

DISEÑO DE INTERFAZ EN LENGUAJE PYTHON PARA EL ANÁLISIS DE MICROFOTOGRAFÍAS: APLICACIÓN A LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORREOLÓGICA DE QUERCETINA

PYTHON INTERFACE DESIGN FOR MICROPHOTOGRAPHY ANALYSIS: APPLICATION TO EVALUATE THE HEMORHEOLOGICAL ACTIVITY OF QUERCETIN

P. Buszniez¹, M. Gómez¹, H. V. Castellini² y B. D. Riquelme^{*1,3,4}

¹Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) - Suipacha 531, Rosario – Argentina

²Facultad de Cs. Exactas, Ingeniería y Agrimensura (UNR) – Rosario – Argentina

³Grupo de Física Biomédica, Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR) – Rosario – Argentina

⁴Consejo de Investigaciones de la UNR – Argentina

Recibido: 06/06/2024 ; Aceptado: 01/09/2024

En este trabajo se describe el desarrollo de una GUI (Graphic User Interface) en Python para sistematizar el análisis de imágenes, en el marco del estudio hemorreológico *in vitro* de fitoquímicos que podrían ser utilizados en el tratamiento de la diabetes. Los criterios de usabilidad de la GUI basada en la librería TkInter están dirigidos a usuarios no expertos. Los algoritmos de procesamiento de imágenes están contenidos en la biblioteca OpenCV2, que utiliza las redes neuronales previamente entrenadas. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital acoplada a un microscopio invertido y objetivo 40x. En este trabajo se optimizó el proceso de búsqueda de parámetros (porcentajes de células aisladas y el coeficiente de células aisladas) para glóbulos rojos incubados con soluciones de quercetina a distintas concentraciones.

Palabras clave: interfaz gráfica de usuario, python, quercetina, diabetes.

This work describes the development of a GUI (Graphic User Interface) in Python to systematize the image analysis within the framework of the *in vitro* hemorreological study of phytochemicals that could be used for diabetes treatment. The usability criteria of the GUI based on the TkInter library are aimed at non-expert users. The image processing algorithms are contained in the OpenCV2 library, which uses pre-trained neural networks. Images were obtained using a digital camera coupled to an inverted microscope (40x objective). In this work, the parameter search process was optimized (percentages of isolated cells and the coefficient of isolated cells) for red blood cells incubated with quercetin solutions at different concentrations.

Keywords: graphic user interface, python, quercetin, diabetes.

<https://doi.org/10.31527/analesafa.2024.35.4.103>



ISSN - 1850-1168 (online)

I. INTRODUCCIÓN

En condiciones normales, los glóbulos rojos en reposo se agregan en estructuras similares a pilas de monedas llamadas rouleaux, pero en determinadas patologías, como por ejemplo la diabetes, forman aglomerados globulares llamados clusters [1],[2]. Para simular *in vitro* las alteraciones que la hiperglucemia produce en pacientes diabéticos, se realizan incubaciones de glóbulos rojos humanos en medios con diferentes concentraciones de glucosa. Además, mediante estudios hemorreológicos es posible evaluar si determinados compuestos podrían revertir estas alteraciones a fin de utilizarlos para el tratamiento de la diabetes [3],[4],[5].

En este tipo de estudios hemorreológicos se suelen utilizar imágenes digitales correspondientes a glóbulos rojos de donantes sanos que fueron incubados con soluciones de glucosa (glicados *in vitro*) y luego tratados con el compuesto en estudio, por ejemplo fitoquímicos (Trigonelina, quercetina, beta-sitosterol) o extractos de plantas nativas (*Phyllanthus sellowianus* y *Bauhinia forficata*) utilizadas para el trata-

miento de la diabetes [6]. Por lo tanto, se necesita procesar una gran cantidad de imágenes digitales de glóbulos rojos de dadores sanos, tratadas con los fitoquímicos e incubadas en medios con distintas concentraciones de glucosa [7]. El protocolo con estas imágenes incluye la determinación de los porcentajes de células aisladas (CA) y parámetros de agregación [8], [9]. En particular, se utiliza frecuentemente el coeficiente de células aisladas definido de la siguiente manera:

$$C_{CA} = \frac{CA_{inicial} - CA_{final}}{CA_{inicial}} \quad (1)$$

Este coeficiente puede variar entre 0 y 1; siendo $C_{CA} = 0$ cuando no hay diferencias en la agregación antes y después del tratamiento, y $C_{CA} = 1$ cuando hay agregación completa después del tratamiento. De esta forma, el valor de C_{CA} cuantifica la variación de la agregación de la muestra tratada relativa al control.

El objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso de obtención de estos parámetros reduciendo el tiempo de trabajo por imagen por parte del operador, mediante el desarrollo de

* riquelme@ifir-conicet.gov.ar

un programa adecuado para el análisis de las microfotografías de glóbulos rojos (GR) incubados con soluciones del fitoquímico quercetina.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron muestras de sangre de dadores sanos obtenidas por punción venosa y anticoaguladas con EDTA. Los GR fueron separados por centrifugación y lavados una vez en PBS (solución buffer fosfato, pH 7.4 y osmolaridad 300 mOsm) para su posterior tratamiento.

Tratamiento de las células

Se utilizó quercetina adquirida de Laboratorio Sigma Aldrich (código 117-39-5). Se prepararon soluciones de quercetina en PBS a distintas concentraciones (0,1; 1; 10 y 100 μM), las cuales fueron elegidas teniendo en cuenta las utilizadas en diversos estudios de investigación y su solubilidad en agua (ensayos previos demostraron que a concentraciones superiores a 100 μM es poco soluble en agua). En esta publicación se describen los efectos obtenidos en función de las concentraciones de quercetina utilizadas:

- Bajas dosis 0 a 10 μM : quimioprevención.
- Dosis medias 10 a 200 μM : efectos mixtos.
- Dosis altas >200 μM : pro-oxidante o potenciales propiedades terapéuticas.

Volúmenes iguales de GR lavados y de cada solución de quercetina fueron mezclados e incubados a 37°C durante 2 horas con agitación controlada. Luego los GR fueron lavados nuevamente con PBS y resuspendidos en plasma autólogo al 0,3% para su observación y toma de imágenes por quintuplicado en el microscopio.

Método

Se desarrolló una GUI (*Graphic User Interface*) en Python para sistematizar el análisis de imágenes digitales tomadas con una cámara acoplada a un microscopio invertido y objetivo 40x. El programa desarrollado permite aplicarles un balance de blancos para mejorar el contraste células-fondo y realizar el conteo de las células totales (incluidas aquellas que no se encuentran aisladas, sino formando rouleaux). Además, se diseñó una interfaz on-click para facilitar el manejo del programa a operarios no familiarizados con recursos informáticos.

Los criterios de usabilidad de la GUI basada en la librería TkInter están dirigidos a usuarios no expertos. Los algoritmos de procesamiento de imágenes están contenidos en la biblioteca OpenCV2, que utiliza las redes neuronales previamente entrenadas por la empresa INTEL (<https://opencv.org/>).

III. RESULTADOS

En la Fig. 1 se muestra un ejemplo de una de las imágenes originales obtenidas para los GR incubados con quercetina.

La interfaz desarrollada permite utilizar imágenes digitalizadas de forma práctica e incluso remota.

En la Fig. 2 se muestra la misma imagen ecualizada por el programa usando la biblioteca “Python Imaging Library”

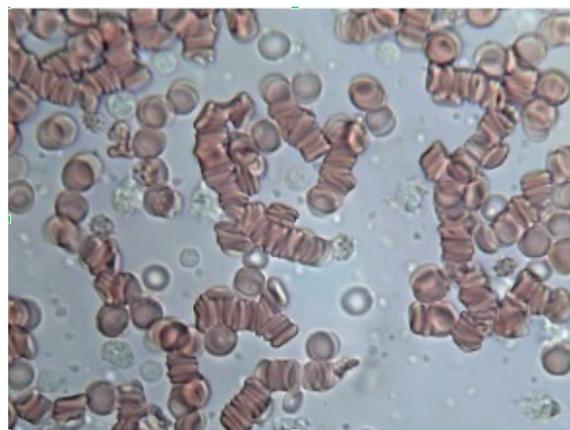


FIG. 1: Imagen original de GR incubados con la solución de quercetina 100 μM , obtenida con una cámara acoplada a un microscopio invertido y objetivo 40x.

(<https://python-pillow.org/>). En la Fig. 3 se puede observar la imagen post conteo donde cada glóbulo rojo incluido en el conteo es indicado por el programa con su circunferencia teñida de azul.

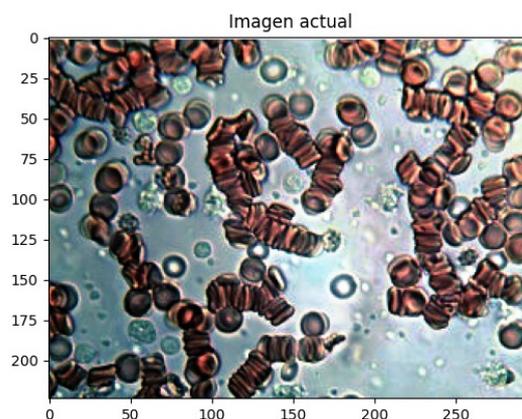


FIG. 2: Imagen ecualizada por el programa usando la biblioteca “Python Imaging Library” (<https://python-pillow.org/>).

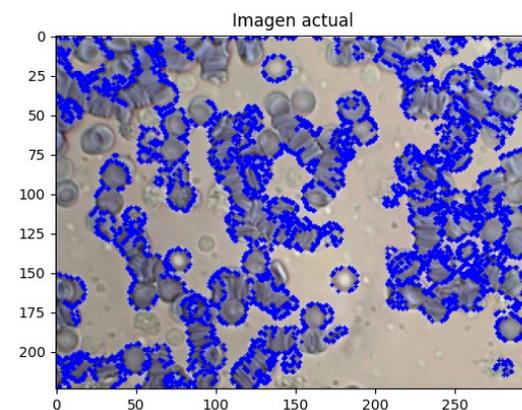


FIG. 3: Imagen post conteo. Cada glóbulo rojo incluido en el conteo es indicado por el programa con su circunferencia teñida de azul.

La interfaz da el conteo y las relaciones del total de células con las células aisladas a través de un histograma, in-

cluyendo las agrupadas en rouleaux o clusters. En la Fig. 4 se presenta la visualización en la barra de estado del resultado del conteo informado por el programa, el cual puede guardarse como un documento.



FIG. 4: El resultado del conteo se informa en el programa y puede guardarse como un documento.

En la Fig. 5 se observa a través del histograma emitido, el número y frecuencia de agregados eritrocitarios según la cantidad de células que los componen (Tamaño de rouleaux), en relación con las células aisladas.

El código desarrollado optimiza las imágenes en el caso de los clusters, empleando un balance de blancos. El proceso asegura que el contraste entre la célula y el fondo sea tal que garantice una interpretación significativa del fenómeno de la agregación de eritrocitos.

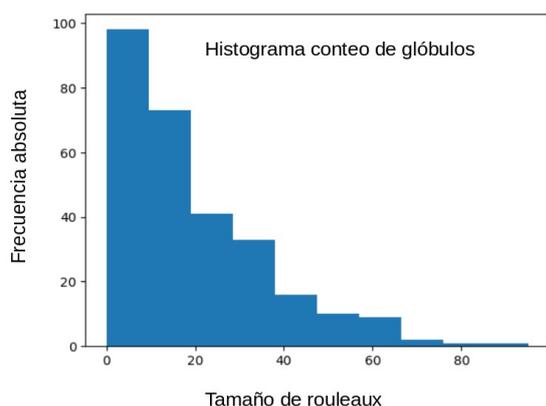


FIG. 5: Histograma obtenido con la relación de C_A y distintos grupos de agregados eritrocitarios.

Con los valores obtenidos se calcula el coeficiente de células aisladas (C_{CA}) que se define como la diferencia entre los porcentajes de células individuales iniciales (GRs control) y finales (GRs tratados) con relación al porcentaje de células individuales antes del tratamiento, de acuerdo con la ecuación (1).

En la Tabla 1 se presentan los parámetros de agregación eritrocitaria (porcentaje de células aisladas y C_{CA}) obtenidos a partir de las imágenes de las muestras de glóbulos rojos tratados con quercetina.

TABLA 1: PARÁMETROS DE IMÁGENES OBTENIDOS PARA LAS MUESTRAS DE GLÓBULOS ROJOS TRATADOS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE QUERCETINA.

Muestra	[CA]	C_{CA}
CONTROL	82,3	0
Q 0,1 μM	72,5 \pm 3,6***	0,120 \pm 0,006
Q 1 $M M$	56,4 \pm 2,8***	0,31 \pm 0,02*
Q 10 $M M$	55,6 \pm 2,8***	0,33 \pm 0,02*
Q 100 $M M$	37,6 \pm 1,9***	0,54 \pm 0,03*

*p-valor<0,05; **p-valor<0,001; ***p-valor<0,0001

La disminución del C_A y el aumento de C_{CA} muestran que a mayores concentraciones de quercetina se forman agregados de mayor tamaño, es decir conformador por una mayor cantidad de células.

IV. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se pudo optimizar el proceso de obtención de los parámetros de agregación eritrocitaria mediante un programa adecuado para el análisis de las microfotografías de glóbulos rojos incubados con soluciones de quercetina. El código desarrollado será de gran ayuda para el análisis de imágenes obtenidas por microscopía de glóbulos rojos tratados in vitro con soluciones de quercetina como así también de otros fitoquímicos y extractos vegetales. Este nuevo diseño será de utilidad además para el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía de muestras de lóbulos rojos de pacientes y de muestras tratadas in vitro con diferentes drogas de interés farmacéutico.

REFERENCIAS

- [1] A. Fontana, N. Lerda, M. Delannoy y B. Riquelme. Técnica de cuantificación de la agregación eritrocitaria por análisis digital de imágenes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **46**, 47-52 (2012). https://drive.google.com/file/d/1CIZbfNtRNJYsHC0m-xxz_DdagonRFmWQ/view.
- [2] M. Delannoy, A. Fontana, M. D'Arrigo y B. Riquelme. Influence of hypertension and type 2 diabetes mellitus on erythrocyte aggregation using image digital analysis. *Series in Biomechanics* **29**, 5-10 (2015). https://www.imbm.bas.bg/biomechanics/uploads/Archive2015-1/5-10_Delannoy.pdf.
- [3] C. Chang, Y. Lin, A. Bartolome, Y. C. Chen, S. C. Chiu y W. C. Yang. Herbal Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Chemistry, Biology, and Potential Application of Selected Plants and Compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **33** (2013). <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/378657/>.
- [4] L. W. Qi, E. H. Liu, C. Chu, Y. B. Peng, H. X. Cai y P. Li. Anti-diabetic agents from natural products—an update from 2004 to 2009. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **10**, 434-457 (2010). <https://benthamscience.com/article/30895>.
- [5] N. Babu y M. Singh. Analysis of aggregation parameters of erythrocyte in diabetes mellitus. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **32**, 269-277 (2005).
- [6] P. Buszniez, O. Di Sapio y B. Riquelme. Effects of Phyllanthus sellowianus Müll Arg. Extracts on the Rheological Properties of Human Erythrocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics* **70**, 1407-1416 (jun. de 2014). ISSN: 1559-0283. <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-014-0072-8>.
- [7] P. A. Menichini, M. G. Larese y B. D. Riquelme. *Automatic analysis of microscopic images of red blood cell aggregates en Biophotonics South America* (eds. Kurachi, C., Svanberg, K., Tromberg, B. J. y Bagnato, V. S.) **9531** (SPIE, jun. de 2015), 953132. <http://dx.doi.org/10.1117/12.2181110>.
- [8] A. I. Alet, S. Basso, M. Delannoy, N. A. Alet, M. D'Arrigo, H. V. Castellini y B. D. Riquelme. *Innovative parameters obtained for digital analysis of microscopic images to evaluate in vitro hemorheological action of anesthetics en Biophotonics South America* (eds. Kurachi, C., Svanberg, K., Tromberg, B. J. y Bagnato, V. S.) **9531** (SPIE, jun. de 2015), 95311P. <http://dx.doi.org/10.1117/12.2180791>.

- [9] P. Ponce de León, G. Del Balzo y B. Riquelme. Biorheological Action of *Ascaris lumbricoides* Larvae on Human Erythrocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics* **65**, 237-242 (sep. de 2012). ISSN: 1559-0283. <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-012-9425-3>.