

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE REDES NEURAIIS CONVOLUCIONAIS NA SEGMENTAÇÃO DO NÚCLEO EM IMAGENS DE SUPER RESOLUÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS H9C2

Palavras-Chave: DEEP LEARNING, REDES NEURAIIS, SUPER-RESOLUÇÃO

Autores(as):

MILENA ANDRADE¹ – UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Aline Mara dos Santos² (Co-orientadora); Prof. Dr. André Alexandre de Thomaz¹ (orientador) – UNICAMP

¹Departamento de eletrônica quântica

²Departamento de biologia celular e estrutural

INTRODUÇÃO:

Complicações cardíacas causadas pelo tratamento com o quimioterápico doxorrubicina (doxo) se tornaram um problema de saúde pública, devido ao aumento na taxa de sobrevivência de pacientes após tratamento contra câncer. A cardiotoxicidade causada pelo doxo pode levar à insuficiência cardíaca e morte do paciente. Atualmente nosso grupo tem em uma de suas linhas de pesquisa a análise de imagens de microscopia de super-resolução para compreender os mecanismos de reparo de dano no DNA em miócitos cardíacos tratados com doxo. Microscopias de super resolução aliadas a técnicas de machine learning (ML) têm proporcionado um grande avanço na análise desses sistemas biológicos. Redes neurais convolucionais se mostraram uma ferramenta eficaz e confiável para a segmentação de regiões celulares. Porém as redes já treinadas e disponibilizadas na internet não podem ser reutilizadas devido a especificidade das imagens geradas. O objetivo deste trabalho é testar arquiteturas de redes neurais convolucionais já conhecidas para segmentar com eficiência o núcleo de imagens de super resolução de miócitos H9c2.

METODOLOGIA:

O código foi desenvolvido no Google Colab, utilizando o tempo de execução padrão Python 3, e o acelerador de hardware do tipo T4 GPU. As imagens utilizadas para os testes de arquiteturas são as disponíveis no banco de dados do laboratório, que conta com células de cardiomiócitos H9C2. Essas imagens de microscopia confocal SIM (Structured Illumination Microscopy) foram adquiridas em um microscópio Zeiss Elyra (Carl Zeiss AG, Alemanha). Os sinais de fluorescência podem ser excitados com lasers em 405nm, 488 nm, 543 nm ou 633 nm, e ela será coletada por uma objetiva alpha Plan-Apochromat 63x/1,46 Oil DIC M27 Elyra. O próprio software do microscópio faz o processamento das imagens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A utilização do machine/deep learning em contrapartida a programação tradicional, tem se mostrado uma ferramenta eficaz para a identificação e segmentação celular, principalmente do núcleo. As redes neurais, do tipo convolucionais são utilizadas para análise de imagens de microscopia. No entanto, a análise de imagens de

super-resolução de núcleos celulares tem sido um desafio devido às características únicas das imagens que diferem das convencionais, uma vez que a segmentação do núcleo pode ser afetada pela presença de ruídos, artefatos, brilho, nitidez e pela resolução aumentada da imagem [1].

Nos últimos anos um dos enfoques da linha de pesquisa desenvolvida pelo nosso grupo tem sido a aplicação de técnicas avançadas de microscopia de super resolução para análise de diferentes sistemas biológicos. Complicações cardiovasculares das terapias antineoplásicas se tornaram um grande problema de saúde pública, considerando que a taxa de sobrevivência ao câncer vem aumentando consideravelmente nos últimos anos [2, 3]. A cardiotoxicidade decorrente da ação de quimioterápicos, como a doxorrubicina (doxo), é uma condição grave, podendo evoluir para cardiomiopatia crônica, insuficiência cardíaca congestiva e morte do paciente [4-7]. Atualmente, nosso grupo está interessado nos mecanismos de reparo ao dano no DNA ativados por estresse genotóxico em miócitos cardíacos. O primeiro passo na análise das imagens geradas pelo grupo é realizar a segmentação nuclear de maneira automática e sistemática através da utilização de deep learning com o uso das redes neurais convolucionais.

3.1. Redes Neurais Convolucionais (CNNs)

As CNNs realizam uma operação matemática conhecida como convolução no lugar da multiplicação de matrizes das redes neurais convencionais [8]. A camada de entrada é a responsável por receber os dados. A segunda camada, a camada de convolução, é onde são realizadas as operações lineares. Nesta camada estão presentes os filtros (kernel) que são utilizados para extrair características específicas das imagens de entrada. Cada filtro é projetado para detectar um padrão específico na imagem de entrada, como bordas, linhas, texturas ou formas [9]. A camada seguinte é conhecida como pooling, sua principal função é reduzir a dimensionalidade dos dados otimizando assim todo o processo. Na sequência, vamos ter a camada de ativação sua função é permitir que a rede neural aprenda e generalize para dados mais complexos, garantindo maior eficiência na resolução de problemas [10]. As principais funções utilizadas nessa camada são geralmente uma função não-linear, como a função sigmóide, a função ReLU (Rectified Linear Unit) ou a função tangente hiperbólica [8]. Na camada que antecede a camada de saída, vamos ter a presença da camada totalmente conectada (fully connected (FC)).

3.2. UNet

A UNet (**Figura 1**) é um tipo de CNN supervisionada utilizada principalmente na segmentação de imagens. Esta arquitetura modificada visa complementar uma rede convencional de contração (downsampling) por meio de camadas sucessivas, substituindo os operadores de pooling por operadores de upsampling. Isso resulta em um aumento na resolução da saída [11].

No contexto do processamento de imagens biológicas, essa arquitetura desempenha um papel crucial na tarefa de localização, onde cada pixel requer a atribuição de um rótulo de classe correspondente. Essa abordagem permite a segmentação precisa de estruturas e características nas imagens, contribuindo significativamente para análises detalhadas e interpretações mais precisas dos dados [12].

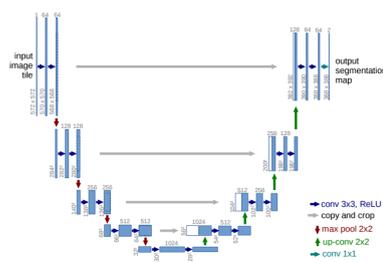


Figura 1. Esquema da arquitetura UNet.

3.3. Código

Após o carregamento do drive e a importação das bibliotecas necessárias, realizamos a montagem do Dataset. Aqui, preparamos nosso banco de dados. Primeiramente, efetuamos a leitura das pastas contendo as imagens originais e suas máscaras correspondentes, adquiridas via ImageJ. Utilizamos, inicialmente, um total de 100 imagens para os testes preliminares. Em seguida, realizamos o processamento das imagens, redimensionando-as para o formato (256x256) e normalizando os seus valores entre 0 e 1. Essa etapa além de padronizar o formato das imagens, diminui a utilização de recursos computacionais.

Posteriormente, dividimos nosso conjunto de dados em conjuntos de treinamento (80%) e validação (20%). O conjunto de treinamento é utilizado para treinar a rede, enquanto o conjunto de validação consiste em imagens retidas, empregadas posteriormente para verificar o desempenho final do modelo. Após essa fase inicial, é essencial realizar uma verificação para garantir que o programa esteja importando as imagens corretamente (Figura 2).

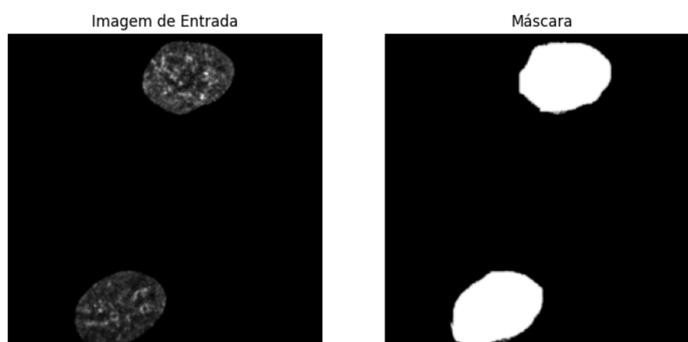


Figura 2. Imagens de microscopia SIM de miócitos cardíacos, a esquerda a imagem de entrada e a direita sua respectiva máscara.

Após a leitura das imagens, a arquitetura UNet é configurada, e a métrica utilizada para medir a função de perda é definida. A função escolhida é a Intersection over Union (IOU), que se baseia na comparação entre a previsão do modelo e a anotação real dos objetos na imagem, valores próximos de 1 uma sobreposição perfeita dos resultados.

Sua camada de entrada é definida com uma forma de (256, 256, 1), indicando imagens de tamanho 256x256 pixels com um único canal (escala de cinza). Depois da entrada, seguimos com três sequências de encoder, que consistem em convoluções e pooling para extrair características da imagem em diferentes níveis de abstração. Após cada conjunto de convoluções, uma camada de pooling reduz a resolução espacial da saída.

Em seguida, temos uma sequência de bottleneck, onde a resolução espacial é reduzida para capturar representações de características complexas. Esta etapa utiliza convoluções seguidas por dropout para evitar overfitting.

A seguir, passamos por cinco sequências de decoder, que consistem em convoluções transpostas para aumentar a resolução espacial e ajustar a saída para o formato desejado. Finalmente, chegamos à camada de saída, onde a última camada de convolução possui uma função de ativação sigmoide para produzir uma máscara de segmentação binária para cada pixel da imagem de entrada.

O modelo utilizado aqui é o `tf.keras.Model`, uma parte essencial do Tensor Flow, que permite construir, treinar e utilizar modelos de aprendizado profundo utilizando a interface simples e intuitiva do Keras. Essa integração oferece uma maneira eficiente de desenvolver e implementar modelos de segmentação de imagens.

Seguindo o código é necessário compilar as informações configurando o modelo para treinamento. Isso envolve especificar o otimizador, a função de perda e as métricas a serem utilizadas durante o treinamento. O próximo passo é realizar o treinamento do modelo, onde definimos o tamanho do lote de dados que será utilizado em cada iteração durante o treinamento. Aqui, optamos por lotes contendo 8 exemplos. Além disso, definimos o número de épocas como 100.

As próximas linhas do código são usadas para avaliar o desempenho do modelo e imprimir as métricas resultantes, como perda (loss) e precisão (IOU), e para realizar o controle desses parâmetros implementamos um callback de ponto de verificação (checkpoint).



Figura 3. *Imagens de microscopia SIM de miócitos cardíacos. A primeira coluna representa imagens de entrada, a segunda coluna suas respectivas máscaras, e a terceira coluna representa a previsão realizada pela arquitetura.*

Por fim, o modelo mais eficiente de treinamento, salvo pelo callback, é selecionado. O melhor threshold, que é o valor de corte usado para decidir quais pixels pertencem ao background e quais pertencem à figura, é então definido para a previsão das imagens (**Figura 3**), e suas segmentações são realizadas (**Figura 4**).

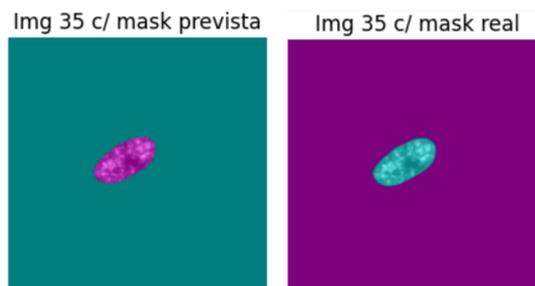


Figura 4. *Imagens que representam a previsão de segmentação de núcleos de cardiomiócitos H9C2, realizados pela arquitetura.*

CONCLUSÕES:

Avaliando os resultados obtidos pela arquitetura, que, embora satisfatórios para uma primeira etapa, as imagens revelaram algumas granulações nas predições. Essa granulação pode ser atribuída ao tamanho e qualidade do conjunto de dados de treinamento, hiperparâmetros mal ajustados, e ou variação na qualidade ou resolução das imagens de entrada e suas máscaras. Portanto, nossos próximos passos incluem a otimização do código, o aumento do número de imagens disponíveis e a exploração de outras arquiteturas para fins de comparação.

BIBLIOGRAFIA

- [1] MELA, Christopher A.; LIU, Yang. Application of convolutional neural networks towards nuclei segmentation in localization-based super-resolution fluorescence microscopy images. *Bmc Bioinformatics*, [S.L.], v. 22, n. 1, 15 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-021-04245-x>.
- [2] C. D et al., "Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2017, 2017 2017, doi: 10.1155/2017/1521020.
- [3] A. SH et al., "Prevention and Monitoring of Cardiac Dysfunction in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 35, no. 8, pp. 893-911, 03/10/2017 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.70.5400.
- [4] F. S, P. EA, F. B, B. F, B. B, and S. L, "Doxorubicin-induced cardiomyopathy treated with carvedilol," *Clinical cardiology*, vol. 21, no. 10, pp. 777-9, 1998 Oct 1998, doi: 10.1002/clc.4960211017.
- [5] M. G, M. P, S. E, C. G, and G. L, "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity," *Pharmacological reviews*, vol. 56, no. 2, pp. 185-229, 2004 Jun 2004, doi: 10.1124/pr.56.2.6.
- [6] Z. L and Z. B, "Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes," *Scientific reports*, vol. 7, p. 44735, 03/16/2017 2017, doi: 10.1038/srep44735.
- [7] P. M, S. A, and B. P, "H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy," *Journal of nucleic acids*, vol. 2010, 08/03/2010 2010, doi: 10.4061/2010/920161.
- [8] GOODFELLOW, Ian; BENGIO, Yoshua; COURVILLE, Aaron. *Deep Learning*. Cambridge, MA: MIT Press, 2016.
- [9] AVALIAÇÃO, P. L. Z. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE REDES NEURAIS CONVOLUCIONAIS UTILIZANDO IMAGENS SINTÉTICA. Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2021.
- [10] BELOTTI, A. R. Redes neurais convolucionais em problemas de processamento de imagens. Dissertação de Mestrado em Ciência da Computação, Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, 2019.
- [11] SILVA, T. A. (2021). "Uma rede UNet modificada para segmentação e identificação de lesões pulmonares em tomografias." Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade de Brasília
- [12] REN, S., HE, K., GIRSHICK, R., & SUN, J. (2015). "Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks." Artigo.