



## Detecção de núcleos em imagens citológicas de AgNOR utilizando Aprendizado Profundo

Detection of nuclei in AgNOR-Stained Cytology Images Using Deep Learning

Detección de núcleos en las imágenes citológicas de AgNOR usando Aprendizaje Profundo

João Gustavo Atkinson Amorim<sup>1</sup>, Luiz Antonio Buschetto Macarini<sup>2</sup>, André Victória Matias<sup>1</sup>, Allan Cerentini<sup>3</sup>, Fabiana Botelho De Miranda Onofre<sup>4</sup>, Alexandre Sherlley Casimiro Onofre<sup>4</sup>, Aldo von Wangenheim<sup>5</sup>

### RESUMO

#### Descritores:

Aprendizado Profundo;  
Biologia Celular;  
Imagens de AgNOR;

**Objetivo:** Avaliar a utilização de modelos de detecção de objeto para a detecção de núcleos coloridos com nitrato de prata proveniente de pacientes com câncer de colo de útero. **Método:** Utiliza-se imagens de um dataset contendo lâminas coradas com nitrato de prata, um método conhecido como AgNOR. No entanto, este método de citologia ainda não foi muito explorado, principalmente utilizando métodos computacionais. Desta forma, compara-se o modelo Faster-RCNN com diferentes backbones para a detecção de núcleos em imagens coradas pelo método AgNOR. **Resultado:** O trabalho alcançou os valores 0,66, 0,79 e 0,80 para acurácia, precisão e revocação respectivamente utilizando um modelo Faster-RCNN. **Conclusão:** A Faster-RCNN é capaz de detectar núcleos individuais coloridos com prata.

### ABSTRACT

**Keywords:** Deep Learning; Cell Biology; AgNOR images

**Objective:** Evaluate the use of object detection models for the detection of nuclei stained with silver from patients with cervical cancers. **Method:** Using images of a dataset containing slides stained with silver nitrate, a method known as AgNOR. However, this method of cytology has not yet been much explored, mainly using computational methods. Thus, the Faster-RCNN model is compared with different backbones for the detection of nuclei in images stained by the AgNOR method. **Result:** The work reached the values of 0.66, 0.79, and 0.80 for accuracy, precision, and recall respectively using a Faster-RCNN model. **Conclusion:** Faster-RCNN can detect individual nuclei stained with the AgNOR method.

### RESUMEN

**Descriptores:**  
Aprendizaje Profundo;  
Biología Celular;  
Imágenes de AgNOR

**Objetivo:** Evaluar el uso de modelos de detección de objetos para la detección de núcleos teñidos con nitrato de plata de pacientes con cáncer de cuello uterino. **Método:** Utilizando imágenes de un conjunto de datos que contiene diapositivas teñidas con nitrato de plata, un método conocido como AgNOR. Sin embargo, este método de citología aún no ha sido muy explorado, principalmente mediante métodos computacionales. Así, el modelo faster-RCNN se compara con diferentes ejes para la detección de núcleos en imágenes teñidas con el método AgNOR. **Resultado:** El trabajo alcanzó los valores de 0,66, 0,79 y 0,80 de exactitud, precisión y recall respectivamente utilizando un modelo de faster-RCNN. **Conclusión:** Faster-RCNN puede detectar núcleos individuales teñidos con el método AgNOR.

<sup>1</sup> Mestrando no Departamento de Informática e Estatística, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>2</sup> Mestrando no Departamento de Automação e Sistemas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>3</sup> Doutorando no Departamento de Informática e Estatística, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>4</sup> Professor(a) no Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>5</sup> Coordenador do Instituto Nacional para Convergência Digital - INCoD, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis (SC), Brasil.

## INTRODUÇÃO

O câncer cervical é um grande problema de saúde pública, sendo o segundo tipo de câncer mais comum nas mulheres. Uma das causas é o diagnóstico inadequado (ou mesmo inexistente) que leva à detecção tardia. Outra causa é que as opções de tratamento padrão estão frequentemente ausentes ou são inacessíveis<sup>(1)</sup>. A causa mais comum é a infecção pelo papilomavírus humano (HPV). Se for detectado precocemente e adequadamente tratado, o câncer do colo do útero pode ser curado, no entanto, a detecção precoce continua a ser uma tarefa difícil<sup>(2)</sup>. A biópsia continua a ser o padrão-ouro na detecção de lesões cancerígenas ou pré-câncer, embora, por ser um método invasivo, é recomendado que seja feito apenas em casos extremos<sup>(3)</sup>.

As células cancerosas têm uma quantidade de DNA que diverge do habitual, resultando num processo conhecido como aneuploidia, que está associado à tumorigênese<sup>(4)</sup>. O aumento da síntese proteica observada nas células aneuploides é um fator que caracteriza a transformação das células de normais para malignas. Desta forma, as Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (AgNORs) podem ser utilizadas como marcador para a quantificação da proliferação celular, diferenciação e transformação maligna<sup>(5)</sup>. O AgNOR tem a vantagem adicional de ser uma técnica simples e barata para detectar a proliferação celular. Os relatórios indicam o potencial valor diagnóstico e prognóstico do AgNOR para a citologia cervical<sup>(6)</sup>. Um desses métodos de diagnóstico é a contagem de NORs, que pode ser facilmente identificada pela técnica de coloração AgNOR<sup>(7)</sup>.

As Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são *loops* de DNA nos núcleos de células que têm genes de RNA ribossômico presentes. Essas regiões podem ser identificadas pelo AgNOR porque estão envolvidas por proteínas nucleares que são argirofílicas. No procedimento manual, os AgNORs são analisados manualmente de acordo com a sua quantidade, tamanho e forma. Esta avaliação sofre de vários problemas, incluindo a variação das percepções visuais, uma variação do nível de especialização dos citologistas/patologistas, o tempo de processamento lento da análise manual, entre outros. Essas razões tornam o processo propenso a erros humanos<sup>(8)</sup>. A análise dos AgNORs utilizando um software requer menos tempo, tem maior precisão e permite a análise de mais células<sup>(7)</sup>.

Técnicas de aprendizado de máquina, especialmente as Redes Neurais, têm sido utilizadas, para desenvolver métodos para o apoio automatizado da análise quantitativa de amostras citológicas há mais de 25 anos<sup>(9-10)</sup>.

Nos últimos anos, contudo, as melhorias no processamento de imagens e algoritmos de aprendizado de máquinas trouxeram a possibilidade de extrair mais informação útil dos dados<sup>(11)</sup>. Os algoritmos de aprendizado profundo têm alcançado resultados notáveis em várias tarefas computacionais, mostrando a sua eficácia na extração de características a partir de dados em diferentes cenários. Especificamente, as *Convolutional Neural Networks (CNNs)* obtiveram sucesso na resolução de problemas para os quais não existiam soluções satisfatórias na pesquisa em inteligência artificial<sup>(12)</sup>. Esta abordagem é utilizada em aplicações genômicas e biomédicas, mostrando quão flexíveis estes

algoritmos são no tratamento de problemas complexos<sup>(8)</sup>.

Nesse contexto, este trabalho apresenta uma abordagem para a detecção de núcleos celulares em lâminas coradas com nitrato de prata (AgNOR) em exames de citologia utilizando algoritmos de aprendizagem profunda para detecção precoce de neoplasia cervical. As imagens utilizadas são provenientes de imagens de campos extraídas de uma única lâmina, onde a detecção de objetos é realizada utilizando o modelo *Faster-RCNN*<sup>(13)</sup>.

## MÉTODOS

Nesta seção serão explicados os dados utilizados, os modelos e seus métodos de treino e, por fim, o método de avaliação de desempenho dos modelos.

### Dataset

O *dataset* utilizado foi o *CCAgT: Images of Cervical Cells with AgNOR Stain Technique*<sup>(14-15)</sup>. O **CCAgT** é composto por 2540 imagens obtidas no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) por uma câmera digital *Hitachi HV-F202SCL* e um microscópio *ZEISS Axio Scanner.Z1*. O *dataset* inclui as marcações de núcleos individuais com seus respectivos NOR's, as quais cada uma das imagens de 1200x1600 possui pelo menos um núcleo, com um total de 4515 núcleos. Em média os núcleos possuem uma área de 4857 pixels (px) com um desvio padrão de 3109px, onde cada pixel corresponde a uma área de 0,111im×0,111im.

### Descrição e treinamento do modelo

Para a detecção de núcleos celulares nas imagens de AgNOR, o modelo de detecção de objetos selecionado foi o *Faster-RCNN*<sup>(13)</sup> com o *ResNet-50*<sup>(16)</sup> e o *ResNeXt-101-32x8d*<sup>(17)</sup> como modelos de *backbone*, referenciados neste artigo como *f-rcnn-r50* e *f-rcnn-rx101* respectivamente. A *ResNet-50* possui 50 camadas de convolução 3x3. A *ResNeXt-101-32x8d* possui 32 grupos paralelos onde há 101 camadas de convoluções 3x3 onde a profundidade de cada uma é 8. Ambos os modelos são treinados previamente utilizando o *dataset*\*.

Os modelos foram implementados através da biblioteca *detectron2*<sup>(18)</sup> em python\*\* e treinados por até 1000 épocas utilizando uma taxa de aprendizagem de 0,05 na plataforma de desenvolvimento Google Colab com uma GPU Tesla P100 de 16Gb de VRAM.

O *dataset* foi dividido em três partes, respeitando técnica de validação cruzada, onde 70% (1.778 imagens e 3.399 núcleos) dos dados foram utilizados para treinar os modelos, 15% (381 imagens e 701 núcleos) para a validação e 15% (381 imagens e 686 núcleos) para teste de desempenho.

### Avaliação dos modelos

Para a avaliação dos modelos, foi utilizada a métrica *Average Precision (AP)*. O cálculo dessa métrica é obtido através das quantidades de *True Positives (TP)*, *False Positives*

\* Disponível em: <http://www.image-net.org/>

\*\* Código disponível em: <https://gist.github.com/johnnv1/5028be782447d7f9ef6a34bc6d4e822b>

(FP) e False Negatives (FN) que, na detecção de objetos são definidos da seguinte forma:

- TP - Uma predição é contabilizada como TP quando o objeto está presente no *ground truth* e o modelo foi capaz de encontrá-lo com um *Intersection over Union* (IoU) superior a um limiar (normalmente 0.5).

- FP - Quando o modelo identifica um objeto inexistente no *ground truth* ou encontra com IoU inferior a um limiar (normalmente 0.5).

- FN - Quando o objeto se encontra no *ground truth* e o modelo não o detecta, ou seja, quando o modelo não gera nenhuma predição para determinada marcação.

Algumas considerações extras sobre esses parâmetros:

- Quando várias predições detectam o mesmo objeto, a predição com IoU mais alta é considerada TP, enquanto as predições restantes são consideradas FP.

- Se o objeto estiver presente e a predição tiver um limiar de IoU inferior ao *ground truth*, a previsão é considerada FP. Se nenhuma predição detectou corretamente o objeto, é contabilizado como FN.

- Se não houver objetos na imagem, e o modelo detectar algum, então a previsão é considerada FP.

O cálculo da IoU<sup>(19)</sup> utilizado como limiar entre um objeto detectado e o *ground truth* se dá pela intersecção sobre a união das áreas de ambos os objetos (delimitado pelas *boundary box* – caixas de contorno). Outras métricas<sup>(20)</sup> calculadas e utilizadas a partir dos parâmetros são: Acurácia (*Accuracy*) – equação 1, Precisão (*Precision*) – equação 2 e Revocação (*Recall*) – equação 3.

A precisão média (AP) se dá pela área sob a curva da precisão (eixo Y) e da revocação (eixo X), onde a precisão e a revocação são calculadas para cada classe em cada uma das imagens.

$$\text{Acurácia} = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} \quad (1)$$

$$\text{Precisão} = \frac{TP}{TP+FP} \quad (2)$$

$$\text{Revocação} = \frac{TP}{TP+FN} \quad (3)$$

## RESULTADOS

Os valores de AP apresentados a seguir seguem o modelo AP50 do COCO-dataset<sup>\*\*\*</sup>, que utiliza como limiar o valor de 0.5 de IoU para a detecção de um objeto. Os valores da AP50 para ambos os modelos nos dados de validação e teste encontram-se na tabela 1.

Para uma melhor avaliação, nas tabelas 2 e 3 são sumarizados os melhores cinco resultados baseados na acurácia, precisão e revocação. Esses resultados foram gerados variando os limiares do *score* (confiabilidade do modelo em sua predição) e IoU entre os valores 0,5 e 0,95, com intuito de encontrar a melhor combinação de limiares que diminuam, principalmente, a quantidade de falsos positivos. Esses resultados são gerados sobre os dados de testes.

Exemplificando a necessidade de escolher os melhores limiares, na Figura 1 podemos ver as predições da f-rcnn-r50. Diversas predições sobre os mesmos núcleos aparecem, mas com valores baixos de *score*. Ao considerar somente os resultados com *score* superior a 95% (0,95), apenas dois resultados (em verde – 99% e azul – 97%) se encaixam nesse limiar. Ou seja, ao aumentar o *score* mínimo aceito o número de predições a serem computadas diminui, e, por consequência, a quantidade de falsos positivos também, melhorando os resultados do modelo.

**Tabela 1** – Resultados de AP50 nos dados de validação e teste

|             | Validação<br>f-rcnn-r50 | Validação<br>f-rcnn-rx101 | Teste<br>f-rcnn-r50 | Teste<br>f-rcnn-rx101 |
|-------------|-------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|
| <b>AP50</b> | 82,1                    | 75,7                      | 82,6                | 76,1                  |

**Tabela 2** – TP, FP, FN, Acurácia, precisão e revocação para os melhores 5 resultados da f-rcnn-r50

| Limiar<br>Score | Limiar<br>IoU | TP  | FP  | FN  | Acurácia | Precisão | Revocação |
|-----------------|---------------|-----|-----|-----|----------|----------|-----------|
| 0,95            | 0,5           | 546 | 141 | 140 | 0,66     | 0,79     | 0,8       |
| 0,95            | 0,55          | 544 | 143 | 142 | 0,66     | 0,79     | 0,79      |
| 0,95            | 0,6           | 536 | 151 | 150 | 0,64     | 0,78     | 0,78      |
| 0,9             | 0,5           | 610 | 285 | 76  | 0,63     | 0,68     | 0,89      |
| 0,9             | 0,55          | 607 | 288 | 79  | 0,62     | 0,67     | 0,88      |

**Tabela 3** – TP, FP, FN, Acurácia, precisão e revocação para os melhores 5 resultados da f-rcnn-rx101

| Limiar<br>Score | Limiar<br>IoU | TP  | FP  | FN  | Acurácia | Precisão | Revocação |
|-----------------|---------------|-----|-----|-----|----------|----------|-----------|
| 0,75            | 0,5           | 510 | 175 | 176 | 0,59     | 0,74     | 0,74      |
| 0,75            | 0,55          | 502 | 183 | 184 | 0,58     | 0,73     | 0,73      |
| 0,7             | 0,5           | 533 | 239 | 153 | 0,58     | 0,69     | 0,77      |
| 0,8             | 0,5           | 459 | 119 | 227 | 0,57     | 0,79     | 0,67      |
| 0,65            | 0,5           | 553 | 291 | 133 | 0,56     | 0,65     | 0,8       |

<sup>\*\*\*</sup>Disponível em: <https://cocodataset.org/#detection-eval>



**Figura 1** - Exemplo do resultado de um campo

## CONCLUSÃO

A aprendizagem profunda apresenta um grande avanço no processamento de imagens citológicas. Atualmente, esses métodos alcançaram resultados de ponta na classificação de imagens, detecção de objetos e segmentação semântica. Aqui, apresentamos uma aplicação de Faster-RCNN para detecção de núcleos de AgNOR em lâminas coradas com nitrato de prata.

Neste trabalho, o melhor resultado foi alcançado com valores de 0,66, 0,79 e 0,80 para acurácia, precisão e revocação respectivamente. Esses resultados validam o uso da detecção de objetos para localizar núcleos AgNORs. Com os resultados aqui obtidos, é possível encontrar automaticamente cada núcleo individualmente. Compreendemos que este processo automatizado pode potencialmente resolver e/ou auxiliar alguns problemas

presentes na rotina clínica como a tarefa de identificação de núcleos que podem ser utilizados para diagnóstico, que ainda é uma tarefa subjetiva e trabalhosa quando realizada manualmente.

## AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento deste trabalho. Gostaríamos de agradecer à Dra. Adriane Pogere, por fornecer as amostras e à Ms. Ane Francyne Costa por toda a assistência necessária para a recolha de dados, e ao Ricardo Thisted pela marcação das mesmas. À Yessica Maria Valencia Lemos pela tradução do resumo para espanhol.

## REFERÊNCIAS

- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2007;370(9590):890-907. doi:10.1016/s0140-6736(07)61416-0
- Song Y, Tan E-L, Jiang X, et al. Accurate Cervical Cell Segmentation from Overlapping Clumps in Pap Smear Images. *IEEE Trans Med Imaging*. 2017;36(1):288-300. doi:10.1109/tmi.2016.2606380
- Chatterjee S, Nawn D, Mandal M, et al. Augmentation of Statistical Features in Cytopathology Towards Computer Aided Diagnosis of Oral Precancer/Cancer. In: 2018 Fourth International Conference on Biosignals, Images and Instrumentation (ICBSII). IEEE; 2018. doi:10.1109/icbsii.2018.8524706
- Danielsen HE, Pradhan M, Novelli M. Revisiting tumour aneuploidy — the place of ploidy assessment in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;13(5):291-304. doi:10.1038/nrclinonc.2015.208
- Rüschhoff J, Plate K, Bittinger A, Thomas C. Nucleolar Organizer Regions (NORs). *Pathology - Research and Practice*. 1989;185(6):878-885. doi:10.1016/s0344-0338(89)80290-0
- García-Vielma C, Dávila-Rodríguez M, Hernández-Garza F, Cerda-Flores R, Cortés-Gutiérrez E. Digital image analysis of AgNORs in cervical smears of women with premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Biotechnology & Histochemistry*. 2015;91(2):102-107. doi:10.3109/10520295.2015.1078909
- Sakai YI, Sakai AT, Isotani S, et al. Morphometric Evaluation of Nucleolar Organizer Regions in Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Pathology - Research and Practice*. 2001;197(3):189-192. doi:10.1078/0344-0338-00032
- Li H, Shaham U, Stanton KP, Yao Y, Montgomery RR, Kluger Y. Gating mass cytometry data by deep learning. *Kelso J, org. Bioinformatics*. 2017;33(21):3423-3430. doi:10.1093/bioinformatics/btx448
- Kolles, H., Wangenheim, A. V., Vince, G. H., Niedermayer, I., & Feiden, W. Automated grading of astrocytomas based on histomorphometric analysis of Ki-67 and Feulgen stained paraffin sections. *Analytical cellular pathology*. 1995;8(2):101-116.
- Kolles, H., Wangenheim, A. V. The use of neural network technology in automated grading of astrocytoma. *Pathology-Research and Practice*. 1997;194(4):254.
- Kandemir M, Hamprecht FA. Computer-aided diagnosis from weak supervision: A benchmarking study. *Computerized Medical Imaging and Graphics*. 2015;42:44-50. doi:10.1016/j.compmedimag.2014.11.010
- LeCun, Y., Bengio, Y. & Hinton, G. Deep learning. *Nature*. 2015;521:436-444. doi:10.1038/nature14539
- Ren S, He K, Girshick R, Sun J. Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*. 2017;39(6):1137-1149.

- doi:10.1109/tpami.2016.2577031
14. Atkinson Amorim JG, Buschetto Macarini LA, Victoria Matias A, et al. A Novel Approach on Segmentation of AgNOR-Stained Cytology Images Using Deep Learning. In: 2020 IEEE 33rd International Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS). IEEE; 2020. doi:10.1109/cbms49503.2020.00110
  15. Atkinson Amorim JG, Buschetto Macarini LA, Victoria Matias A, et al. Cytology dataset – CCAGT: Images of cervical cells with agnor stain technique. Disponível em: <https://arquivos.ufsc.br/d/373be2177a33426a9e6c/>.
  16. He K, Zhang X, Ren S, Sun J. Deep Residual Learning for Image Recognition. ArXiv:1512.03385 [Pré-print]. 2015 [12 p.]. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/1512.03385>
  17. Xie S, Girshick R, Dollár P, Tu Z, He K. Aggregated Residual Transformations for Deep Neural Networks. arXiv:1611.05431v2 [Pré-print]. 2017 [10 p.]. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/1611.05431>
  18. Wu Y, Kirillov A, Massa F, Lo W, Girshick R. Detectron2. 2019. Disponível em: <https://github.com/facebookresearch/detectron2>
  19. Ulku I, Akagunduz E. A Survey on Deep Learning-based Architectures for Semantic Segmentation on 2D images. arXiv:1912.10230v2 [Pré-print]. 2020 [21 p.]. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/1912.10230v2>
  20. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. Pattern Recognition Letters. 2006;27(8):861-874. doi:10.1016/j.patrec.2005.10.010