

Análisis de poblaciones inmunes en melanoma usando Machine Learning e Inmunofluorescencia Multiplexeada

Saraí G. De León Rodríguez^{1,2}, Paul Hernández Herrera³, Cristina Aguilar Flores¹, Vadim Pérez⁴, Adán Guerrero³, Alejandra Mantilla⁵, Ezequiel M. Fuentes Pananá⁶, Christopher Wood^{3*}, Laura Bonifaz^{1*}

¹UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Mexico City, Mexico. ²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. ³Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos. México. ⁴Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, División de Desarrollo de la Investigación, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico. ⁵Servicio de Patología, Hospital de Oncología Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico. ⁶Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico.

Objetivo.

Establecer una metodología de trabajo basado en herramientas de aprendizaje profundo para el análisis de imágenes de manera objetiva, reduciendo el componente de subjetividad del ojo humano y útil para obtener conclusiones sobre el componente inmunológico en el melanoma y su relación con la evolución del paciente

Metodología

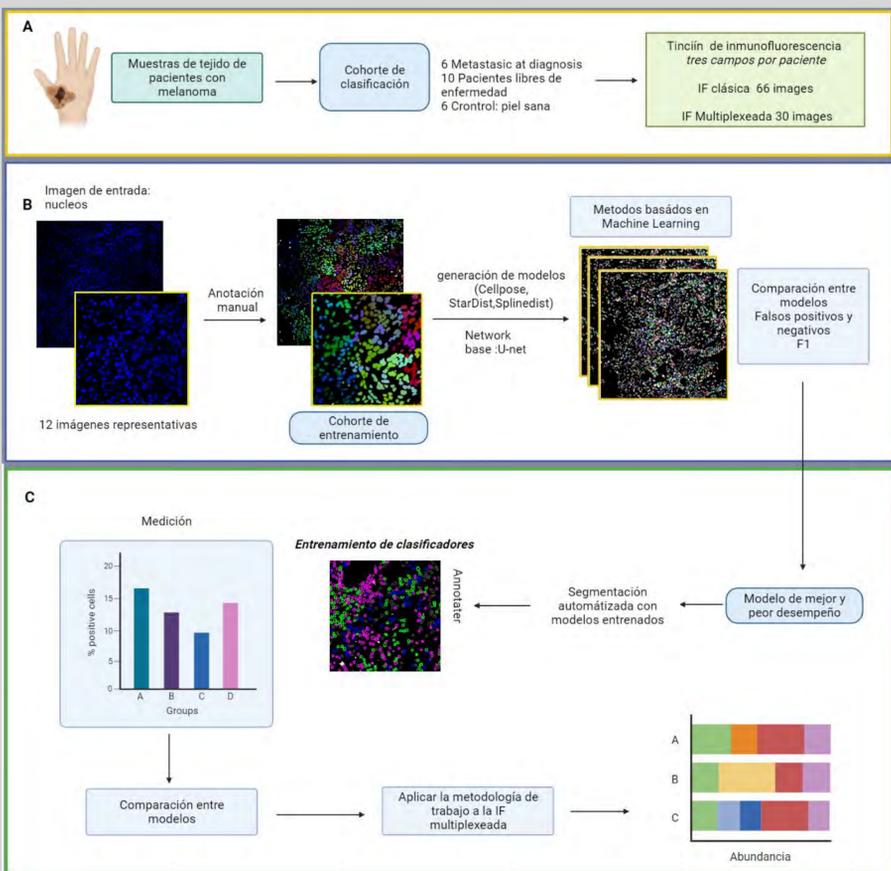


Figura 1. Estrategia para establecer una metodología de trabajo para análisis de poblaciones inmunes por machine learning e inmunofluorescencia.

A. Descripción de la cohorte de estudio de donde se obtuvieron las imágenes de fluorescencia. B. Estrategia de generación de los modelos de segmentación propios. 12 imágenes se anotaron manualmente para entrenar las redes neuronales cuya estructura base es U-Net. De los modelos generados se compararon distintas métricas para evaluar el modelo con mejor desempeño. C. Entrenamiento de clasificadores de marcadores, evaluación del impacto de la red de segmentación y aplicación de la metodología establecida a IFm

Resultados

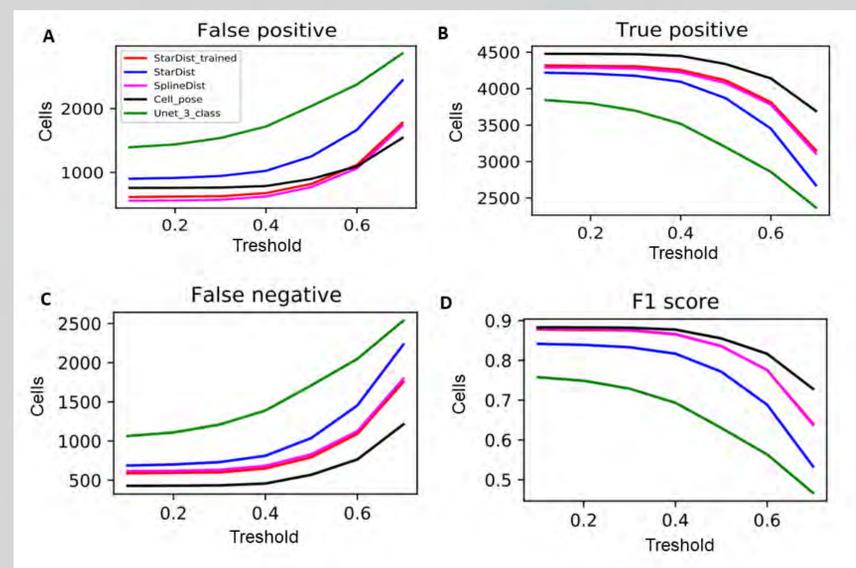


Figura 2. Cellpose es la red neuronal convolucional con mejor desempeño para la segmentación de núcleos.

Comparación de varios algoritmos de aprendizaje profundo para la segmentación de núcleos (Stardist entrenado, Stardist por defecto, SplineDist, Cellpose y U-Net 3-clases). (A-D) Gráfico que representa los falsos positivos, los verdaderos positivos, los falsos negativos y la puntuación F1 para cada uno de los algoritmos evaluados.

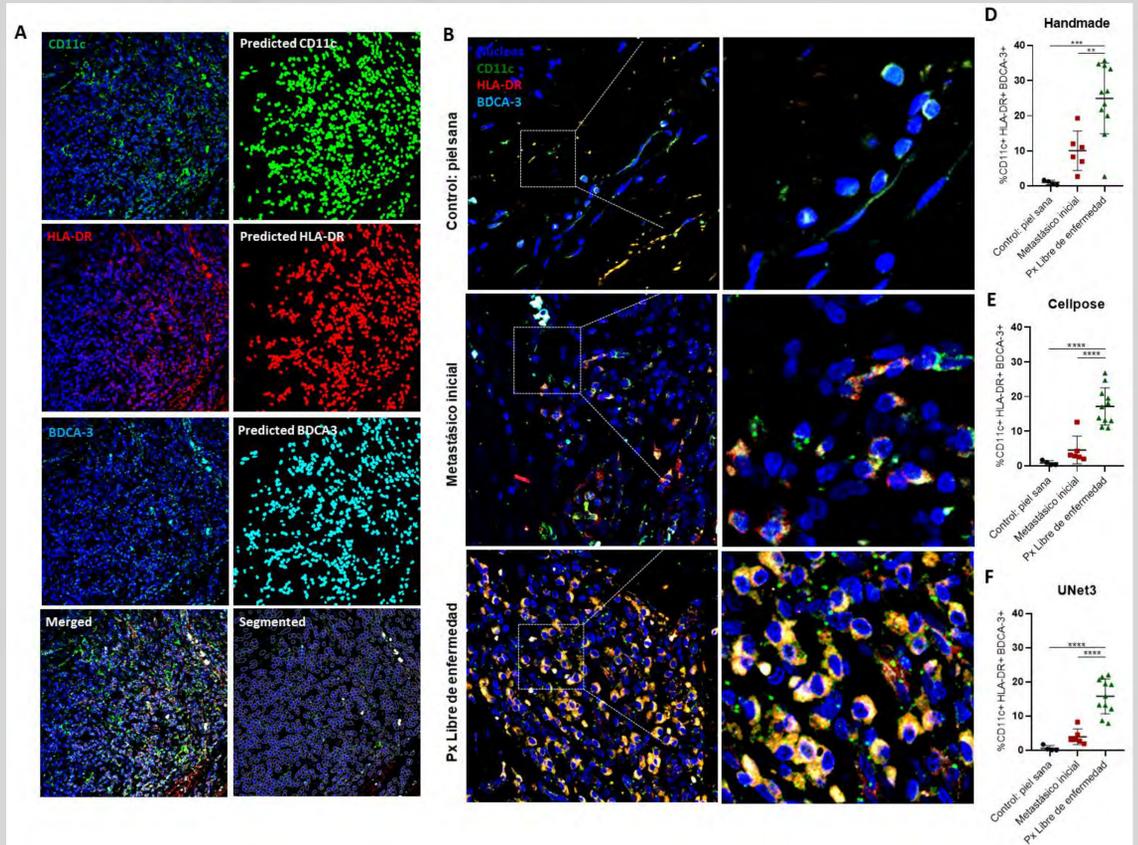


Figura 3. Entrenamiento de clasificadores por random forest e impacto de la selección de modelo de segmentación

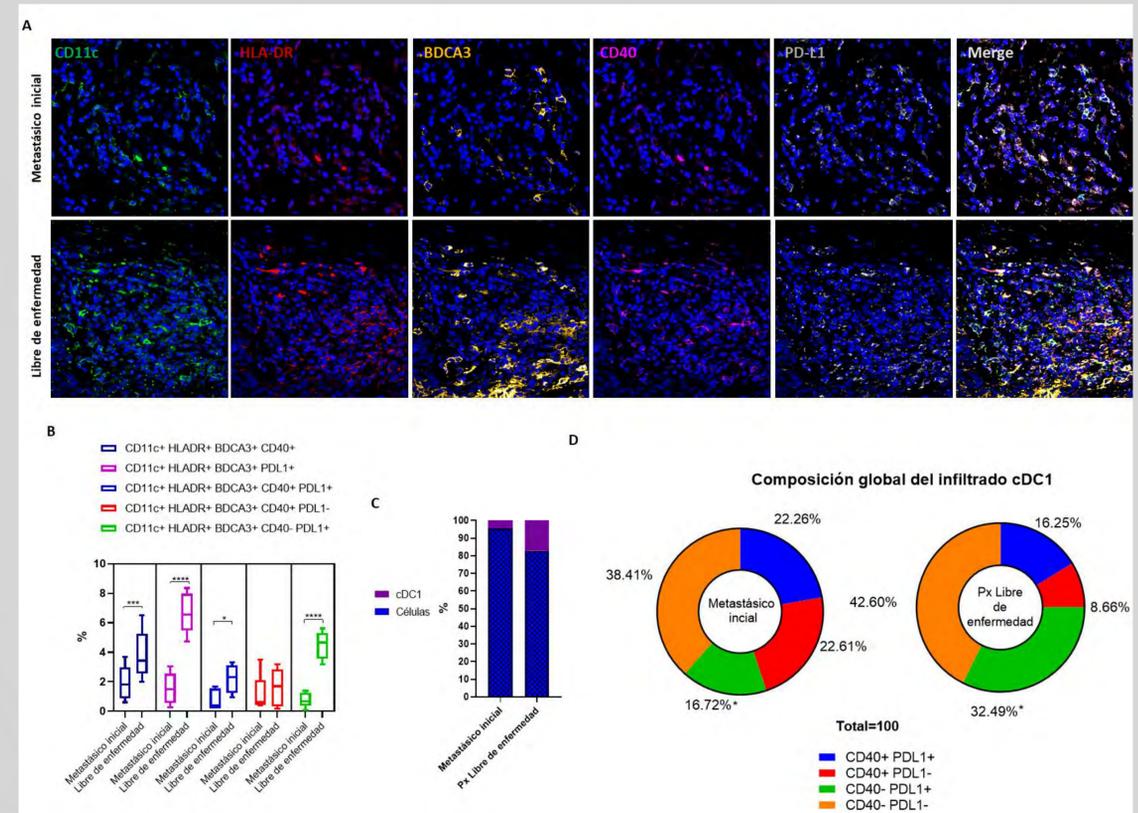


Figura 4. Uso de la metodología establecida para la identificación del fenotipo activador o regulador en cDC1.

A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia multiplex para CD11c (verde) HLA-DR (rojo) BDCA-3 (amarillo) CD40 (magenta) PD-L1 (gris), núcleos en azul y la composición de los 6 canales para un paciente metastásico inicial y otro libre de enfermedad. B. Resultados de la cuantificación porcentual obtenida con los clasificadores entrenados para los fenotipos indicados. C. Representación de la abundancia total de cDC1 en el infiltrado de pacientes metastásicos iniciales y libres de enfermedad. D. Composición global del infiltrado cDC1 de paciente metastásico inicial y paciente libre de enfermedad. Porcentajes obtenidos de la población cDC1 total por campo y paciente. Prueba t pareada p<0.05.

Conclusiones

Se estableció una metodología de análisis basada en herramientas de aprendizaje profundo y machine learning útil para evaluar y fenotipar células infiltrantes de tumor. Se encontró que a pesar de que el modelo de segmentación entrenado no tiene un impacto directo sobre los resultados cuantitativos Cellpose es la red neuronal convolucional con mejor desempeño para nuestros datos. Además el entrenamiento de clasificadores de marcadores utilizando el algoritmo random forest brinda resultados óptimos que son comparables a los resultados con el análisis tradicional no automatizado. Adicionalmente la metodología establecida permitió evaluar de manera objetiva tinciones de inmunofluorescencia multiplex, brindando la capacidad de analizar el fenotipo a las células dendríticas clásicas tipo 1. De tal modo, se logró observar que las cDC1 que expresan CD40 y PD-L1, así como las que sólo expresan PD-L1, son más abundantes tanto en el infiltrado total como en la fracción cDC1 en pacientes que logran controlar la enfermedad. La metodología establecida sienta las bases para ser transportada al análisis de otras poblaciones inmunes, evaluando ampliamente sus fenotipos de una manera objetiva y eficiente, reduciendo el tiempo de análisis de largas cantidades de datos y siendo accesible para la ciencia de cualquier campo.