



# Técnicas de análisis de imagen

Aplicaciones en Biología

José F. Pertusa Grau

2<sup>a</sup> edición

PUV

# TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN

# Educació. Materials 65

TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE  
IMAGEN  
CONCEPTOS BÁSICOS

*José F. Pertusa Grau*

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Colección: Educació. Materials  
Director de la colección: Guillermo Quintás Alonso



Esta publicación no puede ser reproducida, ni total ni parcialmente, ni registrada en, o transmitida por, un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por ningún medio, ya sea fotomecánico, foto químico, electrónico, por fotocopia o por cualquier otro, sin el permiso previo de la editorial.

© El autor, 2010  
© De esta edición: Universitat de València, 2010  
1.ª edición: junio 2003  
2.ª edición corregida: febrero 2010

Coordinación editorial: Maite Simón  
Maquetación y composición de la cubierta: Celso Hernández de la Figuera  
Corrección: Francesc B. Salas

ISBN: 978-84-370-8288-2

---

# *Índice*

---

## INTRODUCCIÓN

### **Capítulo 1. La imagen**

- 1.1 Análisis de imagen y procesamiento de imagen
- 1.2 Tipos de imagen con interés biológico
  - 1.2.1 Ondas electromagnéticas transmitidas
  - 1.2.2 Ondas electro-magnéticas reflejadas
  - 1.2.3 Ondas electromagnéticas emitidas
- 1.3 La imagen real y nuestra percepción del mundo
  - 1.3.1 Mecanismo de estereopar
  - 1.3.2 Referencias espaciales
  - 1.3.3 Movimiento
  - 1.3.4 Juego de luces y sombras
- 1.4 Información contenida en la imagen
  - 1.4.1 Información espacial
  - 1.4.2 Información espectral: energía radiante
- 1.5 Objetos, fondos y campos
- 1.6 Los objetos en análisis de imagen
- 1.7 Morfometría y estereología

### **Capítulo 2. Algunos métodos manuales para la estimación de medidas**

- 2.1 Qué medir y cómo
- 2.2 Estimación del área
  - 2.2.1 Aproximaciones geométricas
  - 2.2.2 Recuento de áreas unitarias
  - 2.2.3 Método de la pesada

- 2.2.4 Estimación del área por el método de la rejilla de puntos
- 2.3 Estimación de la longitud
  - 2.3.1 El método de Buffon
  - 2.3.2 Cálculo del perímetro
- 2.4 Errores de medida
  - 2.4.1 Unidades de medida y errores
  - 2.4.2 Precisión del método en función del número de puntos de la rejilla
  - 2.4.3 El error experimental

### **Capítulo 3. Análisis de imagen asistido por ordenador**

- 3.1 Orígenes del análisis de imagen
- 3.2 Los primeros analizadores
- 3.3 La era de la digitalización
- 3.4 La expansión de la memoria y el tratamiento de grises
- 3.5 Lo analógico y lo digital
  - 3.5.1 Sistemas de referencia
  - 3.5.2 Analógico/Digital
  - 3.5.3 El píxel

### **Capítulo 4. Arquitectura del sistema**

- 4.1 ¿Qué es un ordenador digital?
- 4.2 Representación de la información
- 4.3 Programas y datos
- 4.4 La máquina virtual: el sistema operativo
- 4.5 La era de las ventanas
- 4.6 Una nueva ojeada a la arquitectura del sistema
- 4.7 Sistemas de captación de imagen
  - 4.7.1 Tubos termoiónicos tradicionales
  - 4.7.2 Cámaras de sensor de estado sólido o CCD (*Charge-Coupled Device*)
  - 4.7.3 Cámaras digitales
- 4.8 Características técnicas de las cámaras de vídeo

- 4.8.1 Sensibilidad
- 4.8.2 Rango de sensibilidad
- 4.8.3 Gamma
- 4.8.4 Resolución
- 4.8.5 Respuesta espectral

## **Capítulo 5. La imagen digital**

- 5.1 Digitalización de la imagen
- 5.2 Profundidad
- 5.3 Resolución
- 5.4 El histograma de nivel de gris
- 5.5 Escalado del nivel de gris y paletas de falso color
  - 5.5.1 Escalado del nivel de gris
  - 5.5.2 Paletas de color: falso color
- 5.6 Digitalización del color real
- 5.7 Cómo congelar, grabar y recuperar las imágenes
  - 5.7.1 Formato de imagen

## **Capítulo 6. Procedimiento general de trabajo en análisis de imagen asistido por computadora**

- 6.1 Captura de la imagen
- 6.2 Segmentación
- 6.3 Detección de los objetos
- 6.4 Medidas
- 6.5 Operaciones adicionales y utilidades

## **Capítulo 7. Medidas en análisis de imagen**

- 7.1 Parámetros morfométricos de campo
  - 7.1.1 Número de partículas
  - 7.1.2 Área como parámetro de campo
  - 7.1.3 Perímetro como parámetro de campo
- 7.2 Parámetros morfométricos de objeto
  - 7.2.1 Coordenadas de un objeto: distribución de objetos
  - 7.2.2 Centroides

- 7.2.3 Área de un objeto
- 7.2.4 Medida de los diámetros Feret (diámetros de calibrador)
- 7.2.5 Longitud y anchura de los objetos
- 7.2.6 Longitud y anchura de fibra
- 7.2.7 Perímetro y perímetro convexo
- 7.2.8 Orientación de los objetos
- 7.2.9 Número de agujeros
- 7.3 Parámetros morfológicos derivados
  - 7.3.1 Factor de forma circular
  - 7.3.2 Rugosidad
  - 7.3.3 Factores que relacionan la longitud de los ejes
- 7.4 Parámetros densitométricos
  - 7.4.1 Nivel de gris
  - 7.4.2 Densidad óptica

## **Capítulo 8. Procesado de imagen. Operaciones punto a punto**

- 8.1 Restauración y mejora de la imagen
- 8.2 Operaciones punto a punto
- 8.3 Modificación del histograma de gris
  - 8.3.1 Normalización
  - 8.3.2 Ecuilización
  - 8.3.3 Otras manipulaciones del histograma de gris
- 8.4 Operaciones aritméticas con una imagen
- 8.5 Operaciones aritméticas con varias imágenes

## **Capítulo 9. Procesado de imagen. Operaciones entre píxeles vecinos**

- 9.1 Filtros matriciales
- 9.2 Filtros de suavizado
  - 9.2.1 Filtro de la media
  - 9.2.2 Filtros gaussianos
  - 9.2.3 El filtro de la mediana
- 9.3 Filtros de enfatizado

## 9.4 Utilización de los filtros

### **Capítulo 10. Detección de márgenes**

- 10.1 Tipos de bordes
- 10.2 Operadores laplacianos
- 10.3 Operadores direccionales
  - 10.3.1 Operadores cardinales (norte, sur, este, oeste)
  - 10.3.2 Otros operadores direccionales
- 10.4 Operadores cruzados
  - 10.4.1 Bordes de cuatro píxeles
  - 10.4.2 El operador cruzado de Roberts
- 10.5 Otros detectores de margen

### **Capítulo 11. Segmentación: la imagen binaria**

- 11.1 Técnicas basadas en el marcado de bordes
  - 11.1.1 Perfilado manual de contornos
  - 11.1.2 Detección de bordes como procedimiento de segmentación
- 11.2 Segmentación por umbrales
  - 11.2.1 Utilización de umbrales de nivel de gris
  - 11.2.2 Herramientas para la selección de umbrales
- 11.3 Segmentación automática
- 11.4 Segmentación múltiple
- 11.5 Otras técnicas de segmentación
  - 11.5.1 Crecimiento de regiones
  - 11.5.2 División y unión de regiones
- 11.6 Segmentación de la imagen en color
  - 11.6.1 Cuando el color no es relevante
  - 11.6.2 Utilización del color para la segmentación
- 11.7 Resultado de la segmentación
  - 11.7.1 Significado de la imagen binaria
  - 11.7.2 Criterios de representación de la imagen binaria

### **Capítulo 12. Procesado de la imagen binaria**

- 12.1 Morfología matemática

- 12.2 Conectividad
- 12.3 Erosión y dilatación
- 12.4 Apertura y cierre
- 12.5 Otras operaciones de morfología matemática
  - 12.5.1 Rellenado de agujeros (*hole fill*)
  - 12.5.2 Contorno
  - 12.5.3 Esqueletización (*Skeleton*)
  - 12.5.4 Elimina-bordes
  - 12.5.5 Herramienta para separación de objetos.  
Distancia euclídea
- 12.6 Operaciones lógicas
  - 12.6.1 El Álgebra de Boole
  - 12.6.2 Operaciones booleanas
  - 12.6.3 La función O-EXCLUSIVA
- 12.7 Operaciones booleanas con imágenes binarias
- 12.8 Máscaras binarias, reconstrucción de objetos y otras operaciones
  - 12.8.1 Máscaras binarias
  - 12.8.2 Reconstrucción de objetos
  - 12.8.3 Operaciones de dilatación y erosión aplicadas a la imagen gris
- 12.9 Utilidad del procesamiento de la imagen binaria en análisis de imagen
  - 12.9.1 Separación de objetos contiguos
  - 12.9.2 Aplicación al aislamiento de objetos
  - 12.9.3 Ejemplo de una secuencia normal de trabajo

## **Capítulo 13. Un poco de estereología**

- 13.1 Principio de Delesse
- 13.2 Fracción de volumen (densidad de volumen)
- 13.3 La homogeneidad de la muestra: isotropía y anisotropía
- 13.4 Probabilidad geométrica
- 13.5 Los tests en estereología

- 13.6 Relación superficie/volumen (densidad de superficie) y relación perímetro/área (densidad de perímetro)
- 13.7 El volumen de los objetos
  - 13.7.1 Objetos de geometría conocida
  - 13.7.2 Objetos no regulares, de geometría compleja o desconocida
- 13.8 Recuento de objetos discretos (densidad numérica)
  - 13.8.1 El método de De Hoff y Rhines
  - 13.8.2 Generalización al método de De Hoff para partículas de forma constante
  - 13.8.3 Método de Weibel y Gómez para partículas de forma constante
  - 13.8.4 Corrección de Abercrombie
- 13.9 El efecto Holmes
- 13.10 El método del disector
- 13.11 Diámetro de partículas tridimensionales y en sección
- 13.12 Los parámetros estereológicos

## **Capítulo 14. Programas de análisis de imagen**

- 14.1 Programas de libre distribución
  - 14.1.1 Image J
  - 14.1.2 Scion Image
  - 14.1.3 Image Tool
  - 14.1.4 Osiris
- 14.2 Programas comerciales
  - 14.2.1 Image Processing Tool Kit
  - 14.2.2 Visilog
  - 14.2.3 Qwin (Leica)
  - 14.2.4 Productos Media Cybernetics
- 14.3 Análisis de imagen en la red

BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE ANALÍTICO

APÉNDICE DE COLOR

---

# *Introducción*

---

Las técnicas de proceso y análisis de la imagen digital se están apoderando de todos los campos de la biología; poco a poco se van sustituyendo las viejas cámaras fotográficas de los microscopios por las pequeñas y poderosas cámaras digitales; incluso en las nuevas técnicas microscópicas, la microscopía confocal, todo el manejo de las imágenes de los cortes ópticos se realiza por medio de un programa de procesado que la presenta en el monitor del ordenador.

Esta pequeña revolución digital está permitiendo que los laboratorios más modestos cuenten con muy eficaces sistemas de captura de imagen, lo que les permitirá acceder, a su vez, a las técnicas de análisis de imagen que antes estaban restringidas a los más pudientes.

Todo esto se ha traducido, desde el punto de vista docente, en la necesidad de incorporar al currículum de los estudiantes las materias que les permitan manejarse con soltura en las recién incorporadas técnicas de análisis de la imagen digital.

Pero la información bibliográfica disponible para los biólogos usuarios de estos nuevos métodos es, a mi criterio, reducida y limitada porque una parte de la información proviene de los manuales de los programas de ordenador que se instalan para el manejo de la imagen; el resto de la bibliografía se puede considerar altamente especializada y

requiere que sus lectores tengan una sólida formación matemática.

Cuando comencé la composición de este libro me planteé como objetivo fundamental preparar un manual que acercase el análisis de imagen a aquellos profesionales y estudiantes universitarios que, siendo calificados como «de ciencias», se encuentran ciertamente tan alejados de la informática y la matemática como para sentirse incómodos frente al lenguaje puramente simbólico del álgebra y la lógica binaria.

Conforme avanzaba en la redacción comprendí que más que un objetivo se trataba de un reto. Resulta complejo introducir en el tema a personas que no han visto un programa de análisis de imagen o que, en el peor de los casos, aunque les interese conocer las posibilidades de la técnica aquí expuesta, el hecho de topar con la informática les puede disuadir de la lectura del manual. A esto hay que añadir que la excesiva simplificación del tema conlleva el riesgo de acabar produciendo un libro de divulgación que no alcanza el nivel de utilidad deseable.

No quiero afirmar que este manual haya conseguido los objetivos que me propuse y que resuelva el problema de la información, pero mi esfuerzo ha estado dirigido a paliar esa falta en mi entorno.

Conceptualmente este libro se presenta como una introducción a una de las técnicas morfométricas más recientemente incorporada a la biología, aunque el propio análisis de imagen ya lleve por el mundo unos cuantos años y se haya desarrollado ampliamente en campos como la meteorología o la astronomía.

Pese a que el soporte instrumental es un equipo informático, se ha intentado, en lo posible, no hacer exhaustiva descripción de su funcionamiento, sino cuando era estrictamente necesario. Por ello se podrá encontrar algún capítulo dedicado a estos artefactos con el que pensamos que, al menos, contribuiremos a incrementar la

cultura de nuestros lectores en la lógica de funcionamiento de las máquinas de silicio.

Creo haber superado el escollo del rechazo inicial ordenando, juiciosamente, los razonamientos que nos llevan desde la necesidad de realizar un análisis, hasta el análisis mismo. En el desarrollo me he visto forzado, no obstante, a introducir conceptos matriciales, booleanos y geométricos que suenan peor de lo que en realidad son.

Pienso, con Stephen Hawking y su editor, que cada fórmula que aparezca en el libro supone una reducción del 10 % de los posibles lectores; así que debo de haber escrito el manual para mí mismo porque me he visto obligado, a pesar de todo, a mantener una docena de fórmulas, aunque que no sean más que productos o cocientes de parámetros como el área o el perímetro.

Con todo ello no quiero sino predisponer al lector a que profundice más en el tema tras su primer contacto a través de estas pocas páginas e, incluso, a pesar de ellas. Se trata de una poderosa herramienta para todos aquellos que se encuentren en los campos de la descriptiva y necesiten realizar medidas para caracterizar los elementos que estudian.

---

# 1. *La imagen*

---

El hombre, como el resto de los primates, es un animal eminentemente visual. Este hecho ha sido esencial en el desarrollo de nuestra especie, porque nos ha llevado a que nos valgamos de la imagen como elemento primordial para relacionarnos con nuestro entorno. La imagen es un pilar fundamental en las relaciones con nuestros semejantes, de manera que la mayor parte de la información del mundo la recibimos por medio del sentido de la vista.

Hasta tal punto somos animales visuales que hemos llenado el lenguaje coloquial de expresiones referidas al uso de este sentido. Desde el clásico aforismo que dice que «una imagen vale más que mil palabras», hasta giros como «no lo veo claro» u otros como «¿lo ves?» o «se le ve venir», son alusiones metafóricas a la relación que encontramos entre la comprensión de una situación y la percepción visual.

Y si la imagen es esencial en la vida cotidiana, no digamos cuánto lo es en la investigación científica. También la ciencia apoya su trabajo en las imágenes y es posible que la biología, en especial, sea una de las materias que genere mayor cantidad de imágenes. La observación minuciosa y el análisis de estas imágenes son la base de la actividad científica que permite obtener información para plantear hipótesis y comprobarlas.

¿Cómo nos enfrentamos a la información visual? Toda imagen que percibimos es analizada por el cerebro de manera automática. El análisis aporta gran cantidad de información porque el cerebro, trabajando de forma

comparativa, permite reconocer y clasificar objetos de muy diversa complejidad; reconocemos letras en un texto, la marca y el modelo de un coche o los rostros de otros miembros de nuestra especie. Este análisis nos da idea del aspecto, forma, textura, distancia, velocidad relativa, tipo de movimiento y otras particularidades ligadas a los objetos contenidos en las imágenes. Esta capacidad humana es, hoy por hoy, inalcanzable para cualquier máquina, ordenador o sistema informático, por muy complejo que sea. Ninguna máquina tiene la capacidad del cerebro humano para clasificar objetos; ni siquiera muchos otros animales son capaces de competir con el sistema binario humano ojo-cerebro, ya que aquellos son incapaces de reconocer a sus propios congéneres.

La fantástica capacidad de clasificación de nuestro cerebro se basa, fundamentalmente, en la comparación de las imágenes. Nuestro análisis es cualitativo y casi inmediato. Si en una reunión de amigos alguien nos presenta a otra persona, inmediatamente sabemos, mirando únicamente su cara, si se trata de un hombre o una mujer; somos capaces de clasificar rápidamente el sexo de nuestros congéneres (muy pocas veces erramos) comparando el nuevo rostro con los rostros de nuestros conocidos, y extrayendo de inmediato el estereotipo «sexo al que pertenece». Los detalles comparativos en los que basamos nuestra clasificación son muy sutiles y vagos, pero lo suficientemente claros para proporcionarnos un altísimo índice de certeza, excepto en ciertas situaciones en las que el patrón se hace difícil de aplicar y se nos plantean serias dudas ante un rostro indefinido como el de un niño.

Ahora bien, el cerebro humano no es muy bueno cuando se trata de realizar un análisis cuantitativo de la imagen. Si se nos presenta un grupo de personas de pie, no tendremos demasiados problemas en ordenarlos por altura, pero tendremos ciertas dificultades para calcular la altura de uno en particular, incluso teniendo delante una referencia de

longitud. Sin embargo este tipo de cuantificaciones es muy corriente en la tarea científica básica y es aquí donde los ordenadores pueden ser de mucha utilidad, en especial cuando se precisa automatizar una tarea de cuantificación para hacerla repetitiva. Y, simplemente, en eso consiste el análisis de imagen.

Ciertamente, un equipo de análisis de imagen puede identificar y clasificar objetos, pero el procedimiento que utiliza en esta operación es, precisamente, el opuesto al que utiliza nuestro cerebro: mientras que el cerebro clasifica sin medir, por comparación del problema actual con los datos acumulados con anterioridad, el equipo de análisis de imagen mide primero, obtiene datos numéricos de la morfología (área, perímetro, longitud, anchura) y las características ópticas (color, densidad óptica) y, en función de esos parámetros, clasifica los objetos.

## **1.1 Análisis de imagen y procesado de imagen**

El término «análisis de imagen» hace referencia al estudio realizado sobre la imagen con el fin de obtener información de ella. En principio, no se trata de obtener específicamente datos cuantitativos o cualitativos. Pero, dado que para nosotros es más complicado apreciar las dimensiones de las cosas y que nos es más costoso medir un objeto que recordar su forma, el tiempo ha ido relacionando casi unívocamente el término «análisis de imagen» con la obtención de información cuantitativa.

Así pues, se podría definir nuevamente el término de análisis de imagen como un «proceso» mediante el cual se extrae información cuantitativa de la imagen. Por otra parte, esta definición no implica que el proceso deba realizarse de una manera especial; simplemente se extrae información cuantitativa de la imagen. La obtención manual de un dato a partir de una fotografía utilizando una regla o un pie de

rey también es un análisis de imagen. Sin embargo, tal y como hoy en día es entendido, el análisis de imagen es un proceso llevado a cabo por un sistema informático, capaz de extraer de forma casi instantánea toda la información relevante contenida en una imagen determinada.

Deberíamos hacer una matización ahora que hemos introducido el ordenador digital como herramienta primordial en análisis de imagen porque se tiende a confundir el concepto de análisis de imagen con el de procesado de la imagen. La diferencia queda bien patente en la definición apuntada más arriba: un analizador de imagen siempre cuantifica y, por lo tanto, el resultado del análisis de imagen siempre es una tabla de datos, una gráfica o cualquier representación de los datos numéricos. El procesado de imágenes, sin embargo, siempre produce otra imagen como resultado de la operación; en este caso se pretende, por lo general, mejorar la calidad de una imagen para facilitar la observación de determinados detalles. Un sencillo ejemplo de procesado de imagen que solemos ver con cierta indiferencia es el de los mapas meteorológicos de temperaturas, en los que se colorean los mapas con diversos tonos cálidos (en la gama de los rojos) o fríos (en la de los azules) para facilitar la observación del espectador. Dentro del trabajo científico también se utiliza este sencillo sistema para destacar elementos de la imagen; así, es frecuente encontrar coloraciones con falso color en gamas cálidas o frías para destacar actividad cerebral o regionalización de estructuras en imágenes radiográficas; incluso se utiliza con éxito en la divulgación científica, para hacer más bonitas las imágenes obtenidas por el microscopio electrónico que, como todo el mundo sabe, se obtienen en el más absoluto blanco y negro. La razón de este maquillaje colorista se encuentra en que el ojo humano aprecia mucho mejor los contrastes cromáticos que las diferencias de tonos grises, tal y como lo atestigua la anatomía de la retina dotada de conos y bastones.

El procesado de imágenes puede ser útil, imprescindible en ocasiones, como un paso previo al análisis de la imagen. De hecho, mediante esta técnica se pueden destacar aquellos detalles de la imagen que se quieren medir, o eliminar aquellos otros que dificulten o enmascaren los elementos más esenciales. Es obvio que cualquier modificación de la imagen puede suponer la alteración de la información allí contenida y, por ello, cuando el procesado es un paso previo al análisis, debemos valorar si las modificaciones que se puedan producir en la imagen afectan a los parámetros de nuestro interés.

Un ejemplo biológico que puede resumir lo expuesto hasta el momento es el análisis cariotípico de un individuo cualquiera (fig. 1.1). El proceso comienza con la paralización de las células en la metafase de la mitosis, lo que normalmente se consigue con la adición de un veneno de los microtúbulos como la colchicina que impide que prosiga el reparto cromosómico. A continuación se deposita la célula sobre un portaobjetos, procurando que se rompa la membrana celular para que los cromosomas queden separados y extendidos sobre el portaobjetos. Se colorean los cromosomas y, por último, se obtiene una imagen, supongamos, fotográfica. Ahora ya tenemos posibilidad de analizar una imagen. Y ¿qué buscamos analizar? Pues el número y tamaño relativo de los cromosomas. Para ello los colocaremos ordenadamente en función de sus longitudes y de la posición relativa de su centrómero, y construiremos el idiograma.

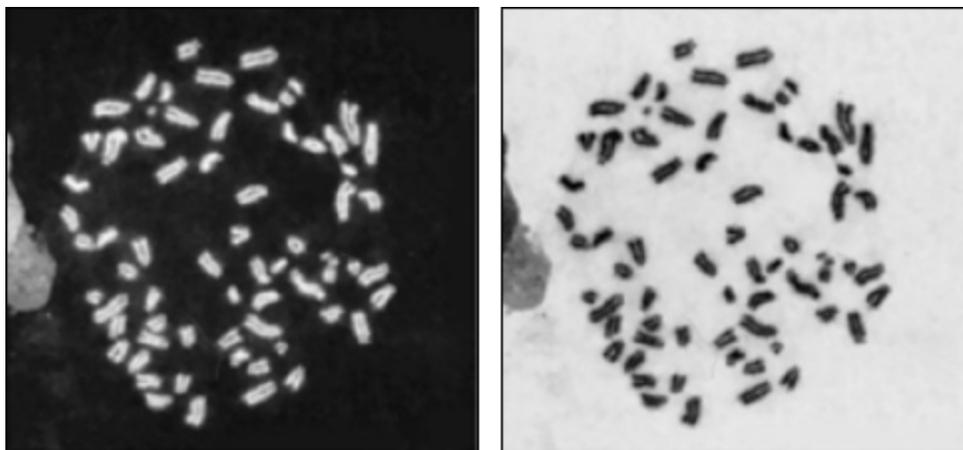


Fig. 1.1 Cromosomas de ratón. Imagen en negativo (izq.) y positivo (der.).

El positivado en papel a partir del negativo fotográfico (que es, en realidad, la imagen captada más próxima a la original) ya es un procesado de imagen que consiste en la conversión de las partes negras de la imagen en blancas y viceversa. Este procesado tiene como único objetivo que tengamos una representación visual de los cromosomas lo más semejante posible a como los vemos a través del microscopio.

Si comenzamos nuestro análisis de imagen por el recuento de cromosomas, enseguida obtendremos el dato numérico. Es un análisis de imagen sencillo pero un análisis al fin y al cabo; incluso si algún cromosoma ha caído superpuesto a otro y sus brazos se cruzan, nuestra pericia técnica nos permite detectar que son dos elementos distintos y anotar dos marcas en vez de una. Pero si pretendemos ordenar los cromosomas por tamaño, deberemos medir sus longitudes y, conocidas sus longitudes, recortarlos y pegarlos en el orden correcto. Dejando por el momento el problema del cálculo de la longitud de un cromosoma, para separar dos de ellos que hayan caído cruzados en la muestra, deberemos hacer dos copias de la imagen para que podamos recortar en cada copia uno de los cromosomas. Una vez recortados los cromosomas se pegan en una lámina, ya ordenados y... ¡por

fin!, ¡Idiograma conseguido! Pues bien, todas las manipulaciones y copias de la foto, los recortes y composición de los cromosomas, no son sino procesos sobre la imagen. El auténtico análisis, por ahora aplazado, es el cálculo de las dimensiones de los cromosomas, que es justamente lo que nos permite la correcta ordenación por tamaños.

No siempre se precisa del procesado de la imagen para realizar el análisis de imagen. El recuento de eritrocitos con una cámara cuentaglóbulos es uno de esos casos. La técnica preparatoria asegura que el recuento se pueda llevar a cabo con solo cargar la cámara de recuento; entonces el experimentador puede comprobar que unos discos refringentes, los eritrocitos, se encuentran esparcidos sobre una rejilla cuadrículada. El análisis acaba cuando obtenemos el número de eritrocitos contenidos en un número de cuadrículas determinado, esto es, en un área de referencia.

## **1.2 Tipos de imagen con interés biológico**

Las imágenes biológicas se generan por interacción de las ondas electro-magnéticas con los objetos biológicos. En realidad todas las imágenes cotidianas del mundo que nos rodea se generan de forma semejante, aunque nuestra apreciación de lo cotidiano a veces no nos permite percatarnos de manera consciente del mecanismo por el que un objeto se hace visible a nuestros ojos. Pero como el presente manual va dirigido especialmente a los estudiantes del área de biología, nos vamos a centrar en las imágenes que con mayor frecuencia se manejan en esta disciplina.

### *1.2.1 Ondas electromagnéticas transmitidas*

Se trata del sistema que utiliza la microscopía de transmisión. Una fuente de ondas electromagnéticas, que suele ser una bombilla en el caso de la microscopía óptica y un filamento incandescente en la microscopía electrónica (aunque en este caso la luz es un haz de electrones), genera un rayo que atraviesa la muestra biológica que se encuentra interpuesta en su camino. En la interacción de la luz con el espécimen se produce la absorción, reflexión y refracción de la luz al atravesar las distintas estructuras que componen el material biológico, con lo que la luz se desvía de su recorrido y se produce una imagen con regiones de luces y sombras.

El fenómeno de interferencia se puede incrementar con la adición de colorantes o contrastantes, según sea el caso, con distinta afinidad por los elementos de la muestra; entonces se produce la absorción de determinadas bandas del espectro de luz y de esa manera se pueden observar, en microscopía óptica, partes con diversas coloraciones que hacen más evidentes y más contrastadas las diferentes porciones de la muestra. La aplicación de contrastantes en microscopía electrónica de transmisión hace que algunos elementos de la muestra se mantengan permeables a los electrones, mientras que otros se hagan opacos a los mismos, con lo que se produce igualmente el incremento de contraste entre los orgánulos celulares. La imagen que se genera está compuesta por zonas más o menos claras, según la concentración de los colorantes o la presencia de sustancias opacas a los electrones. Nótese que las imágenes de microscopía óptica están dotadas de color, mientras que las procedentes de microscopía electrónica son imágenes monoespectrales.

En todos los casos la característica común es que la dirección del haz de luz y la posición de la muestra forman un ángulo de 90 grados. Los fenómenos de reflexión no intervienen de manera importante en la formación de este tipo de imágenes, con excepción de ciertos casos, por lo

que la imagen rara vez nos produce sensación de profundidad: se trata de imágenes, literalmente, planas.

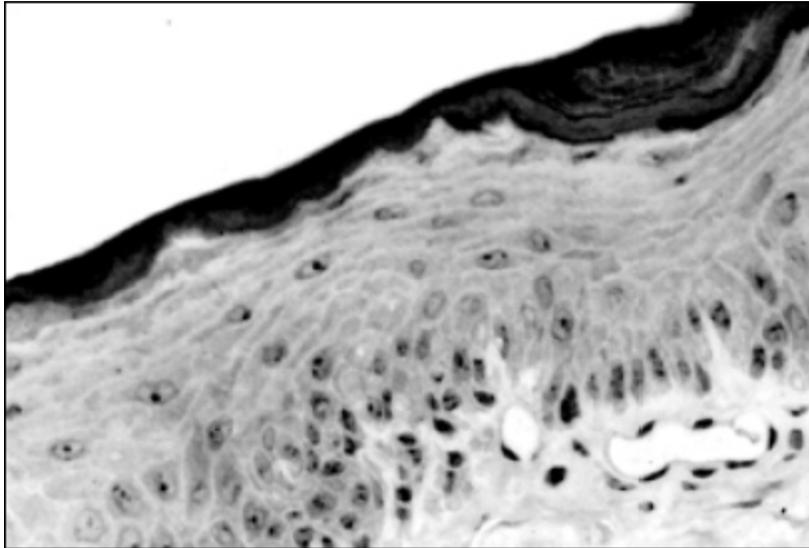


Fig. 1.2 Epitelio de la cara inferior de la lengua del ratón. Microscopía óptica de luz transmitida.

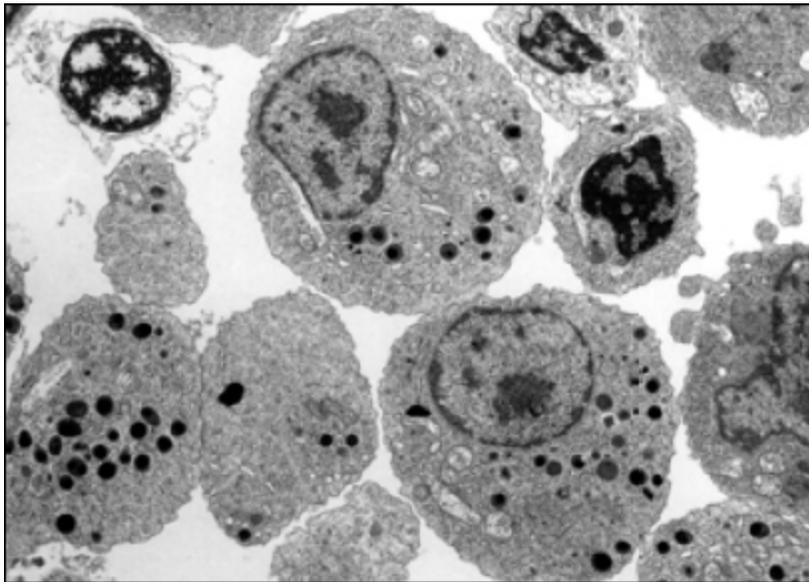


Fig. 1.3 Células hematopoyéticas de la dorada (*Sparus aurata*). Microscopía electrónica de transmisión. (Imagen cedida por el Dr. J. Meseguer. Departamento de Biología Celular. Universidad de Murcia).

### 1.2.2. Ondas electromagnéticas reflejadas

Este es el mecanismo que todos conocemos en la generación común de las imágenes que percibimos en la vida cotidiana. La luz procedente de una o diversas fuentes incide sobre los objetos y se refleja en ellos con un ángulo que depende del propio ángulo de incidencia del haz de radiación y de la geometría de la superficie del objeto. Además de las propias características de los objetos que hacen que se absorba una determinada cantidad de luz de un espectro determinado, la disposición relativa de la fuente de luz y la muestra hace que se obtengan sombras que le dan a la imagen sensación de profundidad.

Aparatos como los microscopios estereoscópicos, las lupas, nos proporcionan imágenes de este tipo. El microscopio de barrido genera imágenes parecidas a las descritas, aunque en realidad la imagen se produce por otro mecanismo más parecido al que trataremos a continuación, la emisión de ondas electromagnéticas. A pesar de todo, la imagen producida por este tipo de microscopio electrónico nos produce la sensación de que se trata de imágenes obtenidas por luz reflejada, porque la posición de las sombras simula esos dibujos artísticos al carboncillo en los que la profundidad la obtenemos por los bordes difusos del sombreado.

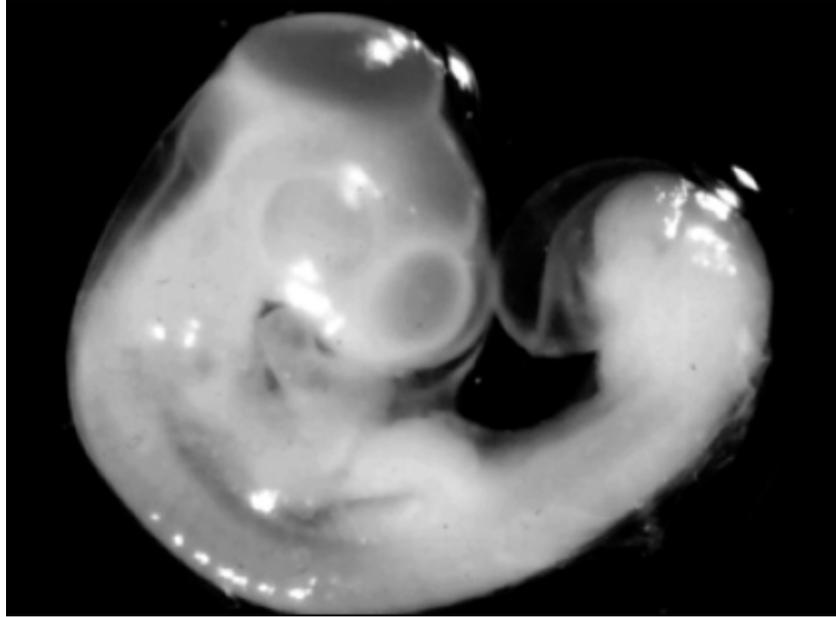


Fig. 1.4 Imagen de un embrión de pollo obtenida con un microscopio estereoscópico.

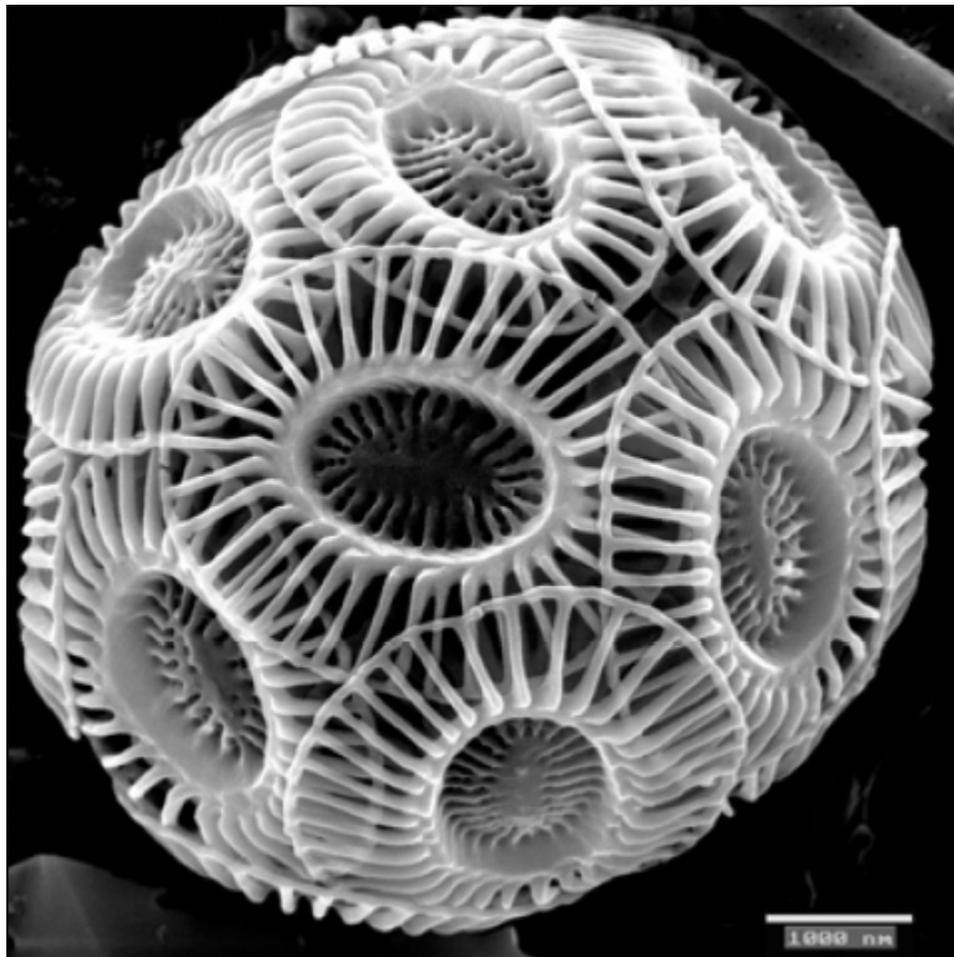


Fig. 1.5 Alga del fitoplancton (*Emiliania huxleyi*). Microscopía electrónica de barrido. (Imagen cedida por el Dr. J. Alcober. Departamento de Botánica. Universitat de València).

### 1.2.3 Ondas electromagnéticas emitidas

El tercer tipo de imagen es aquel que se produce cuando el propio objeto es el que emite la luz (o los electrones). Son muy raros los casos en los que un objeto emite luz por sí mismo, sin estimulación previa del experimentador, pero incluyen un fenómeno de interés biológico como es la bioluminiscencia. Con una cámara suficientemente sensible se puede obtener una imagen de una luciérnaga, por ejemplo, o de la traza que deja durante su vuelo.

Pero el mecanismo más común que produce imágenes biológicas de este tipo es el fenómeno conocido como fluorescencia. Determinadas sustancias son capaces de absorber fotones muy energéticos al ser iluminadas con una luz de una longitud de onda específica (luz incidente) y liberar parte de esa energía absorbida como fotones de menor energía. La forma más frecuentemente utilizada es la aplicación de fuentes de luz azul, violeta o ultravioleta, que producen la emisión de luz roja, amarilla, verde o azul por las muestras biológicas.

Podemos encontrar muy diversos instrumentos biológicos que utilizan el principio de la fluorescencia para analizar las muestras; destacamos el propio microscopio de epifluorescencia, con el que se observan muestras microscópicas tratadas previamente con colorantes fluorescentes específicos o con trazadores marcados con estos colorantes. Los lectores de electroforesis para ácidos nucleicos utilizan como principio la afinidad específica de los nucleótidos por sustancias fluorescentes, como el bromuro de etidio, para iluminarlas posteriormente con luz ultravioleta y determinar las acumulaciones de estas

moléculas en bandas según su peso molecular y la carga eléctrica.

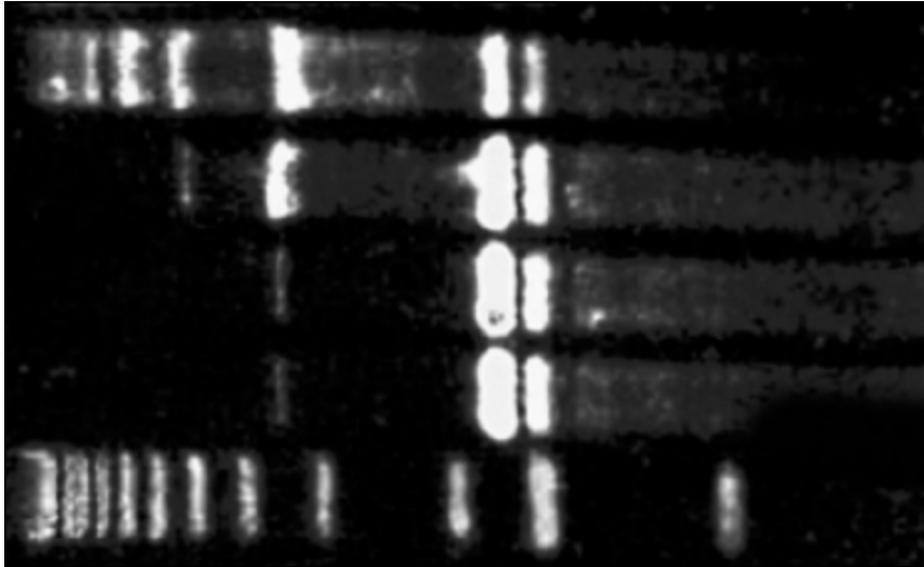


Fig. 1.6 Bandas electroforéticas de ADN en un gel de agarosa. Fluorescencia de bromuro de etidio.

La microscopía electrónica de barrido se fundamenta en un fenómeno semejante. En este caso las muestras se iluminan con un haz de electrones muy energéticos que barre su superficie; esto produce la emisión de electrones menos energéticos (los llamados electrones secundarios) que son detectados por una sonda y utilizados para generar una imagen de vídeo que se ofrece en una pantalla convencional. Como se ve, el mecanismo implica la emisión de radiación, a pesar de que la interpretación de la imagen la hagamos como procedente de una lupa por su juego de luces y sombras.

### **1.3 La imagen real y nuestra percepción del mundo**

El mundo real es tridimensional. Nuestra percepción del mundo nos da la falsa sensación de que las imágenes también lo son, a pesar de que las imágenes son

intrínsecamente bidimensionales. De hecho se trata de haces de luz proyectados sobre un plano. ¿No se trata de una paradoja? La respuesta es no.

La apariencia tridimensional de las imágenes que nosotros percibimos se debe a un procesamiento de la información visual llevada a cabo por nuestro cerebro, por medio de cuatro mecanismos básicos: las referencias espaciales, el movimiento, el mecanismo de estereopar y el juego de luces y sombras.

### *1.3.1 Mecanismo de estereopar*

La retina de cada uno de los ojos, que es una estructura bidimensional, detecta una imagen diferente del campo visual. El cerebro tiene la capacidad de sumar estas dos imágenes bidimensionales y obtener, a partir de sus diferencias, una tercera dimensión sin necesidad de ninguna otra referencia.

### *1.3.2 Referencias espaciales*

Utilizamos las líneas de fuga que determinan la perspectiva de la imagen para estimar la distancia relativa de los objetos al observador. Siempre que miramos al horizonte vemos cómo las líneas paralelas de los objetos de nuestro campo visual se hacen confluentes en algún lugar del horizonte. Además, el tamaño relativo de los objetos conocidos nos permiten interpretar a qué distancia, también relativa, se encuentran situados. Todos tenemos una idea de la estatura normal de una persona; por esa razón, podemos interpretar que dos figuras humanas se encuentran a distintas distancias cuando una de ellas es notablemente menor que la otra y no se trata de niños o individuos sentados. Incluso interpretamos como más próximos aquellos objetos que se ven enteros y más lejanos, los que

se encuentran medio ocultos por otros enteros que se sitúan delante.

### 1.3.3 *Movimiento*

En una imagen dinámica, el movimiento relativo percibido por el observador también da idea de distancia, ya que el movimiento de los objetos se percibe con una velocidad inversamente proporcional a la distancia a la que están situados: más rápidos los próximos y más lentos los lejanos. Una persona que se desplaza en un vehículo puede apreciar cómo las montañas del horizonte permanecen relativamente estáticas, mientras que las casas y los árboles desaparecen de su vista tanto más rápido cuanto más cerca se encuentran de la carretera.

### 1.3.4 *Juego de luces y sombras*

La luz emitida por una fuente luminosa puntual produce, al incidir sobre los objetos, una imagen con zonas en sombras y zonas bien iluminadas distribuidas según el relieve de los mismos. El cerebro aprovecha esta característica para extraer información sobre la dimensión y la profundidad de la imagen. Es notable que muchos sistemas de observación biológica utilizan mecanismos especiales para la creación de sombras con las que dar la sensación de relieve a las muestras, la microscopía electrónica de barrido, la microscopía de contraste interferencial o la criofractura, por ejemplo.

No obstante, no siempre percibimos en biología la tercera dimensión de las imágenes, ya que los aparatos de observación biológica más corrientes, los microscopios de transmisión (ópticos o electrónicos), producen imágenes planas. La tercera dimensión debida al grosor de las muestras queda anulada al obtenerse imágenes como