


MEJORAMIENTO ADAPTATIVO DE IMÁGENES PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

ADAPTIVE OPTIMIZATION OF IMAGES FOR FLUORESCENCE MICROSCOPY

Autor:

-  **Carlos Javier Perucho Lozano**⁽¹⁾
Arturo Plata Gómez⁽²⁾
 **Edwin Fernando Mendoza Carreño**⁽³⁾

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

Cómo citar este artículo:

Perucho L, CJ; Plata G, A; Mendoza Carreño, EF. Mejoramiento adaptativo de imágenes para microscopía de fluorescencia. *Innovaciencia facultad ciencias exactas fis. naturales*. 2016; 4(1): 19-24

Fecha de recepción:

Artículo recibido el 05 octubre de 2016 y aceptado para publicación el 21 de noviembre de 2016.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.15649/2346075X.399>

Palabras clave

Fluorescencia, Microscopía de campo claro, Tratamiento digital de imágenes.

Keywords

Fluorescence, Bright field Microscopy, Digital images treatment.

RESUMEN

Introducción: El microscopio de campo claro es una técnica accesible a la mayoría de laboratorios biológicos, así como su adaptación a la fluorescencia. Debido a una disminución en la profundidad de campo, se encuentran presentes varios planos de focalización en los cuales se puede confirmar que la muestra posee un volumen apreciable. **Materiales y métodos:** Haciendo uso del microscopio de campo claro, junto a sustancias fluorescentes que preservan las características naturales del espécimen, se hace posible focalizar la muestra en diferentes partes de la misma, a una distancia medible dada por el enfoque fino (0.1 mm por rotación). **Resultados y discusión:** Los puntos que son enfocados se relacionan con el desplazamiento del objeto (o del objetivo), adquiriendo planos focalizados y localizados espacialmente, generando superficies de alto contraste. **Conclusiones:** Se reconocen las dimensiones de la muestra; combinándolo con la optimización, se obtienen datos cualitativos de la misma y el mejoramiento en las imágenes obtenidas por la microscopía de campo claro.

ABSTRACT

Introduction: The light field microscope is a technique accessible to majority of biological laboratories, as well as their adaptation to fluorescence. Due to a decrease in depth of field, several focalization planes are present in which it can be confirmed that the sample has an appreciable volume. **Materials and methods:** Using the light field microscope, with fluorescent substances that preserve the natural characteristics of the specimen, make it possible to focus the sample in different parts of the specimen at a measurable distance given by the fine focus (0.1 mm per rotation). **Results and discussion:** Points that are focused are related to the displacement of the object (or the objective), acquiring focused and spatially localized planes, generating high contrast surfaces. **Conclusions:** The dimensions of the sample are recognized; combining it with the optimization, obtains qualitative data of the same and the improvement in the images obtained by the microscopy of clear field.

¹ Grupo de Óptica y Tratamiento de Señales, Universidad Industrial de Santander, A.A:678, Bucaramanga. Colombia. Correo electrónico: perucho_lozano@yahoo.es

² Físico. PhD de la Université de Franche Comte en Ciencias del Ingeniero (óptica). Profesor Titular. Universidad Industrial de Santander. Grupo de Óptica y Tratamiento de Señales. Bucaramanga. Colombia. Correo electrónico: aplatag@yahoo.com

³ Físico, Magister en Física. Docente asociado. Universidad de Santander. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Grupo Ciencias Básicas y Aplicadas para la Sostenibilidad CIBAS. Bucaramanga. Colombia. Correo electrónico: efm2000@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El propósito de este trabajo es obtener una secuencia de imágenes al recorrer el espécimen a lo largo del eje axial del microscopio ^(1,2,3); Encontrando detalles en la muestra biológica gracias a las moléculas fluorescentes que se adhirieron a secciones específicas de ésta, haciéndose visibles con respecto a otros segmentos que conforman el mismo ^(4,5,6).

Así, se da una apreciación concreta de la muestra con adaptación digital en la secuencia de imágenes adquiridas del espécimen.

Realizando un barrido espacial vertical, es percibida la máxima intensidad luminosa en ciertas regiones, mientras que en otras aparenta desvanecimiento. Cada imagen por si misma tiene información parcial de la muestra biológica, que irá, desde una ubicación espacial hasta máxima intensidad de la sustancia fluorescente. Tal como se ilustra en la figura 1, al recorrer toda la muestra se obtiene información de la misma haciendo uso de tratamiento digital de imágenes.

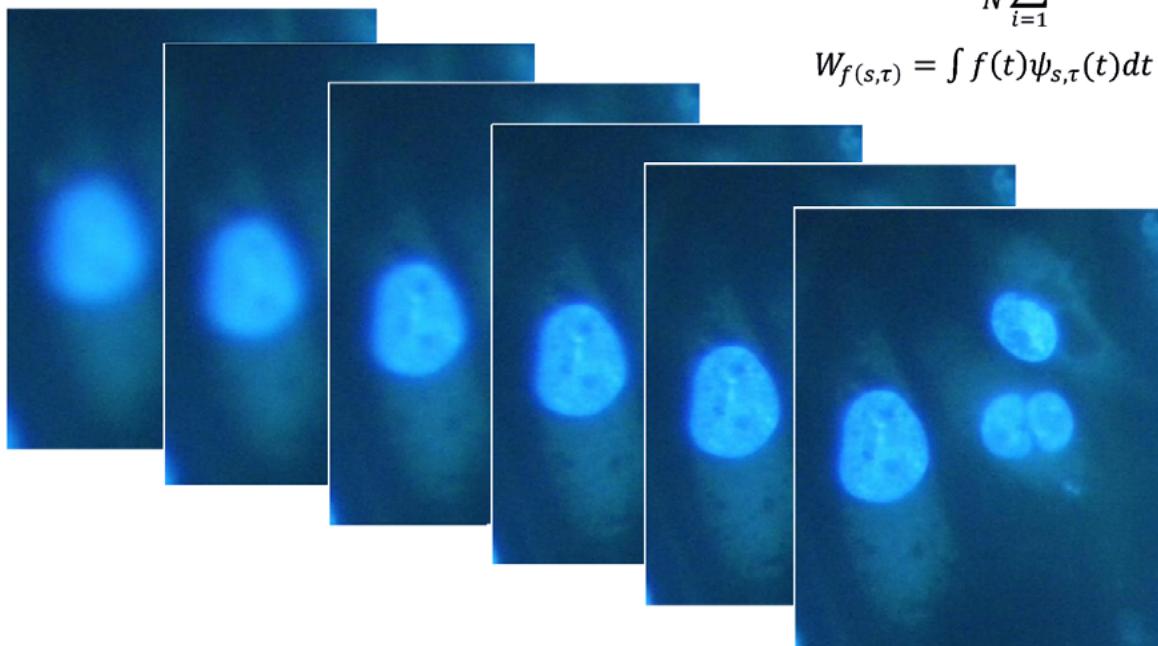


Figura 1. Stack de imágenes obtenidas a lo largo del eje axial del microscopio, perteneciente a una muestra que contiene células sanguíneas. Dimensiones 94 μm x 112 μm . Fuente: Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP). Archivo fotográfico Personal

MATERIALES Y MÉTODOS

El montaje está formado por un microscopio de campo claro adaptado a fluorescencia: Nikon Eclipse ME-400, que incluye una lámpara de mercurio, un cubo de filtros UV-2A y un objetivo de 40x. La adquisición se realizó con una cámara Nikon Coolpix P6000.

La muestra pertenece a células THP1 tenidas con fluorocromo Hoechst 33342, obteniendo un stack de imágenes, para las cuales, cada imagen fue tomada a paso axial de un micrómetro.

Pensando en mejorar la imagen de la muestra, el ruido aditivo presente en la adquisición dada por el sensor, puede ser reducido al hacer uso de los métodos como imagen promediada o wavelet ^(7,8,9,10). Al realizar el recorrido espacial sobre toda la muestra, la iluminación percibida puede provenir de regiones cercanas no enfocadas. Por lo tanto, en las regiones de las imágenes donde no está presente la sustancia de fluorescencia, puede presentarse iluminación no relevante para la adquisición.

$$F_{fin.}(x, y) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N f_i(x, y) \quad (1)$$

$$W_{f(s,\tau)} = \int f(t) \psi_{s,\tau}(t) dt \quad (2)$$

Otro método para estudiar es el de máxima intensidad para una imagen bidimensional, a partir de un stack de imágenes con diferentes puntos de focalización, se obtiene una única imagen, la cual contendrá todos los puntos de máxima claridad y da una apreciación global del volumen del espécimen².

El proceso en el cual tiene lugar la luz y un material en particular como es en este caso una muestra biológica; posee un recorrido espacial (r) (a lo largo del plano imagen) a través de esta muestra, que tiene un área determinada. Su intensidad emergente (I), se relacionará con la intensidad incidente (I_0) por medio de la expresión de Beer–Lambert⁴: Método justificable para una imagen en la que se desea disminuir la iluminación de fondo presente en la muestra.

$$F(r, I_{fin.}) = I_0 * e^{-k(r, I_{ini.})} \quad (3)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los métodos dados por las ecuaciones (1) y (2), se puede realizar una comparación entre los resultados de trabajar con múltiples imágenes, con una sola imagen trabajada con wavelet; como se puede apreciar en la figura 2.

Una característica para resaltar es que la imagen promediada actúa sobre un conjunto de imágenes adquiridas bajo una misma posición axial; presentando un mejoramiento en calidad aunque el tiempo del proceso se puede incrementar. Por otro lado, el método de wavelet hace uso de una sola imagen y el tiempo en procesarla será menor.

Al tener un stack de imágenes para el cual se desea obtener una sola imagen representativa del espécimen, se puede hacer uso del método de profundidad de campo extendido, y presentar una imagen

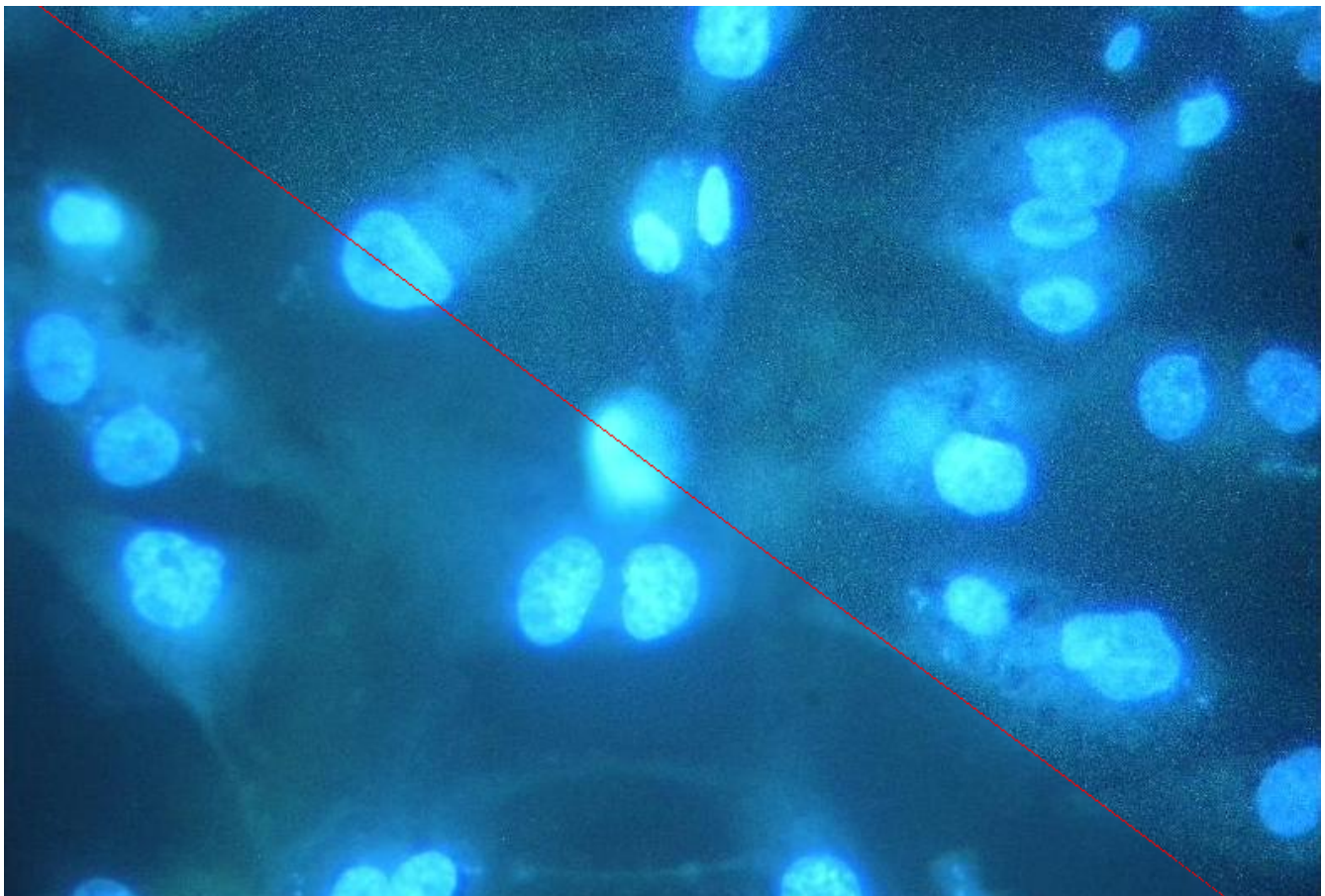
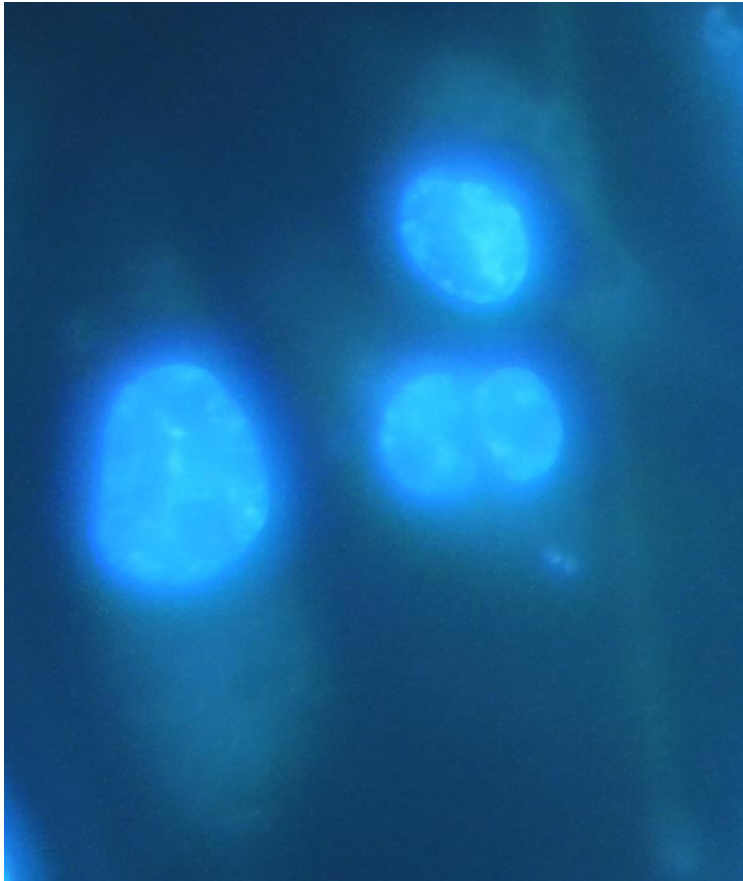


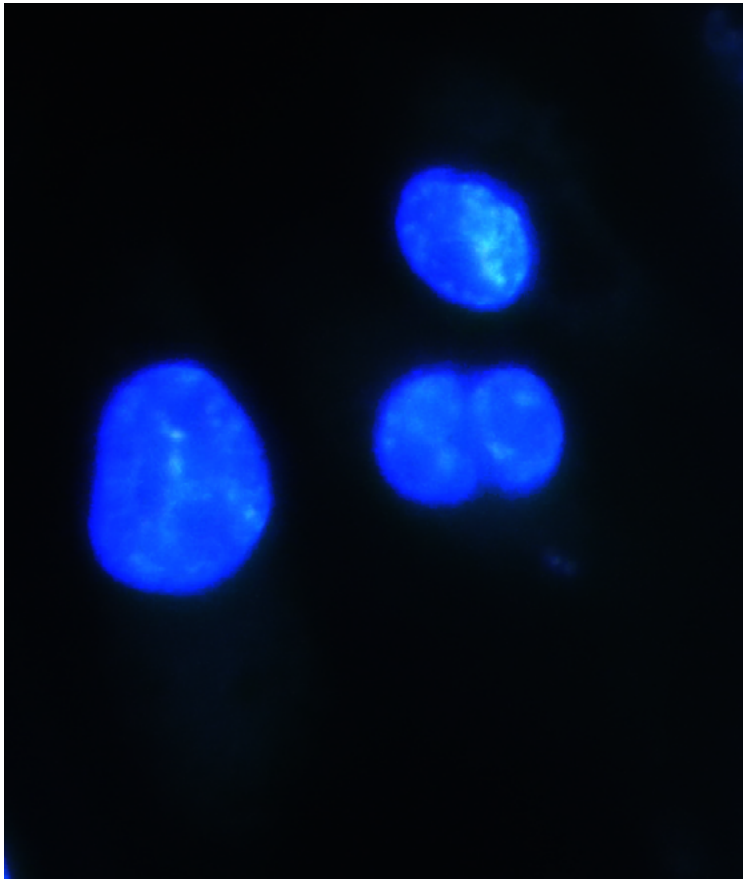
Figura 2. Diferencia presentada en una imagen del espécimen para el cual la imagen con ruido de Poisson (superior) es reducida al aplicar el método de imagen promediada (inferior). Fuente: CINTROP. Archivo fotográfico personal.



bidimensional con características de todo el espécimen². Esto mejora notablemente la imagen con respecto a solo tomar una imagen individual.

En la figura 3 se puede notar que el núcleo representa la adhesión de la sustancia fluorescente, por ello, haciendo uso del método de Beer-Lambert se obtendría la figura 4, resaltando las regiones en la muestra de mayor interés. El contraste juega un papel importante en la descripción del contorno presente en la fluorescencia.

Figura 3. Profundidad de campo extendido para una muestra de THP1, la imagen resultante es una imagen de máxima intensidad bidimensional.



Además, la figura 5 ilustra la distribución de intensidad con un histograma de las figuras anteriores; nótese como el contraste se hace evidente.

Al conocer las posiciones axiales en la adquisición del stack de imágenes, la superficie de la muestra biológica puede ser ilustrada ^(2,8). Se tendría una imagen en dimensiones reales totalmente medible en los tres ejes coordenados.

Figura 4. Representación de la imagen de máxima intensidad procesada con la ecuación de Beer-Lambert.

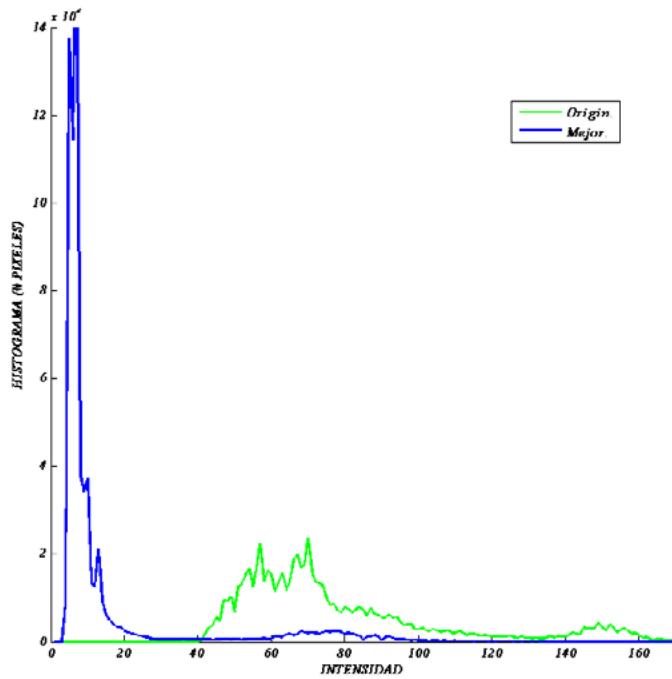


Figura 5. Histograma de las imágenes de las figuras 3 y 4. Se muestra como ha aumentado el contraste para la imagen de intensidad.

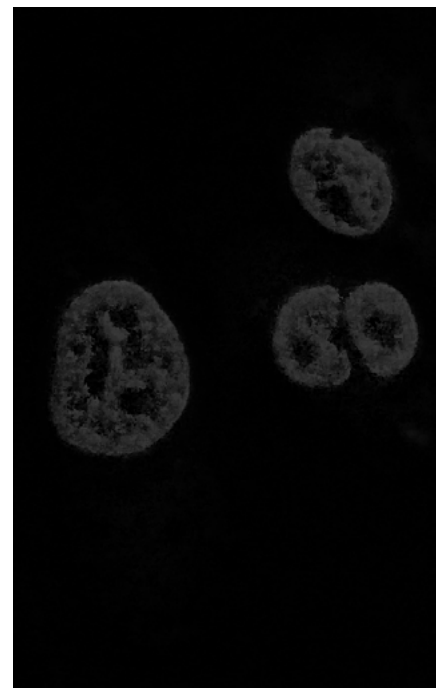


Figura 6. Imagen del estado de superficie de la célula, dimensiones 94 μm x 112 μm.

Al obtener información tridimensional de la muestra, podremos caracterizar tanto su topografía como su textura². Resultando en una imagen sintética a partir de un conjunto de imágenes en el que se pueden cuantificar en igualdad de condiciones, todos los componentes de la muestra.

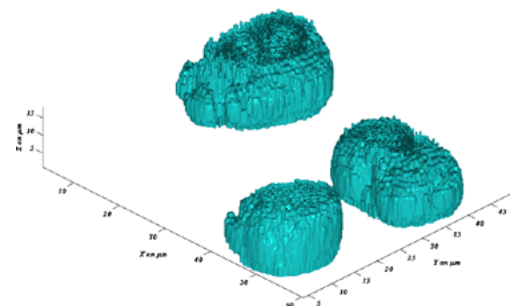
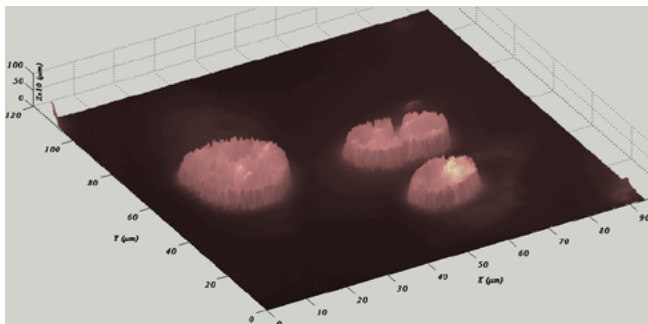


Figura 7-8. Representación en tres dimensiones de la imagen de textura y de la imagen de tomografía respectivamente.

CONCLUSIONES

- Con la máxima intensidad observada en una región enfocada de la muestra, puede obtenerse una sola imagen como una representación en dos dimensiones de todo el volumen de la misma.
- Realizando el proceso adaptativo con métodos como wavelet y análisis del decaimiento de luminosidad se logran imágenes con aumento de contraste y reducción de la borrosidad, evitando los detalles que no ofrezcan información apreciable del objeto.
- Se conservan detalles contrastados en la imagen, detalles complicados de observar simplemente con el uso del microscopio de campo claro para un solo plano de la imagen.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander por el apoyo dado en la presentación de este trabajo y al Grupo de Óptica y Tratamiento de Señales por todas las orientaciones brindadas durante el proceso educativo.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores expresan que no existen conflictos de intereses y aceptan todo el contenido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murphy D B. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. New York: Wiley-Liss Inc; 2001
2. Perucho C. Caracterización de Materiales por Reflectividad en Amplitud y Fase con Microscopía interferencial [Tesis]. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias; 2007
3. Davidson MW, Abramowitz M. Optical microscopy. Florida: National High Magnetic Field Laboratory. The Florida State University.
4. Kempen V. Image Restoration in Fluorescence Microscopy. Netherlands: Delft University Press; 1998.

5. Bamfield P. Chromic Phenomena - The Technological Applications of Colour Chemistry. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2001.
6. Taatjes DJ, Mossman BT. Cell Imaging Techniques-Methods and Protocols. New Jersey: Humana Press Inc; 2006.
7. Kouro S, Musalem R. Tutorial introductorio a la teoría de Wavelet. Chile: Universidad Técnica Federico Santa María; 2002
8. Singer W, Totzek M, Gross H. Handbook of Optical Systems - Physical Image Formation. 2 vols. Germany: Wiley-VCH; 2005.
9. Allan VJ. Protein Localization by Fluorescence Microscopy, New York: Oxford University Press; 2000.
10. Candela VF. Aplicaciones de la Transformada Wavelet - Eliminación de Ruido. 2008.
11. Casado JC, Serra-ricart M. Observaciones Astronómicas con Webcam y CCD. España: Instituto de Astrofísica de Canarias, Producciones Graficas.
12. Clarke AR, Eberhardt CN. Microscopy Techniques for Materials Science. Cambridge – England: Woodhead Publishing Limited; 2002.
13. Conn PM. Methods in Enzymology Vol.307 - Confocal Microscopy. Academic Press.
14. Corle TR, Kino GS. Confocal Scanning Optical microscopy and Related Imaging Systems, California: Academic press; 1996.
15. Darsynkiewicz Z; Cytometry - New Developments. 4a ed. London: ELSEVIER Academic press; 2004.
16. Hinchcliffe EH, Sluder G. Working with Classic Video. In: Methods in Cell Biology 81 vol. New York: Elsevier Inc; 2007
17. Gagalowicz A, Philips W. Computer Vision/Computer Graphics Collaboration Techniques. Lecture Notes in computer Science 4418. Germany: Ed. Springer; 2007.
18. Kinoshita RK. Fluorescence Microscopy – Optimize your System With the Right Filter Set. Laurin Publishing; 2002
19. Hecht E. Óptica. 3a ed. Madrid: Addison Wesley Iberoamericana; 2000.
20. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3a ed. Singapore: Ed. Springer; 2006.