

MARCELA DE OLIVEIRA

**TÉCNICA DE *MACHINE LEARNING* PARA ESTUDO DE NEUROTOXICIDADE
EM *DROSOPHILA* EXPOSTAS ÀS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**

Relatório de Pós-doutorado realizado
na Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências,
Bauru.

Supervisor: Prof. Dr. Paulo Noronha
Lisboa-Filho

Cossupervisor (a): Profa. Dra. Carolina
L. Zilli Vieira e Profa. Dra. Marina
Piacenti-Silva

PROPe - Nº do Processo 4440

Bauru

2023

Relatório Científico de Atividades

Relatório de Pós-Doutoramento

Título do Relatório: “Técnica de *machine learning* para estudo de neurotoxicidade em *Drosophila* expostas às nanopartículas metálicas”.

Dr^a. Marcela de Oliveira

Supervisor: Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho

Colaboradoras: Profa. Dra. Carolina L. Zilli Vieira e Profa. Dra. Marina Piacenti-Silva.

Instituição sede: Faculdade de Ciências - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus Bauru.

Instituição colaboradora: Harvard T.H. Chan School of Public Health.

Registro Nº: 4440

Relatório Científico Referente ao Período: 01/11/2022 a 01/11/2023

Bauru, 2023

1. RESUMO DO PROJETO PROPOSTO

A neurodegeneração é um fenômeno que ocorre no sistema nervoso central (SNC) através de alterações associadas a perda de estrutura e função neuronal. A etiologia da maioria das doenças neurodegenerativas é multifatorial e consiste em uma interação entre fatores ambientais e predisposição genética. Dentre os fatores ambientais, estudos têm discutido o potencial da exposição a metais como fatores de risco para doenças neurodegenerativas, devido a indução de estresse oxidativo por espécies oxigênio-reativas (ROS) e radicais livres e ativação microglial. Atualmente, têm se explorado novos modelos animais para estudo *in vivo* da neurotoxicidade em influência a elementos metálicos. Dentre tais modelos, a *Drosophila* tem sido um grupo animal de grande aplicação para análise de padrões de atividade neural. Entretanto, essa análise é realizada através de uma inspeção visual e manual de marcadores fluorescentes via microscopia confocal, sendo propícia a uma variabilidade inter e intra observadores. Assim, técnicas de *machine learning* têm sido amplamente utilizadas para análise de imagens, proporcionando uma avaliação quantitativa mais acurada e precisa. Nesse sentido, o principal objetivo dessa pesquisa será a implementação de *machine learning* para estudo de neurotoxicidade em *Drosophila* expostas às nanopartículas metálicas. Assim, avaliaremos computacionalmente se a exposição dos elementos metálicos pode causar alterações nos padrões de atividades encefálicas através das imagens de microscopia confocal, com reconhecimento e contagem automática de células da glia (associadas ao processo de neurotoxicidade), geração de ROS e sinapse nervosa.

2. ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO (01/11/2022 a 01/07/2023)

Este período engloba a parte inicial do projeto que foi desenvolvida no Laboratório de Materiais Avançados e Nanotecnologia da Faculdade de Ciências - UNESP Campus de Bauru. O objetivo desta etapa foi o desenvolvimento e caracterização das nanopartículas metálicas que serão utilizadas na segunda etapa desta pesquisa para exposição às *Drosophilas*.

2.1. Atividades Propostas:

A seguir estão apresentadas as atividades que estavam previstas para o período inicial deste projeto:

- a. Síntese das nanopartículas metálicas;
- b. Caracterização das nanopartículas metálicas;
- c. Preparo dos modelos animais e exposição às nanopartículas.

2.2. Atividades Desenvolvidas

Durante o período que abrange este relatório de estágio de pesquisa foram realizadas reuniões quinzenais com o supervisor deste projeto e seu grupo de pesquisa para debate e atualização das atividades do projeto, bem como discussão dos resultados obtidos em cada etapa. Além disso, nas reuniões eram discutidos assuntos relacionados a outros projetos e trabalhos dos demais integrantes do grupo (alunos de graduação, mestrado e doutorado), e tópicos relacionados ao funcionamento do grupo. A seguir estão apresentadas de forma detalhada as atividades desenvolvidas durante esse período inicial:

a. Síntese das Nanopartículas Metálicas

Este período foi dedicado para realizar a síntese das nanopartículas de ferro (NPs-FeO) utilizando o método sol-gel descrito por Abdulkadir et al. (1). Inicialmente, as nanopartículas foram preparadas utilizando 7,2 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ que foram dissolvidas em 200 mL de água mili-Q e 32,6 g de ácido cítrico foram dissolvidos em 800 mL de água mili-Q. A solução de nitrato férrico foi adicionada lentamente à solução de ácido cítrico sob agitação. A mistura foi então aquecida a cerca de 90°C em um agitador magnético até a formação de um gel. O gel obtido foi seco em estufa a 100°C por 24 h, seguido de tratamento térmico a 400°C por 2 h. Após o último tratamento térmico, o gel foi triturado para obtenção das nanopartículas em pó. A Figura 1 ilustra as etapas deste processo de síntese sol-gel para obtenção das NPs-FeO.

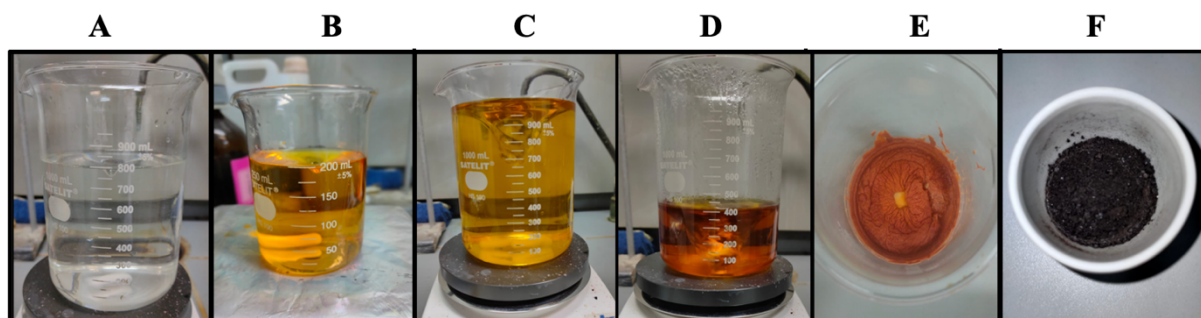


Figura 1. Representação das etapas da síntese das NPs-FeO. A) Ácido cítrico dissolvido em água. B) Nitrato de ferro dissolvido em água deionizada. C) Mistura das duas soluções A e B sob agitação. D) Mistura em aquecimento a 90°C . E) Amostra após secagem em estufa. F) Após calcinação na mufla elétrica e obtenção das NPs-FeO.

As nanopartículas de óxido de cobre (NPs-CuO) também foram sintetizadas por processo sol-gel. As NPs-CuO foram sintetizadas utilizando o método químico sol-gel adaptado de Pires et al. (2). Inicialmente, foi preparada em um béquer uma solução de 100 mL de água deionizada com 15 mL de ácido nítrico, a qual foi levada a um agitador magnético a 300 rpm e temperatura de 90°C , e gradualmente foi adicionado ao líquido 5,0 g de CuO amorfo. Em seguida preparou-se uma segunda solução, em outro béquer, composta por 5,5 g de ácido cítrico em 190 mL de água deionizada. Os dois conteúdos líquidos foram misturados no béquer maior. Após a espera

de 15 minutos, adicionou-se 10,5 mL de etilenoglicol, o qual ficou em agitação por algumas horas para iniciar a medição do pH à temperatura de 290°C. Para tornar o pH básico foram adicionadas 3 gotas de 2 mL cada de etilenoglicoamida. Posteriormente, diminuiu-se a temperatura para 180°C e depois para 70°C até a evaporação total do solvente. Após ocorrer a cristalização, o produto foi levado para secagem em uma mufla elétrica por um período de 2 horas a 350°C com taxa de aquecimento de 1°C/min, seguido de um período de 30 minutos a 500°C com taxa de aquecimento de 5°C/min. Após o último tratamento térmico, o material foi triturado para obtenção das amostras em pó fino. A Figura 2 ilustra as etapas deste processo de síntese sol-gel das NPs-CuO.

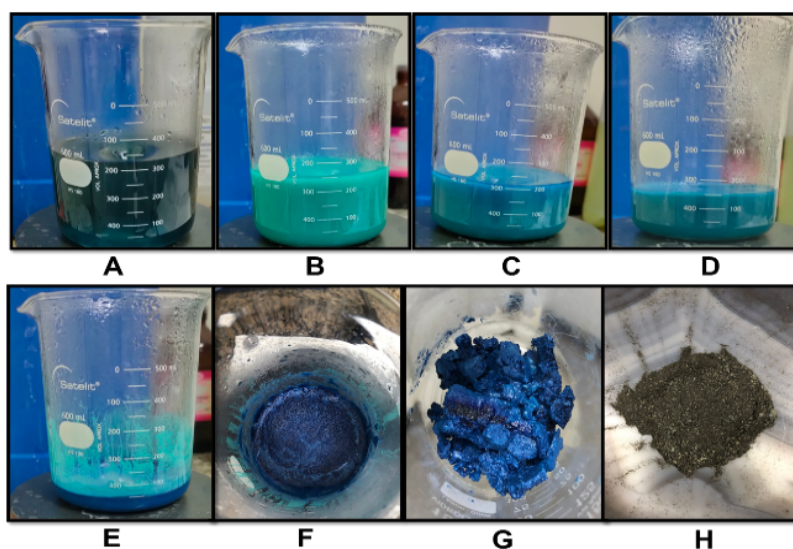


Figura 2. Representação das etapas da síntese das NPs-CuO. A) Solução com CuO amorfo, após a mistura da solução dos dois béqueres. B) Adição da 1ª gota de etilenoglicoamida. C) Adição da 2ª gota de etilenoglicoamida. D) Adição da 3ª gota de etilenoglicoamida. E) Processo de evaporação. F) Processo de cristalização. G) Pós cristalização. H) NPs-CuO obtidas após último tratamento térmico e trituração.

b. Caracterização das Nanopartículas Metálicas via DRX e MEV

Nesta etapa foram realizadas duas técnicas de caracterização das NPs sintetizadas na etapa anterior, a técnica de Difração de Raios X (DRX) e a técnica de microscopia eletrônica por varredura. A natureza cristalina das NPs foi caracterizada pela técnica de DRX. O padrão DRX dos nanopós foram adquiridos à temperatura ambiente com a ajuda de um difratômetro de raios X Rigaku DMAX, com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), escaneado de 20° a 80°. A caracterização para determinar a morfologia das NPs foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Através da técnica de DRX foi possível obter os respectivos espectros contendo as informações estruturais nas NPs dos dois elementos metálicos deste trabalho (Fe, Cu). Como resultado, obteve-se um gráfico de Intensidade (u.a.) por 2 θ (graus), podendo-se visualizar

diferente picos produzidos por interferência construtiva do feixe monocromático de Raios X espalhados em ângulos de 20° a 45° para cada conjunto de planos da rede da amostra. As intensidades de pico foram determinadas pelas posições atômicas dentro dos planos da rede e os espectros obtidos foram comparados com os espectros padrões de referência (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards* - JCPDS), segundo a literatura (1,2).

A Figura 3 mostra o padrão de DRX obtido do nanocompósitos de Fe_2O_3 comprovando que a amostra apresentou padrão de DRX com picos em $2\theta = 24,21^\circ, 33,21^\circ, 35,71^\circ, 40,94^\circ, 49,55^\circ, 54,13^\circ, 57,57^\circ, 62,51^\circ, 64,10^\circ$ e $71,52^\circ$ designados aos planos (012), (104), (110), (113), (024), (116), (122), (214), (300) e (1010) de reflexões de Bragg da fase romboédrica. Os parâmetros de rede das amostras foram: $a = b = 5,0285\text{\AA}$ e $c = 13,7360\text{\AA}$. Os nossos resultados de picos de difração corroboram com o padrão JCPDS n°: 01-084-0307, conforme os dados encontrados por Darezereshki et al. (3) e Abdulkadir et al. (1).

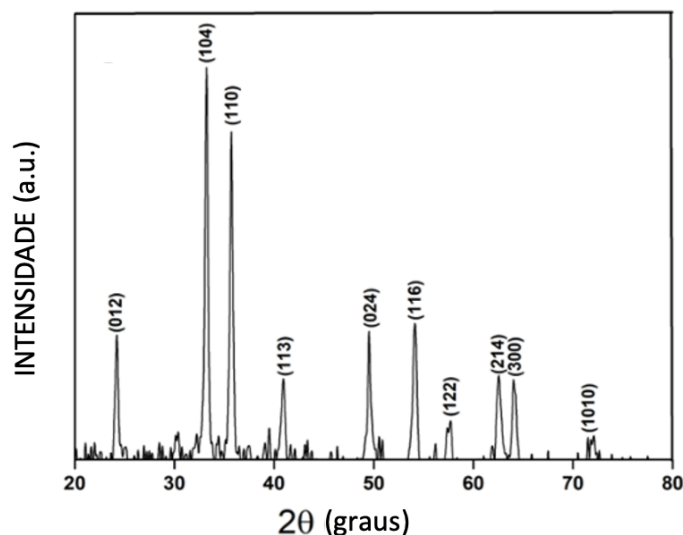


Figura 3. Padrão DRX das NPs-FeO sintetizadas.

A Figura 4 mostra o padrão de DRX obtido das NPs-CuO, comprovando que a amostra apresentou padrão de DRX com picos em $2\theta = 32,56^\circ, 38,75^\circ, 46,33^\circ, 48,89^\circ, 53,51^\circ, 58,30^\circ, 61,62^\circ, 66,39^\circ, 68,13^\circ, 72,43^\circ$ e $74,98^\circ$, que são atribuídos aos planos (110), (111), ($\bar{1}12$), ($\bar{2}02$), (020), (202), ($\bar{1}13$), ($\bar{3}11$), (113), (311) e (004), além disso um pico com 2θ de $35,58^\circ$ integrado ao longo do plano (111) da fase monoclinica do Cu_2O . Os valores dos parâmetros de rede das amostras são: $a = 4,682\text{\AA}$, $b = 3,424\text{\AA}$ e $c = 5,127\text{\AA}$. Os nossos resultados de picos de difração corroboram com o padrão JCPDS n°: 89-5895 e n°05-661 e com demais estudos que realizaram a síntese de nanoestruturas de óxido de cobre (4,5).

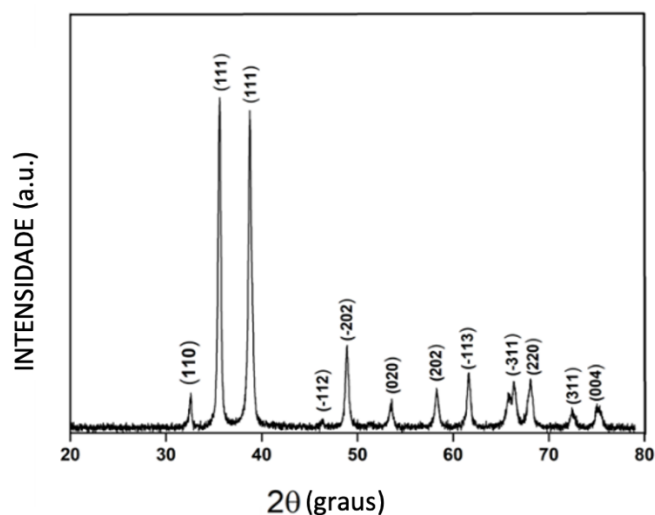


Figura 4. Padrão DRX das NPs-FeO sintetizadas.

Para obtenção das micrografias em MEV, as nanopartículas foram dispersas em etanol e passadas em um sonificador por 5 minutos. Uma gota da solução foi colocada sob *stubs*, deixadas secas e posteriormente cobertas com ouro antes de serem caracterizadas em um microscópio Jeol JSM-7500F e feixe de 10 kV. As micrografias obtidas (Figura 5) evidenciaram a formação de aglomerados compostos por várias pequenas NPs com formato esférico com uniformidade de distribuição de tamanho para ambas as NPs sintetizadas.

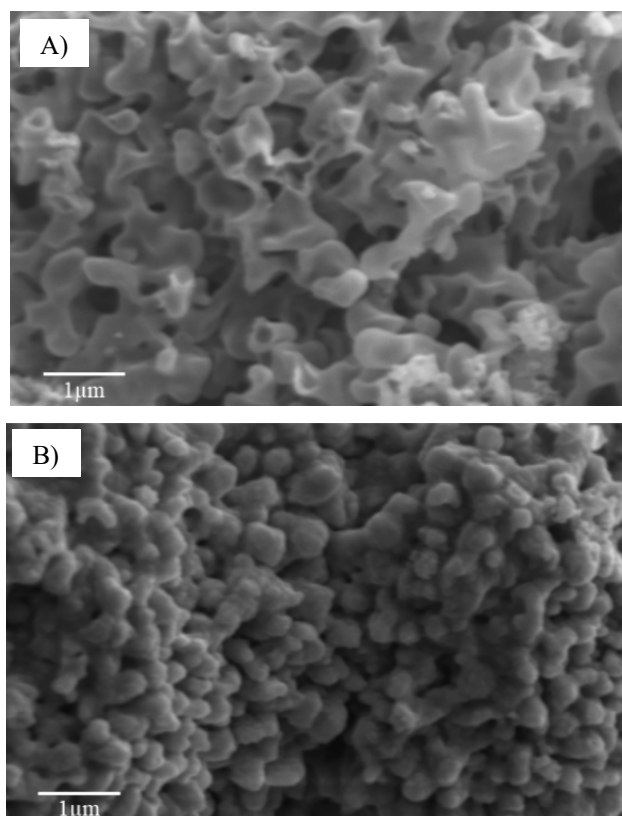


Figura 5. Micrioscopias das nanopartículas A) Fe₂O₃ e B) CuO.

c. Preparo dos Modelos Animais e Exposição às Nanopartículas

Esta etapa engloba a parte do projeto que foi em desenvolvimento em colaboração com a Profa. Dra. Carolina Zilli Vieira e a Profa. Dra. Marina Piacenti Silva, realizada na *Harvard T.H. Chan School of Public Health*. O sistema modelo que foi utilizado neste estudo era composto por moscas *Drosophila melanogaster*, amplamente utilizadas como organismos modelo por apresentarem características favoráveis, como um ciclo de vida rápido (~50 dias), genética simples (4 pares de cromossomos), baixo custo e fácil manuseio (6–8). Para todos os ensaios de exposição, as moscas foram cultivadas em meio de ágar de milho a 25°C, 60% de umidade relativa em ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro (LD) em uma sala com luz branca de ~70 lux (7). Após este arrastamento básico, as moscas foram encaminhadas para os ensaios de exposição às NPs específicas. A metodologia para a exposição das moscas será baseada conforme descrito por Ng *et al.* (9) e Siddique *et al.* (10), em que as diferentes concentrações de NPs serão misturadas na dieta das moscas. Além disso, foi mantido um grupo de moscas sem exposição às NPs, como grupo controle.

A Figura 6.A mostra as suspensões aquosas com diferentes concentrações de NPs-FeO que foram preparadas e adicionadas à comida padrão do grupo animal e misturadas fortemente. Após a adição das suspensões, as concentrações finais nos tubos foram de 10 mg a $1,0 \times 10^{-5}$ mg de NPs-FeO por grama de alimento (Figuras 6.B).

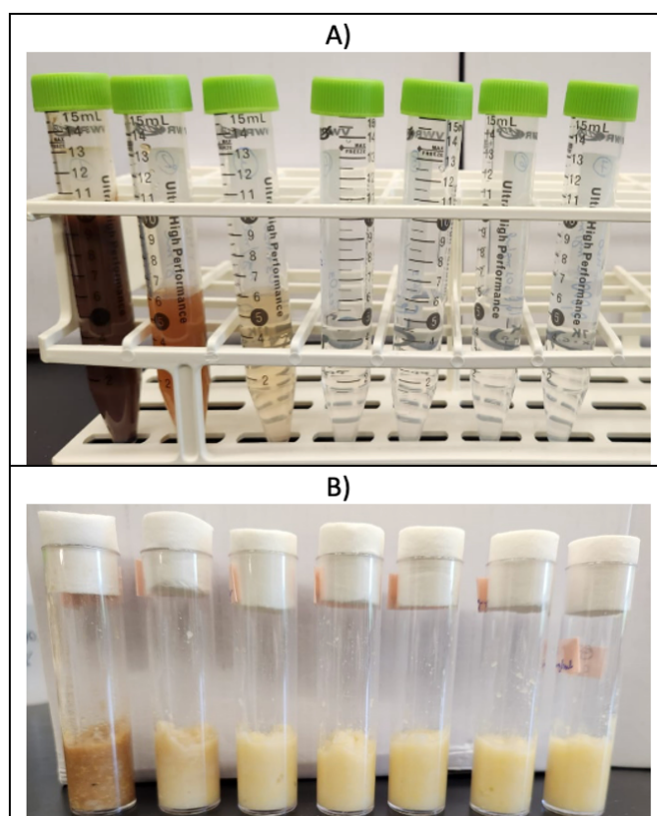


Figura 6. Preparo do alimento suplementado com FeNPs. A) soluções de NPs-FeO. B) Tubos com alimento e NPs

Em seguida, em cada tubo foram colocadas 20 moscas (10 fêmeas e 10 machos), que permaneceram depositando ovos por 24 horas. Após esse período as moscas foram retiradas e os ovos depositados se desenvolveram. Para todos os experimentos, os tubos foram mantidos dentro de uma incubadora a 25°C e 70% de umidade relativa e ciclo de luz 12 claro e 12 escuro (12:12 L/D). Todas as amostras foram feitas em triplicata. Por fim, duas concentrações foram definidas para análise de alterações morfológicas e fisiológicas neurais junto ao grupo controle: 10 mg/g e 0,001 mg/g de NPs-FeO. A Figura 7 representa os três tubos finais com as diferentes concentrações e o desenvolvimento dos ovos.



Figura 7. Tubos com moscas e alimento contendo 10 mg/g, 0,001 mg/g e 0 mg/g de NPs-FeO (da esquerda para direita).

3. ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO (01/07/2023 a 01/11/2023)

Este período engloba a segunda parte do projeto, que também foi em desenvolvimento em colaboração com a Profa. Dra. Carolina Zilli Vieira e a Profa. Dra. Marina Piacenti Silva. O objetivo desta etapa foi a análise do processo inflamatório em associação à exposição das NPs, bem como o desenvolvimento de uma ferramenta computacional para detecção e quantificação dos processos oxidativos associados ao processo neuroinflamatório.

3.1. Atividades Propostas:

A seguir estão apresentadas as atividades que estavam previstas para a segunda etapa deste projeto:

- a) Avaliação de alterações morfológicas e fisiológicas neurais;
- b) *Machine learning* para avaliação do impacto de nanopartículas metálicas nas imagens de microscopia confocal;
- c) Escrita de artigos e relatório final.

3.2. Atividades Desenvolvidas

Durante o período que abrange esta segunda etapa de pesquisa foram realizadas reuniões *online* quinzenais com as colaboradoras desta pesquisa para debate e atualização das atividades. A seguir estão apresentadas de forma detalhada as atividades desenvolvidas durante esse período inicial:

a. Avaliação de Alterações Morfológicas e Fisiológicas Neurais

Após a exposição dos modelos à diferentes concentrações de NPs, a avaliação das possíveis alterações funcionais e morfológicas quanto aos padrões de atividade neural foi feita a partir do processo de geração de ROS, células da glia e neurônios *in vivo*.

Para a detecção de ROS *in situ* foi utilizado dihidroetídio (DHE) (Sigma-Aldrich) e 2',7'-diclorofluoresceína (H2DCF) (Sigma-Aldrich) seguindo metodologia descrita por Vaccaro *et al.* (8). Para avaliar as células da glia a técnica de imuno-histoquímica foi realizada com anticorpos Repo, Elav e HRP, seguindo metodologia descrita por Read *et al.* (11). As respostas neuronais foram medidas de acordo com o aumento (ou diminuição) da fluorescência durante a estimulação. As alterações funcionais e morfológicas quanto aos padrões de atividade neural foram avaliadas a partir de imagens de microscopia confocal (Zeiss LSM 510).

Em suma, larvas foram coletadas, colocadas em solução PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*, solução salina tamponada com fosfato) e os cérebros dissecados (lóbulos centrais e ventral nerve cord). Os cérebros foram fixados em formaldeído 4% por 20 minutos em temperatura ambiente e lavados três vezes por 20 minutos com PBS. Os tecidos foram incubados *overnight* a 4°C e sob rotação em uma solução de PBS/0.5% Triton X-100 + 2% BSA para bloquear ligações não específicas a outras proteínas. Após isso, os anticorpos primários foram incubados a 4°C e sob rotação. Após aproximadamente 24 h os cérebros foram lavados três vezes por 20 minutos com PBS/0.5% Triton X-100 + 2% BSA e os anticorpos secundários incubados por 2 h em temperatura ambiente e sob rotação. Em seguida, os tecidos

foram lavados três vezes por 20 minutos com PBS e montados em lâminas com reagente *Vectashield antifade* (8,12).

Em adição, os anticorpos primários utilizados para marcação de células neurais e glia, respectivamente foram: anti-Repo de camundongo (8D12) 1:40 (DSHB) e anti-Elav 1:750 (DSHB). Cabe ressaltar que as moscas Nrf2-GFP já indicavam a exposição dos tecidos ao estresse oxidativo. Para detectar os anticorpos primários, os anticorpos secundários utilizados foram Alexa 488 e 568 (1:1000).

As imagens foram obtidas por um microscópio confocal Leica SP8 com objetiva de 20x em óleo. As configurações de laser, filtro e ganho permaneceram constantes em cada experimento. Entre 5 a 10 amostras por tratamento foram avaliadas em pelo menos 2 experimentos independentes.

A Figura 8 mostra as imagens obtidas para a expressão de estresse oxidativo em larvas. O marcador Gstd-GFP indicou o aumento da expressão de Nrf2, associada ao estresse oxidativo. Tanto na Figura 8 quanto no histograma da Figura 9 observa-se que o Gstd-GFP foi expresso em níveis baixos em larvas suplementadas menores concentrações.

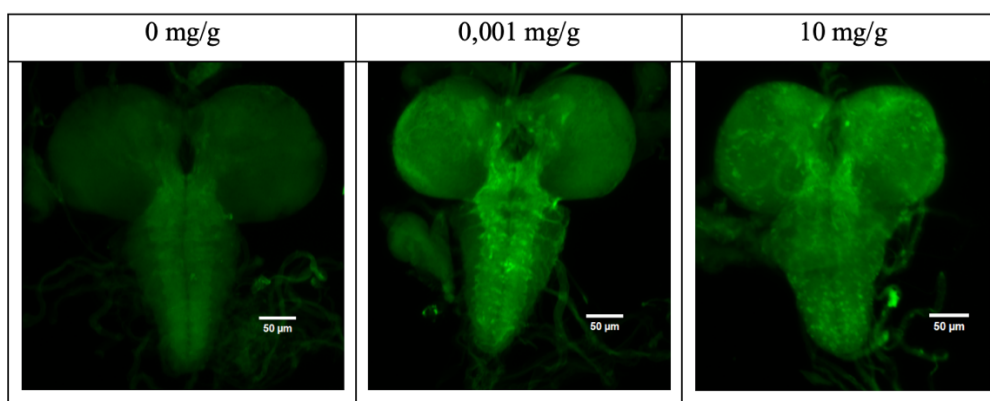


Figure 8. Expressão de Nrf2 por Gstd-GFP marcador. Imagens obtidas com lente de 20x. Soma das projeções.

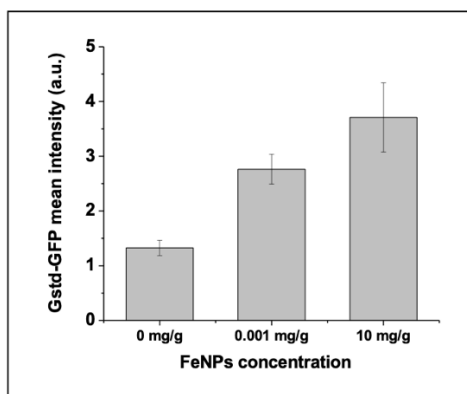


Figure 9. Níveis de Gstd-GFP associados com estresse oxidativo no encéfalo das larvas. Valores médios de 5-7 amostras por grupo.

A Figura 10 apresenta as imagens obtidas de imunofluorescência para a expressão de células neurais e células de glia em larvas.

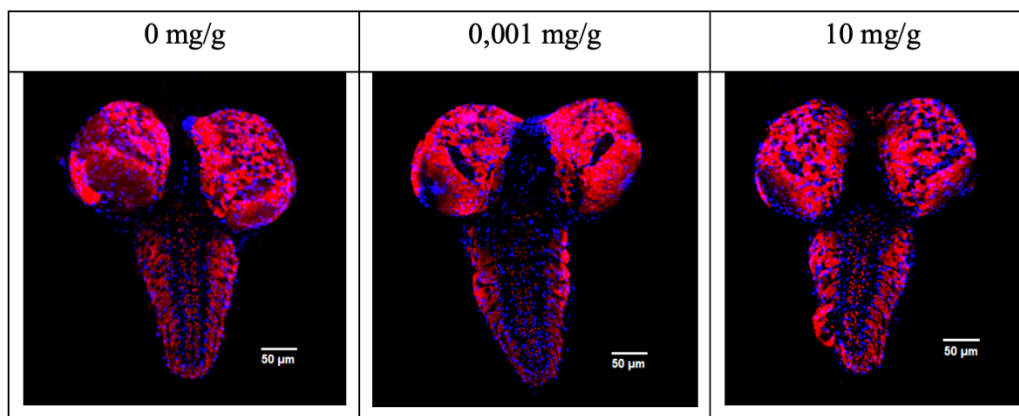


Figura 10. Expressão de ELAv (total neurons) e REPO (glia). Imagens obtidas com lente de 20x.

b. *Machine Learning* para Avaliação do Impacto de Nanopartículas Metálicas nas Imagens de Microscopia Confocal

Nesta etapa, a análise da neurotoxicidade foi realizada computacionalmente pelo programa desenvolvido a partir das imagens microscópicas via contagem automática das células da glia, de produção de ROS e identificação dos neurônios. Atualmente, os trabalhos na literatura realizam essa análise através de uma inspeção visual e manual de marcadores fluorescentes, sendo propícia a uma variabilidade inter e intra observadores (9,13,14). O programa computacional que foi desenvolvido aplicou a técnica de *machine learning* com o método baseado em redes neurais profundas para detecção e quantificação das células da glia, corpo neuronal e espécies oxigênio reativas nas imagens de microscopia confocal de fluorescência (15,16). Esta técnica envolve múltiplos bancos de filtros convolucionais baseados nos princípios de segmentação por limites, análises de histogramas e *clusters*. Neste momento foi utilizada uma rede neural convolucional (CNN do inglês *convolutional neural network*) para obtenção do modelo de predição, a partir do banco de dados de treinamento (17).

Inicialmente, dois pacotes de filtros convolucionais foram aplicados paralelamente em abas as sequências de imagens (células da glia e neurônios) para extração de características da imagem. Assim, a CNN aprendeu o reconhecimento das células de interesse por meio das intensidades na imagem. Cada pacote convolucional era composto por cinco filtros de tamanhos diferentes. Em seguida, as imagens de saída desses pacotes foram concatenadas e novamente passadas pelos filtros convolucionais. Por fim, os rótulos das células de interesse foram gerados por convolução da segmentação manual com um filtro de *Gaussian kernel*, e assim obtido o

modelo de treinamento. A arquitetura desta rede neural convolucional usada para segmentação das células encefálicas está representada na Figura 11.

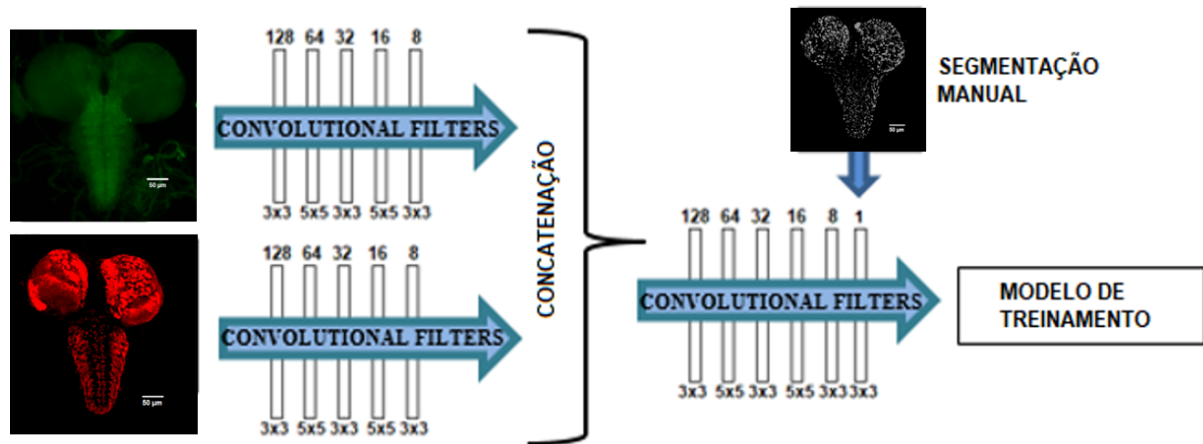


Figura 11. Arquitetura da CNN usada para segmentação das lesões escleróticas encefálicas com pacotes de filtros convolucionais para aprendizagem de características. O número do filtro é listado acima e o tamanho de cada filtro é denotado em baixo (adaptado de (18)).

Em seguida, uma vez o modelo treinado, a implementação do código iniciou com a aplicação da rede neural convolucional de treinamento em todas as imagens de microscopia do grupo de teste, seguida da conversão da quantidade de *voxels* reconhecida e contabilizada nas máscaras binárias de segmentação das células em volume comprometido (em percentagem de comprometimento). Assim, foi possível realizar a quantificação volumétrica da região marcada pelas células de interesse das imagens do grupo teste. A Figura 12 mostra um exemplo de todo o processo realizado computacionalmente pelo programa desenvolvido.

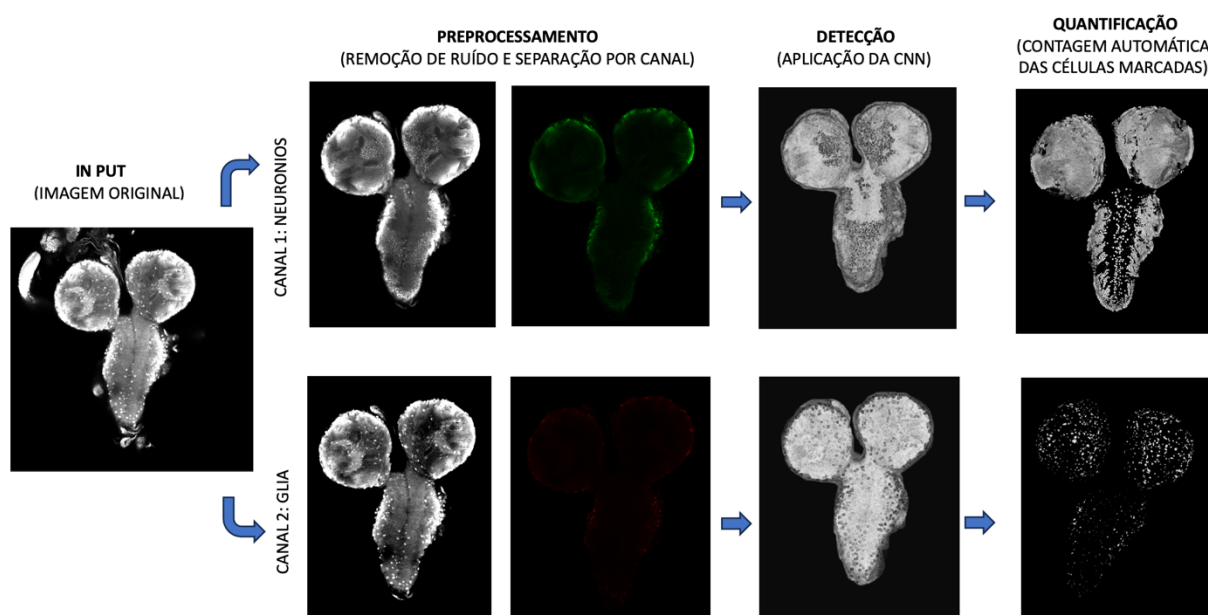


Figura 12. Exemplo de segmentação e quantificação das células da glia e neurônicos com aplicação da CNN.

A Figura 13 mostra os resultados obtidos volumetricamente com o processo de aplicação da CNN para segmentação específica da célula da glia encefálica.

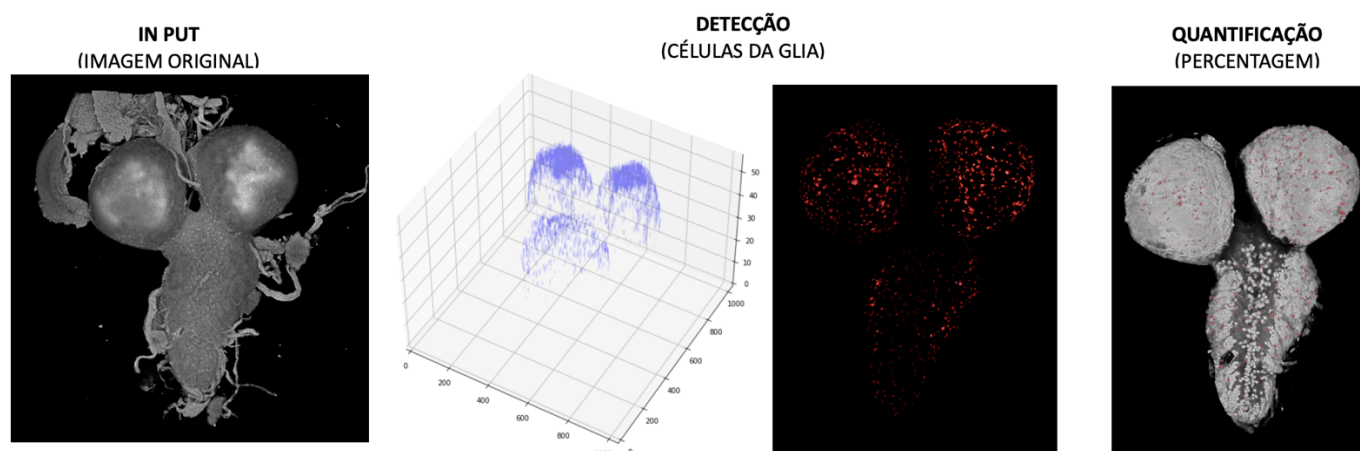


Figura 13. Exemplo de segmentação volumétrica das células da glia com a CNN.

Pro fim, vale ressaltar que a avaliação subjetiva do observador consome tempo e está susceptível às variações inter e intra-observadores. Assim, a utilização de ferramentas computacionais está em constante desenvolvimento e aplicação para avaliação de imagens. Deste modo, é de extrema importância a utilização de programas computacionais que possam auxiliar os observadores em sua análise e aumentar a acurácia da avaliação realizada, proporcionando um suporte maior para o seguimento da progressão de uma doença, bem como o acompanhamento do tratamento aplicado. Além disso, nessa etapa de discussão com o especialista obtivemos um retorno positivo sobre a detecção automática, sendo essencial para garantir a interação entre o trabalho proposto e o campo de aplicação em que será inserido.

c. Redação do Artigo e Relatório Final:

Este projeto de pesquisa teve como objetivo principal o estudo da influência da exposição às nanopartículas metálicas no processo de neuroinflamação em *Drosophila*. A síntese e caracterização das nanopartículas permitiu não só a produção nos materiais metálicos, mas também as análises estruturas e morfológicas das nanopartículas metálicas. Os resultados encontrados mostraram que as alterações nos níveis metálicos estão envolvidos com a produção de espécies reativas de oxigênio e possivelmente associadas às inflamações encefálicas, podendo ser considerados como fatores externos tóxicos. Em adição, o programa computacional desenvolvido mostrou grande potencial para realização desta análise de toxicidade automaticamente, proporcionando uma acurácia maior e em menor tempo. Em suma, todas as

etapas desenvolvidas durante o período de estágio deste pós-doutoramento e os resultados obtidos foram incluídos neste relatório e estão sendo inseridos na redação do artigo final.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdulkadir I, Abdallah HMI, Jonnalagadda SB, Martincigh BS. The effect of synthesis method on the structure, and magnetic and photocatalytic properties of hematite (α -Fe₂O₃) nanoparticles. South African J Chem [Internet]. 2018;71:68–78. Available from: http://www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0379-43502018000100009&nrm=iso
2. Pires LA, de Azevedo Silva LJ, Ferrairo BM, Erbereli R, Lovo JFP, Ponce Gomes O, et al. Effects of ZnO/TiO₂ nanoparticle and TiO₂ nanotube additions to dense polycrystalline hydroxyapatite bioceramic from bovine bones. Dent Mater [Internet]. 2020 Feb;36(2):e38–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564119309066>
3. Darezereshki E, Bakhtiari F, Alizadeh M, Behrad vakylabad A, Ranjbar M. Direct thermal decomposition synthesis and characterization of hematite (α -Fe₂O₃) nanoparticles. Mater Sci Semicond Process [Internet]. 2012;15(1):91–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369800111001478>
4. Sundar S, Venkatachalam G, Kwon S. Biosynthesis of Copper Oxide (CuO) Nanowires and Their Use for the Electrochemical Sensing of Dopamine. Nanomaterials [Internet]. 2018 Oct 12;8(10):823. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-4991/8/10/823>
5. Mallick P. Synthesis of Copper Oxide Nanocomposite (Cu₂O/CuO) by Sol–gel Route. Proc Natl Acad Sci India Sect A Phys Sci [Internet]. 2014 Sep 11;84(3):387–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40010-014-0131-y>
6. Abrieux A, Xue Y, Cai Y, Lewald KM, Nguyen HN, Zhang Y, et al. EYES ABSENT and TIMELESS integrate photoperiodic and temperature cues to regulate seasonal physiology in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Jun;117(26):15293–304.
7. Song BJ, Sharp SJ, Rogulja D. Daily rewiring of a neural circuit generates a predictive model of environmental light. Sci Adv [Internet]. 2022 Sep 7;7(13):eabe4284. Available from: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe4284>
8. Vaccaro A, Kaplan Dor Y, Nambara K, Pollina EA, Lin C, Greenberg ME, et al. Sleep Loss Can Cause Death through Accumulation of Reactive Oxygen Species in the Gut. Cell [Internet]. 2020 Jun;181(6):1307–1328.e15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420305559>
9. Ng CT, Ong CN, Yu LE, Bay BH, Baeg GH. Toxicity Study of Zinc Oxide Nanoparticles in Cell Culture and in Drosophila melanogaster. J Vis Exp. 2019 Sep;(151).
10. Siddique YH, Haidari M, Khan W, Fatima A, Jyoti S, Khanam S, et al. Toxic potential of copper-doped ZnO nanoparticles in Drosophila melanogaster (Oregon R). Toxicol Mech Methods. 2015;25(6):425–32.
11. Read RD, Cavenee WK, Furnari FB, Thomas JB. A drosophila model for EGFR-Ras and PI3K-dependent human glioma. PLoS Genet. 2009 Feb;5(2):e1000374.
12. Meyer S, Schmidt I, Klämbt C. Glia ECM interactions are required to shape the Drosophila nervous system. Mech Dev [Internet]. 2014 Aug;133:105–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925477314000276>
13. Shankar S, Calvert MEK, Yew JY. Measuring Physiological Responses of Drosophila Sensory Neurons to Lipid Pheromones Using Live Calcium Imaging. J Vis Exp. 2016 Apr;(110).
14. Ayaz D, Leyssen M, Koch M, Yan J, Srahna M, Sheeba V, et al. Axonal injury and regeneration in the adult brain of Drosophila. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 2008 Jun;28(23):6010–21.
15. Kose K, Bozkurt A, Alessi-Fox C, Brooks DH, Dy JG, Rajadhyaksha M, et al. Utilizing Machine Learning for Image Quality Assessment for Reflectance Confocal Microscopy. J Invest Dermatol. 2020 Jun;140(6):1214–22.
16. Ellebrecht DB, Heßler N, Schläefer A, Gessert N. Confocal Laser Microscopy for in vivo Intraoperative Application: Diagnostic Accuracy of Investigator and Machine Learning Strategies. Visc Med. 2021 Dec;37(6):533–41.
17. de Oliveira M, Piacenti-Silva M, da Rocha FC, Santos JM, Cardoso JD, Lisboa-Filho PN. Lesion Volume Quantification Using Two Convolutional Neural Networks in MRIs of Multiple Sclerosis Patients. Vol. 12, Diagnostics . 2022.
18. Roy S, Butman JA, Reich DS, Calabresi PA, Pham DL. Multiple sclerosis lesion segmentation from brain MRI via fully convolutional neural networks. arXiv. 2018;(March).