

Quantitative Methods for Bioimage Analysis Tutorial

Histograma y operaciones píxeles

Ejercicio 1 (Medidas sobre ROIs)

- (a) Abrir embryos.jpg. Usar la barra de escala para asignar escala a la imagen con [Analyze > Set Scale]
- (b) Definir regiones de interés en los embriones y calcular las siguientes medidas: área, perímetro, nivel medio de intensidad, y otras de su interés.

Ejercicio 2 (Histogramas y operaciones con píxeles)

- (a) Abrir la imagen CT.
 - 1. Generar su histograma. [Analyze > Histogram].
 - 2. En la ventana de ImageJ/Fiji, seleccionar el icono de Straight con click-derecho y acceder a Freehand_Line. Dibujar un recorrido aleatorio sobre la imagen y visualizar el Perfil de Intensidad [Analyze > Plot_Profile]. ¿Cuanto mide el largo de la curva trazada?
 - 3. Explorar las opciones del comando [Image > Adjust > Brightness/Contrast...].
 - 4. ¿Se está modificando los valores de pixel al variar los parámetros del comando anterior? ¿Qué se está modificando?
 - 5. ¿Cuándo se cambian efectivamente los valores de pixel?
- (b) Generar y comparar los histogramas [Analyze > Histogram] de la imagen de muestra Cell-Colony y Cell_Colony2.tif del directorio /home/pimbio/imagenes.
- (c) Se quiere saber si dos imágenes son idénticas. ¿Comparar sus histogramas es un método confiable?
- (d) Abrir la imagen HeLa Cells ¿Que tipo de pixel contiene?
 - 1. Duplicar el stack dos veces.
 - 2. Llevar el primer duplicado a 8 bits. [Image > Type]
 - 3. Deshabilitar la casilla en [Edit > Options > Conversions > Scale_when_converting], llevar el segundo duplicado a 8 bits y volver a habilitar la casilla.
 - 4. Visualizar el perfil de intensidad a través de una diagonal en la imagen original y sus duplicados. ¿Qué se observa?
- (e) ¿Cuántos niveles de gris pueden existir en una imagen de 16 bits? ¿Cuántos en una imagen de 8 bits?
- (f) La profundidad de bit de una imagen es probablemente algún múltiplo de 8, pero la profundidad de bit de un detector (por ejemplo un sensor CCD) no necesariamente cumple esto. ¿Cuál es el máximo valor de una imagen de 16 bits que fue adquirida con una cámara de 12 bits de salida? ¿Cuál es el máximo valor en una imagen de 8 bits si se adquirió con una cámara de 14 bits de salida?

Ejercicio 3 (Umbralización)

- (a) Buscar un umbral satisfactorio manualmente para la imagen Cell_Colony.jpg. [Image > Adjust > Threshold]
- (b) Usar la herramienta [Image > Adjust > Auto Threshold] para seleccionar el umbral automático que mejor se ajusta.

Ejercicio 4 (LUTs)

- (a) Abrir la imagen hela-cells-mix.tif; se presenta con LUTs que no son las habitualmente utilizadas.
- (b) Corregir este problema y generar una nueva imagen compuesta con los lisosomas en rojo, las mitocondrias en verde y los núcleos en azul. Sugerencia: explorar [Image > Color > Channels Tool].

Ejercicio 5 (Preguntas y ejercicios)

- (a) Abrir la imagen HeLa_Cells.
- (b) Medir el área de cada uno de los núcleos.
Sugerencia: Umbralizar el canal de núcleos y utilizar alguna herramienta adecuada de selección para cuantificar las áreas.
- (c) Cuantificar el área común de los lisosomas y mitocondrias.
Sugerencia: Seguir un procedimiento similar al caso anterior para definir las regiones con fluorescencia relevante y utilizar operaciones entre imágenes con [Process > Image Calculator].

Quantitative Methods for Bioimage Analysis Tutorial

Filtrado lineal y no lineal

Ejercicio 1 (Filtro de media)

Disponible en [Process > Filters > Mean...].

- (a) Abrir la imagen de ejemplo AuPbSn40
- (b) Probar el filtro de media con diferentes radios generando nuevas imágenes suavizadas
- (c) ¿Cómo se podría ver qué es lo que cambió en la imagen al suavizar?
- (d) ¿Cuál es el núcleo del filtro de media implementado en ImageJ/Fiji? ¿Cómo se podría averiguar?

Ejercicio 2 (Filtros lineales generales)

Disponibles en [Process > Filters > Convolve...].

- (a) Implementar un filtro de media de soporte 3×3 y aplicarlo a la imagen de ejemplo AuPbSn40 con y sin normalización.
- (b) ¿Qué hace la normalización? ¿Cómo se puede explicar el resultado? (Pista: ver el tipo de dato o profundidad de los píxeles de la imagen AuPbSn40)?
- (c) ¿Es posible implementar un filtro de media de soporte 2×2 en ImageJ/Fiji? ¿Por qué?
- (d) Implementar un filtro de Sobel horizontal y otro vertical.
- (e) Probar los filtros de Sobel sobre la imagen de ejemplo Straight Lines.
- (f) Probar los filtros de Sobel sobre AuPbSn40 y sus versiones suavizadas.
- (g) Graficar un perfil de una fila de la imagen original y de las imágenes suavizadas [Analyze > Plot Profile]. Relacionar con los valores de salida de Sobel.
- (h) ¿Qué resalta un filtro de Sobel? ¿Cómo afecta el suavizado previo?
- (i) Implementar un filtro con un núcleo $[1\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0]$ (un uno y veinte ceros).
- (j) ¿Qué hace este filtro? ¿Podemos usar este filtro para averiguar qué estrategia de relleno (padding) usa ImageJ/Fiji?

Ejercicio 3 (Filtros gaussianos)

Disponible en [Process > Filters > Gaussian Blur...].

- (a) Sobre la imagen de ejemplo Cell_Colony evaluar filtros gaussianos con diferentes sigmas (1, 2, 3, 4, 5, 6 por ejemplo).

- (b) ¿Cómo es la relación entre el tamaño de las células en la imagen original, el sigma del filtro aplicado y las células que quedan visibles a la salida?
- (c) (Opcional) El proceso de restar dos de estas salidas filtradas con diferente sigma se llama filtro DoG (Difference of Gaussians). Probar con las imágenes resultado del filtrado de Cell _ Colony.
- (d) ¿Qué pasa si restamos dos de las imágenes resultado de filtrar con distinto sigma? ¿Para qué podría servir el filtro DoG?

***Ejercicio 4** (Filtro LoG - Laplacian of Gaussian)

Disponible en [Plugins > FeatureJ > FeatureJ Laplacian.]

- (a) Para instalar FeatureJ se debe agregar el repositorio imageScience. [Help > Update > Manage Update Sites], marcar ImageScience, presionar Apply and Close, luego Apply Changes y reiniciar ImageJ/Fiji.
- (b) Sobre la imagen de ejemplo Cell _ Colony experimentar el filtrado LoG para distintos parámetros.
- (c) ¿Para qué se puede usar el filtrado LoG? ¿Qué hace la opción Detect zero-crossings?

Ejercicio 5 (Filtrado no lineal)

Evaluremos los filtros de mínimo, máximo, y mediana disponibles en [Process > Filters] en una imagen a la que le agregaremos ruido impulsivo.

- (a) Abrir la imagen, por ejemplo Fluorescent Cells.
- (b) Agregar ruido Sal y pimienta [Process > Noise > Salt and Pepper].
- (c) Evaluar el resultado de filtrar con filtro de mínimo, máximo y mediana.
- (d) Evaluar el resultado con:
 - [Process > Noise > Despeckle]
 - [Process > Noise > Remove Outliers...]

Quantitative Methods for Bioimage Analysis Tutorial

Análisis en frecuencia

Ejercicio 1 (Período - Frecuencia.)

Crearemos una imagen sinusoidal.

- (a) Crear una nueva imagen de 512×512 píxeles de 32 bits. [File > New > Image].
- (b) Llenar la imagen con una senoide creando un macro [Process > Math > Macro...] con el siguiente código ¹

```
A = 100; T = 64; C = 128; v = C + A*sin(2*PI*x/T)
```

Veremos el período en píxeles de la senoide en la horizontal y en la vertical.

- (c) Trazar una línea.
- (d) Graficar el perfil de esa línea [Analyze > Plot profile].
- (e) Notar el período en píxeles en la horizontal y vertical (se puede hacer interactivo habilitando el modo Live en el gráfico del perfil).
- (f) ¿Qué parámetros de la senoide son A, C y T?

Veremos la Transformada de Fourier [Process > FFT > FFT].

- (g) Evaluar la ubicación de los principales picos en la Transformada (distancia al centro, orientación con respecto a la senoide).
- (h) Repetir lo anterior para las siguientes sinusoides:

```
A = 100; T = 32; C = 128; v = C + A*sin(2*PI*x/T)
```

```
A = 100; T = 64; C = 128; v = C + A*sin(2*PI*y/T)
```

```
A = 100; T = 64; C = 0; v = C + A*sin(2*PI*x/T)
```

```
A = 100; Tx = 64; Ty = 32; C = 128; v = C + A*sin(2*PI*(x/Tx + y/Ty))
```

- (i) ¿Cómo se relaciona la ubicación de los picos con los valores de A, C y T?

Ejercicio 2 (Filtrado en frecuencia (pasabajo, pasaalto).)

Transformada

- (a) Abrir una imagen (por ej. Lena).
- (b) Pasar a imagen de grises [Image > Type > 8bits].
- (c) Hallar su Transformada de Fourier.

¹Si copia y pega el texto del código proporcionado pueden quedar mal algunos caracteres, revisar antes de correr.

Filtrado pasabajos

Crearemos una máscara para dejar pasar sólo las bajas frecuencias.

- (d) Crear una nueva imagen de 512×512 negra.
- (e) Llenar el centro con círculo blanco (hacer a mano o correr el siguiente macro).

```
// borrar si existe un filtro previo
if (isOpen("Filtro_pasabajo")) {
    selectWindow("Filtro_pasabajo");
    run("Close");
}

// Crear el filtro
size = 512;
newImage("Filtro_pasabajo", "8-bit black", size, size, 1);
radius = 30;
makeOval(getWidth/2-radius, getHeight/2-radius, radius*2, radius*2);
setForegroundColor(255, 255, 255);
run("Fill");
run("Select None");
run("Gaussian Blur...", "radius="+0.9*radius);
```

- (f) Filtrar la imagen de entrada quedándose sólo con las bajas frecuencias [Process > FFT > Custom filter...] (usar el el filtro creado anteriormente).
- (g) Repetir pero creando el filtro sin el Gaussian Blur.

Filtrado pasaaltos

- (h) Crear una máscara para dejar pasar sólo las altas frecuencias.
- (i) Filtrar la imagen de entrada quedándose sólo con las altas frecuencias [Process > FFT > Custom filter...] (usar el el filtro creado en la parte anterior).

```
// borrar si existe un filtro previo
if (isOpen("Filtro_pasaalto")) {
    selectWindow("Filtro_pasaalto");
    run("Close");
}

// Crear el filtro
size = 512;
newImage("Filtro_pasaalto", "8-bit black", size, size, 1);
radius = 30;
setBackground(0, 0, 0);
setForegroundColor(255, 255, 255);
run("Select All");
run("Fill");
makeOval(getWidth/2-radius, getHeight/2-radius, radius*2, radius*2);
run("Clear");
run("Select None");
run("Gaussian Blur...", "radius="+0.9*radius);
```

Ejercicio 3 (Filtrado en frecuencia (pasabanda))

Similar al filtrado pasabajos y pasaaltos es posible hacer un filtrado dejando pasar solamente un rango de frecuencias con una máscara en forma de anillo.

- (a) Crear una máscara en forma de anillo para dejar pasar un rango de frecuencias. Probar distintos radios.
- (b) Filtrar la imagen Cell_Colony [Process > FFT > Custom filter...] (usar el el filtro creado en la parte anterior).
- (c) Probar el filtrado pasabanda implementado en ImageJ/Fiji sobre Cell_Colony y otras imágenes [Process > FFT > Bandpass Filter...].

Quantitative Methods for Bioimage Analysis Tutorial

Restauración de ruido y degradaciones

Ruido aditivo gaussiano

Ejercicio 1 (Análisis de ruido)

Instalar plugin SNR que permite hacer medidas de relación señal ruido.

- (a) Bajar el archivo SNR_.jar siguiendo este enlace.
- (b) Copiar en la carpeta Plugins de ImageJ/Fiji (o arrastrar a la barra de ImageJ/Fiji). Reiniciar ImageJ/Fiji.
- (c) Abrir la imagen de ejemplo Bridge.
- (d) Generar otras tres imágenes iguales a Bridge con nombres ruido 10, ruido 20 y ruido 30.
- (e) Agregar ruido gaussiano aditivo a las tres imágenes con desviación estándar 10, 20 y 30, respectivamente [Process > Noise > Add Specified Noise].
- (f) Graficar perfiles para la imagen original y para las imágenes con ruido para ver el cambio en la imagen al aumentar el ruido.
 - Trazar línea
 - [Analyze > Plot profile]
- (g) Calcular RMSE y PSNR para cada caso usando el plugin instalado (SNR).

Ejercicio 2 (Denoising: ruido aditivo)

Nos basaremos en las imágenes con ruido generadas en el ejercicio anterior.

Instalar el siguiente sitio para el plugin de Non Local Means: [Help > Update], esperar y elegir Manage Update Sites. Buscar Biomedgroup y activarlo. Elegir Apply and Close. Elegir Apply Changes.

- (a) Duplicar y renombrar adecuadamente.
- (b) Procesar con los siguientes métodos:
 - Suavizado mediante filtrado lineal [Process > Smooth]
 - ROF denoising [Process > Noise > ROF Denoising] (Ver Total Variation Denoising)
 - Non Local Means [Plugins > Non Local Means Denoising].
- (c) Para el método de Non Local Means probar la restauración con diferentes parámetros (Sigma y Smoothing Factor), también evaluar con la estimación automática de Sigma.
- (d) Cuantificar la mejora de relación señal a ruido luego del procesamiento volviendo a calcular RMSE y PSNR.

Ruido impulsivo sal y pimienta

Ejercicio 3 (Análisis de ruido)

- (a) Abrir la imagen de ejemplo Bridge
- (b) Generar copias de la imagen Bridge con nombres `syp_X`
- (c) Agregar ruido sal y pimienta en cantidad creciente a las imágenes `syp_X` [Process > Noise > Salt and Pepper] (repetir para mayor ruido).
- (d) Graficar perfiles para la imagen original y para las imágenes con ruido (trazar línea y analizar [Analyze > Plot profile])
- (e) Calcular RMSE y PSNR usando el plugin SNR.

Ejercicio 4 (Denoising: ruido impulsivo)

Nos basaremos en las imágenes con ruido sal y pimienta generadas en el ejercicio anterior.

- (a) Duplicar y renombrar adecuadamente.
- (b) Procesar con los siguientes métodos:
 - Suavizado mediante filtrado lineal [Process > Filters > Mean]
 - Suavizado mediante filtrado no lineal [Process > Filters > Median]
 - Eliminar anomalías [Process > Noise > Remove Outliers]
 - Despeckle [Process > Noise > Despeckle]
- (c) Cuantificar la mejora de relación señal a ruido luego del procesamiento volviendo a calcular RMSE y PSNR.

Quantitative Methods for Bioimage Analysis Tutorial

Segmentación

Ejercicio 1 (Binarizar)

- (a) Abrir las imágenes Macrofagos.png, Dot_Blots y Cell_Colony
- (b) Para las imágenes anteriores:
 - Separar las imágenes por color [Image > Color > Split Channels]
 - Ver el histograma de cada canal. Guardar cada canal como imágenes diferentes de 8 bits.
- (c) Binarizar las imágenes [Image > Adjust > Threshold]
- (d) Analizar el resultado con los diferentes métodos. Buscar el mejor umbral para cada una de las imágenes.
- (e) Superponer la imagen binarizada sobre la original mediante [Image > Overlay > Add Image]
- (f) Jugar con el % de opacidad del overlay.
- (g) ¿En todos los casos es posible encontrar un umbral global adecuado?

Ejercicio 2 (Analizar las partículas)

Para las imágenes binarizadas:

- (a) Seleccionar las medidas a realizar. [Analyze > Set Measurement]
- (b) Analizar. [Analyze > Analyze Particles...] (jugar con los parámetros de visualización).
- (c) Visualizar los resultados. [Analyze > Summarize]
- (d) Analice los resultados de las medidas realizadas sobre las partículas. Observe cómo varían las medidas cuando se varían los umbrales de binarización. ¿Cuáles medidas son más estables a variaciones del umbral?

Ejercicio 3 (Morfología Matemática)

- (a) Abrir parasitos.png y binarizarla con Otsu.
- (b) Convertirla en una máscara: [Process > Binary > Convert to Mask]
- (c) Erosionar: [Process > Binary > Erode]
- (d) ¿Qué pasa? ¿y si repetimos n veces qué pasa?
- (e) Volver a la imagen anterior y Dilatar: [Process > Binary > Dilate]
- (f) ¿Qué pasa? ¿y si repetimos n veces qué pasa?
- (g) Volver a la imagen anterior y Opening: [Process > Binary > Open]

- (h) ¿Qué pasa?¿y si repetimos n veces qué pasa?
- (i) Volver a la imagen anterior y Closing: [Process > Binary > Close]
- (j) ¿Qué pasa?¿y si repetimos n veces qué pasa?
- (k) Probar los procesos anteriores con otras imágenes binarizadas donde ustedes entiendan puede ser útil utilizar estos operadores.
- (l) Probar las funciones **Ultimate Point** y **Outline** con la imagen Dot_Blot.png

Ejercicio 4 (Sobel)

Es necesario instalar el plugin Image Edge del archivo image_edge.jar que se puede descargar desde este sitio.

- (a) Abrir la imagen Dot_Blot.png
- (b) Aplicar el detector de Sobel: [Process > Find Edge]
- (c) ¿por qué hay niveles de gris diferentes en distintos bordes? ¿Qué representan?
- (d) Aplicar el detector de Canny Deriche: [Plugins > Image Edge > Area filter]
- (e) Variar los parámetros del filtro de Canny. Observar los valores del resultado.
- (f) Aplicar umbrales con hysteresis: [Plugins > Image Edge > Hysteresis]
- (g) Aplicar el detector de Sobel y luego el filtrado por hysteresis. Jugar con los parámetros a partir de los que hay a la salida del detector de bordes.
- (h) ¿qué pasa con los dots más claritos?
- (i) Abrir la imagen Dot_Blot.png, aplicar [Plugins > Filters > Perona Malik Anisotropic Diffusion] y luego detectar bordes. Comparar con la detección de bordes sin difusión anisotrópica (ij-plugins/ijp-toolkit/Filters).
- (j) Probar con otras imágenes.

Ejercicio 5 (Regiones)

- (a) Abrir la imagen embryos.png, separar los canales y trabajar con el canal verde.png
- (b) Aplicar segmentador por regiones: [Plugins > Segmentation > Statistical Region Merging]
- (c) Jugar con los parámetros. ¿Qué diferencias observas entre utilizar detector de bordes y de regiones?

*Ejercicio 6 (Contornos Activos)

- (a) Abrir la imagen Dot_Blot.png
- (b) Marcar la región de origen, una región que se deformará hacia los bordes.
- (c) Aplicar [Plugins > Segmentation > Level Set]. Dejar los parámetros por defecto, salvo desmarcar fast marching y verificar que crece hacia adentro (Region expands to ...). Los parámetros son delicados.

Más información en: http://imagej.net/Level_Sets. Variar los parámetros y observar el resultado.

Quantitative Methods for Bioimage Analysis Tutorial

Macros

Ejercicio 1 (Uso de macros existentes)

- (a) Buscar la macro CellSegmentation.txt en la web de ImageJ/Fiji [Help > Macros. . .]
- (b) Crear una nueva macro con el contenido de CellSegmentation.txt
 - [Plugins > New > Macro] (se abre el editor de macros)
 - Pegar el texto en el editor de macros².
- (c) Ejecutar la macro (con el botón Run del editor).
- (d) Cambiar la macro y volver a ejecutar.
 - Se puede «comentar» una línea de una macro anteponiendo «//». Una línea comenzando con «//» no será ejecutada. Por ejemplo probar qué pasa si no se hace el suavizado gaussiano.
 - Cambiar los parámetros de Analyze particles (ver esos parámetros en el menú [Analyze > Analyze particles]). Por ejemplo imponer un distinto rango de tamaños o de circularidades.
- (e) Modificar la macro para ejecutar sobre la imagen de ejemplo Blobs

Ejercicio 2 (Grabación de una macro)

- (a) Abrir la imagen de ejemplo AuPbSn40.
- (b) Abrir el grabador de macros [Plugins > Macros > Record...].
- (c) Realizar algún procesamiento de la imagen (suavizado, búsqueda de bordes, ...).
- (d) Crear la macro presionando el botón Create en el grabador.
- (e) Revertir los cambios realizados a la imagen AuPbSn40 [File > Revert]
- (f) Ejecutar la macro sobre la imagen.

Ejercicio 3 (Grabación de una macro de análisis de partículas)

- (a) Abrir una imagen del directorio parasitos. En las imágenes se pueden ver núcleos y pequeños parásitos
- (b) Grabar una macro para medir sólo los parásitos. La macro debe contar con los pasos:
 - Seleccionar las medidas que se quieren realizar [Analyze > Set Measurements ...]
 - Umbralizar en forma automática.

²También se puede abrir desde [File > New > Script...]

- Convertir a máscara con Convert to Mask.
- Ejecutar el [Particle > Analyzer]
 - restringido a las partículas pequeñas (filtrar por tamaño)
 - con visualización de resultados (opción Display results)
 - show: Overlays
- Guardar los resultados numéricos en un archivo.

(c) Ajustar la macro para que seleccione bien los parásitos.

(d) Abrir otra imagen de parásitos y ejecutar la macro.

Ejercicio 4 (Ejecución «batch» de una macro)

- (a) Ejecutar la macro de análisis de partículas realizada en el ejercicio anterior en todas las imágenes del directorio parasitos.
- [Process > Batch > Macro].
 - Copiar la macro creada.
 - Seleccionar directorio de las imágenes y el directorio de salida de resultados.
 - Presionar el botón de Process.
 - Analizar los resultados.