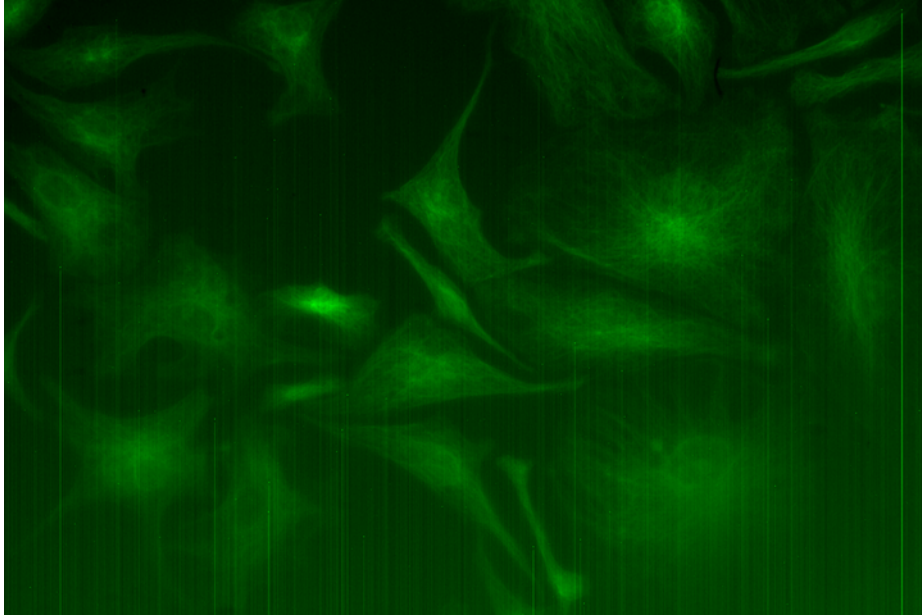
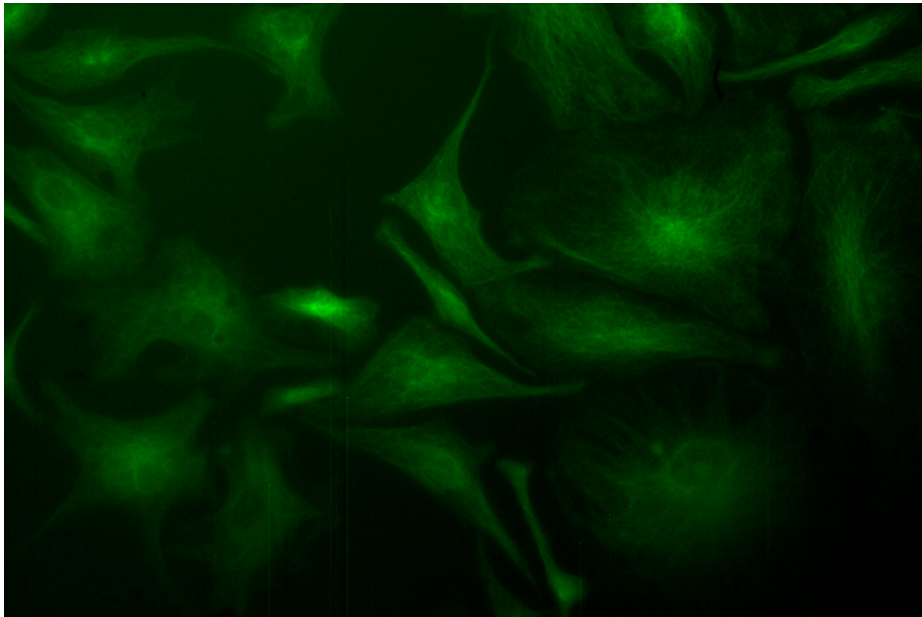


## Cómo pasar de ESTO:



**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)

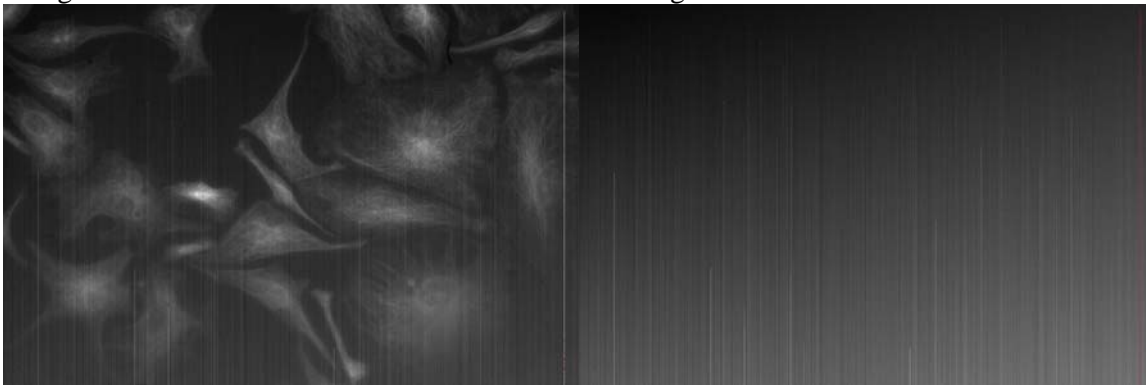
### 3) Restar la imagen de ruido de la cámara a la imagen obtenida con cada cubo

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

Tienen dos 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 (en definitiva reales).

**8bit** tiene una escala de grises de 255 niveles todos enteros (0-254)

**16bit** tiene una escala de grises de 4095 niveles todos enteros (0-4094)

**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

Escribir formula

Elegir imagen

Hacer click para agregar imágenes (letras)

Una vez escrita la formula hacer click aca

Image Expression Parser - v2.2

Expression: A-B

A: cubo\_azul.tif

B: control.tif

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
- gauss(A, 0.8)

Supported ImgLib algorithms:

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

Supported functions:

Description	Syntax
Euler constant	e
π	pi

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!!!**

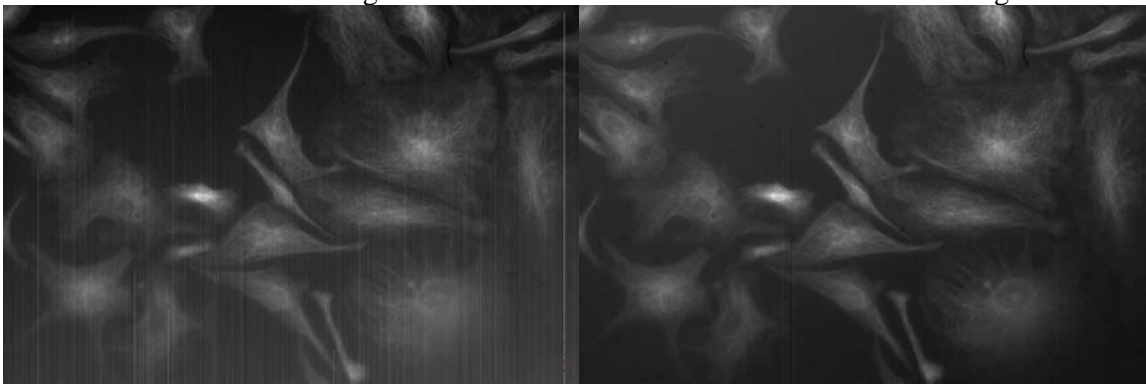
**Image – Adjust – Brightness/Contrast**

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

Pasan a obtener una imagen:

ANTES de restarle la imagen de ruido

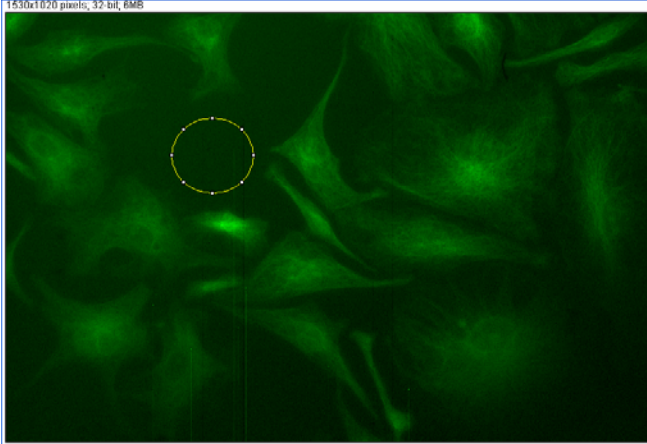
LUEGO de restarle la imagen ruido!!



### 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).

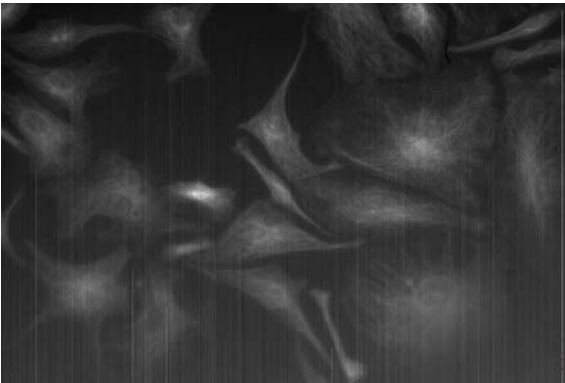
### 6) Restar el fondo a cada imagen

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.

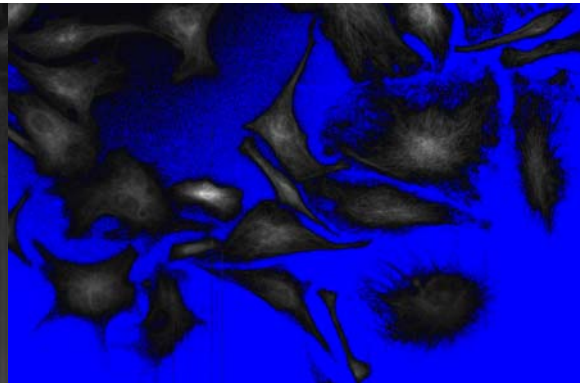
**DESPUES DE REALIZAR ESTA OPERACIÓN HAY QUE VOLVER A AJUSTAR LOS NIVELES DE BRILLO Y CONTRASTE!!!**

**Image – Ajust – Brightness/Contrast**

ANTES de restar el fondo



DESPUES de restar el fondo

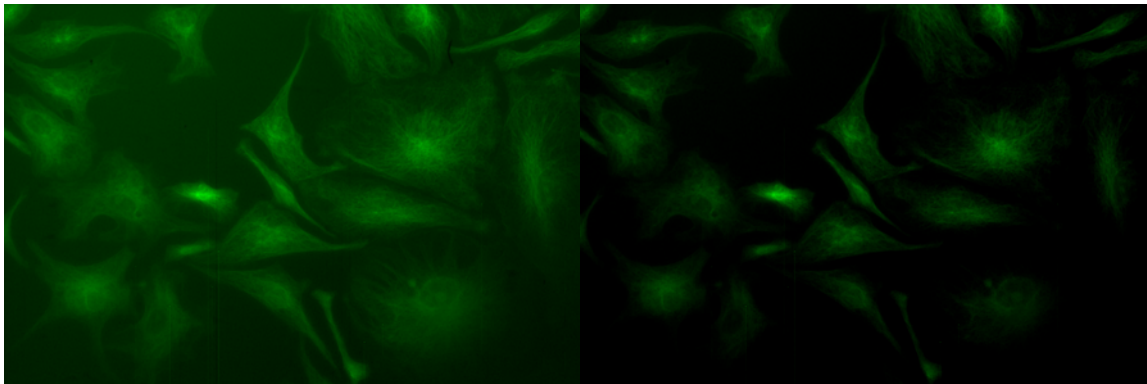


Queda azul el fondo de la imagen de la derecha porque es prácticamente 0

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

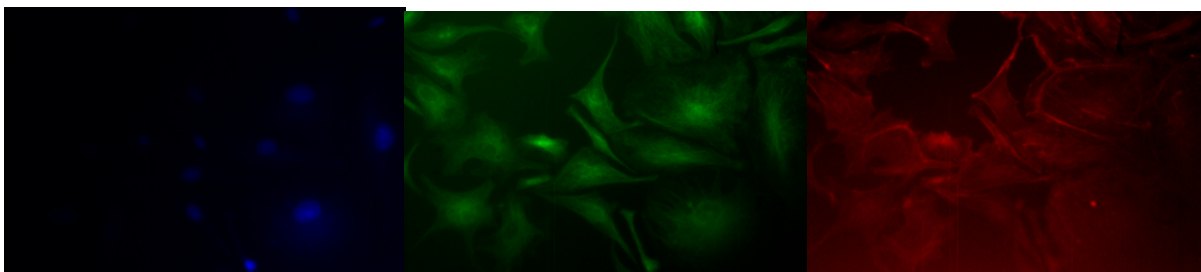
2) A cada imagen ajustar el brillo

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

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

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

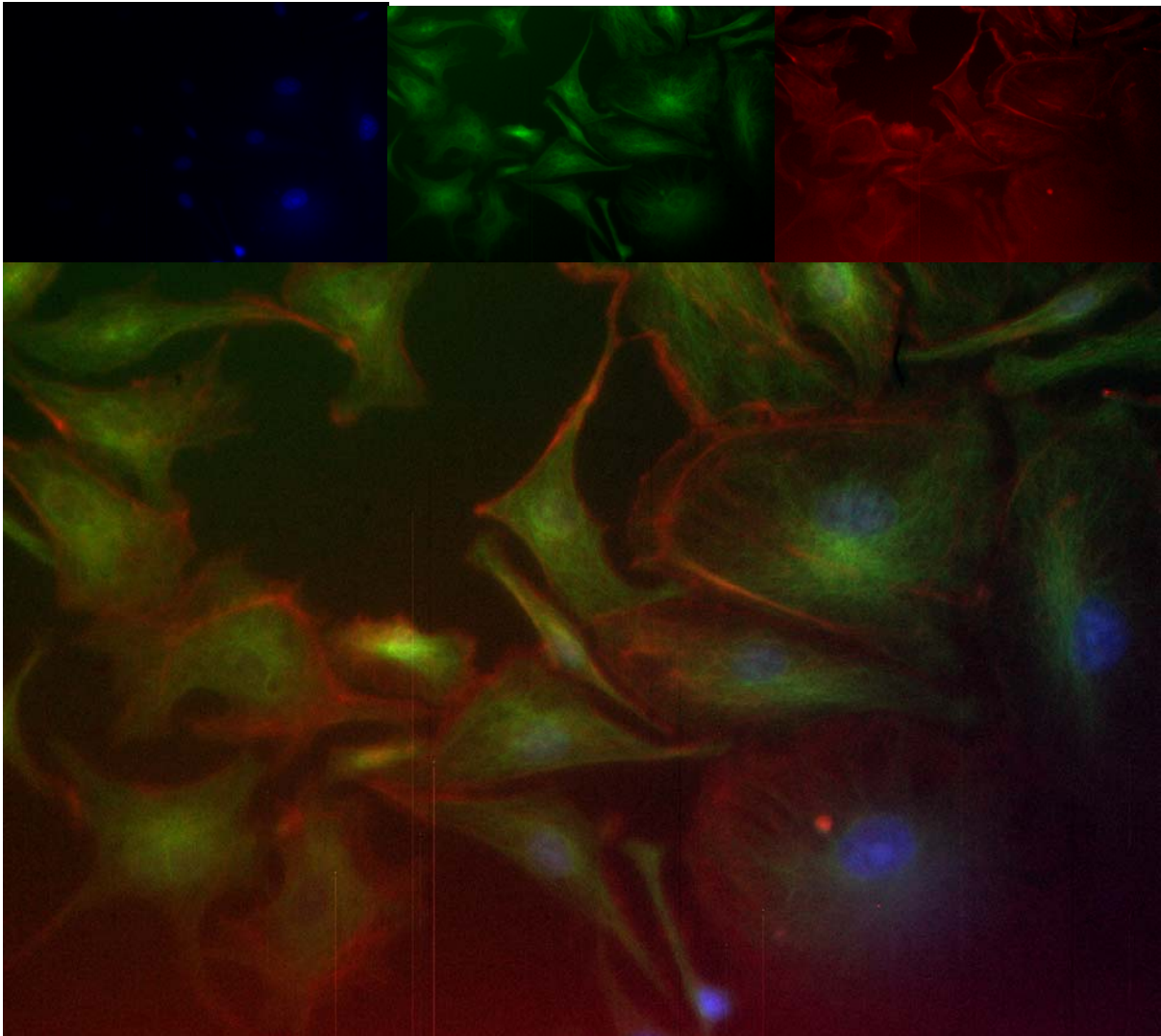
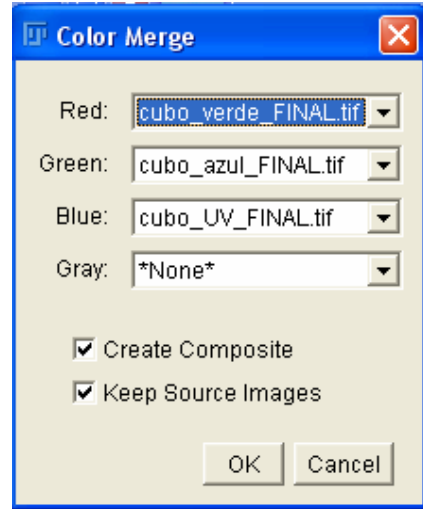
Van a tener 3 imágenes abiertas:



#### 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!!**

## Algunas funciones del FIJI que podrían ser útiles

### 1) Elegir la misma región en varias imágenes

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 – RoiManager** 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

Known distance: 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 - **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**.

### 7) Imagen para procesador de texto o presentación

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**