

Primeros pasos en ImageJ: guía para descargar el programa, abrir una imagen, mejorarla, poner una barra de medida e imprimir.

Benito Alarcón. Servicio de Microscopía. Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC).C/ Jaume Roig 11, 46010, Valencia. Telf: 96 3391760. Email: balarcon@ibv.csic.es.

Este tutorial es una introducción al manejo de imágenes de microscopía en ImageJ. Trata de cómo descargar el programa, abrir una imagen, lo básico para mejorar su aspecto, calibrar la imagen para tomar medidas, poner la barra de medida y consideraciones para imprimir.

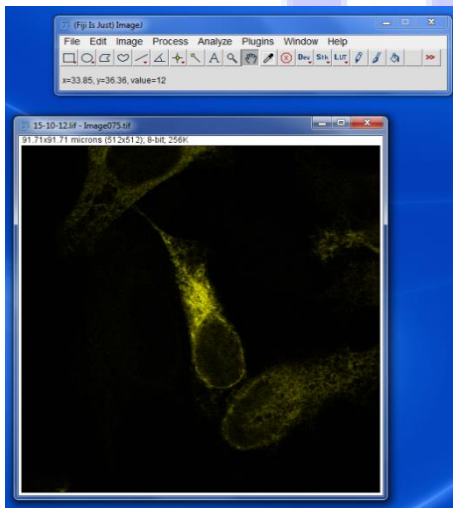
Descargar el programa y abrir una imagen.

ImageJ es un programa pensado para el análisis de imágenes como medir áreas, contar objetos, cuantificar la señal etc. También tiene muchas opciones para mejorar el aspecto de la imagen, manejo de pilas de imágenes (stacks) etc, etc. Además mediante "plugins" se pueden añadir más funciones y mediante "macros" se puede programar para realizar tareas repetidas.

ImageJ es gratuito y se puede descargar en: <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>.

Hay una recopilación de ImageJ llamada **FIJI** (Fiji Is Just ImageJ) que viene con más opciones

(plugins) de serie que ImageJ y se actualiza automáticamente (<http://fiji.sc/Downloads>). En ambos, solo hay que descomprimirlo en una carpeta y crear un acceso directo en el escritorio.



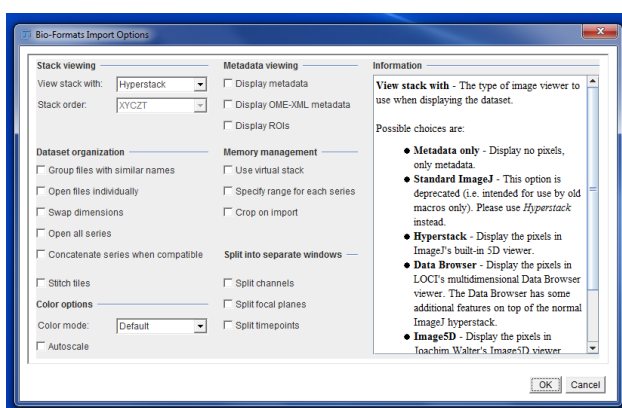
En este tutorial trabajaremos con la versión **FIJI** de ImageJ.

Aquí tienes el manual :

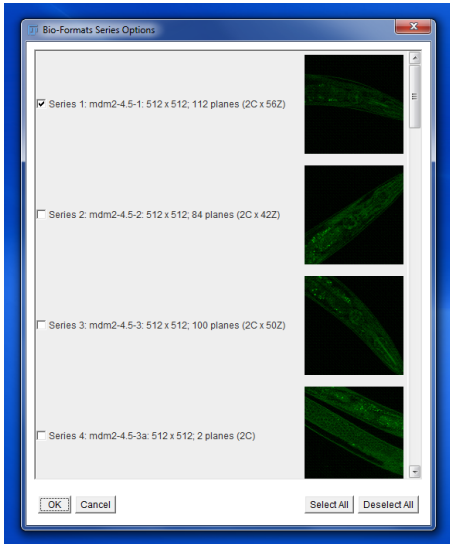
<http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/index.html>

-Al abrir el programa, aparece la barra de ImageJ. Para abrir una imagen, arrastrala hasta la barra de ImageJ.

Los archivos de confocal, por ejemplo .life, .lsm, se abren igual, pero en este caso, primero se abre **Bio-Formats Import options (LOCI)**, que es una aplicación o plugin presente en **FIJI**. Si no tienes este plugin o necesitas otro puedes tenerlo en **menú Help | ImageJ Website...** lo único que hay que hacer es descargarlo y guardarlo en la carpeta de plugins. Luego hay que cerrar y abrir de nuevo el programa para que el plugin se incorpore a la barra.



En **LOCI**, Si pulsas **OK**, aparece una lista con las series de imágenes y con la primera preseleccionada. Puedes abrir una o varias series a la vez. Para tener ordenadas las imágenes en el escritorio, puede ser útil reducirla, pulsando la tecla - (restar) repetidamente.



Si vas a trabajar con imágenes grandes o vas a tener abiertas muchas imágenes, te interesa saber cuánta memoria necesitas y cuánta tiene ImageJ. En menú **Edit | Options | Memory&threads**, puedes ver la que tiene ImageJ reservada por defecto. Se puede añadir más, pero no conviene superar el 75% de la memoria RAM del ordenador.

En la parte inferior de la barra de ImageJ aparecen las coordenadas (x e y) del cursor así como el valor del pixel que señala. Si las coordenadas son números enteros es que la distancia se representa en píxeles. Si son números con decimales, la imagen está calibrada.

Si quieres ver qué pixel estás señalando, pulsa varias veces el botón + para aumentar la

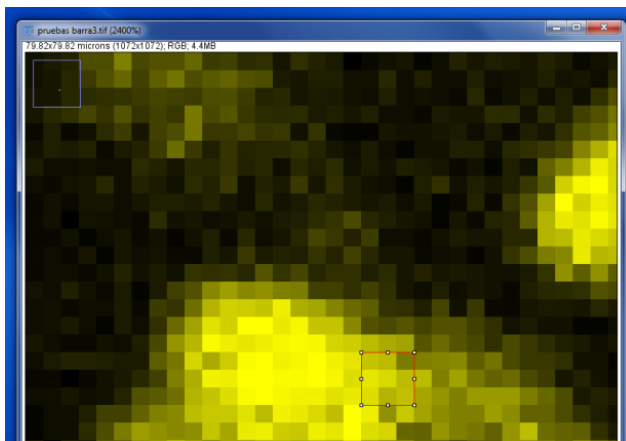


imagen hasta ver los píxeles. La posición del puntero marca la zona de la ampliación que queremos ver. Esta forma de mostrar la imagen puede servir para ver que es lo que ImageJ hace con los píxeles. Por ejemplo, se puede seleccionar 4 píxeles (herramienta de selección rectangular) tomar nota de los valores de cada pixel (situando el cursor en cada pixel) y comprobar si ImageJ hace lo que esperamos cuando, por ejemplo,

queremos obtener el valor medio de la señal (**Ctrl + m** mide en este caso, solo la selección rectangular y muestra los parámetros seleccionados en menú **Analyze | Set Measurements...**). Si al aumentar la imagen no puedes ver los píxeles, ve a menú **Edit | Options | Appearance...** y quita la opción **Interpolate zoomed images**

En la parte superior del marco de la imagen, en la zona azul se encuentra el nombre y la extensión del formato de compresión. La compresión es necesaria para poder manejar la imagen. En este caso es una imagen **.tif**. Este formato comprime sin pérdidas de información y permite conservar los datos de como se tomó la imagen. **JPG-JPEG** es otro formato muy común aunque comprime con un poco de pérdida pero con la ventaja de generar archivos mucho más pequeños.



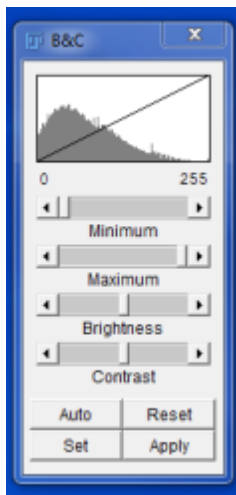
Bajo, en zona blanca del marco se encuentra primero el tamaño que representa la imagen (ancho x alto) en micras, lo que indica que la imagen está calibrada y que

podemos medir distancias, perímetros, áreas y dibujar una barra de medida.

El siguiente dato es 8-bit, es el rango de valores o intensidad que tiene cada píxel (8-bit representa 2^8 , que es igual a 256 valores o tonos de color posibles, en este caso 0 se muestra como negro y el valor 255 amarillo intenso). Los 256 tonos son suficientes para tener una imagen de aspecto natural sin que se note la transición entre diferentes tonos. Sin embargo, si lo que nos interesa es el valor numérico para cuantificar la señal, es mejor tomar la imagen con un mayor rango de valores. Por ejemplo, en una imagen tomada a 12-bit, cada píxel puede tener un valor entre 0 y 4096 lo que nos permitirá diferenciar mejor entre muestras.

El último dato es el tamaño del archivo, 256K (kilobytes). Este valor es el resultado de multiplicar el nº de píxeles (512 X 512) por la profundidad (8 bit) y dividido por 8 para pasar de bits a bytes y dividido por 1024 para pasar a Kilobytes. Cuando guardamos la imagen en formatos como JPG, el tamaño se reduce.

Un retoque mínimo para mejorar la imagen:



Si queremos utilizar la imagen para cuantificar la señal, tendremos que conservar la imagen original ya que cualquier retoque produce cambios en los valores de los píxeles.

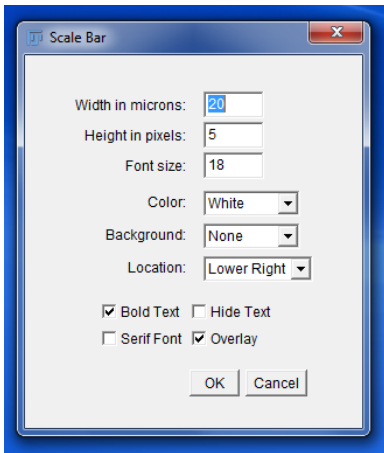
El retoque más común es menú **Image | adjust | brightness/contrast...** La opción **Auto** da un resultado aceptable. El gráfico que se muestra es el "histograma" y representa en **X** los valores posibles de los píxeles (desde 0 a 255) y en **Y** el número de píxeles que tienen un determinado valor. El histograma da una idea de lo iluminada que está una imagen.

Si la cámara dispone del histograma, en técnicas de campo claro conviene iluminar la imagen de tal forma que el histograma este centrado o un poco desplazado hacia la derecha sin que se salga del límite. Los sensores de las cámaras captan mejor la señal a niveles altos de iluminación. Luego si hace falta, se puede oscurecer. En las imágenes de fluorescencia, en cambio, es normal que el histograma esté desplazado hacia la izquierda, debido a que el fondo suele ser negro (tienen muchos píxeles con valores cerca de 0).

Otra opción para mejorar una imagen es aplicar un filtro. Menú **Process | Filters | median...** funciona muy bien con valores de **Radius** entre 1 y 2. **Process | Filters | Gaussian Blur...** es otro de los filtros que permiten mejorar los contornos y es muy fácil de aplicar. Con la opción **preview** se puede probar diferentes **Radius**.

Si necesitamos quitar ruido de fondo en una imagen una opción podría ser: obtener un valor medio del ruido de fondo (por ejemplo, herramienta de selección rectangular, dibujar un rectángulo en la zona del fondo; **ctrl + M**, tomar el valor **mean**. Luego menú **Process | Math | Subtract...** y restar dicho valor a la imagen.

Calibrar la imagen y poner una barra de medida:

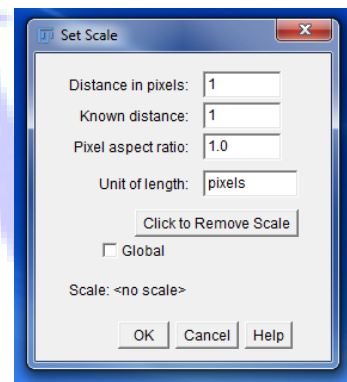


ImageJ incorpora automáticamente los datos de la imagen (metadata) cuando abrimos un archivo del tipo **.tif**, **.lif**, **.czi** o **.ism** etc (con **Ctrl + i** se puede ver esta información). Estos datos contienen la calibración de la imagen y podemos insertar una barra de medida en menú **Analyze|Tools|Scale Bar...**

Si la imagen no tiene los datos de medida, se pueden introducir manualmente. Para ello tendremos que tomar una imagen de un micrómetro objetivo en las mismas condiciones que se tomó nuestra imagen y contar cuantos pixeles representan una distancia en micras. El micrómetro

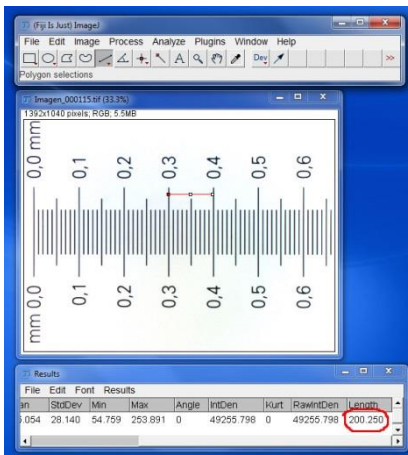
objetivo es un portaobjetos que tiene grabado una escala de 1 mm dividido en 100 partes, cada una representa 10 micras.

Para saber cuantos pixeles representan una distancia conocida, primero abrir la imagen del micrometro objetivo. En menú **Analyze|Set Scale...** introducir el valor 1 en **Distance in pixels** y en **known distance** para que nos mida pixeles. En la barra de ImageJ utiliza la herramienta línea recta (**straight line**) y dibujar una línea entre dos marcas de la escala. Pulsando **Ctrl + m** se muestra una ventana con la



longitud en pixeles, que representa la distancia conocida de la escala.

Volver a **Set Scale** e introducir los datos pixeles y distancia (200 pixeles representan 100 micras). En **Unit of length** poner **microns**. Ahora ya se puede medir en la imagen o insertar la barra de medida en **Scale bar...**



En **Analyze|Set Scale...**, la opción **Pixel aspect ratio** es 1.0 en la mayoría de las imágenes. Si marcas **Global**, cuando vuelvas a abrir otra imagen, se conservará la calibración.

En **Analyze|Tools|Scale Bar...**, podemos elegir como queremos que sea la barra de medida. Si la imagen es RGB podremos elegir cualquier color. Si es 8-bit, en cambio, la barra sera del mismo color que la imagen. Convertir una imagen 8-bit en RGB es fácil: **Image|Type...|RGB color**. Pero hay que tener en cuenta que la imagen va a ser más grande y los valores de los pixeles van a sufrir una cierta transformación por lo que conviene guardar la imagen original. Cambiar de RGB a 8-bit a veces no devuelve la imagen a los valores originales. Para cada pixel, ImageJ asigna la media de los tres valores RGB. Por ejemplo, si en una imagen 8-bit en amarillo, el valor de un pixel es por ejemplo 50, al pasar a RGB lo convierte en 50,50,0 (asigna

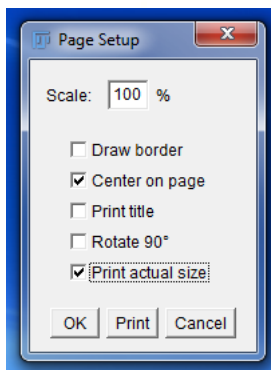
50 al canal rojo, 50 al verde y 0 al azul) para que aparezca amarillo. Si volvemos a 8-bit, los tres valores pasa a ser el valor medio de los tres, es decir 33,3 . Se podría intentar volver al original multiplicando la imagen por 3/2 (menu **Process | Math...**) pero no devuelve el original por los redondeos.

Para que la barra aparezca de forma permanente en la imagen, hay que quitar la opción “**Overlay**” en **Scale Bar**. Cuando se elige **Overlay**, la barra se inserta en modo vectorial para no alterar la imagen y no aparecerá cuando abrimos la imagen en otros programas.

El valor del pixel o intensidad también se puede calibrar (en menú **Analyze | Calibrate...**) para obtener, por ejemplo, densidades ópticas. Esto es útil para cuantificar las bandas de un gel. En la ventana aparecen dos columnas para colocar los valores, a la izquierda el de referencia X (valor conocido) e Y (valor de la intensidad media, por ejemplo) para que el programa realice el ajuste.

Para imprimir:

Una imagen impresa de calidad debería tener 300 píxeles por pulgada (ppp)(una pulgada son 2,54 cm). 512 x 512 pixeles dan para imprimir una imagen de 4,33 cm de lado, en muchos casos, suficiente para publicarla en un artículo. Si la imagen es para imprimirla en un poster, el número de ppp se puede bajar porque las imágenes van a ser observadas desde una distancia mayor (por ejemplo, a una distancia de 80 cm, la resolución del ojo es de 95 ppp). Si es para mostrarla en una presentación, la resolución esta limitada por la de la pantalla que suele ser de 72 pixeles por pulgada.



ImageJ imprime a 72 ppp por defecto (**File | Print...**) . Si queremos imprimir a 300 ppp hay que ir a **Analyze | Set Scale...** introducir 300 en **Distance in pixels** , 1 en **Known distance** e inch en **Unit of length**. Luego ir a menú **File | Page Setup...** y seleccionar **Print actual size**. Por último, ir a menú **File | Print...** para dar la orden de imprimir.