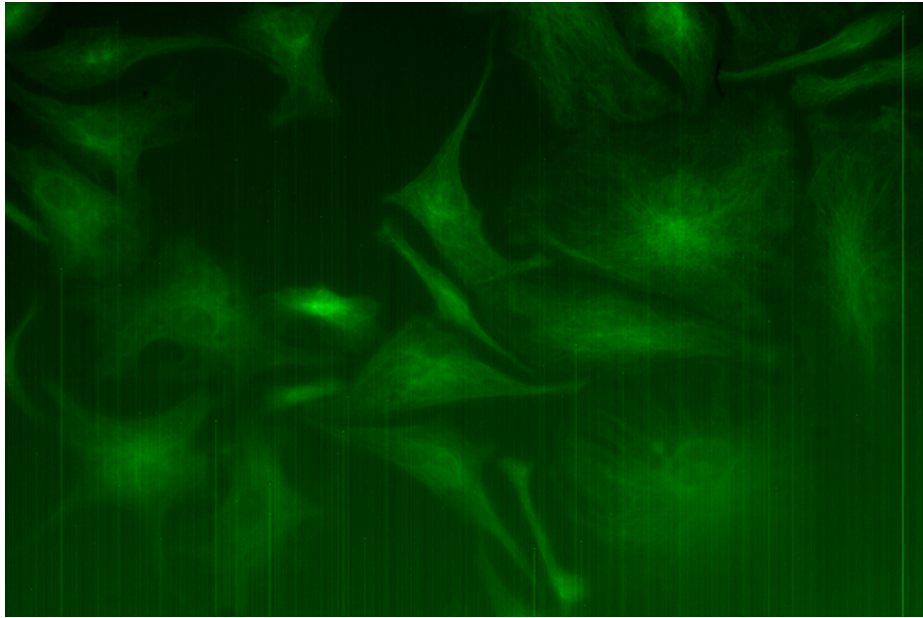
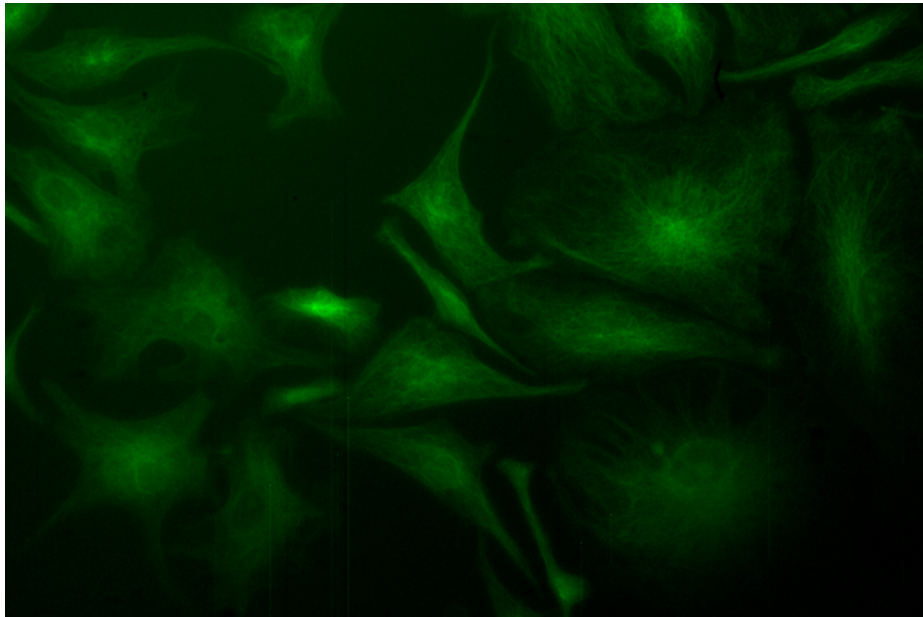


## Cómo pasar de ESTO:



**a**      **ESTO!!!!!!!**



**Procesamiento de imágenes usando FIJI.**

Por Lorena Sigaut

[lorena@df.uba.ar](mailto:lorena@df.uba.ar)

Se emplea el programa FIJI (que es una versión de ImageJ: Fiji Is Just ImageJ)

### 1) Abrir imagen formato tiff

Se puede arrastrar directamente el archivo tiff a la ventana del FIJI

O

Abrir con el menú: : **File – Open image – Ajust – Brightness/Contrast**

### 2) Ajustar parámetros de la imagen

Cambiar rango de escala: **Image – Ajust – Brightness/Contrast**

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)

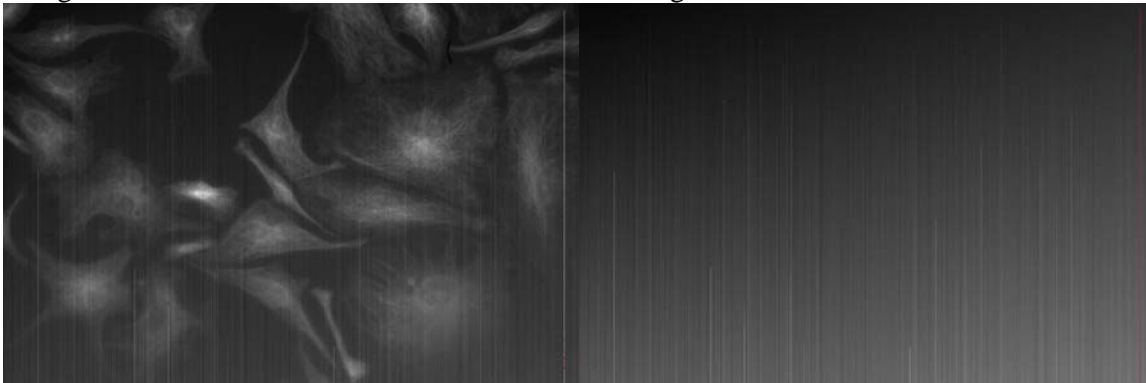
### 3) Restar la imagen de ruido de la cámara a la imagen obtenida con cada cubo

Para este paso tienen que repetir los pasos 1,2 y 3 para la imagen obtenida con un cubo y la imagen de ruido de la cámara CCD.

Abren dos imágenes:

Imagen cubo excitación en azul

imagen ruido de la cámara CCD



**Process – ImageExpressionParser** 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

Ver figura 1!!

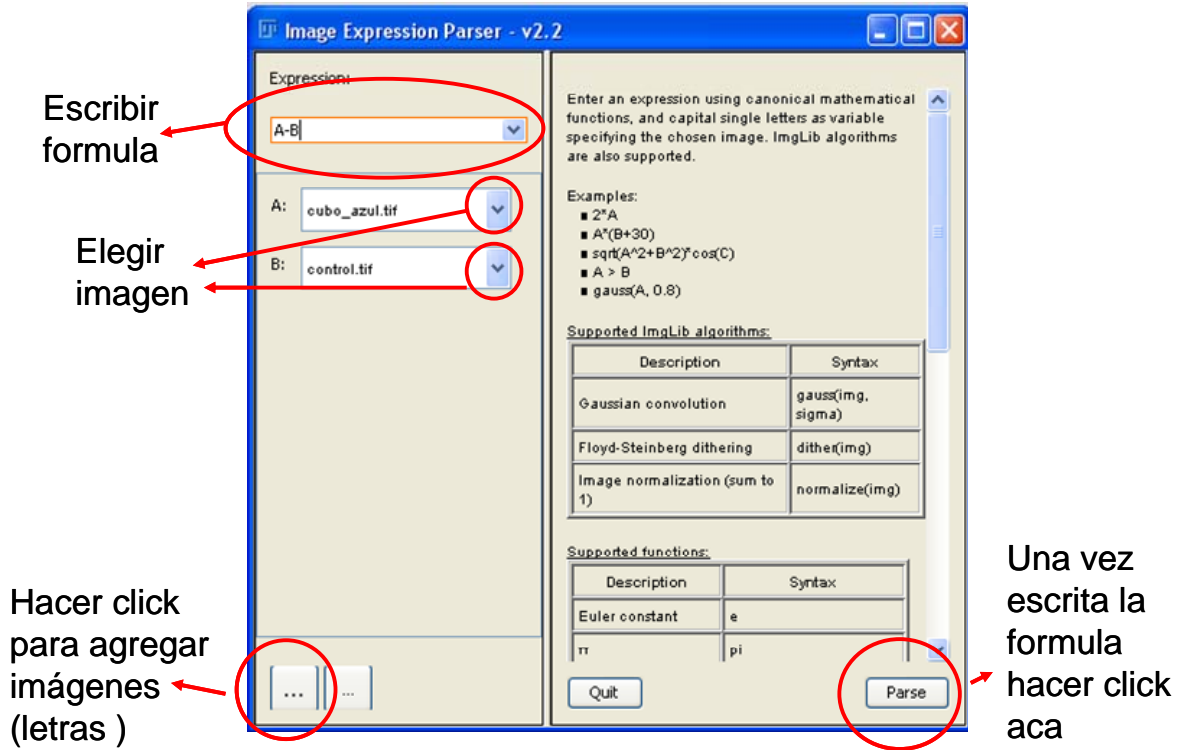


Figura 1

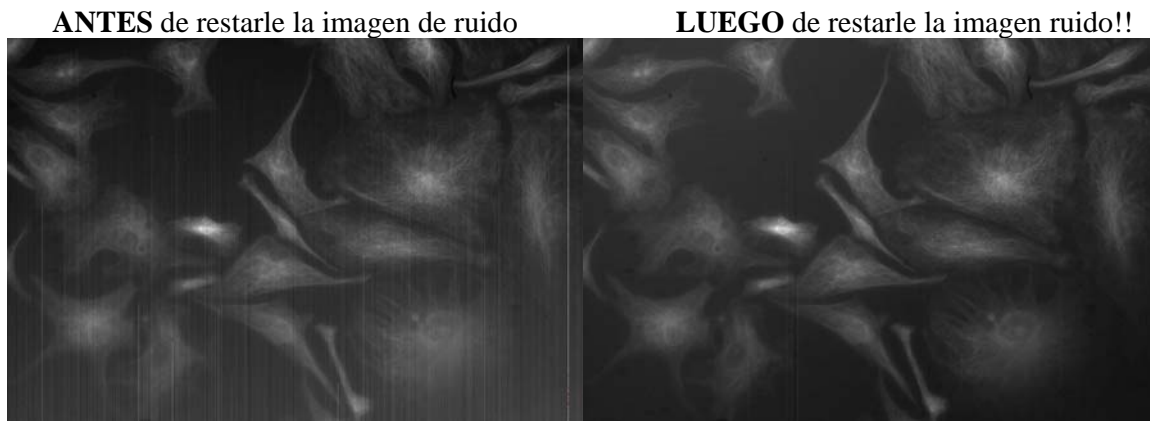
Esta función genera una nueva ventana con la imagen de A-B que se puede guardar como un tiff

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

**Image – Ajust – Brightness/Contrast**

4) Grabar la imagen obtenida en el paso anterior. **File- Save as - tiff**

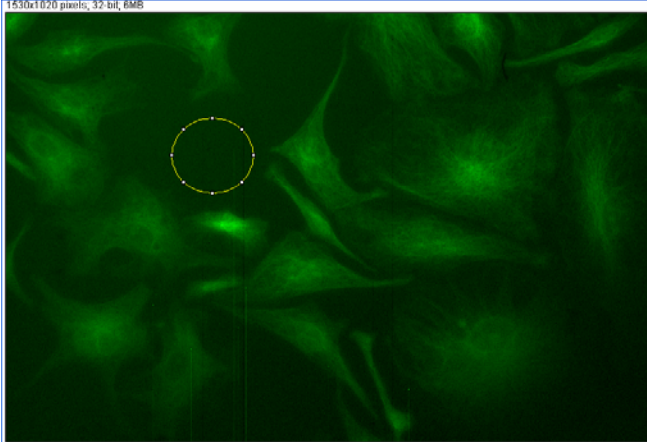
Pasan a obtener una imagen:



### 5) 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 clickear los resultados que se quieren mostrar.

Elijo región donde **NO** hay célula 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).

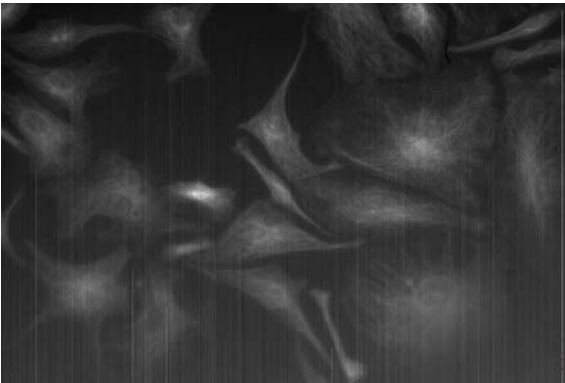
### 6) Restar el fondo a cada imagen

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.

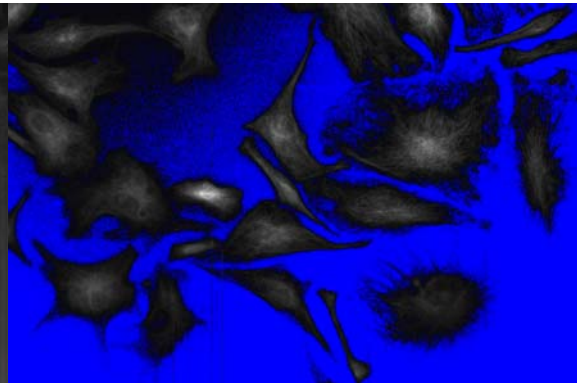
**DESPUES DE REALIZAR ESTA OPERACIÓN HAY QUE VOLVER A AJUSTAR LOS NIVELES DE BRILLO Y CONTRASTE!!!**

**Image – Ajust – Brightness/Contrast**

ANTES de restar el fondo



DESPUES de restar el fondo

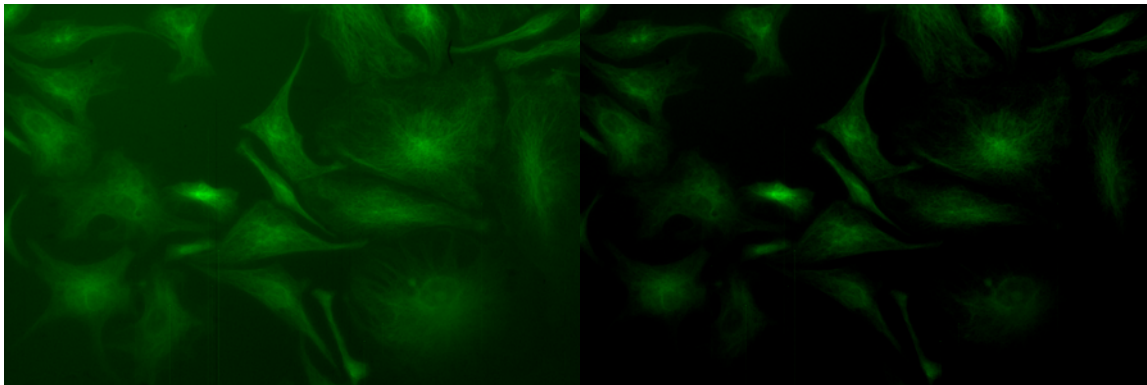


Queda azul el fondo de la imagen de la derecha porque es prácticamente 0

Si paso a escala de verdes en lugar de HiLo  
**Image – LookingTable—Red o HiLo o green**

ANTES de restar el fondo

DESPUES de restar el fondo



7) Grabar la imagen obtenida en el paso anterior. **File- Save as - tiff**

8) Repetir los pasos 1 a 7 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

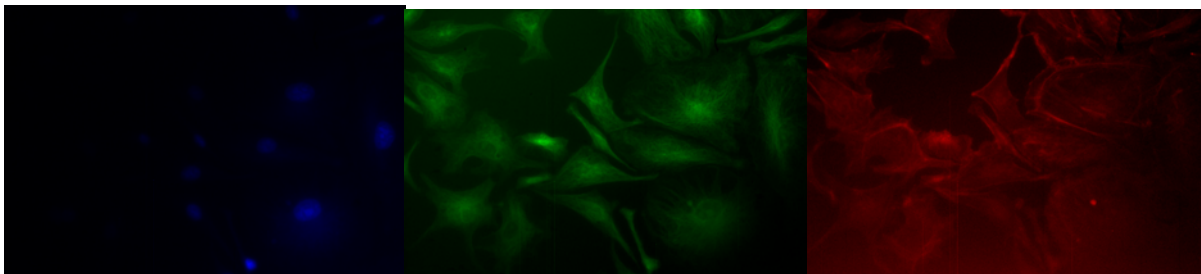
2) A cada imagen ajustar el brillo

**File – Open image – Ajust – Brightness/Contrast**

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

**Image – LookingTable—Red (por ej.)**

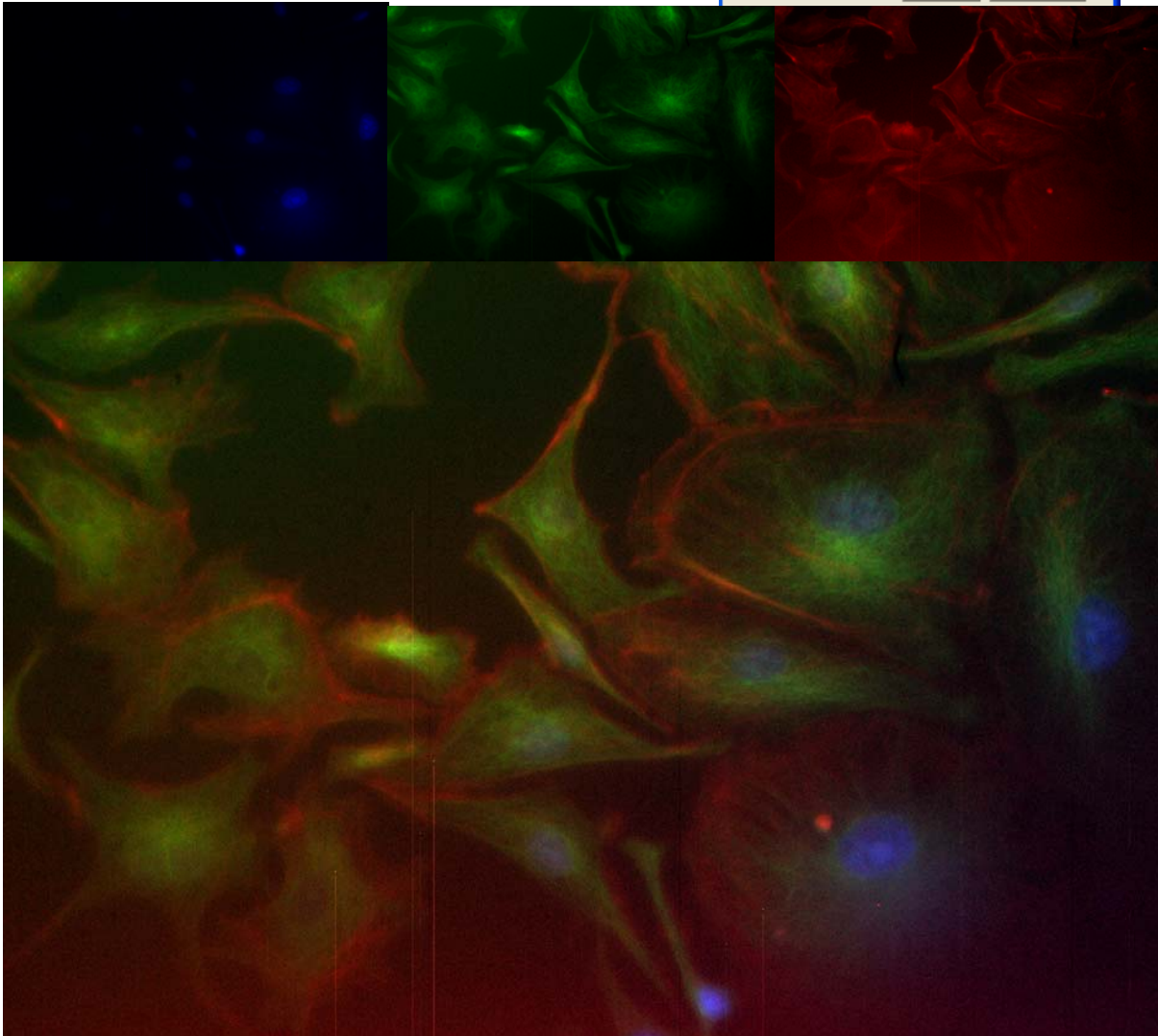
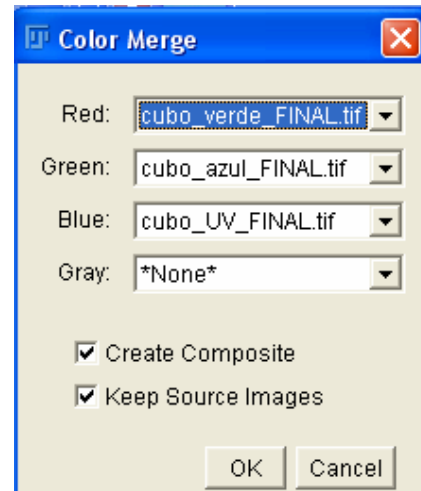
Van a tener 3 imágenes abiertas:



#### 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 FINAL!!**