

Laboratorio de Electromagnetismo y Óptica (ByG)
1er cuat. 2021

TP Nº 6 – PARTE B – Protocolo de procesamiento de imágenes

Procesar las imágenes de fluorescencia de una muestra de células marcada con tres sondas fluorescentes. El procesamiento de las imágenes se efectuará en la plataforma abierta y gratuita FIJI (*Fiji Is Just ImageJ*).

Procesamiento de imágenes

Las imágenes a analizar provienen de una muestra de células endoteliales de arteria pulmonar bovina que tiene marcados con distintas sondas fluorescentes componentes del citoesqueleto y núcleo células endoteliales de arteria pulmonar bovina.

Actina: filamentos detectados con faloidina Texas Red®-X (rojo)

Tubulina: marcado con un anticuerpo primario contra α -tubulina y visualizado con un anticuerpo secundario conjugado a BODIPY® Fluoresceína (verde)

Núcleo: marcado con DAPI (azul)

En la Figura 1 se muestran los espectros de excitación y emisión de los distintos fluoróforos empleados.

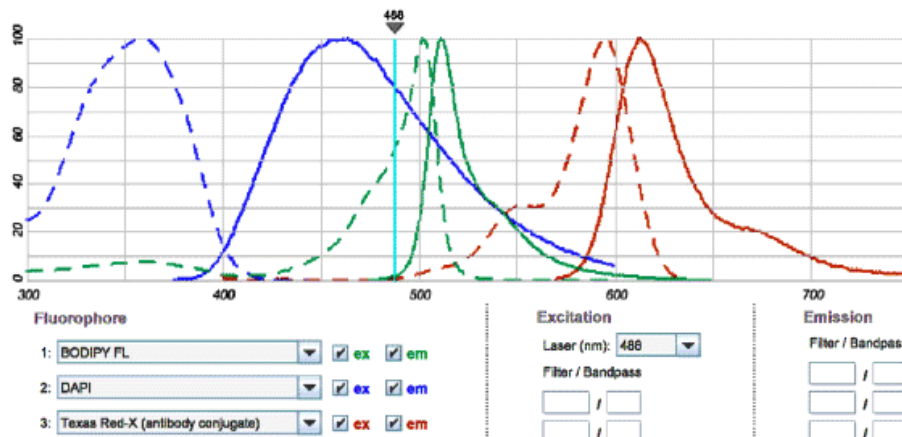


Figura 1. Espectros de excitación (línea de puntos) y emisión (línea llena) de los tres fluoróforos presentes en la muestra: DAPI (azul), BODIPY (verde) y Texas Red (rojo). Tomado de <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>.

La configuración del microscopio utilizado para tomar las imágenes de fluorescencia cuenta con cuatro posiciones para cubos de filtros, tres de ellas están dispuestas para fluorescencia:

- (1) 450-490 - FT 510 - LP520 (*Zeiss*)
- (2) Para transmisión
- (3) Cubo QD 655 (*Chroma*)
- (4) BP 365/12 - FT 395 - LP 397 (*Zeiss*)

Para la adquisición de imágenes, el microscopio de fluorescencia tiene instalado un dispositivo CCD de Astronomical Instruments, modelo ST8.

Imágenes para procesar

- Empleando el objetivo 40X de AN 0.75 del microscopio, se adquirieron imágenes de la muestra de células endoteliales de arteria pulmonar bovina con cada uno de los cubos de fluorescencia:

40xNA075_celulas1_cubo_ex_Azul.tiff
40xNA075_celulas1_cubo_ex_UV.tiff
40xNA075_celulas1_cubo_ex_verde.tiff

- También se adquirió una imagen sin iluminar la muestra, que se utilizará para caracterizar el ruido de oscuridad del detector que luego será descontado de las imágenes adquiridas.

ruido_oscuridad_cámara_CCD.tiff

- Además se adquirió una imagen de transmisión de una grilla de calibración (mínima división 10 μ m), para determinar el tamaño del píxel de las imágenes obtenidas empleando el objetivo 40X NA0.75 del microscopio.

40xNA075_Grilla_calibracion.tiff

Todas las imágenes fueron adquiridas empleando el mismo objetivo 40X NA0.75 y la misma configuración de adquisición de la cámara CCD.

Pasos para procesar las imágenes

El procesamiento y análisis de las imágenes se efectuará en la plataforma abierta y gratuita FIJI (*Fiji Is Just ImageJ*).

Paso previo

Determinar la escala espacial de las imágenes, empleando la imagen de la grilla patrón 40xNA075_Grilla_calibracion.tiff y conociendo que la mínima división de la grilla de calibración es 10 μ m.

Para más detalles de este paso ver PARTE A – del protocolo de procesamiento de imágenes

1. Abrir imagen formato tiff con el programa FIJI. Se puede arrastrar directamente el archivo tiff a la ventana del FIJI o abrir con el menú: **File – Open image .**

40xNA075_celulas1_cubo_ex_Azul.tiff
40xNA075_celulas1_cubo_ex_UV.tiff
40xNA075_celulas1_cubo_ex_verde.tiff
ruido_oscuridad_cámara_CCD

2. Definir la escala espacial de las imágenes

Se necesita saber el tamaño del píxel! (o alguna otra referencia)
Ir a **Analyze - Set scale**, y especificar

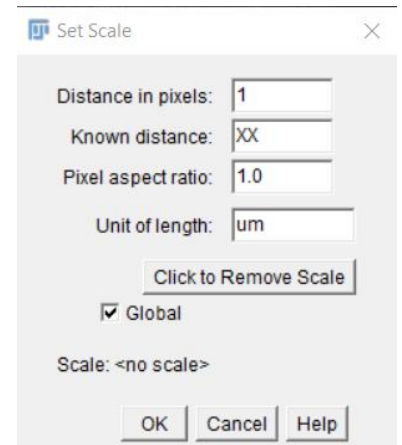
Distance in pixels: 1 (o distancia conocida en pixeles)

Known distance: el tamaño del píxel (o distancia conocida en la escala de unidad elegida)

Pixel aspect ratio: 1

Unit of length: (la unidad en que tienen el tamaño del píxel, m, cm, mm, nm etc... μm se anota como um)

Como todas las imágenes abiertas tienen la misma escala, se puede definir a la escala como **Global**, de esta manera se toma la escala establecida como la misma para todas las imágenes.

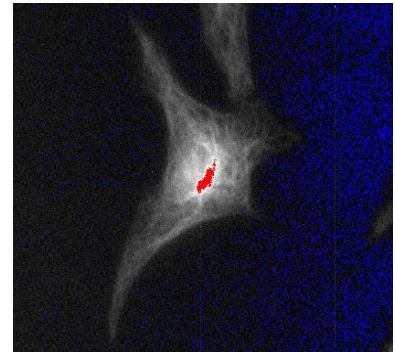


3. Ajustar parámetros de la imagen

Cambiar escala de colores: **Image - LookingTable—Red o HiLo o green** (por ej. Red pone escala de rojos)

Una escala MUY recomendable para usar es la: **HiLo** porque indica en azul los píxeles de la imagen que no tienen señal (es decir: nivel 0) y en rojo los píxeles que saturan (que tienen el nivel máximo de cada escala, si es de 8bit satura con nivel 255)

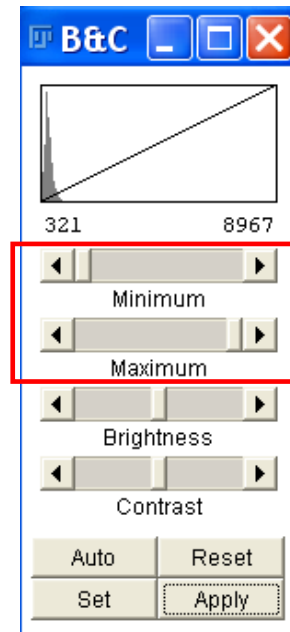
Escala HiLo



Cambiar rango de escala: **Image - Adjust - Brightness/Contrast**

Cambiar los valores mínimos y máximos. **PARA DISCUTIR:**

¿con qué criterios se eligen los valores máximo y mínimo?

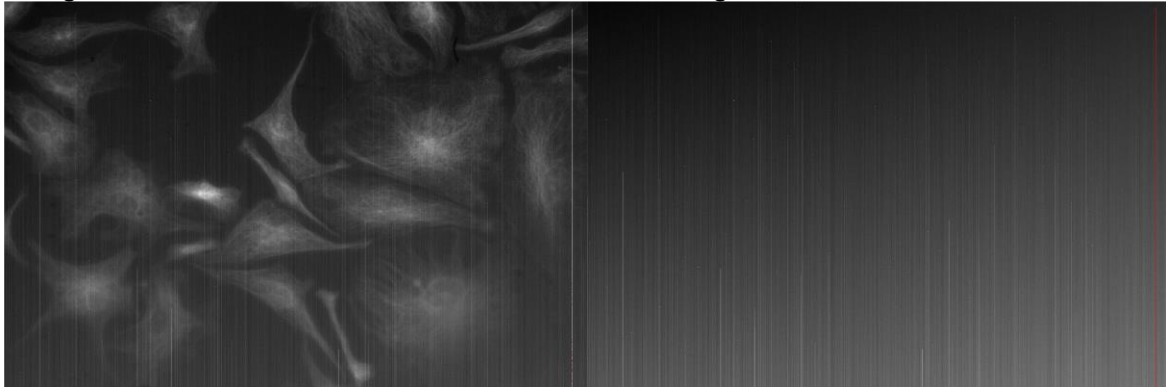


4. Restar la imagen de ruido de la cámara a la imagen obtenida con cada cubo

Para este paso tienen abrir dos imágenes: la imagen obtenida con un cubo y la imagen de ruido de la cámara CCD. Por ejemplo, tienen las imágenes:

Imagen cubo excitación en azul

imagen ruido de la cámara CCD



Una vez abiertas ambas imágenes: **PASAR IMÁGENES A 32bit - IMPORTANTE!!!**

Convertir las imágenes a 32bit: Image – Type –32bit

La escala **32bit o double** posibilita trabajar con números decimales y negativos (números reales).

8bit tiene una escala de grises de 256 niveles, todos enteros entre (0-255)

12bit tiene una escala de grises de 4096 niveles, todos enteros entre (0-4095)

16bit tiene una escala de grises de 65536 niveles, todos enteros entre (0-65535)

Restar las dos imágenes píxel a píxel:

Process – Image Expression Parser abre ventana en donde debo cargar las imágenes con las cuales quiero operar. Se nombran con letras: A, B etc. Esta ventana permite realizar muchas operaciones con múltiples imágenes al mismo tiempo. Muy útil!!

Si A= imagen cubo y B= imagen ruido cámara entonces calculo A-B

Escribir formula

Elegir imagen

Hacer click para agregar imágenes (letras)

Una vez escrita la formula hacer click aca

Enter an expression using canonical mathematical functions, and capital single letters as variable specifying the chosen image. ImgLib algorithms are also supported.

Examples:

- 2^A
- $A^*(B+30)$
- $\sqrt{A^2+B^2} \cos(C)$
- $A > B$
- $\text{gauss}(A, 0.8)$

Supported ImgLib algorithms:

Description	Syntax
Gaussian convolution	<code>gauss(img, sigma)</code>
Floyd-Steinberg dithering	<code>dither(img)</code>
Image normalization (sum to 1)	<code>normalize(img)</code>

Supported functions:

Description	Syntax
Euler constant	<code>e</code>
π	<code>pi</code>

Quit Parse

Esta función genera una nueva ventana con la imagen de A-B que se puede guardar como un tiff

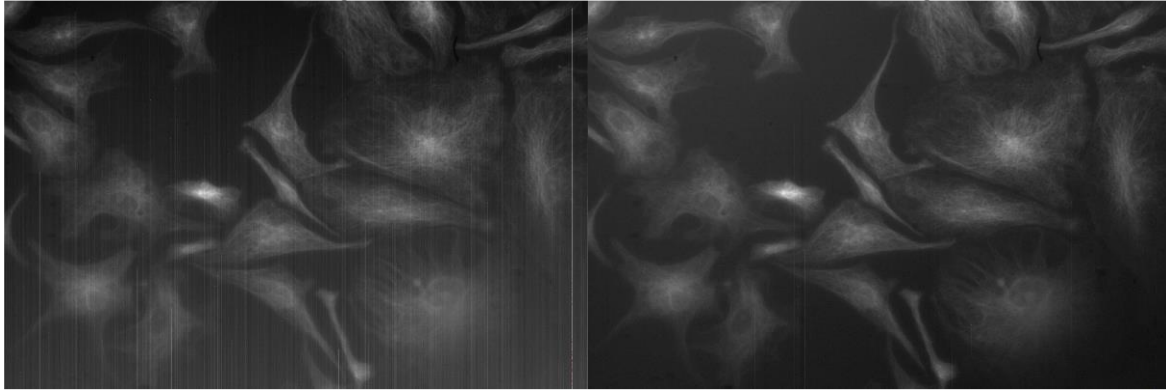
DESPUES DE REALIZAR ESTA OPERACIÓN HAY QUE VOLVER A AJUSTAR LOS NIVELES DE BRILLO Y CONTRASTE!!!

Image – Adjust – Brightness/Contrast

5. Guardar la imagen obtenida en el paso anterior. **File- Save as - tiff**

ANTES de restarle la imagen de ruido

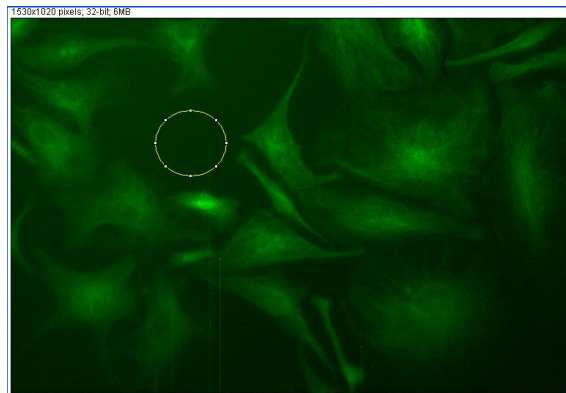
LUEGO de restarle la imagen ruido!!



6. Calcular la señal de fondo de cada una de las imágenes

Elegir una región del fondo de la imagen obtenida usando un cubo y dibujar un rectángulo (u otra figura) en una región en donde **NO** haya célula. Con **M (apretar la M del teclado)** aparece la información de la región, como por ej. el área, el promedio de la intensidad, la std, el max y el min. Si se quieren agregar más parámetros ir en la misma ventana a **Resultados** y clicar los resultados que se quieren mostrar.

Elijo una región donde NO haya células y calculo el valor medio de la intensidad en esa región



Anotar el valor de la intensidad media (ese es el nivel de intensidad de fondo que tiene esa imagen).

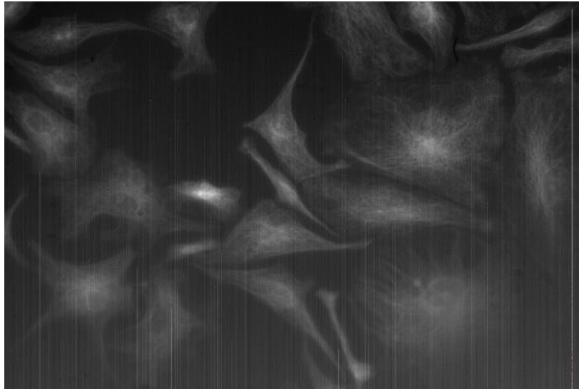
7. Restar el fondo a cada imagen

Para restar el valor de fondo de la imagen, clickear la imagen a la cual se le quiere sustraer el fondo. Luego ir a **Process – Math – Subtract** y escribir el valor de la intensidad promedio hallado en el paso 5.

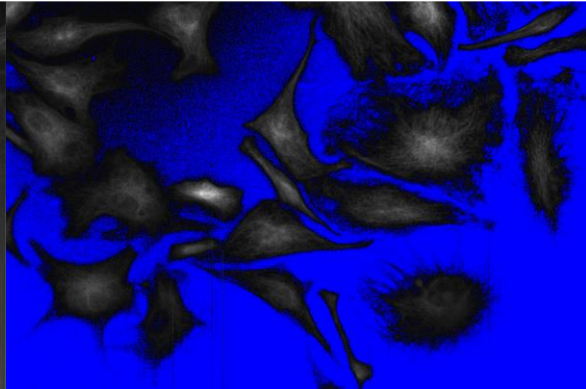
DESPUES DE REALIZAR ESTA OPERACIÓN HAY QUE VOLVER A AJUSTAR LOS NIVELES DE BRILLO Y CONTRASTE!!! **Image – Adjust – Brightness/Contrast**

IMPORTANTE- PARA DISCUTIR: ¿con qué criterios se eligen los valores máximo y mínimo de la escala de colores?

ANTES de restar el fondo



DESPUES de restar el fondo

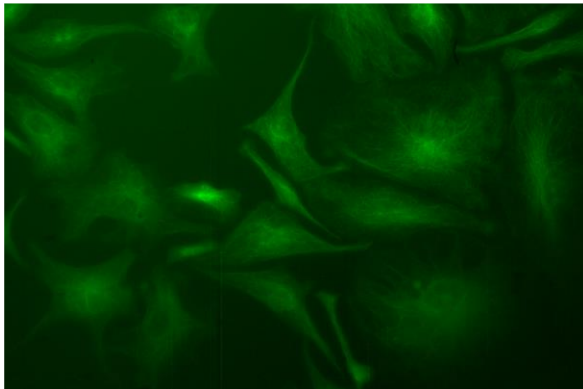


Queda azul el fondo de la imagen de la derecha porque es prácticamente 0

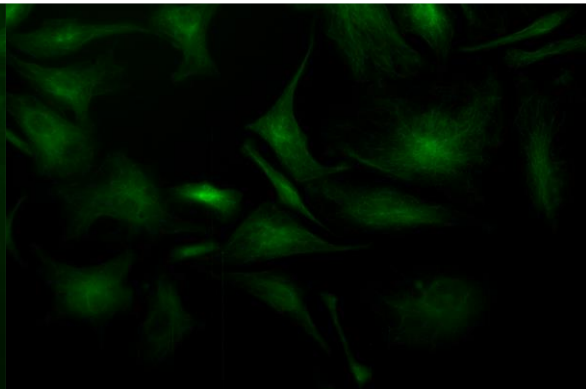
Si paso a escala de verdes en lugar de HiLo

Image – LookingTable— green

ANTES de restar el fondo



DESPUES de restar el fondo



8. Colocar la barra de escala espacial en la imagen - **IMPORTANTE!!!!**

Definir la escala antes de poner la barra de escala!

Analyze – Tools – Scale Bar

9. Guardar la imagen obtenida en el paso anterior. **File- Save as - tiff**

10. Repetir los pasos 1 a 9 para las imágenes obtenidas con cada cubo.

COMBINAR LAS IMÁGENES OBTINIDAS CON CADA CUBO DE FLUORESCENCIA

1. Abrir las 3 imágenes correspondientes a cada uno de los cubos usados

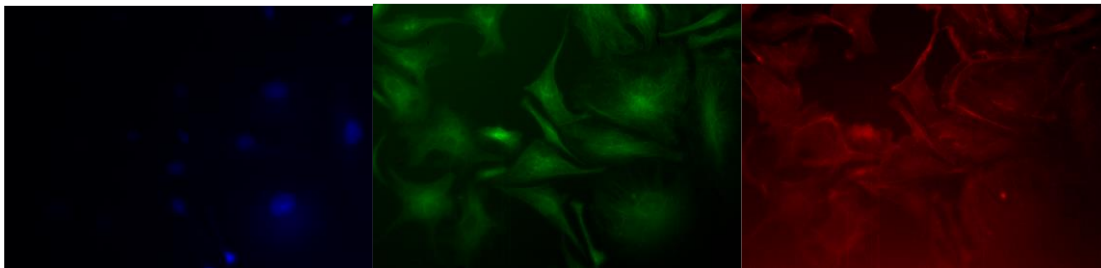
2. A cada imagen ajustar el brillo

File – Open image – Adjust – Brightness/Contrast

3. A cada imagen asignarle el color correspondiente (rojo , verde o azul)

Image – LookingTable—Red (por ej.)

Van a tener 3 imágenes abiertas:

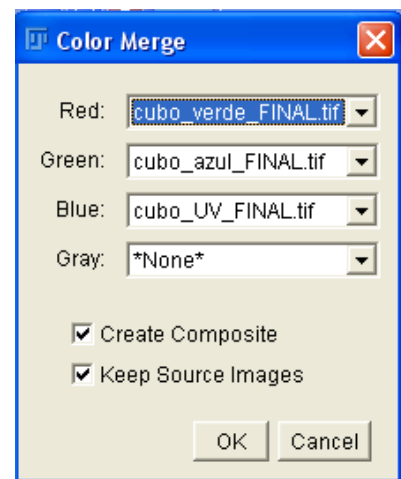
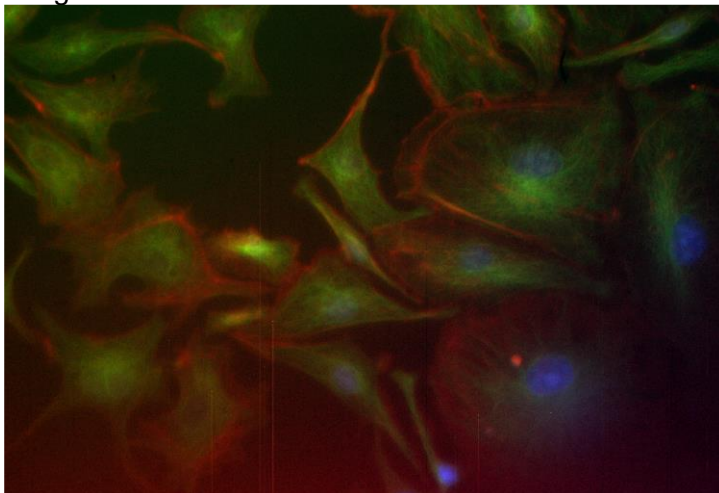


4. Combinar imágenes

Image – Color – Merge channels

Abre una ventana como la que está a la derecha.
Indicar las imágenes que van en rojo – verde- azul

Imagen combinada



5. Colocar la barra de escala espacial en la imagen - **IMPORTANTE!!!!**

6. Imagen para procesador de texto o presentación - **IMPORTANTE!!!!**

Si se quiere incorporar una imagen en un texto o presentación (por ej. en un archivo Word o powerpoint) conviene convertirla a RGB.

Image – Type – RGB color

APENDICE

Algunas funciones del FIJI que podrían ser útiles

1) Elegir la misma región en varias imágenes – Manejo de ROI

Elegir una región del background en una de las imágenes y dibujar un rectángulo (u otra figura). Con **M** aparece la información de la región, como por ej. el área, el promedio de la intensidad, la std, el max y el min. Si se quieren agregar más parámetros ir en la misma ventana a **Resultados** y clicar los resultados que se quieren mostrar.

Para colocar la misma región en otra imagen hay que copiar la región:

Análisis – Tools – Roi Manager y se abre una ventana clicar **Add** esto hace que se copie la región y queda con un código numérico. Clicar en la imagen y hacer doble clic sobre el código numérico (entonces aparece la misma región en la imagen post) apretar **M** y fijarse en el promedio.

2) Recortar una imagen

Si queremos **recortar** una parte de la imagen, seleccionar alguna forma (rectángulo, círculo etc.) y ubicarla dentro de la imagen. **Image - Crop**.

3) Definir la escala

Se necesita saber el tamaño del píxel! (o alguna otra referencia)

Ir a **Analyze - Set scale**, y poner

Distance in pixels: 1

Knowndistance: el tamaño del pixel

Pixel aspect ratio: 1

Unit of length: nm (o la unidad en que tienen el tamaño del pixel)

4) Poner barra de escala espacial - **IMPORTANTE!!!!**

Definir la escala antes de poner la barra de escala!

Analyze – Tools – Scale Bar

5) Poner el código de la escala de colores empleada

Si se desea se puede colocar el código de colores empleado: **Analyze – Tools –Calibration Bar**

6) Realizar un perfil de intensidades

Trazar una recta (seleccionamos la ROI para rectas). Vamos a **Analyze - Plot profile**.

Nota: si se selecciona un **rectángulo en lugar de una recta**, realizará el perfil de intensidad a lo largo del lado horizontal del rectángulo promediando la intensidad de los píxeles en el sentido vertical

7) Imagen para procesador de texto o presentación

IMPORTANTE!!!!

Si se quiere incorporar una imagen en un texto o presentación (por ej. en un archivo Word o powerpoint) conviene convertirla a RGB.

Image – Type – RGB color

Lorena Sigaut, lorena@df.uba.ar