

# Algoritmo para Classificação de Eritrócitos Micronucleados em Imagens Microscópicas de Sangue Periférico

Judson B. da Silva<sup>1</sup>, Aldir Silva Sousa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina – Universidade Estadual do Piauí (UESPI)  
Teresina – PI – Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Sistemas e Computação  
Universidade Estadual do Piauí (UESPI) – Teresina, PI – Brasil

judsonbarroso@gmail.com, aldirss@uespi.br

**Abstract.** *The in vivo Micronucleus Assay is an efficient and low cost assay used to detect mutagenicity induced by substances, its microscopic analysis consists of counting and classifying erythrocytes between normal and micronucleated, being time consuming and laborious. In this paper, an algorithm for automatic classification of erythrocytes is proposed using microscopic images and supervised machine learning. The Convolutional Neural Network used follows the LeNet model, has 120x120 input and was trained using 1600 images. The classifier obtained sensitivity of 95.25%, specificity 98.50% and accuracy of 96.87%.*

**Resumo.** *O Teste do Micronúcleo in vivo é um ensaio eficiente e de baixo custo utilizado na detecção de mutagenicidade induzida por substâncias, sua análise microscópica consiste na contagem e classificação de eritrócitos entre normais e micronucleados, sendo demorada e laboriosa. Nesse trabalho, propõe-se um algoritmo para classificação automática dos eritrócitos utilizando imagens microscópicas e aprendizado de máquina supervisionado. A Rede Neural Convolutiva usada segue o modelo LeNet, tem entrada de 120x120 e foi treinada utilizando 1600 imagens. O classificador obteve sensibilidade de 95,25%, especificidade 98,50% e acurácia de 96,87%.*

## 1. Introdução

Os eritrócitos são células redondas, bicôncavas, anucleadas presentes no sangue e medula óssea de mamíferos e aves, produzidos por um processo denominado eritropoiese, durante o qual têm seu núcleo expulso da célula, de modo que, quando essa expulsão não é completa, forma-se o micronúcleo (MN) [Macêdo et al. 2015]. A contagem e classificação dos eritrócitos entre micronucleados (com MN) e normais (sem MN) utilizando microscopia manual é usada nas técnicas tradicionais de pontuação de lâminas no Teste do Micronúcleo, embora possa ser feita avaliação automatizada das amostras [Lebaron et al. 2013].

O Teste do Micronúcleo *in vivo* é um ensaio usado na detecção de danos induzidos aos cromossomos ou ao aparelho mitótico das células, utilizando a frequência de eritrócitos normais e micronucleados na medula óssea ou sangue periférico [Custer et al. 2016]. Esse ensaio apresenta várias vantagens, como eficiência, baixo custo e confiabilidade para mensurar a instabilidade genética [Ceppi et al. 2010], além de

apresentar sensibilidade em diferentes espécies, sendo possível a detecção de danos em indivíduos expostos a baixas concentrações de contaminantes [Frenzilli et al. 2009], como: produtos farmacêuticos, de uso pessoal, plastificantes, retardantes de chama, surfactantes, nanomateriais e praguicidas [Pereira et al. 2015]. No entanto, a análise microscópica manual do Teste do Micronúcleo é demorada e laboriosa [Shibai-Ogata et al. 2014].

Dada a dificuldade na análise microscópica manual do ensaio, foram descritas algumas metodologias para avaliação automática das amostras, utilizando microscopia de fluorescência em sangue periférico corado com *Hoechst 33342* e *Iodeto de Propídio* através de um *In Cell Analyzer 2000*® [Shibai-Ogata et al. 2014]; citometria de fluxo em culturas de linfócitos utilizando *ImageStreamX*® *MK II* [Rodrigues 2018]; microscopia óptica em sangue periférico corado com *Giemsa* utilizando limiarização de Otsu [Bahreyni Toossi et al. 2017] e morfologia matemática em linfócitos binucleados [Friauff et al. 2013].

Uma possibilidade para classificação é o uso de Redes Neurais Convolucionais (CNN), que têm sido utilizadas em problemas complexos de classificação de imagens, obtendo excelente desempenho em diversas aplicações, entre elas imagens radiológicas, microscópicas, detecção de sinais de trânsito, ultrapassando a capacidade humana em diversos casos [Li et al. 2014]. A principal vantagem da CNN para classificação de imagens é que todo o sistema é treinado de ponta a ponta, de pixels brutos a categorias finais, contudo, a CNN necessita de uma grande quantidade de imagens e grande poder computacional para seu para o treinamento [Han et al. 2018]. A necessidade de uma grande quantidade de imagens pode ser solucionada com o uso de *data augmentation*, um método que consiste na aplicação de uma ou mais deformações num conjunto de imagens de treinamento para aumentar sua quantidade [Salamon e Bello 2017]. Por conseguinte, nesse trabalho propõe-se um algoritmo para classificação automática entre eritrócitos normais e micronucleados utilizando CNN.

### 3. Metodologia

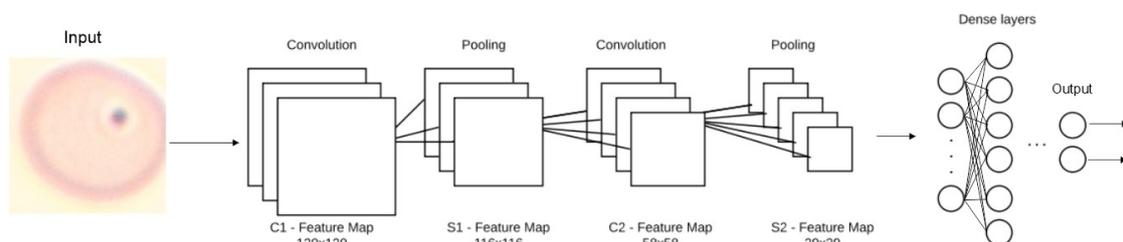
#### 3.1. Aquisição das Imagens

As imagens foram obtidas através do acoplamento de uma câmera digital específica para microscopia óptica com as sensor CMOS e resolução de 2592x1944 pixels. A câmera foi acoplada a um microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (lente objetiva de 100 vezes com óleo de imersão) e conectada a um microcomputador que utilizou o software Z-EYE para captura das imagens. As lâminas de esfregaço sanguíneo do sangue periférico de camundongo foram cedidas pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (NPBio) do CCS/UESPI, com uso aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UESPI) e foram fixadas em metanol absoluto, coradas com *Giemsa* e lavadas com água destilada.

#### 3.2. Implementação do Algoritmo

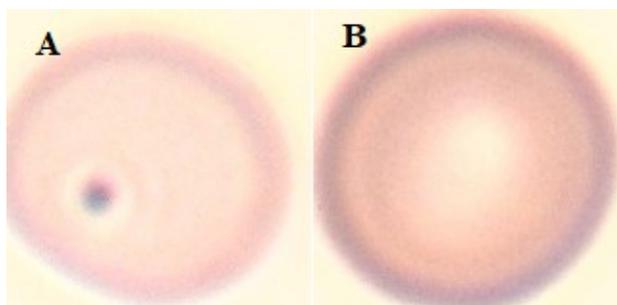
A Rede Neural Convolucional (RNC) utilizada para classificação segue o modelo LeNet proposto por LeCun et al. (1998). A entrada da RNC é uma imagem de 120x120 pixels, espaço RGB (3 canais), que passa por duas camadas convolucionais (para extração de *features*) e duas camadas de *pooling* (ver Figura 1). As funções de *pooling*, ativação e perda utilizadas foram, respectivamente: *Max Pooling*, *ReLU* e

*Multiclass Cross Entropy*. Os algoritmos foram feitos na linguagem Java, utilizando a biblioteca *Deeplearn4J*.



**Figura 1. Arquitetura da Rede Neural Convolucional para classificação entre eritrócitos micronucleados e normais.**

Os eritrócitos presentes nas imagens foram recortados, célula por célula, e classificados entre dois grupos: micronucleados e normais (ver Figura 2). Ao final, obteve-se 2000 imagens (1000 por grupo). Dessas imagens, 80% foram usadas no treinamento (1600 imagens) da Rede Neural Convolucional e 20% para teste e mensuração da acurácia (400 imagens) utilizando matriz de confusão. O treinamento foi feito num computador com processador Intel Core i7-8550U de 1.80GHz, 1992 Mhz, 4 núcleos, 8 processadores lógicos e 8GB de memória RAM. O critério de término utilizado foi o número de 1000 ciclos (*epochs*) ou 30 horas de treino.



**Figura 2. Imagem de eritrócitos micronucleado (A) e normal (B)**

#### **4. Resultados e Discussão**

O treinamento da RNC durou 28h (1000 ciclos) alcançando o menor erro de convergência (score) de 0.2052. Os resultados com as medidas de sensibilidade, especificidade e acurácia estão demonstrados a seguir na Tabela 1.

**Tabela 1. Resultados alcançados pela Rede Neural Convolutacional na classificação entre eritrócitos micronucleados e normais**

<b>Classificação dos eritrócitos</b>	
<b>Sensibilidade</b>	0.9525
<b>Especificidade</b>	0.9850
<b>Acurácia</b>	<b>0.9687</b>

O Teste do Micronúcleo é um ensaio consagrado para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade de substâncias, sendo a sua variante mais comum realizada em sangue periférico corado com *Giemsa* e analisado com microscopia óptica [Custer et al. 2016]. Os resultados obtidos pela CNN (na Tabela 01) possibilitam avaliação automatizada das amostras no Teste do Micronúcleo, tornando sua execução mais rápida e menos laboriosa. Apesar da sensibilidade relativamente baixa (95,25%), o protocolo para o Teste do Micronúcleo [In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test 2010] não obriga o microscopista a contar todas as células presentes em cada campo do microscópio (excluindo células deformadas e nas bordas), acredita-se que a sensibilidade final obtida não cause grande interferência na acurácia final do algoritmo, que atingiu o valor de 96,87%.

Ademais, estima-se que a baixa resolução da câmera utilizada na obtenção das imagens microscópicas tenha interferido na classificação, uma vez que, no ensaio, quanto melhor a resolução da imagem do campo microscópico, mais precisa a classificação. Outros trabalhos relacionados utilizaram câmeras de alta resolução acopladas ao microscópio, obtendo bons desempenhos [Savkare e Narote 2012, Toossi et al. 2017]. Para que se obtenha uma acurácia mais próxima do real, pode-se ainda substituir o uso de técnicas de *data augmentation* pela aquisição de uma maior quantidade de imagens microscópicas em trabalhos futuros.

Os resultados obtidos demonstram a possibilidade do uso de algoritmos utilizando CNN com boa precisão em *softwares* para classificação de eritrócitos em lâminas de esfregaço sanguíneo de imagens microscópicas para automação da análise do Teste do Micronúcleo.

## **Referências**

- Bahreyni Toossi, M. T., Azimian, H., Sarrafzadeh, O., Mohebbi, S., and Soleymanifard, S. (2017). Automatic detection of micronuclei by cell microscopic image processing. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 806: 9–18.
- Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., and Bonassi, S. (2010). Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 705(1): 11–19.

- Custer, L., Doherty, A., and Proudlock, R. (2016). The In Vivo Rodent Micronucleus Assay. *Genetic Toxicology Testing: A Laboratory Manual*. Elsevier Science Publishing Company, 269-322.
- Frenzilli, G., Nigro, M., and Lyons, B. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1): 80–92.
- Frieauff, W., Martus, H. J., Suter, W. and Elhajouji, A. (2013). Automatic analysis of the micronucleus test in primary human lymphocytes using image analysis. *Mutagenesis*, 28(1): 15–23.
- Han, D., Liu, Q. and Fan, W. (2018). A new image classification method using CNN transfer learning and web data augmentation. *Expert Systems with Applications*, 95: 43–56.
- Iano, Y., Arthur, R., Saotome, O., Vieira Estrela, V., and Loschi, H. J. (2019). Proceedings of the 4th Brazilian Technology Symposium (BTSym'18). Smart Innovation, Systems and Technologies.
- Lebaron, M. J., Schisler, M. R., Torous, D. K., Dertinger, S. D. and Gollapudi, B. B. (2013). Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54(3): 222–228.
- LeCun Y., Bottou, L., Bengio, Y and Haffner, P. (1988). Gradient-Based Learning Applied to Document Recognition. Proc. of the IEEE.
- Li, Q., Cai, W., Wang, X., Zhou, Y., Feng, D. D., and Chen, M. (2014). Medical image classification with convolutional neural network. 2014 13th International Conference on Control Automation Robotics & Vision (ICARCV).
- Macêdo, L., Pimentel, M., Araújo dos Santos, F. and Cunha Dias, R. (2015). A eritropoiese e o eritrograma: Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA*, 9(4): 716–732.
- Oecd. (2010). In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- Pereira, L. C., de Souza, A. O., Bernardes, M. F. F., Pazin, M., Tasso, M. J., Pereira, P. H., and Dorta, D. J. (2015). A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18): 13800–13823.
- Rodrigues, M. A. (2018). Automation of the in vitro micronucleus assay using the Imagestream® imaging flow cytometer. *Cytometry Part A*, 93(7): 706–726.
- Salamon, J. and Bello, J. P. (2017). Deep Convolutional Neural Networks and Data Augmentation for Environmental Sound Classification. *IEEE Signal Processing Letters*, 24(3): 279–283.
- Savkare, S. S., and Narote, S. P. (2012). Automatic System for Classification of Erythrocytes Infected with Malaria and Identification of Parasite's Life Stage. *Procedia Technology*, 6: 405–410.

Shibai-Ogata, A., Tahara, H., Yamamoto, Y., Fujita, M., Satoh, H., Yuasa, A. and Kasahara, T. (2014). An automated new technique for scoring the in vivo micronucleus assay with image analysis. *Mutagenesis*, 29(1): 63–71.