

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

GIOVANO NEUMANN

Influência da qualidade de imagens e técnicas de rastreamento nos resultados de análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) em peixes

Toledo

2019

GIOVANO NEUMANN

Influência da qualidade de imagens e técnicas de rastreamento nos resultados de análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) em peixes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Toledo

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Neumann, Giovano

Influência da qualidade de imagens e técnicas de rastreamento nos resultados de análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) em peixes / Giovano Neumann; orientador(a), Robie Allan Bombardelli, 2019.
75 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Graduação em Engenharia de Pesca Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2019.

1. CASA-Mot. 2. Software livre. 3. Análise espermática.
4. Peixes. I. Bombardelli, Robie Allan. II. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Toledo



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE GIOVANO NEUMANN, ALUNO(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E ENGENHARIA DE PESCA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE, E DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO PROGRAMA E O REGIMENTO GERAL DA UNIOESTE.

Ao(s) 08 dia(s) do mês de março de 2019 às 13h30, no(a) Unioeste, Toledo – Auditório do GERPEL, realizou-se a sessão pública da Defesa de Tese do(a) candidato(a) Giovano Neumann, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca - nível de Doutorado, na área de concentração em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca. A comissão examinadora da Defesa Pública foi aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca. Integraram a referida Comissão os(as) Professores(as) Doutores(as): Robie Allan Bombardelli, Paulo Vanderlei Sanches, Gilmar Baumgartner, Jurandir Joaquim Bernardes Júnior, Vanessa Yuri de Lima. Os trabalhos foram presididos pelo(a) Robie Allan Bombardelli, orientador(a) do(a) candidato(a). Tendo satisfeito todos os requisitos exigidos pela legislação em vigor, o(a) candidato(a) foi admitido(a) à Defesa de TESE DE DOUTORADO, intitulada: "Influência da qualidade de imagens e técnicas de rastreamento nos resultados da análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) em peixes". O(a) Senhor(a) Presidente declarou abertos os trabalhos, e em seguida, convidou o(a) candidato(a) a discorrer, em linhas gerais, sobre o conteúdo da Tese. Feita a explanação, o(a) candidato(a) foi arguido(a) sucessivamente, pelos(as) professores(as) doutores(as): Paulo Vanderlei Sanches, Gilmar Baumgartner, Jurandir Joaquim Bernardes Júnior, Vanessa Yuri de Lima. Findas as arguições, o(a) Senhor(a) Presidente suspendeu os trabalhos da sessão pública, a fim de que, em sessão secreta, a Comissão expressasse o seu julgamento sobre a Tese. Efetuado o julgamento, o(a) candidato(a) foi APROVADO. A seguir, o(a) Senhor(a) Presidente reabriu os trabalhos da sessão pública e deu conhecimento do resultado. E, para constar, o(a) Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE - Campus de Toledo, lavra a presente ata, e assina juntamente com os membros da Comissão Examinadora e o(a) candidato(a).

Em tempo _____

Orientador(a) – Robie Allan Bombardelli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Toledo (UNIOESTE)



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

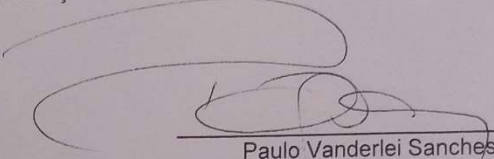
Campus de Toledo



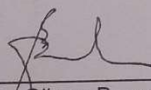
PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

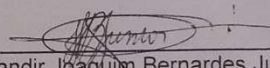
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE GIOVANO NEUMANN, ALUNO(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E ENGENHARIA DE PESCA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE, E DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO PROGRAMA E O REGIMENTO GERAL DA UNIOESTE



Paulo Vanderlei Sanches

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Toledo (UNIOESTE)

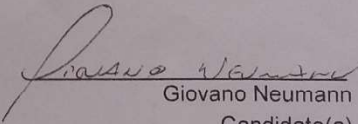

Gilmar Baumgartner

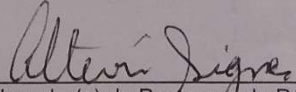
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Toledo (UNIOESTE)


Jurandir Joaquim Bernardes Júnior
Universidade Federal de Santa Catarina


Vanessa Yuri de Lima

Pontifícia Universidade Católica do Paraná


Giovano Neumann
Candidato(a)


Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação
em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca

Alteviri Signor
Coord. do Programa de Pós-Graduação em
Recursos Pesqueiros e Eng. de Pesca - PREP
Portaria nº 1958/2018 - GRE

Homologação do Colegiado do PREP:

Parecer do Colegiado do PREP: favorável, Ata 001 de 01/04/19.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para sua realização. À minha família. Aos meus pais. À minha esposa Silvia por toda a compreensão e apoio. Aos meus filhos Maria Clara e Mateus. Dedico também aos amigos Jurandir e Valdecir.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Gostaria de agradecer à algumas pessoas, dentre elas, à minha esposa Silvia Matias de Oliveira Neumann pelo apoio e paciência durante toda a tese.

Aos amigos Valdecir Neumann e Jurandir Joaquim Bernardes Junior, cuja participação foi fundamental para a execução desta tese.

Agradeço ao Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli e ao Laboratório (LATRAAC) de sua liderança pelos conhecimentos durante esta longa caminhada de orientação, durante a graduação, mestrado e doutorado do qual adquiri os conhecimentos teóricos e práticos necessários para esta proposta e execução de tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Influência da qualidade de imagens e técnicas de rastreamento nos resultados de análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) em peixes

RESUMO

Esta tese baseia-se na elaboração de dois artigos científicos e um processo que padroniza etapas específicas de execução em um *software* CASA-Mot: 1) o primeiro artigo trata e avalia diferentes técnicas de aprimoramento de imagens disponíveis no *software* ImageJ que tem potencial de tratar as imagens espermáticas ao utilizar o *plugin* CASA-Mot. Para os testes, foram gravados vídeos do movimento espermático de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) sob diferentes condições de contraste (alto, médio e baixo) nas imagens espermáticas, através da mudança no condensador do microscópio. Os efeitos de sete técnicas de aprimoramento de imagens foram verificados sob os resultados de número de espermatozoides rastreados, taxa de motilidade e velocidade curvilínea. As técnicas de aprimoramento de imagens *Median*, *Bandpass* e *Rolling-Ball* melhoraram significativamente o contraste entre os espermatozoides e o plano de fundo em todos os níveis de contraste, produzindo resultados confiáveis; 2) o segundo artigo trata e avalia os efeitos das técnicas de rastreamento espermático vizinho mais próximo (*Nearest Neighbor* - NN) nativo do *plugin* CASA-Mot, uma técnica robusta de rastreamento de múltiplas hipóteses (*Multiple Hypothesis Tracking* - MHT) em vídeos simulados do movimento espermático de peixes, contendo diferentes números de espermatozoides no campo visual (50, 100, 200 e 300 espermatozoides) e diferentes taxas de motilidade (30, 60 e 90%). Avaliou-se os resultados apresentados pelos diferentes rastreadores sobre as taxas de motilidade, número de espermatozoides rastreados, quantidade de erros de rastreamento e tempo de análise. Todos os resultados foram influenciados ($p < 0,05$) pela técnica de rastreamento utilizada; 3) É descrito o processo analítico do movimento espermático o qual compreende sete etapas: importar as cenas de vídeo, aplicar técnica de aprimoramento de imagens conforme os resultados do primeiro artigo, segmentar as imagens espermáticas, rastrear os espermatozoides utilizando as técnicas NN ou MHT, calcular os parâmetros de motilidade e fornecer resultados organizados em diretórios específicos. Adicionalmente são apresentadas as telas do *software* desenvolvido para facilitar e automatizar as análises.

Palavras-chave: *plugin* CASA. motilidade espermática. velocidade espermática. *software* de código aberto. *multiple mypothesis tracking* (MHT). Erro de rastreamento.

Influence of image quality and tracking techniques on the results of computer-assisted sperm analysis (CASA-Mot) in fish

ABSTRACT

This doctoral dissertation is based on the elaboration of two scientific articles and a process that normalize specific execution steps in a CASA-Mot software: 1) the first article discusses and evaluates different image enhancement techniques available in ImageJ software which has the potential to treat spermatic images when using the CASA-Mot plugin. For the tests, were recorded videos of the spermatic movement of gray jundiá (*Rhamdia quelen*) under different contrast conditions (high, medium and low) in the spermatic images, through the change in the condenser of the microscope. The effects of seven images enhancement techniques were checked under the results of the number of spermatozoa tracked, motility rate and curvilinear velocity. The images enhancement techniques Median, Bandpass and Rolling-Ball significantly improved the contrast between sperm and background at all contrast levels, producing reliable results; 2) the second article treats and evaluates the effects of spermatic tracking techniques of the Nearest Neighbor (NN) native from CASA-Mot plugin, and a robust Multiple Hypothesis Tracking (MHT) technique in simulated motion videos of the spermatic movement of fishes, containing different numbers of spermatozoa in the visual field (50, 100, 200 and 300 sperm) and different motility rates (30, 60 and 90%). The results presented by the different trackers were evaluated under motility rates, number of spermatozoa traces, number of tracking errors and time of analysis. All results were influenced ($p < 0.05$) by the tracking technique used; 3) The analytical process of sperm movement is described which comprises seven steps: importing video scenes, applying image enhancement technique according to the results of the first article, segmenting sperm images, tracking sperm using NN or MHT techniques, calculating motility parameters and provide results organized in specific directories. Additionally, the software screens developed to facilitate and automate the analysis are presented.

Keywords: plugin CASA. sperm motility. spermatic velocity. open source software. multiple hypothesis tracking (MHT). tracking error.

Tese elaborada e formatada conforme as normas de publicação científica *Animal Reproduction Science*. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/03784320/guide-for-authors>>*

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
1.1 MOTILIDADE ESPERMÁTICA EM PEIXES	10
1.1.1 Avaliações da motilidade espermática.....	11
1.1.2 Variáveis medidas em um sistema CASA-Mot	12
1.2 PARAMETRIZAÇÕES ENTRE SISTEMAS CASA-MOT.....	13
1.2.1 Sistema CASA-Mot livre.....	14
2. JUSTIFICATIVAS	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. ARTIGOS E PROCESSO ELABORADOS	18
4.1 Artigo 1 – Como o aprimoramento de imagens pode eliminar o efeito negativo da falta de contraste entre os espermatozoides e o plano de fundo na análise espermática utilizando o <i>plugin</i> CASA-Mot?	20
4.1.1 Introdução	20
4.1.2 Material e métodos.....	22
4.1.3 Resultados	25
4.1.4 Discussão	29
4.1.5 Conclusão	32
4.1.6 Referências.....	32
4.2 Artigo 2 – Influência da técnica de rastreamento na estimativa das variáveis de motilidade de espermatozoides de peixes em vídeos simulados.	36
4.2.1 Introdução	36
4.2.2 Material e métodos.....	38
4.2.3 Resultados	42
4.2.4 Discussão	46
4.2.5 Conclusão	48
4.2.6 Referências.....	49
4.3 Etapas da análise espermática de peixes em um <i>software</i> CASA-Mot.....	53
4.3.1 Apresentação	53
4.3.2 Etapas de avaliação	53
4.3.3 <i>Layout do software</i>	56
4.3.5 Referências.....	65

5.	CONCLUSÃO GERAL	67
6.	REFERÊNCIAS	68

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os peixes, são o grupo de vertebrados mais diversos, com inúmeras estratégias reprodutivas (Jamieson, 2009). Na grande maioria das espécies de peixes teleósteos, a estratégia reprodutiva é semelhante, com fertilização externa dos gametas (Dzyuba e Cosson, 2014). O sucesso reprodutivo depende da qualidade dos gametas, especificamente tratando dos machos, da qualidade dos espermatozoides, que até a liberação do sêmen, permanecem imóveis nos testículos e dutos devido as condições de osmolaridade, mantidas pelos íons Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} e Ca^{2+} (Mylonas, Duncan e Asturiano, 2017; Bobe e Labbé, 2010). Um dos gatilhos da ativação espermática em peixes é a diluição do sêmen em água ou solução ativadora, hipotônicas para peixes de água doce e hipertônicas para peixes de água salgada (Morisawa, 2008). Para a maioria das espécies, os espermatozoides permanecem em movimento por menos de dois minutos (Rurangwa et al., 2004).

Vários parâmetros seminais têm sido medidos e individualmente relacionados a fertilização em peixes (Bobe e Labbé, 2010; Fauvel, Suquet e Cosson, 2010), tais como o pH (Alavi e Cosson, 2005) e osmolaridade do fluido seminal (Alvi et al., 2010), composição do plasma (Rashid et al., 2018), densidade espermática ou dose inseminante (Boschetto et al., 2011), morfologia espermática (Oberlender et al., 2012), sobrevivência espermática (Gaitán-Espitia et al., 2013), integridade da membrana espermática (Pérez-Cerezales et al., 2010), integridade do DNA (Cabrita et al., 2005), motilidade (Gallego et al., 2017) e velocidade espermática (Neumann et al., 2019). Dentre estes, a motilidade e a velocidade espermática são os mais utilizados para avaliar a qualidade espermática em peixes (Gallego e Asturiano, 2018; Figueroa, Valdebenito e Farias, 2016), apresentando fortes correlações com a fertilização e eclosão em várias espécies, como o baiacu (*Takifugu niphobles*; Gallego et al., 2013), alabote do Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus* L.; Ottesen, Babiak e Dahle, 2009), curimbatá (*Prochilodus lineatus*; Viveiros et al., 2010), jundiá (*Rhamdia quelen*; Neumann et al., 2019) e tambaqui (*Colossoma macropmum*; Gallego et al., 2017).

1.1 MOTILIDADE ESPERMÁTICA EM PEIXES

Resumidamente, podemos definir a motilidade como a capacidade dos espermatozoides de se moverem após serem ativados. Adicionalmente, as características cinéticas podemos também abranger o simples mover-se ou podem ser distintas através das velocidades e do comportamento natatório (linearidade, retilinearidade, oscilação e balanço). A profundidade

com que se conhece a motilidade de determinada espécie depende do número de variáveis seminais avaliadas e do grau de compreensão de cada uma (Gallego e Asturiano, 2018).

1.1.1 Avaliações da motilidade espermática

Por muito tempo, as avaliações da motilidade espermática em peixes foram realizadas através de técnicas subjetivas (Gallego e Asturiano, 2018; Rurangwa et al., 2004). A avaliação subjetiva é feita através de observações dos espermatozoides sob um microscópio (Fauvel, Suquet e Cosson, 2010) e um score é atribuído com base no percentual de espermatozoides móveis em um campo visual fixo.

Essa avaliação permite a coleta de resultados aproximados da motilidade, sendo possível estimar a percentagem de espermatozoides móveis e duração do movimento progressivo (Fauvel, Suquet e Cosson, 2010). Ocorrem algumas desvantagens nesta técnica: (1) como a limitação do olho humano; (2) a experiência do técnico observador (Gallego et al., 2018); (3) a não reprodutividade dos resultados coletados (Viveiros et al., 2010) e; (4) a dependência total de apenas um técnico em todas as avaliações em um ensaio experimental. Os resultados desta técnica podem ser mascarados pela densidade espermática e deriva, onde normalmente utiliza-se um número grande de espermatozoides no campo visual para facilitar a avaliação. Além disso, uma baixa diluição do sêmen pode não ativar completamente os espermatozoides, afetando o tempo total de ativação progressiva ou longevidade (Billard e Cosson, 1992). A baixa reprodutividade desta técnica resulta em variações nas leituras de uma mesma amostra (Gallego et al., 2018), dificultando a interpretação dos resultados. Além disso, longas horas de trabalho podem causar fadiga visual, o que naturalmente altera os resultados.

A técnica subjetiva tem seu mérito e por muito anos era a técnica disponível para avaliação da motilidade espermática em peixes. Com o avanço da tecnologia esta técnica está sendo substituída por outras mais precisas e objetivas.

Avaliação objetiva da motilidade ocorre quando um *software* integra as sucessivas posições das cabeças dos espermatozoides em imagens consecutivas de um vídeo do movimento espermático, calculando as trajetórias e características de movimento (Figuerola, Valdebenito e Farias, 2016). As tentativas de tornar as análises espermáticas objetivas começaram em meados da década de 1980 com a introdução de sistemas de análise espermática assistida por computador (CASA) (Mortimer, Horst e Mortimer, 2015; Amann e Waberski, 2014). Os sistemas CASA-Mot (Bompart et al., 2018; Gallagher et al., 2018; Soler et al., 2018) utilizam computadores para capturar digitalmente uma sequência de imagens de vídeo através

de uma câmara acoplada a um microscópio e, *softwares* capazes de processar as imagens digitais, a fim de detectar, contar e rastrear os espermatozoides (Urbano et al., 2017; Amann e Waberski, 2014). Além disso, os sistemas CASA-Mot podem reconstruir os caminhos de natação dos espermatozoides, medir parâmetros cinemáticos e o percentual de espermatozoides móveis (Amann e Waberski, 2014; Rurangwa et al., 2004).

As desvantagens destes sistemas são os altos custos de aquisição dos equipamentos e *softwares* (Boryspolets et al., 2013; Rurangwa et al., 2004). A precisão e sensibilidade de um sistema CASA-Mot depende de alguns critérios específicos que devem ser cuidadosamente seguidos. A definição da diluição utilizada para ativar os espermatozoides, a densidade de espermatozoides no campo visual, o tipo e profundidade da câmara que irá acomodar a amostra, da taxa de captura da câmara ($>60\text{fp}$), a duração da cena e das configurações dos *softwares* (Bompart et al., 2018; Amann e Waberski, 2014) tornam os resultados repetíveis e comparáveis entre laboratórios e estações de cultivo quando um mesmo sistema CASA-Mot é utilizado (Amann e Waberski, 2014; Boryspolets et al., 2013; Gallego et al., 2013b).

As maiores vantagens de um sistema CASA-Mot são a produção rápida de resultados e a precisão, além da impressão de vários parâmetros, como a taxa de espermatozoides móveis e as características cinemáticas do movimento espermático. Apresentando resultados gerais para a população espermática e resultados individuais a cada espermatozoide detectado (Amann e Waberski, 2014; Rurangwa et al., 2004).

1.1.2 Variáveis medidas em um sistema CASA-Mot

Sob o conceito de sistema CASA, existem diferentes tecnologias disponíveis. Especificamente CASA-Mot refere-se as avaliações de motilidade espermática (Soler et al., 2016), que dispões de vários sistemas CASA-Mot comerciais e alguns livres (Amann e Waberski, 2014; Lu, Huang e Lü, 2014).

Em um sistema CASA-Mot, a trajetória de cada espermatozoide é construída com base na localização xy da cabeça do espermatozoide, nas sucessivas imagens do fragmento de vídeo (Figura 1). A partir destas coordenadas, são realizados cálculos dos parâmetros cinemáticos que descrevem o movimento espermático (Amann e Waberski, 2014; Fauvel, Suquet e Cosson, 2010; Rurangwa et al., 2004).

Os parâmetros comumente gerados por um sistema CASA-Mot podem ser classificados em três categorias: (1) velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$; velocidade real ao longo da trajetória), velocidade média de deslocamento (VAP, $\mu\text{m/s}$; velocidade suavizada da VCL) e

velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$; distância em linha reta da posição inicial até a posição final da VAP) (Figura 1); (2) linearidade (LIN, %; descreve a linearidade ou curvatura de um caminho, ou seja, $\text{VSL}/\text{VCL} \cdot 100$), retidão (STR, %; descreve a linearidade ou curvatura de um caminho médio, ou seja, $\text{VSL}/\text{VAP} \cdot 100$), oscilação (WOB, %; refere-se à oscilação do caminho real sobre o caminho médio, calculado a partir de $\text{VAP}/\text{VCL} \cdot 100$); (3) amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm ; refere-se à magnitude do deslocamento lateral de uma cabeça em relação ao seu caminho médio) e frequência de batimento flagelar (BCF, Hz; refere-se à taxa média em que o caminho curvilíneo cruza o caminho médio, é um parâmetro útil que avalia as mudanças na forma de bamboleio de um flagelo espermático) (Figura 1) (Amann e Waberski, 2014; Lu, Huang e Lü, 2014). Sistemas CASA-Mot também fornecem o percentual de espermatozoides móveis, expresso como taxa de motilidade.

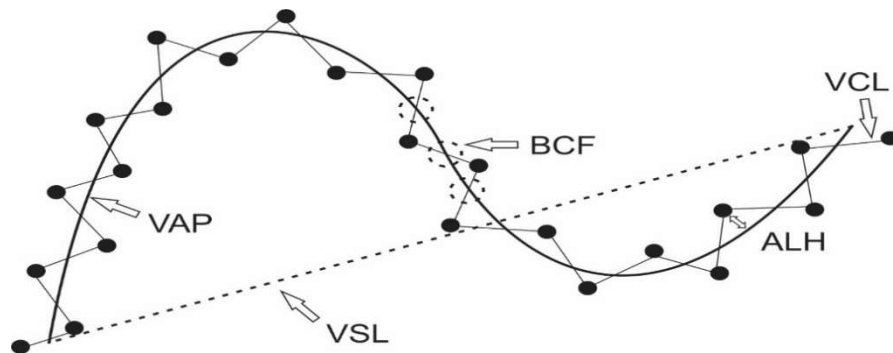


Figura 1 - Diagrama esquemático de alguns dos parâmetros de motilidade registrados pela análise espermática assistida por computador (CASA-Mot). Os círculos pretos representam posições sucessivas da cabeça de um espermatozóide móvel através da gravação de vídeo. Parâmetros de movimento espermático: VCL, velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VAP, velocidade média de deslocamento ($\mu\text{m/s}$); VSL, velocidade em linha reta ($\mu\text{m/s}$); ALH, amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm); BCF, frequência de batimento flagelar (Hz).

1.2 PARAMETRIZAÇÕES ENTRE SISTEMAS CASA-MOT

Como os sistemas CASA-Mot não são dispositivos prontos para uso, eles dependem muito das configurações técnicas e dos procedimentos padronizados. Nesse sentido, parametrizações das configurações técnicas de cada espécie e dos procedimentos adotados nas avaliações são cruciais para aumentar a confiabilidade e repetibilidade da pesquisa por outros laboratórios, além da comparação dos resultados (Mortimer, Horst e Mortimer, 2015; Amann e Waberski, 2014; Boryspolets et al., 2013). Deste modo, todos os estudos devem descrever sua metodologia de forma muito clara, particularmente no que se refere à taxa de aquisição de

imagens, cena do vídeo ou tempo após a ativação, tipo de câmara e profundidade, número de espermatozoides no campo visual, microscópio óptico, ampliação, modelo da câmera, tamanho do sensor óptico da câmera e *software* CASA-Mot (Bompart et al., 2018; Gallego et al., 2013b). Na maioria das publicações, detalhes como estes não são fornecidos (Gallego et al., 2013b).

O sistema CASA-Mot utilizado pode influenciar a avaliação espermática em peixes (Boryspolets et al., 2013), devido a particularidades das técnicas de detecção, segmentação e rastreamento de cada sistema CASA-Mot, não sendo possível comparar resultados sob diferentes sistemas (Bompart et al., 2018; Boryspolets et al., 2013).

Infelizmente, os sistemas CASA-Mot comerciais têm alto preço (Bompart et al., 2018; Gallego et al., 2018; Amann e Waberski, 2014), tornando-se inacessíveis a muitos grupos de pesquisa. Devido a isto, muitas pesquisas ainda utilizam análises subjetivas na avaliação espermática (Gallego e Asturiano, 2018).

1.2.1 Sistema CASA-Mot livre

Um marco importante nas avaliações espermáticas ocorreu em 2007, quando Wilson-Leedy e Ingermann (2007) desenvolveram um *plugin* CASA-Mot para um *software* livre (ImageJ; National Institutes of Health, USA). Este *plugin* de código aberto, permitiu que qualquer laboratório de pesquisa e estação de aquicultura pudessem ter acesso a um *software* CASA-Mot (Neumann et al., 2017), criando possibilidades na obtenção de parâmetros de motilidade rápidos e confiáveis em peixes, padronização de configurações e comparações de resultados (Amann e Waberski, 2014; Purchase e Earle, 2012).

O *plugin* CASA-Mot (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007) está sendo amplamente utilizado em avaliações objetivas da motilidade de peixes, aumentando o uso a cada ano (Neumann et al., 2017). Para operar o *plugin* CASA, é necessário que o usuário tenha conhecimento mediano dos recursos do *software* ImageJ e realize o ajuste de 18 parâmetros para a espécie em estudo (Neumann et al., 2013). A avaliação da motilidade envolve ainda etapas manuais e subjetivas no *software* ImageJ para preparação das imagens antes de aplicar o *plugin* CASA-Mot (Wilson-Leedy e Ingermann, 2006; Neumann et al., 2013). Os resultados são apresentados na tela do ImageJ e necessitam ser processadas manualmente em planilhas eletrônicas para operar a massa de dados das variáveis espermáticas gerados (Neumann et al., 2013; Purchase e Earle, 2012).

Dentre as desvantagens de utilização do *plugin* CASA-Mot, merece destaque as tratativas manuais necessárias ao utilizar o *software* ImageJ, a subjetividade na preparação das

imagens e a técnica de rastreamento espermático utilizado pelo *plugin* CASA-Mot, que gera erros de rastreamento.

1.2.2.1 Tratativas manuais e subjetividade na preparação das imagens espermáticas

Ao importar um fragmento de vídeo do movimento espermático no ImageJ, é necessário primeiramente converter as imagens para 8bits e em escala de cinza, após segmentar os espermatozoides (Wilson-Leedy and Ingermann, 2006). O ImageJ dispõe de vários algoritmos para a segmentação dos espermatozoides, e o algoritmo com a técnica mais eficiente é o threshold automático, sob uma técnica global. Na maioria dos casos é necessário confirmar se os valores de intensidade sugeridos pela técnica de threshold automático realmente destacam os espermatozoides em relação ao fundo, garantindo uma segmentação eficiente (Purchase e Earle, 2012), evidenciando os espermatozoides e removendo os ruídos indesejados das imagens (Neumann et al., 2013). Muitas vezes, os ruídos provenientes do contraste heterogêneo são tão intensos, que o vídeo é descartado das avaliações, porque não é possível gerar uma segmentação confiável utilizando apenas a técnica de limiarização (Maintz, T. 2005). Após a segmentação espermática, o *plugin* CASA-Mot deve ser utilizado para as análises.

Elsayed, El-Sherry e Abdelgawad, 2015 aperfeiçoaram o *plugin* CASA-Mot, implementando processos automatizados de melhoramento de imagens no código. Para imagens espermáticas em condições de microfluído, os autores incluíram cinco técnicas de aprimoramento de imagens que são aplicadas antes do threshold.

A maioria dos aplicativos de processamento de imagens microscópicas dispões de um conjunto de operações padrões, para ajustar a nitidez, contraste, brilho e o balanceamento das cores, buscando principalmente remover a distorção no caminho óptico do microscópico e o desfoque causado pela instrumentação (Chaudhari e Pawar, 2014). Do mesmo modo, o *software* ImageJ dispões de vários recursos de processamento de imagens, que apesar dos artigos não informar o uso, não são estudados para uso nas imagens espermáticas de peixes.

O processo de segmentação pela técnica threshold acentua toda e qualquer variação nas imagens antes imperceptível ao olho humano. O processamento de uma imagem não homogênea (com uma variação sutil no contraste) acarreta na presença de ruído, ou seja, o ruído é evidenciado juntamente com os espermatozoides, podendo prejudicar a precisão dos resultados em um sistema CASA-Mot (Hidayatullah et al., 2017). Se tratando de qualidade de imagens, o ruído causado pelo contraste é um dos fatores mais críticos que afetam o desempenho das ferramentas de detecção e rastreamento de partículas, reduzindo a precisão e robustez dos resultados (Meijering et al., 2012; Smal et al., 2010).

1.2.2.2 Rastreamento espermático

Um dos maiores desafios que os sistemas CASA-Mot atuais enfrentam é quando dois ou mais espermatozoides colidem, ou tem suas trajetórias muito próximas umas das outras (Urbano et al., 2017; Mortimer, Horst e Mortimer, 2015; Shi et al., 2006). A probabilidade de ocorrer colisão está diretamente relacionada a quantidade de espermatozoides presentes no campo visual e ao tamanho da cena utilizada (Hidayatullah et al., 2017).

Os eventos de colisão entre espermatozoides podem gerar erros de rastreamento, que são caracterizados pelo truncamento da trajetória dos espermatozoides envolvidos na colisão, modificando a trajetória impressa pelo CASA-Mot em relação a realidade do movimento dos espermatozoides envolvidos na colisão. Urbano et al., (2017) apontam que a técnica de rastreamento utilizada pelo sistema CASA-Mot é a principal responsável pela ocorrência destes erros.

Quando as técnicas de rastreamento de um sistema CASA-Mot não tratam eficientemente os eventos de colisão, os espermatozoides que colidiram serão eliminados da amostra (Shi et al., 2006) ou será gerada uma trajetória espermática falsa, culminando em um erro de rastreamento, truncando a trajetória de dois ou mais espermatozoides (Urbano et al., 2017; Wilson-Leedy e Ingermann, 2007; Shi et al., 2006). A eliminação de espermatozoides devido aos eventos de colisão e o truncamento de trajetórias acarretam em resultados CASA-Mot equivocados, afetando principalmente a taxa de espermatozoides móveis e a velocidade curvilínea (VCL) (Shi et al., 2006).

A maioria dos sistemas CASA-Mot utiliza uma técnica de rastreamento conhecida como “vizinho mais próximo” (*Nearest Neighbor*; NN) que considera a posição mais próxima da trajetória, supostamente a correta (Urbano et al., 2017). Esta técnica de associação de dados determinísticos rastreia e atribui espermatozoides a uma trajetória. Está implementada no *plugin* CASA-Mot (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007) e na versão 12.1 do sistema CASA-Mot HTM-IVOS (Shi et al., 2006). É a técnica mais simples de atribuição de trajetórias espermáticas e a mais propensa a gerar erros de rastreamento devido os eventos de colisão espermática (Urbano et al., 2017; Shi et al., 2016).

Em 2017, Urbano et al., propuseram o uso da técnica Joint Probabilistic Data Association Filter (JPDAF) (Rezatofighi et al., 2015; Urbano et al., 2017) para o rastreamento e atribuição de posição a espermatozoides humanos. A técnica foi capaz de atribuir corretamente as trajetórias dos espermatozoides, não gerando erros de rastreamento (Urbano et al., 2017).

Da mesma classe de técnica NN, existe a técnica *Nearest Neighbor Global* (GNN) (Konstantinova et al., 2013) que foi testada por Urbano et al., (2017) juntamente com as técnicas JPDAF e NN, apresentando resultados inferiores a técnica JPDAF com relação aos erros de rastreamento, e superiores a técnica NN (Urbano et al., 2017).

As técnicas mais sofisticadas para rastreamento de múltiplos alvos são o *Multiple Hypothesis Tracking* (MHT) (Kim et al., 2015) e o Joint Probabilistic Data Association Filter (JPDAF) (Urbano et al., 2017). MHT e JPDAF usam filtros independentes de Kalman para estimar o estado e covariância de cada alvo rastreado. A técnica JPDAF proposta por Urbano et al., (2017) para atribuir espermatozoides humanos usa apenas as medidas da cercadura atual para atribuir a posição aos espermatozoides, ao contrário do MHT (que ainda não foi utilizada para atribuir trajetórias a espermatozoides) que usa o histórico de medições do passado para atribuir a posição aos espermatozoides no presente. A técnica MHT é considerada a técnica mais robusta de associação de alvos, porém o seu uso não é incentivado no meio científico devido o grande recurso computacional que exige e o tempo elevado para análise (Kim et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVAS

Os sistemas CASA-Mot ganharam lugar em pesquisas relacionadas a reprodução de peixes porque apresentam medidas objetivas, detalhadas e confiáveis da motilidade espermática. Os sistemas comerciais são automatizados e os parâmetros dos equipamentos e das amostras para uma adequada avaliação da motilidade espermática são bem conhecidas e definidas. Uma vez que as análises são padronizadas, os resultados podem ser comparados entre laboratórios e estudos. Por outro lado, os sistemas CASA-Mot comerciais têm custo elevado, inviabilizando a aquisição e manutenção por muitas universidades e laboratórios menores.

Neste sentido, o *plugin* CASA-Mot em *software* livre viabilizou a adoção da ferramenta por muitos grupos de pesquisadores, que além de utiliza-la na avaliação da qualidade do sêmen, também passaram a desenvolver pesquisas para otimizar seu uso. O *plugin* CASA-Mot utiliza uma série de parâmetros que precisam ser ajustados pelo usuário, além dos cuidados exigidos no ajuste dos equipamentos para aquisição das imagens. Para que os resultados das análises sejam confiáveis, a padronização destes parâmetros exige habilidade e conhecimento aprofundado do especialista.

Algumas publicações se dedicaram a avaliar o efeito de alguns destes parâmetros na qualidade dos resultados, entretanto considerando a flexibilidade do *software*, ainda há uma série de questões que precisam ser melhor compreendidas como, por exemplo, o efeito do contraste no processamento e análise das amostras.

Outro aspecto do funcionamento do *plugin* CASA-Mot em *software* livre que gera algumas inconsistências nos resultados é o método de rastreamento. A técnica implementada no *software* perde eficiência em amostras com alta concentração de espermatozoides no campo visual, causando erros de rastreamento em situações de colisão entre células. Compreender como o rastreamento é afetado pelo número de espermatozoides e como os resultados são influenciados é essencial para a coerência das análises.

A necessidade de conhecimento aprofundado sobre o *software* ImageJ é o mais difícil para quem está iniciando o uso, nesse sentido a criação de um processo automático em um *plugin* CASA-Mot aperfeiçoado tornaria a ferramenta mais fácil de utilização.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Compreender como diferentes aspectos de um sistema CASA-Mot influenciam as mensurações da motilidade de espermatozoides de peixe.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar como o contraste entre os espermatozoides e o plano de fundo afetam as mensurações do *plugin* CASA-Mot e quais técnicas de aprimoramento de imagem podem ser utilizadas para minimizar os problemas causados pela falta de contraste.
- Avaliar a influência das técnicas de rastreamento NN e MHT sob os erros de rastreamento e tempo de análise em vídeos do movimento espermático de peixe.
- Apresentar as etapas de avaliação espermática implementadas em *software* para automatizar e facilitar as análises.

4. ARTIGOS E PROCESSO ELABORADOS

Esta tese é composta por dois artigos e a descrição do processo analítico do movimento espermático em um *software* CASA-Mot.

Artigo 1 – Como o aprimoramento de imagens pode eliminar o efeito negativo da falta de contraste entre os espermatozoides e o plano de fundo na análise espermática utilizando o *plugin* CASA-Mot?

Artigo 2 - Efeitos do rastreamento espermático em peixes, utilizando um *software* CASA-Mot.

Etapas da análise espermática de peixes em um *software* CASA-Mot.

4.1 Artigo 1 – Como o aprimoramento de imagens pode eliminar o efeito negativo da falta de contraste entre os espermatozoides e o plano de fundo na análise espermática utilizando o *plugin* CASA-Mot?

Resumo

A qualidade da imagem obtida durante a captura do movimento espermático pode afetar a análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) de várias formas. O presente estudo avaliou de que forma o contraste entre os espermatozoides e o plano de fundo afetou o número de espermatozoides rastreados, a taxa de motilidade e a velocidade curvilínea. Foram avaliadas também quais técnicas de aprimoramento de imagem podem ser utilizadas para produzir resultados confiáveis na avaliação do movimento espermático de peixes. A motilidade do sêmen de *Rhamdia quelen* ($n = 6$) foi avaliada em imagens com baixo, médio (nível ótimo) e alto contraste utilizando o *plugin* CASA para o ImageJ. Em seguida, sete métodos (*Contrast Stretching*, *Median*, *Bandpass*, *Mexican Hat*, *Sharpen*, *Smooth*, and *Rolling-Ball*) de aprimoramento de imagens foram analisados quanto a efetividade no aumento da qualidade das imagens. O número de espermatozoides rastreados e a taxa de motilidade foram menores ($p < 0,05$) em alto contraste, não havendo diferenças ($p > 0,05$) entre médio e baixo contraste. A utilização dos métodos *Median*, *Bandpass* e *Rolling-Ball* melhoraram significativamente o contraste entre os espermatozoides e o plano de fundo em todos os níveis de contraste, produzindo resultados confiáveis. O número de espermatozoides rastreados, a taxa de motilidade e a velocidade curvilínea obtidas com a aplicação destas técnicas foram similares ($p > 0,05$) aos resultados produzidos com imagens capturadas em nível ótimo de contraste e que não necessitaram ser submetidas as técnicas de aprimoramento.

Palavras-chave: Peixe, motilidade espermática, velocidade espermática, *software* de código aberto.

4.1.1 Introdução

É amplamente discutido que a qualidade da imagem pode afetar a análise digital de imagens (Gonzalez e Woods, 2002; Beyerer et al., 2016). O estudo da motilidade dos espermatozoides através da análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) (Bompart et al., 2018; Soler et al., 2018) oferece muitas possibilidades e permite uma avaliação

objetiva e detalhada (Lu, Huang e Lü, 2014, Mortimer, Horst e Mortimer, 2015). Ao considerar a captura de imagens e as análises propriamente ditas, alguns critérios precisam ser satisfeitos. Recomendações básicas sobre o ajuste do microscópio e da câmera estão disponíveis na literatura (Amann e Waberski, 2014; Lu, Huang e Lü, 2014; Wilson-Leedy e Ingermann, 2007) e os fatores que afetam a motilidade do sêmen de peixes são bem conhecidos (Alavi e Cosson, 2005, 2006; Rurangwa et al, 2004; Fauvel et al., 2010).

Especificamente, a magnificação da objetiva (Amann e Waberski, 2014; Gallego et al., 2013; Sanches et al., 2013), a taxa de captura das imagens (Bompart et al., 2018; Boryshpolets et al., 2013a; Lu, Huang e Lü, 2014; Mortimer e Swan, 1999; Wilson-Leedy e Ingermann, 2007), o número de imagens (*frames*) consecutivas necessárias para a análise (Sanches et al., 2013), a concentração de espermatozoides no campo visual (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007), o ajuste do plano focal (Boryshpolets et al., 2013b) e o tipo e profundidade da câmara onde será depositada a amostra de sêmen (Amann e Waberski, 2014; Bompart et al., 2018; Lu, Huang e Lü, 2014; Soler et al., 2018), são alguns dos fatores que afetam a confiabilidade dos resultados obtidos com CASA-Mot.

Embora os efeitos da resolução espacial e do contraste de imagem sejam pouco investigados, seu controle é essencial para o sucesso na avaliação da motilidade espermática. O contraste é um atributo básico de uma imagem e pode ser definido como a diferença na intensidade entre os objetos e o plano de fundo (Peli, 1990). Existem basicamente três formas de controlar o contraste em uma imagem, as quais podem ser aplicadas de forma combinada em estudos com sêmen. São elas a interação entre os espermatozoides e a luz (e.g., utilizando filtros coloridos no microscópio), a técnica de iluminação (e.g., contraste de fase) e a manipulação digital de imagens (técnicas de aprimoramento de imagens) (Sanderson, 2000).

Desde que o *plugin* CASA-Mot foi desenvolvido (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007), a composição do sistema mais utilizada para avaliação do sêmen de peixes tem sido uma câmera com alta taxa de captura (> 60 quadros por segundo) acoplada a um microscópio com contraste de fase (Neumann et al., 2017). Com as imagens já capturadas, uma técnica de limiarização (etapa de processamento) normalmente é utilizada para segmentar os espermatozoides (separar espermatozoides do plano de fundo) e apenas os centroides (valores de *pixel* que representam a cabeça do espermatozoide) são preservados na sequência de imagens (Kheirkhah et al., 2018; Montoya et al., 2016). Na etapa seguinte (análise das imagens), o *plugin* CASA-Mot utiliza a posição *xy* do centroide em sucessivas imagens para calcular os parâmetros de motilidade (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007). A segmentação dos espermatozoides é satisfatória se as

imagens fornecem um contraste apropriado entre os espermatozoides e o plano de fundo, do contrário, muitos ruídos são gerados no processamento das imagens afetando os resultados.

Seguindo os princípios de iluminação Köhler, um técnico treinado pode ajustar o microscópio para obter um bom equilíbrio entre resolução espacial e contraste (Keller, 2003). Entretanto, como os olhos humanos muitas vezes não conseguem distinguir variações sutis nos níveis de contraste (Sanderson, 2000), o contraste percebido nas imagens pode não ser suficiente para se obter uma segmentação satisfatória. Em nossa experiência, avaliando o sêmen de peixes e tendo instruído vários pesquisadores no uso da ferramenta *plugin* CASA-Mot, a obtenção de imagens com pouco contraste ou iluminação heterogênea no campo visual é muito comum.

Parece óbvio que tanto a ausência de contraste ou de iluminação adequados produzirão ruídos indesejados durante a segmentação dos espermatozoides e afetarão a precisão dos cálculos de motilidade. Nesses casos, espera-se que operações de aprimoramento de imagens, aplicadas como pré-processamento, tenham efeitos positivos consideráveis na qualidade da segmentação dos espermatozóides e conseqüentemente na confiabilidade da análise de imagens (Krig, 2014). Dentre as técnicas de aprimoramento de imagens destacam-se o aprimoramento do contraste e equalização da iluminação, a remoção de ruídos e a suavização e nitidez de imagem.

Nos analisadores CASA-Mot comerciais, aparentemente estão embutidos algumas técnicas para aprimoramento de contraste. No entanto, como são soluções fechadas, pouca ou nenhuma informação a respeito do aprimoramento de imagens realizado estão disponíveis. Deste modo, quando se utiliza o *plugin* CASA-Mot, torna-se necessário investir esforços para selecionar e padronizar técnicas apropriadas para cada etapa. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar como o contraste entre os espermatozoides e o plano de fundo afetam as mensurações do *plugin* CASA-Mot e quais técnicas de aprimoramento de imagem podem ser utilizadas para minimizar os problemas causados pela falta de contraste.

4.1.2 Material e métodos

4.1.2.1 Os peixes e a coleta de sêmen

Em março de 2018, seis indivíduos da espécie *Rhamdia quelen* ($n = 6, 294,17 \pm 45,68$ g) que liberaram sêmen sob leve pressão abdominal foram induzidos com extrato pituitário de carpa ($3,0 \text{ mg kg}^{-1}$) para aumentar o volume de sêmen produzido (Adames et al., 2015). Após 240 horas-grau ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), o sêmen foi coletado diretamente em tubos tipo Eppendorf e mantidos

sob refrigeração (12 ± 1 °C) até o final das análises. A primeira gota de sêmen foi descartada para evitar possíveis contaminações com urina, muco e fezes.

O Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná aprovou todos os procedimentos experimentais (CEUA Protocolo n° 4212).

4.1.2.2 Captura das imagens do movimento espermático

Uma câmera com alta taxa de captura (A602fc, Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Alemanha) acoplada a um microscópio com contraste de fase (Eclipse E200, Nikon Instruments Inc., Tóquio, Japão) foi utilizada para capturar imagens do movimento espermático a uma taxa de captura de 100 quadros por segundo e gravar as imagens diretamente no HD (arquivos de vídeo no formato AVI em escala de cinza 8-bit, utilizando o *software* AMCap). O microscópio foi ajustado inicialmente, utilizando os princípios de iluminação Köhler (Keller, 2003).

As amostras de sêmen foram ativadas individualmente por diluição (1:1000; sêmen: diluição final) em água destilada ($20,5 \pm 0,5$ °C). Em seguida, 10 µL da suspensão foram pipetadas em uma câmara de Neubauer (0,1 mm de profundidade) que foi coberta com lamínula e posicionada no microscópio. Aos 12s após a ativação, o movimento dos espermatozoides foi gravado durante 1s. Cada vídeo foi convertido em uma sequência contendo 100 imagens.

4.1.2.3 Níveis de contraste

O movimento espermático foi avaliado em baixo, médio e alto nível de contraste (Figura 1). Os níveis de contraste foram simulados ao variar a posição do condensador. Para o contraste médio (condição considerada ótima), a altura do condensador e a abertura do diafragma de íris foram ajustadas para se obter o melhor equilíbrio entre resolução e contraste em uma objetiva aumento de 10× (Nikon, 10x/0.25, Ph1 DI, ∞/-, WD 7.0). Nos demais níveis, manteve-se a mesma abertura do diafragma e apenas a posição vertical do condensador foi alterada para produzir imagens com baixo (movendo o condensador para baixo) e alto contraste (movendo o condensador para cima).

O contraste da sequência de imagens foi expresso em termos do C_{RMS} (*root-mean-square*) (Peli, 1990). Os valores de intensidade dos *pixels* (0 a 255) foram distribuídos em classes de frequência unitárias e o contraste C_{RMS} foi definido como

$$C_{RMS} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=0}^{255} [(p_i - \bar{p})^2 \times f_i]} \quad (1)$$

onde N é o número total de *pixels* na sequência de imagens, p_i é o valor do *pixel* na classe i , \bar{p} é o valor médio dos *pixels* na sequência de imagens e f_i é a frequência do *pixel* na classe i .

4.1.2.4 Aprimoramento de imagem

Após testes piloto, foram selecionadas sete técnicas (*Contrast Stretching*, *Median*, *Bandpass*, *Mexican Hat*, *Sharpen*, *Smooth*, and *Rolling-Ball*) para avaliar a capacidade de aprimoramento da qualidade das imagens em diferentes níveis de contraste. Apenas uma técnica foi aplicada por vez.

Na técnica *Contrast Stretching*, 0,1% dos *pixels* foram saturados (Beyerer et al., 2016). O filtro *Median* (pacote *fast filter*) foi ajustado para substituir cada *pixel* da sequência de imagens pela mediana dos *pixels* vizinhos em uma distância de 5 por 5 *pixels* e realçar os espermatozoides (função *Remove Filtered*) (Schmid, 2010). Na técnica *Fast Fourier Transform Bandpass*, partículas grandes foram filtradas até 10 *pixels* (correção de sombreamento) e partículas pequenas foram filtradas até 1 *pixel* (suavização) (Walter, 2001). O filtro *Mexican Hat* (*Laplacian of Gaussian* – LoG) foi configurado para convolver a sequência de imagens utilizando um raio de 5 *pixels* (Prodanov, 2012). A técnica *Sharpen* foi utilizada para aumentar o contraste substituindo cada *pixel* pela média ponderada [-1, -1, -1, -1, 12, -1, -1, -1, -1] dos *pixels* vizinhos a uma distância de 3 por 3 *pixels* (Ferreira e Rasband, 2012). A técnica *Smooth* substituiu cada *pixel* da sequência de imagens pela média dos *pixels* vizinhos a uma distância de 3 por 3 *pixels* (Ferreira e Rasband, 2012). Baseado no conceito do algoritmo da bola rolante, a técnica *Rolling-Ball background subtraction* foi configurada para remover o plano de fundo utilizando um raio de bola de 15 *pixels* (Castle e Keller, 2007).

4.1.2.5 Segmentação dos espermatozoides e análise do movimento espermático

A segmentação dos espermatozoides foi realizada através de uma técnica iterativa global de limiarização (binarização) baseada no algoritmo IsoData (Ridler, 1978), tendo sido aplicado para cada imagem (quadro) da sequência (*frame by frame*) (Urbano et al., 2017). Neste procedimento, os *pixels* que compõem a cabeça do espermatozoide (centroide) foram substituídos por 0 (preto) e o plano de fundo por 1 (branco). Em seguida, a análise de motilidade espermática foi realizada utilizando o *plugin* CASA-Mot (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007). Foram avaliados o número de espermatozoides rastreados, a taxa de motilidade e a velocidade

curvilínea (VCL). Os valores de calibração de análise do *plugin* CASA-Mot foram: a=4, b=30, c=98, d=12, e=3, f=10, g=15, h=5, i=1, j=15, k=15, l=25, m=80, n=80, o=50, p=60, q=98, r=943.3962, s=0, t=0, u=0. Todos os procedimentos (pré-processamento, segmentação dos espermatozoides e análise da motilidade) foram realizados no ImageJ 1.50i (Rueden et al., 2017).

4.1.2.6 Análises estatísticas

Considerando o procedimento padrão de análise de imagem em que técnicas de aprimoramento não são utilizadas, o efeito do contraste de imagem nos resultados do *plugin* CASA-Mot foi inicialmente avaliado. O contraste C_{RMS} , o número de espermatozoides rastreados, a taxa de motilidade e a VCL foram comparados entre os níveis de contraste utilizando a análise de variância para medidas repetidas com correção de Greenhouse-Geisser (procedimento GLM: *Repeated Measures* do SPSS; IBM, Armonk, Nova Iorque, Estados Unidos), seguido por comparações par-a-par utilizando o teste *t* com correção de Bonferroni para evidenciar as diferenças significativas (Howell, 2012).

O efeito das técnicas de aprimoramento de imagem no número de espermatozoides rastreados, a taxa de motilidade e a VCL foram avaliadas utilizando a análise de variância para medidas repetidas com correção de Greenhouse-Geisser (Howell, 2012). O nível de contraste e a técnica de aprimoramento de imagem foram considerados fatores intra-sujeitos (*within-subjects*) no modelo, e a interação entre os fatores foi incluída. Quando a interação foi significativa, comparações par-a-par utilizando o teste *t* com correção de Bonferroni foram conduzidas (1) em cada nível de contraste comparando-se as diferentes técnicas e (2) em cada técnica comparando-se os níveis de contraste.

As técnicas de aprimoramento de imagem que produziram resultados mais consistentes entre os diferentes níveis de contraste foram comparadas com os resultados produzidos em condições ótimas de aquisição de imagens em rotina laboratorial (contraste médio sem aplicação de técnica de aprimoramento) através do teste de Dunnett (Zar, 2010).

4.1.3 Resultados

O C_{RMS} aumentou ($p < 0,05$) do menor para o maior nível de contraste (Tabela 1). O nível de contraste em que o movimento espermático foi capturado afetou a segmentação dos espermatozoides e as mensurações do *plugin* CASA-Mot. O número de espermatozoides

rastreados e a taxa de motilidade foram menores ($p < 0,05$) em alto contraste. Os resultados em baixo e médio contraste foram semelhantes ($p > 0,05$).

Tabela 1. Contraste C_{RMS} e resultados da análise de motilidade espermática (média \pm dp) utilizando o *plugin* CASA em diferentes níveis de contraste de imagem.

Contraste	$C_{RMS}^{(1)}$	Espermatozoides (n) ⁽²⁾	Motilidade (%) ⁽³⁾	VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$) ⁽⁴⁾
Alto	6,83 \pm 0,40a	104,67 \pm 17,93a	57,15 \pm 14,04a	71,44 \pm 9,24a
Médio	2,15 \pm 0,12b	214,83 \pm 51,57b	66,83 \pm 13,27b	66,04 \pm 6,91a
Baixo	1,38 \pm 0,12c	198,33 \pm 51,42b	62,47 \pm 16,81ab	63,89 \pm 5,58a

⁽¹⁾ $F(1,09,5,47) = 799,83$, $p < 0,05$, $\eta_p^2 = 0,99$, ⁽²⁾ $F(1,54,7,69) = 13,32$, $p < 0,05$, $\eta_p^2 = 0,73$, ⁽³⁾ $F(1,80,9,02) = 7,34$, $p < 0,05$, $\eta_p^2 = 0,59$, ⁽⁴⁾ $F(1,19,5,96) = 5,14$, $p > 0,05$, $\eta_p^2 = 0,51$. C_{RMS} = raiz quadrada média; VCL = Velocidade curvilínea; Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com o teste t com correção de Bonferroni.

Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre as técnicas de aprimoramento de imagem e os níveis de contraste para todas as variáveis CASA-Mot (Tabela 2). Em alto contraste, as principais diferenças entre as técnicas foram atribuídas ao *Contrast Stretching*, *Sharpen* e *Smooth*. Embora a taxa de motilidade apresentadas pelas técnicas *Contrast Stretching* e *Smooth* não tenha diferido em relação as demais técnicas, ambos o *Contrast Stretching* e *Smooth* afetaram ($p < 0,05$) a segmentação dos espermatozoides, resultando em uma estimativa irreal do número de espermatozoides. A técnica *Sharpen* apresentou valores de motilidade e velocidade curvilínea (VCL) superior ($p < 0,05$) as demais técnicas (Tabela 2). A utilização da técnica *Contrast Stretching* também resultou no aumento ($p < 0,05$) da VCL. Em contraste médio, poucas diferenças entre as técnicas foram observadas nos resultados do CASA-Mot. Em baixo contraste, as técnicas *Contrast Stretching*, *Mexican Hat* e *Smooth* reduziram ($p < 0,05$) a contagem de espermatozoides, entretanto pouca ou nenhuma diferença foi observada para a taxa de motilidade e VCL, respectivamente, entre as técnicas.

Considerando a consistência das técnicas nos diferentes níveis de contraste, apenas os resultados obtidos com *Median*, *Bandpass* e *Rolling-Ball* foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os níveis de contraste para o número de espermatozoides rastreados e a taxa de motilidade. A VCL, no entanto, foi menor ($p < 0,05$) em alto contraste para as três técnicas. Eliminando as técnicas com inconsistência e comparando os resultados obtidos nas técnicas *Median*, *Bandpass* e *Rolling-Bal* com imagens capturadas em nível ótimo de contraste e que não foram submetidas ao aprimoramento de imagens, as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Ainda, as técnicas *Median*, *Bandpass* e *Rolling-Ball* foram eficientes em remover ruídos do plano de fundo e partículas não desejadas (Figura 2).

Tabela 2. Efeito do aprimoramento de imagem na estimativa das variáveis do movimento espermático (média \pm dp) em diferentes níveis de contraste.

Contraste	Técnica	Espermatozoides (n) ⁽¹⁾	Motilidade (%) ⁽²⁾	VCL ($\mu\text{m/s}$) ⁽³⁾
Alto	<i>Contrast stretching</i>	97,33 \pm 19,21b	56,61 \pm 14,01a	67,58 \pm 6,50a
	<i>Median</i>	250,83 \pm 43,17a	57,65 \pm 13,89a	60,80 \pm 6,20b
	<i>Bandpass</i>	258,17 \pm 49,24a	56,61 \pm 13,34a	60,32 \pm 6,25b
	<i>Mexican Hat</i>	247,50 \pm 38,56a	58,89 \pm 13,23a	60,04 \pm 6,02b
	<i>Sharpen</i>	217,00 \pm 17,52a	76,47 \pm 11,11b	209,49 \pm 8,73c
	<i>Smooth</i>	68,33 \pm 17,17c	50,25 \pm 11,61a	60,39 \pm 5,44b
	<i>Rolling-Ball</i>	231,50 \pm 51,32a	54,02 \pm 12,19a	60,63 \pm 6,14b
Médio	<i>Contrast stretching</i>	204,00 \pm 48,66bc	66,58 \pm 14,45ab	66,48 \pm 7,12a
	<i>Median</i>	224,33 \pm 45,35ad	68,41 \pm 12,89a	65,84 \pm 7,38ab
	<i>Bandpass</i>	233,83 \pm 50,11a	67,48 \pm 13,73a	65,54 \pm 7,14b
	<i>Mexican Hat</i>	176,50 \pm 39,10abc	62,23 \pm 13,15b	65,74 \pm 6,95ab
	<i>Sharpen</i>	228,33 \pm 45,05ad	68,03 \pm 12,76a	67,48 \pm 7,12a
	<i>Smooth</i>	159,17 \pm 33,31c	66,55 \pm 13,68a	65,10 \pm 7,27b
	<i>Rolling-Ball</i>	218,33 \pm 46,86bd	67,44 \pm 13,48a	65,85 \pm 7,20ab
Baixo	<i>Contrast stretching</i>	188,33 \pm 41,97abc	62,38 \pm 14,72ab	65,56 \pm 4,55a
	<i>Median</i>	209,50 \pm 49,30ab	61,53 \pm 16,05ab	63,38 \pm 6,00a
	<i>Bandpass</i>	220,83 \pm 55,43ab	61,15 \pm 15,76ab	63,32 \pm 5,90a
	<i>Mexican Hat</i>	35,00 \pm 19,37d	53,58 \pm 16,72b	72,21 \pm 11,61a
	<i>Sharpen</i>	225,17 \pm 56,86a	63,36 \pm 15,36a	67,57 \pm 5,42a
	<i>Smooth</i>	162,33 \pm 39,51c	61,52 \pm 16,72ab	63,16 \pm 5,79a
	<i>Rolling-Ball</i>	207,17 \pm 51,94b	62,00 \pm 15,76ab	63,59 \pm 6,29a

Resultado da interação entre técnicas e níveis de contraste na ANOVA para medidas repetidas: ⁽¹⁾ $F(1,55,7,76) = 55,61, p < 0,05, \eta_p^2 = 0,92$, ⁽²⁾ $F(2,19,10,96) = 14,41, p < 0,05, \eta_p^2 = 0,74$, ⁽³⁾ $F(1,57,7,87) = 686,66, p < 0,05, \eta_p^2 = 0,99$. VCL=velocidade curvilínea; Em cada nível de contraste, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$), de acordo com o teste t com correção de Bonferroni.

Tabela 3. Diferença média nas variáveis do movimento espermático entre imagens aprimoradas e não aprimoradas (obtidas em médio contraste).

Contraste	Técnica	Espermatozoides (n)	Motilidade (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)
Alto	<i>Median</i>	36,00	-9,18	-5,24
	<i>Bandpass</i>	43,34	-10,22	-5,72
	<i>Rolling-Ball</i>	16,67	-12,81	-5,41
Médio	<i>Median</i>	9,50	1,58	-0,20
	<i>Bandpass</i>	19,00	0,65	-0,50
	<i>Rolling-Ball</i>	3,50	0,61	-0,19
Baixo	<i>Median</i>	-5,33	-5,30	-2,66
	<i>Bandpass</i>	6,00	-5,68	-2,72
	<i>Rolling-Ball</i>	-7,66	-4,83	-2,45

VCL=velocidade curvilínea; Nenhuma diferença foi significativa de acordo com o teste de Dunnett ($p > 0,05$).

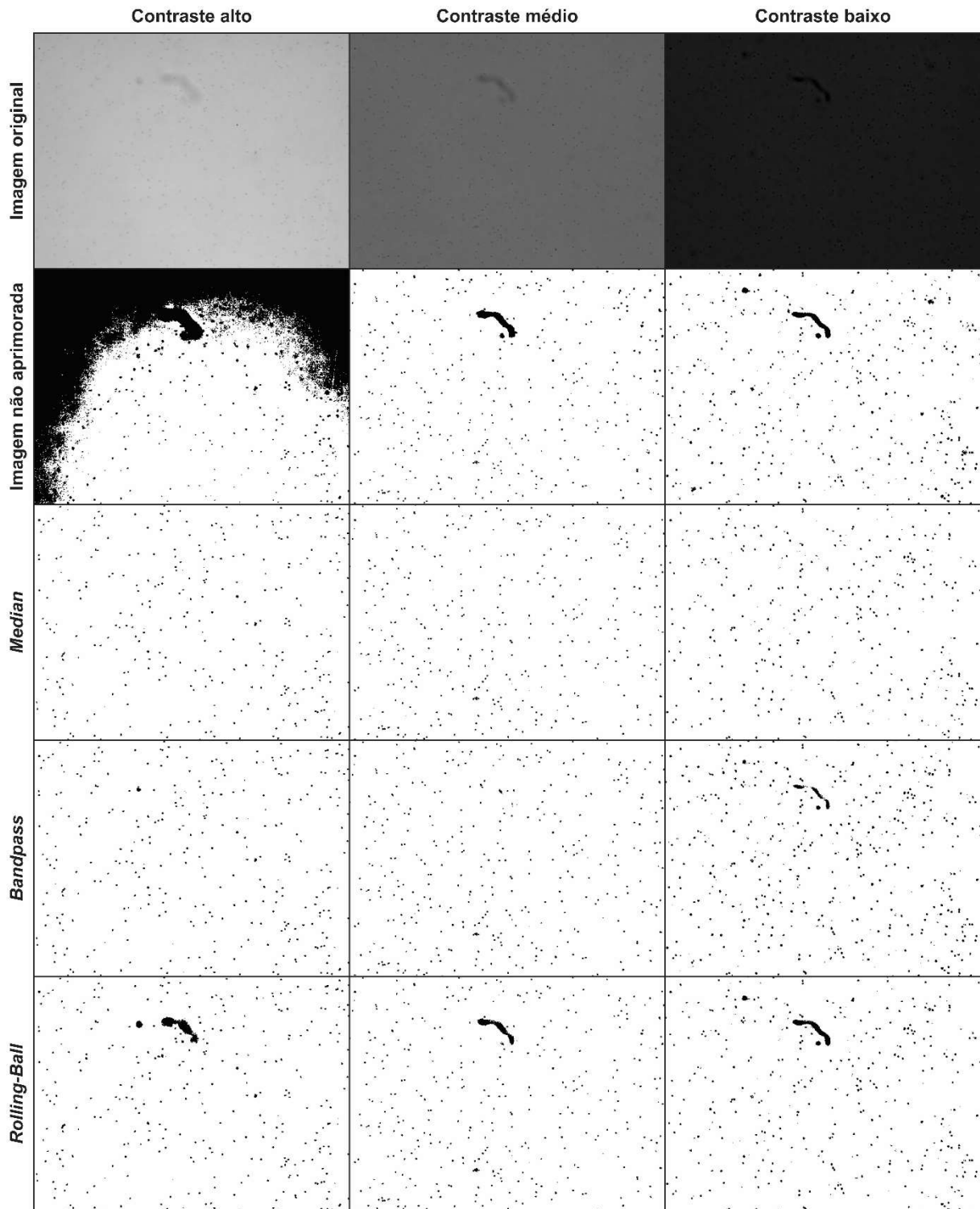


Figura 2. Segmentação dos espermatozoides de *Rhamdia quelen* em imagens não aprimoradas e em imagens aprimoradas utilizando as técnicas *Median*, *Bandpass* e *Rolling-Ball*.

4.1.4 Discussão

Imagens de boa qualidade do movimento espermático de peixes podem ser facilmente obtidas em ambiente controlado como em um laboratório. Entretanto, quando se deseja realizar uma avaliação em campo (e.g., durante o período reprodutivo), onde as condições não são muito apropriadas, o ajuste inadequado dos equipamentos pode interferir nos resultados. Em ambas as situações, ainda que o técnico julgue que o contraste entre os espermatozoides e o plano de fundo seja suficiente, o nível de contraste pode não ser o ideal porque os olhos humanos não distinguem variações sutis no contraste. Em muitos casos o problema é percebido apenas durante a análise das imagens quando as amostras de sêmen já foram processadas.

Durante a reprodução artificial de peixes é muito comum coletar várias amostras de sêmen para depois analisá-las quanto à qualidade (Adames et al., 2015; Bernardes Junior et al., 2017; Sanches et al., 2010). Uma série de vídeos do movimento espermático é gravada para então mensurar os parâmetros de motilidade. Os resultados do presente estudo demonstraram que o ajuste inadequado de contraste afetou a avaliação da motilidade, produzindo resultados equivocados do CASA-Mot. Este efeito negativo foi maior em alto contraste, no qual o plano de fundo recebeu uma iluminação mais clara, em relação aos demais.

Em alto contraste, o excesso de luminosidade afetou o plano de fundo, que resultou em considerável redução da resolução espacial, afetando os cálculos do limiar no processo de segmentação. O valor de limiar distanciou-se dos valores dos *pixels* que compõem a cabeça do espermatozoide, que pôde ser comprovado por regiões contínuas escuras nas imagens segmentadas. Este tipo de perda não é mitigado pelo *plugin* CASA-Mot e o resultado final foi um baixo número de espermatozoides rastreados e baixa taxa de motilidade. Nesta condição, o aprimoramento das imagens foi necessário.

Na avaliação da qualidade do sêmen de mamíferos, principalmente de humanos, o aprimoramento de imagens é uma etapa rotineira e, técnica *Mexican Hat* normalmente é aplicada para aumentar o contraste (Witkowski, 2004; Tan and Mat Isa, 2016; Urbano et al., 2017). Ao menos para peixes, os resultados presentes mostraram que a efetividade do *Mexican Hat* depende do nível de contraste em que as imagens são capturadas e não deve ser utilizado em imagens com baixo contraste. Apesar da técnica identificar corretamente o contorno da cabeça dos espermatozoides em imagens com baixo contraste, os ruídos no plano de fundo foram acentuados, gerando partículas inertes com tamanho semelhante ao dos espermatozoides que reduziram a estimativa da taxa de motilidade.

A técnica *Sharpen* apresentou resultados esperançosos em médio e baixo contraste. Porém, a ocorrência de ruídos em alto contraste afetou os resultados, onde as posições e

frequências de ocorrência dos ruídos foi considerada pelo *plugin* CASA-Mot, sendo confundidos com espermatozoides, com alta velocidade.

Considerando a performance das técnicas nos diferentes níveis de contraste, as técnicas *Median*, *Bandpass* e *Rolling-Ball* melhoraram a qualidade das imagens e produziram mensurações do movimento espermático comparáveis àquelas obtidas com imagens não aprimoradas que foram capturadas sob ótimo contraste. O *Median* e o *Bandpass* fazem parte de duas categorias distintas de aprimoramento de imagem. O *Median* é um filtro não-linear que manipula diretamente os valores dos *pixels* enquanto que o *Bandpass* é um filtro no domínio da frequência que modifica a transformada de Fourier de uma imagem (Gonzalez e Woods, 2002).

Apesar das diferenças conceituais, ambas as técnicas foram efetivas e podem ser utilizadas até mesmo em imagens com boa qualidade. Ao reduzir a frequência dos *pixels* que estão fora dos limites definidos, as técnicas *Bandpass* realçou o contorno da cabeça dos espermatozoides e atenuou o ruído do plano de fundo. Embora a maioria dos detalhes da imagem possa ser perdida ao utilizar o *Bandpass* (Gonzalez e Woods, 2002), os centroides foram preservados, o que é relevante para análise utilizando o CASA-Mot.

A principal função da técnica *Median* é forçar os diferentes valores dos *pixels* a se tornarem mais parecidos com os *pixels* vizinhos (Gonzalez e Woods, 2002). Desta forma, o intervalo dos valores de *pixel* do fundo foi comprimido e o contorno da cabeça dos espermatozoides foi preservado. Com a aplicação desta técnica, a segmentação dos espermatozoides foi precisa.

Além de ser uma das técnicas de ordem estatística mais conhecida no processamento digital de imagens, o *Median* é bastante popular devido à sua notável capacidade de reduzir ruídos aleatórios (e.g., *salt-and-pepper*) (Gonzalez e Woods, 2002). Essa vantagem tornou-se evidente através da remoção de sombras causadas pela presença esporádica de poeira nas superfícies óticas do microscópio ou na lamínula. Ressalta-se que apenas as partículas que não estavam no mesmo plano focal de espermatozoides foram removidas.

A técnica *Rolling-Ball background subtraction* realiza operações complexas capazes de detectar objetos em primeiro plano e remover planos de fundos contínuos e heterogêneos (Sternberg, 1983). Operações de erosão, dilatação e abertura são realizadas enquanto, conceitualmente, uma bola rola sobre a superfície da imagem (Sternberg, 1983; Lou et al., 2014). É preciso cuidado ao ajustar o raio da bola para garantir que o centro da cabeça do espermatozoide não seja apagado. Segundo Castle e Keller (2007), o raio da bola deve ser tão grande quanto o raio do maior objeto de interesse na imagem. No entanto, os testes piloto indicaram que um raio equivalente à metade do tamanho (15 *pixels*) do maior centroide (30

pixels) produziu melhores resultados. Um raio inferior ao menor centroide menor comprometeu a segmentação dos espermatozoides e um raio superior ao maior centroide acentuou o ruído no plano de fundo. Em condições com a presença de ruídos de tamanho superior aos maiores espermatozoides, o uso de um valor de raio inferior a metade do maior centroide é recomendada, removendo desta forma o ruído.

Apesar de considerarmos neste trabalho o contraste médio uma condição ótima para a captura de imagens espermática em peixes, foi observada a presença de ruído em médio contraste, que foi desconsiderada da análise de motilidade devido ao tamanho mínimo dos espermatozoides (*Minimum sperm size* = 4 pixels) configurado no *plugin* CASA-Mot.

4.1.5 Conclusão

As técnicas de aprimoramento de imagens *Median*, *Bandpass* e *Rolling-Ball* podem ser utilizadas para melhorar o contraste entre a cabeça dos espermatozoides e o plano de fundo, e devem ser aplicadas previamente à etapa de segmentação, mesmo sob ótimo contraste.

4.1.6 Referências

- Adames, M.S., Toledo, C.P.R., Neumann, G., Buzzi, A.H., Buratto, C.N., Piana, P.A., Bombardelli, R.A., 2015. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *Animal Reproduction Science* 162, 119-128.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International* 29, 101-110.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International* 30, 1-14.
- Amann, R.P., Waberski, D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, 5-17.
- Bernardes Júnior, J.J., Bombardelli, R.A., Nuñez, A.P.O., 2017. Gonadorelin increases semen production and does not affect its quality in *Leporinus obtusidens*. *Animal Reproduction Science* 185, 154-160.

- Beyerer, J., Puente León, F., Frese, C., 2016. Preprocessing and Image Enhancement, Machine Vision: Automated Visual Inspection: Theory, Practice and Applications, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 465-519.
- Bompart, D., García-Molina, A., Valverde, A., Caldeira, C., Yániz, J., Núñez de Murga, M., Soler, C., 2018. CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development* 30, 810-819.
- Boryshpolets, S., Cosson, J., Bondarenko, V., Gillies, E., Rodina, M., Dzyuba, B., Linhart, O. 2013a. Different swimming behaviors of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa close to solid and free surfaces. *Theriogenology* 79, 81-86
- Boryshpolets, S., Kowalski, R.K., Dietrich, G.J., Dzyuba, B., Ciereszko, A., 2013b. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology* 80, 758-765.
- Castle, M., Keller, J., 2007. Rolling Ball Background Subtraction (ImageJ). Available at: http://imagej.net/plugins/download/Rolling_Ball_Background.java.
- Fauvel, C., Suquet, M., Cosson, J., 2010. Evaluation of fish sperm quality. *J Appl Ichthyol.* 26, 636-643.
- Ferreira, T., Rasband, W.S., 2012. ImageJ User Guide, IJ 1.46r. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/>.
- Gallego, V., Carneiro, P.C.F., Mazzeo, I., Vílchez, M.C., Peñaranda, D.S., Soler, C., Pérez, L., Asturiano, J.F., 2013. Standardization of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm motility evaluation by CASA software. *Theriogenology* 79, 1034-1040.
- Gonzalez, R.C., Woods, R.E., 2002. Digital Image Processing. 2nd edition. New Jersey: Prentice-Hall Inc.
- Howell, D.C., 2012. Statistical Methods for Psychology. Wadsworth, Belmont, CA, USA.
- Immerman, D.A., Goetz, F.W., 2014. The activation and cryopreservation of sablefish (*Anoplopoma fimbria*) sperm. *Aquaculture* 430, 211-217.
- Keller, H.E., 2003. Proper Alignment of the Microscope, In: Wilson, L., Matsudaira, P. (Eds.), *Methods in Cell Biology*, Academic Press, pp. 45-55.
- Kheirkhah, F.M., Mohammadi, H.R.S., Shahverdi, A., 2018. Modified histogram-based segmentation and adaptive distance tracking of sperm cells image sequences. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 154, 173-182.
- Krig, S., 2014. Image Pre-Processing, Computer Vision Metrics: Survey, Taxonomy, and Analysis, Apress, Berkeley, CA, pp. 39-83.

- Lou, S., Jiang, X., Scott, P. J., 2014. Applications of Morphological Operations in Surface Metrology and Dimensional Metrology. *Journal of Physics: Conference Series* 483, 12020.
- Lu, J.C., Huang, Y.F., Lü, N.Q., 2014. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* 46, 329-338.
- Montoya, C.A., Cruz-Roa, A., Cruz-Casallas, E., Cruz-Roa, Á., 2016. Caracterización y clasificación automática de la movilidad masal de espermatozoides de peces como apoya a la reproducción asistida veterinaria. *Revista BI* 1, 13-34.
- Mortimer, S.T., Horst, G.V.D., Mortimer, D., 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* 17, 545-553.
- Mortimer, S.T., Swan, M.A., 1999. Effect of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. *Human Reproduction* 14, 997-1004.
- Neumann, G., Bernardes Júnior, J.J., Sanches, P.V., Piana, P.A., Bombardelli, R.A., 2017. Contribution of the CASA system, based on open source software, to the assessment of sperm characteristics: informetric and usage-based approaches. *Revista Brasileira de Zootecnia* 46, 560-568.
- Peli, E., 1990. Contrast in complex images. *Journal of the Optical Society of America A* 7, 2032-2040.
- Prodanov, D., 2012. Mexican Hat Filter. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/mexican-hat/index.html>.
- Ridler, T.W., Calvard, S., 1978. Picture thresholding using an iterative selection method. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 8, 630-632.
- Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., Eliceiri, K.W., 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18, 529.
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234, 1-28.
- Sanches, E. A., Marcos, R. M., Okawara, R. Y., Caneppele, D., Bombardelli, R. A., Romagosa, E. 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *Journal of Applied Ichthyology* 29, 1114-1122.
- Sanches, E.A., Bombardelli, R.A., Marcos, R.M., Neumann, G., Toledo, C.P.R.de., Romagosa, E., 2010. Sperm motility and *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research* 42, 153-156.

- Sanderson, J. 2000. The Theory of Contrast Control in the Microscope. *Quekett Journal of Microscopy*, 38, 617-627.
- Schmid, M. 2010. Fast Filters. Available at: http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:filter:fast_filters:start.
- Simpson, J.L., Humphries, S., Evans, J.P., Simmons, L.W., Fitzpatrick, J.L., 2014. Relationships between sperm length and speed differ among three internally and three externally fertilizing species. *Evolution* 68, 92-104.
- Soler, C., Picazo-Bueno, J.Á., Micó, V., Valverde, A., Bompart, D., Blasco, F.J., Álvarez, J.G., García-Molina, A., 2018. Effect of counting chamber depth on the accuracy of lensless microscopy for the assessment of boar sperm motility. *Reproduction, Fertility and Development* 30, 924-934.
- Sternberg, S.R., 1983. Biomedical Image Processing. *IEEE Computer* 16, 22-34.
- Tan, W.C., Mat Isa, N.A., 2016. Automated Sperm Head Detection Using Intersecting Cortical Model Optimized by Particle Swarm Optimization. *Plos One* 11, e0162985.
- Urbano, L.F., Masson, P., VerMilyea, M., Kam, M., 2017. Automatic tracking and motility analysis of Human sperm in time-lapse images. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 36, 792-801.
- Walter, J., 2001. FFT Bandpass filter. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/fft-filter.html>.
- Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661-672.
- Witkowski, L., 2004. An automatic system for calculating basic semen parameters. *Task Quarterly* 8, 231-236.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*. 5th edition. New Jersey: Prentice Hall.

4.2 Artigo 2 – Influência da técnica de rastreamento na estimativa das variáveis de motilidade de espermatozoides de peixes em vídeos simulados.

Resumo

A técnica de rastreamento espermática utilizada por um sistema de análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) pode afetar os resultados de motilidade. O presente estudo avaliou de que forma duas técnicas de rastreamento com níveis distintos de complexidade *Nearest Neighbor* (NN) e *Multiple Hypothesis Tracking* (MHT) afetam os resultados de motilidade, número de espermatozoides rastreados, quantidade de erros de rastreamento e tempo de análise em vídeos simulados do movimento espermáticos de peixe. Foram simulados 36 vídeos do movimento espermático (100 fps; 800x500 pixels) de *Rhamdia quelen*. O delineamento foi composto por quatro densidades de espermatozoides no campo visual (50, 100, 200 e 300) e três taxas de motilidade (30, 60 e 90%), com três repetições. As taxas de motilidade avaliadas apresentaram variação máxima de 6,59 e 4,41% para as técnicas NN e MHT, respectivamente, em relação aos valores reais. O número de espermatozoides rastreado foi subestimado pelo NN e MHT, em relação aos valores reais, contabilizaram respectivamente 73,00 e 92,50% do real número de espermatozoides. A quantidade de erros de rastreamento foi influenciada pelo número de espermatozoides presentes nos vídeos e as taxas de motilidade, quanto maior a quantidade de espermatozoides e maior a taxa de motilidade, maior a ocorrência de erros de rastreamento ($p < 0,05$). O NN apresentou maiores quantidades de erros de rastreamento (12,00%) em relação MHT (4,70%). O tempo de análise com o MHT foi maior ($p < 0,05$) que o NN. O rastreamento espermático utilizando a técnica MHT garante alta precisão nos resultados, em comparação a técnica NN.

Palavras-chave: Motilidade espermática, erro de rastreamento, *Nearest Neighbor*, *Multiple Hypothesis Tracking*.

4.2.1 Introdução

Os sistemas de análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) foram desenvolvidos para produzirem medições confiáveis, precisas e objetivas (Gallego et al., 2018; Rurangwa et al. 2004). A quantidade de sistemas CASA-Mot comerciais vem aumentando (Yániz et al., 2018) e embora utilizem *softwares* proprietários cujas informações sobre os

métodos de detecção e rastreamento dos espermatozoides não são disponibilizadas, a grande maioria aparentemente se baseia na técnica original (Mortimer, 2000).

As técnicas de rastreamento de espermatozoides foram, inicialmente, uma adaptação dos algoritmos de rastreamento de alvos com o uso de radares (Blackman e Popoli, 1999). Com a evolução das técnicas, os algoritmos que antigamente conseguiam detectar e rastrear um pequeno número de alvos isolados, hoje são capazes de rastrear múltiplos alvos em condições adversas (Urbano et al., 2017, Chenouard et al., 2013).

Wilson-Leedy e Ingermann (2007) foram os primeiros a desenvolver um *software* CASA-Mot em código aberto, como *plugin*, para o estudo da motilidade dos espermatozoides de peixe, especificamente para *Danio rerio*. A flexibilidade de ajuste dos parâmetros permitiu que o *software* fosse adaptado para uso com várias espécies de peixes, bem como outros táxons (Neumann et al., 2017).

O rastreamento de espermatozoides pode ser pensado como um problema de correspondência (Yilmaz, Javed e Shah, 2006), cujo desafio é identificar as diferentes posições de um mesmo espermatozoide em sucessivas imagens (quadros) de um arquivo de vídeo. A solução para o problema pode ser particularmente complicada pelas saídas e entradas de espermatozoides do campo visual, pelas colisões entre espermatozoides e pela presença de ruídos na amostra (partículas indesejadas) (Elsayed, El-Sherry e Abdelgawad, 2015).

O *plugin* CASA-Mot e a maioria dos *softwares* proprietários utilizam o método de rastreamento *Nearest Neighbor* (NN) para construir a trajetória dos espermatozoides (Urbano et al., 2017). O NN, identifica quais objetos em imagens sucessivas estão mais próximos e se estiverem dentro de uma distância definida pelo usuário (janela de validação “*gate*” ou velocidade máxima entre quadros), serão associados para formar a trajetória. Computacionalmente, o NN é menos complexo e o mais rápido para a associação de objetos a trajetórias (Abbiramy, Shanthi e Alliburai, 2010).

De acordo com Urbano et al., (2017), o NN funciona bem para rastrear um pequeno número de objetos bem separados, porém sua eficiência reduz rapidamente se as janelas de validação contiverem múltiplas detecções conflitantes. Mesmo utilizando vários parâmetros de validação, há várias situações em que as trajetórias são reconstruídas de forma incorreta (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007). Os erros de rastreamento normalmente são observados em trajetórias com mudanças abruptas de direção (Bernardes Júnior et al., 2018; Chalde et al., 2014, Immerman e Goetz, 2014; Boryshpolets et al., 2013; Kalbassi, Lorestani e Maramazi, 2013, Sanches et al., 2013; Zupa et al., 2013; Sanches et al., 2010).

Uma série de técnicas foram propostas com o intuito de aumentar a precisão do rastreamento e solucionar problemas com colisão, oclusão e falsas detecções. Especificamente para o rastreamento de espermatozoides, as técnicas mais recentes são *Hybrid Dynamic Bayesian network* (HDBN) (Arasteh, Vahdat e Yazdi, 2018), *Joint Probabilistic Data Association Filter* (JPDAF) (Urbano et al., 2017), *Hungarian Kalman Filter* (Jati et al., 2016, Sørensen et al., 2008) e *Khan's Markov chain Monte Carlo-based* (MCMC-based) (Tomlinson et al., 2010).

Embora não tenha sido implementada em *softwares* CASA-Mot, a técnica considerada atualmente mais robusta é o *Multiple Hypothesis Tracking* (MHT), que essencialmente é um estimador de probabilidade máxima a posteriori (Pulford, 2005). O MHT utiliza técnicas de correspondência (filtro Kalman) para associar objetos a trajetórias, e as posições de cada objeto são identificadas e avaliadas em várias imagens consecutivas antes de atribuir um objeto da imagem atual a uma trajetória (Chenouard et al., 2013). Em cada etapa, certas hipóteses são formadas e à medida que novas observações chegam, novas hipóteses são formadas com base nas hipóteses anteriores, e a saída é uma hipótese com a probabilidade máxima a posteriori (Arasteh, Vahdat e Yazdi, 2018).

Devido à alta complexidade do MHT há um crescimento exponencial de hipóteses que é diretamente influenciado pela quantidade de objetos e imagens, e conseqüentemente pode haver um elevado consumo de recursos computacionais e tempo de processamento (Pulford, 2005). Por esta razão, argumenta-se que para a análise da motilidade de espermatozoides o MHT seja a técnica mais robusta, porém menos prática que o NN.

Portanto, o presente estudo foi conduzido para avaliar como as técnicas de rastreamento NN e MHT influenciam na determinação da taxa de motilidade, no número de espermatozoides rastreados, nos erros de rastreamento e no tempo de análise em vídeos simulados do movimento espermático de peixe com diferentes densidades e taxas de motilidade.

4.2.2 Material e métodos

4.2.2.1 Vídeos do movimento espermático de peixes

Vídeos do movimento espermático foram produzidos utilizando um simulador baseado na *Web* desenvolvido por Arasteh e Vahdat (2015). O código fonte, inicialmente elaborado para simular o movimento espermático de humanos, foi adaptado para gerar partículas compatíveis em tamanho e movimento com o de espermatozoides de peixe, especificamente o jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) (Sanches et al., 2010).

Foram produzidos 36 vídeos (formato AVI, resolução de 800 x 500 *pixels*, 1 s de duração total, taxa de captura de 100 quadros (imagens) por segundo) do movimento espermático considerando dois fatores com três repetições, sendo: (1) número de espermatozoides no campo visual (50, 100, 200 e 300); e (2) taxa de motilidade (30, 60 e 90 %). Esses fatores foram simulados utilizando os parâmetros (Arasteh e Vahdat, 2015): número de quadros (imagens) (100), número de espermatozoides, espermatozoides não progressivos (0), espermatozoides progressivos, espermatozoides imóveis, desfoque *Gaussiano* (0,3) e ruído (0).

4.2.2.2 Implementação dos códigos

Para a realização dos testes foi desenvolvido um *software free* em linguagem *java*, no qual foram incluídos códigos nativos do *software* ImageJ (Rueden et al., 2017), do *plugin* CASA-Mot contendo o algoritmo *Nearest Neighbor* (adaptado de Wilson-Leedy e Ingermann, 2007) e do algoritmo *Multiple Hypothesis Tracking* desenvolvido por Chenouard et al. (2013) sob uma metodologia “*Single Motion*” randômica em perspectiva 2D (Chenouard et al., 2013).

4.2.2.2.1 Leitura de vídeo, segmentação e detecção espermática

No *software*, os vídeos foram importados e convertidos em sequência de imagens (escala de cinza 8-bits) utilizando o algoritmo *Avi-Reader* (Schmid e Marsh, 2002).

Os espermatozoides foram segmentados utilizando um algoritmo de limiarização, sob um método iterativo global (binarização; *IsoData*) (Ridler, 1978), aplicado para cada imagem da sequência (*frame by frame*) (Urbano et al., 2017). Neste procedimento, os valores dos *pixels* que compõem a cabeça do espermatozoide (centroide) foram substituídos por 0 (preto) e o plano de fundo por 1 (branco);

A posição (coordenadas *xy*) dos centroides em cada imagem foi determinada utilizando o algoritmo *MTrack2* (Stuurman, 2003) adaptado por Lor et al. (2015) e Wilson-Leedy e Ingermann (2007). O critério de detecção foi baseado no tamanho do centroide, considerando como área mínima e máxima, 5 e 25 *pixels*, respectivamente.

4.2.2.2.2 Rastreamento espermático

Para identificação e determinação das trajetórias percorridas pelos espermatozoides, foram utilizadas duas técnicas de rastreamento: (1) *Nearest Neighbor* (NN) (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007) e (2) *Multiple Hypothesis Tracking* (MHT) (Chenouard et al., 2013).

No método NN foi utilizado um raio de deslocamento (*gate* ou *maximum sperm velocity between frames*) de seis *pixels* para atribuir um espermatozoide à uma trajetória no tempo $t + 1$ com base em sua posição no tempo t .

Para o método MHT foram ajustados os parâmetros: raio de deslocamento (*gate factor*) de quatro *pixels*; um valor de quatro *pixels* para a profundidade de quadros (*MHT depth* ou *slide window*) que representa o número de imagens (*frames*) consecutivas que são avaliados no futuro para a tomada de decisão e atribuição da atual posição a um caminho já existente; valor de cinco para o número de falsas detecções por imagem; valor de 0.9 para a taxa de detecção que representa a probabilidade de detectar um objeto de interesse existente e; valor de três (*pixels*) para o deslocamento da posição xy .

4.2.2.3 Parametrização dos rastreadores para identificação de espermatozoides móveis

Após a atribuição dos espermatozoides às respectivas trajetórias, a classificação em espermatozoides móveis e imóveis foi realizada de acordo com os parâmetros propostos por Wilson-Leedy e Ingermann (2007). Foram considerados: (1) velocidade em linha reta (VSL) mínima de 3 ($\mu\text{m/s}$); (2) velocidade média de deslocamento (VAP) mínima de 6 ($\mu\text{m/s}$) e (3) velocidade curvilínea (VCL) mínima de 9 ($\mu\text{m/s}$).

4.2.2.4 Cálculos do movimento espermático

A taxa de motilidade e o número de espermatozoides rastreados foram determinados conforme Wilson-Leedy e Ingermann (2007). Apenas os espermatozoides que permaneceram no campo visual em todas as imagens foram considerados nas análises, portanto, foram eliminados os espermatozoides que entraram ou saíram do campo visual.

4.2.2.5 Avaliação dos erros de rastreamento e tempo de análise

Todos os espermatozoides considerados nas análises foram numerados e suas trajetórias (*paths*) foram construídas e impressas em um arquivo de imagem (Figura 1A). O número de erros de rastreamento de cada técnica foi computado ao comparar os *paths* resultantes das análises com a projeção em máxima intensidade (Figura 1B). A projeção de máxima intensidade (*Image/Stacks/Z Project/Projection Type: max intensity*) foi gerada no *software* ImageJ (Rueden et al., 2017), considerando todos os espermatozoides presentes no vídeo (100 imagens) (Wilson-Leedy e Ingermann, 2006; Sanches et al., 2013).

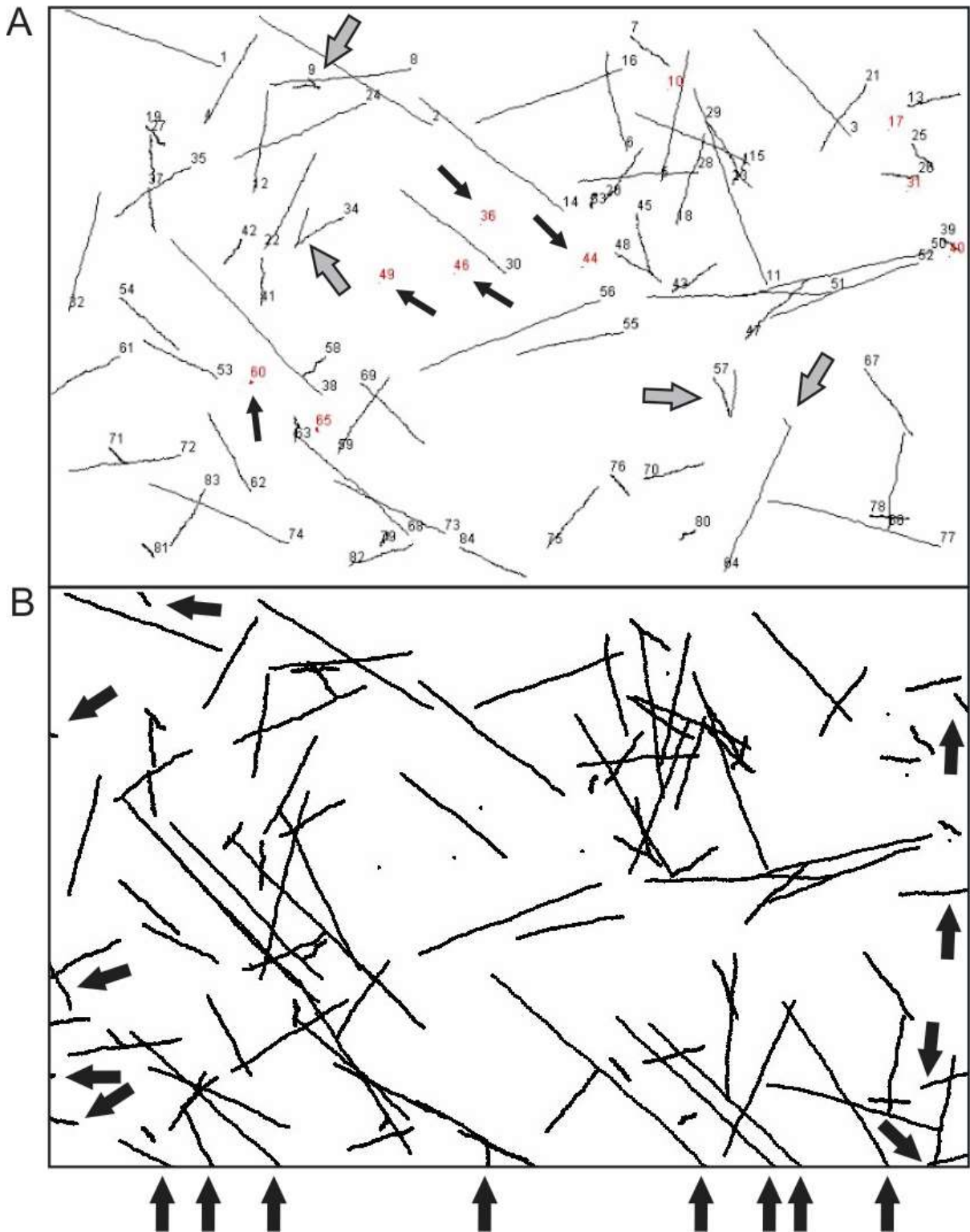


Figura 3. Trajetória dos espermatozoides rastreados; (A) e a projeção de máxima intensidade gerada no ImageJ; (B) Setas finas pretas: espermatozoides imóveis; Setas largas cinzas: falsa trajetória após colisão entre espermatozoides; Setas largas pretas: espermatozoides eliminados na análise por saírem ou entrarem no campo visual.

O tempo de processamento e de análise utilizando cada técnica de rastreamento foi gerado automaticamente pelo *software* para cada vídeo e os dados foram exportados para uma planilha eletrônica.

4.2.2.6 Ambiente de teste

O *software* foi executado em laptop Intel(R) Core(TM) i5-2450M CPU 2.5GHz, 8,00 GB de memória RAM, 120 GB de HD SSD, Sistema Operacional Windows 10 Pro (x64).

4.2.2.7 Análise estatística

Para avaliar a aderência da taxa de motilidade e do número de espermatozoides no campo visual entre o estimado pelas técnicas de rastreamento (NN e MHT) e o valor real, foi realizada uma análise de regressão linear para cada técnica. Os coeficientes angular e linear foram comparados entre as regressões através da análise de covariância (Zar, 2010). Para avaliar se os coeficientes angular e linear diferiram dos valores esperados, o teste F foi aplicado à soma de quadrado dos resíduos de cada regressão. Os valores esperados para cada relação perfeita entre valores reais e estimados são de zero para o coeficiente linear e um para o coeficiente angular.

A relação entre o número de espermatozoides no campo visual e o número de erros de rastreamento foi avaliada através da análise de regressão não linear utilizando um modelo polinomial de segunda ordem. A soma de quadrado dos resíduos foi determinada para cada regressão e utilizado para comparar as curvas através do teste F . Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%.

4.2.3 Resultados

A relação entre a taxa de motilidade real e a estimada pelas técnicas de rastreamento NN e MHT é mostrada na figura 4. Os coeficientes angulares das retas foram iguais ($F_{1,2} = 2,22$; $p > 0,05$) entre os rastreadores e tanto o MHT ($F_{1,34} = 0,16$; $p > 0,05$) quanto o NN ($F_{1,34} = 3,89$; $p > 0,05$) foram iguais a um. O coeficiente linear da regressão ajustada para o NN foi significativamente menor que zero ($F_{1,34} = 57,10$; $p < 0,05$) e menor que o valor obtido para o MHT ($F_{1,3} = 73,44$; $p < 0,05$), indicando que as taxas de motilidade foram subestimadas (Figura 4). Para o MHT, o coeficiente linear foi igual a zero ($F_{1,34} = 0,89$; $p > 0,05$). A diferença ente motilidade real e a calculada variou de 1,94 a 6,59 % para o NN e de 0,17 a 4,41% para o MHT.

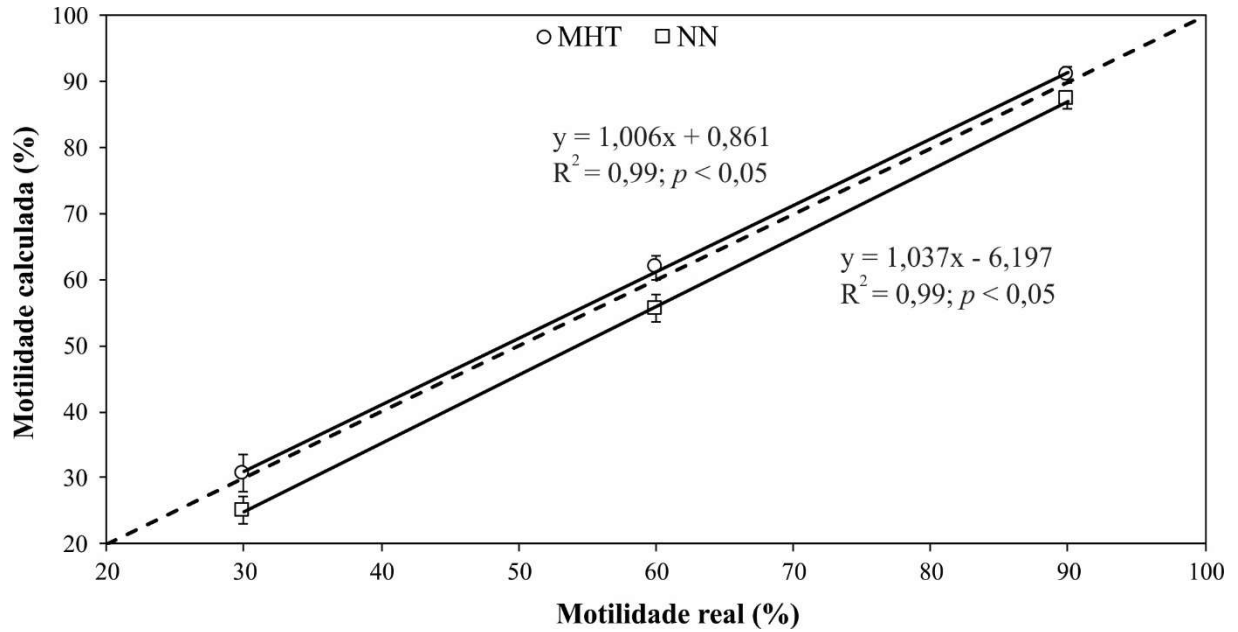


Figura 4. Relação entre a taxa de motilidade real e a estimada com as técnicas de rastreamento MHT (*Multiple Hypothesis Tracking*) e NN (*Nearest Neighbor*) em vídeos simulados do movimento espermático de peixe. Linhas contínuas representam o ajuste da regressão linear. A linha segmentada representa a relação esperada (1:1) entre as variáveis.

O número de espermatozoides no campo visual influenciou a capacidade de contabilização pelos rastreadores (Figura 5). Os coeficientes angulares dos modelos ajustados para o MHT ($F_{1,2} = 35,64; p < 0,05$) e NN ($F_{1,2} = 71,05; p < 0,05$) foram menores que um, indicando que um aumento no número de espermatozoides no campo visual reduziu o número de espermatozoides efetivamente considerados (Figura 5). A taxa de variação diferiu entre os rastreadores ($F_{1,4}=31,49; p < 0,05$), sendo que o NN contabilizou cerca de 73,00 % dos espermatozoides enquanto o MHT se aproximou mais do valor real (92,50 %) (Figura 5).

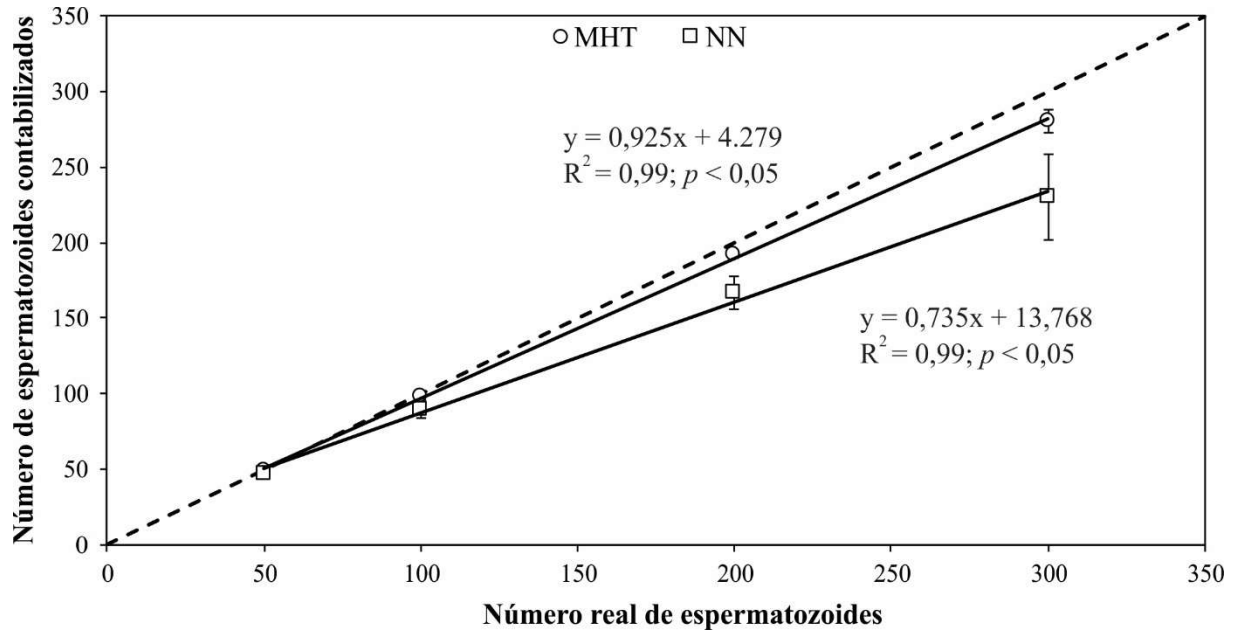


Figura 5. Relação entre o número de espermatozoides no campo visual e o número de espermatozoides contabilizados na análise com os rastreadores MHT (*Multiple Hypothesis Tracking*) e NN (*Nearest Neighbor*) em vídeos simulados do movimento espermático de peixe. Linhas contínuas representam o ajuste da regressão linear. A linha segmentada representa a relação esperada (1:1) entre as variáveis.

A incidência de erros de rastreamento foi influenciada pelo número de espermatozoides no campo visual, especialmente nas taxas de motilidade de 60,00 e 90,00 % (Figura 6). Em baixa taxa de motilidade (30,00 %) o rastreador MHT produziu pequeno número de erros de rastreamento, não relacionados com a densidade (regressão não significativa) (Figura 6). Nos vídeos com motilidades de 60,00 % ($F_{3,18} = 11,71; p < 0,05$) e 90,00 % ($F_{3,18} = 71,13; p < 0,05$) foram observadas diferenças entre os rastreadores, porém em ambos, o número de erros aumentou com o aumento da densidade de espermatozoides (Figura 6). O percentual de erros atingiu o máximo em alta motilidade (90,00 %), totalizando 12,00 % com o rastreador NN e 4,70 % com o MHT.

O tempo necessário para analisar cada vídeo utilizando o rastreador MHT variou na proporção do quadrado do número de espermatozoides (Figura 7), perfazendo 150 s para concluir o processamento de um vídeo contendo 300 espermatozoides no campo visual. Para o NN, o número de espermatozoides não demonstrou relação com a duração, sendo que as análises foram concluídas em menos de 0,5 s em todas as densidades (Figura 7).

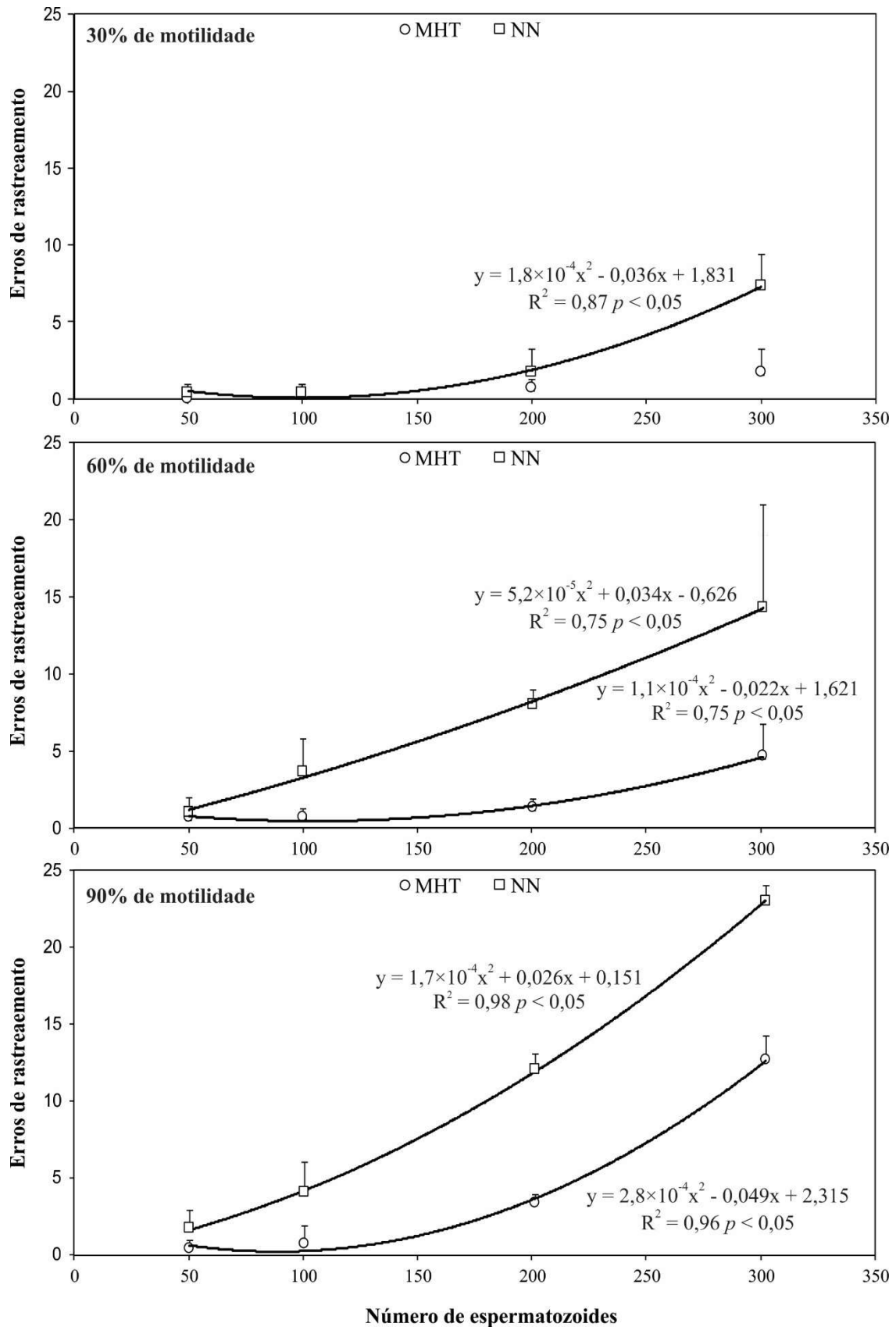


Figura 6. Erros de rastreamento gerados pelas técnicas MHT (*Multiple Hypothesis Tracking*) e NN (*Nearest Neighbor*) em vídeos simulados do movimento espermático de peixe contendo diferentes taxas de motilidade e densidades de espermatozoides.

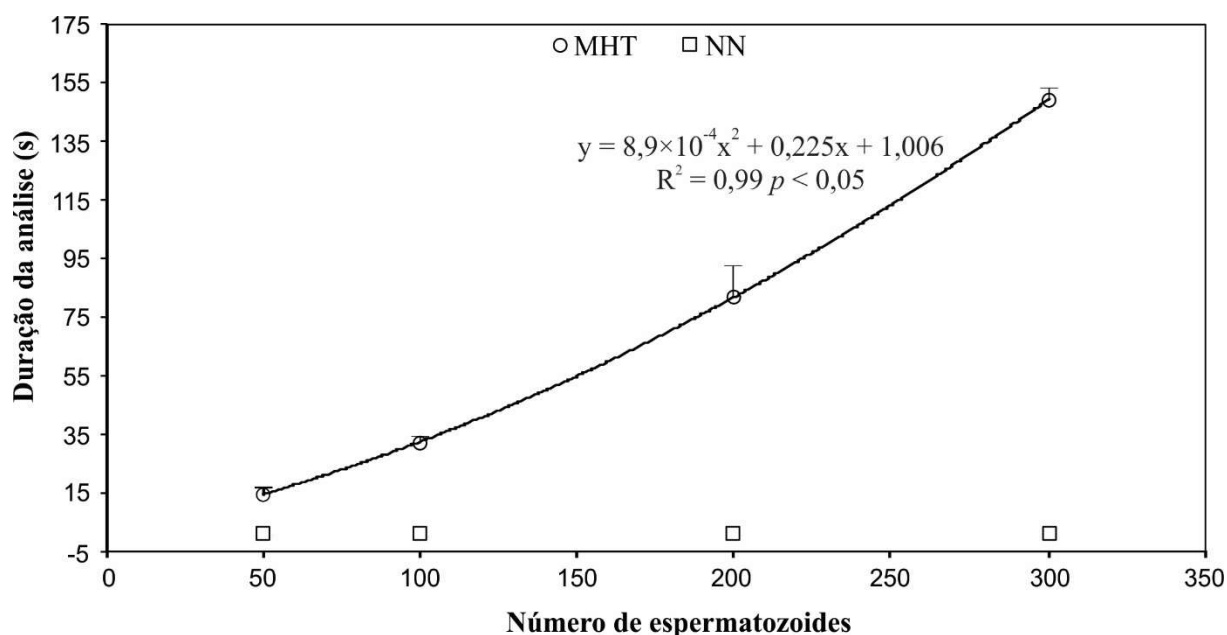


Figura 7. Duração da análise utilizando as técnicas de rastreamento MHT (*Multiple Hypothesis Tracking*) e NN (*Nearest Neighbor*) em vídeos simulados do movimento espermático de peixe contendo diferentes densidades de espermatozoides.

4.2.4 Discussão

A precisão no rastreamento de espermatozoides depende não somente das técnicas de rastreamento e associação, mas de características intrínsecas a amostra como a ocorrência de colisões, oclusões e entradas e saídas de espermatozoides do campo visual (Verstegen et al., 2002; Elsayed et al., 2015).

Uma das técnicas mais comuns e amplamente utilizadas para o rastreamento e associação de alvos é o NN. Apesar da rapidez na associação dos dados (< 0,5 s por vídeo) em todas as densidades de espermatozoides no campo visual, os resultados do presente estudo evidenciaram que os eventos de colisão entre espermatozoides fizeram com que o NN subestimasse as taxas de motilidade em até 6,5% e o número de espermatozoides em até 30%.

Em parte, a redução do número de espermatozoides contabilizados é explicada pela alteração na área ocupada pelos centroides no momento da colisão. Segundo Wilson-Leedy e Ingermann (2007), quando dois ou mais centroides se fundem numa determinada imagem e o tamanho da área ocupada é superior ao máximo definido (>25 *pixels*), o algoritmo exclui ambos os espermatozoides da análise. Variações na estimativa da taxa de motilidade são uma

consequência da exclusão de espermatozoides e o aumento ou redução da taxa dependerá se os espermatozoides excluídos forem móveis ou imóveis.

Nos eventos de colisão entre espermatozoides móveis, ou quando um espermatozoide se deslocando progressivamente colide com um espermatozoide imóvel ou lento, e a área ocupada pela fusão dos centroides for inferior ao tamanho máximo ($<25 \text{ pixels}$), prevalecem as regras da técnica de rastreamento.

Sob a regra do vizinho mais próximo (NN), as coordenadas ocupadas pelos centroides na imagem anterior e posterior a colisão influenciaram a precisão do rastreamento e três situações foram identificadas: 1) a trajetória anterior a colisão de um espermatozoide foi unida a trajetória posterior a colisão do outro espermatozoide, resultando em erro de rastreamento. Este erro foi ocasionado pela maior proximidade das posições destes espermatozoides com a posição onde ocorreu a colisão. Nesta situação ocorre ainda a exclusão das demais trajetórias parciais; 2) as identidades dos espermatozoides foram preservadas porque as posições mais próximas antes e após o evento de colisão pertenciam aos próprios espermatozoides, resultando em uma correta associação das posições às trajetórias para ambos os espermatozoides; 3) a trajetória de um espermatozoide foi construída corretamente e o outro espermatozoide foi excluído da análise. Esta condição foi observada principalmente em colisões entre um espermatozoide se deslocando rápido e outro mais lento, cujas trajetórias se cruzaram perpendicularmente. O espermatozoide mais rápido foi eliminado da análise porque a posição onde ocorreu a colisão foi atribuída à trajetória do outro espermatozoide.

Embora Wilson-Leedy e Ingermann (2007) não tenham encontrado efeito do número de espermatozoides sobre a taxa de motilidade ou nos parâmetros de movimento espermático do *Danio rerio* quando a variação no campo visual foi entre 6 e 344, recomendamos que o número de espermatozoides não deve exceder a 100 (em imagens de $800 \times 500 \text{ pixels}$) para que seja mantido um baixo número de erros de rastreamento e de exclusão de espermatozoides da análise. Esta recomendação está em concordância com o entendimento geral que o NN é mais eficiente quando os objetos estão distantes entre si e em baixa densidade (Urbano et al., 2017; Mabaso et al., 2014; Shi et al., 2006).

Cabe destacar que é comum entre os rastreadores ocorrer a fragmentação das trajetórias e o consequente aumento na densidade e taxa de motilidade após eventos de colisão (Mortimer et al., 2015; Boryshpolets et al., 2013). Para evitar a criação de novas trajetórias pós-colisões de um mesmo espermatozoide ou após a entrada de novos espermatozoides no campo visual, as análises foram padronizadas de maneira que fossem preservadas apenas as trajetórias dos espermatozoides que permaneceram visíveis em todas as imagens (100). Este critério foi

utilizado em ambos os rastreadores, contudo, não impediu a ocorrência de erros de rastreamento.

As taxas de motilidade foram corretamente estimadas pelo MHT e apesar de ter ocorrido um menor número de erros de rastreamento, o número de espermatozoides contabilizados reduziu e a duração da análise aumentou de forma quadrática com o aumento do número de espermatozoides no campo visual. O MHT proposto por Chenouard et al. (2013) para o rastreamento de partículas biológicas em imagens microscópicas é baseado nos princípios Bayesianos de rastreamento e utiliza um modelo estatístico complexo para estimar as melhores trajetórias a partir do conjunto de detecções de partículas.

Por ser uma técnica de correspondência pontual multiquadro (Chenouard et al., 2013), padronizamos o algoritmo para considerar quatro imagens futuras antes de associar as detecções às trajetórias no momento atual, o que conferiu ao MHT uma maior precisão. Ao mesmo tempo em que se obteve uma maior precisão no rastreamento, demonstrado pelo menor número de erros, o custo computacional foi maior, exigindo mais tempo para concluir a análise. A construção e manutenção da árvore de hipóteses envolve intenso uso da memória e do processador (Blackman e Popoli, 1999), porém na prática, mantendo cerca de 100 espermatozoides no campo visual, o tempo necessário para concluir a análise por amostra (< 35 s) não é proibitivo.

Os problemas de rastreamento decorrentes da colisão entre espermatozoides ainda são um grande desafio na análise espermática (Elsayed et al., 2015). Mesmo que um sistema CASA-Mot tenha algoritmos de correção de colisão, ainda poderão ocorrer erros de associação nas trajetórias dos espermatozoides e, possivelmente, na sua cinemática (Tomlinson et al., 2010; Arasteh e Vahdat, 2015; Mortimer et al., 2015).

Ainda que estatisticamente foram observadas diferenças entre os valores reais e estimados pelos algoritmos, ambas as técnicas foram extensivamente validadas para o rastreamento de partículas biológicas, incluindo espermatozoides (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007; Purchase e Earle, 2012; Boryshpolets et al., 2013; Chenouard et al., 2013; 2014; Elsayed, El-Sherry e Abdelgawad, 2015; Giaretta et al., 2017).

4.2.5 Conclusão

A precisão no rastreamento de espermatozoides de peixes em vídeos simulados é influenciada pela técnica de rastreamento e densidade de espermatozoides no campo visual.

Mantendo uma densidade de até 100 espermatozoides no campo visual é possível obter uma boa precisão, baixo número de erros de rastreamento e um tempo de análise aceitável com ambas as técnicas de rastreamento.

4.2.6 Referências

- Abbiramy, V. S., Shanthi, V., Allidurai, C., 2010. Spermatozoa detection, counting and tracking in video streams to detect asthenozoospermia. Signal and Image Processing (ICSIP), International Conference on. IEEE, 265-270.
- Arasteh, A., Vahdat, B. V., 2015. Multiple cell tracking algorithm assessment using simulation of spermatozoa movement. Bioinformatics and Bioengineering (BIBE), 15th International Conference on IEEE. 1–6.
- Arasteh, A., Vahdat, B. V., Yazdi, R. S., 2018. Multi-target tracking of human spermatozoa in phase-contrast microscopy image sequences using a hybrid dynamic Bayesian network. Scientific reports 8(1), 5068.
- Bernardes Júnior, J. J., Jimenez, J. E., Bombardelli, R. A., Nuñez, A. P. O., 2018. Changes in external osmolality and ionic composition affect *Megaleporinus obtusidens* sperm motility. Animal Reproduction Science 190, 63–74.
- Blackman, S. S.; Popoli, R. F., 1999. Multiple hypothesis tracking system design and application. In: Blackman, S.S.; Popoli, R.F. (Eds.), Design and Analysis of Modern Tracking Systems. Artech House, Boston, pp. 1069–1115.
- Boryshpolets, S., Cosson, J., Bondarenko, V., Gillies, E., Rodina, M., Dzyuba, B., Linhart, O., 2013. Different swimming behaviors of starlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa close to solid and free surfaces. Theriogenology 79, 81–86.
- Chalde, T., Gárriz, Á., Sanches, E. A., Miranda, L. A., 2014. Influence of pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) broodstock age on gamete quality, reproductive performance and plasma sex steroid levels during the spawning season. Aquaculture Research 47, 1–14.
- Chenouard, N., Bloch, I., Olivo-Marin, J. C., 2013. Multiple hypothesis tracking for cluttered biological image sequences. IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence 35, 2736–3750.
- Chenouard, N., Smal, I., Chaumont, F., Maška, M., Sbalzarini, I.F., Gong, Y., Cardinale, J., Carthel, C., Coraluppi, S., Winter, M., Cohen, A.R., Godinez, W.J., Rohr, K.,

- Kalaidzidis, Y., Liang, L., Duncan, J., Shen, H., Xu, Y., Magnusson, K.E., Jaldén, J., Blau, H.M., Paul-Gilloteaux, P., Roudot, P., Kervrann, C., Waharte, F., Tinevez J.Y., Shorte, S.L., Willemsse, J., Celler, K., van Wezel, G.P., Dan, H.W., Tsai, Y.S., Ortiz de Solórzano, C., Olivo-Marin, J.C., Meijering, E., 2014. Objective comparison of particle tracking methods. *Nat Meth* 11, 281–289.
- Elsayed, M., El-Sherry, T.M., Abdelgawad, M., 2015. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology* 84, 1367–1377.
- Gallego, V., Herranz-Justado, J. G., Rozenfeld, C., Pérez, L., Asturiano, J. F., 2018. Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. 2018. *Fish Pysiol Biochem* 44, 1457–1467.
- Giaretta, E., Munerato, M., Yeste, M., Galeati, G., Spinaci, M., Tomanini, C., Mari, G., Bucci, D., 2017. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Animal Reproduction Science* 176, 11-19.
- Immerman, D. A., Goetz, F. W., 2014. The activation and cryopreservation of sablefish (*Anoplopoma fimbria*) sperm. *Aquaculture* 430, 211–217.
- Jati, G., Gunawan, A.A.S., Lestari, S.W., Jatmiko, W., Hilman, M.H., 2016. Multi-sperm tracking using Hungarian Kalman Filter on low frame rate video, 2016 International Conference on Advanced Computer Science and Information Systems (ICACSIS), pp. 530-535.
- Kalbassi, M. R., Lorestani, R., Maramazi, J., 2013. Analysis of saline activator solution effects on sperm quality indices of *Barbus sharpeyi* by ImageJ software. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12, 357–377.
- Lor, Y., Revak, A., Weigand, J., Hicks, E., Howard, D. R., King-Heiden, T. C., 2015. Juvenile exposure to vinclozolin shifts sex ratios and impairs reproductive capacity of zebrafish. *Reproductive Toxicology* 58, 111-118.
- Mabaso, M; Withey, D.J; Twala, B., 2014. Comparison of two detection algorithms for spot tracking in fluorescence microscopy images. In: Proceedings of the 2014 PRASA, RobMech and AfLaT International Joint Symposium, Lagoon beach, Cape Town, pp. 27–28
- Mortimer, S. T., Horst, G. V. D., Mortimer, D., 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* 17, 545-553.
- Mortimer, S. T., 2000. CASA – Practical aspects. *Journal of andrology* 21(4), 515-524.

- Neumann, G., Bernardes Júnior, J. J., Sanches, P. V., Piana, P. A., Bombardelli, R. A., 2017. Contribution of the CASA system, based on open source-software, to the assessment of sperm characteristics: informetric and usage-based approaches. *Revista Brasileira de Zootecnia* 46(7), 560-568.
- Pulford, G. Taxonomy of multiple target tracking methods. 2005. *IEE Proceedings-Radar, Sonar and Navigation* 152, 291–304.
- Purchase, C. F., Earle, P. T., 2012. Modifications to the IMAGEJ computer assisted sperm analysis plugin greatly improve efficiency and fundamentally alter the scope of attainable data. *Journal of Applied Ichthyology* 28, 1013-1016.
- Ridler, T.W., Calvard, S., 1978. Picture thresholding using an iterative selection method. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 8, 630-632.
- Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., Eliceiri, K.W., 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18, 529.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., Nash, J. P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234, 1-28.
- Sanches, E. A., Bombardelli, R. A., Marcos, R. M., Neumann, G., Toledo, C. P. R., Romagosa, E., 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studies using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research* 42, 153–156.
- Sanches, E. A., Marcos, R. M., Okawara, R. Y., Caneppele, D., Bombardelli, R. A., Romagosa, E., 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *Journal of Applied Ichthyology* 29, 1114–1122.
- Sahmid, M., Marsh, D., 2002. AVI Reader. <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/avi-reader.html>
- Shi, L. Z., Nascimento, J. M., Berns, M. W., Botvinick, E. L., 2006. Computer-based tracking of single sperm. *Journal of Biomedical Optics* 11(5), 1-10.
- Sørensen, L., Østergaard, J., Johansen, P., Bruijne, M., 2008. Multi-object tracking of human spermatozoa, *Proc. SPIE* 6914, *Medical Imaging 2008: Image Processing*, 69142C (11 March 2008); doi: 10.1117/12.771135.
- Stuurman, N., 2003. MTrack2. <https://valelab4.ucsf.edu/~nstuurman/IJplugins/MTrack2.html>
- Tomlinson, M. J., Pooley, K., Simpson, T., Newton, T., Hopkisson, J., Jayaprakasan, K., Jayaprakasan, R., Naeem, A., Pridmore, T., 2010. Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms. *Fertility and Sterility* 93, 1911–1920.

- Urbano, L. F., Masson, P., VerMilyea, M., Kam, M., 2017. Automatic tracking and motility analysis of human sperm in time-lapse images. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 36, 792–801.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149–179.
- Wilson-Leedy, J. G., Ingermann, R. L., 2006. Computer assisted sperm analysis using ImageJ: description of necessary components and use of free software. <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/docs/CASAIstructions.pdf>.
- Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661–672.
- Yániz, J.L., Silvestre, M.A., Santolaria, P., Soler, C., 2018. CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility and Development* 30, 799-809.
- Yilmaz, A., Javed, O., Shah, M., 2006. Object tracking: a survey. *Acm Comput Surv* 38 1–45. <http://dx.doi.org/10.1145/1177352.1177355>.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*. 5th edition. New Jersey: Prentice Hall.
- Zupa, R., Fauvel, C., Mylonas, C. C., Santamaria, N., Valentini, L., Pousis, C., Papadaki, M., Suquet, M., de la Gándara, F., Bello, G., De Metrio, G., Corriero, A., 2013. Comparative analysis of male germ cell proliferation and apoptosis in wild and captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus L.*). *Journal of Applied Ichthyology* 29, 71–81.

4.3 Etapas da análise espermática de peixes em um *software* CASA-Mot

4.3.1 Apresentação

Este capítulo ilustra o processo analítico empregado para a avaliação dos parâmetros de motilidade e cinética do movimento espermático de peixes. Para automatizar e facilitar a realização das análises apresentadas nos artigos 1 (4.1) e 2 (4.2) foi desenvolvido um *software free* em linguagem Java que conjuga várias técnicas disponíveis sob licenças de código aberto. O *software* aqui denominado “CASA-Mot Series” contém códigos que foram extraídos dos *softwares* ImageJ (Rueden et al., 2017) e Icy (Chenouard et al., 2011) e do *plugin* CASA-Mot (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007). A automatização das análises foi necessária devido ao elevado número de tratamentos e repetições.

4.3.2 Etapas de avaliação

O processo analítico é composto por sete etapas (Figura 8) que englobam ações de importar um fragmento de vídeo, aplicar uma técnica de aprimoramento de imagens, segmentar as imagens espermáticas, detectar os espermatozoides em cada imagem, rastrear os espermatozoides, calcular as variáveis de motilidade e fornecer resultados organizados em planilhas. O processo é repetido automaticamente para cada fragmento de vídeo.



Figura 8 – Diagrama de funcionamento do *software* CASA-Mot Series.

4.3.2.1 Pré-processamento

O algoritmo AVI Reader (Ferreira e Rasband, 2012) é utilizado para importar vídeos do movimento espermático de peixes e converte-los em sequencias de imagens em um padrão de 8bits, em escala de cinza.

Em seguida, as imagens podem ser submetidas a um dos três possíveis filtros para aprimoramento da qualidade. Para isso, foram implementados algoritmos de processamento de imagens sob os pacotes: (1) *Median filter* do pacote Fast Filter (Shimid, 2010), modificado para utilização apenas do filtro *Median*, especificamente sob a função *Remove Filtered*; (2) *Fast Fourier Transform Bandpass* do pacote FFT Filter (Walter, 2001) e (3) *Rolling-Ball background subtraction filter* (Castle e Keller, 2007), conforme resultados apresentados no artigo 1 desta tese.

4.3.2.2 Segmentação espermática

Implementamos um algoritmo de limiarização global (Auto Threshold) (Landini, G.; Ferreira e Rasband, 2011) que binariza as imagens usando a técnica de segmentação IsoData (Ridler, 1978) de limites globais. Neste procedimento, os *pixels* das imagens que compõem a cabeça dos espermatozoides (centróides) são substituídos por 0 (preto) e o plano de fundo por 1 (branco).

4.3.2.3 Remoção de ruído (opcional)

Prevendo uma possível necessidade de remoção de ruídos nas imagens espermáticas após o processo de segmentação, duas técnicas de remoção de ruído foram implementadas. Os algoritmos *Remove Outliers* e *Despeckle* (Ferreira e Rasband, 2012) nativos do *software* ImageJ (Rueden et al., 2017).

Os processos acima apontados (4.3.2.1 e 4.3.2.2) são executados de forma recursiva a cada imagem do fragmento de vídeo. Da seguinte forma: 1) a primeira imagem do fragmento é importada; 2) aprimorada (opcional); 3) segmentada e 4) removido o ruído (opcional). Esta rotina é feita para imagem do fragmento de vídeo, nesta ordem. Os dados são armazenados em uma matriz de dados, após são encaminhados ao algoritmo de detecção dos espermatozoides. Essa rotina é fixa no *software* e é repetida para cada fragmento de vídeo e para cada vídeo.

4.3.2.4 Detecção dos espermatozoides

A posição do pixel central (coordenadas xy) dos centroides é determinada através do algoritmo MTrack2 (Stuurman, 2003) adaptado por Wilson-Leedy e Ingermann (2007), que armazena as coordenadas xy de cada partícula detectada em cada imagem.

4.3.2.5 Rastreamento do movimento espermático

O rastreamento espermático é realizado pelo algoritmo de rastreamento *Multiple Hypothesis Tracking* (MHT) (Chenouard et al., 2013) ou Nearest Neighbor (NN) (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007). O MHT rastreia os espermatozoides sob técnicas de correspondência buscando associar as partículas (espermatozoides) à trajetórias, e o NN rastreia os espermatozoides pela técnica do vizinho mais próximo, onde a associação da trajetória das partículas (espermatozoides) é realizada posição a posição (frame a frame) pela proximidade.

Ambas as técnicas de rastreamento utilizam as coordenadas xy armazenadas pela técnica de detecção. Após a associação das trajetórias, retornam massa de dados contendo a associação de cada partícula sob o fragmento de vídeo solicitada para análise.

4.3.2.6 Cálculos da motilidade espermática

Com as coordenadas xy de cada centroide, dez parâmetros de motilidade espermática (Mortimer, Horst e Mortimer, 2015; Amann e Waberski, 2014; Wilson-Leedy e Ingermann, 2007; Wilson-Leedy e Ingermann, 2006) são medidos, sendo a:

1) Taxa de motilidade (%): Proporção de espermatozoides com movimento progressivo em relação ao total de espermatozoides rastreados;

- 2) Velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$): Somatória das distâncias percorridas pelo tempo de análise;
- 3) Velocidade média de deslocamento (VAP, $\mu\text{m/s}$): Velocidade calculada utilizando o caminho médio seguido pelo espermatozoide, utilizando 5/6 do total de imagens;
- 4) Velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$): Distância em linha reta entre a primeira e última posição considerada na VAP, dividida pelo tempo de análise;
- 5) Retidão (STR, %) $((\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100)$: Medida da linearidade do caminho médio;
- 6) Linearidade (LIN, %) $((\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100)$: Linearidade do caminho curvilíneo;
- 7) Dimensão Fractal (D fractal) expressa a regularidade do caminho de natação (Mortimer et al., 1996), e mede as alterações na direção do espermatozoide. O cálculo não é dependente dos valores cinemáticos (VCL, VAP e VSL) e pode ser usado em associação com a STR e LIN para interpretar padrões de natação espermática;
- 8) Oscilação (WOB, %) $((\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100)$: Medida de oscilação do caminho ideal sobre o caminho médio;
- 9) Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, $\mu\text{m/s}$): Distância média da cabeça do espermatozoide em relação ao caminho médio (VAP) e
- 10) Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz): Número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento curvilíneo.

4.3.2.7 Entrega dos resultados

Os resultados da avaliação da motilidade espermática são fornecidos em planilha eletrônica (.xls). São apresentados os resultados médios dos espermatozoides considerados na análise e os resultados individualizados.

No mesmo diretório, é gerada a imagem do rastreamento espermático (*path*), para cada fragmento de vídeo. Na imagem *path*, os espermatozoides são numerados e pintados quanto ao tipo de movimento, progressivos (cor preta) e não progressivos (cor vermelha).

O usuário pode optar por gerar a primeira imagem (quadro) da cena com as respectivas aplicações de aprimoramento, segmentação e remoção de ruído, para verificação visual do efeito de cada técnica sob a imagem.

4.3.3 Layout do software

Neste tópico são apresentadas as telas do *software* desenvolvido com o propósito de facilitar e automatizar as análises do movimento espermático propostas na tese.

4.3.3.1 Tela principal

Na tela principal estão os parâmetros gerais relacionados à: 1) arquivo contendo a calibração espécie-específico; 2) o caminho para o diretório que contém os vídeos; 3) o caminho para o diretório a ser armazenado os resultados; 4) a técnica de aprimoramento de imagens (filtro antes da segmentação); 5) quantas vezes será repetida a técnica de aprimoramento de imagens, 6) a técnica de remoção de ruído (filtro após a segmentação) e 7) a técnica de rastreamento MHT ou NN (Figura 9).

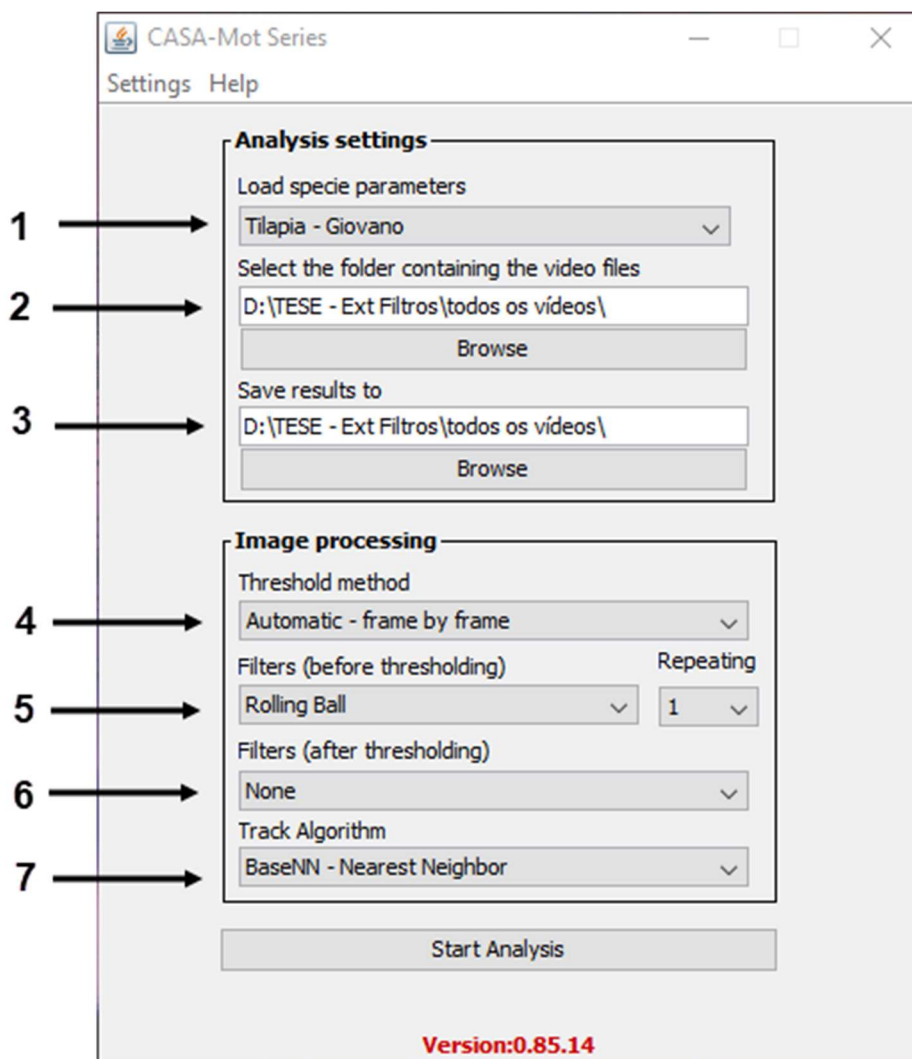


Figura 9 – Layout da tela principal do *software* CASA Series.

4.3.3.2 Tela de configurações

4.3.3.2.1 Tela geral

Na tela geral (Figura 10) são configurados parâmetros específicos para cada espécie e cada tipo de análise, que podem ser salvos, criando vários arquivos de parâmetros editáveis.

As configurações estão relacionadas a: 1) taxa de captura, onde é informado a taxa de captura da câmara acoplada ao microscópio que será utilizada nos cálculos da motilidade; 2) número de quadros a serem importados para análise, representando o tamanho do fragmento de vídeo; 3) tempo após ativação a ser analisado, ou seja, o tempo que representa o fragmento de vídeo a ser analisado; 4) área mínima e máxima dos centroides a serem considerados na análise; 5) opção de análise manual, onde é necessário preencher os valores de mínima e máxima intensidade de segmentação da técnica de limiarização, semelhante à realizada pelo *plugin* CASA-Mot e 6) opções de impressão de resultados, além dos resultados sumarizados da população espermática (Figura 10).

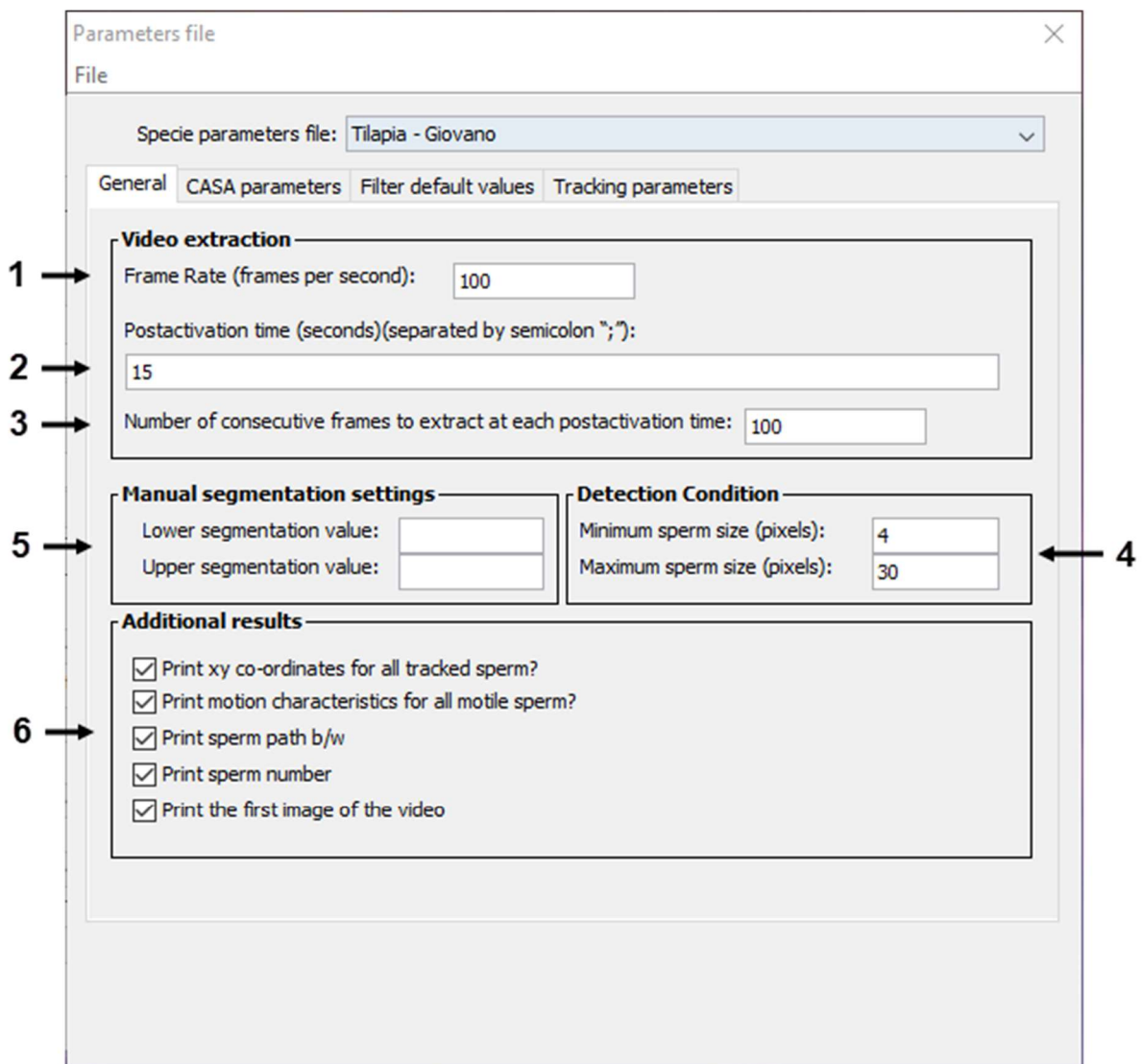


Figura 10 – Layout da tela geral de configurações do *software* CASA Series.

4.3.3.2.2 Parâmetros CASA-Mot Series

Na tela dos parâmetros de análise do CASA-Mot Series (Figura 11) são configurados: 1) a permanência de cada espermatozoide no fragmento de vídeo, ou seja, em quantos quadros consecutivos o espermatozoide precisa participar para ser considerado na análise; 2) detalhes relacionados a velocidade espermática, para serem considerados espermatozoides progressivos nos cálculos de motilidade; 3) máximo valor fractal, que desconsidera da análise o espermatozoide com valor superior ao preenchido; 4) distância em micrometros por *pixel*, utilizado para a calibração do *software* e real impressão das velocidades espermáticas e 4) parâmetros relacionados as tratativas de capilaridade que eventualmente podem ocorrer em vídeos espermáticos de peixes (Figura 11).

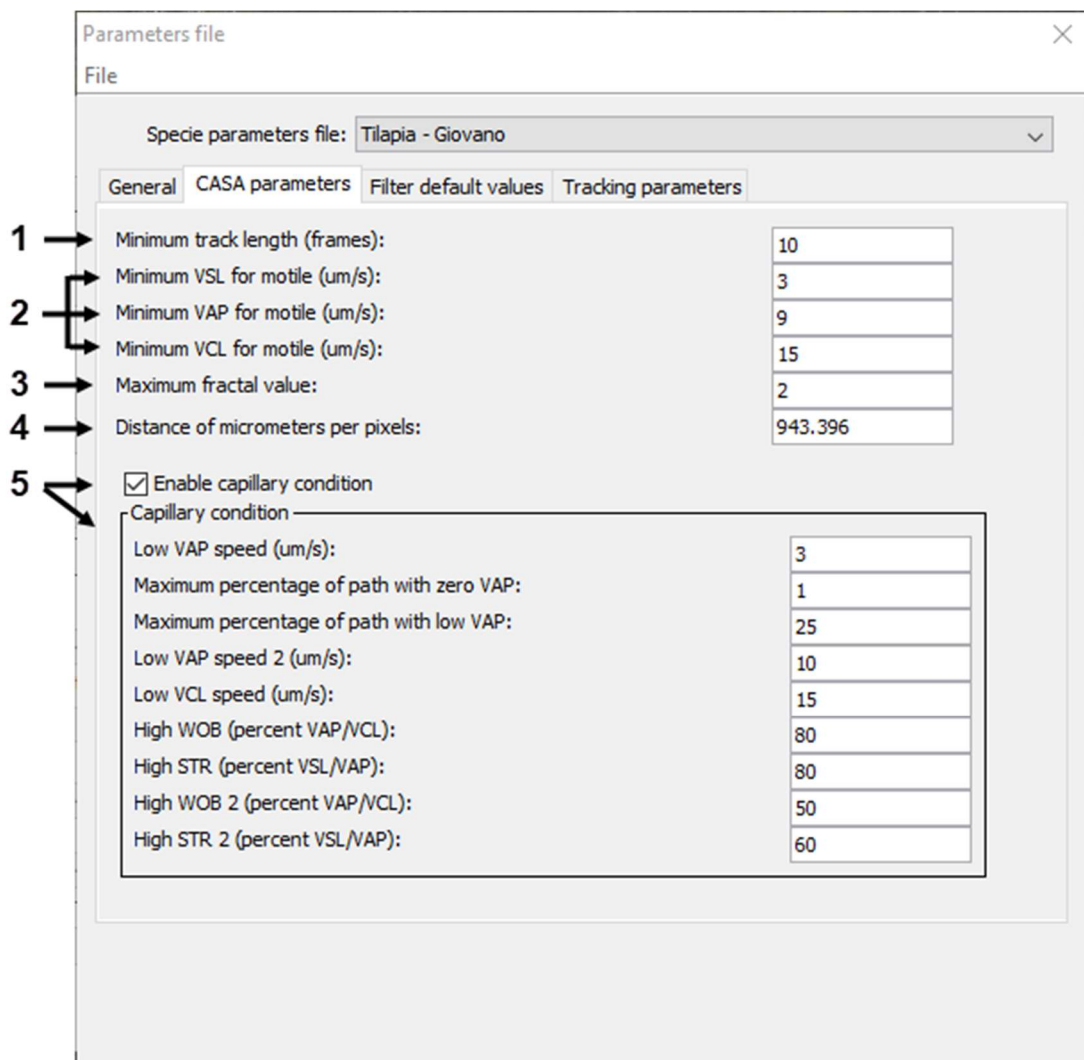


Figura 11 – Layout da tela de configurações específicas da análise de motilidade do *software* CASA Series. Adaptado de Wilson-Leedy e Ingermann (2007).

4.3.3.2.3 Configuração das técnicas de aprimoramento de imagens e remoção de ruído

Na tela de configuração, valores são aplicados pelas técnicas de aprimoramento de imagens e remoção de ruído (Figura 12), sendo: 1) o valor do raio da circunferência da bola rolante da técnica de aprimoramento “*Rolling-Ball*”, conforme resultados do primeiro artigo desta tese; 2) valores de partículas em *pixels* a serem filtradas pela técnica de aprimoramento “*FFT bandpass*”, conforme resultados do primeiro artigo desta tese; 3) valor de raio das partículas a serem filtradas pela técnica de aprimoramento *Median* (pacote *Fast Filter*), conforme resultados do primeiro artigo desta tese; 4) valores preenchidos para aplicação do filtro *Remove Outliers*, sendo: valores do raio da área (*pixel*) usada para calcular a mediana de cada partícula encontrada e, valor de “*threshold*” que determina o quanto o *pixel* deve desviar da mediana para ser substituído pela mediana dos *pixels* vizinhos (Figura 12).

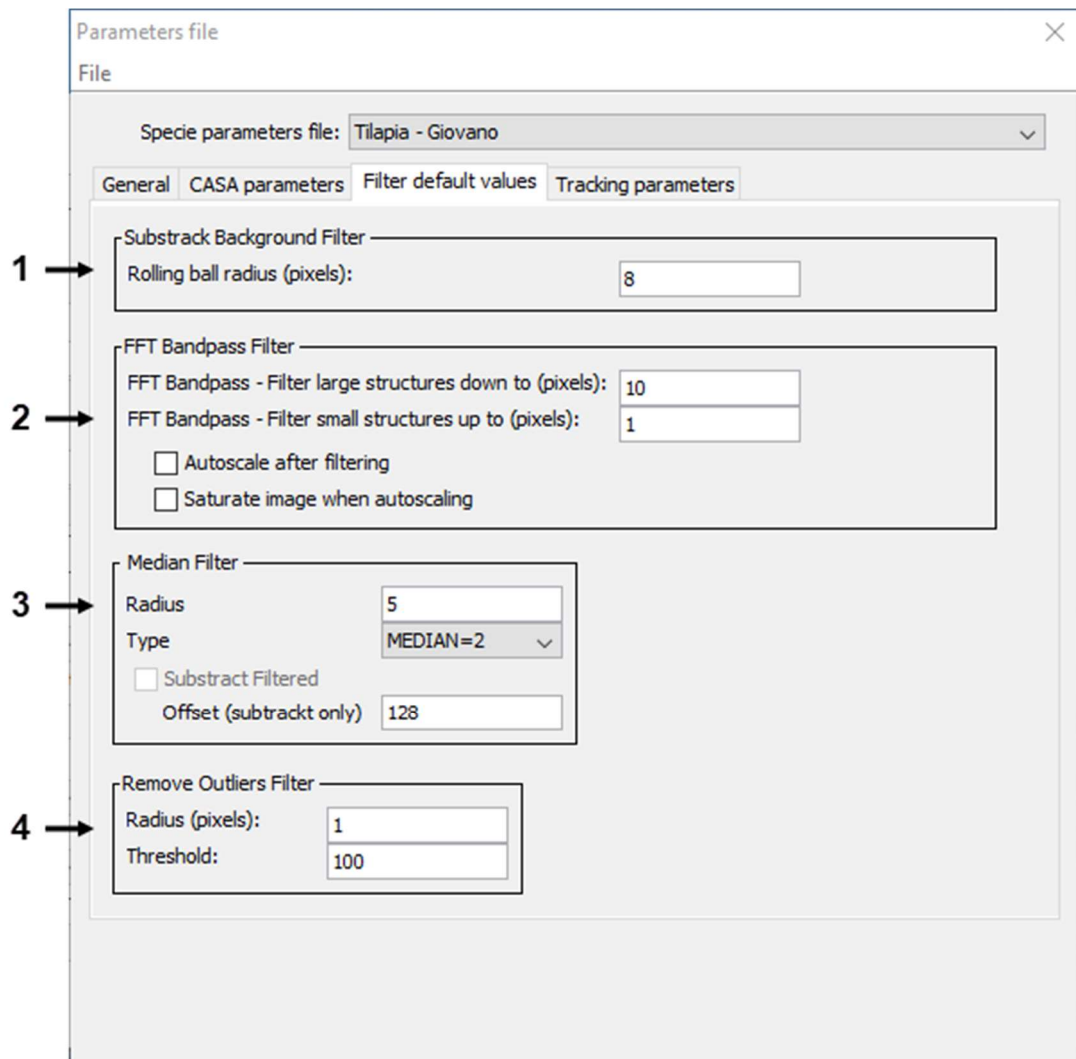


Figura 12 – Layout da tela de configurações das técnicas de aprimoramento de imagens e remoção de ruído do *software* CASA Series.

4.3.3.2.4 Configuração da técnica de rastreamento MHT

Na tela de configuração dos parâmetros do rastreador (Figura 13), estão apresentados diversos parâmetros a serem configurados. Para uso do rastreador NN, apenas um parâmetro é necessário nesta técnica: a distância máxima percorrida pelo centroide entre imagens. Para uso do rastreador MHT, vários parâmetros devem ser configurados. Para os vídeos espermáticos utilizados nesta tese, utilizamos os valores abaixo indicados. Para encontrarmos os valores que trazem os resultados mais satisfatórios, verificamos através de testes práticos. Partimos dos princípios teóricos relacionados a cada parâmetro, aos valores *default* e recomendações do autor (Chenouard et al., 2013) em comunicação pessoal.

Os valores aqui apresentados também foram os melhores para os espermatozoides de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) e Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Os parâmetros que mais influenciam a técnica são o “*Gate Factor*”, “*MHT Depth*” e “*Displacement xy* e *xy2*”. Quando aumentamos os valores de “*Gate Factor*”, “*MHT Depth*” aumenta também o tempo de análise e a necessidade de recurso computacional (memória).

Parameters file ×

File

Specie parameters file: Tilapia - Giovano ▼

General CASA parameters Filter default values Tracking parameters

NN Tracking

Maximum particle distance between frames (pixels): 8

MHT Tracking - Detections settings

NumberOfFalseDetections 20

DetectionRate 0.9d

MHT Tracking - Target existence parameters

ConfirmationThreshold 0.5d

TerminationThreshold 0.0001d

MeanTrackLength 20d

MHT Tracking - Target motion parameters

IsSingleMotion UseMostLikelyModel

DisplacementXY 3 isDirectedMotion isUpdateMotion

DisplacementXY2 3 isDirectedMotion2 isUpdateMotion2

MHT Tracking - Target existence parameters

GateFactor 4 MhtDepth 4

NumberInitialObjects 20 NumberNewObjects 10

Figura 13 – Layout da tela de configurações da técnica de rastreamento do *software* CASA Series.

4.3.3.3 Entrega de resultados

Conforme já especificado no item 4.3.2.7 os resultados são fornecidos em planilha eletrônica (exemplo em Figura 14), resultados do rastreamento são impressos graficamente em imagem *path* (exemplo em Figura 15) e são fornecidas imagens do efeito do aprimoramento de imagens utilizado (exemplo na Figura 16).

The figure consists of two screenshots of Microsoft Excel spreadsheets. The top screenshot shows a summary table with the following data:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	Video	Time(second)	Motility	VCL	VAP	VSL	STR	LIN	D	WOB	ALH	BCF	Sperm_count
2	Tilapia_2	15	79,76	123,42	68,85	54,73	79,50	44,35	1,26	55,79	2,92	45,05	84
3	Tilapia_2	30	68,42	79,73	43,60	40,20	92,20	50,42	1,19	54,69	1,86	43,45	95
4	Tilapia_2	45	50,57	53,47	25,28	23,51	92,99	43,96	1,27	47,27	1,22	41,34	87
5	Tilapia_4	15	85,63	97,99	53,80	48,19	89,58	49,18	1,21	54,90	2,36	49,25	167
6	Tilapia_4	30	81,87	65,08	38,82	66,11	170,30	101,58	1,16	59,65	1,60	46,66	171
7	Tilapia_4	45	57,14	44,20	25,86	24,77	95,80	56,04	1,17	58,50	1,11	46,95	161

The bottom screenshot shows a detailed table for 'Tilapia_2-15-Sperm' with the following data:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Video	Time(second)	Sperm	VCL	VAP	VSL	STR	LIN	D	WOB	ALH	BCF
2	Tilapia_2	15	2	130,49	92,82	79,12	85,24	60,63	1,14	71,13	4,27	18,18
3	Tilapia_2	15	3	118,14	92,05	85,45	92,83	72,33	1,10	77,92	3,59	20,00
4	Tilapia_2	15	4	129,87	87,80	79,29	90,31	61,05	1,13	67,60	3,54	46,32
5	Tilapia_2	15	5	107,93	57,96	51,17	88,29	47,41	1,21	53,70	2,43	48,53
6	Tilapia_2	15	7	158,91	87,96	54,48	61,94	34,28	1,34	55,35	3,73	46,88
7	Tilapia_2	15	8	138,62	81,50	75,78	92,98	54,67	1,15	58,80	3,14	59,57
8	Tilapia_2	15	9	147,22	69,59	36,44	52,27	21,06	1,10	59,21	2,99	54,25

Figura 14 – Imagem exemplo, da planilha eletrônica com os resultados de motilidade sumarizados e individualizados impressos pelo *software* CASA-Mot Series.

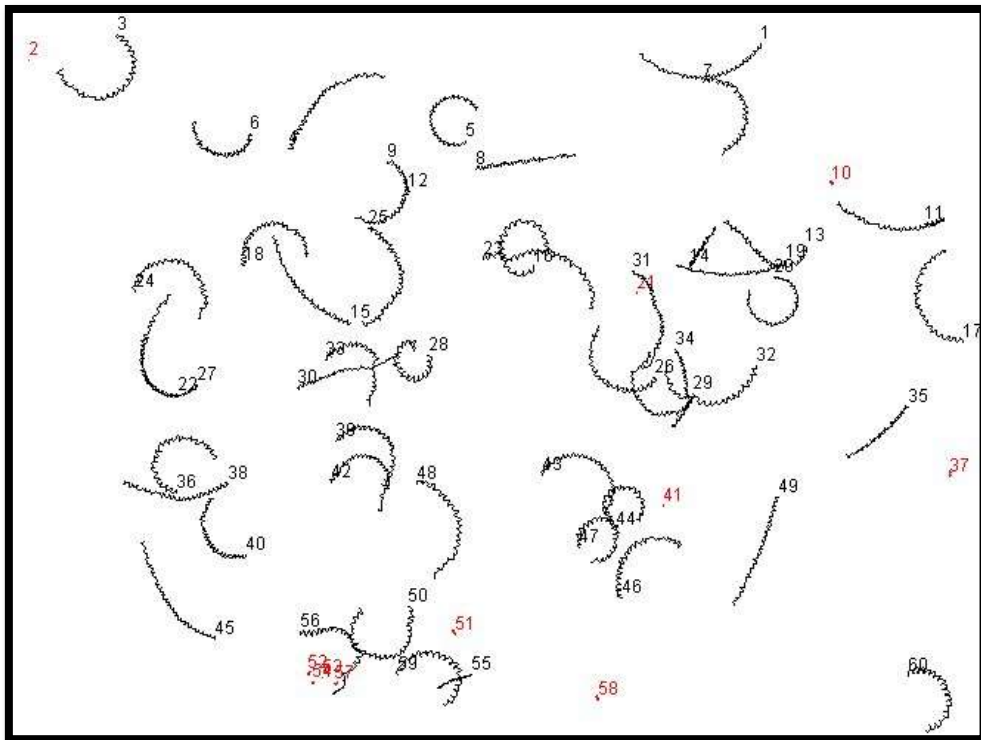


Figura 15 – Imagem exemplo, da trajetória espermática impressa pelo *software* CASA-Mot Series.

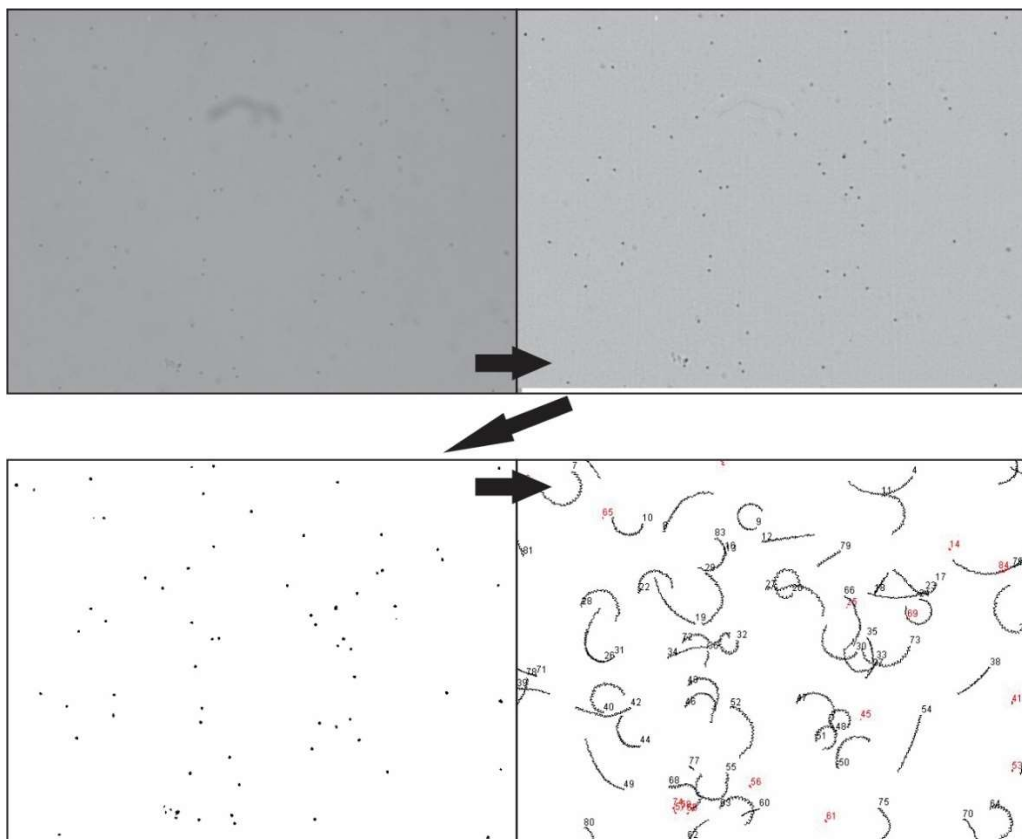


Figura 16 – Imagem exemplo, das imagens do efeito do aprimoramento utilizado pelo *software* CASA-Mot Series.

4.3.5 Referências

- Amann, R. P., Waberski, D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, 5-17.
- Castle, M., Keller, J., 2007. Rolling Ball Background Subtraction (ImageJ). Available at: http://imagej.net/plugins/download/Rolling_Ball_Background.java.
- Chenouard, N., Dufour, A., Hervé, N., Med-Yedid, V., Orioux, F., Pop, S., 2011. Icy. <http://www.bioimageanalysis.org/icy/doc/index.html>
- Chenouard, N., Bloch, I., Olivo-Marin, J. C., 2013. Multiple hypothesis tracking for cluttered biological image sequences. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence* 35, 2736–3750.
- Ferreira, T., Rasband, W.S., 2012. ImageJ User Guide, IJ 1.46r. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/>.
- Landini, G.; Ferreira e Rasband, 2011. https://imagej.net/Auto_Threshold.
- Mortimer, S. T., Horst, G. V. D., Mortimer, D., 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* 17, 545-553.
- Mortimer, S. T., Swan, M. A., Mortimer, D., 1996. Fractal analysis of capacitating human spermatozoa. *Human Reproductions* 11(5), 1049-1054.
- Ridler, T.W., Calvard, S., 1978. Picture thresholding using an iterative selection method. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 8, 630-632.
- Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., Eliceiri, K.W., 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18, 529.
- Schmid, M. 2010. Fast Filters. Available at: http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:filter:fast_filters:start.
- Stuurman, N., 2003. MTrack2. <https://valelab4.ucsf.edu/~nsturman/IJplugins/MTrack2.html>
- Walter, J., 2001. FFT Bandpass filter. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/fft-filter.html>.
- Wilson-Leedy, J. G., Ingermann, R. L., 2006. Computer assisted sperm analysis using ImageJ: description of necessary components and use of free software. <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/docs/CASAINSTRUCTIONS.pdf>.

Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661–672.

5. CONCLUSÃO GERAL

As técnicas de aprimoramento de imagens *Median*, *Bandpass* e *Rolling-Ball* podem ser utilizadas para melhorar o contraste entre a cabeça dos espermatozoides e o plano de fundo, e devem ser aplicadas previamente à etapa de segmentação, mesmo sob ótimo contraste. O uso destas técnicas de aprimoramento de imagens não se restringe a espécie *Rhamdia quelen*, elas podem ser utilizadas para outras espécies de peixes.

A precisão do rastreamento de espermatozoides de peixes é influenciada pela técnica de rastreamento e densidade de espermatozoides no campo visual. É possível utilizar a técnica de rastreamento *Nearest Neighbor* (NN) com boa precisão se mantiver uma densidade de até 100 espermatozoides no campo visual, produzindo baixo número de erros de rastreamento.

O rastreamento espermático pela técnica de rastreamento *Multiple Hypothesis Tracking* (MHT) gera resultados de motilidade confiáveis com até 300 espermatozoides no campo visual, reduz a exclusão espermática devido os eventos de colisão, além de reduzir a quantidade de erros de rastreamento. Apesar do uso da técnica de rastreamento MHT ser mais demorada, os resultados gerados são mais precisos, compensando o tempo de análise.

6. REFERÊNCIAS

- Alavi, S. M. H., Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishs. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International* 29, 101-110.
- Alavi, S. M. H., Jorfi, E., Hatf, A., Mortezaei, S. A. S., 2010. Sperm motility and seminal plasma characteristics in *Barbus sharpeyi* (Günther, 1874). *Aquaculture Research* 41, e688-e694.
- Amann, R. P., Waberski, D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, 5-17.
- Billard, R.; Cosson, M. P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology* 261, 122–131.
- Bobe, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 535-548.
- Bompart, D., García-Molina, A., Valverde, A., Caldeira, C., Yániz, J., Murga, M. N., Soler, C., 2018. CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development* 30, 810-819.
- Boryshpolets, S., Kowalski, R. K., Dietrich, G. J., Dzyuba, B., Ciereszko, A., 2013. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology* 80, 758-765.
- Boschetto, C., Gasparini, C., Pilastro, A., 2011. Sperm number and velocity affect sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 65, 813-821.
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., Herráez, M. P., 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 50, 144-153.
- Chaudhari, N. M., Pawar, B. V., 2014. New hybrid approach for identification of spermatozoa in human sêmen sanple using microscope image processing techniques. *Advances in Image and Video Processing* 2(6), 15-24.
- Dzyuba, V., Cosson, J., 2014. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagela response. *Reproductive Biology*. 14, 165-175.
- Elsayed, M., El-Sherry, T. M., Abdelgawad, M., 2015. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology* 84, 1367-1377.

- Fauvel, C., Suquet, M., Cosson, J., 2010. Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology* 26, 636-643.
- Figuerola, E., Valdebenito, I., Farias, J. G. 2016. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research* 47, 1691-1705.
- Gaitán-Espitia, J. D., Martínez-Silva, M. A., Barrero, C. E., Ramírez, L., Valencia, J. P., 2013. Cryogenic preservation of sperm from lane snapper (*Lutjanus synagris*): Testing the effects of extenders and freezing rates on sperm quality. *Aquaculture* 384-387, 6-12.
- Gallagher, M. T., Smith, D. J., Kirkman-Brown, C., 2018. CASA: tracking the past and plotting the future. *Reproduction, Fertility and Development* 30, 867-874.
- Gallego, V., Asturiano, J. F., 2018. Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach. *Reviews in Aquaculture* 1-28.
- Gallego, V., Pérez, L., Asturiano, J. F., Yoshida, M., 2013. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). *Aquaculture* 416-417, 238-243.
- Gallego, V., Carneiro, P. C. F., Mazzeo, I., Vilchez, M. C., Peñaranda, D. S., Soler, C., Pérez, L., Asturiano, J. F., 2013b. Standardization of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm motility evaluation by CASA software. *Theriogenology* 79, 1034-1040.
- Gallego, V., Cavalcante, S. S., Fujimoto, R. Y., Carneiro, P. C. F., Azevedo, H. C., Maria, A. N., 2017. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology* 87, 16-24.
- Gallego, V., Herranz-Jusado, J. G., Rozenfeld, C., Pérez, L., Asturiano, J. F., 2018. Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. *Fish Physiology Biochemistry* 44, 1457-1467.
- Giaretta, E., Munerato, M., Yeste, M., Galeati, G., Spinaci, M., Tomanini, C., Mari, G., Bucci, D., 2017. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Animal Reproduction Science* 176, 11-19.
- Hidayatullah, P., Mengko, T. L. E. R., Munir, R., 2017. A survey on multisperm tracking for sperm motility measurement. *International Journal of Machine Learning and Computing* 7(5), 144-151.
- Jamieson, B. G. M., 2009. Reproductive biology and phylogeny of fishes. 8^o vol. School of Integrative Biology University of Queensland. St. Lucia, Queensland Australia.

- Kim, C., Li, F., Ciptadi, A., Rehg, J. M., 2015. Multiple Hypothesis tracking revisited. Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision 4696-4704.
- Konstantinova, P., Udvarev, A., Semerdjiev, T., 2003. A study of a target algorithm using Global Nearest Neighbor approach. International Conference on Computer Systems and Technologies 290-295.
- Lu, J. C., Huang, Y. F., Lü, N. Q., 2014. Computer-aided sperm analysis: past, presente and future. First International Journal of Andrology 46, 329-338.
- Maintz, T., 2005. Mathematical morphology. Digital and medical image processing. Cap 6, 121-160.
- Meijering, E., Dzyubackyk, O., Smal, I., 2012. Methods for cell and particle tracking. Methods in enzymology. Academic Press 504, 183-200.
- Mortimer, S. T., Horst, G. V. D., Mortimer, D., 2015. The future of computer-aided sperm analysis. Asian Journal of Andrology 17, 545-553.
- Mylonas, C. C., Duncan, N. J., Asturiano, J. F., 2017. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. Aquaculture 472, 21-44.
- Nascimento, A. F., Maria, A. N., Pessoa, N. O., Carvalho, M. A. M., Viveiros, A. T. M., 2010. Out-of-season sperm cryopreserved in diferente media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). Animal Reproduction Science 118, 324-329.
- Neumann, G., Bombardelli, R. A., Sanches, E. A., Toledo, C. P. R., 2013. Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre. ISBN: 978-85-6603-0840-8. 1º ed. 87p.
- Neumann, G., Bernardes Júnior, J. J., Sanches, P. V., Piana, P. A., Bombardelli, R. A., 2017. Contribution of the CASA system, based on open source-software, to the assessment of sperm characteristics: informetric and usage-based spproaches. Revista Brasileira de Zootecnia 46(7), 560-568.
- Neumann, G., Sanches, P. V., Bombardelli, R. A., 2019. Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhandia quelen* sêmen at diferente post-activation times. Animal Reproduction Science 201, 84-92.
- Oberlender, G., Murgas, L. D. S., Zangeronimo, M. G., Silva, A. C., Pereira, L. J., Muzzi, R. A. L., 2012. Comparison of two diferente methods for evaluating boar sêmen morphology. Archivos de medicina veterinaria 44, 201-205.
- Ottesen, O. H., Babiak, I., Dahle, G., 2009. Sperm competition and fertilization success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture 286, 240-245.

- Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J., Herráez, M. P., 2010. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology* 74, 282-289.
- Purchase, C. F., Earle, P. T., 2012. Modifications to the IMAGEJ computer assisted sperm analysis plugin greatly improve efficiency and fundamentally alter the scope of attainable data. *Journal of Applied Ichthyology* 28, 1013-1016.
- Rashid, I., Hossain, M. S., Salam, M. A., Rafiqzaman, S. M., 2018. Evaluation of seminal plasma composition and spermatozoa quality parameters of silver barb, *Barbonymus gonionotus* Bleeker, 1850. *Fish Physiology Biochemistry* 1-10.
- Morisawa, M., 2008. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. *Journal of Applied Ichthyology* 24, 362-370.
- Rezatofghi, S. H., Milan, A., Zhang, Z., Shi, Q., Dick, A., Reid, I., 2015. Joint probabilistic data association revisited. *Proceedings of the IEEE international conference on computer vision* 3047-3055.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., Nash, J. P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234, 1-28.
- Shi, L. Z., Nascimento, J. M., Berns, M. W., Botvinick, E. L., 2006. Computer-based tracking of single sperm. *Journal of Biomedical Optics* 11(5), 1-10.
- Smal, I., Loog, M., Niessen, W., Meijering, E., 2010. Quantitative comparison of spot detection methods in fluorescence microscopy. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 29, 282-301. *Reproduction, Fertility and Development* 30, 810-819.
- Soler, C., Cooper, T. G., Valverde, A., Yániz, J., 2016. Afterword to sperm morphometrics today and tomorrow special issue in *Asian Journal of Andrology*. *Asian Journal of Andrology* 18, 895-897.
- Soler, C., Picazo-Bueno, J. Á., Micó, V., Valverde, A., Bompert, D., Blasco, F. J., Álvarez, J. G., García-Molina, A., 2018. Effect of counting chamber depth on the accuracy of lensless microscopy for the assessment of boar sperm motility. *Reproduction, Fertility and Development* 30, 924-934.
- Urbano, L. F., Masson, P., VerMilyea, M., Kam, M., 2017. Automatic tracking and motility analysis of human sperm in time-lapse images. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 36(3), 792-801.
- Viveiros, A. T. M., Nascimento, A. F., Orfão, L. H., Isaú, Z. A., 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology* 74, 551-556.

Wilson-Leedy, J. G., Ingermann, R. L., 2006. Computer assisted sperm analysis using ImageJ: description of necessary components and use of free software. <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/docs/CASAIinstructions.pdf>.

Wilson-Leedy, J. G., Ingermann, R. L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661-672.