



## CLASSIFICAÇÃO DE IMAGENS MICROSCÓPICAS DE OÓCITOS EM RELAÇÃO AO ESTÁGIO DE MATURAÇÃO UTILIZANDO PDI E AM

RENATA ZOTTIS JUNGES<sup>1</sup>; LÚCIO LEAL BASTOS<sup>1</sup>; MARILTON SANCHOTENE  
DE AGUIAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – {rzjunges, llbastos, marilton}@inf.ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica de reprodução assistida que simula artificialmente os eventos biológicos que ocorrem no aparelho reprodutor da fêmea. De acordo com VARAGO et al. (2008), a PIVE é uma importante biotécnica da reprodução associada ao aumento da produtividade pois ela maximiza a exploração do potencial reprodutivo dos bovinos, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal. A PIVE compreende três etapas desenvolvidas em laboratório: a maturação *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV).

A MIV é iniciada após a obtenção dos complexos cumulus-oócitos (CCOs), a partir da punção ovariana. Durante a maturação oocitária ocorrem transformações no núcleo e no citoplasma para que o oócito esteja apto à fecundação (BUENO et al., 2008; WRENZYCKI, 2016). Ao ser coletado, o oócito imaturo encontra-se na fase de diplóteno - estágio onde se encontra a vesícula germinativa (GV). Após serem expostos ao LH e FSH, os oócitos retomam o ciclo celular e avançam até a metáfase II, etapa na qual o gameta encontra-se maturado e apto a ser fertilizado (WRENZYCKI, 2016). Durante a FIV, os oócitos são colocados em contato com os espermatozóides para que ocorra a fertilização e seja gerado o zigoto (VARAGO et al., 2008; SANTOS, 2017). A última etapa da PIVE, o CIV, compreende o desenvolvimento do zigoto até o estágio de blastocisto (WRENZYCKI, 2016).

Portanto, para garantir o sucesso da PIVE é importante que ocorra uma MIV eficiente dos oócitos (REMIÃO et al, 2016). Utilizando-se um microscópio fluorescente pode-se classificar os oócitos em relação ao seu estágio de maturação: imaturo caso exista apenas um ponto fluorescente; maturo se dois pontos fluorescentes são observados; e, degenerados se houver um número indefinido de pontos (REMIÃO et al, 2016).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho é aplicar técnicas de aprendizado de máquina (AM) e processamento digital de imagens (PDI) para realizar de forma automatizada a classificação das imagens microscópicas de oócitos em relação ao estágio de maturação.

### 2. METODOLOGIA

Pode-se dividir esse trabalho nas seguintes etapas: obtenção das imagens microscópicas (sem e com fluorescência); e, a utilização de técnicas de PDI juntamente com técnicas de AM não supervisionado.

Após a obtenção das imagens microscópicas, utilizou-se diversas técnicas de PDI com o objetivo de encontrar algum padrão, que normalmente não seria possível perceber a olho nu, para classificar os oócitos quanto ao estágio de



maturação. Porém, entre diversas técnicas estudadas e utilizadas - histogramas, equalização, limiar de intensidade, uso de máscaras, etc - a técnica que produziu resultados preliminares mais relevantes foi o detector e descritor de características ORB (*Oriented FAST and Rotated BRIEF*), mostrando-se mais eficiente do que os descritores SIFT (*Scale Invariant Feature Transform*) e SURF (*Speeded Up Robust Features*) (RUBLEE et al., 2011), utilizados em trabalhos prévios do Grupo de Pesquisa em Computação Aplicada ao Meio Ambiente.

O ORB é um descritor binário, ou seja, é composto por três etapas: um padrão de amostragem (amostrar pontos na região ao redor do descritor); compensação de orientação (mecanismo para medir a orientação do ponto chave e girá-lo para compensar mudanças de rotação); e pares de amostragem (os pares a serem comparados ao construir o descritor final). Para cada par ( $p_1$ ,  $p_2$ ), se a intensidade do ponto  $p_1$  é maior que a intensidade do ponto  $p_2$ , então é escrito 1 num *string* binário, caso contrário é escrito 0.

Além disso, como o nome sugere, ORB é um algoritmo que faz a fusão do detector de pontos chaves FAST (*Features from Accelerated Segment Test*) e o descritor BRIEF (*Binary Robust Independent Elementary*) com várias modificações para melhorar o desempenho. Primeiramente, o ORB utiliza o FAST para encontrar pontos chaves e depois aplica a esquina de Harris para encontrar os melhores  $n$  pontos entre eles. Depois, para os descritores, ORB utiliza uma versão modificada do BRIEF. Ao contrário do BRIEF original, que utiliza pares de amostragem escolhidos aleatoriamente, o ORB aprende pares de amostragem ótimos e é invariante a rotação (RUBLEE et al., 2011).

Visto que as técnicas de AM são utilizadas com sucesso para resolver diversos tipos de problemas (CARVALHO et al., 2011), decidiu-se usá-las para auxiliar na classificação das imagens microscópicas após a etapa de uso do PDI. O AM pode ser dividido em três subáreas: aprendizado supervisionado, não supervisionado e por reforço (RASCHKA, 2014).

No aprendizado supervisionado o algoritmo aprende um modelo, baseado em um conjunto de dados de treinamento, e realiza previsões sobre dados futuros; o algoritmo aprende a classificar os dados de acordo com a classificação dada ao conjunto de treinamento. Em contraste, no aprendizado não supervisionado, também conhecido como clusterização, são agrupados os elementos com maior similaridade e para cada novo elemento se diz a qual grupo pertence (RASCHKA, 2014).

Dado que o presente trabalho está em fase de desenvolvimento, a etapa que está sendo realizada é a utilização do algoritmo de clusterização *k-means*. Esse algoritmo foi escolhido pois ele é de fácil implementação e é muito eficiente comparado a outros algoritmos de clusterização (RASCHKA, 2014). No *k-means* particiona-se as observações em  $k$  grupos de acordo com a proximidade entre si. Neste trabalho cada ponto fluorescente proveniente das imagens microscópicas formam um grupo (*cluster*), assim, de acordo com as informações do *k-means* irá se decidir se o oócito está imaturo (um *cluster*), maduro (dois *clusters*) ou degenerado (nenhum *cluster*).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

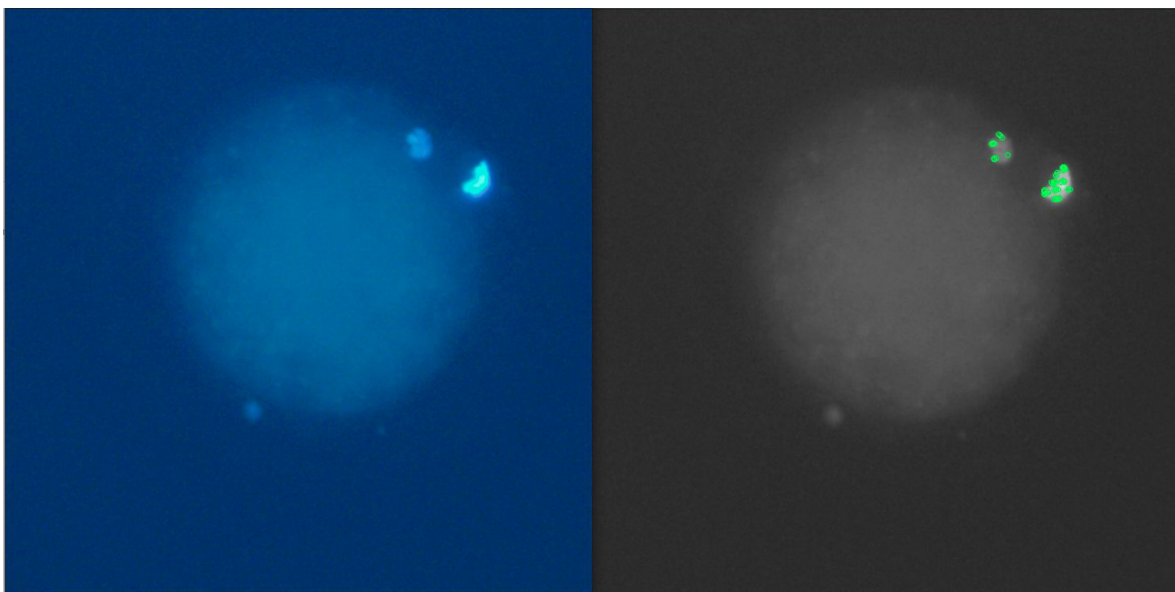
Até o presente momento, foi realizada uma revisão bibliográfica dos assuntos citados nas Seções 1 e 2, e desenvolveu-se algoritmos na linguagem de



programação *Python* utilizando as bibliotecas: *numpy*, *cv2* e *matplotlib* para a aplicação do ORB nas imagens microscópicas de oócitos.

O ORB se mostrou eficiente na maior parte das imagens analisadas, evidenciando que o algoritmo *k-means*, que será utilizado posteriormente, trará excelentes resultados referentes à classificação do oócito em relação ao seu estágio de maturação.

Na Figura 1, é possível ver do lado esquerda a imagem microscópica original do oócito com fluorescência, e do lado direito é a imagem resultante após o uso do algoritmo ORB. Na imagem resultante observam-se vários círculos delimitando as regiões que são usadas na classificação do oócito. Aplicando o algoritmo *k-means* será possível determinar que esta imagem resultante tem dois grupos, e, por esse motivo, o oócito está na fase de metáfase II (maturado).



**Figura 1:** Imagem microscópica de um oócito antes da aplicação do algoritmo ORB (à direita) e após a aplicação (à esquerda).

#### 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho verificou-se que é viável classificar as imagens microscópicas de oócitos em relação ao estágio de maturação através de técnicas de PDI e AM.

Para trabalhos futuros, pretende-se utilizar algoritmos de aprendizado supervisionado para que sem o uso da fluorescência seja possível decidir em relação ao estágio de maturação. Além disso, pretende-se comparar os resultados da classificação resultante do *k-means* com os resultados do algoritmo de aprendizado supervisionado e verificar qual tem maior acurácia. Baseado nesse resultado, pretende-se desenvolver uma aplicação educacional *mobile* para auxiliar estudantes na tomada de decisão em relação a classificação do estágio de maturação do oócito.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUENO, A.; BELTRAN, M.P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n.11, 2008.

CARVALHO, A.C.P.L.; FACELI, K.; LORENA, A.C.; GAMA, J. **Inteligência Artificial: Uma Abordagem de Aprendizado de Máquina**. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

RASCHKA, S. **Python Machine Learning**. Packt Publishing, 2015.

REMIÃO, M.H.; LUCAS, C.G.; DOMINGUES, W.B.; SILVEIRA, T.; BARTHER, N.N.; Komninou, E.R.; BASSO, A.C.; JORNADA, D.S.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; VARELA JUNIOR, A.S.; SEIXAS, F.K.; CAMPOS, V.F.; GUTERRES, S.S.; COLLARES, T. Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**, v.63, p.70–81, 2016

RUBLEE, E.; RABAUD, V.; KNOLIGE, K.; GRADSKI, G. ORB: An efficient alternative to SIFT or SURF. In: **COMPUTER VISION (ICCV), 2011 IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON**. IEEE, 2011. p.2564-2571

SANTOS, C.A. **Avanços da produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2017. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Maranhão.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, 2008

WRENZYCKI, C. Sistemas de cultivo *in vitro*: quão longe estamos das condições ideais?. **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Foz de Iguaçu, p.155-159, 2016.