

Avaliação automática da compactação da cromatina e do comprimento da cabeça de espermatozoides de galos (*Gallus gallus*)

L.B.T. Oliveira^{1*}, B.A.N. Travençolo², R.R. Silva³, M.E. Beletti⁵

*¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural – UFU, Uberlândia, MG, Brasil; ²FACOM - UFU, ³FAMEV - UFU; ⁴ICBIM - UFU.



INTRODUÇÃO

- Nas aves os espermatozoides possuem a forma da cabeça semelhante a um bastão levemente espiralado, não existindo uma classificação detalhada e consolidada de alterações morfológicas da cabeça.
- Já foi descrito que a cabeça do espermatozoide de galo pode apresentar morfologia normal com diferentes comprimentos e alterações na cromatina espermática o que interfere na fertilidade, mas por dificuldades metodológicas, geralmente não se avalia esta característica em espermograma de rotina.
- Para tornar essas avaliações mais exequíveis e menos subjetivas, objetivou-se com este trabalho testar uma metodologia automática para avaliação da cromatina espermática e do comprimento da cabeça de espermatozoides de galo.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Foram utilizadas 60 amostras de sêmen de galo e imediatamente após a coleta, uma gota de sêmen foi colocada em 1,5 mL de formol salina.
- Foi realizado um esfregaço de cada amostra, os quais foram corados colocando-se uma gota de azul de toluidina 0,025% pH 4,0 sobre o esfregaço.
- Posteriormente, foi colocado uma lamínula sobre a gota, retirando-se o excesso de corante com papel de filtro.
- Três minutos após foram realizadas em média 50 fotos de cada esfregaço utilizando-se um microscópio (Leica DM500) acoplado a um sistema de captura de imagens (Leica ICC50), com objetiva de imersão de 100 X.
- Para avaliação das imagens foi desenvolvido em ambiente de programação Octave[®] um sistema de avaliação automática onde as imagens passam por uma etapa de pré-processamento (conversão para tons de cinza, aumento de contraste, suavização Gaussiana (sigma 1,0)).
- Em seguida é realizada a segmentação baseada na segunda derivada do histograma de intensidade, que permite identificar a maioria das cabeças da imagem.
- Depois de identificadas e segmentadas, para cada cabeça é aplicado um algoritmo de esqueletização baseado em morfologia matemática, que permite estimar o comprimento da cabeça.
- Para avaliação da cromatina, dentre as cabeças segmentadas, o sistema identifica quais são as 10 mais claras (com cromatina mais compactada), as definindo como cabeças-padrão.
- Posteriormente o sistema compara a média dos valores de pixel de cada cabeça com a média das cabeças-padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Os resultados obtidos foram condizentes com os de literatura.
- As cabeças com valores $\geq 5\%$ do valor médio das cabeças-padrão foram consideradas como portadoras de alteração de cromatina.
- O sistema mostrou-se parcialmente eficiente, pois fez-se necessário uma inspeção visual para excluir da análise as cabeças segmentadas com sobreposições ou com artefatos.
- A forma levemente espiralada da cabeça do espermatozoide de galo também fez com que em muitas vezes não fosse possível a focalização perfeita da cabeça, necessitando que muitas destas cabeças tivessem que ser excluídas no momento da inspeção visual.

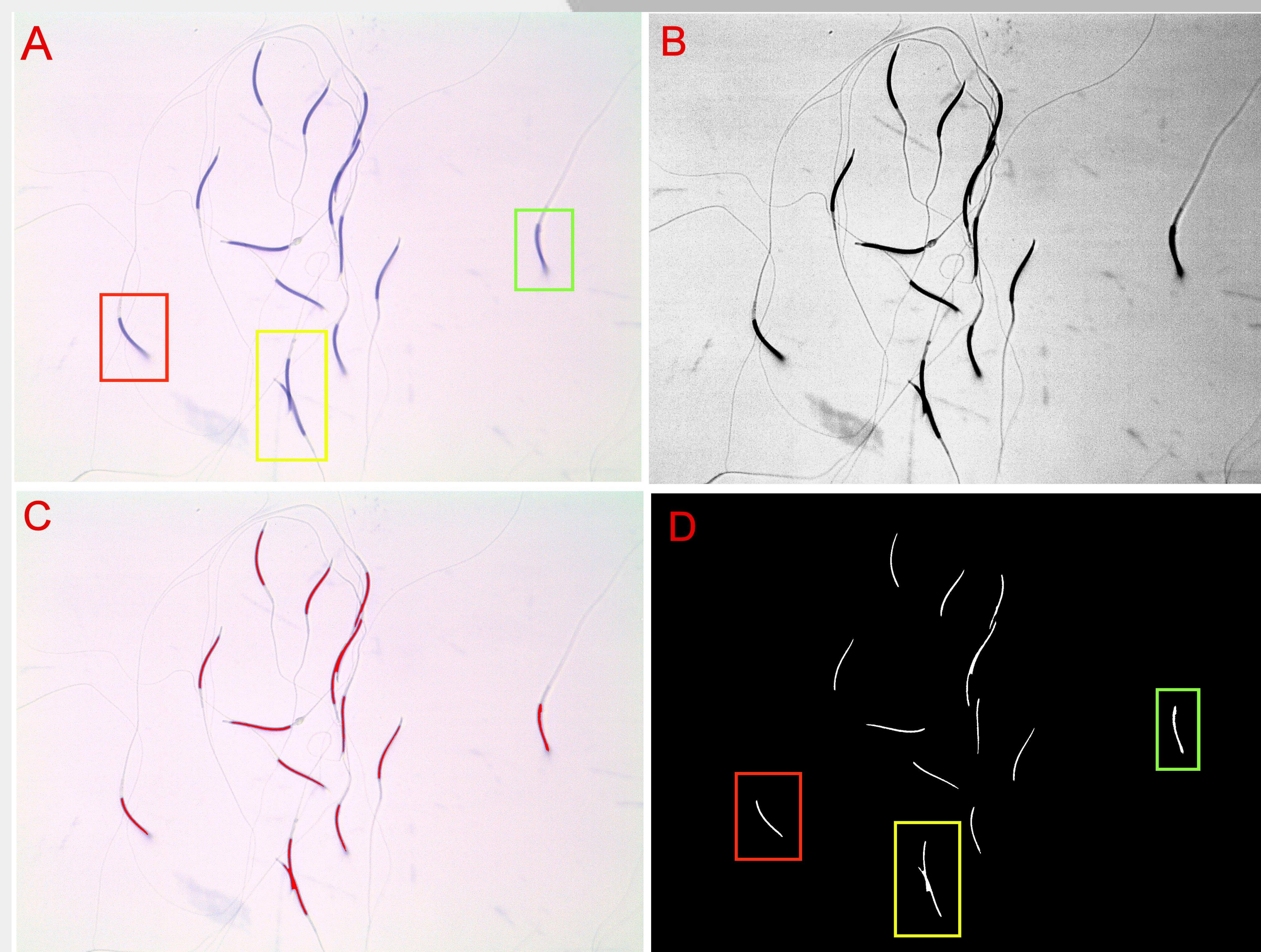


Figura 1. Fotomicrografia de esfregaço de sêmen de galo corado com azul de toluidina pH 4,0. **A:** Observa-se a fotomicrografia sem processamento de imagem. **B:** Conversão para tons de cinza. **C:** Cabeças marcadas após segmentação baseada na segunda derivada. **D:** Máscara que será utilizada para segmentação final de cada cabeça, onde o retângulo vermelho mostra cabeça corretamente segmentada, o verde mostra cabeça que foi descartada após inspeção visual e o amarelo mostra cabeças sobrepostas também descartadas após inspeção visual.

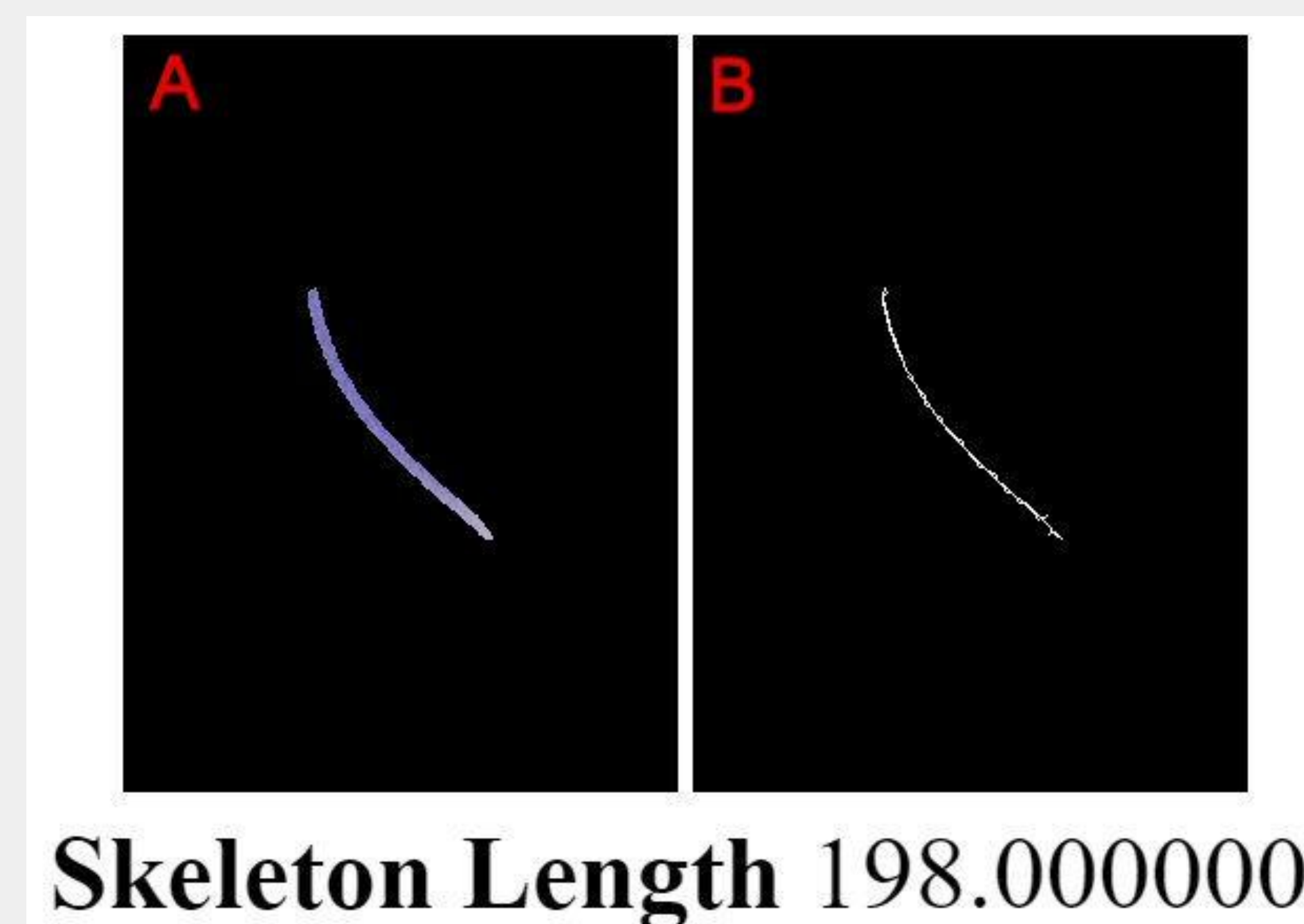


Figura 2. Cabeça de espermatozoide de galo marcada com retângulo vermelho na figura 1. Em **A** cabeça segmentada após todos o processamento da imagem e em **B** esqueletização da cabeça com o comprimento em pixels da cabeça

CONCLUSÃO

- Conclui-se que este sistema automático de avaliação da compactação da cromatina e do comprimento da cabeça de espermatozoides de galos só deve ser usado após uma inspeção visual das cabeças segmentadas.

AGRADECIMENTOS

