipse. Para uma dada célula, a análise computadorizada atribui um valor de possibilidade (lógica nebulosa) a célula pertencer a uma determinada classe. A célula é classificada selecionando-se a classe com maior valor de possibilidade.

O usuário pode adquirir tantas imagens quanto se queira, com o objetivo de colher células de diversos campos da lâmina corada. O resultado desta análise é armazenado num banco de dados para posterior impressão do mesmo.

Classificação por Lógica Nebulosa (*Fuzzy Logic*)

A classificação de trajetos e células por lógica nebulosa foi adotada por se tratar do modelo mais adequado neste caso, já que este modelo permite o usuário especificar cada classe de forma menos rígida. Em lógica clássica, um elemento pode ser membro de um conjunto (por exemplo, atribuindo-se o valor 1) ou não ser membro deste conjunto (valor 0). Na lógica nebulosa, a pertinência de um dado elemento a um certo conjunto pode assumir um valor de possibilidade no intervalo [0, 1], refletindo a crença deste elemento pertencer ao conjunto (classe) em questão.

A lógica nebulosa é uma ferramenta mais adequada que a lógica clássica, neste caso, pois permite ao usuário mapear o seu conhecimento em termos de grandezas numéricas sem que ele precise se preocupar com a mútua exclusão entre classes.

Após a especificação dos parâmetros e respectivos valores numéricos que definem cada classe, o sistema está apto a classificar as células. Dado um conjunto de medidas extraídas de uma célula pelo sistema Sêmen-Análise, a possibilidade desta célula pertencer a uma classe é calculada tomando-se o valor mínimo das possibilidades das medidas da célula satisfazerem os diversos parâmetros daquela classe.

Análise de Motilidade -- Os parâmetros medidos automaticamente pelo sistema e utilizados para classificar os trajetos são os seguintes: Velocidade Curvilínea, Velocidade Linear, e Linearidade. A velocidade curvilínea é obtida dividindo-se o tamanho absoluto do trajeto de uma célula pelo intervalo de tempo que a célula gastou para percorrer este trajeto t_{traj} . A velocidade linear é obtida dividindo-se a distância euclidiana percorrida pela célula por t_{traj} . A linearidade, para velocidades curvilínea e linear diferentes de zero, é a razão entre a velocidade linear e a velocidade curvilínea. Quando as velocidades curvilínea e linear são iguais a zero, a linearidade é fixada em zero.

Cada espermatozóide pode ser classificado, pelos parâmetros de trajeto, como: Móvel Não Progressivo, Linear Lento, Linear Rápido e Imóvel. A Tabela 1 mostra um exemplo de definição de parâmetros para cada classe.

Tabela 1. Definição de parâmetros de motilidade para classificação de trajetos.

Classificação	Velocidade Curvilínea		Linearidade	
	mínimo	máximo	mínimo	máximo
Móvel Não Progressivo	5	200	0	0,7
Linear Lento	15	30	0,7	1
Linear Rápido	30	200	0,7	1
Imóvel	0	5	-	-

Análise Morfológica -- Os parâmetros medidos automaticamente pelo sistema e utilizados para classificar as células segundo sua forma são os seguintes: percentual de acrossoma, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e fator de elipse. O percentual de acrossoma é obtido dividindo-se a área

do acrossoma pela área da cabeça. O fator de elipse é obtido dividindo-se o diâmetro mínimo pelo diâmetro máximo.

Cada célula pode ser classificada, pelos parâmetros de forma, como: Normal, Afilada, Redonda, Macro, Micro ou Amorfo. A Tabela 2 mostra um exemplo de definição de parâmetros para cada classe.

Tabela 2. Definição de parâmetros de forma para classificação morfológica das células.

Classificação	% acrossoma		diametro menor		diametro maior		fator de elipse	
	mínimo	máximo	mínimo	máximo	mínimo	máximo	mínimo	máximo
Normal	40	70	2,5	3,5	5	6	-	-
Afilado	-	-	1	2	6	20	-	-
Macro	-	-	3,5	-	6	-	-	-
Micro	-	-	-	2,5	-	5	-	-
Redondo	-	-	-	-	-	-	0,9	1,0

RESULTADOS

A Figura 2 apresenta uma amostra do tipo de resultado gerado pelo sistema Sêmen-Análise para um exame de Morfologia. A análise da cabeça do espermatozóide, conforme anteriormente citado, é feita automaticamente pelo sistema. Os dados da cabeça são então utilizados para classificar o espermatozóide, utilizando lógica nebulosa.

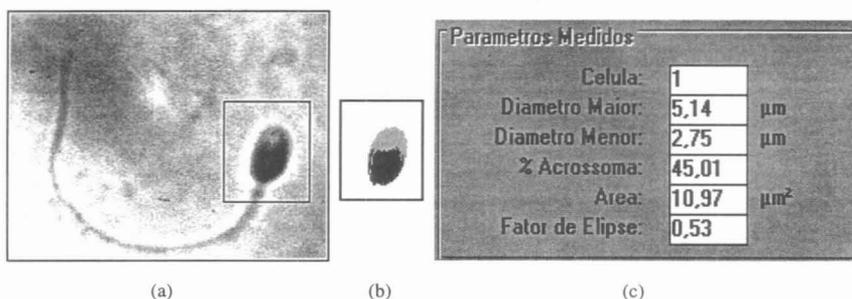
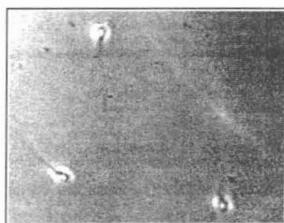


Figura 2. Exame de Morfologia. (a) imagem de uma célula capturada, (b) segmentação automática da cabeça da célula mostrando corpo e acrossoma, (c) Resultados da análise.

A Figura 3 apresenta uma amostra do tipo de resultado gerado pelo sistema Sêmen-Análise para um exame de Motilidade. A Figura 3.(a) apresenta uma das imagens adquiridas para o exame de motilidade. As demais imagens apresentam os espermatozóides que estão em movimento

localizados em posições de imagem diferentes da Figura 3.(a). A Figura 3.(b) apresenta o resultado da análise do trajeto do espermatozóide localizado no canto inferior esquerdo da Figura 3.(a). O sistema permite o usuário descartar qualquer trajeto analisado, visando assim evitar a computação errônea do resultado devido às impurezas contidas no sêmen.

A avaliação final dos resultados do sistema computadorizado foi feita através do cruzamento dos dados obtidos pelo sistema automático com os dados subjetivos fornecidos pelo operador. A correspondência dos resultados subjetivo e automático foi considerada satisfatória conforme publicado em Borges *et alii* (1993 e 1993b). Em 52 ciclos de inseminação terapêutica e 15 ciclos de fertilização in-vitro foi notado que os parâmetros de concentração de células, motilidade, velocidade média e linearidade não são consideravelmente diferentes para indicar fertilidade masculina. Por outro lado, a motilidade efetiva medida pelo sistema de visão computacional provou ser um bom indicador de fertilidade masculina.



(a)



(b)

Figura 3. Exame de Motilidade. (a) imagem de uma célula capturada, (b) Resultados da análise.

Adicionalmente, como enfatizado em Borges *et alii* (1994), repetidas análises da mesma amostra de sêmen realizadas pelo sistema computadorizado produziram resultados com coeficiente de variação inferior a 15%, para todos os parâmetros avaliados.

CONCLUSÕES

O uso de um sistema de visão computacional para análise de sêmen humano permite, de forma rápida e objetiva, a obtenção de resultados geralmente impossíveis de serem obtidos por métodos convencionais.

A tecnologia disponível atualmente para aquisição e processamento de imagens, tem permitido que sistemas de visão computacional venham a ser aplicados em tarefas de automação, onde a confiabilidade, versatilidade, facilidade de manuseio, e velocidade de obtenção de resultados se faz necessária. O uso de tais sistemas provê um alto nível de automação em laboratórios, clínicas, empresas e universidades.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pelo auxílio financeiro e ao núcleo POLOVALE de São José dos Campos pela infraestrutura.

REFERÊNCIAS

- BORGES JR., E., IACONELLI JR., A., AOKI, T. e SIMBOL, S. (1993). "Análise Seminal Computadorizada e Convencional: Estudo Comparativo". *XXIV Congresso Brasileiro de Urologia*.
- BORGES JR., E., IACONELLI JR., A., ORTIZ, V. e SIMBOL, S. (1993b). "Análise Seminal Computadorizada no Estudo da Capacidade Fértil do Espermatozóide". *IV Congresso Latino Americano de Esterilidade e Fertilidade*.
- BORGES JR., E., IACONELLI JR., A., AOKI, T., ORTIZ, V., SIMBOL, S. e VIEIRA, M. E. (1994). "Análise Seminal Computadorizada e Convencional: Estudo Comparativo". *Jornal Brasileiro de Urologia*, v. 20, n. 3, p. 133-137.
- DRIANKOV, D., HELLENDORRN, H. and REINFRANK, M. (1993). *An Introduction to Fuzzy Control*. Berlin: Springer-Verlag.
- HARALICK, R. M. and SHAPIRO, L. G. (1992). *Computer and Robot Vision*. Reading: Addison-Wesley.
- HORN, B. K. P. (1986). *Robot Vision*. Cambridge, Massachusetts: MIT Press and Mc Graw-Hill.

COMPUTER VISION SYSTEM FOR MOTILITY AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF SPERMATOZOA POPULATIONS

A. Francisco Júnior¹, D. G. Smidt², E. Borges Jr.³

ABSTRACT -- The development and the application of an automatic computer vision system to process visual data from a spermatozoa population is described. From the real time image acquisition to the final extracted parameters of motility and morphology, a computer based strategy was used in order to guide the expert in semen analysis towards an objective procedure. The motion analysis problem can be synthesized as a matching problem between the feature point sets (cells of two consecutive image frames) of a dense population of independent moving small sized cells. A fast and effective matching algorithm was used based on both the inter frame distance of each cell and on a verification procedure. The final evaluation, crossing the automatic computed results and the subjective expected values, was considered good enough for the main purpose of the automatic system. In a 52 cycles of therapeutic insemination and 15 cycles of fertilization *in vitro* it was noticed that the parameters of cell concentration, motility, mean velocity and linearity are not considerably different to indicate pregnant capability but not the parameter of effective motility. Therefore, the effective motility measured by the computer vision system proved to be a good indicator of pregnancy on that experiments. Additionally, the results of the computerized system were reproducible with a variation coefficient smaller than 15% in all evaluated parameters. It should be emphasized that using computer vision systems for semen analysis provide a very fast, reproducible and objective results enabling data acquisition generally impossible to be measured using conventional methods.

Key-words: Automatic Semen Analysis, Computer Vision, Fuzzy Logic

¹ INPE/LAC Av. dos Astronautas, 1758, CEP. 12.210-100, São José dos Campos, SP
tel: +55- 012-325-6825, e-mail: kico@lac.inpe.br

² Atonus Engenharia de Sistemas Ltda, Rua Francisco Paes, 56, POLOVALE 12.242-901 São José dos Campos, SP, tel: +55-012-341-7585 r: 209, e-mail: atonus@polovale.softex.br

³ Fertility Centro de Fertilização Assistida, Av. Brigadeiro Luís Antônio, 4258, Jd. Paulista, CEP. 01402-002, São Paulo, SP tel: +55- 011-885-6719 / 885-9858