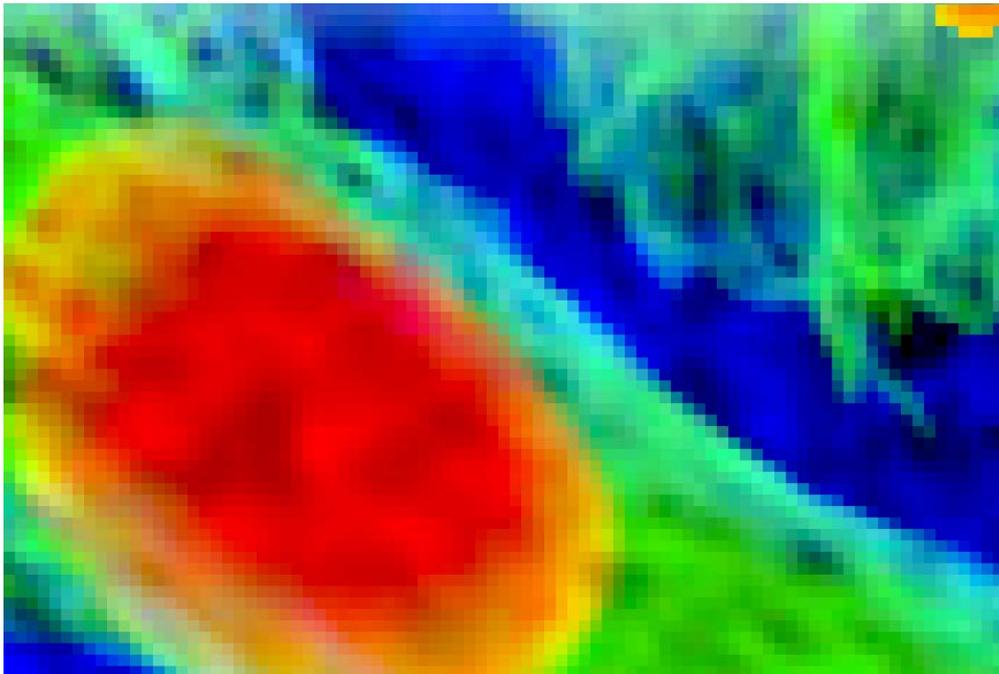


# Análisis Multidimensional de Imágenes Digitales

Enrique L. Portiansky



**Análisis Multidimensional de Imágenes Digitales**  
**Enrique L. Portiansky**  
**1ª Edición**

**30 ejemplares**

**Universidad Nacional de La Plata**  
**Calle 7 No 776**  
**La Plata**

**ISBN 978-950-34-1023-3**

**Laboratorio de Análisis de Imágenes (LAI)**  
**Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP**  
**Calles 60 y 118**  
**1900 La Plata**  
**Argentina**

Fecha de catalogación: **04/10/2013**

Fecha de Impresión: **15/11/2013**

<p>Portiansky, Enrique Leo Análisis multidimensional de imágenes digitales. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2013. 380 p. ; 29x21 cm.</p> <p>ISBN 978-950-34-1023-3</p> <p>1. Morfometría. 2. Imágenes. I. Título CDD 599.94°</p>
--

© 2013 Universidad Nacional de La Plata

**Queda hecho el depósito que establece la Ley 11.723.**

*Libro de edición Argentina*

*No se permite la reproducción parcial o total, el almacenamiento, el alquiler, la transmisión o la transformación de este libro, en cualquier forma o por cualquier medio, sea electrónico o mecánico, mediante fotocopias, digitalización u otros métodos, sin el permiso previo y escrito del editor. Su infracción está penada por las leyes 11723 y 25446.-*

*a Damián y Tatiana  
a Nelly  
a Silvia*

*a Jim*

Enrique L. Portiansky, es Médico Veterinario y Doctor en Ciencias Veterinarias, egresado de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) (Argentina) y Master of Sciences, del Instituto Weizmann de Ciencias (Israel). Es Investigador Principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Actualmente se desempeña como Profesor Asociado de la Cátedra de Patología General, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP y es el director del Laboratorio de Análisis de Imágenes (LAI) de la misma Facultad.

# Prefacio

No debe existir científico en nuestros días que no haya escuchado hablar de procesamiento y análisis de imágenes. Sin embargo, no son muchos los que han trabajado alguna vez en este campo de manera directa o indirecta. Con los recientes avances de la microscopía y la informática resulta desalentador que estos sistemas sean utilizados con el único propósito de obtener la imagen perfecta para su publicación, ya que sería un menosprecio al valor agregado que estos brindan.

El análisis de imágenes se define como la ciencia de extracción cuantitativa de datos (numéricos, geométricos, densitométricos y espectrométricos) a partir de las mismas. Desde tiempos inmemorables el hombre ha tratado de clasificar elementos y registrar variaciones para comprender fenómenos físicos, químicos o biológicos. En particular, la biología se ha basado en la medición de las formas de los organismos y sus células para comprender los fenómenos evolutivos. Hoy en día, la morfometría nos permite establecer normas que sirven para comprender los cambios fisiológicos o patológicos observados en estas estructuras.

La histología y la citología dependen del reconocimiento de las formas, donde la apreciación visual directa resulta de suma utilidad. Sin embargo, cuando debe analizarse la celularidad de un tejido o su intensidad de tinción, la observación directa carece de poder de discriminación. La histometría, en cambio, permite establecer características morfológicas de las células tales como área, perímetro, redondez, entre otras, así como determinar valores volumétricos y caracterizar parámetros de movimiento, como velocidad, dirección, aceleración de desplazamiento de células vivas o sus estructuras. Más aún, con el advenimiento de sistemas microscópicos confocales o de súper-resolución, la capacidad de medición de las estructuras resulta cada vez más precisa. En la actualidad existe una gran variedad de aplicaciones del análisis de imágenes en el campo de la medicina y la biología.

Este libro no pretende ser un compendio de información tecnológica sobre el conocimiento actual del análisis de imágenes, sino un texto dinámico, dirigido a todas aquellas personas que quieran iniciarse en este fascinante mundo imaginario. En este sentido, se sugiere al lector no leerlo como un libro de texto sino, en lo posible, tratar de encontrar en cada uno de sus párrafos sus propios ejemplos y aplicarlos en cualquier sistema microscópico o analizador de imágenes a su disposición.

Todos los temas aquí tratados surgen de la experiencia de más de 17 años en este campo. Más allá de los aspectos teóricos que se brindan, se toman ejemplos obtenidos a partir de las tareas diarias realizadas en el Laboratorio de Análisis de Imágenes (LAI) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Ojalá el lector pueda disfrutar este libro, tanto como yo lo disfruté al escribirlo.

E.L.P.

La Plata, Argentina. Octubre de 2013

# Agradecimientos

Quisiera agradecerle a todos los que desde 1995 me han acompañado en este desafío de adentrarme en el mundo del análisis de imágenes y me permitieron hacer realidad la redacción de mi primer libro. A la Agencia Japonesa JICA, por haber comprado mi primer programa de análisis y microscopio de investigación, confiando que le íbamos a sacar el mejor provecho posible. A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina, por haberme brindado un espacio que hoy cuenta con varios microscopios y centrales de análisis, dando origen al Laboratorio de Análisis de Imágenes (LAI). Al Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación Argentina, por haberme brindado subsidios para la compra o actualización de equipamiento. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET), por creer que mi trabajo de investigador en el campo de la patología morfológica tiene un verdadero valor. A mis colegas y personal técnico de la Cátedra de Patología General, por su diaria interacción y provisión de material para este libro. A los más de 60 pasantes que han transitado por nuestro laboratorio para aprender las técnicas de morfometría e intercambiar conocimientos de diferentes áreas. A G. Casanovas y Bioanalítica Argentina, por haberme dado la oportunidad de transmitir mis conocimientos, a través de cursos de difusión, a lo largo y ancho del país. A Olympus Latinoamérica, por haberme ayudado a cruzar la frontera argentina para brindar cursos por todo el continente americano, permitirme perfeccionar en Estados Unidos y Europa, así como por subsidiarme la compra de equipamiento. A H. Mendoza por hacer el mantenimiento de los equipos "in situ" y "on line" y siempre aportar información de último minuto en el tema. A E. Gimeno, C. Barbeito y R. Goya, con los que hemos publicado nuestros hallazgos aplicando diferentes técnicas morfológicas. A C. Zanuzzi y F. Nishida, a quienes tuve cerca para abrumarlos con la morfometría. A P. Guerstein, quien constantemente me ha alentado con la escritura de este libro y realizó la edición correctiva de algunas de sus páginas. A F. Zyserman, por su apoyo matemático y a C. Romero, por su ayuda en la corrección. A los "Sextarios" que siempre están. A S. Monteoliva, con quien comenzamos midiendo fibras de sauce y continuamos caminando juntos por la vida; sus sabios consejos me impulsaron a escribir este libro. A mi familia, por su apoyo incondicional de todos los días.

Todas las imágenes microscópicas fueron capturadas en nuestro laboratorio o provistas por científicos que han trabajado con nosotros, cuyo nombre se menciona en el epígrafe correspondiente. Para la captura de las imágenes se utilizaron microscopios Olympus (BX50 con sistema fluorescente y eje Z y platina motorizados y confocal FV1000) y cámaras Olympus (DP71) o QImaging (Evolution-VF). Las imágenes fueron capturadas, procesadas y analizadas con los programas cellSens Dimension v1.6 (Olympus), ImagePro Plus v6.3 (Media Cybernetics) e ImageJ v1.46r (NIH). Para la deconvolución de las imágenes también se utilizó el programa Autodeblur & Autovisualize 2.0 (Media Cybernetics). Algunas imágenes fueron modificadas utilizando Corel Draw 15.0 (Adobe). Algunas de las imágenes no microscópicas fueron obtenidas de archivos personales propios o de espacios de dominio público en Internet. Las ilustraciones tomadas de sitios privados de Internet fueron reconocidas en el epígrafe de la figura correspondiente.

# Tabla de contenidos

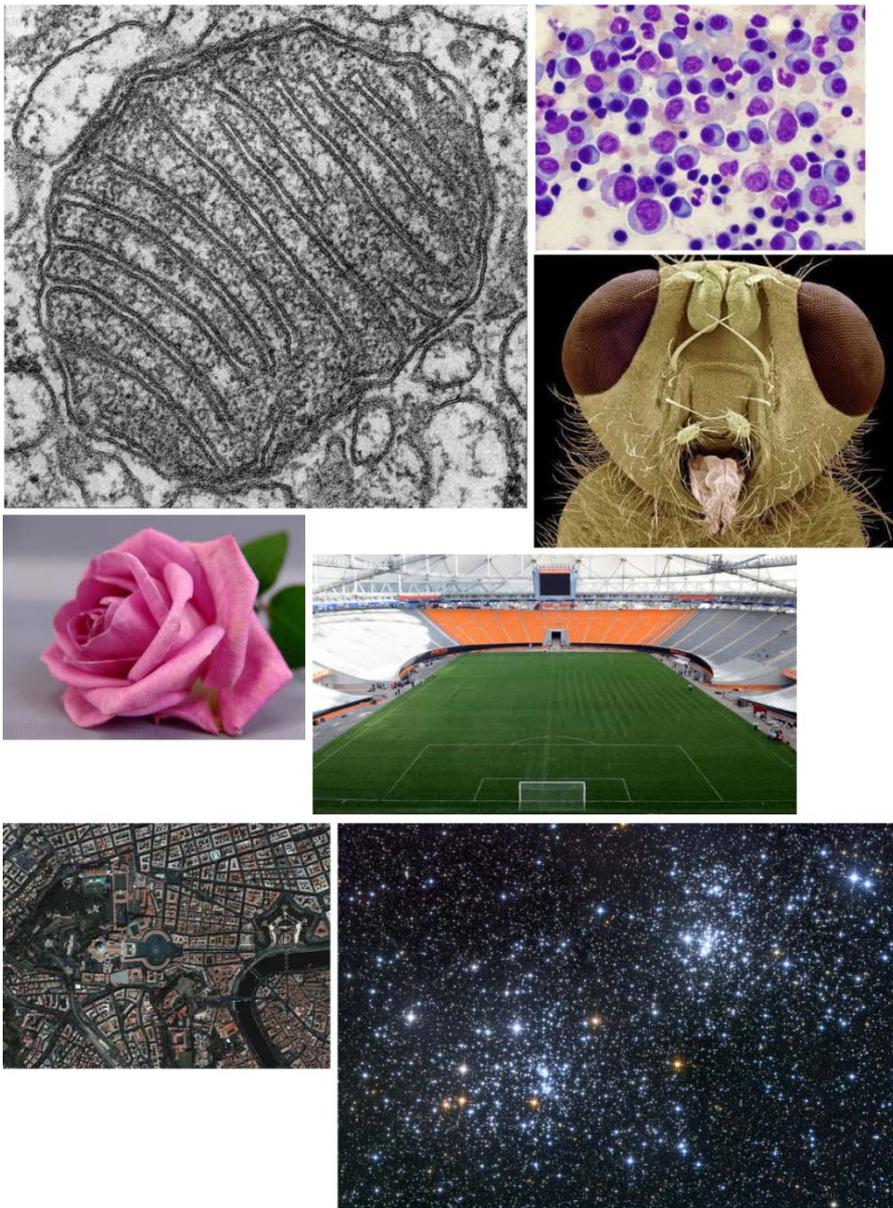
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
<b>GENERALIDADES DE LAS IMÁGENES.....</b>	<b>1</b>
LAS IMÁGENES.....	2
ESTRUCTURA DEL OJO.....	2
ILUSIONES ÓPTICAS.....	5
<i>Ilusiones de tamaño y longitudes.....</i>	5
<i>Ilusiones de direcciones y posiciones.....</i>	6
<i>Ilusiones de curvaturas.....</i>	7
<i>Ilusiones de contrastes.....</i>	9
<i>Ilusiones de color.....</i>	10
TIPOS DE IMÁGENES.....	11
ATRIBUTOS DE LOS PÍXELES.....	12
CLASES DE PÍXELES.....	15
EL COLOR.....	16
RESOLUCIÓN.....	22
COMPRESIÓN DE LAS IMÁGENES.....	24
DIMENSIÓN DE LAS IMÁGENES.....	29
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>34</b>
<b>PREPARACIÓN DEL MATERIAL.....</b>	<b>34</b>
EL MATERIAL A ANALIZAR.....	35
REQUERIMIENTO DE LAS IMÁGENES.....	35
ARTEFACTOS.....	38
ERRORES SISTEMÁTICOS Y ALEATORIOS.....	51
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>54</b>
<b>CAPTURA DE IMÁGENES.....</b>	<b>54</b>
FORMAS DE CAPTURA.....	55
HISTORIA DEL MICROSCOPIO.....	55
CARACTERÍSTICAS DE LA LUZ.....	58
FUNCIÓN DE DISPERSIÓN PUNTUAL (PSF).....	61
FUENTES DE LUZ.....	65
FLUORESCENCIA.....	70
TIPOS DE SISTEMAS MICROSCÓPICOS.....	73
<i>Microscopía Óptica.....</i>	74
<i>Microscopía Confocal.....</i>	75
<i>Microscopía de Disco Giratorio (Spinning Disk).....</i>	78
<i>Microscopía de Fluorescencia de Reflexión Interna Total (TIRFM).....</i>	80
<i>Microscopía Confocal Multifotónica.....</i>	81
<i>Microscopía de Súper-resolución.....</i>	83
<i>Microscopio electrónico.....</i>	85
<i>Microscopio de Fuerza atómica.....</i>	88
ANATOMÍA DEL MICROSCOPIO.....	89
<i>Objetivos.....</i>	90
Apertura numérica.....	98
Patrón de Airy.....	100
Criterio de Rayleigh.....	103
Criterio de Nyquist.....	109
<i>Medio de inmersión.....</i>	111
<i>Condensador.....</i>	113
<i>Filtros del microscopio.....</i>	114
<i>Oculares.....</i>	115

<i>Platina</i> .....	117
<i>Filtros de luz fluorescente</i> .....	118
<i>Adaptador de cámara</i> .....	121
CÁMARAS DE VIDEO.....	121
<i>Rango dinámico</i> .....	131
<i>Binning</i> .....	135
<i>Digitalización</i> .....	136
CÁMARAS FOTOGRÁFICAS DIGITALES .....	138
FOTOMULTIPLICADORES.....	141
ESCÁNER.....	144
ADQUISICIÓN DE IMÁGENES.....	146
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>155</b>
<b>PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES.....</b>	<b>155</b>
GENERALIDADES .....	156
CORRECCIÓN DE DEFECTOS .....	156
<i>Expansión de contraste</i> .....	157
<i>Desuniformidad de la iluminación</i> .....	158
<i>Remoción de defectos</i> .....	161
FILTROS .....	162
<i>Proceso de filtración</i> .....	163
<i>Clases de filtros</i> .....	164
<i>Filtros de realce</i> .....	164
Filtros de suavizado .....	173
Filtros de detección de bordes .....	180
Filtros morfológicos.....	183
<i>Filtros espectrales grandes</i> .....	197
<i>Transformada de Fourier</i> .....	199
<i>Transformada Wavelet</i> .....	208
DECONVOLUCIÓN .....	212
<i>Algoritmo Wiener Invertido</i> .....	216
<i>Algoritmo Vecinos Cercanos (Nearest Neighbors)</i> .....	217
<i>Algoritmos Iterativos</i> .....	218
<i>Algoritmos Iterativos Restrictivos</i> .....	219
<i>Algoritmos estadísticos</i> .....	221
<i>Deconvolución Ciega (Blind deconvolution)</i> .....	222
MANIPULACIÓN DEL CONTRASTE.....	225
ECUALIZACIÓN .....	231
PROCESOS MATEMÁTICOS .....	233
<i>Sumatoria</i> .....	234
<i>Substracción</i> .....	237
<i>Diferencia absoluta</i> .....	238
<i>Multiplicación</i> .....	240
<i>División</i> .....	241
<i>Promedio</i> .....	241
<i>Máximos y Mínimos</i> .....	241
<i>Logarítmico</i> .....	242
<i>Raíz cuadrada</i> .....	243
<i>Cuadrática</i> .....	243
<i>Potencia</i> .....	244
<i>Exponencial</i> .....	244
<i>Inverso</i> .....	245
<i>Operadores lógicos</i> .....	245
TRANSFORMACIONES GEOMÉTRICAS.....	251
CONVERSIÓN DE IMÁGENES .....	258
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>268</b>
<b>SEGMENTACIÓN DE LAS IMÁGENES.....</b>	<b>268</b>
GENERALIDADES .....	269

SEGMENTACIÓN POR DELIMITACIÓN MANUAL .....	270
SEGMENTACIÓN POR UMBRALIZACIÓN .....	271
SEGMENTACIÓN POR COLOR .....	278
SEGMENTACIÓN POR TEXTURA .....	283
SEGMENTACIÓN POR FILTRACIÓN .....	285
SEGMENTACIÓN DE IMÁGENES MULTIDIMENSIONALES .....	286
SEGMENTACIÓN ESPECTRAL .....	288
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>292</b>
<b>MEDICIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS IMÁGENES.....</b>	<b>292</b>
GENERALIDADES .....	293
ESTEREOLOGÍA .....	294
CALIBRACIÓN .....	307
<i>Calibración espacial.....</i>	<i>307</i>
<i>Calibración de intensidad.....</i>	<i>309</i>
DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN .....	312
DETERMINACIÓN DE LA ORIENTACIÓN .....	315
DETERMINACIÓN DE LA PROXIMIDAD .....	316
DETERMINACIÓN DE LA ALINEACIÓN .....	318
DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO .....	321
DETERMINACIÓN DE LA FORMA .....	328
DETERMINACIONES MANUALES .....	331
DETERMINACIÓN DE LA INTENSIDAD.....	333
COLOCALIZACIÓN CUANTITATIVA .....	336
RECUENTO.....	341
SEGUIMIENTO DE OBJETOS (TRACKING) .....	343
MEDICIONES Y RECUENTO 3D.....	349
MACROS.....	356
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....	358
PALABRAS FINALES.....	358
<b>BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....</b>	<b>359</b>
PÁGINAS WEB CONSULTADAS .....	367
<b>INDICE DE TÉRMINOS .....</b>	<b>370</b>

# Capítulo 1

## Generalidades de las Imágenes



De lo nanométrico a lo estelar: Mitocondria (microscopía electrónica - nm); células (microscopía de luz -  $\mu\text{m}$ ); insecto (microscopía estereoscópica - mm); flor (fotografía macro - cm); estadio (fotografía panorámica - m); ciudad (imagen satelital - km); constelación (imagen telescópica - años luz).

## ***Las imágenes***

Es difícil dar una única definición de las imágenes cuando existen muchas acepciones que las definen. En términos concretos, se puede decir que son representaciones gráficas de objetos. Con mucha frecuencia se escuchan acepciones tales como **tipificación, interpretación, procesamiento, análisis y comprensión** de las imágenes que parecerían ser muy similares entre sí, pero encierran conceptos distintos. Si bien a lo largo de este libro se irán describiendo y analizando cada uno de estos términos, en breves palabras se puede decir que la tipificación de las imágenes hace referencia a la forma en cómo se representan. De esta manera, se puede hablar de imágenes analógicas o digitales, y de acuerdo con su dimensión, se clasifican en mono (1D), bi (2D), tri (3D), tetra (4D) y penta (5D) dimensionales. La interpretación es la operación que consiste en asociar los objetos y las relaciones entre los mismos con símbolos de una teoría. Concretamente, es la identificación de cada uno de los objetos que forman la imagen, de acuerdo a conceptos previamente internalizados. El procesamiento hace referencia a la elaboración, transformación o filtración, entre otros, que se realizan sobre las imágenes. El análisis, por su parte, realiza mediciones y cuantificaciones de los objetos presentes en las imágenes; es decir, al finalizar este proceso se obtiene información numérica que será interpretada de manera matemática y estadística. Finalmente, la comprensión sería la resultante surgida de la asociación de los procesos de interpretación, procesamiento y análisis, para poder juzgar los resultados encontrados.

Todo lo que nos rodea está formado por objetos, que se perciben a través de los sentidos. Las diferentes especies animales identifican estos objetos en función de sus características biológicas. Así, los murciélagos utilizan sonidos de alta frecuencia; por su parte, los perros y gatos tienen visión restringida pero un elevado sentido del olfato; las víboras identifican a su presa por sensores de calor en la piel; los peces tienen órganos sensibles a los campos eléctricos. Si bien en los pájaros prevalecen las funciones visuales, no tienen la misma configuración del ojo humano. En los seres humanos, probablemente sea el sentido de la vista el que juegue un papel más preponderante al momento de la identificación de los objetos.

La vista se genera de los estímulos luminosos que recibe la retina, membrana compuesta por cuerpos neuronales y sus prolongaciones que, en conjunto, forman el nervio óptico que conduce los impulsos nerviosos hasta el centro de la visión. Esta membrana está anatómicamente ubicada en el fondo del globo ocular.

## ***Estructura del ojo***

Para poder comprender el funcionamiento de la visión, es necesario conocer como está constituido el globo ocular. En la figura 1-1 se observa un corte transversal del ojo. Este está constituido por tejidos firmes y humores. Su capa más externa es la esclerótica, que se identifica rápidamente por su color blanquecino, siendo el tejido que le da estructura y rigidez al globo ocular. Por la cara anterior del ojo, la esclerótica se transforma en una delgada membrana transparente, llamada córnea, que facilita la entrada de los haces luminosos al interior del órgano. Debajo de la esclerótica, y hacia el interior del globo ocular, se encuentra la coroides, una estructura formada por tejido vascular encargada de proveer los nutrientes necesarios para el funcionamiento del órgano. La capa más interna, que recubre todo el fondo del ojo se denomina retina, que a través de sus neuronas transforma los fotones del haz luminoso en impulsos eléctricos. Estos estímulos serán conducidos finalmente, a través del nervio óptico, hasta el centro cerebral de la visión.

Por detrás de la córnea se encuentra la cámara anterior del ojo conteniendo al humor acuoso, líquido que le da turgencia a la parte anterior del órgano. Detrás de éste se encuentra el iris, que por contracción delimita la apertura o cierre del orificio central denominado pupila. Caudalmente, se encuentra el cristalino, cuya capacidad de inclinación le permite enfocar los objetos que estén más alejados o más cercanos a nuestra persona. Finalmente, entre este último y la retina se encuentra el humor vítreo que baña la superficie de esta membrana nerviosa y le da turgencia a la parte posterior del ojo.

Cuando un haz de luz impacta sobre la córnea, atraviesa el humor acuoso, la pupila del iris, el cristalino, el humor vítreo y finalmente estimula las neuronas de la retina. La imagen que se forma resulta invertida luego que la luz que se desprende del objeto atraviesa la

córnea y la lente biconvexa del cristalino. Cabe mencionar, que es la córnea y no el cristalino, la membrana responsable de la mayor parte (65%) del poder de refracción total del ojo.

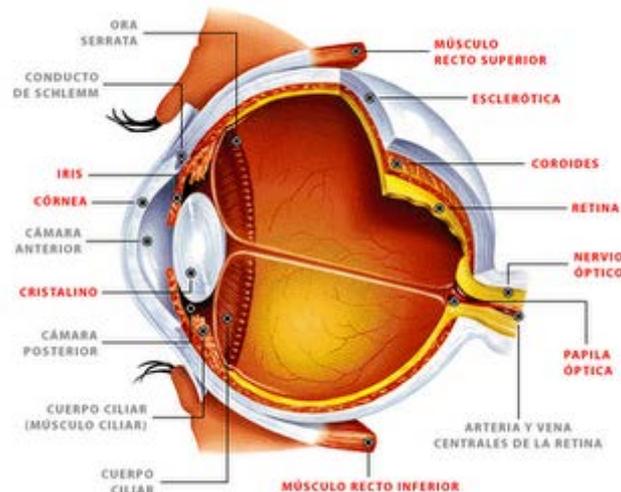


Fig. 1-1. Esquema de un corte transversal del globo ocular.

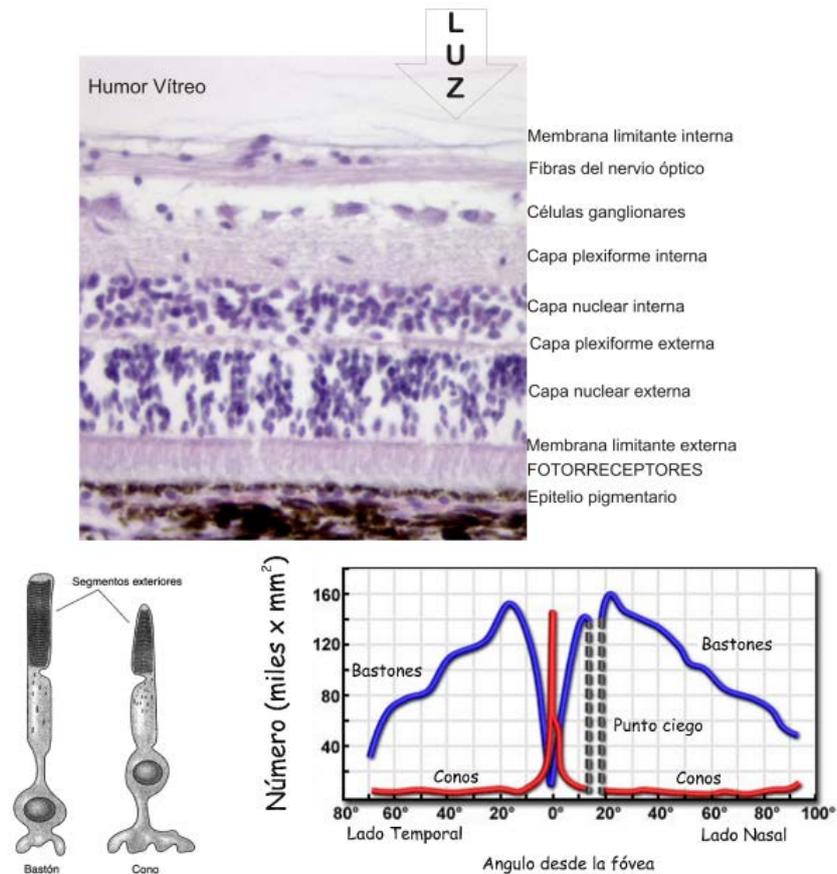
La córnea es una membrana muy delgada, suave y clara como el vidrio y tan flexible y durable como el plástico. Actúa como barrera de protección del ojo, impidiendo la penetración de microorganismos, polvo, fibras, sustancias químicas y otros materiales peligrosos. Es la encargada de controlar la cantidad de luz que ingresa al interior del órgano y de filtrar los rayos ultravioleta.

La cantidad de luz que penetra al interior del ojo a través de la pupila está controlada por el iris, diafragma circular que se abre de manera inversamente proporcional a la intensidad recibida, es decir, aumenta su diámetro cuando los niveles de luz son bajos y disminuye cuando la intensidad luminosa es alta, para proteger a la retina. A medida que cambia la intensidad de la luz, el diámetro de la pupila varía de manera refleja entre 2 y 8 mm. Cuando la iluminación es muy brillante, la pupila se estrecha y las partes periféricas de los elementos refractantes son desviados del camino óptico. Como resultado, se producen menos aberraciones de los rayos de luz que forman la imagen, logrando una imagen más nítida. Una pupila muy estrecha (2 mm) produce aberraciones de difracción (ver Capítulo 3).

Como se mencionó anteriormente, el cristalino permite enfocar objetos situados a diferentes distancias como consecuencia de un aumento de su curvatura y espesor. A este proceso se lo denomina **acomodación**. El cristalino se caracteriza por su alta concentración en proteínas, que le confieren un índice de refracción más elevado que el de los fluidos que lo rodean. Este hecho le permite refractar la luz, ayudando a la córnea a formar las imágenes sobre la retina. La retina funciona como un sensor de imágenes en las cámaras digitales (CCD) en conjunto con un convertidor analógico-digital, tal como se presenta en los sistemas modernos (ver Capítulo 3). Histológicamente, la retina está formada por varias capas de células, cada una de las cuales se comunica con las capas siguientes, para dirigir el estímulo luminoso captado por las neuronas fotorreceptoras hacia el nervio óptico (Fig. 1-2).

La capa de fotorreceptores está formada por dos tipos celulares fundamentales para capturar las diferentes longitudes de onda de la luz: los conos y los bastones. Los conos son los responsables de la visión en colores. En la región de la fovea retiniana, que es el centro de la retina carente de vasos sanguíneos, se encuentra la mayor concentración de estas células, cuya abundancia disminuye hacia la periferia. En los seres humanos existen 3 tipos de conos, siendo cada uno de ellos sensible a una determinada longitud de onda de la luz (ver Capítulo 3). Así, los conos que contienen eritropsina son sensibles a largas longitudes de onda dentro del espectro visible ( $> 560$  nm). Estas células transportan hacia el nervio óptico la información sobre las tonalidades cercanas al rojo. Las neuronas que captan longitudes de onda cercanas a los 530 nm, que son aquellas que contienen cloropsina, distinguen

las tonalidades de verde. Finalmente, existen conos sensibles al azul, ya que contienen cianopsina, que detectan longitudes de onda cercanas a los 430 nm.



**Fig. 1-2.** La retina es la membrana interna que recibe los impulsos lumínicos que posteriormente se traducen en imágenes. Arriba: corte histológico mostrando todas las capas de células y fibras que la componen. Abajo izquierda: esquema de las células fotorreceptoras del haz luminoso: cono y bastón. Abajo derecha: distribución de conos y bastones en la retina.

Los conos que son sensibles a las longitudes de onda cercanas al verde y al rojo tienen una curva de sensibilidad similar entre ellos, mientras que los conos sensibles al azul tienen una sensibilidad que representa la veintava (1/20) parte de la respuesta a los otros dos colores. Los colores finales son interpretaciones cerebrales de acuerdo a la cantidad de conos de cada tipo estimulados frente a diferentes objetos. La sensación de color se puede definir como la respuesta de cada uno de las curvas de sensibilidad al espectro radiado por el objeto observado. De esta manera, se obtienen tres respuestas diferentes, una por cada tonalidad. Cuando los tres tipos de conos son estimulados con la misma intensidad, la luz es percibida como acromática o blanca.

Por su parte, los bastones son las neuronas fotorreceptoras responsables de la visión en condiciones de baja luminosidad. Dada su elevada sensibilidad a la luz (estas células pueden ser estimuladas por la energía de un solo fotón) y a su poder de saturación frente a condiciones de exceso de la misma, este tipo de células se estimula, preferentemente, durante las horas nocturnas. Más aún, estas neuronas son insensibles al color. Se las localiza en toda la extensión de la retina, excepto en la región de la fóvea (Fig. 1-2). Al igual que los conos, contienen una opsina, pero en este caso es la rodopsina, proteína formada en parte por un derivado de la vitamina A, con mayor sensibilidad a las longitudes de onda cercanas a los 500 nm, es decir, a la luz verde azulada.

La visión humana es primariamente cualitativa y comparativa, más que cuantitativa. Se juzga el tamaño relativo y la forma de los objetos mediante un ejercicio mental de rotación de los mismos y comparación por superposición. El ojo humano es pobre al juzgar colores o intensidades de las imágenes, a menos que pueda compararlo por posicionamiento adya-

cente. Los cambios graduales en el brillo con la posición del objeto o en el tiempo por lo general son ignorados, ya que representan variaciones en la iluminación que pueden ser automáticamente compensadas. Esto significa que sólo se pueden detectar los cambios bruscos en la iluminación.

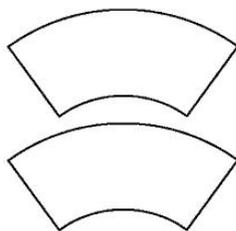
Las imágenes que se imprimen en la retina, provengan estas de una imagen bidimensional o del mundo tridimensional, son representaciones llanas en una superficie encorvada. Sumado a la deficiencia de observación en la iluminación o intensidad de los colores, esto da lugar a la formación de una variedad infinita de posibles estructuras tridimensionales. El sistema visual humano, sin embargo, normalmente realiza una interpretación correcta. Cuando se comete un error, se produce una ilusión óptica que se interpreta en la corteza visual.

### ***Ilusiones ópticas***

Las imágenes se deben analizar recurriendo a distintos sistemas de medición y recuento dado que, muchas veces, lo que se cree ver, no está ocurriendo realmente. Existen infinidad de ejemplos gráficos que generan ilusiones ópticas. El hecho de conocer previamente cual es el efecto que producen en el observador no las anula, aunque la observación prolongada pueda debilitar la distorsión. Para relacionar los posibles efectos visuales que se presenten en las imágenes, se verán a continuación algunas de las llamadas ilusiones geométricas, que suponen formas gráficas representadas sobre el plano.

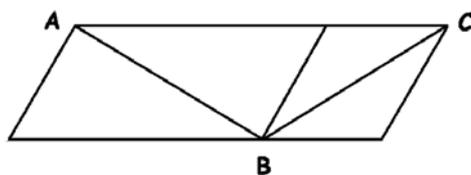
#### **Ilusiones de tamaño y longitudes**

Como se puede observar en la figura 1-3, aparentemente, la figura geométrica inferior parece ser más grande que la de arriba. La ilusión de Jastrow se logra al colocar dos objetos idénticos muy próximos, dispuestos de manera tal que uno de los dos parece más grande, cuando en realidad son iguales.



**Fig. 1-3.** Ilusión de Jastrow. Superponiendo ambas figuras se vería que son exactamente iguales.

En la figura 1-4 se observa un paralelogramo donde, aunque no lo parezca, la línea  $\overline{AB}$  tiene la misma longitud que la línea  $\overline{BC}$ .



**Fig. 1-4.** Paralelogramo con líneas de igual longitud. Las rectas  $\overline{AB}$  y  $\overline{BC}$  tienen la misma longitud

De la misma manera, la base A del trapecio superior en la figura 1-5 tiene la misma longitud que la base C del inferior.

Otra figura que ilustra este fenómeno es la T invertida o de la perpendicular, descrita por Wundt (Fig. 1-6). Su efecto es el denominado "horizontal-vertical" donde, aunque ambas líneas son iguales, la vertical siempre parecerá aproximadamente un 30% mayor que el horizontal.

En la ilusión de la figura 1-7, el segmento vertical B parecería ser más largo que el segmento A. Esto se debe a la perspectiva lineal, pero podría también deberse al relativismo entre los espacios llenos y vacíos.

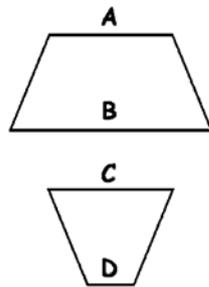


Fig. 1-5. Trapecios con bases iguales. Las bases A y C tienen la misma longitud.

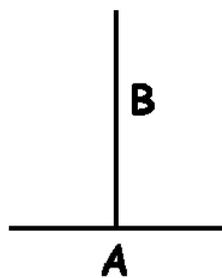


Fig. 1-6. T invertida de Wundt.

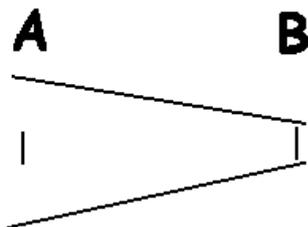


Fig. 1-7. Efecto de las vías del tren.

Finalmente, el círculo rodeado por otros más grandes en la figura 1-8 izquierda, parecería ser menor al circunscrito por otros más pequeños. Cuando se retiran todos los círculos periféricos, la ilusión desaparece. Esta es una situación bastante frecuente al observar cortes de tejidos donde una misma célula puede estar rodeada por otras de mayor o menor tamaño.

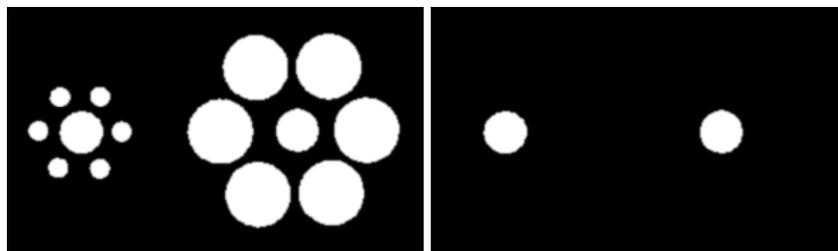


Fig. 1-8. Círculos circunscritos. Se observa que al quitar los objetos en torno a los círculos centrales, estos son exactamente iguales.

### Ilusiones de direcciones y posiciones

En la ilusión de Zöllner (Fig. 1-9), pequeños cuadrados negros y blancos se disponen en filas de manera equidistante entre sí. A su vez, la disposición de los cuadrados es distinta para las diferentes filas superpuestas. Esta distribución ejerce un efecto inductivo, sugi-

riendo al observador que las líneas que separan las filas no son paralelas. Más aún, parecería que las líneas de la misma fila de cuadrados negros fueran divergentes. De esta manera, queda alterado el paralelismo geométrico que no se restituye hasta que desaparecen los elementos distorsionantes.

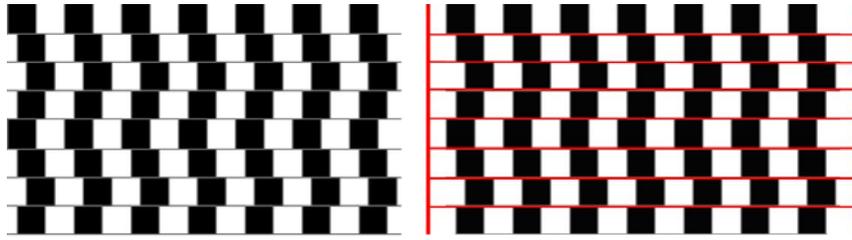


Fig. 1-9. Ilusión de Zöllner. Al aplicar rectas paralelas de otro color se anula el efecto.

La ilusión de Poggendorff consiste en el efecto óptico que se produce cuando una línea inclinada queda interrumpida, lo cual hace pensar que los segmentos resultantes no pertenecen a la misma. Al observar la figura 1-10, parece que la prolongación de la línea ubicada a la izquierda del rectángulo vertical se corresponde con la línea B, cuando en realidad es la prolongación de C. El efecto logrado por Johann Poggendorff en 1860 es producido por el "vacío" que existe entre las dos verticales paralelas que, al interrumpir la dirección de la recta oblicua, genera la sensación de quebradura o de desplazamiento. Este impacto se observa en la naturaleza cuando un mismo cuerpo se encuentra en dos fases (aire-agua) dando lugar al principio de la refracción (ver Capítulo 3).

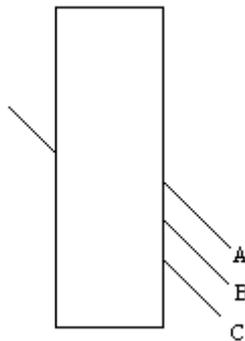


Fig. 1-10. Ilusión de Poggendorff.

### Ilusiones de curvaturas

En este tipo de ilusiones las curvas se ven distorsionadas por efecto de "distractores" del fondo. Sin embargo, la ilusión por curvas también se puede lograr de acuerdo con su posición en el espacio. En la figura 1-11 se pueden observar una serie de 3 arcos de distinta longitud. A primera vista se podría decir que el arco superior está más curvado que los otros y que el inferior es prácticamente plano. Sin embargo, todos los arcos tienen exactamente el mismo radio.



Fig. 1-11. Arcos de igual radio.

En 1861, Ewald Hering generó una distorsión óptica al generar la apariencia curvilínea de rectas paralelas (concavidad), cuando las líneas distractoras o inductoras eran convergen-

tes (Fig. 1-12, superior). En 1986, Wilhelm Wundt modificó la ilusión invirtiendo la curvatura de las paralelas. Con esta técnica se produce una desviación progresiva, semejante a la de Zöllner con las paralelas (Fig. 1-9), pero transformándolas en curvas (convexidad) (Fig. 1-12, inferior). Eliminando las líneas inductoras, desaparece el efecto ilusorio.

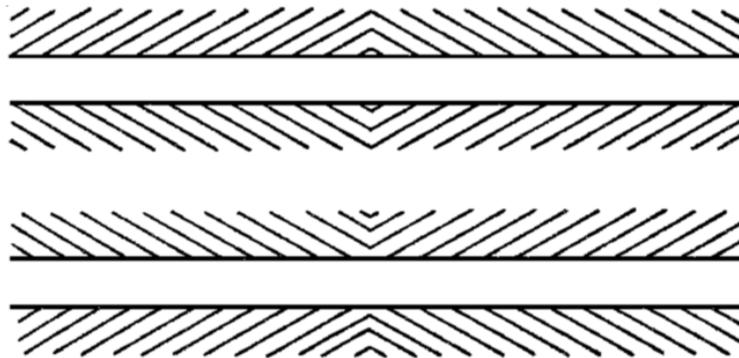


Fig. 1-12. Curvatura de paralelas. Superior (Hering). Inferior (Wundt).

En el lado izquierdo de la figura 1-13, se pueden ver líneas dispuestas en sentidos oblicuos divergentes. En el centro de la figura, se inscribe una estructura que parecería no ser circular. Para determinar lo, existen varias soluciones posibles. Una de ellas incluiría el trazado mediante un compás. Este procedimiento sería el más apropiado, ya que no sólo se estaría analizando subjetivamente la muestra, sino que además, se la podría delimitar o medir. Para lograr una rápida apreciación, se podría pintar el interior del sector central o borrar todas las líneas distractoras del fondo, ya que distorsionan al círculo. De esta manera se produciría una sensación más precisa acerca de la forma.

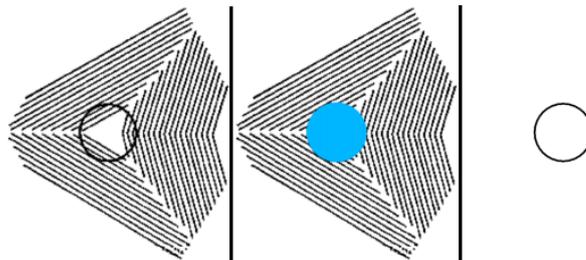


Fig. 1-13. Círculo inscrito. Al desaparecer las rayas del fondo, ya sea pintando el aro central (centro) o por eliminación de las mismas (derecha), desaparece el efecto óptico.

¿Cuál de los dos puntos de color presentes de la figura 1-14 (izquierda) se encuentra en el centro geométrico de la circunferencia exterior? A simple vista parecería ser el celeste, que se encuentra entre los dos arcos. Sin embargo, trazando dos diámetros perpendiculares (Fig. 1-14, derecha), se comprueba que no es cierto.

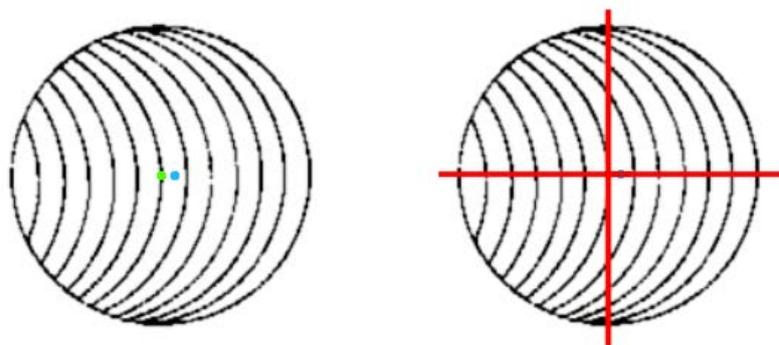


Fig. 1-14. Centralización en las curvas. Las líneas rojas atraviesan el punto central (verde).

## Ilusiones de contrastes

El fenómeno de los contrastes, tanto de las tonalidades como de las intensidades, produce fenómenos visuales muy llamativos. En ellos interviene la ilusión visual por influencia comparativa con un testigo, que generalmente forma parte del fondo de la imagen. El estímulo próximo de un tono muy oscuro, puede resaltar con mayor luminosidad un color medio. La figura 1-15 muestra unos puntos negros que cambian constantemente. Este fenómeno tiene gran relación con la ilusión de los cruces grises denominada la "Parrilla de Hering". Los puntos negros aparecen cuando los conos o bastones retinianos los detectan fuera del enfoque centrado en la fovea. Este es un invaluable ejemplo para cuando se quieren cuantificar objetos claros inmersos en un fondo oscuro.

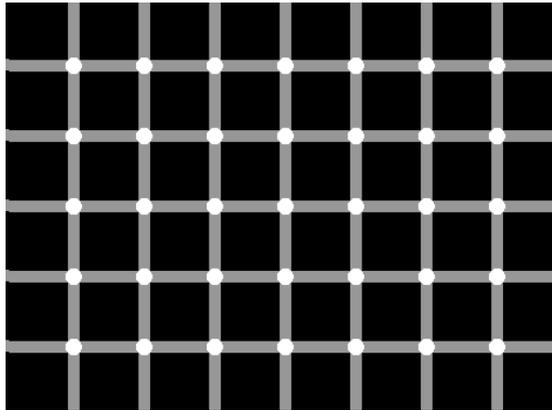


Fig. 1-15. Grilla basada en la parrilla de Hering

La escala graduada del blanco al negro que se presenta en la figura 1-16 (izquierda), tiene una tonalidad (intensidad) diferente en cada columna. Este efecto escalonado puede comprobarse cuando se realiza un escaneo de superficie (ver Capítulo 6) (Fig. 1-16 derecha). Una observación más minuciosa, permite determinar que en la unión entre dos bandas de diferente intensidad se forman pequeños bordes marginales que son más claros hacia la columna blanca (izquierda), y más oscuros hacia la negra (derecha), lo que produce un efecto de ondulaciones (Fig. 1-17).



Fig. 1-16. Patrón de escalonamiento de diferentes intensidades de gris. Cada escalón contiene la misma intensidad a lo largo y a lo ancho. A la derecha, se observa gráficamente el patrón de escalonamiento, en función de la intensidad de luz.

Las bandas de Mach surgen de una imagen en donde se conjugan zonas de mayor y menor intensidad lumínica. En este caso, en el punto de unión de las diferentes intensidades se produce una transición lumínica que va de menor a mayor graduación. En el punto donde dicha transición se hace estable, el ojo humano percibiría una banda más brillante hacia uno de los lados y otra más opaca del lado opuesto en comparación con el área que se encuentra a su alrededor (Fig. 1-17). Sin embargo analíticamente, estas diferencias de intensidad son inexistentes. Este efecto se puede ver en las imágenes radiográficas como bandas positivas (claras) o negativas (oscuras), pudiendo confundir al profesional que las interpreta.

Cuando existe una transición casi imperceptible entre el blanco y el negro (escala de grises), resulta extremadamente difícil saber cuál es el intervalo de intensidad entre uno y otro. En la figura 1-18 se observa esta transición formada por 256 intervalos (el primero

corresponde al negro [valor 0] y el último al blanco [valor 255]). A pesar de que el valor de intensidad es igual para todos los elementos de la columna (figura 1-18 inferior) se genera la sensación que la intensidad hacia el centro de la imagen es más oscura que hacia la periferia, como formando la letra C.

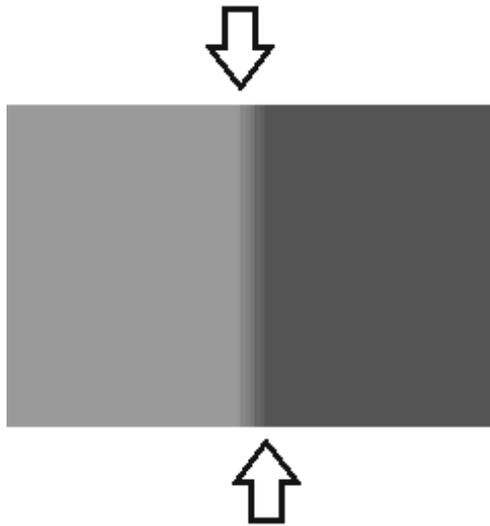


Fig. 1-17. Bandas de Mach. Las flechas indican la posición de las líneas blanca y negra que el ojo humano puede interpretar, pero que no existen en la realidad.

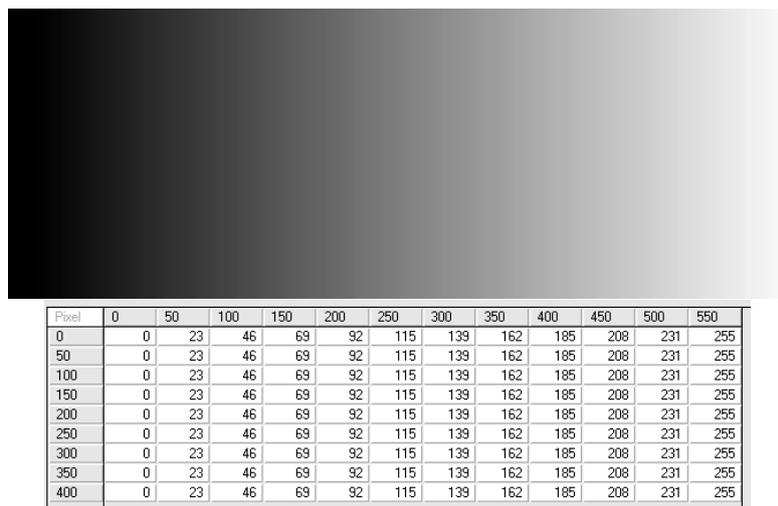


Fig. 1-18. Transición en escala de grises (arriba). Abajo: valor del píxel de cada columna en intervalos de 50 píxeles.

En una escala de grises de 256 intervalos, el ojo humano es capaz de distinguir sólo 20 de éstos. Por el contrario, la computadora distingue cada uno de ellos.

### Ilusiones de color

Las ilusiones ópticas que afectan al tono o matiz (lo que genéricamente se denomina color), pueden confundir al profesional dedicado al análisis digital de imágenes debido a la carga subjetiva que éstas puedan contener. Asimismo, los efectos de luminosidad, es decir, la propiedad de ser más brillante u oscuro, así como la saturación, o sea, la pureza de un color sin mezcla de tonos grises, incrementan aún más la ilusión.

En la figura 1-19 se puede ver un paisaje selvático en su versión monocromática o de escala de grises (izquierda) y en policromática o color (derecha). En la primera, resulta difícil encontrar al batracio, pero no así en la segunda, que se distingue fácilmente entre los otros objetos presentes. Esto se debe a que en la imagen monocromática sólo se ven las superficies en relación con la cantidad de luz que reflejan (brillo), independientemente de la calidad de la luz. En otras palabras, frente a una imagen color, el cerebro tiene mucha más información para tomar una decisión y actuar en consecuencia.



Fig. 1-19. Detalles de paisaje monocromático y color.

El color permite ver un mayor número de similitudes y diferencias entre los objetos, lo cual es fundamental cuando se analizan las imágenes. Para evitar los efectos distractores de la luz, los objetos deben estar bien delimitados al momento de cuantificar o medir, es decir, sus bordes deben ser netos, al igual que su textura y su color (crominancia) o intensidad (luminancia) y deben generar un contraste con el fondo donde se encuentren.

Para ver el efecto de la ilusión óptica de la figura 1-20, es necesario fijar la mirada en el punto negro que aparece en el centro de la misma. Sin mover la vista, se podrá apreciar cómo van desapareciendo las manchas coloreadas que rodean al punto central. A los pocos segundos de comenzado el ejercicio comienza a desaparecer el cian, al que le sigue el amarillo y finalmente el magenta, de acuerdo a sus longitudes de onda (ver Capítulo 3). Esto se debe a la llamada “fatiga retinal”, cuyo efecto es más pronunciado en objetos que no tienen bien definidos los bordes, pero que por el contrario se detectan con el movimiento de los ojos.

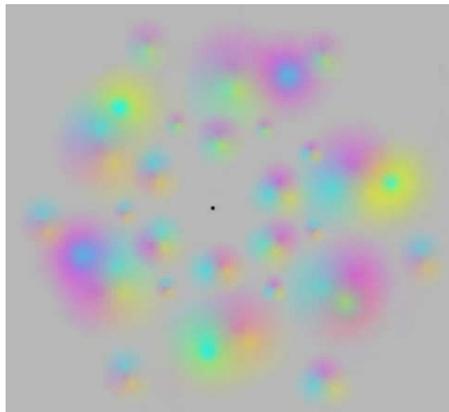


Fig. 1-20. Ilusión de desaparición de colores.

Existen diferencias destacables entre la vista humana y los programas informáticos de análisis, con referencia al tipo y la forma de obtención de la información de las imágenes. Como se describió previamente, la vista del hombre es inicialmente cualitativa y comparativa más que cuantitativa, en donde se compara el tamaño y la forma relativa de los objetos haciendo un trabajo intelectual para alinearlos o sobreponerlos. Asimismo, su sistema visual es bastante deficiente al juzgar colores e intensidades, a los que distingue sólo cuando existen cambios abruptos en los mismos. Por esta razón, dada la subjetividad que se genera al enfrentarse con distintas imágenes, resulta necesario recurrir a sistemas concretos de medición para poder analizar los objetos.

### ***Tipos de imágenes***

Existen dos tipos de imágenes: analógicas y digitales. Todo lo que se percibe con la vista es analógico: paisajes, fotografías impresas sobre papel y videos grabados sobre cintas magnéticas. La fotografía analógica es el proceso de grabar imágenes fijas sobre una superficie de material sensible, basado en el principio de la cámara oscura, en donde la proyección de la luz captada a través de un pequeño orificio se impregna sobre una superficie

cargada con granos de sales de plata, de tal forma que el tamaño de la imagen queda reducido y aumenta su nitidez. El grano fotográfico de estas imágenes químicas es irregular en forma y tamaño y se distribuye de manera aleatoria. Estas imágenes adquieren una calidad especial y una textura visualmente muy apreciada.

Por su parte, las imágenes digitales son estructuras electrónicas que se pueden capturar y ver con equipos electrónicos, tales como cámaras digitales, monitores, tabletas, etc. Son la representación matemática de los objetos en un medio electrónico, a través de un sistema binario (formado por 0 y 1). Están formadas por unidades gráficas llamadas **píxeles** que se agrupan en forma de arreglo o matriz de columnas y filas. De la combinación de colores o intensidades de luz de los píxeles, y expresados a un tamaño imperceptible por el ojo humano, se reconstruyen objetos intelectualmente reconocibles (Fig. 1-21).

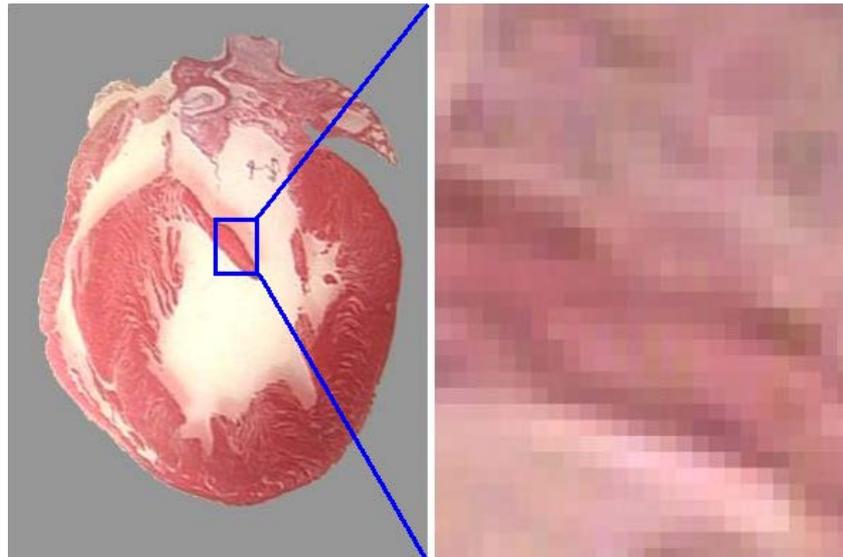


Fig. 1-21. Imagen digital. A la derecha se observa una ampliación de una válvula cardíaca (recuadro azul de la imagen izquierda). En esta magnificación se observa la matriz de píxeles, que son las unidades estructurales de la imagen, distribuidos en columnas y filas.

Una imagen vectorial es una imagen digital formada por objetos geométricos independientes (segmentos, polígonos, arcos, etc.), cada uno de ellos definido por distintos atributos matemáticos de forma, posición, color, etc. Por ejemplo, un círculo de color verde quedaría definido por la posición de su centro, su radio, el grosor de línea y su color.

Este formato de imagen es completamente distinto a aquel de los gráficos de mapas de bits (también llamados rásters o imágenes matriciales), formados por píxeles. El interés principal de los gráficos vectoriales es poder ampliar el tamaño de una imagen a voluntad sin sufrir el efecto de escalado (“pixelado”) que sufren los gráficos digitales. Asimismo, permiten mover, estirar y retorcer imágenes de manera relativamente sencilla. Su uso también está muy extendido en la generación de imágenes en tres dimensiones (3D), tanto dinámicas como estáticas. Actualmente, la computadora transforma los gráficos vectoriales en mapas de bits para poder representarlos sobre pantallas constituidas físicamente por píxeles.

### ***Atributos de los píxeles***

El término píxel, proviene del acrónimo en inglés de los términos “*Picture Element*” o elemento pictórico. Son estructuras cuadradas, que al formar una matriz, determinan imágenes rectangulares (Fig. 1-22). Todos los píxeles de una misma imagen tienen los mismos atributos.

Los píxeles presentan una ubicación espacial dentro de la imagen que se expresa en término de columnas (X) y filas (Y). El píxel que ocupa la primera posición de la imagen responde a las coordenadas 0,0 y se encuentra en el extremo superior izquierdo de la misma. Las coordenadas de la última posición, es decir, las que corresponden a la última columna

y última fila en el extremo inferior derecho de la imagen, estarán determinadas por la resolución (ver más adelante).

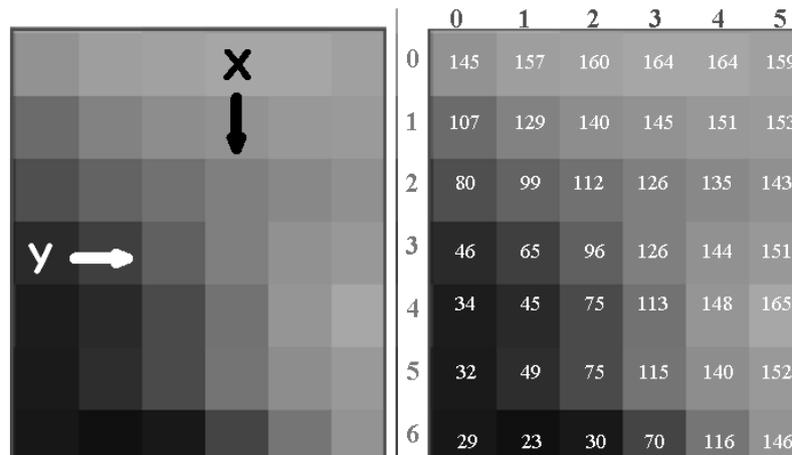


Fig. 1-22. Disposición espacial de los píxeles en la imagen y su valor de intensidad.

Cada uno de los píxeles que forman la imagen digital, almacena información eléctrica en forma de bits. Los dígitos binarios (del inglés, “binary digit” - bits) almacenados en cada píxel, determinan la profundidad de bit o profundidad de color de la imagen. Cada bit (unidad de almacenamiento eléctrico) puede presentar dos estados: encendido o apagado. Dado que matemáticamente se representan por un sistema binario, podría decirse que los bits encendidos están en estado 1 (verdadero), mientras que los que están apagados, están en estado 0 (falso). De manera análoga, se puede asumir que los píxeles encendidos son blancos mientras que los que están apagados son negros.

Un píxel que contienen un solo bit de almacenamiento puede presentar sólo dos estados (0 o 1). Si se incrementa en uno el número de bits para cada píxel, se obtienen cuatro combinatorias (0-0; 1-1; 1-0; 0-1). En la primera combinatoria se observa un píxel negro; en la segunda, uno blanco y en las dos últimas un píxel gris conteniendo 50% de negro y 50% de blanco.

Los sistemas informáticos actuales trabajan con estructuras octales (8 bits = 1 byte), como unidades básicas de información de los dispositivos de almacenamiento (Tabla 1-1). Al ser un sistema binario, esto produce una combinatoria de  $2^8 = 256$  posibilidades. En la primera combinatoria (identificada con el valor 0) todos los bits se encuentran en 0 (0000 0000) y muestran un píxel negro. En la última (identificada con el valor 255), todos los bits están en 1 (1111 1111) y representan un píxel blanco. En el intervalo entre la primera y la última combinatoria se encuentran todas las combinaciones para formar diferentes tonalidades de gris.

Tabla 1-1. Unidades de codificación de las imágenes digitales

Cantidad	Denominación de la unidad
1 bit	Bit
8 bits	Byte
$10^3$ Bytes	Kbyte (Kilobyte)
$10^3$ Kbytes	Mbyte (Megabyte)
$10^3$ Mbytes	Gbyte (Gigabyte)
$10^3$ Gbytes	Tbyte (Terabyte)

Al incrementar la cantidad de bits que se pueden asignar a cada píxel se obtienen mayores combinatorias y se incrementa el rango dinámico, como se muestran en la Tabla 1-2.

La profundidad de bits por píxel (bpp) es un concepto de la computación gráfica, que se refiere a la cantidad de dígitos binarios de información necesarios para representar el color o la intensidad lumínica de un píxel en una imagen digital. Debido a la naturaleza numérica del sistema binario, una profundidad de bit de “n” implica que cada píxel de la imagen

puede tener  $2^n$  posibles valores y por lo tanto, representar  $2^n$  colores o intensidades distintas.

Tabla 1-2. Relación entre bits y rango dinámico

BPP#	Sistema binario	Rango dinámico
1	$2^1$	0..1
8	$2^8$	0..255
12	$2^{12}$	0..4095
16	$2^{16}$	0..65535
24	$2^{24}$	0..16.7x10 <sup>6</sup>
32	$2^{32}$	0..4.29x10 <sup>9</sup>
36	$2^{36}$	0..6.87x10 <sup>10</sup>
48	$2^{48}$	0..2.81x10 <sup>14</sup>

# BPP = Bits Por Píxel

El rango dinámico es un término que se aplica preferentemente a las cámaras digitales (ver Capítulo 3). En términos generales, se puede decir que es la relación entre el máximo nivel de luminosidad que puede medir el sensor antes de saturarse y el mínimo nivel de luz alcanzado, una vez descontado el ruido de lectura. Fuera de ese rango, la cámara percibe un negro o un blanco absolutos. Con respecto a los píxeles de la imagen digital, el rango dinámico sería la expresión teórica de la cantidad de tonalidades grises o colores que un mismo píxel puede expresar.

De manera comparativa, el rango dinámico sería como la longitud total de una escalera, en tanto que la profundidad de bits sería el número de escalones, si bien su altura puede variar de acuerdo a su ubicación en el rango. En la parte baja de la escalera (oscuridad), los escalones son escasos en número y muy altos y, conforme se va ascendiendo (luminosidad), éstos se hacen más numerosos y más bajos. Si se requiere de una escalera más alta habrá que añadir escalones. Lamentablemente, no es posible incrementarlos sólo en la parte baja, donde se necesitaría un mayor número de ellos. Los nuevos escalones tendrán que distribuirse de manera desigual a lo largo de toda la escalera, acumulándose preferentemente en la parte alta, donde menos se necesitan. El valor del rango dinámico, de acuerdo a la intensidad de luz o color, es el valor final del píxel.

Tanto la posición del píxel dentro de la matriz que forma la imagen, como su profundidad de color, que le da un valor numérico de intensidad de luz, son datos fundamentales que constituyen la base del análisis de imágenes. Cabe aclarar que el píxel no es una unidad de medida, sino una unidad de representación. Volviendo al ejemplo de la figura 1-22, del lado izquierdo se presenta un arreglo de píxeles en una imagen monocromática de 8 bits. En la misma se observa claramente la forma cuadrada de los píxeles y su disposición en columnas y filas. Asimismo, se puede ver que varía su intensidad de luz, siendo más oscuros los que se encuentran en el extremo inferior izquierdo que aquellos ubicados el extremo superior derecho. Del lado derecho de la figura se repite la misma matriz pero con la asignación de un valor numérico a cada columna, a cada fila y a cada píxel individual.

En esta imagen en particular, se cuentan seis columnas y siete filas numeradas del 0 al 5 y del 0 al 6, respectivamente. El píxel con valor 99 se encuentra en la posición 1,2, lo cual significa que se localiza en la segunda columna de la tercera fila. Entre este píxel y el correspondiente al valor 135, ubicado de la misma fila (posición 4,2), existe una distancia de cuatro píxeles. De la misma manera, entre el 99 y aquel con valor 65, ubicado en la misma columna (posición 1,3), existe una distancia de dos píxeles. Si el lado correspondiente a cada píxel fuera de 1,5 cm, la distancia entre los píxeles con valores 99 y 135 sería de 6 cm. Cabe aclarar, que dependiendo de la forma de cálculo de los programas de análisis este resultado puede variar, ya que si se consideran las distancias de centro a centro de píxel, sólo existirían 3 pasos, lo cual arrojaría un resultado de 4,5 cm. Si bien ésta es la forma más correcta de expresarlo (ver Capítulo 6), a los efectos gráficos del presente ejemplo se seguirá con la medición del píxel como unidad. Si ahora el lado del píxel correspondiera a 2,54  $\mu\text{m}$ , la distancia entre aquellos con valores 99 y 65 sería de 5,08  $\mu\text{m}$ .

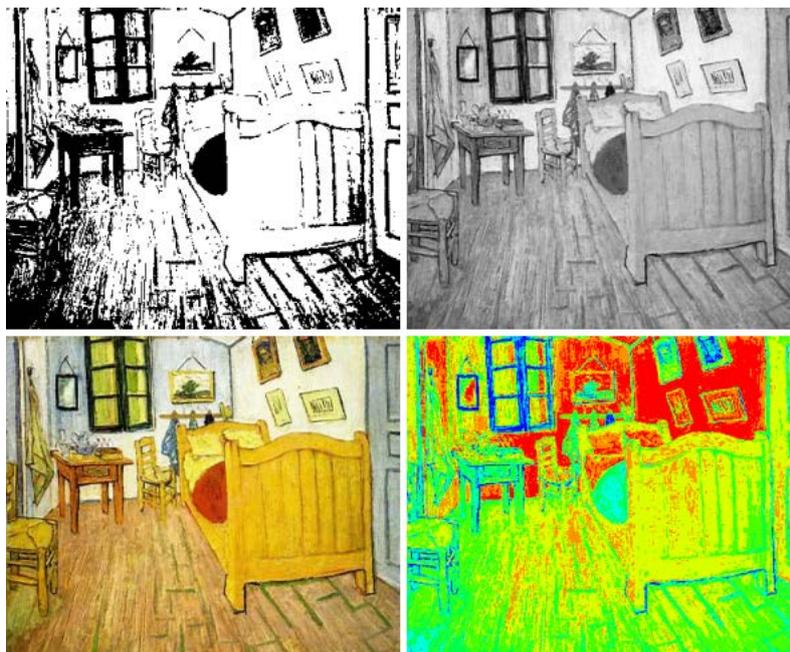
Para determinar la distancia entre las coordenadas 1,2 (valor 99) y 4,5 (valor 140) hay que recurrir al teorema de Pitágoras. El mismo indica que en un triángulo rectángulo, el cuadrado de la hipotenusa es igual a la suma de los cuadrados de los catetos. Si el valor del píxel fuera de 2 km, la diagonal que une las mencionadas coordenadas abarcaría una distancia de 11,31 km ( $8^2 + 8^2 = 128$ ;  $\sqrt{128} = 11,31$ ). Las áreas también se pueden calcular en las imágenes digitales. Así, el área comprendida entre los píxeles con valores 99 (posición 1,2), 112, 65 y 96 (posición 2,3), para un lado de píxel correspondiente a 5,8 nm, sería de 134.56 nm<sup>2</sup>. Como se observa, no importa cuál es la unidad en la que se estén expresando los valores de longitud o área, ya que la computadora sólo contará distancias entre los píxeles.

Finalmente, sólo resta saber cuál es el significado de los valores numéricos que identifican a cada píxel. En una imagen de 8 bits, los píxeles pueden asumir valores comprendidos entre el 0 y el 255. Ese dato es asignado en relación directa con la intensidad de luz incidente. En una imagen fluorescente el valor del píxel se corresponde directamente con la intensidad del fluoróforo. Si se hacen las conversiones correspondientes, los valores de intensidad de luz también pueden representar datos de densidad óptica, temperatura, altitud, etc.

### *Clases de píxeles*

La clase de píxel se refiere a la expresión visual de las imágenes las que se pueden clasificar en monocromáticas y policromáticas. Las llamadas imágenes binarias sólo contienen píxeles con intensidades blancas o negras. No obstante, siguen siendo monocromáticas.

En el mundo real, la mayoría de las imágenes son policromáticas. El microscopio de luz produce imágenes color y la mayoría de las técnicas de tinción se basan en la identificación de estructuras o localización de actividad química por medio de éstas. Aún para el material inorgánico, el uso de técnicas de polarización de la luz produce imágenes de color para delinear estructuras. El microscopio electrónico, por su parte, genera imágenes monocromáticas. Las imágenes fluorescentes normalmente son capturadas como monocromáticas y luego son pseudo-coloreadas. El pseudo-color o falso color, se utiliza debido a la limitación de la visión humana para distinguir pequeñas o sutiles diferencias en el brillo de las imágenes. El inconveniente en su uso es que puede oscurecer el contenido real de una imagen.



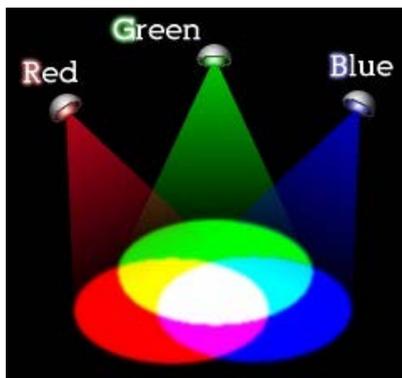
**Fig. 1-23.** Clase de imágenes. Superior izquierda: binaria; Superior derecha: monocromática; inferior izquierda: policromática o color real (RGB); inferior derecha: pseudo-color. (Pintura: El cuarto, 1888. V. Van Gogh. Imagen original obtenida de: <http://www.vangoghmuseum.nl/vgm/index.jsp?page=2796&collection=451&lang=en>).

Como se mencionó previamente, el ojo humano puede distinguir aproximadamente 20-40 tonalidades de gris en una imagen monocromática, pero cientos de colores diferentes en una imagen policromática. Los colores fuerzan a concentrarse en los detalles, lo que induce a perder la información gestáltica, es decir, la apreciación subjetiva provista por el observador (Fig. 1-23).

### **El color**

Cuando se habla de imágenes de color real se hace mención, principalmente, al sistema RGB, acrónimo que se forma por el nombre en inglés de los colores: rojo (“*Red*”), verde (“*Green*”) y azul (“*Blue*”). Las imágenes de color real están codificadas, al menos por 24 bits, que corresponden a 8 bits de cada uno de los canales que forman el RGB. Es decir, que cada píxel expresa la combinatoria de 1:256 posibilidades del rojo, del verde y del azul. De esta forma, se logra la expresión de más de los 16 millones de colores, como se viera en la Tabla 1-2.

El rojo, el verde y el azul son considerados como colores primarios desde el punto de vista físico. Los colores cian, magenta y amarillo constituyen los colores secundarios. A los primarios también se los conoce como aditivos, mientras que a los secundarios se los llama substractivos. De acuerdo con la figura 1-24, los colores secundarios surgirían de la intersección entre los primarios y en su conjunto darían lugar a la expresión de la luz total, representado por el color blanco.



**Fig. 1-24.** Intersección de colores primarios y secundarios.

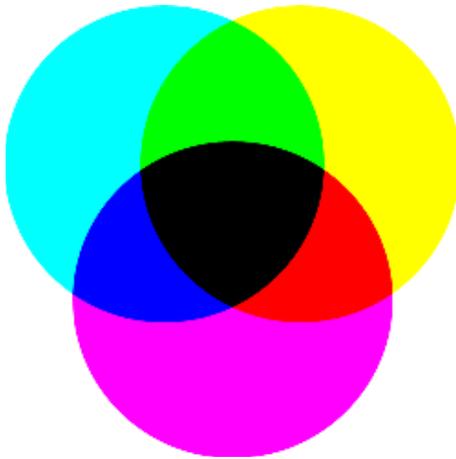
En realidad, de acuerdo a lo que se observa en la figura 1-25, los colores secundarios son filtros de luz, que sólo dejan atravesar aquellas longitudes de onda que se encuentran fuera del rango de restricción. Así, el filtro amarillo deja expresar las longitudes de onda para el verde y el rojo, filtrando las del azul; el magenta retiene el verde y el cian retiene al rojo, permitiendo el paso del azul y del verde. Cuando interactúan los tres filtros, obstruyen completamente la luz, generando la oscuridad, representada por el color negro (Fig. 1-26). También se podría decir que son substractivos porque cada uno ellos se obtiene “substrayendo” uno de los colores primarios de la luz blanca. Por ejemplo, el amarillo se obtiene quitando de la luz, la longitud de onda correspondiente al azul; el magenta, al retirar al verde y el cian, cuando se extrae el rojo. Más allá de cuál sea el verdadero concepto de la “substracción”, el efecto que se observa siempre es el mismo.



**Fig. 1-25.** Colores substractivos o filtros.

Para indicar con qué proporción se mezcla cada longitud de onda en una imagen color de 24 bits, a cada uno de los colores primarios se le asigna un valor numérico comprendido entre 0 y 255. Por ejemplo, el valor 0 para una de las tres longitudes de onda del RGB, expresados en un mismo píxel, significa que ese color no interviene en la mezcla. A medi-

da que dicho valor aumenta, significa que aporta mayor intensidad a la combinación. Por lo tanto, el rojo puro se obtiene con (255,0,0), el verde con (0,255,0) y el azul con (0,0,255). La ausencia de color, o lo que comúnmente se conoce como color negro, se obtiene cuando las tres componentes son 0 (0,0,0).



**Fig. 1-26.** La interacción entre los colores secundarios genera la oscuridad, representada por el color negro.

Si dos de los colores del RGB tienen valores de 255 y el tercero tiene valor de 0, se obtienen los colores secundarios. De esta forma, el amarillo es (255,255,0), el cian (0,255,255) y el magenta (255,0,255). Indudablemente, la luminosidad total (color blanco) se forma con los tres colores primarios en su máxima expresión (255,255,255). La figura 1-27, muestra el efecto que surge de la combinación de diferentes intensidades de cada uno de los colores que forman el RGB.

0,0,0	255,255,255	171,171,171	182,73,0
182,0,255	146,255,170	255,109,170	255,219,85

**Fig. 1-27.** Ejemplos de combinatoria de cada uno de los canales del RGB, con indicación de su valor de intensidad.

Al separar matemáticamente cada uno de los canales de la imagen color se obtienen tres imágenes monocromáticas, que al ser re-ensambladas restituyen el color inicial (Fig. 1-28). La imagen monocromática se genera extrayendo el valor correspondiente a cada canal, expresado en cada uno de los píxeles de la imagen color.

Otro modelo de color, diferente al RGB, es el llamado CMYK (acrónimo en inglés de “*Cyan, Magenta, Yellow y black*”) que es sustractivo y se lo utiliza en la impresión en colores sobre papel. El modelo CMYK se basa en la absorción de la luz. El color que presenta un objeto corresponde a la parte de la luz que incide sobre éste y que no es absorbida por el mismo.

A la inversa que en el modelo RGB, el sistema CMY original utilizaba los colores secundarios para lograr los primarios. La combinación de los tres secundarios sobre el papel generaba un tinte negro que no era el ideal. Por esta razón, el negro fue incorporado como tinta separada de los otros colores y la denominación actual del sistema lleva la sigla de CMYK.

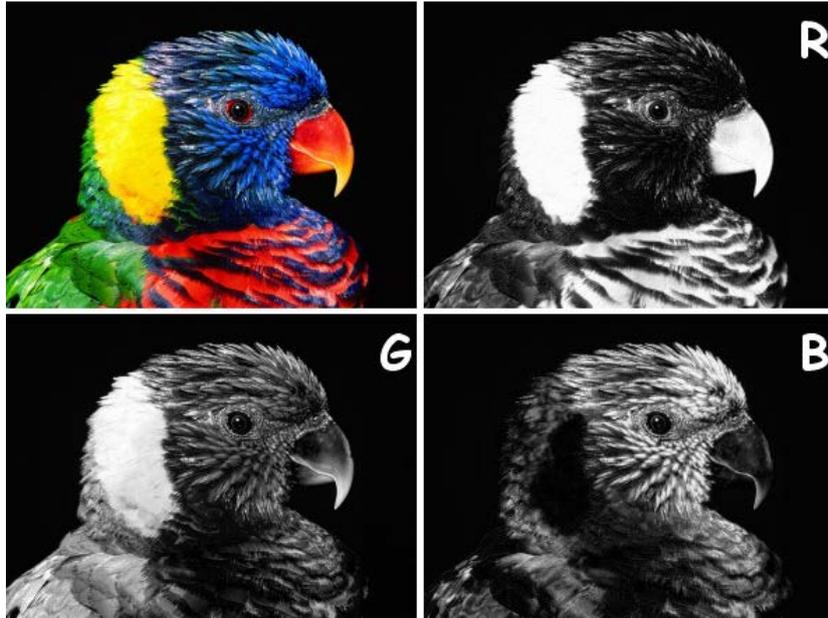


Fig. 1-28. Separación de cada uno de los canales del RGB.

La impresión a cuatro tintas genera un buen resultado con mayor contraste. Sin embargo, el color del modelo CMYK visto en el monitor de una computadora es diferente al impreso del mismo objeto. Esto se debe a que los modelos CMYK y RGB tienen diferentes gamas de colores. Por ejemplo, el azul puro del sistema RGB es 0,0,255, que resulta imposible de reproducir mediante el sistema CMYK. El equivalente más cercano en este sistema es un tono azul-violáceo. En la figura 1-29 se pueden ver imágenes comparativas de ambos sistemas. Si bien el efecto general puede ser casi imperceptible, las variaciones se notan en el brillo y la homogeneidad de los colores.



Fig. 1-29. Comparación entre imágenes coloreadas con el sistema RGB (izquierda) y el sistema CMYK (derecha), al observarse sobre un monitor.

Tanto el sistema RGB en un dispositivo electrónico, como el sistema CMYK en un soporte impreso, pueden reproducir una gran variedad de colores. Sin embargo, para la mayoría de los usuarios inexpertos, la proporción del rojo, del verde y del azul es intuitiva. Más aún, ninguno de los sistemas aditivos (RGB) o substractivos (CMYK) pueden definir la proporción de color como lo hace el ojo humano. En un intento de acomodar el sistema a un modelo intuitivo fueron creados otros sistemas de color tales como el HSL, el HSV o HSB, el HSI y el YIQ (Fig. 1-30).

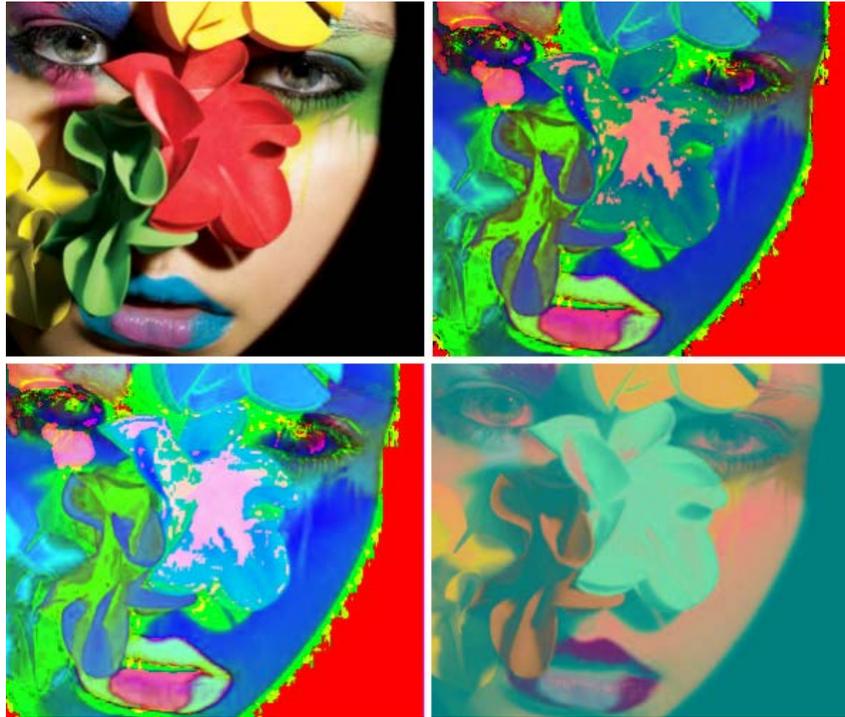


Fig. 1-30. Sistemas de color. Arriba izquierda: RGB tomado como base para la conversión a los otros sistemas; arriba derecha: HSI; abajo izquierda: HSV, abajo derecha: YIQ.

Estos sistemas son llamados cilíndricos por la forma en que se dispone su representación. El sistema HSL (acrónimo en inglés de “*Hue, Saturation, Lighting*”), el sistema HSV (del inglés, “*Hue, Saturation, Value*”) o HSB (del inglés, “*Hue, Saturation, Brightness*”), el sistema HSI (del inglés, “*Hue, Saturation, Intensity*”) y el sistema YIQ (del inglés, “*Luminance, In-phase, Quadrature*”), utilizado por el sistema NTSC de televisión), se basan en principios similares. En cada cilindro, el ángulo alrededor del eje central corresponde a la tonalidad; la distancia desde el eje hacia la periferia corresponde a la saturación; y la distancia a lo largo del eje se corresponde con la luminosidad, el valor o la intensidad (Fig. 1-31).

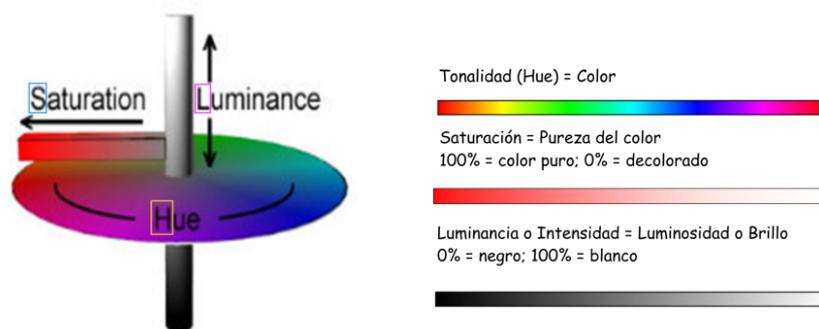


Fig. 1-31. Sistema cilíndrico de representación del color.

La tonalidad se refiere al valor puro de cada uno de los colores del RGB, sin el agregado de los otros dos canales del triplete (1..255,0,0 - 0,1..255,0 - 0,0,1..255, para el rojo, verde y azul, respectivamente), aunque también se refiere a la combinatoria de los colores substractivos. En otros términos, la tonalidad es el atributo a la sensación visual según la cual un área parece ser similar a uno de los colores primarios percibidos de manera independiente o a una combinación de dos de ellos. Por su parte, la saturación indica la pureza del color; es decir, se refiere al “colorido” de un estímulo en relación con su propio brillo. Cuanto menor sea el porcentaje de saturación de un color, mayor tonalidad grisácea tendrá y más decolorado estará. Los posibles valores se expresan del 0% al 100% (Fig. 1-32).



Fig. 1-32. Saturación del color.

La luminosidad, valor o intensidad alude al brillo del color, en relación con el brillo del blanco iluminado de manera similar. Se refiere concretamente a cuanta oscuridad (tendencia al negro) o claridad (tendencia al blanco) contenga el color. La luminosidad, valor o intensidad se expresan en valores entre el 0% y 100%. El 0% siempre corresponde al negro. Dependiendo de la saturación, el valor de 100% podría corresponder al blanco o a un color más o menos saturado.

En términos angulares, el ángulo de 0° en estos sistemas circulares corresponde al rojo, los 120° al verde y los 240° al azul. Para los colores mixtos se usan ángulos intermedios. Así, el amarillo se representa a los 60°, el cian a los 180° y el magenta a los 300°.

La aplicación más concreta de estos sistemas de color se observa en los programas informáticos que cuentan con herramientas de selección de colores (Adobe Photoshop®, Corel Draw® (Fig. 1-33), etc.). En estos programas es sencillo intercambiar entre los distintos sistemas de color.

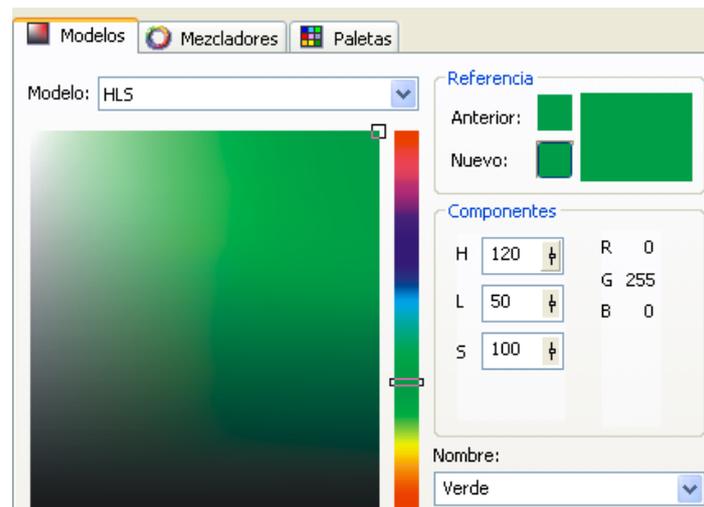


Fig. 1-33. Herramienta de selección de color en Corel Draw®.

Una imagen RGB expresada en un sistema HSI produce tres canales monocromáticos que separan las características de la imagen de manera independiente. A diferencia del sistema RGB, donde cada uno de los canales representa un color, en el sistema HSI las tonalidades están representadas en uno de sus canales (tonalidad - H). Los canales de saturación (S) e intensidad (I), expresan la variación de brillo y de oscuridad/luminosidad, respectivamente, de las diferentes tonalidades (Fig. 1-34). Este sistema es ampliamente utilizado en ciertos procesos de filtración y segmentación que serán discutidos en los Capítulos 4 y 5, respectivamente.

El sistema  $L^*a^*b^*$  es un espacio de color “oponente”, donde “L” representa la luminosidad y los colores son representados por “a” y “b”. La teoría del color oponente indica que el sistema visual humano interpreta la información acerca del color, a través del procesamiento de señales de los conos y bastones, de manera antagónica. Para el sistema visual es más sencillo registrar las diferencias entre las respuestas de los conos, que la respuesta individual de cada uno de ellos. La teoría sugiere que el rojo se opone al verde y el azul al amarillo, mientras que el negro antagoniza con el blanco en representación de la luminosidad. El sistema  $L^*a^*b^*$  está basado en el sistema de color CIE XYZ que predice cual es el poder de distribución espectral que será percibido como el mismo color. Actualmente se usa el sistema combinado CIE  $L^*a^*b^*$  (o CIELAB).



Fig. 1-34. Imagen RGB (arriba izquierda) transformada y desglosada en el sistema HSI. Arriba derecha: canal de tonalidad (H). Abajo izquierda: canal de intensidad (I). Abajo derecha: canal de saturación (S).

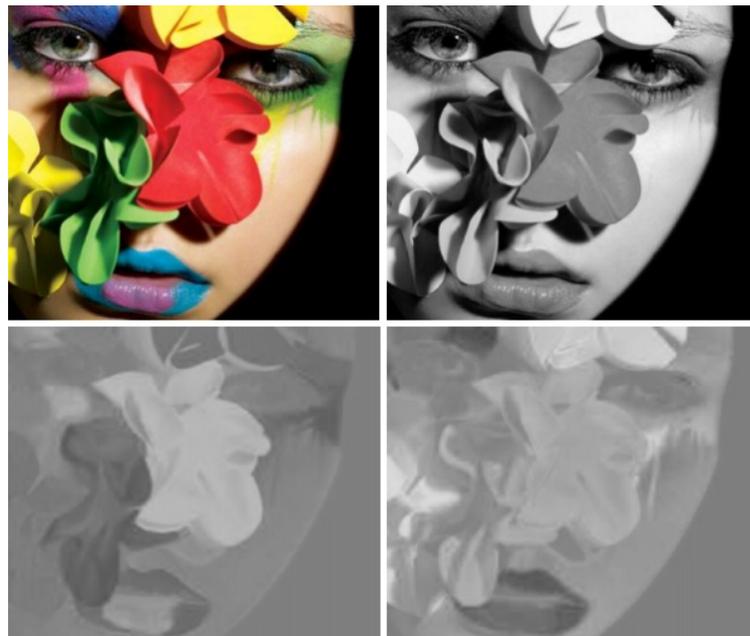


Fig. 1-35. Conversión y separación de cada una de las fases del sistema CIE  $L^*a^*b^*$ . Arriba izquierda: imagen original RGB; arriba derecha: fase  $L^*$ ; abajo izquierda: fase  $a^*$ ; abajo derecha: fase  $b^*$ .

El sistema  $L^*a^*b^*$  incluye todos los colores perceptibles, por lo que su gama supera a la de los modelos RGB y CMYK. A diferencia de estos últimos, el sistema  $L^*a^*b^*$  está diseñado para aproximarse a la visión humana, buscando la uniformidad de percepción de los colores y que su componente L se acerque a la percepción de la luz. Dado que el espectro de colores es mayor que el de los otros sistemas, se necesita agregar mayor información por píxel para obtener su misma precisión. Por esta razón, este sistema sólo puede ser expresado en 16 bits.

En el sistema CIELAB la  $L^* = 0$  representa al negro y la  $L^* = 100$ , al blanco difuso. El blanco especular puede tener un valor mayor; la  $a^*$  representa al rojo/magenta (si es posi-

tivo) o verde (si es negativo) y la  $b^*$  representa al azul (si es negativo) o al amarillo (si es positivo). La figura 1-35 muestra la extracción de cada uno de los componentes del sistema.

### Resolución

El significado del término **resolución** es controvertido, ya que depende del ámbito donde se aplique. No es lo mismo la resolución de un microscopio óptico o electrónico, que la que corresponde a una cámara de video o a una imagen digital.

En el ámbito de la microscopía, el término se aplica a la mínima distancia física existente entre dos objetos en íntimo contacto, que pueda ser detectada por un sistema óptico. El poder de resolución del ojo humano es de 0,2 mm, es decir, que para ver dos objetos separados, estos deben estar como mínimo a esa distancia. El microscopio aumenta la imagen hasta el nivel de la retina para captar la información. Sin embargo, debido a la difracción de la luz al atravesar el sistema de lentes del microscopio, la luz procedente de un objeto puntual crea una imagen anular con un patrón de difracción característico, denominado patrón de Airy (Fig. 1-36). Este consiste en una serie de anillos oscuros alternando con anillos claros y en cuyo centro, denominado disco de Airy, se alberga el 86% de la luz total del objeto (ver Capítulo 3).

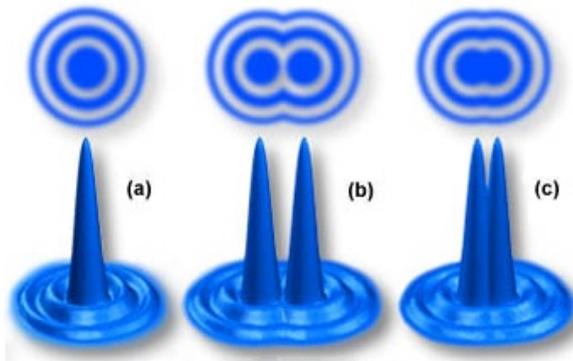


Fig. 1-36. Discos de Airy. (a) un solo objeto; (b) dos objetos separados; (c) dos objetos vistos como uno solo.

La resolución determinada por la separación entre dos discos de Airy, también se conoce como resolución lateral. Por su parte, la resolución axial se define como la distancia mínima en la que las imágenes difractadas de dos puntos se aproximan entre sí, pero que se siguen distinguiendo como dos puntos (Fig. 1-37) y se mide a lo largo del eje óptico del microscopio (eje Z), es decir, de manera perpendicular al plano de foco en el que se consideró a la resolución lateral.

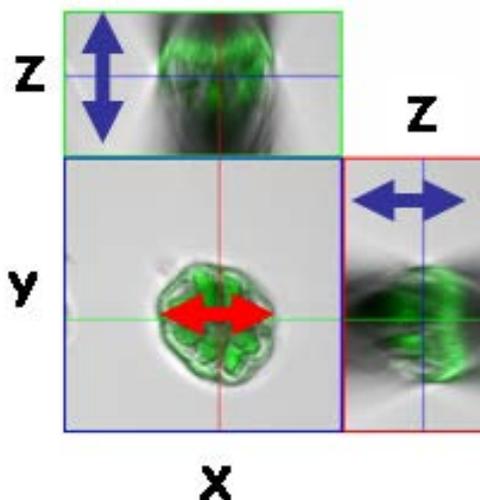


Fig. 1-37. Resolución axial. La imagen que se observa en XY se proyecta en el eje Z (XZ e YZ). La flecha roja indica los límites del objeto en su visualización XY, mientras que las flechas azules indican su espesor en la profundidad del eje Z.

Ambos tipos de resolución están condicionados por la apertura numérica (NA) del objetivo, el índice de refracción del medio que se interponga entre el objetivo y la muestra (aire, agua, aceite, etc.) y longitud de onda de la luz.

Existe también controversia en cuanto al concepto de resolución de una cámara de video. Esto se debe a que en determinadas circunstancias sólo se considera el número de fotosensores o fotodiodos activos que tenga el CCD (circuito electrónico de captura de señales luminosas), sin tomar en cuenta los filtros de color. En otros casos, se incluyen los fotosensores localizados en los bordes del dispositivo, que si bien no contribuyen con la formación de la imagen, son utilizados para medir la corriente oscura (ver Capítulo 3). Por su parte, la cantidad de fotodiodos, estará en relación directa con el tamaño del CCD, su propio tamaño y la separación entre los mismos.

Por su parte, la acepción de resolución de la imagen digital es diferente a las vertidas hasta el momento, estando definida por la cantidad de píxeles que forman su matriz o mapa de bits. Un mismo objeto podrá ser representado con mayor resolución (y por ende tendrá mayor definición), cuando la imagen esté conformada por mayor número de píxeles. Sin embargo, este valor estará determinado por la capacidad de la computadora y sus periféricos para obtenerla, mostrarla, almacenarla o reproducirla.

La resolución **axial** de la imagen digital es la cantidad de imágenes que forman la pila (del inglés, “*stack*”) en el eje Z en una imagen tridimensional (ver más adelante). Por su parte, la resolución **espacial** es la cantidad de píxeles por unidad de medida o viceversa (Px/U - U/Px), que definen las dimensiones reales de los objetos presentes en la imagen. El rango de unidades de longitud se puede expresar desde nanómetros hasta años luz, dependiendo del sistema donde se esté implementando. Para obtener esta calibración es necesario contar con una regla micrométrica, calibre o cualquier otro elemento estandarizado de referencia.

En un sistema microscópico es necesario calibrar espacialmente las imágenes para cada uno de los objetivos, tubos de expansión (adaptador de la cámara) y cámaras utilizados. Muchos programas de análisis que controlan el sistema microscópico (microscopio y cámara de video), reconocen cuáles son las características de los objetivos y del sensor de la cámara, pudiendo establecer fácilmente la calibración de la imagen en el momento de su captura.

La resolución **volumétrica** se refiere a la cantidad de imágenes de la pila, multiplicada por el espacio Z, que es aquel que se circunscribe entre dos imágenes que forman parte de dicha pila. La resolución **temporal**, en cambio, es la cantidad de imágenes tomadas por unidad de tiempo. Por su parte, la resolución **espectral** es la cantidad de señales fluorescentes que puede mostrar una imagen de manera simultánea.

Frecuentemente se confunden los términos de resolución y calidad de la imagen. La calidad de la imagen almacenada está determinada por los bits asociados a cada píxel (profundidad de bits) y por el tipo de compresión a la que fue sometida (ver más adelante). Depende también de la capacidad de discriminar bordes (*luminancia*: establecida por las tonalidades grises) y de distinguirse de los bordes (*chrominancia*: determinada por los colores). Finalmente, está también en relación con la densidad espacial de la muestra, es decir, de la cantidad de objetos analógicos por unidad de superficie, así como de la resolución óptica del microscopio. A modo de ejemplo: una imagen microscópica desenfocada, capturada con una resolución de 4080 x 3072 píxeles (12 MPx), con una profundidad de color de 16 bits y en formato TIFF sin comprimir, permitirá obtener una imagen de muy alta resolución, pero de pésima calidad.

En la figura 1-38 (lado izquierdo) se pueden observar un panel con cuatro imágenes de Albert Einstein capturadas con diferentes resoluciones, pero expresadas gráficamente en el mismo tamaño. Nótese como a medida que se reduce la resolución de la imagen comienzan a visualizarse los píxeles que la componen (“pixelado”). Sobre la derecha de la figura, se observa el tamaño real de cada una de esas imágenes, de acuerdo a su resolución.

Surge entonces el interrogante acerca de cuál debe ser la resolución apropiada para obtener un buen detalle de los objetos dentro de la imagen. En teoría, no debería haber ninguna pérdida de información durante la conversión analógico-digital. Para garantizarlo, la resolución digital debe ser igual o superior a la resolución óptica (poder de resolución del

microscopio). Este requerimiento se formula en el teorema de Nyquist, que expresa que el intervalo de muestreo, es decir, el número de píxeles en una imagen, debe ser igual al doble de la máxima frecuencia espacial presente en la imagen óptica (analógica). En otras palabras, para capturar el mayor grado de detalle, se deben utilizar dos píxeles por cada patrón de detalle en la muestra original (ver Capítulo 3). Para imágenes de alta resolución, el criterio de Nyquist se extiende a 3 píxeles por patrón. En ningún caso la frecuencia debe ser menor a estas; de otro modo se puede perder información.

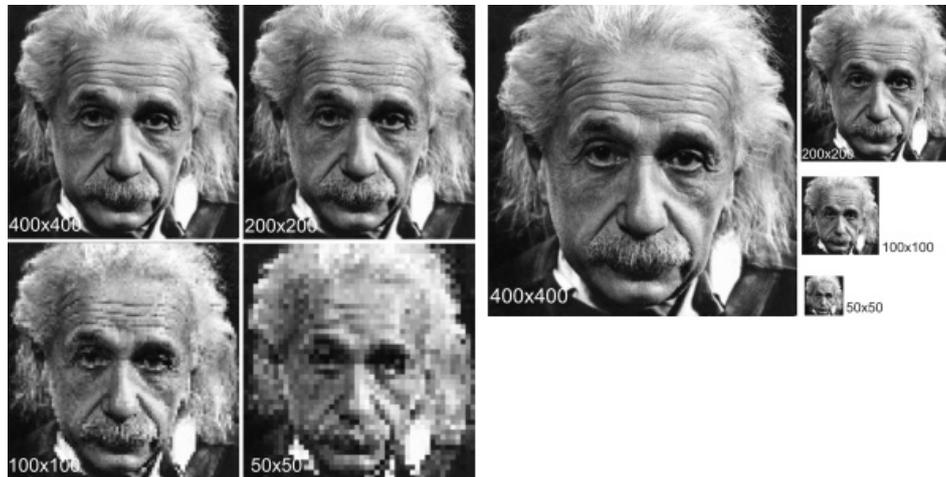


Fig. 1-38. Resolución de la imagen digital. Izquierda: cuatro resoluciones diferentes de una imagen digital expresadas en un mismo espacio físico. En el extremo inferior izquierdo de cada una de ellas se inscribe su resolución. Se observa que a medida que se reduce la misma se incrementa el efecto de "pixelado" de la imagen. Derecha: expresión de la misma imagen digital de acuerdo a su resolución. En este caso, el tamaño del píxel es el mismo para las cuatro imágenes.

### Compresión de las imágenes

En el mercado existen numerosos formatos gráficos que son utilizados en distintos medios o por distintos programas. En la Tabla 1-3 se listan los formatos más populares de gráfica y video que existen en la actualidad.

Muchos de estos formatos cuentan con procesos de compresión, con o sin pérdida de la información. La compresión consiste en sustituir la cadena de datos de la imagen por otra más corta, durante el almacenamiento del archivo en un dispositivo electrónico (disco duro, tarjeta de memoria, etc.). Ciertos métodos son reversibles (sin pérdida de la información), porque permiten la reconstrucción exacta del original. Otros, en cambio, sólo recuperan la información original de manera aproximada (con pérdida de la información), ya que descartan una parte de los datos en pos de una compresión mayor.

Existen procesos de compresión adaptativos, semi-adaptativos y no adaptativos, que tienen en cuenta o ignoran las características del archivo a comprimir. El código no adaptativo de Huffman establece una tabla de códigos con las combinaciones de bits que más se repiten estadísticamente. A estas secuencias se les asignan códigos cortos, mientras que a las menos probables, se le asignan claves más largas. Los compresores de uso general más populares utilizan métodos como éste. Por esta razón, emplean más tiempo en empaquetar los datos que en descomprimirlos (Fig. 1-39 izquierda).



Fig. 1-39. Ejemplo de codificación de una línea de píxeles sobre una tabla de 4 entradas y otra de 6 (izquierda), mediante la utilización del código no adaptativo de Huffman. El método adaptativo RLE codifica series de píxeles repetidos (derecha). Esta secuencia de 12 valores se anota simplemente con 6 datos.

Tabla 1-3. Algunos formatos de gráfica y video actuales

Acrónimo	Nombre del Formato
Animated GIF (.gif)	Animated GIF
AVI (.avi)	uncompressed AVI movie files
AxioVision ZVI (.zvi)	Zeiss ZVI File Format
BMP (.bmp)	BitMap
CUR (.cur)	Windows cursor
Deltavision (.dv, .r3d)	Applied Precision Deltavision Systems File Format
DICOM (.dic, .dcm, .dicom)	Digital Imaging and Communications in Medicine
DM3 (.dm3)	Gatan Digital Micrograph File Format
EPS (.eps, .epsi)	Encapsulated PostScript
ERS (.ers), RS (.rs)	PerkinElmer UltraView(E)RS
Fluoview FV1000 OIB (.oib)	Olympus Fluoview FV1000 OIB
Fluoview FV1000 OIF (.oif, .tif, -ro.pty, .lut, .bmp)	Olympus Fluoview FV1000 OIF
FluoView TIFF (.tiff)	Olympus Fluoview tiff
GEL (.gel)	Amersham Biosciences GEL Image Format
GIF (.gif)	Graphics Interchange Format
Imaris (.ims)	BitPlane Imaris
IMG (.img)	Packard InstantImager
IPW (.ipw)	Image-Pro Workspace
JPEG (.jpeg, .jpg)	Joint Photographic Experts Group
JPEG2000 (.jp2)	JPEG2000 Format
Leica Lif (.lif)	Leica Image File Format
Leica TIFF (.tiff, .lei)	Leica Multichannel SP
LSM (.lsm)	Zeiss Laser Scanning Microscope Image Format
Metamorph (.stk)	Universal Imaging (Molecular Devices)
MI, NII, NIII	Molecular Imaging and Nanoscope AFM File Format
ND2 (.nd2)	Nikon NIS-Elements ND2
Nikon (.nef, .tiff)	Nikon Electronic Format
NRRD (.nrrd, .nhdr)	Nearly Raw Raster Data
OME-XML (.ome)	Open Microscopy Environment XML
PBM (.pbm)	Portable Bitmap
PCX (.pcx)	ZSoft PC Paintbrush File Format
PIC (.pic)	Bio-Rad PIC Format
PICT (.pict, .pic, .pct)	Apple PICTure
PNG (.png)	Portable Networks Graphics
PSD (.psd)	Photoshop Document
Quicktime (.pic, .mov)	Quicktime Movie
RAW	Guess Raw from Fuji Bas 1000 Phosphor imager
SEQ (.seq)	Image-Pro Sequence
TGA (.tga)	TrueVision Targa File Format
TIFF (.tiff, .tif)	Tagged Image File Format

El método RLE (acrónimo en inglés de: “*Run Lengh Encode*”), es el proceso adaptativo más simple ya que sustituye series de valores repetidos por una clave con indicador numérico (Fig. 1-39 derecha). El sistema adaptativo LZW deriva del método RLE y a través de una lectura única, codifica repeticiones sin crear una tabla de códigos (Fig. 1-40). Cuando se localiza una secuencia similar a otra anterior, se sustituye por una clave de dos valores: los correspondientes a la cantidad de pasos a retroceder y a repetir. Se lo utiliza en formatos universales como el GIF o el TIFF. Aunque no logra relaciones de compresión muy altas, normalmente ahorra un tercio del espacio de almacenamiento del archivo.

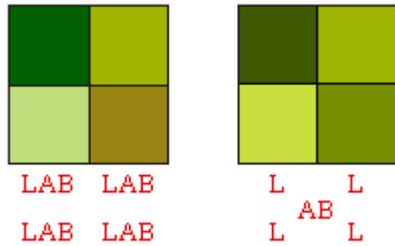


Fig. 1-40. De acuerdo al sistema LZW #5 4 significa retroceder 5 píxeles y repetir 4; #12 7 significa retroceder 12 píxeles y repetir 7

Entre los sistemas con pérdida de la información se encuentran el JPEG (o JPG) y el método fractal. Mediante este último, se rastrean las regiones de la imagen de manera que, a través de escalado, rotación, reflejo o combinación de transformaciones, se encuentren aquellas que puedan corresponder a un mismo bloque. Se anotan las correspondencias y se testean y seleccionan aquellas que permitan una reconstrucción más parecida de los datos. Su principal inconveniente es la lentitud del proceso.

El sistema propuesto por el grupo diseñador del formato JPEG es una combinación de varias técnicas, que crean un archivo con un nivel de compresión regulable, capaz de reducir el peso informático de la imagen, en algunos casos, a menos del 1%. El proceso estándar consta de cinco pasos:

1. Conversión de la imagen a un modo de color que defina la luminancia en un canal, como el L\*a\*b (o LAB). Los mapas de bits de las imágenes color se transforman a grises, mientras que en las imágenes monocromáticas se obvia este paso.
2. Dado que el ser humano es ópticamente capaz de ver un cambio sutil en la luminosidad mucho antes que en el tono cromático, se iguala el tono en cada grupo de cuatro píxeles, respetando los valores individuales de luz (Fig. 1-41).



**Fig. 1-41.** En modo LAB, cada píxel tiene un valor L de luminosidad y 2 valores (A y B) que definen el color. Sólo con este paso se reduce un 50% de los datos a registrar.

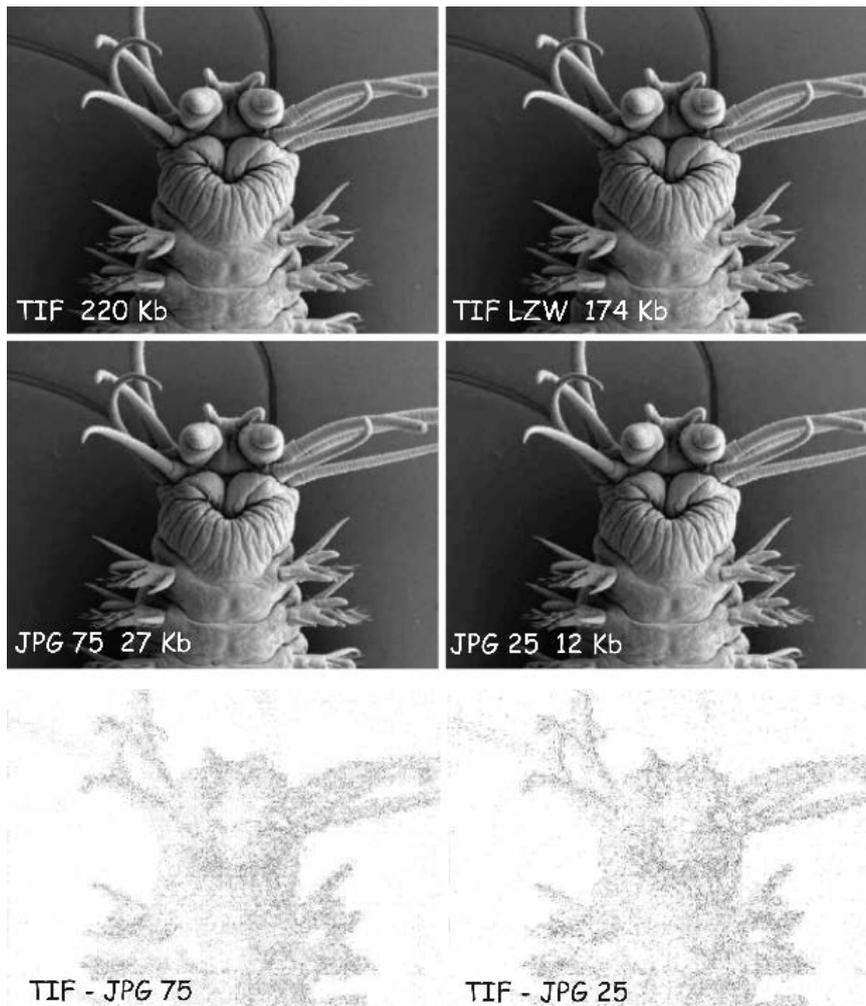
3. División de la imagen en bloques de 8 x 8 píxeles. Para cada sub-imagen se anota el valor promedio, la amplitud de la oscilación de valores y una descripción frecuencial de esta oscilación mediante una función de tipo Fourier, llamada Transformada Discreta del Coseno (TDC), en la que se combinan varios parámetros de onda. Cuantos más parámetros se combinen, mejor correspondencia habrá entre la función y la secuencia de valores.
4. Cuantificación de los valores TDC mediante su división por un factor entero. El número de coeficientes de onda y el factor a dividir determinan la profundidad de la compresión de una escala que, según el programa, va de 1 a 10, de 1 a 12 o de 0 a 100, pero que siempre juega de manera inversa entre el nivel de compresión y la calidad del resultado. Las fracciones decimales se redondean al entero más próximo, resultando una cadena de datos con muchas probabilidades de reiteración.
5. Obtención del resultado y aplicación de la codificación estadística de Huffman, para compactar las cadenas más repetidas en códigos breves.

Los efectos negativos de una excesiva compresión se observan como un empobrecimiento del tono y de la nitidez global. Estos efectos son más apreciables en una impresión. También pueden aparecer artefactos a nivel local, visibles sobre todo en la pantalla. La ventaja de este sistema de compresión es el relativo poco peso final de la imagen, que lo hace ideal para las presentaciones multimediales. Sin embargo, al haber pérdida de la información se ve resentido el proceso de cuantificación a través del análisis.

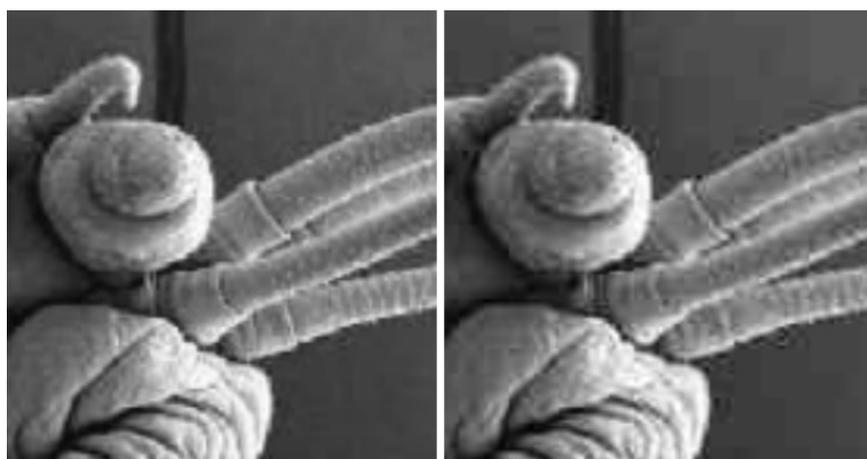
En la figura 1-42 se compara el efecto de la compresión LZW sobre una imagen almacenada con formato TIFF y de distintos porcentajes de compresión producidos mediante el código no adaptativo de Huffman, sobre imágenes archivadas con formato JPEG. Si bien a simple vista no se aprecian diferencias entre las cuatro imágenes, mediante un estudio de mapas de bits es posible comprobar que existen sólo para las imágenes JPEG, ya que la compresión LZW no produce ningún tipo de cambio o pérdida de información en las imágenes TIFF.

Tanto en las imágenes JPEG con compresión-75, en las que se comprime el 25% de la imagen, como con compresión-25, donde se comprime el 75% de la misma, los cambios pueden ser muy marcados. Los mismos consisten en la transformación del valor de los píxeles en aquellos estadísticamente más abundantes. Dicha transformación se produce por zonas de la imagen. En la fila inferior de la figura 1-42 se observan las intensidades de los píxeles modificados en ambas compresiones de archivos JPEG. Estas imágenes fueron obtenidas al restar matemáticamente la imagen original TIFF sin comprimir, de aquellas procesadas mediante el sistema con pérdida de información.

Cuando se amplían (zoom) las imágenes archivadas con diferentes formatos y comprimidas con diferentes algoritmos, se observan las diferencias existentes entre ellas (Fig. 1-43).



**Fig. 1-42.** Aspecto de una misma imagen almacenada con distintos formatos y sistemas de compresión. El "peso" final de cada imagen se expresa en Kilobytes (Kb). Las imágenes de la línea inferior resultan de la resta matemática entre la imagen TIF de 220Kb y las correspondientes imágenes JPG. Ambas imágenes fueron invertidas para su mejor apreciación. Cuanto mayor es el porcentaje de compresión, mayores son las diferencias con la imagen sin comprimir.



**Fig. 1-43.** Aumento (200%) de un detalle de la imagen en formato TIF sin comprimir de la figura 1-42 (izquierda) y en formato JPG con compresión-25 (derecha).

Otra forma de comprimir las imágenes es a través de la transformada Wavelet. Si bien el principio de su aplicación se verá en el Capítulo 4, aquí se describirá la forma de comprimir datos sin mayor pérdida de información. Estos métodos pueden mejorar la calidad de

la imagen reconstruida a cierto nivel de compresión, sin mayor variación en el tiempo de procesamiento.

Este tipo de proceso es actualmente utilizado por el formato JPEG2000 estándar y presenta mayores ventajas que el formato JPEG original. Entre ellas, permite trabajar con imágenes con profundidades mayores a los 8 bits por canal y con matrices mayores a 8x8 píxeles, muestra la misma imagen con diferentes resoluciones y puede manipular simultáneamente 256 canales de información, mientras el JPEG sólo puede hacerlo sobre los canales del RGB.

No obstante los beneficios que trae este tipo de compresión con respecto al detallado para el JPEG original, sería recomendable no usar este formato más que para la visualización en pantalla o en impresiones, ya que los valores finales pueden diferir de los originales, lo que llevaría a un error de valoración en los procesos cuantitativos.

Para realizar la compresión se debe contar con una secuencia de números. A modo de ejemplo se tomó la siguiente secuencia (secuencia original):

56	40	8	24	48	48	40	16
----	----	---	----	----	----	----	----

Si estos números son considerados de a pares, esta secuencia cuenta con cuatro grupos con dos números cada uno. Para realizar el próximo paso en el proceso de compresión, es necesario encontrar el promedio entre cada par de números. En el ejemplo, el primer par (56 y 40) arroja un promedio de 48; luego, es necesario restar del primer número del par (56) el valor del promedio (48). En el ejemplo se obtiene el valor de 8. Si se procede de la misma manera con el resto de los pares se obtiene la siguiente lista de números:

48	8	16	-8	48	0	28	12
----	---	----	----	----	---	----	----

En términos matemáticos, se reemplazó el par (a,b) por el nuevo par (c,d) dado por las ecuaciones:

$$c = \frac{a + b}{2} \quad [1-1]$$

$$d = a - \frac{a + b}{2} = \frac{a - b}{2} \quad [1-2]$$

La serie de números obtenida en última instancia es exactamente igual a la primera, la cual se puede recuperar siempre y cuando se apliquen la inversión de las ecuaciones (1-1) y (1-2); esto es:

$$a = c + d \quad [1-3]$$

$$b = c - d \quad [1-4]$$

Es decir, mediante las ecuaciones [1-1] y [1-2] se hace la construcción de una lista alternativa, mientras que con las ecuaciones [1-3] y [1-4], se reconstruye la secuencia original. Si se continúa con el proceso a partir de la primera construcción, se puede obtener una tercera lista de números, pero en este caso, sólo se toman los valores resultantes del promedio y no aquellos de las diferencias, las que se mantienen en la misma posición. En el ejemplo, los números 48, 16, 48 y 28 deben ser tomados de a pares (48 y 16; 48 y 28) y repetir el mismo procedimiento descrito previamente. La secuencia ahora se transforma en la segunda construcción:

32	8	16	-8	38	0	10	12
----	---	----	----	----	---	----	----

Estos números también representan la secuencia original, sólo que para obtenerla es necesario invertir ésta aplicando las ecuaciones [1-3] y [1-4] dos veces. Para realizar esta in-

versión es necesario tener en cuenta cuáles números fueron calculados como promedios y cuáles como diferencia.

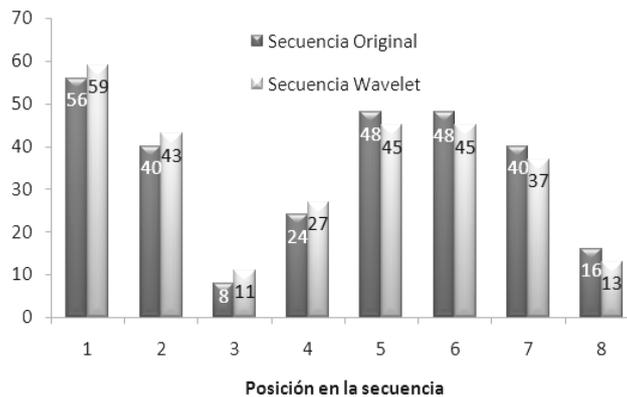
Finalmente, se repite el proceso con los números 32, 16, 38 y 10, pero dado que 16 y 10 son la resultante de diferencias, sólo se buscará el promedio y las diferencias entre 32 y 38. En ese caso, el promedio es 35 y la diferencia -3. De esta manera la secuencia se expresa como la tercera construcción:

35	8	16	-8	-3	0	10	12
----	---	----	----	----	---	----	----

Una vez más, revirtiendo el proceso tres veces, tomando en cuenta los valores resultantes del promedio y los de la diferencia, se puede llegar hasta la secuencia original. Sin embargo, hasta este momento el algoritmo no ha tenido ninguna ventaja sobre el almacenamiento directo de los valores iniciales. Para obtener un beneficio, es necesario establecer un valor umbral por debajo del cual todos los valores numéricos son reemplazados por el cero. Si en el ejemplo anterior se considera el umbral 4, todos los números cuyo valor absoluto sea inferior a éste, deben ser reemplazados por cero. Para este ejemplo, sólo el -3 debe ser reemplazado. La secuencia revertida tres veces quedaría entonces como:

59	43	11	27	45	45	37	13
----	----	----	----	----	----	----	----

que es similar a la original. La figura 1-44 muestra la gráfica de estas dos secuencias.



**Fig. 1-44.** Se observa que los valores correspondientes a la secuencia de reconstrucción (secuencia wavelet) son similares a los valores de la secuencia original, cuando se usa un valor umbral de 4.

Una de las mayores aplicaciones de compresión mediante la transformada Wavelet se encuentra en el archivo de huellas digitales. Si cada huella puede ser representada como una matriz monocromática de 256x256 píxeles, se puede almacenar la información de cada individuo en la forma de una secuencia de pares de números, en donde uno de ellos corresponde al píxel de acuerdo a su posición y el otro a su valor de intensidad.

La figura 1-45 compara el efecto producido por el almacenamiento de una misma imagen residente en memoria, con distintos formatos y porcentaje de compresión. Según los histogramas visualizados, la mayor pérdida de información se produce en la imagen con formato JPEG, seguido por el JPEG2000, ambas con compresión-75. Sin embargo, para este caso particular, la compresión sin pérdida de información a través del formato JPGE2000 (compresión-100) no mostró diferencias con el histograma de la misma imagen almacenada en formato TIFF sin compresión. Asimismo, los diferentes tipos de formatos de compresión muestran una diferencia significativa en el peso final de la imagen con respecto a la imagen TIFF sin comprimir.

### ***Dimensión de las imágenes***

Al comenzar este capítulo quedo expresado que las imágenes pueden ser de diferentes dimensiones. Toda imagen impresa sobre el papel es bidimensional, al igual que las imá-

genes representadas sobre el monitor de una computadora. Sin embargo, así como en la naturaleza todo lo percibido por el ojo humano es tridimensional, existe la posibilidad de emularlo en una imagen digital. En la figura 1-46 se observan tres imágenes que corresponden al mismo objeto, pero expresadas en tres dimensiones distintas.

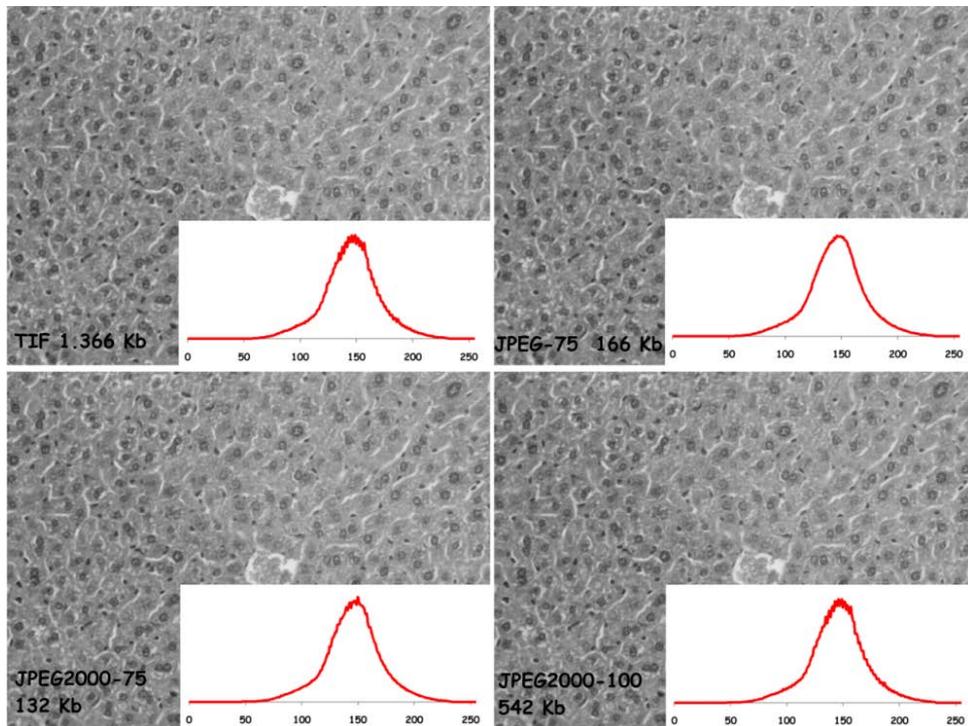


Fig. 1-45. Imagen de un hígado normal almacenado en distintos formatos. En apariencia, todos lucen similares. Arriba izquierda: TIF sin comprimir; arriba derecha: JPEG-75; abajo izquierda: JPEG2000-75; abajo derecha: JPEG2000-100 (sin pérdida de información). Al pie de cada imagen se observa el correspondiente histograma. En cada imagen se expresa el peso final (en Kb) de cada una de ellas.

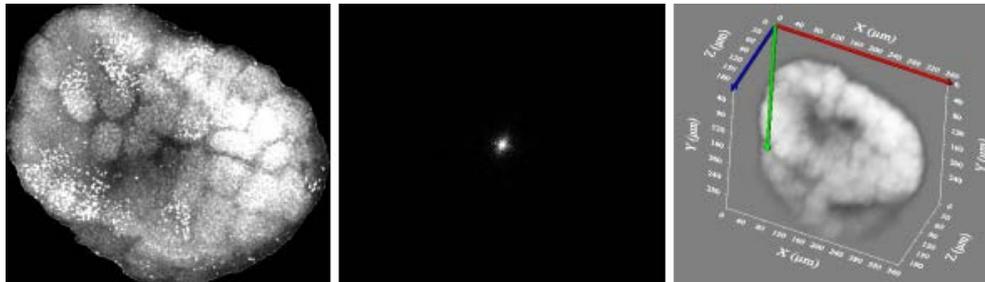


Fig. 1-46. Lóbulo olfatorio del cangrejo *Chasmagnathus granulatus* visualizado como imagen 2D, 1D y 3D.

La imagen tridimensional (3D) es esencialmente una sucesión de imágenes bidimensionales (2D) apiladas (“stack”) que, a través de un programa intérprete que produce un cálculo matemático complejo (efecto de **renderización**), genera la sensación de visualización de la tercera dimensión. Sin embargo, la sensación 3D también se puede obtener por medio de filtros, simulando la óptica Nomarski (Fig. 1-47 izquierda), o a través de representaciones isométricas (Fig. 1-47 derecha).

La proyección isométrica es un método gráfico de representación; más específicamente, es una axonométrica cilíndrica ortogonal. La perspectiva axonométrica representa elementos geométricos o volúmenes en un plano, mediante proyección paralela o cilíndrica, referida a tres ejes ortogonales, de tal forma que conserven sus proporciones en cada una de las tres direcciones del espacio: alto, ancho y longitud. Constituye una representación visual de un objeto 3D en dos dimensiones, en la que al proyectarse los tres ejes ortogonales

principales, forman ángulos de  $120^\circ$ . Las dimensiones paralelas a dichos ejes se miden en una misma escala.

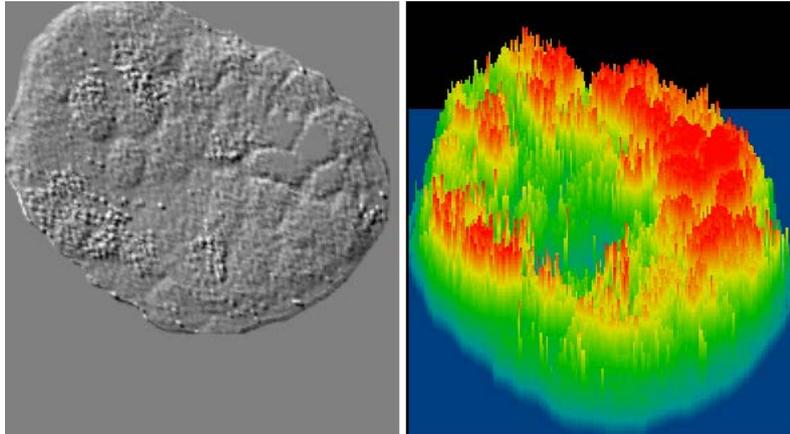


Fig. 1-47. Aplicación de filtro Escultura o Sculpt (izquierda) a la misma imagen de la figura 1-46. A la derecha, se observa la representación isométrica de la misma imagen.

La unidad gráfica de codificación de las imágenes 3D se denomina **vóxel** (acrónimo en inglés de: “*Volume Element*”), que esencialmente es un píxel, con todas las características del mismo, pero que se representa en el espacio (Fig. 1-48).

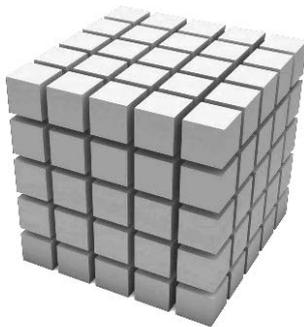


Fig. 1-48. Representación esquemática de la disposición de los vóxeles en una imagen 3D.

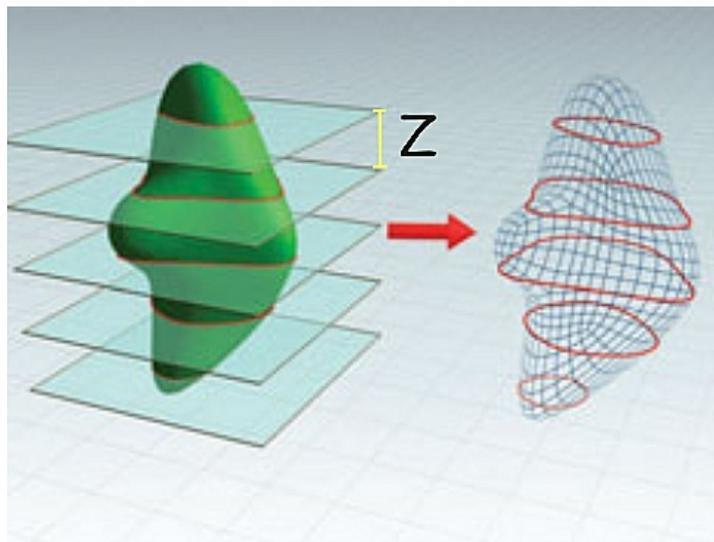


Fig. 1-49. El espacio Z en una pila de imágenes 2D da lugar a la renderización 3D. Cada uno de los cuadrados celestes del lado izquierdo, que se representan como aros rojos en la imagen 3D del lado derecho, corresponde al plano óptico de captura.

La tercera dimensión del vóxel está representada por el espacio que queda entre cada una de las imágenes 2D que forman la pila. Esta distancia se denomina **espacio Z** (Fig. 1-49) y está determinado por la frecuencia (intervalo) de captura secuencial de las imágenes 2D. El espacio Z puede ser igual a la dimensión de los ejes X e Y del píxel. En este caso se dice que el vóxel es cúbico. Dado que esta proporción no es la más frecuente de encontrar, se podría decir que el vóxel es cuboide.

Las imágenes también se pueden expresar en una sola dimensión (1D) y se denominan uni o monodimensionales. No se manifiestan a través de matrices o arreglos de píxeles, sino que son representaciones espectrales (espacio Fourier) que grafican las frecuencias de los píxeles, en términos de muestreo y orientación, que forman la imagen 2D en el espacio digital. La imagen central de la figura 1-46 es un ejemplo de esta dimensión.

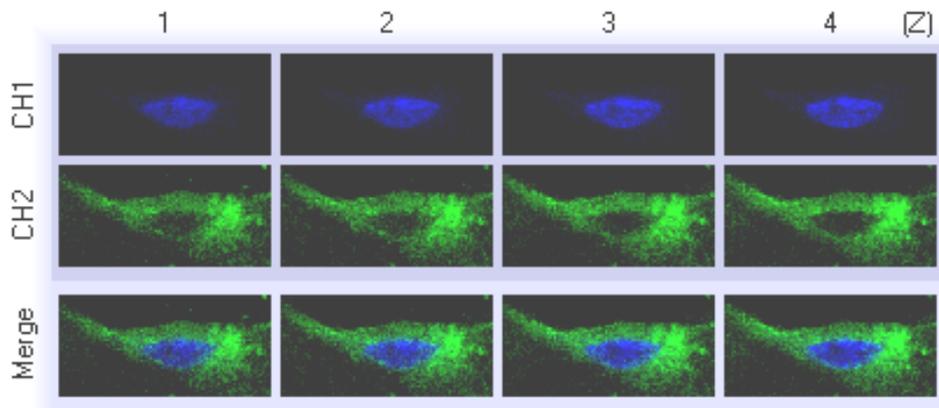
Las imágenes 1D son utilizadas para remover el “ruido” que se observa en las imágenes 2D o 3D cuando son capturadas mediante diferentes dispositivos electrónicos (cámaras de video, cámaras fotográficas, escáner, etc.). Es decir, actúan a modo de filtros. Para obtener imágenes 1D, se requiere de ciertos algoritmos, tales como la transformada rápida de Fourier (FFT). Éste procedimiento será detallado en el Capítulo 4.

La cuarta dimensión (4D) aparece en diversos contextos, con distintos significados. Así en física, se refiere al tiempo, principalmente desde el planteo de la Teoría de la Relatividad de Einstein. En matemática, se refiere o bien a espacios Euclidianos de más de tres dimensiones o, más generalmente, a espacios localmente Euclidianos o 4-variedades diferenciables. En las imágenes digitales, el término 4D se asigna a diferentes tipos de imágenes. Si se restringe exclusivamente al concepto de dimensionalidad, una imagen 4D sería una imagen 3D a la que se le suma la dimensión del tiempo (XYZT). Esta dimensión también se conoce como Time Lapse 4D por analogía con el Time Lapse 2D, término asignado a la secuencia de imágenes 2D en el tiempo (XYT) (Fig. 1-50).



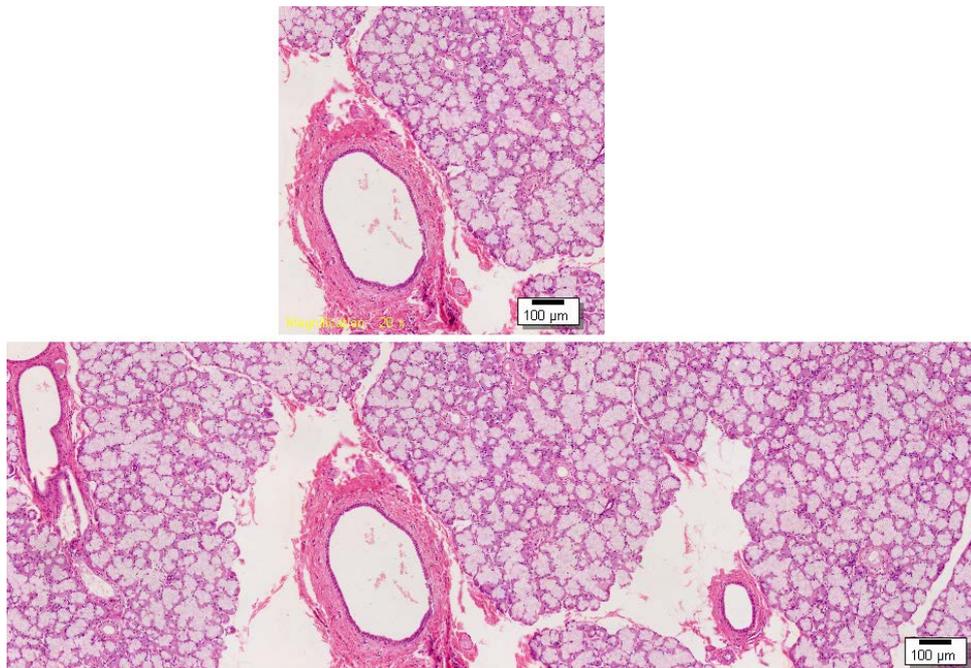
Fig. 1-50. Secuencia desglosada (imagen 4D XYT o Time Lapse 2D) del parásito *Toxocara* spp. La imagen cuenta con 30 secuencias que pueden ser animadas en tiempo real.

Una imagen pentadimensional (5D) es aquella 4D a la que se le agrega el factor de canales o señales fluorescentes (XYZTS). La condición para considerarla como tal, es que al menos tenga dos señales distintas. En este caso, cada una de las señales se asocia a una imagen 3D en el tiempo. Tal como se describió para las imágenes 4D, también se puede considerar que una imagen es 5D cuando una imagen 2D o 3D presentan al menos 2 canales de fluorescencia (XYS o XYZS, respectivamente) (Fig. 1-51).



**Fig. 1-51.** Imagen 5D formada por una secuencia 3D (XYZ) a la que se le suma la señal fluorescente (XYZS). Se observa el citoplasma de una neurona identificado mediante un anticuerpo anti-enolasa acoplado con el fluoróforo Alexa 448 (verde) (Canal 1 - CH1) y su núcleo celular reconocido por el DAPI (azul) (canal 2 - CH2). Cada uno de los números del encabezado representa un corte óptico de la neurona en la profundidad del eje Z.

Actualmente existen sistemas informáticos que generan imágenes panorámicas que abarcan más de un campo visual del microscopio y que se produce por superposición de varias imágenes individuales capturadas, correspondientes a toda o gran parte de la extensión de la muestra microscópica. Estas imágenes se obtienen mediante un proceso que, en términos generales se denomina Alineación Múltiple de Imágenes o “*stitching*” (Fig. 1-52). Si bien este proceso no se considera como parte de las dimensiones previamente mencionadas, dado que la alineación se puede producir con imágenes 2D, 3D o 5D, permitiría encuadrarla como la sexta dimensión (6D).



**Fig. 1-52.** Efecto del “*stitching*” para la confección de imágenes panorámicas. Arriba: imagen única. Abajo: unión de 3 imágenes.

# Capítulo 2

## Preparación del Material



Algunos de los elementos utilizados en la preparación del material necesario para la obtención de las imágenes: balanza, diversos tipos de micrótomos, baño y platina térmicos, tren de coloración, estufa de parafina, cortes montados.

### ***El material a analizar***

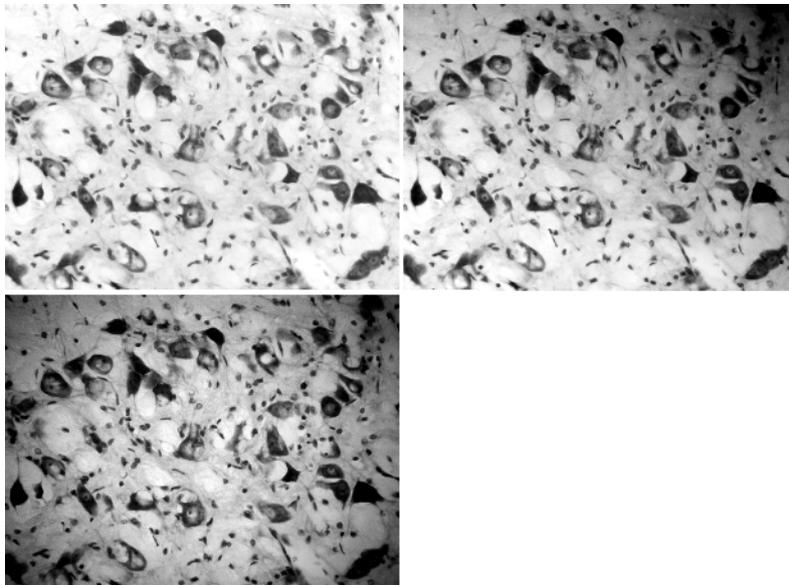
Para analizar una imagen digital es necesario seguir varios pasos metodológicos que van desde la captura, el procesamiento, la segmentación, el recuento, el análisis de las formas o intensidades o densidades, hasta la obtención de la información numérica y posterior evaluación estadística. A lo largo de los próximos capítulos se irán describiendo cada uno de estos procesos y se establecerán cuales son los requerimientos necesarios, de acuerdo a las imágenes que se estén analizando o las herramientas con las que se cuente.

Si bien el proceso es muy estandarizado, los resultados no lo son. Eso se debe, fundamentalmente, a que cada muestra se comporta de manera distinta, ya que depende de particularidades inherentes a la misma, pero también y no menos importante, por la forma de su preparación histológica o morfológica antes de iniciar el proceso de análisis.

### ***Requerimiento de las imágenes***

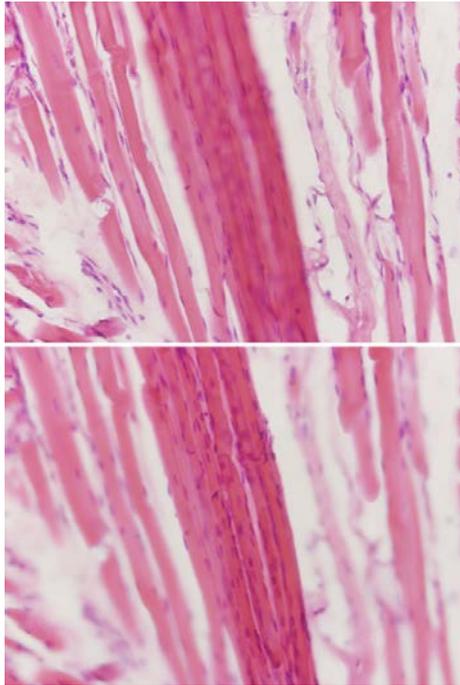
Dada la diversidad de tipos y clases de imágenes mencionados en el Capítulo 1, se deben establecer algunos criterios generales acerca de las necesidades de las mismas para ser analizadas. Una de las primeras consideraciones es su uniformidad, es decir, un mismo patrón expresado varias veces en la misma imagen debe verse siempre de igual manera. Esto implica que la intensidad de luz y los valores de color deben ser siempre los mismos. Consecuentemente, la iluminación tiene que ser uniforme y estable para las imágenes adquiridas en diferentes momentos.

La figura 2-1 muestra la superficie de un tejido con iluminación no uniforme. Afortunadamente, es posible solucionar este error mediante procesamiento por interposición de un fondo (corrección de fondo) (ver Capítulo 4). Sin embargo, es conveniente evitar toda manipulación de las imágenes después de su captura para no modificar el valor de los píxeles y perder la posibilidad de comparación con otras imágenes en estudios secuenciales.



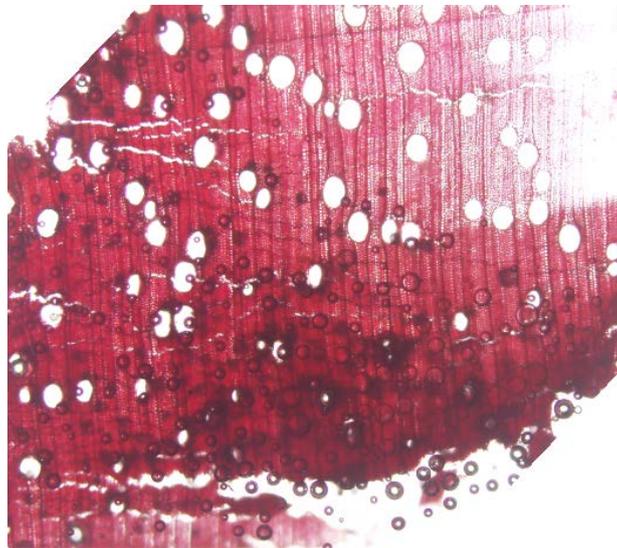
**Fig. 2-1.** El mal centrado del condensador o una fuente de iluminación deficiente pueden producir defectos en la iluminación de los tejidos, que posteriormente generan errores en la interpretación de las intensidades. Arriba izquierda: distribución normal de la luz. Arriba derecha: luz descentrada. Abajo: luz centrada, pero mal distribuida.

Asimismo, es necesario que los cortes histológicos de donde se obtengan las imágenes sean los más planos posible. Es frecuente observar, sobre todo en cortes más gruesos que 3 a 5  $\mu\text{m}$ , un efecto ondulatorio de los mismos (Fig. 2-2). Esto podría deberse a la forma en que fueron seccionados.



**Fig. 2-2.** El efecto ondulatorio de los cortes delgados montados sobre el portaobjetos hace que en el mismo campo visual se vean zonas enfocadas y desenfocadas.

El seccionamiento manual realizado sobre tejidos muy duros como la madera es inevitablemente ondulatorio, aunque varía dependiendo de la habilidad del técnico. Los cortes obtenidos mediante micrótopo no están exentos de estas ondulaciones, ya sea por el uso de un equipo manual (micrótopo por deslizamiento), en donde la sección depende en gran medida de la destreza del operador, así como de la calidad de la cuchilla con la que se trabaja (Fig. 2-3). Las cuchillas fijas o descartables son igualmente buenas cuando están bien afiladas. Sin dudas, el corte realizado mediante un micrótopo automatizado (por deslizamiento circular o por vibración) es el que brinda los mejores resultados.



**Fig. 2-3.** Corte de madera realizado con micrótopo de desplazamiento horizontal. En la imagen se aprecian zonas más intensamente teñidas que otras (región inferior) por efecto de los diferentes espesores de la muestra. Asimismo, en todo el corte, pero principalmente en su región inferior, se observan fracturas del tejido inducidas por la falta de filo en la cuchilla fija. Finalmente, se observan burbujas de aire por debajo de la muestras pero también sobre la misma, que se deben al montaje deficiente del cubreobjetos. Estas burbujas pueden interferir con las mediciones.

Las ondulaciones en los cortes también se pueden observar cuando los tacos a seccionar son muy grandes o cuando estos o la cuchilla de corte no están bien sujetos, lo cual produ-

ce vibraciones al cortar. Las ondulaciones también se suelen producir durante el montaje de cortes delgados, sobre todo de aquellos de grandes dimensiones. El exceso o déficit de sustancias adhesivas, la variación en su distribución en la superficie del portaobjetos, la mala calidad del adhesivo y la temperatura de la platina de secado, entre otros, generalmente producen este tipo de fallas. Estos defectos pueden ser corregidos mediante la aplicación de algoritmos informáticos que buscan el punto focal o la profundidad de campo extendida de la imagen obtenida (ver Capítulo 4).

Para realizar mediciones sobre las imágenes es necesario que las mismas estén calibradas espacialmente. En las imágenes obtenidas con un microscopio, la calibración es relativamente sencilla cuando se conocen las propiedades ópticas de los objetivos, del tubo de acople de la cámara y de la misma cámara de video. Si se analizan imágenes macroscópicas, debe adjuntarse un indicador métrico o escala (regla, calibre, etc.) al momento de su captura. Asimismo, es necesario evitar las distorsiones geométricas que se producen por los fenómenos de perspectiva (Fig. 2-4). Estos detalles serán ampliados en los Capítulos 3 y 6.



Fig. 2-4. No sólo es necesario contar con un elemento de medición al hacer un análisis de imágenes macroscópicas sino que, además, hay que tomar la precaución de capturarlas evitando el efecto de la perspectiva.

La medición de la intensidad de luz (densidad o valores de color), requiere de una fuente de iluminación y un sensor muy estables. Las mediciones de color son fácilmente afectadas por los cambios observados en una lámpara incandescente, que se deben a fluctuaciones menores del voltaje, calentamiento y/o envejecimiento de la misma. Los tubos fluorescentes de la habitación pueden introducir interferencia en las cámaras de estado sólido debido a su parpadeo de alta frecuencia. Las reflexiones especulares brillantes pueden causar saturación o cambios en la ganancia (“*gain*”) de la cámara.

Otro punto a considerar es el relacionado con las imágenes seriales. El término serial proviene de la microscopía de luz, en la cual los bloques de tejido embebidos en parafina son cortados con el micrótopo en una serie de secciones individuales. La captura de las imágenes correspondientes a todos los cortes o de algunos de ellos, permiten al investigador ensamblar una serie de imágenes, que posteriormente pueden ser utilizadas para reconstruir la estructura 3D. Este proceso trae aparejados ciertos problemas: el primero de ellos es que las imágenes individuales tienen que estar alineadas. Hay que considerar que los cortes obtenidos con micrótopo son montados sobre portaobjetos con orientaciones arbitrarias; por lo tanto, aunque la misma estructura pueda localizarse en diferentes secciones, probablemente sus imágenes sucesivas no estén alineadas. Esto requiere de un trabajo exhaustivo y por lo general, poco exitoso ya que al inclinar o rotar cada imagen para su alineación visual entre las secciones, se puede alterar completamente la estructura 3D reconstruida. Normalmente, se asume que si las imágenes tienen suficiente cantidad de detalles, una alineación promedio podría evitar errores mayores. Sin embargo, está lejos de ser cierto que la mejor alineación visual es la más certera, ni que los métodos automáticos de superposición secuencial de imágenes produzcan una alineación apropiada.

Los métodos automatizados de reconstrucción 3D generalmente buscan minimizar el desajuste entre las secciones ópticas. Esto se puede lograr de dos maneras: mediante la alineación del centroide (centro de masa) de los objetos en los planos, de tal manera que la suma de los cuadrados de las distancias se minimicen o mediante la superposición de pares

de imágenes binarias que se inclinan o se rotan para minimizar el área resultante de su combinación (ver Capítulo 4).

Estos inconvenientes se evitan mediante la interposición de una marca (por ejemplo un orificio que atraviese toda la muestra en el taco de parafina), de tal manera que aún siendo montados sobre portaobjetos de manera azarosa, su superposición permitiera alinear de la mejor manera toda la estructura incluida. La mayor cantidad de marcas sobre la muestra optimizará la alineación. Hay que tener en cuenta, no obstante, que el seccionamiento con micrótopo produce cierta distorsión sobre el bloque y el efecto mecánico del corte un 5 a 20% de compresión, aunque en una sola dirección (dirección del corte). Si se conocen las coordenadas absolutas de las marcas realizadas, es posible realizar el estiramiento de las imágenes para la corrección de esta distorsión.

El seccionamiento óptico es el proceso por el cual un microscopio adecuadamente diseñado puede producir imágenes claras de planos focales en profundidad dentro de una muestra de espesor grueso y a diferencia del seccionamiento físico, no destruye la muestra. En un microscopio ideal, sólo la luz del plano focal debería alcanzar al detector de la cámara, con lo cual se obtendría una imagen clara del plano enfocado. Lamentablemente, en la mayoría de los microscopios actuales no es tan específica y la luz proveniente de los planos no focales también llega al detector. En una muestra de espesor grueso puede haber una cantidad significativa de material que emita luz y, por lo tanto, que genere señal espuria entre el plano focal y la lente del objetivo.

En los microscopios de transmisión de luz no es sencillo realizar seccionamiento óptico, debido justamente a las propiedades de la luz emitida por una lámpara dicróica. La profundidad de campo o resolución axial de los objetivos con alta apertura numérica (NA), es muy pequeña (sólo unas pocas veces la resolución lateral), de tal manera que sólo una pequeña porción de la imagen va a estar enfocada. Sin embargo, la luz proveniente de lugares por encima y por debajo del plano focal también es emitida, aunque fuera de foco, lo que genera una nubosidad en la imagen e incluye información sobre una distancia extendida en el plano axial (eje Z). El microscopio confocal y más aún el microscopio multifotónico o el de súper resolución, tienden a eliminar esta luz espuria, brindando exclusivamente la información del plano focal y evitando, de esta manera, el procesamiento posterior de la imagen. Las características de estos microscopios y sus componentes se verán en el Capítulo 3.

Otra dificultad con las secciones seriadas es su calibración espacial en el eje axial. El grosor de las secciones individuales sólo se conoce de manera aproximada y no siempre son los mismos, aún utilizando micrótopos automatizados. Construir una escala de profundidad precisa es casi imposible, sobre todo si hay que medir cada sección de manera individual. La situación se complica aún más si no se utilizan todas las secciones seriadas para la reconstrucción de la estructura. Con el advenimiento de los programas de reconstrucción 3D y el seccionamiento óptico, resulta sumamente sencillo conocer la dimensión axial. No obstante, no siempre es posible realizarlo, resultando poco probable hacer una reconstrucción 3D de secciones utilizadas en microscopía electrónica si no es por el método del seccionamiento seriado.

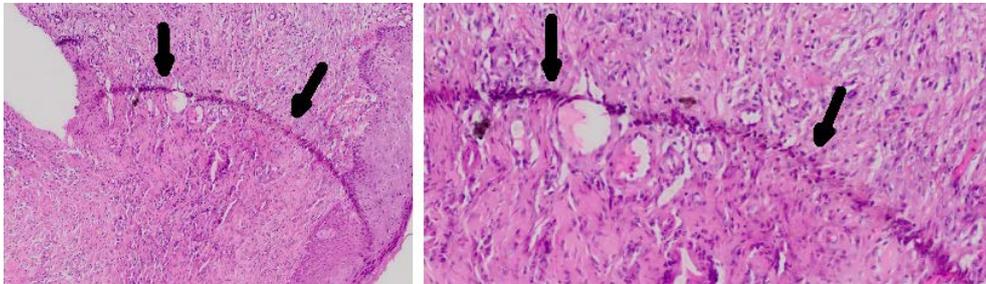
En síntesis, lo ideal para la reconstrucción 3D de una imagen, sería el seccionamiento óptico de un corte grueso de la muestra mediante el uso del microscopio confocal, de tal manera que sea el mismo microscopio y el programa informático, los que tomen el trabajo de realinear las imágenes secuenciales.

## ***Artefactos***

Los detalles descriptos en el apartado anterior hacen a los requerimientos generales del material a utilizar para la obtención de imágenes. No obstante, es necesario tener en cuenta que muchas de las fallas observadas cuando se tiñen las muestras, y que luego se traducen en errores de análisis, sobrevienen por el mismo procesamiento del material. Todas las muestras biológicas que se van a observar en el microscopio requieren de algún tipo de procesamiento: fijación, inclusión, deshidratación, hidratación, calentamiento, etc. Cada uno de estos procesos es una fuente incalculable de errores conocidos como artefactos. En términos histológicos y citológicos se puede definir al artefacto como una estructura que

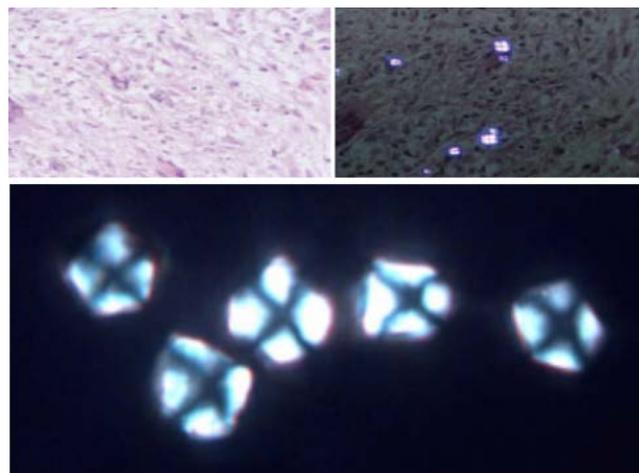
no está normalmente presente en el tejido vivo. El desafío es el reconocimiento de de los mismos para no confundirlos con los componentes normales o patológicos del tejido a analizar. En algunas situaciones, la presencia de un artefacto puede poner en peligro un diagnóstico preciso.

Los artefactos se pueden producir aún antes de fijar la muestra. Pueden surgir como consecuencia de suturas presentes en el tejido (Fig. 2-5), que generan un aumento de densidad de las estructuras que se encuentran a su alrededor.



**Fig. 2-5.** Las suturas dejan su huella sobre los tejidos, con un aumento de densidad a su alrededor (flechas), producto de la reacción colágena del organismo.

También se pueden originar por depósitos de almidón, proveniente de los guantes de cirugía. Para su observación, es necesario recurrir a tinciones especiales, como el PAS o a técnicas microscópicas como la polarización de la luz (Fig. 2-6).

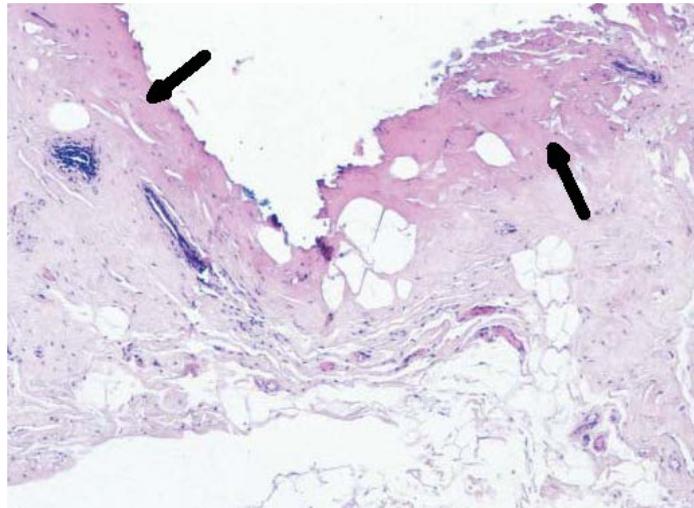


**Fig. 2-6.** Las partículas de almidón, difícilmente se observan con tinciones de hematoxilina y eosina (arriba izquierda), pero pueden ser puestas de manifiesto mediante polarización de la luz (arriba derecha). Abajo: detalle de las partículas de almidón.

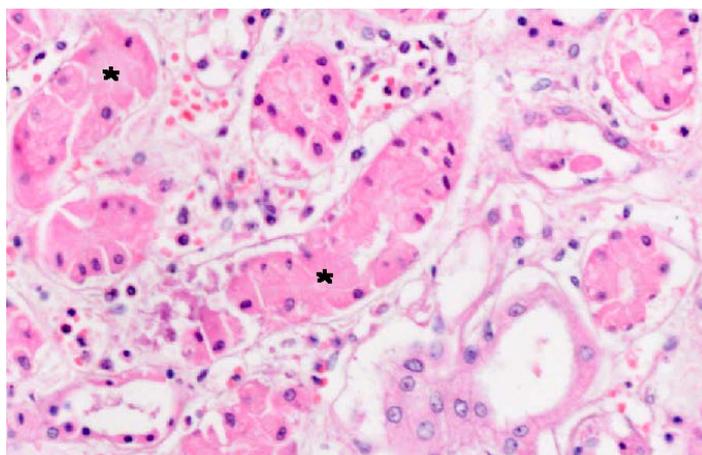
El daño producido por calor generalmente se observa a lo largo del margen de las biopsias quirúrgicas obtenidas mediante bisturí de láser. Se presenta en forma de manchas con fuerte acidofilia (color rosado), en un área local, con la pérdida del detalle nuclear y citoplasmático (Fig. 2-7). Las fibras de tejido conectivo se coagulan debido a los efectos del calor. La deshidratación y la desnaturalización de las proteínas resultante producen coagulación y condensación, lo que lleva a un aumento de la acidofilia del tejido conectivo, en comparación con otros tejidos fijados. Por su parte, los componentes del tejido glandular se pueden vacuolar (producción de vacuolas). Los daños por calor también pueden ocurrir en cualquier etapa posterior a la fijación, pero especialmente durante la inclusión con exceso de parafina caliente, durante el secado sobre la platina caliente o en la incubadora.

Un punto fundamental a tener en cuenta para la diferenciación entre un proceso biológico natural y un artefacto es el tiempo que transcurrió desde la muerte del organismo animal o vegetal, hasta la fijación de la muestra. Los cambios degenerativos de los tejidos animales comienzan inmediatamente luego de la privación del suministro sanguíneo adecuado. En un individuo vivo, este proceso puede finalizar con la muerte del tejido (necrosis). En un individuo muerto, la autólisis sobreviene por efecto de enzimas hidrolíticas liberadas

por ruptura de membranas que recubren a los lisosomas celulares. El proceso de autólisis implica pérdida de las estructuras celulares y titulares, dependiendo del tiempo transcurrido desde el comienzo del evento hasta la fijación del tejido (Fig. 2-8).



**Fig. 2-7.** Efecto del exceso de temperatura. Se observa la coagulación del tejido, imprimiéndole una coloración rojiza más intensa que en el resto de la muestra (flechas).



**Fig. 2-8.** Durante el proceso autolítico de los tejidos animales, se van perdiendo los núcleos celulares y los límites entre las células (\*).

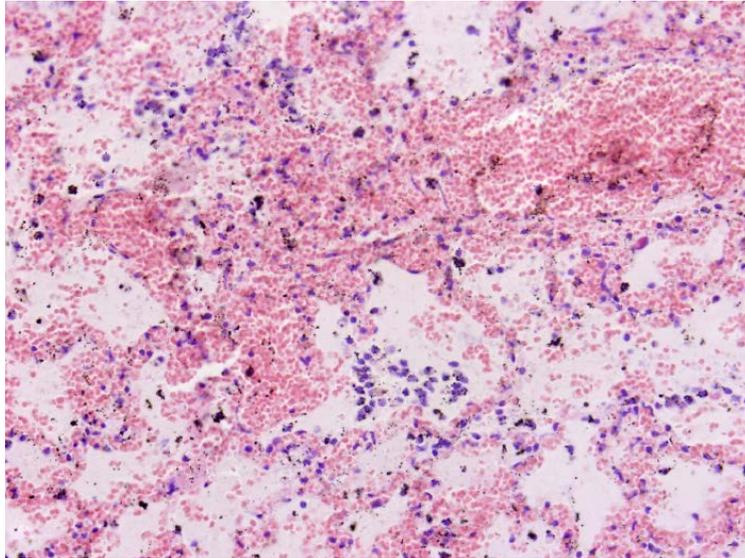
El tejido nervioso y el epitelial sufren más rápidamente los efectos autolíticos, en comparación con los tejidos mesenquimáticos (músculos, conjuntivo, cartílago, hueso, etc.). A este cuadro le podemos sumar la contaminación post-mortem de los tejidos proveniente de microorganismos que forman la flora natural durante la vida (como las del tracto gastrointestinal y la piel) o contaminantes que llegan de distintas fuentes después de la muerte. Estos organismos suelen teñirse débilmente con la hematoxilina.

Una precaución que se debe tomar al diseccionar y extraer órganos de un organismo animal o vegetal, es la limpieza del material utilizado para su manipulación (bisturí, pinzas, etc.) ya que pueden quedar restos de tejidos previamente extraídos que “contaminen” las futuras muestras.

Suelen utilizarse diversos colorantes, como la tinta china, el nitrato de plata, azul o verde alcian para orientar la muestra más fácilmente en el momento de su inclusión. El problema surge cuando el color no queda exclusivamente circunscrito a la superficie del tejido, penetra dentro de éste y colorea diversas estructuras.

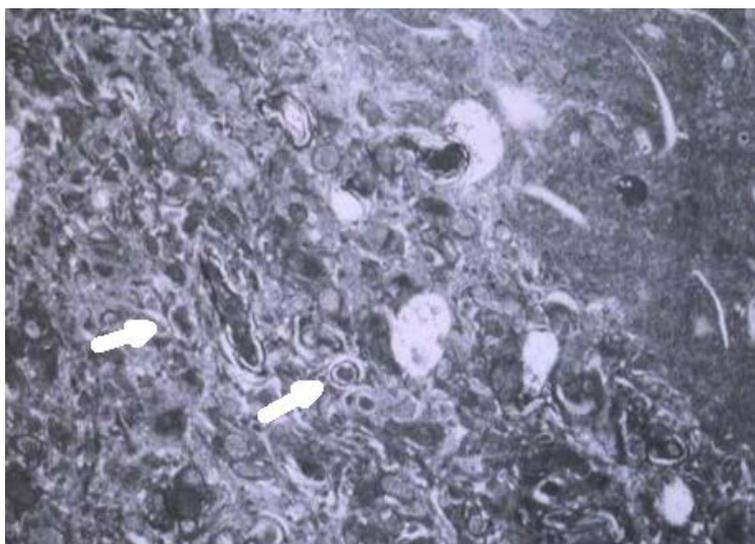
Los fijadores, tan variados en cuanto a características químicas como a efectos de acuerdo a su concentración, son generadores de artefactos en las muestras. Por ejemplo, la presencia de un fino precipitado negro sobre los tejidos, en los intersticios o dentro de los vasos sanguíneos, pero sin relación con alguno de estos, sugiere la formación del pigmento lla-

mado hematina, que surge de la unión del formol (fijador) con el hierro del grupo hemo de la hemoglobina contenida dentro de los glóbulos rojos de la sangre (Fig. 2-9). Este problema se confirma por microscopía de luz polarizada, ya que el pigmento se transforma en birrefringente y aparece como numerosas motas de color blanco brillante sobre la muestra. Este proceso se produce cuando el tampón del formol se agota y el tejido se vuelve ácido, lo que promueve la formación del mencionado complejo. Este pigmento se observa de manera más frecuente en los tejidos que contienen grandes cantidades de sangre como el bazo y los linfonodos. El defecto se soluciona haciendo cortes finos y sumergiéndolos en abundante formalina tamponada.



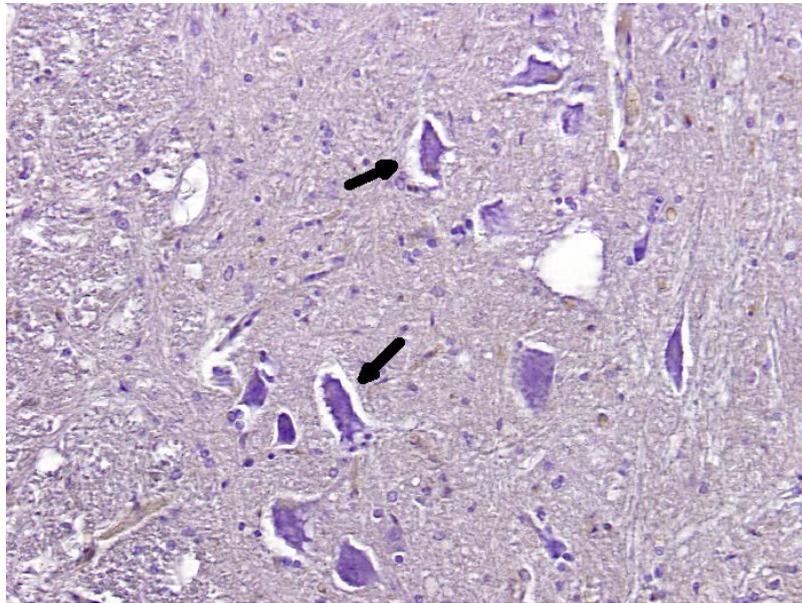
**Fig. 2-9.** El uso de formalina no tamponada utilizada como fijador puede causar el depósito de pigmento (hematina) sobre los tejidos, en forma de pequeñas manchas de color pardo.

Suele suceder, que al descongelar y fijar muestras que fueron rápidamente congeladas para su corte en el criostato o micrótomo de congelación, queden cristales de hielo que lesionan el tejido donde se encuentran. En estos casos, los núcleos celulares se ven rodeados por un espacio claro, aparecen un poco más pequeños y condensados y muestran una coloración más oscura de la cromatina (Fig. 2-10). Asimismo, se puede perder la definición del detalle citoplasmático y nuclear. Estos efectos no se distribuyen de manera uniforme en el corte, pero tienden a observarse en parches irregulares.



**Fig. 2-10.** Sustancia gris de tejido nervioso congelado, descongelado y fijado. Se observa la condensación de algunos núcleos, con la formación de halos blanquecinos a su alrededor (flechas blancas).

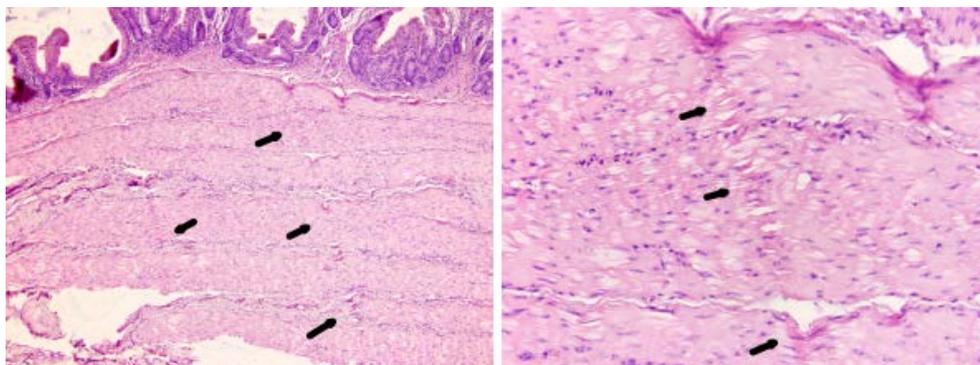
Cuando la cantidad del fijador o el tiempo de fijación no son apropiados suelen observarse rápidos procesos de autólisis del tejido nervioso. En este caso, con mucha frecuencia se detecta una retracción de los vasos sanguíneos o de las neuronas (Fig. 2-11), defecto que se soluciona con la perfusión del individuo, inmediatamente luego de su muerte.



**Fig. 2-11.** Retracción de neuronas (flechas) y de vasos sanguíneos debido a una fijación posterior al comienzo de los fenómenos autolíticos.

Los tejidos que no fueron suficientemente deshidratados antes de su inclusión en parafina son de difícil sección con el micrótopo, lo que provoca todos los defectos previamente mencionados. Si las muestras son tratadas mediante procesadores automáticos, es necesario brindarles un tiempo suficiente de deshidratación. A pesar de los recaudos que se puedan tomar, este proceso resulta más dificultoso en climas húmedos que en climas secos. Lo ideal es trabajar en ambientes secos por aislamiento del exterior o mediante la utilización de acondicionadores de aire, con sistemas de enfriamiento por evaporación. Como resultado del pobre procesamiento, se produce una disrupción del tejido, principalmente por efecto sobre el tejido conjuntivo laxo.

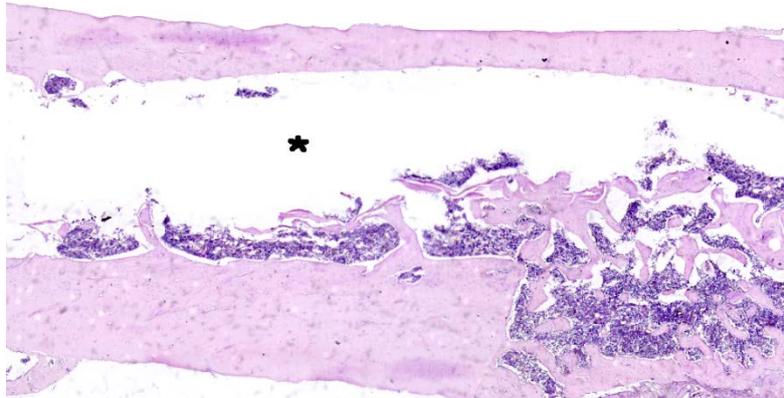
Uno de los artefactos más frecuentes, es la aparición de desgarros del material como resultado del seccionamiento de la muestra por medio de una cuchilla mal afilada. Esto puede originar una posterior interferencia con los objetos a cuantificar (Fig. 2-12).



**Fig. 2-12.** Los desgarros del tejido, comúnmente llamadas mellars (flechas), son frecuentes cuando las cuchillas de corte no están bien afiladas.

La dureza del tejido que se está seccionando es otro aspecto a considerar ya que un órgano blando exige menos cuidados que uno duro. El hueso es un tejido sumamente duro, que requiere algún tipo de reblandecimiento por descalcificación previo a su seccionamiento. Cuando se cortan huesos para la observación de la reacción medular, es probable que la

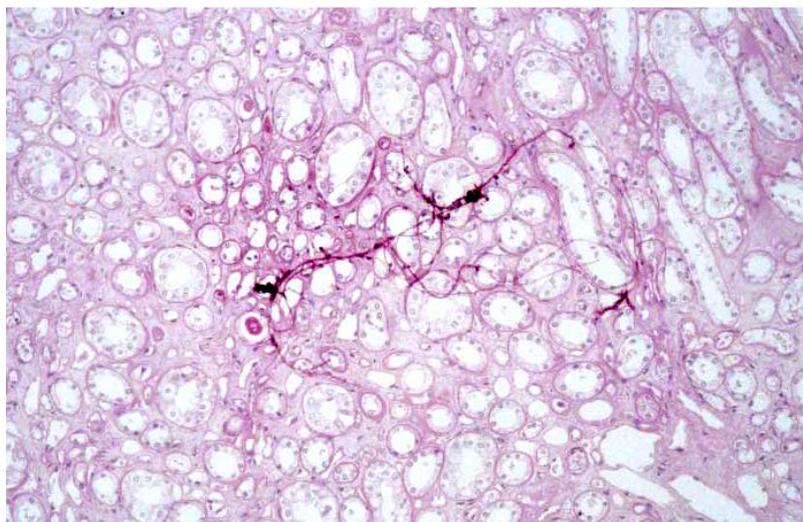
cuchilla arrastre el material blando si el tejido no fue bien descalcificado (Fig. 2-13). Sin embargo, la sobre-descalcificación por exposición prolongada a agentes ácidos puede producir daño de los tejidos fijados. El exceso de descalcificación induce una sobretinción con eosina (rosado intenso) y con marcada pérdida de hematofilia nuclear (azul pálido). El detalle nuclear y citoplasmático se va perdiendo.



**Fig. 2-13.** Si la desmineralización del hueso no fue efectiva, el material blando puede ser arrastrado y eliminado al realizar el corte. En este caso, se ve la pérdida de parte de la médula ósea (\*).

Al momento de montar los cortes sobre el cubreobjetos, es muy frecuente que se formen burbujas de aire alrededor de las muestras, que resultan en la deshidratación de las secciones montadas y con ello, el cambio de densidad del tejido. Las burbujas también se pueden formar cuando la cantidad del medio de montaje no es suficiente. En estos casos, al retraerse dicho medio se aspira aire del exterior que queda atrapado debajo del cubreobjetos (Fig. 2-3). La contaminación con sustancias clarificantes (solventes) como el xilol, también inducen la producción de burbujas.

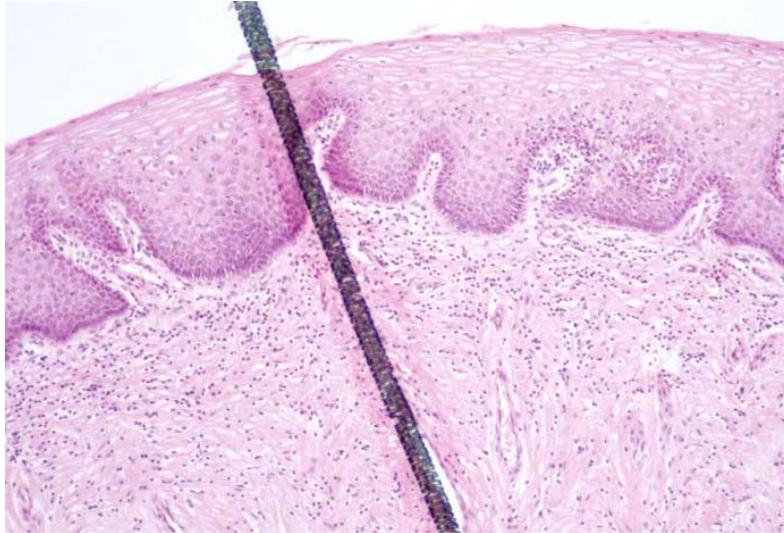
Las burbujas también son causadas por una mala técnica de flotación, en donde el corte es “tirado” sobre el portaobjetos, en lugar de ser suavemente arrastrado a través de la superficie del agua. Por otra parte, las burbujas presentes en el baño donde flotan las muestras pueden ser atrapadas por el portaobjetos, quedando por debajo de la muestra. Este problema se soluciona hirviendo el agua del baño de flotación durante unos minutos previos a su uso.



**Fig. 2-14.** Presencia de hongos (hifas y conidias) sobre el tejido renal. Tinción: PAS.

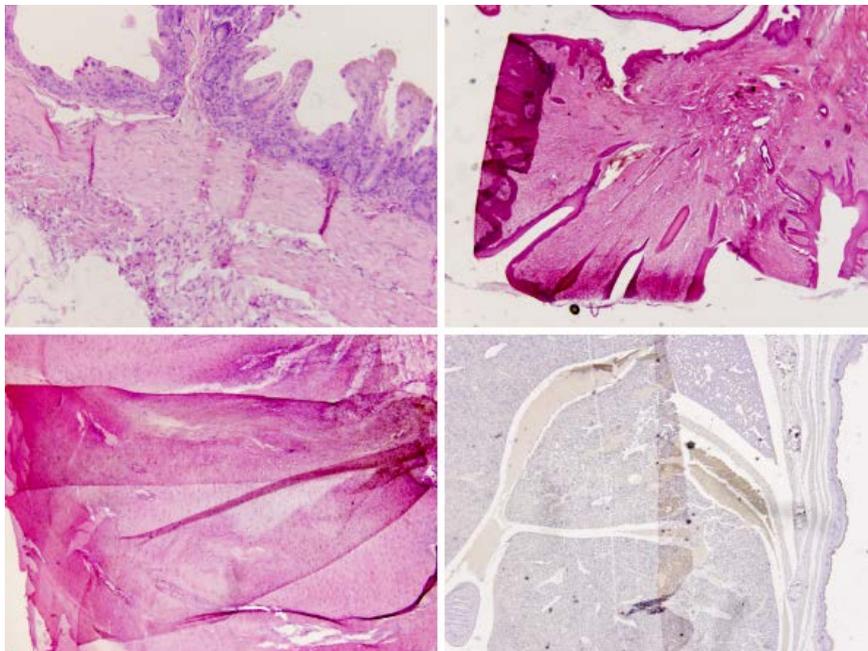
Muchas veces aparecen “elementos contaminantes” sobre los cortes teñidos. Pueden ser células descamadas o mucosidades provenientes del técnico que realizó el proceso, microorganismos presentes en el aire, principalmente hongos (Fig. 2-14), fibras provenientes del

aire, resto de otros cortes flotando en el baño térmico, pelos del pincel usado para la transferencia de las secciones desde la cuchilla de corte hasta el baño de flotación (Fig. 2-15) o tierra.



**Fig. 2-15.** Presencia de un pelo del pincel utilizado para transportar el corte histológico desde el micrótopo hasta el portaobjetos.

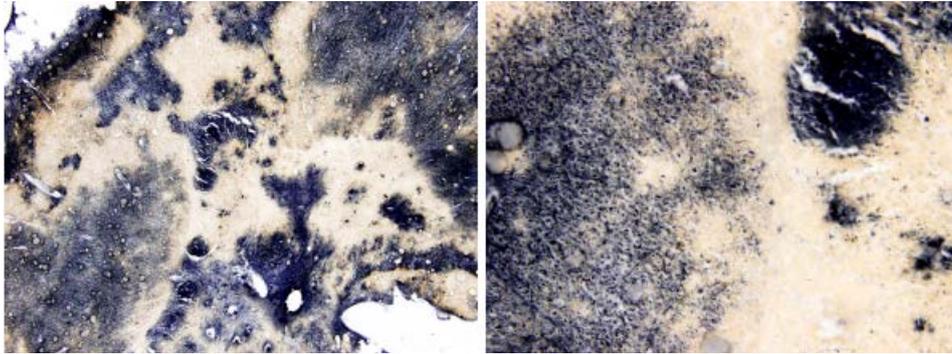
Cuando se montan los cortes sobre el portaobjetos pueden producirse pliegues de los mismos, que si bien pueden pasar desapercibidos a simple vista, se observan fácilmente en el microscopio y generan todo tipo de inconvenientes. Todo tejido plegado incrementa la densidad de tinción, cualquiera sea esta (tinciones histológicas, inmunohistoquímicas, etc.) (Fig. 2-16), generando un error no deseable, particularmente en las muestras que serán utilizadas para estudios de densidad óptica o intensidad de luz, sobre todo si la captura y el análisis se hacen de manera totalmente automatizada.



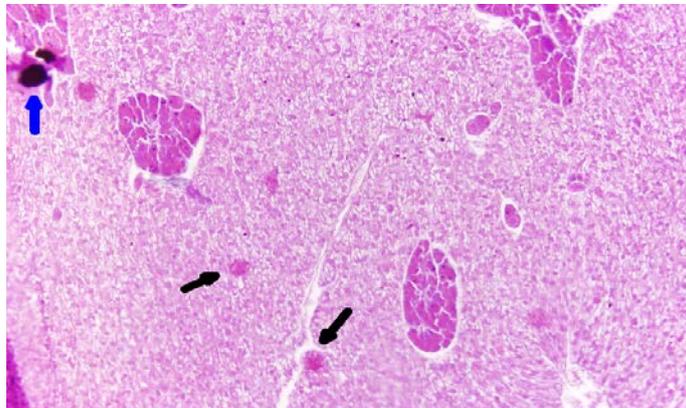
**Fig. 2-16.** Los pliegues que se producen en los tejidos al montarlos sobre el portaobjetos, generan un aumento de la densidad, independientemente del tipo de tinción, del tejido involucrado o del sector donde estos se encuentren.

Los artefactos de tinción más frecuentes se deben a la presencia de parafina, por presencia de restos de la misma (Fig. 2-17) y a depósitos de colorantes utilizados en las tinciones histológicas (Fig. 2-18), inmunohistoquímicas (Fig. 2-19) o inmunofluorescentes (Fig. 2-

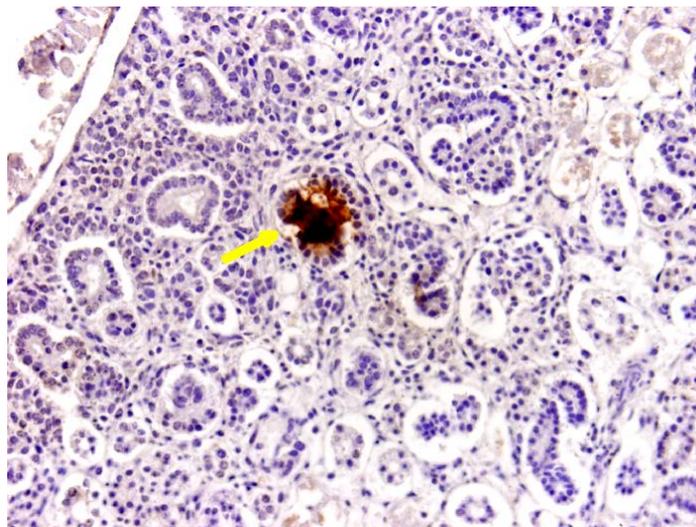
20). Los restos de parafina, que imposibilitan la tinción uniforme del corte histológico, son eliminados con la desparafinación final, previa al montaje del cubreobjetos sobre la muestra, no quedando evidencias del error de la tinción.



**Fig. 2-17.** Defecto de tinción del tejido nervioso por falla en el desparafinado del corte. Las áreas no teñidas se corresponden con la presencia de parafina durante la tinción. Tinción con sales de plata.



**Fig. 2-18.** Los depósitos de colorante pueden dar la apariencia de estructuras con tinción positiva (flechas negras). La deposición de altas concentraciones del colorante puede visualizarse como puntos oscuros (flecha azul). Tinción con hematoxilina y eosina.



**Fig. 2-19.** El colorante utilizado en las reacciones inmunohistoquímicas también puede depositarse de manera inespecífica sobre los tejidos (flecha amarilla).

Existen diversas sustancias que se utilizan para fijar el corte al portaobjetos con el fin de impedir su desprendimiento en los procesos de recuperación de antígenos. No todas las sustancias utilizadas son de la misma calidad y algunas de ellas se tiñen con el mismo

colorante usado sobre la muestra. Esto afecta, de alguna manera, la densidad de luz observada en el microscopio. Al teñir los cortes de tejido nervioso con colorantes como el violeta de cresilo, la gelatina utilizada para fijarlos al portaobjetos también se puede teñir, sobre todo si se encuentra en altas concentraciones (Fig. 2-21). Una posible solución, es disminuir la concentración de la gelatina utilizada.

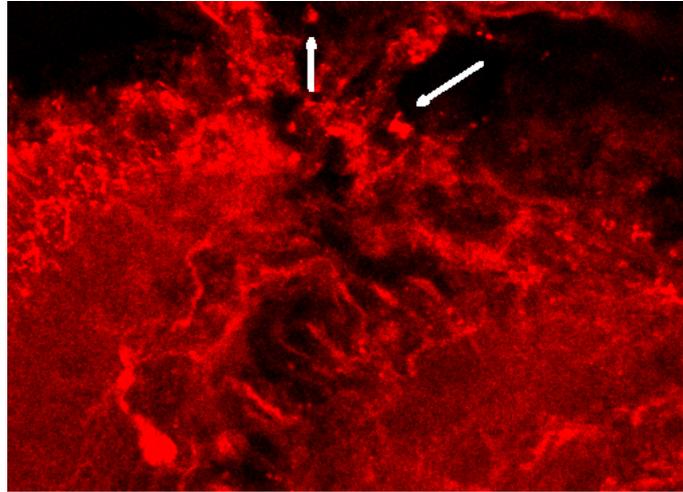


Fig. 2-20. Al igual que con las otras técnicas, el material fluorescente puede depositarse sobre los tejidos y dar la apariencia de un falso positivo (flechas).

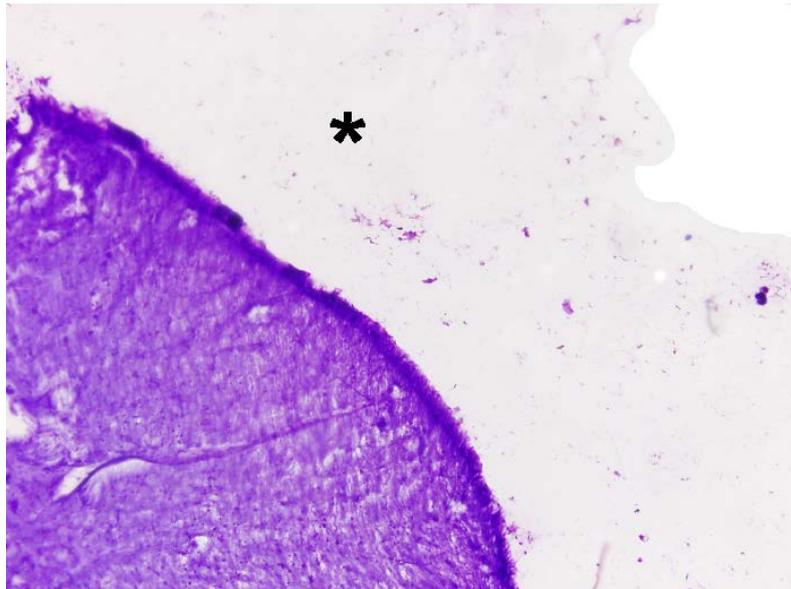
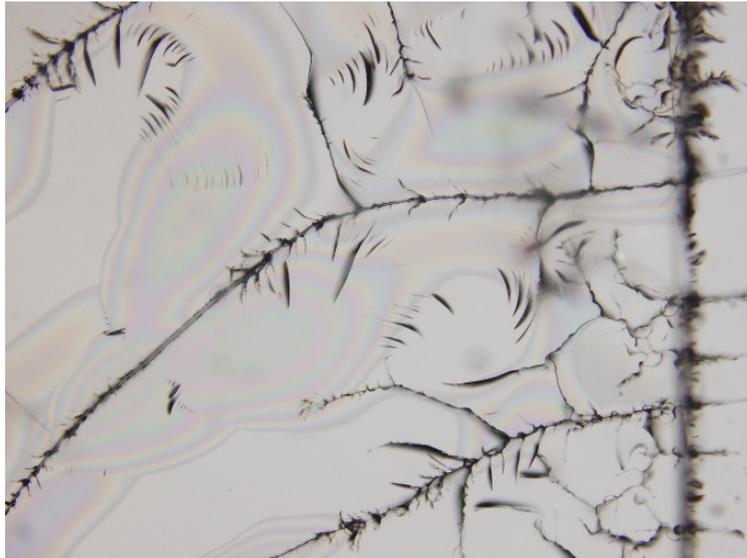


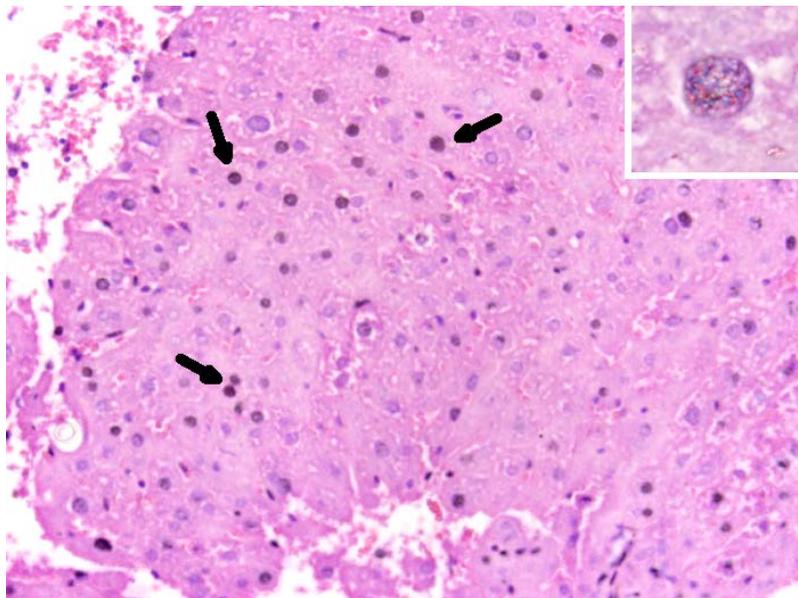
Fig. 2-21. La gelatina en altas concentraciones puede teñirse con los mismos colorantes de los tejidos. Esto produce un efecto enturbiante del paso de luz (\*). Tinción violeta de cresilo.

Previo a su observación microscópica, los cortes histológicos deben cubrirse con un vidrio cubreobjetos. El medio de montaje utilizado para este fin también puede generar artefactos, por presencia de impurezas que contaminan la muestra de manera directa. A esto se le agregaría la desecación y retracción de los medios de montaje sintéticos, en donde se observa el fenómeno de “*cracking*”, es decir, la producción de ramificaciones del material, a modo de vegetales (Fig. 2-22).

Las muestras de tejido que se desecan también pueden verse afectadas. En la figura 2-23 se observa la aparición de núcleos oscuros que carecen de detalles visibles. Este defecto se produce cuando transcurre un tiempo excesivo entre la eliminación del xileno para la clarificación de la muestra y la aplicación del cubreobjetos. La sección comienza a secarse y se forman burbujas diminutas que quedan atrapadas en los núcleos, aspecto que se subsan desmontando y remontando el cubreobjetos.



**Fig. 2-22.** Efecto de la desecación del medio de montaje sintético. Además de las formaciones arboriformes, se observa una difracción de la luz (fenómeno de interferencia), lo que dificultaría la correcta lectura de la densidad óptica.



**Fig. 2-23.** Efecto de la desecación del corte. Los núcleos se ven oscurecidos (flechas). En el detalle se puede observar la presencia de burbujas diminutas dentro del núcleo.

Un error que se comete con bastante frecuencia en las tinciones inmunohistoquímicas sobre tejidos animales, es la falta de inhibición de la peroxidasa endógena o de la fosfatasa alcalina, lo que conduce a una coloración inespecífica. La peroxidasa endógena se localiza en los eritrocitos y en menor medida en los granulocitos, tanto en tejidos fijados con formalina como en el tejido fresco. La figura 2-24 muestra una tinción de peroxidasa residual en los glóbulos rojos dentro de los vasos sanguíneos, en una sección de pulmón. Una precubación del tejido con peróxido de hidrógeno podría eliminar este artefacto. La actividad endógena de la fosfatasa alcalina no se conserva en preparaciones embebidas en parafina, por lo que este inconveniente se puede observar sólo en las secciones congeladas y extendidos celulares.

De la misma manera que se producen fallas en la tinción previas al montaje del cubreobjetos, también se originan decoloraciones posteriores. En muestras teñidas con colorantes histológicos, la decoloración se puede deber a la aireación de las mismas. En la figura 2-25 se observa la palidez de tinción del tejido que se encuentra cerca de una fractura del cubreobjetos. La exposición excesiva a la luz, también causa decoloración.

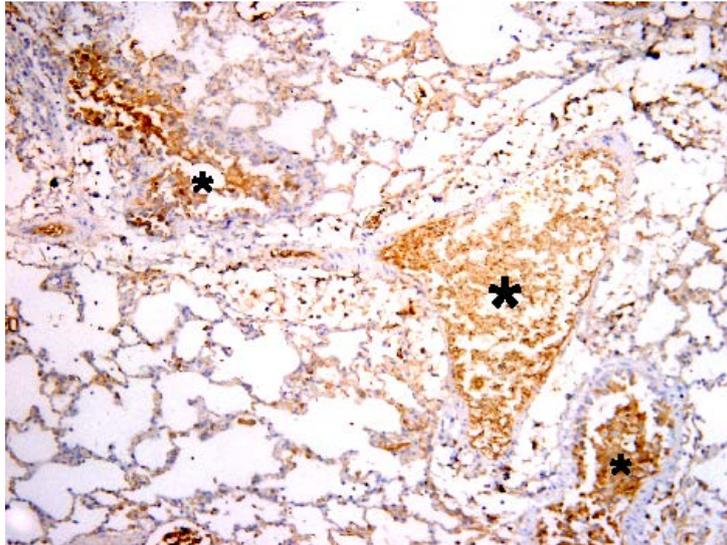


Fig. 2-24. La falta de inhibición de la peroxidasa endógena de los glóbulos rojos hace que los mismos se vean teñidos cuando se realizan tinciones inmunohistoquímicas (\*).

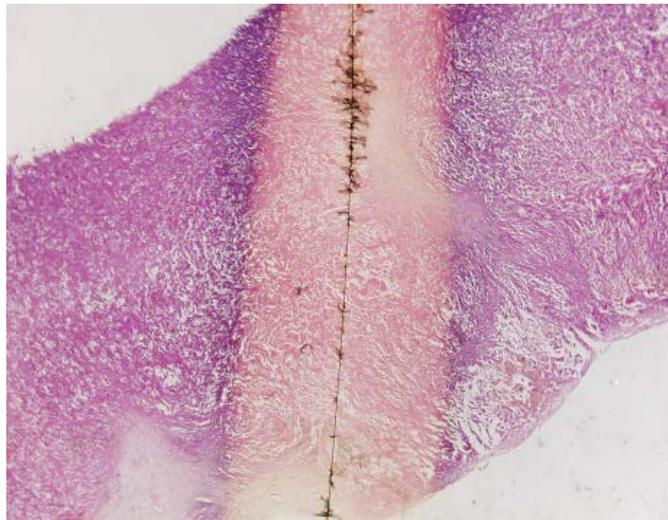


Fig. 2-25. Decoloración del tejido próximo a una rajadura en el cubreobjetos.

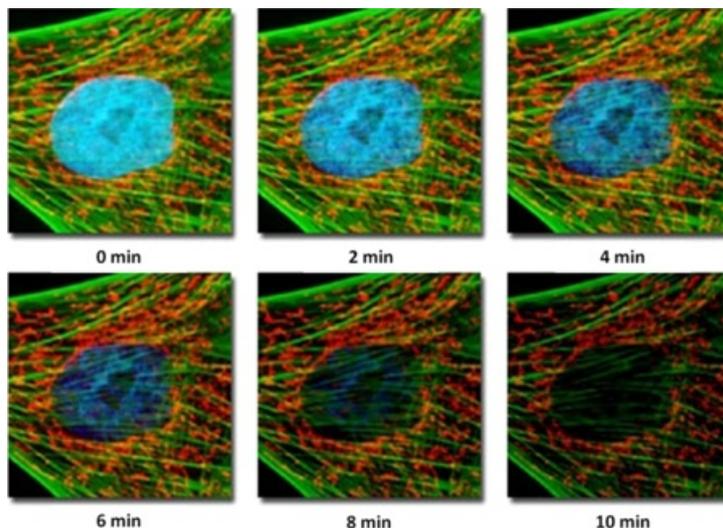
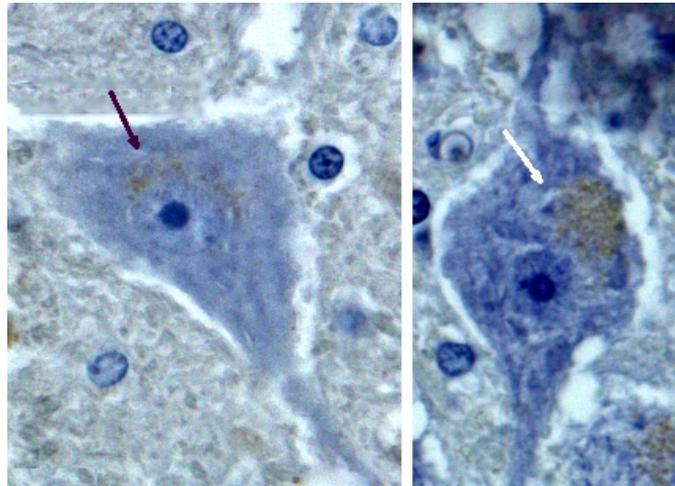


Fig. 2-26. Fotoblanqueo en un fibroblasto. Las coloraciones azul y verde van desapareciendo con el tiempo. El color rojo pareciera mantenerse inalterado. Obtenida de: [http://physwiki.apps01.yorku.ca/index.php?title=Main\\_Page/BPHS\\_4090/microscopy\\_II](http://physwiki.apps01.yorku.ca/index.php?title=Main_Page/BPHS_4090/microscopy_II)

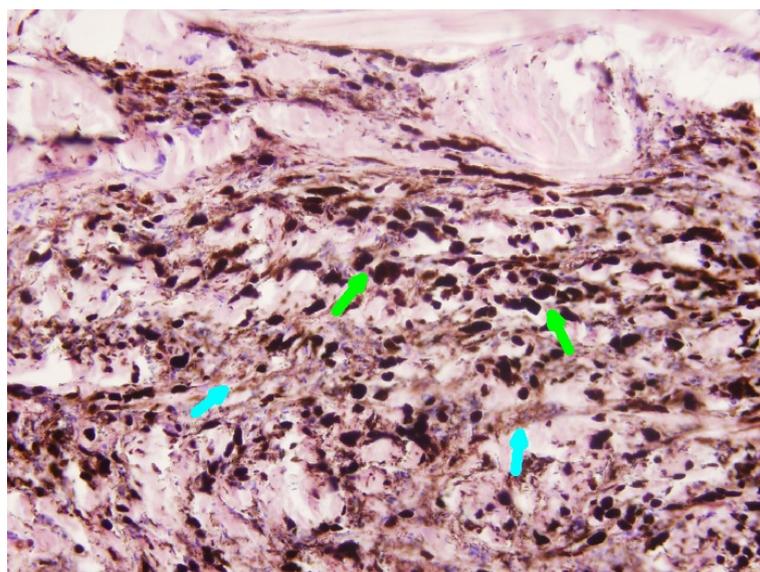
En las muestras incubadas con sustancias fluorescentes, la lámpara de mercurio o el láser pueden producir fotoblanqueo (del inglés, “*photobleaching*”) de todo el campo visual o de la región afectada, respectivamente (Fig. 2-26).

Un detalle que se debe tener en cuenta cuando se analiza el color de las muestras de tejido animal es la presencia de pigmentos, sustancias que tienen la propiedad de cambiar el color de la luz que reflejan como resultado de la absorción selectiva de la misma. Este proceso físico es diferente al de la fluorescencia, fosforescencia y otras formas de luminiscencia, en las cuales el propio material emite luz.



**Fig. 2-27.** Presencia del pigmento lipofuscina (color parduzco) dentro de neuronas de animales viejos. Se observa su distribución perinuclear (flecha negra) o en manchones dentro del citoplasma (flecha blanca). Tinción violeta de cresilo.

Muchos materiales absorben selectivamente ciertas frecuencias de luz, dependiendo de su longitud de onda. Algunas estructuras biológicas como la piel, los ojos y el pelo, contienen melanina, pigmento presente en células macrofágicas llamadas cromatóforos o melanóforos. En cortes histológicos teñidos con colorantes convencionales (Hematoxilina-Eosina, Violeta de cresilo, etc.), los pigmentos dificultan la visualización de estructuras, pero de alguna manera, es posible discriminarlos del resto del tejido (Fig. 2-27). La situación se complica cuando en las tinciones inmunohistoquímicas la longitud de onda de la diaminobencidina (colorante) se cruza con la de la melanina (Fig. 2-28).

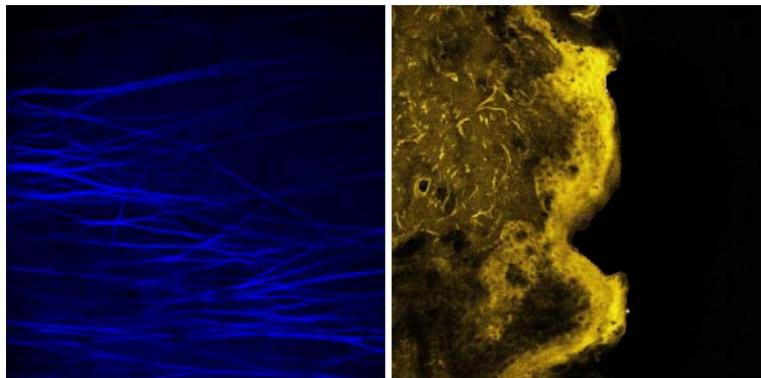


**Fig. 2-28.** Reacción inmunohistoquímica donde se observa la coloración pardo oscura de la diaminobencidina (flechas celestes) entremezclada con la melanina cargada dentro de los macrófagos (flechas verdes).

Otro fenómeno que suele interponerse en el análisis de intensidad o de las formas o simplemente en la identificación de los objetos, es el proceso de autofluorescencia. Esta se define como la emisión natural de la luz por parte de estructuras biológicas, como las mitocondrias, que debe ser distinguida de la luz artificial procedente de marcadores fluorescentes (fluoróforos). La matriz extracelular también puede contribuir a la autofluorescencia debido a las propiedades intrínsecas del colágeno y la elastina (Fig. 2-29). En general, las proteínas que contienen una mayor cantidad de los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina muestran algún grado de este fenómeno lumínico. Uno de los pigmentos biológicos más importantes que se encuentra presente en todos los organismos con plastos en sus células es la clorofila, que también genera este tipo de efecto.

La autofluorescencia interfiere con la detección de señales fluorescentes específicas, sobre todo cuando estas son muy tenues. Para distinguir el fenómeno de autofluorescencia de la fluorescencia específica de un marcador, es necesario contar con un microscopio confocal que diferencia los tiempos de vida útil de los fluoróforos excitados y de las moléculas endógenas. Mejor aún, los microscopios espectrales permiten capturar datos de la imagen en frecuencias específicas a través del espectro electromagnético. En estos microscopios, las longitudes de onda pueden separarse mediante filtros o por instrumentos sensibles a las mismas. Las imágenes espectrales obtienen información adicional, que el ojo humano no logra captar con sus receptores para el rojo, verde y azul.

La fuga espectral es un proceso en el cual dos fluoróforos pueden aparecer simultáneamente cuando la excitación de uno de ellos solapa el espectro de absorción del segundo. Para evitar estos inconvenientes, cuando se utiliza microscopía de fluorescencia de campo ampliado, donde la fuente de luz cubre un amplio espectro de longitudes de onda visibles, la selección de los fluoróforos apropiados es el paso fundamental. Por su parte, si los fluoróforos seleccionados se solapan en algún punto del espectro, cuando se utiliza microscopía confocal, conviene capturar cada uno de los canales de manera secuencial y no simultánea.



**Fig. 2-29.** Autofluorescencia de fibras de elastina (izquierda) y de la piel (derecha) cuando se las excita con un láser de 405 nm.

La fuga espectral, también conocida como “sangrado” o “entrecruzamiento” (del inglés, “bleed-through” y “crossover” o “crosstalk”) de emisión de fluorescencia, se produce por la presencia de anchos de banda de luz excesivamente amplios y a perfiles espectrales asimétricos provenientes de muchos fluoróforos (Fig. 2-30). Este inconveniente debe ser abordado tanto en la microscopía de campo ampliado como confocal. El fenómeno se manifiesta generalmente por la emisión de un fluoróforo que se detecta en el canal fotomultiplicador o a través de la combinación de filtros reservados para un segundo fluoróforo. Los artefactos por sangrado a menudo complican la interpretación de los resultados experimentales, particularmente si se hacen estudios de colocalización subcelular de fluoróforos o en mediciones cuantitativas, tales como en la transferencia de energía de resonancia (FRET) y fotoblanqueo (FRAP).

Esta aberración se produce con mayor frecuencia entre el iso-tiocianato de fluoresceína y la rodamina. Los efectos se pueden disminuir al utilizar filtros que separan ampliamente los anchos de banda, pero no se descartan totalmente. Existen fluoróforos sintéticos, tales como los del grupo de los Alexa, que si bien poseen diferentes longitudes de onda, pueden

llegar a solapar entre algunos de estos espectros. Tal es el caso del Alexa 488 y el Alexa 555; ambos fluoróforos comienzan a entrecruzarse aproximadamente en los 550 nm, que es el punto en donde decae el primero y comienza a excitarse el segundo. En la figura 2-31 se observan gráficas comparativas de la superposición espectral, en una serie de combinaciones del fluoróforo Alexa Fluor (AF), potencialmente útiles para la marcación dual de tejidos. El solapamiento entre el AF 488 y el AF 555 puede ser indeseable si la emisión del primero supera ampliamente a la del segundo, hecho que podría ocurrir si la cantidad de elementos marcados por el primero es significativamente mayor a la del AF 555.

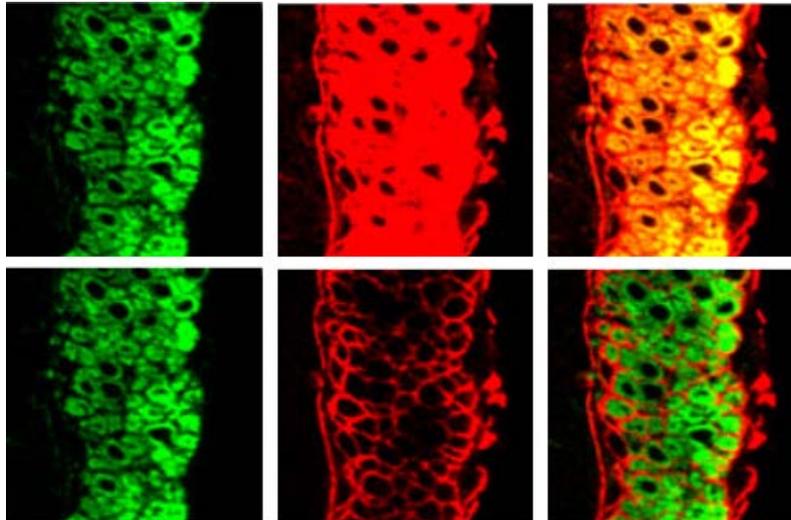


Fig. 2-30. En la fila superior se muestra la captura simultánea de los fluoróforos Alexa Fluor 488 (izquierda) y Cy3 (cianina) (centro) cuyos espectros de absorción y emisión son similares a los de la fluoresceína y la rodamina, respectivamente. Aquí se observa claramente el "sangrado" del primer fluoróforo sobre el segundo. La superposición de ambos canales (derecha) se visualiza de color amarillo. En la fila inferior se registra la captura secuencial de ambos fluoróforos, donde prácticamente desaparece el efecto de sangrado. Obtenido de: <http://www.olympusconfocal.com/theory/bleedthrough.html>

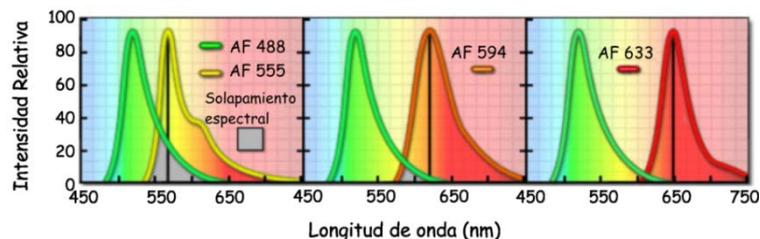


Fig. 2-31. Izquierda: se observan los picos bien separados del Alexa Fluor (AF) 488 y AF 555. Sin embargo, se ve que existe un nivel moderado de solapamiento espectral (en gris) del AF 488 en el pico de emisión del AF 555 (marcado por la línea negra vertical). Para el AF 594, el solapamiento es menor (centro) y prácticamente desaparece para el AF 633 (derecha). En estas gráficas, el espectro de emisión fue normalizado para su comparación. Modificado de: <http://www.olympusconfocal.com/theory/bleedthrough.html>

Afortunadamente, existen programas informáticos que separan intensidades con longitudes de onda similares, de manera tal que cada una de ellas se vea de distinto color (ver Capítulo 5).

### ***Errores sistemáticos y aleatorios***

De acuerdo a lo descrito en el presente capítulo, si se cometen equivocaciones en la preparación de las muestras son muchas las probabilidades de llegar a un análisis erróneo de los datos. Estos errores pueden ser considerados como sistemáticos o aleatorios.

Los errores sistemáticos se producen sobre todas las muestras, en algún eslabón del proceso desde su preparación hasta su análisis estadístico y se detectan cuando los valores finales se desvían de la normalidad, en una dirección sistemática. Estos errores presentan sesgos de los valores obtenidos, lo que conduce a que el promedio de muchas mediciones individuales difiera significativamente del valor real del atributo medido. Pueden ser constantes o relativos (proporcionales o porcentuales) con respecto al valor real. Los constantes se deben a fallas en la calibración del instrumento de medición y sólo se eliminan con su puesta a punto. Este tipo de error no tiende a anularse al aumentar el tamaño de la muestra. Está implícito en el diseño del estudio y resulta difícil de corregir en la fase analítica. Los errores relativos pueden deberse a cambios ambientales, a las características del operador o del proceso de medición, etc.

Los errores sistemáticos que se producen durante el proceso de análisis de las imágenes se pueden clasificar en:

**A. Procesamiento del tejido.** Se considera a todo lo relacionado con el proceso de fijación de las muestras, así como su inclusión en diferentes materiales para su posterior seccionamiento, el corte en sí mismo (métodos de corte y grosor) y finalmente la tinción utilizada. Todos estos puntos han sido discutidos previamente.

**B. Escala de medición de la muestra.** Al analizar las imágenes se debe establecer cuál es su resolución espacial (ver Capítulo 1) y que todas las muestras que vayan a ser comparadas tengan la misma escala.

**C. Identificación de los objetos.** Resulta necesario que el profesional que analice las muestras reconozca las diferentes estructuras que quiera cuantificar o medir. Previamente se hizo mención a la forma que diversos artefactos se confunden con objetos cuantificables.

**D. Exactitud.** Una medición es exacta cuando los errores sistemáticos asociados con ella son insignificantes o nulos. Esto se consigue al emplear las herramientas apropiadas para cada caso. El uso de reglas o calibres está limitado por el material constitutivo de los mismos, su estado actual y la capacidad del observador para realizar una lectura exacta. Es indeseable el empleo de estos instrumentos en la medición de imágenes digitales sobre el monitor. En su lugar, se deben utilizar reglas digitales dentro de un programa de análisis y mejor aún, tratar de automatizar la medición para evitar el efecto subjetivo del operador.

**E. Densidad/Intensidad de luz.** Muchos de los artefactos mencionados son responsables de los errores sistemáticos, sobre todo cuando se realizan estudios de densitometría o de intensidad de luz. En los estudios de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, la especificidad de los anticuerpos utilizados es la causa preponderante. Lo ideal es trabajar con moldes exactos de las moléculas a analizar, pero no siendo esto posible, el uso de anticuerpos resulta de excelente ayuda, aunque no siempre de manera totalmente efectiva. Los anticuerpos monoclonales se unen específicamente a la molécula que le dio origen. No obstante, muchas veces estos anticuerpos vienen “contaminados” con otras proteínas, lo que requiere de diferentes tipos de purificaciones para su eliminación. Los anticuerpos policlonales, por su parte, son un conjunto de moléculas que se dirigen contra diferentes dominios dentro de las proteínas. Esto induce a que las moléculas de color (diaminobencidina, fluoróforos, etc.), utilizadas para identificar su unión con las moléculas diana, se depositen en mayor proporción a la observada con los anticuerpos monoclonales. Como resultado, se observa una mayor densidad o intensidad de la reacción, que distorsiona el resultado final. También se debe tener en cuenta la viabilidad y decaimiento de los colorantes, ya que para hacer estudios comparativos, todas las muestras a ser analizadas deben ser teñidas simultáneamente con el mismo colorante y en el estado en que se encuentre. Finalmente, los colorantes utilizados para la contra-tinción en una reacción inmunohistoquímica deben estar lo más diametralmente alejados dentro del círculo cromático (Fig. 1-31), en relación con el colorante principal del ensayo. De esta manera se evitan los errores de segmentación del límite entre el objeto y el fondo (ver Capítulo 5).

Por su parte, los errores aleatorios están determinados por la cantidad de muestras tomadas para realizar el estudio; esto ya no depende del estado de las mismas, sino de la cantidad incorporada al estudio analítico. Las fuentes de estos errores son difíciles de identificar o sus efectos no se pueden corregir totalmente; pueden ser numerosos y pequeños, pero su acumulación hace que las medidas fluctúen alrededor de una media. Una medición precisa

es aquella en la que la dispersión de los distintos valores obtenidos es pequeña, o sea, cuando los errores aleatorios son pequeños.

Al igual que para con los errores sistemáticos, es posible realizar una simple clasificación de los errores aleatorios:

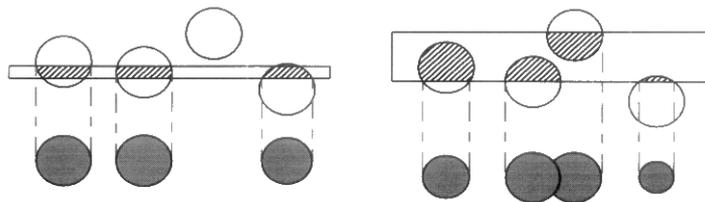
**A. tamaño de la muestra.** ¿Cuántas imágenes se deben capturar, con qué resolución y a partir de cuántos cortes histológicos, para lograr un resultado preciso y confiable? No existe una respuesta única y excede el propósito de este libro. Sólo se puede decir que debido a que los datos obtenidos mediante análisis de imágenes son necesariamente estadísticos, es fundamental seguir las reglas de la estadística para cumplir con el objetivo propuesto. Lo que se busca es que, sea cual fuere la cantidad de imágenes analizadas, los resultados arrojen la menor dispersión posible para cumplir con el requisito de la exactitud.

**B. Distribución de los objetos.** Al momento de capturar las imágenes hay que tener en cuenta la distribución de los objetos a analizar dentro del órgano, del tejido o de la muestra y que ésta se repita a lo largo de todas las imágenes capturadas que se van a comparar.

**C. Selección al azar.** Debe considerarse que la distribución de los objetos a cuantificar no condiciona a que la captura de las imágenes dentro de la muestra deje de ser aleatoria. Este es un principio fundamental de la estereología (ver Capítulo 6) que debe ser respetado, aún para las mediciones no estereológicas de las imágenes digitales.

**D. Forma y tamaño de los objetos.** No todos los objetos a cuantificar o medir tienen las mismas formas y tamaños. Por ello, durante la captura se debe considerar la mínima magnificación en donde los objetos más pequeños se puedan resolver con facilidad, sin recurrir a técnicas de separación de los mismos.

**E. Espesor de la muestra.** Cuando se trabaja con microscopía confocal (ver Capítulo 3) se pueden utilizar cortes gruesos ya que, por la particularidad del microscopio, no influye en el foco de todo el espesor de la muestra. Más aún, permite obtener una pila de imágenes que posteriormente puedan ser reconstruidas tridimensionalmente (3D). Sin embargo, cuando se realizan estudios histoquímicos y se miden densidades/intensidades o se hacen recuentos de objetos, el grosor de la muestra es un elemento clave. En este tipo de estudios es necesario que el grosor de la muestra sea el mínimo posible, para evitar el llamado efecto Holmes (Fig. 2-32).



**Fig. 2-32.** Efecto Holmes. La muestra, representada por los círculos blancos, se proyecta (círculos negros) de acuerdo con el espesor del corte.

El efecto Holmes se manifiesta como un problema de sobre-proyección debido al grosor de la muestra. En este caso, los objetos no transparentes se ven más grandes de lo que deberían verse. Cuanto más grueso sea el corte donde se encuentren los objetos, mayor interferencia se observará. Debido a este efecto, si el espesor del corte es proporcional al tamaño de los componentes estudiados, la distorsión de los objetos es el doble de sus relaciones volumétricas. Sólo en secciones que tengan 1/10 o 1/20 partes del diámetro medio de las estructuras estudiadas permitirá ignorar el efecto.

Para evitar el efecto Holmes las secciones deben tener una adecuada orientación (para objetos anisomorfos), un adecuado espesor, los objetos deben estar bien distribuidos y las imágenes deben ser representativas de las muestras. De todas maneras, afortunadamente existen métodos matemáticos que pueden corregir estas aberraciones utilizando coeficientes especiales. En el Capítulo 4 se describirán diferentes algoritmos tendientes de corregir los defectos de las imágenes.

# Capítulo 3

## Captura de Imágenes



Distintos equipos utilizados para la captura de imágenes: Microscopio estereoscópico, de campo ampliado invertido, de campo ampliado directo, confocal, electrónico y de absorción atómica. Cámara fotográfica digital, videograbadora digital, escáner, cámara de video color, cámara de video ultra-refrigerada, telescopio Hubble.

## ***Formas de Captura***

Como se estableció en el primer capítulo, el ojo humano, a pesar de sus imperfecciones, es la herramienta biológica ideal para capturar las imágenes que posteriormente serán almacenadas, procesadas y analizadas por el cerebro. Lamentablemente, no existe aún un dispositivo que permita extraer y compartir lo que cada individuo visualiza, de manera directa y en tiempo real. Existe en cambio, la posibilidad de registrar físicamente diferentes eventos, a través de dispositivos analógicos y digitales que reproducen imágenes. Estos dispositivos son capaces de capturar procesos que ocurren a niveles inalcanzables para el ojo humano, tanto por su dimensión como por su longitud de onda de emisión.

La captura busca registrar la mejor intensidad del **objeto** a analizar, con un contraste óptimo en relación al **fondo** de la imagen, de manera de identificarlo y medirlo fácilmente. En una imagen, el objeto es todo aquello que sea de interés para el observador, ya sea para modificarlo, medirlo o cuantificarlo, mientras que fondo es todo lo que rodea al objeto y que, por lo general, no se cuantifica, si bien su presencia condiciona el procesamiento.

Uno de los problemas más graves en microscopía es la deficiente diferencia de contraste producida cuando la luz pasa a través de muestras muy delgadas o cuando se refleja por superficies con alto grado de reflectividad. Para evitar la falta de contraste existen varios subterfugios ópticos que lo aumentan y proporcionan variaciones de color en las muestras. Estas técnicas incluyen la luz polarizada, el contraste de fases, el contraste de interferencia diferencial (DIC), la iluminación mediante fluorescencia, el campo oscuro y el uso de varios filtros ópticos, entre otros.

Actualmente existe una gran variedad de dispositivos analógicos (microscopios, telescopios) que, a través de sistemas ópticos, transmiten diferentes intensidades de luz. A su vez, la luz transmitida puede ser capturada de manera directa por el ojo humano o por medio de otros dispositivos analógicos o digitales (cámaras fotográficas, cámaras de video, escáner). Estos últimos son los responsables de modificarla o almacenarla en forma de imagen, en dispositivos digitales (discos, CD, DVD, etc.).

El conocimiento de estos equipos es fundamental para lograr resultados exitosos en el análisis de las imágenes. Esto sirve no sólo para saber cuándo utilizar cada uno de ellos, sino para elegir la configuración más apropiada de acuerdo con el propósito perseguido. La captura de imágenes, en conjunto con la preparación de las muestras determina, al menos, el 50% del éxito final.

## ***Historia del microscopio***

El dispositivo óptico actual se basa en aquellos que, siglos atrás, fueron concebidos como simples magnificadores visuales. Los primeros conocimientos que se tienen acerca del uso de lentes para magnificación fueron aportados por Alhazen, que vivió entre los años 965 y 1040, en una región correspondiente al actual Irán. En sus manifestos, Alhazen contradujo la teoría de la visión de Ptolomeo y Euclides, la que consideraba que los objetos eran vistos por rayos que emanaban de los ojos. Su nueva teoría sostenía que los rayos se originaban en el objeto y no en el ojo. Por sus múltiples observaciones y su extensiva investigación, Alhazen es considerado como el padre de la óptica moderna.

Hacia finales del siglo XVI, Zaccharias y Hans Janssen diseñaron lo que podría considerarse como el principio del microscopio compuesto y del telescopio (Fig. 3-1). Consistía en un tubo rígido de 45 cm de longitud y 5 de diámetro, que contenía una lente en cada uno de sus extremos (bi-convexa en el extremo ocular y plano-convexa en el extremo opuesto), que permitía una magnificación entre 3 y 10 aumentos. El enfoque se obtenía haciendo deslizar el tubo de desplazamiento externo hacia arriba o hacia abajo.

En el siglo XVII, Anthonie Van Leeuwenhoek (1632-1723), un holandés pulidor de lentes fue quien, a través de métodos nunca revelados, creó el primer microscopio con tornillos macro y micrométricos, con la posibilidad de aumentar entre 70 y 250 veces los objetos que observaba (Fig. 3-2). A Van Leeuwenhoek se le deben las primeras descripciones de los protozoarios, células sanguíneas, movimiento de los espermatozoides y muchas otras

estructuras biológicas e inertes. Podría decirse que, de acuerdo a la minuciosidad de sus descripciones, es el padre de la morfometría celular.



**Fig. 3-1.** Micro-telescopio construido por Janssen en 1595. A su derecha se observa un esquema de su funcionamiento.



**Fig. 3-2.** Antonie van Leeuwenhoek y vistas de uno de sus 500 microscopios.

Los microscopios fueron evolucionando, siendo Hooke (1635-1703) quién fabricó un microscopio por combinación entre aquél de la familia Janssen y el de Van Leeuwenhoek (Fig. 3-3). Estaba compuesto por un ocular, un objetivo y un tornillo de enfocado.



**Fig. 3-3.** Microscopio de Hooke (1670).

Hooke fue uno de los científicos experimentales más relevantes de la historia de la ciencia. Entre otras actividades, publicó el libro “Micrographia” (1665) (Fig. 3-4), en el que por primera vez aparecen dibujos de imágenes tomadas con microscopía óptica. En el mismo, se acuña el término de “célula”, a semejanza de las celdas de un panal, para la descripción de las unidades biológicas que forman los tejidos. A partir de ese momento, comenzó una carrera vertiginosa en la fabricación de microscopios, mejorando la calidad de las imágenes y la resolución de los objetos observados (Fig. 3-5).

Simultáneamente comenzaron a aparecer las llamadas tinciones histoquímicas que daban identidad particular a las células y los tejidos. Para ese momento, la medicina comenzó a hacer uso de las ventajas de la microscopía y fue así como pudo relacionarse la presencia de pequeños organismos con las causas de las enfermedades. El paradigma de las enfermedades cambió radicalmente a partir de la introducción del microscopio. Antes de poder observar estructuras tan pequeñas, se consideraba que las enfermedades eran originadas por causas ignotas, por generación espontánea y sujetas a explicaciones hoy consideradas no científicas.

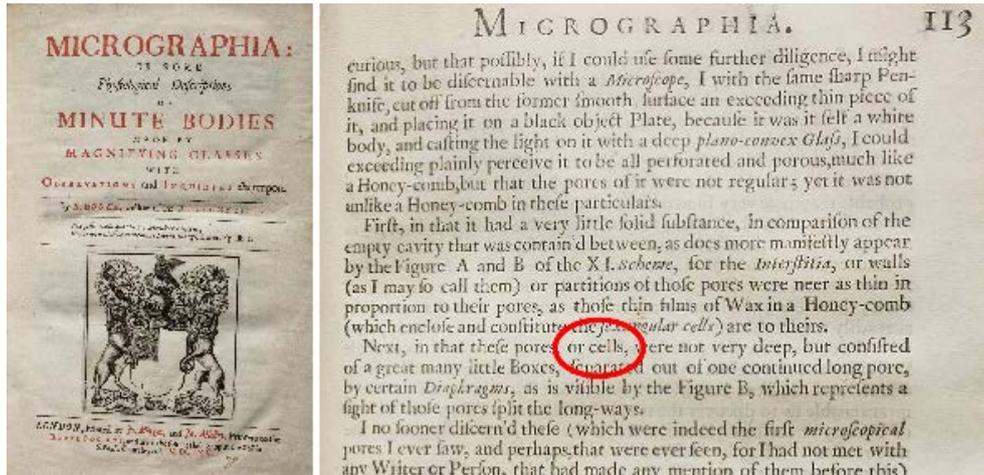


Fig. 3-4. Libro de Hooke, donde aparece por primera vez el término "célula".



Fig. 3-5. Evolución de los microscopios compuestos.

La evolución de la óptica y las ciencias afines propiciaron avances sorprendentes en medicina y biología. Los microscopios ópticos han sido modificados una y otra vez en función del tipo de sustancias implicadas en la tinción de los cortes. Así es como apareció el microscopio de fluorescencia que, al trabajar con una luz generada por un arco voltaico en un vidrio cerrado al vacío conteniendo mercurio o argón, estimula eléctricamente ciertas moléculas visibles al ojo humano. De esta forma, se consigue mayor resolución de los objetos observados. A partir del principio de fluorescencia, aparecieron otros microscopios como el de disco giratorio, el confocal y el confocal multifotónico, estos últimos con una fuente de luz producida por un haz de rayos láser. En los últimos 10 años comenzó a implementarse la microscopía de fuerza atómica para la obtención de mapas tridimensionales de resolución nanométrica en los tres ejes (X, Y, Z).

## Características de la luz

Antes de comenzar con la estructura propia de los microscopios es necesario conocer las características básicas del principio que los rige, esto es, ampliar los objetos mediante sistemas ópticos, basándose en la transmisión o reflexión de la luz.

La luz es la parte de la radiación electromagnética que percibe el ojo humano (Fig. 3-6). Esta radiación es una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, que se propagan a través del espacio, transportando energía de un lugar a otro. De acuerdo a la teoría ondulatoria de la luz, las ondas electromagnéticas vibran en dirección perpendicular a la dirección de propagación.

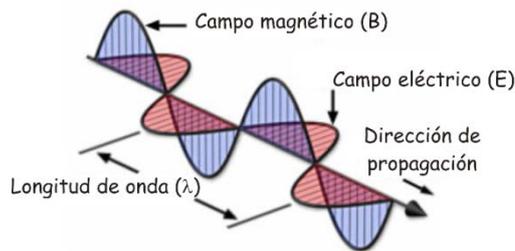


Fig. 3-6. Onda electromagnética.

Desde el punto de vista físico, el término “luz” se usa en un sentido más amplio e incluye todo el campo de la radiación conocido como espectro electromagnético, que es la distribución energética del conjunto de las ondas electromagnéticas. Por su parte, la expresión “luz visible” se refiere específicamente a la fracción del espectro que visualiza el ojo humano.

La luz es, entonces, la resultante de una onda electromagnética con una amplitud específica y con cierta longitud. La amplitud de la onda define el brillo o la intensidad de la misma, mientras que su longitud determina su color.

El espectro electromagnético se extiende desde la radiación de menor longitud de onda, como los rayos gamma y rayos X, pasando por la luz ultravioleta, la luz visible y los rayos infrarrojos, hasta las ondas de mayor longitud, como las de radio (Fig. 3-7).

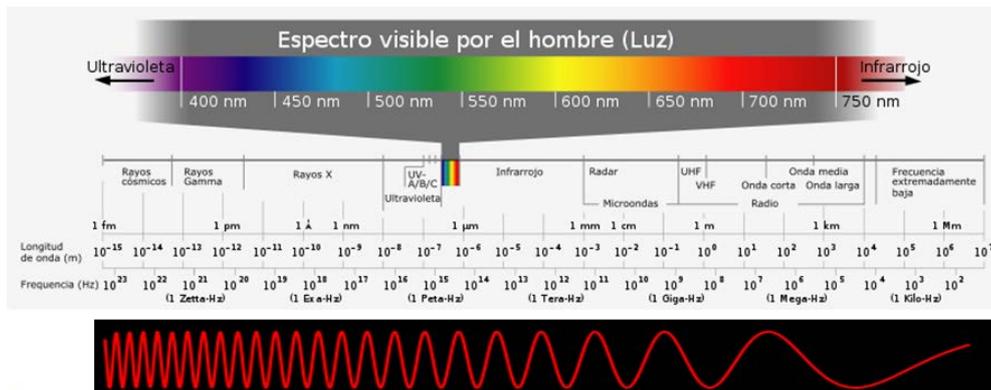
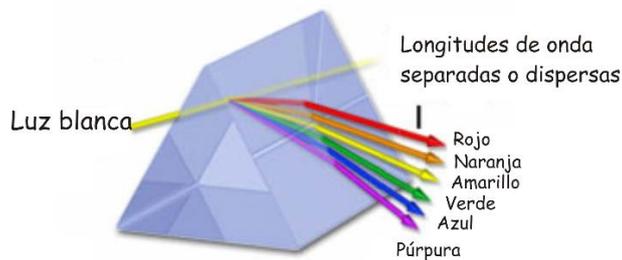


Fig. 3-7. Las ondas electromagnéticas de menor longitud (rayos  $\gamma$  y X) tienen mayor frecuencia, energía y poder de penetración que las de longitudes más largas (radio, microondas). Todas las ondas electromagnéticas viajan a la velocidad de la luz.

Las ondas de luz visible (entre 400 y 750 nm) y del infrarrojo cercano ( $\sim 780$ -2500 nm), son absorbidas y emitidas por los electrones de las moléculas y átomos cuando se mueven de un nivel de energía a otro. Los objetos que no producen luz son visualizados por el ojo humano porque absorben y reflejan una determinada longitud de onda dentro de la región visible del espectro.

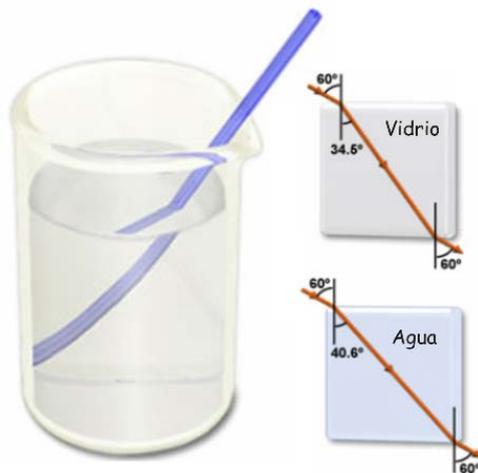
En el vacío, la luz se propaga de manera lineal y a velocidad constante. Al atravesar diferentes medios con distintas densidades, tales como el agua, el aceite y el vidrio, cambian de velocidad y dirección. La **refracción** es la variación brusca de dirección que sufre la luz al cambiar de medio. Esta modificación de la trayectoria será mayor cuanto mayor sea el cambio de velocidad, ya que recorre distancias superiores en aquellos medios en los que

se desplaza más rápido. El índice de refracción es la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y en un medio como el vidrio. La refracción depende de la energía y, por lo tanto, cuando se hace pasar luz blanca o policromática a través de un medio no paralelo (prisma), se produce la separación de la misma en sus diferentes componentes energéticos (Fig. 3-8). En la figura 3-9 se observa el efecto visual que produce la imagen de un sorbete al atravesar tres medios: el aire, el vidrio y el agua.



**Fig. 3-8.** Descomposición de la luz blanca (arco iris) por un fenómeno de refracción.

Otro fenómeno físico que experimenta la luz es la **difracción**. Se basa en el curvado y esparcido de las ondas cuando encuentran un obstáculo o al atravesar una ranura. La interferencia se genera cuando la longitud de onda es mayor que las dimensiones del objeto; por ende, los efectos de la difracción disminuyen hasta hacerse indetectables a medida que el tamaño del objeto aumenta en comparación con aquella. Esta es la razón por la que los objetivos de los microscópicos alcanzan un máximo de resolución determinado, más allá de lo cual se vería todo distorsionado.



**Fig. 3-9.** Efecto visual por el principio de refracción de la luz.

La **reflexión** es la propiedad que tiene un haz de luz de ser absorbido por la materia y luego emitido en todas las direcciones. En la superficie lisa de un espejo, la reflexión se produce únicamente en la misma dirección del rayo incidente ya que el resto de la radiación se pierde.

La luz también se refleja por medio del fenómeno denominado reflexión interna total, que se produce cuando un haz de luz sale con un determinado ángulo, desde un medio donde su velocidad es más lenta a otro donde se desplaza con mayor velocidad. Se produce, entonces, una refracción de la luz tal, que no es capaz de atravesar la superficie entre ambos medios, reflejándose completamente (Fig. 3-10).

La luz puede sufrir otros dos procesos al tomar contacto con la materia: la **absorción** y la **transmisión**. Si la luz es absorbida por la materia, la energía de la misma se transforma en calor. Este fenómeno se origina cuando la luz de una determinada frecuencia toma contacto con un material cuyos electrones tienen la misma frecuencia vibracional. En este caso, los electrones absorben la energía de la luz y la transforman en movimiento vibracional. Durante su vibración, los electrones interactúan con los átomos vecinos de tal manera, que la convierten en energía térmica. La energía proveniente de la luz transformada en calor

nunca se recupera como luz. Dado que los átomos y moléculas tienen diversas frecuencias naturales de vibración, éstos absorben selectivamente diferentes frecuencias de la luz visible.

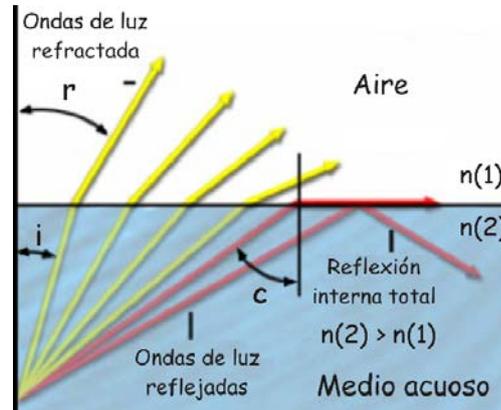


Fig. 3-10. Ejemplos de refracción, reflexión y reflexión interna total, donde  $r$ ,  $i$  y  $c$  son ángulos de desplazamiento de la luz. La densidad de los medios se define por el  $n$ .

La reflexión y la transmisión se producen porque las frecuencias de las ondas de luz no coinciden con las frecuencias naturales de vibración de los objetos. Cuando las ondas de luz impactan sobre un cuerpo, los electrones presentes en sus átomos comienzan a vibrar. Pero en lugar de hacerlo en resonancia con una gran amplitud, lo hacen con pequeñas amplitudes de vibración durante periodos breves. Por esta razón, la energía es emitida nuevamente como una onda de luz. Si el material es transparente, las vibraciones de los electrones se transfieren a los átomos vecinos a través de este, y se emiten por el lado opuesto del mismo, generando frecuencias de luz transmitida. Si por el contrario el objeto es opaco, las vibraciones de los electrones no pasan de un átomo a otro a través del mismo. En su lugar, los electrones de los átomos de la superficie del material vibran durante periodos cortos y luego vuelven a emitir la energía como una onda de luz reflejada. A modo de síntesis, la figura 3-11 muestra las propiedades de la luz sobre la materia.

El fenómeno de la **polarización** de la luz se observa cuando uno de dos cristales transparentes colocados en forma paralela, está girado en un ángulo tal con respecto al otro, que no permite el paso de luz. La luz atraviesa los cristales con su mayor intensidad, cuando el cristal girado se encuentra a  $90^\circ$  sexagesimales respecto al ángulo de total oscuridad. Este principio es utilizado en ciertas técnicas microscópicas para lograr patrones de luz, que de otra forma no se obtendrían (Fig. 3-12).

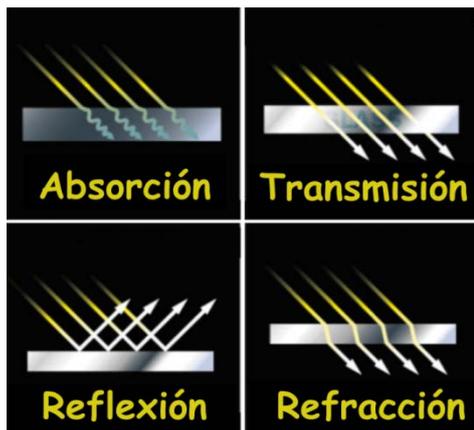


Fig. 3-11. Propiedades de la luz al tomar contacto con la materia.

De acuerdo con la teoría corpuscular, la luz es considerada como un flujo de partículas sin carga y sin masa llamadas fotones, capaces de acarrear todas las formas de radiación electromagnética. Esta interpretación surgió debido a que la luz, en sus interacciones con la materia, intercambia energía sólo en cantidades discretas denominadas “cuantos”.

Si bien las teorías ondulatoria y corpuscular de la luz se contraponen en muchos aspectos, ambas permiten dilucidar muchos de los fenómenos observados en la naturaleza. Actual-

mente se busca una teoría unificadora que explique la relación de la luz, como campo electromagnético, con el resto de las interacciones fundamentales de la naturaleza.

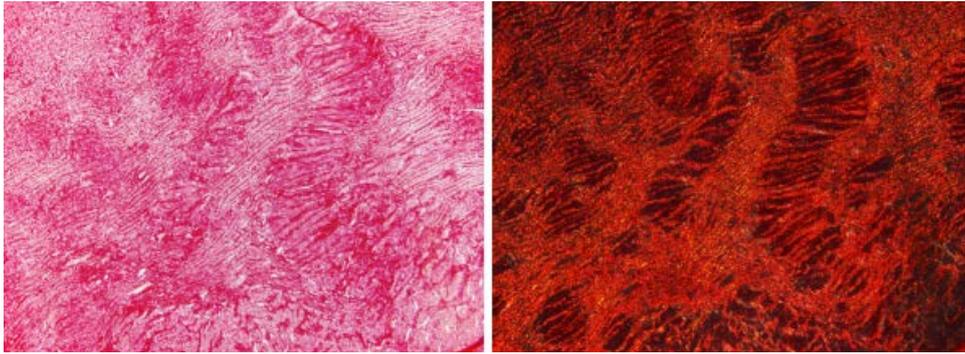


Fig. 3-12. Arteria Aorta teñida con la técnica de Picrosirius, vista sin (izquierda) y con (derecha) polarización de la luz.

### ***Función de dispersión puntual (PSF)***

En un microscopio de campo ampliado, la energía emitida por un punto es capturada por las lentes del objetivo y se representa como un conjunto borroso de franjas de difracción, conocido como la función de dispersión o difuminación del punto (del inglés, “*Point Spread Function*” - PSF).

La PSF describe cómo se comporta un sistema óptico ante un objeto puntual o una fuente de luz puntual. Por lo tanto, cualquier imagen (M) obtenida en el microscopio, es el resultado de la convolución ( $\otimes$ ) de la función que describe la distribución de la intensidad de la luz incidente dentro de la muestra tridimensional (I), con su PSF y se representa como:

$$M_{x,y,z} = I_{x,y,z} \otimes PSF_{x,y,z} \quad [3-1]$$

La convolución es entonces, una operación matemática que transforma dos funciones ( $f$  y  $g$ ) en una tercera función que, en cierto sentido, representa la magnitud en la que se superponen  $f$  y una versión traducida e invertida de  $g$ .

En teoría, un punto visualizado como tal, debería ser representado de la misma manera dentro de un sistema óptico. Sin embargo, dado que ninguno de ellos es perfecto, la luz incidente sobre un punto genera una distorsión sobre el mismo (visión borrosa), que da lugar al concepto de PSF (Fig. 3-13).

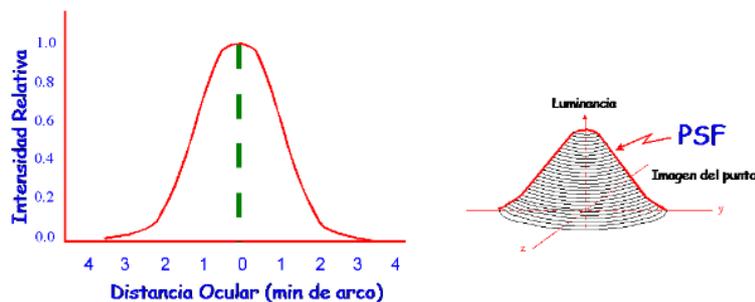
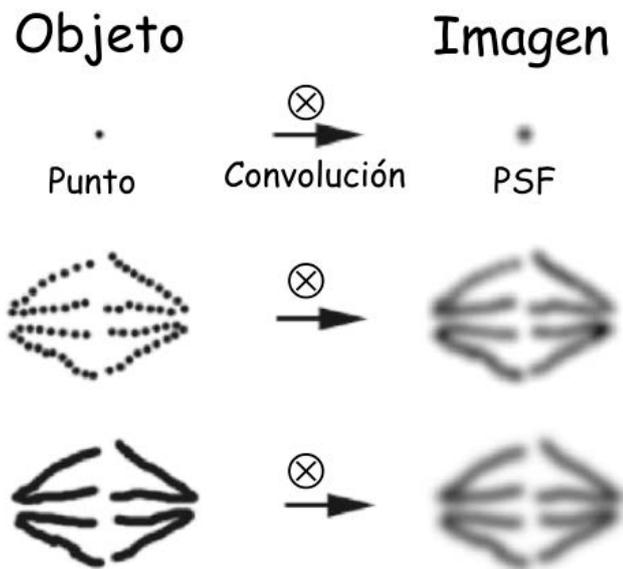


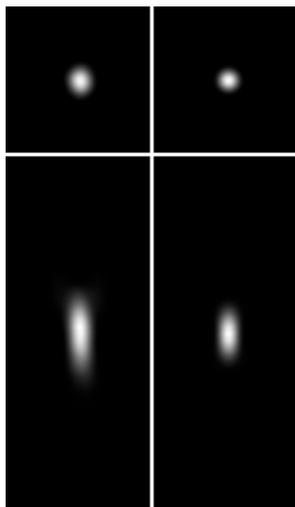
Fig. 3-13. Si el sistema óptico (visual o microscópico) fuera perfecto, la imagen de un punto muy pequeño de luz, reflejado en la retina o el ocular del microscopio, debería ser idéntica al punto original. Por lo tanto, si la intensidad relativa de este punto de luz se representara en función a la distancia a la retina u ocular, debería verse como la línea verde punteada (gráfico izquierdo). Sin embargo, los sistemas ópticos no son perfectos, por lo que la intensidad relativa del punto de luz se distribuye y se visualiza como se muestra en la curva roja. Esta curva se denomina PSF. En la imagen derecha se puede apreciar esta misma función como la distribución 3D de la luz.

Mediante la ecuación [3-1], cada punto del objeto es reemplazado por una imagen borrosa del mismo, con un brillo proporcional al del punto original; siendo la imagen final la suma de todos ellos (Fig. 3-14).



**Fig. 3-14.** Transformación de un objeto original en su correspondiente imagen borrosa a través del proceso de convolución de un punto y la PSF del sistema óptico.

La PSF podría considerarse como la gota extendida en una imagen, que representa un objeto sin resolver. En un sistema óptico perfecto basado en elementos circulares, la PSF tendría un patrón de Airy (Fig. 1-36). Sin embargo, aún en los equipamientos ópticos más precisos, existe una diferencia entre la PSF calculada y la teórica (Fig. 3-15). Esto se puede deber a errores en la alineación o aberraciones de esfericidad de las lentes, baja apertura numérica (NA) de los objetivos o efectos de difracción de la luz. Si la fuente puntual fuera representada en la imagen ideal por un solo píxel, en la imagen real sería representada por varios píxeles más en torno al central.



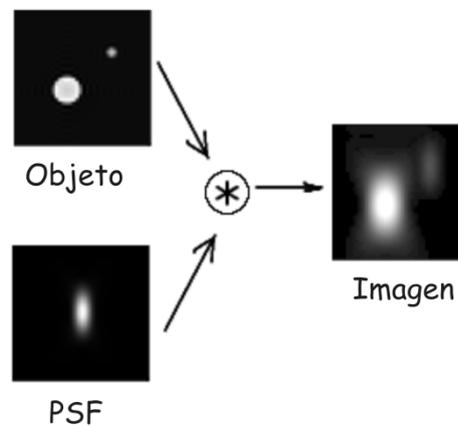
**Fig. 3-15.** Comparación entre la PSF medida (izquierda) y la calculada (derecha) en un microscopio confocal. Arriba: imágenes centrales de una muestra que representa a  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ , en disposición XY. Abajo: imágenes centrales de una muestra que representa a  $2 \times 5 \mu\text{m}^2$ , en disposición XZ. Modificado de: <http://www.svi.nl/PointSpreadFunction>

La PSF es un concepto útil en la microscopía electrónica, la confocal y la de fluorescencia. En los sistemas de imágenes incoherentes, como los microscopios ópticos o telescopios, el proceso de formación de la imagen puede considerarse lineal y por lo tanto, descrito por la teoría de sistemas lineales. Esto significa que cuando dos objetos son capturados de manera simultánea, el resultado es igual a la suma de la imagen de cada uno de ellos, si se las hubiera obtenido de manera independiente; es decir, la imagen de uno de los objetos no se

ve afectada por la imagen del otro y viceversa. Esto se debe a la ausencia de interacción entre los fotones.

La PSF, es una función de representación de cada objeto individual en el plano, donde matemáticamente, cada punto de luz se dispersa (difumina), formando un área finita en el plano de la imagen. Cuando un objeto se divide en puntos discretos de elementos de diversa intensidad, la imagen se calcula como la suma de la PSF de cada uno de ellos. Dado que la PSF está determinada exclusivamente por el sistema óptico (microscopio o telescopio), toda la imagen se puede describir mediante el conocimiento de las propiedades ópticas del sistema.

En síntesis, una imagen es la resultante de la convolución entre el objeto y su PSF (Fig. 3-16). En el procesamiento de imágenes, el conocimiento de la PSF del dispositivo de captura es muy importante para la restauración de la imagen a su aspecto original. Este proceso se denomina deconvolución (ver Capítulo 4).



**Fig. 3-16.** En todos los sistemas ópticos, la imagen final es la resultante de la convolución entre el objeto iluminado y su PSF.

En el plano focal de un microscopio de campo ampliado, la PSF se manifiesta como un disco de Airy central rodeado por anillos concéntricos oscuros, que son el resultado de la difracción que se produce cuando la luz pasa a través de las aberturas circulares del microscopio. Al alejarse del plano focal, la PSF axial se extiende hacia el exterior, formando dos conos opuestos al ápice, con las ondulaciones de difracción dentro de ellos (Fig. 3-17). Este patrón indica que estos microscopios forman imágenes a partir de conos de luz recogida por las lentes del objetivo en los que el ángulo del cono y la forma de la PSF se determinan principalmente por la NA del objetivo. La extensión axial de los conos concéntricos de la PSF en el eje Z, retirados del plano focal, muestran la contribución de la luz fuera de foco en este tipo de microscopios. Esto no ocurre con la PSF en un microscopio confocal, donde ésta se acerca a los niveles del fondo al aumentar la distancia (Fig. 3-18). Al igual que la PSF de un microscopio determina cómo se genera la imagen de un objeto, la forma de la PSF define la manera en que las imágenes de los objetos se difuminan unos contra otros en la imagen final.

Las diferencias entre una imagen obtenida mediante un microscopio óptico de campo ampliado y otro confocal radican exclusivamente en la discrepancia de sus respectivas PSF. En el de campo ampliado, la PSF tiene forma de conos concéntricos divergiendo a cada lado del plano focal; estos intersectan dicho plano dando lugar al patrón de Airy de discos concéntricos. En ausencia de aberraciones, la PSF presenta simetría rotacional con respecto al eje óptico y simetría de reflexión con respecto al plano de foco. En el microscopio confocal, la luz atraviesa por un diafragma “agujero de alfiler” (del inglés, “*pin-hole*”), que es un colimador delimitante, que evita la incidencia de luz dispersa sobre la muestra y es posteriormente filtrada por un segundo pinhole. Este efecto requiere la aplicación de dos PSF, por ende, la combinación de estas representa el cuadrado de aquella en el microscopio de campo ampliado. Esto reduce la intensidad de la luz de manera considerable, particularmente de aquella fuera del plano focal. Bajo estas circunstancias, la luz proveniente de los espacios fuera de foco es sustancialmente reducida, generando imágenes más nítidas.

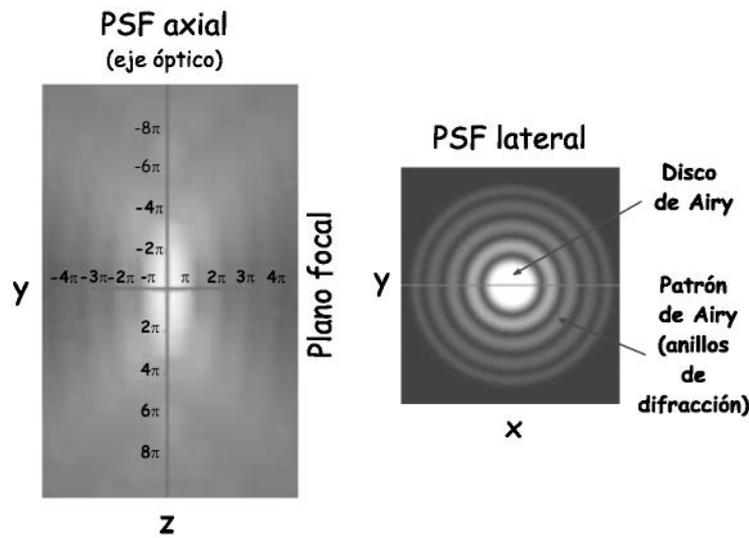


Fig. 3-17. En los puntos no paraxiales (plano intermedio de la imagen) de la resolución lateral, la PSF puede extenderse hasta  $4\pi$ , mientras que en el plano axial es extensible hasta  $10\pi$  del punto focal.

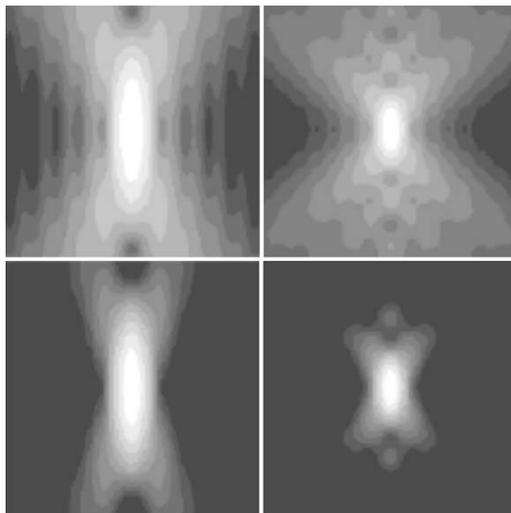


Fig. 3-18. PSF teóricas calculadas (en proyección XZ) en un microscopio de campo ampliado (arriba) o confocal (abajo), para un objetivo con NA de 0,9 (izquierda) y de 1,25 (derecha).

La PFS puede ser calculada de manera teórica o empírica. La mayor ventaja del cálculo teórico es la ausencia de ruido. De esta manera, también es posible calcular la estructura 3D de la PSF dentro y fuera del plano focal, hasta la distancia donde los detectores no capturen señal por encima del ruido. Sin embargo, es preferible utilizar el cálculo empírico de la PSF, dado que la estimación teórica sólo se aplica a sistemas de lentes y caminos ópticos “perfectos”, difíciles de encontrar en la práctica. Aún las pequeñas variaciones de las lentes pueden resultar en un cálculo erróneo. Asimismo, las aberraciones de esfericidad son difíciles de predecir de manera teórica. Todas las discrepancias entre la PSF calculada y la real atentan contra la eficiencia del proceso de deconvolución.

Para calcular la PSF de un microscopio es necesario conocer sus características. Este cálculo se basa en la NA del objetivo y su distancia de trabajo, la longitud de onda de emisión, el índice de refracción del medio entre el objetivo y la muestra y el espesor del cubreobjetos. También es necesario conocer el tipo de microscopio utilizado (campo ampliado, disco giratorio, confocal, etc.) y la dimensión de las imágenes capturadas.

Para la determinación empírica de la PSF se utilizan nanopartículas fluorescentes (Qdots), que representan el punto mínimo que este sistema puede detectar. Se deben emplear partículas con un diámetro menor a la mitad de la resolución óptica seleccionada. Por ejemplo, para una NA de 1,4, con una resolución lateral de  $0,4 \mu\text{m}$  y una longitud de onda de emi-

sión de 500 nm, se deben observar nanopartículas de 0,15  $\mu\text{m}$ , las que deben estar ubicadas en distintas profundidades al ser escaneadas. Esto se logra ubicándolas dentro de muestras de tejido, obteniendo el espesor apropiado para las distintas profundidades requeridas.

La profundidad es importante dado que la nubosidad causada por la aberración de esfericidad es el factor que más cambios induce en la PSF y a su vez, ésta aberración cambia con la profundidad. Para identificar la emisión de fluorescencia por encima y por debajo del punto focal de la nanopartícula, es necesario capturar una pila (“*stack*”) de imágenes. También es conveniente hacer un promedio de varias imágenes capturadas sobre la misma partícula y evitar la sobreexposición y el fotoblanqueo. Además, se debe calcular la PSF para cada potencial fluoróforo y medio de inmersión a utilizar, ya que los valores pueden variar de un caso a otro. Lo ideal sería capturar la partícula sobre la misma muestra de la que luego se tomarán las imágenes, ya que el comportamiento de la luz puede variar de una muestra a otra, pero esto es prácticamente inviable. Más allá de los procedimientos a realizar, la determinación empírica de la PSF podría resultar el método más apropiado para la mayoría de los sistemas ópticos de los diferentes laboratorios.

A diferencia de lo que ocurre con la PSF teórica, la PSF medida en un microscopio de campo ampliado raramente es simétrica alrededor del plano focal, ni radialmente simétrica en el eje óptico. Las asimetrías en el eje Z normalmente se deben a aberraciones de esfericidad, debido a errores en el índice de refracción entre el objetivo, el medio de inmersión y la muestra o en el espesor del cubreobjetos. Estas asimetrías también se logran por descentrado o falta de alineación del eje óptico (ausencia de iluminación Köhler - ver más adelante).

La extensión de la PSF determina la resolución del microscopio. El tamaño de la PSF se expresa generalmente en términos del ancho que corresponde a la máxima intensidad. Para un objetivo de inmersión de alta magnificación en un microscopio de campo ampliado, este ancho es menor a 0,4  $\mu\text{m}$  en el plano focal. La extensión axial en estos microscopios debería ser infinito a energía constante en todos los planos, pero la realidad indica que se pierde energía con la distancia y la PSF queda recortada. De todas maneras, la extensión de la PSF en el plano axial de estos microscopios resulta en una pérdida masiva del contraste de los objetos, sobre todo si tienen un elevado espesor.

El grado de difuminación, nubosidad o visión borrosa (del inglés, “*blurring*”) del objeto puntual es una medida de la calidad de un sistema de imágenes. El tamaño de la PSF es proporcional a la magnificación, lo que significa que, a mayor aumento del objetivo, mayor difuminación tendrá el punto y por lo tanto, se verá más borroso.

Existen una serie de fenómenos que contribuyen con el proceso de nubosidad en la microscopía de luz: a medida que la luz atraviesa el camino óptico del microscopio se producen efectos de difracción, lo que resulta en la difusión y fusión de los rayos de luz en la imagen. La luz también se puede dispersar y la posición de la fuente original puede no aparecer en el mismo punto de la imagen. Finalmente, las inconsistencias entre el medio de inmersión y las muestras o las imperfecciones en la alineación del sistema óptico se suman a la aberraciones, causando el redireccionamiento de los haces de luz.

Aumentando la NA del sistema disminuye la difuminación y aumenta la señal de los objetos en foco, pero también se reduce el contraste debido a la captura de mayor cantidad de luz dispersa a partir de muestras gruesas. Sumado a esto, los objetivos con elevada NA presentan distancias de trabajo limitadas, que a su vez limitan el seccionamiento en profundidad.

## ***Fuentes de luz***

El sistema de iluminación está constituido por las partes del microscopio que producen o captan, reflejan y regulan la intensidad de la luz que se utiliza para la observación microscópica. Uno de los aspectos críticos a considerar en la microscopía óptica es la fuente de luz que se emplea para iluminar el espécimen. Si la muestra es iluminada de manera inadecuada, la calidad de la imagen que se obtiene se verá afectada, aún cuando se disponga de un excelente sistema óptico. La iluminación óptima debe ser brillante, sin res-

plandores y en lo posible debe dispersarse de manera uniforme en el campo de observación.

Si se emplea luz visible (fotones) es usual que al microscopio se le denomine fotónico. En sus inicios, la microscopía se practicaba con iluminación por reflexión. Para ello se utilizaba un espejo plano o cóncavo que se orientaba para recoger la luz solar o en su defecto, luz artificial, como la luz de una vela, de un mechero a gas o de lámparas de aceite que la desviaba hacia la muestra. Este método se mantuvo durante mucho tiempo, debido al lento perfeccionamiento de las bombillas incandescentes, que consisten en un globo de cristal en el que se ha hecho el vacío y dentro del cual va colocado un hilo de metal (platino, carbón, tungsteno, entre otros), que al paso de una corriente eléctrica se pone incandescente y sirve para alumbrar.

El sistema de iluminación está constituido por la fuente de luz, el condensador y un diafragma o iris. Como regla general, el sistema de iluminación se ubica debajo de la platina con la finalidad de iluminar mediante luz transmitida. En la mayoría de los casos, el estudio de las muestras histológicas se hace por transiluminación. La fuente de luz emite una radiación que es recogida por un dispositivo denominado condensador, que forma un cono luminoso necesario para la visualización con objetivos de mayor aumento. En casos más específicos se emplea el método de luz reflejada, en el cual se ilumina la superficie de la muestra mediante epi-iluminación (ver más adelante).

De todas las fuentes de luz existentes, las térmicas son las más comunes. A una determinada temperatura los cuerpos emiten un espectro característico de radiación. El ejemplo más emblemático es la luz proveniente del sol, en el que el 40% de su emisión se encuentra en el espectro visible. Las lámparas incandescentes (Fig. 3-19) también proveen luz, en la que sólo el 10% de su energía se encuentra en el espectro visible, mientras que el resto se emite como infrarrojo. Por su parte, las partículas resplandecientes de la llama ígnea también son fuente de luz. El pico de su espectro se encuentra normalmente en el infrarrojo, donde los cuerpos están relativamente fríos. A medida que aumenta la temperatura de la fuente de emisión el pico se desplaza hacia longitudes de onda más corta, donde en primera instancia se produce un resplandor rojo, luego uno blanco y, finalmente, uno de color azul. Estos colores se pueden ver cuando el metal se calienta al "rojo vivo".



**Fig. 3-19.** Diferentes fuentes de luz: lámparas incandescentes, descarga de arco o gas, diodos y láser.

Se define la temperatura de color de una fuente de luz, como el valor de la temperatura absoluta de un radiador metálico (radiador de cuerpo negro) cuando la cromaticidad del mismo coincide con la de la fuente de luz. La figura 3-20 ilustra la gama de colores que genera la luz interior (artificial) y la exterior (luz natural). Aquellos valores que caen por debajo de los 3500 K son considerados dentro del "rango tungsteno". Los colores neutros que se observan con esta iluminación parecen ser más rojos que los observados con luz natural. Habrá que tener en cuenta, entonces, la intensidad (calor) de la luz natu-

ral/artificial necesaria, para que los colores de la muestras micro o macroscópicas se vean lo más reales posibles.

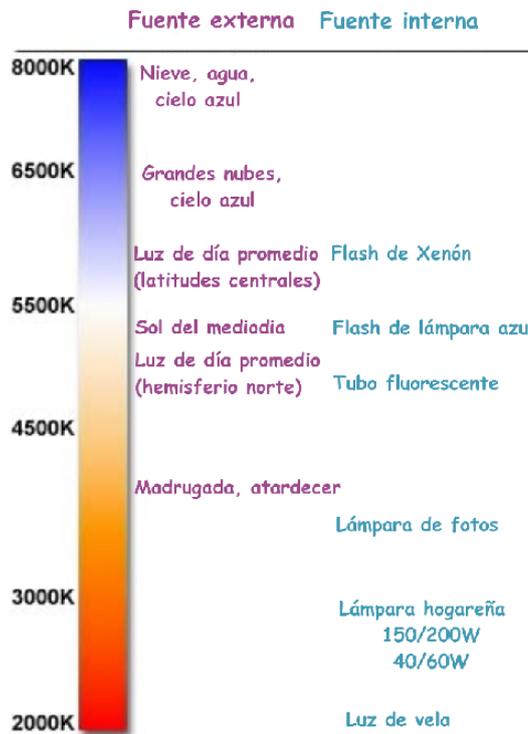


Fig. 3-20. Rango de colores generados por la luz natural y artificial de acuerdo a la temperatura.

Los átomos emiten y absorben luz en energías características, produciendo “líneas de emisión” en el espectro de cada átomo. La emisión puede ser espontánea, como en diodos emisores de luz, lámparas de descarga de gas (lámparas de neón, de vapor de mercurio, etc.) y las llamas ígneas. Ciertas sustancias químicas producen radiación dentro del espectro visible por un fenómeno de quimioluminiscencia, es decir, emisión de luz con limitada emisión de calor, como resultado de una reacción química. En los seres vivos, este proceso se llama bioluminiscencia. Las luciérnagas producen luz por este medio, al igual que algunos peces.

Algunas sustancias producen luz cuando son iluminadas con radiación de mayor energía, proceso conocido como fluorescencia. Otros compuestos en cambio, la emiten lentamente luego de la excitación por radiación de mayor energía (fosforescencia). Los materiales fosforescentes son excitados mediante bombardeo con partículas subatómicas (luminiscencia catódica). Este mecanismo se utiliza en sistemas de tubos de rayos catódicos, como los del televisor y el de los monitores de tubo de las computadoras.

Como fuera mencionado anteriormente, la luz natural y artificial es liberada por los cambios de energía a nivel atómico y molecular y se producen sin ninguna intervención externa. Sin embargo, existe un segundo tipo de luz que se produce cuando un átomo o molécula conserva su exceso de energía hasta ser estimulado para emitirla. Los sistemas láser están diseñados para producir y amplificar esta forma estimulada de la luz en haces intensos y concentrados. La palabra láser fue acuñada como un acrónimo del inglés, “*Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation*” (Amplificación de Luz por la Emisión Estimulada de Radiación). La naturaleza especial de la luz láser ha hecho de ésta tecnología una herramienta vital en casi todos los aspectos de la vida cotidiana como las comunicaciones, el entretenimiento, las industrias y la medicina.

Si bien los láseres que emiten luz visible son los más comunes, los principios básicos se aplican a gran parte del espectro electromagnético. La primera emisión estimulada fue alcanzada en la región del espectro correspondiente a las microondas. No obstante, actualmente se dispone de láseres que emiten luz ultravioleta e infrarroja, y se está avanzando hacia la producción de láseres para la región correspondiente a los rayos X. Un tipo de láser descubierto hace más de 30 años es el pulsado, que genera una excitación multifotó-

nica. Cuando la densidad de fotones es alta, dos fotones pueden ser absorbidos de forma simultánea mediante la combinación de sus energías para provocar la transición electrónica de un fluoróforo al estado excitado. Dado que la energía de un fotón es inversamente proporcional a su longitud de onda, los dos fotones deben tener longitudes de onda de aproximadamente el doble de la requerida para un solo fotón de excitación. Este es el principio en el que se basa la microscopía multifotónica para producir una mayor resolución axial de las muestras.

La iluminación es una variable crítica a considerar al poner en funcionamiento el microscopio. El uso incorrecto de la iluminación, aún en equipos sofisticados, conduce a la obtención de imágenes defectuosas. El espécimen debe ser iluminado mediante una fuente de luz artificial, la cual puede producir artificios en la imagen a observar. Existen ciertas características inherentes a las fuentes de luz que deben ser tenidas en cuenta al capturar las imágenes, tales como el brillo, la uniformidad, la longitud de onda y la coherencia.

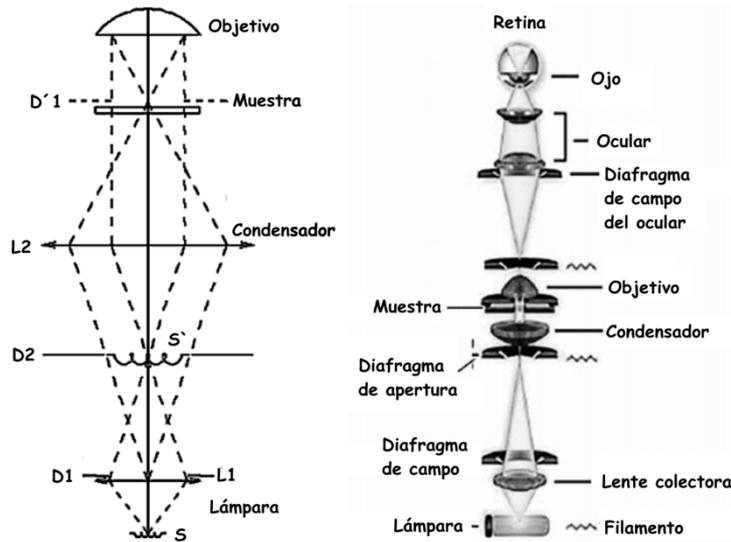
La intensidad de la imagen declina con el cuadrado de la magnificación. Por lo tanto, el brillo de la fuente de iluminación es la característica más importante a tener en cuenta. El brillo no se refiere exclusivamente al potencial de la fuente para generar muchos fotones/segundo sino también, a su capacidad para producirlos a partir de una fuente de pequeño volumen, de modo que una parte sustancial de éstos se oriente en una región reducida de la muestra. Un tubo fluorescente doméstico de 40W produce la misma cantidad de fotones/segundo que una lámpara de arco de 50W utilizada en microscopía de fluorescencia, con la diferencia en que en esta última los fotones emergen en un área que es un millón de veces menor que la de aquel.

Para que una fuente de iluminación sea uniforme, todo el plano de la imagen debe recibir la misma densidad de iluminación. Dado que el área de luz emitida por una lámpara de arco o de la mayoría de las de filamento no es uniforme, es necesario recurrir a la iluminación Köhler, de forma tal que la falta de uniformidad quede restringida a los planos de apertura. De esta manera, se ilumina uniformemente a todo el plano de la imagen a excepción de los ángulos, en los que la luz se aproxima a cada punto del plano focal.

En el año 1893, el profesor August Köhler propuso un método de iluminación para optimizar la observación microscópica y la microfotografía, que permite aprovechar al máximo las capacidades de los objetivos. La función de la iluminación de Köhler es entonces, iluminar un espécimen con un campo uniforme de luz, que sea del mismo diámetro que el área de captura del objetivo, a los efectos de regular la marcha de los haces, centrando la mayor intensidad de los mismos y cubriendo exactamente el diámetro frontal de cada objetivo, acorde con su NA específica. De esta manera, se aprovecha al máximo posible la luz emitida por la fuente emisora.

La iluminación Köhler se compone de dos diafragmas: uno de campo, situado a nivel de la lámpara emisora y uno de apertura o iris, situado por debajo del condensador (Fig. 3-21). La imagen del diafragma de campo es proyectada en el plano de la muestra por efecto del condensador, el cual se desplazará verticalmente hasta conseguir una imagen lo más nítida posible. Esta se logra cuando el condensador se encuentra prácticamente en contacto con la muestra. El diafragma de campo regula la apertura de la iluminación, es decir, el contraste, la profundidad de campo y el poder de resolución. Una vez ajustada la iluminación Köhler no se debe regular la intensidad de la luz o el brillo bajando el condensador o cerrando la apertura de diafragma-iris. Por el contrario, se debe optimizar la intensidad de la lámpara mediante un ajuste de voltaje.

Los microscopios actuales han sido diseñados de manera tal que, tanto las lentes colectoras como cualquier otro componente óptico integrado al microscopio proyecte una imagen aumentada y enfocada del filamento de la lámpara sobre el plano del diafragma de apertura de un condensador correctamente posicionado por debajo de la platina. Cerrando o abriendo el diafragma condensador se controla el ángulo de los rayos de luz, que salen del condensador y llegan hasta la muestra en todas las direcciones. Dado que la fuente de luz no se focaliza en la muestra, la iluminación a este nivel es esencialmente degranulada y extendida y a su vez, no se deteriora por la presencia de polvo o imperfecciones presentes sobre la superficie del vidrio del condensador. Abriendo y cerrando el diafragma de apertura del condensador, se controla el ángulo del cono de luz que llega a la muestra.



**Fig. 3-21.**-Iluminación Köhler. La muestra se debe iluminar siguiendo el esquema de la izquierda: La lámpara posee un filamento (S) incandescente cuya luz es captada por la lente colectora L1 y regulada por el diafragma de campo D1. La imagen S' del filamento de la lámpara es proyectada al plano del segundo diafragma D2. Este primer paso se realiza con D1 completamente abierto. La altura del condensador L2 se regula de manera que su punto focal esté en el plano D2. La imagen del diafragma de campo D1 es proyectada en el plano de la muestra por el condensador. Derecha: mismo esquema ubicado anatómicamente dentro del camino óptico del microscopio de transmisión de luz.

El ajuste del diafragma del condensador junto con la NA del objetivo, determinan la NA del sistema microscópico. Cuando el diafragma se abre, la NA del sistema aumenta, resultando en un mayor poder de resolución y transmisión de luz. Los haces de luz paralelos que iluminan y pasan a través de la muestra, hacen foco en el plano focal posterior del objetivo donde, tanto la imagen del diafragma como la imagen de la fuente de luz, se pueden ver en foco.

La iluminación Köhler no es muy eficiente en la cantidad de fotones obtenidos debido a que no aprovecha al máximo la superficie total de la fuente emisora ni la distribución angular total de la luz emitida. Además, dado que la NA del condensador debe ser igual a la del objetivo, estos deben estar alineados sobre el mismo plano focal. Esta alineación debe realizarse con cada muestra que varíe en su grosor, al igual que cuando se observen cambios en el espesor de los cubreobjetos y portaobjetos, ya que esto introduce cantidades variables de aberraciones de esfericidad (ver más adelante).

Otra característica de la fuente de iluminación hace referencia a la longitud de onda. En este particular, existen diferencias entre la luz emitida por un filamento y la obtenida a través de una lámpara de arco. En esta última, los fotones se producen únicamente cuando un electrón excitado pierde energía. Además, estos fotones sólo se verán dentro del espectro visible si la cantidad de energía emitida por los electrones varía entre 1,59 y 3,30 electrón-volts (eV). Finalmente, la forma más eficiente de producción de electrones se genera cuando el filamento de tungsteno alcanza los 3200K a 3400K.

Si bien la coherencia y el brillo de una fuente de luz son directamente proporcionales, el concepto de brillo describe la capacidad de la fuente para focalizar un gran número de fotones en una pequeña área. Por su parte, la coherencia es una medida de la capacidad de las ondas que describen a dichos fotones para interferirse, tanto en el plano focal (ideal), como en las imperfecciones del sistema óptico o en la reflexión de las partículas de polvo ambiental (indeseable). En sistemas con luz coherente (láser), una gran fracción de estas funciones de onda que pasan por un punto en particular se encuentra en fase entre sí.

La luz del láser es extremadamente coherente, sin embargo, si bien todos los fotones comienzan en fase, luego de una determinada distancia (longitud de coherencia), aquellos con mayor longitud de onda empezarán a alejarse de la fase, en comparación con aquellos de menor longitud. Esto significa que la dispersión de la luz producida por el polvo de un

lado del portaobjetos puede interferir con la luz dispersa del otro lado, si el grosor del vidrio es menor a la longitud de coherencia. La interferencia de este tipo producirá un moteado indeseable sobre la muestra. En concreto, se considera que la luz es incoherente cuando no produce el moteado sobre la imagen y coherente cuando lo produce. Dado que en microscopía se desea que el contraste observado en la imagen sólo represente la interferencia que ocurre dentro de la muestra, sería preferible el uso de fuentes de luz de baja coherencia.

Los defectos comunes que se encuentran en los elementos ópticos, tales como el polvo, las manchas o el aceite de inmersión desecado, reducen significativamente su rendimiento óptico y contribuyen con la dispersión de la luz. De hecho, cualquier elemento que desplace la fase de la luz que pasa a su través por tan sólo  $1/4$  de longitud de onda, evitará que los haces lumínicos contribuyan a formar una imagen con difracción limitada.

En la microscopía general, la luz con baja coherencia es aconsejable para campo claro y reflexión, mientras que la luz con alta coherencia se necesita para el contraste de fase e interferencia. El proceso de emisión de fluorescencia, implica tantos pasos intermedios entre la excitación y la emisión, que se pierde cualquier coherencia de la luz emitida por la fuente, mientras que aquella emitida por la muestra es básicamente incoherente.

La función principal de la iluminación Köhler es, por lo tanto, generar una iluminación homogénea en el plano de foco y controlar de alguna manera su coherencia. Sin embargo, es un sistema esencialmente coherente pero que no lidia con la luz, como lo hacen ciertos sistemas que controlan la luz del láser.

## ***Fluorescencia***

En las últimas dos décadas se ha producido un incremento considerable en el uso de la fluorescencia en las ciencias biológicas. Actualmente es considerada como un método dominante no sólo en la bioquímica y biofísica, sino además, en la citometría de flujo, el diagnóstico médico, el secuenciamiento de ADN, los estudios forenses y el análisis genético, entre otros. Las técnicas histoquímicas que hacen uso de la fluorescencia se han convertido en rutinarias y los materiales para su ejecución son fácilmente asequibles. Es por ello que esta técnica ha ganado terreno en los últimos años de manera sustancial, en el campo de la biología molecular, celular y tisular.

Como se mencionara anteriormente, la fluorescencia es la propiedad que tienen algunas sustancias de absorber energía, emitiendo parte de la misma en forma de luz. La energía de la luz emitida siempre es menor a la absorbida y la diferencia entre ambas es disipada en forma de calor.

En términos generales, las sustancias fluorescentes (fluoróforos o fluorocromos) absorben energía en forma de radiación electromagnética de onda corta (radiación gamma, rayos X, UV) y luego la emiten en una longitud más larga, por general, dentro del espectro visible. Sin embargo, existen sustancias capaces de producir fluorescencia al recibir energía de otras fuentes, como por ejemplo, de la colisión de partículas con radiación alfa o beta, neutrones y hasta rayos cósmicos.

De acuerdo al esquema de Jablonski (Fig. 3-22), la fluorescencia se produce cuando un fotón de alta energía excita a un electrón que se encuentra en un estado basal (acoplado a otro electrón formando un doblete) y lo promueve a orbitales moleculares de mayor energía (singlete). El electrón excitado decae nuevamente a orbitales de menor energía, emitiendo luz de longitud de onda más larga. La diferencia de energía entre los fotones absorbidos y los emitidos se disipa como calor por medio de diferentes mecanismos de conversión interna. Todo este proceso es muy breve ( $10^{-9}$ - $10^{-15}$  segundos). Si el electrón excitado cambia de orientación de giro (spin), se transforma en un triplete, que tarda en regresar a su estado basal en milisegundos a segundos. En este caso se habla de un proceso de fosforescencia.

En la actualidad existen cientos de fluoróforos, entre naturales y sintéticos, que emiten en toda la gama del espectro visible. La fluoresceína ha sido uno de los más utilizados a lo largo de los años, generalmente conjugado con otras moléculas (inmunoglobulinas, lectinas, biotina, etc.) para la identificación de diferentes compuestos orgánicos. Otros fluoró-

foros que también han sido utilizados con frecuencia son los derivados de la rodamina, cumarina y cianina. Actualmente existe una nueva generación de fluorocromos, como los Alexa Fluor, que son más fotoestables, brillantes y menos sensibles al pH que otras sustancias colorantes de excitación y emisión comparables.

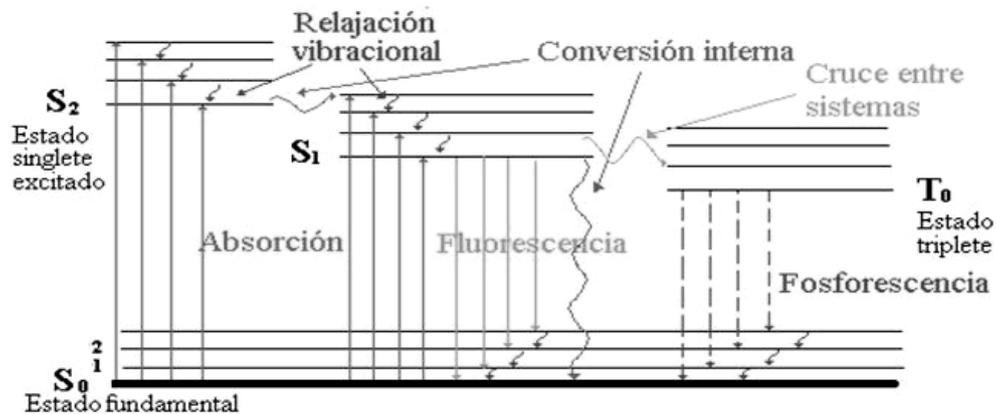


Fig. 3-22. Diagrama de Jablonski, en donde la línea horizontal  $S_0$  designa el estado electrónico base,  $S_1$  designa al primer estado electrónico de energía y  $S_2$  al segundo estado electrónico. Los fluoróforos pueden existir en distintos niveles de energía vibracional (0, 1, 2, etc.) dentro de cada uno de estos niveles. Las transiciones entre estados se representan con líneas verticales. La absorción de la luz ocurre en el orden de los  $10^{-15}$  segundos y el fluoróforo es excitado a algún estado alto de energía vibracional dentro de  $S_1$  o  $S_2$ . La magnitud del salto del electrón excitado corresponde a la energía del fotón absorbido. Después de la absorción, el electrón decae rápidamente al nivel vibracional más bajo de  $S_1$  por medio de relajaciones entre niveles vibracionales y de conversiones internas entre estados de energía. Este decaimiento ocurre entre  $10^{-14}$  y  $10^{-11}$  segundos. Dado que los tiempos de fluorescencia son típicamente cercanos a los  $10^{-9}$  segundos, la conversión interna termina antes que la emisión. La emisión de fluorescencia se produce a partir del estado de energía vibracional más bajo de  $S_1$ .

La estructura de los fluoróforos varía según el tipo de molécula pero, en términos generales, se representan como el que se observa en la figura 3-23. En esta misma figura se aprecia una forma simplificada del esquema de Jablonski.

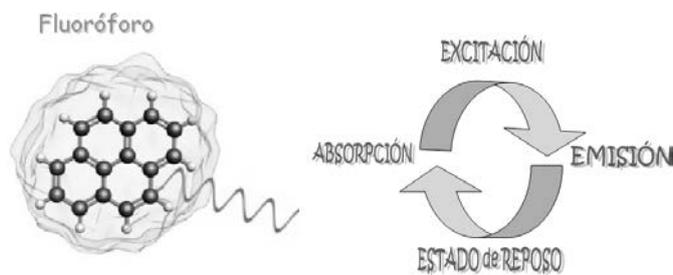
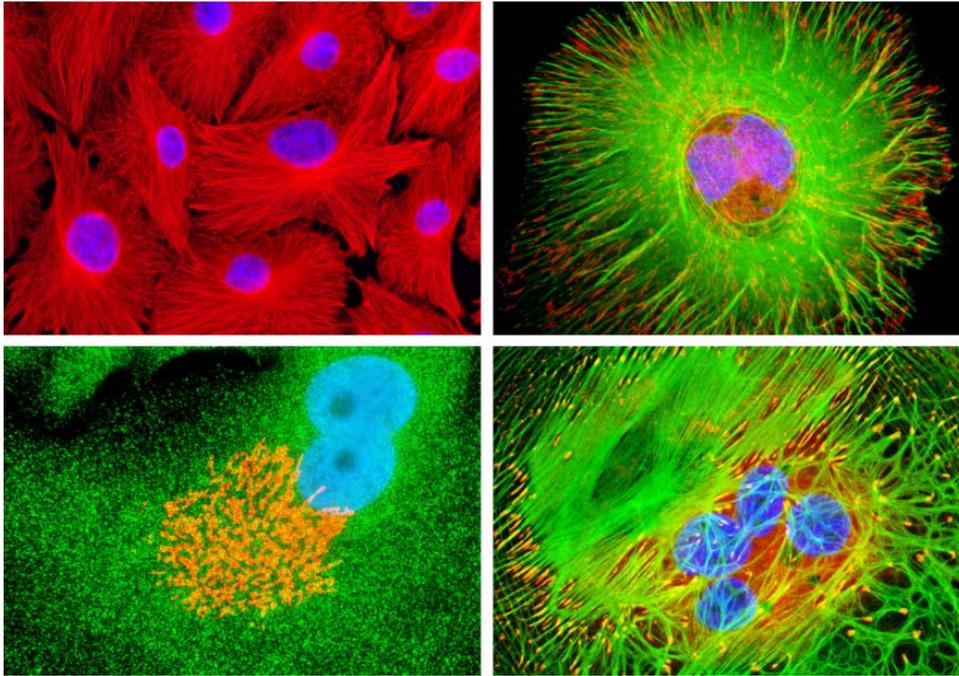


Fig. 3-23. Estructura de un fluoróforo y esquema de sus estados de excitación.

La tecnología de sondas fluorescentes, así como la biología celular se modificaron de manera sustancial con el descubrimiento de la proteína fluorescente verde (del inglés, "Green Fluorescent Protein" - GFP) de la medusa y el desarrollo de mutantes variantes del espectro, que han abierto la puerta a las investigaciones con fluorescencia no invasiva para la localización subcelular de proteínas, las interacciones intermoleculares y el estudio de transporte en cultivos celulares. En la figura 3-24 se pueden ver algunas imágenes donde los diversos tejidos fueron incubados con diferentes fluoróforos.

Los quantum dots (Fig. 3-25) son cristales semiconductores purificados, de tamaño nanométrico, que están emergiendo como agentes de marcación de células vivas y fijadas, tanto en la microscopía de fluorescencia convencional como en la microscopía confocal. Estos cristales se pueden acoplar con anticuerpos, otras proteínas biológicamente activas o carbohidratos, para ser utilizados en diversos protocolos histoquímicos.



**Fig. 3-24.** Se observan células (fibroblastos de riñón de mono verde - VERO) y sus componentes celulares puestos de manifiesto mediante diferentes fluoróforos. Arriba izquierda: Rodamina red X (rojo): tubulina. DAPI (azul): ADN; Arriba derecha: MitoTracker Red (rojo): CMXRos. Alexa Fluor 488 (verde): Faloidina. DAPI (azul): ADN; Abajo izquierda: Alexa Fluor 488 (verde): clatrina. Alexa Fluor 568 (naranja): giantina. Hoeschst 33258 (celeste): ADN; Abajo derecha: Cy3 (rojo): vinculina. Alexa Fluor 488 (verde): actina. DAPI (azul): ADN. Obtenidas de: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/agmindex.html>



**Fig. 3-25.** Nanocrystal fluorescente (Quantum dot).

Los quantum dots iluminan de una manera similar a los diodos semiconductores, pero se activan por la absorción de un fotón en lugar de un estímulo eléctrico. Emiten fotones de diversa longitud de onda en función de su tamaño físico, es decir, las partículas más pequeñas emiten luz de menor longitud que los de mayor tamaño. Cabe destacar que la diferencia de tamaño entre las partículas puede ser de tan sólo 0,1 nm.

Los quantum dots son partículas muy estables en el tiempo. Generan picos de emisión simétricos, independientemente de la longitud de onda que estén emitiendo. No obstante, la intensidad de emisión se incrementa cuando la onda excitatoria es más corta. El ancho de la onda de emisión en su pico de expresión es de aproximadamente 30 nm. Esto permite la observación simultánea de numerosas partículas con diferentes longitudes de onda de emisión, casi sin producir interferencia (“bleed-through” o sangrado) entre las mismas. En la Tabla 3-1 se enumeran algunos fluoróforos de uso más frecuente, especificando sus rangos de excitación y emisión.

Tabla 3-1. Listados de algunos fluoróforos más utilizados

Fluoróforo	Excitación		Emisión	
Alexa Fluor 350	346		442	
Alexa Fluor 405	401		421	
Alexa Fluor 430	433		541	
Alexa Fluor 488	495		519	
Alexa Fluor 500	503		525	
Alexa Fluor 514	518		540	
Alexa Fluor 532	532		553	
Alexa Fluor 546	556		573	
Alexa Fluor 555	555		565	
Alexa Fluor 568	578		603	
Alexa Fluor 594	590		617	
Alexa Fluor 610	612		628	
Alexa Fluor 633	632		647	
Alexa Fluor 647	650		665	
Alexa Fluor 660	663		690	
Alexa Fluor 680	679		702	
Cy2	489		506	
Cy3	548		562	
Cy3.5	581		596	
Cy5	650		670	
Cy5.5	675		695	
Cy7	710		805	
DAPI	350		470	
EBFP (Enhanced Blue FP)	380		440	
ECFP (Enhanced Cyan FP)	433, 453		 475, 501	
EGFP (Enhanced GFP)	488		507	
EYFP (Enhanced Yellow FP)	513		527	
Ethidium Bromide	510		595	
FITC	490		525	
MitoTracker Green FM	490		516	
MitoTracker Red 580	581		644	
MitoTracker Deep Red 633	644		665	
Propidium Iodide	536		617	
Qdot 525	350-450		 525	
Qdot 525	350-525		 565	
Qdot 585	350-550		 585	
Qdot 605	350-575		 605	
Qdot 655	350-600		 655	
Rhodamine 110	496		520	
Rhodamine B	540		625	
Rhodamine Red	570		590	
Texas Red	596		615	
TRITC	557		576	

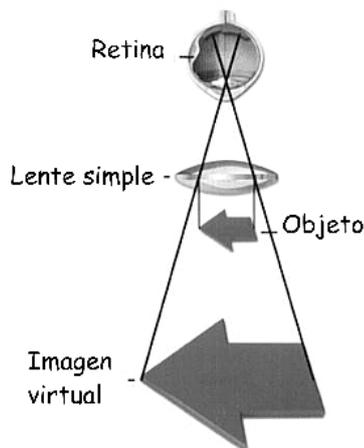
### *Tipos de sistemas microscópicos*

Desde su invención, los microscopios han sido utilizados para comprender, fundamentalmente, fenómenos biológicos que ocurren a nivel estructural. El avance tecnológico permitió profundizar en la resolución de los objetos hasta llegar a niveles ultra-estructurales, siendo superado en la actualidad por equipos que permiten la visualización de partículas a

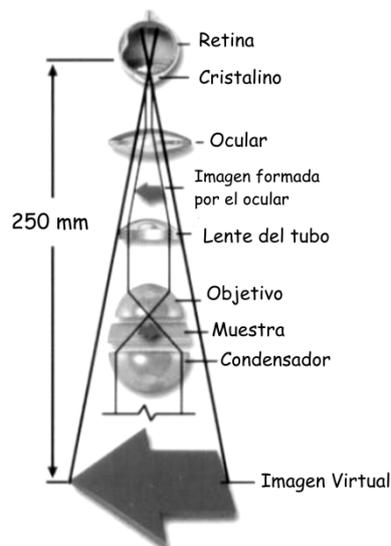
nivel atómico. Por otro lado, mediante el uso de diversas técnicas histoquímicas se ha podido analizar la interacción entre moléculas. Cada uno de estos logros se obtuvo al utilizar la técnica apropiada y en el sistema correspondiente. A continuación se describen algunos tipos de sistemas microscópicos, analizando su alcance.

### Microscopía Óptica

Los microscopios ópticos son aquellos basados en lentes ópticas, como los descritos en la sección inicial del capítulo. La lupa es el sistema microscópico óptico más sencillo. Consiste simplemente en una lente biconvexa, que agranda el tamaño del objeto observado, de acuerdo a la distancia que se encuentre de éste (Fig. 3-26). La imagen obtenida tiene la misma orientación que el objeto original. El microscopio de van Leeuwenhoek también podría considerarse como un microscopio sencillo. Cuando se agrega más de una lente al sistema, el equipo se convierte en un microscopio compuesto (Fig. 3-27).



**Fig. 3-26.** La magnificación de la muestra en un microscopio sencillo como la lupa, dependerá de la distancia entre la lente amplificadora y el objeto. En este caso, la imagen no se invierte con respecto a la orientación de la muestra.



**Fig. 3-27.** La magnificación de la muestra en un microscopio compuesto dependerá de la magnificación del objetivo y del ocular. En este caso, se invierte la imagen con respecto a la orientación de la muestra.

Tanto el microscopio simple como el compuesto se emplean para observar objetos cercanos. La diferencia radica en que los últimos tienen mayor poder separador (capacidad de resolución de objetos), debido a que el sistema óptico del microscopio transforma el haz de luz homocéntrico divergente que entra al sistema, en un haz de rayos paralelos que emergen de él.

En el microscopio óptico, la fuente de luz atraviesa la muestra que se encuentra fijada sobre un soporte transparente (vidrio, plástico), sigue la vía óptica a través del objetivo y llega hasta los oculares. Por esta razón, a este tipo de microscopio también se lo conoce como “de luz”, de “transmisión” o “de campo claro”.

El microscopio de fluorescencia es esencialmente un dispositivo óptico en donde la fuente de luz (lámpara de mercurio, xenón, LED, etc.) genera diversas longitudes de onda que estimulan a las sustancias fluorescentes. En los antiguos equipos de fluorescencia, el haz de luz atravesaba la muestra al igual que en el microscopio de campo claro. En los sistemas actuales (epi-fluorescencia) el haz de luz “rebota” (reflexión) cuando alcanza la muestra coloreada. Para distinguirlos de la fluorescencia observada en un sistema confocal, este tipo de sistema se conoce como de campo ampliado (del inglés, “*Widefield*”). Como se verá más adelante, el sistema de luz fluorescente consiste en la fuente de luz y la presencia de filtros de excitación y emisión, con la interposición, por lo general, de un espejo dicroico.

Tanto el microscopio de luz como el de fluorescencia pueden tener la disposición directa, como la mayoría de los microscopios antecesores desde su invención, o invertida, es decir, que el sistema de iluminación se encuentra por encima de la muestra y los objetivos se encuentran por debajo de la misma. Esta última configuración, surgió por la necesidad de observar células vivas contenidas en frascos de cultivo estériles. En este caso, el haz de luz (de bulbo o fluorescente) debe atravesar todo el espesor del frasco hasta impactar sobre las células.

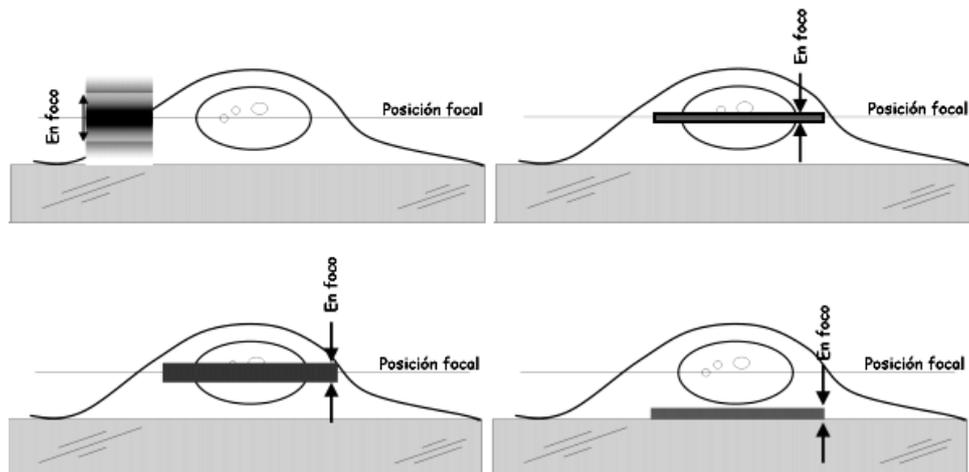
Si bien inicialmente el microscopio fue utilizado para el reconocimiento de estructuras y organizaciones biológicas en el orden de micronésima parte del metro ( $10^{-6}$ ), fue posteriormente incorporado en estudios de cristales (Química, Geoquímica), de las propiedades físicas de los materiales (Física) y de la composición de rocas (Geología), por citar algunas disciplinas de la ciencia.

El microscopio estereoscópico es una lupa binocular que permite observar imágenes estereoscópicas (3D) de los objetos. Los oculares de estos equipos están dispuestos espacialmente de tal manera que pueden emular la visión binocular humana. Al igual que en los sistemas ópticos previamente mencionados, este dispositivo permite el acople de sistemas de luz fluorescente. Estos microscopios son muy apropiados para observar objetos de tamaños relativamente grandes (mm a cm), sin la necesidad de procesarlos y seccionarlos. En este tipo de óptica, la luz no pasa a través de la muestra sino que se refleja sobre su superficie. Es utilizado para la observación de muestras vivas o inertes en el campo de la biología, así como para el estudio de estructuras geológicas y hasta industriales. Algunos ejemplos de estos microscopios se pueden ver en portada del capítulo.

### **Microscopía Confocal**

Estos sistemas se basan en los principios del microscopio óptico de fluorescencia. Sin embargo, existen diferencias sustanciales entre ambos. La microscopía confocal aventaja a la de campo ampliado en su capacidad para controlar la profundidad de campo, eliminar o reducir la información de fondo (del inglés, “*background*”) que degrada la imagen, y recoger secciones ópticas seriadas a partir de muestras de espesor grueso. La clave del enfoque confocal consiste en el uso de técnicas espaciales de filtrado que eliminan la luz fuera de foco o los reflejos en las muestras cuyo espesor supera a la del plano focal. El auge de la microscopía confocal se debe, en parte, a la relativa facilidad con la que se obtienen imágenes de muy alta calidad a partir de muestras preparadas para microscopía de fluorescencia convencional, así como al creciente número de aplicaciones de la biología celular que se basan en imágenes de células fijas o vivas.

En la microscopía de campo ampliado, la fluorescencia secundaria emitida por todo el volumen de la muestra puede entorpecer la resolución de los objetos que se encuentran en el plano focal del objetivo. El problema se agrava con muestras más gruesas (más de 2  $\mu\text{m}$ ) ya que, por lo general, presentan un alto grado de emisión de fluorescencia que enmascara la mayoría de los detalles pequeños. La microscopía confocal proporciona sólo una mejora marginal, tanto en el eje axial como lateral, pero es capaz de excluir la fluorescencia secundaria que se produce en las zonas alejadas del plano focal. Si bien con los sistemas ópticos actuales no se alcanza la resolución de un microscopio electrónico de transmisión, existe una tendencia hacia ese camino. En la figura 3-28 se grafica la emisión de fluorescencia cuando se utiliza microscopía de campo ampliado y diversos sistemas confocales.



**Fig. 3-28.** Plano focal en cada uno de los sistemas microscópicos. Arriba izquierda: microscopía de campo ampliado. Arriba derecha: microscopía confocal. Abajo izquierda: microscopía de disco giratorio (Spinning Disk). Abajo derecha: sistema TIRF.

Al contrastar las similitudes y diferencias entre ambos sistemas microscópicos, resulta útil comparar el carácter y la geometría de la iluminación de la muestra generada con cada una de las técnicas. En los microscopios de epi-fluorescencia, los objetivos se centran en un cono de iluminación amplia que abarca un gran volumen de la muestra. La luz reflejada por la muestra es uniforme y se expresa simultáneamente (Fig. 3-29). Gran parte de la emisión de fluorescencia que se dirige nuevamente hacia el microscopio es recogida por el objetivo (dependiendo de su NA) y proyectada por los oculares o el detector (cámara de video o fotográfica). Como resultado, se obtiene una elevada cantidad de señal, debido a la luz de fondo emitida y a la autofluorescencia procedentes de áreas por encima y por debajo del plano focal, lo que reduce seriamente la resolución y el contraste de la imagen.



**Fig. 3-29.** Iluminación de la muestra mediante campo ampliado y confocal.

En microscopía confocal, la fuente de iluminación láser se expande inicialmente para llenar la abertura posterior del objetivo y luego, por efecto del sistema de lentes, se centra en un punto muy pequeño en el plano focal. El tamaño del punto de iluminación varía entre 0,25 y 0,80  $\mu\text{m}$  de diámetro (dependiendo de la apertura numérica del objetivo) y de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de profundidad en el punto más brillante de intensidad. El tamaño del punto confocal es determinado por el diseño del microscopio, la longitud de onda de la luz láser incidente, las características del objetivo, la configuración de la unidad de escaneo y la muestra analizada. En la figura 3-30 se observa una misma muestra capturada mediante un sistema de campo ampliado y otro confocal.

Esencialmente, en un sistema confocal, la luz coherente emitida por el láser (fuente de excitación) pasa a través de un diafragma (“pinhole”), que se encuentra en un plano conjugado (confocal) con un punto focal de la muestra. A medida que el láser se refleja en un espejo dicróico y excita la muestra en un plano focal definido, la fluorescencia emitida desde la muestra (en el mismo plano focal) pasa de nuevo a través del espejo dicróico y se centra en el segundo pinhole que se encuentra frente a detector (fotomultiplicador), el que actúa como un filtro espacial en el plano de conjugación de la imagen (Fig. 3-31). El desplazamiento vertical del objetivo en un microscopio confocal produce cambios en los puntos de excitación y emisión de una muestra que genera un nuevo plano focal, el que se convierte en confocal con el pinhole, la fuente de luz y el detector. El espejo dicróico,

junto con los filtros de emisión y excitación del microscopio realizan funciones similares a los mismos componentes presentes en el microscopio de campo ampliado.

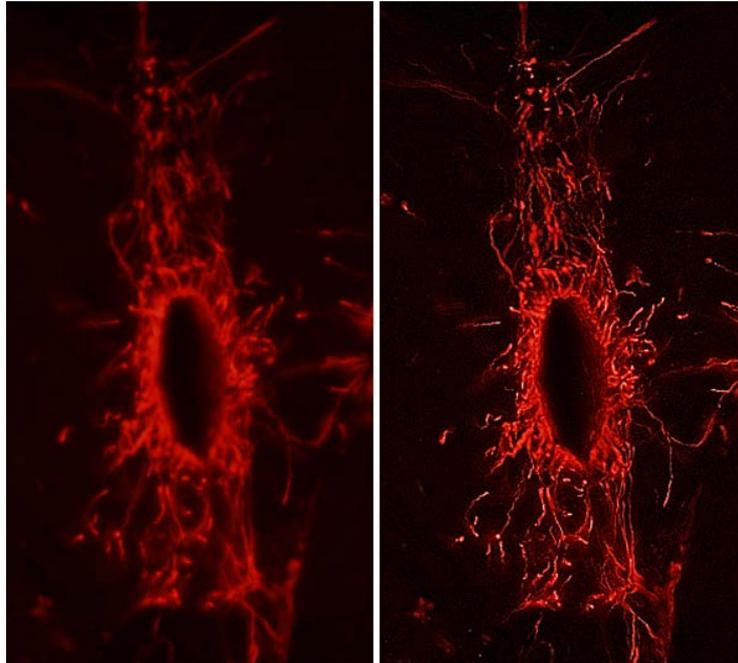


Fig. 3-30. Imágenes de una misma muestra (canal central de la médula espinal marcada mediante Alexa 555 para la identificación de vimentina presente en las células ependimarias) obtenidas mediante microscopía de campo ampliado (izquierda) y confocal (derecha).

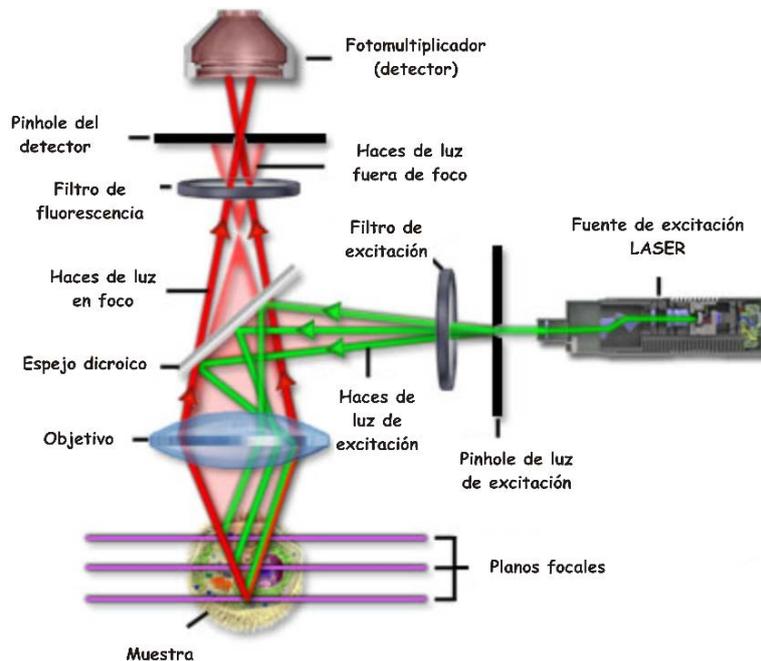


Fig. 3-31. Configuración óptica del microscopio confocal.

La gran cantidad de fluorescencia emitida por debajo y por encima del plano focal del objetivo (haces de luz fuera de foco) no es confocal con el pinhole y por lo tanto, se producen formas extendidas de discos de Airy (Fig. 1-36) en el plano de apertura. Dado que sólo una pequeña fracción de los haces de luz de emisión pasan a través del pinhole, la mayor parte de la luz espuria no es detectada por el fotomultiplicador y por lo tanto, no contribuye a formar la imagen final.

La resultante de la reducción de las imágenes al plano focal es una mayor resolución axial, lo que hace posible llevar a cabo un seccionamiento óptico serial no invasivo, del orden de los nanómetros a los micrómetros y la generación de pilas de imágenes de más de 200  $\mu\text{m}$ , sin perder información. Esto se encuentra en total dependencia con la muestra observada, el láser utilizado y la concentración del fluoróforo estimulado. La ventaja del seccionamiento óptico por sobre el seccionamiento físico de las muestras, radica en obtener imágenes no sólo de tejido fijado, sino también de células vivas. Estos cortes ópticos se pueden combinar a su vez, para producir una imagen 3D.

Cuando se realizan secciones físicas de la muestra para una posterior captura de las imágenes y ulterior reconstrucción 3D, se corre el riesgo de las divergencias en la orientación de cada una de las secciones y con ello, la necesidad de procesamiento de las imágenes capturadas (Capítulo 2). Como se analizará en el Capítulo 4, no siempre es posible reorientar las muestras sin perder información de los objetos, cambiar la intensidad de los píxeles o modificar el tamaño de la imagen, con lo cual, no se puede garantizar el éxito final en la reconstrucción 3D de la muestra inicial. Mediante el seccionamiento óptico se pueden evitar todos estos inconvenientes.

La mayoría de los programas que controlan a los diferentes microscopios confocales del mercado tienen la posibilidad de realizar captura de imágenes multidimensionales, es decir, permiten obtener imágenes planas (2D), pilas de imágenes (3D) y la combinación de estas en el tiempo (4D) y de más de un fluoróforo (5D). Los microscopios confocales que cuentan con un detector espectral, pueden capturar imágenes de diferentes longitudes de onda (escaneo  $\lambda$ ) y, a partir de ellas, deducir el espectro de emisión de un fluorocromo determinado.

Otra de las grandes ventajas del sistema confocal es su capacidad de ajuste electrónico de la magnificación. Esto se logra variando el área de barrido o escaneo de la muestra sin necesidad de cambiar de objetivos. Este proceso, conocido como **factor de magnificación** (del inglés, “*zoom factor*”), se utiliza para ajustar la resolución espacial de la imagen, alterando el período de escaneo de láser. El incremento del zoom reduce el área escaneada de la muestra, lo que simultáneamente disminuye la velocidad de barrido. El resultado es un incremento del número de muestras para un mismo sector considerado, que aumenta la resolución espacial de la imagen y amplía la visualización de los objetos en el monitor. El zoom se utiliza normalmente para que coincida la resolución de la imagen digital con la resolución óptica del microscopio, cuando la NA y la magnificación de los objetivos utilizados son bajas.

### Microscopía de Disco Giratorio (Spinning Disk)

El Spinning Disk es esencialmente un sistema óptico con capacidades tendientes a la confocalidad. Tiene todas las características de un microscopio de fluorescencia de campo ampliado, con su misma fuente de luz y sistema de captura de las imágenes, pero con la particularidad que interpone un disco giratorio en el camino óptico. Este sistema semi-confocal permite la adquisición de imágenes a altas velocidades, con una iluminación mínima de las muestras. Esta propiedad lo convierte en un sistema ideal para la captura de imágenes 3D y 4D de organismos vivos.

De acuerdo al modelo comercial, el sistema cuenta con uno o dos discos giratorios compuesto por miles de orificios dispuestos en una espiral de Arquímedes, como en el disco de Nipkow (Fig. 3-32 izquierda) o por un patrón de líneas verticales y horizontales, como el patentado por Olympus (Fig. 3-32 derecha) para su modelo DSU.

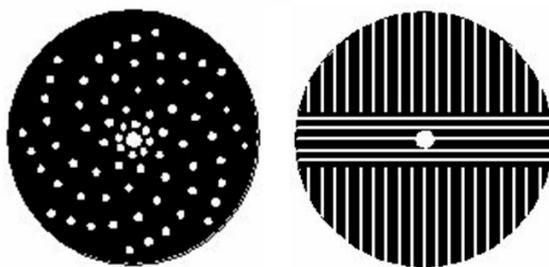
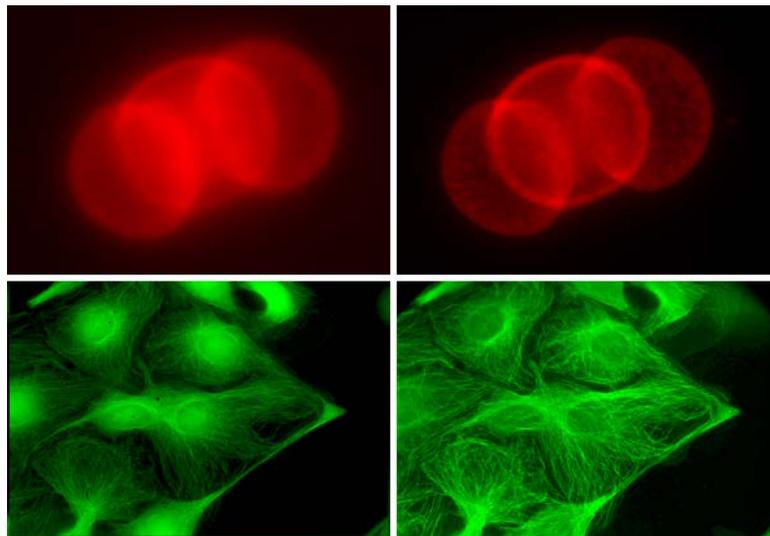


Fig. 3-32. Disco de Nipkow (izquierda) y de DSU (derecha) utilizados en el sistema confocal de disco giratorio (Spinning Disk Confocal Scanner).

En algunos discos giratorios, como los escáneres de Yokogawa CSU, el segundo disco está equipado con microlentes que incrementan la eficiencia. Esto permite que el sistema sea muy apropiado para la captura de imágenes de células vivas que presentan una débil expresión fluorescente y que son propensas a fotoblanqueo (del inglés, “*photobleaching*”).

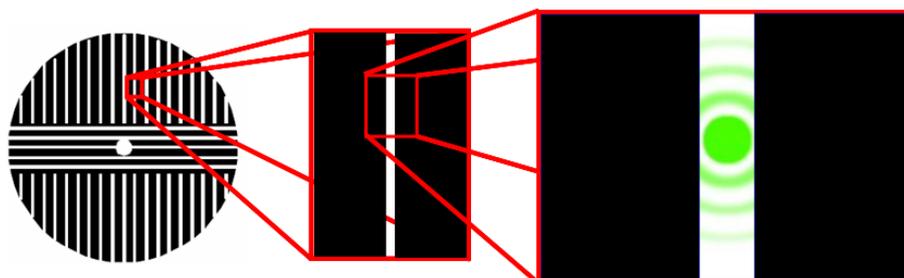
Cuando la luz de la lámpara del microscopio se proyecta sobre el disco, los agujeros trazan arcos concéntricos de luz de excitación sobre la muestra. La luz fluorescente reflectante regresa por el mismo camino a través de la lente del objetivo y del agujero del disco, atraviesa el espejo dicróico y llega finalmente al detector. Dado que todo el campo de visión se captura en una única exposición de la cámara, se puede obtener una imagen de alta calidad con gran rapidez (Fig. 3-33). Para ello se necesita contar con una cámara CCD de alta sensibilidad y velocidad. Si este mismo procedimiento se repite en el eje axial, se obtienen pilas de imágenes para la reconstrucción 3D de alta calidad confocal y a gran velocidad.



**Fig. 3-33.** Imágenes comparativas entre los sistemas ópticos de fluorescencia de campo ampliado (izquierda) y el sistema semi-confocal de disco giratorio (derecha). Arriba: granos de polen; abajo: células de cultivo.

El microscopio de disco giratorio recoge varios puntos de manera simultánea en lugar de escanear un solo punto por vez, como lo hace el microscopio confocal. Esto significa que si bien la calidad de la imagen no llega a superar a aquella obtenida por el sistema confocal, el proceso de captura tiende a ser más rápido. La rapidez de obtención de las imágenes es fundamental para el estudio de los sistemas vivos, no sólo por el efecto del fotoblanqueo sino porque, como todo sistema vivo, tiende a moverse.

El diseño del disco en el sistema DSU obedece al principio de los discos de Airy. Al girar a alta velocidad (3000 rpm), se genera un bloqueo alternativo vertical y horizontal del patrón de Airy de cada punto de la muestra (Fig. 3-34). De esta manera, lo que se percibe es prácticamente sólo lo que corresponde al punto focal (Fig. 3-28).



**Fig. 3-34.** Seccionamiento óptico del disco de Airy. Al girar a alta velocidad, se produce la limitación vertical y horizontal del punto focal de iluminación.

Este sistema presenta ventajas y desventajas. Entre las primeras, permite hasta cien o mil veces mayor velocidad de captura que el microscopio confocal, ya que múltiples puntos de luz iluminan la muestra y son detectados en paralelo, a diferencia del confocal que lo hace de manera secuencial, reduciendo sustancialmente la saturación del fluoróforo. Asimismo, genera una imagen en tiempo real que puede ser detectada por una cámara CCD de alta eficiencia cuántica, presenta menor fotoblanqueo, debido a una menor intensidad de excitación y no requiere de iluminación láser, con lo cual se reducen los costos y muestra más opciones de longitud de ondas de excitación. La eficiencia cuántica es la fracción de fotones incidentes que se pueden registrar, es decir, mide la cantidad de fotones absorbidos en comparación con su cantidad emitida. La detección de la luz con una eficiencia cuántica baja introduce ruidos que pueden ser muy perturbadores.

Entre las desventajas, se destaca que la luz dispersada por objetos que se encuentren fuera del plano de foco puede alcanzar al detector, a través de orificios (pinholes) adyacentes del disco, con lo cual se reduce la resolución axial. Asimismo, la baja transmisión de luz a través de los orificios del disco puede obstaculizar la detección de señales débiles. Si bien se podría compensar con un tiempo de exposición más prolongado, iría en contra de la ventaja de la velocidad del sistema. Más aún, del 90% al 99% de la luz incidente no atraviesa el disco y por lo tanto, sus reflexiones podrían producir mucha señal de fondo. Como desventaja adicional, mediante este sistema microscópico no se pueden realizar experimentos de FRAP (del inglés, “*Fluorescent Recovery After Photobleaching*”).

### Microscopía de Fluorescencia de Reflexión Interna Total (TIRFM)

El sistema TIRF (del inglés, “*Total Internal Reflection Fluorescence*” - Fluorescencia de Reflexión Interna Total) se basa en la microscopía óptica y confocal, con la diferencia que, por su estructura, está principalmente orientado al estudio de moléculas de membranas celulares y la interacción entre las mismas.

La microscopía TIRF utiliza las propiedades únicas de una onda de luz evanescente, inducida selectivamente para iluminar y excitar fluoróforos en una región restringida de la muestra, adyacente a la interfaz vidrio-medio líquido. El concepto básico de este sistema es simple, sólo requiere de un haz de luz de excitación que viaje con un alto ángulo de incidencia a través del vidrio del cubreobjetos o frasco de cultivo, donde se encuentran adheridas las células.

Las diferencias entre el índice de refracción del vidrio y el medio líquido regulan la forma cómo se refracta o se refleja la luz en su interfaz, en función del ángulo de incidencia. En un ángulo crítico específico, el haz de luz se refleja totalmente en la interfaz vidrio-medio líquido, en lugar de atravesarlo o refractarse de acuerdo con la ley de Snell. La reflexión genera un campo electromagnético muy delgado (por lo general menor a los 200 nm) en el medio acuoso, el cual tiene una frecuencia idéntica a la de la luz incidente. Este campo, denominado “onda o campo evanescente”, sufre un decaimiento exponencial de la intensidad al aumentar la distancia desde la superficie (Fig. 3-35).

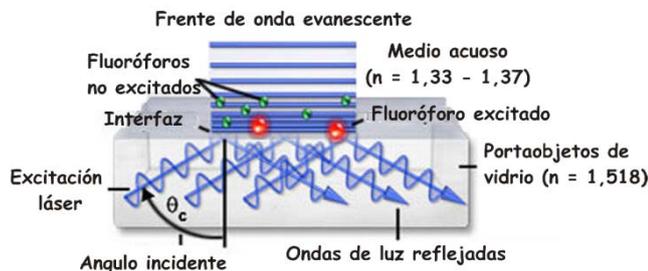
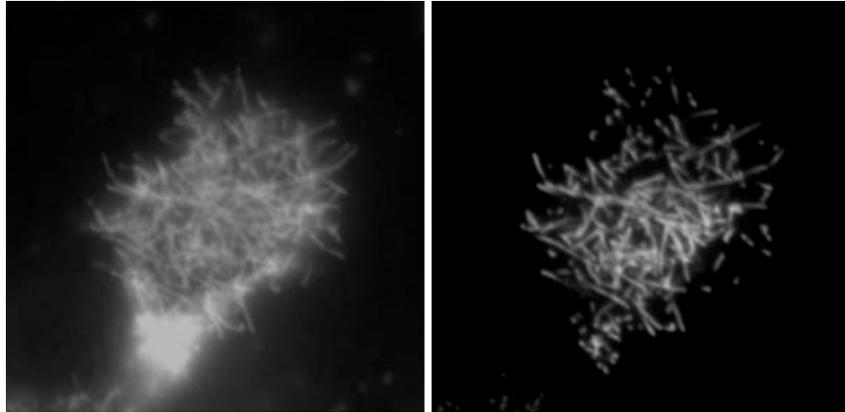


Fig. 3-35. Sistema TIRF.

El decaimiento de la intensidad de la onda evanescente en función de la distancia depende del ángulo de iluminación incidente, su longitud de onda y la diferencia en el índice de refracción entre los dos medios a ambos lados de la interfaz. Los fluoróforos que se encuentren cerca de la interfaz podrán ser excitados por el campo evanescente, siempre que tengan transiciones electrónicas que se encuentren en una longitud de onda cercana a la de la luz incidente. Dada la caída exponencial en la intensidad de la onda generada, los

fluoróforos más alejados de la superficie no podrán ser excitados. Esto conduce a una drástica reducción en la emisión de fluorescencia secundaria procedente de moléculas que no se encuentran en el plano focal principal (Fig. 3-28). De esta manera, se generan imágenes de alto contraste que retratan los procesos ocurridos en la interfaz, con un aumento significativo en la relación señal-ruido de fondo, en comparación con las técnicas clásicas de campo ampliado (Fig. 3-36).



**Fig. 3-36.** Comparación entre la microscopía epi-fluorescente de campo ampliado para la observación de proteínas de membrana (izquierda) con la misma imagen capturada en un microscopio óptico con sistema TIRF (derecha).

El sistema TIRF se usa, entre otras cosas, para establecer la interacción de diferentes moléculas con las superficies celulares, principalmente en células vivas. Algunos ejemplos se encuentran en la activación de las células por parte de las hormonas, neurotransmisores y antígenos, la adhesión celular a las superficies, el transporte de electrones en la membrana mitocondrial y la dinámica del citoesqueleto y la membrana, entre otros.

### **Microscopía Confocal Multifotónica**

La microscopía de fluorescencia multifotónica es una poderosa herramienta de investigación, que combina las técnicas avanzadas de microscopía láser confocal con la excitación de fluorescencia multifotónica de larga longitud de onda. Este sistema se utiliza para capturar imágenes de alta resolución, a partir de muestras incubadas con fluoróforos muy específicos.

Tanto el sistema confocal como el confocal multifotónico pueden generar imágenes con una resolución en el orden de los micrones o los sub-micrones. La diferencia entre estos dos sistemas microscópicos radica en el poder de penetración de láser multifotónico, lo cual permite el uso de cortes más gruesos, sin perder intensidad. Esto se debe a que los láseres utilizados en este sistema tienen una longitud de onda cercana al infrarrojo, que posibilita no sólo su mayor penetración en los tejidos, en comparación con láseres de menor longitud de onda sino, además, la reducción del alto grado de dispersión de la luz (fluorescencia secundaria) que se produce con estos últimos.

La figura 3-37 muestra una comparación entre la misma imagen adquirida mediante microscopía confocal y multifotónica. Se observa claramente que esta última genera menos fondo y mayor profundidad de penetración, lo que conduce a la visualización de un mejor detalle.

La excitación en la microscopía multifotónica sólo se produce en el punto focal del microscopio de difracción limitada, lo que lo capacita a realizar secciones ópticas en muestras biológicas gruesas para su posterior reconstrucción 3D. Dado que la posición del punto focal se puede determinar y controlar con precisión, la microscopía multifotónica es útil para estudiar regiones seleccionadas de la muestra. Este sistema genera poco daño sobre los tejidos vivos y un mínimo de fotoblanqueo, debido a que la energía de excitación está muy localizada. Mediante esta técnica es posible analizar tejidos vivos de espesor grueso, rebanadas gruesas de tejido nervioso y hasta embriones en desarrollo, hechos que serían difíciles, sino imposibles de estudiar con otras técnicas de microscopía.



Fig. 3-37. Imagen de la pulga de agua obtenida mediante microscopía confocal (izquierda) y multifotónica (derecha). Obtenidas de:  
[http://www.cf.gu.se/english/Centre\\_for\\_Cellular\\_Imaging/Equipment/Multiphoton\\_microscopy/](http://www.cf.gu.se/english/Centre_for_Cellular_Imaging/Equipment/Multiphoton_microscopy/)

Los principios básicos de este sistema microscópico indican que ante la emisión de altas densidades de fotones, dos fotones pueden ser absorbidos de manera simultánea mediante la combinación de sus energías, para provocar la transición electrónica de un fluoróforo al estado excitado (Fig. 3-22). Como fuera mencionado anteriormente, dado que la energía de un fotón es inversamente proporcional a su longitud de onda, ambos fotones deben tener longitudes de onda de aproximadamente el doble de la requerida para un solo fotón de excitación. A modo de ejemplo, dos fotones de longitud de onda de 640 nm (luz roja) se pueden combinar para excitar un fluoróforo que absorbe en la región de 320 nm (luz ultravioleta), lo que resulta en la emisión secundaria de fluorescencia de mayores longitudes de onda (azul o verde). Este principio permite que la luz con ondas presentes en la región cercana al infrarrojo pueda ser favorablemente utilizada para excitar a los fluoróforos en un solo evento cuántico, los que posteriormente emiten radiación secundaria de mayores longitudes.

La fluorescencia multifotónica requiere de alta densidad de fotones para garantizar un nivel suficiente de excitación de los fluoróforos. De hecho, la concentración fotónica debe ser de aproximadamente un millón de veces superior a la que se requiere para la absorción de un número equivalente de fotones únicos. Esto se logra con láseres pulsados de gran potencia que generan una cantidad significativa de energía durante los picos de pulso, pero con una potencia media lo suficientemente baja como para no dañar las muestras. Los pulsos breves pero intensos aumentan la probabilidad promedio de los fluoróforos para absorber dos fotones. La probabilidad de que las sustancias fluorescentes que se encuentran por fuera del plano focal absorban estos dos fotones es prácticamente nula, ya que la densidad de los mismos no es lo suficientemente alta en esta región. Esto reduce de manera significativa la producción de fluorescencia secundaria, como se observa con los otros sistemas microscópicos previamente analizados.

La resolución de las imágenes producidas por la microscopía multifotónica no excede a la alcanzada con la microscopía confocal y, de hecho, la utilización de longitudes de onda cercanas al infrarrojo (700-1200 nm) da como resultado una PSF de mayor extensión. Esto se traduce en una ligera reducción de la resolución lateral y axial.

Los fluoróforos empleados en experimentos de microscopía multifotónica deben tener una gran capacidad de absorción a determinadas longitudes de onda, alto rendimiento cuántico, baja tasa de fotoblanqueo y el menor grado posible de toxicidad química y fotoquímica. Los fluorocromos también deben ser capaces de soportar la iluminación de alta intensidad proveniente del láser, sin sufrir una degradación significativa. Entre las sustancias fluorescentes más utilizadas se encuentran el Lucifer amarillo (que se excita con pulsos de 860 nm), Bodipy (con 920 nm), Dansyl (con 700 nm), Cumarina 307 (con 776 nm) e Indo-1 (con 700 nm).

Con este tipo de equipamiento también es posible realizar microscopía intravital, que ayuda a comprender procesos *in vivo* ocurridos a nivel microscópico. Es una herramienta

de investigación sofisticada que permite visualizar directamente la microcirculación de los órganos en los animales anestesiados, así como las complejas interacciones biológicas y los posibles mecanismos de enfermedad. La microscopía intravital no requiere del uso de anticoagulantes ni la fijación de los tejidos. Además de requerir objetivos adecuados, uno de los elementos más importantes de este equipamiento es la cámara, que debe tener una velocidad de captura muy rápida, necesaria para reproducir los eventos en tiempo real y con una buena resolución (Fig. 3-38).

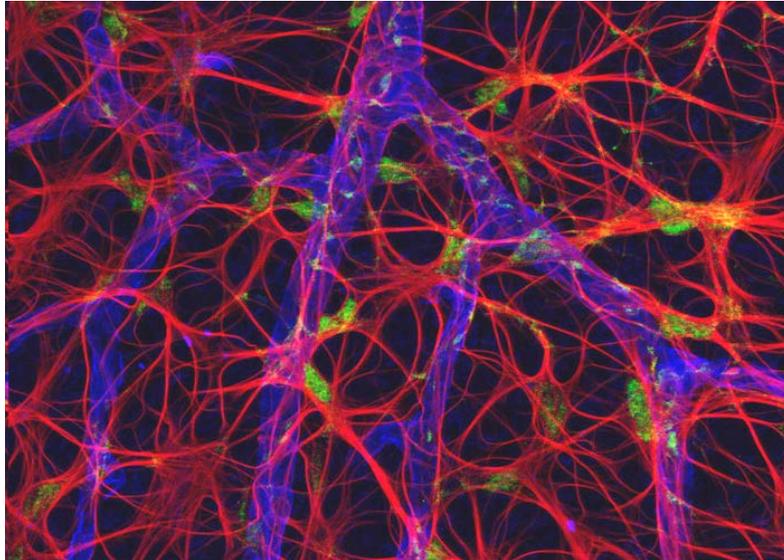


Fig. 3-38. Imagen multifotónica de la circulación dentro del ojo de la rata. El color azul denota la presencia de endotelina en la pared de los vasos sanguíneos. En rojo: el filamento intermedio GFAP. Obtenida de: <http://www.olympusbioscapes.com/>

### Microscopía de Súper-resolución

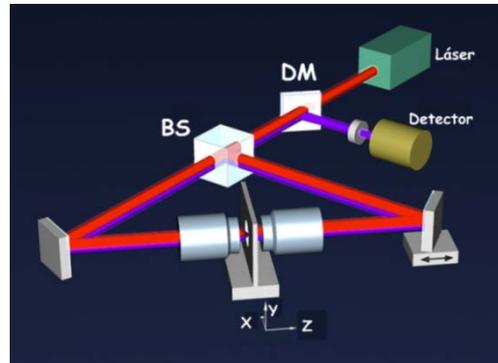
Este tipo de microscopio también se basa en el sistema óptico. Como fuera mencionado al hablar de resolución de las imágenes (Capítulo 1) y como se verá al describir las lentes objetivos, la resolución en un microscopio de luz está limitada por la NA del sistema. Por lo general, el poder de resolución de un microscopio óptico es de aproximadamente 250 nm. Las técnicas de súper-resolución permiten romper la barrera del límite de difracción de la luz para lograr una mejor separación entre los objetos. Estas técnicas se dividen en dos grandes categorías: súper-resolución “verdadera”, en donde se captura la información contenida en las ondas evanescentes y súper-resolución “funcional”, que aplica técnicas experimentales específicas para la reconstrucción de las imágenes, conociendo las limitaciones del sistema.

Las técnicas verdaderas incluyen a aquellos microscopios que utilizan súper-lentes, de fabricación artificial y que emplean meta-materiales electromagnéticos con propiedades que no se encuentran en la naturaleza. Estos materiales tienen un índice de refracción negativo que permite crear lentes con una resolución espacial menor a la de la longitud de onda. Actualmente son sólo utilizables a nivel de las microondas del espectro electromagnético. Las técnicas verdaderas, también se consiguen mediante microscopía óptica de barrido de campo cercano (del inglés, “*Near Field Scanning Optical Microscopy*”), utilizado para el estudio de nanopartículas. Para ello, el detector se ubica muy cerca a la muestra (a menor distancia que la longitud de onda de la luz incidente), con lo cual se logra una resolución lateral de 20 nm y axial de 2-5 nm. Este procedimiento está limitado al estudio de las superficies.

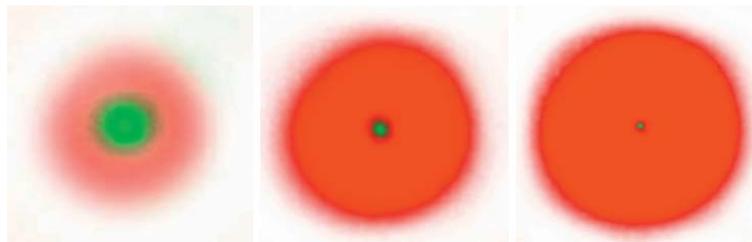
El 4Pi es un microscopio diseñado para lograr súper-resolución. Es esencialmente confocal, con 2 objetivos enfocados sobre la misma muestra, logrando resoluciones axiales que pasan de 500-700 nm a 100-150 nm (Fig. 3-39). Actualmente, este microscopio se usa en conjunto con el principio STED.

Los métodos funcionales actualmente más utilizados para lograr la súper-resolución son el STED, el GSD y el SIM. El sistema STED (del inglés, “*Stimulated Emission Depletion*”),

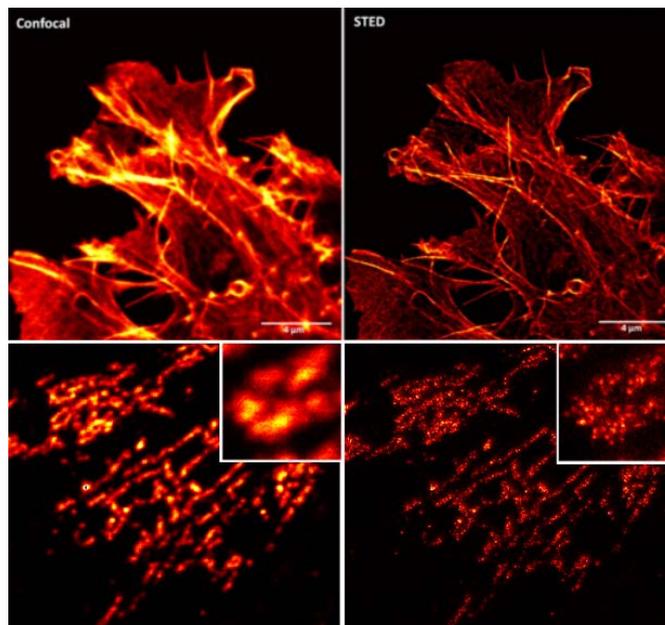
utiliza dos pulsos de láser: el impulso de excitación que excita a los fluoróforos a su estado fluorescente y el pulso STED para la des-excitación de los fluorocromos por medio de la emisión estimulada. Dado que existe una dependencia no lineal entre la emisión de estimulación de uno de los láseres con la intensidad del STED, todos los fluoróforos alrededor del punto focal de excitación estarán en su estado de “apagado”, es decir, el estado fundamental de las sustancias fluorescentes (Fig. 3-40). Con este tipo de técnicas se puede lograr una resolución de hasta 5,8 nm (Fig. 3-41).



**Fig. 3-39.** Microscopio 4Pi. La luz láser se fragmenta por un divisor de haz (Beam Splitter - BS) y por medio de espejos se dirige hacia las dos lentes objetivos opuestas. La superposición de la imagen se produce en el punto focal común de ambos haces de luz. DM: espejo dicróico.

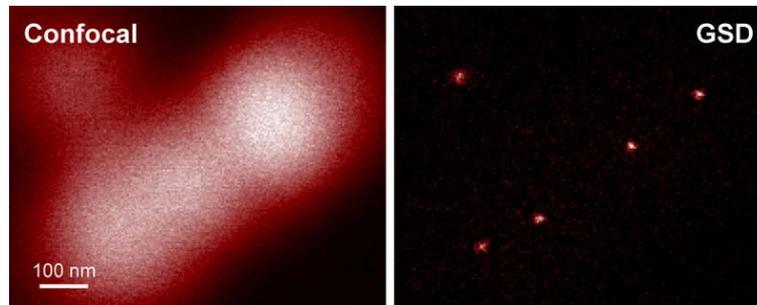


**Fig. 3-40.** El área de fluorescencia efectiva (verde) decrece con la potencia de emisión del láser des-excitante (rojo).



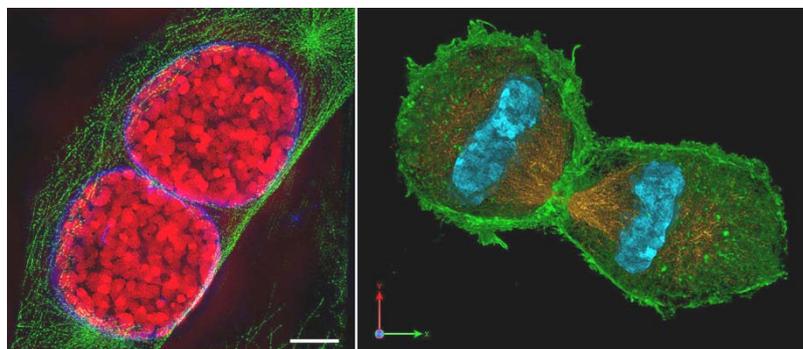
**Fig. 3-41.** Arriba: Comparativa entre el sistema láser confocal y STED para fibras de actina. Obtenidas de <http://microscopy.duke.edu/news/STED.html>. Abajo: Se observan vesículas marcadas con TI-VAMP. En el inserto se presenta la magnificación de una región de la imagen. En el sistema STED (derecha) se resuelven las vesículas individuales en el orden de los 40 nm, mientras que el confocal (izquierda) se muestra una acumulación borrosa de las mismas. Modificada de: <http://www.biomedicale.univparis5.fr/neurophysiologie/Groups/superresolution.php>

En la microscopía GSD (del inglés, “*Ground State Depletion Microscopy*”) también se utilizan marcadores fluorescentes. Normalmente, el fluoróforo excitado desde el estado de reposo puede regresar espontáneamente al punto de partida, emitiendo un fotón de fluorescencia. Sin embargo, si se aplica una longitud de onda apropiada, la sustancia fluorescente puede ser excitada a un estado oscuro de larga duración, es decir, un estado donde no se produce fluorescencia. Mientras la molécula se encuentre en este estado (como triplete), no podrá ser excitada desde el estado de reposo. De esta manera se logran imágenes con elevada resolución (Fig. 3-42).



**Fig. 3-42.** Izquierda: registro confocal de los sitios vacantes en un diamante, donde las pequeñas manchas no se pueden separar. Derecha: imagen GSD del mismo sitio donde los sitios vacantes son claramente visibles. El punto correspondiente a estos sitios es de aproximadamente 15 nm. Obtenidas de: [http://en.wikipedia.org/wiki/GSD\\_microscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/GSD_microscopy).

La microscopía de iluminación estructurada (del inglés, “*Structured Illumination Microscopy*” - SIM), ilumina una muestra con un patrón de luz y aumenta la resolución mediante la medición de franjas en el patrón de Moaré. Este es un efecto visual derivado de la superposición, con distinto ángulo, de dos grupos de líneas finas paralelas, creando una sensación visual como las fibras de seda. La medición se realiza en el sitio de interferencia entre el patrón de luz y la muestra. El método aumenta la resolución espacial mediante la recopilación de información sobreimpuesta desde el espacio de frecuencia Fourier de la imagen original (ver Capítulo 4) (Fig. 3-43).



**Fig. 3-43.** Células capturadas mediante el método SIM. Izquierda: núcleos de células murinas en profase. Derecha: Célula murina en telofase. Obtenidas de: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:3D-SIM-1\\_NPC\\_Confocal\\_vs\\_3D-SIM.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:3D-SIM-1_NPC_Confocal_vs_3D-SIM.jpg)

### Microscopio electrónico

Los sistemas microscópicos vistos hasta ahora resuelven objetos en el orden de los 200-250 nm. Actualmente, la única forma de resolver objetos mil o más veces menores es mediante la utilización del microscopio electrónico. A diferencia de los microscopios ópticos, que utilizan luz con longitud de onda dentro del espectro visible, el electrónico usa electrones con una longitud de onda 100.000 veces menor para iluminar la muestra y producir la imagen magnificada. Por esta razón, las imágenes sólo pueden ser monocromáticas.

El microscopio electrónico utiliza lentes electrostáticas y electromagnéticas para controlar el haz de electrones y enfocarlos en la muestra para producir la imagen (Fig. 3-44). El flujo de electrones se produce con alto voltaje en una cámara de alto vacío, ya que de otra manera estos serían absorbidos por el aire. Por esta razón, no se pueden utilizar organis-

mos o células vivos. En estos microscopios sólo se puede utilizar material previamente procesado para este fin.

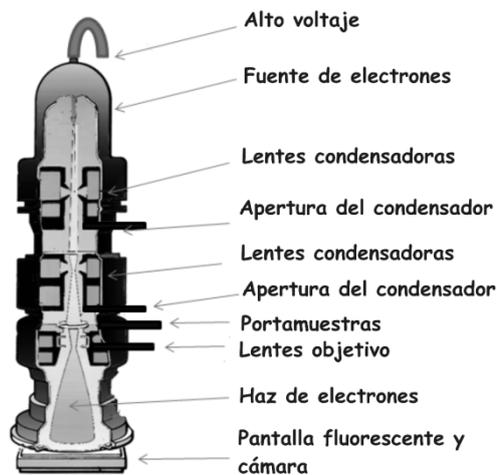


Fig. 3-44. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión.

Existen diversos tipos de microscopios electrónicos. Uno de ellos es el de transmisión (del inglés, “*Transmisión Electrón Microscope*” - TEM). En este dispositivo, los electrones son emitidos por un cañón, generalmente equipado con un cátodo de filamento de tungsteno. El haz de electrones es entonces acelerado por el ánodo, sigue su trayectoria a través de las lentes condensadoras y finalmente impacta sobre la muestra, que en parte es transparente al mismo y en parte lo dispersa. Al emerger de la muestra, el haz de electrones es magnificado por el sistema de lentes del objetivo y alcanza a la pantalla de visualización, al sistema de captura fotográfico o al sensor CCD que transmite la información de la imagen hacia una computadora.

El TEM es utilizado para observar una gran variedad de especímenes biológicos (Fig. 3-45) e inorgánicos, incluidos los microorganismos, células, moléculas de gran tamaño, muestras de biopsia, metales y cristales. Este microscopio se emplea con cierta frecuencia para el control de calidad y análisis de fallas en la industria.

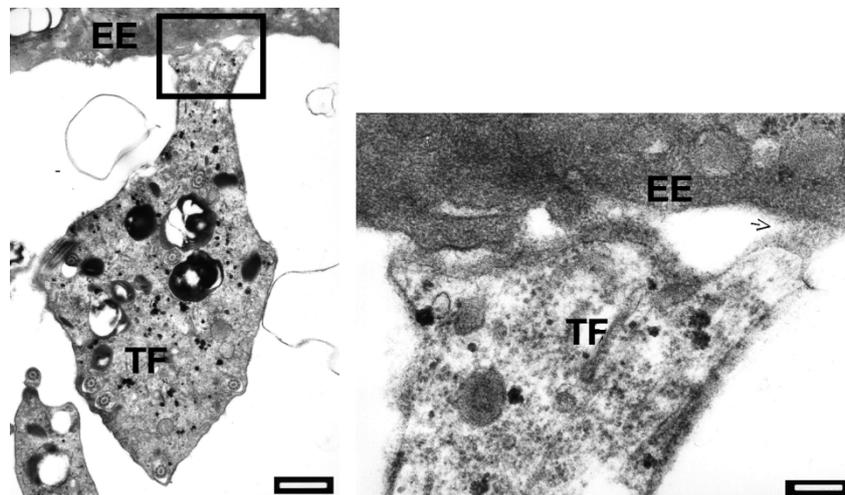


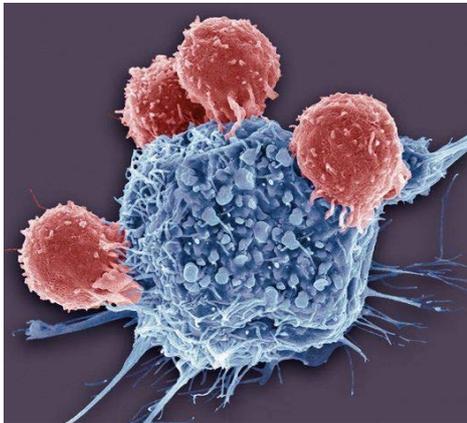
Fig. 3-45. Imagen de *Tritricomona foetus* (TF) vista con el TEM. A la izquierda se ve al parásito unido a una célula endometrial (EE). La barra de magnificación corresponde a 1  $\mu\text{m}$ . A la derecha se ve una magnificación de lo circunscripto en el recuadro negro, correspondiente al sitio de unión entre el parásito y la célula. Barra = 200 nm.

Las muestras utilizadas con este sistema microscópico tienen que ser extremadamente delgadas (100 nm). De otro modo, se producirían mayores aberraciones en las imágenes de las que se producen. Una de ellas es la de esfericidad que se genera debido a la refracción de los electrones al atravesar las lentes. Para subsanar este tipo de defectos se diseñó un nuevo tipo de TEM, que aumenta la resolución de las imágenes. El HRTEN (del inglés,

“*High Resolution Transmisión Electrón Microscope*”) produce imágenes con una resolución por debajo de los 0,5 Å ( $0,5 \times 10^{-10}$  m), con magnificaciones superiores a las 50 millones de veces.

A diferencia del TEM, el microscopio electrónico de barrido (del inglés, “*Scanning Electrón Microscope*” - SEM), no absorbe el haz de electrones. Por el contrario, al contactar con la muestra gruesa recubierta con una capa metalizada, los electrones pierden energía por diferentes mecanismos. Parte de esa energía es convertida en calor, emisión secundaria de electrones de baja energía, electrones de alta energía dispersada, emisión de luz (luminiscencia catódica) o emisión de rayos X. Estas formas de conversión de la energía proporcionan las señales portadoras de información sobre las propiedades de la superficie de la muestra, tales como su topografía y composición.

En general, la resolución de la imagen obtenida con el SEM es inferior a la capturada con el TEM. Sin embargo, el propósito del primero es totalmente diferente al del segundo, ya que éste último sólo busca obtener información de la superficie. Por otro lado, las muestras para el SEM pueden llegar a ser de hasta varios centímetros cuadrados de superficie y con una gran profundidad de campo, que es la distancia comprendida entre los puntos más próximos y más lejanos que se reproducen con nitidez en una imagen. Por estas particularidades, el SEM genera imágenes que son una buena representación de la forma 3D de la muestra (Fig. 3-46).



**Fig. 3-46.** Imagen coloreada obtenida con un microscopio electrónico de barrido (SEM) donde se observan linfocitos T (rojo) adheridos a una célula cancerosa (azul). Obtenida de: <http://www.sciencephoto.com/media/76117/enlarge>

El ESEM (del inglés, “*Environmental scanning electron microscope*”) es un microscopio electrónico de barrido que permite la captura de imágenes de especímenes en su estado natural. Para ello, se dispone de una cámara de elevada presión de gas que evita los efectos deletéreos del elevado vacío del equipo sobre el material fresco. Es utilizado para el estudio de plantas vivas, microorganismos (Fig. 3-47), determinación de la calidad de ciertos materiales, etc.



**Fig. 3-47.** Esporas de hongos ubicadas sobre la hoja de la hierba de limón vista con el microscopio ESEM. Obtenida de: [http://en.wikipedia.org/wiki/Environmental\\_scanning\\_electron\\_microscope](http://en.wikipedia.org/wiki/Environmental_scanning_electron_microscope)

### Microscopio de Fuerza atómica

El microscopio de fuerza atómica (del inglés, “*Atomic Force Microscope*” - AFM) genera imágenes de muy alta resolución (en el orden de los nanómetros). Pertenece al grupo de microscopía de sonda (del inglés “*Scanning Probe Microscopy*” - SPM) que es una rama de la ciencia que forma imágenes de la superficie utilizando una sonda física que analiza la muestra. Entre otros sistemas que pertenecen al mismo grupo se encuentran el microscopio de resonancia magnética y el de barrido térmico.

Este microscopio consiste en un brazo de palanca con una punta afilada (sonda) en su extremo, la que se utiliza para explorar la superficie de la muestra (Fig. 3-48). Este brazo está generalmente compuesto de silicón con un radio de curvatura en la punta de pocos nanómetros. Cuando la punta se aproxima a la superficie a analizar, las fuerzas eléctricas producidas entre ambas generan un desvío del brazo de palanca. La deflexión de este brazo se mide utilizando un puntero láser, reflejado en la superficie superior del sensor sobre una matriz de fotodiodos. Dependiendo de la situación, las fuerzas que se miden en el AFM incluyen a las de contacto mecánico, van der Waals, capilares, de uniones químicas, electrostáticas, magnéticas y de hidratación, entre otras.

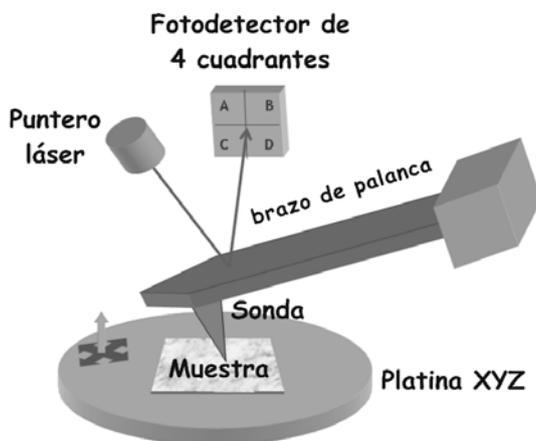


Fig. 3-48. Esquema de un microscopio de fuerza atómica.

El AFM puede ser utilizado para obtener imágenes y manipular átomos y estructuras de una gran variedad de superficies. Los átomos individuales se pueden advertir cuando existen interacciones entre los de la muestra y los de la sonda. Las muestras observadas mediante este microscopio no necesitan tratamientos especiales que puedan modificarlas o dañarlas. Las mismas pueden estar expuestas al aire o en medio líquido, lo que permite el estudio de macromoléculas y hasta de organismos vivos. Estos microscopios pueden escanear muestras de hasta 150  $\mu\text{m}$  de lado y 10 a 20  $\mu\text{m}$  de profundidad. En la figura 3-49 se compara la imagen de nanotubos capturada con el AFM y el SEM.

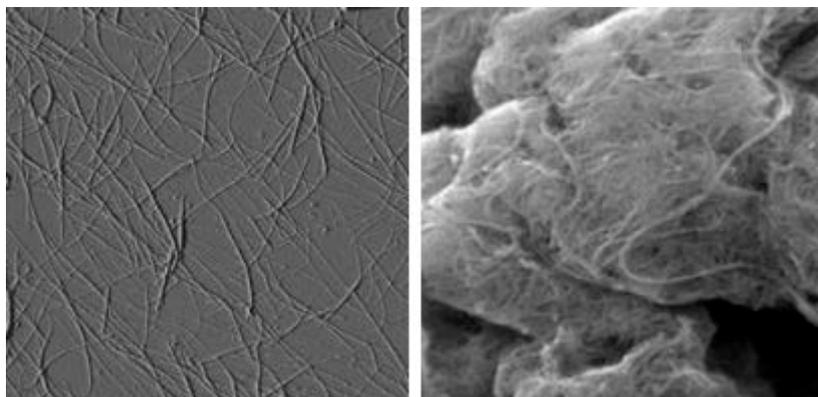


Fig. 3-49. La imagen capturada con el AFM (izquierda) muestra que los nanotubos de carbón Unidym son cortos y de pared delgada. En la imagen obtenida mediante el SEM se observa que estos nanotubos tienden a formar cuerdas y agrupaciones de cuerdas. Modificada de: [http://www.unidym.com/technology/cnt\\_healthandsafety\\_nanotubecharacteristics.html](http://www.unidym.com/technology/cnt_healthandsafety_nanotubecharacteristics.html)

## Anatomía del microscopio

La mayoría de los microscopios ópticos mencionados anteriormente y utilizados en la actualidad, se basan en el mismo tipo de estructuras: objetivos, tubo de proyección y oculares. La diferencia sustancial entre los microscopios ópticos actuales y aquellos usados en siglos anteriores, es el poder de resolución de las muestras y se debe, fundamentalmente, a la calidad de los objetivos utilizados. Asimismo, con el tiempo se fueron incorporando otros aditamentos en el paso de luz, que permitieron lograr resoluciones antes nunca vistas. En síntesis, los objetivos se fueron modificando con el agregado de nuevos tipos de lentes y anillos de restricción de luz, se modificaron los condensadores y los oculares fueron reemplazados por pantallas digitales o cámaras de video. Por otra parte, el sistema comenzó a motorizarse y hoy es posible comandar el microscopio directamente desde la computadora.

A continuación se verán algunas de las características de las diferentes partes del microscopio óptico. Como se observa en la figura 3-50, el microscopio está formado por componentes mecánicos y eléctricos y en su interior alberga diferentes lentes en distintos sectores del camino óptico. Estas lentes tienen la propiedad de conducir la luz desde una fuente hasta el sitio de observación.



Fig. 3-50. Estructura del microscopio de luz, mostrando distintos tipos de lentes interpuestas en el camino óptico.

La iluminación de las muestras puede provenir de una fuente de luz transmitida o reflejada (Fig. 3-51), que impacta sobre las muestras y seguirá las leyes de la física descritas previamente en este capítulo. Sin embargo, la resolución de las imágenes observadas dependerá de los distintos componentes ópticos del microscopio.

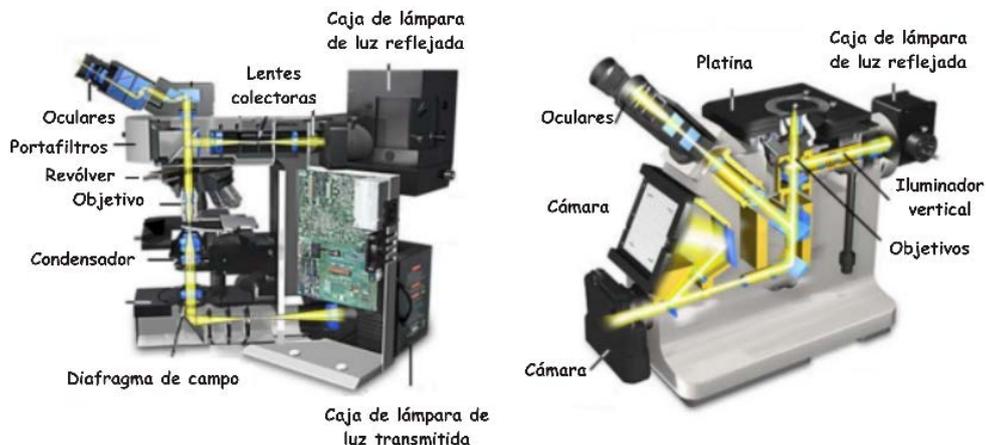


Fig. 3-51. Tanto en el microscopio directo (izquierda) como en el invertido (derecha), la luz transmitida y la reflejada llegan por distintos caminos ópticos hasta los oculares o dispositivos de registro (cámaras).

## Objetivos

Estos componentes son quizás los elementos más importantes de un microscopio óptico, ya que son los responsables de la formación de la imagen principal y juegan un papel central en la determinación de la calidad de las mismas. Los objetivos son los responsables de la ampliación de un espécimen en particular y de la resolución de los detalles de la imagen.

Existe gran variedad de objetivos para cada sistema microscópico, no sólo por su magnificación, sino además, por las características ópticas tales como apertura numérica (NA), corrección de las aberraciones de tipo cromático y de esféricidad, distancia de trabajo, etc. El objetivo es una estructura de estado sólido, con inscripciones características en su superficie que le dan entidad a la misma (Fig. 3-52). Allí se expresa su magnificación, NA y tipo de corrección realizada. En ciertas lentes objetivos se inscriben tipos especializados de actividad. Por otro lado, pueden contener dispositivos mecánicos de modificación de la luz interna (diafragma iris) o de la distancia al cubreobjetos (collar de corrección).



**Fig. 3-52.** Los objetivos muestran inscripciones en su superficie, que siguen los estándares de la Sociedad de Microscopía. Referencia de los componentes e inscripciones: 1. Rosca de montaje al revolver; 2. Fabricante; 3. Corrección de aberraciones; 4. Magnificación; 5. NA; 6. Longitud del tubo y grosor del cubreobjetos; 7. Distancia de trabajo (del inglés, "working distance" - WD); 8. Código de color de la magnificación; 9. Anillo de corrección (diafragma iris); 10. Collar de corrección (espesor del cubreobjetos); 11. Código de color del medio de inmersión; 12. Caja de la lente frontal.

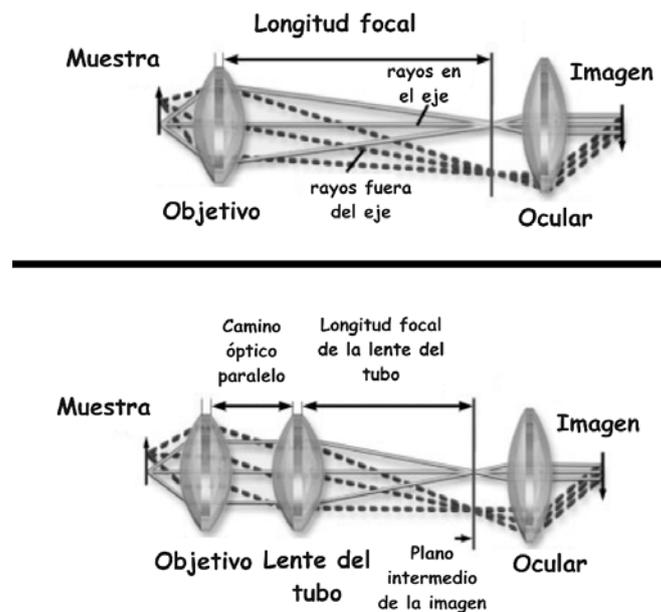
La mayoría de los objetivos son compatibles exclusivamente con los microscopios de su propia empresa fabricante. Esto se debe a la correspondencia entre la distancia de trabajo (ver más adelante) y el largo del tubo de proyección, entre otras características. En cuanto a la magnificación, no todos los fabricantes producen todo el rango existente en el mercado, que se inicia con 0,5x y finaliza con 250x, con muchas variaciones intermedias. Las magnificaciones más pequeñas (0,5x; 1,25x; 4x) hacen las veces de lupa panorámica. Los objetivos de 10x y 20x permiten la identificación de estructuras celulares dentro de los tejidos. En técnicas de microscopía de luz, el objetivo de 40x es el que se usa para ver los detalles finos de las células, mientras que en microscopía de campo ampliado, los objetivos de elección son los de 60x y 63x. El objetivo de 100x es utilizado casi exclusivamente para el análisis de células individuales, cualquiera sea el tipo de microscopía que se utilice.

El objetivo de 250x se utiliza específicamente en ciertas técnicas de campo claro y campo oscuro debido a su larga distancia de trabajo. El uso de objetivos con larga distancia de trabajo es deseable cuando se examinan muestras que se encuentran dentro de placas de cultivo o cuando se realiza microscopía química y metalúrgica, donde la lente frontal del objetivo debe protegerse del calor o de los productos químicos dañinos, utilizando un cubreobjetos grueso sobre la muestra.

La indicación de las correcciones ópticas presentes en la superficie de los objetivos puede variar entre acromática, semi-apocromática o fluorita, apocromática, plano-apocromática y súper-apocromática. La indicación de la NA es un valor fundamental que indica el ángulo de recepción de luz, que a su vez determina el poder de captación de la misma, su poder de resolución y la profundidad de campo del objetivo (ver más adelante).

En ciertos objetivos, también se inscribe la longitud del tubo de proyección del microscopio. Esta distancia se extiende desde el sitio donde se enrosca el objetivo hasta el comienzo del ocular. La distancia del tubo (longitud mecánica) fue variando en los distintos microscopios utilizados desde el siglo XIX hasta 100 años después, entre 160 (Nikon, Olympus, Zeiss) y 170 mm (Leica). Los microscopios actuales cuentan con un sistema óptico que no necesita de una distancia fija para enfocar la muestra y que se encuentra entre los 160 y 200 mm (longitud de referencia focal), de acuerdo al fabricante. Actualmente, los objetivos presentan el símbolo de infinito ( $\infty$ ) y además inscriben las siglas ICS (del inglés, “*Infinity Corrected System*”) o UIS (del inglés, “*Universal Infinity System*”) que refuerzan el concepto de óptica con corrección al infinito. Los sistemas ópticos con este tipo de corrección permiten la introducción de elementos auxiliares en el camino óptico entre el objetivo y la lente del tubo, tales como el contraste de interferencia diferencial (DIC), prismas, polarizadores e iluminadores de epi-fluorescencia, entre otros. La incorporación de estos elementos auxiliares produce una variación mínima en el enfoque y en las correcciones de las aberraciones (ver más adelante).

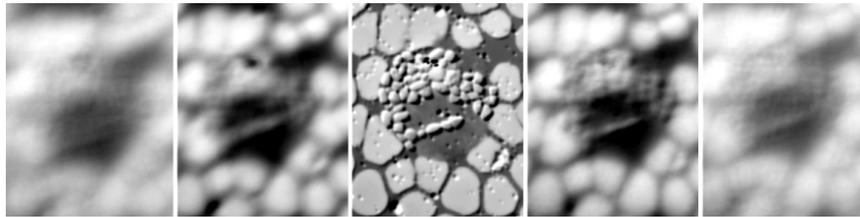
En los microscopios con óptica finita (tubos de longitud fija), el diseño asume que el foco de la muestra se encuentra unos pocos micrómetros más allá del plano focal frontal del objetivo. Esto implica que la incorporación de accesorios ópticos, en este tipo de microscopios, aumentaría la longitud efectiva del tubo, introduciendo aberraciones de esfericidad en un sistema, por lo demás, perfectamente corregido desde el punto de vista óptico (Fig. 3-53).



**Fig. 3-53.** Arriba: en un sistema de óptica finita, con una longitud fija del tubo de proyección, la luz pasa a través del objetivo, se dirige hacia el plano de imagen intermedia ubicado en el primer plano focal del ocular (línea vertical roja) y converge en ese punto, pasando por una interferencia constructiva y destructiva para producir una imagen. Abajo: la situación es muy diferente en un sistema óptico de corrección al infinito, donde el objetivo produce un flujo de haces de luz paralelos reflejados en el infinito (a menudo referido como el espacio infinito), que se enfocan en el plano intermedio de la imagen de la lente del tubo. Una porción de la luz que llega al objetivo emana de la periferia de la muestra y entra en el sistema óptico en ángulos oblicuos, avanzando en diagonal (pero aún en haces paralelos) hacia la lente del tubo. Toda la luz recogida por la lente del tubo se enfoca, entonces, en el plano intermedio de la imagen y es posteriormente ampliada por el ocular.

La mayoría de los objetivos de transmisión de luz, fueron diseñados para la observación de muestras cubiertas por un cubreobjetos de vidrio. Actualmente se usan cubreobjetos con un espesor de 0,17 mm para la mayoría de las aplicaciones, aunque en ciertas circunstancias se utilizan láminas de menor espesor. Por esta razón, algunos objetivos cuentan

con un collar de corrección, que mueve internamente las lentes para compensar esta variación, con un rango que puede ir de 0,11 a 0,23 mm (Fig. 3-54). Los objetivos de inmersión no tienen collares de corrección de las aberraciones de esfericidad.



**Fig. 3-54.** Células sanguíneas en extendido capturadas mediante un microscopio confocal a través de un objetivo 40x NA 0.95, con collar de corrección del espesor del cubreobjetos de 0.11 a 0.23 mm y DIC. De izquierda a derecha se observa el efecto causado por la corrección para cubreobjetos de espesor 0,11 mm, 0,14 mm, 0,17 mm, 0,20 mm y 0,23 mm.

La distancia de trabajo es aquella que separa la lente frontal del objetivo y la porción superior del cubreobjetos, cuando la muestra está en el foco (Fig. 3-55). En microscopía confocal, el límite de esta distancia se establece por debajo de la superficie del cubreobjetos. En la mayoría de los casos, la distancia de trabajo disminuye a medida que aumenta la magnificación y la NA. El valor de este parámetro no aparece en todos los objetivos y su presencia varía según el fabricante.



**Fig. 3-55.** La distancia de trabajo (WD) es la que establece la máxima separación permitida entre el objetivo y la muestra para no perder foco y resolución.

La rosca de montaje del objetivo debería estar dimensionada de acuerdo a los estándares de la Sociedad de Microscopía Real (del inglés, “*Royal Microscopical Society*” - RMS), que establece un diámetro de 20,32 mm para la compatibilidad universal. Sólo Olympus y Zeiss respetan esta norma. En la Tabla 3-2 se detallan las especificaciones de microscopios ópticos corregidos al infinito de los principales fabricantes del mercado.

**Tabla 3-2.** Características físicas de los objetivos de distintos fabricantes

Fabricante	Distancia focal de la lente del tubo (mm)	Distancia parafocal (mm)	Diámetro de la rosca (mm)
Leica	200	45	25,00
Nikon	200	60	25,00
Olympus	180	45	20,32
Zeiss	165	45	20,32

La mayoría de los objetivos fueron diseñados para trabajar con aire como medio entre éste y el cubreobjetos. Para alcanzar una  $NA > 1$ , el espacio ocupado por el aire deberá ser cubierto por medios de inmersión tales como el aceite, el agua y el glicerol. En los objetivos que así lo requieran, estará indicado el medio necesario. Los colores inscriptos en los objetivos identifican la magnificación y el medio de inmersión requerido. La Tabla 3-3 exhibe los códigos de color en los objetivos de los principales fabricantes del mercado.

Tabla 3-3. Códigos de color de los objetivos según su magnificación

Magnificación	Código de color	Magnificación	Código de color
0.5x	Sin color	20x	Verde
1x	Negro	25x	Turquesa
1.25x	Negro	32x	Turquesa
1.5x	Negro	40x	Celeste
2x	Marrón	50x	Celeste
2.5x	Marrón	60x	Azul Cobalto
4x	Rojo	63x	Azul Cobalto
5x	Rojo	100x	Blanco
10x	Amarillo	150x	Blanco
16x	Verde	250x	Blanco

Medio de inmersión	Código de color
Aceite	Negro
Glicerol	Naranja
Agua	Blanco
Especial	Rojo

En algunos objetivos se encuentra la inscripción FN y el número de campo (del inglés, "Field Number"). La inscripción FN 26.5 significa que cuando se utilice un ocular y un tubo que garanticen un campo visual de 26,5, el campo de visión real estará determinado por la división entre este número y la magnificación del objetivo y expresado en mm de diámetro. Por ejemplo, para un objetivo de 40x, el diámetro de campo visual será igual a  $26,5 / 40 = 0,66$  mm.

La distancia parafocal es otra especificación que varía de acuerdo al fabricante y se mide desde la lente posterior del objetivo (por debajo de la rosca), hasta la cara superior del portaobjetos (Fig. 3-55). Esta medida indica que el movimiento de revólver sólo requerirá de un ajuste fino del foco, ya que todos los objetivos presentes en él proyectan una imagen aproximadamente al mismo plano en el tubo de proyección. La distancia parafocal difiere entre los distintos fabricantes (Tabla 3-2). La parafoalidad reduce el tiempo de enfoque y evita el posible contacto de los objetivos más largos con el cubreobjetos, con lo que se impide el daño, tanto las lentes como de la muestra. La mayoría de los fabricantes también diseñan revólveres de objetivos paracéntricos, lo que significa que cuando la muestra se centra en el campo de visión de un objetivo, queda centrado para el próximo que se enfrente con la muestra al girar el dispositivo.

Dentro de los objetivos se encuentran las lentes, que se disponen en forma apareada en dobletes (dos lentes pegadas), tripletes (tres lentes pegadas) o de manera individual, en una determinada posición y con la correspondiente orientación. Esto no sólo da la magnificación del objeto observado, sino que de esto depende la corrección de las diferentes aberraciones, quedando implícita la modificación en la NA (Fig. 3-56).

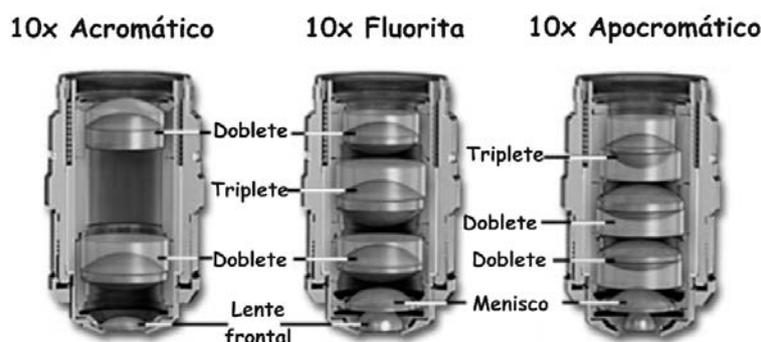
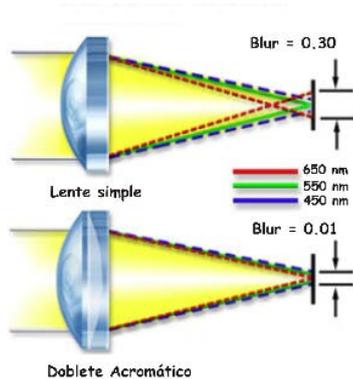


Fig. 3-56. La cantidad de lentes, su combinación en dobletes o tripletes y su ubicación dentro del tubo del objetivo, determinan el tipo de corrección del objetivo.

Las lentes frontales y los meniscos funcionan de forma sincrónica en la captura de los rayos de luz en objetivos con amplio NA, con un mínimo de aberración esférica. En general, los efectos de las aberraciones ópticas inducen a errores en las características de una imagen que se observa a través de un microscopio o que se transforma en imagen digital. Las lentes de los objetivos modernos están compuestas por vidrios formulados con tierras raras, con índices de refracción altamente específicos. Se logran así, lentes con muy baja dispersión, que corrigen la mayoría de las aberraciones ópticas más comunes como el astigmatismo, coma, distorsión geométrica, curvatura de campo y las aberraciones cromáticas y de esfericidad.

Las **aberraciones cromáticas** pueden ser longitudinales (axiales) y laterales. Las longitudinales son el resultado de los cambios en la distancia focal de las lentes ( $\Delta f$ ) a medida que cambia la longitud de onda de la luz. Cuando la luz pasa a través de una lente convexa, las diferentes ondas que la componen se refractan de acuerdo a su frecuencia y amplitud. La luz azul es la que más se refracta, seguida por la luz verde y la roja, fenómeno que comúnmente se conoce como dispersión.

Por lo general, el plano de la imagen se encuentra en foco nítido para una sola longitud de onda o para una banda estrecha de las mismas. Para las otras ondas, el plano focal permanece levemente desenfocado. La incapacidad de la lente para hacer converger todos los colores en un enfoque común hace que se formen imágenes de diferente tamaño y punto focal para cada longitud de onda predominante. En la porción superior de la figura 3-57 se ve el efecto de la dispersión sobre una lente simple. Dentro de los objetivos, se pueden agregar lentes en forma de doblete o triplete para ir corrigiendo este defecto (Fig. 3-57 abajo). El efecto que produce este tipo de error es la formación de un halo de color alrededor del objeto (Fig. 3-58).



**Fig. 3-57.** Corrección de la aberración cromática. El Blur (bruma, nubosidad o difuminación) es la distorsión física que se genera en la imagen por falta de corrección de la aberración cromática.



**Fig. 3-58.** La imagen de la izquierda fue obtenida con una lente acromática, mientras que la de la derecha fue capturada con una lente apocromática. Nótese la franja roja alrededor del pájaro y de la rama y el bajo contraste de la imagen izquierda. Si el fondo hubiese sido rojo, el halo de color sería verde o azul. La imagen de la derecha no muestra aberraciones. Obtenidas de: <http://www.company7.com/leica/telescopes/digiscopy.html>

Las lentes acromáticas están formadas, entonces, por dobletes que tienden a reducir a cero la aberración cromática. Esta forma simple de corrección permite que la imagen apunte a los 486 nm en la zona azul y a los 656 nm en la zona roja para poder coincidir en un solo punto. De esta manera, las lentes acromáticas, que se utilizan en los microscopios de rutina y que tienen el grosor, curvatura e índices de refracción y dispersión apropiados, presentan correcciones para las longitudes de onda del azul y del rojo, pero no para el verde u otras longitudes de onda intermedias. Si en la formulación de las lentes se agrega la fluorita, entonces la corrección del verde también es posible. Estas lentes se denominan semi-apocromáticas.

Para corregir todo el intervalo de longitudes de onda, desde el infrarrojo cercano (IR) al ultravioleta (UV), se diseñaron los objetivos apocromáticos, que constituyen la clase de mayor calidad y se los utiliza en los microscopios de investigación (campo claro, campo ampliado, confocal, etc.) (Fig. 3-59). Estos objetivos también están compuestos por tripletes para la corrección de aberraciones. A pesar de ello, en microscopía confocal con excitación UV de emisión en el rango visible (351 nm a 514 nm), aún las mejores lentes plano-apocromáticas no pueden asegurar una parafocalidad precisa.



Fig. 3-59. Lentes apocromáticas.

En las aberraciones cromáticas laterales, también llamadas diferencias cromáticas de aumento, si bien los tres colores principales son llevados a planos focales axiales idénticos, las imágenes puntuales que se encuentran cerca de la periferia del campo de visión no son del mismo tamaño. Esto se debe a la dispersión de los rayos fuera del eje (Fig. 3-53), lo que causa que las longitudes de onda componentes de la luz blanca formen imágenes a diferentes alturas sobre el plano focal de la imagen.

Dado que la magnificación es proporcional a la inversa de la distancia focal ( $1/f$ ), la misma variación del foco que produce que las diferentes longitudes de ondas enfoquen en distintos planos, con la consecuente aberración cromática axial, puede inducir a que la longitud de onda de la luz incidente cambie la magnificación, produciendo la aberración cromática lateral. En microscopía confocal, esta aberración puede inducir a que la luz de excitación retorne a una posición cercana o alejada del eje de localización aparente de la fuente, lo que conlleva a una merma en la intensidad de emisión a la altura del pinhole.

Actualmente, algunos microscopios utilizan la tecnología convencional que sigue las normas ISO, en las que el objetivo forma una imagen real en consonancia con un tubo de 160 mm; la distancia parafocal se determina a los 45 mm y la distancia desde la muestra hasta la formación de la imagen en el ocular es de 195 mm (Fig. 3-60). En los microscopios con tubo de proyección fija, la aberración cromática lateral se puede compensar con el ocular.

Los objetivos con óptica finita forman una imagen intermedia de manera directa. Los objetivos con óptica con corrección en el infinito, necesitan de una lente en el tubo para formar dicha imagen intermedia. La óptica con corrección al infinito presenta la gran ventaja de ser insensible a los componentes ópticos (filtros, analizadores, prismas DIC, etc.) que se encuentren en el espacio telescópico entre el objetivo y la lente del tubo (Fig. 3-53). Los haces infinitos o paralelos no se ven afectados por el grosor de la muestra o por el índice de refracción del material interpuesto entre esta y el objetivo, siempre que sean planos y paralelos. Por lo tanto, en los microscopios con óptica corregida al infinito, la aberración cromática lateral se puede corregir mediante la introducción de una cantidad fija de esta aberración en la lente del tubo de proyección que se utiliza para formar la imagen intermedia, a partir de la luz emanada del objetivo.

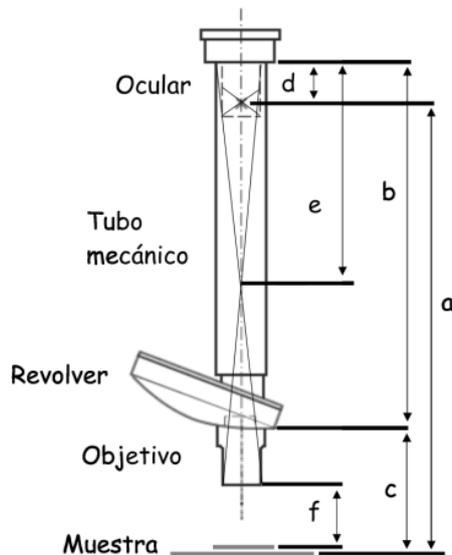


Fig. 3-60. Medidas estandarizadas de acuerdo a normas ISO de un microscopio convencional. a: Distancia de la muestra a la imagen (195 mm); b: Longitud del tubo mecánico (160 mm); c: Distancia de la muestra al objetivo (distancia parafocal) (45 mm); d: Distancia de la imagen intermedia del ocular (10 mm); e: Distancia desde la montura del ocular en el tubo monocular hasta la imagen intermedia; f: Distancia de trabajo (WD) del objetivo.

La **aberración de esfericidad** o **esférica** se produce cuando las ondas de luz que pasan a través de la periferia de la lente no llegan al foco en conjunto con aquellas que pasan por el centro. Es una deficiencia óptica axial, independiente de la longitud de onda de la luz incidente, generada por frentes de ondas no esféricas, producidas por el mismo objetivo o por el mal uso del mismo, el grosor inapropiado del cubreobjetos, modificaciones en la longitud del tubo del microscopio o la presencia de sustancias entre el objetivo y el plano focal, que tengan un índice de refracción inapropiado.

Las ondas que pasan cerca del centro de la lente se refractan ligeramente, mientras que aquellas que lo hacen cerca de la periferia se refractan en mayor grado, lo que resulta en la producción de diferentes puntos focales a lo largo del eje óptico. Este es uno de los artefactos de resolución más graves, ya que lejos de estar en foco, la imagen se desenfoca (Fig. 3-61). La aberración de esfericidad positiva se produce cuando los rayos de luz se desvían demasiado, mientras que se considera negativa si no se dispersan lo suficiente. Cuando los rayos toman la dirección apropiada no se observa aberración (Fig. 3-62).

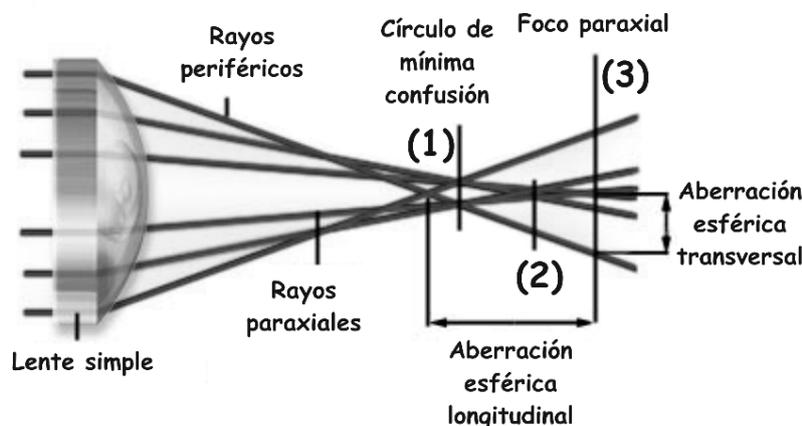


Fig. 3-61. Si se hace pasar la luz a través de una lente simple, se generan rayos centrales (paraxiales), medios y periféricos. La refracción de estos últimos es mayor que la de los otros. El punto focal de los rayos periféricos se produce en (1). Los rayos medios y paraxiales tienen sus puntos focales en los puntos (2) y (3), respectivamente. Esta divergencia de puntos focales da lugar a la aberración esférica o de esfericidad.

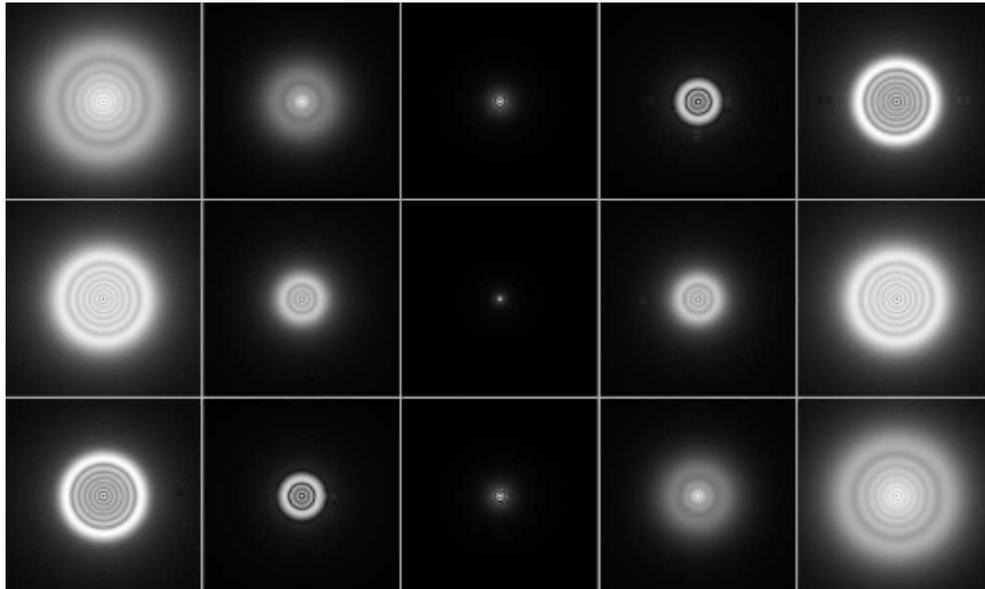


Fig. 3-62. Vista de una fuente puntual de luz, con aberración de esfericidad negativa (fila superior), nula (fila central) o positiva (fila inferior). Las imágenes de la izquierda están desenfocadas hacia el interior, mientras que las de la derecha las hacen hacia el exterior.

En este tipo de aberración, los rayos paraxiales tienen una longitud focal diferente a la de los periféricos, lo que produce una difuminación de la imagen que genera un cambio de intensidad asimétrica cuando se desenfoca en  $\pm \Delta Z$ . Entre las sustancias que modifican el paso óptico y originan las aberraciones de esfericidad, se encuentran los cambios en la concentración de sal, la temperatura y las diferencias en la estructura molecular.

En un microscopio óptico con objetivos de baja magnificación y baja NA, los pequeños cambios que modifiquen la longitud del tubo del microscopio conducirán a la obtención de imágenes de inferior calidad. Si bien la aberración esférica puede ser corregida hasta niveles inferiores a los perceptibles visualmente para todos los tipos de objetivos, esto es cierto sólo si se cumplen todas las especificaciones ópticas para cada lente. En las lentes que trabajan bajo inmersión en aceite, esta aberración puede ser difícil de modificar, ya que en todos los materiales el índice de refracción es una función de la longitud de onda y la temperatura. Si el espesor del cubreobjetos y la densidad del aceite se mantienen constantes, los distintos fabricantes pueden corregir las aberraciones de esfericidad para diferentes valores de longitud de onda. En objetivos con alta NA, la aberración esférica se corrige para un determinado número de longitudes de onda, pero sólo para un medio de inmersión. Para obtener el rendimiento recomendado, se debe utilizar el medio de inmersión para el cual se diseñó el lente o utilizar objetivos con collar de corrección de ajuste para diferentes medios. En los objetivos de alta NA, secos o de inmersión en agua, el punto más crítico para evitar el incremento de la aberración es el espesor del cubreobjetos, el que debe asegurarse en 0,17 mm.

En los objetivos que lo traen provisto, se puede mover el collar de corrección del espesor para evitar las aberraciones de esfericidad que se producen al utilizar cubreobjetos de distinto espesor a lo recomendado por el fabricante de objetivos (Fig. 3-63).

Existen otras distorsiones en la óptica de las lentes que se conocen como **aberraciones geométricas**. Estas incluyen a las aberraciones de **coma** o comáticas, que son similares a las esféricas, pero que se observan exclusivamente con haces de luz fuera de eje y son más severas cuando el microscopio está desalineado. En estos casos, un objeto puntual presenta la forma de cometa (de ahí el término de coma). Estos defectos se suelen corregir junto con las aberraciones esféricas.

Las aberraciones de **astigmatismo** son similares a las comáticas. Sin embargo, estos defectos no son tan sensibles al tamaño de apertura del objetivo y dependen en mayor medida del ángulo oblicuo del haz de luz. En una luz puntual, la aberración se manifiesta como una línea o una elipse que se corrige en forma conjunta con las aberraciones de curvatura de campo.

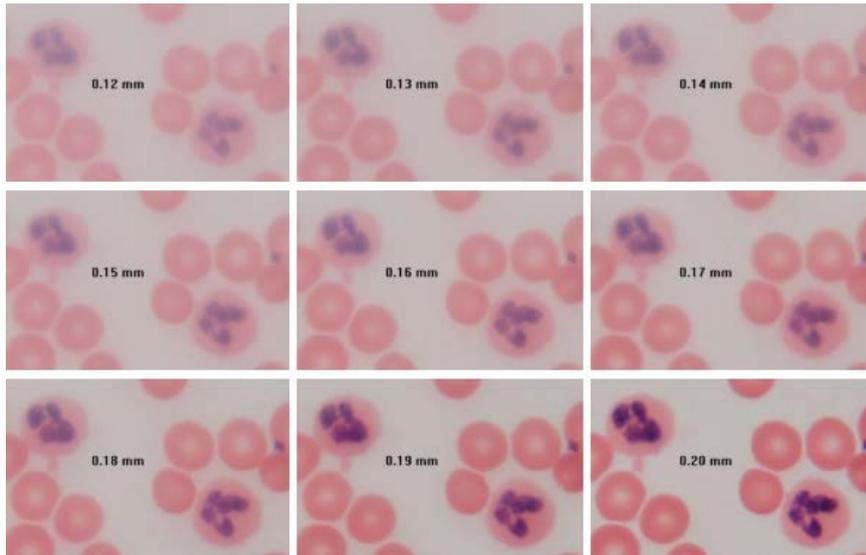


Fig. 3-63. Cuando se utilizan cubreobjetos de diferente grosor a lo recomendado en el objetivo, es necesario utilizar el collar de corrección del espesor para evitar las aberraciones de esfericidad. Estas se observan como nubosidades o como si estuvieran fuera de foco. Los números en mm expresan el rango de amplitud del anillo de corrección. En este caso, el espesor del cubreobjetos era de 0.20 mm.

La aberración de **curvatura de campo** es el resultado natural del uso de lentes que tienen superficies curvas. Cuando la luz visible se enfoca a través de una lente curvada, el plano de la imagen producida por esa lente también se curva. Los objetivos modernos corrigen esta aberración mediante la incorporación de lentes planas y debido a ello reciben el prefijo de “plan” o “plano”, siendo el tipo más común en la actualidad. Si un objetivo plano fue también corregido para la aberración cromática, se denominará plan o plano-acromático, plano-semi-apocromático o plano-apocromático. Actualmente también existen dispositivos plano-súper-apocromáticos que corrigen todas las aberraciones, además de transmitir la luz desde el infrarrojo al ultravioleta, tener mayor NA y corregir el foco infrarrojo. Sin embargo, es necesario aclarar que un objetivo “plano” no garantiza que se produzca una imagen perfectamente plana sin astigmatismo. La Tabla 3-4 muestra los distintos tipos de objetivos y sus correspondientes correcciones de aberraciones.

Tabla 3-4. Correcciones de las aberraciones en los objetivos

Objetivo	Aberración esférica	Aberración cromática	Aberración de curvatura de campo
Acromático	1 color	2 colores	No
Plano-Acromático	1 color	2 colores	Si
Semi-Apocromático	2-3 colores	2-3 colores	No
Plano SemiApocromático	3-4 colores	2-4 colores	Si
Plano-Apocromático	3-4 colores	4-5 colores	Si
SuperApocromático	5-6 colores	4-5 colores	Si

#### Apertura numérica

La apertura numérica (NA) de un objetivo es una medida de la capacidad de mismo para recoger la luz y, por lo tanto, de resolver los detalles finos de la muestra a una distancia fija del objetivo. La NA se calcula con la siguiente ecuación:

$$NA = n * (\sin \mu) \quad [3-2]$$

donde,  $n$  es el índice de refracción del medio existente entre la lente frontal del objetivo y el vidrio que cubre a la muestra;  $\mu$  es la mitad de la apertura angular del objetivo (Fig. 3-

64). Cuanto mayor sea  $\mu$ , mayor será la NA. Cuando el medio es aire, el valor máximo teórico de la NA = 1 ( $\mu = 90^\circ$ ), mientras que el límite práctico es NA = 0,95.

La NA de un objetivo también depende, en cierta medida, de la magnitud de la corrección de las aberraciones ópticas. Los objetivos que presentan mayor número de correcciones tienden hacia una NA más elevada, como se observa en la Tabla 3-5.

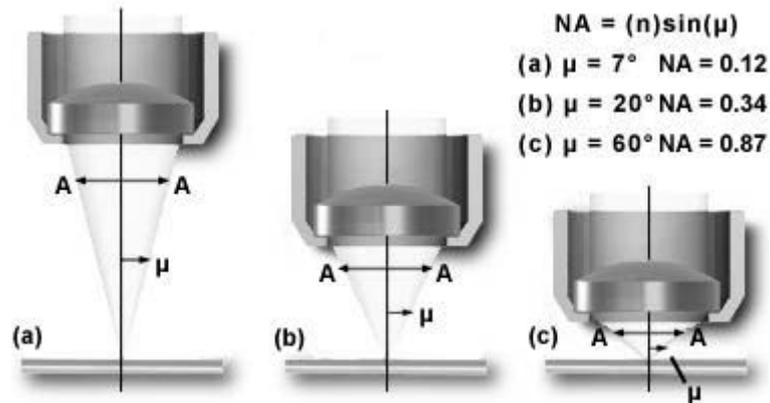


Fig. 3-64. Conos de luz derivados de los objetivos con diferente longitud focal y NA en un medio que contiene aire.

Tabla 3-5. Apertura Numérica (NA) de los objetivos

Magnificación	Plano Acromático (NA)	Plano-Semi-Apocromático (NA)	Plano Apo-cromático (NA)	Plano-Súper-Apocromático (NA)
0,5x	0,025	0,02	N/D	N/D
1,25x	0,04	N/D	0,04	N/D
2x	0,06	N/D	0,08	N/D
4x	0,10	0,13	0,20	0,16
10x	0,25	0,30	0,45	0,40
20x	0,40	0,50	0,75	0,75
40x	0,65	0,75	0,90	0,95
40x O <sup>#</sup>	N/D	1,30	1,00	N/D
60x	0,75	0,90	0,95	N/D
60x O <sup>#</sup>	N/D	1,25	1,42	1,35
100x O <sup>#</sup>	1,25	1,30	1,40	1,40
150x	N/D	N/D	0,90	N/D

N/D = no determinado; # O = inmersión en aceite.

Si bien la NA de un objetivo determina su poder de resolución, la resolución total de un sistema microscópico depende también de la NA del condensador. No obstante, no se puede considerar como un efecto absoluto ya que la misma resolución puede variar dependiendo del tipo de microscopio (luz transmitida, campo ampliado, confocal) y del espesor de la muestra. Otros factores como el bajo contraste de la luz y la iluminación inapropiada, pueden generar una menor resolución. La Tabla 3-6 lista las resoluciones y NA, de acuerdo a la magnificación del objetivo y sus correcciones.

Es necesario tener en cuenta que la magnificación no es un factor determinante en la resolución, como si lo son la NA y la longitud de onda de la luz incidente. Las longitudes de onda más cortas generan mayores resoluciones y viceversa. En microscopía óptica, el mayor poder de resolución se obtiene con luz cercana al ultravioleta. En cuanto a eficacia de resolución, la luz azul es menos eficiente que la ultravioleta, le sigue la verde, siendo la roja la menos eficiente. La luz que se utiliza para la determinación de la resolución es la que corresponde a los 550 nm (luz verde), ya que la vista humana es más sensible a esta frecuencia. El efecto de la variación de la longitud de onda sobre la resolución, manteniendo fija la NA puede verse en la Tabla 3-7.

Tabla 3-6. Resolución de los objetos dependiente del tipo de objetivo

Magnificación	Plano-Acromático		Plano-Semi-Apocromático		Plano-Apocromático		Plano-Súper-Apocromático	
	NA	R (μm)	NA	R (μm)	NA	R (μm)	NA	R (μm)
4x	0,10	2,75	0,13	2,12	0,20	1,37	0,16	2,10
10x	0,25	1,10	0,30	0,92	0,45	0,61	0,40	0,84
20x	0,40	0,69	0,50	0,55	0,75	0,37	0,75	0,45
40x	0,65	0,42	0,75	0,37	0,95	0,29	0,95	0,37
60x	0,75	0,37	0,85	0,32	0,95	0,29	1,35	0,24
100x	1,25	0,22	1,30	0,21	1,40	0,20	1,40	0,24

R = resolución

Tabla 3-7. Resolución en función de la longitud de onda

Longitud de Onda (nm) *	Resolución (μm)	Longitud de Onda (nm) *	Resolución (μm)
360	0.19	550	0.29
400	0.21	600	0.32
450	0.24	650	0.34
500	0.26	700	0.37

\* Calculado a una NA fija de 0.95

#### Patrón de Airy

Como fuera establecido en el Capítulo 1, la difracción de la luz crea un patrón circular alrededor de un punto central denominado patrón de Airy. El límite óptico debido a la difracción puede calcularse de manera empírica a partir del criterio de Rayleigh. En teoría, un microscopio óptico tiene una resolución espacial máxima de 200 nm. Esta resolución está íntimamente relacionada con la longitud de onda de la fuente luminosa, el espesor de la muestra, la calidad de la fijación y la intensidad de la coloración, pero también depende de la NA del objetivo y del condensador del microscopio. En la resolución lateral, el espacio mínimo que se puede resolver en una grilla de líneas periódicas esta dado por:

$$d_{min} = \frac{1,22 * \lambda}{[NA_{Obj} + NA_{Cond}]} \quad [3-3]$$

donde,  $d_{min}$  se expresa como la distancia lateral en el espaciado de la muestra; 1,22 es una constante derivada de un cálculo de la posición del primer anillo de oscuridad que rodea al disco de Airy central. Este factor se utiliza con la intención de aproximar la habilidad del ojo humano para distinguir dos fuentes puntuales de luz, cuyos discos de Airy se superponen;  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz emitida y  $NA_{Obj}$  y  $NA_{Cond}$  es la apertura numérica del objetivo o del condensador, respectivamente. En términos generales, la resolución espacial de un microscopio es igual a la mitad de la longitud de onda de la luz, es decir 250 nm. Por su parte, la resolución de un microscopio electrónico es 1000 veces mayor (0,2 nm).

Cuando la NA del condensador se ajusta a la del objetivo, es decir, cuando la apertura del condensador es esencialmente la misma que la del objetivo, la ecuación se simplifica a:

$$d_{min} = \frac{0,61 * \lambda}{NA_{Obj}} \quad [3-4]$$

Un método complementario para definir el límite de resolución consiste en utilizar objetos puntuales, como las partículas fluorescentes nanométricas (qdots), en lugar de grillas de líneas periódicas. La imagen enfocada de estos puntos diminutos genera un patrón de difracción de Airy con el centro luminoso y discos concéntricos oscuros y claros a su

alrededor, que progresivamente se van haciendo más débiles. El radio del primer disco oscuro que rodea al disco central del patrón de Airy depende de la longitud de onda de la luz emitida y la NA del objetivo y se expresa como:

$$r_{Airy} = \frac{0,61 * \lambda}{NA_{Obj}} \quad [3-5]$$

donde,  $r_{Airy}$  indica la distancia en el plano de la muestra.

Asimismo, esta medida se puede determinar en el plano axial. En este caso, la distancia desde el centro del patrón de difracción 3D hasta el primer axial mínimo (expresado en dimensiones de espacio del objeto) se calcula en base a:

$$Z_{min} = \frac{2\lambda\eta}{(NA_{Obj})^2} \quad [3-6]$$

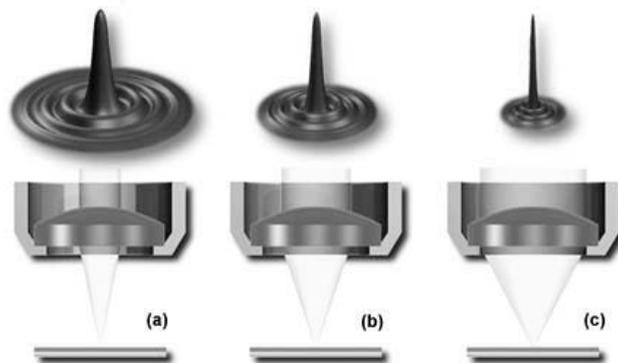
donde,  $\eta$  es el índice de refracción del medio,  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz y  $Z_{min}$  se corresponde con la distancia que hay que levantar el objetivo del microscopio para enfocar la primera intensidad mínima observada a lo largo del eje del patrón de difracción 3D, en lugar del máximo valor central del foco.

Al igual que con la resolución lateral, el valor de  $Z_{min}$ , que mide objetos puntuales en lugar de una grilla periódica, se puede utilizar para medir el límite de resolución axial de la óptica microscópica. Sin embargo, a medida que  $Z_{min}$  se estrecha de manera inversamente proporcional a  $(NA_{Obj})^2$ , el límite de resolución lateral se estrecha solamente con la  $NA_{Obj}$ . Por lo tanto, la relación resolución axial:resolución lateral dada por:

$$\frac{Z_{min}}{r_{Airy}} = \frac{3,28\eta}{NA_{Obj}} \quad [3-7]$$

que es sustancialmente mayor que la longitud de onda de la luz e inversamente proporcional a la  $NA_{Obj}$ .

Cuanto más pequeño sea el disco de Airy proyectado por un objetivo para la formación de la imagen, mayor cantidad de detalles de la muestra se harán perceptibles. Los objetivos con mayores correcciones de las aberraciones (fluorita y apocromático) producen discos de Airy más reducidos que aquellos con menores correcciones. De manera similar, los objetivos que tienen una NA mayor también son capaces de producir discos de Airy más pequeños. Esta es la razón principal por la que las lentes objetivos de mayor NA y corrección total de las aberraciones ópticas (súper-Apocromáticos) pueden distinguir los detalles más finos en la muestras (Fig. 3-65).



**Fig. 3-65.** Se ilustra el efecto de la NA en el tamaño de los discos de Airy, mediante una serie de objetivos hipotéticos con la misma distancia focal, pero que difieren en la NA. A medida que aumenta la NA y el ángulo del cono de luz [de (a) a (c)], se reduce el tamaño del disco de Airy y con ello aumenta la resolución de la muestra.

La profundidad de campo de un microscopio, es aquella en la que la imagen aparece en foco al mover el tornillo micrométrico. Está determinada por la distancia desde plano focal más cercano al objeto, hasta el plano en foco más alejado (Fig. 3-66). Este valor se mide a lo largo del eje óptico (axial) del microscopio y se expresa en unidades de distancia (micrómetros). En un microscopio de luz, esta distancia debería coincidir con la resolución axial, al menos en teoría. Sin embargo, ésta se ve influenciada por [1] la extensión geométrica y la difracción limitada por encima y por debajo del plano focal de la luz emitida por un punto sencillo dentro de la muestra; [2] la acomodación del ojo del observador y [3] la magnificación final de la imagen. El segundo factor desaparece si la imagen es “visualizada” a través de la cámara de video, mientras que el tercer factor también debería desaparecer cuando la magnificación final fuera lo suficientemente grande ya que de esta manera, la unidad de difracción de la imagen se volvería más grande que la resolución de los fotosensores del detector.

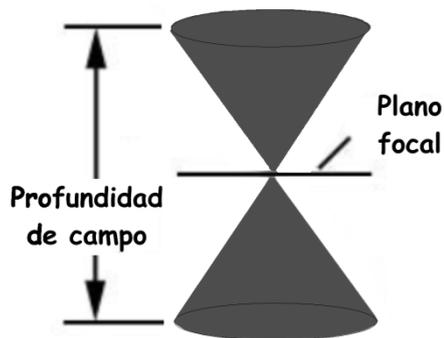


Fig. 3-66. El cono de luz que se genera a partir de la muestra es dependiente de la difracción de la luz, la acomodación del ojo del observador, la magnificación final de la imagen y del NA del objetivo.

Para que la unidad de difracción de la imagen sea mayor a la resolución de los fotosensores del detector, la separación de los elementos debe ser al menos dos veces más fina que el radio del disco de Airy. Cuando se toma sólo la difracción limitada, la profundidad de campo se puede calcular como:

$$\delta = \frac{1}{4} (Z_{min+} - Z_{min-}) \quad [3-8]$$

es decir, un cuarto de la distancia entre la primera axial mínima por encima ( $Z_{min+}$ ) y por debajo ( $Z_{min-}$ ) del máximo central en el patrón 3D del disco de Airy, expresado en unidades de distancia.

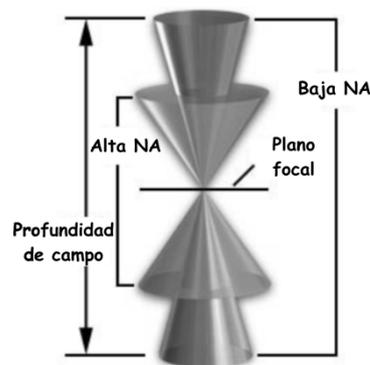


Fig. 3-67. La profundidad de campo o resolución axial del objetivo está en íntima relación con la NA. A mayor NA, menor profundidad de campo y viceversa.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la NA del objetivo también es un factor fundamental para la determinación de la profundidad de campo, ya que a medida que aquella y la magnificación del objetivo aumentan, disminuye este valor, así como la distancia de trabajo (Fig. 3-67). Esta es la razón por la cual los objetivos con alta capacidad de resolución sólo son utilizados para estudios de microscopía confocal y otras técnicas microscópicas.

picas avanzadas, donde se llega al límite de resolución del microscopio. Por lo tanto, para aquellos estudios donde la resolución de las muestras es menos crítica y donde se pueden utilizar magnificaciones menores, es preferible utilizar objetivos con NA menores, pero con la posibilidad de obtener una mayor distancia de trabajo y mayor profundidad de campo.

En un microscopio de fluorescencia de campo ampliado, la luz emitida por un punto produce suficiente intensidad significativa que alcanza distancias considerables, por encima y por debajo del plano focal, por lo que en estos sistemas es difícil determinar la profundidad de foco. Por su parte, en un sistema confocal, la luz difractada tiende a eliminarse y, por lo tanto, la luz del objeto puntual tiende a limitarse al espacio correspondiente a la resolución axial del microscopio.

### Criterio de Rayleigh

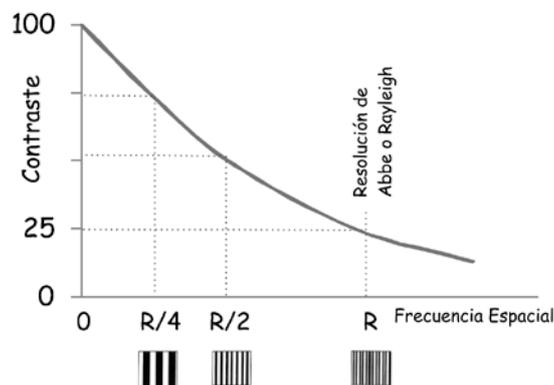
Cuando existen dos puntos de luz separados por una pequeña distancia  $[d]$  en el plano de la muestra, la difracción de la imagen se esparce hacia los lados en el plano focal. La imagen de dos puntos de igual intensidad estará resuelta si  $[d]$  es menor o igual al radio del disco de Airy. Este es el criterio de Rayleigh, también llamado límite de Abbe, y se basa en la asunción que las dos fuentes puntuales irradian luz de manera incoherente. Si la luz se irradiara de manera que dos puntos de una onda guardaran una relación de fase constante y el valor de uno predijese el del otro (coherencia), lo que debería considerarse sería su amplitud en lugar de la distribución de la intensidad, ya que la resolución generalmente disminuye.

El criterio de Rayleigh también establece que para un objeto puntual brillante expresado sobre un fondo oscuro, el mínimo contraste que permite visualizar el objeto, es del 25%. De acuerdo con la figura 3-68, el contraste de la imagen es proporcional a aquel del objeto, degradada por la función de transferencia del contraste o espectro de potencia (del inglés, “*Contrast Transfer Function*” – CTF o “*Power Spectrum*”), en el sistema óptico. Asimismo, el contraste de los elementos pequeños que se encuentran dentro de los límites de resolución, es menor a aquel de los elementos grandes.

El contraste se puede definir como la diferencia entre la señal en un píxel y aquella en otro, que transmite al observador la información acerca de la forma de la muestra. Es la diferencia en la intensidad de la señal entre las distintas partes de una imagen o entre el objeto de interés y el fondo. Matemáticamente, se puede definir como la variación en la intensidad de la imagen, dividida por su valor promedio:

$$\gamma = \frac{\Delta I}{\bar{I}} \quad [3-9]$$

donde,  $\gamma$  es proporcional a la diferencia de intensidad ( $\Delta I$ ) entre dos áreas de la imagen, dividida por el brillo promedio de la imagen ( $\bar{I}$ ).



**Fig. 3-68.** Función de transferencia del contraste (CTF). El gráfico muestra cómo el contraste de un objeto de la imagen se relaciona inversamente con su tamaño. El espaciado menor entre las barras blancas y negras significa una mayor frecuencia espacial (gráficas inferiores) y aparecerán menos contrastadas dentro de la imagen que en el objeto muestreado.

En microscopía confocal, el contraste deriva de diferencias en la forma en que los diversos sub-volumenes de la muestra (vóxeles) interactúan con la iluminación. Esta interacción puede incluir la absorción lineal y no lineal, la fluorescencia simple o multifotónica, emisión Raman, fluorescencia espectral, decaimiento fluorescente, refracción, reflexión, polarización, dispersión, generación de armónicos, etc.

Para la producción de una imagen, el contraste es tan esencial como la resolución y ambos están relacionados por la CTF. Esta función es una medida fundamental para la caracterización de la información de la capacidad de transmisión de cualquier sistema óptico. Consiste en un gráfico que describe el contraste que producen los objetos en una imagen, en función de su tamaño o la inversa de su tamaño, es decir, su frecuencia espacial. Si bien en biología los patrones regulares con una determinada periodicidad de presentación, que se expresan en valores/unidad métrica o 1/valores periódicos por unidad métrica, no se ven con mucha asiduidad, cualquier imagen puede ser considerada como un conjunto de puntos que presentan diferentes intensidades o como una colección de espacios y orientaciones.

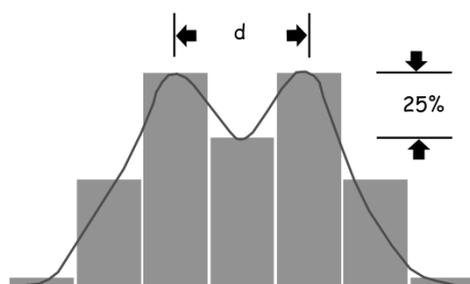
La CTF grafica el contraste de la imagen, asumiendo que cada objeto tiene el 100% del mismo (compuesto por barras blancas y negras alternadas, con una variedad de diferentes periodicidades). En un microscopio, sin embargo, el contraste del material biológico es de menor porcentaje. La intensidad de la CTF en la frecuencia espacial cero, es una medida del brillo promedio de toda la imagen.

Dadas las limitaciones impuestas por la difracción, el contraste de las barras más anchas, cuya frecuencia espacial es cercana al cero, será cercano al 100%, mientras que aquellas que están muy cercanas unas de otras, es decir, aquellas que tienen una frecuencia espacial cercana al límite de difracción, serán registradas con menor contraste dentro de la imagen.

De la figura 3-68 se desprende que el criterio de resolución de Rayleigh es la frecuencia espacial en el cual la CTF del sistema óptico desciende hasta aproximadamente un 25%. En general, los objetos que doblen el tamaño del límite de Rayleigh ( $R/2$  o la mitad de la frecuencia espacial), serán transmitidos con un poco menos del doble del contraste ( $\sim 50\%$ ), y así sucesivamente para objetos más grandes.

Si se utiliza un objetivo con una elevada apertura numérica ( $NA = 1,4$ ) que produce una resolución de Rayleigh o límite de Abbe ( $R$ ) de  $\sim 0,25 \mu\text{m}$ , significa que los puntos que estén a la izquierda de la marca  $R/4$  describirán la forma en la que el sistema óptico registrará todos los objetos mayores a  $1 \mu\text{m}$  ( $R/4$ ), mientras que si se encuentran a su derecha, tomará en cuenta los objetos menores a dicha medida.

El cálculo de la resolución de Rayleigh asume que dos objetos puntuales de intensidad similar se representan en la imagen como discos de Airy, separados, de manera que el pico de cada uno se localice sobre el primer anillo del patrón de Airy del otro. Si se grafica la intensidad de luz de los dos discos sumados, el histograma de la imagen mostrará un valle entre estos. El fondo matemáticamente exacto de este valle, se correspondería con el 25% de la intensidad del pico. De aquí surge el concepto acerca de que el 25% del contraste es igual al criterio de Abbe. Bajo estas circunstancias, el menor espacio resoluble se define como la distancia entre el centro del disco de Airy y aquel de su primer disco oscuro. Para poder muestrearlo, los píxeles deben ser más chicos que la mitad de esta distancia, es decir, que se debe considerar un tamaño de píxel que represente a la mitad de la resolución basada en el criterio de Abbe del sistema óptico (Fig. 3-69).



**Fig. 3-69.** Muestreo de Nyquist de una imagen de dos puntos separados por la resolución de Rayleigh ( $d$ ). Los límites muestran el 25% correspondiente a la CTF para esta imagen.

En síntesis, la CTF puede ser utilizada para determinar cuál sería el mejor contraste a obtener de una muestra bajo determinadas condiciones de longitud de onda de la luz incidente y NA del objetivo utilizado. Esta función se puede utilizar para determinar, no sólo las condiciones del sistema óptico sino también las del sistema de detección (cámara de video) y el sistema de almacenamiento de la imagen (analógica o digital).

El contraste de la imagen se produce por la interacción entre los haces de luz incidentes y la muestra. Existen diversas maneras de seleccionar física o digitalmente la señal incidente. Así, es posible discriminar longitudes de onda específicas a través del uso de cubos de fluorescencia con diversos filtros y espejos dicróicos. Las diferentes NA de los objetivos producen distintos contrastes de las superficies que se están observando. Por su parte, la luz polarizada puede ser utilizada para obtener un contraste producido por la birrefringencia de la muestra.

Si la interacción ente la luz y la muestra es esencialmente de absorción y la muestra tiene un espesor uniforme y delgado, la luz incidente  $I_0$  se transmitirá como  $I_1$  e  $I_2$ , cuando no atraviese ningún objeto o lo haga, respectivamente (Fig. 3-70 izquierda). Estas intensidades pueden ser representadas a través de las ecuaciones:

$$I_1 = I_0 e^{-\mu_1 x} \quad [3-10]$$

$$I_2 = I_0 e^{-\mu_2 x} \quad [3-11]$$

donde,  $\mu_1$  y  $\mu_2$  son los coeficientes de absorción del pasaje a través de la muestra sin estructuras o con ellas, respectivamente;  $X$  es la longitud del camino de absorción (el espesor del vóxel). Tomando en cuenta la ecuación [3-9], el contraste producido por la absorción se puede representar como:

$$\gamma_{abs} = \frac{\Delta I}{\bar{I}} = \frac{I_1 - I_2}{\bar{I}} \quad [3-12]$$

Sin embargo, en las muestras reales, los objetos de interés son más chicos que el espesor de la muestra (Fig. 3-70 derecha). En este caso, el coeficiente de absorción efectivo para una determinada luz incidente es:

$$\mu_T = \sum_{i=1}^m \mu_i \quad [3-13]$$

donde,  $\mu_T$  es el coeficiente de absorción asociado con la atenuación de la luz a lo largo del camino específico de la misma, que describe una muestra con capacidad de absorción, compuesta por  $m$  subunidades diferentes, en las que cada una tiene su propio coeficiente de absorción ( $\mu_i$ ).

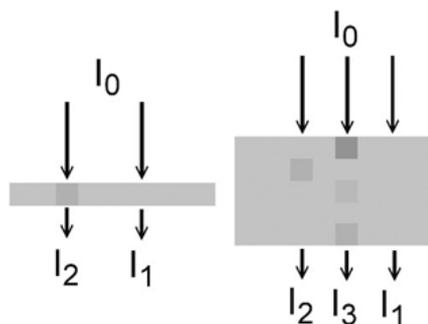


Fig. 3-70. Muestras hipotéticamente delgada (izquierda) y gruesa (derecha), compuestas de una matriz absorbente de luz, con un coeficiente de absorción  $m_1$ , conteniendo pequeñas estructuras, con un coeficiente de absorción  $m_2$ . Las intensidades de transmisión de la matriz y sus estructuras se representan por  $I_1$ ,  $I_2$  o  $I_3$ .

Al igual que con muestras fijas, el contraste de la imagen en la microscopía de muestras biológicamente activas se degrada a medida que el objetivo enfoca más profundamente dentro del tejido. Las reflexiones interfaciales de los diferentes componentes celulares incrementan la degradación del haz de luz conforme éste atraviesa las distintas células.

Más aún, cuanto más profundo se enfoque, el “sustrato” existente entre el plano focal y el objetivo se vuelve más heterogéneo y por lo tanto, mayor será la degradación del rendimiento óptico del microscopio.

En la microscopía de fluorescencia de campo ampliado, la imagen detectada incluye señal tanto de los fotones emitidos en el punto focal como por fuera de él hasta una cierta distancia. Esto produce, por lo general, una imagen que contiene mucha “bruma” y carece de contraste. Dado que la neblina formada es proporcional al espesor y la densidad de tinción de la muestra, este tipo de microscopía provee mejores resultados cuando las muestras de tejidos son delgadas o se observan células de cultivo. Por su parte, en las imágenes confocales, las señales de los objetos que están fuera de foco son casi completamente removidos, resultando en una imagen con un elevado contraste.

Los mecanismos de contrastes pueden ser ópticos, geométricos, biológicos o químicos y sintéticos. Si bien son mecanismos independientes, varios de ellos se pueden producir de manera simultánea. Los contrastes **geométricos** se obtienen mediante el uso de sistemas microscópicos como el TIRF, o de diferentes técnicas fluorescentes como FRET, FLIM, FRAP y FLIP, mencionadas anteriormente. El contraste **estructural** es aquel producido por efecto de los procesos biológicos o químicos, donde se observa la generación de segundas (SHG) o terceras (THG) señales armónicas. Las SHG, se producen cuando dos fotones con frecuencia  $\omega$  se destruyen y, simultáneamente, crean un fotón con frecuencia  $2\omega$ , en un proceso de mecánica cuántica simple. Dado que la SHG es sensible a la orientación relativa entre la polarización de la luz incidente y la condición de simetría del material, la señal de esta armónica se puede utilizar para proporcionar información sobre la orientación de los cristales, su estructura molecular y determinar las regiones en las que el centro de simetría se rompe, tales como las superficies e interfaces ópticas.

La producción de THG compromete un proceso en el que tres fotones con frecuencia  $\omega$  se destruyen para crear un fotón con frecuencia  $3\omega$ . Este tipo de proceso es útil para la captura de imágenes provenientes de muestras transparentes con bajo contraste intrínseco y es sensible a los cambios en las propiedades ópticas no lineales de la muestra, tales como interfaces entre medios con distintos índices de refracción. Es importante remarcar que tanto la absorción no lineal (fluorescencia) como la generación de armónicas, pueden ocurrir simultáneamente en la misma muestra.

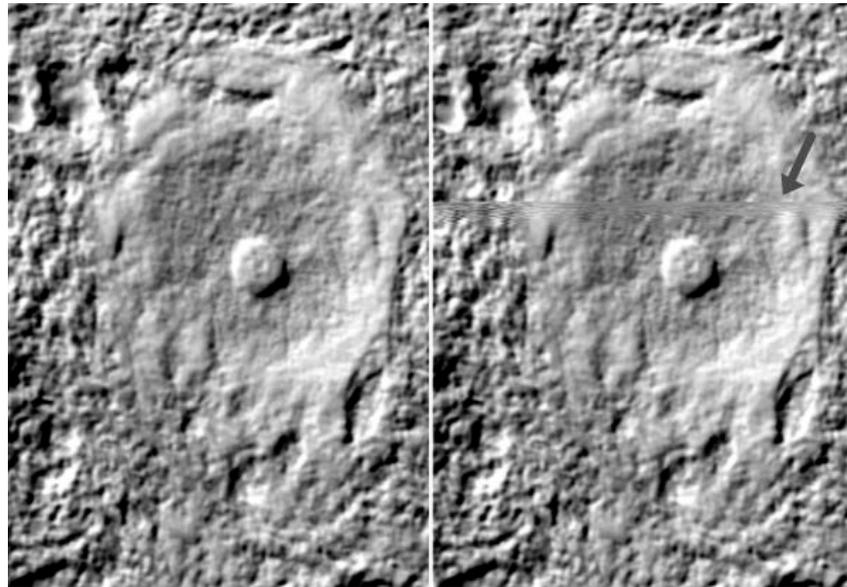
La birrefringencia también produce un contraste de tipo estructural. Existen diversas estructuras biológicas que lo son, tales como los microtúbulos y las microfibrillas y por lo tanto, pueden ser visualizadas mediante técnicas de polarización de la luz. La polarización convencional utiliza dos polarizadores cruzados por encima y por debajo de la muestra para lograr la extinción de fondo y permitir que el material birrefringente aparezca como sombras grises sobre un fondo negro. Existen colorantes, como el Sirius red, que al presentar esta propiedad exagera su color sólo en aquellos sitios donde se encuentren fibras de colágeno (Fig. 3-12).

El contraste **sintético** o **derivado** es el que se produce por la combinación de factores intrínsecos y extrínsecos combinados. La fluorescencia es un fenómeno intrínseco, en donde los fluoróforos excitados emiten en una determinada longitud de onda. Sin embargo, para que exista el mejor contraste entre la marca y el entorno, se debe recurrir a procesos extrínsecos que mejoren el aspecto de la señal. Uno de dichos procesos es la deconvolución, la que se verá con mayor detalle en el Capítulo 4.

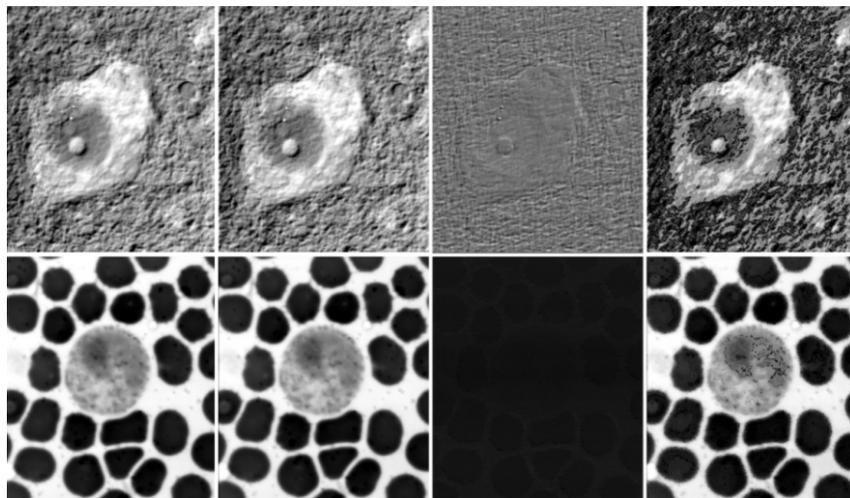
El contraste también se puede modificar de manera artificial. Las vibraciones producidas por el sistema de escaneo en un microscopio confocal o las provenientes del exterior al sistema pueden tener un efecto negativo sobre el contraste de la imagen, ya que modifican la posición de la muestra con respecto al plano focal del objetivo (Fig. 3-71). La interposición de una mesa anti vibratoria que sostenga al microscopio de captura puede resolver esta situación. Es necesario, sin embargo, evitar que la caja que contienen los láseres se encuentre sobre la misma mesada, ya que la vibración del sistema de enfriamiento podría producir interferencia.

La interferencia de la luz del cuarto donde se encuentra el microscopio también es otro proceso artificial que puede influir sobre la imagen obtenida. La luz ambiente dispersada por la muestra y que entra en el sistema de detección, puede modificar el contraste dinámico del fondo, es decir, puede variar la relación entre la luminancia del color más brillante (ten-

dencia al blanco), con el más oscuro (tendencia al negro) que pueda producir el sistema de detección. Para comprobar las diferencias de iluminación entre ambos ambientes sólo es necesario recurrir a la resta matemática o la aplicación de un operador lógico (Fig. 3-72).



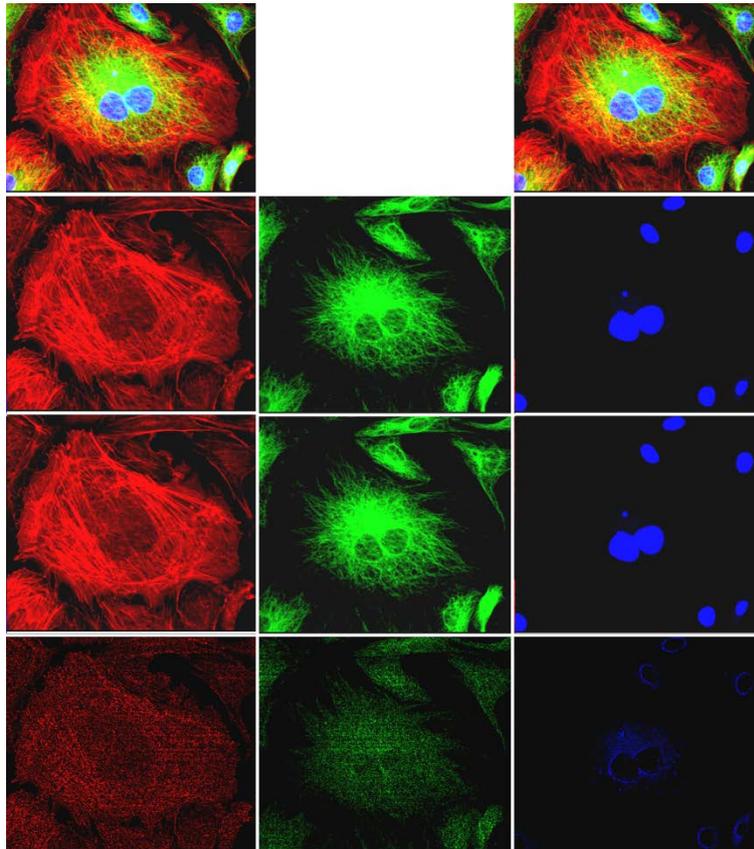
**Fig. 3-71.** Neurona teñida con el colorante violeta de cresilo, capturada con un microscopio confocal al ser excitada por un láser de 405 nm, mediante la técnica de contraste de interferencia diferencial (DIC). La flecha en la imagen derecha muestra el efecto de una vibración inducida sobre la mesa en la que apoyaba el microscopio. La diferencia en la profundidad a partir de la vibración fue de  $0,25 \mu\text{m}$ .



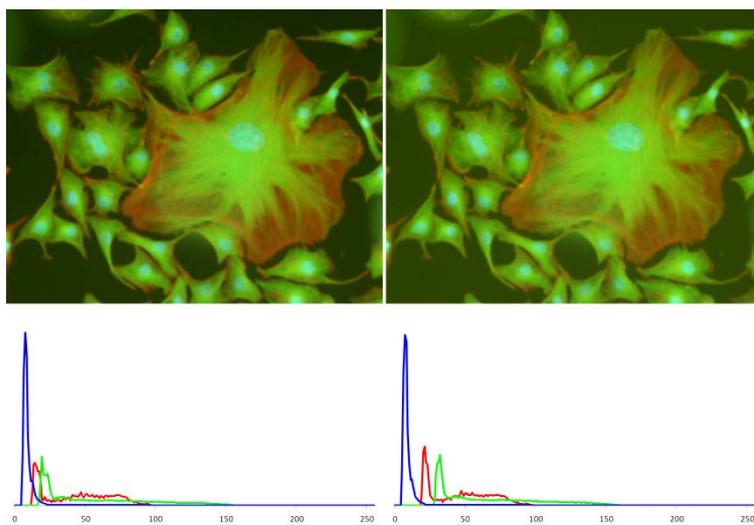
**Fig. 3-72.** Diferencias entre imágenes confocales capturadas en la oscuridad o con luz ambiente. La fila superior muestra neuronas no fluorescentes capturadas con un objetivo 40x NA 0.95 y DIC y excitadas con un láser de 405 nm. La fila inferior muestra células sanguíneas en extendido, capturadas con un objetivo 40x NA 0.95 y excitadas con el mismo láser. La primera columna de la izquierda muestra las imágenes capturadas en un ambiente oscuro, donde la única luz visible era la emitida por los monitores y los LEDs indicadores de actividad de los equipos. En la segunda columna se observan las imágenes capturadas en un ambiente iluminado con dos tubos fluorescentes de 40W y una lámpara incandescente de 75W. Las dos últimas columnas representan la resta y la aplicación del operador AND, respectivamente, entre las imágenes de la primera y la segunda columna.

Cuando las muestras fluorescentes son capturadas con un microscopio confocal (Fig. 3-73), si bien el efecto puede no interceder mayormente con la visualización de los objetos, esta interferencia puede resultar deletérea en aquellos casos en que sea necesario medir la intensidad de marcación, fundamentalmente cuando ésta se encuentre en pequeñas canti-

dades o sea muy débil. Sin embargo, si la muestra es capturada con un microscopio de fluorescencia de campo ampliado (Fig. 3-74), las diferencias son tan marcadas que modifican completamente el contraste de la muestra.



**Fig. 3-73.** Diferencias entre imágenes confocales capturadas en la oscuridad o con luz ambiente. La fila superior muestra células fluorescentes (Texas Red; Bodipy FL; DAPI), capturadas con un objetivo 40x NA 0.95 en un ambiente oscuro (izquierda) o totalmente iluminado (derecha). La segunda y tercera filas muestran cada uno de los canales en forma separada, tomados en total oscuridad o en el ambiente totalmente iluminado, respectivamente. La cuarta fila resulta de la resta matemática entre las dos filas precedentes.



**Fig. 3-74.** Diferencias entre imágenes fluorescentes capturadas con un microscopio de fluorescencia de campo ampliado, en la oscuridad o con luz ambiente. La fila superior muestra la imagen compuesta, en un ambiente oscuro (izquierda) o totalmente iluminado (derecha). La fila inferior muestra los histogramas correspondientes a cada uno de los canales de las imágenes de la fila superior.

### Criterio de Nyquist

Como se mencionara en el Capítulo 1, el teorema de Nyquist toma en consideración la cantidad de píxeles que es necesario disponer en la imagen para que dos objetos ubicados en el límite de la resolución espacial, puedan seguir siendo identificados como tales. De acuerdo con Nyquist, la frecuencia de muestreo debe ser al menos dos veces superior al objeto en estudio, para datos no periódicos. Siendo que un punto se representa a través de su disco de Airy, el mismo debería estar representado por 4 o 5 píxeles que pasen a través del diámetro del primer anillo del patrón de Airy.

La figura 3-75 ejemplifica el criterio de Nyquist. En la parte superior de cada uno de los cuatro cuadrantes (A, B, C, D), se representa un patrón periódico de líneas blancas y negras apareadas (patrón analógico). Los cuadrantes A y C muestran una alineación geométrica distinta a la de los cuadrantes B y D, que se desplazan media línea hacia la derecha o la izquierda. Con un intervalo de muestreo de dos píxeles por par de líneas (cuadrantes A y B) por medio del CCD de la cámara digital, la imagen digital puede resolver (cuadrante A) o no (cuadrante B) el par de líneas analógicas. Este resultado sólo depende de la alineación geométrica entre la muestra y la cámara. Con un intervalo de muestreo de tres píxeles (cuadrantes C y D), el par de líneas analógicas se pueden resolver, independientemente de la alineación geométrica. Con muestras reales, la representación mediante dos píxeles debería ser suficiente.

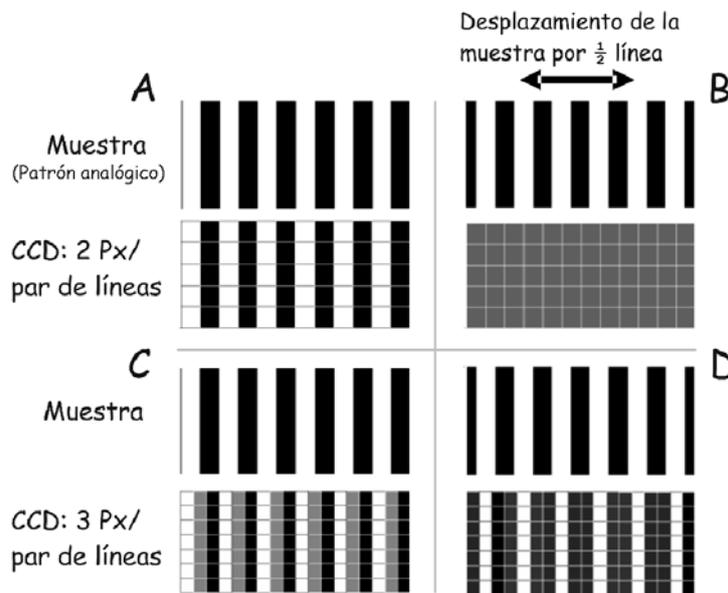


Fig. 3-75. Representación digital de un patrón de líneas pares (analógicas) ubicadas en la porción superior de cada cuadrante, obtenidas mediante una cámara CCD con dos píxeles por línea (A y B) o 3 píxeles por línea (C y D).

A modo de ejemplo, el criterio de Nyquist se expresa de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$R * M = 2 * \text{Resolución del CCD} \quad [3-14]$$

donde,  $R$  es la resolución óptica del objetivo;  $M$  es el aumento resultante en el sensor de la cámara (CCD), que se calcula multiplicando aquel del objetivo por el del adaptador de la cámara.

Si se trabaja con un objetivo 10x Plano Apocromático con una  $NA = 0,4$  y el valor promedio de la longitud de onda de la luz que ilumina la muestra es  $\lambda = 550 \text{ nm}$ , la resolución óptica del objetivo será:

$$R = \frac{0,61 * \lambda}{NA} = 0,839 \quad [3-15]$$

Es decir, de acuerdo con este ejemplo, se requiere de una distancia mínima de  $0,839 \mu\text{m}$  para ver dos objetos como tales. Suponiendo además, que la magnificación del adaptador de cámara es de  $1x$ , la resultante de la multiplicación por la magnificación del objetivo será:

$$M = 1 * 10x = 10x \quad [3-16]$$

De aquí se desprende que, para establecer el tamaño del área a muestrear hay que multiplicar los resultados de las ecuaciones [3-15] y [3-16]:

$$R * M = 0,839 \mu\text{m} * 10 = 8,39 \mu\text{m} \quad [3-17]$$

Por lo tanto, en esta configuración, existe una distancia mínima de  $8,39 \mu\text{m}$  que debe ser muestreada a través de la cámara. Para determinar la cantidad de líneas necesarias de muestreo se recurre a la ecuación:

$$\frac{1}{8,39} = 119 \text{ líneas/mm} \quad [3-18]$$

Finalmente, el tamaño del fotosensor resulta de dividir el tamaño del CCD de la cámara, por el número de sus fotodiodos (resolución de la cámara). Un CCD de  $\frac{1}{2}$  pulgada tiene un tamaño de  $6,4 \text{ mm} * 4,8 \text{ mm}$ . Por lo tanto, la cantidad necesaria de píxeles en la imagen para que este CCD cumpla con el criterio de Nyquist de 2 píxeles por patrón será:

$$\text{Nyquist} = \frac{1}{R * M * \text{tamaño del CCD} * 2} \quad [3-19]$$

Para el ejemplo en cuestión:

$$\begin{aligned} 119 \text{ líneas/mm} * 6,4 \text{ mm} * 2 &= 1526 \text{ píxeles (columnas) y} \\ 119 \text{ líneas/mm} * 4,8 \text{ mm} * 2 &= 1145 \text{ píxeles (filas)} \end{aligned}$$

Si se desea muestrear a razón de 3 píxeles por línea, la resolución de la imagen deberá ser de  $2289 \times 1717$  píxeles, para la misma área escaneada.

Para tener una apreciación gráfica de lo descrito, la figura 3-76 muestra como se puede representar una señal analógica por medio de píxeles, de manera de obtener un patrón similar al original. En este gráfico se observa que la frecuencia de muestreo óptima, es decir, la cantidad de píxeles necesaria para construir una imagen digital, se determina haciendo coincidir la resolución del dispositivo de captura con la del programa utilizado para visualizar la imagen. Para esto se necesita generar un número suficiente de píxeles por muestreo que representen a la imagen original de manera confiable.

Cuando la imagen analógica es muestreada de manera inadecuada, se pueden perder gran cantidad de detalles. En la figura 3-76 se observa que esta señal tiene una distribución de intensidad continua. Cuando se captura la imagen digital con 32 muestras (píxeles), la señal resultante retiene la mayoría de las características de intensidad y de frecuencia espacial de la muestra original. Cuando la frecuencia de muestreo se reduce, la señal original se pierde durante la digitalización. Este fenómeno se conoce como distorsión (del inglés, “aliasing”), ya que se producen alteraciones escalonadas en las líneas curvas y diagonales. Cuando el aliasing es extremo (gráfico D), se introducen datos espurios de baja frecuencia que no existían en la muestra analógica.

Como se describirá al hablar de los diferentes equipos de captura, los fotomultiplicadores que operan en los microscopios confocales pueden modificar el tamaño del píxel al momento de capturar la imagen por efecto de la manipulación del zoom, a diferencia de las posibilidades estáticas de las cámaras digitales de modificar el tamaño de sus fotosensores. En los microscopios confocales, si bien el incremento del zoom cambia el área de escaneo de la muestra, generalmente no lo hace por variación en el número de píxeles. Consecuentemente, el tamaño del píxel es inversamente proporcional al factor de zoom. Sin embargo,

esto no cambia el hecho que para un sistema óptico dado, solamente un tamaño de píxel y, consecuentemente, un solo factor de zoom, acuerdan con el criterio de Nyquist. Con un zoom que provea píxeles de menor tamaño, la información del objeto se puede sobremuestrear, lo que puede llevar por un lado, al fotoblanqueo de la muestra, y por el otro, a que sólo una pequeña porción de la misma se pueda escanear en un determinado espacio temporal. Por su parte, cuando los píxeles son más grandes que lo establecido para cumplir el criterio de Nyquist, los elementos pequeños pueden llegar a desaparecer completamente, mientras que otros pueden llegar a aparecer, debido al fenómeno de aliasing.

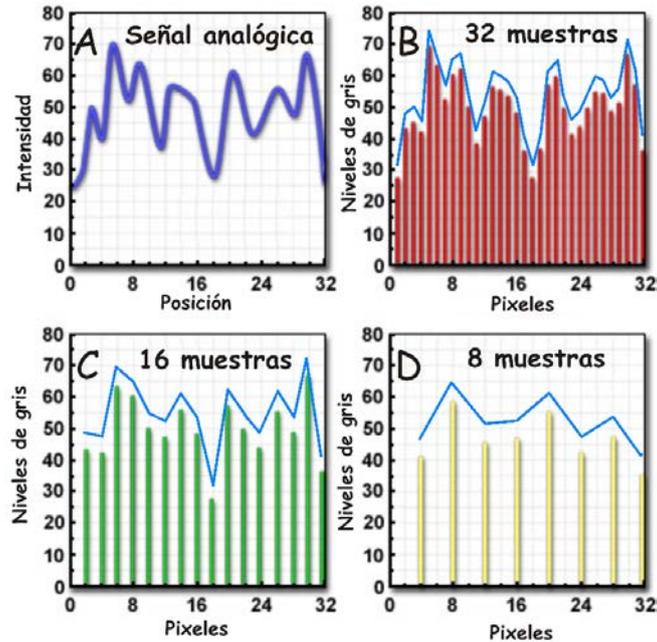


Fig. 3-76. Frecuencia de muestreo digital a partir de una muestra analógica. Los gráficos B a D muestran la representación digital de la imagen analógica (A). Las líneas azules superpuestas sobre los gráficos digitales indican el grado de representatividad de la imagen analógica.

El límite de la resolución óptica en el plano XY está determinado por la ecuación de Airy [3-5]. Esto implica que por cada longitud de onda y objetivo utilizados existe un zoom óptimo. De la misma manera, el intervalo de muestreo en las imágenes 3D debe ser idealmente inferior a la mitad de la resolución Z. Si se toman 200 nm como valor típico de la  $r_{\text{Airy}}$  para un objetivo de alta resolución con una NA de 1,4, entonces se necesita un ancho de píxel igual a  $200/2,3$  (Nyquist) = 80 nm para muestrear el objeto de manera apropiada en el plano XY. Por su parte, el intervalo en Z para las mismas condiciones ópticas debería ser 3 veces mayor (240 nm). Esto significa que la representación de un punto tendrá siempre 5 píxeles de ancho y 5 planos en profundidad (125 vóxeles).

Para calcular el tamaño de un píxel dentro de una imagen, basta con medir en micrómetros el ancho de una imagen, preferiblemente correspondiente a la de una regla micrométrica, y dividir ese valor por la cantidad de píxeles en la línea.

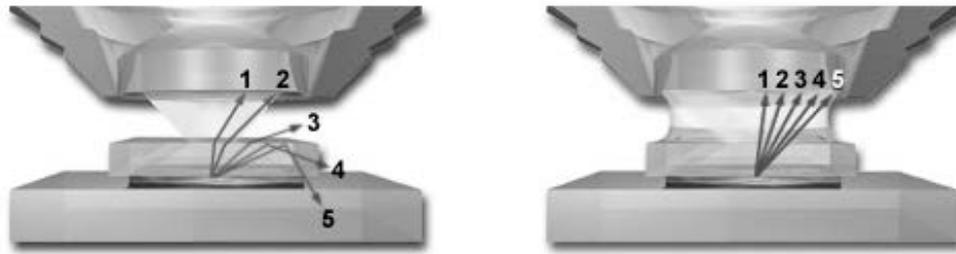
### Medio de inmersión

La capacidad que tiene un objetivo de microscopio para capturar los haces de luz que se desvían a partir de una muestra es dependiente, tanto de la NA del mismo, como del medio a través del cual viaja la luz. De acuerdo a la ecuación [3-2], la NA es directamente proporcional al índice de refracción del medio interpuesto entre el cubreobjetos y la lente frontal del objetivo, así como al seno de la mitad de la apertura angular del objetivo. Dado que  $\mu$  no puede ser mayor a 90°, la máxima NA posible estará determinada por el índice de refracción del medio de inmersión.

La mayoría de los objetivos trabaja sin la interposición de un medio de inmersión. Es decir, en el espacio entre la lente frontal del objetivo y el cubreobjetos sólo se encuentra aire. A este tipo de lentes se las denomina “secas”. El aire tiene un índice de refracción de

$n = 1,0003$ . Por su parte, para el agua  $n = 1,33$ , para la glicerina  $n = 1,47$ , mientras que para el aceite  $n = 1,515$ .

El principio de los medios de inmersión se describe en la figura 3-77. Si en el espacio indicado sólo hay aire, los haces de luz individuales que atraviesan la muestra pasan hacia el objetivo o se refractan en otras direcciones. En un espacio conteniendo medio de inmersión, la tendencia está dirigida a capturar la mayor cantidad de haces de luz. Por lo general, los objetivos de inmersión están corregidos para varias aberraciones de la luz. Su NA puede llegar hasta 1,40 cuando se los utiliza con un aceite de inmersión con adecuada dispersión y viscosidad. Estos objetivos permiten la mayor apertura del diafragma del condensador de luz, con lo que se extiende la iluminación de la muestra y se aumenta la resolución microscópica.



**Fig. 3-77.** En el esquema de la izquierda se ilustra un objetivo seco con cinco rayos (1-5) que pasan a través de la muestra cubierta por el cubreobjetos, en un microscopio directo. Estos haces son refractados en la interfase cubreobjetos-aire y sólo los dos más próximos al eje óptico del microscopio (haces 1 y 2) tienen el ángulo apropiado para entrar en la lente frontal del objetivo. El tercer haz se refracta en un ángulo aproximado de  $30^\circ$  con respecto al cubreobjetos y no entra en el objetivo. Los dos últimos haces (4 y 5) se reflejan internamente hacia el cubreobjetos y, junto con el tercer haz, contribuyen con las reflexiones internas de luz sobre las superficies de vidrio, que tienden a degradar la resolución de la imagen. Cuando el aire se sustituye por el aceite del mismo índice de refracción del vidrio (esquema derecho), los haces de luz pasan directamente a través de la interfaz vidrio-aceite sin desviarse por efecto de la refracción. De esta manera, se incrementa la NA por un factor de  $n$  correspondiente al aceite.

Un problema que se genera con muchos aceites de inmersión convencionales es su propiedad de absorción en la región ultravioleta del espectro (aproximadamente por debajo de los 375 nm). Sin embargo, esto no afecta al resto de la luz del espectro visible. La absorción ultravioleta de la glicerina es despreciable, y por ello, bajo estas circunstancias, se podría utilizar este medio de inmersión. De igual manera, se pueden producir inconvenientes en el infrarrojo (por encima de los 700 nm). El único medio apropiado para este rango de luz es el aceite de parafina. Esta sustancia tampoco absorbe por debajo de los 350 nm. El aceite de parafina tiene una  $n = 1,48$ .

Un factor que suele pasarse por alto cuando se utilizan objetivos de inmersión en aceite de alta NA, son las limitaciones impuestas al sistema por el condensador de luz. Cuando se utiliza un objetivo con  $NA = 1,40$  y un condensador de menor NA, la NA total del sistema se limita a la de este último. Los condensadores modernos tienen la posibilidad de corregir su valor de NA en un rango de 1,0 a 1,4, para aprovechar al máximo las características del objetivo. En un sistema ideal, debería colocarse aceite de inmersión no sólo entre el cubreobjetos y la lente frontal del objetivo, sino además, entre la lente del condensador y el portaobjetos.

Para la observación de células vivas, cuyo índice de refracción es  $n = 1,35$ , y que se encuentran en un medio salino con una  $n = 1,33$ , lo ideal es utilizar objetivos de inmersión en medio acuoso. El uso de objetivos de inmersión en aceite para observar células vivas es problemático debido a las diferencias de índice de refracción entre el medio formador de imágenes acuoso y el vidrio de la lente frontal del objetivo. Asimismo, el uso de lentes secas con largas distancias de trabajo también tiene el inconveniente de las reflexiones de la luz proveniente del medio líquido donde se encuentran las células, lo que produce el oscurecimiento del detalle de las mismas.

## Condensador

La función del condensador es recoger la luz proveniente de la fuente de luz del microscopio y concentrarla en un cono que ilumine la muestra con una intensidad uniforme sobre la totalidad del campo visual. Es sumamente crítico que el cono sea ajustado debidamente, para optimizar la intensidad y el ángulo de luz que penetra en la lente frontal del objetivo (Fig. 3-78).

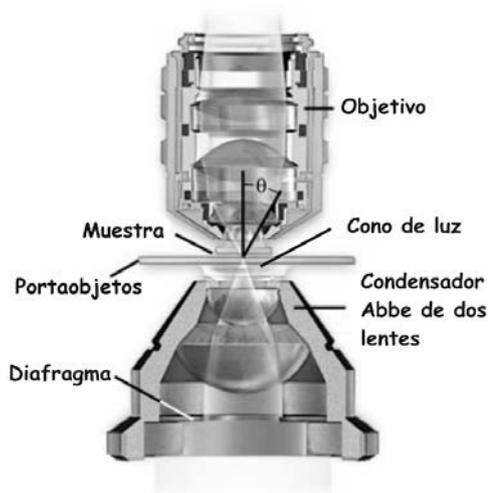


Fig. 3-78. Formación del cono de luz, luego de su paso por el condensador de tipo Abbe.

Al cambiar de objetivo se debería realizar un ajuste en el condensador para proporcionar el cono de luz adecuado a su NA (Fig. 3-79). Cuando el diafragma de apertura del condensador se abre demasiado, la luz difusa generada por la refracción de los haces de luz oblicuos provenientes de la muestra puede causar encandilamiento y reducir el contraste.

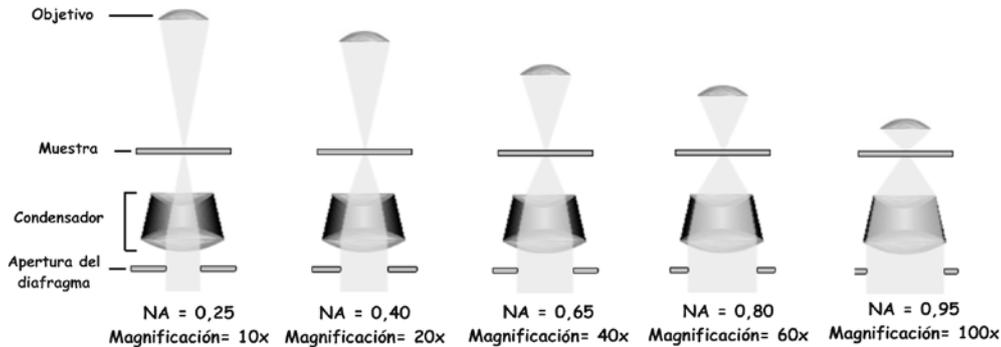


Fig. 3-79. A medida que aumenta la magnificación del objetivo se va expandiendo el ángulo de apertura del cono de luz producido por el condensador. Este cono también está en relación con la apertura óptima del diafragma para cada magnificación de objetivo. La NA del sistema microscópico surge del tamaño y el ángulo del cono de luz que genera el condensador.

Existen distintos tipos de condensadores, divididos de acuerdo a su propósito (campo claro, campo oscuro, contraste de fase, etc.), así como a su grado de corrección óptica. El más sencillo es el de tipo Abbe, que puede contener dos o más lentes internas y llegar a una NA de 1,4 pero que no corrige aberraciones de esfericidad ni cromáticas. Las imágenes producidas por este condensador no son muy claras y están rodeadas de un halo azul y rojo. Se usa exclusivamente en microscopios de rutina para diagnóstico.

Los condensadores **acromáticos** están compuestos por 3 o 4 lentes y sólo corrigen las aberraciones cromáticas producidas por las longitudes de onda del rojo y del azul. Su máxima NA es de 0,95 y por lo tanto, sólo pueden ser utilizados con lentes secas en microscopios de rutina o de análisis. Los condensadores **aplanáticos** corrigen sólo las aberraciones de esfericidad (longitud de onda verde) y pueden alcanzar una NA de 1,40. Normalmente cuentan con 5 lentes y son capaces de enfocar la luz en un solo plano. Son

ideales para la captura de imágenes monocromáticas en sistemas ópticos con iluminación láser o halógena.

El mayor nivel de modificación se consigue con los condensadores acromáticos/aplanáticos que corrigen ambos tipos de aberraciones. Son ideales para la captura de imágenes color. La máxima NA de estos condensadores es de 1,38 que se logra con 8 lentes internas (2 dobles cementados y 4 lentes simples) (Fig. 3-80).



Fig. 3-80. Condensador acromático/aplanático.

Los condensadores que superan la NA de 0,95 resultan más eficientes si se les adiciona una gota de aceite de inmersión sobre la lente frontal. Esto hace que los haces que emergen oblicuos desde el condensador ingresen de manera directa en la muestra.

No es práctico utilizar un único condensador para todos los objetivos (0,5x a 100x) debido a la amplia gama de conos de luz que deben producirse para que coincida con la NA de los objetivos. Para objetivos de 1.25x a 5x, el cono de iluminación debe tener un diámetro entre 6-10 mm, mientras que en los de 60x a 100x se necesita un cono de luz altamente concentrado de sólo 0,2 a 0,4 mm de diámetro. Con una longitud focal fija, es difícil lograr que un solo condensador tenga esta amplia gama de conos de iluminación. Para ello, existen condensadores que presentan una lente rebatible por sobre el cuerpo principal. Con bajas magnificaciones (por debajo de 10x), se rebate la lente, mientras que con altas magnificaciones, la lente debe estar interpuesta en el camino óptico para su mejor aprovechamiento.

Para realizar técnicas microscópicas especiales (campo oscuro, contraste de fase, etc.) existen condensadores que, además de las características mencionadas, permiten la incorporación de diafragmas de interposición de luz, apropiados para cada técnica.

De la misma manera que el espesor del cubreobjetos es esencial para los objetivos, el espesor del portaobjetos lo es para el condensador. La mayoría de los portaobjetos comerciales tiene un espesor que varía entre los 0,95 mm y 1,20 mm, siendo los más comunes aquellos de 1 mm. Los portaobjetos de 1,20 mm no son apropiados para los condensadores con alta NA que tienen una distancia de trabajo muy corta. Si bien pueden ser utilizados en microscopios de rutina, no son aptos para el posterior análisis de las imágenes.

### Filtros del microscopio

Si la intensidad de luz del microscopio debe permanecer fija, ésta puede resultar demasiado brillante al realizar la observación con diferentes aumentos. La aplicación de filtros de microscopio no sólo puede reducir la intensidad de la luz emitida sino que además, puede hacer que los colores se vean diferentes (Fig. 3-81).

En microscopía óptica, existen filtros de luz que solamente reducen la intensidad. Estos son los llamados filtros de densidad neutra (filtros ND) o filtros grises neutros, y se denominan según la luz que transmitan. Así, un filtro ND50 dejará pasar el 50% de la intensidad de luz, mientras que un ND25 reducirá la intensidad al 25%, sin cambiar los colores. Si el por el contrario, se altera el espectro de la luz, se trata de filtros de color. Existe una enorme variedad de filtros de color disponibles, pero aquí sólo se mencionarán aquellos conocidos como filtros balanceadores de luz diurna (filtros LBD). Estos filtros se usan en conjunción con la fuente de luz halógena para compensar la sobre-distribución de las longitudes de onda largas (rojas). Esto permite que, al realizar microscopía de campo claro, se puedan observar los colores del corte histológico sobre un fondo blanco neutro.

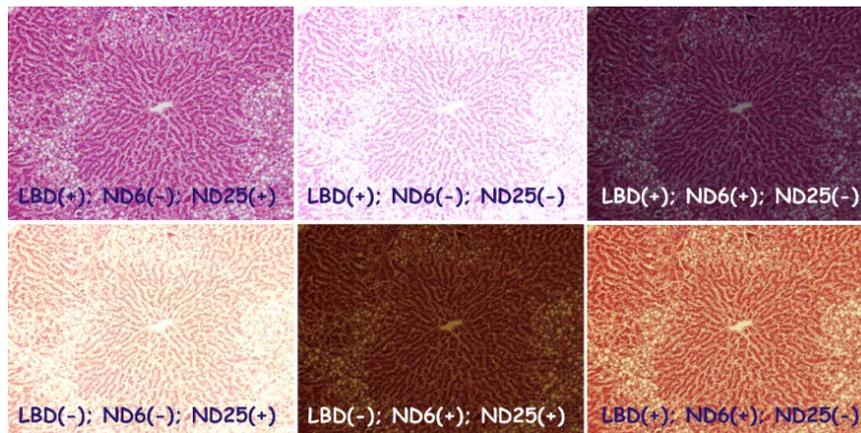


Fig. 3-81. Manteniendo los parámetros de la cámara de manera fija, se puede observar que la aplicación de diversos filtros del microscopio no sólo cambia la intensidad de la luz sino además, la percepción de los colores. La ausencia de filtros genera una imagen saturada de luz, mientras que la aplicación de todos los filtros genera una imagen completamente oscura (estos dos extremos no se muestran en la figura). LBD: filtro balanceador de luz diurna. ND: filtro de densidad neutra. (+) Filtro aplicado; (-) Filtro no aplicado.

### Oculares

Si bien la tendencia actual es reemplazar los oculares del microscopio por un sistema donde una cámara de video, interpuesta en el camino óptico, se conecte con la computadora o un monitor, pasará mucho tiempo hasta que desaparezcan estos dispositivos.

Los oculares trabajan en combinación con los objetivos para magnificar la imagen intermedia, de manera tal que los detalles de las muestras puedan verse con facilidad. Esto se debe a que los oculares se encuentran cerca del punto focal del objetivo. La magnificación final dependerá de la distancia focal del ocular, que es aquella que se encuentra entre el centro óptico de la lente y el foco o punto focal cuando se enfoca al infinito. Para una lente convergente o convexa, la distancia focal es positiva y se define como aquella que va desde el eje central de la misma hasta donde un haz de luz de rayos paralelos que la atraviesa se enfoca en un punto único (Fig. 3-53 y Fig. 3-61). Para una lente divergente o cóncava, la distancia focal es negativa y se define como aquella que existe entre el eje central de la misma y un punto imaginario del cual parece emerger la luz que pasa a su través.

Al igual que los objetivos, los oculares también llevan inscripciones en su superficie para indicar sus características particulares. En la figura 3-82 se observa un ocular entero y un corte sagital del mismo mostrando las características externas e internas, respectivamente. También se inscribe la magnificación de las lentes. Los más comunes son de 10x y 15x (si bien existen magnificaciones de 6.3x a 25x). La denominación H/26.5 indica el número de campo, que se refiere al diámetro (en mm) del diafragma fijo presente en el ocular.



Fig. 3-82. Inscripciones externas del ocular y corte sagital mostrando el interior del mismo.

Las inscripciones de la superficie pueden contener letras que hacen referencia a la amplitud de campo del ocular: WF (del inglés, “Wide Field”) o WH; SW (del inglés, “Super Widefield”) y SWH o UWF (del inglés, “Ultra Widefield”). En algunos casos aparece la letra H o el símbolo de gafas, para indicar un elevado punto focal que permite usar anteojos mientras se están viendo las muestras.

Algunos oculares también tienen un ajuste de enfoque y un tornillo o punto de fijación, que lo mantiene fijo en el tubo ocular del cabezal del microscopio. Algunos, también vienen provistos de cubiertas de goma que permiten, por un lado, acomodar la posición de los ojos a una distancia apropiada de la lente frontal, y por otro, evitar la reflexión de la luz de la habitación sobre la superficie de la lente, lo que puede interferir con la vista del observador.

Existen dos tipos principales de oculares que se agrupan de acuerdo a la disposición de las lentes y el diafragma: los negativos, que presentan el diafragma entre las lentes y los positivos, cuyo diafragma se encuentra por debajo de la lente de campo (Fig. 3-83).



Fig. 3-83. Ocular positivo (izquierda) y negativo (derecha).

Los oculares negativos, también llamados Huygenianos, cuentan con dos lentes: la superior u ocular, que se encuentra más cercana al ojo del observador y la inferior o de campo, que se ubica por debajo del diafragma. Ambas lentes orientan sus convexidades hacia la muestra. Modelos más sofisticados presentan dobletes y tripletes. Tanto las lentes oculares como las de campo pueden contener aberraciones, pero estas se cancelan entre sí. Este tipo de oculares se utilizan en los microscopios de rutina.

Los oculares positivos o de tipo Ramsden, presentan lentes plano-convexas cuyas convexidades se enfrentan. Estos oculares ubican el diafragma por debajo de la lente de campo, lo que los hace elegible para el montaje de retículas (reglas micrométricas, plantillas estereológicas, etc.) sobre los mismos. De esta manera, el observador puede hacer el análisis morfométrico o estereológico sin la necesidad de capturar las imágenes.

Los rayos de luz que emanan del ocular se deberían cruzar en el punto ocular del observador para tener todo el campo de visión que permita la lente. Este punto se encuentra, por lo general, de 8 a 10 mm por debajo de la lente ocular. Al aumentar la magnificación del dispositivo, dicho punto se traslada más cerca de la superficie superior de la lente, lo que resulta más difícil para la observación, especialmente si está usando gafas. Este defecto se corrige con la incorporación de lentes que le permitan mantener al observador una distancia de 20 a 25 mm por encima de la lente ocular.

El número de campo determina la amplitud real del campo de visión del objeto utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Diámetro de Visión} = \frac{FN}{M(O) * M(T)} \quad [3-20]$$

donde,  $FN$  es el número de campo expresado en mm;  $M(O)$  es la magnificación del objetivo y  $M(T)$  es el factor de magnificación de la lente del tubo del microscopio (si la tuviera). Para un ocular WF con  $FN$  22, objetivo de 20x y sin lente del tubo, el diámetro real de visión es de  $22 / (20 \times 1) = 1,1$  mm. En la Tabla 3-8 se registran los diámetros de visión real, utilizando este tipo de ocular con distintas magnificaciones de objetivos.

Tabla 3-8. Diámetros de visión real utilizando un ocular WF 10x con FN 22 y sin lente de tubo

Objetivo	Diámetro de visión (mm)
0,5x	44,00
1,25x	17,60
4x	5,50
10x	2,20
20x	1,10
40x	0,55
60x	0,37
100x	0,22

Los oculares se deben seleccionar luego de elegir los objetivos a incorporar al microscopio, para asegurar una magnificación óptima de la muestra sin la necesidad de incorporar artefactos. Para lograr una magnificación final de 200x, se puede utilizar un ocular de 20x con un objetivo de 10x. Sin embargo, esta magnificación también se obtiene cuando se acopla un ocular de 10x con un objetivo de 20x. La NA de este último puede ser de 0,75, mientras que la de un objetivo 10x es de 0,30. En este caso, la combinación ocular 10x y objetivo 20x es preferible.

El rango de magnificación útil de una combinación ocular/objetivo se define por la NA del sistema. Existe una magnificación mínima necesaria para que se puedan resolver los detalles presentes en una imagen. Este valor se establece arbitrariamente como de 500 veces la NA ( $500 \times NA$ ). Por su parte, la máxima magnificación útil se suele establecer en 1000 veces la NA ( $1000 \times NA$ ). Magnificaciones superiores a este valor no producen una resolución más fina de los detalles de la imagen y, por lo general, conducen a la degradación de las mismas. La Tabla 3-9 lista las combinaciones ocular/objetivo más comunes, que se encuentran en el rango de aumento útil.

Tabla 3-9. Rango de magnificación útil (500-1000 x NA del objetivo)

Objetivo	NA	Oculares				
		10x	12.5x	15x	20x	25x
2,5x	0,08	N	N	N	S	S
4x	0,12	N	N	S	S	S
10x	0,35	N	N	N	S	S
25x	0,55	N	S	S	S	N
40x	0,70	S	S	S	N	N
60x	0,95	S	S	S	N	N
100x	1,42	S	S	N	N	N

S = Combinación útil; N = Combinación sin utilidad

Exceder el límite de aumento útil resulta en un fenómeno conocido como “magnificación vacía”, donde el incremento de magnificación obtenido en el ocular o en la lente del tubo intermedio sólo hace que la imagen se vea más ampliada, sin el correspondiente aumento en la resolución de los detalles.

### Platina

Todos los microscopios cuentan con una platina, que es el lugar donde se deposita el portaobjetos que contiene la muestra que se quiere observar. La mayoría de las platinas utilizadas en los distintos tipos de microscopios están equipadas con un sistema mecánico de desplazamiento, que permite mover la muestra en sentido vertical (eje Y), horizontal (eje X) o angular (Fig. 3-84).

Por lo general, las platinas son rectangulares y presentan una traba o tornillo que les permite fijar la posición en un ángulo de hasta 90° con respecto a la horizontal. Si bien la mayoría de las platinas presenta los tornillos de desplazamiento del lado derecho, también las hay con mando del lado izquierdo. El orificio central del dispositivo permite el ingreso

de la luz proveniente del condensador para que impacte sobre la muestra, la atraviese y siga su camino hacia el objetivo. Las marcas graduadas de localización, posicionadas en la parte mecánica, le permiten al observador señalar la ubicación de puntos que considere relevantes dentro de las muestras, pudiendo retornar fácilmente a los mismos. También existen platinas circulares, utilizadas fundamentalmente para la observación de muestras geológicas, ya que se desplazan en sentido giratorio de 360° (Fig. 3-85).

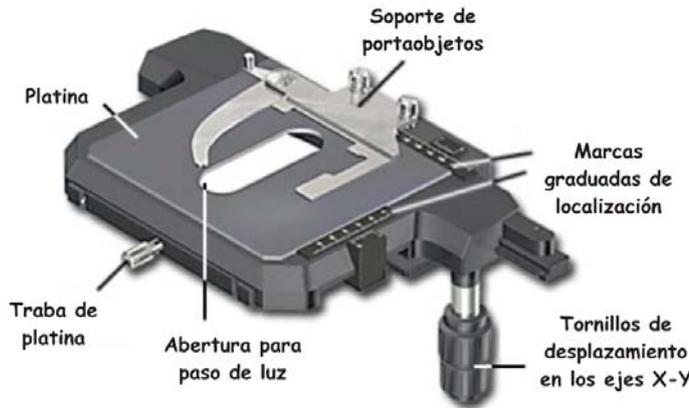


Fig. 3-84. Platina mecánica rectangular.



Fig. 3-85. Platina mecánica circular.

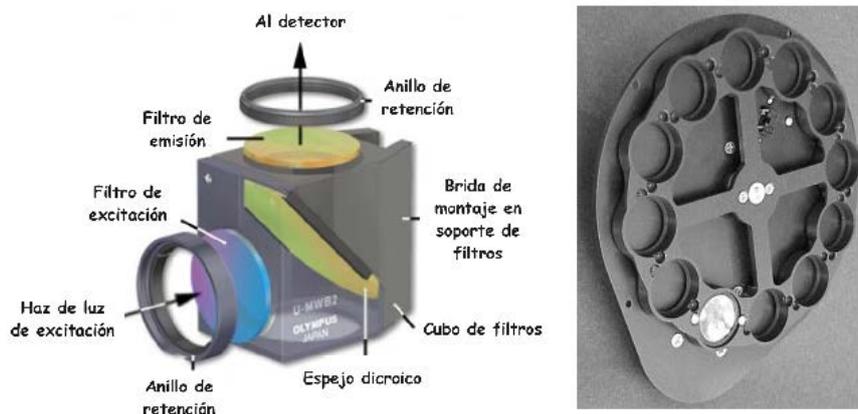
Existen platinas para microscopios invertidos que están diseñadas para sostener placas o frascos de cultivo que contienen muestras vivas. Su configuración es esencialmente similar a la de los microscopios directos. También existen platinas motorizadas, controladas por software a través de una computadora, que se desplazan a pasos de 0,01  $\mu\text{m}$ . Estas platinas son ideales para la reconstrucción total de la muestra dentro de una sola imagen (gigantoimagen o imagen compuesta). Estos equipos también pueden trabajar en coordinación con un motor de desplazamiento en el eje Z del microscopio, con lo que se puede conseguir un escaneo total de la muestra en las tres dimensiones (X, Y, Z) para una posterior reconstrucción 3D. Normalmente se adaptan a cualquier tipo de microscopio de investigación.

### Filtros de luz fluorescente

Para poder observar muestras fluorescentes es necesario contar con filtros apropiados, montados en cubos (Fig. 3-86 izquierda) o en ruedas (Fig. 3-86 derecha), asociados al camino óptico del microscopio.

Existen distintos tipos de filtros de fluorescencia: excitadores, de barrera o emisores y espejos dicróicos o divisores de haz dicromáticos. La función principal del filtro de excitación es bloquear toda la luz de la fuente de iluminación, a excepción de una banda seleccionada de longitudes de onda que se correspondan con las características de absorción del fluorocromo utilizado para identificar a la muestra. Un filtro de excitación fabricado para

ser excitado por lámparas de mercurio o de xenón, que tienen un espectro de emisión desde el ultravioleta al infrarrojo, debería tener mayores cuidados que uno diseñado para ser excitado por una casi única longitud de onda proveniente de un láser. Esto se debe a que en los primeros se necesita bloquear una mayor cantidad de longitudes de onda innecesarias. Sin embargo, los filtros utilizados con excitación láser deben evitar la mayor cantidad de haces reflectivos que podrían dañar a la fuente de iluminación. Es necesario recordar, además, que si bien el láser está construido para emitir en una sola longitud de onda, emite varios armónicos o luz espuria que se dispersa en múltiples longitudes de onda. Es por ello que, antes de alcanzar el filtro de excitación en los microscopios confocales, se interpone un filtro de “limpieza” del láser, que elimina todas estas “impurezas”, dejando pasar sólo un paso de banda de aproximadamente 10 nm. Este filtro tiene que tener las mismas características constructivas que el filtro de excitación. Estos últimos pueden ser de amplio o estrecho pasaje, en referencia al rango de longitudes de onda que dejan pasar.



**3-86.** Izquierda: cubo de filtros fluorescencia. Derecha: rueda de filtros de excitación o emisión dentro de un dispositivo automatizado.

Los espejos dicroicos son filtros especializados que están diseñados para reflejar de manera eficiente las longitudes de onda de excitación y dejar pasar las longitudes de onda de emisión. Dentro del cubo de filtros, están ubicados en el camino óptico del microscopio, entre el filtro excitador y el emisor, con un ángulo de  $45^\circ$  hacia ambos filtros. Estos espejos reflejan ciertas longitudes de onda y transmiten otras y, por lo tanto, funcionan separándolas en lados opuestos de un rango estrecho del espectro. El espejo dicroico refleja longitudes de onda de excitación en un ángulo de  $90^\circ$  y los dirige hacia la muestra, a lo largo del eje óptico. Simultáneamente, el espejo transmite las longitudes de onda de la fluorescencia emitida por los fluoróforos de la muestra, que luego atraviesan el filtro de emisión.

Los filtros de emisión son aquellos que están diseñados para suprimir o bloquear (absorber) las longitudes de onda de excitación y permitir que sólo las longitudes de onda de emisión puedan pasar al sistema detector o al ocular. Las características ópticas del filtro de emisión deben adaptarse cuidadosamente a las del filtro de excitación, para evitar que las longitudes de onda no filtradas por este último puedan enmascarar la emisión de fluorescencia relativamente débil. En términos generales, la luz de excitación puede ser un millón de veces más brillante que la de emisión del fluorocromo, por lo tanto, la luz de excitación no bloqueada por completo puede enmascarar a la de la señal. Actualmente, los filtros de emisión están diseñados para bloquear longitudes de onda de un filtro de excitación correspondiente a una densidad óptica de 5,5 o mayor.

La mayoría de los filtros disponibles en el mercado son de tipo interferencial, es decir, filtros altamente selectivos de longitud de onda, que proveen la máxima atenuación de la luz de excitación, a la vez que permiten la captura de la máxima cantidad de fotones posibles. Asimismo, están diseñados para minimizar el fotoblanqueo y la fototoxicidad de las muestras vivas. Estos tipos de filtros reducen al mínimo el efecto de la autofluorescencia.

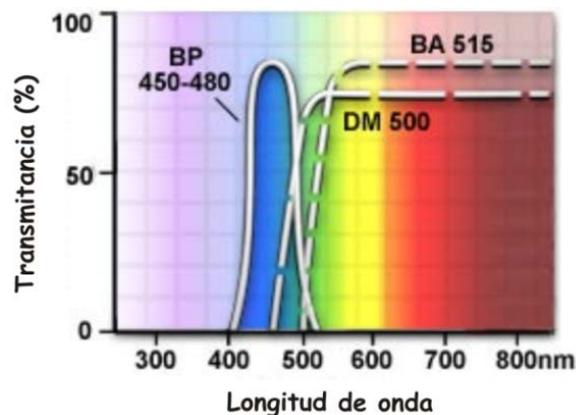
Los filtros de interferencia se construyen depositando capas delgadas de materiales especializados sobre sustratos planos de vidrio o una fundición de sílice/cuarzo. Su diseño se basa en la deposición de una película delgada y de tecnologías de película delgada de

interferencia óptica. Su estructura básica consiste en la deposición de capas alternas de materiales con índices de refracción altos y bajos, siendo cada uno un múltiplo entero de un cuarto de longitud de onda de espesor. Si bien las capas delgadas son incoloras, la superposición de las mismas les da la apariencia de colores como en una burbuja de detergente.

En la figura 3-87 se observa la excitación de una muestra con luz azul, utilizando un filtro de excitación entre 450 y 480 nm, un espejo dicroico de 505 nm y un filtro de emisión de 515 nm, lo que da como resultado la emisión de fluorescencia de color verde. Este proceso puede graficarse en términos de porcentaje de transmisión (o el logaritmo del porcentaje) en función de las longitudes de onda, como se observa en la figura 3-88. La curva correspondiente al filtro de excitación (BP450-480) muestra que el mayor porcentaje de luz de excitación se encuentra dentro de este rango de longitudes de onda. El espejo dicroico con denominación DM500, indica que la longitud de onda al 50% de la máxima transmisión de este espejo es de 500 nm. El filtro de emisión (BA515) es de paso largo ya que transmite un alto porcentaje de longitudes de onda por encima de los 515 nm de forma continua desde el verde al rojo lejano.



**Fig. 3-87.** Izquierda: La luz emitida por una lámpara de mercurio, ubicada en la caseta de la lámpara fluorescente, atraviesa el camino óptico del brazo fluorescente hasta alcanzar el soporte de filtros ubicado en el camino óptico del microscopio. Si el filtro de excitación está diseñado para dejar pasar las longitudes de onda entre 450 y 480 nm, la luz reflejada será de color azul. Esta luz incide sobre la muestra y se refleja nuevamente hacia el cubo, atravesando el espejo dicroico y finalmente el filtro de emisión. Si este último deja pasar las longitudes de onda cercanas a los 500 nm, la luz que se dirige al detector u ocular será de color verde. Derecha: Esquema del cubo de filtros que estaría actuando en la figura de la izquierda.



**Fig. 3-88.** El filtro de excitación (BP450-480) deja pasar el mayor porcentaje luz de excitación dentro del rango de los 450 y 480 nm. La curva del espejo dicroico (DM500) muestra una elevada transmisión por encima de los 500 nm pero una brusca caída por debajo de estos, junto con una máxima reflectividad. El filtro de emisión (BA515) tiene una pendiente pronunciada hacia la izquierda de los 515 nm, lo que indica que por debajo de esta longitud de onda pasa poca luz.

### Adaptador de cámara

Es un dispositivo que se interpone en el camino óptico entre el tubo de proyección del microscopio y la cámara de video. Normalmente se adapta al cabezal del microscopio trinocular por un extremo y enrosca a la cámara con rosca "C" por el otro. Puede estar vacío o contener una lente amplificadora o reductora. El propósito de este dispositivo es montar la cámara sin perder el mismo foco que se observa a través de los oculares. Existen varios modelos de diferentes alturas de acuerdo a la lente que contengan (Fig. 3-89). Algunos adaptadores también permiten la corrección fina del foco. Las lentes reductoras más comunes son de 0.35x; 0.5x y 0.63x.



Fig. 3-89. Adaptadores de cámara de distinta magnificación.

### Cámaras de video

Son los dispositivos de captura de imágenes más comunes, principalmente para las muestras tomadas desde los microscopios de luz. Existen diversos tipos de cámaras para los distintos propósitos: analógicas o digitales; monocromáticas o policromáticas; con o sin sistema de refrigeración; con alta o baja velocidad de captura, etc. El "alma" de las cámaras de video se encuentra en el sensor de luz de las mismas, que puede ser un CCD o un CMOS.

Las mayoría de las cámaras modernas están equipadas con una central de captura de luz llamada dispositivo de cargas acopladas (del inglés, "Charge Coupled Device" - CCD), que tiene la función de transformar los fotones de luz capturados en cargas eléctricas (Fig. 3-90). Está formado por circuitos integrados basados en silicio, consistente en una matriz densa de fotodiodos (fotosensores o píxeles de la cámara). Los electrones generados por la interacción de los fotones con los átomos de silicio se almacenan en una celda de potencial, para ser posteriormente transferidos a través de registros presentes en el dispositivo, con salida a un amplificador.

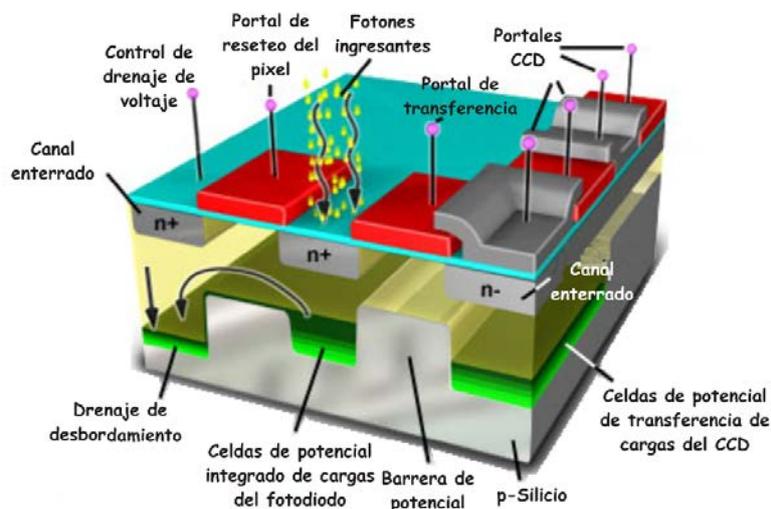


Fig. 3-90. Anatomía del dispositivo de Cargas Acopladas o CCD. Modificado de: <http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/concepts/ccdanatomy.html>

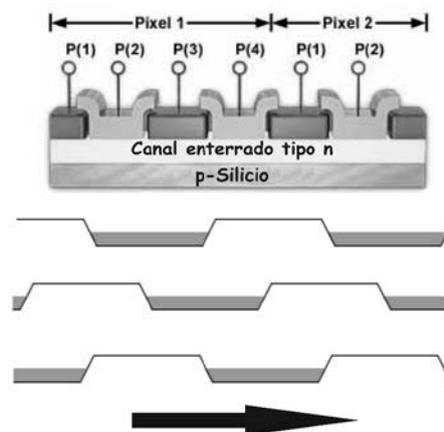
El CCD se construye en varios pasos que incluyen el grabado, la implantación de iones, la deposición de una película delgada y la metalización, entre otros, para definir las distintas funciones dentro del dispositivo. El sustrato de silicio está cargado eléctricamente para formar p-Silicio, un material en el que los principales portadores son agujeros electrónicos cargados positivamente. Cada dispositivo es empaquetado en una carcasa de cerámica o polímero, cubierto con un vidrio o ventana de cuarzo, a través del cual pasa la luz que ilumina la matriz de fotodiodos sobre la superficie del CCD.

Cuando un fotón de luz ultravioleta, visible o infrarroja impacta sobre un átomo de silicio en reposo o cerca de un fotosensor del CCD, se libera un electrón y se produce un “agujero” por la ausencia temporal del mismo en la estructura cristalina. El electrón libre se recoge en una celda de potencial que se encuentra en la profundidad del dispositivo, en una zona conocida como la capa de agotamiento, mientras que el agujero es desplazado desde la celda hacia el sustrato de silicio. Los fotodiodos individuales están aislados eléctricamente de sus vecinos por medio de un canal ocluidor, formado por difusión de iones de boro a través de una máscara en el sustrato de p-Silicio.

Luego que los electrones son recogidos en cada fotodiodo de la matriz del CCD, se aplica un potencial de voltaje sobre las capas de electrodos de p-Silicio, denominados portales, para cambiar el potencial electrostático del material subyacente. El sustrato de silicio situado directamente debajo del electrodo del portal se convierte en una celda de potencial capaz de recoger los electrones generados localmente al ser inducidos por la luz incidente. Los portales vecinos ayudan a confinar electrones dentro de la celda de potencial mediante la formación de zonas de alto potencial (barreras), que rodean a la celda. A través de la modulación de la tensión aplicada a los portales de p-Silicio, éstos se pueden convertir en una celda de potencial o en una barrera de la carga integrada recogida por el fotodiodo.

Los CCD más comunes tiene una serie de portales que subdividen cada fotosensor en tres partes por medio de tres celdas de potencial orientadas en una fila horizontal. Cada celda de potencial es capaz de mantener un número de electrones que determina el límite superior del rango dinámico del dispositivo.

Después de haber sido iluminados por los fotones entrantes durante un período llamado de integración, las celdas de potencial en la matriz de fotodiodos se llenan de electrones en la capa de agotamiento del sustrato de silicio. La medición de esta carga almacenada se logra mediante una combinación de transferencias en serie y paralelo de la carga acumulada. La velocidad de transferencia de carga en paralelo suele ser suficiente para realizarse durante el período de integración de la siguiente imagen. Una vez recogidos en las celdas de potencial, los electrones se desplazan en forma paralela de una fila por vez, a diferencia de lo que ocurre en el binning (ver más abajo). Este desplazamiento se produce por una señal generada por el reloj de registro de desplazamiento vertical, que opera en ciclos de 2 a 4 pasos, para cambiar los voltajes en los electrodos alternativos de los portales verticales. Como consecuencia, se produce el desplazamiento de la carga acumulada a través del CCD (Fig. 3-91).



**Fig. 3-91.** Los electrones que forman la carga integrada están representados por las franjas verdes. En pasos de reloj (2, 3 o 4) estas cargas se transfieren de un portal hacia el otro. La flecha muestra la dirección del traspaso.

Después de atravesar los portales de la matriz de registro de desplazamiento paralelo, la carga alcanza finalmente una fila especializada de portales conocida como registro de desplazamiento serial. En este caso, los paquetes de electrones que representan cada píxel de la cámara se desplazan horizontalmente en secuencia, bajo el control de un reloj de registro de desplazamiento horizontal, hacia un amplificador de salida. Finalmente, los electrones son transportados hacia el convertor analógico-digital, donde se transforman en bits de electricidad.

Cuando un CCD es expuesto a una iluminación de muy alta intensidad, puede agotar la capacidad de almacenamiento de sus celdas. Este proceso se conoce como “*blooming*”. Si ocurre, el exceso de carga se desbordará en las celdas de los fotodiodos adyacentes, resultando en una imagen dañada (imagen saturada). El blooming se manifiesta por manchas blancas que lavan completamente los detalles de la imagen. La saturación total se produce cuando se alcanza la máxima capacidad de transferencia.

En los CCD modernos se reserva un espacio para un nuevo portal adyacente al fotodiodo, denominado portal de restablecimiento, reseteo (del inglés, “*reset*”) o portal de desborde. Este permite que el exceso de carga sea transportado desde el fotosensor hacia un desagüe común, sin afectar la señal del dispositivo (Fig. 3-92).

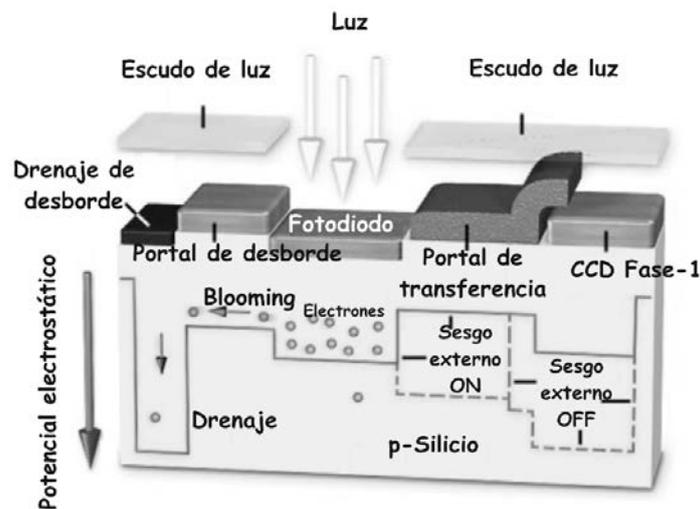


Fig. 3-92. Para evitar la saturación de luz (*blooming*), los CCD modernos vienen provistos de un portal de desborde, que envía los electrones sobrantes a un drenaje. Modificado de: <http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/concepts/blooming.html>

En síntesis, el fotodiodo, referido con frecuencia como el píxel del microchip de la cámara, es el elemento clave de un sensor de imagen digital. La sensibilidad de la cámara estará determinada por una combinación entre la carga máxima de energía que pueda ser acumulada por el fotosensor, junto con la eficiencia de conversión de los fotones incidentes a electrones y la capacidad del dispositivo para acumular la carga en una región confinada sin fuga o derrame. Estos factores suelen ser determinados por el tamaño físico y la apertura del fotodiodo y, por su relación espacial y electrónica, con los elementos vecinos en la matriz. Otro factor importante es la relación entre la carga y el voltaje de conversión logrado, lo que determina la eficacia del sensor, es decir, la capacidad que presenta la carga integrada de electrones para convertirse en una señal de voltaje que puede ser medida y procesada.

Los sensores CCD son capaces de adquirir imágenes en uno de los tres formatos: barrido de punto, de exploración lineal y área de escaneo. Cada uno de estos formatos tiene aplicaciones específicas en la fotografía digital y la digitalización de documentos e imágenes (Fig. 3-93).

La técnica más simple de captura es la de **escaneo secuencial puntual**, donde se utiliza un único detector para capturar una imagen a lo largo de una serie de coordenadas X e Y. Los detectores de este tipo son relativamente baratos y proporcionan una medida uniforme de exploración de un sitio a otro. Su principal desventaja es el número de exposiciones digita-

les necesarias para componer una imagen completa y la complejidad mecánica de la cámara para el mecanismo de translación en sentido XY.

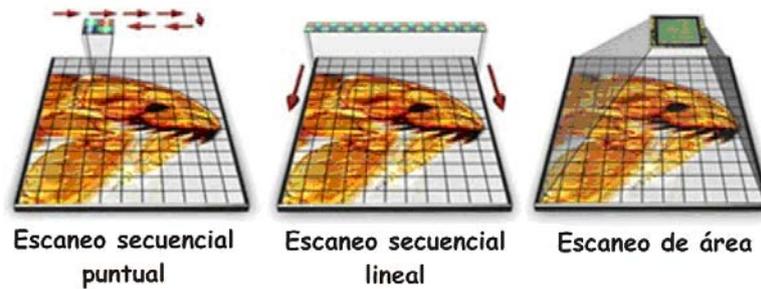


Fig. 3-93. Diversos formatos de escaneo a través del CCD. Modificado de: <http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/concepts/scanningformats.html>

Para producir una imagen digital mediante el **escaneo lineal**, los eventos se registran a lo largo de un eje del CCD. De esta manera, se mejora el rendimiento en comparación con el escaneo puntual. Este proceso se lleva a cabo en una sola dirección, donde se captura cada línea de información, se la almacena y se la amplifica antes de escanear la línea siguiente. Este tipo de mecanismo se utiliza comúnmente en escáneres planos (ver más adelante). El tiempo de procesamiento de estos sensores se encuentra en el orden de los segundos a minutos, por lo que estos dispositivos no son adecuados para aplicaciones en tiempo real.

La técnica de **escaneo digital por áreas** es la más sofisticada. Utiliza detectores 2D, lo que permite que una imagen sea capturada de manera completa con una sola exposición. Este método elimina el movimiento del sensor y la necesidad de costosos dispositivos de transducción mecánica. Los escáneres de área ofrecen la más rápida velocidad de captura de imágenes secuenciales, con un alto grado de precisión de registro entre los píxeles, por lo que constituyen los dispositivos de detección ideales para cámaras digitales.

Como se verá más adelante, en el microscopio confocal la imagen es escaneada de a un píxel por vez, mientras que con un CCD de una cámara de video o fotográfica toda la imagen es registrada de manera simultánea. Por lo tanto, el fotomultiplicador de un microscopio confocal puede ser considerado como un dispositivo serial, mientras que el CCD sería un dispositivo paralelo.

Los intensificadores de imágenes son dispositivos que se asocian con el CCD para incrementar las señales fluorescentes débiles de algunas moléculas. En los intensificadores, los fotones impactan sobre el cátodo y liberan electrones en el vacío. Cada electrón es posteriormente amplificado, produciendo una nube de aproximadamente un millón de electrones, los que son acelerados sobre una capa de fósforo, donde cada uno libera su energía, produciendo un número mayor de fotones. Esos fotones son posteriormente redirigidos hacia el CCD. La ganancia producida por el intensificador es tan alta que la señal de salida del CCD correspondiente a un solo fotoelectrón es mayor al ruido de lectura del dispositivo de cargas.

Los intensificadores producen muy bajo nivel de ruido. Asimismo, pueden capturar la señal de un simple fotón y su eficiencia cuántica se eleva del 10% al 25%. Sin embargo, si la señal es muy brillante se puede producir el blooming del píxel. Asimismo, si se produce una sobreexposición del fotocátodo a la luz, éste se puede ver permanentemente dañando.

El efecto deletéreo de la sobreexposición del amplificador fue mejorado a través de un circuito integrado dentro del CCD, denominado multiplicador de electrones (del inglés, *“Electron-Multiplying CCD”* - EMCCD). El EMCCD es una cámara digital cuantitativa, capaz de detectar eventos de fotones individuales mientras la eficiencia cuántica se mantiene elevada. Es un dispositivo de acoplamiento de carga en el que se coloca un registro de ganancia entre el registro de desplazamiento y el amplificador de salida.

El registro de ganancia se divide en un gran número de etapas. En cada una de ellas, los electrones se multiplican por ionización de impacto de manera similar a un diodo de avalancha. La probabilidad de ganancia en cada etapa del registro es pequeña, pero como el número de elementos es grande, la ganancia total puede ser muy alta, en donde una pe-

queña cantidad de electrones individuales de entrada pueden producir miles de electrones de salida. Al leer una señal desde un CCD se observa un ruido de fondo de unos pocos electrones. En un EMCCD, este ruido de lectura es insignificante. Asimismo, en estas cámaras, el ruido de fondo corresponde a 0,001 electrones/píxel, un nivel todavía no superado por otros sensores.

A diferencia de un CCD convencional, el EMCCD no está limitado por el ruido de lectura del amplificador de salida, incluso cuando se opera a elevadas velocidades de lectura. Esto se logra mediante la adición de un registro multiplicador de electrones de estado sólido (EM) al final del registro serial. Este registro permite que las señales débiles se multipliquen antes de que cualquier ruido de lectura sea añadido al amplificador de salida y por lo tanto, hace que este último sea insignificante. El registro de EM tiene varios cientos de etapas que utilizan voltajes superiores al del reloj normal. Como la carga se transfiere a través de cada etapa, el fenómeno de ionización de impacto se utiliza para producir electrones secundarios y, por lo tanto, para obtener el efecto multiplicador. Cuando este proceso se realiza durante varios cientos de ciclos a través del control de programas informáticos, la ganancia resultante puede ser de cientos a miles de veces.

Dado que por un lado se elimina el ruido de lectura, pero por otro, se incrementa el ruido producido por amplificación desapareja de los electrones, la eficiencia cuántica de este tipo de dispositivos es sólo del 50%, en comparación con un CCD sin EM.

Las cámaras con EMCCD necesitan de un sistema de refrigeración que produzca una temperatura entre  $-65^{\circ}\text{C}$  y  $-95^{\circ}\text{C}$ . Lamentablemente, este sistema de refrigeración puede producir problemas de condensación dentro de la cámara. Sin embargo, las cámaras EMCCD de gama alta están equipadas con un sistema de vacío hermético permanente que confina al microchip para evitar estos inconvenientes.

De acuerdo a la capacidad de estos dispositivos para la captura de imágenes aún en bajas condiciones de luz, lo hacen apropiado para su uso en astronomía y biología a nivel nanoscópico. En particular, su bajo nivel de ruido a altas velocidades de lectura permite su uso en una variedad de aplicaciones tales como fotometría de recuento de fotones de alta velocidad, espectroscopía de alta resolución, registro de moléculas individuales, espectroscopía Raman, microscopía de súper resolución, así como una amplia variedad de técnicas modernas de microscopía de fluorescencia gracias a una mayor relación señal:ruido en condiciones de poca luz, en comparación con los sensores CCD e ICCD.

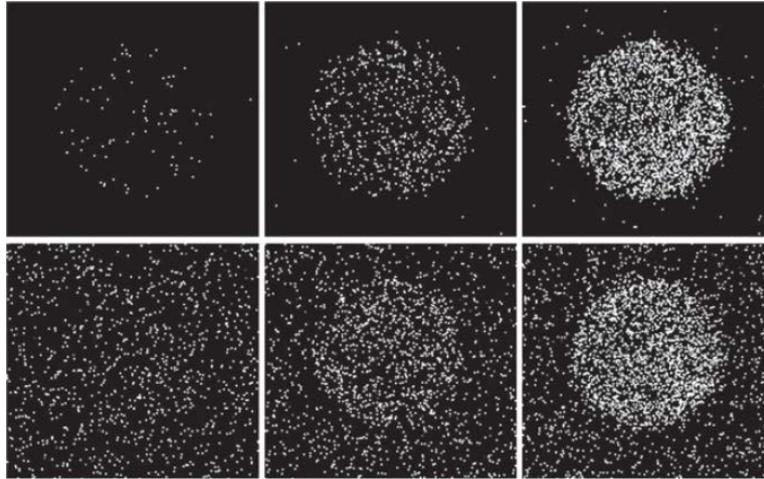
El dispositivo de acoplamiento de carga intensificada (ICCD) es un CCD conectado ópticamente a un intensificador de imagen, que se monta delante del CCD. El intensificador de imagen incluye tres elementos funcionales: un fotocátodo, una placa de micro-canal (MCP) y una pantalla de fósforo, que se encuentran estrechamente montados. Los fotones que provienen de la fuente de luz impactan en el fotocátodo, donde generan fotoelectrones. A su vez, estos son acelerados hacia la MCP a través de un voltaje eléctrico que se aplica entre este último y el fotocátodo. Los electrones se multiplican dentro de la MCP y posteriormente se aceleran hacia la pantalla de fósforo. Finalmente, esta pantalla convierte los electrones multiplicados de nuevo a fotones, los que son guiados al CCD a través de una fibra óptica o una lente.

Los intensificadores de imagen incluyen una función que actúa a modo de obturador (del inglés, “*shutter*”): si se invierte el voltaje entre el fotocátodo y la MCP, los fotoelectrones emitidos no son acelerados hacia esta última pero vuelven al fotocátodo. Por lo tanto, no se multiplican electrones, no llegan electrones a la pantalla de fósforo y no se emite luz desde el intensificador de imagen. En este caso, no llega luz al CCD, lo que significa que el obturador está cerrado. El proceso de inversión del voltaje a nivel del fotocátodo se denomina “*gating*”.

Estas cámaras son extremadamente sensibles, lo que les permite la detección de fotones individuales. El gating es una de las principales ventajas del ICCD sobre el EMCCD (Fig. 3-94). Las cámaras ICCD de mayor rendimiento permiten velocidades de obturación de tan sólo 200 picosegundos.

El sensor CMOS (del inglés, “*Complementary Metal Oxide Semiconductor*”) es otro de los dispositivos de elección para la captura de imágenes provenientes del microscopio. Es de muy bajo consumo y tiene una tensión de alimentación única, a diferencia del CCD que

puede requerir cinco o más tensiones de voltaje diferentes a diferentes velocidades del reloj y con mucha mayor energía de consumo. El CMOS y el CCD son sensibles a la luz a través de mecanismos similares. La diferencia entre ambos radica fundamentalmente en su proceso de fabricación. Dada esta diferencia, la luz procesada por el CMOS es convertida directamente a voltaje y de ahí convertida en señal digital, sin pasar por los registros como lo hace el CCD.



**Fig. 3-94.** Imágenes (400 × 400 píxeles) tomadas a partir de un disco luminiscente de 1,25 pulgadas de diámetro con salida constante. De izquierda a derecha, las imágenes fueron capturadas con exposiciones de 33, 250, y 1000 ms, mediante una cámara ICCD a -20 °C (fila superior) y una cámara EMCCD a -70°C (fila inferior). La emisión verde se filtró a 550 nm para limitar la luz en el pico nominal de las curvas de eficiencia cuántica de cada sensor. La cámara ICCD detectó 85 fotones en la exposición de 33 ms. A la misma velocidad, el EMCCD no pudo detectar el objeto ya que el ruido de carga inducido por reloj excedió el nivel de fotones dentro de la región de interés. Modificado de: <http://www.laserfocusworld.com/articles/print/volume-47/issue-7/features/low-light-imaging-iccd-emccd-and-scmos-compete-in-low-light-imaging.html>

En el sensor CMOS, cada píxel de circuito integrado consiste en un fotodiodo junto con el amplificador de lectura. Esto implica que la carga acumulada por el fotosensor es convertida en un voltaje amplificado dentro del mismo píxel, el que luego es transferido en filas y columnas secuenciales al convertor analógico-digital. En estos sensores, cada fotodiodo contiene una triada de transistores que transforman los fotones en voltaje, resetean al fotosensor y envían la corriente a su correspondiente transportador, respectivamente. Este diseño permite que las señales de cada píxel de la matriz puedan ser leídas mediante un simple direccionamiento XY, lo que no es posible con la actual tecnología CCD.

Dado que los sensores CMOS son capaces de acceder a los datos de fotodiodos individuales a lo largo de toda la matriz, esto puede ser utilizado para leer y procesar de manera selectiva una parte de la imagen a ser capturada. Esta técnica se conoce como “ventaneo” (del inglés, “*Windowing*”) o lectura de la ventana de interés, que amplía enormemente las posibilidades de procesamiento de imágenes de estos sensores. El ventaneo se controla directamente en la matriz y comprende cualquier tamaño de ventana y en cualquier posición dentro de la región activa de la misma. Esta característica puede ser muy útil para hacer el seguimiento temporal del movimiento de un objeto en una subregión de la imagen. También puede ser empleado para el control de movimiento electrónico de acercamiento (del inglés, “*zoom*”).

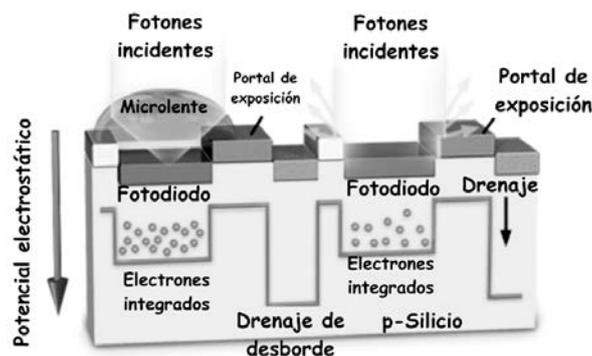
Una de las características más versátiles de los sensores CMOS es su capacidad de captura secuencial de imágenes a velocidades muy elevadas. Esto facilita la grabación de imágenes time-lapse en tiempo real, a través de interfaces controladas por software. Las tasas de entre 30 y 60 imágenes/segundo son comunes, mientras que existen varias cámaras de alta velocidad que pueden alcanzar registros de más de 1000 imágenes/segundo.

La mayor desventaja del sensor CMOS es el alto grado de ruido que se hace evidente al examinar las imágenes producidas por estos dispositivos. Los avances en la tecnología de sensores han permitido la integración cuidadosa entre los circuitos de procesamiento de

señal con la matriz de la imagen, lo que ha eliminado sustancialmente muchas fuentes de ruido y mejorado drásticamente el rendimiento de este dispositivo. Sin embargo, otros tipos de ruido, como el de disparo de fotones, de oscuridad, reset y el ruido térmico (ver más adelante) no se manejan con tanta facilidad.

Versiones actuales de CMOS, conocidas como sCMOS (*Scientific CMOS*) presentan ciertas ventajas sobre versiones anteriores del dispositivo y aún sobre el CCD: producen muy poco ruido, aumentan la cantidad de cuadros por segundo, tienen un amplio rango dinámico, son de alta eficiencia cuántica, alta resolución, y muestran un amplio campo de visual. Esto los hace particularmente apropiados para la obtención de imágenes de alta fidelidad y para la cuantificación científica, aún frente a muestras con baja emisión de luz. Si bien esta cámara ofrece todas las propiedades mencionadas, todavía no queda claro si supera las virtudes de los dispositivos que cuentan con EMCCD o ICCD.

Tanto el CMOS como el CCD pueden contar con matrices de microlentes superpuestas sobre los fotodiodos. En los CCD se utilizan para aumentar el factor de relleno óptico de los dispositivos de transferencia interlineal que sufren de una reducción de su apertura, de hasta tres veces, debido a su protección metálica (Fig. 3-95).

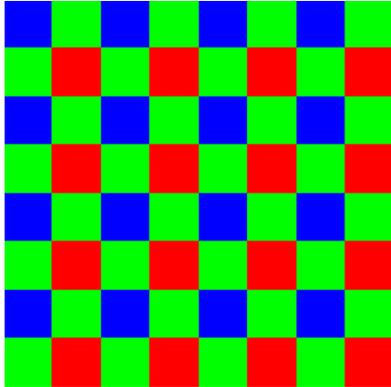


**Fig. 3-95.** Esquema de un par de fotodiodos en una línea de transferencia del CCD. Uno de los fotosensores está equipado con una microlente para concentrar la luz en el sensor, mientras que el otro debe absorber los rayos de luz incidente sin el beneficio de esta ayuda óptica. Los fotones incidentes que impactan sobre la microlente de vidrio o polímero se dirigen hacia el fotodiodo por efecto de la refracción. El fotodiodo sin microlente recoge una parte mucho menor de los fotones entrantes debido a que aquellos que impactan sobre los escudos de luz (portal de exposición y estructuras vecinas) no son útiles para la integración de cargas. Modificado de: <http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/concepts/microlensarray.html>

Estos sistemas de lentes diminutas sirven para enfocar y concentrar la luz sobre la superficie del fotodiodo. De esta manera, se evita la pérdida de iluminación en las áreas no fotosensibles del dispositivo. La apertura numérica de las microlentes oscila entre 0,15 y 0,4. La desventaja de su uso está ampliamente compensada por el incremento de la sensibilidad de los dispositivos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que cuando los rayos de luz inciden en la parte exterior de un fotodiodo, también pueden impactar en el fotodiodo vecino (y posteriormente en el fotodiodo detector), lo cual resulta en un error del registro. Además, cuando el tamaño de fotosensor detector alcanza el límite de difracción de las microlentes, su celda se llena en exceso (blooming), lo cual lleva a mediciones inexactas. A medida que los fotodiodos se hacen más pequeños, aumentan los problemas asociados con la producción de microlentes de calidad, entre los que se encuentran la corrección de las aberraciones de esfericidad. Finalmente, la presencia de microlentes en los CCD aumenta el número de pasos de procesamiento y transferencia de la información.

Tanto el CMOS como el CCD son circuitos integrados esencialmente monocromáticos, que responden únicamente al número total de electrones acumulados en los fotodiodos y no al color de la luz que impacta sobre la matriz. El color es detectado, ya sea porque la luz incidente pasa a través de una secuencia de filtros rojos, verdes y azules, o porque lo hace a través de una película delgada transparente de filtros poliméricos que se depositan sobre la matriz de fotosensores. Esta película, que es una matriz de filtros de color (del inglés: “*color filter array*” - CFA), se la encuentra tanto en cámaras de video, como cámaras fotográficas y escáner. La disposición de los colores varía en las distintas cámaras de

acuerdo a su fabricante. El filtro más común es el llamado Bayer, un polímero (diazonaf-toquinona) que consiste en un arreglo en forma de mosaico, en donde el 50% está formado por filtros verdes y el resto repartido entre el azul (25%) y el rojo (25%) (Fig. 3-96). La mayor frecuencia del color verde en este filtro se debe a que la vista humana depende en gran medida de las longitudes de onda de este color para percibir detalles finos y la resolución de luminancia.



**Fig. 3-96.** Filtro Bayer. Se observa el patrón en mosaico donde los filtros verdes se intercalan con los azules o con los rojos, de manera tal que nunca se enfrenten dos filtros verdes.

Dentro de la cámara, el filtro se superpone a los fotodiodos sensibles a la luz del sensor. Así, cada fotosensor activo recibe uno de los tres colores primarios. El color de cada píxel en la imagen se obtiene de la interpolación de cuatro fotodiodos vecinos. De esta manera, mediante la implementación de diferentes algoritmos, un píxel verde obtiene información de color de píxeles adyacentes azul y rojo, y así sucesivamente.

En algunas cámaras digitales o dispositivos de captura, la información de color de una muestra se detecta por submuestreo de la imagen en tres planos de color (rojo, verde y azul - RGB). En esos casos, la imagen original “cruda o en bruto” (del inglés, “*Raw image*”) se forma a partir de cada uno de los “píxeles crudos” de uno de los tres componentes de color/intensidad (R, G o B). En los dispositivos de presentación, como el monitor o la impresora, cada píxel se compone de una combinación de los componentes R, G y B. La interpolación de color es entonces, la recuperación de la información del color total a partir de las submuestras de un solo color de píxel obtenido de la imagen cruda.

Como se mencionara anteriormente, en las cámaras digitales fotográficas y de video, la luz capturada por el CCD se almacena en un patrón particular, conocido como filtro Bayer, con lo cual, cada posición de la matriz (cada píxel de la imagen) contiene el valor de sólo un color. En las imágenes policromáticas, donde cada píxel es representado por cada uno de los canales del RGB, es necesario recobrar los dos colores faltantes de cada píxel. Para ello, se diseñaron diferentes métodos de interpolación o recuperación de color.

La mayoría de los algoritmos de interpolación se basan en técnicas de combinación de los colores vecinos para cada uno de los píxeles de la imagen con el fin de reconstruir, recuperar o predecir los colores faltantes en la imagen cruda. El método más sencillo es el de promediado. A modo de ejemplo, para interpolar el píxel verde de la columna 2, fila 2 (posición 2,2) del patrón de Bayer, se deben promediar los colores rojo de las posiciones 2,1 y 2,3, así como los azules de las posiciones 1,2 y 3,2. De esta manera se obtiene un píxel con los tres canales, que representan la aproximación más sencilla del color real del objeto.

La interpolación es necesaria para generar una imagen a todo color de estos píxeles que parten de una sola tonalidad. En las últimas décadas, los algoritmos de interpolación han mejorado sustancialmente, por lo que los errores de interpolación prácticamente han desaparecido en las cámaras digitales actuales.

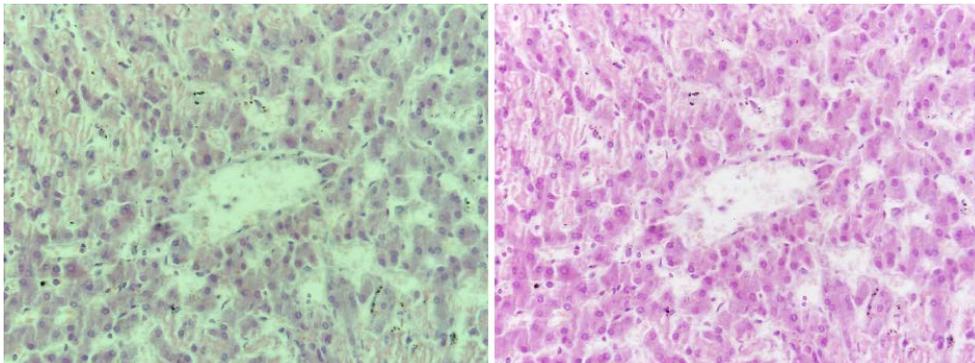
Existen cámaras de video que cuentan con 3 CCD, uno para cada color, lo cual le brinda mayor precisión a las tonalidades transmitidas por el dispositivo. También existen cámaras monocromáticas, a las cuales se les interpone un filtro giratorio con cada uno de los tres colores del RGB, que permite pseudo-colorear la imagen en el momento de la captura. Para obtener una imagen color se deben realizar tres disparos, uno con cada filtro. Esto requiere de un mayor tiempo de exposición y la necesidad de un soporte libre de vibraciones.

Independientemente de la cantidad de dispositivos presentes en la cámara, el canal azul es el que genera más ruido debido a la baja sensibilidad de la cámara para esta longitud de onda y a la consiguiente necesidad de una mayor amplificación. Estas deficiencias pueden ser posteriormente corregidas mediante la integración de imágenes o la aplicación de filtros para mejorar la apariencia de las mismas (ver Capítulo 4).

Como se mencionara previamente, las fuentes de luz son dependientes de la temperatura, lo que genera un impacto sobre los colores durante la adquisición de las imágenes digitales. La luz es esencial tanto para los microscopios como para las cámaras, de tal manera que su variación con la temperatura puede influir significativamente sobre la visualización y percepción del color. El ojo humano corrige este efecto de forma automática y subconsciente, mediante la adaptación a condiciones lumínicas cambiantes. Esto implica que el individuo verá como blancas aquellas cosas que efectivamente sabe que lo son. Lamentablemente, las cámaras de video o digitales no son tan inteligentes como para registrar por sí mismas los cambios en las condiciones de iluminación y para corregir las consiguientes alteraciones de color. Este es el motivo por el cual las imágenes tomadas con estas cámaras pueden presentar colores distorsionados.

Aunque pueda parecer caprichoso, no todas las fuentes luminosas producen la misma luz. Esto no se refiere a la posibilidad de interponer un filtro de color que cambie las propiedades del haz resultante, sino que dichas fuentes pueden tener diferentes temperaturas de color, lo que genera que los colores registrados por una misma cámara puedan verse distintos. Por este motivo, para obtener imágenes con colores reales se debe ajustar la cámara mediante el **balance de blancos**.

Las cámaras fotográficas o de video distinguen colores, sino que generan diferentes tonalidades a partir de un único "color": el blanco. Conociendo la intensidad de luz que representa al blanco, la cámara puede identificar al resto de las tonalidades. El balance de blancos es el proceso por el cual se instruye a la cámara de lo que el observador considera como tal, encuadrando una superficie de referencia, con la iluminación existente al momento de capturar la imagen. En primer lugar, se calculan tres factores de corrección sobre la base de los píxeles del sector, uno por cada componente del RGB. Estos factores se definen de forma tal que los píxeles del sector serán grises en promedio, es decir, el sector no tendrá ningún color. Luego, toda la imagen es corregida en forma automática de acuerdo a las modificaciones realizadas (Fig. 3-97).



**Fig. 3-97.** Izquierda: captura microscópica de un tejido hepático patológico con los parámetros actuales de la cámara, manteniendo fijos los filtros de luz del microscopio. Derecha: captura del mismo tejido, luego del balance de blancos.

Sería ideal poder elegir cualquier cámara digital en la que los colores que aparecen en la pantalla se asemejaran a los originales. Desafortunadamente, es difícil lograr que éstos coincidan. Esto se debe en parte, a que el color es subjetivo, es decir, es una característica intrínseca de un objeto y su percepción es interpretada por el sistema visual y el cerebro. Por otro lado, la iluminación afecta el color, es decir, que su visualización variará según la luz incidente. Dependerá en gran medida del tipo de pantalla (monitor, plasma, LCD), de la iluminación del ambiente y de la potencia de iluminación. Más aún, los colores pueden verse afectados por otras tonalidades, vale decir que la propia percepción de un determinado color variará de acuerdo a las tonalidades que lo rodeen. Asimismo, las cámaras pueden registrar colores imposibles de ser reproducidos por los monitores. Un modelo

cromático es, después de todo, sólo una manera de representar los colores matemáticamente. Los dispositivos que usan diferentes modelos cromáticos tienen que traducir los colores de un modelo a otro, lo que en ciertas circunstancias conduce a errores.

Dadas todas las limitaciones encontradas al tratar de aparear los colores de los diferentes sistemas, es importante comprender la diferencia entre errores cromáticos corregibles y no corregibles. Los primeros son aquéllos que pueden ser tratados con software, por ejemplo, mediante un sistema de manejo del color o con balance de blanco. Los segundos son aquéllos sobre los que no hay nada que se pueda hacer, ya que la información que se requiere para corregirlos simplemente no existe. Los errores no corregibles pueden ser minimizados con mejores lentes, mejores recubrimientos ópticos y dispositivos CCD más avanzados. Los errores corregibles, sin embargo, requieren del manejo apropiado del color a través de software. Si todos los programas emplearan el mismo sistema de manejo del color, éste no sería un problema. Si todos los dispositivos periféricos de una computadora usaran el mismo modelo cromático o tradujeran la información cromática hacia/desde un patrón, se podría transferir esta información de un programa a otro, o de una imagen escaneada a una impresora, sin introducir errores.

El tamaño de los sensores (CCD / CMOS) se expresa como una fracción de pulgada, tales como 1/1.8" o 2.3", conocido como formato óptico, es decir, la medida de la máxima longitud diagonal de un sistema óptico que captura una imagen en el plano focal (Fig. 3-98). Cuanto más pequeño sea el sensor, menor será su sensibilidad a la luz y mayor su propensión al ruido. La Tabla 3-10 muestra algunos ejemplos de CCD correspondientes a cámaras digitales modernas.

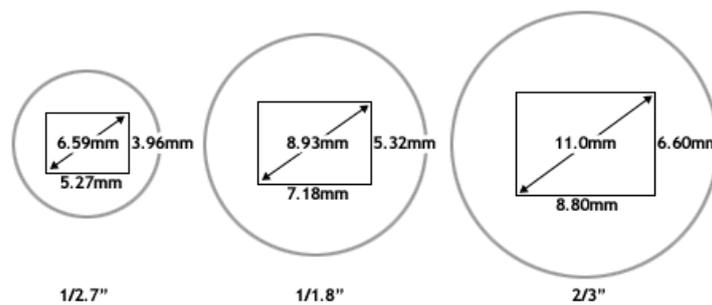


Fig. 3-98. Distintos tamaños de CCD o CMOS.

Tabla 3-10. Tipos de CCD de acuerdo a su tamaño

Tipo	Aspecto (ancho/alto)	Ancho mm	Alto mm	Diagonal mm	Area mm <sup>2</sup>	Area Re- lativa*
1/6"	4:3	2,30	1,73	2,87	3,98	1,00
1/4"	4:3	3,20	2,40	4,00	7,68	1,93
1/3.6"	4:3	4,00	3,00	5,00	12,00	3,02
1/3.2"	4:3	4,53	3,42	5,67	15,49	3,89
1/3"	4:3	4,80	3,60	6,00	17,28	4,34
1/2.7"	4:3	5,27	3,96	6,59	20,87	5,24
1/2"	4:3	6,40	4,80	8,00	30,72	7,72
1/1.8"	4:3	7,17	5,32	8,93	38,17	9,59
2/3"	4:3	8,80	6,60	11,00	58,08	14,60
1"	4:3	12,80	9,60	16,00	122,88	30,88
4/3"	4:3	18,00	13,50	22,50	243,00	61,07

\* Area relativa al CCD más chico

Para calcular el tamaño de los fotodiodos de cualquiera de los CCD del mercado, hay que dividir el ancho o el alto del dispositivo por el ancho o el alto de la máxima resolución de imagen que la cámara sea capaz de capturar, respectivamente. Suponiendo que la resolución de la imagen producida por un CCD de 2/3" sea de 1360 x 1024, el cálculo del tamaño del fotosensor estaría dado por:

$$8,80/1360 = 0,0064 \text{ mm (6,4 } \mu\text{m)} \text{ y } 6,6/1024 = 0,0064 \text{ mm (6,4 } \mu\text{m)}$$

Esto significa que para el CCD especificado, cada fotodiodo tiene una medida de 6,45  $\mu\text{m}$  de lado (41,6  $\mu\text{m}^2$ ).

Teniendo en cuenta estas medidas, es posible calcular la resolución espacial de los píxeles de las imágenes, de acuerdo a la magnificación del objetivo utilizado. La Tabla 3-11 lista el valor espacial de un píxel para diferentes tamaños de fotodiodos y para diferentes magnificaciones de objetivos, que surge de dividir el valor de primero por el del segundo. Si se utiliza un adaptador de cámara con lente amplificadora o reductora, es necesario dividir el valor obtenido anteriormente, por el de la lente interpuesta.

El campo de visión de la cámara no es el mismo que se observa en el microscopio al mirar a través de los oculares y está íntimamente relacionado con el tamaño del CCD. El FN (número de campo) de la cámara disminuye con la disminución del tamaño del sensor. Para calcular el campo de visión real de la cámara se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Campo de visión real (mm)} = \frac{\text{Área de proyección del CCD}}{\text{Magnificación del objetivo} * \text{Magnificación del tubo}} \quad [3-21]$$

Tabla 3-11. Resolución espacial de cada uno de los píxeles de la imagen, de acuerdo al tipo de CCD y a las magnificaciones utilizadas

Magnificación	Tamaño del fotodiodo dependiente del CCD								
	3.75	5.9	6.45	7.4	8	13	13.7	16	24
1.25x	3,00*	4,72	5,16	5,92	6,40	10,40	10,96	12,80	19,20
4x	0,93	1,47	1,61	1,85	2,00	3,25	3,42	4,00	6,00
10x	0,37	0,59	0,64	0,74	0,80	1,30	1,37	1,60	2,40
20x	0,18	0,29	0,32	0,37	0,40	0,65	0,68	0,80	1,20
40x	0,09	0,14	0,16	0,18	0,20	0,32	0,34	0,40	0,60
60x	0,06	0,10	0,11	0,13	0,13	0,21	0,23	0,27	0,40
100x	0,04	0,06	0,06	0,07	0,08	0,13	0,14	0,16	0,24

\* Los valores de resolución espacial están expresados en  $\mu\text{m}$ . Los datos están calculados para un tubo adaptador de la cámara de magnificación 1x.

En la Tabla 3-12 se puede ver el valor del FN de acuerdo al “área de proyección” (diagonal) del CCD y a la magnificación del tubo de proyección de la cámara.

Tabla 3-12. Área de proyección (FN) del CCD de acuerdo a la magnificación del tubo adaptador de la cámara

Magnificación	Tamaño del CCD		
	2/3"	1/2"	1/3"
0.35x	-	22*	17,1
0.50x	22	16	12
0.63x	17,5	12,7	9,5
1.00x	11	8	6

\* Los valores del área de proyección del CCD están expresados en mm.

### Rango dinámico

Está especificado como la máxima señal alcanzable, dividida por el ruido de la cámara, donde la primera se determina por la capacidad de llenado de la celda y el segundo resulta de la suma de los ruidos de oscuridad y de lectura. Las cámaras de video presentan un rango dinámico que es independiente del tipo de sensor (CCD o CMOS).

La **corriente de oscuridad** (corriente oscura, ruido oscuro o ruido de oscuridad) se genera por los artefactos que producen señal de carga (electrones) en ausencia de iluminación.

Esto significa, que el ruido se produce por el número de electrones generados térmicamente dentro de la estructura de silicio del sensor, de manera independiente de los fotones que inducen la señal, pero de forma totalmente dependiente de la temperatura del dispositivo. La tasa de generación de electrones térmicos a una temperatura dada del CCD se conoce como corriente oscura, la que se rige por la relación de Poisson, y es equivalente a la raíz cuadrada del número de electrones térmicos generados durante el tiempo de exposición de la imagen.

Este ruido puede variar sustancialmente de un fotodiodo a otro, lo que depende en gran medida de las condiciones de funcionamiento. El enfriamiento del CCD reduce la corriente de oscuridad de manera sustancial (la mitad de su valor por cada 8°C de enfriamiento). En la práctica, las cámaras de alto rendimiento suelen ser refrigeradas a una temperatura en la que la corriente oscura es insignificante en un intervalo de exposición estándar.

Las cámaras de infrarrojo deben ser refrigeradas en mayor medida que las de luz visible, ya que los fotones tienen menos energía y se requiere menor cantidad de ésta para la producción de un electrón con señal. Esto hace que haya mayor cantidad de corriente oscura a temperatura ambiente.

Por su parte, el **ruido de lectura** es una combinación de todos los ruidos generados durante la lectura de la cámara, es decir, todas aquellas interferencias relacionadas con la conversión de los acarreadores de carga del sensor en señales de voltaje, que involucra al reseteo del transistor, la salida del amplificador y el subsiguiente proceso de conversión analógico-digital. Este valor oscila entre los 10-20 electrones/fotosensor en CCD de alta calidad operando a temperatura ambiente y desciende a 2-5 electrones/fotodiodo en CCD enfriados por el sistema Peltier. Este sistema refrigerante, también llamado bomba de calor termoeléctrica, es un dispositivo de estado sólido que bombea calor desde un lado del dispositivo hacia el otro, en contra de un gradiente de temperatura (de frío a calor) con consumo de energía eléctrica, lo que permite reducir la temperatura en decenas de grado. Para una reducción de cientos de grados de temperatura es necesario utilizar nitrógeno líquido o helio líquido. Las cámaras de video con CCD de alto rendimiento y refrigeradas, diseñadas con amplificadores de bajo ruido de salida y adecuadas para un escaneo lento de las imágenes, tienen un menor ruido de lectura y mayor rango dinámico.

El **ruido de reseteo** o **restablecimiento** puede ser inducido cuando la carga recogida en cada fotodiodo de la matriz se convierte en voltaje, al utilizar un condensador de sentido y un amplificador. El **ruido blanco** y el de **parpadeo** (del inglés, “*flicker*”), ambos provenientes del amplificador, también forman parte del ruido de lectura.

El **ruido de fondo** (background) es una luz difusa que puede ser constante en intensidad sobre el plano del detector; puede provenir de la reflexión especular de los elementos ópticos y de la luz dispersada dentro del cuerpo del microscopio. También puede provenir de la autofluorescencia de los tejidos y de los cementos utilizados en el montaje de las muestras o presentes en la unión de las lentes del objetivo, o se puede originar de manera uniforme dentro de un objeto fluorescente infinitamente grande.

El tiempo también es otro determinante en el ruido de fondo. Los sistemas de escaneo lineal y los microscopios con cámaras CCD refrigeradas, brindan mejor rendimiento en la relación señal:ruido en comparación con el sistema confocal para el escaneo rápido de la muestra, particularmente ante la presencia de fondo, producido por la autofluorescencia que se genera alrededor del objeto teñido.

Si bien el **ruido de fotones** o **fotónico** no modifica de manera directa el rango dinámico, puede modificar la relación señal:ruido (Fig. 3-99). Este ruido se produce por la variación en la tasa de llegada de fotones incidentes hasta el sensor. Los fotoelectrones generados dentro de los dispositivos semiconductores constituyen la señal, cuya magnitud fluctúa al azar con la incidencia de fotones en cada fotodiodo del CCD. El intervalo de llegada de cada fotón, está gobernado por la estadística de Poisson y, por lo tanto, el ruido fotónico es equivalente a la raíz cuadrada de la señal. Dado que este ruido es una propiedad inherente a la detección de señal del sensor y que no se puede reducir por el diseño de la cámara, el mismo representa el nivel mínimo de ruido alcanzable por un sistema en el que, los ruidos de lectura y de la corriente oscura se reducen a su mínima expresión.

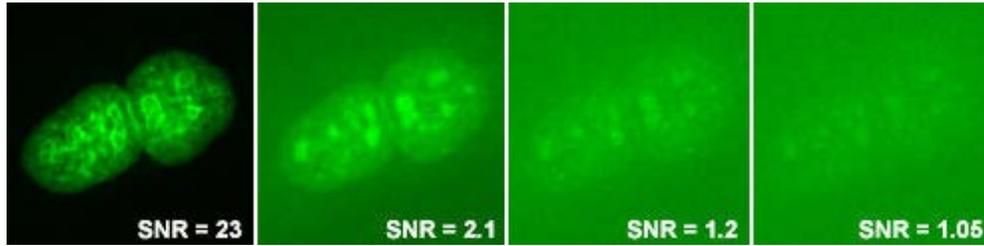


Fig. 3-99. Núcleos de células epiteliales del riñón en interfase, mostrando una relación señal:ruido alta (izquierda), donde el contraste es muy marcado y existe una buena definición de detalles precisos, resaltados sobre un fondo negro. Al disminuir la relación señal:ruido (hacia la derecha), la definición y el contraste de los núcleos también disminuyen, hasta prácticamente fundirse en un fondo con ruido.

La señal empleada para calcular la relación señal:ruido en un CCD, depende del flujo de fotones que inciden en los fotodiodos del mismo (expresado en fotones/píxel/segundo), la eficiencia cuántica del dispositivo (donde 1 representa una eficiencia del 100%) y el tiempo de integración (tiempo de exposición), durante el cual se recoge la señal. El producto de estas tres variables establece el valor del numerador en la relación señal:ruido, mientras que todas las fuentes que originan ruido y que distorsionan el funcionamiento del CCD establecen el valor del denominador. La ecuación que lo define es la siguiente:

$$SNR = \frac{PQ_e t}{[PQ_e t + Dt + N_r^2]^{\frac{1}{2}}} \quad [3-22]$$

donde,  $P$  es el flujo de fotones incidentes (fotones/píxel/segundo);  $Q_e$  es la eficiencia cuántica del CCD;  $t$  es el tiempo de integración, expresado en segundos;  $D$  es el valor de la corriente oscura (electrones/píxel/segundo) y  $N_r$  representa el ruido de lectura (raíz media cuadrática (del inglés: “*Root Mean Square*” o valor eficaz - RMS) electrones /píxel). La raíz cuadrada de la señal representa el ruido fotónico, el ruido oscuro es equivalente a la raíz cuadrada del producto de la corriente oscura y el tiempo de integración y la raíz cuadrada de  $N_r$  al cuadrado representa al ruido de lectura.

En el cálculo de la relación señal:ruido se asume que la señal es la única fuente de luz. En el microscopio óptico, el ruido de fondo así como la luz ambiente pueden contribuir a la producción de ruido. Si esta contribución es significativa, el flujo de fotones ( $B$ ) se debe añadir al componente de ruido fotónico en la siguiente ecuación:

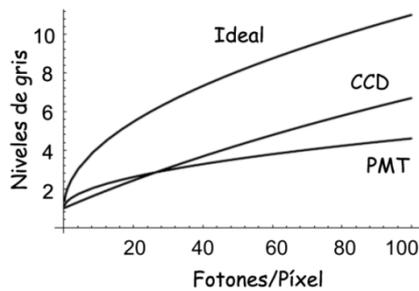
$$SNR = \frac{PQ_e t}{[(P + B)Q_e t + Dt + N_r^2]^{\frac{1}{2}}} \quad [3-23]$$

Otro factor adicional a tener en cuenta, es que el valor del flujo de fotones incidentes y fotones del fondo, así como la eficiencia cuántica, son funciones de la longitud de onda. Por lo tanto, cuando se utiliza una fuente de iluminación de banda ancha, el cálculo de la relación señal:ruido requiere que estas variables sean integradas con todas las longitudes de onda que se empleen para procesar la muestra.

Tanto el ruido oscuro como el fotónico son considerados como ruidos de disparo (del inglés, “*shot noise*”) que representa el límite fundamental de la relación señal:ruido. El ruido de disparo se infiere de la variación estadística en el número de fotones detectados, que a su vez depende de la distribución de Poisson. Esta distribución resulta asimétrica cuando el número de fotones es pequeño pero tiende a hacerse simétrica conforme estos aumenten.

El comportamiento del fotosensor ideal debería tener una eficiencia cuántica ( $Q_e$ ) del 100% y un ruido de sensor igual a 0. Un fotomultiplicador (PMT) (ver más adelante) tiene una  $Q_e$  baja (13%) pero prácticamente no tiene ruido de sensor, mientras que un CCD tiene una  $Q_e$  alta (70%) con un ruido de sensor de 9 RMS electrones por píxel. A medida que se incrementa la cantidad de fotones detectados por píxel, tanto el PMT como el CCD comienzan a discriminar diferentes niveles de grises (Fig. 3-100). Dadas las características

de ambos tipos de sensores, el PMT resulta ser más efectivo cuando la cantidad de fotones/píxel no supera la cantidad de 25, mientras que el CCD es preferible cuando se supera dicha cantidad.



**Fig. 3-100.** Niveles de gris discernibles en una imagen formada, utilizando diferentes detectores bajo diferentes condiciones de iluminación.

El rango dinámico de un CCD depende de diversas variables. Una de ellas es la corriente oscura, la que está altamente influenciada por la temperatura, dado que su valor puede duplicarse cada 8 a 10 grados centígrados. A medida que aumenta la temperatura, el valor de la corriente oscura se hace dominante, mientras que a temperaturas más bajas el rango dinámico se determina por el ruido de salida del amplificador. La cantidad de carga oscura recogida en cada fotodiodo depende no sólo de la temperatura del dispositivo, sino también del tiempo de integración y de almacenamiento previo a la lectura. Un aumento en el tiempo total de integración produce un aumento en la corriente oscura y una consecuente disminución en el rango dinámico.

El ruido proveniente de diferentes fuentes es inherente a todos los sensores electrónicos. Por lo tanto, es necesario controlarlo para asegurar que los niveles de señal en relación con éste sean los adecuados durante la captura de las imágenes. La relación señal:ruido caracteriza la calidad de la medición y determina el máximo rendimiento del sistema.

A medida que se incrementa el rango dinámico de un dispositivo, se mejora la capacidad de medir cuantitativamente la más tenue intensidad en una imagen. Este rango representa el espectro de intensidades que puede tener cabida cuando la ganancia del detector, el tiempo de integración, la apertura de la lente y otras variables, se ajustan a diferentes campos visuales.

El rango dinámico en una cámara de video se expresa en decibeles. Cuando se digitaliza la imagen analógica, el valor de este rango se transforma en profundidad de bits (ver Capítulo 1). La Tabla 3-13 muestra la relación entre los decibeles de rango dinámico de un CCD con la profundidad de bit de la imagen digital obtenida.

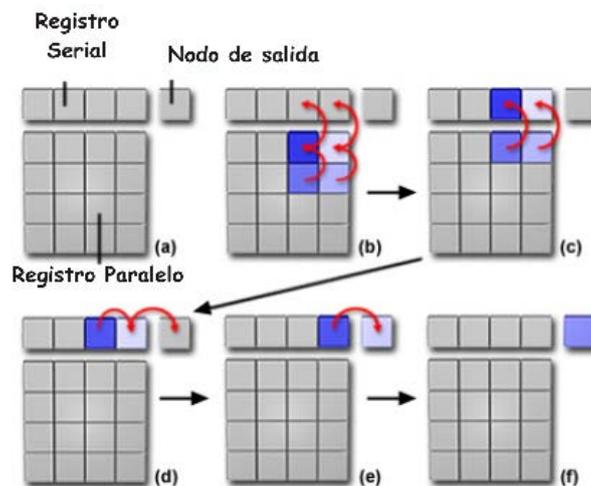
**Tabla 3-13.** Profundidad de Bits y Rango Dinámico del CCD

Profundidad de Bit	Niveles de gris	Rango Dinámico (decibeles)
1	2	6 dB
2	4	12 dB
3	8	18 dB
4	16	24 dB
5	32	30 dB
6	64	36 dB
7	128	42 dB
8	256	48 dB
9	512	54 dB
10	1.024	60 dB
11	2.048	66 dB
12	4.096	72 dB
13	8.192	78 dB
14	16.384	84 dB
16	65.536	96 dB

## Binning

El binning de píxeles es un esquema de reloj que combina la carga recogida por varios fotodiodos adyacentes en uno solo, con el propósito de reducir el ruido y mejorar la relación señal:ruido en bajas condiciones de luz, así como aumentar la velocidad de captura de las imágenes en los dispositivos digitales, a expensas de la resolución de las mismas.

Como fuera previamente mencionado, la luz incidente sobre el CCD genera electrones que se acumulan en los fotosensores. La cantidad de electrones que puede albergar cada fotodiodo se denomina “profundidad de celda”. Este valor puede estar comprendido entre los 30.000 y 350.000, dependiendo de cada CCD. El rango dinámico de cada dispositivo de captura es directamente proporcional a la profundidad de celda. El nivel de luz incidente y el tiempo de exposición determinan la cantidad de electrones acumulados en cada fotosensor. Luego de un ciclo de iluminación, los electrones se transfieren de la matriz paralela y serial a un amplificador de salida, donde son convertidos de señal analógica a digital (Fig. 3-101).



**Fig. 3-101.** Para lograr un binning de 2x2, se parte de una matriz de 4x4 fotodiodos o píxeles paralelos y un registro de 4 píxeles en serie, más un fotosensor de suma, celda o nodo de salida (a). Los fotones ingresantes al CCD impactan sobre los fotodiodos, dando lugar a la formación de un grupo de electrones que se acumulan en cada celda, como se observa en los 4 cuadrados azules (b). La carga de estos fotosensores se va transmitiendo de a pares a la matriz de píxeles seriados (c). El contenido de estos últimos es posteriormente transmitido de a pares al nodo de salida (d), hasta completar toda la transmisión (e). Una vez concentrado en esta celda (f), los electrones correspondientes a los 4 píxeles iniciales son transferidos al amplificador de salida para su conversión analógica-digital. En este caso, la relación señal:ruido se incrementa por un factor de 4, pero la resolución de la imagen se reduce a un 50% de la original. Modificado de: <http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/concepts/binning.html>

El binning proporciona ciertos beneficios sobre la imagen visualizada:

- Un aumento de la señal, igual al número de electrones agrupados. Esto permite que la cámara detecte señales débiles, reduciendo así el tiempo de exposición.
- Un aumento en la frecuencia de imágenes por unidad de tiempo, debido a la reducción del lapso de exposición y al número de fotodiodos que deben medirse. Este proceso resulta útil en una variedad de aplicaciones donde la cantidad de cuadros por segundo debe ser elevada, aunque a expensas de la resolución.
- Un incremento en la relación señal:ruido resultante de un error de lectura que se aplica a la carga de los fotosensores agrupados, en lugar de la adición de múltiples errores de lectura si las celdas de carga hubiesen sido leídas en forma individual. Si bien el binning no puede reducir el ruido oscuro, el enfriamiento de la cámara a bajas temperaturas puede resolver esta falencia.
- Un incremento en el rango dinámico del sensor, resultante de la capacidad de carga mayor del nodo sumador (generalmente un aumento de 1,65 a 2 veces en la profundidad de la celda).

- Un aumento en la precisión del enfoque, al reducir el tiempo necesario para la adquisición de la imagen.
- Una mayor sensibilidad a los niveles bajos de luz fuera de foco.

En términos generales, el binning se podría graficar de la forma en que se observa en la figura 3-102.

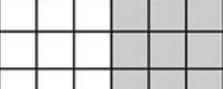
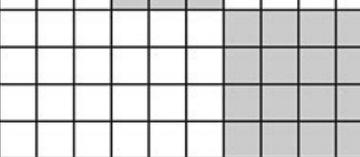
Opciones de Binning	Píxeles combinados en el sensor CCD
Ninguno	
2x2 (4 píxeles = 1)	
3x3 (9 píxeles = 1)	
4x4 (16 píxeles = 1)	

Fig. 3-102. El binning del CCD es un proceso de combinación de electrones de los fotodiodos vecinos en un gran "súper-fotosensor". Este representa el área de todos los fotodiodos individuales que contribuyen con la carga. En un binning de 2x2, se necesita la carga de 4 píxeles adyacentes para formar uno solo, mientras que en un binning de 3x3 se necesitan 9 y en uno de 4x4, 16.

### Digitalización

Una vez que la energía fotónica es transformada en señal eléctrica analógica continua dentro del fotosensor, se debe convertir en señal digital para que pueda ser almacenada y posteriormente procesada dentro de cualquier dispositivo de almacenamiento digital. La señal eléctrica analógica es aquella en la que los valores de la tensión o voltaje varían constantemente en forma de corriente alterna, incrementando su valor con signo eléctrico positivo (+) durante medio ciclo y disminuyéndolo a continuación con signo eléctrico negativo (-) en el medio ciclo siguiente Fig. 3-103).

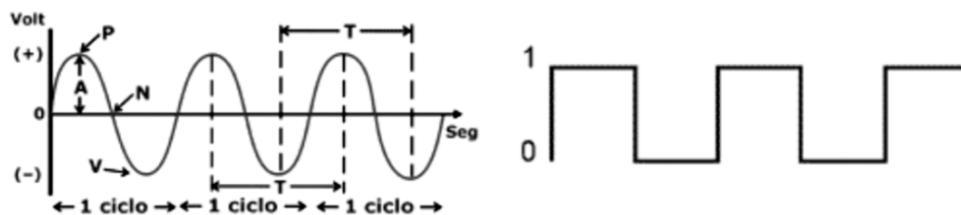
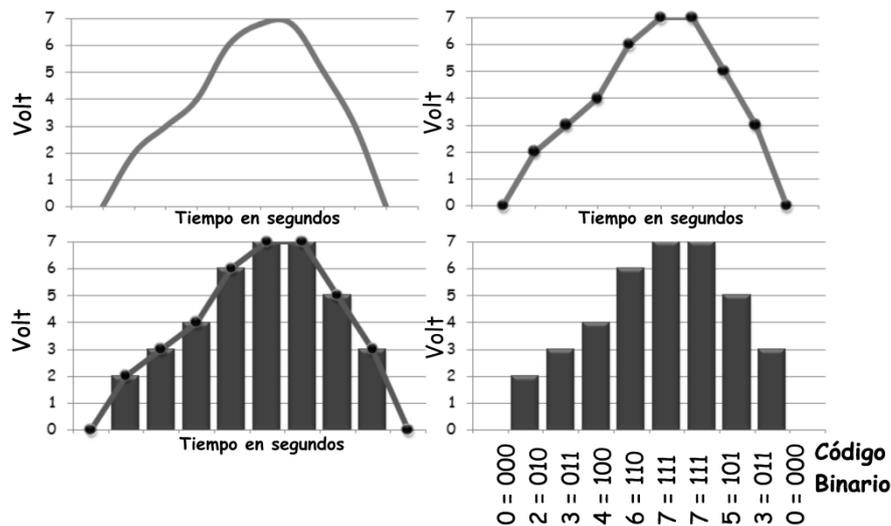


Fig. 3-103. Izquierda: Representación gráfica de una onda sinusoidal alterna con una frecuencia de 3 Hz o ciclos por segundo. Cada ciclo está determinado por la amplitud de la onda (A), que puede ser positiva (+) cuando la senoide alcanza su máximo valor de tensión o pico (P) de voltaje (por encima de 0 volt) y negativa (-) cuando decrece (por debajo de 0 volt), hasta alcanzar un valor mínimo de valle (V). La distancia existente entre un pico y el otro, o entre un valle y el otro se denomina período (T). Derecha: Representación gráfica de una señal digital, integrada por valores discretos binarios de ceros y unos.

En una señal eléctrica analógica, los valores de tensión positivos y negativos pueden mantenerse con un valor constante o pueden variar en una escala que fluctúa entre 0 volts, hasta un valor máximo prefijado, pasando por valores intermedios. Sin embargo, en la señal digital sólo existen dos condiciones en las cuales se registra el voltaje: presente o ausente y su variación no ocurre de forma continua, sino de forma discreta, a intervalos de tiempo determinados.

Para realizar la conversión de la señal analógica en digital se requiere de un conversor analógico-digital (del inglés, “*Analog to Digital Converter*” - ADC). Este dispositivo realiza el muestreo de la señal analógica, la cuantificación o cuantización de la propia señal y la transformación del resultado de esta última a código binario (Fig. 3-104).



**Fig. 3-104.** Arriba izquierda: Representación gráfica de medio ciclo positivo (+), correspondiente a una señal eléctrica analógica. Los valores de variación de la tensión o voltaje en esta sinusoide varían entre 0 y 7 volts. Arriba derecha: el primer paso para convertir la señal analógica en digital consiste en tomar valores discretos de tensión o voltaje a intervalos regulares (muestreo) en diferentes puntos de la onda sinusoidal. Abajo izquierda: proceso de cuantización de la señal analógica para su conversión en señal digital. Abajo derecha: La codificación permite asignarle valores numéricos binarios equivalentes a los valores de tensiones o voltajes que conforman la señal eléctrica analógica original. En este caso, se ejemplificó la binarización del voltaje mediante tres bits. Este mismo voltaje puede ser codificado por 8, 10, 12 o 16 bits, incrementando de esta manera, el rango dinámico del dispositivo de captura.

En el primer paso en la conversión analógico-digital se realiza un muestreo de la señal de entrada, es decir, se toman diferentes muestras de tensiones o voltajes en diferentes puntos de la onda sinusoidal. El intervalo de tiempo existente entre las muestras adquiridas se denomina razón, tasa o frecuencia de muestreo. Este intervalo llegará a ser fidedigno sólo si es mayor al doble de la mayor frecuencia de la señal. Esto es esencialmente lo que se materializa en el teorema de muestreo de Nyquist. Este teorema fue probado por Shannon, quien estableció que si el intervalo para la medición de intensidades es menor a la mitad del período de la mayor frecuencia en la señal original, será posible reconstruir fielmente la misma a partir de los valores digitales registrados. La frecuencia de muestreo descrita se conoce como **frecuencia de Nyquist**, mientras que su inversa es el **intervalo de muestreo de Shannon**.

Durante el muestreo, se asignan valores numéricos equivalentes a la tensión o voltaje existente en diferentes puntos de la sinusoide, con la finalidad de pasar al proceso de cuantización. Para esta parte del proceso, los valores continuos de la sinusoide se convierten en series de valores numéricos decimales discretos correspondientes a los diferentes niveles o variaciones de voltajes que contiene la señal analógica original. Por lo tanto, la cuantización representa el componente de muestreo de las variaciones de valores de tensiones o voltajes tomados en diferentes puntos de la onda sinusoidal, que permite medirlos y asignarles sus correspondientes valores en el sistema numérico decimal, antes de convertir esos valores en sistema numérico binario. A continuación, los valores de las tomas de voltajes se representan numéricamente por medio del código numérico binario.

En la figura 3-104 se ejemplificó la binarización del voltaje mediante tres bits. Este mismo voltaje puede ser codificado por 8, 10, 12 o 16 bits, incrementando de esta manera, el rango dinámico del dispositivo de captura.

Dado que prácticamente el ADC no puede hacer una conversión instantánea, el valor de entrada debe, necesariamente, mantenerse constante durante el tiempo que el conversor realiza el proceso (tiempo de conversión). Para ello existe un circuito de entrada que, en la mayoría de los casos, utiliza un capacitor para almacenar el voltaje de entrada, y un interruptor electrónico para desconectarse de dicho capacitor.

Existen diversos tipos de ADC que emplean distintas técnicas de digitalización, tales como el de conversión directa o ADC Flash, el ADC de aproximación sucesiva, el de codificación delta, el comparador tipo rampa o multirampa, el tipo tubería y el ADC sigma-delta. Cada uno mantiene sus características particulares de trabajo, lo que produce ventajas y desventajas de acuerdo a las distintas circunstancias en que se los aplique.

En la actualidad, estos dispositivos se encuentran dentro de las cámaras, en asociación directa con los sensores de luz con lo cual, la señal que se envía a los dispositivos de almacenamiento o procesamiento, ya es digital. Finalmente, la información digital de las cámaras pasa hacia la computadora a través de un cable digital con interfaces USB, Ethernet o IEEE 1394 (“*Fire Wire*”).

Hasta hace unos años, el proceso de digitalización se realizaba a través de una placa digitalizadora (“*frame grabber*”), que se instalaba sobre la placa madre de la computadora. Estos dispositivos inicialmente tenían la memoria suficiente como para almacenar solamente una imagen digital de baja resolución por vez. La tecnología fue evolucionando, lo que permitió que estos circuitos pudieran almacenar mayor cantidad de imágenes y hasta comprimirlas en tiempo real utilizando algoritmos como el MPEG2 y JPEG. Las cámaras de video analógicas, se conectaban a estos dispositivos a través de un cable analógico, lo cual agregaba ruidos a la imagen que se estaba enviando.

### ***Cámaras fotográficas digitales***

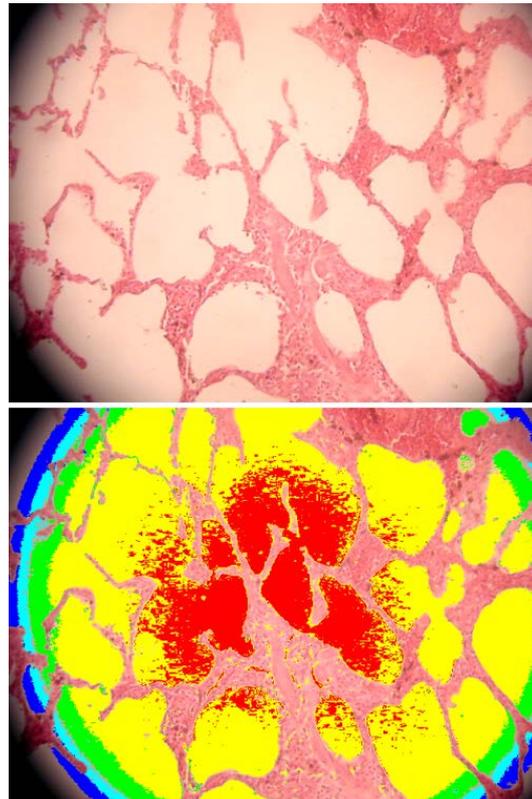
En la mayoría de las cámaras fotográficas actuales el sensor de imágenes es un CCD. Estas cámaras utilizan la misma tecnología CCD que una cámara de video y pueden producir mayor calidad de imágenes. Esto se debe en parte, a los tiempos de exposición más largos que recogen más electrones y que reducen, de esta manera, el ruido estadístico y de amplificación. Además, la lectura de datos más lenta a partir del CCD disminuye el ruido de lectura. A diferencia de las cámaras de video, las cámaras fotográficas pueden utilizar un segundo o más para la captura, en lugar de los 1/60 segundos. Las cámaras fotográficas leen los datos en una sola pasada (exploración progresiva), sin el entrelazado de píxeles. Algunos CCD de estas cámaras contienen celdas grandes y un elevado número de bits en el digitalizador, lo que les brinda un elevado rango dinámico. Más aún, si las cámaras son refrigeradas, la integración de las imágenes por exposición es mucho más efectiva, sobre todo cuando la captura puede durar entre decenas de segundos y varios minutos, como sucede en algunas aplicaciones astronómicas. Además, la capacidad de utilizar un obturador físico en lugar de uno electrónico, simplifica el circuito del CCD y aumenta el factor de llenado. El número de fotosensores en las cámaras de video no necesita ser mayor al de la resolución de la imagen obtenida. Por su parte, en una cámara fotográfica digital, el elevado número de píxeles puede dar lugar a una resolución extremadamente alta.

Todo parecería indicar que sería ideal contar con una cámara fotográfica con un elevado número de fotosensores de gran tamaño individual y en consecuencia, de amplio rango dinámico. Sin embargo, para algunas aplicaciones, la cantidad de fotosensores no es importante. Con altas magnificaciones microscópicas, la limitación relevante es la resolución óptica. En una configuración típica, la imagen proyectada en el CCD al utilizar un objetivo de baja magnificación (10x), representa alrededor de 1600  $\mu\text{m}$  del ancho en la muestra, mientras que con un objetivo de 100x (gran aumento), este espacio se convierte en 160  $\mu\text{m}$ . Para una cámara que contenga una matriz de 3600 x 2400 sensores (menos de 10 megapíxeles - MPx), la imagen de baja magnificación requiere de un píxel por micrómetro, lo que resulta adecuado para la resolución de la óptica. Por su parte, la imagen de alta magnificación requiere de 90 píxeles por micrómetro. Dado que la resolución óptica del microscopio, bajo condiciones óptimas, es de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  con un objetivo de 100x, esto implicaría un gran sobremuestreo que resulta innecesario.

Por lo general, las cámaras fotográficas digitales se promocionan por la cantidad de fotosensores (en MPx) que presentan, para indicar la resolución de las mismas; sin embargo, este no es un indicativo de calidad. Hay varios factores que afectan la calidad del dispositivo, entre los que se incluyen, la naturaleza de la lente, el tamaño del sensor y su rango dinámico y la organización de los fotosensores (una cámara fotográfica monocromática sin filtro Bayer tiene una resolución más alta que otra de color).

Muchas cámaras fotográficas digitales compactas son criticadas por tener demasiados fotosensores en relación al pequeño tamaño del CCD que los alberga. El aumento de la densidad de los fotosensores disminuye la sensibilidad del CCD, debido a que cada uno de ellos es tan pequeño que recoge muy pocos fotones. De esta manera, para conservar la relación señal:ruido se deberá aumentar la iluminación de cada fotocelda. Esta disminución de la sensibilidad conduce a cuadros ruidosos, calidad pobre en sombras y por lo general, a imágenes de pobre calidad si están escasamente iluminadas.

La mayoría de las cámaras fotográficas digitales no son apropiadas para la realización de trabajos técnicos debido a sus limitantes en la óptica (lentes de foco fijo con distorsiones geométricas) y resolución límite (Fig. 3-105). Algunas cámaras interpolan la información entre los fotosensores del dispositivo de captura para crear imágenes con magnificación vacía, es decir, aquella información que no proviene de los fotodiodos del CCD. En la mayoría de los casos, esto produce artefactos en las imágenes que imposibilitan las determinaciones cuantitativas. El mayor defecto de las cámaras fotográficas digitales hogareñas es que almacenan la información en formato JPEG (ver Capítulo 1), que descarta información valiosa de las imágenes: los bordes se rompen y se desplazan, el color y la densidad se alteran y los detalles finos pueden ser eliminados o movidos. Estos cambios, que en la mayoría de los casos resultan imperceptibles al ojo humano, pueden ser desestimados en la fotografía social. Sin embargo, no pueden tolerarse cuando se realiza el análisis cuantitativo.



**Fig. 3-105.** Arriba: imagen de un pulmón de cerdo capturada mediante una cámara fotográfica digital hogareña apoyada contra el ocular de un microscopio de investigación. En la periferia de la imagen se observan las deficiencias de luz. Abajo: diferencias en la intensidad de luz en el fondo de la imagen registrada mediante diferentes colores en un patrón circular. El rojo indica la mayor intensidad y el azul, la menor. Los colores amarillo, verde y celeste expresan intensidades intermedias.

Desde que las primeras cámaras fotográficas fueron introducidas al mercado, han existido tres métodos principales de captura, según la configuración del hardware del sensor y de los filtros de color. El primer método se denomina de **disparo único**, en referencia al número de veces que el sensor de la cámara se expone a la luz que pasa a través de la lente. Los sistemas de disparo único utilizan un CCD con un filtro de Bayer, o tres sensores de imagen independientes (uno por cada uno de los colores primarios aditivos del RGB), que se exponen al mismo objeto.

El segundo método se denomina de **multidisparo**, porque el sensor se expone a la imagen en una secuencia de tres o más aperturas del obturador de la lente. Existen variantes de aplicación de esta técnica. La más común, utiliza un único sensor de imagen con tres filtros (rojo, verde y azul), colocados delante del sensor para obtener la información aditiva del color. Otra variante de multidisparo utiliza un solo CCD con un filtro de Bayer pero mueve la posición física del sensor en el plano del foco de la lente para componer una imagen de mayor resolución que la que el mismo CCD permitiría. Una tercera versión combina los dos métodos sin un filtro de Bayer en el sensor.

El tercer método se denomina de **exploración** debido a que el sensor se mueve a través del plano focal como aquel de un escáner de escritorio (ver más adelante). Sus dispositivos lineales o tri-lineales utilizan solamente una línea de fotodiodos, o tres líneas para los tres colores, respectivamente. En algunos casos, la exploración se logra rotando la cámara fotográfica entera; una cámara fotográfica con línea rotativa ofrece imágenes de resolución total muy elevada.

Los últimos avances en cámaras fotográficas fueron registrados en aquellas basadas en CCD de disparo único. Sin embargo, las basadas en sensores CMOS de disparo único también se encuentran en franco avance. Independientemente del tipo de sensor, los formatos de imagen actualmente más utilizados por estas cámaras incluyen al RAW y TIFF, manteniendo las bondades del JPEG.

Muchas cámaras fotográficas, especialmente las profesionales o DSLR, permiten descargar el formato RAW (crudo). Una imagen de este formato está formada por el conjunto de píxeles sin procesar (ni siquiera la interpolación de color que produce el filtro Bayer) obtenidos directamente del sensor de la cámara fotográfica. A menudo se utilizan los formatos propietarios de cada fabricante, cuyas especificaciones no son conocidas. Sin embargo, ya existen firmas que ofrecen un formato de imagen RAW libre de derechos (como el PNG) que ha sido adoptado por algunos fabricantes.

En un principio, los archivos RAW debían ser procesados mediante software de edición especializados, pero con el tiempo ciertos programas de alcance masivo y gratuito agregaron el soporte para poder editarlos. Editar imágenes en formato RAW permite una mayor flexibilidad en ajustes, tales como la modificación del balance de blancos, compensación de la exposición y cambio de la temperatura de color. Asimismo, las imágenes de este formato permiten una mayor profundidad de color que 8 bits por canal que, dependiendo del fabricante, pudiendo llegar a 10, 12, 14 o hasta 16 bits. Esencialmente, el formato RAW permite hacer ajustes sin pérdida de calidad de imagen que, de otra manera, implicarían la necesidad de volver a tomar la fotografía.

Al igual que las cámaras de video, las cámaras fotográficas cuentan con filtros (CFA) que permiten interpretar los colores del entorno en cada uno de los píxeles. La mayoría de estas cámaras contienen un filtro de tipo Bayer. Sin embargo, existen otros tipos de CFA que presentan un patrón similar, pero que contienen otros pigmentos, tal como se observa en la figura 3-106. Estos últimos han sido utilizados en pocas cámaras fotográficas.

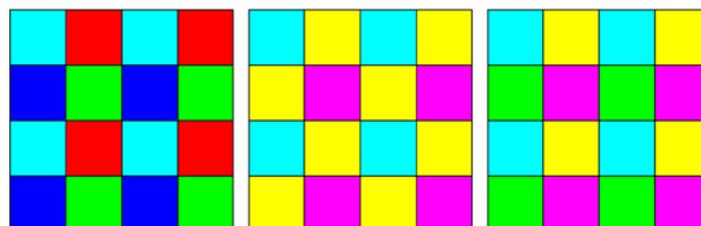


Fig. 3-106. Diferentes tipos de filtros de aplicación sobre el CCD para la obtención del color final. De izquierda a derecha: Filtros RGBE, CYM y CYGM.

Recientemente, se presentó en el mercado un sensor de imágenes que, a diferencia de aquellos que cuentan con CFA, utiliza tres capas de filtros para recoger la información total de la luz roja, verde y azul. Al incidir la luz, el silicio del sensor absorbe longitudes de onda más cortas (azul) cerca de su superficie y longitudes de onda verde y roja, a niveles más profundos. El sensor de imagen aprovecha la posibilidad de contar con tres capas de filtros para capturar todos los colores de la luz en cada posición de fotosensor (Fig. 3-107). De esta manera, esta estructura vertical evita la necesidad de reunir diferentes colores en diferentes localizaciones horizontales. Este sistema de captura de color completo es, en principio, capaz de proporcionar la misma resolución de luminancia que la resolución de crominancia.

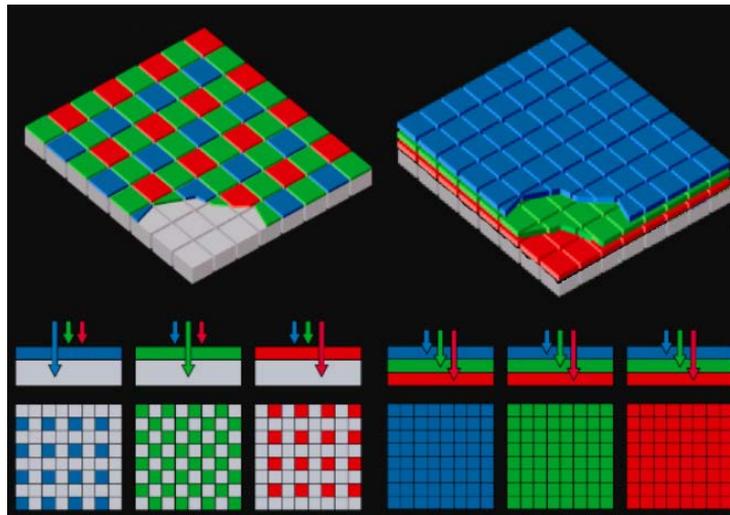


Fig. 3-107. La mayoría de las cámaras utiliza un filtro Bayer (arriba izquierda) que se aplica sobre el CCD luego de fabricado, o se construye de manera conjunta. Este filtro tiene un patrón de distribución tal que el 50% del área está cubierto por filtros verdes y el 50% restante se divide en partes iguales para el rojo y el azul (abajo izquierda). Las nuevas tecnologías han diseñado un CCD que contiene 3 capas de filtros (arriba derecha), de tal manera que toda la luz atraviesa simultáneamente y queda retenida dentro de cada filtro (abajo derecha). Esto evita el proceso de interpolación, ya que cada píxel tiene la información total de cada color.

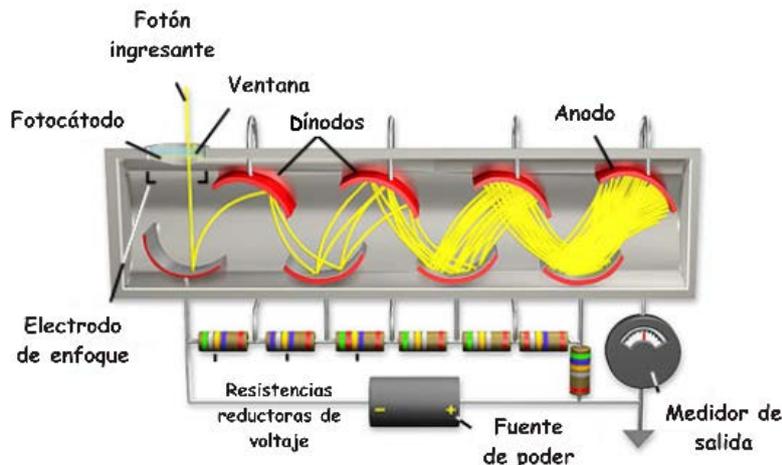
Por lo general, los CFA son propensos a crear moaré, problema causado por la interferencia entre la repetición de patrones de líneas finas en la materia y el patrón de mosaico de la matriz de filtro de color en sí. El moaré suele evitarse mediante la instalación de un filtro de paso bajo delante del sensor de imagen, que elimina las frecuencias más altas de la luz que llevan los detalles finos. Esto impide la interferencia y, por lo tanto, evita el moaré. Pero también afecta negativamente a la resolución y nitidez de la imagen. Ante esta disyuntiva, algunas cámaras utilizan sensores CFA sin un filtro de paso bajo, aceptando los efectos de moaré de forma inevitable como el precio a pagar por una imagen más nítida. En los sensores que cuentan con las tres capas de filtros de color no se necesita un filtro de paso bajo para evitar el moaré.

### **Fotomultiplicadores**

El tubo fotomultiplicador (PMT) es útil para la detección de la luz proveniente de señales muy débiles. Es un dispositivo fotoemisor, en el que la absorción de un fotón resulta en la emisión de un electrón. Estos detectores producen la amplificación de los electrones generados por un fotocátodo expuesto a un flujo de fotones (Fig. 3-108). Los microscopios confocales y los espectrofotómetros utilizan este tipo de dispositivo para capturar las señales fluorescentes de los compuestos que están siendo observados.

Los PMT pueden producir señal incluso en ausencia de luz debido a la corriente oscura que surge de las emisiones térmicas de los electrones procedentes del fotocátodo, de la corriente de fuga entre dínodos, así como por la pérdida de radiación de alta energía. Dado que los fotomultiplicadores no almacenan la carga y que responden a los cambios en el

flujo de entrada de luz en unos pocos nanosegundos, pueden ser utilizados para la detección y registro de eventos extremadamente rápidos.



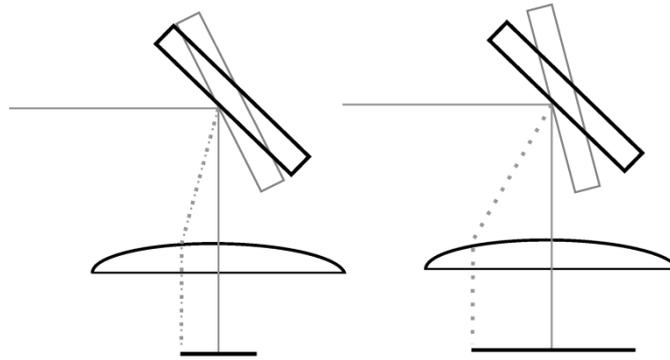
**Fig. 3-108.** Los PMT adquieren la luz a través de un cristal o ventana de cuarzo que cubre una superficie fotosensible, llamado fotocátodo. Este libera electrones que se multiplican sobre electrodos de metal denominados canales dinodos. A medida que van tomando contacto con éstos, los electrones emitidos por el cátodo se van acelerando. Al final de la cadena de dinodos se encuentra el ánodo o electrodo de recolección. Modificado de:

<http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/concepts/photomultipliers.html>

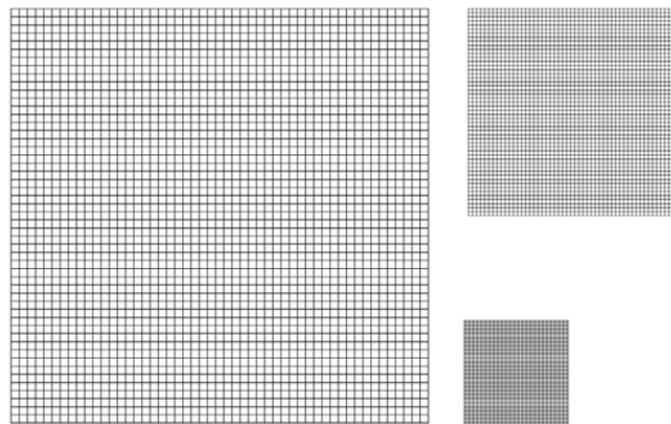
Como se mencionara anteriormente, los microscopios de luz, de campo ampliado y de disco utilizan una cámara de video que contiene un sensor de luz (CCD o CMOS) que, durante la exposición, opera leyendo un voltaje proporcional al número de fotones absorbidos dentro de una pequeña área cuadrada de su superficie. Dado que la intensidad medida se almacena directamente en la computadora, esta pequeña área define el tamaño del píxel para todo el sistema óptico. En términos concretos, la NA del objetivo, la longitud de onda de la luz y la magnificación total del sistema hasta llegar al CCD o CMOS determinan, tanto el tamaño del píxel, referido al plano de la muestra, como el tamaño ideal del píxel para el sensor. Por ejemplo, en un microscopio cuyo objetivo sea de 40x con una NA 1,3, una cámara con fotosensores de 8  $\mu\text{m}$  de lado, montada a través de un tubo con magnificación 1x, capturará una imagen cuyos fotodiodos cubrirán  $8/40 = 0,2 \mu\text{m}$  por lado ( $0,04 \mu\text{m}^2$ ). Si se cambia a un objetivo de 100x, manteniendo constantes los otros parámetros, se obtendrá una cobertura de  $0,08 \mu\text{m}$  por lado. Sin embargo, la cantidad de fotones que incidirán en cada fotosensor durante un tiempo determinado será de  $2,5 \times 2,5 = 6,25$  veces menor, debido a que la señal de intensidad disminuye con el cuadrado de la magnificación.

En un microscopio confocal, una fracción de los fotones que toman contacto con el PMT produce un solo fotoelectrón, el que posteriormente se amplifica cerca de un millón de veces por multiplicación de cargas. En el proceso de digitalización de la señal emitida por el PMT, se lee línea por línea a intervalos regulares que representan un área cuadrada de la imagen. Ese intervalo es el mismo que representa el espacio entre líneas adyacentes. Finalmente, la digitalización de cada intervalo representa la intensidad de señal de una pequeña área cuadrada de la imagen final. Dado que en un microscopio confocal la forma de la imagen digital se define por el tamaño de la señal electrónica enviada a los espejos de escaneo (Fig. 3-109) a diferencia de la disposición matricial de los fotosensores en el CCD, existe mayor flexibilidad en términos de tamaño y forma de las imágenes digitales provenientes de estos dispositivos.

La combinación de la magnificación de los objetivos y del zoom de escaneo definen las dimensiones de la imagen digital del objeto en el plano. Si se envía mayor cantidad de corriente a los espejos de escaneo (menor magnificación del zoom), se abarcará una mayor área de la muestra. Inversamente, las magnificaciones mayores del zoom enviarán menos corriente a los espejos escaneadores, lo que determinará un área de escaneo menor sobre la muestra. En este caso, el área representada por cada píxel individual será proporcionalmente menor (Fig. 3-110), si se mantiene fija la resolución de escaneo.



**Fig. 3-109.** El espejo galvanométrico escanea el haz del láser a través del plano de foco del objetivo, cambiando el ángulo en el cual la luz pasa a través del punto focal posterior del objetivo. Una mayor deflexión del espejo escaneará la luz sobre una línea más larga de la muestra (B). Cuando los datos de esta mayor longitud se muestran a través del monitor de la computadora, el efecto tiende a reducir la magnificación total de la imagen en comparación con el efecto del ángulo en (A). Si el número de píxeles a lo largo de cada línea se mantiene constante, una línea más larga, implica píxeles más grandes.

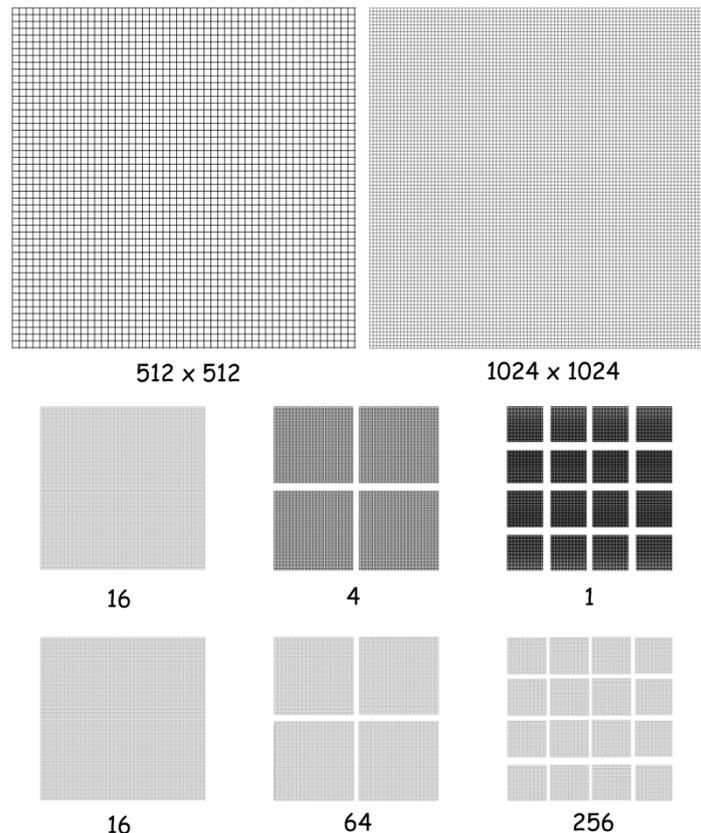


**Fig. 3-110.** Relación entre el zoom y el área escaneada de la muestra. Todas las grillas representan una matriz con resolución de 512x512, pero con variación en la magnificación del zoom (izquierda: 1x; arriba derecha: 2x; abajo derecha: 4x). Una mayor magnificación del zoom (4x) sólo permite el escaneo de una pequeña área de la muestra. Dado que ahora cada píxel representa a un área menor de la muestra, se dice que los píxeles son "más chicos". El desafío es lograr una magnificación del zoom tal que, el tamaño del píxel sea aproximadamente el 50% de la resolución de Abbe para la NA del objetivo y la longitud de onda del haz de luz utilizados.

Un píxel con determinadas dimensiones no puede representar objetos más pequeños que estas. Sin embargo, si el píxel tiene menor tamaño, puede presentar ciertas desventajas: o bien representa una menor área de la muestra o bien aumenta la resolución, donde la misma unidad de área se ve representada por mayor cantidad de píxeles. Si se aumenta esta resolución, habrá que almacenar y analizar más datos; asimismo, se capturarán menor cantidad de fotones en cada píxel o se deberá aumentar el tiempo de captura para no perder información (Fig. 3-111), lo que puede llevar a producir daño en la muestra, especialmente si se trata de especímenes vivos.

Capturar menor cantidad de fotones por píxel también puede generar inconvenientes: dado que la detección de fotones es un evento de la mecánica cuántica, existe cierta incertidumbre intrínseca en el número real de fotones detectados en un determinado momento, sobre todo cuando la cantidad de los mismos es muy baja (10 a 15 fotones). Dicha incertidumbre se conoce como Poisson o ruido estadístico, que es igual a la raíz cuadrada de la cantidad de fotones detectados. Si por ejemplo se cuentan 16 fotones, los que realmente se detectan son  $16 \pm 4$  eventos. El ruido de Poisson (o fotónico) es una limitante física rígida, como lo es la difracción. Por lo tanto, la única forma de reducir la incertidumbre es aumentando la cuenta de eventos (fotones). Por otro lado, si se aumenta el zoom y se reduce la potencia del laser para obtener la misma cantidad de señal por  $\mu\text{m}^2$ , se aumentará aún más la incer-

tidumbre. Por lo tanto, cuando los fotones son escasos, es preferible usar píxeles de un tamaño menor al necesario al recoger la información de la muestra.



**Fig. 3-111.** Cuando se pasa de una resolución de 512x512 a una de 1024x1024, manteniendo el zoom en 1x, la dimensión de cada píxel se reducirá en un 50% (fila superior). La fila intermedia muestra la cantidad de fotones/píxel (16) si la misma cantidad de señal se distribuye en una mayor cantidad de píxeles. En este caso, el nivel de señal de cada uno de ellos disminuirá, mientras que ruido fotónico se verá incrementado. Si el escaneo se realiza más lentamente o si se aumenta la intensidad del láser para que todos los píxeles reciban la misma cantidad de señal al aumentar la resolución (en este caso 16 fotones/píxel) (fila inferior), la señal total de la imagen se verá incrementada y por ende, el riesgo de daño de la muestra.

Como conclusión, la magnificación del zoom en el microscopio confocal debe establecerse una vez que se conozca el tamaño más pequeño de los objetos que se quieran registrar en la imagen digital.

### **Escáner**

Es un dispositivo electrónico, periférico de las computadoras, que tiene la particularidad de explorar o “escanear” (del inglés, “*scanner*”, “*to scan*”) imágenes, texto escrito o impreso y objetos, a través de un sistema óptico, con la finalidad de transformarlos en imágenes digitales (Fig. 3-112). Existen modelos de mesa (plano), manuales e industriales, estos últimos conocidos como escáneres 3D.

Los dispositivos actuales usan un sensor CCD como los de las cámaras de video. Si bien existe el sensor CIS (del inglés, “*Contact Image Sensor*”) que se usa, entre otras cosas, como lector de código de barras, su profundidad de campo es muy limitada, lo cual lo hace poco sensible para el análisis de imágenes.

El escáner plano se compone de un panel o placa de vidrio, bajo el cual hay una luz brillante (generalmente de xenón o fluorescente de cátodo frío), que ilumina el panel y un CCD de exploración que se desplaza. Este tipo de escáneres suelen contener tres filas (matriz) de sensores, con filtros de color rojo, verde y azul (Fig. 3-113).

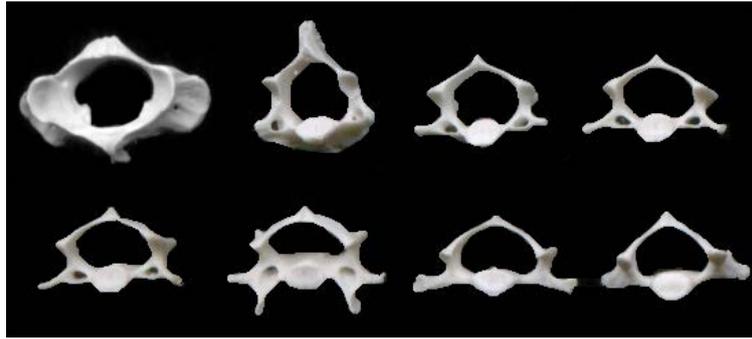


Fig. 3-112. Vértices C1 a T1 de rata, escaneadas a 600 ppi (puntos por pulgada).

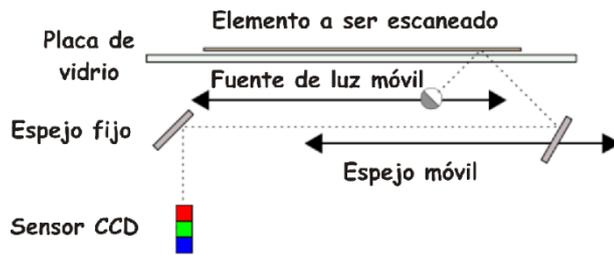


Fig. 3-113. Estructura de un escáner plano.

Los escáneres actuales se conectan a la computadora a través de una interfaz entrada/salida de tipo USB y su información es recolectada por medio de un protocolo o norma TWAIN. Los escáneres más modernos lo hacen a través de una red inalámbrica o del sistema Bluetooth. Pueden volcar datos con una profundidad de color de 24 bits, aunque también los hay de 36 y 48 bits. Su resolución se mide en píxeles por pulgada (del inglés, “*Pixels Per Inch*” - ppi). Si bien el dispositivo cuenta con su propia resolución óptica, en estos equipos normalmente se utiliza la resolución “interpolada”, que por lo general es mayor.

La interpolación consiste en un proceso matemático de simplificación de datos, que entrelaza la estimación de la información entre valores de información real. De esta manera, es posible aumentar la resolución de la imagen (mayor cantidad de píxeles), pero sin ganancia en el incremento de detalles de la muestra. La imagen así generada, solo será más grande.

Cuando un escáner, una cámara o un programa aplican técnicas de interpolación, lo hacen para cambiar la cantidad o la orientación de los píxeles. Al rehacer un muestreo, sobre la cuadrícula inicial se superpone otra de distinto tamaño o frecuencia, y a partir de los valores de intensidad originales se calculan los valores para los nuevos píxeles. Dado que estos valores son calculados y que los píxeles no proceden de la captura original, no se recupera la misma información ya que el promediado resultante suaviza y desdibuja las formas.

Cuando se utiliza la función de interpolación de datos no se obtiene, por lo general, el mismo resultado que se obtendría si se utilizara la imagen original, pero dependiendo del dominio del problema y el método de interpolación usado, la ganancia en simplicidad puede compensar el error. Si bien los equipos actuales reclaman una resolución interpolada máxima de 19200 ppi, la resolución elegida para realizar análisis de imágenes con cierto grado de confiabilidad no debería superar aquella resolución óptica máxima del dispositivo. Esta resolución oscila entre los 600 y 1200 ppi.

En un escáner de 600x1200 ppi, los 600 representan la resolución óptica, mientras que los 1200 representan los pasos mecánicos de la unidad de motor. Este último dato es una especificación importante del dispositivo, pero que no contribuye con la resolución óptica. A modo de ejemplo, en un escáner de 600x1200 ppi se pueden adquirir muestras que estén separadas 1/600 pulgadas en sentido horizontal. Simultáneamente, el motor puede hacer 1/1200 pasos por pulgada en sentido vertical. Si se escanea a 300 ppi, se avanzan 4 pasos de manera simultánea en sentido vertical y se muestrean al 50% en sentido horizontal, para lograr una imagen con resolución de 300x300 ppi. En cambio, si se escanea a 1200 ppi, se avanza de a un paso en sentido vertical, pero en sentido horizontal se interpola un

píxel por cada píxel real escaneado, ya que la resolución seleccionada supera por el doble a la real del equipo. Bajo estas circunstancias, se obtiene una imagen de 1200x1200 ppi. La mayoría de las revistas científicas exigen una resolución de las imágenes de 300 ppi para imágenes microscópicas y 600 ppi para gráficos manuales o computarizados.

### **Adquisición de imágenes**

Para poder analizar las imágenes provenientes de la cámara montada sobre el microscopio o del escáner, se necesita contar con un sistema informático que tome contacto con estos dispositivos. En la actualidad existe una innumerable cantidad de programas comerciales o de dominio público orientados para tales fines. No es el propósito de este libro describir cada uno de ellos, ni tan sólo uno. La intención es sólo comentar las posibilidades que tienen estos programas durante la captura de las imágenes. En los respectivos capítulos se harán descripciones de las funciones de procesamiento y de análisis de estos sistemas informáticos.

Desde que comenzó la era digital y el uso masivo de computadoras en la década de 1980, se produjeron muchos cambios en la arquitectura de los sistemas de cómputos así como en los sistemas operativos que los regulaban. De la misma manera, los programas de manejo de imágenes han ido evolucionando y perfeccionando, no sólo por una cuestión de competencia comercial, sino para adaptarse a los nuevos desarrollos implementados sobre las imágenes, provenientes principalmente del campo de las matemáticas y la física. Pero estos cambios no fueron lineales y en una sola dirección; por el contrario, todos ellos se retroalimentan. Así las modificaciones en el hardware implican cambios en el software y con él, el desarrollo de nuevas aplicaciones, que en sí, inducen a la modificación de software y hardware apropiados para una mejor visualización o ejecución.

Son muchas las consideraciones que hay que tomar en cuenta al adoptar un sistema de captura, procesamiento y análisis de las imágenes. Todo depende de cuál sea el objetivo que se persiga. Algunos de estos parámetros se listan en la Tabla 3-14.

Tabla 3-14. Algunas consideraciones al seleccionar un programa de adquisición, procesamiento y análisis de las imágenes

<b>Captura</b>
Control del sistema de captura (microscopio y cámara) a través de drivers
Observación de las muestras en tiempo real
Procesamiento de las muestras en tiempo real
Captura de imágenes secuenciales en tiempo real
<b>Imágenes</b>
Soporte de imágenes de diferente profundidad de bits
Soporte de imágenes multidimensionales
Soporte de diferentes formatos de archivos gráficos
<b>Procesamiento</b>
Herramientas para el procesamiento de imágenes (LUT, filtros, FFT)
Operaciones lógicas y matemáticas con imágenes
Herramientas de deconvolución
<b>Segmentación</b>
Segmentación de imágenes por diferentes criterios
<b>Análisis</b>
Generación y análisis de imágenes 1D, 2D, 3D, 4D y 5D
Amplia variedad de mediciones y recuentos automáticos y/o manuales
Generador de histogramas y estadísticas
<b>Programación</b>
Manejo de macros y rutinas de programación
<b>Diseño</b>
Interfaz amigable

Muchos de estos programas cuentan con algoritmos llamados **operadores** o **conductores** (del inglés, “*drivers*”), que conectan la computadora con los dispositivos de captura (microscopio, cámara, escáner). Esto permite que durante el proceso de captura se pueda regular la magnificación, el tiempo de adquisición, el brillo y el contraste, así como, la adquisición única o multidimensional de las imágenes, a través del mismo programa. Es de suponer que, si un mismo programa controla los dispositivos de transmisión y captura, existirá una correlación directa entre lo que se captura y los parámetros de los dispositivos. Es decir, al establecer la puesta a punto inicial y conocerse cuáles son las características del microscopio (objetivos, condensador, luz incidente, canales de fluorescencia, etc.) y de la cámara (resolución de captura, cuadros por segundo, binning, etc.) la calibración espacial, la profundidad de bits y la dimensionalidad de las imágenes capturadas, entre otros parámetros, quedarán establecidos automáticamente.

La importancia de trabajar en tiempo real es fundamental para la captura de imágenes de organismos vivos, pero a su vez, permite procesar imágenes que pueden ser descartadas sin la necesidad de ser almacenadas, lo cual evita ocupar un espacio en memoria o en el disco, como ocurre con aquellas que son capturadas.

Muchos programas de análisis cuentan con herramientas para la visualización de imágenes 3D, pero son pocos aquellos que permiten analizar cuantitativamente sus datos. Mediante herramientas de análisis 3D se pueden obtener datos volumétricos, que de otra manera sólo podrían ser inferidos mediante diversas técnicas de muestreo y posterior análisis matemático. La reconstrucción de las imágenes 3D o 4D, por otro lado, posibilita observar detalles que la animación de imágenes secuenciales no permite ver. Asimismo, el análisis de imágenes time lapse (2D + tiempo), facilita la comprensión de la funcionalidad del objeto que se esté desplazando, así como el análisis del flujo de una sustancia fluorescente que se esté liberando.

Al elegir un programa de análisis hay que seleccionar aquellos que ofrezcan la mayor variedad de funciones de procesamiento, segmentación, recuento y medición. La alta gama de posibilidades incrementa el éxito final.

La posibilidad de contar con macros (ver Capítulo 6) genera una extraordinaria reducción del tiempo de captura y posterior procesamiento manual de las imágenes. Si bien esto tiende a reducir la labor del usuario, se deben tomar recaudos para evitar los errores aleatorios que se pudieran cometer (ver Capítulo 2).

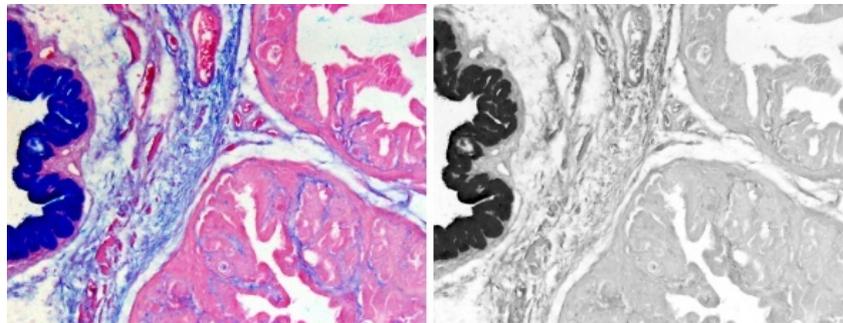
El análisis de imágenes no es un proceso de sólo “apretar el botón”. Por el contrario, requiere de muchas horas de preparación de las muestras, captura de las imágenes y todos los procesos restantes. Por esta razón, es necesario contar con un programa que permita facilitarle la tarea al usuario, agrupando los algoritmos que sirvan para un mismo propósito o que permita que el mismo usuario las agrupe, reduciendo al máximo la cantidad de pasos necesarios para obtener un único resultado. Asimismo, es deseable contar con un entorno de trabajo agradable y funcional, ya que se debe interactuar con el mismo durante largas jornadas laborales.

Además del software de captura, procesamiento y análisis de las imágenes, resulta indispensable contar con una computadora que sea capaz de manejar su “peso”, tanto para su manipulación en memoria como para su posterior almacenamiento. Al seleccionar una computadora, es necesario particularizar en tres elementos de la misma: su unidad central de procesamiento o procesador de datos (CPU), considerando fundamentalmente su velocidad de procesamiento, la memoria RAM (memoria de acceso aleatorio) y la capacidad y velocidad del disco duro.

La velocidad de transferencia de datos del disco duro puede limitar la velocidad de las animaciones en imágenes time lapse y de la visualización 3D, sobre todo cuando la pila de imágenes es muy extensa. La velocidad de la CPU es fundamental para todo el procesamiento de datos, sean estos secuenciales o simultáneos. Con el avance de la tecnología informática, se fueron diseñando coprocesadores, como la unidad de procesamiento de gráficos (del inglés, “*Graphic Processing Unit*” - GPU) que se dedica exclusivamente al procesamiento de gráficos y a las operaciones de coma flotante. De esta manera, se facilita la tarea de la CPU, sobre todo para el procesamiento de imágenes 3D voluminosas. La memoria RAM es la que determina la cantidad de imágenes que se pueden procesar simultáneamente en tiempo real.

Cuando se trabaja con muestras vivas, pero también con muestras estáticas, es necesario evitar los artefactos mecánicos durante el proceso de captura manteniendo bajo, de esta manera, el ruido acústico. Conviene también cerrar puertas y evitar tocar cualquier parte del sistema microscópico. Es necesario aislar el equipo de captura de vibraciones que pudieran provenir del piso donde se apoyan, a través de una mesa anti vibratoria. Los sistemas refrigerantes mediante ventiladores deben estar mecánicamente desacoplados del microscopio. Como se mostró previamente (Fig. 3-71), las vibraciones pueden producir, por un lado, variaciones en el contraste de las imágenes que se están capturando, pero por otro lado, pueden distorsionar los objetos, alterando de esta manera sus contornos.

Previo a la captura de las imágenes microscópicas se deben ajustar los diversos parámetros del microscopio, la cámara y el software, ya que de esto depende en gran parte su calidad final. La clase y la profundidad de bits de las imágenes resultantes deben determinarse en primera instancia. En términos generales, las muestras histológicas son teñidas mediante diversos procesos histoquímicos que generan contrastes de color de utilidad para el observador y para el ulterior análisis. En estos casos, lo ideal es capturar las imágenes en color real (24 bits) ya que en una imagen monocromática se perderían los contrastes de las diferentes tonalidades (Fig. 3-114).



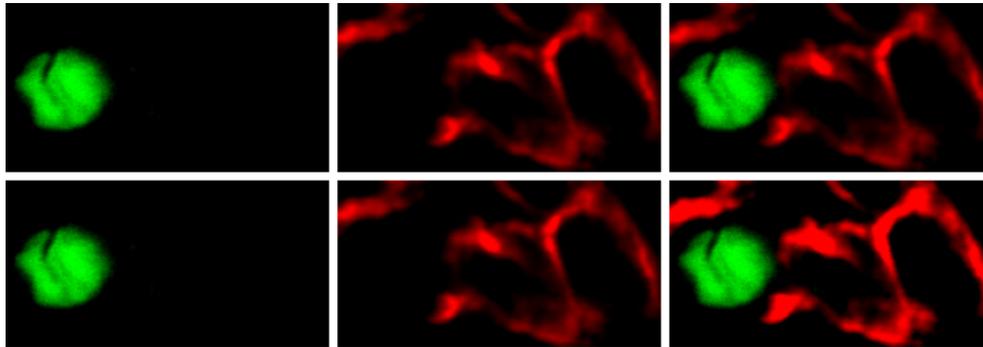
**Fig. 3-114.** Tinción histoquímica con azul Alcian de la glándula de Skene de la vizcacha. Izquierda: captura RGB 24 bits. Derecha: captura monocromática 8 bits.

Sin embargo, cuando se trabaja con muestras fluorescentes lo ideal es la captura monocromática (de 8, 12 o 16 bits) y su posterior pseudo-coloración. Esto se debe a que, por lo general, se captura un solo canal por vez, de acuerdo al filtro de fluorescencia con el que se esté trabajando, para luego hacer la superposición con otros canales fluorescentes. Capturar un solo canal de 8 bits mediante una imagen color de 24 bits, implica la adquisición del triple de información necesaria. Por ejemplo, si se captura el canal rojo mediante una imagen RGB, se añadirán valores del rojo, pero también del verde y el azul, aunque la información de estos dos últimos sea nula. Es decir, un rojo puede ser puro y por lo tanto tener valores de 0 a 255, con valores de 0 para el verde o para el azul, o bien puede estar combinado con valores de estos últimos. En ambos casos, la información triplica a la obtenida con una imagen monocromática de 8 bits y a su vez, en el último de los casos, los datos correspondientes a los colores adicionales que se fusionaron para expresar el rojo, se perderán, o peor aún, se extrapolarán en el resultado final de cada uno de los canales, cuando se quiera hacer una composición de varios de ellos (Fig. 3-115).

Al hablar del criterio de Nyquist para determinar la frecuencia de muestreo, se mencionó que en ciertas circunstancias se puede llegar a producir fenómenos de sobremuestreo y submuestreo. En términos generales, es preferible sobremuestrear a perder información de pequeños elementos por falta de resolución de la imagen. Más aún, cuando se observe una muestra fluorescente que no sufra el efecto deletéreo de la luz (emitida por una lámpara de arco o una fuente láser), el sobremuestreo puede mejorar la visibilidad por aumento de los datos registrados y, por ende, la reducción del efecto producido por el ruido fotónico (Poisson). Dado que la mayoría de los sensores de las cámaras digitales se saturan cuando son expuestos a más de 100.000 fotones/fotosensor, para poder observar contrastes entre los objetos es necesario incrementar la resolución de la imagen.

No obstante, en ciertas circunstancias, tales como el registro de variaciones de un fluoróforo en respuesta a la concentración de ciertos iones, es preferible que se realice un submuestreo, ya que la medición de pocos y grandes píxeles, y durante un tiempo más pro-

longado, puede brindar resultados más exactos, sobre todo cuando los cambios esperados en las propiedades del fluoróforo no son muy marcadas. En estas muestras, la resolución espacial elevada es imposible debido a la difusión de la luz, mientras que se requiere de una elevada resolución de intensidad para que los pequeños cambios se hagan visibles.



**Fig. 3-115.** Inmunofluorescencia del núcleo de células ependimarias que expresan GFP (verde) y del citoplasma de las mismas células que muestran filamentos intermedios de vimentina (rojo). En las columnas izquierda y central de la hilera superior se muestran imágenes monocromáticas de 8 bits pseudo-coloreadas en verde o en rojo, respectivamente. En la tercera columna se muestra la superposición de ambos canales fluorescentes ("merge"). En la fila inferior se muestran las mismas imágenes capturadas individualmente como color de 24 bits (RGB). En la imagen de la tercera columna, donde se superponen ambos canales, el color rojo se encuentra más saturado debido a la sumatoria de intensidades de ambas imágenes individuales.

Otros parámetros que se pueden establecer previos a la captura de las imágenes son los correspondientes a la intensidad de la luz (brillo, contraste y gamma). Estos deben ser establecidos para lograr el máximo contraste entre los objetos a ser medidos o cuantificados y el fondo. De la misma manera, se pueden incluir filtros previos a la captura para, entre otras cosas, homogeneizar la luz de los objetos o del fondo. La inestabilidad de la fuente de luz o del detector durante el tiempo requerido para escanear o digitalizar una imagen pueden generar ruidos en el producto resultante. Este ruido se traduce como una imagen con variaciones en el brillo en regiones uniformes. Para minimizar este defecto se debería capturar la imagen con un tiempo de escaneo inferior o superior al tiempo de fluctuación de la luz.

Cuando se trabaja con el microscopio confocal, se debe establecer la apertura del pinhole, que dará las propiedades de la confocalidad. Si dicha apertura es muy pequeña ( $<0,1$  unidades Airy) la resolución XY del microscopio se incrementa en un 40% por encima del establecido por el límite Abbe, pero sólo al costo de reducir el nivel de señal en un 95%. Al abrir el pinhole entrará más luz, pero se irá reduciendo la resolución XY. Al igualar a 1 unidad Airy, se acepta hasta el 80% de la luz proveniente del plano focal. Al aumentar el diámetro, entrará mayor cantidad de luz, pero se perderá mayor resolución lateral y eventualmente resolución axial. Para la mayoría de las muestras, lo ideal sería tener una apertura de pinhole igual a 0,5 unidades Airy, es decir, el diámetro en el cual el disco de Airy alcanza el 50% de su pico de intensidad. Bajo estas características, el 60% de la luz emitida en el plano focal de la muestra alcanzará al detector (PMT). Aún así, la resolución lateral seguirá siendo mejor que la obtenida en un sistema no confocal.

La visibilidad de los objetos pequeños observados en un microscopio confocal no sólo depende de la óptica del sistema, sino también de la detección de un número suficiente de fotones para permitir que la señal emitida por la muestra sea estadísticamente discriminada de aquella del fondo. Esto se debe a que los objetos pequeños se transmiten a través del sistema óptico con menos contraste que los objetos grandes. Por lo tanto, cuando se quieran registrar objetos de pequeño tamaño, se deben guardar imágenes con mayor profundidad de bits que incrementan los niveles de gris.

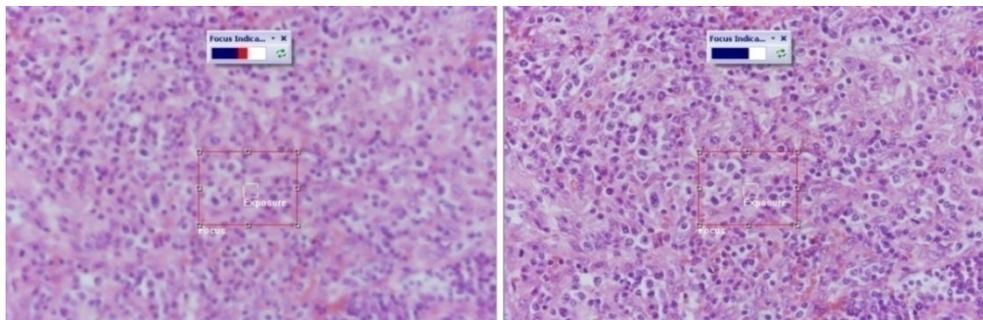
Cuando se captura una imagen color se debe establecer el balance de blancos (Fig. 3-97) ya que, de esta manera, será más efectiva la separación de colores y con ello, el contraste entre los objetos y el fondo. Normalmente, este proceso se realiza con el objetivo de 10x debido a que es una magnificación intermedia en toda la escala de magnificaciones de los objetivos más comunes.

En algunos programas, el tiempo de exposición de captura está relacionado automáticamente con la cantidad de luz que proviene de la muestra, ya sea por emisión de fluorescencia, o por la intensidad de la luz proveniente del microscopio. En otros, este valor se puede establecer también de manera manual, en cuyo caso, el usuario debe establecer la cantidad de luz incidente que quiere capturar.

Asimismo, hay que establecer la magnificación de las imágenes obtenidas. Esto es válido tanto para los programas que manejan automáticamente los dispositivos periféricos como para aquellos de modificación manual. Como fuera mencionado anteriormente, la cantidad de luz incidente varía con la magnificación y por ende, los contrastes también pueden variar. Los programas automatizados normalmente establecen la luz incidente de acuerdo a la magnificación del objetivo. En algunos programas, la selección de la magnificación permite establecer de manera automática la calibración espacial de la imagen obtenida. En otros, dicha calibración debe realizarse de manera manual.

En un microscopio confocal, el área de la muestra representada por un único píxel varía con la magnificación y la NA del objetivo, así como con la magnificación del zoom aplicado. El ajuste del zoom controla la magnitud de la corriente suministrada a los espejos de exploración y con ello, el tamaño de la muestra a escanear. Las pequeñas corrientes hacen que el haz del laser escanee áreas más pequeñas de la muestra, produciendo una mayor magnificación. Por el contrario, las grandes corrientes de exploración producen baja magnificación debido a que el escaneo se produce sobre grandes áreas de la muestra.

Es necesario controlar el foco de la imagen a ser capturada, ya que una imagen fuera de foco en su totalidad o en distintos puntos puede ser causal de posteriores errores de interpretación y análisis. El foco depende en parte de la calidad del material histológico, de la magnificación del objetivo y de la distancia entre este y la muestra. Las imágenes fuera de foco generan un contorno poco claro de los objetos (Fig. 3-116). Las imágenes así formadas tienen un aspecto esmerilado que no permite distinguir el borde de los mismos. Si bien estas imágenes pueden ser posteriormente procesadas para, de alguna manera, restablecer la focalidad mediante diversos algoritmos (filtros), lo ideal es que la imagen capturada se encuentre en el encuadre apropiado para su pronto análisis.



**Fig. 3-116.** Algunos programas de captura vienen provistos con un indicador de foco que establece el punto exacto donde los objetos tienen bordes netos. Izquierda: imagen fuera de foco. Derecha: misma imagen, enfocada.

Cuando se trabaja con cortes gruesos, como con las secciones del tejido nervioso, resulta difícil encontrar un foco único para la imagen. Si bien se puede realizar una captura 3D (ver más adelante), donde cada imagen de la pila tenga sectores en foco, algunas veces se requiere de ciertos algoritmos que ensamblen toda la pila en una única imagen 2D enfocada, durante la captura. Estos algoritmos se conocen como **foco extendido de la imagen** (del inglés: “*Extended Focus Image*” - EFI) o **profundidad de campo extendida** (del inglés: “*Extended Depth of Field*” - EDS). Para realizar este proceso de manera automatizada se requiere de un eje Z motorizado del microscopio. Este dispositivo no es necesario si el proceso se realiza en modo manual. En la figura 3-117 se observa la reconstrucción final de un sector del cerebelo, a partir de varios focos tomados en profundidad.

Por lo general, las cámaras ofrecen la posibilidad de variar la resolución de la imagen capturada, hasta un máximo permitido. Algunas cámaras mantienen fijas todas las opciones de resolución, mientras que otras permiten la interacción con el usuario. En algunos drivers de cámara, la variación del valor sólo implica una reducción del área capturada por

el dispositivo, mientras que en otros, esta variación significa una modificación del valor actual del píxel, es decir, se modifica la resolución espacial de la imagen. Es por ello, que el usuario debe conocer las propiedades de las cámaras, sobre todo, cuando se hacen estudios comparativos entre imágenes.

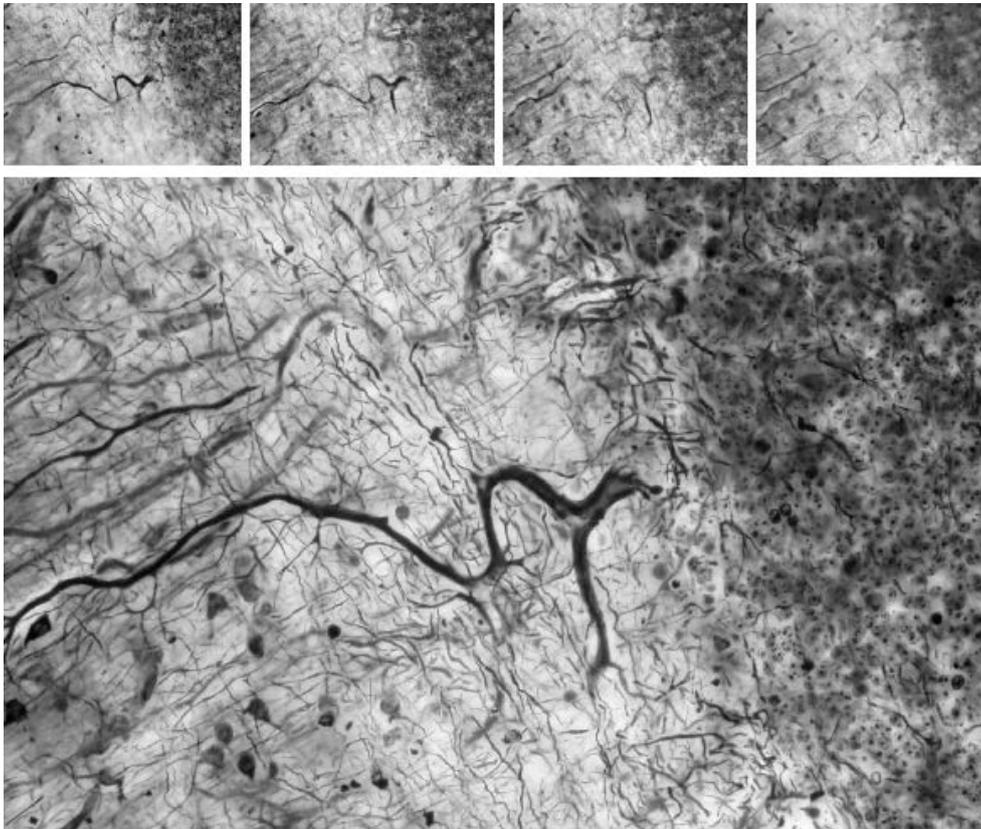


Fig. 3-117. Reconstrucción del foco en una imagen 2D a partir de varios focos tomados en profundidad, de un corte de cerebello de 40  $\mu\text{m}$  de espesor, teñido con técnicas argénticas. Este procedimiento se realizó previo a la captura de la imagen final. Arriba, cuatro secciones tomadas en profundidad mostrando distintos focos. Abajo: imagen 2D reconstruida.

Una variante en la captura de imágenes es la “integración” de las mismas. Este proceso incluye las operaciones de **promediar** y de **acumular**. En la primera, se capturan varias imágenes en una unidad de tiempo, con los mismos patrones de la cámara. Estas imágenes se integran y la resultante final y única, es una imagen con un valor de píxel igual al promedio de todos los píxeles que se encuentran en esa posición dentro de la imagen (Fig. 3-118). Este tipo de proceso de captura se utiliza para reducir el ruido dentro de la imagen. Cabe acotar que no necesariamente se tiene que promediar por el mismo número de imágenes que se utilizaron para realizar la integración, sino que este puede ser menor. La figura 3-119 muestra un ejemplo de integración promedio.

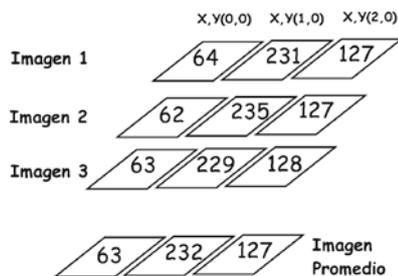
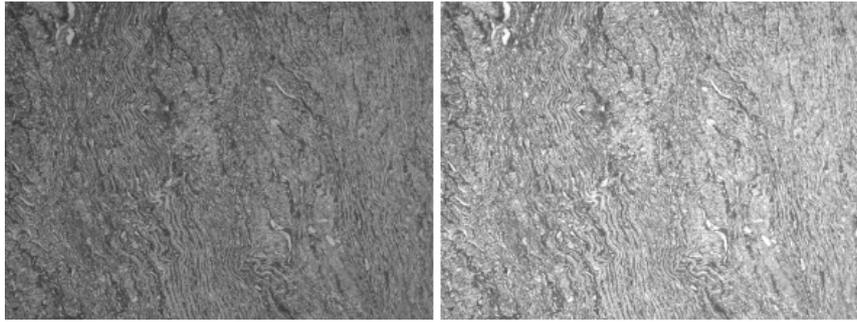


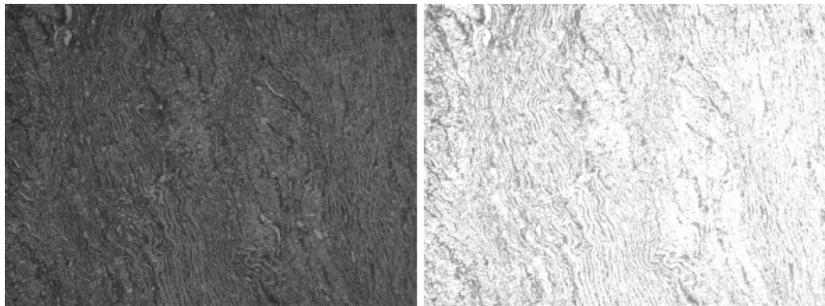
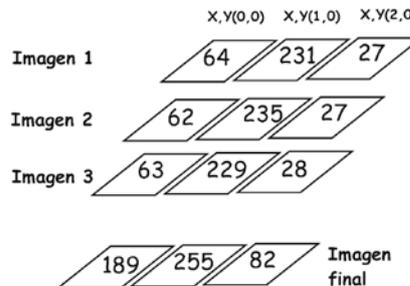
Fig. 3-118. Formación de una imagen integrada, luego de promediar los valores de tres imágenes tomadas para este propósito. Se promedia el valor individual del píxel para cada posición, en cada una de las imágenes integradas.



**Fig. 3-119.** Izquierda: imagen original. Derecha: imagen integrada entre 3 y dividida entre 2 imágenes originales. La resolución de ambas imágenes es la misma.

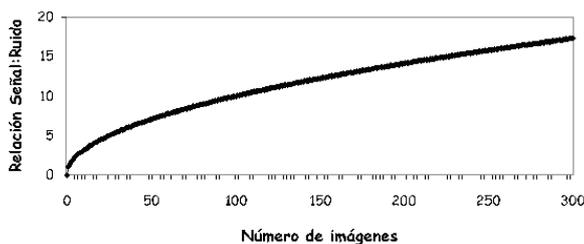
Mediante el proceso de integración también se puede acumular información del píxel. Este proceso está recomendado cuando se quiere incrementar su valor de intensidad, bajo condiciones de escasa iluminación. El procedimiento consiste en una simple sumatoria de valores. Cabe mencionar que aquellos que superen el valor máximo de rango dinámico para el tipo de imagen que se esté capturando, permanecerán con el máximo valor posible (Fig. 3-120). En la figura 3-121 se puede observar un ejemplo de integración por sumatoria.

**Fig. 3-120.** Formación de una imagen integrada luego de sumar los valores de tres imágenes tomadas para este propósito. Se suma el valor individual del píxel para cada posición, en cada una de las imágenes integradas. En una imagen de 8 bits, aquellos píxeles cuya sumatoria supere el valor del 255 permanecerán con este valor de saturación.



**Fig. 3-121.** Izquierda: imagen original. Derecha: imagen integrada por sumatoria de 3 imágenes originales. La resolución de ambas imágenes es la misma.

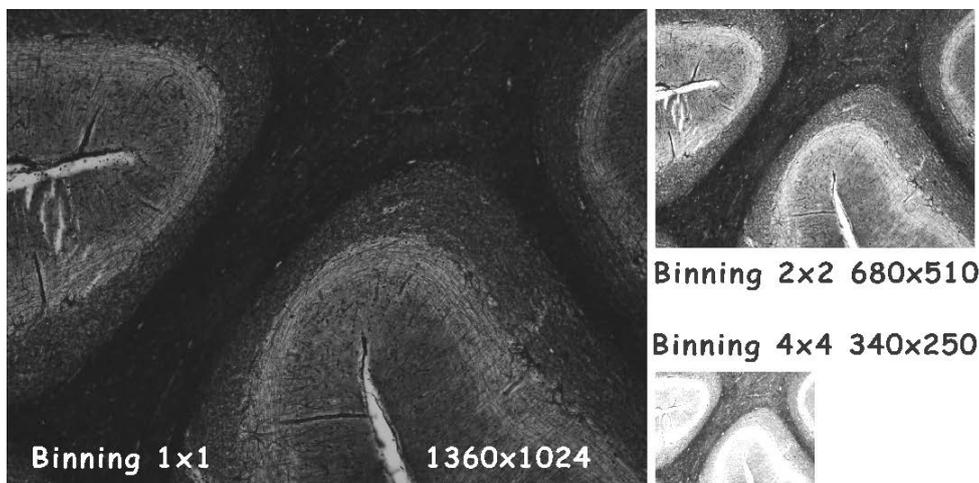
El proceso de integración implica una reducción en el ruido y una mejora en la calidad de la imagen, que es proporcional a la raíz cuadrada del número de imágenes adquiridas. En la figura 3-122 se observa que la relación señal:ruido de imágenes promediadas se incrementa a medida que aumenta la raíz cuadrada de la cantidad de imágenes adquiridas.



**Fig. 3-122.** Relación señal:ruido para la cantidad de imágenes integradas.

Dado que el tiempo de integración es múltiplo de la cantidad de imágenes tomadas, es necesario contar con suficiente memoria RAM para evitar que el programa descarte imágenes de la secuencia y para permitir la menor variación de los píxeles cuando se capturen objetos animados. Para la captura de objetos inanimados estas reglas no cuentan y sólo deben estar presentes por cuestiones de variación en la intensidad de la luz incidente. En microscopía de fluorescencia hay que considerar, además, el proceso de fotoblanqueo. Para ello, lo ideal es la captura por integración mediante el uso de cámaras refrigeradas o a través del promedio de imágenes en el menor tiempo posible.

El binning es utilizado con frecuencia cuando la señal fluorescente es muy baja o la densidad del tejido que debe atravesar la luz es muy alta. De esta manera, reduciendo la resolución de la imagen capturada se incrementa la señal en cada punto, a la manera que lo haría la integración acumulativa. En la figura 3-123 se puede observar la diferencia en la intensidad de los píxeles entre una imagen correspondiente a un tejido nervioso de espesor grueso y capturada con su máxima resolución y otras del mismo tejido capturadas con binning de 2x2 y 4x4. Claramente se observa el incremento en la intensidad de luz a expensas de la resolución final de la imagen.

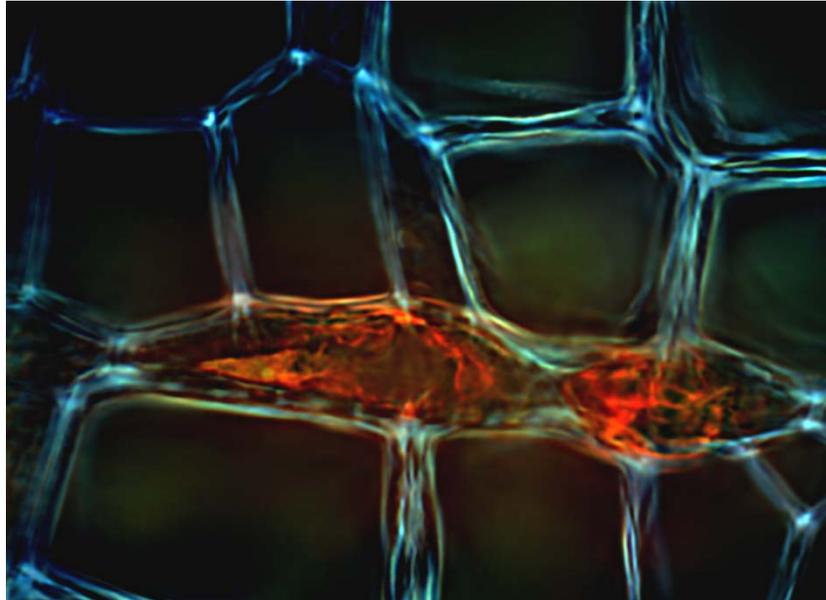


**Fig. 3-123.** Cuando las imágenes con binning de 1x1 son de baja intensidad de luz, es posible incrementar el binning previo a su captura, a expensas de la pérdida de resolución de la imagen resultante.

Para evitar la fotodestrucción fluorescente de organismos vivos, es necesario recordar la propiedad que presentan los objetivos de mayor NA de capturar un mayor número de fotones en comparación con los de baja NA. Asimismo, en un microscopio confocal se debe utilizar el zoom óptimo compatible con la resolución requerida. Hay que tener en cuenta, además, que cuando el plano de foco se encuentra a más de 5  $\mu\text{m}$  del cubreobjetos, se deben utilizar objetivos de inmersión en agua, para evitar pérdida de señal producida por la aberración de esfericidad al utilizar lentes de inmersión en aceite. Se debe reducir, también, el tiempo de exposición a la luz. Finalmente, la eficiencia fotónica de un microscopio confocal puede ser maximizada utilizando los mejores espejos, el tamaño apropiado del pinhole para la resolución requerida (en X, Y y Z) y los fotodetectores que brinden la mayor eficiencia cuántica de acuerdo a la longitud de onda de la señal.

Como fuera definido en el Capítulo 1, las imágenes multidimensionales pueden resultar del agregado de una dimensión más a la previa o por combinatoria de dimensiones. Cuando se realizan capturas de imágenes multidimensionales es necesario calibrar el eje Z del microscopio para establecer los posibles límites superior e inferior de desplazamiento vertical de la platina. Si se trabaja con platina motorizada para capturar toda la muestra histológica por sumatoria de imágenes parciales (alineación de imágenes, “*stitching*”) (6D), es necesario calibrarla para establecer los límites de la muestra a ser escaneada. Asimismo, se debe alinear la cámara de video con la platina, ya que el proceso supone una superposición de la imagen previa con la posterior, que debe ser lo suficientemente delicada como para que la unión entre ambas imágenes pase desapercibida.

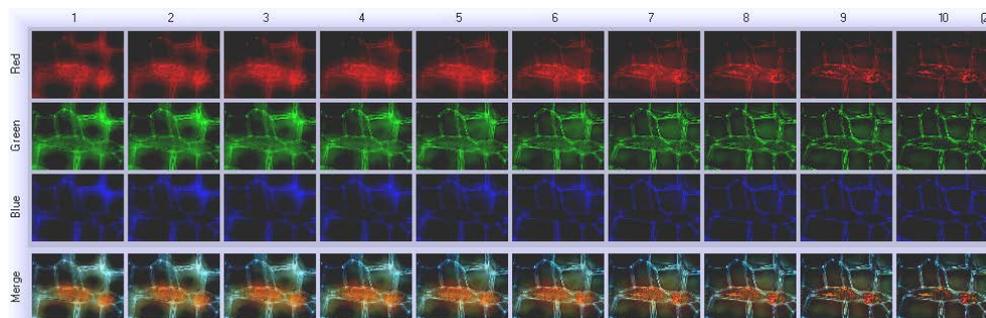
Si se desea adquirir una imagen time lapse (4D) se necesita establecer la cantidad de imágenes a capturar, el tiempo total de captura y el intervalo entre las mismas. Cuando la captura multidimensional incluye canales de fluorescencia (5D) hay que establecer: el fluoróforo a ser detectado (longitud de onda de excitación), el cubo de filtro apropiado para tal fluorocromo, el tiempo de exposición para cada longitud de onda y la apertura o cierre del shutter (obturador del paso de luz) automático o manual. Una imagen 5D puede visualizarse como imagen 2D con los canales fluorescentes superpuestos (Fig. 3-124) o como una secuencia de cada uno de los canales, para cada una de las imágenes de la pila (Fig. 3-125).



**Fig. 3-124.** Visualización de una imagen 2D, que fuera originalmente 5D (proyección en Z, con 3 canales fluorescentes).

Una vez que las imágenes simples o multidimensionales son capturadas, deben ser almacenadas en un dispositivo electrónico para su posterior recuperación y continuación del análisis. Para su almacenamiento, hay que considerar el formato con que serán archivadas (ver Capítulo 1) y su tamaño.

Existen programas que cuentan con una librería de macros que permiten la captura de múltiples imágenes de manera automatizada (ver Capítulo 6). Estos macros pueden realizar cambios en los parámetros de la cámara, controlar el microscopio y sus partes, capturar la imagen con las condiciones requeridas y almacenar el producto obtenido. Los programas que cuentan con editores de macros permiten personalizar la captura según las necesidades del usuario.



**Fig. 3-125.** Expansión de la imagen 5D de la Fig. 3-124. Se visualizan los 10 niveles de proyección en Z, para cada uno los 3 canales fluorescentes. En la última hilera se observa la agrupación (merge) de los 3 canales para cada una de las posiciones en Z.

# Capítulo 4

## Procesamiento de las Imágenes

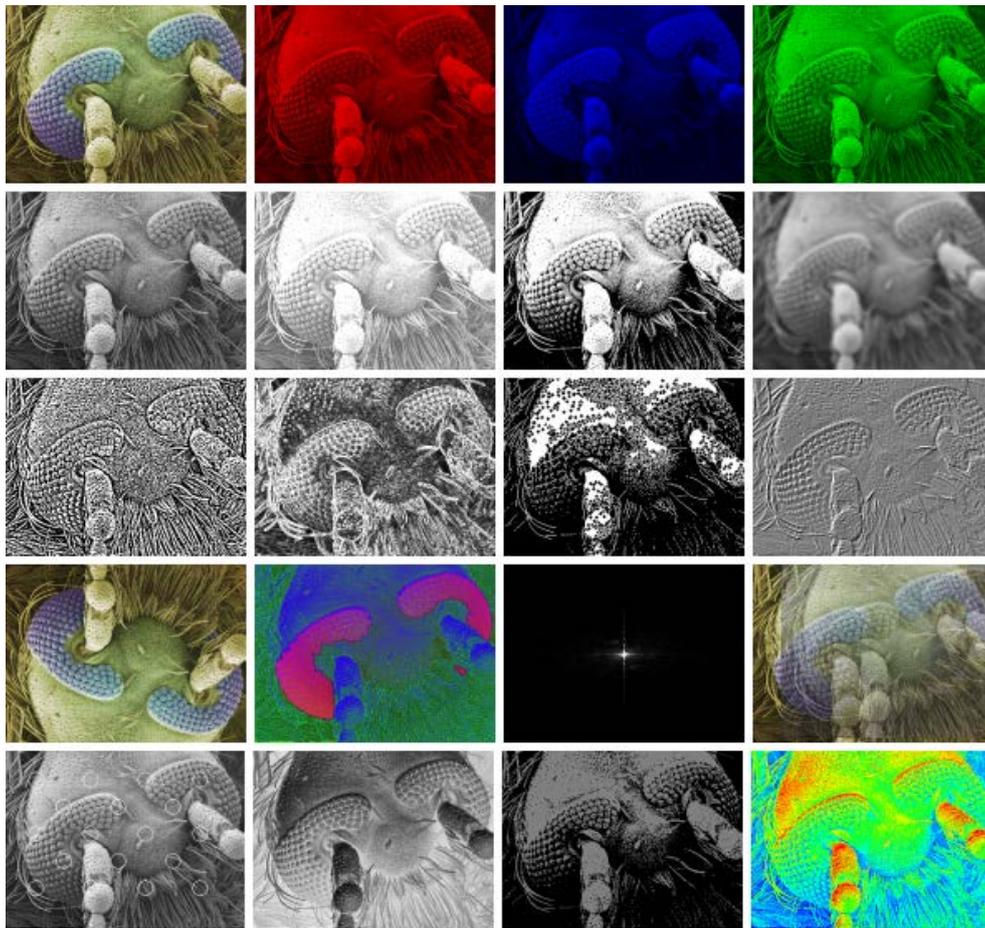


Imagen de la cabeza de un mosquito, procesada mediante distintos procedimientos (de arriba a abajo y de izquierda a derecha): imagen color (RGB); canales rojo; azul y verde. Imagen monocromática; modificación en la intensidad de luz y el contraste. Filtros LowPass; Gauss; Sobel; Pruning y Sculpt. Rotación de la imagen color; transformación a color HSI; aplicación de la transformada de Fourier sobre la imagen monocromática; superposición de dos imágenes de color. Aplicación de una grilla estereológica; inversión la imagen mediante los operadores lógicos NOT y AND; pseudo-coloración de la imagen monocromática.

## ***Generalidades***

El procesamiento de las imágenes implica una gran cantidad de eventos tendientes a modificar los valores de intensidad de los píxeles, con el propósito de incrementar el contraste entre los objetos a ser cuantificados o medidos y el resto de los objetos, comúnmente denominados “fondo”. Estos procesos incluyen la corrección de defectos, su filtrado, el realce de la imagen, la umbralización (del inglés: “*thresholding*”) y las operaciones matemáticas. En el presente capítulo se verán cada uno de estos procesos, así como los ejemplos de sus efectos.

Dado que el procesamiento implica cambios en el valor de los píxeles, sería deseable evitar cualquier tipo de manipulación sobre las imágenes previo al análisis morfológico o cuantitativo, sobre todo en aquellas en las que deban hacerse estudios comparativos. Hay que tener en cuenta que los procesos que se realicen sobre una imagen deben aplicarse sobre la totalidad de aquellas que se comparen. Esto no garantiza, no obstante, que los cambios que se apliquen vayan a tener el mismo resultado sobre todas ellas por igual. Como se expresara en el Capítulo 3, cuanto mayor sea el ajuste que se realice sobre el equipamiento (microscopio, cámara, software) previo a la captura, mayor similitud habrá entre las imágenes obtenidas y, por ende, existirá mayor veracidad en los valores numéricos obtenidos.

El procesamiento de las imágenes surge como consecuencia de la falta de perfección en la captura. La buena voluntad y el deseo no van de la mano de las posibilidades que tienen los sistemas periféricos para capturar las imágenes. Ni aún teniendo los equipos más costosos se puede garantizar la ausencia de defectos, o al menos, ciertas imperfecciones en las imágenes obtenidas, como sucede en la captura en tiempo real, ya que es difícil pensar en la posibilidad de obtener varias imágenes y luego promediarlas o sumarlas para mejorar su expresión. La intensidad de la iluminación artificial que va decayendo con el tiempo o la tensión dependiente de la línea eléctrica a la cual está conectado el equipo también pueden ser causales de imperfecciones. Asimismo, se puede incluir la irregularidad en la superficie de la muestra a capturar, ya que la luz incidente será distinta en las distintas porciones de tejido, proceso que deberá ser corregido una vez que la imagen haya sido capturada. Por lo general, la luz emitida por sustancias fluorescentes va decayendo con el tiempo. Por esta razón, en ciertas circunstancias es preferible sacrificar el factor tiempo y realizar procesos posteriores de procesamiento, en aras de la obtención de datos más fiables. Es necesario recordar, asimismo, todas las aberraciones provenientes de las propias lentes (ver Capítulo 3) y los defectos de la misma luz emitida, para comprender porque siempre se obtienen imágenes imperfectas. No obstante, para muchos estudios la perfección no es necesaria, mientras que obtener la mejor imagen contrastada es una obligación.

Existen diversas maneras de realzar las imágenes. En este proceso no se pierden píxeles sino que se redistribuyen o se alteran sus valores para lograr un mejor contraste y con ello, producir un mejor examen o interpretación. El realce también puede utilizarse para corregir defectos de iluminación, ya sea por exceso o falta de luz, exceso o falta de contraste o defectos en las lentes del microscopio o de las cámaras. Finalmente, en muchos casos, el realce de la imagen permite distinguir más fácilmente entre objetos y fondo, y por lo tanto, hace más sencillo el proceso de cuantificación posterior.

El procesamiento de las imágenes se puede llevar a cabo de diversas maneras: en el dominio espacial, como lo hacen diversos filtros lineales o no lineales, en el espacio de frecuencial, mediante procesos matemáticos entre imágenes o simplemente mediante manipulación del contraste. Todos estos procesos serán analizados con detalle a lo largo del capítulo.

La manipulación de las imágenes insume tiempo de procesamiento, sobre todo cuando los diversos algoritmos son aplicados sobre la totalidad de las mismas. Por ello, es necesario que la computadora que procese estas imágenes disponga del procesador electrónico de mayor velocidad posible y de suficiente memoria RAM.

## ***Corrección de defectos***

El ruido en las imágenes puede provenir de muchas fuentes. Una de ellas proviene de la utilización de filtros de fluorescencia de banda estrecha, ya que la poca cantidad de foto-

nes que pueden atravesarla genera imágenes oscuras. Este defecto se agrava al adquirir imágenes seriadas de muy corta duración, para la medición de la actividad en función del tiempo. Este error se puede subsanar con el procedimiento de integración (promedio o sumatoria) vistos en el Capítulo 3, ya que mediante esta técnica podría reducirse el ruido de las mismas. Si bien la integración se puede realizar mediante el programa de captura, existen cámaras que almacenan la integración de los fotones antes de digitalizar la imagen y con ello se reduce el ruido. Sin embargo, ambos ruidos son diferentes: aquel producido por la corriente oscura se reduce con el uso de cámaras refrigeradas (ver Capítulo 3) y permite, a su vez, capturar una mayor cantidad de fotones. Por lo tanto, cuando se obtienen imágenes muy oscuras, lo ideal es utilizar la integración dentro de la cámara, para evitar que cada píxel individual llegue a su saturación. Esto generará el menor ruido posible y la mejor imagen. En una imagen brillante, lo ideal es promediar varias de ellas, para reducir la variación de los píxeles debido a los ruidos de lectura aleatorios. Esta integración la realiza el programa de captura.

Existen diversas formas adicionales para eliminar el ruido, como por ejemplo la aplicación de filtros de diversos tipos. Si el ruido se concibe como “bruma” sobre las imágenes, existe un proceso de eliminación de la misma conocida como deconvolución.

### **Expansión de contraste**

La adquisición de una imagen libre de ruido o el procesamiento de las mismas para eliminarlos no garantizan que la imagen resultante pueda ser bien visualizada o interpretada por el observador o el programa de análisis.

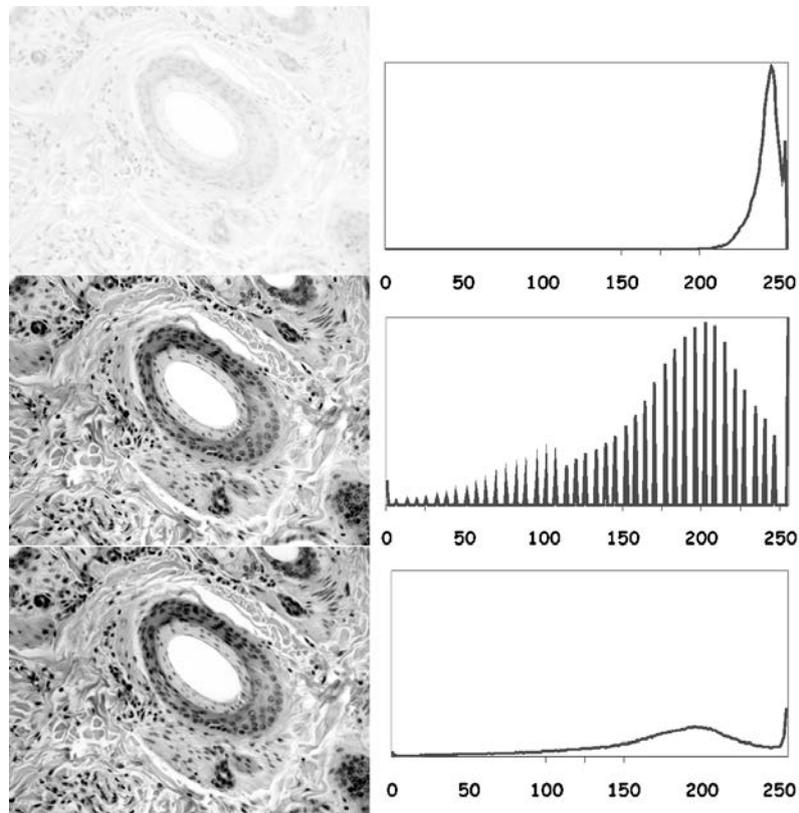
El rango de luz es un determinante del contraste entre los objetos y el fondo. El rango dinámico de las imágenes es más pequeño que el de las cámaras, por lo tanto, las imágenes obtenidas con cámaras con rango dinámico estrecho producirán imágenes con bajo contraste. La figura 4-1 (arriba) muestra una sección microscópica de piel en la que se observa un folículo piloso. La imagen fue capturada con un objetivo de 40x con baja apertura numérica (NA) en un microscopio de luz. La iluminación del microscopio y la tinción débil de la muestra generó un bajo contraste total. El histograma correspondiente a la imagen monocromática de 8 bits es un gráfico del número de píxeles en cada uno de sus 256 niveles de luz posibles. El pico estrecho en el extremo derecho indica que sólo se representan unos pocos niveles de luz.

La visualización de las estructuras presentes puede ser mejorada mediante el ajuste de contraste, de manera que los valores de los píxeles puedan ser reasignados para cubrir todo el rango disponible (Fig. 4-1 centro). El gráfico es lineal y “uno a uno”: esto significa que los píxeles oscuros en la imagen original son asignados al negro, los claros al blanco y a los grises intermedios se les asigna un nuevo valor que está linealmente interpolado entre el negro y el blanco. El histograma de la imagen central muestra una distribución de los niveles de gris a lo largo de toda la escala de iluminación. Sin embargo, hay que remarcar que la mayoría de estos niveles no tienen píxeles en el histograma. La reasignación de valores incrementó la visualización de contraste para los píxeles presentes, pero no aumentó la capacidad de discriminar las variaciones sutiles en la escala de grises que no fueran registradas en la imagen original. Cabe recordar que aquellos píxeles que por exceso o por defecto se transformen en blanco o en negro, respectivamente, no podrán redistribuirse entre los grises si se aplicara algún otro tipo de proceso para modificar la iluminación de la imagen.

En el histograma de la imagen inferior de la figura 4-1 se observa todo el rango dinámico de la misma. Esto se logró promediando varias imágenes secuenciales integradas. La imagen resultante es visualmente similar a la central, sin embargo, en la primera se pueden representar todos los posibles valores de gris (256) y además, se pueden distinguir y medir las pequeñas variaciones en la densidad de la muestra. Asimismo, se observa una reducción del ruido, representada por la suavización del histograma.

No siempre es práctico ajustar los parámetros de la cámara (iluminación, ganancia, etc.) para llenar exactamente la profundidad de píxel disponible. Además, el incremento desmedido del rango de brillo puede hacer que los píxeles que se encuentren hacia los extremos claros u oscuros sean transformados en blanco o en negro, lo cual también causa pérdida de la información. Muchas cámaras digitales disponen de mayor cantidad de bits

de precisión (10 o 12 bits) de los que son utilizados para almacenar la imagen (8 bits). Esto permite que los valores finales se adecuen para cubrir toda la escala de iluminación. Las cámaras de video pueden almacenar la imagen cruda de 10, 12 o más bits y, tras un proceso de conversión a 8 bits, se obtienen los mismos resultados que con la cámara fotográfica digital.



**Fig. 4-1.** Columna izquierda arriba: imagen de un folículo piloso con bajo contraste. Centro: la misma imagen luego de expandir su iluminación. Abajo: resultante de la integración de varias imágenes. En la columna derecha se visualizan sus correspondientes histogramas, en cuyos ejes de abscisas se representan los valores de intensidad de los píxeles para una imagen de 8 bits. En el eje de las ordenadas se representan la cantidad de píxeles.

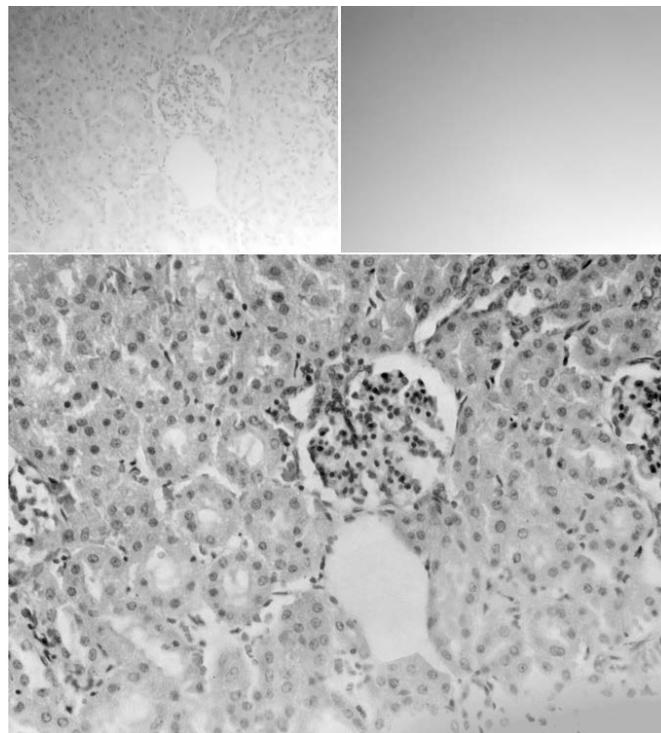
### Desuniformidad de la iluminación

Cuando se analizan las imágenes se toman en cuenta las intensidades (o tonalidades) de los objetos para su identificación. Si las intensidades entre los mismos son diferentes, podrán ser identificados, contados y medidos fácilmente. Uno de los métodos más sencillos y rápidos para identificarlos es la umbralización del brillo, para lo cual hay que considerar los problemas de sombreado.

Cuando se observan superficies irregulares, la cantidad de luz que se dispersa hacia el observador o hacia la cámara desde cada región, está en función de la orientación de la superficie con respecto a la fuente de luz y al observador. La mayoría de las imágenes que se analizan son 2D y la variación en la elevación de la superficie es generalmente pequeña en comparación con las dimensiones laterales. Aún las superficies con bajo relieve no son necesariamente planas: en un corte delgado de tejido de 5  $\mu\text{m}$  se encuentran objetos con diferentes relieves. Esto produce una sombra a lo largo del campo visual generada por la iluminación del microscopio. Si bien en los sistemas de transmisión de luz estas deficiencias se compensan a través del condensador, éstos pueden estar mal alineados y generar sombras. Asimismo, algunos objetivos de baja calidad o de baja magnificación, así como algunas cámaras, pueden generar una sombra en la periferia del campo debido a que la luz es parcialmente absorbida. Estos defectos pueden ser corregidos con la alineación apropiada o con el uso de equipamiento acorde a las necesidades. Sin embargo, cuando las

condiciones de trabajo no son las ideales, se debe recurrir al procesamiento de las imágenes.

Para la corrección de la iluminación no uniforme se debe adquirir una imagen que sólo represente el fondo de aquella de la que se quiere eliminar el defecto. Es decir, donde sólo se represente la luz incidente sin la presencia de objetos. La idea es capturar el patrón de intensidad que se obtiene al dejar pasar la luz a través del portaobjetos vacío, el medio de montaje y el cubreobjetos, para llegar hasta el objetivo y de ahí a la cámara de video. Esta imagen patrón puede ser utilizada como nivel basal de las próximas imágenes en el experimento. Este procedimiento se conoce como corrección del fondo (del inglés, “*Background Correction*”). Si el dispositivo de adquisición es logarítmico con un valor de gamma de 1,0 (ver más adelante), entonces se produce una sustracción “punto a punto” de la imagen original con respecto a la imagen del fondo (Fig. 4-2). Si el sensor de la cámara es lineal, el procedimiento correcto consiste en dividir la imagen original por la del fondo (Fig. 4-3). En términos prácticos, la corrección del fondo por sustracción se usa en todos los casos, excepto en aquellos en los que se quiera medir la densidad óptica de la muestra. Para este tipo de medición se utiliza la corrección del fondo por división, dado que la densidad óptica no es una función lineal de la escala de grises.



**Fig. 4-2.** Corrección del fondo por sustracción. Arriba izquierda: imagen original (corteza renal). Arriba derecha: imagen del fondo. Abajo: imagen resultante.

En la figura 4-2, las diferencias entre la imagen original y la resultante son muy marcadas. Tanto en la primera como en la segunda, se nota claramente que el paso de luz en el microscopio está descentrado hacia el extremo inferior derecho, probablemente debido al desalineado del condensador. En la figura 4-3, las diferencias entre la imagen inicial y la final son sutiles. Esto se debe a que la iluminación del microscopio estaba alineada y que la calidad del objetivo era la ideal. No obstante, luego de la corrección del fondo, la imagen resultante está más contrastada. En estudios de inmunohistoquímica cuantitativa, donde se desea conocer la densidad óptica del tejido teñido, es recomendable realizar la corrección del fondo por división, para evitar la cuantificación de la densidad de los vidrios (portaobjetos y cubreobjetos) así como la del medio de montaje.

La ecuación que regula la corrección del fondo por sustracción es la siguiente:

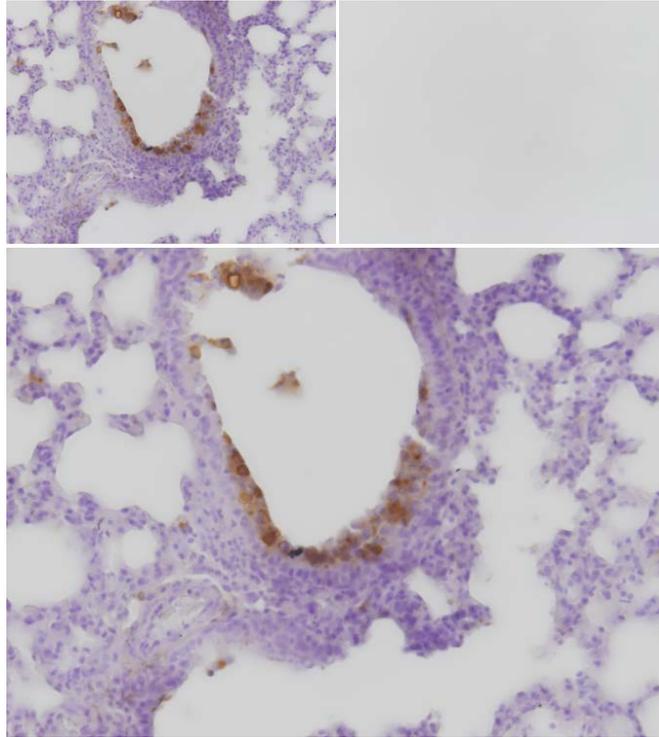
$$CI_{x,y} = I_{x,y} - BI_{x,y} + M \quad [4-1]$$

donde,  $I_{x,y}$  es el valor del píxel en la imagen original en la posición  $X,Y$ ;  $BI_{x,y}$  es el valor del píxel en la imagen del fondo en la misma posición;  $M$  es el valor promedio de la imagen del fondo y  $CI_{x,y}$  es el nuevo valor del píxel en la imagen corregida.

Por su parte, la ecuación que regula la corrección del fondo por división es la siguiente:

$$CI_{x,y} = \frac{(I_{x,y} - BL)}{(BI_{x,y} + BL)} + BL \quad [4-2]$$

donde,  $I_{x,y}$  es el valor del píxel en la imagen original en la posición  $X,Y$ ;  $BI_{x,y}$  es el valor del píxel en la imagen del fondo en la misma posición;  $BL$  es el nivel de negro y  $CI_{x,y}$  es el nuevo valor del píxel en la imagen corregida.

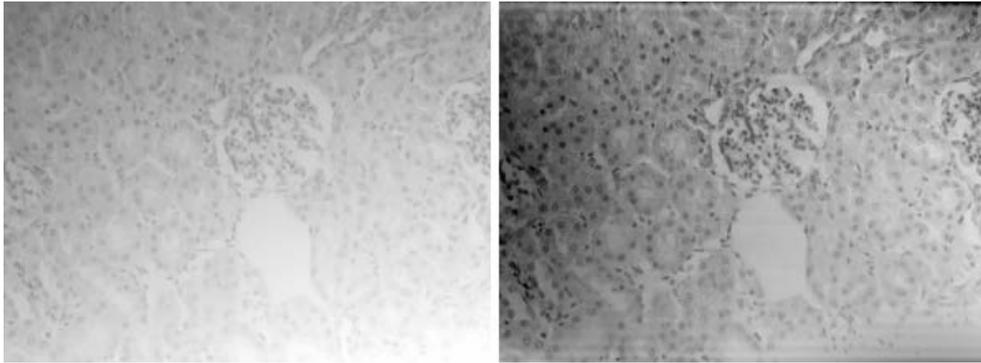


**Fig. 4-3.** Corrección del fondo por división. Arriba izquierda: imagen original (bronquiolo pulmonar, donde se observan células epiteliales con reacción positiva: color marrón). Arriba derecha: imagen del fondo. Abajo: imagen resultante.

En síntesis, el proceso de corrección del fondo enmienda las desigualdades de intensidades de luz del fondo y compensa las irregularidades, debido a una iluminación no apropiada del microscopio, a una respuesta no uniforme de la cámara o a imperfecciones ópticas menores. Podría ser utilizado para eliminar la evidencia de polvo en la lente o para corregir puntos brillantes causados por la luz proveniente por debajo de la platina.

A pesar de las posibles mejoras visuales que se puedan detectar en la imagen final, el proceso de corrección del fondo genera una pérdida de parte del rango dinámico de la imagen original. A medida que la variación en el brillo en la imagen del fondo sea mayor, menor será la variación remanente que se pueda registrar en la imagen final. Esta pérdida y el incremento inevitable de ruido estadístico en la imagen (proveniente de restar una imagen de la otra) hacen que sea preferible establecer una mejor iluminación, previo a la captura de la imagen.

Otra forma de modificar la iluminación de fondo es a través de la transformada rápida de Fourier (del inglés, “*Fast Fourier Transform*” - FFT), la que será discutida en forma particular más adelante. No obstante, sus efectos se pueden ejemplificar a través de la figura 4-4. En la misma, se observa que el método no es el ideal para este propósito, a pesar de obtener una imagen más contrastada y con una mejor distribución de la luz, en comparación con la imagen original.



**Fig. 4-4.** La imagen original (izquierda) muestra una iluminación descentrada. Si se aplica la transformada rápida de Fourier (FFT), y luego un filtro sobre ciertas frecuencias de la imagen, la reversión del proceso conduce a la imagen de la derecha. Este método no es del todo exitoso para esta imagen, ya que los bordes resultantes muestran variaciones significativas debido a que la FFT trata de aparear el borde derecho con el izquierdo y el superior con el inferior.

Si bien los procesos descritos hasta aquí fueron aplicados sobre imágenes monocromáticas, también se pueden aplicar al plano de intensidad de las imágenes color, aunque no siempre son apropiadas para aplicar a los planos de tonalidad y saturación, y nunca los son para los planos del RGB. Cuando se usa en este sentido, las operaciones pueden producir desplazamiento de los colores que alteran las imágenes y, por lo tanto, no pueden ser umbralizadas con éxito, más allá de “no verse bien”. La corrección de los colores es un proceso complicado, que por lo general, requiere un conocimiento detallado de la fuente de luz y de la respuesta de la cámara que se obtiene con calibraciones estandarizadas (ver Capítulo 6).

### Remoción de defectos

Algunos defectos de las imágenes pueden ser eliminados o al menos, disimulados, por efecto de los filtros (ver más adelante). El proceso consiste en reemplazar los píxeles “defectuosos” con un valor tomado de los píxeles que los rodean. A este proceso se lo conoce como **interpolación**. Mediante esta herramienta se pueden reemplazar defectos localizados, tanto los pertenecientes al propio objeto, como los generados por la cámara (suciedad de las lentes, rajaduras, etc.). Si el defecto es grande o irregular, el proceso de suavizado mediante filtros no podrá evitar que algunos de los valores de píxeles de la imagen original se mantengan en la imagen resultante. Por otro lado, sería impracticable utilizar los valores vecinos para la aplicación de un filtro Rango que fuera lo suficientemente grande como para abarcarlo (ver más adelante). En muchos casos, se obtienen mejores resultados cuando se rellena la región del defecto utilizando los valores adyacentes. Como se observa en la figura 4-5, el defecto sobre el rostro de la niña se circunscribe manualmente y los píxeles son reemplazados mediante una interpolación lineal con los píxeles del borde del área delimitada. Cabe mencionar que este proceso se puede realizar con total libertad sobre imágenes “sociales”, pero no es apropiado realizarlo sobre imágenes científicas, ya que se estarían manipulando los resultados.



**Fig. 4-5.** El recuadro rojo encierra un defecto sobre el rostro de la niña, que se amplifica al pie de la imagen. Si ese defecto se circunscribe manualmente, se puede aplicar un filtro de interpolación para tratar de disimular el defecto. En el recuadro inserto se observa la magnificación del área interpolada.

## Filtros

Las operaciones de filtrado reducen o aumentan la tasa de cambios en los valores de intensidad de los píxeles y con ello, las transiciones de intensidad que se producen dentro de una imagen. Las áreas en las que se producen cambios abruptos las transiciones se observan como bordes duros; en las áreas donde se producen cambios graduales, los bordes se observan como suaves delimitaciones. El proceso de filtrado actúa detectando y modificando la velocidad de cambio en estos bordes. Los filtros pueden aumentar las diferencias de intensidad en un borde suave para que parezca más nítida, o reducirlas en un borde duro para suavizarlas.

Las imágenes pueden procesarse dentro de diferentes dominios. El dominio espacial es aquel en donde los cambios se operan directamente sobre los píxeles de la matriz que forma la imagen. Por su parte, en el dominio frecuencial las operaciones se realizan sobre las frecuencias que representan a la imagen original. Existen otros dominios de procesamiento que serán descritos más adelante. Las operaciones de filtrado en el dominio espacial actúan por modificación del valor de un píxel central basado en el valor original de sus vecinos. Esto no ocurre con el filtrado en el dominio frecuencial, que requiere de la aplicación de la transformada de Fourier.

Los filtros son algoritmos matemáticos que operan sobre las imágenes digitales. Si la función utilizada para alterar el valor del píxel depende linealmente de los píxeles del entorno, entonces se habla de un filtrado espacial lineal. En este caso, se hace referencia a filtros de **convolución**. En cualquier otro caso, se habla de un filtrado espacial no lineal (filtros de **no convolución**). Ambos tipos de filtros actúan por acción sobre píxeles vecinos a uno central. La vecindad consiste, generalmente, en regiones de forma cuadrada, en arreglos de 3x3, 5x5 o 7x7, etc., pero que también pueden adoptar otras configuraciones (circulares, en cruz o irregulares).

Los filtros también pueden ser clasificados como de **paso alto** o de **paso bajo**. Esto se refiere a la capacidad de retener altas o bajas frecuencias dentro de la imagen. Las bajas frecuencias son aquellas áreas donde se observan pequeños cambios o transiciones graduales en los valores de los datos como por ejemplo, en un cielo sin nubes o dentro de un objeto único y homogéneo que domine la imagen. Las áreas con grandes cambios o rápidas transiciones se conocen como regiones de altas frecuencias. La imagen satelital de una ciudad registrada a baja altura, el texto sobre un fondo blanco o la presencia de diferentes tipos de objetos son ejemplos de imágenes de alta frecuencia.

Los filtros de paso bajo atenúan las componentes de frecuencias medio-bajas y dejan intactas las bajas en función de la frecuencia de corte que se elija. Se usan para eliminar ruido de alta frecuencia o para eliminar todo lo que no sean variaciones suaves de niveles de gris. Los filtros de este tipo suavizan la imagen sobre la que operan. En términos generales, están diseñados para eliminar ruido o detalles pequeños de poco interés, puesto que sólo afectan a zonas con muchos cambios (altas frecuencias). La zona de corte se determina por el tamaño de la máscara de filtrado (kernel) y sus coeficientes.

Los filtros de paso alto atenúan las componentes de baja frecuencia (tonalidad uniforme) y dejan intactas las de medias-altas en función de la frecuencia de corte que se elija. Se usan para exacerbar las propiedades de la imagen en las que los niveles de gris varían bruscamente, como en los bordes, líneas y ciertos tipos de ruidos. Esto permite una mejor identificación posterior de los objetos debido a que el brillo se hace mayor en las zonas con frecuencias más altas, al mismo tiempo que se oscurecen las zonas de frecuencias bajas. Este tipo de filtros contrastan los objetos sobre los que operan con respecto al fondo.

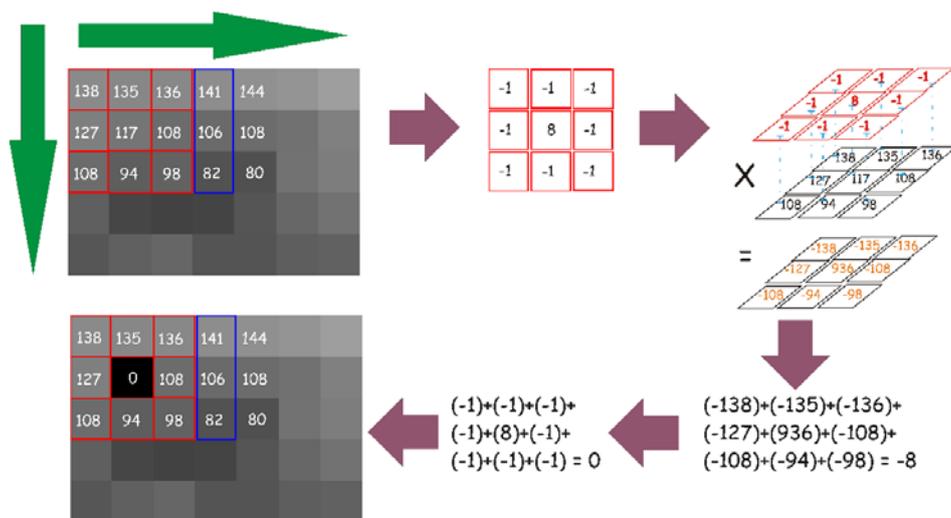
Cuando el ruido de las imágenes es aditivo, es decir, que se agrega a la señal, las estadísticas del proceso caen dentro de la ley de Gauss. En otras palabras, esto significa que el ruido presenta una distribución Gaussiana. Bajo estas condiciones, se recomienda utilizar un filtro lineal. Sin embargo, en ciertos casos no es posible encontrar el filtro de convolución apropiado, ya sea porque el ruido no es aditivo o porque su distribución no es Gaussiana. Los filtros lineales pueden remover ruidos de alta frecuencia si éstos no se encuentran en la misma región frecuencial que la señal. Por su parte, la señal puede contener componentes estructurados de alta frecuencia, tales como bordes. En estos casos, los filtros de paso bajo difuminarían los bordes marcados, con lo que se obtendrían resultados indeseados. En estas circunstancias deben utilizarse los filtros de no convolución.

Los filtros no lineales localizan y eliminan los datos que sean reconocidos como ruido. El algoritmo es no lineal porque “mira” en cada valor de píxel y decide si el dato corresponde a ruido o a señal válida. Si el valor corresponde a ruido, simplemente lo retira y lo sustituye por una estimación basada en los datos de los píxeles vecinos. Los valores considerados señal válida no se modifican en absoluto. Los filtros lineales de paso alto y paso bajo carecen de esta capacidad de decisión y, por lo tanto, modifican todos los datos.

### Proceso de filtración

Los filtros espaciales de convolución procesan a los píxeles vecinos mediante una operación matemática, en la que interviene una plantilla o máscara virtual llamada “kernel”. Como se mencionó anteriormente, la matriz de esta plantilla puede adoptar la forma cuadrada, ortogonal o irregular. A su vez, puede estar formada por arreglos matriciales de dos o más píxeles. En todo caso, la mayoría de las máscaras no supera la matriz de 7x7. Todo depende, en alguna medida, de la velocidad de procesamiento de la computadora y de su memoria RAM. Algunos programas de análisis permiten la creación de kernels de hasta 21x21, pero tal configuración no es recomendable, ya que el rendimiento se deteriora a medida que aumenta el tamaño del filtro.

Durante la ejecución del filtrado, los valores enteros del kernel se multiplican con los de los píxeles de la imagen sobre los que se superponen. La sumatoria de los resultados parciales de multiplicación se divide finalmente por la sumatoria de los valores del kernel. A este valor se le puede sumar un número entero (dentro del rango entre 0 y 255 en una imagen de 8 bits) que sirve como amplificador. El resultado reemplaza al píxel central de aquellos que intervinieron en el cálculo. La figura 4-6 ilustra este proceso.



**Fig. 4-6.** Esquema de aplicación de un filtro de convolución. La imagen original (extremo superior izquierdo) es una matriz de 7x5 píxeles. Cada píxel tiene un valor de intensidad. Los píxeles que están remarcados en rojo son los que van a experimentar, en primera instancia, el efecto del filtrado a través de un kernel de 3x3. El valor del píxel de la imagen original se multiplica por aquel correspondiente al del kernel. Luego se suman todos los valores hallados (en este ejemplo es igual a -8) y se dividen por un valor entero, que generalmente corresponde a la sumatoria de los valores del kernel. Si el divisor es igual a 0 (como en el ejemplo), generalmente se divide por la sumatoria de valores positivos o se aplica un desplazamiento de 128, ya que es imposible dividir por el valor nulo. La resultante de la división se aplica sobre el píxel central de la imagen original. El proceso continúa por desplazamiento de una posición de píxel en el mismo sentido que indican las flechas verdes, es decir, de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo (remarcado en azul en la imagen original).

El proceso de convolución siempre usa los valores de los píxeles vecinos sin filtrar para comenzar con el procedimiento y así continúa hasta finalizar la serie, que se desplaza de un píxel desde el extremo superior izquierdo hasta el extremo inferior derecho. En el ejemplo de la figura 4-6, si bien el valor de convolución del píxel central de la imagen

original resultó ser igual a cero, al desplazarse a la derecha seguía teniendo el valor original (117) hasta que finalizó el proceso de filtración.

Cabe mencionar que si en una imagen de 8 bits no se normalizan los valores para que los mismos caigan dentro del rango (0-255), aquellos datos que se encuentren por debajo de 0, tomarán este valor, mientras que los que se encuentren por encima de 255, asumirán este número. Por el contrario, si los datos se normalizan, al resultado final se le deberá sumar el valor de la tendencia, para que todos los datos sean iguales o mayores que 0. Dicho valor se calcula mediante la sumatoria absoluta de los datos negativos del kernel. En el ejemplo de la figura 4-6, el valor de la tendencia es igual a 8 y representa el desvío de los datos inferiores del rango. Por su parte, si el resultado final supera al 255, se le deberá restar el valor de coeficiente o escala, que se obtiene por la sumatoria de todos los valores absolutos del kernel, que en el ejemplo es igual a 16. De esta manera, tanto los datos inferiores como los superiores se encontrarán dentro del rango permitido.

Cuando se aplica un filtro no lineal (no convolutivo o morfológico), se sustituye el píxel central por el resultado obtenido a través de una función no lineal, que depende de los píxeles de la vecindad. Estos filtros no aplican un kernel sobre la imagen, sino que usan métodos estadísticos o fórmulas matemáticas. Se los utiliza fundamentalmente para suprimir ruido de la imagen, haciendo que los valores de píxel con niveles de intensidad distintos sean más parecidos a los de su vecindario.

Un problema que surge en el proceso de convolución es el tratamiento de los píxeles de los bordes de la imagen, ya que de acuerdo a lo mencionado anteriormente, los cambios sólo se aplican a los píxeles centrales del sector considerado. Una de las técnicas normalmente utilizadas para solucionar este problema se conoce como **superposición de límite cero**. Consiste simplemente en hacer caso omiso de los píxeles problema y realizar la convolución sólo sobre los píxeles alejados del borde. Este método tiene la desventaja de producir una imagen con una resolución inferior a la de la imagen original, ya que se eliminan todos los píxeles del borde. Una segunda técnica (**superposición de relleno cero**), consiste en el relleno de los píxeles faltantes con ceros (en ciertos filtros se rellena con el valor promedio de los píxeles del borde o u otro valor constante). Otra técnica considera a la imagen como una matriz de imágenes idénticas, de modo que los píxeles que faltan se toman desde el lado opuesto de la imagen (**superposición de relleno basado en espejo**). Este método tiene la ventaja de permitir el uso de la aritmética para eliminar la necesidad de considerar a los píxeles del borde como un caso especial. Los últimos dos métodos se usan normalmente en procesos de realce las imágenes, mientras que el primero se utiliza para la detección de bordes.

Es evidente que el uso de kernels basados en matrices impares es más común, dado que tienen un único punto central. Cuando la matriz no es cuadrada se supone que el píxel central es el que se orienta a la región inferior izquierda. Por ejemplo, una matriz de orden 3x4 tendría su centro en [2,2]; mientras que una matriz de orden 4x3 tendrá el suyo en [3, 2].

En la actualidad los filtros de convolución también aceptan valores de punto flotante. Anteriormente los kernels eran relativamente pequeños y con valores enteros para hacer los cálculos matemáticos lo más rápido posible. El avance de la tecnología informática ha permitido acelerar también todos los procesos de cálculo.

### **Clases de filtros**

Más allá de cuál sea su forma de operar sobre las imágenes, existen filtros que realzan las imágenes, otros que las suavizan y otros que detectan bordes. También existen filtros espectrales y filtros que operan sobre imágenes multidimensionales.

#### *Filtros de realce*

Dentro de este grupo, se encuentran aquellos que modifican la luz del fondo para realzar los objetos. Uno de estos filtros, llamado **Unsharp**, es de convolución y tiene la particularidad de incrementar los detalles finos y de los bordes de la imagen, aumentando su visibilidad, o de enfocar una imagen borrosa. Este filtro también aumenta el contraste local mediante la supresión del rango de luz general de la imagen. Asimismo, crea halos adya-

centes a los bordes pero no resuelve detalles adicionales, como lo hace el proceso de deconvolución que se verá más adelante.

La aplicación del filtro Unsharp se realiza mediante un kernel de 3x3, 5x5 o 7x7 (Fig. 4-7). La única diferencia entre los mismos, además de su tamaño, es su valor central. El efecto de la aplicación de este filtro a través de sus distintos kernels se puede observar en la figura 4-8, mientras que sus correspondientes histogramas se grafican en la figura 4-9.

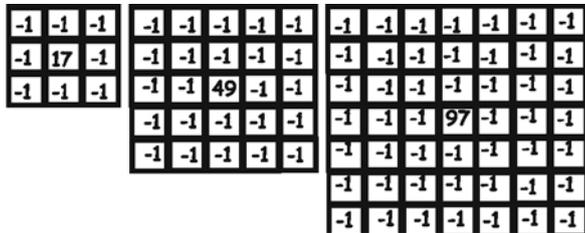


Fig. 4-7. Filtro Unsharp en su versión de kernel de 3x3; 5x5 y 7x7.

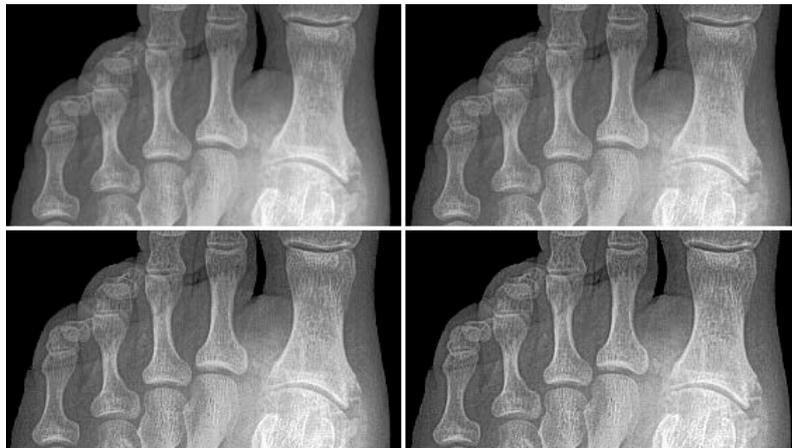


Fig. 4-8. Efecto de la aplicación del filtro Unsharp. Arriba izquierda: imagen original; arriba derecha: Unsharp 3x3; abajo izquierda: Unsharp 5x5; abajo derecha: Unsharp 7x7.

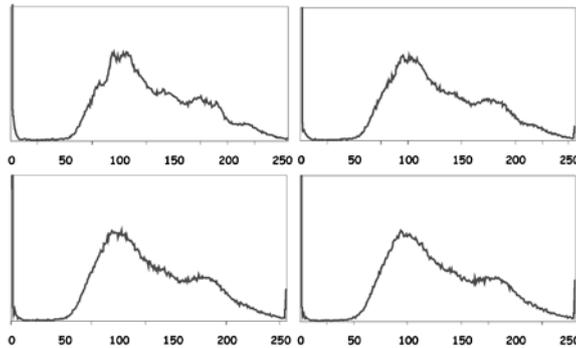


Fig. 4-9. Histogramas correspondientes a las imágenes de la Fig. 4-8.

En el histograma correspondiente a la imagen original se observa la distribución de intensidades de los píxeles sobre el eje de las X (abscisa), mientras que el eje de las Y (ordenada) representa la cantidad de píxeles de cada intensidad. En una imagen de 8 bits, cada uno de las intensidades se registra en un punto del histograma. En una imagen de mayor profundidad de bits, las intensidades se distribuyen dentro de las 256 divisiones. Si bien los histogramas correspondientes a la figura 4-8 tienen un patrón similar, las curvas se van suavizando conforme aumenta el tamaño del kernel, en donde los píxeles con intensidades intermedias se van redistribuyendo hacia el grupo de píxeles más claros (objeto) o más oscuros (fondo). Esto demuestra que el filtro Unsharp incrementa el contraste local alrededor de líneas y bordes. De esta manera, aumenta la visibilidad de los detalles finos, mientras que suprime las variaciones de brillo en toda la imagen.

El método Unsharp proviene de un método antiguamente utilizado para el realce de fotografías en papel, en donde se hacía una primera impresión de contacto a partir del negativo

original de la película, en la misma magnificación que ésta pero un tanto desenfocada. Luego del revelado de la película, se realizaba una segunda impresión a partir de los dos negativos alineados y superpuestos. De esta manera, las áreas iluminadas del negativo original eran cubiertas por las áreas oscuras de la película impresa (la “máscara” Unsharp), lo que permitía un leve pasaje de luz a su través. En los programas actuales de procesamiento de imágenes también se puede llegar a resultados similares, sólo que en este caso se utilizan diversos filtros y procesos matemáticos de sumas y restas hasta obtener el producto final (Fig. 4-10).

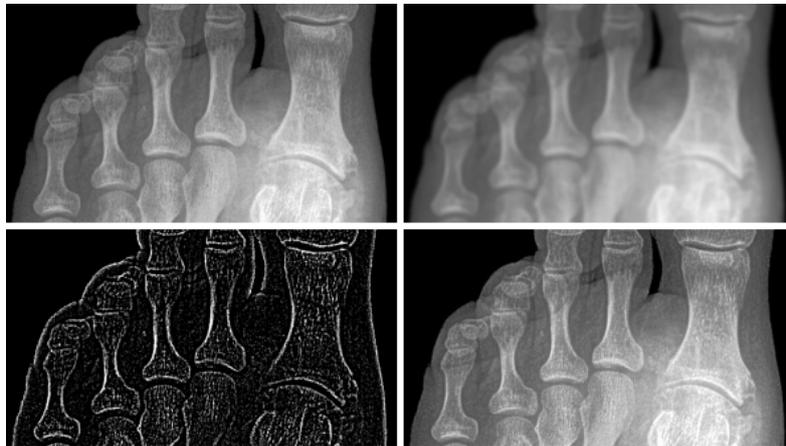


Fig. 4-10. Efecto de la aplicación del filtro Unsharp según el principio fotográfico. Arriba izquierda: imagen original; arriba derecha: imagen desenfocada mediante el filtro Gauss de tamaño 15; abajo izquierda: resultante de la resta entre la imagen original y la imagen desenfocada; abajo derecha: resultante de la sumatoria entre la imagen previa y la original.

Si se compara este procedimiento con el de filtración directa mediante el filtro Unsharp, se observa que ambos son muy similares (Fig. 4-11). De todas maneras, al existir un filtro apropiado para un determinado propósito es deseable su utilización ya que, por un lado, exige menor manipulación de la imagen y por otro, implica un ahorro de tiempo de procesamiento. No obstante, al aplicar un filtro Gaussiano de distintos tamaños, como en el método fotográfico, se eliminan paulatinamente las variaciones aleatorias de ruido, a su vez que se mantiene un rango determinado de frecuencias o separaciones.



Fig. 4-11. Izquierda: Filtro Unsharp 7x7. Derecha: resultante final de la Fig. 4-10.

El filtro **HiPass** es otro filtro de realce y a diferencia del anterior, utiliza un kernel que permite incrementar la información de alta frecuencia, lo que genera un contraste significativo con los píxeles vecinos. Este filtro sólo deja expresar elementos de alto contraste. Presenta tres tipos estandarizados de kernel: el de 3x3, 5x5 y 7x7 (Fig. 4-12).

-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	0	0	0	-1	-1	-1	0	0
-1	9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	0
-1	-1	-1	-1	-1	21	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
			-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	37	-1	-1	-1
			0	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
								0	-1	-1	-1	-1	-1	0
								0	0	-1	-1	-1	0	0

Fig. 4-12. Filtro HiPass en su versión de kernel de 3x3; 5x5 y 7x7.

Como se puede observar en la figura 4-13, a medida que se incrementa la matriz del kernel se exagera la delimitación y el contraste de los objetos, principalmente evidenciado en el borde de las hojas, mientras que el fondo (zona de cielo) pasa de un tono celeste claro hasta llegar al blanco grisáceo. Todos los objetos (flor central y hojas) se oscurecen en pos de un mayor contraste. En la imagen correspondiente al kernel de 7x7, las nervaduras de las hojas pueden distinguirse con suma facilidad. Los histogramas correspondientes a las imágenes filtradas (Fig. 4-14) muestran la tendencia a la atenuación de los componentes de baja frecuencias, unificación de los colores y aumento de los contrastes.



Fig. 4-13. Efecto de la aplicación del filtro HiPass. Arriba izquierda: imagen original; arriba derecha: HiPass 3x3; abajo izquierda: HiPass 5x5; abajo derecha: HiPass 7x7.

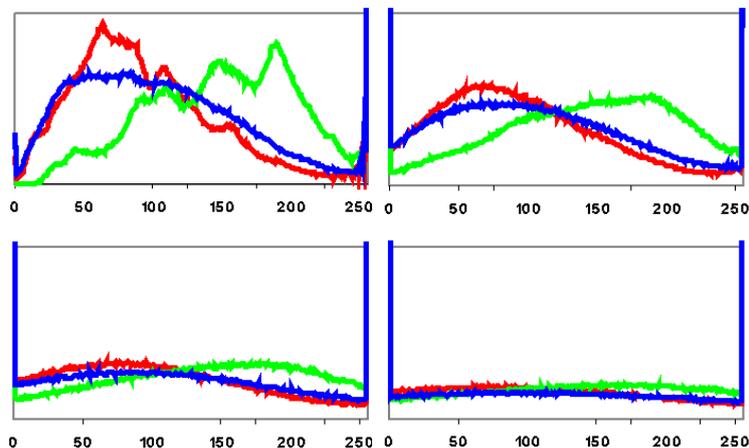


Fig. 4-14. Histogramas correspondientes a las imágenes de la Fig. 4-13.

La figura 4-15 muestra de manera comparativa el efecto del filtro Unsharp de 7x7 con respecto al HiPass 7x7. Queda así evidenciado que el primero mejora la calidad de la imagen de manera global, mientras que el segundo genera mayores contrastes y exagera los detalles.

Otro filtro que realza la imagen es el llamado **HiGauss**. Este filtro es similar al HiPass, pero dado que usa una función Gaussiana, le permite realzar los detalles finos de la imagen, a la vez que introduce menor ruido. Para ello utiliza un kernel de 5x5, 7x7 o 9x9 (Fig. 4-16). El resultado producido por la aplicación de este tipo de filtro puede observarse en la figura 4-17. Es de notar que, para esta imagen en particular, el efecto más destacado se

observa con el kernel 5x5, ya que los otros generan un producto más suavizado. Este efecto visual se corrobora con los histogramas de estas imágenes (Fig. 4-18) donde se observa que si bien el efecto del kernel 5x5 es similar al de 9x9 con respecto a los píxeles oscuros (objeto), existe una mayor concentración de los claros (fondo) en el primero, y por lo tanto, se genera un mayor contraste entre ambos.



Fig. 4-15. Efecto del filtro Unsharp 7x7 (izquierda) en comparación con el filtro HiPass 7x7 (derecha).

0	-1	-1	-1	0	0	0	-1	-1	-1	0	0	-1	0	-1	-3	-4	-3	-1	0	-1
-1	0	2	0	-1	0	-1	-1	0	-1	-1	0	0	-2	-7	-8	-7	-8	-7	-2	0
-1	2	5	2	-1	-1	-1	2	4	2	-1	-1	-1	-7	-5	3	7	3	-5	-7	-1
-1	0	2	0	-1	-1	0	4	10	4	0	-1	-3	-8	3	19	27	19	3	-8	-3
0	-1	-1	-1	0	-1	-1	2	4	2	-1	-1	-4	-7	7	27	42	27	7	-7	-4
					0	-1	-1	0	-1	-1	0	-3	-8	3	19	27	19	3	-8	-3
					0	0	-1	-1	-1	0	0	-1	-7	-5	3	7	3	-5	-7	-1
												0	-2	-7	-8	-7	-8	-7	-2	0
												-1	0	-1	-3	-4	-3	-1	0	-1

Fig. 4-16. Filtro HiGauss en su versión de kernel de 5x5; 7x7 y 9x9.

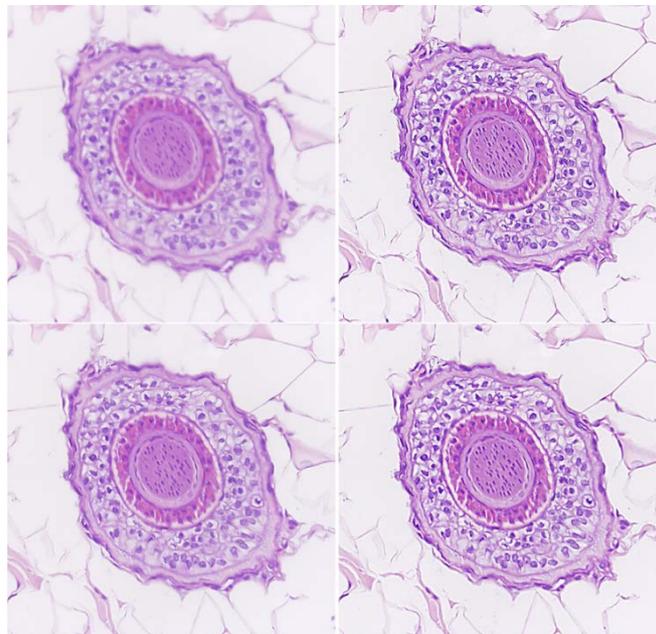


Fig. 4-17. Efecto de la aplicación del filtro HiGauss sobre un folículo piloso. Arriba izquierda: imagen original; arriba derecha: HiGauss 5x5; abajo izquierda: HiGauss 7x7; abajo derecha: HiGauss 9x9.

El filtro de **Ecuación Local** es de tipo no lineal y se lo utiliza para realzar el contraste de los píxeles. Se basa en el histograma de los píxeles vecinos al central, presentes en una ventana de tamaño regulable de NxN posiciones alrededor de cada píxel de la imagen, donde N expresa cualquier número entero entre 1 y 256. Las ventanas más grandes producen resultados más suavizados, mientras que las más pequeñas permiten seguir más de cerca los pequeños detalles. El valor resultante, luego de la aplicación de la correspondien-

te ecuación [4-3], es asignado a cada uno de los píxeles de toda la imagen o a los de la región seleccionada. Estos valores sólo se aplican una vez finalizada la operatoria de filtrado.

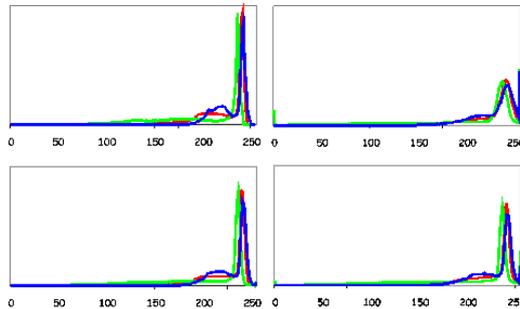


Fig. 4-18. Histogramas correspondientes a las imágenes de la Fig. 4-17.

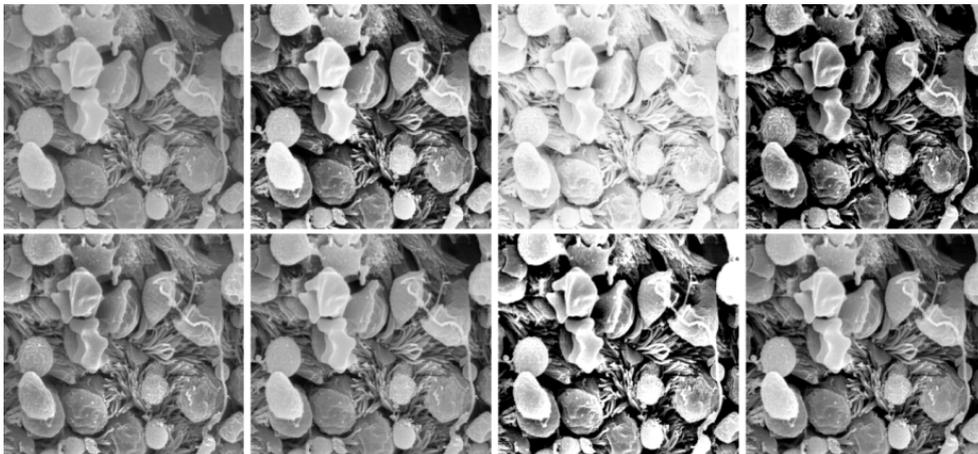


Fig. 4-19. Efecto del filtro de Ecuación Local sobre una imagen SEM de glóbulos rojos ubicados sobre el epitelio alveolar pulmonar (obtenida de: <http://histology-world.com/photoalbum>). Fila superior, de izquierda a derecha: imagen original; variable Lineal con ventana de 256x256; variable Exponencial con ventana de 75x75; variable Logarítmica con ventana de 90x90. Fila inferior, de izquierda a derecha: variable Bell con ventana de 90x90; variable Best fit con ventana de 120x120; variable Desvío Estándar con ventana de 75x75 y un desvío; variable Desvío Estándar con ventana de 256x256 y dos desvíos.

La Ecuación Local acepta distintas variables de aplicación. La variable **Lineal** distribuye el histograma de manera igualitaria a lo largo de la escala de intensidad. La variable **Bell** distribuye el histograma de manera uniforme alrededor del centro de la escala de intensidad. Esta función produce una imagen con un contraste algo menor que la distribución lineal. La distribución **Logarítmica** concentra el histograma en la región inferior de la escala (tendencia a 0). Esta función produce una imagen de alto contraste con un rango dinámico pequeño, que tiende a oscurecerla. Es útil para aumentar el contraste en una imagen muy iluminada. La función **Exponencial** concentra el histograma en la región superior de la escala (tendencia a 255 en una imagen de 8 bits). Esta función produce una imagen de alto contraste con un rango dinámico pequeño, que tiende a iluminarla. Es útil para aumentar el contraste en una imagen muy oscura. La variable de **Best fit** optimiza los valores de la imagen. Estos resultados se logran por el estiramiento del histograma local para maximizar el contraste entre los píxeles más brillantes y los más oscuros dentro de la región de la ventana. En este proceso se pueden producir áreas en las que un solo píxel, brillante u oscuro, desajuste el contraste. Por ello, cuando este método genera resultados muy contrastados es preferible utilizar el método del **desvío estándar**. Este método encuentra el promedio o media estadística y el desvío estándar de la ventana utilizada para la aplicación del filtro. Esta función extiende el contraste de manera tal que el valor del negro se establece en la media, menos el número de desvíos estándar deseados, mientras que la intensidad total se establece en la media, más el número de desvíos estándar seleccionados. Al usar el comportamiento estadístico de la imagen se evita que los píxeles atípicos, que son aquellos extremadamente claros u oscuros, puedan influir de manera indebida

sobre las modificaciones del contraste. A manera de ejemplo, si la distribución de los píxeles fuera Gaussiana, un desvío estándar incluiría aproximadamente el 68% de los píxeles de la ventana; dos desvíos incluirían al 95% de los píxeles y tres desvíos incluirían al 99%. En la figura 4-19 se pueden observar las modificaciones generadas por las distintas variables del filtro de Ecuación lineal aplicadas sobre una imagen tomada mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM).

Los histogramas correspondientes a la figura 4-19 son muy característicos de acuerdo a su efecto (Fig. 4-20). Los picos observados corresponden a los valores de brillo más frecuentes, que se pueden corresponder con los objetos presentes, mientras que los valles indican valores de brillo menos frecuentes. El histograma de la función lineal muestra una distribución uniforme y plana. Esto se debe a que todos los píxeles que inicialmente tenían el mismo valor de brillo son reasignados con el mismo valor final.

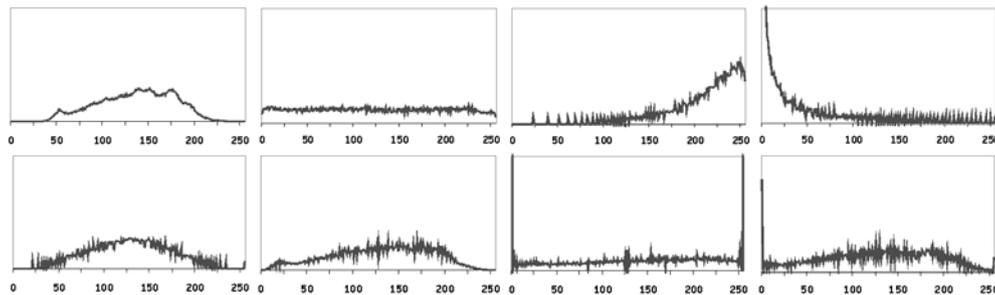


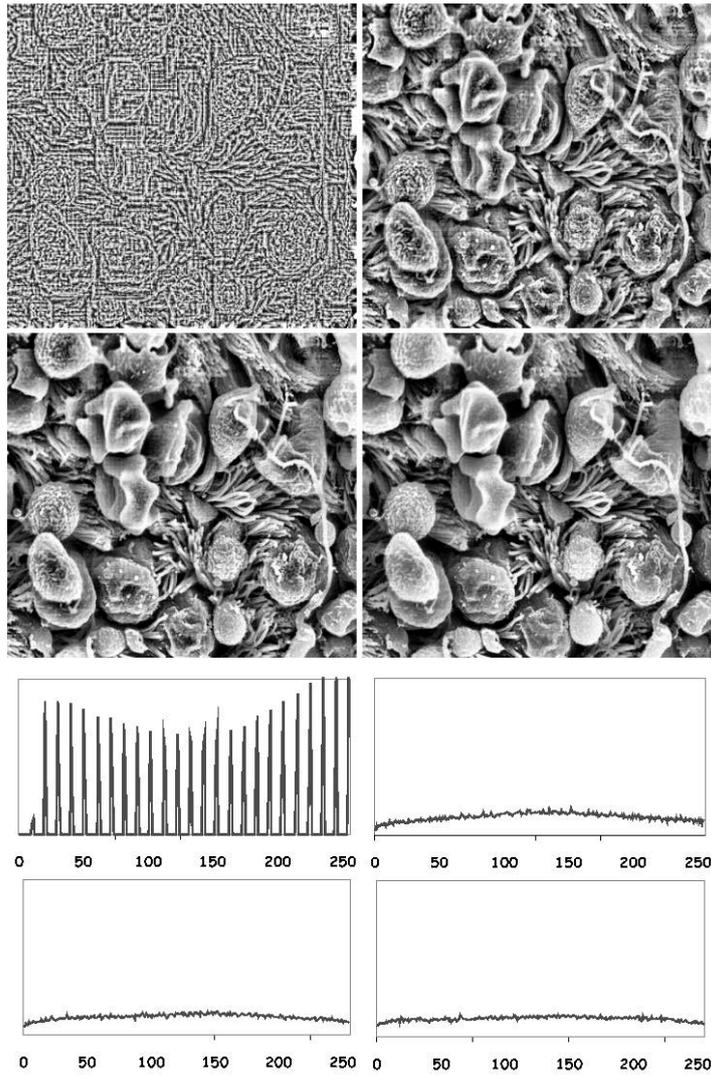
Fig. 4-20. Histogramas correspondientes a las imágenes de la Fig. 4-19.

El objetivo de la ecualización reside en extender los niveles de brillo que se muestran en las áreas de los picos y comprimirlos en los valles, de modo que cada posible nivel de brillo sea mostrado por la misma cantidad de píxeles. Esta redistribución se lleva a cabo mediante la reasignación de los valores de brillo de los píxeles, basados en el histograma de la imagen. Los píxeles individuales mantienen su orden inicial de brillo, o sea que siguen siendo más brillantes o más oscuros que otros, pero sus valores se corren hacia un valor promedio, de manera que haya un número similar de píxeles de cada intensidad. Este proceso se resuelve matemáticamente mediante la siguiente ecuación:

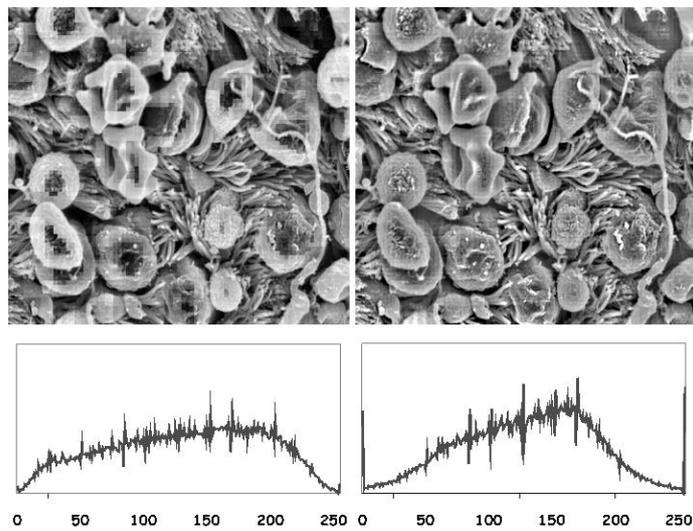
$$k = 256 * \sum_{i=0}^j \frac{N_i}{T} \quad [4-3]$$

Si el rango de valores de intensidad va a de 0 a 255, para cada nivel de intensidad  $j$  en la imagen original (y en el histograma), el nuevo valor  $k$  se calcula como la sumatoria de la división entre el número de píxeles ( $N$ ) en la ventana, con un valor de intensidad igual o menor que  $j$ , y el número total de píxeles de la ventana ( $T$ ).

El tamaño de la ventana del filtro de Ecuación Local ejerce un efecto definitorio sobre el resultado final de la imagen. En la figura 4-21 se puede ver el efecto de la ecualización lineal con ventanas de 5x5, 30x30, 50x50 y 75x75 píxeles. En el histograma de la ventana de 5x5 se observa la pérdida de varias intensidades de gris a lo largo de toda la escala, en la que sólo se detectan picos correspondientes a algunas intensidades. Con la ventana de 30x30, la curva del histograma tiende a la horizontalidad como se había visto en la figura 4-20 con una ventana de 256x256. Sin embargo, puede verse un aspecto “pixelado” de la imagen, sin realmente estarlo (pseudo-pixelado). A medida que se incrementa el tamaño de la ventana, la curva tiende hacia la horizontal y la imagen se va suavizando. Con la ventana de 75x75 se aprecia que el efecto de pseudo-pixelado prácticamente ha desaparecido. Este efecto se destaca con mayor facilidad al utilizar los filtros Best fit y Desvío Estándar con 2 desvíos, cuando se aplica una ventana de 30x30, siendo más marcado en el primero (Fig. 4-22).



**Fig. 4-21.** Efecto del filtro de Ecuación Lineal con ventanas de distinto tamaño. Arriba izquierda: ventana de 5x5; arriba derecha: ventana de 30x30; abajo izquierda: ventana de 50x50; abajo derecha: ventana de 75x75. En el cuadrante inferior se observan los correspondientes histogramas.

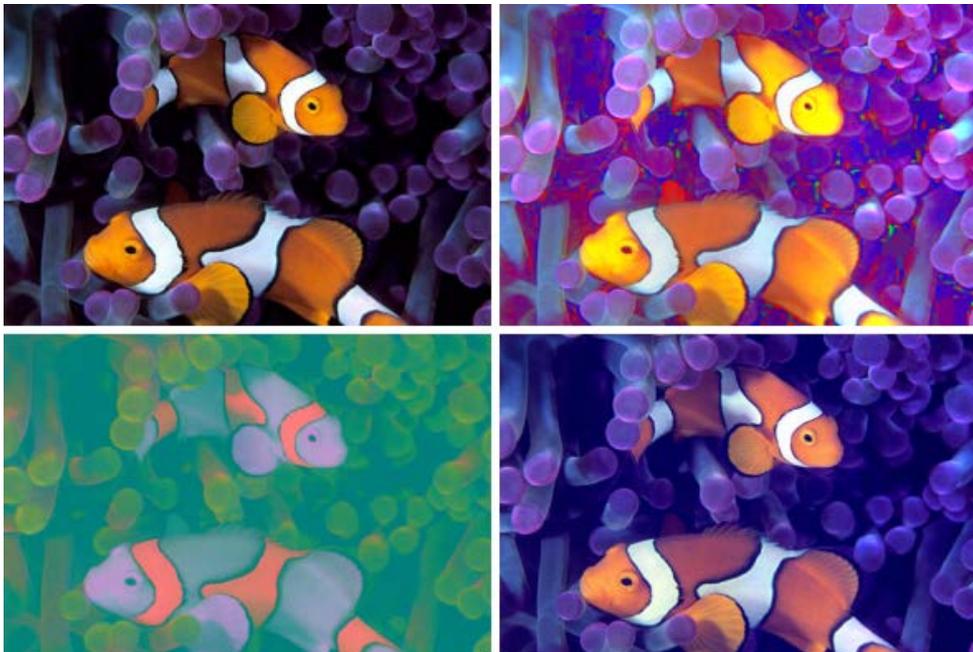


**Fig. 4-22.** Efecto de pseudo-pixelado al aplicar el filtro de Ecuación Best Fit (arriba izquierda) o Desvío Estándar (2 desvíos) (arriba derecha), con una ventana de 30x30. Abajo se observan los histogramas correspondientes.

No es sencillo aplicar el filtro de Ecuilización Local sobre imágenes color debido a que los resultados obtenidos pueden ser muy poco apropiados. La figura 4-23 muestra un ejemplo donde se aplicaron distintas funciones del filtro de Ecuilización. En este caso, se observa que tanto sea por aumento de contraste o de brillo, en algunas circunstancias se exageran algunos detalles y se deprimen otros. De todas maneras, la forma más apropiada para filtrar por ecuilización de una imagen color, es transformarla previamente a una imagen HSI o  $L^*a^*b$ , separar cada uno de los canales, modificar el canal de intensidad y finalmente reensamblar toda la imagen. La figura 4-24 muestra este proceso.



**Fig. 4-23.** Efecto de la Ecuilización Local sobre una imagen color. Fila superior, de izquierda a derecha: imagen original; variable Lineal con ventana de 256x256; variable Exponencial con ventana de 120x120; Fila inferior, de izquierda a derecha: variable Logarítmica con ventana de 256x256, variable Bell con ventana de 90x90; variable Desvío Estándar con ventana de 50x50 y 3 desvíos.



**Fig. 4-24.** Sobre la imagen original (arriba izquierda) se aplicó un filtro de Ecuilización, variable Desvío Estándar, con 3 desvíos y una ventana de 180x180 (arriba derecha). La imagen original (RGB) fue convertida al sistema  $L^*a^*b$  (abajo izquierda). Al separar los 3 canales, se aplicó el filtro de Ecuilización, variable Desvío Estándar, con 3 desvíos y una ventana de 180x180 al canal de intensidad (L). La imagen fue reensamblada para lograr la imagen color (abajo derecha). Se puede observar que se exageraron, fundamentalmente, los colores del fondo, sin variar mayormente el color de los objetos (peces).

### Filtros de suavizado

Este tipo de filtros genera una uniformidad tal en las estructuras, que la imagen se observa como “suavizada” o “esmerilada”. Estos filtros se utilizan principalmente para la eliminación de ruidos.

Uno de estos filtros es el llamado **LowPass** y se lo considera de convolución, ya que es lineal y opera a través de un kernel. Su estructura es la más sencilla de todos los filtros (Fig. 4-25). Cabe remarcar que cualquiera sea el tamaño del kernel, todos sus valores siempre serán igual a 1. Este filtro suaviza la imagen eliminando la información de alta frecuencia. Su aplicación produce el difuminado de la imagen, en general y de los bordes remarcados, en particular (Fig. 4-26).

1	1	1
1	1	1
1	1	1

Fig. 4-25. Filtro LowPass en su versión de kernel de 3x3.

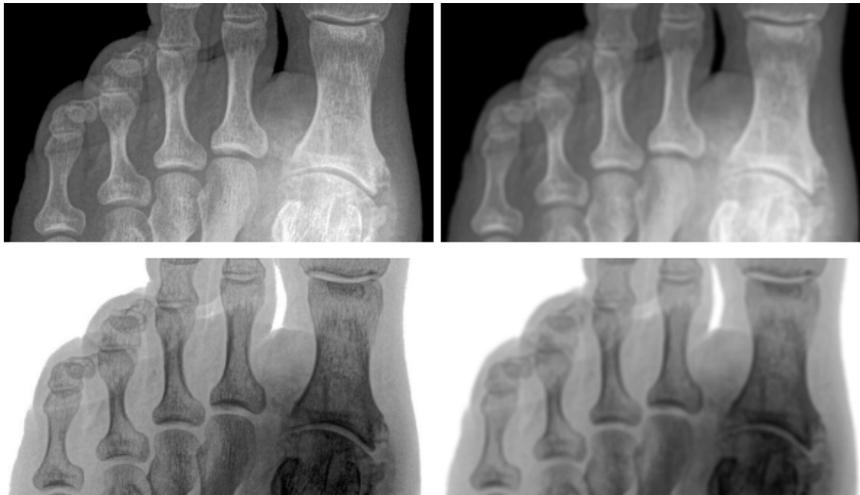


Fig. 4-26. A la imagen radiográfica original (arriba izquierda) se le aplicó el filtro LowPass con un kernel de 7x7 (arriba derecha). Al “negativizar” (invertir) las imágenes (fila inferior), el efecto del filtro se observa con mayor detalle sobre sus bordes.

Al igual que el filtro LowPass, el filtro lineal **Gauss o Gaussiano** elimina la información de alta frecuencia. Esto produce un suavizado de la imagen sobre la que opera. Es muy similar al filtro LowPass, con la diferencia que degrada a la imagen en menor medida que el anterior. En la figura 4-27 se observa un ejemplo de kernel de filtro Gauss. El efecto que produce la aplicación de este filtro se puede ver en la figura 4-28. Allí se compara con el efecto del filtro LowPass de 7x7. Las diferencias se aprecian mejor cuando se invierten las imágenes.

3	6	7	6	3
6	9	11	9	6
7	11	12	11	7
6	9	11	9	6
3	6	7	6	3

Fig. 4-27. Filtro Gaussiano en su versión de kernel de 5x5.

En términos matemáticos, la función Gaussiana se define por la expresión:

$$f(x) = ae^{-\frac{(x-b)^2}{2c^2}} \quad [4-4]$$

donde,  $a$ ,  $b$  y  $c$  son constantes reales ( $a > 0$ ). La función se representa por una curva simétrica con forma de campana (Campana de Gauss). El parámetro  $a$  es la altura de la campana.

na, centrada en el punto  $b$  y  $c$  representa el ancho de la misma (Fig. 4-29). Las funciones Gaussianas con  $c^2=2$  son las auto-funciones de la transformada de Fourier. Esto significa que la transformada de Fourier de una función Gaussiana no es sólo otra Gaussiana sino, además, un múltiplo escalar de la función original (ver Transformada de Fourier). Expresado en términos de dimensiones de píxeles, la ecuación anterior puede ser representada de la siguiente manera:

$$G(x, y, \sigma) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\left(\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}\right)} \quad [4-5]$$

donde,  $x$  y  $y$  representan la distancia en píxeles desde el centro del kernel. El tamaño del kernel es 3 veces el desvío estándar a cada lado del píxel central. El desvío estándar de estos kernels es el radio (en píxeles) que contienen el 68% de la magnitud integrada de los coeficientes (o el volumen bajo la superficie, si el filtro se aplica a una imagen 3D). Para una distribución Gaussiana unidimensional, el 68% del área bajo la curva se encuentra dentro de  $\pm 1$  desvío estándar. En términos de píxeles, el desvío estándar de 1 píxel se logra con un kernel de  $7 \times 7$ , mientras el de 3 píxeles se obtiene con uno de  $19 \times 19$ .

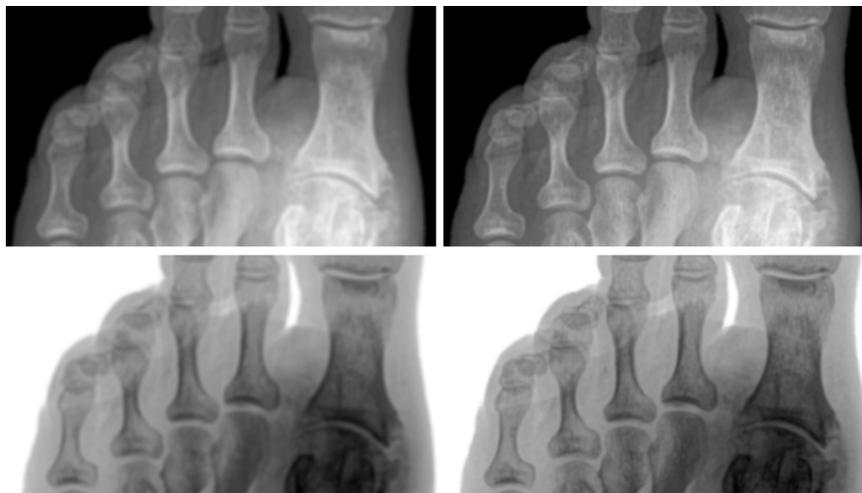


Fig. 4-28. Efecto del filtro LowPass de  $7 \times 7$  (izquierda) y del filtro Gauss de  $7 \times 7$  (derecha). Si bien los dos suavizan la imagen, el efecto del segundo no es tan marcado como el del primero. En la fila inferior se observan las mismas imágenes, pero invertidas.

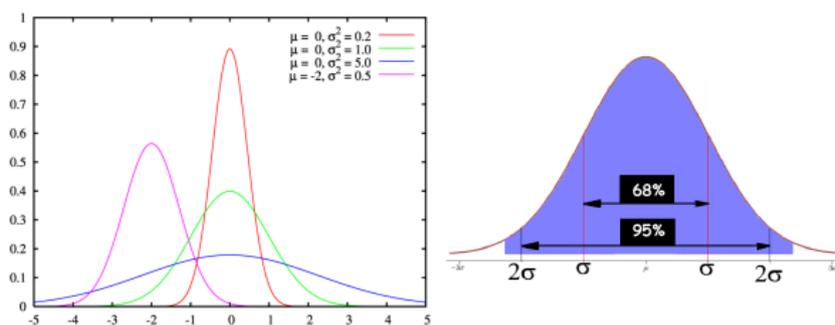


Fig. 4-29. Curvas Gaussianas con distintos parámetros.

Este tipo de filtros se usa esencialmente para eliminar ruidos provenientes de la captura de la imagen. En la figura 4-30 se observa una imagen tomada con una cámara fotográfica hogareña. En la fotografía de la izquierda se puede observar que alrededor de las hojas y ramas del árbol hay un reflejo blanquecino, moteado, que corresponde a ruido. Luego de la aplicación del filtro Gauss  $7 \times 7$  este ruido desaparece. No obstante, la imagen se observa como desenfocada. La aplicación posterior de un filtro UnSharp  $7 \times 7$  permite restablecer la fidelidad inicial, pero sin la presencia del ruido de fondo.



**Fig. 4-30.** La imagen original (izquierda) muestra el efecto del ruido de la cámara fotográfica alrededor de los objetos y en el fondo (puntillado blanco). Al aplicar un filtro Gauss (centro) con un kernel de  $7 \times 7$ , el ruido desaparece. Si sobre la imagen filtrada se aplica un filtro Unsharp (derecha), se restablece la fidelidad inicial, pero sin el ruido de fondo.

Otro filtro que reduce el ruido de las imágenes a través del uso de kernels es el conocido como **Despeckle** (quitamanchas). A diferencia de los filtros anteriores, éste remueve el ruido de las imágenes pero sin difuminar los bordes. El filtro trata de detectar áreas complejas, a las que deja intactas, para suavizar las áreas donde el ruido sea detectable. Para ello, se calcula el desvío estándar de cada píxel y el de sus vecinos, determinando si el área es de alta o baja complejidad. Si la complejidad es menor que el umbral, el área se suaviza con un filtro promedio. Se utiliza para eliminar defectos pequeños debido a polvo sobre la lente o ralladuras de las mismas y también para eliminar el efecto moaré, que es un patrón de interferencia que se forma cuando se superponen dos rejillas de líneas con un cierto ángulo. Este efecto generalmente se obtiene al escanear una imagen desde una revista. En su accionar, el filtro Despeckle detecta los bordes de los objetos en la imagen, genera un duplicado de la misma y la matiza. Luego difumina la imagen original combinándola con la imagen matizada. De esta manera, se suavizan las áreas con bajo contraste, mientras que se mantienen inalterados los detalles de contorno.

El proceso de filtración mediante el filtro Despeckle es siempre una compensación entre la supresión de ruido y la pérdida de la información. La mayoría de estas técnicas están limitadas por el tamaño y la forma del kernel. Si este es muy grande, se produce un exceso de suavizado, los detalles sutiles de la imagen se pueden perder en el proceso y los bordes se van a difuminar. Por otro lado, un kernel pequeño disminuye la capacidad de suavizado y por lo tanto, hace ineficiente al filtro.

Muchos de los filtros Despeckle disponibles comercialmente no mejoran los bordes de los objetos; tan sólo inhiben el suavizado a su alrededor, que se visualiza en forma de halo. En la figura 4-31 se observa el efecto que causa este filtro sobre un cúmulo estelar.

En áreas homogéneas, cuanto mayor sea el kernel, mayor será la eficiencia para eliminar el ruido de mancha. En áreas heterogéneas, un filtro pequeño permite mantener inalterados los detalles sutiles de la imagen. En estos casos, un kernel de  $7 \times 7$  sería lo más apropiado para provocar un efecto. Cabe recordar que este es un filtro no lineal y por lo tanto, el kernel no contiene valores sino que sirve exclusivamente como plantilla o ventana para determinar cuáles son los píxeles sobre los cuales hay que determinar el desvío estándar. Asimismo, para el uso de este filtro se requiere de un paso previo de umbralización (ver Capítulo 5).

Para comprobar los cambios operados mediante este filtro, sólo basta hacer una resta absoluta entre los valores de la imagen original y la filtrada. Los valores de cero indicarán que el píxel que se encuentra en esas coordenadas no sufrió diferencias. La figura 4-32 muestra la diferencia absoluta entre la imagen original y la filtrada con un kernel  $7 \times 7$  tomadas de la figura 4-31.



**Fig. 4-31.** Efecto de la aplicación del filtro Despeckle sobre un cúmulo estelar. Arriba izquierda: imagen original; arriba derecha: Despeckle 3x3; abajo izquierda: Despeckle 5x5; abajo derecha: Despeckle 7x7. Se observa claramente que los puntos más sobresalientes de la imagen se mantienen inalterados dentro de la misma, mientras que los menos destacados van desapareciendo conforme aumenta el tamaño del kernel.



**Fig. 4-32.** En la imagen inferior se observa la diferencia absoluta entre la imagen original (arriba izquierda) y la filtrada con Despeckle 7x7 (arriba derecha). Los distintos colores observados en la imagen resultante corresponden a las distintas intensidades de los píxeles, perdidas luego del proceso de filtración.

El filtro **Mediano** elimina de manera eficiente los ruidos adquiridos por azar, en los que se pueden encontrar píxeles corruptos o faltantes. También elimina los ruidos adquiridos por impulso, es decir, aquellos con alta frecuencia de patrones claros y/o oscuros, que se encuentran distribuidos de manera aleatoria sobre la imagen. Mediante este filtro, el píxel central es reemplazado por el valor de la mediana de los píxeles vecinos. Este filtro es

ideal para eliminar el ruido de cámaras con defectos en los sensores, en los que algunos fotodiodos aparecen “vacíos”, o en imágenes escaneadas desde un libro.

La mediana representa el valor de la variable que ocupa la posición central en un conjunto de datos ordenados de manera ascendente o descendente. Si los valores tienen tendencia central, es decir, forman un pico único y bien definido en el histograma, entonces la mediana es un buen estimador de la posición del pico. Si la distribución no tiene un pico central o es bimodal (dos picos) el filtro Mediano no tendrá ningún efecto positivo. Estadísticamente, el ruido por impulso está muy por fuera del pico de distribución de valores del vecindario de cualquier píxel, por lo que el filtro Mediano es muy apropiado para detectarlo y finalmente, tratar de removerlo.

Los objetos estelares se pueden interpretar como una especie de ruido por impulso de imágenes celestes, especialmente cuando son numerosos, ya que se encuentran circunstancialmente distribuidos al azar, son brillantes y pequeños. Teniendo en cuenta todos estos datos, el filtro Mediano se puede utilizar para eliminar o aislar cuerpos celestes, con el propósito de construir máscaras. Al aplicar un filtro Mediano de 7x7 sobre la imagen original de la figura 4-31 se puede lograr una imagen similar a la obtenida luego de la filtración con el filtro Despeckle 7x7 (Fig. 4-33). Sin embargo, a diferencia de este último, el filtro Mediano difumina los objetos remanentes.

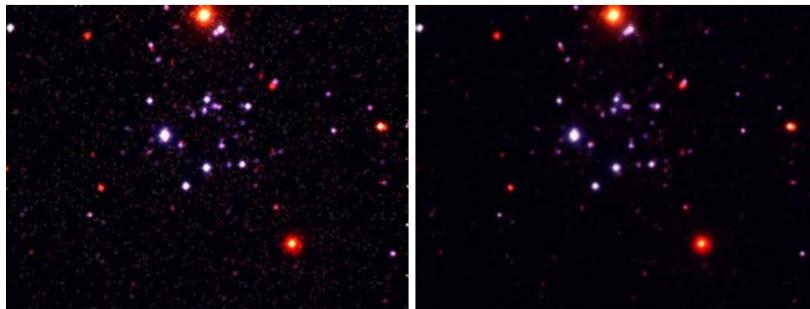


Fig. 4-33. Comparación del efecto del filtro Despeckle 7x7 (izquierda) y el filtro Mediano 7x7 (derecha), al ser aplicados sobre la imagen original de la figura 4-31. El filtro Mediano produce un difuminado sobre los objetos remanentes que no se observa con el filtro Despeckle.

Al igual que el filtro Despeckle, el filtro Mediano trabaja con kernels que carecen de valores predeterminados. En este caso, la plantilla sólo sirve como “molde” para determinar cuáles van a ser los píxeles vecinos que serán tenidos en cuenta para obtener el valor de la mediana. Existen varios modelos de kernels para este filtro. El más común es el cuadrado (3x3, 5x5 o 7x7), pero también los hay circulares u octogonales de 5x5, que contiene 21 píxeles activos y el circular u octogonal de 7x7, con 37 píxeles activos. Los kernels cuadrados son más fáciles de implementar, pero a medida que se incrementa su tamaño, los filtros circulares son preferibles ya que producen resultados isotrópicos, es decir, que generan resultados uniformes en todas las direcciones. Existe un filtro Mediano particular llamado “híbrido de 2 vías” cuyo procedimiento se explica en el epígrafe de la figura 4-34.

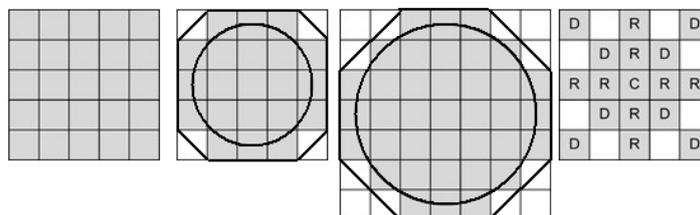


Fig. 4-34. Algunos modelos de kernel del filtro Mediano. De izquierda a derecha: cuadrado de 5x5; circular u octogonal de 5x5; circular u octogonal de 7x7; híbrido de 2 vías. Este último, opera aplicando la ecuación  $Valor Px = (MR + MD + C) / 3$ , donde,  $MR$  es la mediana de los píxeles verticales y horizontales marcados con R;  $MD$  es la mediana de los valores diagonales marcados con D. El valor del filtro que se aplica al píxel central es la media aritmética entre los dos valores medianos y el del píxel central (C). En el resto de los kernels, sólo se utilizan los valores de los píxeles que están marcados en gris para calcular la mediana. Los círculos u octógonos están representados sólo para darle significación a los términos de “circular” u “octogonal”.

El filtro Mediano híbrido conserva los bordes de mejor manera que un filtro Mediano cuadrado, porque se trata de una operación de clasificación en tres etapas, donde los datos de diferentes direcciones espaciales se clasifican por separado. Los kernels circulares pueden preservar las estructuras pequeñas, especialmente las redondeadas.

Si el ruido de la imagen es del estilo de “sal y pimienta”, en donde los píxeles erráticos son pequeños y están distribuidos de manera aleatoria, se puede aplicar un filtro Mediano de 3x3 que elimine el ruido y preserve la imagen original (Fig. 4-35). Si en cambio, el ruido es producido por el tipo de medio donde se encuentran los objetos (por ejemplo, la trama del papel donde se encuentra una imagen a ser escaneada), será conveniente aplicar un filtro Mediano de mayor tamaño. En la figura 4-36 se muestra el efecto de este filtro sobre una imagen histológica, escaneada a 600 dpi mediante un escáner plano.



Fig. 4-35. Efecto del filtro Mediano con kernel de 3x3, para eliminar el ruido de tipo “sal y pimienta”.

El filtro Mediano tiende a borrar líneas más delgadas que la mitad del ancho del kernel y a redondear bordes. Esto se logra principalmente utilizando el híbrido de 2 vías. En el proceso, el filtro encuentra cada una de las medianas y luego las compara con el píxel central, a diferencia de los kernels cuadrados, que operan de la misma manera que con los filtros vistos previamente en el capítulo.

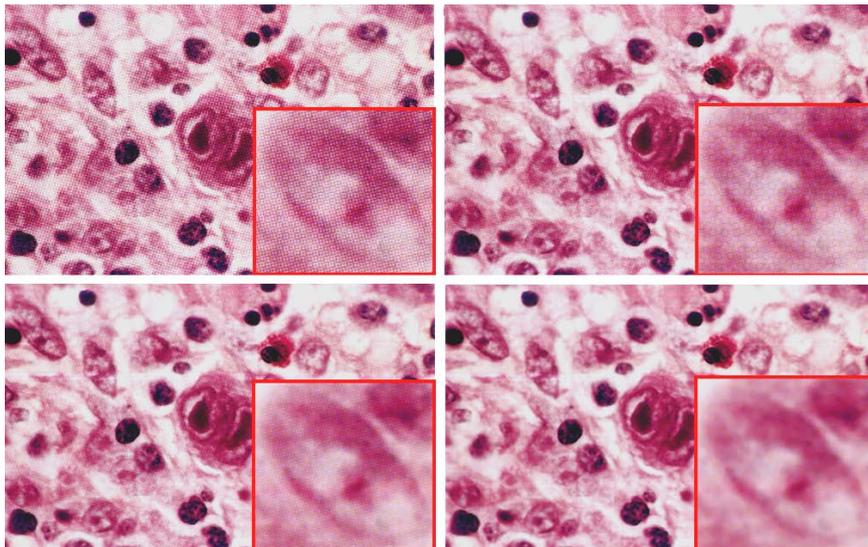
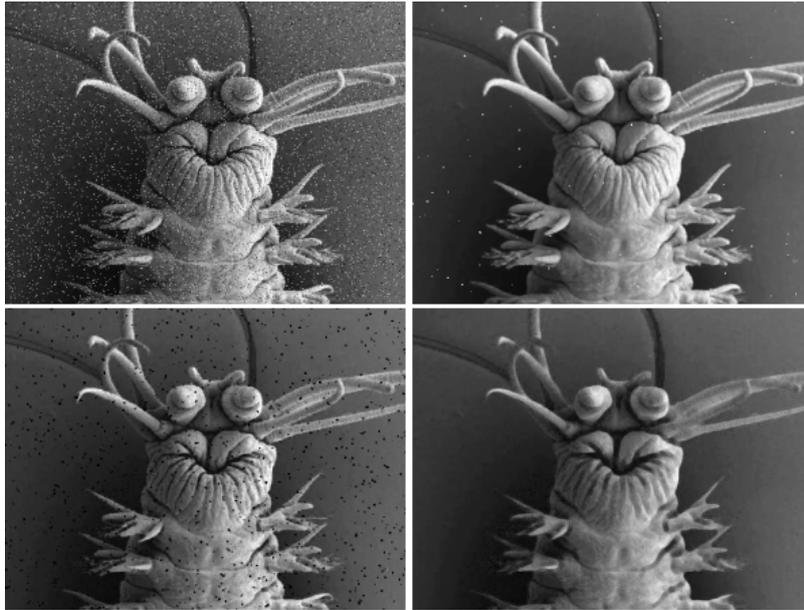


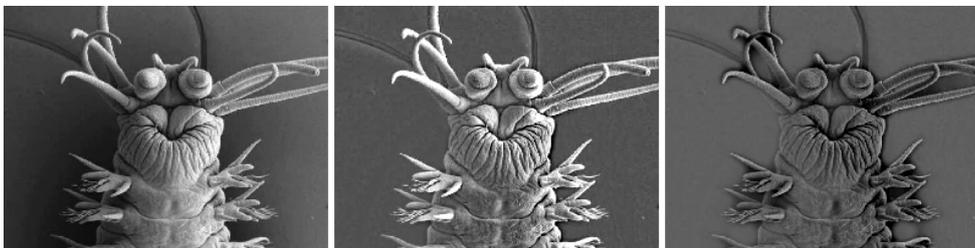
Fig. 4-36. Arriba izquierda: imagen histológica correspondiente a un linfoma, escaneada a 600 dpi. Aplicación del filtro Mediano de 3x3 (arriba derecha); 5x5 (abajo izquierda) y 7x7 (abajo derecha). En los recuadros se ve una ampliación de la figura para mostrar el patrón de ruido en cada una de ellas. El aspecto de “panal de abejas” que se observa en la imagen original, desaparece con el kernel de 7x7.

Otro filtro que remueve ruido de tipo impulso es el **Rango** o **Rank**. Los valores del kernel están ordenados por intensidad, tomándose sólo en cuenta aquel que se encuentre dentro del porcentaje de rango especificado, para luego compararlo con el píxel central en la imagen. Por ejemplo, si se selecciona un rango de 95% para un kernel de 5x5, se tomará en cuenta el segundo valor más brillante de la plantilla, para su comparación con el central en la imagen. Si la diferencia entre el valor seleccionado y el central es mayor que el del umbral (que también se selecciona), el valor del píxel central se reemplaza por aquel seleccionado del kernel. Los porcentajes cercanos a 100, generan cambios brillantes, mientras que los más cercanos a 0, generan cambios oscuros. En la figura 4-37 se observa el efecto del filtro Rango sobre una imagen con ruido de sal y pimienta, utilizando distintos kernels, porcentajes de rango y nivel de umbral.



**Fig. 4-37.** Efecto de la aplicación del filtro Rank. Arriba izquierda: imagen original con ruido de sal y pimienta; arriba derecha: Rank 3x3 80% y umbral 0. El ruido remanente se ve más iluminado; abajo izquierda: Rank 3x3 20% y umbral 0. El ruido remanente se ve más oscurecido y en mayor cantidad al anterior; abajo derecha: Rank 7x7 20% y umbral 10. Se eliminó el ruido pero la suavización de la imagen distorsionó la misma.

Cuando el nivel de iluminación o brillo del fondo varía a lo largo y ancho de la imagen, no se puede aumentar el contraste de la misma sin perder la información vital. Para ello existe el filtro **Flatten**, que empareja las variaciones del fondo mediante un proceso de convolución. Este filtro “prepara” a la imagen para las operaciones de recuento y medición, cuando los objetos de interés son difíciles de aislar del fondo, ya que contienen píxeles de la misma intensidad. En la figura 4-38 se observa un ejemplo de aplicación de este filtro.



**Fig. 4-38.** Efecto de la aplicación del filtro Flatten. En la imagen original (izquierda) se ve claramente un desnivel en la intensidad de los píxeles del fondo, donde el lado izquierdo está más oscuro que el derecho. Al aplicar el filtro Flatten, para oscurecer el fondo con un ancho de kernel de 20 píxeles, se observa cómo se incrementa el contraste con el objeto (centro). Cuando se aplica con el mismo ancho pero se ilumina el fondo, también se genera un contraste (derecha) pero no tan marcado como el caso anterior.

### Filtros de detección de bordes

Estos filtros trabajan esencialmente buscando contraste entre los objetos dentro de la imagen digital. Su objetivo es identificar puntos en los que se observe un cambio abrupto de brillo o se detecten discontinuidades, las que se pueden corresponder con profundidades, orientación de la superficie, cambios en las propiedades del material y variaciones en la iluminación de la muestra. Existen diversas maneras de conseguir este propósito. Una de ellas es a través de filtros de convolución que aplican efectos negativos sobre un lado de un borde y positivo sobre el otro. Esto tiene un efecto neto de tendencia a cero si los valores son los mismos de un lado y del otro, y se incrementa si existen contrastes. Este proceso reduce significativamente la cantidad de información de la imagen, mientras que preserva los patrones estructurales más destacados de la misma.

El filtro **Sobel** se utiliza para realzar los bordes principales de una imagen. Aplica un kernel de 3x3 vertical y otro horizontal y luego los relaciona matemáticamente mediante la aplicación de la raíz cuadrada de la sumatoria del producto entre cada uno de los píxeles de ambas imágenes filtradas. En la figura 4-39 se presenta la versión horizontal y vertical de los kernels del filtro Sobel. El efecto final que produce el filtro se puede observar en la figura 4-40.

1	2	1	1	0	-1
0	0	0	2	0	-2
-1	-2	-1	1	0	-1

Fig. 4-39. Kernel Sobel de efecto horizontal (izquierda) y vertical (derecha).

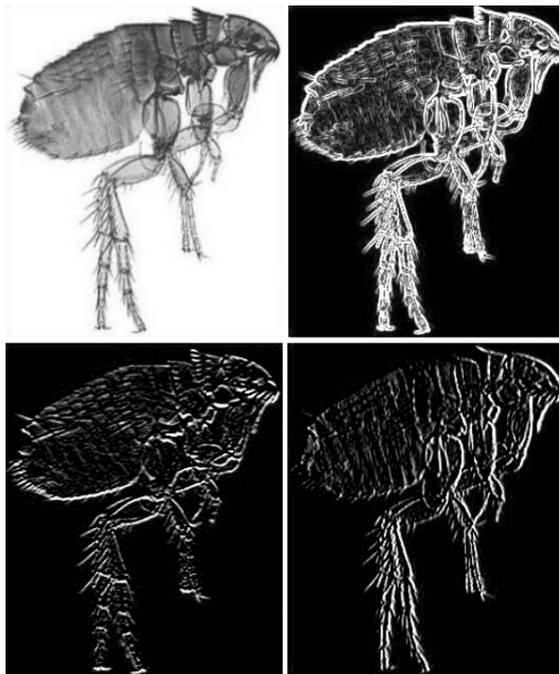
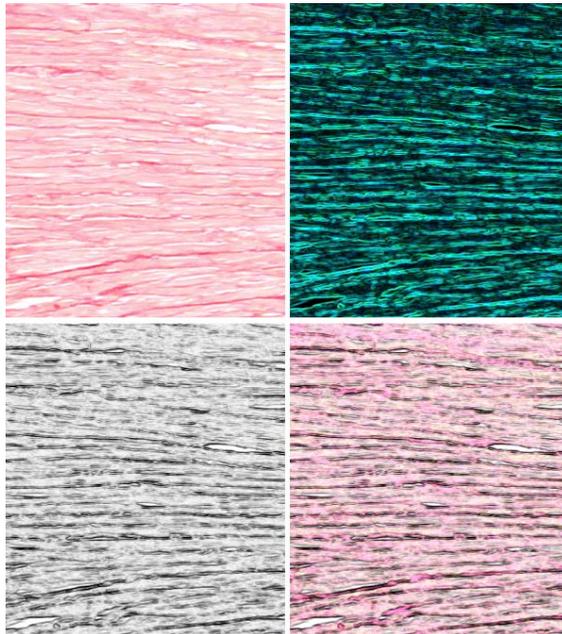


Fig. 4-40. Efecto de la aplicación del filtro Sobel (arriba derecha) sobre la imagen original de una pulga (arriba izquierda). En la fila inferior se observan las derivadas horizontal (izquierda) y vertical (derecha) utilizadas para componer la imagen filtrada final.

Este filtro se puede aplicar sobre imágenes color, aunque los resultados no siempre son los más apropiados, ya que si bien producen la delimitación de los bordes, generan un cambio de color que puede dar lugar a falsas interpretaciones. En la figura 4-41 se aplicó el filtro Sobel sobre una imagen correspondiente a un corte de corazón teñido con la técnica de Picosirius, para la observación de fibras de colágeno que rodean a las fibras musculares. Si bien esta técnica requiere del uso de luz polarizada para la observación de fibras de colágeno de tipo I y III de manera diferencial, también es posible observarlas con el microscopio de luz convencional. En este caso las fibras de colágeno se tiñen con la misma tonalidad que el fondo (fibras musculares), pero con mayor intensidad. Al aplicar el filtro Sobel directamente sobre la imagen color, se observa que si bien la mayoría de las fibras quedan delimitadas, se produce un cambio de tonalidad que no permite distinguirlas de manera apropiada de otros posibles elementos acompañantes. Una forma de evitar el cambio de tonalidad es extraer los canales de color en un sistema HSI, aplicar el filtro Sobel

sobre el canal de intensidad (I) y luego invertir la imagen. Al recombinar los tres canales del HSI quedarán delimitadas las fibras de colágeno sin haber modificado la tonalidad de la imagen subyacente.



**Fig. 4-41.** Arriba izquierda: corte de corazón teñido con la técnica de Picrosirius para la observación de las fibras de colágeno que rodean a las fibras musculares. Arriba derecha: efecto del filtro Sobel sobre la imagen color. Abajo izquierda: aplicación del filtro Sobel sobre el canal I del HSI y posterior inversión de la imagen. Abajo derecha: recombinación de los 3 canales del HSI.

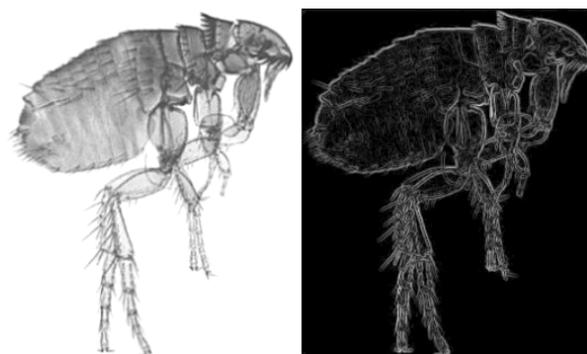
Otro de los filtros que detecta bordes es el llamado **Roberts o Roberts Cross**. Este filtro es de no convolución y aplica una fórmula matemática sobre 4x4 píxeles vecinos para producir su efecto:

$$Y_{i,j} = \sqrt{X_{i,j}} \quad [4-6]$$

$$Z_{i,j} = \sqrt{(Y_{i,j} - Y_{i+1,j+1})^2 + (Y_{i+1,j} - Y_{i,j+1})^2} \quad [4-7]$$

donde,  $X$  es el valor de intensidad inicial del píxel;  $Z$  es la derivada computarizada e  $i,j$  representa la localización del píxel en la imagen. El resultado esta operación mostrará los cambios en una dirección diagonal.

Este filtro fue diseñado para eliminar todo el fondo posible, definir bien los bordes y hacer que su intensidad se corresponda de la manera más aproximada a lo que la vista humana pueda percibir. La idea es aproximar el gradiente de una imagen a través de la diferenciación discreta, que se consigue mediante el cálculo de la suma de los cuadrados de las diferencias entre píxeles adyacentes diagonalmente. En términos concretos, a diferencia del filtro Sobel, que realza los bordes principales, el filtro Roberts permite realzar los bordes finos, y por lo tanto, se observa el contorno del objeto más tenue que con el otro filtro (Fig. 4-42).



**Fig. 4-42.** Efecto de la aplicación del filtro Roberts (derecha) sobre la imagen original de una pulga (izquierda).

El filtro **Laplace** también fue diseñado para realzar bordes mediante un proceso de convolución. En su proceder, amplifica todos los ruidos presentes. Los kernels que usa este filtro se presentan en la figura 4-43.

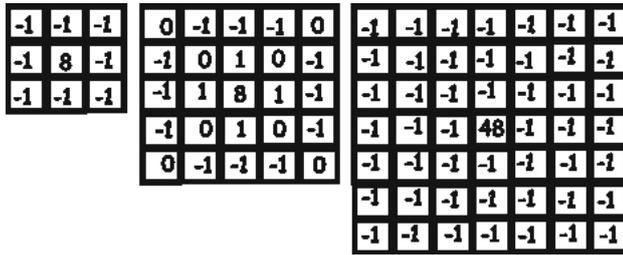


Fig. 4-43. Filtro Laplace en su versión de kernel de 3x3; 5x5 y 7x7.

El kernel de 3x3 resta ocho veces el valor del píxel central a la intensidad de brillo de cada uno de los ocho píxeles vecinos. En consecuencia, si se aplica el filtro sobre una región de la imagen que sea uniforme en brillo o que tenga un gradiente de brillo uniforme, el valor del píxel central se reduce a cero. Si en cambio, existe una variación en forma de puntos, líneas o bordes, el resultado de la filtración será distinto de cero. Los resultados pueden ser positivos o negativos, dependiendo de donde se ubique el punto central con respecto al borde. Cuando se observan tanto resultados positivos como negativos, algunos programas mueven el valor de cero a un valor de gris intermedio (128 en una imagen de 8 bits), para poder apreciar tanto los valores claros como los oscuros. El efecto del filtro Laplace se puede observar en la figura 4-44.

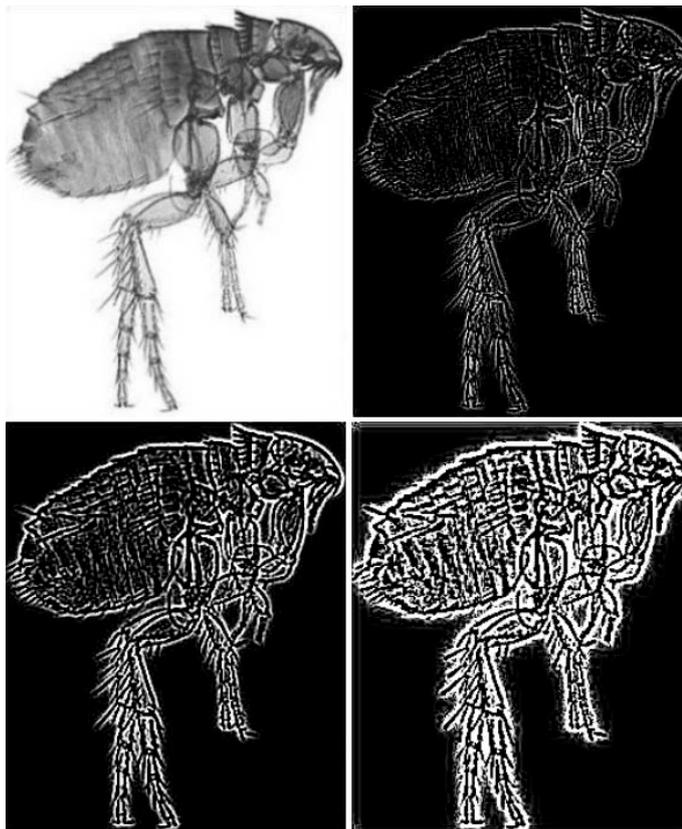


Fig. 4-44. Efecto de la aplicación del filtro Laplace. Arriba izquierda: imagen original; arriba derecha: Laplace 3x3; abajo izquierda: Laplace 5x5; abajo derecha: Laplace 7x7.

El filtro **Varianza** realza bordes y texturas. Al igual que otros filtros descritos previamente, utiliza un kernel sin valores para modificar el valor del píxel central. Calcula y compara la variación estadística de los píxeles de la región con los del resto de la imagen, para finalmente ajustar el valor central en consonancia con la totalidad. Concretamente, el filtro Varianza calcula la suma de los cuadrados de las diferencias de brillo con la media de los píxeles que rodean al central. El valor de varianza es pequeño en regiones uniformes de la imagen y se agranda cuando se encuentran transiciones o líneas. Este tipo de filtro es de utilidad para hacer recuento y mediciones de los objetos.

La figura 4-45 muestra el efecto de la aplicación del filtro Varianza sobre una imagen monocromática, donde se observan globos con diferentes intensidades de gris. La aplicación de este filtro con un kernel de 3x3 permite delimitar los bordes de los globos. En pasos posteriores, la imagen filtrada puede ser umbralizada (ver Capítulo 5) y posteriormente esqueletonizada (ver más adelante), para reducir los bordes a una línea delgada de un píxel de ancho. La imagen resultante puede finalmente superponerse sobre la original para obtener la delimitación exacta de los objetos.

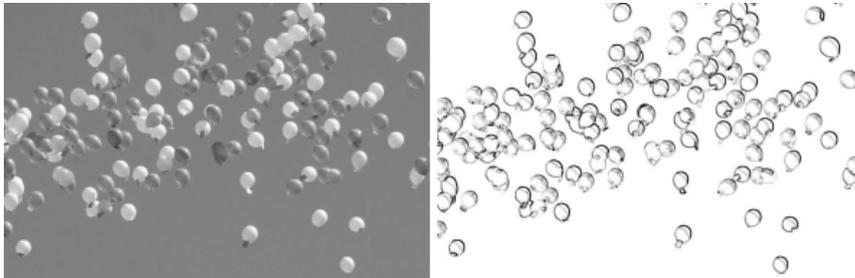


Fig. 4-45. Efecto de la aplicación del filtro Varianza 3x3 y posterior inversión (derecha) sobre una imagen monocromática (izquierda).

Este filtro también puede ser utilizado para identificar bordes celulares. En la figura 4-46, se observa el efecto del filtro sobre una imagen de células grasas del tejido adiposo.

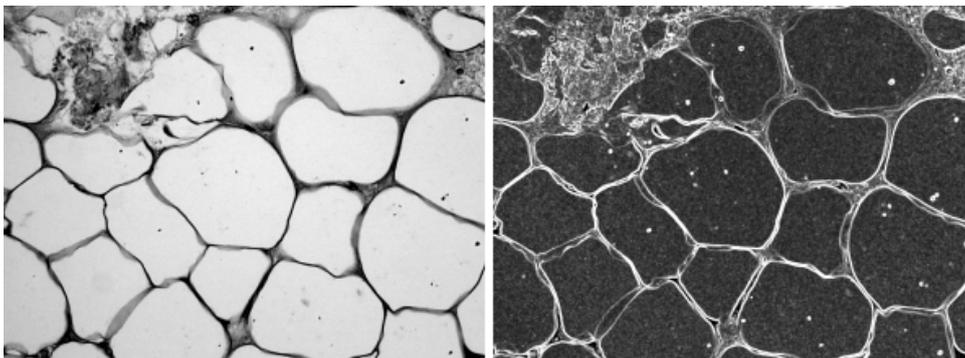


Fig. 4-46. Efecto de la aplicación del filtro Varianza 7x7 (derecha) sobre el tejido adiposo (izquierda).

#### *Filtros morfológicos*

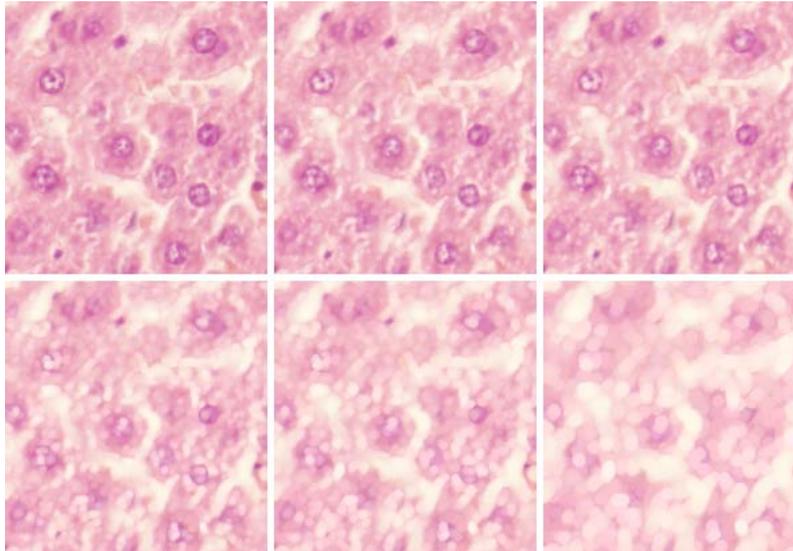
La morfología matemática es un método no lineal de procesar imágenes digitales basándose en la forma. Su principal objetivo es la cuantificación de estructuras geométricas. Los filtros morfológicos también están definidos por su kernel, pero no para realizar la convolución sino sólo como un elemento estructurante.

Los filtros **Máxima (Dilatación)** y **Mínima (Erosión)**, son una variedad del filtro **Rango** que, de acuerdo al radio del píxel que se seleccione, exacerbarán los píxeles claros o los oscuros, respectivamente. Esto se debe a que el filtro busca el píxel más brillante o el más oscuro dentro del kernel y lo reemplaza por el píxel central. Estos algoritmos se basan en los principios que rigen la filtración sobre imágenes binarias, en los que invierte el valor de los píxeles que están en 1 a 0 y viceversa.

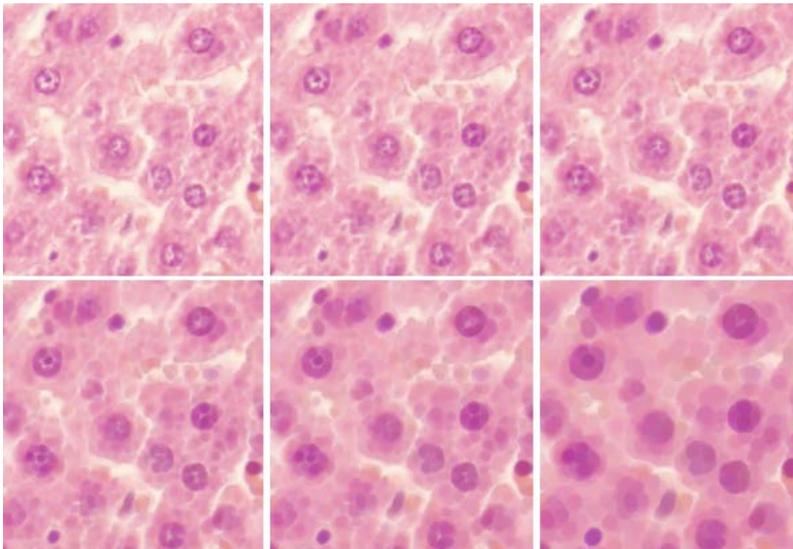
El filtro Dilatación produce efectos de “encogimiento”, “contracción”, o “reducción” y puede ser utilizado para eliminar elementos de menor tamaño que el objeto principal. La dilatación se efectúa tomando el valor máximo obtenido de una serie de sumas, con lo que se dilata los objetos brillantes y se erosiona los oscuros. Puede ser aplicado tanto a imágenes umbralizadas (binarias), monocromáticas, como a las de color. La figura 4-47 muestra un ejemplo de su efecto.

El filtro Erosión opera de manera opuesta al filtro Dilatación, a través de un kernel estructurante. Puede ser utilizado para rellenar huecos de tamaño igual o menor que el objeto sobre el cual se aplica. Este filtro erosiona los bordes de los objetos iluminados y agranda los oscuros. La erosión se efectúa tomando el valor mínimo obtenido de una serie de dife-

rencias. Al igual que el otro filtro, se puede aplicar sobre imágenes binarias, monocromáticas o color. La figura 4-48 muestra un ejemplo de su efecto.



**Fig. 4-47.** Efecto de la aplicación del filtro Dilatación. Fila superior, izquierda: imagen original (tejido hepático); centro: kernel 2x2; derecha: kernel 3x3 en cruz. Fila inferior izquierda: kernel 5x5 circular; centro: kernel 7x7 circular; derecha; kernel 11x11 circular. Nótese que a medida que se incrementa el kernel, se van agrandando los espacios entre las células y la imagen se va aclarando.



**Fig. 4-48.** Efecto de la aplicación del filtro Erosión. Fila superior, izquierda: imagen original (tejido hepático); centro: filtro 2x2; derecha: filtro 3x3 en cruz. Fila inferior izquierda: filtro 5x5 circular; centro: 7x7 circular; derecha; 11x11 circular. Nótese que a medida que se incrementa el kernel, se van reduciendo los espacios entre las células y la imagen se va oscureciendo.

Cuando los filtros de Erosión y Dilatación se aplican de manera alterna sobre una misma imagen, se obtienen los efectos de **Apertura (Open)** y **Cierre (Close)**, respectivamente. El resultado de aplicar dilataciones y erosiones de manera alternada es la eliminación de aquellos detalles de tamaño menor que el del objeto principal, sin la distorsión geométrica global de los detalles no suprimidos. A manera de ejemplo, al aplicar el filtro Apertura, se suaviza el contorno de los objetos, se rompen los istmos y se eliminan pequeñas islas y picos. Inversamente, al aplicar el filtro Cierre, se rellenan los pequeños agujeros y se agrandan las protrusiones que conectan objetos cercanos. En la figura 4-49 se observa el efecto de los filtros Open y Close sobre la imagen original de la figura 4-47.

Sobre una imagen monocromática se observan efectos similares. En la figura 4-50 se aprecia el efecto de estos 4 filtros morfológicos sobre la estructura del *Mycoplasma suis* capturada mediante el microscopio electrónico. Nótese los cambios que sufren los componentes internos del microorganismo por efecto del filtrado, así como las variaciones en los histogramas correspondientes.

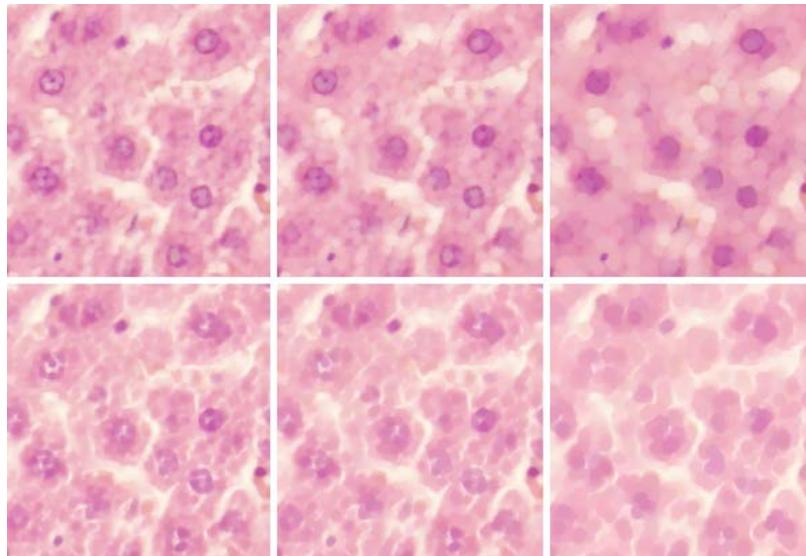


Fig. 4-49. Efecto de la aplicación del filtro Apertura (fila superior) o Cierre (fila inferior) sobre la imagen original de la figura 4-47. De izquierda a derecha: kernels 5x5 circular; 7x7 circular y 11x11 circular.

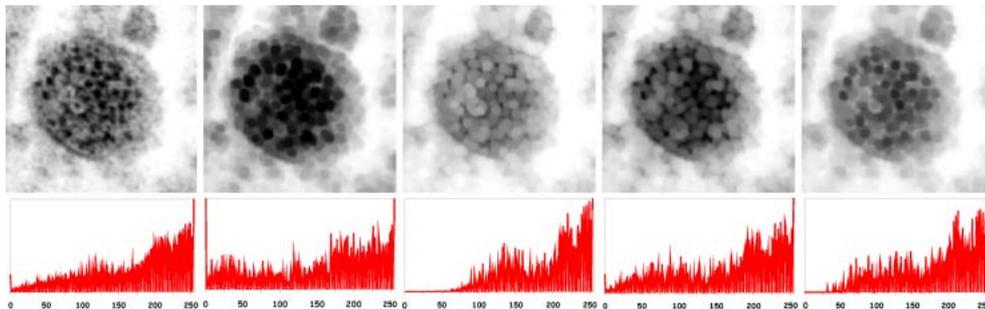


Fig. 4-50. Fila superior izquierda: microfotografía del *Mycoplasma suis*, obtenida mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM). A su derecha se observa el efecto de los filtros Erosión, Dilatación, Apertura y Cierre, con un kernel de 5x5 circular. Debajo de cada imagen se observa el histograma correspondiente.

El filtro morfológico **Sombrero de Copa** o **Top Hat** se basa en el rango de los píxeles vecinos al central, pero de dos regiones de diferentes tamaños. El valor más brillante o más oscuro de la región interior circular se compara con el valor más brillante o más oscuro en una región anular circundante (Fig. 4-51). Si la diferencia entre el círculo interior y exterior supera un nivel umbral, el píxel central se reemplaza con el valor medio o de la mediana del círculo externo. El filtro lleva este nombre debido a que la región interior (círculo central) sería la corona y el umbral su altura, mientras que el anillo externo sería el ala del sombrero.

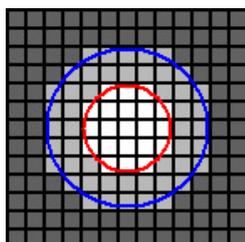


Fig. 4-51. Kernel del filtro Top Hat 5x5 circular. El píxel más brillante que se encuentre dentro del círculo central (rojo) se comparará con el más brillante dentro del círculo azul. Para que el filtro produzca su efecto, el objeto deberá estar contenido enteramente dentro del círculo central.

Este filtro es útil para detectar y remover suciedad. En la figura 4-52 se observa una estrella central grande y muy brillante, rodeada por decenas más pequeñas. Al aplicar el filtro, los píxeles que superan el umbral son eliminados o transformados en el valor de los píxeles vecinos. Los que no superan el umbral se mantienen inalterados.

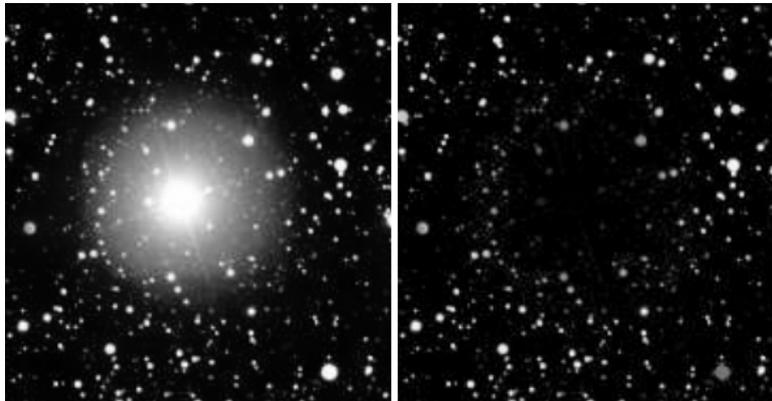


Fig. 4-52. Efecto de la aplicación del filtro de Top Hat. Izquierda: imagen original. Derecha: imagen filtrada con un kernel de 3x3 circular.

Muchos filtros operan sobre los objetos de acuerdo a su estado de contacto, es decir, si son objetos independientes o contactan con otros objetos circundantes. Los píxeles de los objetos que contactan pueden hacerlo a través de sus vértices y/o de sus lados. Bajo estas circunstancias se habla de conexión-4 o conexión-8, respectivamente.

La conexión de 4 o de 8 direcciones se basa en una matriz teórica de 9 píxeles donde se establece la relación entre el píxel central con sus vecinos (Fig. 4-53). La regla de conexión-4 indica que los objetos se consideran separados sólo si existe una conexión con el píxel central a través de sus vértices, pero se consideran únicos si la misma se produce a través de los bordes del dicho píxel. La regla de conexión-8 establece que los objetos pertenecen a un mismo universo si existe conexión del píxel central con cualquiera de los 8 píxeles que lo rodean. En el ejemplo de la Fig. 4-54 se puede apreciar el efecto de conexión-4 y conexión-8 en el momento de hacer un recuento.

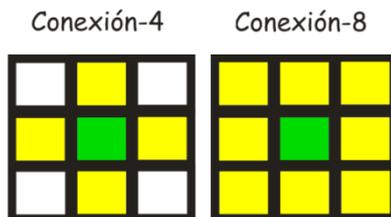


Fig. 4-53. Conexión-4 y conexión-8 tomadas en cuenta para la determinación de los píxeles inclusivos o exclusivos. En ambos casos, para considerar a dos objetos como uno solo, el píxel central (cuadrado verde) debe estar en contacto con alguno de los cuadrados amarillos.

El filtro **Distancia** se utiliza para establecer la distancia entre los puntos de un objeto con respecto a su entorno. Trabaja exclusivamente sobre imágenes binarias y genera una imagen monocromática en la cual, a cada píxel del objeto se le asigna un valor de acuerdo a la menor distancia que tenga, en línea recta (Euclídeana), con respecto a los píxeles del fondo. Luego de aplicar este filtro, el fondo será negro (píxeles con valores 0) y los objetos tendrán valores distintos de cero que se irán incrementando de acuerdo a la distancia que tengan con respecto al mismo. Así, todos los píxeles que se encuentren en el borde del objeto tendrán el valor de 1, ya que se encuentran alejados del fondo por un solo píxel. Aquellos que estén alejados 2 píxeles del fondo tendrán un valor de 2 y así sucesivamente. De esa forma se crea el **Mapa de Distancia Euclídeana**.

Si se midiera la distancia entre cada píxel del objeto con respecto al fondo, se emplearía mucho tiempo de procesamiento. Por esta razón se diseñaron distintas variedades del filtro Distancia. Algunos algoritmos generan el mapa por mediciones en pocas direcciones. Para un retículo de píxeles cuadrados esto puede estar restringido a 90° o puede incluir direcciones de 45°. Esta forma de medición es similar a la conexión-4 o conexión-8 vistas previamente, de acuerdo a como se tocan los píxeles. En cualquiera de los dos casos, la dis-

tancia de cada píxel con respecto a su vecino en la vertical, horizontal o diagonal, es igual a 1, independientemente de la dirección que tome. Estas mediciones adquieren un patrón particular, que es muy distinto a aquel observado con la forma Euclidiana o Pitagórica, como se observa en la figura 4-55.

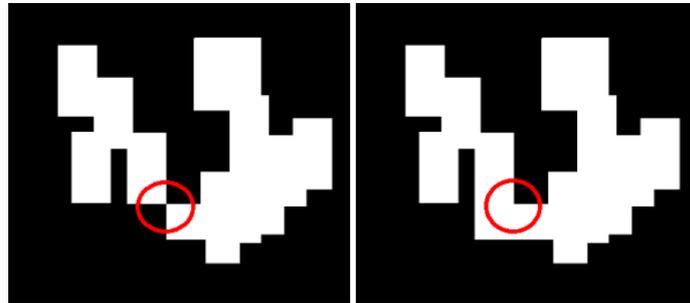


Fig. 4-54. Ejemplos de conexión-4 y conexión-8. Si en la figura de la izquierda se selecciona una conexión-4, se identifican 2 objetos, ya que ambos están unidos sólo por el vértice (dentro del círculo rojo) y no por los laterales. Si se selecciona una conexión-8, toda la estructura se cuenta como un solo objeto. En la figura de la derecha, tanto la conexión-4 como la conexión-8 reconocen un solo objeto.

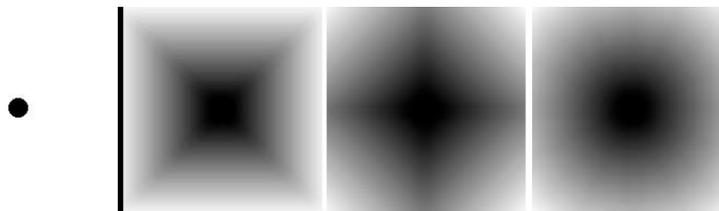


Fig. 4-55. Efecto del filtro Distancia. De izquierda a derecha: imagen original; opción cuadrada (conexión-4); opción diagonal (conexión-8); opción Euclidiana.

De acuerdo a la distribución de las intensidades de los píxeles (Fig. 4-56), se observa que la opción Euclideana tiende a producir un efecto intermedio entre la cuadrada y la diagonal. Estas dos últimas opciones no producen efectos más isotrópicos que los producidos por los filtros Erosión y Dilatación.

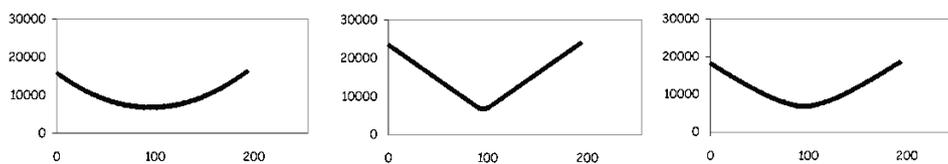


Fig. 4-56. Gráficas de distribución de los píxeles en función de su intensidad, correspondientes al filtro Distancia opción cuadrada (izquierda), diagonal (centro) y Euclidiana (derecha).

Muchas veces se necesita recurrir a las operaciones de erosión y dilatación para definir regiones de medición. Mediante el empleo del filtro Distancia estas definiciones pueden ser más precisas. Muchos programas de procesamiento vienen provistos con filtros de Erosión, Dilatación, Apertura, Cierre, Watershed, Voronoi y Reducción o Punto Final que operan a través del filtro de Distancia, para suavizar los resultados y lograr efectos más precisos que la aplicación del filtro puro, es decir, la aplicación del filtro sobre imágenes binarias y posterior aplicación del kernel correspondiente. Las figuras 4-47 a la 4-50 son ejemplo de ello.

Existen otros filtros morfológicos que en su mayoría operan sobre imágenes monocromáticas y que, en esencia, reducen el tamaño de los objetos sobre los que se aplican. Estos filtros son utilizados principalmente para los procesos de segmentación que serán analizados en el Capítulo 5.

Uno de estos filtros es el llamado **Watershed (Cuenca)**, que separa objetos en contacto que no pueden ser identificados como elementos individuales. Esto se produce cuando hay una alta densidad de objetos en la muestra o cuando se utilizan cortes gruesos de tejido

para su observación mediante un microscopio de transmisión. Este filtro opera sobre imágenes monocromáticas, aunque algunos programas sólo lo hacen sobre imágenes binarias que se obtienen por un proceso de umbralización.

La forma más primitiva de implementación de este filtro es mediante la erosión y dilatación iterativa de los objetos hasta que desaparezcan las conexiones entre los mismos. La técnica va normalmente precedida por un filtro que suavice el ruido y detecte bordes. El método iterativo es muy lento ya que requiere guardar las imágenes intermedias luego de cada erosión y restituir las durante la dilatación.

Afortunadamente, existe una forma más sencilla y eficiente de resolverlo. Esto se logra a través de la implementación del mapa de distancia Euclideana. Si el gradiente de intensidad de los píxeles desde el borde hasta el centro (o centroide) del objeto se graficara como una elevación, cada uno de los objetos tendría una forma de montaña, que será más alta cuanto más grande sea la estructura. El punto de contacto entre dos objetos unidos será la línea basal de las montañas que estos determinan (la cuenca). Esta es la línea elegida por el algoritmo para separar las estructuras.

El filtro Watershed no opera sobre objetos cóncavos o irregulares, más específicamente, puede separar elementos con bordes rectos sólo si se distingue una línea Euclideana entre los mismos. Tampoco separa partículas cuyo solapamiento es tan grande que no permite distinguir dicha línea. De todas maneras, si los objetos de la imagen son lo suficientemente curvos y se encuentran a una distancia apropiada, la aplicación del filtro ahorra un significativo tiempo de separación manual.

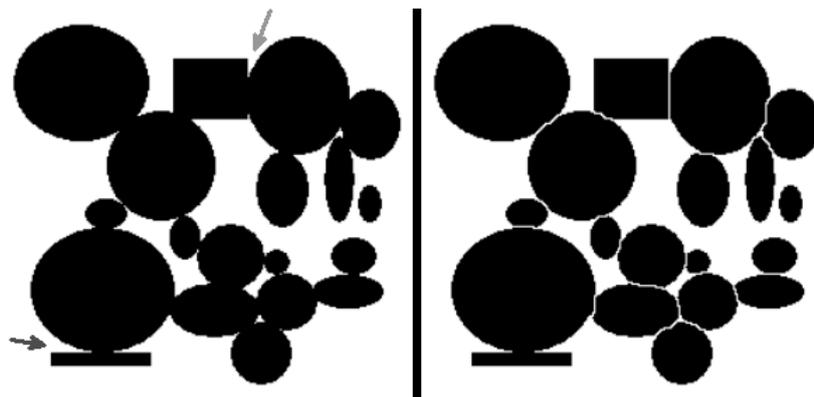


Fig. 4-57. Efecto del filtro Watershed sobre una muestra de figuras geométricas en contacto. Nótese que el rectángulo (flecha superior) puede ser interpretado como tal, cuando el valor de la distancia Euclideana en su punto de contacto con la esfera es igual a 1. Cuando este valor no se consigue, los objetos no se separan, tal como se observa entre el rectángulo y la esfera señalados por la flecha inferior.

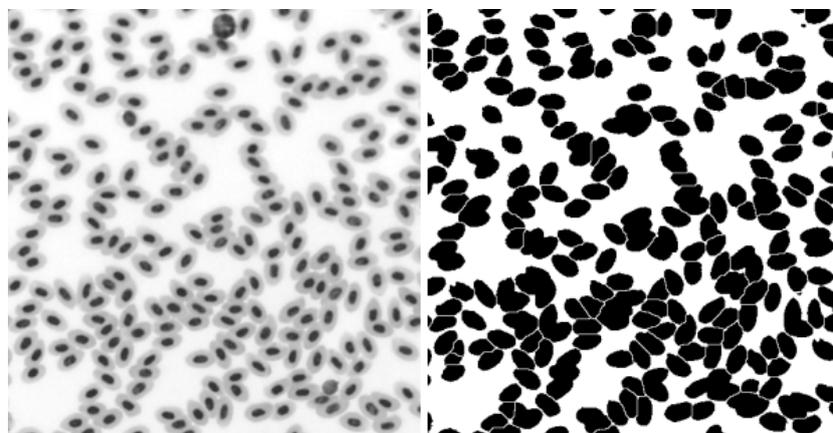


Fig. 4-58. Efecto del filtro Watershed sobre un extendido sanguíneo de ave. Sobre la imagen monocromática original (izquierda) se aplicó un proceso de umbralización y posterior binarización. Finalmente se aplicó el filtro Watershed (derecha).

En la figura 4-57 se presentan varias figuras geométricas en contacto. Cuando se aplica el filtro, los objetos tienden a separarse si las superficies de contacto son curvas. Si una superficie recta se encuentra en contacto con una superficie curva, la separación sólo se producirá si existe una mínima distancia Euclídeana entre ambas. De lo contrario, esta separación no se producirá. Este mismo efecto se puede observar sobre material biológico (Fig. 4-58).

El filtro **Thinning** reduce la imagen a su esqueleto. El proceso se conoce como “esqueletoización” y consiste en identificar la estructura básica del objeto por medio de líneas de un píxel de ancho. Haciendo una analogía con la graficación de las antiguas civilizaciones, la esqueletoización podría parecerse a las constelaciones, donde al unir estrellas por medio de trazos daban idea de objetos significativos (Fig. 4-59).

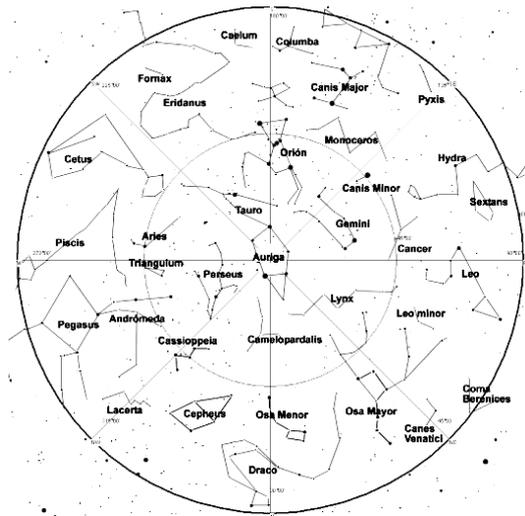


Fig. 4-59. Constelaciones descritas por Claudio Ptolomeo de Alejandría en el *Almagesto (tratado sobre Astronomía)*, en el siglo II.

La esqueletoización es la representación de la forma del objeto, manifestada en un su mínima expresión, en una ubicación equidistante a los límites originales del mismo. Se produce por un efecto de erosión en el cual se van removiendo los píxeles de los bordes en pasos sucesivos, en los que constantemente se analiza el efecto resultante. El número de iteraciones es proporcional a la mayor dimensión de cualquiera de los objetos de la imagen. Durante el desarrollo del proceso se va determinando la conexión entre los píxeles vecinos con respecto al central. Si forman un grupo continuo, entonces el píxel central se puede eliminar; de otra forma, queda inalterado. Los esqueletos resultantes se basan en la conexión-8, mientras que el fondo sigue las reglas de la conexión de 4 direcciones. En la figura 4-60 se puede apreciar el efecto del filtro Thinning con un umbral de 30, aplicado sobre un objeto real. Al seleccionar otros valores umbral, los efectos obtenidos pueden ser variados (Fig. 4-61). Las diferencias de aspecto de los esqueletos también dependen del tipo de algoritmo que emplee el programa de análisis y de la estructura sobre la que se aplique el filtro. A medida que van cambiando los objetos, el esqueleto también se va haciendo más complejo. En la figura 4-62, se observa el efecto del filtro Thinning con un umbral de 10 y luego de 50 iteraciones.

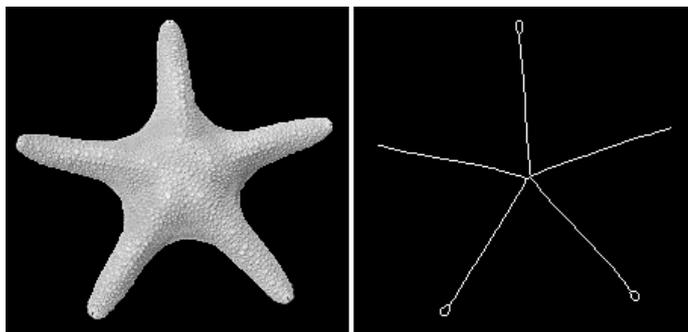


Fig. 4-60. Efecto de la esqueletoización de una estrella de mar. Para su obtención, se aplicó el filtro Thinning con un umbral de 30 y con 2 iteraciones.

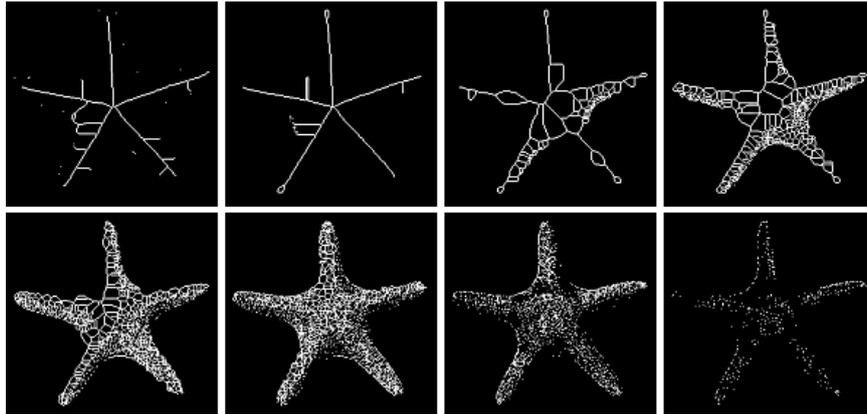


Fig. 4-61. El efecto del filtro Thinning puede variar dependiendo del umbral que se seleccione. De izquierda a derecha, en la fila superior se aplicaron los valores umbral de 10, 20, 40 y 50 sobre la imagen original de la figura 4-60. En la fila inferior, los valores umbral fueron 60; 70; 80 y 90. En todos los casos se realizó una sola iteración.

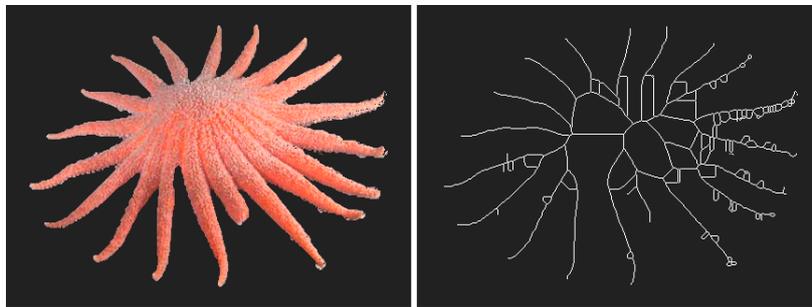


Fig. 4-62. El filtro thinning no siempre es efectivo para todas las estructuras. Para lograr la esqueletonización de esta estrella de mar se utilizó un umbral de 10, con 50 iteraciones.

La esqueletonización es una herramienta sumamente importante para el reconocimiento de las formas, ya que contiene información topológica y métrica. Los valores topológicos incluyen el número de puntos finales, el número de nodos donde se reúnen las ramas y el número de bucles internos. Los valores métricos se corresponden con la longitud media de las ramas (tanto las internas del objeto como las que tienen un extremo libre) y los ángulos de las mismas. La figura 4-63 muestra estas estructuras sobre la base del esqueleto de la figura 4-60.

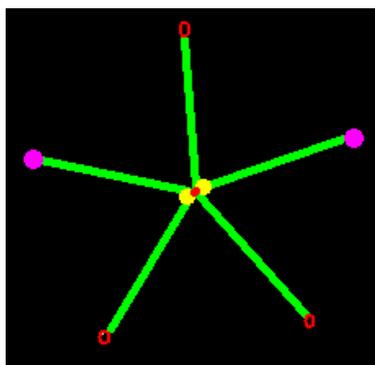


Fig. 4-63. El esqueleto muestra 2 puntos terminales (magenta); 2 nodos (amarillo); 3 bucles (rojos), que este caso son terminales; una rama interna (roja) y 5 ramas externas (verde).

La locación de los nodos y de los puntos terminales en un esqueleto se reduce al recuento de píxeles vecinos. Los puntos a lo largo de las ramas con conexión-8 tienen exactamente 2 píxeles vecinos. Los puntos terminales tienen sólo un píxel vecino, mientras que los nodos tienen 3 o 4.

La medición de los segmentos da una idea del tamaño de la muestra. Cabe recordar que con la aplicación del filtro Thinning, la longitud del esqueleto es un poco más corta que el de la muestra real, dado que el punto terminal se localiza en el centro del círculo inscrito en la porción terminal de la rama.

Este filtro se aplica con cierta frecuencia en la práctica cotidiana, ya que al generar un esqueleto equidistante a los bordes de un objeto, permite analizar modificaciones de pocos píxeles que se puedan presentar en grandes estructuras. En la figura 4-64 se observa la superposición del esqueleto de una vértebra cervical sobre la muestra original. La comparación entre esqueletos que representen la misma vértebra en animales jóvenes y viejos, permite determinar si se produjeron cambios estructurales que pudieran justificar las variaciones en el comportamiento animal en el desplazamiento registrados con la edad.

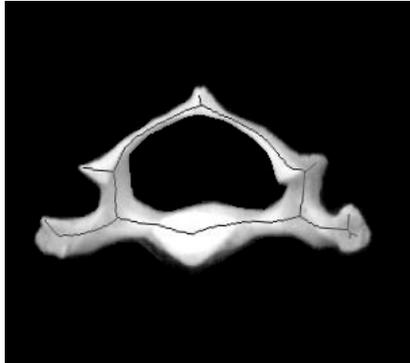


Fig. 4-64. Esqueleto obtenido mediante el filtro Thinning, superpuesto sobre la imagen de una vértebra cervical de rata.

El filtro también se puede aplicar sobre secuencias de imágenes (time lapse) para analizar las variaciones en el desplazamiento de estructuras. En la figura 4-65 se observa la esqueletonización de gráficos correspondientes a un equino, utilizado para determinar el posicionamiento de las articulaciones en la marcha. Este es un dato fundamental en los equinos de carrera, en donde la correcta disposición de los aplomos de los miembros determina la capacidad del animal para desarrollar su actividad.

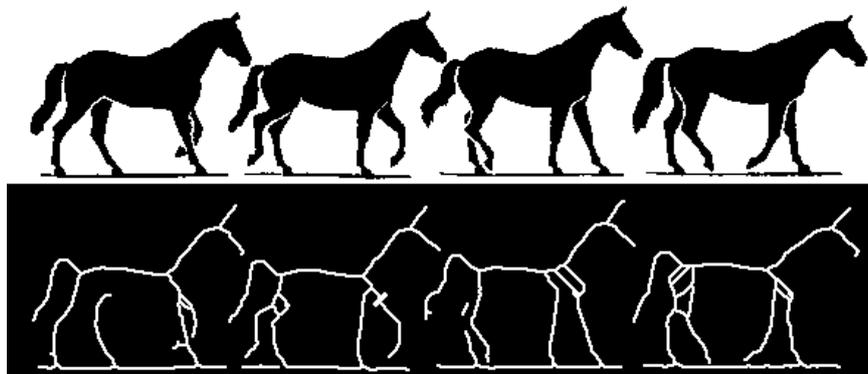


Fig. 4-65. Arriba: gráfica del desplazamiento de un equino en la marcha. Abajo: esqueletonización de cada una de las posturas. Las imágenes resultantes fueron erosionadas para su mejor observación.

Este tipo de técnica también es útil para determinar las características de las huellas digitales o para el análisis de fibras en un tejido. En estos casos, las imágenes son contrastadas y posteriormente umbralizadas. Las fibras o huellas que contrastan sobre el fondo pueden ser combinadas matemáticamente con la imagen original para tomar como referencia anatómica (Fig. 4-66).

El filtro **Pruning** es muy similar al Thinning, con la excepción que busca los puntos terminales de las ramas (un solo píxel vecino) y comienza a eliminarlas hasta encontrar un nodo (más de 2 píxeles vecinos). Por lo general, el filtro Pruning se aplica sobre la imagen ya esqueletonizada. La figura 4-67 muestra un ejemplo del mismo.

El filtro **Voronoi** es una variedad del proceso de esqueletonización. El algoritmo también se conoce como esqueleto por zonas de influencia (del inglés: “*skeletons by influence zone*” - SKIZ) y se encarga de segmentar el fondo de la imagen (Fig. 4-68). Este filtro genera áreas equidistantes de los bordes de los objetos a los cuales circunscribe. Si se establece el centro del área, es posible conocer la distancia entre los centros de los objetos a los cuales circunscribe.

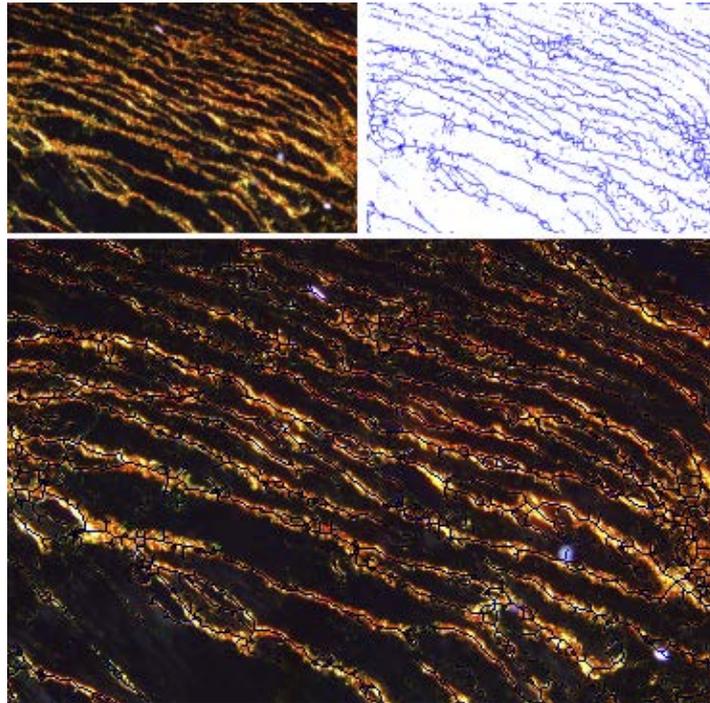


Fig. 4-66. Arriba izquierda: fibras elásticas de la aorta bovina teñidas con el colorante Sirius Red. Arriba derecha: imagen resultante luego de la aplicación del filtro Thinning. Ambas imágenes fueron superpuestas mediante la operación matemática AND (abajo).

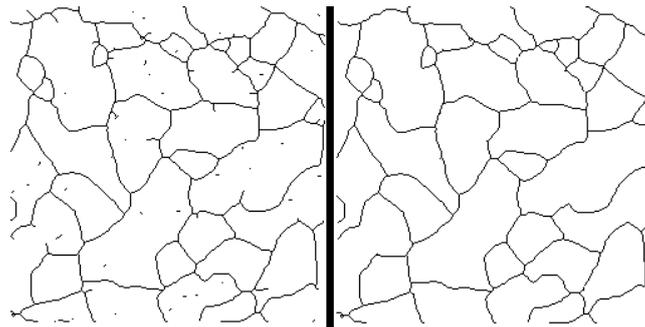


Fig. 4-67. Izquierda: efecto del filtro Thinning sobre una imagen original. Derecha: efecto del filtro Pruning sobre la imagen eskeletonizada.

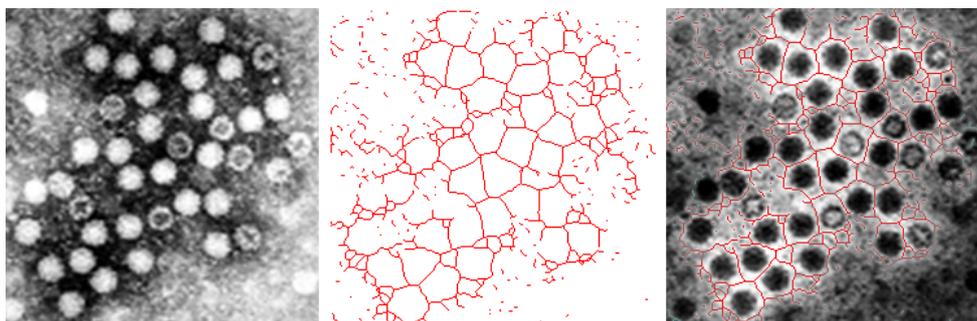
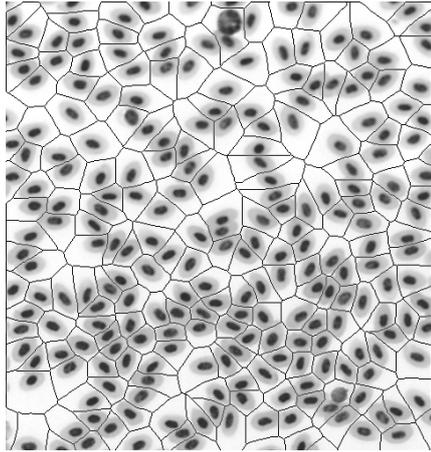


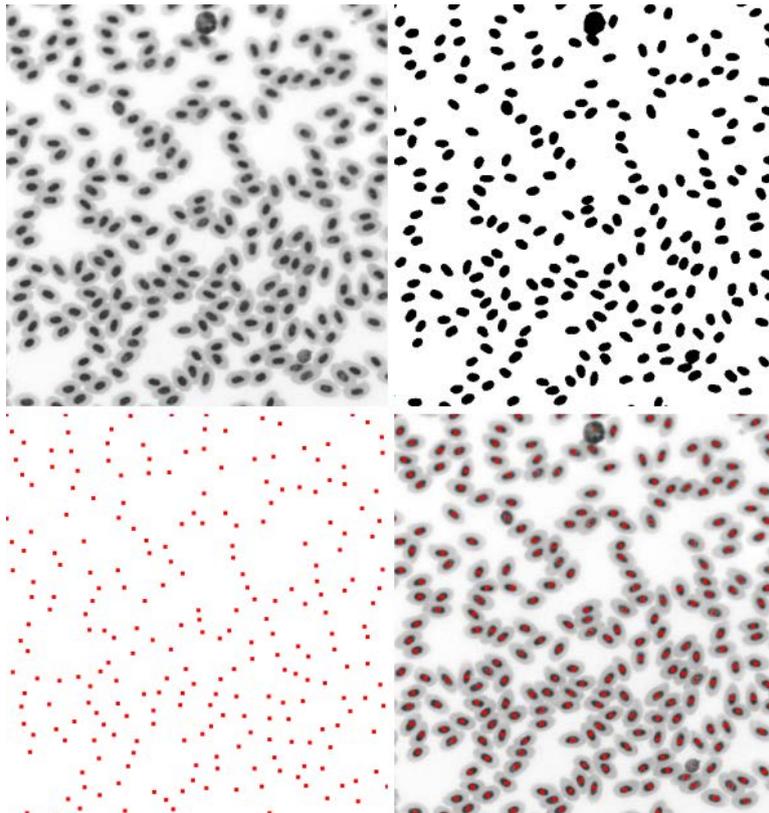
Fig. 4-68. Las partículas del virus de la Hepatitis pueden ser separadas en áreas mediante el filtro Voronoi. En el centro de la figura se observa el efecto del filtro. Una vez superpuesto sobre la imagen original (mediante el operador XOR), es posible establecer los límites de área entre las partículas virales.

Tomando el mismo ejemplo de la figura 4-58, el filtro Voronoi establece la separación entre los glóbulos rojos de aves, basado en la binarización de la imagen. Para este último propósito, el umbral de intensidad se corresponde con los núcleos de las células (centro oscuro de las estructuras ovaladas (Fig. 4-69).



**Fig. 4-69.** Efecto del filtro Voronoi sobre la imagen original de la figura 4-58. Nótese que la delimitación del área no encierra al objeto en su centro sino en un punto equidistante con respecto al núcleo del objeto vecino.

El filtro de **Reducción** o de **Punto Final** reduce el objeto a un punto único o grupo de puntos dentro de la imagen binaria. A estos puntos resultantes se les asigna el valor máximo de la Distancia Euclídeana, que es igual al radio del círculo más grande que encierra al objeto binario, en cuyo centro se encuentra el punto final. Este filtro permite establecer las coordenadas del centroide de los objetos dentro de la imagen, así como tomarlas de referencia para establecer distancias manuales entre los objetos. El centroide o centro de masa se define como el punto equidistante de los bordes de una estructura. En un objeto circular, el centroide coincide con el centro. El efecto de este filtro se puede observar en la figura 4-70.



**Fig. 4-70.** Efecto del filtro de Punto Final. Arriba izquierda: imagen original. Arriba derecha: efecto de la binarización (umbralización). Sobre esta última, se aplicó el filtro Punto Final (abajo izquierda). Esta imagen fue erosionada para la mejor observación de los puntos. La imagen inferior derecha surge de la combinación matemática entre la precedente y la original.

Una forma de delimitar los objetos es mediante un filtro especial de convolución llamado **Escultura** o **Sculpt**. Tal vez este filtro pueda ser considerado más por el efecto visual que produce que por sus beneficios en las mediciones, ya que no es efectivo en todas las cir-

cunstances. Su efecto se podría considerar como similar al que se observa en el microscopio cuando se utiliza la óptica Nomarski. En la figura 4-71 se observa su efecto sobre distintos objetos. Al igual que otros filtros de convolución se basa en la estructura de un kernel como se observa en la figura 4-72.

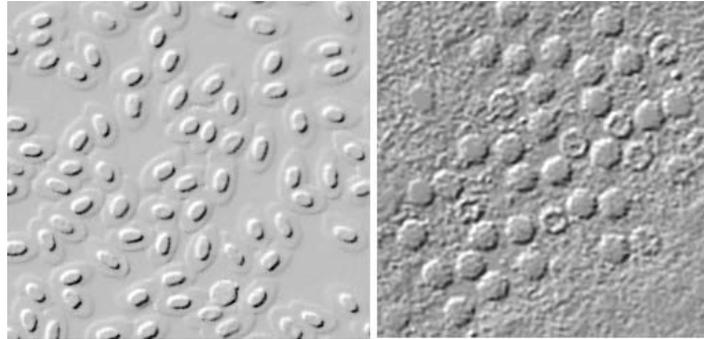


Fig. 4-71. Efecto del filtro Escultura sobre la imagen original de la figura 4-58 (izquierda) y de la figura 4-68 (derecha).

-1	0	0
0	0	0
0	0	1

Fig. 4-72. Filtro Escultura en su versión de kernel de 3x3.

Todos los filtros previamente mencionados, pueden ser aplicados de manera individual o combinada. Esto es, una imagen puede ser procesada por un solo tipo de filtro o por varios, de manera consecutiva. El resultado final dependerá de la imagen original, de los tipos de filtros aplicados, de la configuración del kernel y de la secuencia de filtración. Constantemente se están generando nuevos filtros que cubren las deficiencias de otros o que asocian directamente varios filtros en uno, evitando así la necesidad de tener que secuenciar su aplicación. En la figura 4-73 se muestra el efecto producido por la asociación de varios tipos de filtros sobre una imagen de glóbulos rojos, capturada con el microscopio electrónico de barrido (SEM).

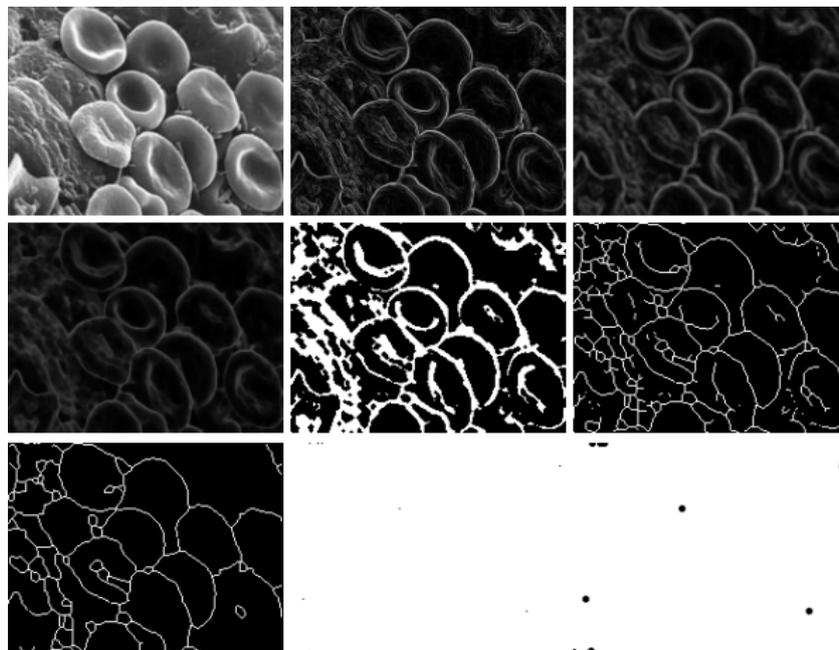


Fig. 4-73. Efecto de la aplicación de diferentes filtros sobre la misma imagen original. De arriba abajo y de izquierda a derecha: imagen original; filtro Roberts; filtro LowPass 3x3; filtro Erosión 3x3 en cruz; binarización; filtro Thinning; filtro Pruning; filtro Punto Final; filtro Erosión 5x5 circular.

La aplicación de estos mismos filtros, pero con otro orden, puede generar resultados totalmente distintos. Más aún, la ausencia de alguno de estos filtros, manteniendo el mismo orden establecido, puede generar una imagen final totalmente diferente. Si la imagen original de la figura 4-73 hubiese sido procesada exclusivamente mediante el filtro de Punto Final, la cantidad de puntos terminales hubiese sido mayor al obtenido con la secuencia presentada (Fig. 4-74). Esto demuestra que la aplicación de filtros puede beneficiar el aspecto de las imágenes, ya sea por realce o por suavización, pero en todos los casos, el efecto sobre las mismas siempre va a ser distinto a no haber aplicado ningún tipo de modificación.

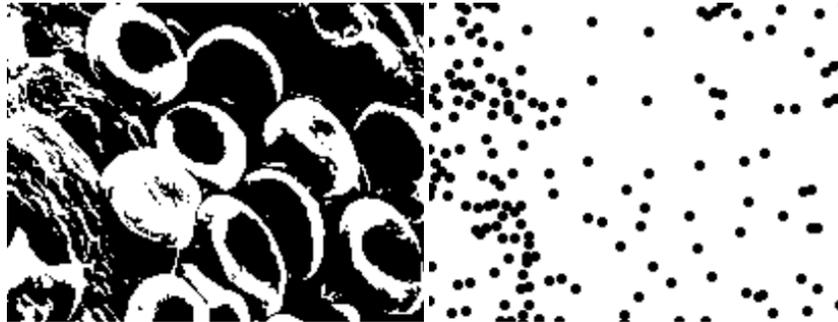


Fig. 4-74. La imagen original de la figura 4-73 fue binarizada (izquierda). Posteriormente se aplicó el filtro Punto Final y el Erosión 5x5 circular (derecha).

En una imagen color, los filtros pueden ser aplicados a todos los canales en forma conjunta o a alguno de ellos en forma separada, independientemente del modelo de color utilizado. Al reagrupar los canales en una imagen única, el efecto se observa sobre la imagen final.

La figura 4-75 muestra una imagen color HSI, cuyos canales de tonalidad, saturación e intensidad fueron separados. Luego de aplicar diversos filtros sobre cada uno de ellos y reensamblarlos, se pueden apreciar los cambios ocurridos con respecto a la imagen original, tales como: pérdida del color, a modo de una imagen monocromática, con algunos reflejos verdosos; asimismo, está suavizada con respecto a aquella, habiendo perdido la textura del efecto del lápiz sobre el papel. Por su parte, si se modifica, alternativamente, cada uno de los canales separados de la imagen original mientras se mantienen inalterados los otros dos, se obtienen imágenes con tonalidades, saturaciones e intensidades diferentes entre sí, con respecto a la imagen inicial y en comparación con la resultante de la sumatoria de los tres canales modificados.

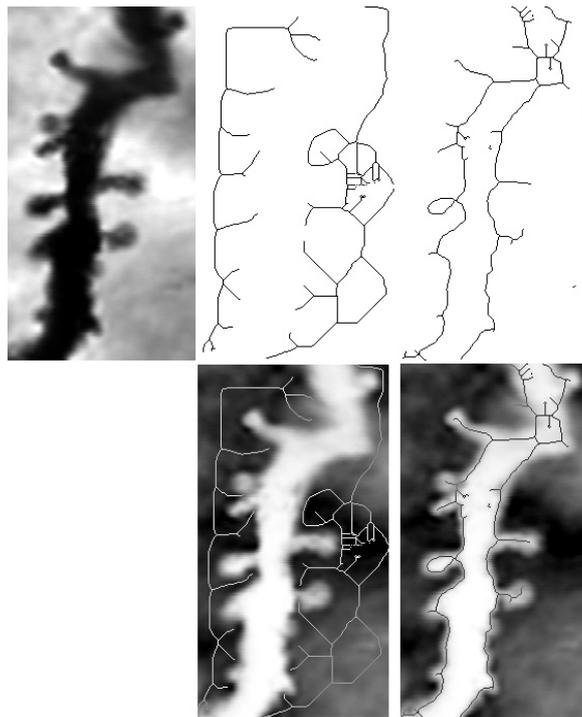
En aquella imagen que sólo se modificó el canal de tonalidad, los colores se ven exacerbados, predominando un tono verdoso. La modificación del canal de saturación se manifiesta fundamentalmente en el rostro, manteniendo prácticamente inalterado el color de los ojos. Cuando se modificó el canal de intensidad, los colores se mantuvieron inalterados con respecto a la imagen original, pero se suavizó la textura.

Si bien los filtros analizados hasta aquí se aplican sobre imágenes 2D, también se los puede utilizar sobre imágenes multidimensionales. Aquellas que contienen varios canales fluorescentes, pueden ser tratadas de la misma manera que las imágenes color, cuando se separa cada uno de sus canales. Por su parte, cuando se trabaja con imágenes 3D o 4D, se pueden aplicar filtros 3D preparados para tal fin, o en su defecto, los mismos que se utilizan sobre las imágenes 2D. Si bien los resultados pueden parecer similares, lo conveniente es utilizar el filtro que corresponda a cada dimensión, ya que están matemáticamente diseñados para actuar sobre el conjunto y no sobre cada una de las imágenes de la pila o la secuencia de manera separada. En aquellos programas donde sólo se ofrezcan los filtros convencionales, lo más apropiado es separar todas las imágenes, procesarlas de manera individual y finalmente reensamblarlas.

En la figura 4-76 se observa el efecto de la aplicación del filtro Thinning y Thinning-3D. Al aplicar el primero, se logra un efecto similar al que produce el filtro Voronoi, mientras que el segundo realiza la eskeletonización sobre la pila de imágenes (3D) como lo hubiese realizado el primero sobre una única imagen plana (2D).



**Fig. 4-75.** Efecto de la aplicación de filtros sobre cada uno de los canales de una imagen color HSI. Fila superior: imagen RGB original de una gráfica a lápiz color (gentilmente cedida por M. Zabala) (izquierda). Derecha: imagen resultante al reagrupar cada uno de los canales, luego de haber sido filtrados (ver detalles en las referencias de la tercera fila). Segunda fila: canales de tonalidad (H) (izquierda), saturación (S) (centro) e intensidad (I) (derecha) de la imagen original convertida al sistema de color HSI. Tercera fila: efecto del filtro Ecuilización Local, opción Desvío estándar, para una ventana de 256 y posterior filtrado con el filtro Rango 3x3 sobre el canal H (izquierda); filtro TopHat 3x3 y posterior filtrado con LowPass 3x3 sobre el canal S (centro) y filtro Mediano 3x3 sobre el canal I (derecha). Fila inferior: reconstrucción de la imagen RGB de cada uno de los canales modificados, dejando inalterados los otros dos.



**Fig. 4-76.** La aplicación de filtros 3D sobre imágenes multidimensionales puede producir efectos distintos a los observados con los filtros 2D aplicados sobre imágenes bidimensionales. La imagen original (arriba izquierda) correspondiente a una pila de 58 imágenes teñidas con la tinción de Golgi para la observación de espinas dendríticas (gentilmente cedida por el Dr. A. Rasia-Filho, Facultad Federal de Porto Alegre, Brasil). La aplicación del filtro Thinning (arriba centro) muestra un comportamiento distinto al Thinning-3D (arriba derecha). En la fila inferior se observa la superposición entre las imágenes eskeletonizadas y la original, luego de la aplicación del operador XOR.

### Filtros espectrales grandes

Los filtros espectrales se utilizan para seleccionar o eliminar la información de una imagen, en base a las diferentes longitudes de onda incidentes sobre la misma. Por lo general, la luz incidente pasa a través de filtros con una longitud de onda conocida y, por lo tanto, lo que se registra en la imagen son todas aquellas que sortearon el filtrado. Dado que la luz que entra en un sensor tiene una distribución espectral que depende, principalmente, de las características espectrales de la fuente de iluminación y de la reflectancia del tejido iluminado, la utilización de un filtro para seleccionar las regiones de la imagen con propiedades espectrales conocidas puede ayudar a extraer la información deseada.

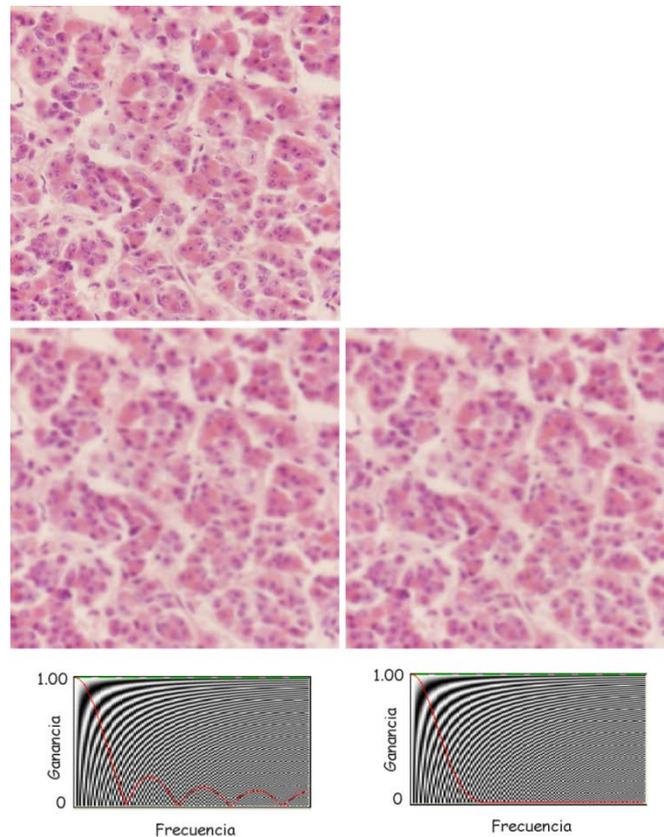
Los filtros espectrales grandes son algoritmos que no trabajan sobre la luz incidente sino que afectan directamente a la imagen capturada. Estos filtros son de convolución y producen realce o suavización de la muestra. Además, al trabajar sobre la luz espectral de la imagen, pueden generar bordes. Se comportan igual que los filtros descriptos previamente (LowPass, HiPass, Sobel), pero en lugar de utilizar un kernel estructurado, utilizan algoritmos que evitan los procesos de sumas y multiplicaciones. De esta manera se ahorra tiempo de procesamiento. Esta flexibilización del cálculo permite utilizar grandes kernels (hasta 4000 x 4000), sin afectar mayormente el uso de la memoria y el tiempo de ejecución de la computadora. A modo de ejemplo: la utilización de un filtro LowPass de 30x30 insume tanto tiempo de cálculo (minutos) que lo torna inaceptable. La aplicación de un filtro espectral grande LowPass, sobre la misma imagen, puede procesarse en fracciones de segundo, dependiendo de la resolución de la misma y el procesador de cómputo utilizado.

La particularidad de los filtros espectrales grandes es que, a diferencia de los filtros previamente descriptos que operan dentro de un dominio espacial (píxeles), lo hacen a nivel frecuencial, es decir, se analizan matemáticamente de acuerdo a su frecuencia. En términos concretos, lo que la convolución hace en el dominio espacial, se realiza por multiplicación en el dominio frecuencial.

Un gráfico frecuencial muestra los componentes de la señal según la frecuencia en la que oscilan dentro de un rango determinado. Una representación frecuencial incluye también la información sobre el desplazamiento de fase que debe ser aplicado a cada frecuencia para poder recombinar sus componentes y recuperar de nuevo la señal original. El dominio de la frecuencia está relacionado con las series de Fourier, las cuales permiten descomponer una señal periódica en un número finito o infinito de frecuencias. El dominio de la frecuencia, en caso de señales no periódicas, está directamente relacionado con la transformada de Fourier (ver más adelante).

En la figura 4-77 se presenta la imagen original y la aplicación de un filtro espectral grande LowPass. A los efectos de conseguir una mejor suavización de la imagen y un espectro más claro, es conveniente utilizar un kernel más pequeño e incrementar las veces de aplicación del mismo. El fondo del espectro muestra un rango de armónicas espaciales para las frecuencias correspondientes. Estas se orientan de manera vertical y su escala es igual a la imagen expresada al 100%. El fondo del espectro es utilizado para evaluar el tamaño de los objetos que serán realzados o atenuados.

Cuando se utiliza el filtro espectral grande HiPass, se produce un aumento de la nitidez y del contraste de la imagen. En la figura 4-78 se observa el efecto del filtro espectral grande HiPass tomando como base la imagen original de la figura 4-77. A diferencia de lo que ocurre con el filtro LowPass, al incrementar los pasajes del filtro, aún reduciendo el tamaño del kernel, se tiende a la binarización de la imagen.



**Fig. 4-77.** Sobre un corte de hipófisis (arriba) se aplicó un filtro espectral grande LowPass de 9x9 en un solo pasaje (centro izquierda). A su derecha se muestra el efecto del mismo filtro pero con un kernel 5x5 con 4 pasajes (centro derecha). Si bien el aspecto de suavizado en ambas imágenes es similar, en la fila inferior se observa que el espectro en la imagen de la derecha es más claro que en el de la izquierda y, por lo tanto, más conveniente.

El filtro espectral grande Paso de Banda, es una combinación de los filtros espectrales LowPass y HiPass. Debido a esto, el algoritmo suprime componentes de alta frecuencia que, por lo general, representan el ruido y a la vez incrementa el contraste de la imagen (Fig. 4-79).

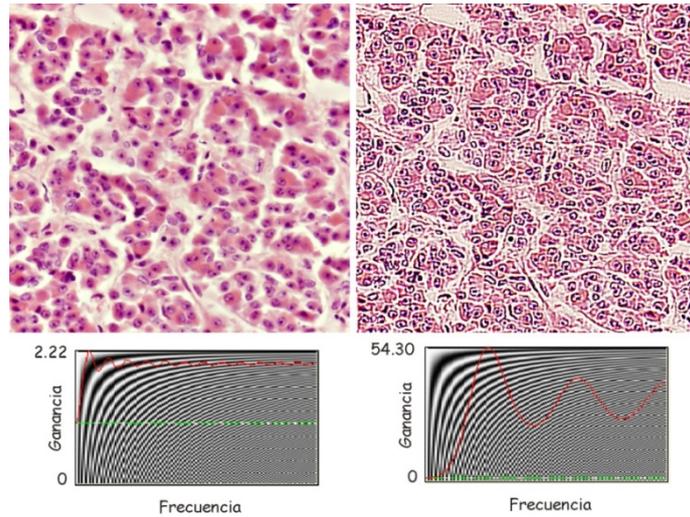


Fig. 4-78. Aplicación del filtro espectral grande HiPass de 50x50 en un solo pasaje sobre la imagen original de la figura 4-77 (izquierda) y del mismo filtro con un kernel de 10x10 con 5 pasajes (derecha). En la fila inferior se observa el espectro de cada uno de estos filtros.

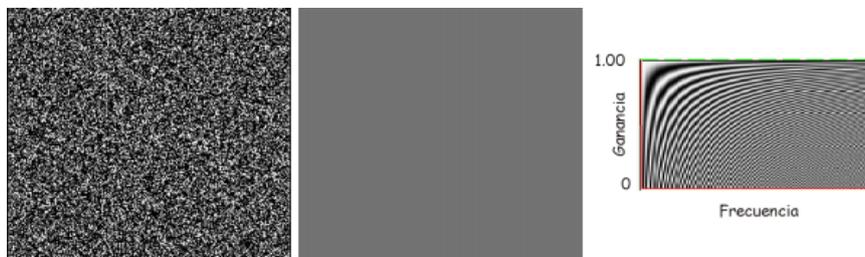


Fig. 4-79. Sobre una imagen representativa de ruido estático (izquierda) se aplicó el filtro espectral grande de Paso de Banda (centro). El kernel de HiPass fue de 63x63, mientras que el de LowPass fue de 232x232, durante 20 pasajes. Las partículas de ruido fueron eliminadas y se incrementó la intensidad. El espectro (derecha) muestra una curva ideal.

Los filtros espectrales grandes de Bordes pueden incrementar el brillo de los mismos sobre un fondo oscuro u oscurecerlos sobre un fondo claro. En la figura 4-80 se ve un ejemplo del mismo.



Fig. 4-80. Aplicación del filtro espectral grande para enaltecer bordes sobre un fondo oscuro. Se utilizó un kernel de 27x27 en un solo pasaje.

### Transformada de Fourier

De acuerdo con la teoría de Fourier, las señales pueden ser representadas mediante la combinación de dos o más sinusoides. La transformada de Fourier se basa en el teorema que establece que cualquier función armónica, mono o multidimensional, puede ser representada por una serie de funciones seno y coseno (suma de sinusoides) que sólo difieren en su frecuencia espacial, dirección, amplitud, intensidad y fase (posición).

El ingreso a la transformada se encuentra dentro del dominio espacial (imagen original compuesta por una matriz de píxeles) mientras que la salida se produce dentro del espa-



que los de alta frecuencia son necesarios para realzar los bordes de los mismos y proveer el detalle fino.

El número de frecuencias se corresponde con el número de píxeles en el dominio espacial de la imagen, por lo tanto, la imagen original y el dominio frecuencial de Fourier tienen el mismo tamaño. Para una imagen cuadrada de  $N$  filas x  $N$  columnas, donde  $N$  es una potencia de 2 (256, 512, 1024, etc.), la DFT bidimensional se expresa a través de la siguiente ecuación:

$$F(k, l) = \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{N-1} f(i, j) e^{-i2\pi \left( \frac{k_i}{N} + \frac{l_j}{N} \right)} \quad [4-8]$$

donde,  $f(i, j)$  representa la imagen en el dominio espacial y el término exponencial es la función base correspondiente a cada punto  $F(k, l)$  en el dominio frecuencial. La ecuación puede ser interpretada como: el valor de cada punto  $F(k, l)$  se obtiene multiplicando la imagen espacial con la correspondiente función base y sumando el resultado. Las funciones de base son las ondas de seno y coseno con frecuencias cada vez mayores. Así,  $F(0,0)$  representa el valor DC (corriente directa, del inglés “*direct current*”) de la imagen original, que corresponde a la intensidad promedio de la misma, mientras que  $F(N-1, N-1)$  representa la mayor frecuencia.

Una vez expresada, la imagen frecuencial DFT puede ser revertida al dominio espacial. Esta inversión se logra aplicando la siguiente ecuación:

$$f(i, j) = \frac{1}{N^2} \sum_{k=0}^{N-1} \sum_{l=0}^{N-1} F(k, l) e^{-i2\pi \left( \frac{k_i}{N} + \frac{l_j}{N} \right)} \quad [4-9]$$

donde, el término de normalización  $1/N^2$  es la transformación inversa.

Para obtener el resultado de estas ecuaciones (conversión y reconversión desde y hacia el dominio espacial), se necesita calcular una suma doble para cada punto de la imagen. Cada una de las sumas se realiza por separado. Por esta razón, la imagen DFT se transforma primero en una imagen intermedia usando la transformada de Fourier unidimensional, en donde se calculan los valores para las filas y luego para las columnas (o viceversa, dado que ambas direcciones son equivalentes). Esta imagen intermedia es posteriormente transformada en la imagen final, también mediante una transformada unidimensional. Al calcular la transformación de Fourier bidimensional en términos de una serie de transformadas  $2N$  unidimensionales, disminuye el número de cálculos requeridos.

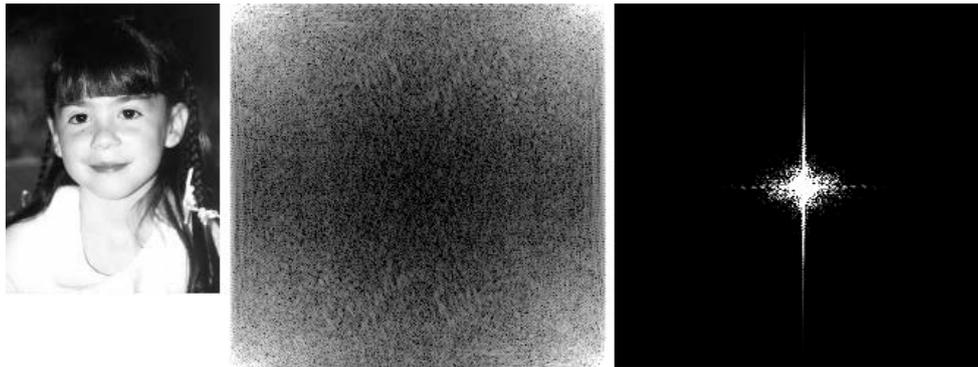
A pesar de este ahorro de cálculos, la DTF unidimensional tiene la complejidad de  $N^2$ . Esto puede ser reducido a  $(N \log_2 N)$  si se utiliza la transformada rápida de Fourier (del inglés, “*Fast Fourier Transform*” - FFT) para computar la DTF unidimensional. Esto mejora la velocidad de los cálculos, principalmente para las imágenes grandes.

El dominio frecuencial de Fourier maneja un rango de valores mucho mayor que el de la imagen en el dominio espacial. Por lo tanto, para ser más exacto, suele ser calculado y almacenado en 32 bits.

Como se estableció en el Capítulo 1, la transformada de Fourier es utilizada para la compresión de imágenes. También se la utiliza para representar el espectro de la descomposición de la imagen digital en sus componentes sinusoidales. De esta manera, se puede operar sobre las frecuencias de ciertas intensidades de forma tal de realzarlas, suavizarlas o suprimirlas, más rápidamente que en el dominio espacial, como lo hacen los filtros previamente descritos en este capítulo. Otra utilidad del dominio frecuencial se corresponde con el teorema de cortes de Fourier, en donde se relaciona una imagen con sus proyecciones (la imagen se ve desde sus lados). Esta es la base de la tomografía computarizada, una técnica de imagen de rayos X utilizada en la medicina y la industria.

De acuerdo a la forma en que trabaja el algoritmo de Fourier, las amplitudes de las componentes de baja frecuencia (mayor espaciado) se encuentran en las esquinas del espectro

bidimensional, mientras que las altas frecuencias (menor espaciado) se ubican en el centro. Dado que en el dominio frecuencial pueden existir valores negativos, la escala de grises de estas imágenes se compensan de tal manera que las intensidades negativas son de color oscuro, el cero es de color gris y los valores positivos son claros. Los componentes de baja frecuencia de una imagen son normalmente mucho más grandes en amplitud que los de alta frecuencia. Esto explica la presencia de intensidades muy brillantes sólo en las cuatro esquinas de la imagen polar (Fig. 4-84). En la representación invertida de la FFT, las frecuencias también se invierten. Así, el centro del espacio de Fourier se localiza en el centro de la imagen, correspondiendo a un brillo uniforme (frecuencia cero) en el espacio real (dominio espacial), mientras que las intensidades alejadas del origen representan espacios cada vez más pequeños a medida que se alejan del punto central (alta frecuencia).



**Fig. 4-84.** La imagen original en el dominio espacial (izquierda) es transformada al dominio frecuencial usando la FFT. En la imagen central se observa el espectro mostrado en forma polar, con las cuatro esquinas más iluminadas (valores positivos) que el centro (oscuro), donde se encuentran las mayores frecuencias. En la imagen derecha se observa el mismo espectro, pero invertido, es decir, las mayores frecuencias, de menor amplitud, se encuentran hacia la periferia. Esta última imagen se logra desplazando la imagen central  $N/2$  veces horizontalmente (hacia la derecha o la izquierda) y  $N/2$  veces verticalmente (hacia arriba o hacia abajo), donde  $N$  es la resolución de la imagen en vertical y horizontal. Si bien la imagen original tiene una resolución de  $293 \times 398$ , a los efectos de obtener una FFT de  $512 \times 512$  (potencia de 2 más cercana), se le agregaron píxeles con valor 0 ("padding"). Ambas imágenes frecuenciales fueron realizadas para su mejor apreciación.

De acuerdo con la ecuación [4-8], la resolución de las imágenes frecuenciales es igual a la potencia de 2 más cercana a la de la imagen en el dominio espacial. Cuando la resolución de la imagen digital no representa a esta potencia, su imagen frecuencial debe completarse con píxeles para alcanzar dicho valor. Esto se obtiene mediante un proceso de "relleno" (del inglés, "padding") que consiste en agregar píxeles, con valor de 0 o de un promedio de la intensidad del fondo, hasta alcanzar la resolución deseada.

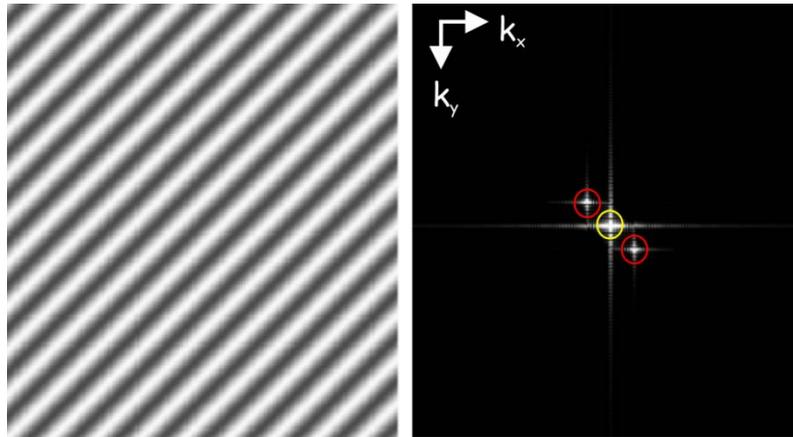
La FFT opera sólo sobre imágenes monocromáticas aunque estas sean multidimensionales. Si se desea aplicar la transformada sobre imágenes color, es necesario separar cada uno de sus canales, procesar la imagen monocromática y finalmente reagruparlos.

Si bien la forma directa de operar de la FFT determina un espectro con las frecuencias más bajas ubicadas hacia la periferia, la mayoría de los programas de análisis muestran el espectro invertido, es decir, con la frecuencia cero en el centro (valor DC central), las frecuencias bajas cerca del centro y las altas alejadas del punto central, en la dirección que identifica la orientación de las líneas. Los procesos de remoción o selección de frecuencias resultan más sencillos en este tipo de disposición. Cabe recordar que cada modificación que se haga en la imagen frecuencial, afectará a la imagen espacial cuando se haga la reversión.

La imagen en el dominio frecuencial es simétrica. Si se las divide en cuatro cuadrantes, el cuadrante superior izquierdo se corresponde totalmente con el inferior derecho, así como el superior derecho, con el inferior izquierdo. En cada uno de estos cuadrantes se representan las diferentes frecuencias con distintas distancias con respecto al centro. Las direcciones que adoptan las frecuencias representan distintas orientaciones en la imagen original. La intensidad de expresión en cada localización muestra la cantidad de frecuencias y orientaciones presentes en la imagen. En la gráfica de Fourier se muestra la intensidad de

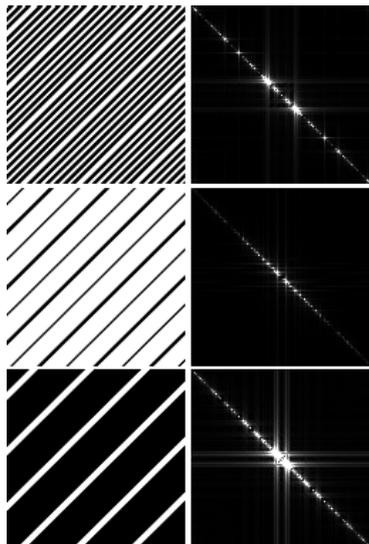
la onda senoidal, su dirección y su frecuencia espacial, pero no se muestra la fase exacta, es decir, cuándo aparece dentro de la imagen espacial. Mediante la transformada de Wavelet (ver más adelante) es posible determinarlo.

En la figura 4-85 se observa que el patrón de rayas oblicuas en el espacio real, genera tres picos en el espacio frecuencial. Esto se produce debido a que la senoide nuclea todos los valores positivos por adición de una constante, que podría ser, por ejemplo, la intensidad emitida por la muestra. El pico de la frecuencia cero, que se encuentra en el centro de la imagen frecuencial, representa la constante adicionada, mientras que los otros dos picos tomados en conjunto, forman la onda senoidal remanente del espacio real.



**Fig. 4-85.** El patrón con rayas oblicuas del espacio real (digital) (izquierda) se transforma en sinusoides en el espacio frecuencial (derecha). El pico central corresponde a la frecuencia cero (círculo amarillo), mientras que los picos secundarios (círculos rojos) corresponden a la onda senoidal remanente del espacio real. Los componentes de la onda senoidal se inscriben a lo largo del eje de las abscisas ( $k_x$ ) mientras que los valores máximos de brillo se representan en el eje de las ordenadas ( $k_y$ ).

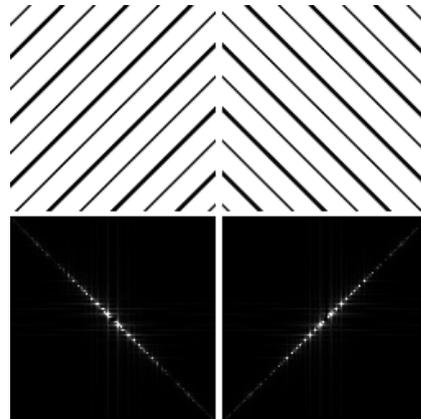
Cada pico individual en el dominio frecuencial, en realidad constituye una onda exponencial cuyo vector se orienta en dirección positiva o negativa. Las ondas sumadas constituyen la condición senoidal en el dominio espacial. En síntesis, los valores en dos posiciones opuestas dentro del dominio frecuencial son conjugados complejos, que combinados forman una onda sinoidal en el espacio real.



**Fig. 4-86.** Patrón a rayas de las imágenes originales y su correspondiente representación frecuencial.

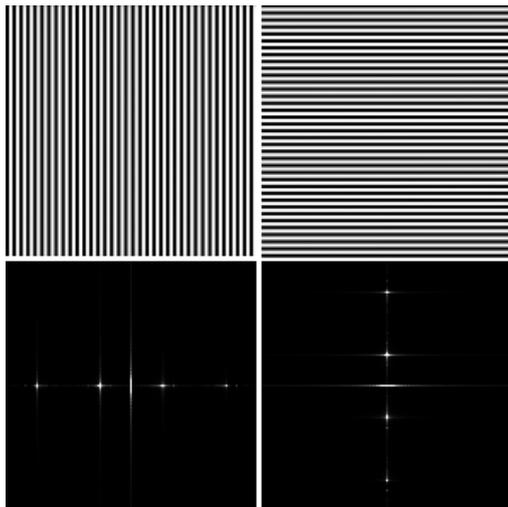
En la figura 4-86 se observan tres patrones de rayas distintos que tienen la misma orientación, aunque difieren en sus variaciones sinusoidales de brillo y varían en el espaciado (frecuencia). Para cada uno de ellos, la FFT bidimensional es muy sencilla ya que su perfil de luminosidad es perfectamente sinusoidal y, por lo tanto, tiene una sola frecuencia. En

estos espectros también se representa la orientación que es la misma para todos los casos. El brillo de los puntos presentes en el dominio Fourier representa el logaritmo de la potencia, es decir, el cuadrado de la amplitud de la frecuencia correspondiente. Si se invierte la dirección del patrón de rayas (Fig 4-87), esta también cambia en la imagen frecuencial.

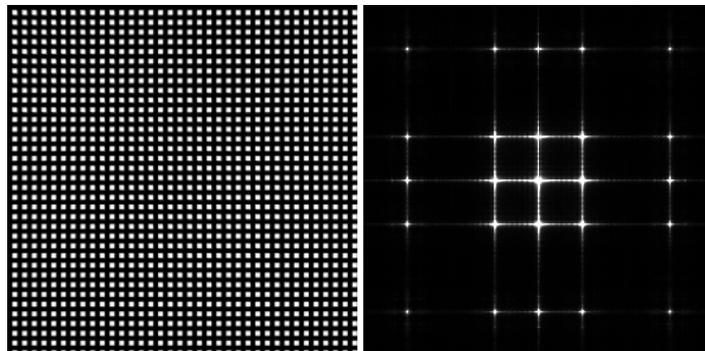


**Fig. 4-87.** El mismo patrón de rayas pero con dirección invertida, genera una imagen frecuencial idéntica a aquella pero orientada en el sentido inverso (en espejo).

Un patrón de rayas verticales u horizontales genera una imagen frecuencial donde los puntos se ubican en el mismo eje horizontal o vertical del espectro, respectivamente, en donde se localiza el punto central de origen  $F(0,0)$  (Fig. 4-88). Si se suman estos patrones verticales y horizontales en una sola imagen espacial, se obtiene una imagen frecuencial que es la suma de ambas imágenes frecuenciales separadas (Fig. 4-89).



**Fig. 4-88.** El mismo patrón de rayas horizontales o verticales genera imágenes frecuenciales, donde los puntos se ubican en el mismo eje vertical u horizontal que el punto de origen, respectivamente.



**Fig. 4-89.** La imagen espacial de la izquierda resulta de la sumatoria entre el patrón de rayas verticales y horizontales. El espectro que se genera, también es igual a la suma de los espectros de ambos patrones.

Las distintas formas de los objetos generan espectros de frecuencias muy distintos. En la figura 4-90 se presentan tres figuras geométricas diferentes. En la primera, se observa un

triángulo sin una orientación específica. El espectro que se genera, muestra tres líneas de valores que corresponden a la serie de sinusoides necesarios para especificar cada uno de los bordes de la figura. De la misma manera, el círculo se representa con coordenadas de puntos que se circunscriben al punto central  $F(0,0)$ . En este espectro se observa uniformidad en todas las direcciones. La estrella es una sumatoria de triángulos y por lo tanto, tienen un espectro parecido al primero, sólo que en este caso se representan los 5 bordes que circunscriben a la figura.

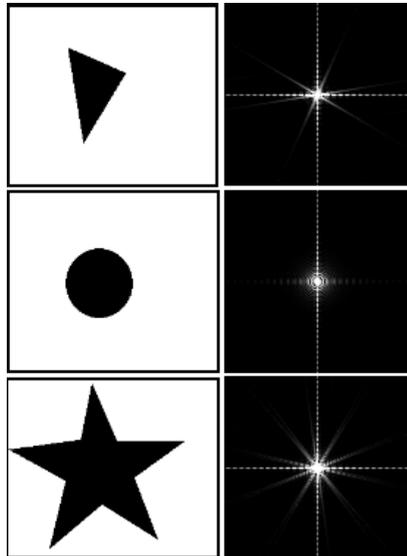


Fig. 4-90. Las diferentes figuras geométricas presentan un patrón frecuencial acorde a sus formas.

La aplicación de la FFT sobre una imagen conteniendo objetos reales muestra que existen similitudes con las formas previamente descritas (Fig. 4-91). En este caso se trata de una estrella de mar que muestra un patrón parecido al de la estrella de la figura 4-90. Sin embargo, el espectro consta de más de cinco aristas ya que las intensidades luz no forman sinusoides perfectas, contiene información no periódica (como en los patrones de rayas vistos previamente) y sus formas son más redondeadas.

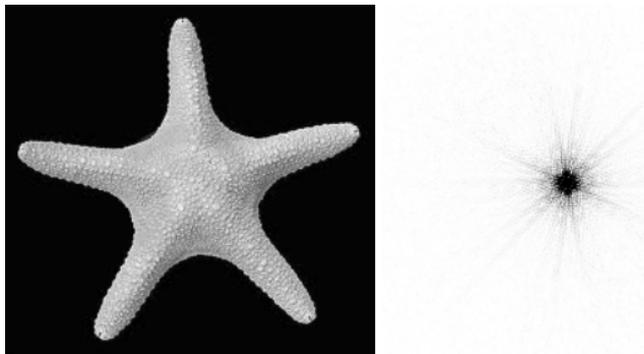
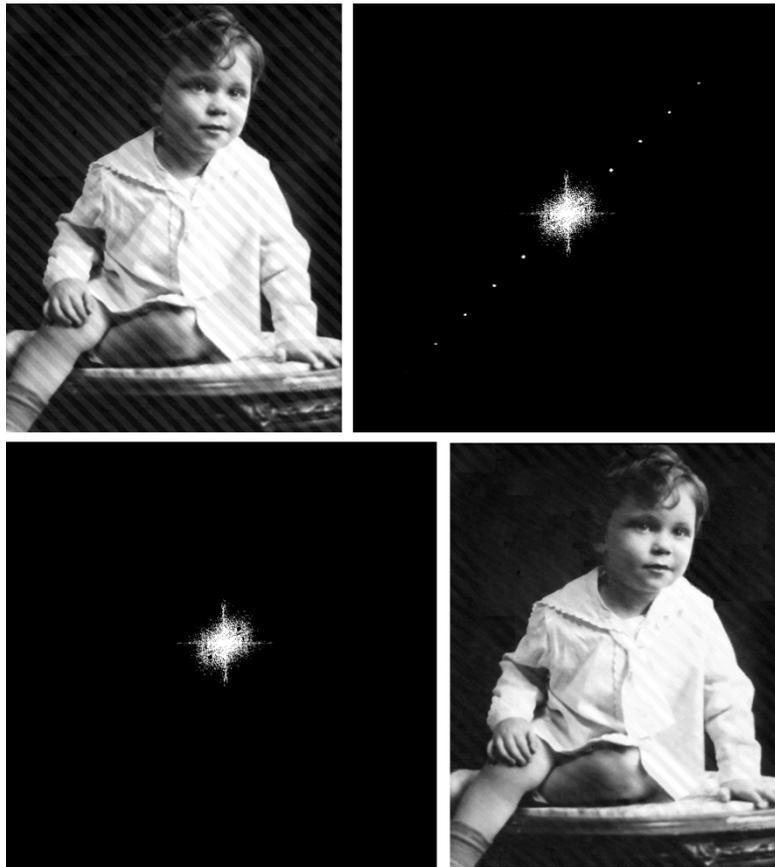


Fig. 4-91. Efecto de la FFT sobre una estrella de mar. La imagen del espectro fue invertida para apreciar mejor las formas.

La FFT se puede utilizar para aislar ruidos periódicos. Como se mencionó anteriormente, transformar dos imágenes originales y luego sumar sus frecuencias produce el mismo efecto que sumar las dos imágenes originales y luego aplicar la transformada (Fig. 4-89). Basado en este principio, la resta de una porción del espectro debería remover sectores no deseados dentro de la imagen original. Como fuera mencionado en el Capítulo 3, los ruidos presentes en las imágenes pueden provenir de diversas fuentes. Si se determinan las frecuencias que se asocian con dichos ruidos, es posible reducir su amplitud a cero para que sólo quede la información deseada. Esta imagen “manipulada” es revertida al dominio espacial, en donde ya no se observa el ruido. En la figura 4-92 se observa un ejemplo del mismo, donde gran parte del ruido fue eliminado.



**Fig. 4-92.** La imagen original (arriba izquierda) contiene un ruido continuo y sinusoidal, visualizado como rayas oblicuas que se representan en forma de puntos en la imagen Fourier (1D) (arriba derecha). Luego de la remoción de las frecuencias más destacadas (abajo izquierda), se revirtió la imagen hacia el dominio espacial (abajo derecha). Si bien todavía se observa algo del ruido, la mayor parte del mismo fue removido.

Existen diversas formas para realzar o eliminar las frecuencias deseadas o indeseadas. En todas ellas es necesario trabajar con un Area o Región de Interés (del inglés, “*Area or Region Of Interest*” - AOI o ROI). Esto se logra mediante herramientas que proveen los programas de procesamiento y de análisis de imágenes. Consisten en figuras expandibles cuadradas, redondas o de forma libre que circunscriben regiones dentro de la imagen, para que los diversos procesos ocurran exclusivamente dentro de las mismas.

Una vez circunscripta el área deseada, tomando como punto central al DC de la imagen frecuencial, se puede aplicar el filtro “Low Pass”. A diferencia del filtro de convolución que se utiliza para suavizar las imágenes en el dominio espacial, éste se encarga de eliminar todas las frecuencias que estén por fuera del área circunscripta, es decir, todas aquellas alejadas del punto central DC (frecuencias altas). Por el contrario, al seleccionar el filtro “High Pass”, se eliminan todas las frecuencias dentro del área circunscripta (bajas frecuencias), dejando intactas las restantes. Es posible marcar una o varias AOI en otros sectores del espectro, pero en este caso sólo se eliminarán o realzarán las frecuencias que se encuentren dentro de las áreas seleccionadas, sin afectar al resto de las mismas.

No siempre es posible remover todos los patrones indeseados, pero al menos este proceso permite reestructurar la imagen inicial para poder distinguir mejor los objetos presentes, como se observa en la figura 4-93. La imagen original muestra un patrón horizontal que genera ruido por detrás de las notas musicales (que literalmente generan ruido al ejecutarse simultáneamente). La eliminación de este patrón mediante el recorte de todo el eje vertical de la imagen espectral, elimina gran parte del ruido. Luego, la aplicación de otros filtros y la corrección del LUT (ver más adelante), permite mejorar la calidad de la imagen espacial observada. Si se continúan extrayendo frecuencias, es posible llegar a aislar las notas musicales (Fig. 4-94).

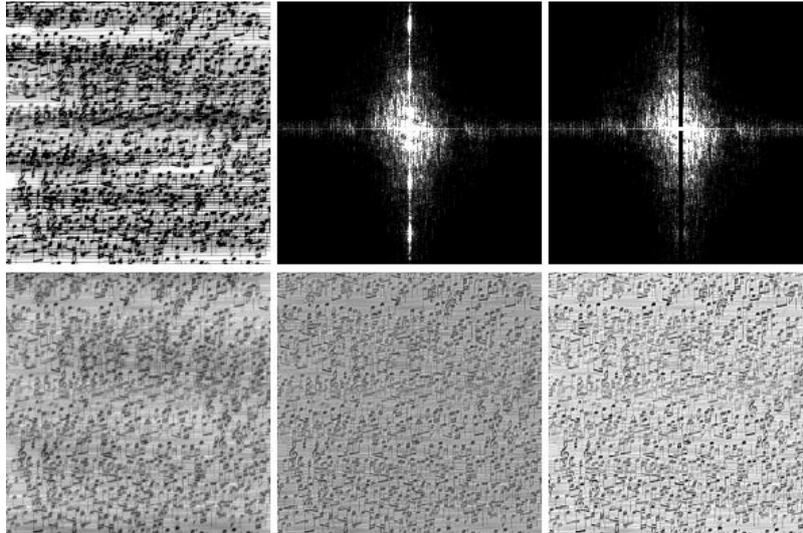


Fig. 4-93. La imagen original (arriba izquierda) es un conjunto de notas musicales puestas sobre el pentagrama de manera caótica. A su derecha se observa su representación espectral con un eje vertical central muy marcado. La eliminación de este eje central (arriba derecha) genera una imagen donde desaparecen la mayoría de los patrones horizontales (abajo izquierda). La aplicación de filtros Unsharp 7x7 y Flatten homogeniza la luz de la imagen (abajo centro), que finalmente es incrementada mediante la tabla de asignación de valores - LUT (abajo derecha).

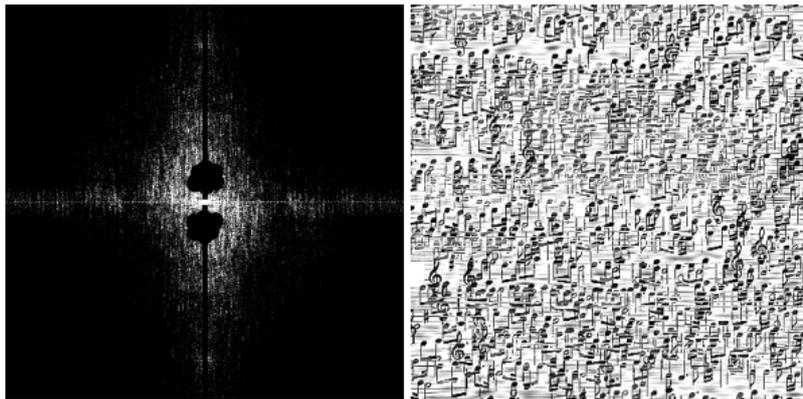


Fig. 4-94. Izquierda: sobre la imagen superior derecha de la figura 4-93, se eliminaron otras frecuencias. Luego de la aplicación de los filtros Unsharp 7x7 y Flatten y de la LUT, se observa que es posible seguir aislando las distintas notas musicales.

La aplicación de la FFT puede ser suplida muchas veces por filtros tales como Gauss o Laplace, ya que la selección de regiones arbitrarias en la imagen frecuencial puede generar un “anillado” en la periferia de la imagen digital, como se observa en la figura 4-4. Esto se produce debido a la forma en que el algoritmo opera sobre los bordes. Como fuera mencionado previamente, las imágenes en el dominio frecuencial necesitan completar su resolución mediante el agregado de píxeles (“padding”) para alcanzar una resolución que sea igual a la potencia de 2 más cercana a la de la imagen digital. En el dominio espacial, el agregado de píxeles en el contorno de la imagen sirve para que los distintos kernels ejerzan su efecto sin distorsionar los verdaderos bordes de la misma. Sin embargo, en el dominio frecuencial se asume que la imagen se “envuelve” alrededor de estos, de tal manera que el borde derecho es contiguo al izquierdo y el superior lo es con el inferior. De esta manera, cuando se multiplican los valores de la imagen frecuencial para su reversión, se produce un efecto tal como si los píxeles en el dominio espacial también se “envolvieran” y, por lo tanto, se generan los mencionados artefactos de anillado. Para evitar estos inconvenientes es necesario hacer un *padding* sobre la imagen digital que se quiera operar en el dominio frecuencial.

La decisión de la utilización de la FFT o los distintos filtros analizados en este capítulo depende enteramente de la imagen sobre la que se trabaje. La FFT puede emplear más tiempo de cómputo y memoria que los filtros con kernels pequeños. Sin embargo, la filtra-

ción de Fourier es más rápida que los otros métodos, principalmente cuando los kernels pueden llegar a ser tan grandes como la misma imagen.

### Transformada Wavelet

Como ha sido descrito, la transformada de Fourier es un conjunto de ondas sinusoidales de diferentes frecuencias. Mediante esta transformada, la señal se expresa como la suma, teóricamente infinita de senos y cosenos (la imagen se considera como una señal 2D finita), por lo que este procedimiento puede ser apto para analizar señales infinitas y periódicas. Sin embargo, al pasar la imagen digital al espacio frecuencial se pierde la información temporal. Esto significa que una imagen frecuencial presenta eventos, pero es imposible determinar cuando ocurrieron. En términos gráficos, a través de este procedimiento se podría determinar la presencia de notas musicales (frecuencias) pero no cuando deben ser ejecutadas (tiempo).

Existen variantes a la transformada de Fourier como la transformada de Fourier de tiempo corto (del inglés, “*Short-time Fourier transform - STFT*”) que permite crear ventanas de pequeñas dimensiones. Así, al aplicar la función sobre esta ventana, se puede localizar de mejor manera la aparición de un evento y determinar simultáneamente su frecuencia. El inconveniente posterior radica en que el mismo tamaño de ventana seleccionado (periodo de tiempo) será aplicado al resto de la imagen, por lo que sólo se podrían apreciar los eventos que ocurrieran exclusivamente en dicho intervalo (Fig. 4-95). Más aún, si dos o más eventos aparecen muy cerca unos de otros, no podrán ser resueltos, es decir, no será posible distinguir los diferentes comportamientos dentro de una misma amplitud de ventana.

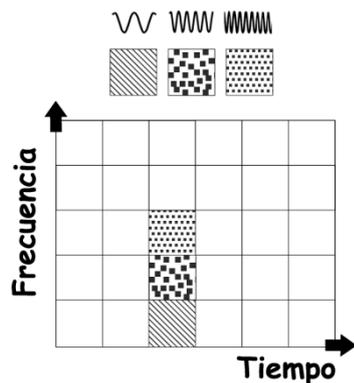


Fig. 4-95. Plano del tiempo-frecuencia de Fourier (STFT).

Para sobrellevar estos inconvenientes se describió la transformada Wavelet (del inglés, “*pequeñas ondas*”), basada en pequeñas ondas (en contraposición con las grandes ondas sinusoidales utilizadas por el análisis de Fourier) con duración limitada que decae rápidamente. Mediante esta transformada es posible obtener información frecuencial y temporal simultáneamente. Además, dado que el ancho de las ventanas no es fijo, se puede realizar un análisis de multiresolución con ventanas dilatadas, que es una técnica que permite analizar señales en múltiples bandas de frecuencia: el análisis de las frecuencias de mayor rango se realiza usando ventanas angostas mientras que aquel de las frecuencias de menor rango se hace utilizando ventanas anchas.

Al escuchar música, se percibe la variación de la frecuencia del sonido en el tiempo. Las propiedades de este sonido pueden ser reveladas por transformadas que descomponen la señal en tiempo y frecuencia, tales como la STFT y los wavelets. La transformación tiempo-frecuencia lineal correlaciona la señal con una familia de funciones (ondas con distinta forma) construidas a partir de traslaciones (o desplazamientos) y dilataciones (o contracciones) de una función principal denominada “onda madre”. Estas variantes de ondas se denominan átomos de tiempo-frecuencia. Para analizar señales de diferentes tamaños es necesario utilizar átomos de tiempo-frecuencia con diferentes soportes de tiempo. La transformada Wavelet descompone la señal a través de distintas “pequeñas ondas”. La función wavelet tiene un promedio de cero y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \varphi(t) dt = 0 \quad [4-10]$$

donde, la frecuencia en el tiempo está normalizada ( $|\varphi(t)| = 1$ ) y se encuentra centrada en  $t = 0$ . La familia de átomos de tiempo-frecuencia se obtiene a partir del escalado de  $\varphi(t)$  a través de  $a$  y su translación a través de  $b$ , expresados en la siguiente ecuación:

$$\varphi_{a,b}(t) = \frac{1}{\sqrt{|a|}} \varphi\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad [4-11]$$

donde,  $a$  es el parámetro de escalado o escala, que mide el grado de compresión;  $b$  es el parámetro de translación que determina la ubicación del tiempo en el wavelet. Si  $|a| < 1$ , la ecuación [4-11] es la versión comprimida de la onda madre y se corresponde principalmente con las altas frecuencias. Por otro lado, si  $|a| > 1$ , las wavelets son dilatadas y  $\varphi_{a,b}(t)$  tiene una mayor extensión en el tiempo que  $\varphi(t)$ , correspondiéndose con las bajas frecuencias. Las wavelets  $\varphi_{a,b}(t)$  generadas de la misma función wavelet madre  $\varphi(t)$ , tienen diferente escala  $a$  y ubicación  $b$ , pero todas tienen la misma forma.

Las señales a ser analizadas se pueden clasificar en continuas y discretas. Las primeras se describen mediante funciones continuas, como por ejemplo una señal musical, que mide la corriente que circula en el cable hasta llegar al parlante en función del tiempo. Por su parte, las señales discretas son aquellas descritas por una secuencia de números o pares de números. Una imagen binaria es una secuencia (píxeles) de pares de números (0 o 255).

Existen diferentes tipos de funciones wavelet que analizan las mencionadas señales. Las hay continuas (sombrero mejicano, Morlet, Shannon), discretas (que son funciones continuas con factores de escala y translación discretos) y rápidas. Las transformadas unidimensionales actúan directamente sobre una señal única. Por su parte, la transformada bidimensional se usa en el procesamiento de imágenes. Para este propósito se necesitan una función de escalado bidimensional  $[\phi(x,y)]$ , que da una aproximación a las frecuencias altas o bajas y tres wavelets  $[\varphi^V(x,y), \varphi^H(x,y), \varphi^D(x,y)]$ , que miden las variaciones de intensidad a lo largo de las direcciones V (columnas), H (filas) y D (diagonales).

En el procesamiento de imágenes, la transformada Wavelet usualmente recurre a las bases wavelet de Daubechies, las cuales tienen la propiedad de formar una base ortonormal (donde la norma del conjunto de vectores es igual a 1;  $|\mathbf{x}| = \sqrt{\langle \mathbf{x}, \mathbf{x} \rangle} = 1$ ) y poseen soporte compacto. Por esta razón, son adecuadas para el análisis de señales con soporte finito (notas musicales, electrocardiogramas, sismogramas, etc.) y en particular en el procesamiento y análisis de imágenes. La condición de ortonormalidad, asegura la independencia de la representación de la señal en los diferentes niveles de descomposición, es decir, que no se genera información redundante de la señal, y así, se evita la aparición de información falsa. Las bases de Daubechies permiten calcular la transformada Wavelet mediante un algoritmo poco complejo, con un bajo costo computacional y numéricamente estable, lo cual las hace eficientes frente a las bases no ortonormales. En el cálculo práctico de esta transformada se utiliza un conjunto de filtros discretos de paso-bajo  $[p(n)]$  y paso-alto  $[q(n)]$ .

En el procesamiento de imágenes 2D, la descomposición wavelet de una función  $f(x,y)$  se puede calcular con un algoritmo que considera a la imagen original como una matriz de datos iniciales  $c_0(x,y)$  (Fig. 4-96 izquierda). En cada nivel  $i$  de resolución del algoritmo (iteración), se calcula la correlación entre las filas  $c_{i-1}(x,y)$  y los filtros unidimensionales  $(p(n)$  y  $q(n))$  en la dirección vertical, resultando dos imágenes compuestas, cada una por la mitad de las filas de la matriz (Fig. 4-96 centro). Luego, se calcula la correlación entre estas imágenes y los filtros  $p(n)$  y  $q(n)$  en la dirección horizontal resultando, de cada una, dos imágenes compuestas por la mitad de las columnas (Fig. 4-96 derecha). Estas cuatro sub-imágenes resultantes constituyen las tres imágenes detalle y la imagen aproximación (tendencia o residuo) y su resolución (cantidad de píxeles) es igual a aquella registrada en la imagen original. Por lo tanto, la transformada Wavelet no incrementa el volumen de datos.

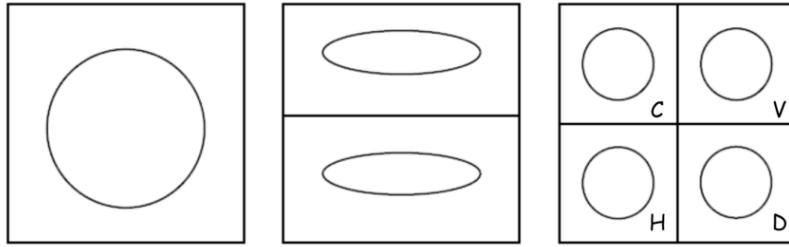


Fig. 4-96. Pasos del proceso de descomposición de una imagen. Izquierda: imagen original; centro: descomposición en dirección vertical; derecha: descomposición de la imagen central en dirección horizontal (resultado final). Las letras presentes en los cuadrantes indican el coeficiente de aproximación (C) y los componentes independientes en el dominio Wavelet que dan cuenta de los detalles de la imagen original en el primer nivel  $i$ , en las direcciones: vertical (V), horizontal (H) y diagonal (D).

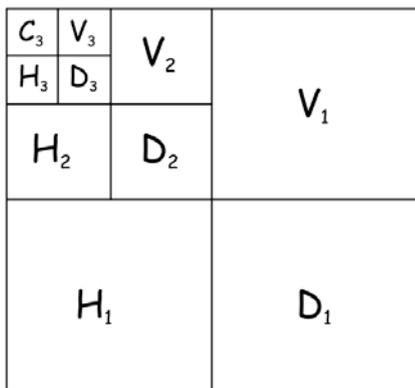


Fig. 4-97. Esquema de la descomposición Wavelet piramidal en dos dimensiones para tres iteraciones. Las letras presentes en los cuadrantes indican el coeficiente de aproximación (C) y los componentes independientes en el dominio Wavelet que dan cuenta de los detalles de la imagen original en el nivel de iteración correspondiente, en las direcciones: vertical (V), horizontal (H) y diagonal (D).

Si se emplea un algoritmo piramidal con tres iteraciones, la cantidad de píxeles sigue aún sin variar, pero las resultantes en la imagen se distribuyen de manera distinta dentro de la matriz, como se observa en la figura 4-97.



Fig. 4-98. Descomposición de una imagen real mediante la transformada Wavelet en una sola iteración.

En la figura 4-98 se observa la descomposición de una imagen mediante la transformada Wavelet en una sola iteración, mientras que en la figura 4-99 se observa otra imagen iterada 3 veces.

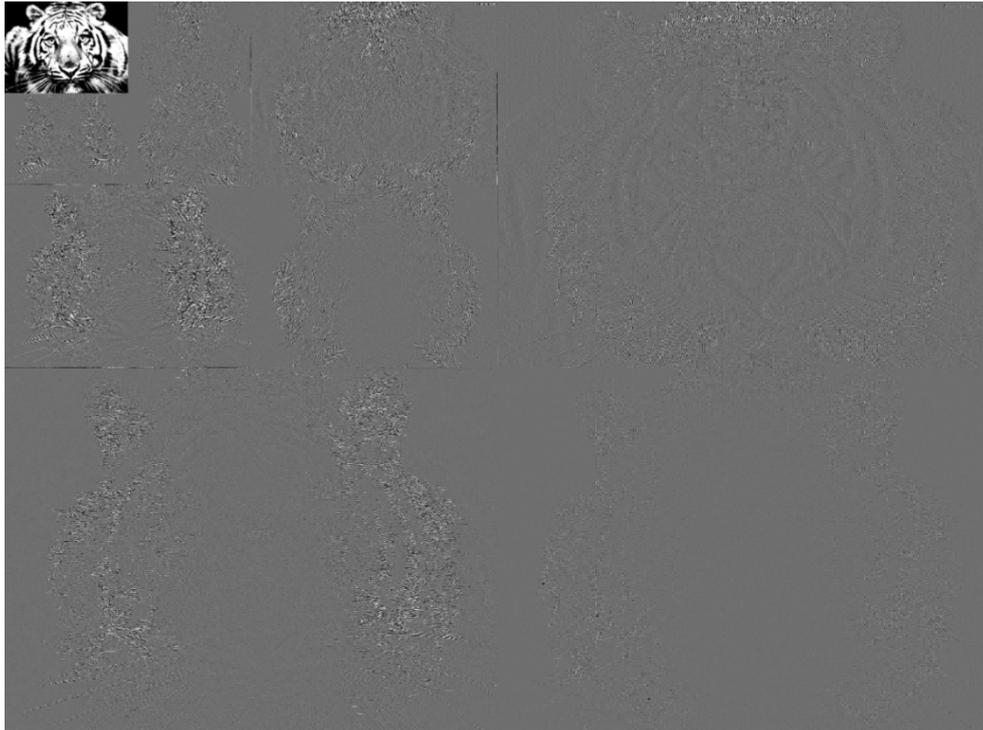


Fig. 4-99. Descomposición de una imagen real mediante la transformada Wavelet en tres iteraciones.

Una vez que se obtiene la matriz con las imágenes detalle (vertical, horizontal y diagonal) y la imagen tendencia, se puede aplicar el algoritmo inverso de la transformada Wavelet para reconstruir la imagen original  $c_0(x,y)$ . Si se aplica el algoritmo de reconstrucción sólo a los coeficientes wavelet de un determinado nivel de resolución (iteración 1..n) y el coeficiente de aproximación se convierte en cero, se puede reconstruir cualquier nivel de detalle. De la misma manera, si se aplica el algoritmo de reconstrucción sólo a los coeficientes de aproximación, haciendo cero el resto de la matriz, se puede reconstruir la tendencia.

En cada iteración, la imagen resultante contiene una banda limitada del espectro de frecuencias originales: específicamente, los detalles y la tendencia de la primera iteración contienen la mitad más alta y más baja del espectro de frecuencias de la imagen original, respectivamente; a su vez, el detalle de la segunda iteración contiene la mitad más alta del espectro de frecuencias de la tendencia de la primera iteración y así sucesivamente.

La visión humana es más sensible a las pequeñas variaciones de color y brillo que a las grandes, es decir, que distingue preferentemente las señales de baja frecuencia. Por lo tanto, los componentes de alta frecuencia presentes en las imágenes digitales pueden ser comprimidos sin distorsión. Mediante el uso de wavelets es posible determinar donde se encuentran tanto las áreas de alta como de baja frecuencia. En la figura 4-100 se presenta un ejemplo en donde la información de alta frecuencia fue incorporada a la imagen original, en la que prácticamente pasa desapercibida. Para ello, se incluyeron tres elementos con diferente tonalidad y tamaño sobre una matriz de tonalidad uniforme. Mediante el uso de la transformada Wavelet fue posible desenmascararlos.

En la actualidad el uso de la transformada Wavelet es muy diverso. En el Capítulo 1 se describió su aplicación en la compresión de datos, principalmente para la portación de imágenes, pero también para su archivo, como en el caso de las huellas dactilares, sobre las que también se emplea en el reconocimiento de patrones. Asimismo, se utiliza para el procesamiento de señales electrocardiográficas, sísmicas, de sonido y de radar. En el procesamiento y análisis de imágenes, la transformada Wavelet permite suavizar y eliminar ruidos de las mismas, así como detectar bordes y esquinas. Otras aplicaciones incluyen el análisis de ADN y proteínas, control de calidad de diversos productos, reconocimiento de voz, gráficos computacionales y análisis multifractal. También tiene aplicación en la astrofísica, en la óptica y en la mecánica cuántica. Las aplicaciones más sorprendentes incluyen la descripción del tráfico de Internet, para el diseño del tamaño de los servicios que

presta y en finanzas, para la detección de las propiedades de variación rápida de los valores.

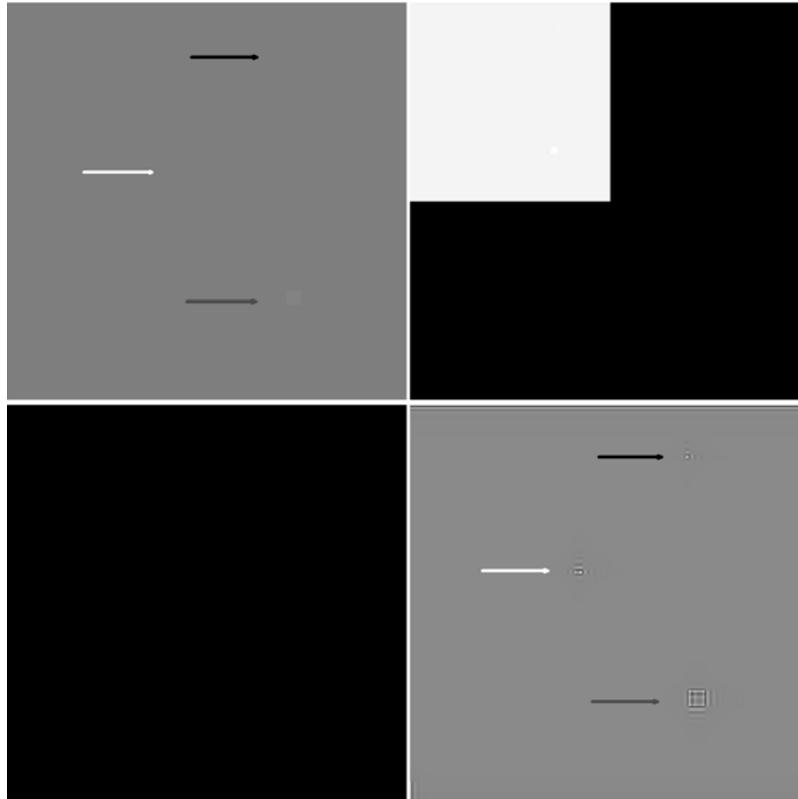


Fig. 4-100. Arriba izquierda: imagen de resolución 256x256 con una intensidad uniforme de 125, en la que se incorporaron tres elementos: un píxel aislado con intensidad 128 (flecha negra); tres píxeles secuenciales con intensidad 128 y otro adyacente de intensidad 130 (flecha blanca) y una matriz de 8x8 píxeles con intensidad 130 (flecha gris). Arriba derecha: análisis ortonormal de la transformada Wavelet (aplicado mediante el algoritmo Fractional Splines Wavelets). La imagen con los cuatro cuadrantes está expresada en 32 bits. Abajo izquierda: transformación de los píxeles del coeficiente de aproximación a intensidad cero. Abajo derecha: inversión de la imagen anterior, aplicando la transformada Wavelet inversa (síntesis). Las flechas muestran el contorno de los objetos incluidos manualmente en la imagen original. La imagen está expresada en 8 bits para su mejor apreciación.

### Deconvolución

De acuerdo a lo descrito en el Capítulo 3, la luz que atraviesa un sistema óptico genera una dispersión de cada uno de los puntos que ilumina, lo que produce una bruma o nubosidad sobre los objetos de la imagen. A esta dispersión se la denomina Función de Difusión del Punto (del inglés, “*Point Spread Function*” - PSF). En síntesis, la imagen es la suma de las imágenes de los puntos que forman los objetos, cada uno de los cuales es multiplicado por una función que se corresponde con la cantidad de luz proveniente de dicho punto. La multiplicación y la sumatoria son representadas matemáticamente por una operación denominada convolución. Para que se cumpla esta condición, la producción de la imagen debe ser lineal e invariante. Si bien los procesos de contraste de fase y contraste de interferencia diferencial (DIC) son procesos no lineales debido a que sus contrastes dependen de las diferencias en el índice de refracción dentro de los objetos, la epifluorescencia es lineal e invariante, tanto en el microscopio de campo ampliado como en el confocal.

La linealidad se consigue cuando cada punto de la muestra es representado de manera idéntica a otros puntos de la misma muestra, en tanto y en cuanto se utilice el mismo sistema óptico. El principio de linealidad se establece si la suma de las imágenes de dos objetos separados es la misma que la imagen de los objetos combinados. La linealidad está

relativamente asegurada en la microscopía de fluorescencia dado que los detectores son lineales.

La invariación (de inglés: “*shift invariance*”), implica que las características de la imagen y por lo tanto, la de la PSF, son las mismas en el mismo campo de visión. En otras palabras, la imagen de un objeto va a ser la misma, independientemente de su posición dentro del campo visual. De estos principios surge que la imagen está constituida por la superposición (suma) de las instancias de la escala apropiada y el desplazamiento de la PSF. Por lo tanto, conociendo la PSF es suficiente para caracterizar las propiedades de transmisión de luz del sistema óptico del microscopio.

Cuando se conoce la PSF del sistema, a veces resulta posible separar cada uno de los objetos de la imagen en el dominio frecuencial, por medio de realce y eliminación de la bruma. Este proceso se conoce como deconvolución y se logra mediante divisiones complejas entre la imagen original y la PSF del sistema. Lamentablemente, el proceso de reversión no es tan sencillo debido a que en la imagen se suman los diferentes ruidos producidos durante su captura. Más aún, el tiempo requerido para la captura de una imagen en un microscopio de campo ampliado o confocal puede ir desde fracciones de segundo a segundos, mientras que el proceso de reversión de la convolución puede insumir desde varios segundos a minutos.

Una imagen puede ser degradada por fenómenos independientes tales como ruido, dispersión de la luz, resplandor y bruma. Si bien los algoritmos de deconvolución pueden operar sobre todas estas anomalías, son particularmente efectivos para la remoción de la nubosidad, la que se describe como una dispersión no aleatoria de la luz, generalmente producida por la difracción que se genera al atravesar el camino óptico de un microscopio. Esto representa un límite intrínseco de cualquier sistema óptico y determina su mayor resolución.

La nubosidad puede ser modelada matemáticamente como una convolución, lo que posteriormente permite aplicar métodos matemáticos de deconvolución para revertirla. Este proceso se puede expresar mediante la siguiente fórmula, que representa una variación de la ecuación [3-1]:

$$g(x) = f(x) \otimes h(x) + n(x) \quad [4-12]$$

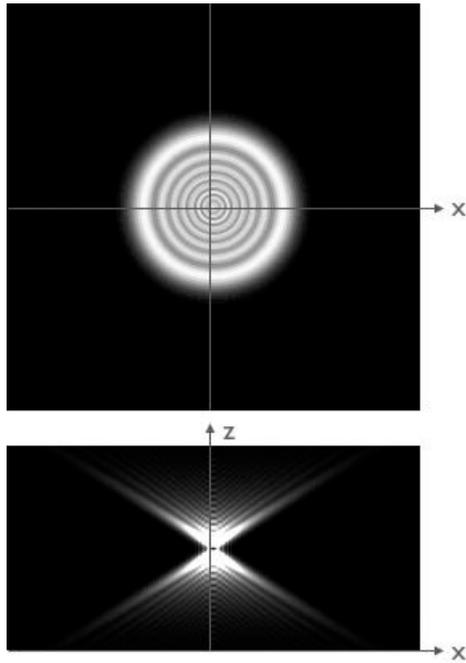
donde, la imagen ideal  $f(x)$  y la PSF  $h(x)$  se relacionan a través de un proceso de convolución ( $\otimes$ ); si se agrega el ruido  $n(x)$  se obtiene la imagen observada  $g(x)$ .

En el espacio de Fourier (frecuencial), el símbolo  $\otimes$  se convierte en una multiplicación. Por lo tanto, la deconvolución será la división entre la transformada de Fourier de la imagen por la transformada de Fourier de la PSF, también llamada función de transferencia óptica (del inglés: “*Optical Transform Function*”, OTF) y finalmente, la inversión de dicho resultado al dominio espacial. Mientras la PSF proporciona información sobre el rendimiento espacial del microscopio, la OTF informa directamente la respuesta frecuencial del mismo.

El proceso de convolución se realiza más rápidamente en el dominio frecuencial que en el espacial, mediante la división de la transformada de Fourier de la imagen por la OTF del microscopio. Dado que la PSF se considera invariante, sólo se necesita una OTF para realizar todo el cómputo en el dominio frecuencial.

Al formarse la imagen en el microscopio o en la cámara de video, se produce un mecanismo de convolución entre la PSF y cada partícula de la muestra. Este proceso genera puntos borrosos en diversas regiones de la imagen dependiente de la óptica que atraviese la luz. Luego de la convolución, el brillo en cada punto de la imagen se relaciona de manera lineal con el brillo natural de la muestra.

Para construir una imagen ideal a partir de la imagen observada, se necesita conocer la función de ruido y la PSF del sistema. La estimación de la primera es altamente probable, mientras que la PSF depende en gran medida del sistema óptico y de la muestra. Dado que la PSF es tridimensional (Fig. 3-13 y Fig. 4-101), la nubosidad que se genera también es un fenómeno tridimensional. Esto significa que la imagen proveniente de cualquier plano focal contiene la luz difusa de los puntos ubicados en ese plano, mezclada con aquella de los puntos originados en otros planos focales.



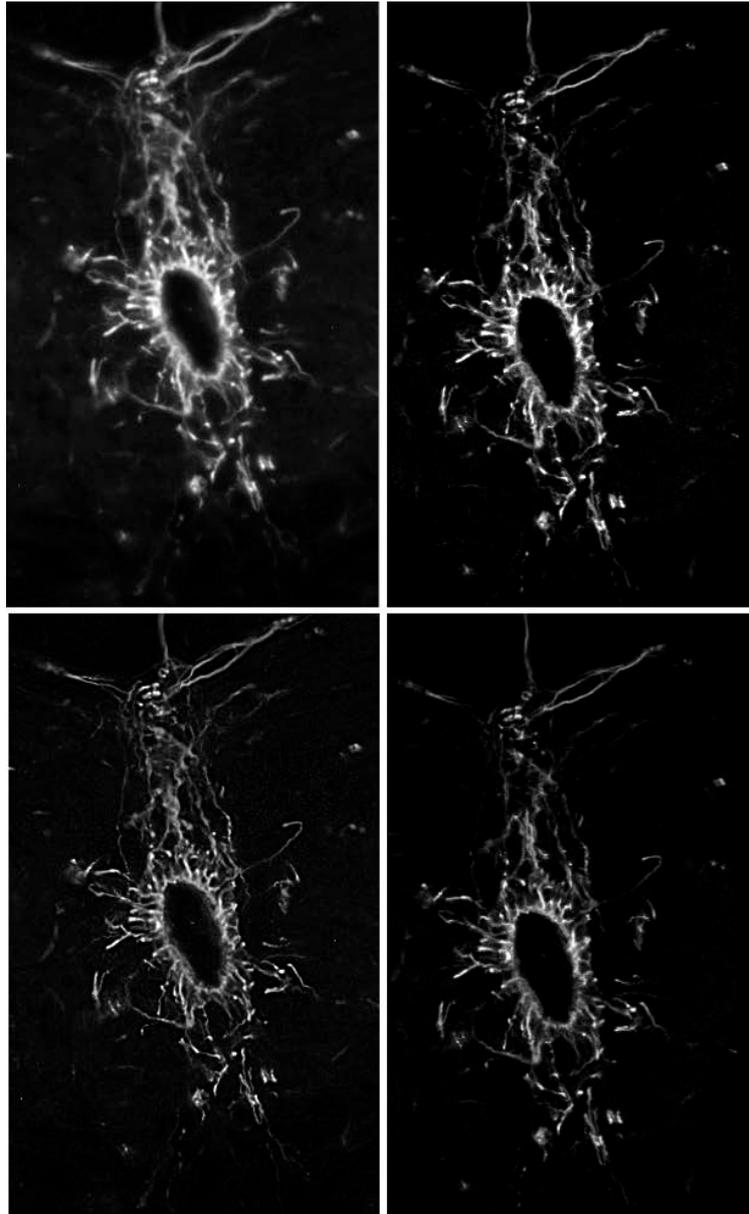
**Fig. 4-101.** Aspecto de la PSF de un punto, vista en el plano con sus discos de Airy (arriba) y su proyección en el eje Z (abajo).

En síntesis, la imagen se forma por la convolución entre la muestra y la PSF del sistema. La deconvolución revierte este proceso e intenta reconstruir la muestra a partir de una imagen con nubosidad fuera de foco. Dicho de otra manera, la deconvolución actúa sobre el contraste en una imagen 3D como si fuera un filtro lineal que promedia la señal de manera adaptativa sobre una gran cantidad de vóxeles, eliminando el ruido Poisson.

La PSF describe la respuesta del microscopio para cada punto de la muestra en la imagen. Esta información es necesaria para la mayoría de los algoritmos de deconvolución ya que establece la forma en que los objetivos y el resto de los sistemas ópticos distorsionan la imagen durante la adquisición.

El objetivo final de la microscopía celular es capturar la actividad de los componentes celulares. Sin embargo, en la microscopía óptica este propósito está limitado a su resolución espacial. Un microscopio de campo ampliado no tiene la resolución suficiente para identificar pequeñas organelas y mucho menos estructuras fibrilares. Como consecuencia, se obtienen imágenes borrosas, ya que se capturan los fotones correspondientes al punto focal y aquellos que están por encima y por debajo del foco. En este sentido, el microscopio confocal provee una mayor resolución. Sin embargo, cuando se quieren capturar imágenes de células vivas, no tiene la rapidez requerida para lograrlo, sumado a que la elevada energía provista por el láser puede dañar la muestra. Bajo estas circunstancias, el microscopio de disco giratorio podría ser una alternativa intermedia.

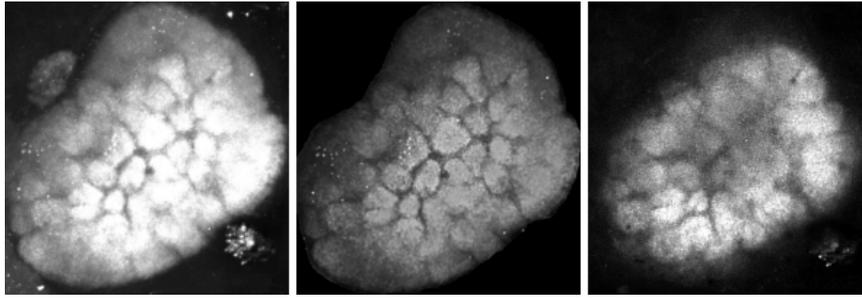
Más allá de cuál sea el microscopio seleccionado, la totalidad de las imágenes generadas muestra cierto aspecto brumoso. A pesar de ello, la aplicación de la deconvolución genera los resultados más vistosos cuando procesa imágenes provenientes de la microscopía de campo ampliado. Esto se debe a que si bien el microscopio confocal elimina físicamente gran parte de la emisión de los fotones que se encuentran por encima y por debajo del punto focal, estos algoritmos matemáticos sustraen la totalidad de la luz borrosa o reasignan la totalidad de luz difractada a su lugar de origen. Como toda la señal emitida se recoge por medio de una cámara CCD de alta sensibilidad, la deconvolución de las imágenes adquiridas con el microscopio de campo ampliado puede, en algunos casos, proporcionar una mayor resolución que la observada mediante microscopía confocal. Más aún, la sensibilidad y el rango dinámico obtenidos mediante deconvolución de una imagen no confocal son mayores que los de las que si lo son. De todas maneras, siempre es posible mejorar la calidad de las imágenes y por lo tanto, aquellas obtenidas mediante microscopía de campo ampliado podrán mejorar sustancialmente su calidad, pero no podrán tener la resolución que les brinda el microscopio confocal (Fig. 4-102).



**Fig. 4-102.** En la fila inferior se muestra el efecto producido por la aplicación del mismo tipo de algoritmo de deconvolución (MLE fast) sobre una imagen capturada con el microscopio óptico de campo ampliado (arriba izquierda) y el microscopio confocal (arriba derecha). Claramente se observa que los mayores cambios se producen sobre la imagen no confocal, si bien ambas tienen el mismo espesor. Las imágenes corresponden a la máxima proyección en el eje Z.

Como fuera descrito anteriormente, un filtro de realce como el Unsharp incrementa los contrastes de los bordes y logra que la imagen se agudice visualmente. Sin embargo, la deconvolución recobra información adicional y puede revelar detalles pequeños que no se visualizaban en la imagen original. En la figura 4-103 se compara el efecto del proceso de deconvolución con la aplicación del filtro Unsharp sobre la imagen original.

El objetivo final de la deconvolución es reasignar la nubosidad óptica a su posición original y reducir el ruido estadístico. No siempre es posible lograrlo debido a las características de los microscopios y de las muestras capturadas. Por ello, existen diversos algoritmos que tratan de obtener los mejores resultados sobre los diferentes tipos de imágenes procesadas. Cada uno de estos procedimientos está basado en datos simulados y, por lo tanto, no siempre son efectivos sobre todas las muestras procesadas. Asimismo, es posible que, aunque se utilice el mismo algoritmo de deconvolución, los diferentes programas de procesamiento produzcan resultados distintos, aún utilizando la misma imagen testigo.



**Fig. 4-103.** La imagen de la izquierda corresponde a una proyección máxima en el eje Z del lóbulo olfatorio derecho del cangrejo (*Chasmagnathus granulatus*) (provista gentilmente por el Dr. A. Delorenzi, Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, Universidad de Buenos Aires). La pila de imágenes fue capturada con un microscopio confocal (320 imágenes con un intervalo Z de 0,25  $\mu\text{m}$ ). La imagen central muestra el efecto producido por la deconvolución con el algoritmo 3D Blind, en donde se realzan los detalles. La imagen derecha es el resultado de la aplicación del filtro Unsharp 7x7 sobre la imagen original.

La mayoría de los algoritmos opera sobre imágenes monocromáticas. Si existiera la necesidad de deconvolucionar una imagen color, se deben separar sus canales básicos, procesarlos de manera individual y finalmente reagruparlos. Es probable que la PSF sea diferente para cada canal, principalmente si se utilizó una cámara con un solo CCD conteniendo un filtro Bayer. En cuanto a las imágenes monocromáticas, es conveniente trabajar con una profundidad de bits superior a 8. Lo ideal son 16 bits obtenidos con una cámara refrigerada.

La deconvolución directa no es tan sencilla debido a que durante el proceso de captura se incorpora ruido. Este ruido, rico en componentes de alta frecuencia, no proviene de manera directa desde el objeto sino que se introduce durante la formación de la imagen. El proceso de deconvolución, que pretende aumentar el contenido de alta frecuencia, puede llegar a amplificar el ruido hasta el punto de enmascarar y hacer inservible toda la información de la imagen proveniente del proceso. Por ello, tampoco existe un único método de deconvolución que satisfaga todas las circunstancias ya que depende de la muestra y el tipo de ruido que haya incorporado. Los algoritmos actuales solucionan algunas de estas limitaciones, a menudo haciendo una serie de supuestos razonables acerca del objeto, tales como suavidad y la no negatividad, e incluyen información adicional sobre el proceso del ruido en sí.

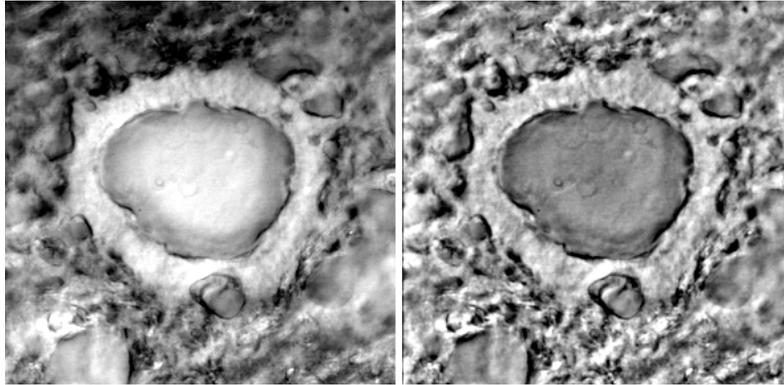
En la actualidad existen varios algoritmos que llevan a cabo el proceso de deconvolución por diferentes métodos, actuando sobre distintos aspectos de las imágenes. Si bien éstas pueden ser degradadas por fenómenos independientes, tales como ruido, dispersión de la luz, resplandor y bruma, los algoritmos de deconvolución son particularmente efectivos para la remoción de la nubosidad (del inglés: “*deblur*”) y para la restauración la luz de las mismas. Los procesos de remoción son fundamentalmente 2D, ya que aplican los operadores matemáticos plano por plano en las imágenes 3D. Por el contrario, los algoritmos restaurativos son esencialmente 3D, ya que operan simultáneamente sobre cada vóxel de la pila de imágenes. Los algoritmos de remoción son cualitativos, ya que mejoran la visualización de la imagen pero remueven información de la misma. Por su parte, los restaurativos son cuantitativos, ya que preservan la información de la imagen por redistribución de las intensidades de los vóxeles a su localización de foco. De esta manera, permiten realizar posteriores estudios morfométricos y de medición de intensidad. Los procedimientos más frecuentemente utilizados se describen a continuación.

### **Algoritmo Wiener Invertido**

Es un método directo de restauración con bajos requerimientos de cómputos. Sin embargo, es muy sensible a los cambios de la PSF y cualquier error en su estimación puede redundar en la producción de artefactos. El algoritmo de inversión funciona dividiendo la transformada de Fourier de una imagen original por la transformada de Fourier de la PSF del sistema óptico. Dado que la división en el espacio de Fourier es equivalente a la deconvolución en el dominio espacial, este es el método más sencillo para revertir la convolución que produce una imagen borrosa.

Este proceso es efectivo cuando la nubosidad se reparte de manera uniforme por todo el campo visual (imagen telescópica). Cuando se observan cortes gruesos al microscopio, la nubosidad es despareja y por lo tanto, este método no es muy efectivo. Generalmente, se lo emplea para hacer una aproximación en los procesos iterativos, sin embargo, se lo puede utilizar específicamente cuando se utiliza el contraste de fase en un microscopio de luz transmitida con una apertura pequeña del condensador.

Es un método ideal cuando la imagen es nubosa y contiene ruido aleatorio, ya que minimiza los errores entre la imagen original y la reconstruida (Fig. 4-104). La utilidad de este método está limitada por la amplificación de pequeñas variaciones de ruido que se pueden producir durante la eliminación de la nubosidad en el dominio frecuencial.



**Fig. 4-104.** Efecto del algoritmo Wiener (derecha) sobre una imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) correspondiente a una pila de imágenes (intervalo Z de  $0,2 \mu\text{m}$ ) de un corte grueso ( $40 \mu\text{m}$ ) del canal del epéndimo de la médula espinal. Se observa una mejor definición de las zonas borrosas, tanto del centro de la imagen como de la periferia.

#### **Algoritmo Vecinos Cercanos (Nearest Neighbors)**

Este procedimiento de remoción no utiliza toda la información de la PSF fuera de foco, sino que sólo toma los datos contenidos en los planos superior e inferior al plano de interés (los vecinos cercanos). Se basa en el concepto de que estos dos planos son los que contribuyen en mayor medida con lo que se observa en el plano central. El algoritmo genera nubosidad sobre los dos planos vecinos mediante la aplicación de un filtro de suavización y luego la sustrae del plano central.

Esta técnica es muy rápida ya que sólo requiere de dos convoluciones bidimensionales por plano. El proceso consiste en una exaltación de los detalles de cada una de las imágenes de la pila por turno. Para ello, se produce una convolución de las imágenes superior e inferior a la posición de la imagen que se está procesando, por medio de una PSF estimada. Luego, estas imágenes son multiplicadas por un coeficiente ( $<1$ ) y finalmente sustraídas de la imagen en proceso.

La limitante del método es justamente su incapacidad para calcular la luz que pueda provenir de otros planos que no sean los vecinos inmediatos (Fig. 4-105). Los resultados son menos precisos que con los procesos iterativos (ver más adelante) y el algoritmo Wiener. Más aún, este método tiene ciertas desventajas, ya que el ruido de varios planos puede sumarse al resultado final. Además, estos algoritmos remueven la señal borrosa y de esa forma, reducen la señal global de la imagen. Cuando un objeto comparte la PSF con más de un plano, este puede ser tratado en el plano no correspondiente y el efecto final es una alteración del mismo. En síntesis, los procesos de remoción mejoran el contraste de las imágenes sobre las que operan a expensas de una reducción en la relación señal:ruido, pudiendo llegar a introducir artefactos. En realidad, más que un proceso de deconvolución es un proceso de realce, a la manera que lo hacen los filtros, pero sobre una pila de imágenes. Lo más indicado sería considerarlo como un proceso de des-difuminación.

Cuando se trabaja con imágenes 2D o imágenes time lapse, la aplicación del algoritmo Nearest Neighbors tiene el efecto del algoritmo **No Neighbors**. Este es una variante del anterior, ya que usa exclusivamente la información de la PSF en foco (Fig. 4-106). Este algoritmo convolucionada la misma imagen que se está procesando, la multiplica por un

coeficiente y la resta de la misma imagen original. Dada esta particularidad, este filtro también puede ser utilizado sobre imágenes 2D.

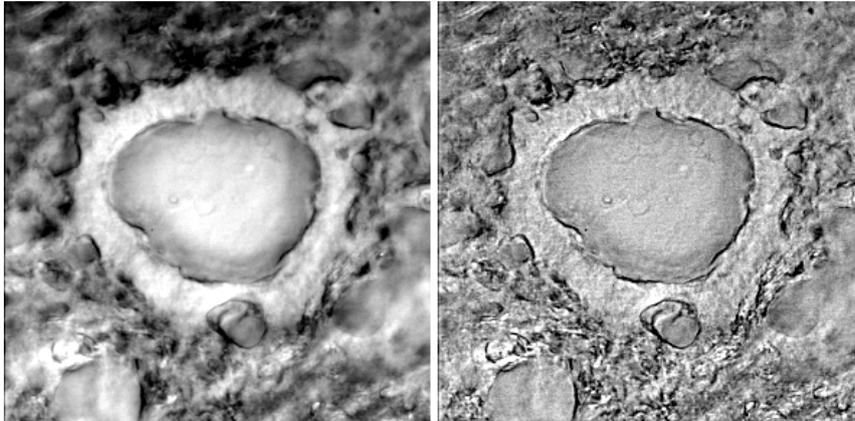


Fig. 4-105. Efecto del algoritmo Nearest Neighbors (derecha) sobre la imagen original.

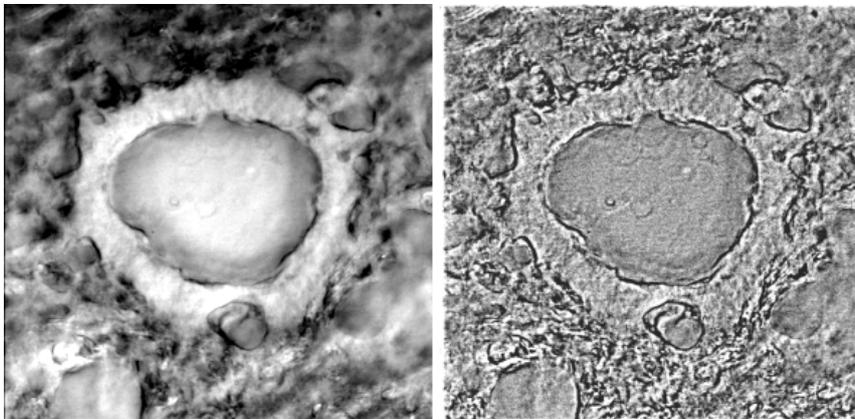


Fig. 4-106. Si durante la deconvolución sólo se considera la PSF en foco, se obtiene el efecto No Neighbor, como el de la imagen derecha.

Estos algoritmos son considerados como no cuantitativos, ya que a pesar de ser muy rápidos, no conservan las intensidades originales de la imagen, manteniendo sólo una fracción de las mismas.

### Algoritmos Iterativos

Los métodos lineales de deconvolución no pueden garantizar que el objeto deconvolucionado resulte positivo. En presencia de imágenes con ruido, algunos píxeles del objeto procesado pueden adquirir un valor negativo, lo cual es incorrecto. En las imágenes fluorescentes todo el flujo de fotones tiene que ser positivo y por lo tanto, en estos casos es necesario utilizar métodos no lineales que aseguren la ausencia de resultados negativos en la imagen deconvolucionada. La limitación de la positividad puede ser fácilmente lograda a través de procesos iterativos.

En los algoritmos iterativos, el objeto a deconvolucionar no se calcula en un solo paso, como sucede mediante el proceso Nearest Neighbor o el filtro de Wiener, sino que se estima en una serie de eventos que se repiten. Cada paso da lugar a una nueva estimación del objeto que debe ir asimilándose al objeto real. Durante este proceso, la positividad se consigue convirtiendo los valores negativos en cero. El pequeño error que se introduce por este procedimiento de recorte se debe corregir en la siguiente iteración. Si se utiliza un algoritmo apropiado, la estimación converge en una solución no negativa que se aproxima el objeto verdadero. Después de un cierto número de iteraciones, determinadas por el usuario, se obtienen los datos deconvolucionados.

La diferencia existente entre los diferentes algoritmos iterativos reside en la forma en la que se calcula el nuevo estimado. Para determinar una mejor estimación del objeto, es necesario saber si la conjetura actual del mismo es o no es apropiada. Idealmente, la esti-

mación difuminada por la PSF debería ser la misma que la de la imagen adquirida, excepto por el agregado de diferentes ruidos en los datos de la imagen. Siguiendo esta idea, se puede calcular una señal de error como aquella que se obtiene de la diferencia entre la estimación difuminada y los datos reales. De esta manera, para actualizar la estimación de la imagen difuminada, se debe tomar una fracción de la señal de error y agregársela a la estimación actual. Este es el procedimiento que se sigue mediante el algoritmo de Jansson-Van Cittert.

Los algoritmos actuales presentan un esquema de actualización de la estimación utilizando diferentes tipos de procesos matemáticos. Así, los llamados algoritmos de **máxima similitud** tratan de encontrar el objeto que maximice la probabilidad de que los datos hubieran ocurrido con un determinado modelo de ruido específico, el que se requiere para calcular matemáticamente estas probabilidades. En síntesis, la idea es encontrar una función (estimación del objeto borroso) con la ponderación adecuada para el ruido. En las **deconvoluciones ciegas**, donde los procesos ocurren en ausencia de una PSF medida o calculada, ésta es estimada de manera iterativa, alternativamente con los datos del objeto.

No existe un método de elección, todo depende de la imagen en consideración y de tres elementos que entran en juego: la resolución, el tiempo y el ruido. Por lo general, la mejoría en alguno de estos tres parámetros irá en detrimento de otro. Los algoritmos iterativos mejoran la calidad de las imágenes de campo ampliado al punto de obtener resoluciones comparables con las imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal. Sin embargo, pueden ser problemáticas al procesar muestras que produzcan mucha dispersión de la luz o ante situaciones donde se observen aberraciones de esfericidad. En términos de velocidad, el algoritmo de los vecinos cercanos (Nearest Neighbor) es más rápido que el de los iterativos, pero a su vez genera una menor relación señal:ruido que estos últimos. En términos de ruido, los métodos para campo ampliado son inicialmente superiores hasta el momento en que la resolución se transforma en limitante, en cuyo caso desaparecen las diferencias entre los métodos.

### Algoritmos Iterativos Restrictivos

Esta familia de procedimientos se basa en la ecuación de las imágenes:

$$i_m = N \left( \sum_l h_{l-m} o_l \right) = N(a_m) \quad [4-13]$$

donde,  $a_m$  es la imagen carente de ruido. A cada punto  $m$  con coordenadas  $m=(X,Y,Z)$  en 3D, la imagen adquirida para el punto  $i_m$  es igual a la suma de las contribuciones del objeto  $o$ , medido por la función de difuminación  $h$  (PSF del microscopio). El ruido  $N$ , asociado a cada punto, es independiente del sistema de formación de las imágenes.

El objetivo de estos algoritmos es encontrar la mejor solución a través de un proceso iterativo que, cuando se combina con una función de difuminación conocida, provee una imagen con su luz restaurada al plano focal. Durante la búsqueda, estos procesos aplican restricciones sobre las posibles soluciones, que no sólo ayudan a minimizar el ruido y otras distorsiones sino que además, aumentan el poder de restauración de la señal borrosa. Estos algoritmos consideran despreciable al ruido  $N_m$  y, por lo tanto, la ecuación de las imágenes queda reducida a:

$$i_m = \sum_l h_{l-m} o_l = a_m \quad [4-14]$$

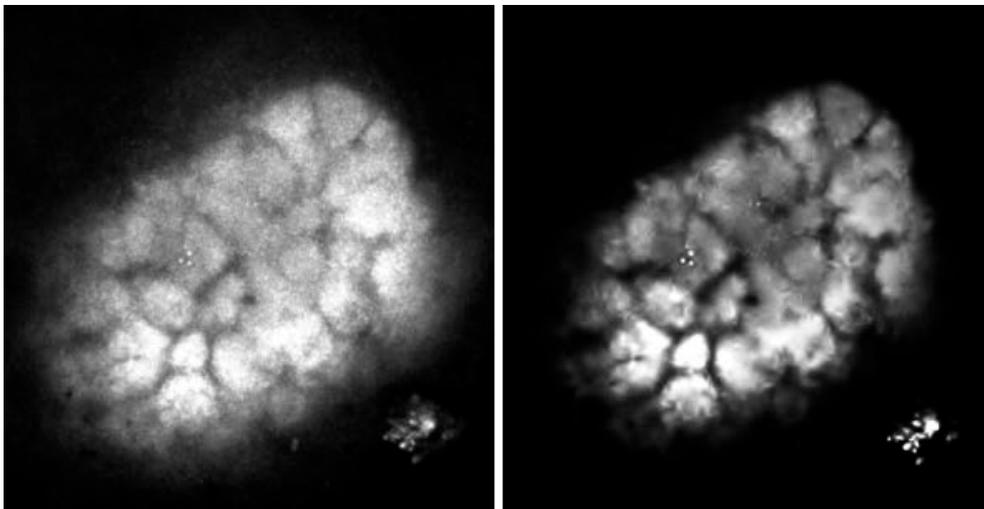
Los algoritmos iterativos restrictivos no hacen presunciones acerca de la PSF sino que la extraen directamente de la pila de imágenes. Dado que estos procedimientos trabajan de manera iterativa sobre toda la imagen 3D, es imposible utilizar imágenes 2D o secuencias en el tiempo (time lapse).

El proceso iterativo restrictivo opera de la siguiente manera: en principio se genera un estimado del objeto, que generalmente se corresponde con la imagen original o cruda (del inglés: "Raw image"). Este estimado es convolucionado con la PSF del sistema, lo cual

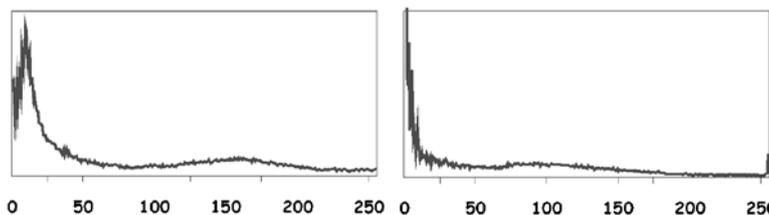
genera un “objeto borroso estimado” que se compara con la imagen original. Esta comparación se emplea para calcular un “criterio de error”, que representa la similitud entre la estimación borrosa y la imagen cruda. El criterio de error se utiliza entonces para alterar al objeto borroso estimado, de tal manera que el error se reduzca. Terminada esta iteración, el proceso se repite la cantidad de veces que se consideren necesarias. El esquema de este proceso se analizará al describir la deconvolución ciega (ver más adelante).

El mejor estimativo será aquel que minimice el criterio de error. Si no se logra reducir este criterio conforme va progresando el algoritmo, el objeto borroso estimado es nuevamente estimado y se computa nuevamente el criterio de error. Todo el proceso se repite hasta que este último se minimiza o se alcanza un umbral definido. La imagen final restaurada es igual al objeto borroso estimado de la última iteración.

El algoritmo iterativo de **Jansson Van-Cittert** calcula una nueva estimación del objeto en función de la estimación anterior, de la imagen adquirida y de la PSF conocida, con un factor aditivo de corrección. El algoritmo **Gold** reemplaza el factor aditivo por el de multiplicación (Fig. 4-107). Ambos algoritmos convergen en la solución de manera muy lenta y los resultados no son ideales si la imagen contiene mucho ruido. El histograma de las imágenes muestra la redistribución de las intensidades (Fig. 4-108).



**Fig. 4-107.** Efecto del algoritmo Gold (derecha) sobre la imagen original del lóbulo olfatorio del cangrejo (izquierda). El proceso concluyó luego de aproximadamente 3 minutos de ejecución (programa cellSens® Dimension v1.6), para 2 iteraciones.



**Fig. 4-108.** Histogramas correspondientes a las imágenes de la figura 4-107.

Durante el proceso iterativo se va perdiendo la nubosidad de la imagen, pero si ésta tiene la misma intensidad que la de la bruma también se puede perder información. Por ello, se necesita establecer la cantidad de veces que debe iterar el algoritmo para mejorar la calidad de la imagen sin perder información. En la figura 4-109 se compara el efecto de 2, 5 y 10 repeticiones. Allí se observa que con dos de ellas, todavía se distinguen áreas nubladas. Con cinco, esa nubosidad desaparece pero comienza a perderse intensidad en algunos puntos. Con 10 iteraciones se pierde mucha información sin incrementar sustancialmente los detalles del objeto. Asimismo, se observa cómo van cambiando los histogramas con el incremento de las repeticiones. Basado en los criterios visuales y el análisis del histograma, se podría establecer que, para este caso en particular, lo más apropiado son las 5 iteraciones.

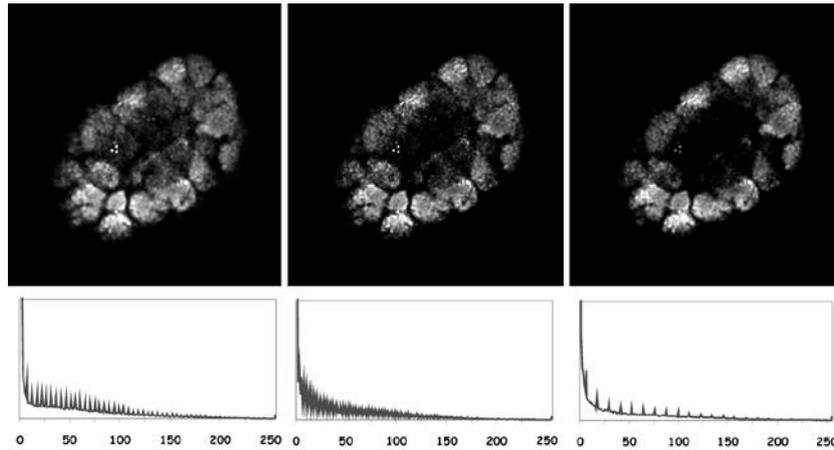


Fig. 4-109. Fila superior: efecto del algoritmo Gold sobre la imagen original de la figura 4-103 con 3 (izquierda), 5 (centro) y 10 (derecha) iteraciones. En la fila inferior se presentan los histogramas de cada una de las imágenes.

### Algoritmos estadísticos

Estos procesos se basan en la información estadística del ruido presente en las imágenes. Son procesos recursivos pero, a diferencia del método restrictivo, están orientados a determinar cómo se alteran los objetos adquiridos por efecto de la difuminación ejercida por el sistema óptico y el ruido aleatorio.

La naturaleza cuántica de la luz produce la distorsión de la imagen mediante la incorporación de ruido, causado por los fotones (distribución Poisson), el CCD (distribución Gaussiana) y la conversión analógico-digital (distribución normal). Los algoritmos estadísticos tratan de encontrar un estimado del objeto de acuerdo a la naturaleza de los ruidos. Para ello, utilizan la estimación de máxima verosimilitud (del inglés “*Maximum Likelihood Estimation*” - MLE) que minimiza el ruido de los fotones en la imagen.

Estos procesos estándar se utilizan principalmente para restaurar imágenes con mucho ruido, ya que están específicamente dirigidos hacia esa corrección. Sin embargo, su convergencia hasta la imagen final es lenta, pudiendo necesitar entre 50 y 1000 iteraciones, lo cual emplea más tiempo de cómputo por iteración que los algoritmos restrictivos. Por lo general, se requiere de dos convoluciones por iteración.

El MLE es una estrategia de optimización matemática utilizada para producir las mejores estimaciones de las cantidades de datos dañados por el ruido aleatorio. Puede ser aplicado tanto a algoritmos ciegos (ver más adelante) como no ciegos y entra dentro de la categoría de los procedimientos iterativos limitados. Son iterativos ya que repiten el mismo proceso para actualizar la reconstrucción de la tinción en cada iteración y son limitados ya que el ancho de banda es limitado y los valores de tinción permitidos son no-negativos. Es un algoritmo cuantitativamente preciso, es decir, se conserva la suma de la intensidad de todos los píxeles de la imagen.

Existe una variación 2D del algoritmo MLE. Este proceso funciona bien cuando la muestra es inherentemente 2D, los objetos planos caben dentro de la profundidad de campo, los objetivos tienen una gran profundidad de campo o cuando se utiliza microscopía TIRF. También puede ser empleado sobre imágenes 3D cuando se capturan con objetivos con alta NA, para reducir la profundidad de campo. Sin embargo, en estos casos convendría pensar que es un filtro de realce no lineal, dado que el algoritmo asume que la imagen es 2D.

En la figura 4-110 se observa el efecto del algoritmo MLE luego de 10 y 50 iteraciones. Con las primeras, se obtienen resultados similares a los de ellas utilizando el algoritmo Gold. Por su parte, con las segundas, se alcanza la misma información del detalle de los objetos que la obtenida con cinco repeticiones de aquel. Sin embargo, para esta muestra en particular, con 50 iteraciones del MLE se pierde tanta información como con 10 del otro algoritmo. En una computadora de alto rendimiento, los tiempos de procesamiento de esta deconvolución no difieren de los utilizados con los algoritmos iterativos previamente

descriptos. A pesar de ello, con 50 repeticiones el tiempo de procesamiento fue 30 segundos mayor.

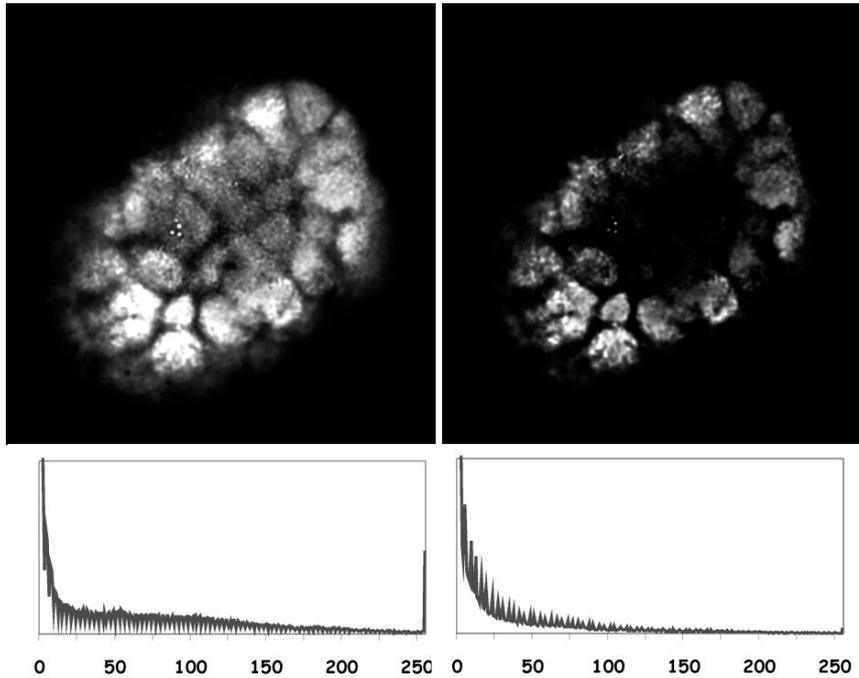


Fig. 4-110. Efecto del algoritmo MLE sobre la imagen original de la figura 4-103, con 10 (izquierda), y 50 (derecha) iteraciones. En la fila inferior se presentan los histogramas de cada una de las imágenes.

Una forma de acelerar el proceso es introduciendo una función de regulación (**MLE fast**). Para ello, se asume que el ruido sigue una distribución Gaussiana en lugar de otra de tipo Poisson. De esta manera, el algoritmo puede ser resuelto matemáticamente y es compatible con la teoría Bayesiana. La figura 4-111 muestra el efecto del algoritmo MLE fast con 25 iteraciones sobre la misma imagen utilizada en los procesos iterativos descritos previamente. Los resultados son totalmente comparables con los del MLE estándar de 50 iteraciones, con la salvedad que el tiempo de ejecución fue de un minuto menor.

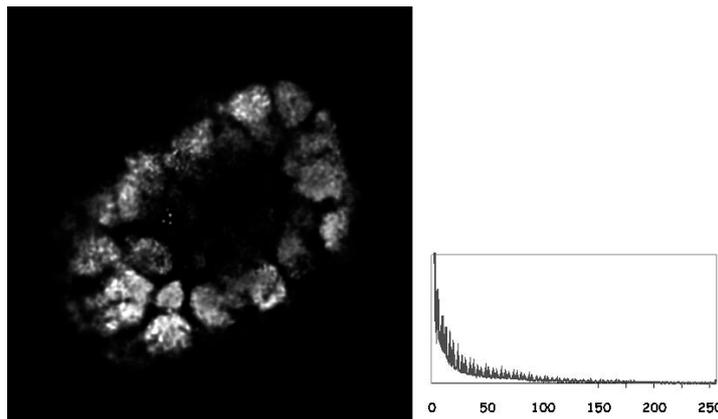


Fig. 4-111. Efecto del algoritmo MLE fast con 25 iteraciones. El histograma es totalmente comparable con el del MLE estándar de 50 iteraciones, aunque el tiempo de ejecución fue un minuto menor.

### Deconvolución Ciega (Blind deconvolution)

Con estos algoritmos se asume que tanto el objeto como la PSF son desconocidos y, por lo tanto, deben ser estimados a través de un proceso iterativo. Los otros tipos de deconvolución previamente mencionados se utilizan cuando realmente se conoce o se puede calcular la PSF del sistema.

Los procedimientos ciegos se basan en el algoritmo MLE estándar, en forma conjunta con la estimación de la PSF en cada iteración, dado que esta herramienta incluye fotones cuánticos como una suposición subyacente. El resultado es una reducción en el ruido causado por la distribución de Poisson.

Debido a la difracción de la luz, cualquier microscopio representa un sistema de banda limitada. Esto significa que cualquier señal conveniente se encuentra dentro de estos límites y que gran parte de la energía del ruido indeseable (señal de ruido) se encuentra fuera de estos límites. El algoritmo MLE reconoce estas características y posteriormente rechaza el ruido que se encuentre por fuera de los límites de banda. Además, establece que la imagen deconvolucionada sólo presente valores no negativos, un proceso que no puede ser implementado con un filtro de limitación de banda. Los mejores resultados se consiguen cuando el píxel o el espaciado de la sección óptica (espacio  $Z$ ) es menor al requerido por el criterio de Nyquist (ver Capítulo 3).

El algoritmo 3D Blind inicializa el objeto, de acuerdo a la ecuación de las imágenes [4-13], como  $o=i_m$ , es decir, con los valores de la imagen cruda. Por su parte, la primera PSF se calcula de manera teórica a partir de los parámetros del sistema óptico. En la figura 4-112 se esquematizan las iteraciones en el proceso de deconvolución ciega.

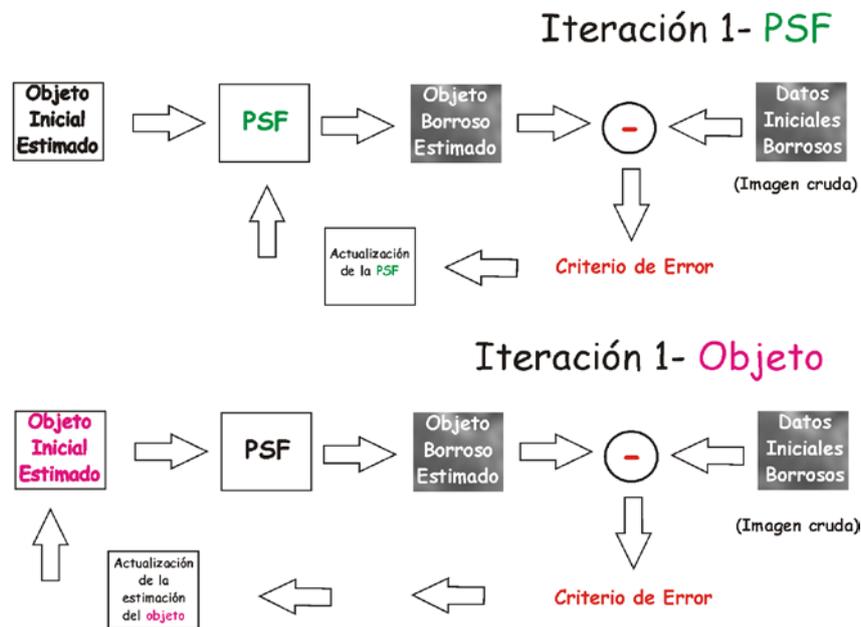
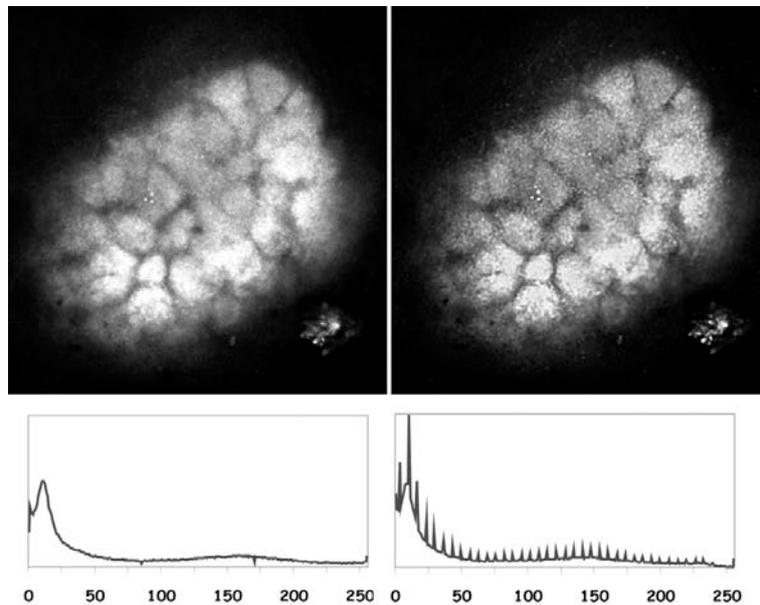


Fig. 4-112. Esquema de iteraciones en el proceso de deconvolución ciega. En la primera iteración se utiliza como punto de partida una PSF estimada (en verde) a partir de la óptica del sistema. Luego, se hace una estimación de cual debería haber sido la imagen ideal (en magenta) que, a partir de la PSF estimada, hubiese dado origen a la imagen que se está observando. Posteriormente, se realiza una estimación acerca de cuál debería haber sido la PSF necesaria para transformar la imagen original en aquella que se está observando. Si los resultados no minimizan el criterio de error, se seguirán produciendo iteraciones hasta que el operador lo considere necesario. En todos los casos se realizan procesos matemáticos que aseguran que estas iteraciones converjan en valores razonables. En las iteraciones sucesivas, el objeto borroso estimado y la PSF se actualizan en forma conjunta.

A diferencia de lo que ocurre en los procesos iterativos restrictivos, en la deconvolución ciega se asume que la PSF es desconocida y se genera un estimativo de la misma basándose en las características del microscopio, la longitud de onda de excitación y la NA del objetivo. Por ello, el primer paso dentro de la iteración consiste en la estimación de la PSF y la comparación de la imagen borrosa estimada con la imagen cruda. Si no se cumple con el criterio de error será necesario generar una nueva repetición, pero previamente se procederá a estimar la imagen borrosa, tal como fuera descrito para los algoritmos iterativos restrictivos. Dado que durante este proceso se realiza el doble de comparaciones que con aquellos algoritmos, el tiempo de ejecución teórica también debería ser el doble. No obstante, con la tecnología informática actual no se observan estos valores.

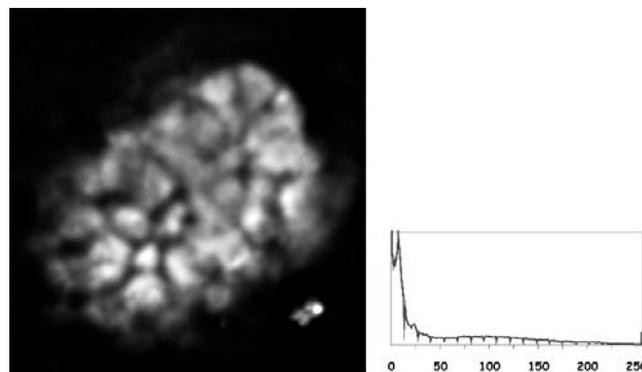
El tiempo de ejecución está en relación con la cantidad de imágenes de la pila, las operaciones matemáticas necesarias y el soporte informático. Para deconvolucionar la imagen de la figura 4-113 con el algoritmo 3D Blind se empleó el mismo tiempo que en los procesos iterativos previamente analizados.



**Fig. 4-113.** Efecto del algoritmo 3D Blind con 10 iteraciones (arriba derecha). El histograma muestra un aumento de los píxeles oscuros (abajo derecha), pero guardando una similitud con el histograma de la imagen original (abajo izquierda). La sumatoria de intensidades en ambas imágenes es la misma.

Estos algoritmos deben utilizarse cuando se desconoce la PSF debido a que, al igual que en la MLE estándar, la convergencia hacia la imagen final es lenta y los estimados obtenidos no son estables. Es más lenta por iteración que la MLE estándar pero puede producir mejores resultados que mediante el uso de una PSF teórica, principalmente cuando se encuentran aberraciones impredecibles.

Una variante de este método es el 2D Blind que permite aplicar la deconvolución ciega sobre una imagen tridimensional, sin la necesidad de conocer previamente los parámetros de captura del microscopio o de la misma imagen. También puede procesar imágenes 4D o 5D. Este algoritmo suprime el ruido mientras que retiene la exactitud cuantitativa (número total de fotones) de la imagen, tal cual lo hace el algoritmo 3D Blind. De esta manera, se pueden realizar mediciones cuantitativas válidas. Durante el procesamiento 2D Blind de una imagen 3D, se deconvolucionan cada una de las imágenes dentro de la pila. Los resultados pueden verse en la figura 4-114.



**Fig. 4-114.** El efecto del algoritmo 2D Blind con 10 iteraciones es bastante similar al producido por el algoritmo MLE. Sin embargo, el histograma es el más parecido al de la imagen original, aunque redistribuye los valores de intensidad de los píxeles. El tiempo de ejecución del proceso fue el de mayor duración y estuvo en total dependencia con la cantidad de imágenes de la pila.

Una vez más, NO existe un método ideal para todas las imágenes. Más aún, como se ha visto hasta aquí, distintos algoritmos producen diferentes efectos sobre la misma imagen original y se podría considerar que muchos de ellos son indeseables, ya que no sólo no mejoran la calidad de la imagen cruda sino que además, transforman, deforman o sustraen información valiosa. Más aún, el mismo algoritmo puede tener diferentes efectos sobre una misma imagen capturada con diferentes microscopios o distintas cámaras y procesada por diferentes programas de análisis. Por otra parte, el tiempo de ejecución del algoritmo depende, en gran medida, de la configuración de la computadora, lo que torna impracticables a varios de ellos. Por esta razón, si bien por lo general, los procesos de deconvolución mejoran sustancialmente la visualización de la imagen, lo ideal es capturar las muestras con el mejor de los contrastes posibles, el foco más apropiado y sin producir la sobre- o sub-exposición, para evitar todo tipo de procesamiento posterior. También se debe evitar la mayor cantidad de ruido aleatorio posible, ya que el proceso de deconvolución lo puede amplificar, al punto tal de dominar la imagen. Esto último puede solucionarse utilizando largos tiempos de exposición y promediando las imágenes durante la adquisición.

Como se mencionara anteriormente, si bien los procesos de deconvolución producen los resultados más espectaculares sobre las imágenes adquiridas a través del microscopio de campo ampliado, también generan cambios sobre imágenes confocales y de super-resolución, tendientes a aumentar la resolución de las mismas. El mayor beneficio de estos procesos no es la reasignación de intensidades sino la reducción de la luz fuera de foco, lo que redundaría en un menor ruido. Asimismo, estos algoritmos mejoran el contraste y remueven artefactos.

### ***Manipulación del contraste***

Siempre es posible mejorar la calidad de las imágenes digitales y esto se puede llevar a cabo de diferentes maneras. Los procesos de filtrado en el dominio espacial y frecuencial, así como los de deconvolución previamente descritos, por lo general producen cambios beneficiosos para las imágenes. Mediante la expansión del contraste de una imagen oscura o clara, también se puede mejorar la calidad de los objetos. Si es sólo a los efectos de su visualización, la modificación del brillo y contraste del monitor de la computadora podría resolver la situación. Si el propósito es lograr distinguir los objetos del fondo para su posterior análisis, se puede recurrir a una **Tabla de búsqueda** o de **asignación de valores** (del inglés: “*LookUp Table*” - LUT). Esta tabla sustituye un valor de brillo en la pantalla para cada valor de píxel almacenado en la memoria virtual (RAM) de la computadora, es decir, se produce un proceso de reasignación de valores. Bajo estas circunstancias, no es necesario modificar los valores almacenados en la memoria física (disco duro, DVD, memoria flash, etc.).

La manipulación de brillo del píxel puede ser descrita en términos de una función de transferencia relativa, desde su valor de almacenamiento temporal hasta el valor que se muestra en pantalla. Esto significa que, cuando se incrementa el brillo en una imagen, todos sus valores de intensidad se ven incrementados en una cierta cantidad. Sin embargo, el valor de los píxeles archivados no se ve modificado. Los cambios que se observan en la pantalla son calculados a partir de la lectura del valor original de cada píxel y posteriormente procesados a través de la LUT, la que determina cuanto se debe interpretar a partir del valor inicial.

Muchos de los algoritmos descritos en este capítulo trabajan mediante una técnica conocida como “**operaciones puntuales**”, que afecta píxeles individuales de manera secuencial, en lugar de actuar sobre matrices enteras. Estas técnicas emplean la ecuación:

$$S_{x,y} = M * E_{x,y} \quad [4-15]$$

donde,  $E_{x,y}$  representa el píxel de la imagen de entrada en las coordenadas  $X,Y$ ;  $S_{x,y}$  es el píxel en la imagen de salida, con las mismas coordenadas y  $M$  es una función de mapeo lineal.

Por lo general, la **función de mapeo** es una ecuación que convierte los valores de brillo del píxel de entrada en otro valor para el píxel de salida. Si este proceso se tuviera que

implementar para cada uno de los píxeles presentes en una imagen de alta resolución, se necesitaría mucho tiempo de procesamiento. Afortunadamente, la LUT es capaz de mapear imágenes de alta resolución, mediante almacenamiento de los cambios en la memoria RAM. Cuando se procesa una imagen monocromática de 8 bits con un rango dinámico de 0 a 255, existen 256 posibles valores de salida. Para ello, la LUT reserva un espacio en memoria correspondiente a una matriz de 256 elementos, que contiene valores enteros (de 0 a 255). Esta matriz es la denominada función de mapeo, en la que se describe un orden de posición y un valor asociado.

Cuando una operación puntual tiene que ser aplicada a una imagen utilizando la LUT, el valor entero de cada píxel de entrada es utilizado como un puntero que señala a un solo elemento (número de orden) dentro de la función de mapeo. El valor de intensidad contenido en esa posición apuntada, se convierte en el valor del píxel de salida. A modo de ejemplo, si el proceso utilizado necesita que la imagen sea de tipo binaria (sólo 0 y 1), el sistema puede configurarse de manera tal que todos los valores entre 0 y 127 se transformen en 0, mientras que aquellos que se encuentren entre 128 y 255 sean transformados a 1 (Fig. 4-115).

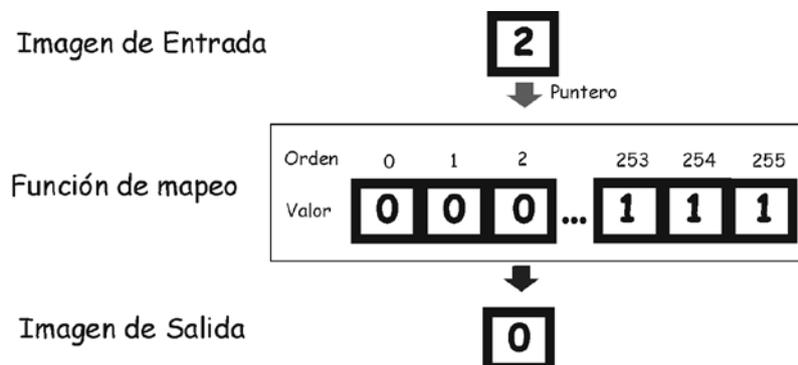


Fig. 4-115. El valor de intensidad del píxel de entrada apunta a la posición (orden) de la matriz (función de mapeo) y su contenido (valor) se transforma en el valor de intensidad del píxel de salida.

Alternativamente, si se quiere invertir una imagen monocromática, sólo es necesario asignar el valor 255 al valor de orden 0 dentro de la función de mapeo; 254 al valor 1; 253 al valor 2 y así sucesivamente, hasta convertir el 0 en 255 (Fig. 4-116). Cuando cada píxel de la imagen de entrada apunte a la función de mapeo, recibirá su valor invertido en la imagen de salida.

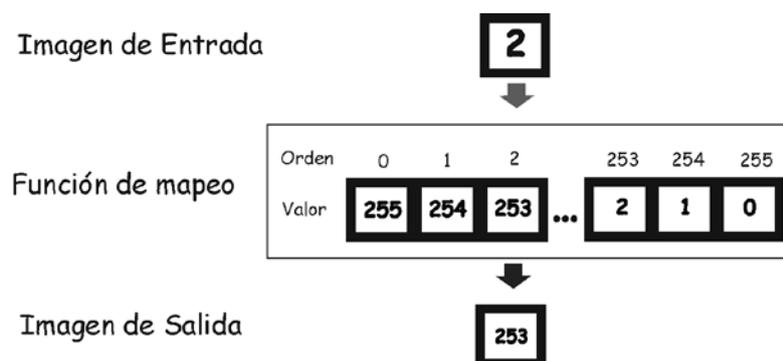


Fig. 4-116. Inversión de la imagen a través de la LUT.

Estos cambios virtuales pueden permanecer en memoria hasta que se descarte la imagen o pueden ser aplicados sobre la misma para su archivo. Sólo en este último caso los valores de la imagen de entrada se transforman definitivamente en los de salida.

La LUT no es restrictivamente lineal, ya que permite introducir modificaciones no lineales para enfatizar ciertos valores de intensidad. Asimismo, puede trabajar sobre cualquier tipo de imagen monocromática o color. Además de estructurarse como una matriz lineal de valores, también puede ser representada como un mapa cuadrado. Para utilizar este tipo de

mapas, en primera instancia se determina el valor de intensidad del píxel en la imagen de entrada y se traza una vertical hasta el lado opuesto del cuadrado. En el punto de intersección con la función de mapeo (diagonal del cuadrado) se traza una horizontal para determinar el valor de intensidad del píxel de salida (Fig. 4-117).

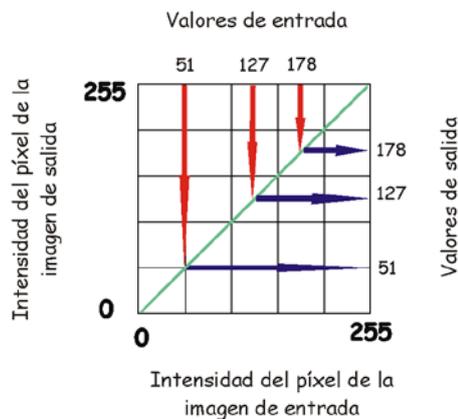


Fig. 4-117. Representación cuadrada de la LUT. La línea verde representa la función de mapeo.

En el proceso de umbralización (ver Capítulo 5), todos los píxeles por debajo de un valor umbral se transforman en cero, mientras que los que se encuentran por encima de dicho valor se mantienen inalterados (Fig. 4-118).

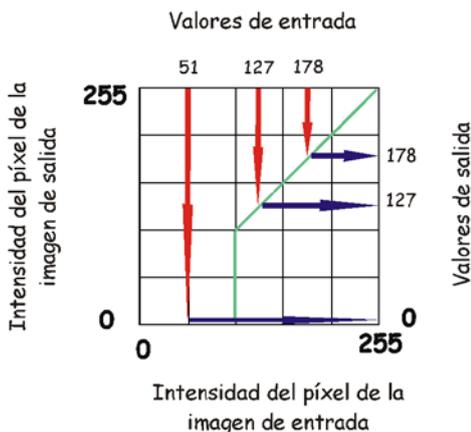


Fig. 4-118. Representación cuadrada de la LUT en un proceso de umbralización.

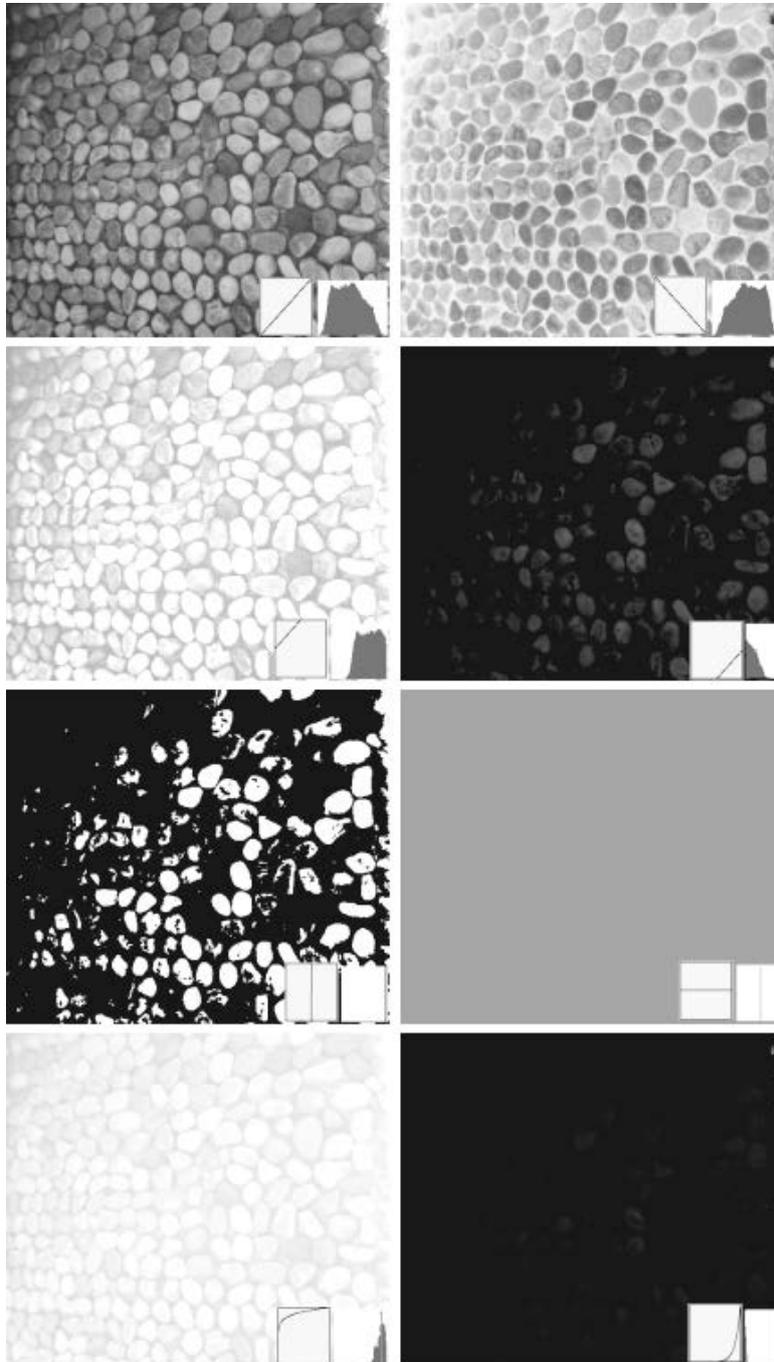
Mediante la LUT se puede ampliar el rango de contraste, a través de la asignación de valores de píxel más oscuros hasta llegar al negro o valores más brillantes hasta alcanzar el blanco. Las diferentes tonalidades de gris (o color) se obtienen por interpolación de manera lineal del resto de los píxeles. De esta manera se logra una mejor visibilidad de la imagen.

Para la manipulación del contraste se puede operar de manera individual o colectiva sobre el brillo, el contraste y la gamma. Esta última es una operación matemática que incrementa los contrastes en las zonas oscuras o en las claras. En la figura 4-119 se puede ver el efecto de los máximos y mínimos de aplicación del brillo, contraste y la gamma sobre una imagen original. En la figura 4-120 se observa el efecto de la combinación entre distintas intensidades de esto tres parámetros.

Cuando se captura una imagen digital desde un microscopio, el brillo percibido no sólo depende de la iluminación de la muestra, sino además, de la sensibilidad y linealidad del detector (CCD). De esta manera, se afecta la distribución de la intensidad y la relación de contraste entre las zonas claras y oscuras dentro de la muestra. Esta relación se interpreta a través de una variable denominada **gamma**. La corrección gamma es una operación no lineal que codifica y decodifica luminancia sobre las imágenes. Está regida por la ecuación:

$$V_S = KV_E^\gamma \quad [4-16]$$

donde,  $K$  es una constante que normalmente es  $K = 1$ ;  $V_E$  y  $V_S$  son los valores de entrada y de salida, respectivamente. Un valor de  $\gamma < 1$  se denomina gamma-codificado y el proceso de codificación no lineal se conoce como **compresión gamma**. Un valor  $\gamma > 1$  se denomina gamma-decodificado y el proceso de decodificación no lineal se conoce como **expansión gamma** (Fig. 4-121).



**Fig. 4-119.** Efecto de la aplicación de los máximos y mínimos del brillo, contraste y gamma. La imagen original (arriba izquierda) muestra zonas muy oscuras (borde izquierdo) y zonas muy claras (borde derecho). En el resto de la misma existe una variación de intensidades. En la porción inferior de esta imagen se observa el gráfico de la LUT y a su derecha, el histograma. A la derecha de la imagen original se observa una imagen invertida. En las filas sucesivas se observan los máximos (izquierda) y mínimos (derecha) del brillo, contraste y gamma, con sus correspondientes gráficas de LUT e histograma.

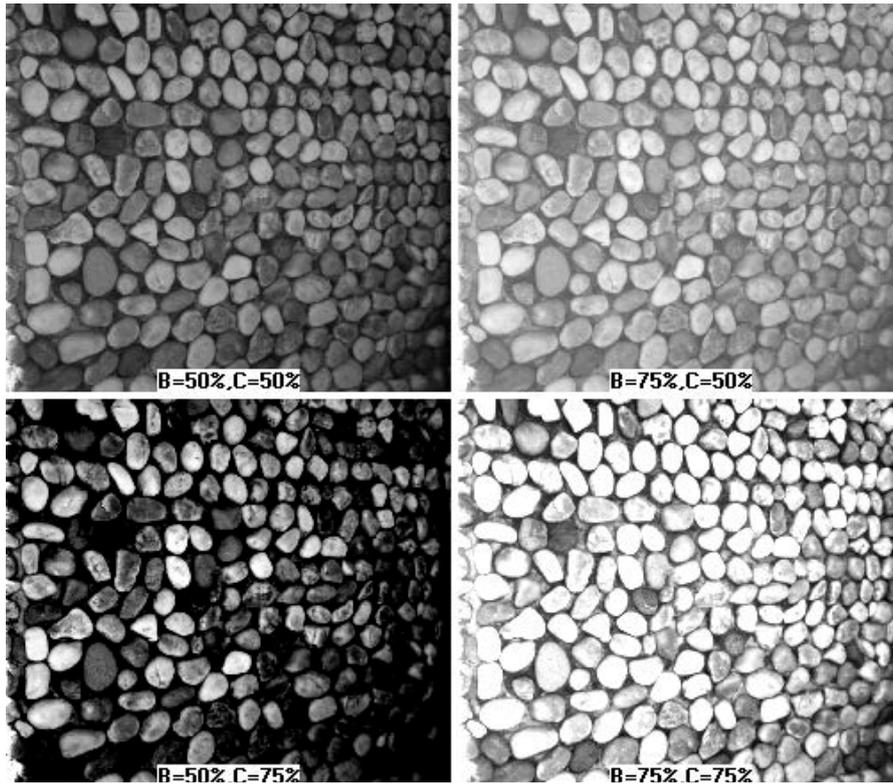


Fig. 4-120. Arriba izquierda: imagen original. Las variaciones del brillo y el contraste pueden combinarse dentro de la imagen, dando como resultado distintas apariencias de la misma. Algunos puntos se realzan y otros se deprimen. Debajo de cada imagen aparece el porcentaje de brillo (B) o contraste (C) que se empleó para modificarlas con respecto a la original.

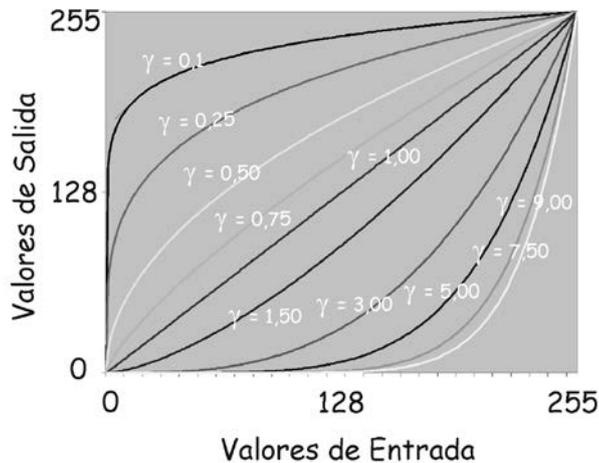
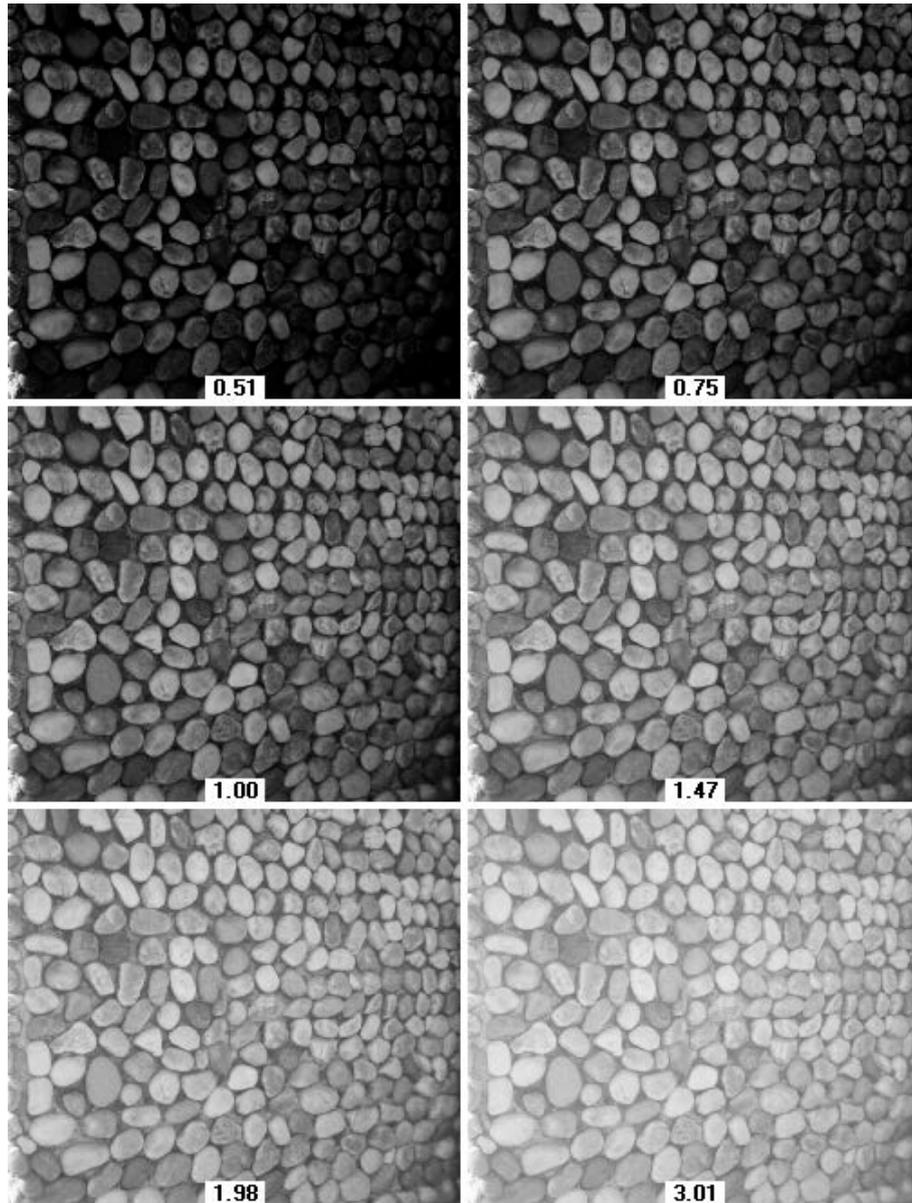


Fig. 4-121. Relación de los valores de entrada y salida de los píxeles, al aplicar distintos valores de gamma en una imagen monocromática de 8 bits.

La codificación gamma es necesaria para la compensación de las propiedades de la vista humana y para la maximización del uso bits, relativa a forma en que aquella percibe la luz y el color. Si las imágenes no son gamma-codificadas/decodificadas, se asignan demasiados bits sobre zonas muy claras que el ojo no puede diferenciar y muy pocos bits en las zonas oscuras a los que éste es sensible. Por esta razón, la modificación de la gamma permite generar más contrastes en zonas más claras y más oscuras para mantener la misma calidad visual (Fig. 4-122).

Si se modifica la intensidad de luz de la imagen, lo ideal es modificar el brillo y el contraste en primera instancia, para que los tonos oscuros sean lo más oscuros posibles y los claros, lo más claros posibles. La aplicación posterior de la gamma induce la producción de tonos medios que mejora la calidad global de la imagen. Como se observa en la figura 4-123, el proceso de modificación de la intensidad de la luz también se puede aplicar sobre imágenes color.



**Fig. 4-122.** La aplicación de la gamma genera mayores contrastes en zonas muy claras o muy oscuras. Los números representan el valor de gamma, aplicado a cada imagen a partir de la original (con valor de gamma = 1.00).

Cuando se trabaja con imágenes policromáticas, no sólo es posible corregir la intensidad general de la imagen sino que, además, se puede modificar el brillo, el contraste y la gamma de cada uno de los componentes del color. Más aún, es posible separar cada uno de los canales de la imagen, trabajar sobre estos de manera independiente, modificarlos y ensamblarlos nuevamente.

Muchas veces la manipulación de la luz a través de la LUT es suficiente como para generar buenos contrastes entre los objetos a analizar y el fondo, sin tener que recurrir a los procesos de filtración descritos en este capítulo. Sin embargo, hay que recordar que una vez que se aplican los cambios sobre la imagen que se está visualizando, el valor de los píxeles también cambia y por ende los resultados posteriores al realizar análisis de intensidades. Más aún, los cambios que se operan sobre las imágenes son subjetivos al usuario y están en relación con su agudeza visual y con las características de la pantalla de la computadora (color y resolución). En síntesis, los cambios en la intensidad de luz-contraste pueden ser beneficiosos para las imágenes enviadas a publicar o para aquellas sobre las que se realicen estudios morfométricos, no obstante, se debe ser cauto al utilizarlas para medir su intensidad.

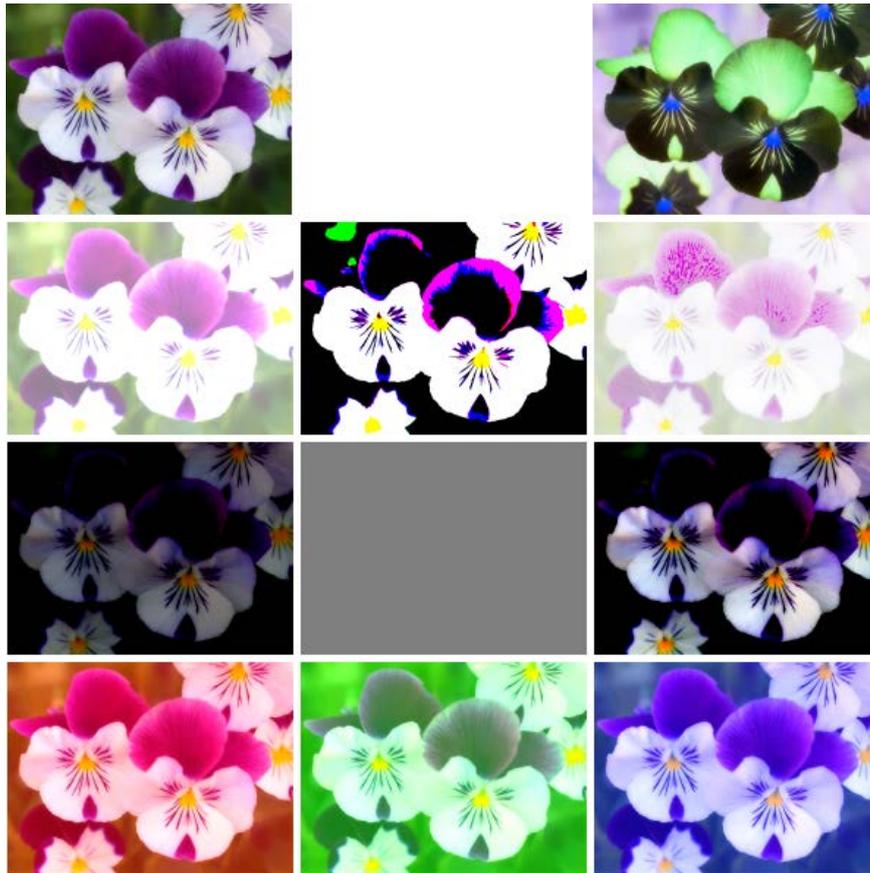


Fig. 4-123. Efecto de la aplicación de los máximos y mínimos del brillo, contraste y gamma sobre una imagen color. La imagen original (arriba izquierda) muestra zonas muy oscuras (pétalos violeta) y zonas muy claras (pétalos blancos). A su derecha, se observa su imagen invertida. En la segunda fila, de izquierda a derecha, se observan los máximos del brillo, contraste y gamma. En la tercera fila se encuentran los correspondientes mínimos. En la fila inferior se presenta el efecto del brillo máximo para los canales rojo, verde y azul.

### ***Ecuación***

La manipulación del contraste también puede ser realizada a través de la modificación del histograma de la imagen, que es una representación gráfica del brillo y el contraste de la misma. A través de éste, es posible identificar deficiencias de luz, de contraste o de rango dinámico. La manipulación del histograma puede corregir brillos o contrastes deficientes para mejorar la calidad de la imagen observada.

El histograma es un gráfico o mapa que acumula las observaciones que pertenecen a cada intervalo de una partición. En su eje de abscisas se muestran los valores de intensidad de los píxeles de la imagen de entrada. En una imagen monocromática de 8 bits, la cantidad de intervalos de intensidades puede llegar hasta 256. No obstante, no siempre es necesario mostrar todos ellos. El gráfico puede presentar tantas divisiones en el eje X como valores de rango dinámico tenga la imagen. En algunos programas, estas divisiones están limitadas a 256 y frente a imágenes mayores a 8 bits, redistribuyen los valores entre los intervalos seleccionados. Por su parte, en el eje de las ordenadas se muestra el número de píxeles que expresan cada intervalo de intensidad (Fig. 4-124). Los picos de los histogramas se corresponden con los valores de intensidad más frecuentes, mientras que los valles o depresiones muestran las intensidades menos frecuentes.

Otra forma de mostrar el mismo histograma es a través de la representación acumulativa, que simplemente representa la integral o sumatoria de valores de intensidad (Fig. 4-125). Este tipo de presentación suele ser útil para ajustar el brillo y el contraste en imágenes obtenidas por contraste de fase y contraste de interferencia diferencial (DIC), que tienden a mostrar fondos claros.

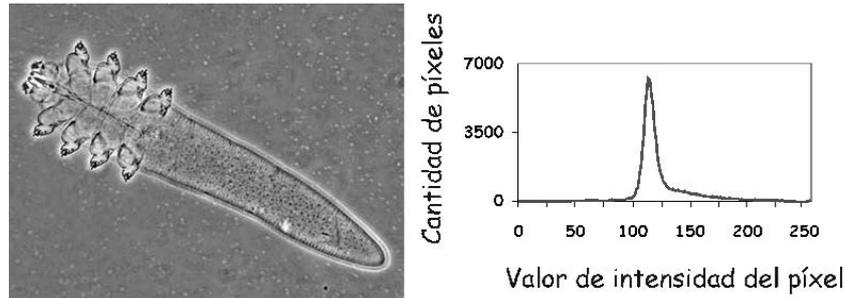


Fig. 4-124. Imagen del artrópodo *Demodex folliculorum* (resolución 378x282) y su correspondiente histograma.

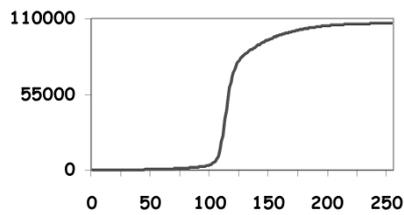


Fig. 4-125. Histograma acumulativo correspondiente a la imagen de la figura 4-124, mostrando un total de  $378 \times 282 = 106596$  píxeles.

Cada imagen tiene su histograma global, pero a su vez, cada sector de la imagen tiene un histograma distinto. Todo depende de los objetos, el fondo, y los tamaños y texturas que se muestren, ya que cada uno de estos patrones tiene sus propias características (Fig. 4-126). Más aún, un mismo objeto puede variar su intensidad si se compara su centro con los bordes. Esto demuestra que, de acuerdo a como se distribuyan los objetos, convendrá modificar el histograma general o sólo el de aquella región donde se muestren las mayores deficiencias de contrastes.

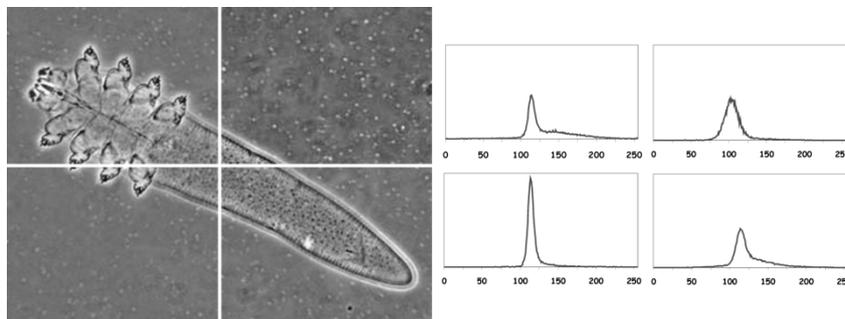


Fig. 4-126. Cada sector de cualquier imagen muestra un histograma distinto al histograma general de la misma.

Las imágenes color también pueden ser representadas por histogramas. En estos casos, se genera un gráfico por cada uno de los canales de color. De todas maneras, si se quisiera modificar la intensidad de los píxeles en una imagen color RGB, es conveniente transformarla al modelo HSI, extraer el canal correspondiente a la intensidad (I), modificar sus valores a través del histograma, reensamblar la imagen y transformarla nuevamente a RGB. Existen diversas formas de ecualizar las imágenes. Cada una de ellas se explica por el histograma que generan (Fig. 4-127).

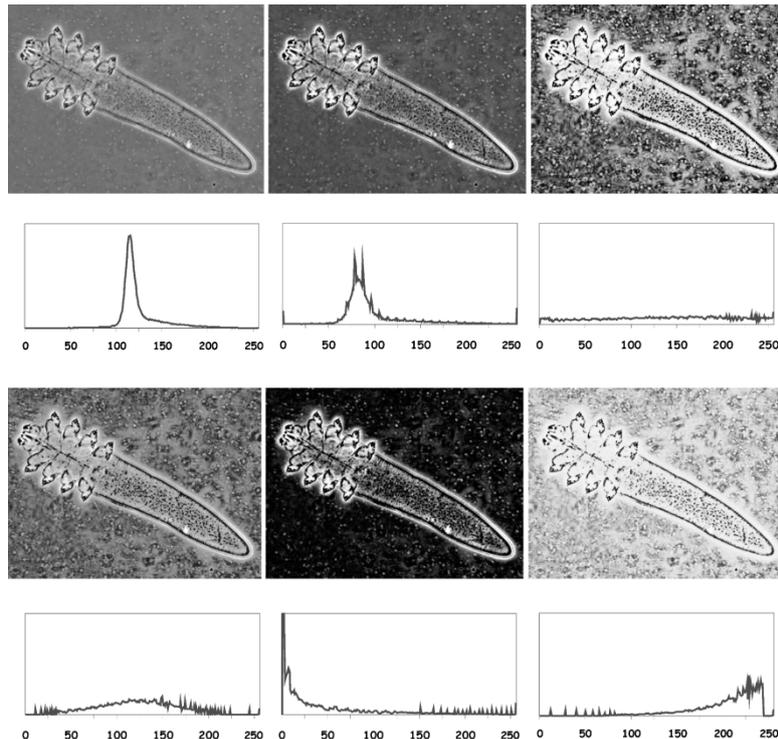
La ecualización es una técnica que reasigna los valores de los píxeles a través del histograma, de modo tal que se utilice el rango total de valores de intensidad y que la cantidad de píxeles por intervalo se mantenga constante. Este proceso mantiene el intervalo de valores presente en la imagen original. Esto significa que, aunque finalmente se apliquen los cambios sobre los píxeles, los contrastes de intensidad entre los mismos se mantienen tal cual se mostraban en la imagen original.

La ecualización puede ser utilizada para mejorar el contraste en las imágenes donde la mayoría de los píxeles tienen casi el mismo valor. La técnica también es eficaz para modi-

ficar las imágenes con gradientes de baja amplitud. El proceso es relativamente sencillo y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$k = 256 * \sum_{i=0}^j \frac{N_i}{T} \quad [4-17]$$

donde, asumiendo que se trata de una imagen monocromática con un rango dinámico entre 0 y 255, para cada nivel de intensidad  $j$  en la imagen original, hay un valor  $k$  que se calcula multiplicando el valor de 256 por la sumatoria del número de píxeles ( $N$ ) de la imagen con intensidades iguales o menores a  $j$ , siendo  $T$  el número total de píxeles.



**Fig. 4-127.** Sobre la imagen original (arriba izquierda), se aplicó la Ecuación de tipo Best fit (arriba centro) o Lineal (arriba derecha). Debajo de cada imagen se observa el correspondiente histograma. En las filas inferiores, de izquierda a derecha se observa la Ecuación de tipo Bell, Logarítmica y Exponencial, y sus correspondientes histogramas.

### ***Procesos matemáticos***

Las mismas operaciones matemáticas de suma, resta, multiplicación y división que se utilizan en las operaciones de convolución, de transformación al espacio Fourier y de substracción del fondo, se pueden aplicar directamente entre dos imágenes. Dado que las imágenes están formadas por píxeles con valores enteros, no debería sorprender que esto fuera posible. Cabe recordar que estos números son el resultado de una codificación binaria, en donde los bits sólo pueden contener valores de 0 y 1. Por esta misma razón, se pueden realizar operaciones matemáticas a nivel de bit, utilizando operadores lógicos.

La figura 4-128 muestra algunas de las operaciones matemáticas más frecuentemente utilizadas para modificar la intensidad de luz de las imágenes, las que se utilizan cuando la aplicación de los distintos procedimientos previamente descritos no es suficiente para cubrir todo el rango de luz en una imagen monocromática. Más aún, es posible realizar más de una de estas operaciones sobre el mismo par de imágenes originales hasta obtener el efecto deseado. Lógicamente, como se mencionara para otros procesos, cualquier manipulación que se realice entre imágenes implicará la variación en la expresión de la intensidad de luz que contenía la imagen original.

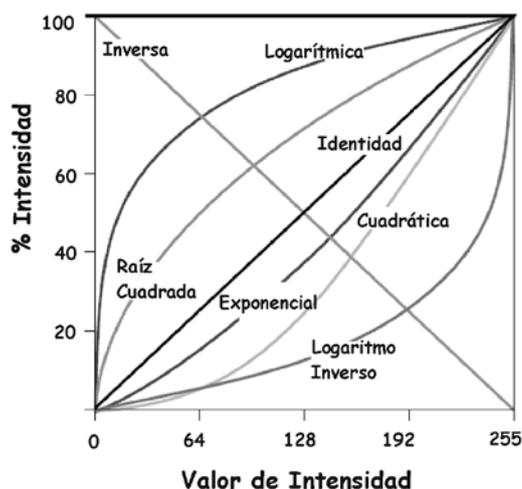


Fig. 4-128. Operaciones matemáticas más frecuentemente utilizadas para modificar la intensidad de luz de las imágenes.

### Sumatoria

Este proceso consiste simplemente en sumar el valor de intensidad de cada una de las imágenes que se utilicen en la operación. Esto tiende a incrementar la luminosidad en la resultante. No obstante, hay que tener en cuenta que en una imagen monocromática de 8 bits, el rango de 0 a 255 puede hasta duplicarse. Dado que el resultado final de esta sumatoria no puede exceder el valor de 255, aquellos píxeles que lo superen, se identificarán como saturados y mantendrán este tope (Fig. 4-129).

La sumatoria es muy sencilla de realizar y expresa cada píxel como la suma real entre las dos imágenes:

$$IF_{(x,y)} = O1_{(x,y)} + O2_{(x,y)} \quad [4-18]$$

donde, el primer operando ( $O1$ ) y el segundo ( $O2$ ) pueden corresponder o no a la misma imagen;  $O1_{(x,y)}$  y  $O2_{(x,y)}$  corresponden al valor de la intensidad de píxel en las coordenadas  $X, Y$  de ambos operandos e  $IF$  es la imagen resultante de la sumatoria. El segundo operando podría ser reemplazado por un valor entero constante ( $n$ ), en cuyo caso la ecuación quedaría transformada en:

$$IF_{(x,y)} = O1_{(x,y)} + n \quad [4-19]$$

Si la imagen resultante fuera almacenada en 8 bits, el valor de  $n$  debería encontrarse entre 0 y 255. En cambio, si se guarda en una de 32 bits de punto flotante, el valor de  $n$  podría estar comprendido entre  $\pm 1 \times 10^9$ .

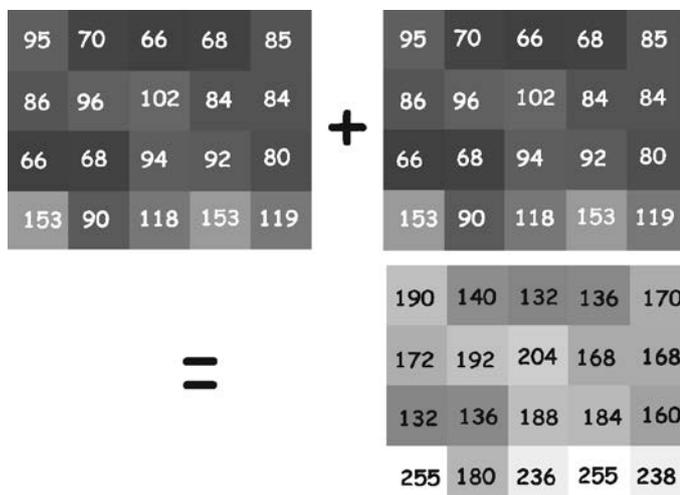


Fig. 4-129. La sumatoria de dos imágenes idénticas da por resultado una tercera, cuya intensidad de píxel se corresponde con la sumatoria real entre las primeras. Esto es igual a multiplicar una de las originales por la constante 2. Nótese que cuando se supera el valor de 255 en una imagen monocromática de 8 bits, éste queda como valor final.

A diferencia de lo que sucede en algunas operaciones de la aritmética clásica, el orden los operandos en cualquiera de las relaciones matemáticas entre imágenes es fundamental, aún en los aditivos (suma, multiplicación, máximos, mínimos, etc.). Esto se debe a la posibilidad de interacción numérica entre imágenes con distinta resolución. Más adelante se verá la diferencia de efecto en las operaciones sustractivas cuando se invierten los operandos, aún cuando ambas imágenes tuvieran la misma resolución.

Si la resolución de la segunda imagen fuera menor que aquella de la primera, la suma sólo afectaría a la región de la primera imagen que coincidiera con la resolución de la segunda, comenzando desde el extremo superior izquierdo (Fig. 4-130). Si se invirtiera el orden de los operandos, la imagen resultante tendría la resolución del primero de ellos (Fig. 4-131).

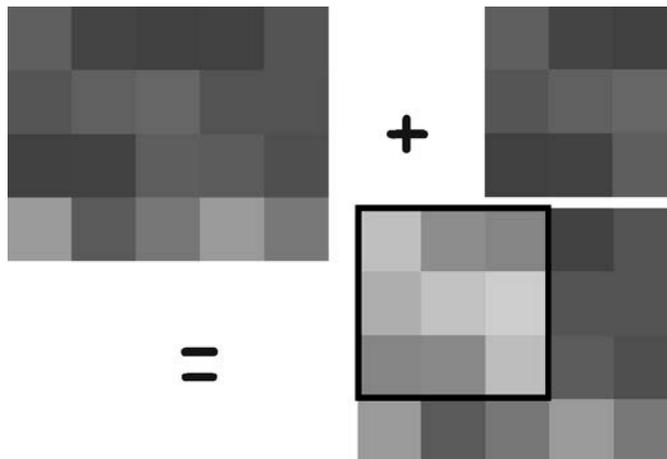


Fig. 4-130. Cuando se suman imágenes con distinta resolución y la primera es más grande que la segunda, el resultado se aplica al extremo superior izquierdo de la primera (encuadrado en negro).

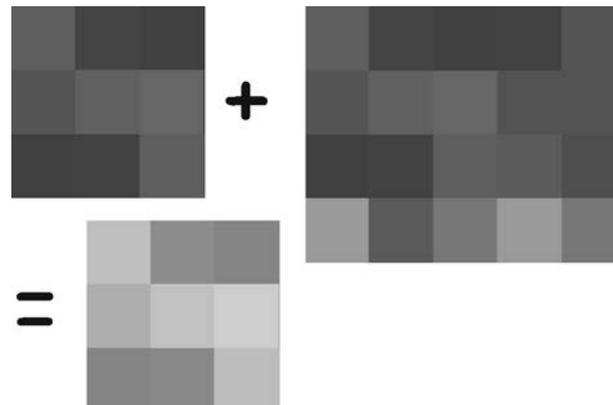


Fig. 4-131. Al invertir los operandos, la imagen resultante queda limitada a la resolución del primero.

El efecto de la adición sobre objetos reales se puede ver en la figura 4-132, en donde se combina la imagen original, con la misma imagen luego de aplicar los filtros Roberts y Flatten. Si la resultante de esta misma secuencia se expresa como una imagen de 32 bits de punto flotante, el aspecto final difiere de aquella expresada en 8 bits (Fig. 4-133).

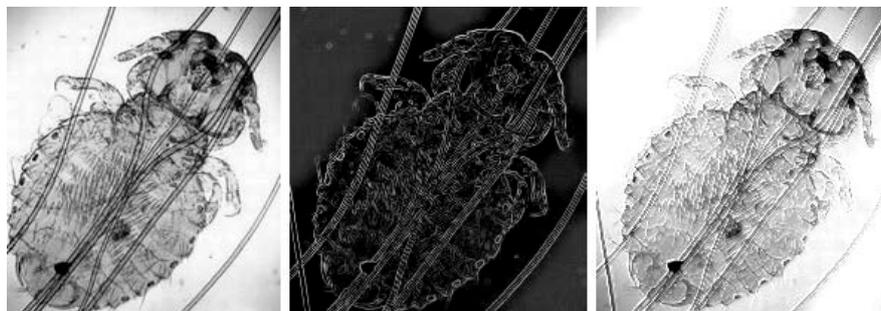


Fig. 4-132. Sumatoria entre la imagen monocromática de 8 bits original del ácaro (izquierda) con la misma imagen luego de aplicar los filtros Roberts y Flatten (centro). La resultante es una imagen con un fondo más claro y más límpido. Se observa que los pelos que atraviesan al ácaro comienzan a desaparecer.

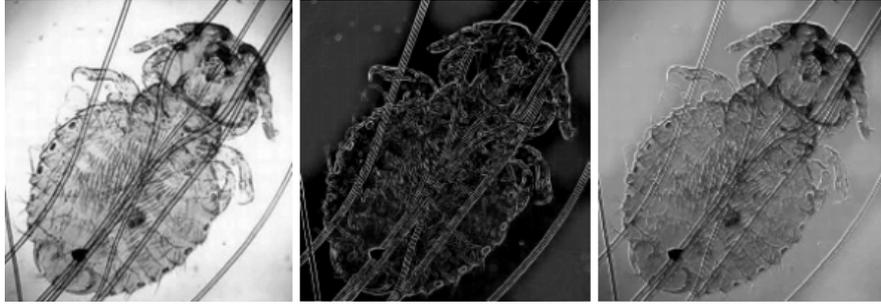


Fig. 4-133. Sumatoria realizada bajo las mismas condiciones que las imágenes de la figura 4-132, con la excepción que la resultante se expresa como imagen de punto flotante de 32 bits.

La sumatoria también se puede aplicar sobre imágenes color. El proceso es exactamente igual al de sumatoria de las monocromáticas, con la salvedad que cada canal de color del primer operando se combina con el mismo canal del segundo. Los resultados pueden ser similares a los obtenidos con las imágenes monocromáticas (Fig. 4-134).

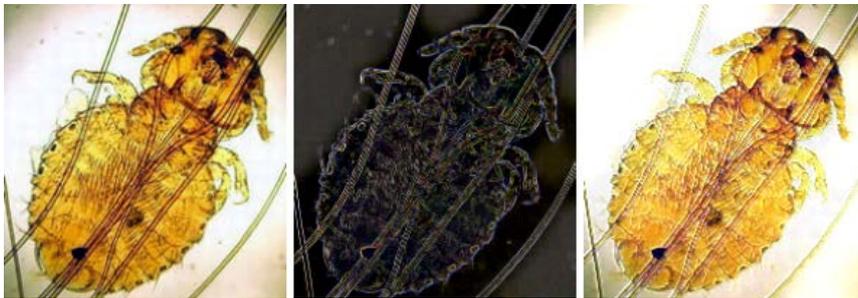


Fig. 4-134. Derecha: sumatoria entre la imagen color del ácaro (izquierda) con la misma imagen luego de aplicar los filtros Roberts y Flatten (centro).

La sumatoria entre imágenes permite mejorar la calidad de información de las placas radiográficas. Para ello, se deben realizar varias operaciones matemáticas: en primera instancia, la imagen original se suma a una copia de la misma que fuera previamente desenfocada por filtración y posteriormente invertida. La imagen resultante se suma a la original, para obtener la imagen realzada final (Fig. 4-135). Mediante el filtro Unsharp se puede llegar a un resultado similar, si bien no tan efectivo como el alcanzado mediante el método descrito. De todas maneras, la aplicación de un solo filtro implica menor manipulación y tiempo de procesamiento de las imágenes.

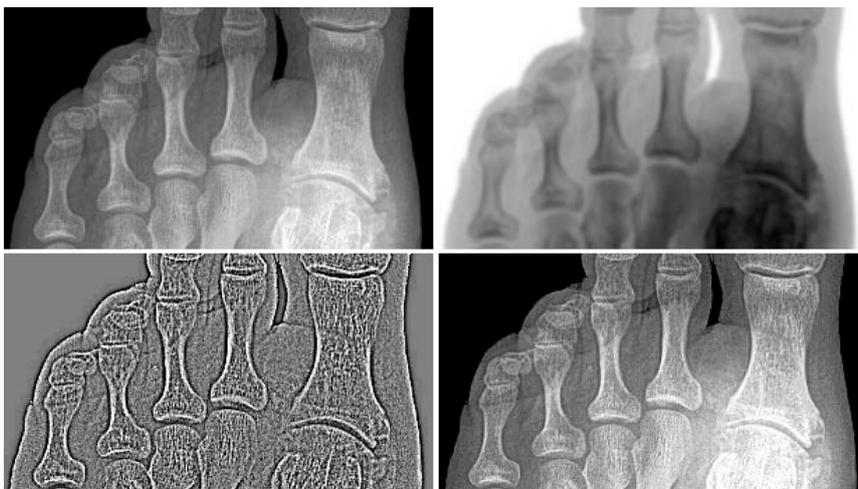


Fig. 4-135. Realce de la imagen radiográfica por efecto de la sumatoria entre imágenes. Arriba izquierda: imagen original. Arriba derecha: imagen original invertida y desenfocada mediante el filtro Gauss de tamaño 15. Abajo izquierda: Resultante de 32 bits de la suma entre las dos imágenes previas. Abajo derecha: resultante de la sumatoria entre la imagen previa y la original, también expresada en 32 bits y Ecuilizada con Best Fit.

### Substracción

Al igual que con la sumatoria, la substracción es un proceso que se calcula píxel a píxel, en donde los valores del primer operando se restan de los del segundo. En una imagen resultante de 8 bits, la resta de un píxel de menor intensidad por otro de mayor intensidad arrojaría un número negativo. Como este valor no se puede representar dentro del rango dinámico de estas imágenes, aquellos que estén por debajo del cero tomarán este valor como final.

En la figura 4-136 se observa el efecto de la sustracción sobre la misma imagen radiográfica de la figura 4-135. Si la substracción entre las imágenes se realizara en sentido inverso los resultados serían diferentes, como se puede apreciar en la figura 4-137.



Fig. 4-136. Realce de la imagen por substracción. Arriba izquierda: imagen original. Arriba derecha: imagen original filtrada con el filtro Gauss de tamaño 15 para desenfocarla. Abajo izquierda: resultante de 32 bits de la resta entre la original y la filtrada. Abajo derecha: imagen de 32 bits resultante de la resta entre la imagen previa y la original. Esta última fue posteriormente realizada mediante LUT.

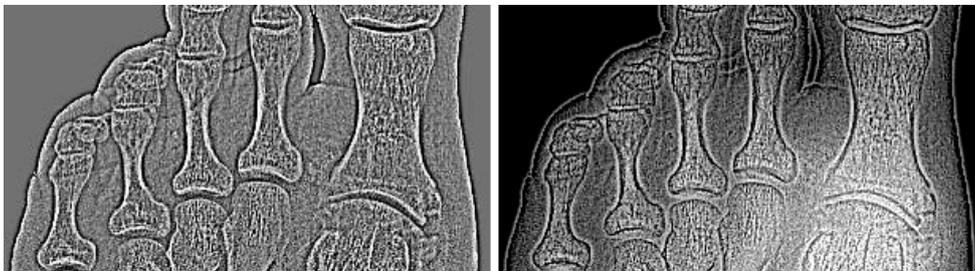


Fig. 4-137. Izquierda: resultante de la resta entre la imagen original de la figura 4-136 (Operando 1) y su imagen desenfocada e invertida (Operando 2). Derecha: el orden de los operandos fue invertido.

La substracción también es una buena opción para encontrar diferencias entre imágenes. Esto resulta muy útil durante los procesos de control de calidad. En la figura 4-138 se compara la imagen original con la misma imagen modificada ex-profeso. En la imagen resultante de la resta entre ambos operandos aparecen las porciones modificadas o faltantes.

El efecto de la substracción puede ser representado matemáticamente, tal como sucedía con la sumatoria [4-18] y [4-19]:

$$IF_{(x,y)} = O1_{(x,y)} - O2_{(x,y)} \quad [4-20]$$

$$IF_{(x,y)} = O1_{(x,y)} - n \quad [4-21]$$

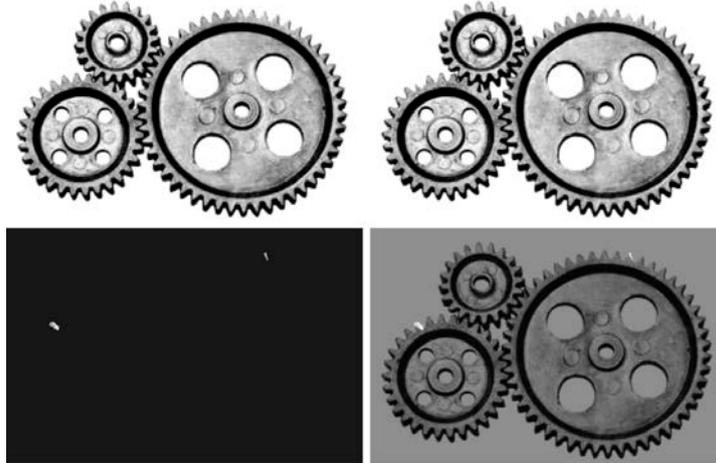


Fig. 4-138. La imagen original (arriba izquierda) fue levemente modificada (arriba derecha) para realizar la prueba. Al restar la primera de la segunda se obtienen las diferencias entre ambas (abajo izquierda), que a simple vista podrían haber pasado desapercibidas. La imagen resultante fue superpuesta sobre la imagen modificada para mostrar la ubicación de las modificaciones realizadas.

### Diferencia absoluta

Este operador es muy similar al anterior, con la diferencia que si se utiliza una imagen de 32 bits como resultante, todos sus valores negativos serán truncados. Al igual que en la substracción, si el resultado se encuentra por fuera de los límites del rango dinámico en una imagen resultante de 8 bits, éste será truncado a los valores máximos y mínimos permitidos. En la figura 4-139 se compara el proceso de substracción con el de la diferencia absoluta.

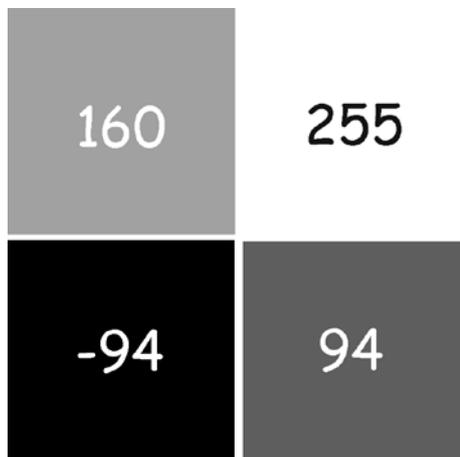


Fig. 4-139. Al restar la imagen con valor 160 de la de valor 255 se obtiene una imagen de punto flotante con valor negativo (-94). Si entre las dos imágenes iniciales se aplica el operador de diferencia absoluta, el valor resultante es de 94, aún siendo una imagen de 32 bits.

Estas diferencias no se obtienen simplemente eliminando el signo, sino que es necesario normalizar la escala. Para lograrlo, o bien se divide toda la imagen por 2, al resultado se le adiciona 128 y por último se realiza una expansión lineal o sencillamente se aplica la siguiente ecuación:

$$V = Rango * \frac{(Suma - \text{Mínimo})}{(\text{Máximo} - \text{Mínimo})} \quad [4-22]$$

donde, el *Rango* es la capacidad de la memoria (generalmente = 255). La *Suma* es la sumatoria de valores; *Mínimo* y *Máximo* corresponden a los valores mínimo y máximo dentro de la imagen. La aplicación de esta ecuación es preferible a la propuesta de división por 2 ya que la precisión de los resultados es mayor.

Tanto la substracción como la diferencia absoluta pueden ser utilizadas para reconocer movimiento. Si los objetos son lo suficientemente grandes como para verse a simple vista y la cantidad de imágenes por unidad de tiempo es la apropiada para que los mismos se solapen entre aquellas de la secuencia, la substracción entre las imágenes permite establecer su desplazamiento en tiempo real. En este caso, la substracción muestra un área brillante de diferencia. Por su parte, la longitud entre la zona de no coincidencia dividida por el tiempo transcurrido brinda la velocidad de desplazamiento. La dirección puede ser determinada por la orientación de la región. La figura 4-140 muestra el desplazamiento de uno de los parásitos del cultivo. La secuencia (imagen time lapse) consiste en 10 imágenes tomadas durante 5 segundos. A simple vista se aprecia que el parásito circunscripto en rojo en el primer recuadro se desplaza en el tiempo de manera diagonal y hacia abajo. Para cuantificar este desplazamiento sólo es necesario realizar la substracción entre la primera y la segunda imagen del par considerado en cada instancia. Si se tiene en cuenta el tiempo transcurrido para cada imagen de la secuencia, se puede realizar un simple cálculo para establecer la velocidad y aceleración del desplazamiento.

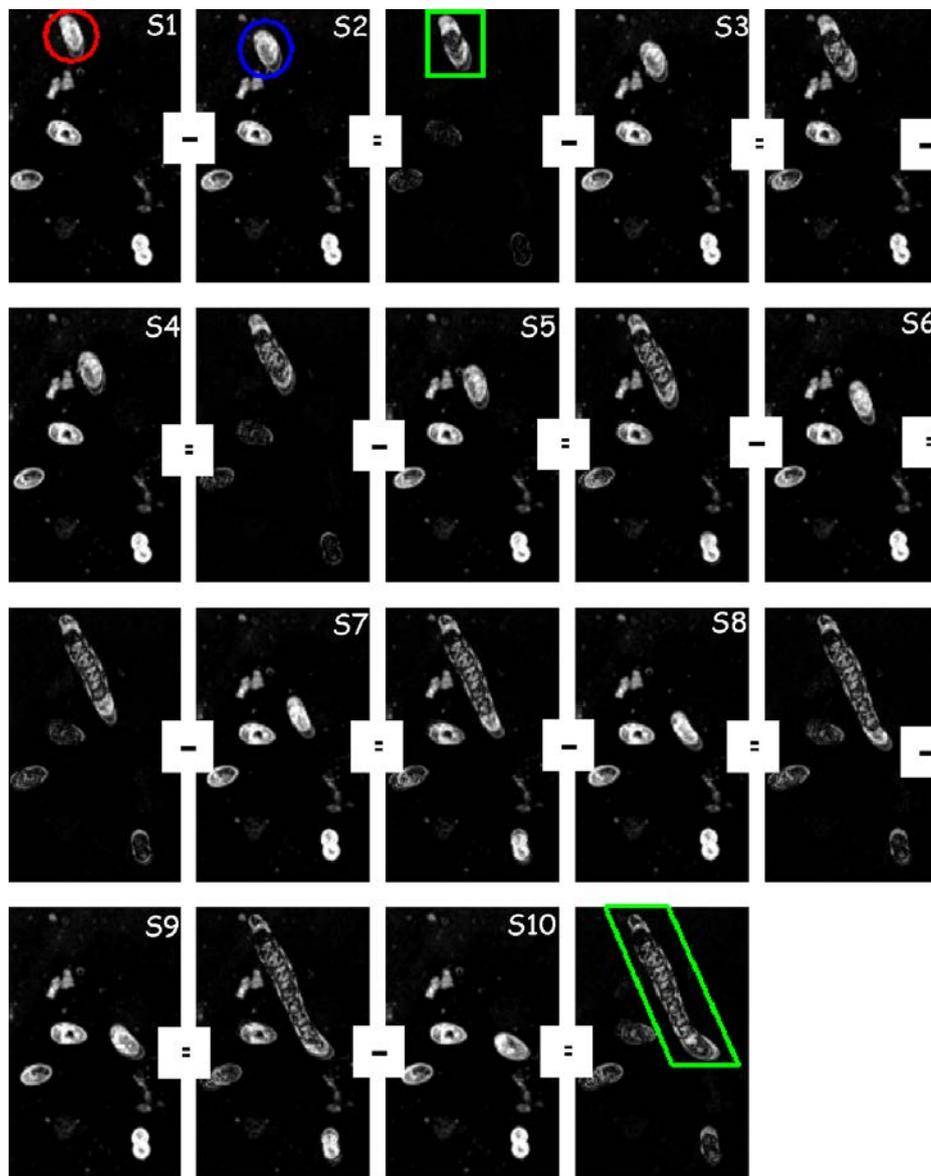


Fig. 4-140. Las imágenes secuenciales (S1 a S10) muestran el desplazamiento de un protozooario. En la S1, el parásito está circunscripto por un halo rojo, mientras que en la S2 lo rodea un halo azul. Mediante diferencia absoluta entre S1 y S2 se logró establecer la sumatoria entre las dos posiciones (encuadrada en verde). Mediante el mismo procedimiento se restan las imágenes secuenciales (S) de las resultantes previas, hasta llegar al final de la secuencia, donde se observa el desplazamiento total del parásito.

## Multiplicación

Este operador no se usa con mucha frecuencia. Una de las dificultades con la multiplicación es el rango extremo de valores que se pueden generar. Para imágenes de 8 bits con un rango dinámico entre 0 y 255, el resultado final puede variar entre 0 a más de 65.000. Para almacenar este valor se necesitarían 2 bytes (1 byte = 8 bits), pero sólo uno de ellos puede ser almacenado de vuelta en la imagen original, salvo que se utilice la escala normalizada. De esta manera se pierde precisión significativa en la imagen final.

La multiplicación puede ser utilizada para incrementar la intensidad de luz en el espacio frecuencial (Fig. 4-141). También se la utiliza para combinar dos imágenes entre sí, como sucede entre una imagen fluorescente y la misma obtenida mediante contraste de interferencia diferencial (DIC) (Fig. 4-142) o luz transmitida.

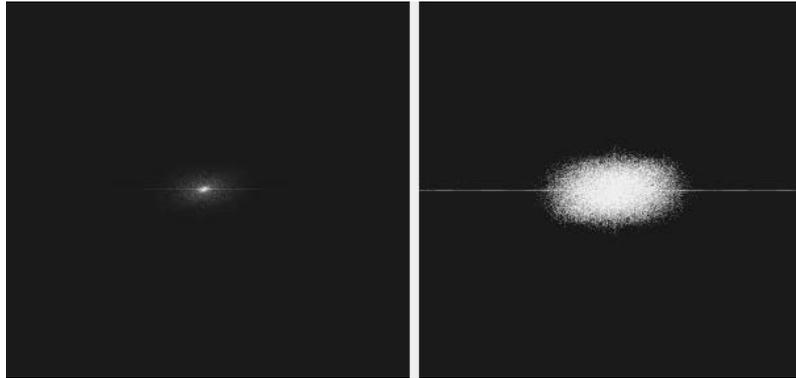


Fig. 4-141. La multiplicación permite incrementar la visualización del espectro en una imagen unidimensional (1D). Este efecto es similar a la Ecuación Best Fit.

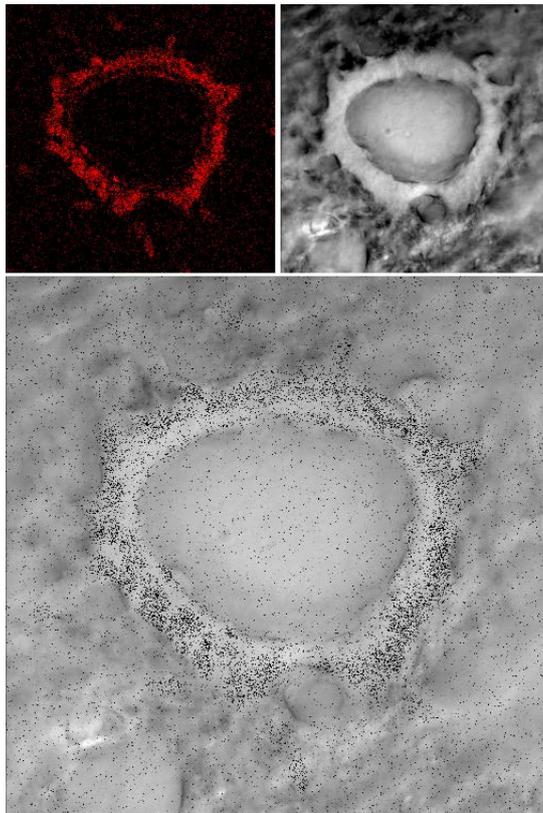


Fig. 4-142. Arriba izquierda: canal del epéndimo de la médula espinal marcado con nanopartículas fluorescentes. Arriba derecha: mismo sector capturado mediante la técnica de contraste de interferencia diferencial. La imagen inferior de 32 bits muestra el resultado de la multiplicación entre ambas. Para que este resultado fuera posible, hubo que invertir la imagen fluorescente.

En la multiplicación se usa la siguiente ecuación:

$$IF_{(x,y)} = (O1_{(x,y)} * O2_{(x,y)}) * N \quad [4-23]$$

donde, el operando 1 ( $O1_{(x,y)}$ ) es multiplicado por el operando 2 ( $O2_{(x,y)}$ ), para cada una de las coordenadas  $X, Y$  y el resultado es multiplicado por un factor de normalización de escala ( $N$ ) para obtener la imagen final ( $IF$ ).

### División

Al igual que la multiplicación, la división tampoco se usa de manera muy frecuente. Asimismo, se generan problemas por la magnitud de los números. Uno de ellos se produce cuando se pretende dividir por cero. Por lo general, los programas agregan 1 al valor del píxel y por lo tanto el rango pasa a ser de 1 a 256 en lugar de 0 a 255. El ejemplo más concreto de su uso fue visto al describir el proceso de corrección del fondo, previamente en este capítulo.

### Promedio

Mediante esta operación se reemplaza cada píxel con el valor promedio entre dos operandos. Muchas veces se necesita compensar una señal débil mediante el aumento del tiempo de exposición. En otras ocasiones, su reducción permite delinear los contornos de mejor manera. Si se realiza un promedio entre los píxeles es posible lograr una imagen definida en su estructura y con la iluminación más apropiada. La figura 4-143 muestra un ejemplo del promedio entre imágenes.

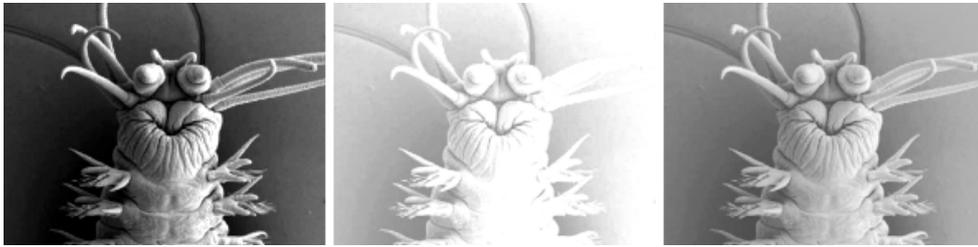


Fig. 4-143. La imagen de la izquierda muestra las características del objeto, pero tiene un fondo oscuro que no permite distinguir los bordes con claridad. La imagen central fue sobreexpuesta para aclarar el fondo. La imagen resultante (derecha) está más compensada.

Este tipo de operatoria responde a la siguiente ecuación, basada en las ecuaciones [4-18] y [4-19] de la sumatoria:

$$IF_{(x,y)} = (O1_{(x,y)} * O2_{(x,y)})/2 \quad [4-24]$$

$$IF_{(x,y)} = (O1_{(x,y)} + n)/2 \quad [4-25]$$

### Máximos y Mínimos

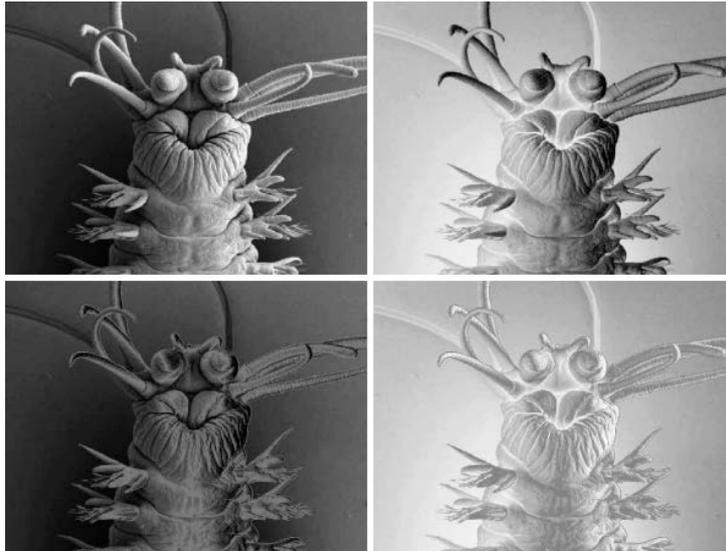
Estos operadores buscan los valores máximos o mínimos entre dos operandos y los reemplazan en la imagen final. Responde al siguiente criterio comparativo:

$$\text{Mínimo} = Si(O1_{(x,y)} \leq O2_{(x,y)}; O1; O2) \quad [4-26]$$

$$\text{Máximo} = Si(O1_{(x,y)} \geq O2_{(x,y)}; O1; O2) \quad [4-27]$$

donde, el condicional *Si* establece cual será la prioridad de selección. Para determinar el mínimo, si el valor del píxel en el primer operando es menor al del segundo, se fijará el valor del primero sobre la imagen resultante. De lo contrario, se imprimirá el segundo. Para la determinación del máximo, el proceso de comparación sigue el mismo criterio. La figura 4-144 muestra un ejemplo de aplicación de máximos y mínimos sobre una imagen monocromática.

Hasta aquí se han visto las operaciones matemáticas que se pueden realizar entre dos imágenes. A continuación se describirán aquellos operadores que se aplican exclusivamente sobre la imagen que se quiere modificar.



**Fig. 4-144.** La imagen original (izquierda) y su inversa (derecha) fueron relacionadas mediante los operadores Mínimo y Máximo. Sus respectivas resultantes se observan en la fila inferior. En este caso en particular, si se invirtiera cualquiera de las imágenes resultantes, se observaría el mismo efecto que el de la otra.

### Logarítmico

Mediante este operador, el valor de cada píxel es reemplazado por el de su logaritmo. La aplicación de un logaritmo a los niveles de gris tiene como resultado un realce del contraste en las zonas oscuras, a expensas de un empobrecimiento del mismo en las zonas más claras. La fórmula general para la aplicación de un logaritmo en base 10 es la siguiente:

$$IF_{(x,y)} = k * \log_{10}(1 + OI_{(x,y)}) \quad [4-28]$$

donde,  $k$  es la constante que fija el máximo nivel de salida (255, para una imagen de 8 bits), y el valor constante 1 asegura que los valores de la salida sean positivos y mayores que 0;  $OI_{(x,y)}$  es el valor del píxel en las coordenadas  $X,Y$ . Los píxeles con valores menores o iguales a 0 se invalidan. El proceso es efectivo si la imagen resultante es de 32 bits, ya que de lo contrario, los valores logarítmicos son truncados a valores enteros y el rango de salida es muy acotado, oscureciéndose aún más la imagen original. La figura 4-145 muestra un ejemplo sobre una imagen monocromática de 8 bits, transformada a partir de la original de 24 bits.



**Fig. 4-145.** Efecto del operador Logaritmo (derecha) sobre una imagen monocromática con bajo contraste (Palacio Urquiza, Entre Ríos, Argentina) (izquierda). Los mayores efectos se observan sobre los sectores más oscuros.

Si se extrae el canal de intensidad de la imagen original color con formato HSI, es posible realizar el mismo procedimiento. Sin embargo, al reensamblar la imagen color, si bien se incrementa el detalle en las zonas oscuras, el color logrado no es el real (Fig. 4-146).



Fig. 4-146. Izquierda: imagen color original (RGB). Derecha: imagen HSI convertida a RGB. Previamente, se aplicó el operador logarítmico sobre el canal de intensidad.

### Raíz cuadrada

Este operador reemplaza el valor de cada píxel con el correspondiente a su raíz cuadrada. El proceso de ecualización aplica una expansión no lineal, basada en la raíz cuadrada de la intensidad del píxel. Este operador responde a la ecuación:

$$IF_{(x,y)} = \sqrt{O1_{(x,y)}} \quad [4-29]$$

donde, la imagen final resultante (*IF*) es el resultado de la aplicación de la raíz cuadrada de cada uno de los píxeles del operando.

Al igual que el operador Logarítmico, la Raíz Cuadrada genera contrastes en las zonas oscuras pero en menor proporción al de aquel operador. De la misma manera, las zonas claras permanecen prácticamente invariables (Fig. 4-147).



Fig. 4-147. Efecto del operador Raíz Cuadrada sobre una imagen con bajo contraste (arriba izquierda). Los mayores efectos se observan sobre los sectores más oscuros en una imagen resultante de 32 bits. Los sectores claros se mantienen prácticamente inalterados (arriba derecha). Cuando la resultante se aplica sobre una imagen monocromática de 8 bits, todas las intensidades se deprimen, oscureciendo aún más la imagen original (abajo).

### Cuadrática

Este operador reemplaza el valor de cada píxel con el correspondiente a su potencia cuadrática. Esta función genera un efecto contrario al que producen los operadores Logarítmico y Raíz Cuadrada.

La función Cuadrática es inversa a la de Raíz Cuadrada [4-29] y responde a la siguiente ecuación:

$$IF_{(x,y)} = O1_{(x,y)}^2 \quad [4-30]$$

La figura 4-148 muestra el efecto de este operador. Allí se puede observar que las zonas oscuras se oscurecen aún más, perdiendo la capacidad de discriminar entre objetos. Por el contrario, las zonas más claras se exacerban en brillo y contraste, aunque algunos píxeles puedan llegar a saturarse.



Fig. 4-148. El operador cuadrático genera mayor contraste entre las zonas oscuras y claras. Sobre estas últimas, incrementa el brillo y el contraste (derecha).

### Potencia

Esta es una variante del operador Cuadrático. Tiene el mismo efecto que aquel operador pero se incrementa de acuerdo al exponente de la potencia. El efecto del operador Potencia puede verse en la figura 4-149. Este operador responde a la ecuación:

$$IF_{(x,y)} = O1_{(x,y)}^n \quad [4-31]$$

donde,  $n$  puede ser cualquier valor entero y positivo.



Fig. 4-149. Imagen lograda al aplicar el operador Potencia sobre la imagen original de la figura 4-148. En este caso, se aplicó una potencia de 5 sobre el valor del píxel.

### Exponencial

Mediante este operador se logra una “binarización” de los resultados (no es una imagen binaria), en donde los píxeles más claros se convierten en blanco y los más oscuros, en negro (Fig. 4-150). El histograma de la imagen original muestra dos picos correspondientes a la distribución de objetos oscuros y claros. Cuando se aplica el operador Exponencial, estas intensidades se redistribuyen hacia los extremos del rango en una imagen de 32 bits. Sobre una imagen monocromática de 8 bits, todos los píxeles se sobresaturan.

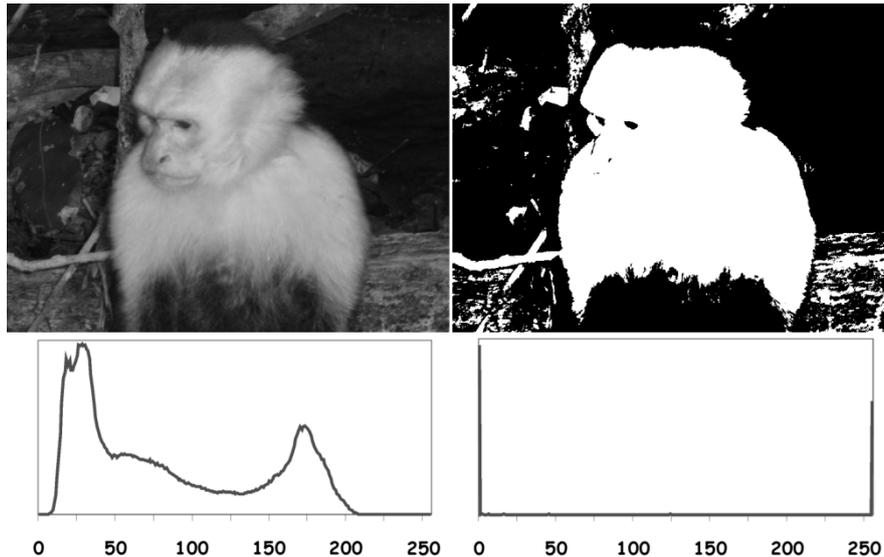


Fig. 4-150. Aplicación del operador Exponencial (derecha) y efecto sobre el histograma.

### Inverso

El operador Inverso reemplaza cada píxel con su valor invertido ( $1/\text{píxel}$ ). Dado que cualquier valor inicial que se introduzca dará como resultado un valor comprendido entre 0 y 1, es necesario introducir un factor de escala para que los valores de los píxeles se expandan dentro del rango correspondiente.

El efecto de este operador es similar al Logarítmico y Raíz Cuadrada en su capacidad de intensificar los detalles en las zonas oscuras, pero a su vez, oscurece las zonas claras. Los resultados producidos por el operador Inverso (Fig. 4-151) no deben confundirse con los de la inversión de la imagen a través del operador lógico NOT (ver más adelante).



Fig. 4-151. Se aplicó el operador Inverso con un factor de escala de 5000 sobre la imagen original de la figura 4-148 (izquierda). Este efecto no debe confundirse con la inversión de los valores de los píxeles mediante el operador lógico NOT (derecha).

La ecuación del operador Inverso es la siguiente:

$$IF_{(x,y)} = \frac{1}{O1_{(x,y)}} * E \quad [4-32]$$

donde, el factor de escala  $E$  es un valor entero y positivo que multiplica a la inversión del valor del píxel, en la posición  $O1_{(x,y)}$ .

### Operadores lógicos

Los operadores lógicos, también conocidos como conectores lógicos, son símbolos o términos utilizados por la lógica para conectar dos o más frases. De manera análoga, estos conectores son utilizados en álgebra Booleana (*álgebra de los valores binarios 0 y 1 -bit- o de secuencias de bits*). Una operación binaria es aquel procedimiento matemático que

necesita un operador y dos operandos (argumentos) para que se pueda calcular un valor final. En el Capítulo 1 se mencionó que los píxeles estaban formados por bits, los cuales podían tener valores de 0 o 1. En los sistemas informáticos actuales, cada píxel está formado, al menos, por 8 bits (1 byte), es decir, que pueden combinarse ocho 1 y 0 para lograr los valores de 0 a 255. Por esta razón, cuando se aplican operadores lógicos sobre las imágenes, si bien estos operan bit a bit, el resultado será el que exprese el byte de cada píxel en su conjunto. En la Tabla 4-1 se observa la representación binaria de algunos números decimales.

Tabla 4-1. Código binario para distintos números decimales

Número decimal	Código binario	Número decimal	Código binario
0	0000 0000	10	0000 1010
1	0000 0001	25	0001 1001
2	0000 0010	50	0011 0010
3	0000 0011	75	0100 1011
4	0000 0100	100	0110 0100
5	0000 0101	127	0111 1111
6	0000 0110	128	1000 0000
7	0000 0111	200	1100 1000
8	0000 1000	254	1111 1110
9	0000 1001	255	1111 1111

Los operadores lógicos son el AND, OR y NOT, a los que se les agregan los operadores complementarios NAND (No-AND o AND invertido), NOR (No-OR u OR invertido) y XOR (OR exclusivo). Todos estos operadores actúan de manera selectiva sobre los bits, de acuerdo a la combinatoria de 0 y 1 dentro del píxel. En lógica clásica, los únicos valores de verdad posibles son el Verdadero y el Falso. Por analogía, la lógica Booleana asigna el "1" al valor Verdadero y el "0" al Falso. Una tabla de verdad, o tabla de valores de verdad, es una enumeración de valores Verdaderos o Falsos que indican la veracidad de una declaración o proposición compuesta. En la figura 4-152 se observa la tabla de verdad para la lógica Booleana, entre los bits y los operadores lógicos.

0 AND 0 = 0	0 OR 0 = 0	NOT 0 = 1
0 AND 1 = 0	0 OR 1 = 1	NOT 1 = 0
1 AND 0 = 0	1 OR 0 = 1	
1 AND 1 = 1	1 OR 1 = 1	
0 NAND 0 = 1	0 NOR 0 = 1	0 XOR 0 = 0
0 NAND 1 = 1	0 NOR 1 = 0	0 XOR 1 = 1
1 NAND 0 = 1	1 NOR 0 = 0	1 XOR 0 = 1
1 NAND 1 = 0	1 NOR 1 = 0	1 XOR 1 = 0

Fig. 4-152. Si se considera al píxel blanco con el valor de 1 y al negro con el valor 0, se pueden establecer las correlaciones lógicas para los operadores AND, OR y NOT y los complementarios NAND, XOR y NOR.

En términos sencillos, el valor 1 representa lo que existe, mientras que lo inexistente se representa por el 0. Es decir, tomando como ejemplo el operador AND, para que el objeto sea observado en la imagen final debe estar presente en ambas imágenes relacionadas. En

cambio, al utilizar el operador OR, sólo basta con que esté presente en una de ambas imágenes (operandos), como para que se exprese en la imagen final (resultante).

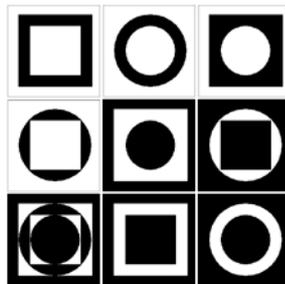
La relación lógica entre bytes es igual a la de los bits, ya que la misma se establece bit a bit. El resultado final representa la intensidad del píxel que corresponde al conjunto de bits binarios, expresado en el sistema decimal. La figura 4-153 muestra un ejemplo concreto.

En imágenes color RGB o de otros sistemas, este proceso se produce exactamente de la misma manera, con la salvedad que tiene que ser realizado para cada uno de los canales de color.

Operador	Expresión decimal	Expresión binaria
	64	= 0100 0000
	192	= 1100 0000
AND	64	= 0100 0000
OR	192	= 1100 0000
NAND	191	= 1011 1111
NOR	63	= 0011 1111
XOR	128	= 1000 0000
NOT-64	191	= 1011 1111
NOT-192	63	= 0011 1111

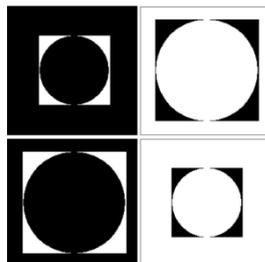
**Fig. 4-153.** Al relacionarse dos valores de intensidad de píxel (64 y 192) a través de conectores lógicos, se obtienen valores que surgen de la interacción bit a bit de acuerdo a la tabla de verdad, vista en la figura 4-152.

Al combinar dos imágenes bidimensionales mediante distintos operadores lógicos, los resultados pueden ser múltiples. Si se toman como ejemplo imágenes binarias se pueden realizar algunas combinaciones como las que se muestran en la figura 4-154. Cabe mencionar que en este tipo de operaciones el orden de los operandos no altera el resultado final.



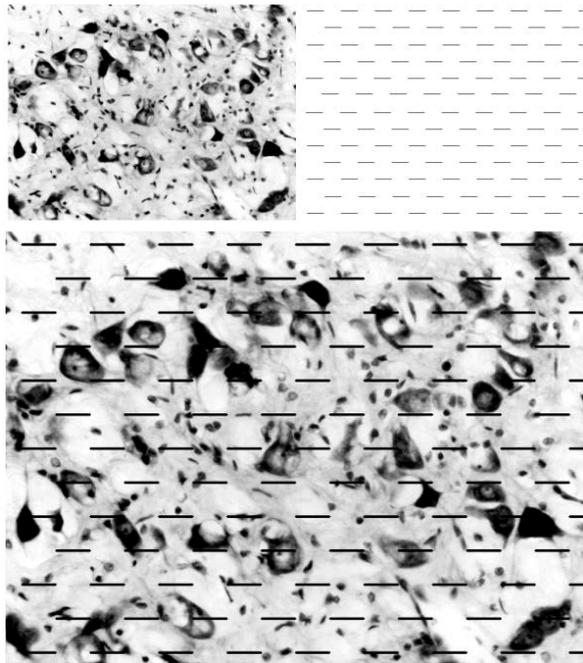
**Fig. 4-154.** Operaciones Booleanas. De arriba a abajo y de izquierda a derecha: Operando 1 (O1); Operando 2 (O2); O1 AND O2; O1 OR O2; O1 NAND O2; O1 NOR O2; O1 XOR O2; NOT O1; NOT O2.

Los operadores lógicos también se pueden utilizar de manera combinada, es decir, a la combinatoria inicial se le puede asociar otra combinatoria para lograr más resultados, como lo muestra la figura 4-155.

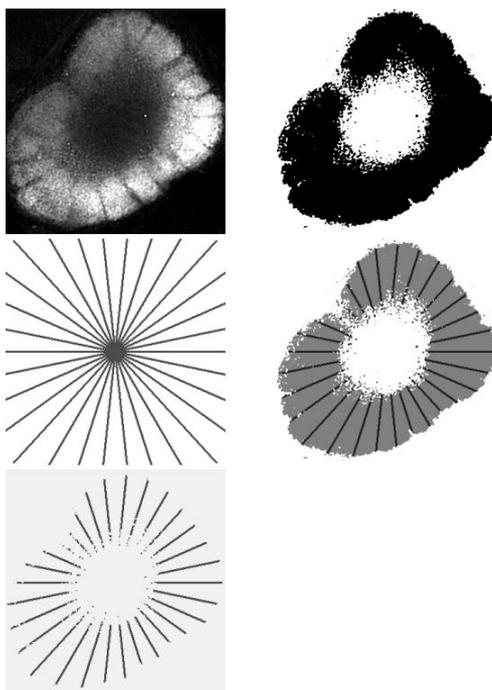


**Fig. 4-155.** Operaciones Booleanas combinadas. De arriba abajo y de izquierda a derecha: O1 AND (NOT O2); O1 OR (NOT O2); (NOT O1) AND O2; (NOT O1) OR O2.

El operador AND es muy útil para la aplicación de grillas estereológicas para el recuento de objetos (Fig. 4-156) o para la medición de los mismos (Fig. 4-157).



**Fig. 4-156.** Arriba izquierda: imagen original. Arriba derecha: plantilla multipropósito de la estereología. Abajo: superposición de ambas para realizar recuentos y mediciones estereológicas.

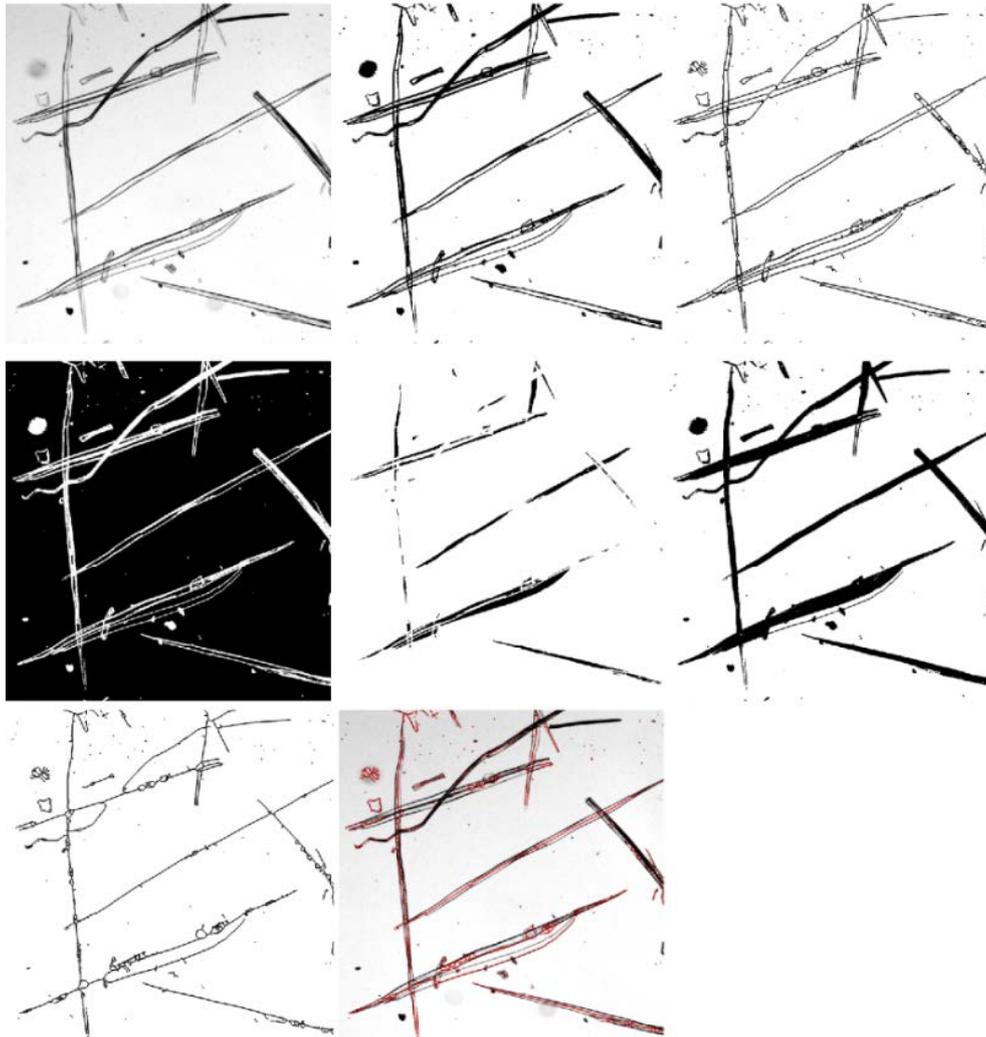


**Fig. 4-157.** La imagen original (arriba izquierda) fue umbralizada para eliminar el fondo (arriba derecha). La grilla (centro izquierda), fue confeccionada específicamente para esta imagen y consiste en 30 líneas concéntricas. Esta grilla fue empastada con sólo un 50% de su intensidad y sólo sobre los píxeles oscuros (objeto) de la imagen umbralizada (centro derecha). Al aplicar el operador AND sobre esta última y utilizando como segundo operando al valor de la intensidad final del objeto umbralizado en esta misma imagen (127), se separaron las líneas que intersectaban con el objeto (última fila). De esta manera, al medir la longitud de las líneas es posible hacer un estimado sobre el espesor del objeto en sus distintas porciones.

El operador OR también es muy útil en la combinación de imágenes. En la figura 4-158 se muestra la asociación entre el efecto producido por los filtros y la aplicación de procesos matemáticos. Allí se puede observar la presencia de fibras vegetales de sauce disgregadas a partir de la madera por un proceso de maceración. El propósito de esta separación es la posibilidad de medir el largo de cada una de estas fibras. El conocimiento de este dato, permite establecer de manera estadística, diferentes calidades de fibras aptas para distintos usos industriales (papel, tableros, etc.). Lamentablemente, no siempre es posible evitar el entrecruzamiento de las fibras o separarlas completamente. Por ello, se recurre al uso de filtros, que lejos de modificar las características fundamentales de las mismas, permiten generar un esqueleto para su mejor medición.

El operador NAND permite expresar todos los objetos presentes en ambas imágenes relacionadas, excepto aquellos que coincidan con la imagen contraria. Una forma de aprovechar este operador es a través de la relación entre una imagen original con otra que sólo

contenga los bordes de los objetos presentes. Eso se consigue fácilmente utilizando el filtro Roberts. Como resultado, se observa una “silueta” de la imagen, que sirve como modelo o base de diseño (Fig. 4-159).

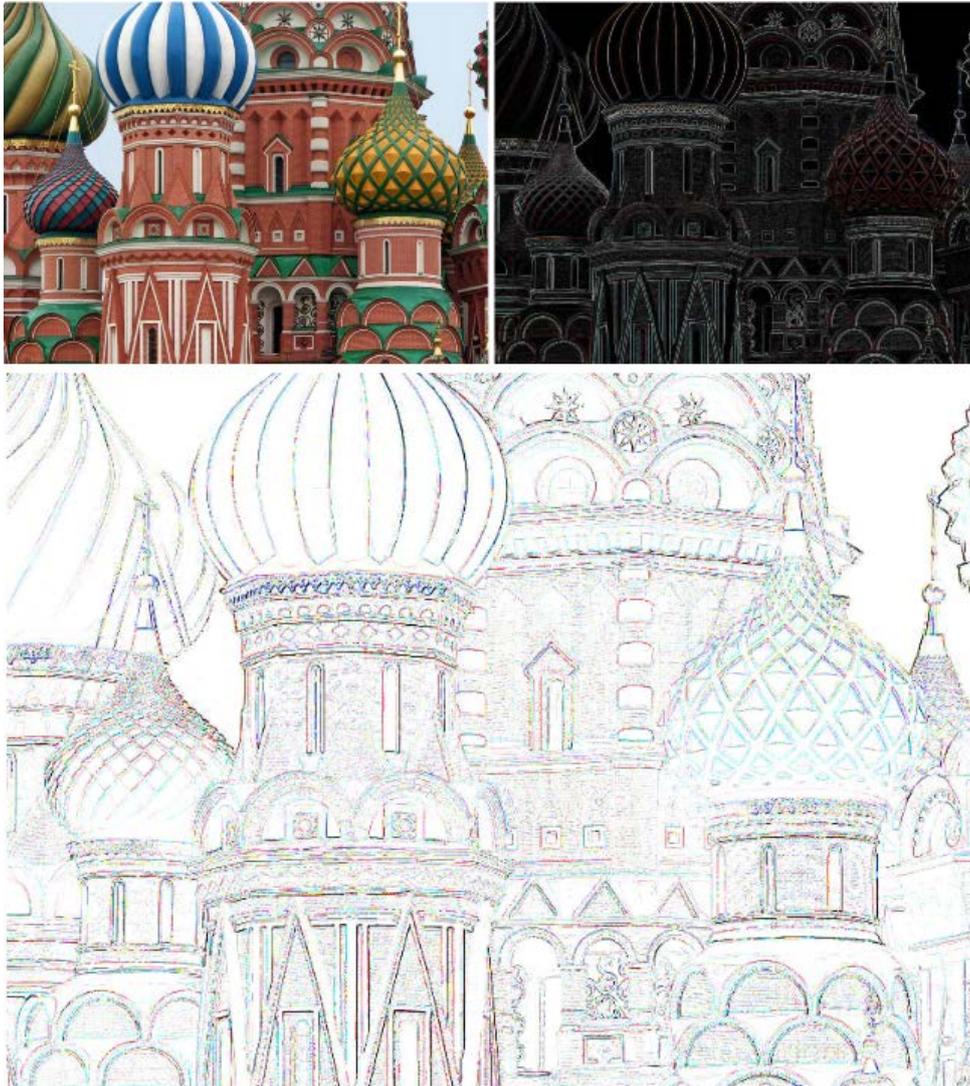


**Fig. 4-158.** Identificación de fibras de sauce (*Salix matsudana*) mediante esqueletonización. De arriba abajo y de izquierda a derecha: imagen original mostrando fibras entrecruzadas (imagen gentilmente cedida por la Dra. S. Monteoliva, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata); binarización de la imagen original; aplicación del filtro Thinning (que resultó ser inapropiado debido a que deja espacios vacíos dentro de las fibras); inversión de la imagen original para mostrar los espacios; selección de los píxeles correspondientes a los espacios de las fibras de acuerdo a diferentes parámetros morfométricos; combinación de la última imagen con la imagen binarizada mediante el operador OR; generación de un esqueleto de las fibras; superposición de las fibras esqueletonizadas (en rojo) con la imagen original, mediante el operador AND. Las imágenes correspondientes a los esqueletos fueron erosionadas (filtro Erosión), para su mejor observación.

La aplicación de operador NAND muestra resultados diferentes a los que se obtienen mediante el operador NOT, que sólo tiene la función de invertir la imagen. En la figura 4-160 se compara el producido por ambos operadores.

El operador NOR produce resultados que son complementarios a la operación OR. Sólo los bits que estén en 0 tanto en el operando 1 como en el operando 2, estarán expresados en la imagen final. Como resultado, se produce una especie de inversión de la imagen original. En la figura 4-161 se observa una imagen donde los objetos (piedras) presentan ciertas características de luz y posición que impide separarlos como unidades. Al aumentar la intensidad de los píxeles a través de la LUT y aplicar posteriormente el operador NOR,

se obtiene una imagen oscurecida (a modo de umbralización), donde los objetos pueden ser separados.



**Fig. 4-159.** Sobre la imagen original (arriba izquierda) se aplicó el filtro Roberts (arriba derecha). Ambas imágenes fueron posteriormente relacionadas mediante el operador NAND. La imagen resultante fue realizada para su mejor observación.



**Fig. 4-160.** Comparación entre el producido por el operador NAND de la figura 4-159 (izquierda) y el operador NOT sobre la imagen filtrada de la misma figura (derecha). Ninguna de las imágenes resultantes fue realizada.

El operador XOR puede ser utilizado para unir imágenes donde cada una aporta su contenido, a menos que este se solape con la información del otro (Fig. 4-162).

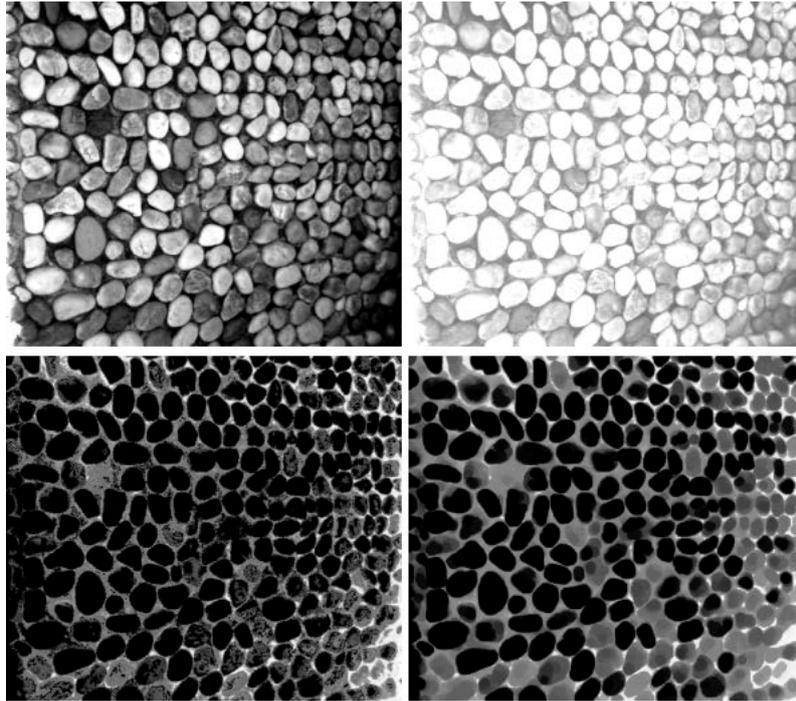


Fig. 4-161. La imagen original (arriba izquierda) fue modificada en su intensidad por medio de la LUT (arriba derecha). Ambas imágenes fueron relacionadas con el operador NOR (abajo izquierda) y posteriormente filtradas mediante el filtro Close.

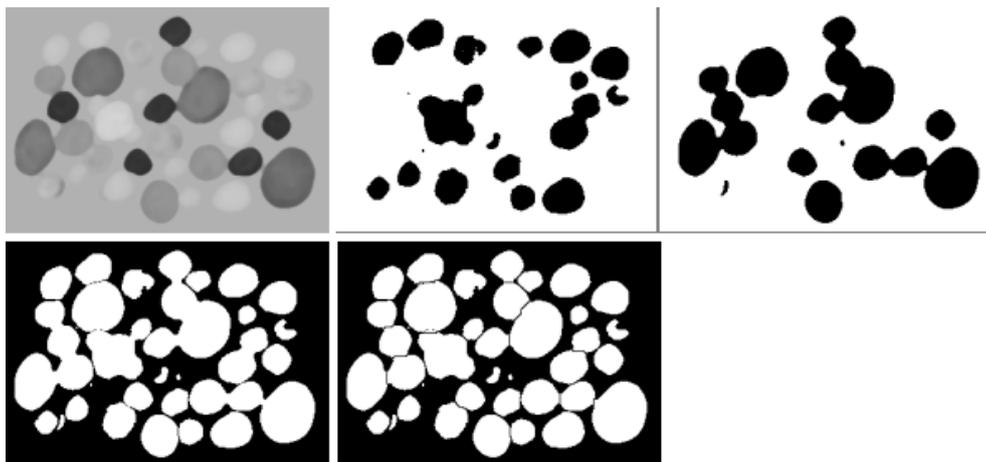


Fig. 4-162. Cuando se necesitan separar partículas para su recuento y medición y parte de las mismas tienen un valor de intensidad que está por encima o por debajo del valor de intensidad del fondo (arriba izquierda), se puede recurrir a la umbralización de ambos rangos de valores. Arriba centro: umbralización del rango por debajo de la intensidad del fondo. Arriba derecha: umbralización del rango por encima de la intensidad del fondo. Las imágenes obtenidas pueden ser relacionadas en una sola, mediante el operador XOR (abajo izquierda). La aplicación del filtro Watershed (abajo derecha), permite separar cada uno de los objetos encontrados.

### ***Transformaciones geométricas***

Si el propósito final de la captura y procesamiento de una imagen es su análisis, resulta fundamental que la misma presente las condiciones apropiadas para que los datos obtenidos sean los más exactos posibles. Muchas veces se observan imágenes donde no todos sus puntos están expresados en similares proporciones, como podría estarlo una imagen capturada con el microscopio. Concretamente, las imágenes obtenidas con cámaras fotográficas, en las que se registran objetos cercanos o distantes, pueden tener un ángulo tal que comienzan a imperar los fenómenos de la perspectiva reduciendo, de esta manera, la posibilidad concreta de una medición exacta (ver Fig. 2-4). Cuando se utiliza el microscopio-

pio estereoscópico para la observación de objetos que tienen volumen y presentan cierta desuniformidad de sus partes, necesariamente se van a generar sombras que enmascararán al objeto a medir. Esta situación no se observa normalmente en el microscopio de luz, ya que la profundidad de campo de las ópticas es tan corta que las superficies tienden a ser planas y normales para el eje óptico. De esta manera, las imágenes observadas permanecen en foco.

Para reacomodar las imágenes existen diferentes procesos matemáticos. Uno de ellos es el de **Deformación** o **Distorsión** (en inglés: “*Warping*”), que permite corregir cualquier objeto distorsionado, o a la inversa, genera una distorsión a partir de un objeto normal. Esta misma técnica puede aplicarse a los videos.

Las distorsiones se tratan mediante distintas funciones matemáticas. Entre las mismas se encuentran las inyectivas y biyectivas. Si la función es inyectiva la imagen original puede ser reconstruida de manera directa. Si es biyectiva, las imágenes se reconstruyen de manera inversa. Una función ( $f: X \rightarrow Y$ ) es inyectiva, si a cada valor del conjunto  $X$  (dominio) le corresponde un valor distinto en el conjunto  $Y$  (imagen o codominio). Es decir, a cada elemento del conjunto  $Y$  le corresponde un solo valor de  $X$  tal que, en el conjunto  $X$  no puede haber dos o más elementos que tengan la misma imagen (Fig. 4-163). La misma función es sobreyectiva, cuando cada elemento de  $Y$  es la imagen de al menos un elemento de  $X$ . Finalmente, la función es biyectiva si es al mismo tiempo inyectiva y sobreyectiva, es decir, si todos los elementos del conjunto de salida tienen una imagen distinta en el conjunto de entrada, y a cada elemento del conjunto de entrada le corresponde un elemento del conjunto de salida; concretamente, mediante esta función no existen elementos no apareados. En síntesis, mediante las funciones inyectivas o biyectivas se trata de ubicar puntos en común entre la imagen de referencia y aquella capturada por un medio que pueda producir distorsión, como puede serlo una cámara fotográfica.

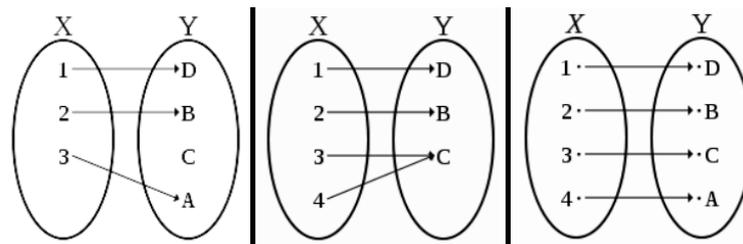


Fig. 4-163. Izquierda: función Inyectiva. Centro: Función Sobreyectiva. Derecha: Función Biyectiva.

La imagen central de la figura 4-164 está orientada con un ángulo tal que a simple vista produce una distorsión de tipo trapezoidal. La porción de la superficie que está más cerca de la lente se amplía más que las regiones más alejadas y las distancias se escorzan en la dirección de inclinación. Con el fin de medir y comparar las características de estas superficies, o incluso para aplicar correctamente los métodos de procesamiento, puede ser necesario transformar esta imagen para corregir la distorsión. Dado que el ángulo de inclinación exacto y la distancia hacia el objeto pueden ser desconocidos, se requiere de una imagen considerada como “normalizada”, que sirva como referencia para la corrección. Esta operación es conocida como **Corrección del Registro**.

La transformación geométrica también puede ser utilizada para la alineación de imágenes. Mediante este procedimiento se genera una gran imagen formada por la superposición de varias de ellas, a manera de mosaicos. De esta manera, se obtiene un panorama más global de una región geográfica fotografiada mediante vuelos a baja altura o se interpreta la interacción de células nerviosas entre diferentes regiones de un tejido, cuando éstas no caben dentro del contexto de una sola imagen (Fig. 4-165). La alineación puede ser realizada sobre imágenes de distinta dimensión (2D, 3D, 4D o 5D). Por esta razón, en el Capítulo 1 se propuso la posibilidad de identificar a este tipo de imágenes como 6D.

La alineación se produce mediante el uso de patrones reconocidos dentro de las imágenes. Este proceso puede ser manual, cuando el usuario identifica los patrones de alineación, o automático, a través de un procedimiento de **correlación cruzada**, que utiliza una plantilla de referencia. En este último caso, la imagen a alinear (flotante) se desplaza por sobre la

imagen de referencia y los valores de los píxeles de ambas se multiplican en cada posición de interacción. El total obtenido se almacena en cada posición para formar una imagen intermedia que detecta donde se encuentran las regiones idénticas o similares entre ambas imágenes iniciales.



Fig. 4-164. La imagen de frente de la Catedral de la ciudad de La Plata, Argentina (izquierda), sirve como modelo para corregir la distorsión de la imagen central, producida por efecto de la lente gran angular de la cámara. Mediante un proceso de registro, es posible eliminar la distorsión (derecha).

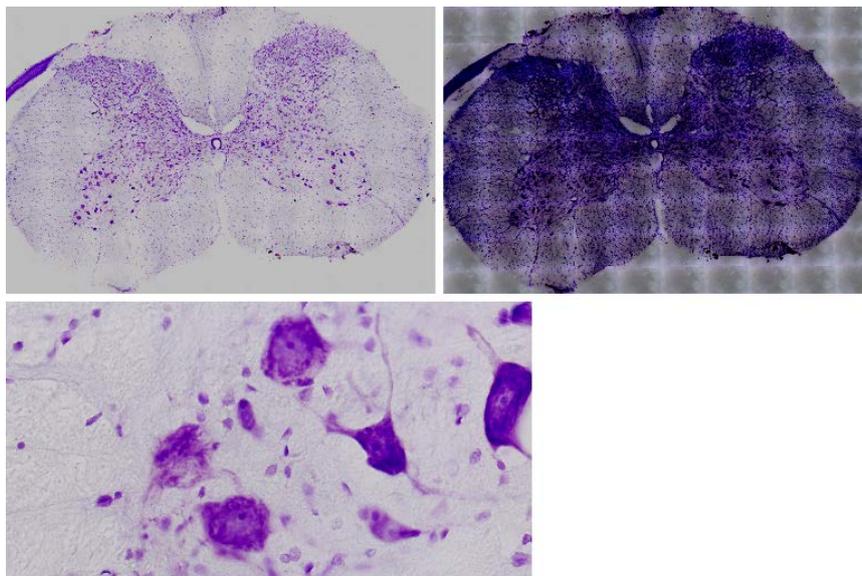


Fig. 4-165. Arriba izquierda: se observa la sección completa del segmento C5 de la médula espinal, teñida con violeta de cresilo. El corte histológico fue automáticamente escaneado a una magnificación de 40x y las imágenes capturadas fueron alineadas en una matriz de 9x10, con una resolución de 1360x1024 cada una. Esta imagen está expresada al 5% de su magnitud real. Arriba derecha: mediante manipulación de la LUT se pueden observar las intersecciones de cada una de las imágenes capturadas. Sin embargo, al ampliar la imagen al 100% y con la intensidad de luz apropiada, dichas intersecciones pasan totalmente desapercibidas. La imagen inferior fue construida con 3 intersecciones.

En ciertas circunstancias se requiere que la alineación sea **vertical**. Cuando se desean comparar estudios radiográficos, tomográficos o de resonancia magnética de un mismo individuo en el tiempo, hay que recurrir a los algoritmos de registro vertical. También se pueden alinear verticalmente las imágenes correspondientes a estudios realizados mediante un tomógrafo por emisión de positrones y otras provenientes de la tomografía computarizada. Mediante el primero se obtienen datos cuantitativos de procesos bioquímicos ocurridos en tiempo real, mientras que con el segundo se consiguen imágenes anatómicas de alta resolución.

El registro vertical también puede ser necesario para alinear cortes histológicos seriados. Para realizar una reconstrucción 3D de cortes de tejido obtenido mediante seccionamiento físico, se deben realizar secciones seriadas, las que deben montarse sobre el portaobjetos para ser capturadas mediante la cámara ubicada sobre el microscopio. Este proceso manual puede tener complicaciones cuando no se conservan todos los cortes de la serie y cuando la alineación de las muestras sobre el portaobjetos no es la misma. Más aún, al faltar secciones de la serie se puede perder la referencia de la imagen anterior. Si bien con una platina giratoria se pueden subsanar las dificultades de la alineación, este procedimiento es muy laborioso y no siempre exacto. En estas circunstancias es posible recurrir a los algoritmos de registro, que por un lado alinean las imágenes sobre un mismo eje central y por otro lado, pueden tomar puntos de referencia que no necesariamente sean contiguos a la imagen que se está alineando.

Las transformaciones geométricas cambian la teselación, es decir, la regularidad o patrón de figuras que cubren completamente una superficie plana sin dejar huecos entre los patrones y sin que estos se superpongan. En estos casos, la imagen resultante difiere en tamaño y quizás en forma con respecto a la original. Existen varios modelos matemáticos que establecen las relaciones geométricas entre las imágenes. Una transformación genérica puede expresarse como:

$$x' = S * R * x + t \quad [4-33]$$

donde,  $x$  es el vector de la imagen de entrada,  $x'$  el vector correspondiente de la imagen transformada,  $S$  un factor de escala,  $R$  una matriz de rotación (no necesariamente ortogonal) y  $t$  el vector de la translación. A partir de esta ecuación surgen las ecuaciones de giro, translación y escalado de las imágenes [4-34 a 4-39]:

Giro de la imagen	Translación de la imagen	Escalado de la imagen
$X' = X \cos \alpha + Y \sin \alpha$	$X' = X + \Delta x$	$X' = X * \lambda$
$Y' = Y \cos \alpha + X \sin \alpha$	$Y' = Y + \Delta y$	$Y' = Y * \lambda$

Durante las transformaciones geométricas es probable que los píxeles presentes no coincidan en su posición con la que guardaban en la imagen original y por lo tanto, su efecto visual también cambie. Para evitarlo, a cada píxel se le asigna el nivel de gris existente en la imagen original o se lo interpola a partir de los píxeles vecinos. Existen varias formas de lograrlo. Una de ellas es la del Vecino Más Cercano (del inglés: “*Nearest Neighbor*”). Cabe aclarar que si bien el nombre es el mismo que aquel del proceso de deconvolución descrito previamente en este capítulo, estos algoritmos no se relacionan.

Este método consiste otorgar el valor de intensidad de un píxel de la imagen original a otro de la imagen transformada, cuyo centro geométrico esté más cercano a su homólogo en la primera. Para ello, se toman las coordenadas de un punto en la imagen original ( $m,n$ ), se anota su valor de intensidad, y se busca dicha intersección en la imagen corregida. A partir de allí se calculan las distancias a dichas coordenadas y a los centros de los cuatro píxeles más cercanos en la imagen original, guardando en esta posición el valor de intensidad correspondiente a aquel píxel que proporcione la menor distancia, como se observa en la figura 4-166. Mediante este método no se altera el nivel de gris de la imagen original. Este proceso es utilizado cuando se realizan cambios en la escala de magnificación (zoom).

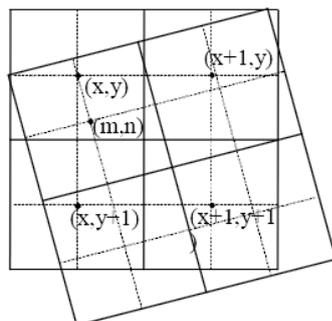
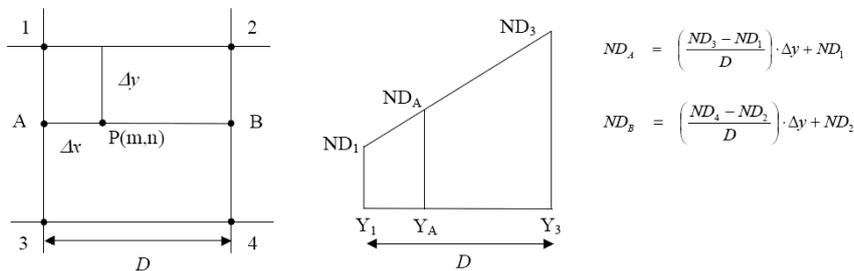


Fig. 4-166. Método de los Vecinos Más Cercanos para la interpolación de intensidades durante la rotación de la imagen.

Este mismo proceso se puede realizar mediante la interpolación bilineal o la interpolación bicúbica. La primera considera los niveles de intensidad de los 4 píxeles más cercanos en la imagen resultante al píxel de la imagen original (Fig. 4-167). Este método produce mayores precisiones espaciales que el de los Vecinos Más Cercanos.



**Fig. 4-167.** Interpolación bilineal. Se marcan sólo los puntos correspondientes al centro de los píxeles. El punto  $P(m,n)$  es el centro del píxel de la imagen original, los puntos 1, 2, 3 y 4 son los cuatro píxeles más cercanos.  $\Delta x$  e  $\Delta y$  son las diferencias absolutas entre los puntos  $P$  y 1 en  $X$  e  $Y$ , respectivamente.  $D$  indica el ancho y alto de la celda, asumiendo píxeles cuadrados. Los puntos  $A$  y  $B$  tienen la misma ordenada que  $P$ , donde  $A$  pertenece a la recta que une los puntos 1,3 y  $B$  a la que une los puntos 2,4. Este procedimiento está basado en una doble interpolación lineal. Para calcular el nivel de gris en el punto  $A$  ( $ND_A$ ), se aplica una interpolación lineal entre los puntos 1,3.

La interpolación bicúbica tiene el mismo fundamento que la interpolación bilineal, pero considera 16 píxeles más cercanos en la imagen resultante, en lugar de 4, para compararlos con el de la imagen original.

La interpolación siempre genera un efecto de suavizado sobre la imagen, ya que remueve alguna información de alta frecuencia, pero minimiza el “aliasing” a lo largo de líneas y bordes. El aliasing es el efecto que causa que las señales continuas distintas se tornen indistinguibles cuando se muestrean digitalmente. Cuando esto sucede, la señal original no puede ser reconstruida de forma unívoca a partir de la señal digital.

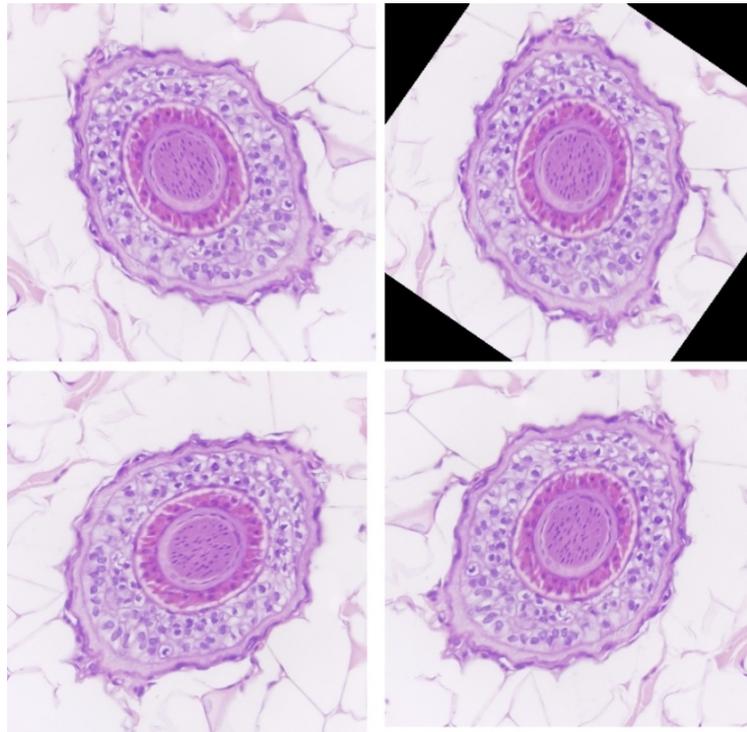
La interpolación bilineal reduce más el contraste de la línea de lo que lo hace la interpolación bicúbica, pero esta última difumina más su ancho (Fig. 4-168). Al rotar un objeto, las dimensiones del mismo prácticamente no se ven afectadas. Sin embargo, la intensidad de luz se puede modificar. En la figura 4-169 se ejemplifica la rotación de un tejido.



**Fig. 4-168.** Al rotar una línea de un píxel de ancho de color negro, el efecto final dependerá del método utilizado. A la izquierda se ve el efecto de la rotación por el método de los vecinos cercanos. En el centro se ve el efecto de la interpolación bilineal y a la derecha el de la interpolación bicúbica. Estos dos últimos métodos agregan grises a lo largo del eje para suavizar el efecto de la rotación.

El **redimensionamiento** es otra transformación geométrica de las imágenes, en donde la resolución original de las mismas puede verse alterada en menos (sub-muestreo) o en más (interpolación). El proceso también puede ser temporal en más o menos (zoom), pero en

este caso, no se modifica la resolución sino que simplemente cambia el tamaño del píxel que se muestra en pantalla.



**Fig. 4-169.** La imagen del folículo piloso (918x893) (arriba izquierda) fue rotada 35° (arriba derecha). Nótese que las zonas que no cuentan con tejido se rellenan con negro para mantener la resolución de la imagen. La imagen inferior izquierda muestra la rotación de la imagen original en 90° en sentido horario. En este caso, la resolución de la imagen se invierte (893x918). En la imagen inferior derecha se produce un vuelco de derecha a izquierda de la imagen original sin variar la resolución original.

El redimensionamiento es un proceso que requiere de un equilibrio entre la eficiencia del mismo, la suavidad de la muestra y la nitidez de las estructuras. En el proceso temporal, al aumentar el tamaño de la imagen comienzan a observarse los píxeles (“imagen virtualmente pixelada”) pudiendo llegar a distorsionar el objeto observado. Por el contrario, cuando se reduce el zoom, existe una tendencia a aumentar su suavización y aparente nitidez. A pesar de ello, se pierde resolución, y por ende, información valiosa que pudiese contener la imagen original. El sub-muestreo se produce esencialmente para reducir el espacio que ocupa una imagen en el soporte electrónico. Este proceso se realiza mediante los mismos algoritmos utilizados para la interpolación. En la figura 4-170 se muestra el efecto de sub-muestreo. A primera vista es casi imposible ver las diferencias entre la imagen original y sus derivados. Para ello, es necesario recurrir al redimensionamiento comparativo, como se aprecia en la figura 4-171.

El proceso de interpolación de píxeles sirve para aumentar la resolución de la imagen, a expensas de la calidad de la información, ya que es imposible aumentar los detalles de una imagen previamente digitalizada. Los efectos de la interpolación dependen del algoritmo utilizado.

Para poder percibir el efecto de suavizado y de la intensidad de los píxeles durante el proceso de interpolación se deben ampliar las imágenes. De esta manera, se observa que no todas ellas muestran los mismos efectos sobre los objetos. Las diferencias radican no sólo en los algoritmos utilizados, sino también en la resolución inicial de la imagen original. En la figura 4-172 se observa un detalle del dibujo de Escher y el efecto de la interpolación cuando los algoritmos de Vecinos Más Cercanos, interpolación bilineal y bicúbica, incrementan tres veces la resolución original. Al hacer un redimensionamiento de un sector se pueden apreciar mejor los efectos de los algoritmos mencionados (Fig. 4-173).



Fig. 4-170. Efecto del sub-muestreo. Arriba: obra "Angeles y Demonios" de M.C. Escher (obtenida de su página oficial: <http://www.mcescher.com/>) con una resolución de 850x850. Abajo: su sub-muestreo a la mitad (425x425) utilizando los algoritmos de Vecinos Más Cercanos (izquierda), interpolación bilineal (centro) e interpolación bicúbica (derecha).

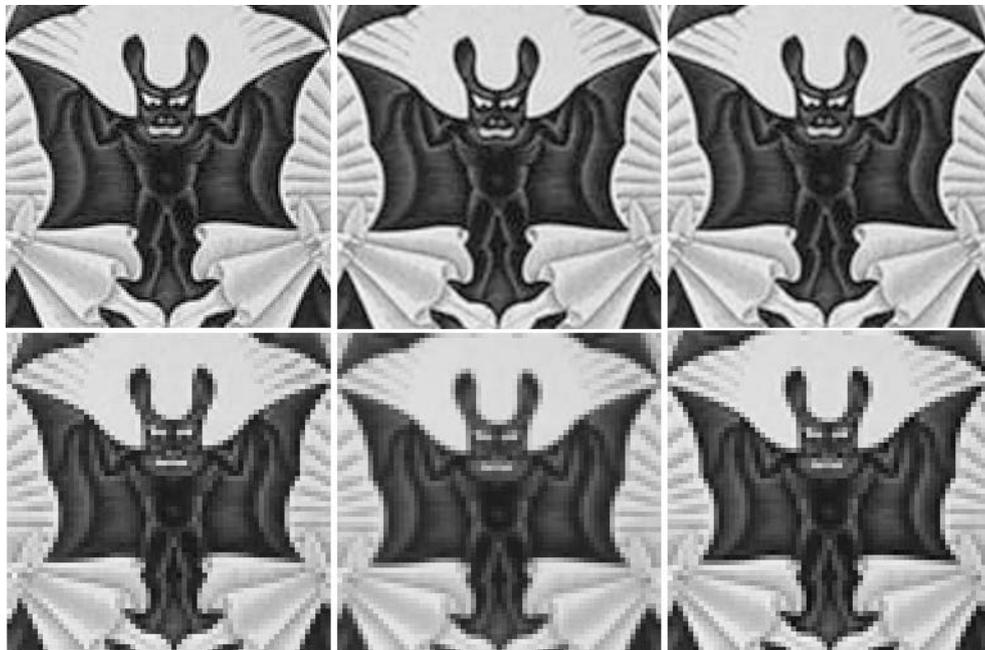


Fig. 4-171. Un detalle de la imagen original de la figura 4-170 fue redimensionado al 200x (fila superior). La columna de la izquierda corresponde al efecto producido por el algoritmo de Vecinos Más Cercanos, la central, a la interpolación bilineal y la derecha, a la interpolación bicúbica. A simple vista no se observan mayores detalles de modificación entre ellos. Sin embargo, cuando se redimensionan los mismos detalles al 400x, pero a partir de las imágenes reducidas al 50% con respecto a la original (fila inferior de la Fig. 4-170), no sólo se observan diferencias con el producido con el mismo algoritmo, sino también entre los producidos por los diferentes algoritmos.



Fig. 4-172. Efecto de la interpolación para el aumento de la resolución de la imagen. En el extremo superior izquierdo se ve el detalle original. A su derecha se observa el efecto producido mediante el algoritmo Vecinos Más Cercanos al incrementar 3 veces la resolución inicial. Abajo: los efectos bilineal (izquierda) y bicúbico (derecha).



Fig. 4-173. Detalles de la figura 4-172. Vecinos más cercanos (izquierda), interpolación bilineal (centro), interpolación bicúbica (derecha).

### ***Conversión de imágenes***

Al hablar de atributos de los píxeles (Capítulo 1), se describió la profundidad de bits de las imágenes, así como la clase de las mismas. De la misma manera que las imágenes se pueden redimensionar para que tengan mayor o menor resolución, también se les puede cambiar su profundidad de bits y hasta su sistema de color.

En cuanto a los sistemas policromáticos, en el Capítulo 1 se mencionó que las imágenes de color real más frecuentemente utilizadas pertenecían al sistema RGB, es decir, compuestas por los canales rojo, verde y azul. En la figura 1-28 se observa que al separar cada uno de los canales no se obtienen imágenes de color sino monocromáticas. Esto se debe a que, como fuera descrito, una imagen de 24 bits se compone de 3 canales monocromáticos de 8 bits cada uno. Sin embargo, a pesar de poder expresarse de manera monocromática, estos 3 canales están relacionados a través de una posición dentro del sistema de color.

Para convertir una imagen de color real en la representación monocromática de su luminancia (imagen monocromática), se deben obtener los valores del rojo, verde y azul mediante codificación lineal de su intensidad, utilizando la expansión gamma. Luego, por convención, se suman 30% del valor de color rojo, 59% del valor verde, y 11% del valor azul, mediante la siguiente ecuación:

$$Gris = (0,299 * R + 0,587 * G + 0,114 * B) \quad [4-40]$$

Independientemente de la escala seleccionada (0,0 a 1,0; 0 a 255; 0% a 100%) el número resultante representa el valor de la luminancia lineal buscada (Fig. 4-174). Por lo general, para regresar a una representación de grises convencional simplemente se asigna el valor del pixel monocromático a cada uno de los canales de color. Si fuera necesario, se aplicaría la compresión gamma (Fig. 4-175).

R=109 G=219 B=170	R=36 G=219 B=85	R=182 G=219 B=85	R=255 G=219 B=85	181	149	193	215
R=255 G=0 B=170	R=255 G=36 B=0	R=182 G=109 B=0	R=219 G=146 B=170	95	98	119	171
R=109 G=0 B=255	R=182 G=73 B=255	R=219 G=109 B=255	R=36 G=182 B=255	61	126	158	146

Fig. 4-174. Aplicando la formula de conversión, la imagen RGB es convertida a monocromática.

181	149	193	215	R=181 G=181 B=181	R=149 G=149 B=149	R=193 G=193 B=193	R=215 G=215 B=215
95	98	119	171	R=95 G=95 B=95	R=98 G=98 B=98	R=119 G=119 B=119	R=171 G=171 B=171
61	126	158	146	R=61 G=61 B=61	R=126 G=126 B=126	R=158 G=158 B=158	R=146 G=146 B=146

Fig. 4-175. Transformación de una imagen monocromática a imagen color.

Si se seleccionan las imágenes monocromáticas obtenidas en la figura 1-28 mediante un proceso de separación de colores, estas se pueden reagrupar, revirtiendo el proceso, para volver a formar la imagen color original, siguiendo el mismo procedimiento que el de la conversión visto en la figura 4-174, con la salvedad que en este caso, cada canal de color tomará una posición específica dentro de la imagen final. En la figura 4-176, se pseudo-colorearon cada uno de los canales para hacer la conversión mas entendible, aunque este paso no es necesario. Al sumar cada uno de los colores se van formando imágenes intermedias para dar lugar a la imagen final color de la figura 1-28.

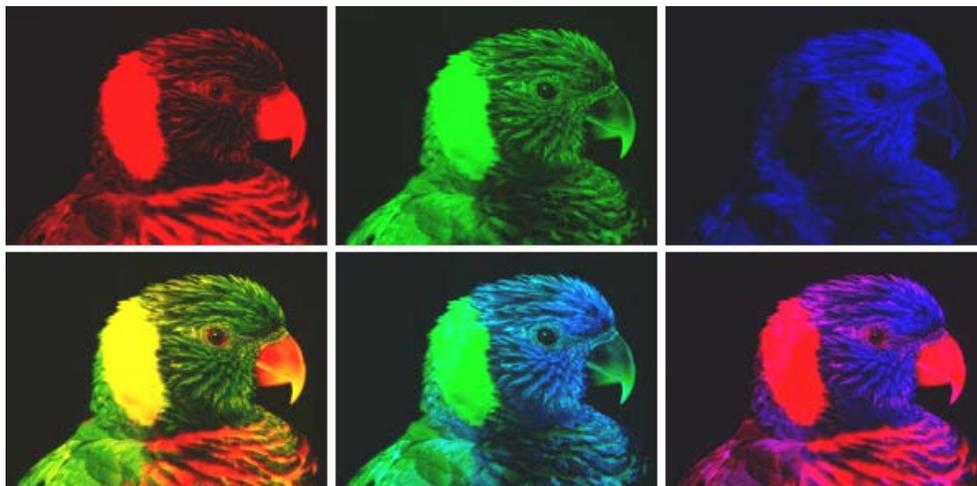
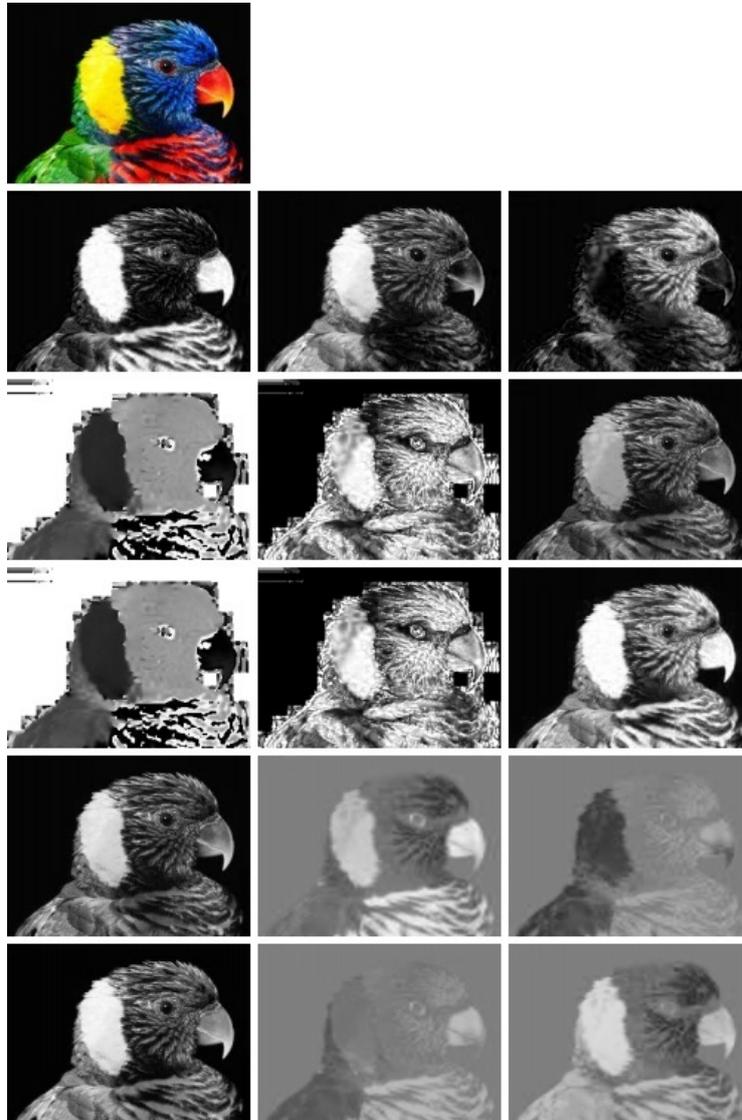


Fig. 4-176. En la fila superior, las 3 imágenes monocromáticas fueron pseudo-coloreadas para su mejor identificación. Por combinatoria de estas imágenes se pueden lograr las imágenes intermedias de la fila inferior. A la izquierda, se observa la combinación entre el canal rojo y el verde, en el centro, entre el verde y el azul y a la derecha, entre el rojo y el azul.

Para convertir una imagen RGB en otros sistemas de color (como el  $L^*a^*b$ ), en primera instancia se realiza su compresión gamma. Posteriormente, se computa su luminosidad como una combinación lineal directa de la compresión gamma de los valores del RGB, en lugar de la linealización a través de la expansión y compresión gamma vistas para la conversión a imágenes monocromáticas. En la figura 4-177 se observa la conversión y extracción de las imágenes monocromáticas correspondientes a los sistemas de color HSI, HSV, YIQ y CIE  $L^*a^*b$ , a partir de una imagen RGB. La ventaja de la conversión de un sistema de color a otro es la portabilidad y similitud al momento de reproducir colores en pantalla, impresora, telas, televisión, etc.



**Fig. 4-177.** Una imagen color puede ser convertida a otros sistemas de color. Arriba, se observa la imagen original RGB. En la primera fila de imágenes monocromáticas, de izquierda a derecha se desglosan los canales del sistema RGB; segunda fila: sistema HSI (Hue, Saturation, Intensity); tercera fila, sistema HSV (Hue, Saturation, Value); cuarta fila, sistema YIQ (Luminance, In-Phase, Quadrature); quinta fila, sistema CIE  $L^*a^*b$  (Lightness, a Dimension, b Dimension).

La luminancia se refiere al nivel de brillo de un píxel o de una imagen, mientras que cromaticidad es la tonalidad en el espectro de color y la saturación o intensidad de dicha tonalidad. En una imagen RGB, el canal verde es el que contiene la mayor parte de la información de la luminancia, mientras que los canales rojo y azul representan la cromaticidad. Esto se debe a la capacidad de la vista humana para distinguir más las variaciones de verde que las de los otros colores.

Existe un espacio de color denominado YCrCb, que si bien no es un espacio absoluto (al igual que el RGB), donde la diferencia perceptiva entre colores está directamente relacionada con las distancias entre colores representados por puntos en el espacio de color, es una forma de codificar información del RGB. Los componentes que forman la base colorimétrica de este sistema son: la luminosidad del verde (Y), la crominancia del rojo (Cr) y la del azul (Cb). La conversión de un sistema a otro es directa a través de las siguientes relaciones:

$$Y_{i,j} = (0,299 * R_{i,j} + 0,587 * G_{i,j} + 0,114 * B_{i,j}) \quad [4-41]$$

$$Cr_{i,j} = (-0,168736 * R_{i,j} - 0,331264 * G_{i,j} + 0,5 * B_{i,j}) \quad [4-42]$$

$$Cb_{i,j} = (0,5 * R_{i,j} - 0,418688 * G_{i,j} - 0,081321 * B_{i,j}) \quad [4-43]$$

donde,  $i,j$  representa la posición del píxel dentro de la matriz.

La ventaja del sistema YCrCb sobre el RGB es que prioriza el efecto producido por el color sobre el ojo humano, más que una combinación de intensidades (Fig. 4-178). Más aún, el “peso” final de la imagen en este espacio de color es la mitad de aquel de la imagen RGB, ya que la cantidad de bits de cada píxel se reduce de 24 a 12. Este sistema es utilizado en sistemas digitales de video y fotografía.

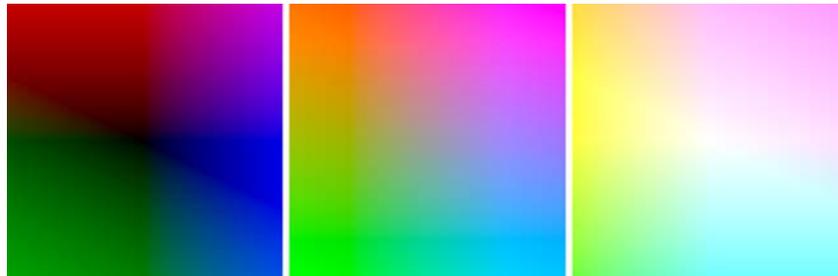


Fig. 4-178. Sistema de color YCrCb mostrando su aspecto de acuerdo al valor de Y. Izquierda: Y=0; Centro: Y=0,5; Derecha: Y=1.

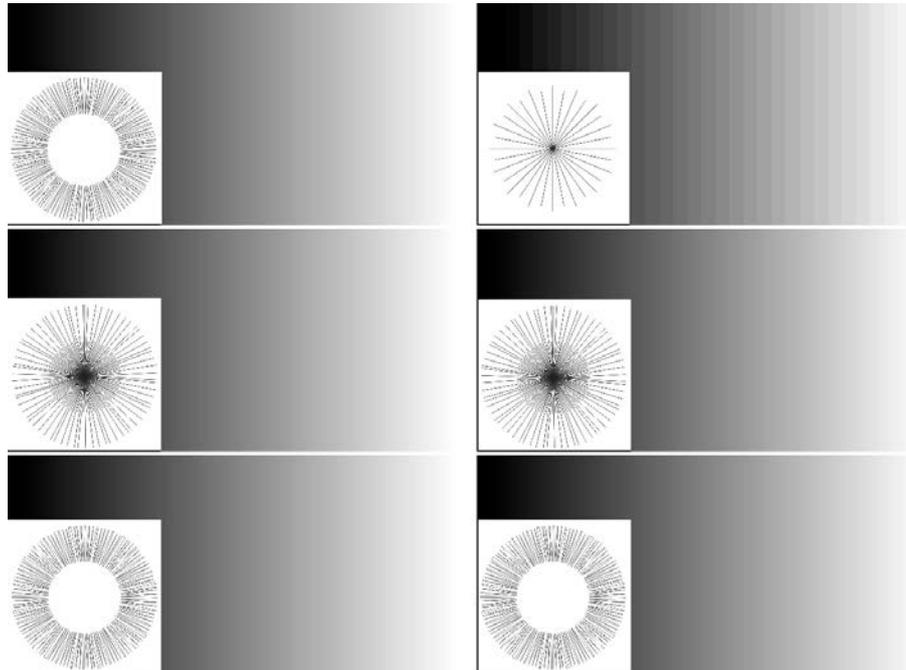
Para convertir una imagen de 8 bits en otra de 16 bits es conveniente reescalar los valores de los píxeles del primero en la escala del segundo. Esta conversión no es directa, ya que en una imagen de 8 bits, con un rango de 0 a 255 (256 valores), la transformación de un valor a otro sólo alcanzaría para producir 65280 tonalidades de gris ( $256 * 255$ ), cuando en realidad es necesario alcanzar el valor  $2^{16} = 65536$ . En este caso, el valor 0 de la imagen de 8 bits se equipara con el valor 0 de la imagen de 16 bits, mientras que el valor 255 del primero se homologa con el valor 65535 del segundo. De todas maneras, algunos programas permiten ambos tipos de conversiones. Los valores intermedios se escalan linealmente de acuerdo a la ecuación:

$$V_{16 \text{ bits}} = V_{8 \text{ bits}} * 65535/255 \quad [4-44]$$

La transformación de una imagen de 8 bits a otra de 16 bits no mejora la calidad final pero evita todas las pérdidas de información que se producen al procesarlas. Al trabajar con 8 bits, todos los valores son enteros y positivos. Al aumentar la cantidad de bits a 16, si bien los valores siguen siendo enteros y positivos, la pérdida de información es menor. Esto se debe a que los valores intermedios se acercan más a la realidad cuando se realizan operaciones matemáticas, en donde se obtienen números decimales. Actualmente es posible transformar una imagen de 16 bits enteros en decimales. De todas maneras, para lograr que todos los valores obtenidos sean considerados en los cálculos luego de ciertas operaciones matemáticas, es necesario convertir las imágenes a 32 bits de punto flotante, donde los píxeles adquieren valores decimales y se admiten tanto los resultados positivos como los negativos. Para la conversión de una imagen de 8 o 16 bits a otra de 32 bits, la transferencia de los valores es directa, es decir, no es necesario hacer la normalización.

A modo de ejemplo, si se cuenta con una imagen con un degradado del negro al blanco y se la divide por un valor entero, se obtiene otra imagen con intensidades menores. Si la

imagen resultante de la división es ahora multiplicada por aquel mismo valor entero, se debería obtener la misma imagen inicial. Sin embargo, esto no sucede con las imágenes de 8 bits (Fig. 4-179).



**Fig. 4-179.** La columna izquierda muestra la imagen original de 8 bits (línea superior), su transformación a 16 bits (segunda línea) y a 32 bits (tercera línea). Si cada una de estas imágenes es dividida por la constante 8 y a la resultante se la multiplica por esta misma constante, se obtienen aquellas de la columna derecha. En los insertos se observa el histograma radial que muestra las diferencias entre las distintas profundidades de bit y entre las imágenes originales y aquellas procesadas matemáticamente. Las diferencias más marcadas se encuentran entre ambas imágenes de 8 bits.

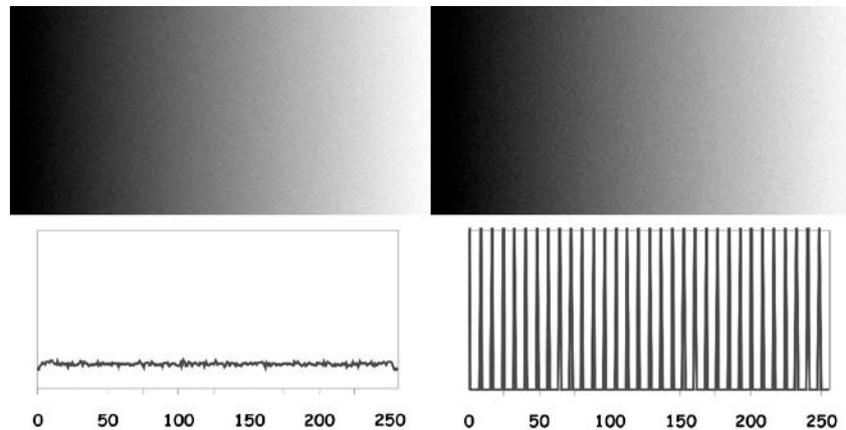
En esta figura se observa la disposición en zonas de las distintas intensidades, proceso que se corrobora con el histograma. Si bien en las imágenes de 16 bits este proceso se mejora, quedan aún algunos sectores donde el intervalo de valores se ve interrumpido. De la figura se desprende que los resultados teóricamente esperados sólo se reproducen al trabajar con imágenes de 32 bits, donde se obtiene prácticamente la misma imagen original luego de procesamiento matemático.

Si la imagen original tiene un píxel con valor 187 y se lo divide por un valor entero de 8, el valor final del píxel será  $187 / 8 = 23,375$ . Como en la imagen de 8 bits sólo se aceptan valores enteros, el valor final del píxel será 23. Luego, si se multiplica este número por el mismo valor entero inicial, el resultado será:  $23 * 8 = 184$ . Siguiendo con el mismo razonamiento, todos los valores comprendidos entre el 184 y el 191 arrojarán el mismo valor, los que en la imagen se ven agrupados como en franjas, proceso conocido como **posterización**.

El proceso de posterización sólo se observa en las imágenes de 8 bits carentes de ruido. De manera errónea, estas bandas se suelen asociar a la escasez de niveles tonales cuando hay sub-exposición. Sin embargo, cuando realmente existe la sub-exposición, aumenta el nivel de ruido generado por el propio sensor de la cámara y no aparece la posterización (Fig. 4-180). Esto no significa que sean mejores las imágenes con más ruido, pero sí que hay que tener especial cuidado con aquellas que están más limpias de ruido. Por lo tanto y en la medida de lo posible, sería ideal trabajar con imágenes de 32 bits o al menos de 16 bits, cuando éstas vayan a ser procesadas por cualquiera de los métodos descritos en el capítulo.

La conversión entre bits permite redistribuir las intensidades de una imagen. Esto puede servir para lograr una mejor visualización de las diferencias entre las mismas (al aumentar la cantidad de bits) o por el contrario, para restringir la información presente, de manera

tal de hacer más manejable los datos. A veces, estas conversiones se llevan a cabo sin la percepción del usuario, ya que son utilizadas por los diferentes algoritmos para lograr un efecto que de otra manera no se hubiese conseguido. Existen dispositivos que capturan imágenes en 8 bits, las procesan en 12 bits y las muestran en pantalla en 4 bits.



**Fig. 4-180.** A la imagen de 8 bits de la figura 4-179 se le introdujo ruido Gaussiano con un desvío estándar de 5 (arriba izquierda). Luego de dividir esta imagen por la constante 8, y a su resultante multiplicarla por la misma constante, se obtiene una imagen sin posterizar (arriba derecha). Si bien en apariencia las imágenes son similares, los histogramas muestran patrones diferentes.

Para mostrar imágenes de baja profundidad de bits en pantallas de alta resolución, es necesario realizar una extensión de la resolución de la imagen original. Por el contrario, para mostrar una imagen de alta resolución en dispositivos de baja resolución, sólo se necesita realizar una reducción de la señal de la imagen original.

En general, durante los procesos de reducción de bits se introducen artefactos no deseados, tales como falsos contornos que provocan gradaciones escalonada en la pantalla. Esto son artefactos muy comunes cuando se utilizan técnicas de reducción de bits, debido al error de cuantificación. Aunque la técnica de **tramado** (del inglés, “*dithering*”) produce menos falsos contornos que la técnica de **truncamiento medio**, ambos generan patrones difuminados en las imágenes sobre las que operan. Estos fenómenos se producen porque ninguna de las dos técnicas toma en consideración la señal de la imagen original. Afortunadamente, existen diversos algoritmos basados en las técnicas de modelado de ruido, que filtran los componentes de baja frecuencia de error de cuantificación (por ejemplo, el fondo de la imagen) y los mueven a los componentes de alta frecuencia.

El proceso de extensión de bits es relativamente sencillo, ya que sólo se necesita multiplicar el valor del píxel de la imagen original por un factor de conversión. Existen diversas maneras de seleccionar el factor de conversión y ello se debe a la forma en que se desea escalar los valores. En el **escalado directo**, la imagen convertida se parece a la original (Fig. 4-181), sólo que sus valores se han escalado al rango correspondiente (Tabla 4-2). En este caso, se obtienen los mismos valores al convertir de 8 a 16 bits, que desde 12 a 16 bits.



**Fig. 4-181.** Conversión de la imagen original de 8 bits (izquierda) en 12 bits (centro) y 16 bits (derecha) mediante el escalado directo. La apariencia de todas las imágenes es la misma. Los encabezados de cada columna sirven como referencia para los valores listados en la Tabla 4-2.

Los valores obtenidos mediante el escalado directo surgen de multiplicar el valor de intensidad del píxel por 16, cuando se quiere convertir de 8 a 12 bits o de 12 a 16 bits y por 256, al transformar de 8 a 16 bits.

Tabla 4-2. Valores de intensidad del píxel luego de la conversión de 8 a 12 y 16 bits mediante el escalado directo

Bits	Rango	Columnas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8	0..255	0	15	47	79	111	143	175	207	239	255
12	0..4095	0	240	752	1264	1776	2288	2800	3312	3824	4080
16	0..65535	0	3840	12032	20224	28416	36608	44800	52992	61184	65280

Los valores expresados debajo de cada columna se corresponden con los valores de intensidad en las correspondientes imágenes de la figura 4-181.

En el **escalado por multiplicación**, la conversión de 8 a 16 bits se obtiene al multiplicar por 257, en lugar de 256. De esta manera, el valor máximo alcanzado durante la conversión será de 65535 en lugar de 62280, llegando así, al extremo permitido del rango. En la conversión de 8 a 12 bits y de 12 a 16 bits, el factor de multiplicación es 16,0625. Para obtener el valor entero final se deben truncar los decimales (Tabla 4-3).

Tabla 4-3. Valores de intensidad del píxel luego de la conversión de 8 a 12 y 16 bits mediante el escalado por multiplicación

Bits	Rango	Columnas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8	0..255	0	15	47	79	111	143	175	207	239	255
12	0..4095	0	240	754	1268	1782	2296	2810	3324	3838	4095
16	0..65535	0	3855	12079	20303	28527	36751	44975	53199	61423	65535

El efecto consiste en mover los valores binarios hacia la izquierda, el número apropiado de bits, y añadir los bits más significativos del valor original en el lado derecho (bits menos significativos) de la nueva imagen. De esta manera, se consigue el rango completo y los valores entre cero y el máximo se escalan en concordancia. En todos los casos, la conversión por extensión mediante el escalado por multiplicación tampoco afecta la visualización de la imagen, que se mantiene igual a la visualizada en la figura 4-181.

Existe un tercer método de conversión que consiste en la **copia directa** de los datos de la imagen original en la imagen resultante, sin el proceso de escalado. Los resultados de esta conversión normalmente se verán más oscuros que en la imagen original debido a que la copia directa de los datos resulta en una imagen cuyos valores de intensidad son sólo una pequeña fracción del rango dinámico de la imagen resultante (Fig. 4-182).

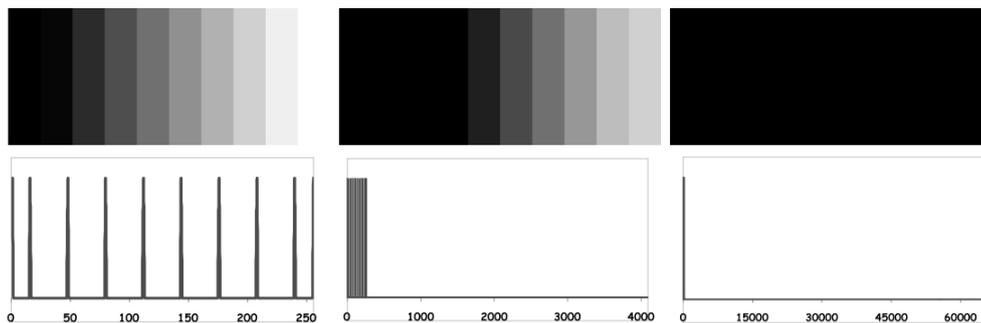


Fig. 4-182. Conversión de la imagen original de 8 bits (izquierda) en 12 bits (centro) y 16 bits (derecha) mediante la copia directa. Principalmente, la imagen de 16 bits se observa más oscura. En la fila inferior se presenta el histograma de cada una de las imágenes.

La conversión a 32 bits (imagen de punto flotante) a partir de imágenes con cualquier otro tipo de profundidad de bits, se realiza a través del escalado hasta alcanzar el valor máximo del rango (255, 4095 y 65535 para 8, 12 y 16 bits, respectivamente). De esta manera, los histogramas se mantienen tal cual se observan en la imagen original. La única variación que podría mencionarse es que el valor de la intensidad del píxel en la imagen de 32 bits se expresa en decimales y que existen variaciones entre los valores de estos, dependiendo

del cual haya sido la profundidad de bits de la imagen original. La Tabla 4-4 muestra las variaciones de los valores de intensidad de las imágenes de 32 bits en comparación con las de 8, 12 y 16, dependiendo de cual haya sido su origen.

Tabla 4-4. Valores de intensidad de los píxeles en una imagen 32 bits luego de su conversión a partir de otras profundidades de bit

Conversión (en bits)	Intensidad del Píxel						
	0	1	2	3	64	128	255
8 a 32	0,4980469	1,494141	2,490234	3,486328	64,24805	127,9980	254,5020
12 a 32	0,4998779	1,499634	2,499390	3,499146	64,48425	128,4686	255,4376
16 a 32	0,4999924	1,499977	2,499962	3,499947	64,49902	128,4980	255,4961

La conversión por reducción se puede realizar desde cualquier profundidad de bits a otra. A través de este proceso siempre se pierde información, que puede o no ser relevante. Para realizar esta conversión, la escala a convertir no necesariamente tiene que corresponder a todo el rango de la imagen original. Es posible sesgar la información a un intervalo en particular, el que será escalado dentro de la imagen de menor profundidad de bits. Aquellos valores que se encuentren por debajo del valor especificado del intervalo seleccionado, serán convertidos a cero, mientras que los que superen el valor máximo serán equiparados al valor máximo del rango de la imagen de destino. Si no se especifica un intervalo determinado, todos los valores de la imagen original serán escalados en la imagen destino. De la misma manera, también se puede especificar cuál será el rango sobre el cual los valores de la imagen de mayor profundidad de bits serán repartidos en la imagen final (Fig. 4-183). Los valores de intensidad de cada una de las conversiones se listan en la Tabla 4-5.

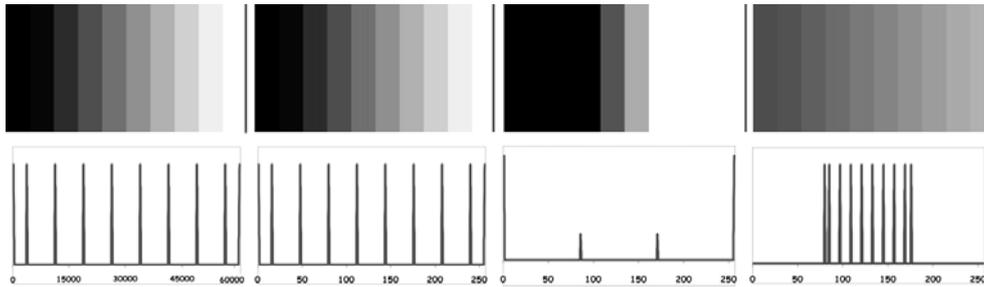


Fig. 4-183. Conversión de la imagen original de 16 bits (izquierda) en 8 bits (segunda columna) donde el rango completo de la imagen original se escala a la totalidad de la imagen destino. Tercera columna: imagen de 8 bits convertida a partir de la de 16 bits, habiendo establecido un rango de intensidad entre 20303 y 44975. Derecha: imagen de 8 bits, donde la totalidad del rango de la imagen de 16 bits se escala entre los valores de 79 y 175 de la imagen destino. En la fila inferior se observan los histogramas correspondientes.

Tabla 4-5. Valores de intensidad del píxel luego de la conversión de 16 a 8 bits

Bits	Columnas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
16	0	3855	12079	20303	28527	36751	44975	53199	61423	65535
8 <sup>A</sup>	0	15	47	79	111	143	175	207	239	255
8 <sup>B</sup>	0	0	0	0	85	170	255	255	255	255
8 <sup>C</sup>	79	84	96	108	120	132	144	156	168	175

Los valores corresponden a las intensidades de los píxeles de las imágenes de la figura 4-183. A: conversión rango completo de la imagen original en la totalidad del rango de la imagen destino. B: conversión del rango de 20303 a 44975 de la imagen de 16 bits, en la totalidad del rango de la imagen destino. C: Conversión de la totalidad del rango de la imagen de 16 bits en el rango de 79 a 175 en la imagen destino.

La reducción de bits también se puede producir en imágenes policromáticas. Así, las imágenes RGB de 24 bits se pueden transformar en imágenes de color paleta de 8 bits. La transformación de una imagen con capacidad de mostrar más de 16 millones de colores a otra de tan sólo 256 puede implicar una gran pérdida del detalle de los objetos, y con esto, de la calidad total de la imagen. No obstante, el espacio ocupado por la imagen se reduce al tercio y puede ser presentado en pantallas cuya capacidad máxima de muestreo sea de 256 colores.

Uno de las formas de transformación a color paleta se realiza mediante el proceso de dithering, que es una técnica usada en computación gráfica para crear la ilusión de profundidad de color en imágenes con una paleta de colores limitada. En una imagen tramada, los colores no disponibles en la paleta se aproximan, por un efecto de ilusión óptica de difusión de píxeles de color, dentro de la gama de colores disponibles. El ojo humano percibe la difusión como una mezcla de los colores dentro de ésta (Fig. 4-184).

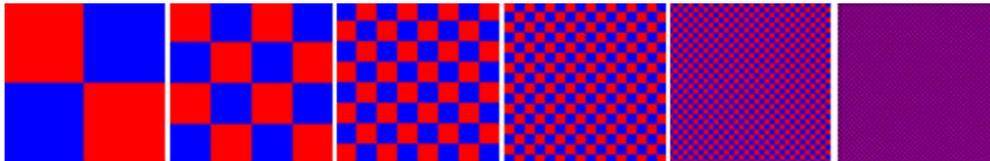


Fig. 4-184. El tramado se produce por distribución espacial de colores. En este caso, sólo se utilizaron los colores rojo y azul. De acuerdo a su distribución y tamaño del píxel que lo contiene, podría dar la sensación de estar representando otro color, que en este caso es el violeta.

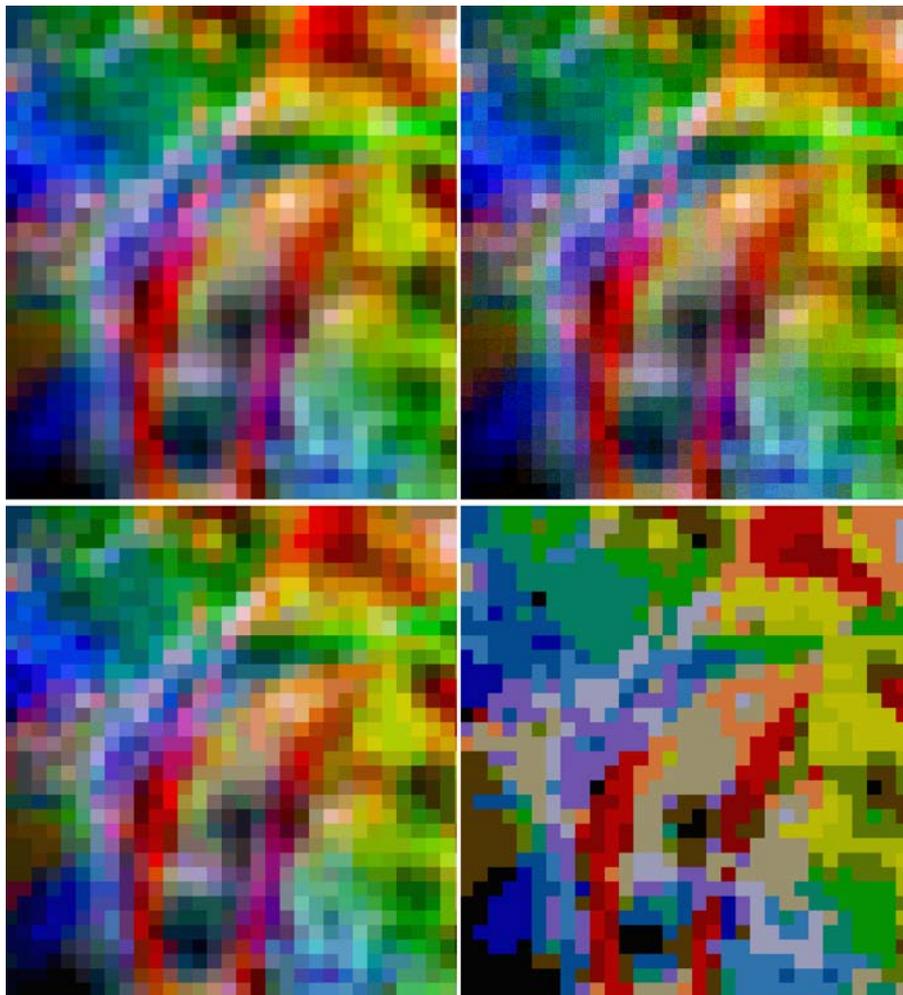


Fig. 4-185. Arriba izquierda: imagen original RGB (24 bits); arriba derecha: transformación a paleta (8 bits) por el método del entramado; abajo izquierda: transformación a paleta con una gama de 256 tonalidades a través del método del corte medio; abajo derecha: transformación a paleta, mediante la misma técnica, pero con una gama de 16 tonalidades.

La forma más sencilla de lograr una conversión lo más parecida posible a la imagen real, es generando una tabla de conversión (LUT), donde cada color tenga una posición determinada dentro de la lista. Al transformar la imagen de 24 bits en 8 bits, se estaría generando un puntero a una posición de la tabla, que daría como resultado el color definitivo. Si bien la apariencia puede resultar más suavizada al utilizar este método, la transformación es única para cada imagen, mientras que con el método de entramado, todas las imágenes se comportan de la misma manera para un determinado color.

Las imágenes tramadas, en particular las que tienen relativamente pocos colores, a menudo se distinguen por un grado de granulosidad característico o por un aspecto moteado (Fig. 4-185). La conversión a paleta se puede lograr a través de un proceso de entramado, donde la imagen resultante de 8 bits simula el rango de colores de la imagen de color real.

Otro método utiliza la técnica del **corte medio** propuesta por Heckbert, que es un algoritmo para ordenar los datos de un número arbitrario de dimensiones en una serie de conjuntos, cortando cada conjunto de datos en el punto medio. En este caso, se buscan los valores medios más frecuentes y son los que quedan registrados en la imagen final. Mediante este algoritmo se puede seleccionar la cantidad de tonalidades que participan en la transformación, con un máximo de 256 y un mínimo de 2.

La figura 4-186, muestra un detalle del efecto producido por la aplicación de los diferentes algoritmos de transformación de una imagen RGB a paleta. De todas maneras, el efecto producido por la transformación a color paleta, sea cual fuere el método utilizado, no genera mayores diferencias en ciertas imágenes que representan objetos reales (Fig. 4-187). No obstante, cabe recordar que este tipo de imágenes no son aptas para las aplicaciones morfométricas, debido a la variación en el valor de intensidad que producen en los píxeles.

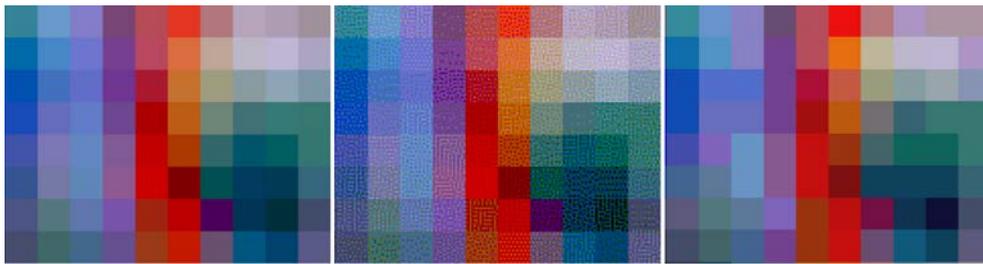


Fig. 4-186. Detalles de las imágenes de la figura 4-185. Izquierda: imagen RGB; centro: imagen paleta por entramado; derecha: imagen paleta por corte medio con 256 tonalidades.

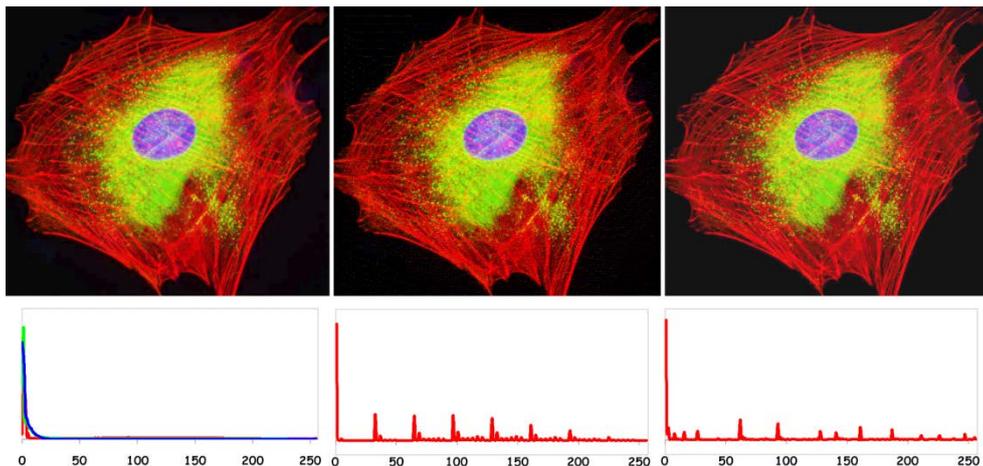
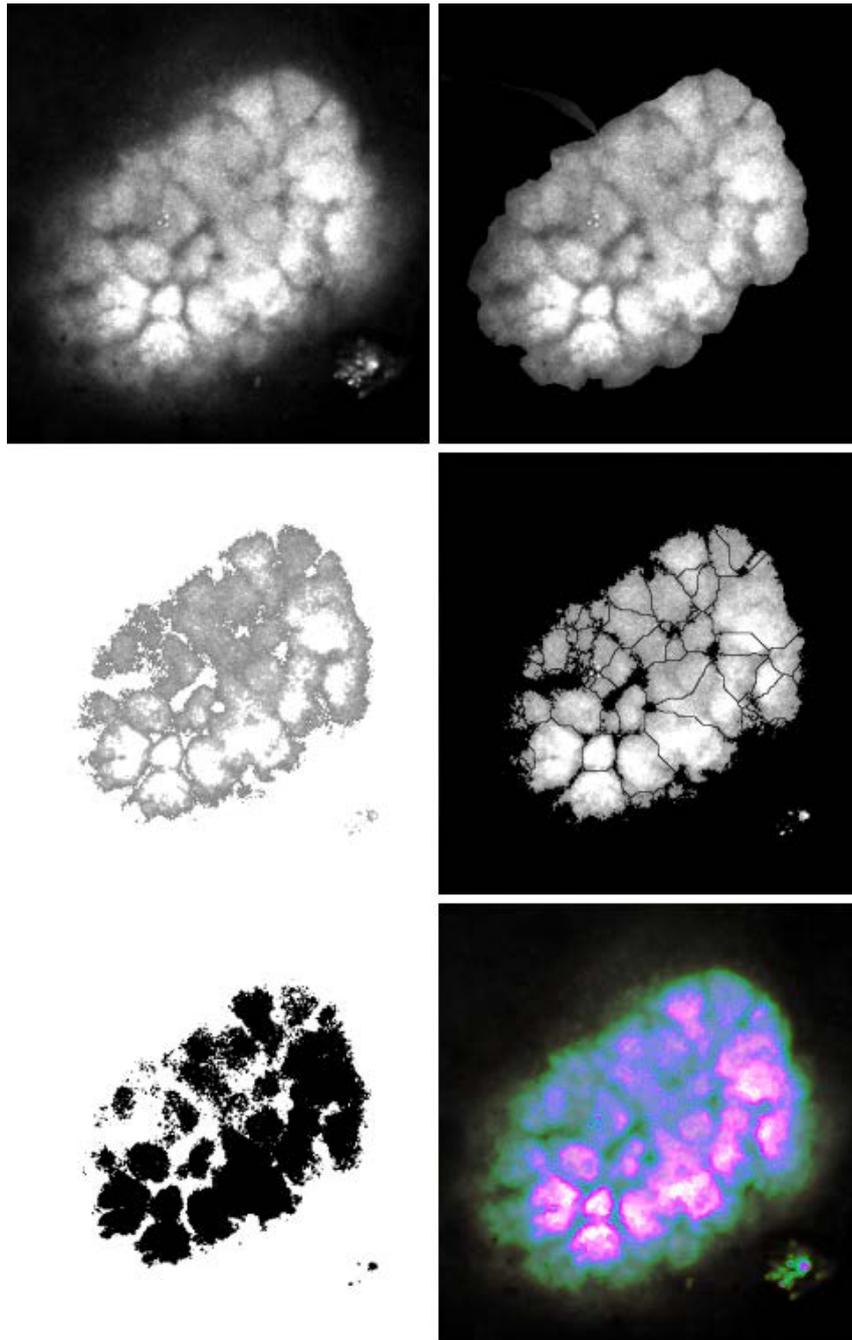


Fig. 4-187. Efecto de la transformación a color paleta en una imagen real. Izquierda: imagen RGB; centro: imagen paleta por entramado; derecha: imagen paleta por corte medio con 256 tonalidades. En la fila inferior se observan los correspondientes histogramas.

# Capítulo 5

## Segmentación de las Imágenes



La segmentación de la imagen original se puede lograr por métodos manuales; por selección de umbral mínimo y máximo, por filtración (Watershed), por umbralización (Shanbag) y por textura, entre otros.

## Generalidades

Luego del posible procesamiento de las imágenes, pero antes de su cuantificación, es necesario separar los objetos que se quieren contar o medir, de aquellos que constituyen el fondo. Esta separación puede ser real, al modificar temporalmente las características de la imagen observada en pantalla o virtual, al separar los objetos por medio de diferentes técnicas que dejen expresado exclusivamente lo que se quiere medir o cuantificar, sin modificar el resto de la imagen.

La segmentación puede ser utilizada para reconocer objetos a través de su superficie o de sus bordes, para la compresión de las imágenes, para su edición, etc. Puede ser implementada sobre imágenes 2D o multidimensionales y sean estas monocromáticas o color. Mediante la segmentación se puede simplificar o cambiar la expresión de la imagen, para trabajar sólo con lo representativo de la misma y facilitar así su análisis.

De acuerdo a la escuela Gestáltica, el ser humano tiende a agrupar objetos o remarcarlos en base a diferentes criterios. En su principio de organización, los objetos o eventos que están cercanos entre ellos, en espacio o tiempo, se perciben como unidades.

¿Cómo se podría describir la figura 5-1? ¿Acaso el primer pensamiento sería que se trata de la sabana africana?, ¿Alguien repararía en la cantidad total de animales?; probablemente no. ¿Se diría que hay dos especies distintas, los ñus y las cebras? ¿Se reconocerían únicamente las cebras en medio de “otros animales”, sólo por tener un patrón más distintivo? ¿Se racionalizaría que no existen dos cebras con los mismos patrones de rayas o simplemente se diría que son “idénticas”?



Fig. 5-1. Manada de ñus y cebras.

El ser humano tiende a agrupar elementos: si se quisiera que dos o más objetos fueran considerados como grupo, a pesar de tener características totalmente distintas (figuras y textos, objetos y colores, etc.), sólo bastaría con ubicarlos espacialmente cerca. De acuerdo con la teoría Gestáltica, cuando existe un determinado número de estímulos en el campo visual, no se ven aspectos individuales iguales al número de sus estímulos, sino que se ven figuras como un todo, cuya configuración es más simple y regular. A partir de estos conceptos se establecieron diferentes criterios, por medio de la representación de figuras geométricas sencillas (Fig. 5-2). Si las demás condiciones se mantienen constantes, existe la tendencia de agrupar los elementos cuyo intervalo sea más pequeño (factor de proximidad); los elementos similares (factor de similitud); los patrones cerrados (factor de cierre); los elementos que tengan continuidad (factor de continuidad) y los patrones sencillos y regulares (factor Gestáltico).

Estos mismos procesos se producen cuando al observar al microscopio, se genera una idea errónea de la cantidad de células o sus características estructurales y su relación con el entorno. Por esta razón, se debe segmentar de acuerdo a las características propias de lo que se quiere cuantificar o medir, para evitar las selecciones subjetivas.

Los programas de análisis no trabajan según los patrones del cerebro humano. Por otro lado, construir patrones de identificación que sigan la forma en que los seres humanos tienden a agrupar, tampoco es tarea sencilla. Actualmente, los diferentes algoritmos de segmentación tratan de agrupar píxeles con características similares, ya sea en intensidad,

color, textura o forma. Existen varios métodos de segmentación, los que se irán describiendo en el presente capítulo.

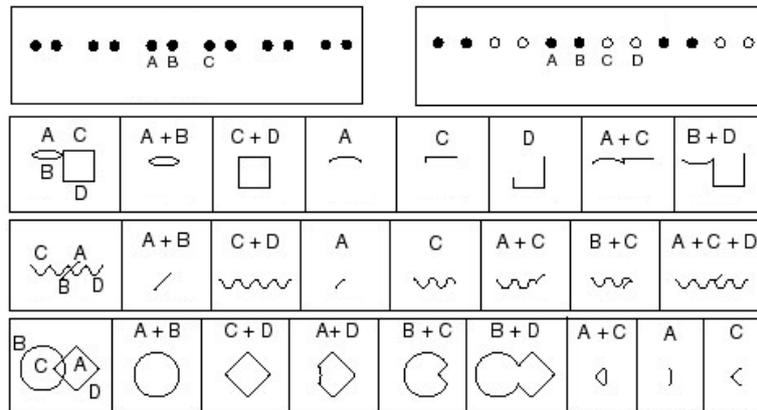


Fig. 5-2. Factores Gestálticos. Arriba izquierda: factor de proximidad, donde existe una mayor tendencia a agrupar A con B, que B con C. Arriba derecha: factor de similitud, donde se tiende a agrupar A con B y C con D. Segunda línea: factor de cierre; tercera línea: factor de continuidad; línea inferior: factor Gestáltico. En las tres últimas filas, el cuadro de la izquierda es el estímulo y hacia la derecha, la tendencia al menor reconocimiento de la forma.

### Segmentación por delimitación manual

Este procedimiento es tal vez el más sencillo pero a la vez, el menos preciso de todos los métodos de segmentación. Se basa simplemente en la delimitación manual de lo que el usuario considere como objeto, mediante el uso de herramientas tales como las AOI o ROI (área o región de interés), con formas circulares, rectangulares o no estructuradas. Este tipo de segmentación es de ejecución rápida y sirve para realizar una delimitación inicial cuando el análisis posterior no es muy exigente. La figura 5-3 muestra un ejemplo de este tipo de proceso.

Las herramientas AOI o ROI también permiten hacer una segmentación temporal. Esto significa que se pueden realizar todo tipo de modificaciones o cuantificaciones sobre el sector circunscripto, sin la necesidad de segmentar el resto de la imagen (delimitación incluyente). En la figura 5-4 se muestran distintas operaciones realizadas sobre una ROI.

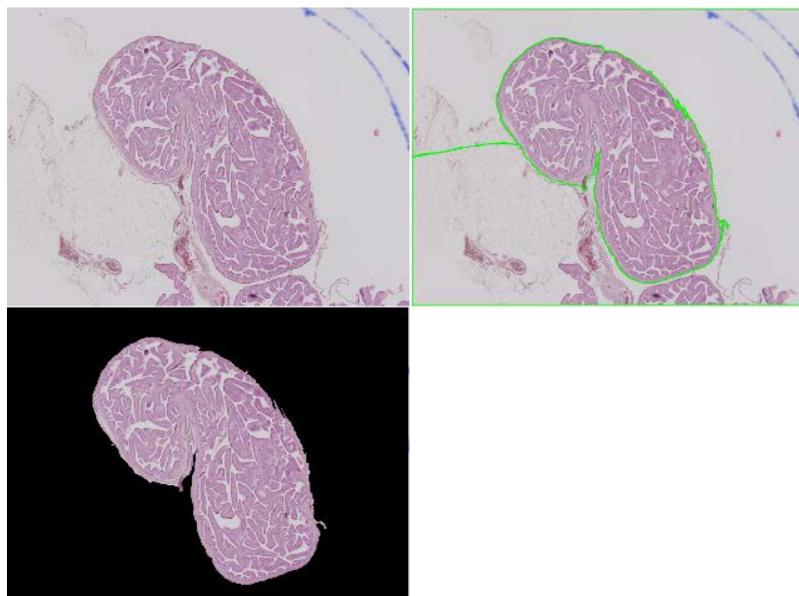
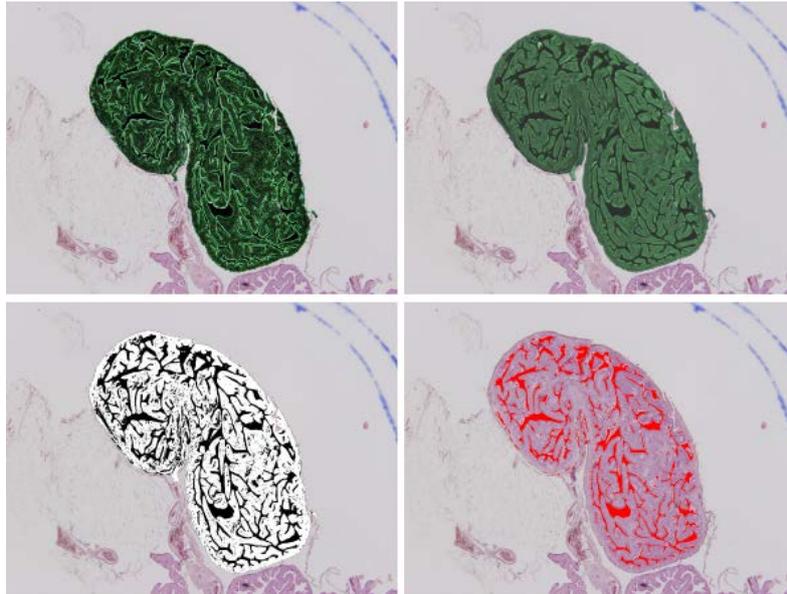


Fig. 5-3. La imagen original (arriba izquierda) fue delimitada (delimitación excluyente) mediante la herramienta de forma libre del ROI (arriba derecha). Todo lo que queda circunscripto por la delimitación (fondo) puede ser rellenado con cualquier tonalidad (abajo).

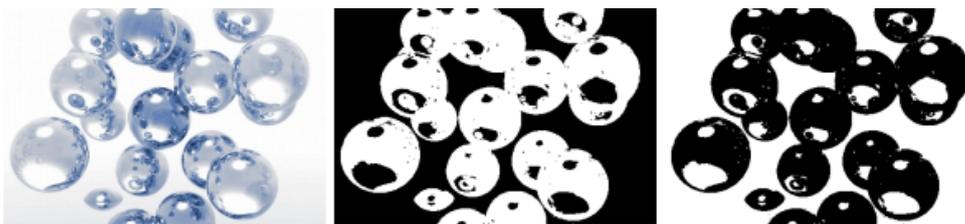


**Fig. 5-4.** El objeto (ampolla del oviducto de la vizcacha) fue delimitado manualmente (delimitación incluyente) mediante un ROI no estructurado y posteriormente se aplicó el filtro Sobel (arriba izquierda); el operador matemático lógico NOT (arriba derecha); el proceso de umbralización (abajo izquierda) y la selección de áreas no tisulares (abajo derecha). El resto de la imagen (fondo) quedó inalterado.

### ***Segmentación por umbralización***

A lo largo de este libro se discutieron los términos “objetos de interés” (o simplemente, objetos) y “fondo” para distinguir lo que se quiere cuantificar o medir de lo que resulta innecesario dentro de la imagen. El proceso de umbralización consiste en separar los objetos del fondo, transformando la imagen monocromática o color en una imagen binaria, es decir, en “blanco y negro” (aunque la mayoría de los programas las almacene y trate como monocromáticas). Este proceso puede ser aplicado tanto a imágenes 2D como multidimensionales.

No existe una convención acerca si el objeto debe ser negro o blanco y el fondo lo opuesto. Todo depende de cuál sea la conveniencia del usuario. A los efectos de la medición o cuantificación, no existe diferencia entre ambos (Fig. 5-5).



**Fig. 5-5.** La umbralización se puede realizar sobre imágenes monocromáticas o color. Los objetos umbralizados pueden ser blancos o negros, no existiendo diferencias para su cuantificación.

La umbralización puede ser utilizada para diferentes propósitos, tales como el análisis de documentos para el reconocimiento de caracteres (del inglés, “*Optical Character Recognition*” - OCR) y el mapa de procesamiento de hojas de música donde deben encontrarse líneas, leyendas y notaciones musicales. También puede ser utilizado para encontrar un objeto dentro de una muestra o partes defectuosas en un material. Dentro de las ciencias biológicas y morfológicas, la umbralización permite separar e identificar unidades celulares y analizar imágenes de tomografía computarizada, térmicas, endoscópicas, confocales, etc. En el Capítulo 4 se describió el uso de las imágenes umbralizadas para la detección de bordes mediante los filtros Watershed, Thinning, Pruning, Open, Close, etc.

La forma de segmentar por umbralización es muy variada. La mayoría de los métodos se basa en el uso de histogramas. Sin embargo, existen otros métodos entre los que se encuentran la separación de clusters, entropía, atributos del objeto, umbralización espacial y la adaptación local. Estos métodos serán descriptos más adelante.

Durante el proceso de umbralización, los píxeles cuyo valor supere aquel considerado como umbral, son seleccionados como objeto (o como fondo). También se puede considerar como objeto a todos aquellos píxeles que se encuentren comprendidos entre dos valores extremos. Los valores restantes son considerados como fondo o viceversa.

En la figura 5-5, se consideró como objeto a todo píxel cuyo valor estuviera incluido en el rango entre 0 y 226 para el canal rojo, 0 y 255 para canal verde y 0 y 255 para el canal azul. El fondo estuvo ocupado por todos los píxeles cuyo canal rojo estuviese comprendido entre los valores 227 y 255. Cabe mencionar que si bien las imágenes color pueden ser umbralizadas, primero deben ser separadas en cada uno de sus canales monocromáticos y finalmente combinarlos. Lo ideal es utilizar sistemas de color HSI, que es la forma en que los seres humanos distinguen mejor los colores.

Para segmentar las burbujas de la figura 5-5 se utilizó el histograma, en búsqueda de la expresión de los picos correspondientes a las concentraciones de píxeles con determinadas características. Finalmente se procedió a establecer el valor umbral de manera manual, es decir, se determinó visualmente la mejor opción para separar los objetos. Esta forma de segmentación no es muy apropiada, no sólo por el tiempo que se emplea sino, además, porque se basa exclusivamente en una determinación subjetiva, donde el usuario establece “lo que está bien y lo que está mal”. Un proceso de este tipo raramente pueda ser reproducido por otro usuario y por lo tanto, los resultados pueden no ser comparables. Además, esto genera muchos errores posteriores al cuantificar y medir.

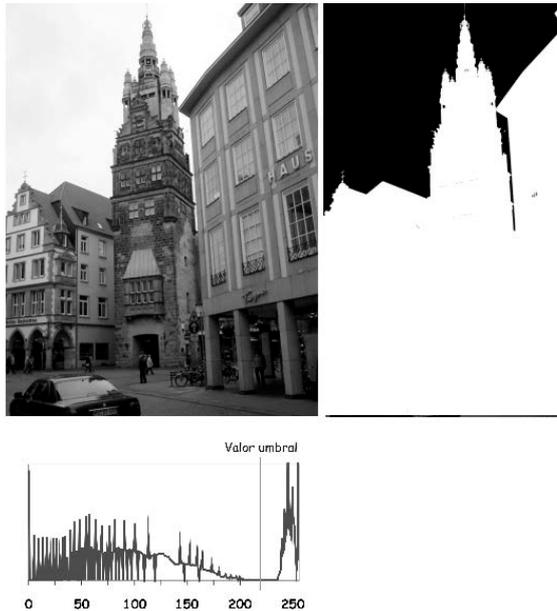
Lo más apropiado es recurrir a los procesos de umbralización automáticos. Estos se basan en diferentes algoritmos que seleccionan cuales son los puntos de inflexión entre el objeto y el fondo. La mayoría de estos algoritmos utilizan el histograma para sus cálculos, aunque algunos hacen uso de la información local de los píxeles, es decir, se basan en los valores de los píxeles de acuerdo a su localización (y la de sus vecinos) dentro de la imagen. Todos los métodos automatizados indagan en la naturaleza de la imagen, por lo tanto, para elegir alguno de estos métodos es necesario conocer datos tales como la forma en que fueron adquiridas (iluminación, cámara), cantidad de objetos, tipos de objetos, etc.

El método de las **concavidades de Rosenfeld**, está basado en el análisis del histograma, en donde la concavidad más profunda se transforma en la candidata del valor umbral. Si existiera competencia entre las mismas, se seleccionaría aquella que permitiera distinguir los bordes de los objetos. Otro método utilizado selecciona un porcentaje fijo de los píxeles más brillantes y los más oscuros para producir la imagen “binaria”. El procedimiento comienza en un extremo del histograma y suma sus intervalos hasta alcanzar la fracción de área deseada. El valor umbral corresponde, entonces, al nivel de brillo alcanzado en el último intervalo del histograma. Este procedimiento funciona bien en aplicaciones tales como la localización de orificios en los objetos, ya que la posición de los mismos puede variar, pero su superficie total se mantiene constante.

Otra forma de segmentar por umbralización está basada en el **análisis de clusters** (grupos de píxeles). Mediante estos algoritmos los diferentes niveles de grises son divididos en dos grupos. Cada uno de estos clusters se corresponde con los dos picos bien delimitados del histograma; uno de ellos corresponde a los objetos y el otro, al fondo. El método más sencillo de umbralización basada en clusters consiste en localizar los picos dentro del histograma y establecer el valor umbral a la mitad de camino entre ellos. Esta forma de proceder es consistente, ya que los picos generalmente representan formas bien definidas y posiciones fácilmente reconocibles. No obstante, este método no es muy preciso para definir las estructuras presentes (Fig. 5-6).

El método **iterativo de Ridler** se basa en el modelo de mezcla de dos clases Gaussianas. En la iteración  $n$ , se establece un nuevo valor umbral  $T_n$  promediando las medias de clase del objeto y del fondo. La iteración finaliza cuando el valor absoluto  $|T_n - T_{n+1}|$  se hace suficientemente pequeño. Por su parte, el **método de Otsu** sugiere reducir al mínimo la suma ponderada de las variaciones dentro de la clase del objeto y los píxeles del fondo, para establecer un umbral óptimo. Cabe mencionar que la minimización de las diferencias

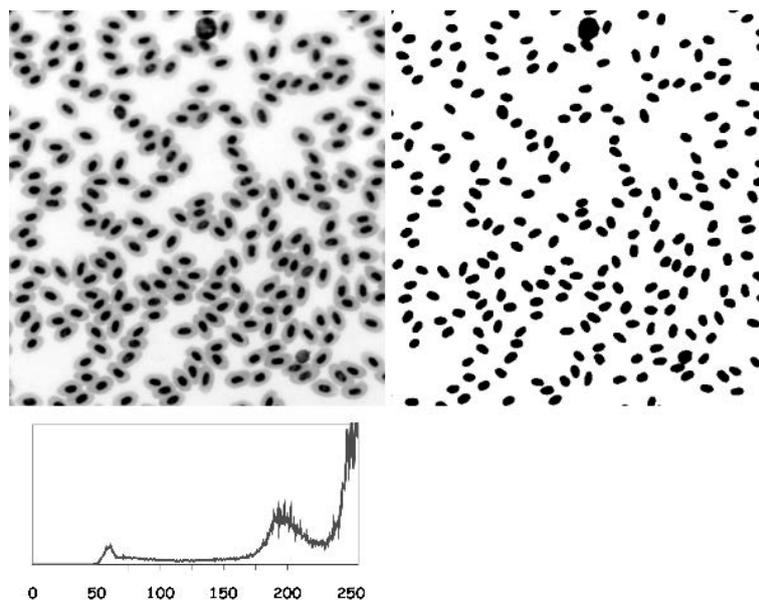
de clase equivale a la maximización de la dispersión entre las mismas. Este método da resultados satisfactorios cuando el número de píxeles en cada clase se acercan uno al otro, es decir, que sus varianzas son similares (Fig. 5-7).



**Fig. 5-6.** La umbralización a través del histograma genera una separación entre objetos oscuros y claros (arriba derecha). El valor umbral del histograma se encuentra entre ambos picos (indicado por la raya vertical).

Si bien es uno de los métodos más utilizados en la actualidad, no existe ninguna base para suponer que esto es correcto. El valor umbral final se obtiene por un proceso iterativo en el que se selecciona un nivel inicial, posteriormente se calculan las varianzas de las dos mitades, se ajusta el umbral y se continúa así sucesivamente, hasta lograr la convergencia. El algoritmo expandido sería de este tipo:

1. Obtener el histograma de la imagen
2. Dar un valor umbral para cada grupo. Establecer la sumatoria de valores y calcular su varianza
3. Corroborar para todos los valores umbral desde  $U=1$  hasta el valor máximo, actualizando los valores de sumatoria y recalculando la varianza
4. El valor umbral deseado corresponde a la mayor varianza para un umbral determinado



**Fig. 5-7.** Aplicación del método Otsu para la umbralización de los glóbulos rojos de ave (arriba derecha). El valor óptimo de umbral se estableció automáticamente en 160.

Este tipo de algoritmo se utiliza con mucha frecuencia para hacer el reconocimiento óptico de caracteres (OCR) y para mejorar la calidad de contraste entre el objeto (caracteres dibujados o escaneados) y el fondo (soporte de papel). Para este mismo propósito existe el método de **umbralización por diferencia de masas**, que consiste en encontrar el valor umbral óptimo relacionando el valor global máximo (pixel de mayor intensidad) y el promedio de masa (promedio de intensidades). Este método usa desvíos entre ambos valores relacionados. El valor umbral óptimo se obtiene mediante la siguiente ecuación:

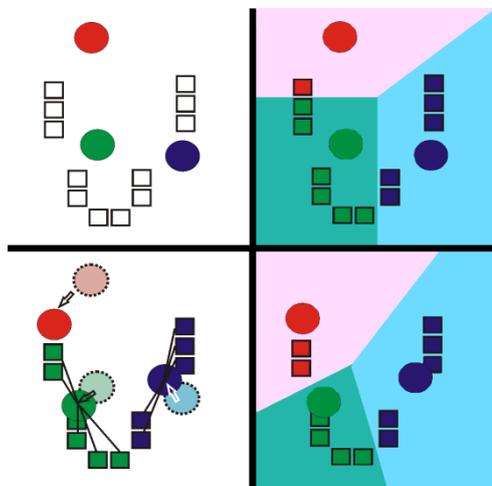
$$T = |M - (G_{max} - M)| \quad [5-1]$$

donde, la desviación total  $T$ , que representa el valor umbral óptimo, se obtiene del valor absoluto cuando se sustrae el valor de la masa ( $M$ ) de su desvío ( $G_{max}-M$ ), siendo  $G_{max}$  el máximo valor global. Si el valor global máximo fuera 246 y el valor promedio de masa fuera 226, el valor umbral óptimo sería de 206.

Otro método basado en clusters es el de los **mínimos errores de Kittler**, posteriormente modificado por Lloyd. Es un método iterativo que asume que la imagen puede ser caracterizada por una distribución entremezclada de objeto y fondo. Este algoritmo parte la imagen en clusters  $K$ . Su estructura es la siguiente:

1. Encontrar el centro del cluster  $K$  de manera aleatoria o basada en la heurística.
2. Asignar cada uno de los píxeles de la imagen al cluster que minimice la distancia entre aquel y el centro de éste, de acuerdo al diagrama de Voronoi.
3. Recalcular el centro del cluster luego de encontrar el promedio del valor de todos los píxeles dentro del mismo.
4. Repetir los pasos 2 a 3 hasta conseguir una convergencia (cuando no se observen cambios en la estructura del cluster por reacomodación de los píxeles).

La figura 5-8 representa los pasos del algoritmo en donde los distintos objetos de la imagen son asignados a diferentes clusters.



**Fig. 5-8.** Secuencia gráfica del algoritmo. Fila superior izquierda: hallazgo de los clusters (en este caso,  $K=3$ ), seleccionados al azar (identificados por los colores). Arriba derecha: los clusters  $K$  son creados al asociar cada observación con el promedio más cercano. Las divisiones de color del fondo representan el diagrama de Voronoi generado por los promedios. Abajo izquierda: el centroide de cada cluster  $K$  se convierte ahora en el nuevo promedio. Abajo derecha: se repiten los pasos 2 y 3 hasta que se logre la convergencia.

Finalmente, el algoritmo siempre converge, pero el resultado no siempre es el ideal. La calidad de la solución depende de los clusters iniciales y del valor  $K$  y puede resultar de menor calidad que el global óptimo. Dado que el algoritmo es extremadamente rápido, se puede ejecutar varias veces hasta encontrar la mejor distribución de clusters.

Los métodos de umbralización basados en la **entropía** hacen uso de la distribución entrópica de los píxeles en la imagen. La maximización de la entropía de la imagen umbralizada se interpreta como indicativo de la transferencia de la máxima información. Estos métodos no son paramétricos, es decir, que no se basan en la forma del histograma. En su lugar, usan la información de dos grupos de píxeles (por encima y por debajo del valor umbral).

La umbralización **entrópica de Kapur** (Fig. 5-9) considera que el objeto y el fondo de una imagen provienen de dos fuentes de señales distintas. Por lo tanto, se dice que la imagen está óptimamente umbralizada cuando la suma entrópica de las dos clases llega a su

máximo. Tomando como base la imagen original de la figura 5-7 se puede observar que el efecto de la umbralización por máxima entropía de Kapur es bastante similar al método Otsu. Sin embargo, estas diferencias existen y se pueden comprobar en imágenes que tengan menos detalles, como los observados en la figura 5-10.

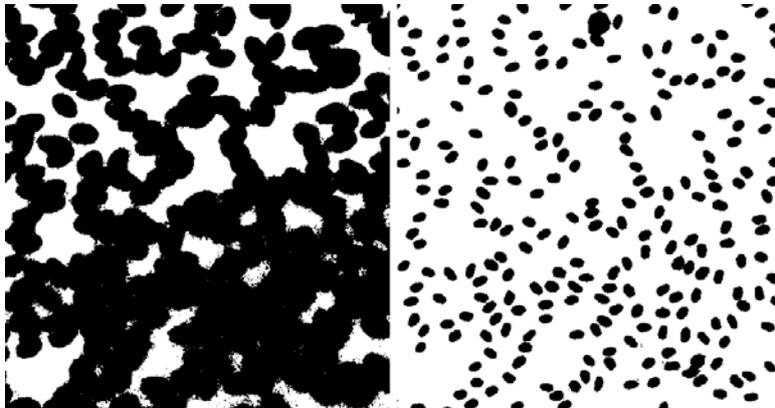


Fig. 5-9. Aplicación del método de umbralización del mínimo error de Kittler (izquierda) y la máxima entropía de Kapur (derecha) realizadas sobre la imagen original de la figura 5-7.

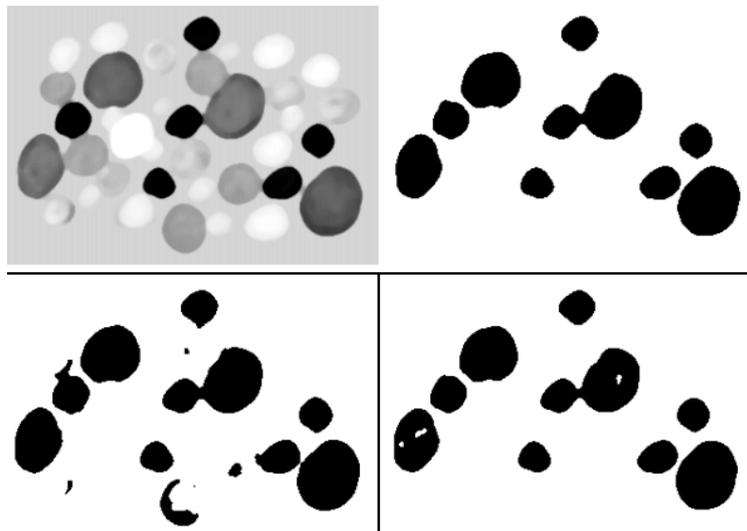


Fig. 5-10. Comparación entre el método de umbralización Otsu (arriba derecha), el de la máxima entropía de Kapur (abajo izquierda) y la entropía difusa de Shanbag (abajo derecha) a partir de la imagen original (arriba izquierda).

Una variante de este método es el de **entropía difusa de Shanbag** (Fig. 5-10). Este algoritmo considera a las memberships difusas como un indicativo de cuán arraigado al objeto o al fondo se encuentra un valor de intensidad. De hecho, cuanto más alejado esté un valor del presunto umbral, mayor será su potencial para pertenecer a una clase específica (objeto o fondo). Los métodos de entropía también pueden ser utilizados para identificar bandas en geles de poliacrilamida, como se observa en la figura 5-11.

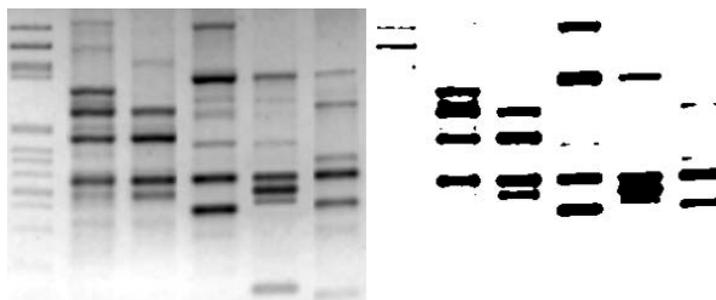


Fig. 5-11. Umbralización por máxima entropía de un gel de poliacrilamida.

Los métodos basados en los **atributos** seleccionan el valor umbral de acuerdo la calidad del objeto o de la similitud entre la imagen original y la imagen binarizada. Estos atributos pueden tomar la forma de coincidencia en los bordes, compacticidad de las formas, momentos de niveles de gris, conectividad, textura o estabilidad de los objetos segmentados.

La umbralización por **preservación de los momentos de Tsai**, considera a la imagen monocromática como la versión borrosa de una imagen binaria ideal. El umbral se establece de modo que los primeros tres momentos de niveles de gris coincidan con los mismos momentos de la imagen binaria (Fig. 5-12).

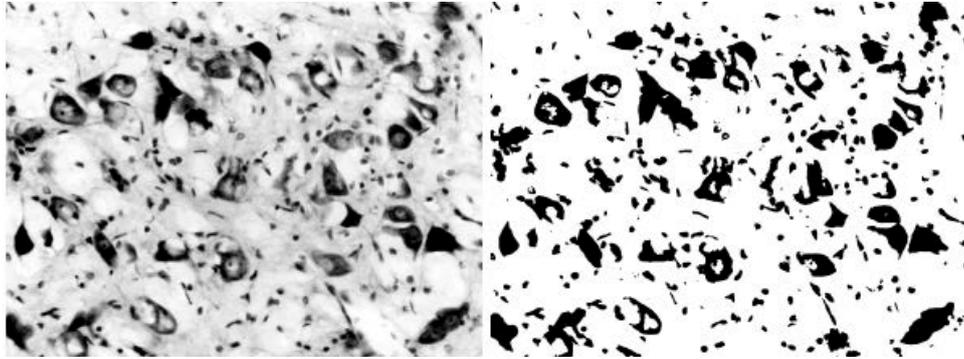


Fig. 5-12. Efecto de la umbralización por preservación de los momentos de Tsai.

El método de umbralización por **bordes coincidentes de Hertz** es una técnica de binarización múltiple donde un borde delgado, obtenido a partir de una imagen monocromática, se compara con aquel derivado de la imagen binaria. El umbral global se obtiene por el valor que maximiza la coincidencia de los dos bordes, basado en la cuenta de aquellos coincidentes y penalizando los sobrantes, en cualquiera de ambas imágenes (Fig. 5-13).

La umbralización por **similitud difusa de Huang** propone obtener un índice de difusión midiendo la distancia entre los valores de intensidad de la imagen monocromática original y su versión binaria. El umbral óptimo se obtiene minimizando el índice de difusión, definido por las medias o medianas de cada clase (objeto o fondo) (Fig. 5-14). Por su parte, el método de umbralización **espacial** no sólo utiliza la distribución de valor de intensidad de los píxeles, sino también la dependencia de éstos en una zona, por ejemplo, en forma de probabilidades contextuales, funciones de correlación, probabilidades de concurrencias, modelos de píxeles con dependencia lineal local, entropía, etc.

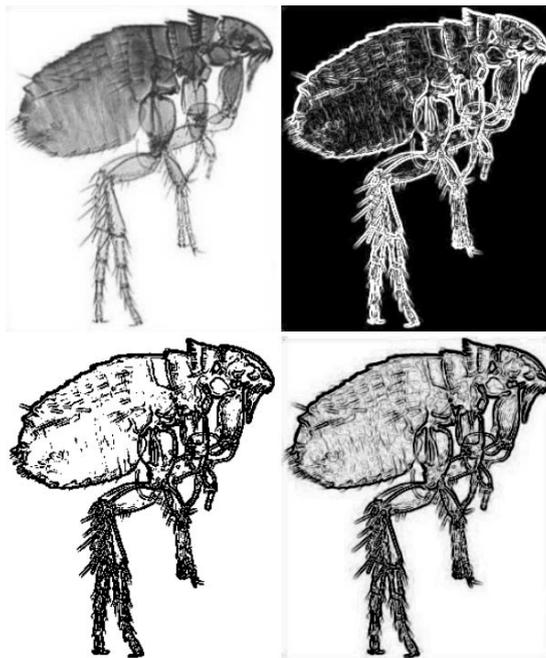


Fig. 5-13. La umbralización por coincidencia de bordes (abajo izquierda) se obtiene luego de aplicar el filtro Sobel (arriba derecha) sobre la imagen monocromática original (arriba izquierda). La última imagen (abajo derecha) representa la inversión (operador NOT) de la imagen filtrada. En la misma, se observan las diferencias con la imagen previa umbralizada.

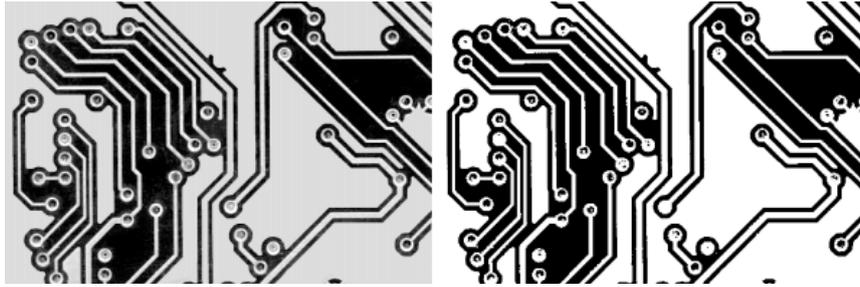


Fig. 5-14. Umbralización del circuito integrado mediante el uso del método de similitud difusa de Huang (derecha).

En los métodos de umbralización por **adaptación local** se calcula el valor umbral en cada píxel. Este depende de algunas variables estadísticas locales como el rango, la varianza, o los parámetros de ajuste de superficie de los píxeles vecinos. El valor del umbral  $T(x,y)$  queda indicado como una función de las coordenadas  $(X,Y)$  de cada píxel. Este tipo de algoritmos se aplica en la determinación de la varianza local, en donde el valor umbral se ajusta de acuerdo al valor promedio local en  $X,Y$  y al valor de su varianza. También se aplican para la determinación del contraste local, en donde se compara el valor de intensidad de cada píxel con el promedio de intensidad de sus vecinos. Si el píxel es significativamente más oscuro que el promedio, se lo considera como objeto, de otra manera, se lo considera como fondo. Este tipo de métodos se usa particularmente para el reconocimiento de caracteres.

En muchas situaciones, los objetos de interés no tienen un valor de intensidad o de uniformidad en el color, ni siquiera un rango común de esos valores. En estos casos, lo importante es que el fondo sea uniforme en color o intensidad de luz para que se realice la umbralización sin mayores inconvenientes. En la figura 5-15 se compara el efecto de los distintos algoritmos previamente descritos sobre una misma matriz formada por sectores con diferentes valores de intensidad.

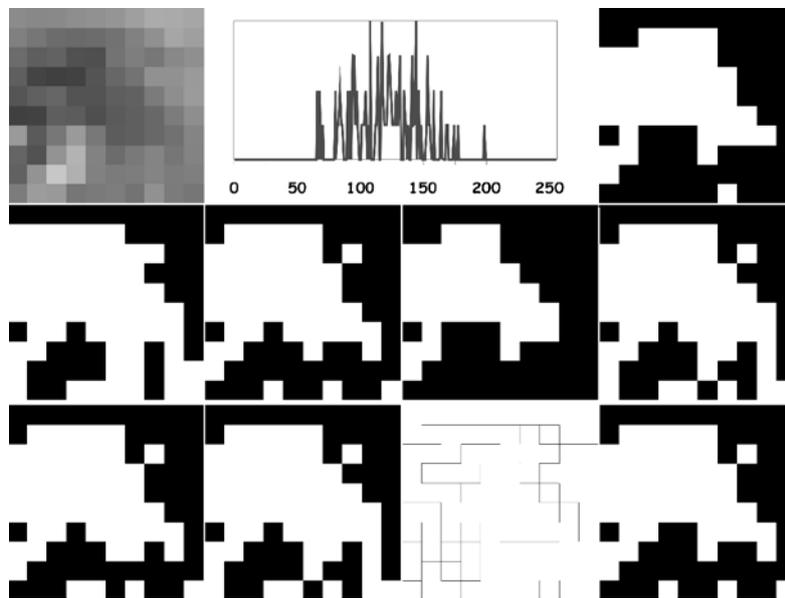


Fig. 5-15. Comparación entre algunos métodos de umbralización. En la fila superior se observa una matriz de diferentes intensidades (izquierda) y a su derecha, el histograma correspondiente. En el extremo derecho se observa la umbralización por el método de las concavidades de Rosenfeld (umbral  $T=116$ ). En la segunda fila y de izquierda a derecha, se observa el método basado en clusters del histograma ( $T=119$ ), el iterativo de Otsu ( $T=119$ ), el de los errores mínimos de Kittler ( $T=109$ ) y la umbralización de máxima entropía de Kapur ( $T=123$ ). En la fila inferior se observa el efecto del método entrópico difuso de Shanbag ( $T=121$ ), la umbralización por preservación de momentos de Tsai ( $T=123$ ), la umbralización por bordes coincidentes de Hertz luego de la aplicación del filtro Sobel sobre la imagen original ( $T=59$ ) y la umbralización por similitud difusa de Huang ( $T=118$ ).

Si bien se recomienda el uso de la umbralización automática por sobre la selección manual, ya que selecciona de manera más apropiada cuales son los objetos presente en la imagen, esta técnica no está exenta de dificultades. Una de ellas se produce cuando el objeto ocupa un lugar muy pequeño o muy grande dentro de la totalidad de la imagen, o cuando los niveles de gris del mismo y del fondo se solapan, incluso, dando por resultado una distribución unimodal. Por otra parte, el histograma puede ser “ruidoso” si su estimación se basa solamente en una pequeña muestra, o puede tener una estructura en forma de peine, debido a los intentos de estiramiento y/o ecualización. En consecuencia, se puede obtener una mala clasificación de los píxeles y la resultante es una deformación de los objetos, que finalmente afecta de manera negativa al proceso de segmentación y posterior análisis. Por lo tanto, al momento de seleccionar alguno de los métodos de umbralización previamente descritos es necesario tomar en consideración tanto el ruido del mapa de segmentación como la deformación de los objetos a segmentar.

### ***Segmentación por color***

El uso de las imágenes color brinda ciertas ventajas sobre las imágenes monocromáticas, ya que los objetos se pueden identificar más fácilmente por las distintas tonalidades que estos adoptan. De esta forma, la segmentación se puede hacer de manera manual, pero con los mismos riesgos que los comentados para el proceso de umbralización. Si bien la racionalización del usuario permite una identificación más rápida de los objetos de interés, ya que se basa en su propia formación intelectual, se debe recordar que no todas las estructuras conocidas se van a expresar de la misma manera en todas las imágenes. Un exceso de colorante o un déficit del mismo pueden producir un rango de intensidades tal, que los objetos pueden llegar a pasar desapercibidos cuando son considerados en diferentes entornos.

Lo ideal es tratar que el proceso de segmentación busque un valor umbral de separación de manera automatizada. Esto no implica riesgos menores. Uno de ellos es el solapado de colores. Si cada píxel está formado por los canales rojo, verde y azul, puede ser que el rango de uno de estos canales en el objeto de interés sea compartido con el de las estructuras del fondo. Una forma de solucionar este inconveniente consiste en separar cada uno de los canales de color del RGB o mejor aún del HSI (tonalidad, saturación e intensidad), en sus componentes monocromáticos y tratarlos como en el proceso de umbralización.

El uso de histogramas para la segmentación de objetos puede también ser útil sólo si la expresión de color del objeto a segmentar está bien definida. De otra forma, en la gráfica de cada uno de los colores del RGB es difícil reconocer que pico corresponde a cual estructura. Aún si los colores del RGB son convertidos al sistema HSI y se construyen histogramas para este sistema, el uso de tres gráficas separadas y con niveles de umbral distintos no ayuda demasiado para dilucidar la combinatoria de valores presentes o para establecer cuáles son los píxeles que presentan dichas combinaciones.

Mucho más difícil aún es la selección de colores en imágenes 3D, ya que actualmente no existe un sistema que permita encuadrar de manera interactiva una zona arbitraria y ver que vóxeles fueron seleccionados, como tampoco se puede procesar esa región y ver su efecto en la imagen. En estos casos es preferible separar cada una de las imágenes de la pila y tratarlas como bidimensionales.

En la figura 5-16 se observa la segmentación sobre objetos que tienen un color bien definido y que a su vez, es distinto en rango entre ellos. Por otro lado, se presentan sobre un fondo con intensidad uniforme y su tonalidad es totalmente distinta a la de los objetos. En este caso la segmentación es muy sencilla.

No siempre es posible encontrar un valor umbral para segmentar objetos de color. La situación puede complicarse cuando, si bien los objetos son claramente separables y cada uno de ellos tiene tonalidades racionalmente reconocibles, el rango de alguno de los colores coincide con el de otro objeto. En la figura 5-17 se muestra un claro ejemplo. Allí se pueden ver dulces con tonalidades amarilla, verde clara, anaranjada, violeta y rosada. Cuando se selecciona el color violeta, algunos píxeles rosados también se seleccionan; cuando se elijen las tonalidades verdes, se observa coexistencia de rangos en las amarillas y anaranjadas.

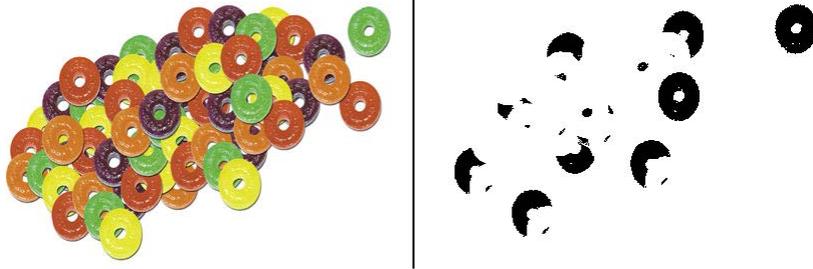


Fig. 5-16. Segmentación por color. Se seleccionó el color verde para generar un umbral.

Si la imagen original de la figura 5-17 se transformara al sistema HSI y se separaran los canales, se podría ver el histograma de cada uno de los colores de dulces y sus puntos de entrecruzamiento, responsables del solapamiento entre las muestras (Fig. 5-18).

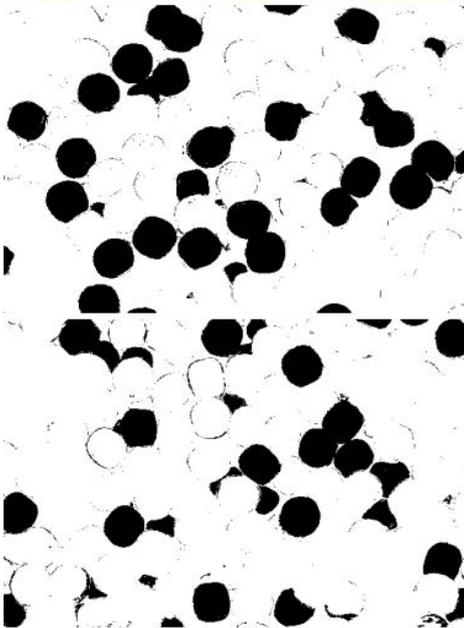


Fig. 5-17. En una imagen, donde racionalmente es sencillo distinguir las tonalidades, no es tan fácil implementar la segmentación. En la imagen central se identificaron los dulces de color violeta y en la inferior los verdes. En ambos casos se observa "contaminación" con otros objetos.

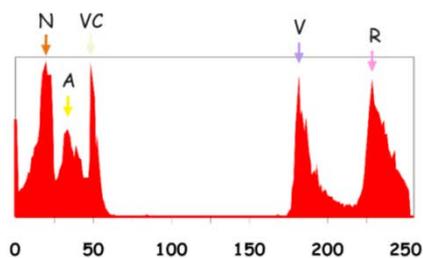
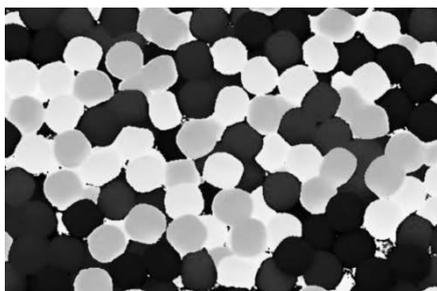
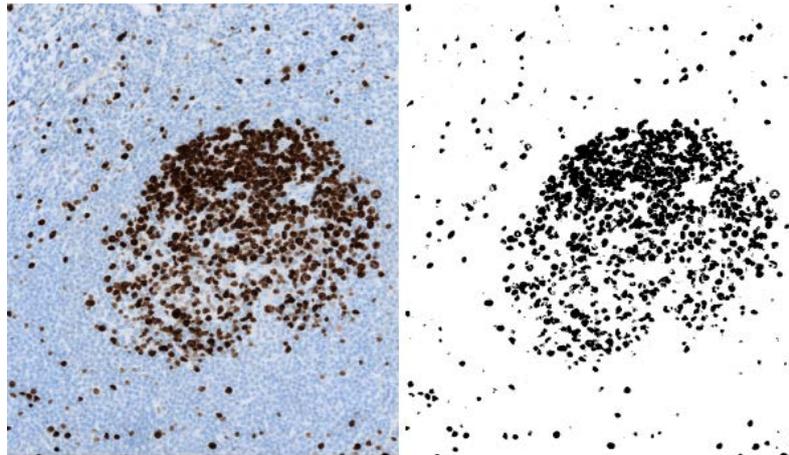


Fig. 5-18. Canal de tonalidad (H) de la imagen original de la figura 5-17 convertida al sistema HSI. Su histograma muestra la ubicación de cada una de las tonalidades (N=naranja; A=amarilla; VC=verde clara; V=violeta; R=rosada).

Llevado a ejemplos de laboratorio, las tinciones inmunohistoquímicas pueden resultar un buen modelo de segmentación por color. En estos casos, los objetos identificados como positivos tienen una tonalidad marrón, producto de la reacción de la diaminobencidina con el agua oxigenada. En muchas ocasiones se utiliza un colorante genérico, como la hematoxilina, para establecer un contraste con los elementos no seleccionados en la reacción. La hematoxilina tiñe de color azul a todos los núcleos de las células presentes. En la escala cromática, el marrón está más cerca de los rojos que de los azules. De esta manera, se puede generar un contraste aceptable para la identificación del objeto de interés y del fondo. En estos casos, la tinción con algún colorante verde también sería efectiva, no así el uso de eosina, que genera una tinción rojiza. En la figura 5-19 se muestra un ejemplo de tinción inmunohistoquímica, donde el color del objeto resulta fácilmente distinguible, tanto para la vista humana como para el histograma.



**Fig. 5-19.** La segmentación por color en una reacción inmunohistoquímica resulta sencilla si existe un buen contraste entre la reacción positiva del objeto (tinción marrón) y la coloración de fondo (tinción azul). A la derecha se observa la umbralización de los objetos marrones lograda por medio del histograma.

Sin embargo, si la búsqueda del umbral se deja librada exclusivamente al proceso automático, puede ser que muchas estructuras que resultan positivas al criterio del investigador no sean identificadas, como se observa en la figura 5-20. En estos casos, será necesario ubicar el umbral de segmentación de manera manual, con el riesgo que otras estructuras también puedan ser detectadas.

Una forma más laboriosa de resolver este procedimiento, pero a su vez más efectiva, se logra al trabajar sobre las imágenes monocromáticas. Si se separan los canales rojo, verde y azul de la imagen original de la figura 5-19, se obtienen las imágenes de la figura 5-21. De acuerdo a sus histogramas, la disposición de las intensidades en los tres canales es muy similar. Más aún, si se hace una proyección del entrecruzamiento rojo-verde, verde-azul y azul-rojo se observa que la mayoría de píxeles muestran una tendencia a agruparse sobre un eje diagonal (Fig. 5-22). Esto significa que, para la mayoría de los píxeles, la tendencia hacia cualquiera de los otros colores forma parte de un aumento general de brillo, al aumentar los valores de todos los canales. En otras palabras, el sistema RGB dispersa de manera deficiente los valores de los diferentes colores y no permite establecer un umbral adecuado que logre diferenciar las diferentes regiones presentes.

La figura 5-23 muestra la separación de canales de la misma imagen original de la figura 5-19, pero en el sistema HSI. Se puede observar que los histogramas de estas imágenes son completamente diferentes entre sí. Más aún, cuando se aparean los canales H-S, S-I e H-I, la mayor dispersión de picos en los diferentes histogramas genera varias agrupaciones de diferentes valores (Fig. 5-24).

Por lo general, en las tinciones biológicas, la imagen de tonalidades del HSI (H), identifica el lugar en donde se ubica un color particular, mientras que la imagen de saturación (S) se corresponde con la cantidad de colorante y la imagen de intensidad (I) indica la densidad global de objeto teñido.

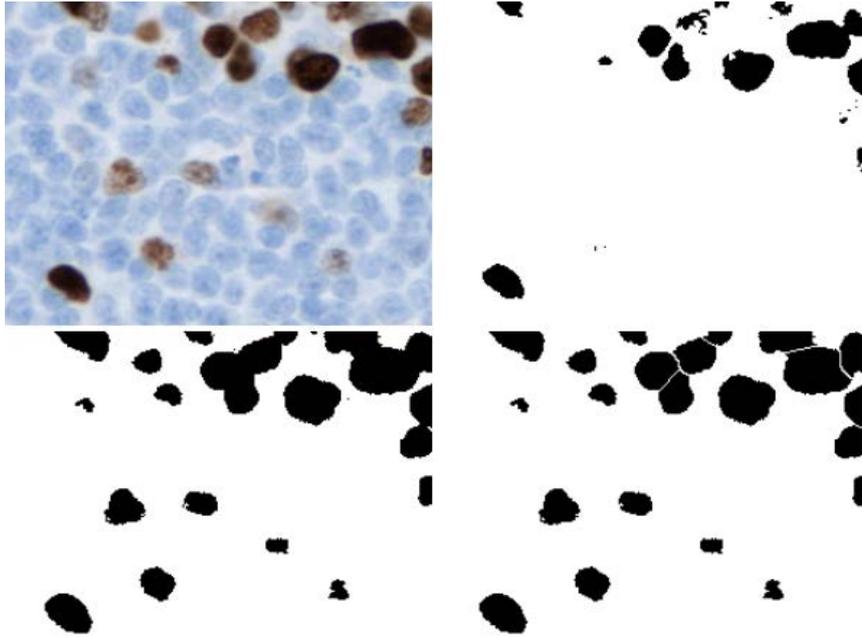


Fig. 5-20. Arriba izquierda: un detalle de la imagen original de la figura 5-19 muestra células con diferente intensidad de tinción. A la derecha, la segmentación automática por color y posterior umbralización muestra que las células menos teñidas no fueron seleccionadas. Abajo izquierda: efecto producido sobre la imagen original luego de la corrección manual del umbral para incluir todas las células consideradas como positivas. A su derecha, la misma imagen luego de la segmentación por medio del filtro Watershed.

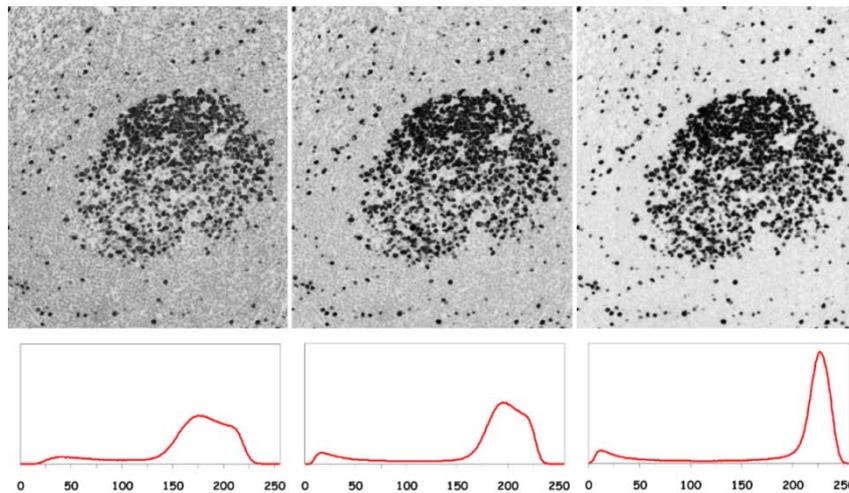


Fig. 5-21. Separación de los canales RGB de la imagen original de la figura 5-19 y sus correspondientes histogramas.

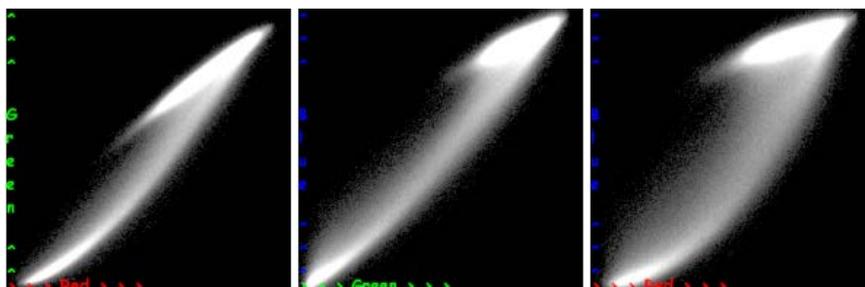


Fig. 5-22. Combinación del histograma de a pares de colores del RGB. Izquierda: rojo-verde; centro: verde-azul; derecha: rojo-azul.

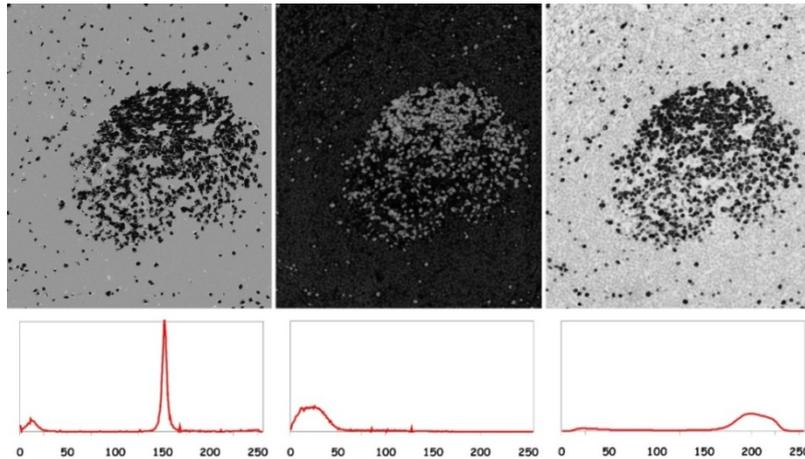


Fig. 5-23. Separación de los canales HSI de la imagen original de la figura 5-19 y sus correspondientes histogramas.

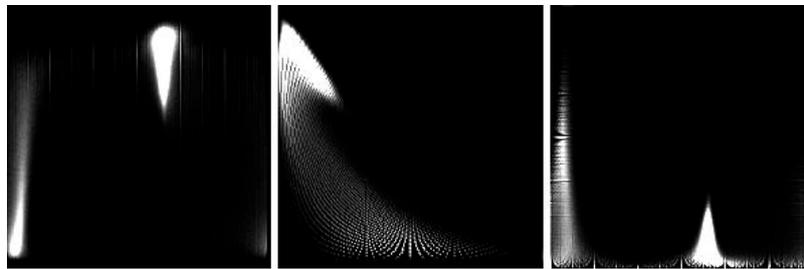


Fig. 5-24. Combinación del histograma de a pares de canales de HSI. Izquierda: H-S; centro: S-I; derecha: H-I.

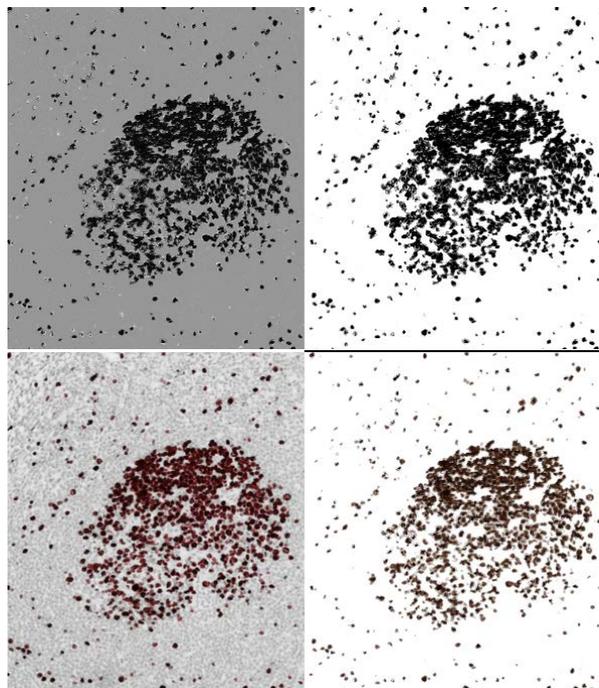
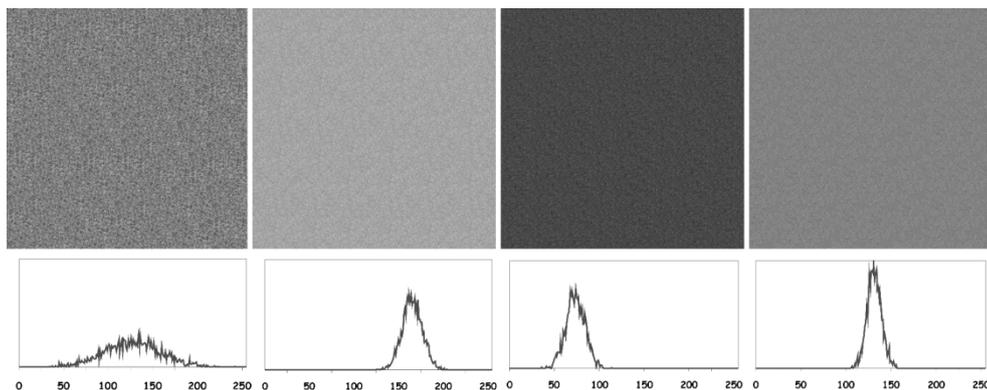


Fig. 5-25. El canal de tonalidades (H) del HSI (arriba izquierda) fue segmentado por umbralización (arriba derecha). Si esta imagen se une a los canales S e I del HSI, se puede reconstruir la imagen color, donde los píxeles que representan a la reacción positiva en la imagen original (marrón) se expresan coloreados (tinción rojiza) sobre un fondo monocromático (abajo izquierda). Si en cambio, la imagen umbralizada (8 bits) se relaciona matemáticamente con la imagen original de la figura 5-19 (RGB), a través de la operación de Máximos valores, se obtiene una imagen color (24 bits), donde todos los píxeles que representan la positividad de la reacción muestran las tonalidades e intensidades originales sobre un fondo blanco (abajo derecha).

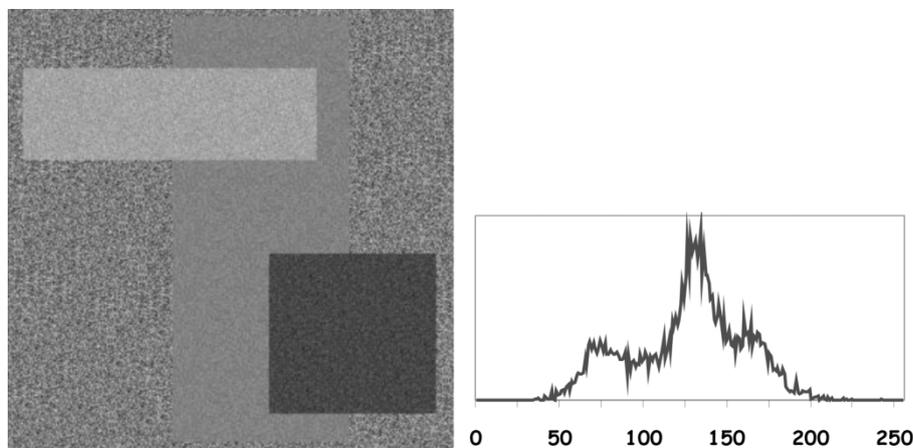
Trabajar sobre la imagen de tonalidades permite recuperar la totalidad de los píxeles con características similares. En la figura 5-25 se muestra la umbralización del canal H de la imagen original de la figura 5-19 transformada al sistema HSI, donde se puede apreciar la mayor cantidad de detalles obtenidos, en comparación con la umbralización directa sobre la imagen color en dicha figura. Cuando se utiliza la imagen segmentada para la reconstrucción de la imagen color, se observa que están representados todos los píxeles cuyas tonalidades coincidían con la reacción positiva (marrón). Si la imagen umbralizada se relaciona con la imagen original a través de la operación matemática de los valores Máximos, se obtienen los píxeles con su tinción original (color e intensidad), dejando el fondo uniforme (blanco). Este tipo de imagen es ideal para la cuantificación de superficies inmunomarcadas y las determinaciones de intensidad/densidad promedio y densidad óptica integrada (ver más adelante).

### ***Segmentación por textura***

Es muy difícil definir la textura en imágenes digitales. En términos genéricos, es la propiedad que tienen las superficies de los objetos, así como las sensaciones que causan al ser captadas por el sentido del tacto. Sin embargo esta definición no tiene aplicación sobre las imágenes digitales. En éstas, la textura podría definirse como el efecto cognitivo que produce en el observador la visualización gráfica de objetos, como el de la superficie de un fruto, de una pared o del papel de lija. Un patrón o un mosaico, también constituyen texturas visuales. Cuando una imagen o simplemente algunas líneas se repiten varias veces, terminan creando una textura visual. En éstas últimas hay que considerar su granulosidad, el contraste o intensidad y la dirección de los patrones. En la figura 5-26 se observa que las cuatro texturas diferentes que se distinguen por su intensidad de luz, no tienen una dirección definida y son granularmente similares, al menos las últimas tres.



**Fig. 5-26.** Diferentes texturas con diferente intensidad y similar patrón de orientación y granulosidad, con sus correspondientes histogramas.



**Fig. 5-27.** Las diferentes texturas de la figura 5-26 fueron integradas en una sola imagen, combinando los cuatro histogramas.

Estos cuatro patrones son bien reconocibles cuando están dispuestos de manera individual. Cuando los mismos se combinan en una sola imagen, si bien son distinguibles de manera visual, no resulta tan sencillo poder segmentarlos para su análisis (Fig. 5-27). En forma combinada, daría la sensación de un cambio en la granulosidad de estos patrones, así como una cierta orientación de los mismos, tal vez inducidos por su intensidad en contraste con los otros o por su forma u orientación geométrica dentro de la imagen.

La utilización de la segmentación por umbralización permite identificar parcialmente cada uno de los patrones, pero no puede identificar límites netos entre todos ellos (Fig. 5-28). Cabe recordar que sin contar con la imagen original, el resultado de la umbralización podría generar patrones que se identifican sólo como una ilusión óptica (ver Capítulo 1). Asimismo, la segmentación por intensidad de grises es prácticamente imposible ya que muchos de los píxeles de cada una de las texturas se comparten con la de las otras.

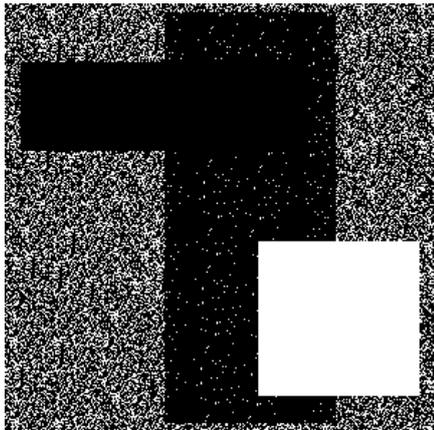


Fig. 5-28. Umbralización de la imagen de la figura 5-27.

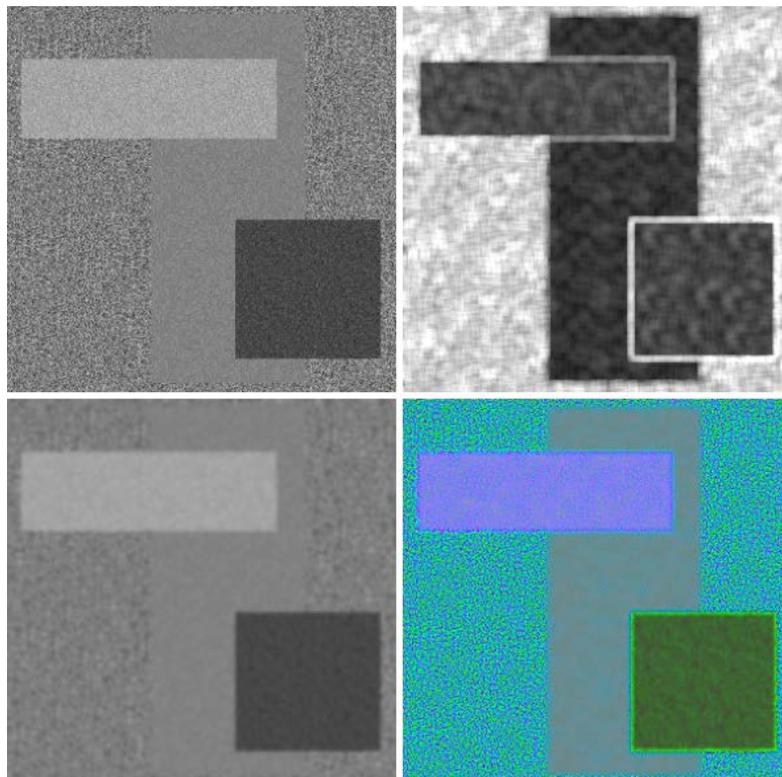
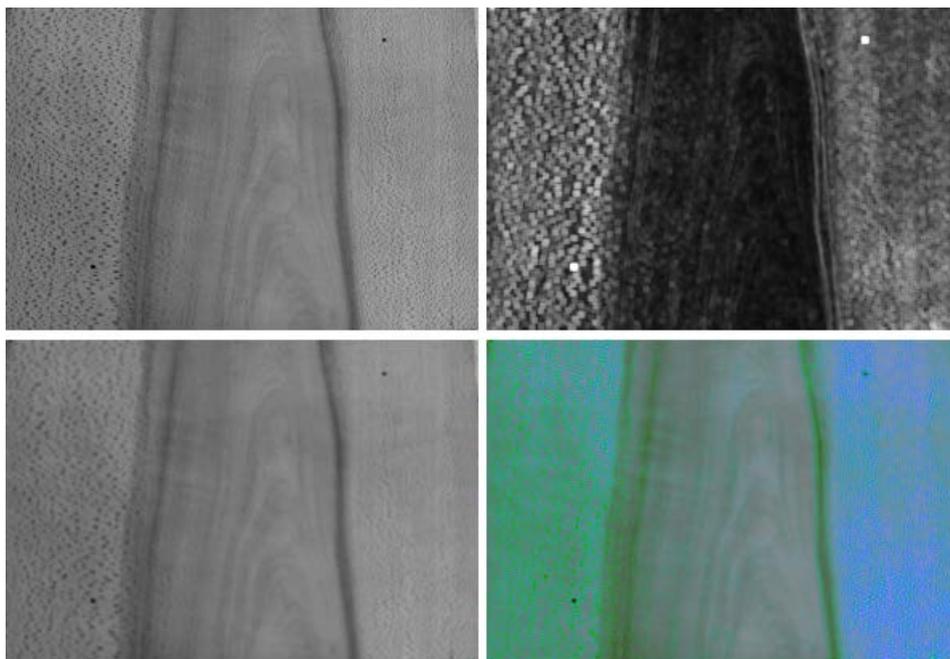


Fig. 5-29. Para la segmentación de patrones se puede tomar a la imagen original (arriba izquierda) como el canal de tonalidad (H) en el espacio de color HSI; a la imagen original filtrada con el filtro Varianza (arriba derecha), como canal de saturación (S), y a la imagen original filtrada con el filtro Gauss (abajo izquierda), como el canal de intensidad (I). Como resultante de la combinación de los tres canales se obtiene la imagen inferior derecha. De esta manera se pueden reconocer los cuatro patrones de la figura 5-27.

Una forma de segmentar la imagen de la figura 5-27 es realizando las texturas de los objetos. Esto se logra aplicando el filtro de detección de bordes Varianza. Por su parte, para remarcar las diferencias de intensidad se pueden suavizar las texturas empleando el filtro Gauss. Estas dos imágenes filtradas, en conjunto con la imagen original pueden ser combinadas en un espacio de color, como el HSI, para lograr una imagen en donde cada textura se reconozca por un patrón (Fig. 5-29). Es necesario recordar que la presencia de color es simplemente a manera de distinción de las texturas, ya que originalmente son imágenes monocromáticas.

No siempre se van a encontrar patrones tan definidos dentro de una imagen. No obstante, utilizando la misma metodología es posible tratar de aislar dichos patrones. En la imagen original de la figura 5-30 se observa un corte macroscópico longitudinal de una tabla de madera de Radal, con aparentes diferencias de textura a la izquierda y a la derecha de la zona central (corte tangencial), correspondiente a los diferentes cortes radiales. Del lado izquierdo no se llega a ver exactamente el mismo patrón que del lado derecho debido a que en este último sector el corte de la madera está levemente desviado. Si los cortes fueran perfectamente radiales, ambos sectores deberían verse iguales.

Luego de la reconstrucción de la imagen en el espacio HSI es posible distinguir cuatro patrones de textura. Sin embargo, es necesario observar que el patrón de la derecha de la imagen, tiene cierta presencia del lado izquierdo de la misma. De todas maneras, al momento de cuantificar las áreas, estos patrones pueden ser fácilmente distinguibles. El reconocimiento de los mismos es de suma importancia en el mercado de las chapas de madera decorativas, tanto para la industria del mueble como la del enchapado.



**Fig. 5-30.** La imagen original (arriba izquierda) corresponde a un corte longitudinal de la madera de Radal. A su derecha, la imagen original filtrada con el filtro Varianza. Abajo, la imagen original filtrada con el filtro Gauss. La combinatoria de las tres imágenes en el espacio HSI permite ver la imagen color, mostrando los cuatro patrones reconocidos.

### ***Segmentación por filtración***

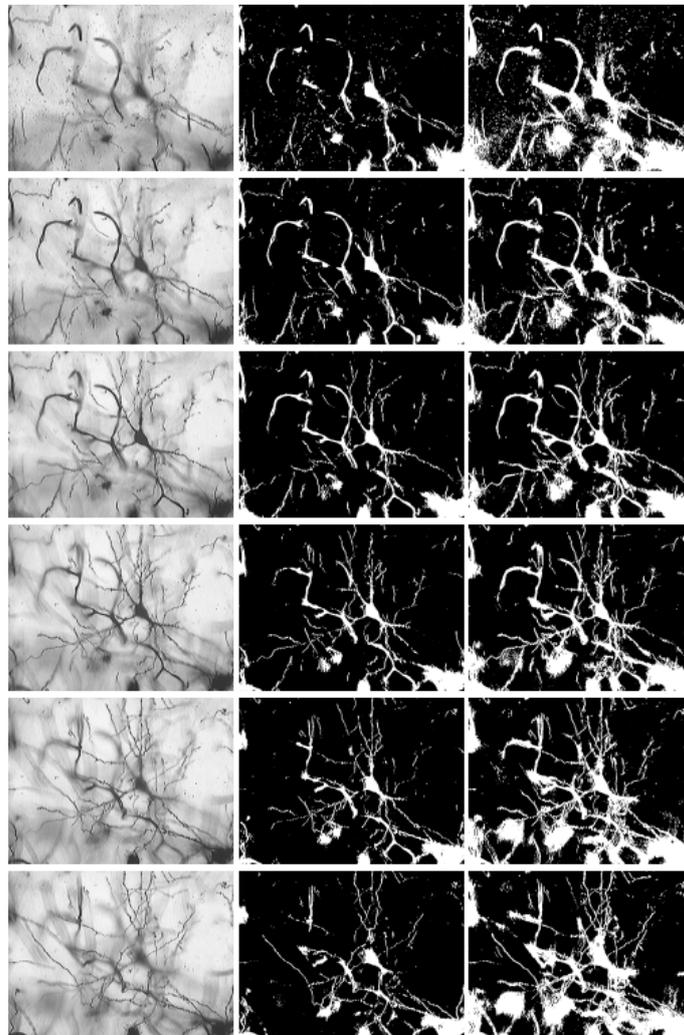
En el Capítulo 4 se describió el uso de los filtros en el procesamiento de las imágenes y también como herramientas de segmentación. Para este propósito se consideraron a los filtros morfológicos Watershed, Thinning y Pruning, como los principales efectores de la segmentación de estructuras sobre imágenes umbralizadas. Sin embargo, a pesar de que algunos filtros no produzcan la segmentación per se, son fundamentales para que este proceso se lleve a cabo. No es la intención del autor volver a repetir el efecto de los filtros en la segmentación y por ello se remite al lector al apartado correspondiente.

### ***Segmentación de imágenes multidimensionales***

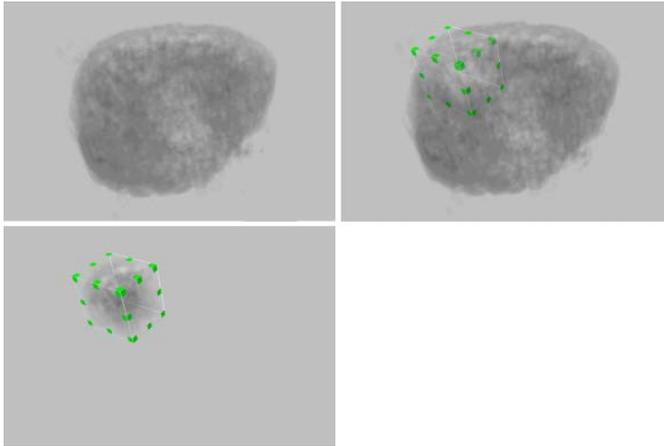
La segmentación también se puede aplicar sobre imágenes 3D, 4D y 5D. Si bien el proceso no se asemeja a los descriptos para las imágenes 2D, el efecto final permite, de alguna manera, separar los objetos de análisis de manera virtual.

Las imágenes 3D están formadas por una sucesión de imágenes en el eje Z. La separación entre éstas (espacio Z) dependerá del criterio de muestreo elegido, relacionado con el tamaño de los objetos a representar. Una forma de seleccionar los objetos de interés es mediante el seccionamiento óptico. Dado que, por lo general, no todas las estructuras se encuentran presentes en todos los planos, la selección de los planos apropiados podría ser un método de segmentación. Otra forma, tal vez un poco más laboriosa, es realizar una segmentación individual de cada uno de los componentes de la pila de imágenes y finalmente volver a ensamblar el stack. Existen programas de análisis que permiten realizar una umbralización general de la imagen 3D, basados en un umbral general o en el de cada una de las imágenes de la pila. La figura 5-31 muestra una comparación entre la umbralización global y la individual de una imagen 3D.

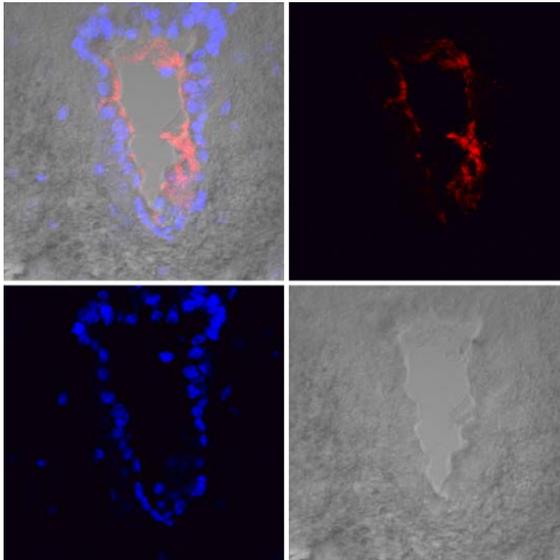
Dado que las imágenes 3D se expresan en vóxeles, una forma de segmentar este tipo de imágenes es restringiendo el tamaño de la imagen a los vóxeles que contengan el objeto deseado. Esto se logra mediante el empleo de una herramienta similar al ROI llamada VOI (volumen de interés, del inglés: "*Volumen Of Interest*"), tal como se observa en la figura 5-32.



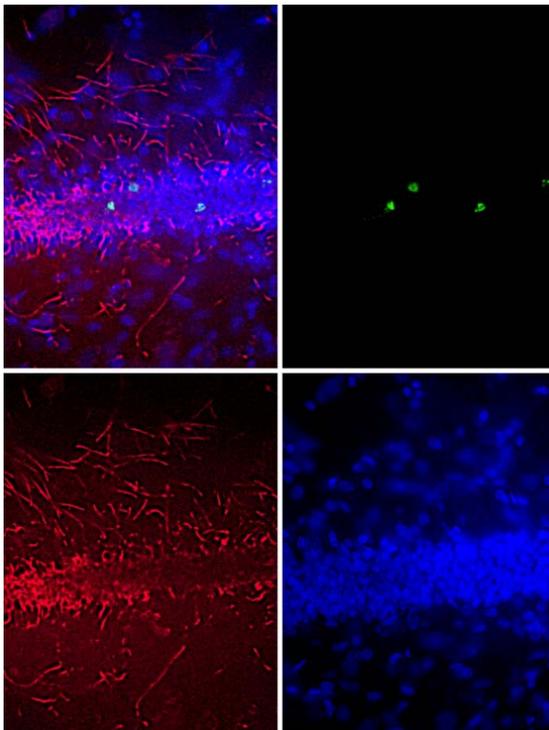
**Fig. 5-31.** Comparativa entre la segmentación por umbralización global (Máxima entropía) de una imagen 3D (columna central) o de cada una de las imágenes que componen la pila (columna derecha) a partir de la pila de imágenes originales (columna izquierda).



**Fig. 5-32.** Reconstrucción 3D del lóbulo olfativo del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. En la imagen superior derecha se observa la herramienta VOI y en la inferior, el volumen segmentado.



**Fig. 5-33.** Segmentación de una imagen 5D. Arriba izquierda: superposición del canal rojo correspondiente a la fluorescencia de nanopartículas (Quantum dots 655™) con el canal azul correspondiente a la incubación con DAPI y el canal DIC de la región del Obex, en la porción terminal del cuarto ventrículo.



**Fig. 5-34.** Segmentación de canales en un corte longitudinal a nivel del segmento C6 de la médula espinal de rata. El canal verde muestra la expresión de GFP luego de la terapia génica con un adenovirus que acarrea el gen. El canal rojo corresponde a los filamentos de vimentina incubados con el fluoróforo Alexa 555 y el canal azul corresponde a la tinción con DAPI de los núcleos de las células del epéndimo que rodean al canal central.

Al igual que con las imágenes 3D, las imágenes 4D o time lapse pueden segmentarse de manera conjunta, o de manera individual. Como se verá en el Capítulo 6, la segmentación de este tipo de imágenes permite hacer un seguimiento en el tiempo (“*Tracking*”), de los objetos seleccionados.

Las imágenes 5D son las más sencillas de segmentar, ya que al contar con dos o más canales de expresión de diferentes longitudes onda se los puede utilizar como criterio de segmentación. La figura 5-33 muestra la separación de 2 canales de fluorescencia y un tercer canal correspondiente al contraste de fase diferencial (DIC). La figura 5-34 muestra un corte longitudinal de canal central de la medula espinal de rata, donde es posible segmentar el canal rojo fluorescente, del verde y del azul.

## ***Segmentación espectral***

En las imágenes espectroscópicas, cada píxel adquiere muchas bandas de intensidad de luz a partir del espectro, en lugar de los tres canales del RGB. Esto se produce por la adquisición simultánea de imágenes espacialmente co-registradas, es decir, adquiridas con diferentes sensores pero mezcladas en una imagen única. Las distintas bandas se almacenan dentro de cada píxel de manera contigua, de acuerdo a su espectro.

En estas imágenes hiper-espectrales, los píxeles mixtos son una mezcla de más de una sustancia distinta. Estas combinaciones se pueden producir por dos razones distintas: una de ellas es por composición de espectros de distintos materiales, que se genera cuando la resolución espacial de un sensor es muy baja, como sucede en las plataformas de sensores remotos (satélites artificiales) que navegan a elevadas alturas. La otra sencillamente se debe a la combinación de materiales en una mezcla homogénea. Esta circunstancia puede ocurrir de manera independiente de la resolución espacial del sensor.

En el Capítulo 2 se mencionó que el sangrado espectral se produce cuando muchos fluoróforos son excitados simultáneamente y parte de su espectro de emisión se solapa con la región espectral aceptada por más de un canal. El desmezclado espectral (del inglés, “*Spectral unmixing*”) es el procedimiento por el cual los espectros mezclados dentro de un mismo píxel se descomponen en sus constituyentes espectrales (miembros terminales) y en sus fracciones (abundancias), que indican la proporción de cada uno de ellos. En las imágenes satelitales, estos constituyentes corresponden generalmente a objetos macroscópicos conocidos, tales como agua, suelo, vegetación, etc. En las imágenes hiper-espectrales con regímenes reflectivos, la señal incidente corresponde a la radiación electromagnética proveniente del sol, luego de reflejarse sobre la superficie de la Tierra.

El spectral unmixing sirve para caracterizar un píxel o una región de la imagen, basado en su marca espectral. Si bien dichos píxeles pueden parecer similares cuando se presentan como imagen RGB, de hecho pueden tener marcas espectrales muy diferentes, que sólo son visibles cuando cada uno está asignado a un color específico.

Existen dos formas de producir la segmentación espectral: una lineal y otra no lineal. En la primera se considera que si la superficie total barrida por el sensor se divide proporcionalmente de acuerdo a las abundancias fraccionales de los miembros terminales, entonces la radiación reflejada transmite las características de los objetos sobre los que impacta, con las mismas proporciones. En este sentido, existe una relación lineal entre la abundancia fraccional de las sustancias que comprenden el área que se explora y los espectros de la radiación reflejada. Por su parte, la segmentación no lineal surge por la dispersión múltiple que se genera al reflejar la luz del sol, a menudo debida a la falta una superficie plana, como se produce ante la presencia de edificios o diversidad de alturas en la vegetación.

El modelo lineal puede ser representado matemáticamente mediante la siguiente ecuación:

$$p = A * x \quad [5-2]$$

donde,  $p$  representa al píxel observado por el sensor,  $A$  es la matriz del material reflectado y  $x$  es la proporción de dicho material dentro del píxel.

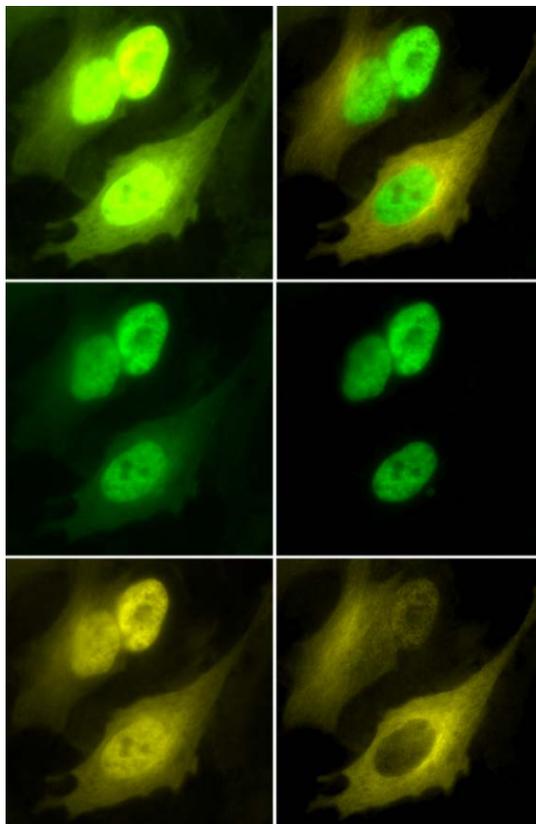
Cuando la luz se refleja sobre una superficie plana, el método lineal es el de elección. Sin embargo, cuando los objetos de interés están en íntima asociación, es decir, cuando los

materiales de los miembros terminales se mezclan en escalas espaciales más pequeñas que el camino óptico de los fotones, es necesario utilizar los métodos no lineales. Esto se debe a que es la única manera de determinar con cierta precisión la interacción que se produce entre la luz y más de un componente en la mezcla, cuando estos la dispersan de manera no lineal.

En los tejidos biológicos, el uso de fluoróforos para la identificación de diferentes estructuras celulares puede dar lugar a los fenómenos de mezcla espectral. En términos generales, la separación de los fluorocromos se puede resolver fácilmente por captura secuencial de cada una de las diferentes longitudes de onda, para evitar, de esta manera, el “sangrado” o mezcla espectral. Sumado a esto, lo ideal es trabajar con fluoróforos cuyos espectros de emisión no se solapen. Pero en ciertas circunstancias, como cuando se quieren registrar las variaciones temporales de color en sistemas vivos o cuando se necesita diferenciar espacialmente varios fluoróforos en un espacio reducido (nanómetros), es necesario recurrir a técnicas de muestreo espectral y posterior segmentación. La ventaja de este método reside, entonces, en que aquellos fluoróforos con perfiles de una alta superposición de emisión espectral, pueden ser separados en sus canales individuales.

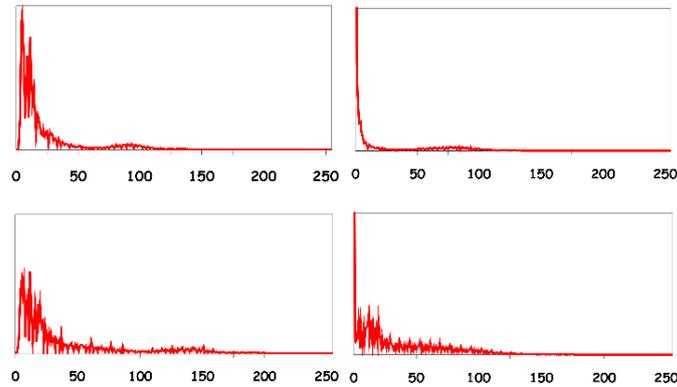
En la actualidad existen combinaciones de fluoróforos que se utilizan para identificar diversos componentes celulares. Algunos se utilizan de a pares, como la unión del tiocianato de fluoresceína y el lucifer amarillo o el GFP (“*Green Fluorescent Protein*”) con el YFP (“*Yellow Fluorescent Protein*”), y otros lo hacen entre varios, como la superposición de quantum dots. Tanto en la combinación de los primeros, pero principalmente en estos últimos, se requiere de la segmentación espectral.

En la separación espectral, el espectro de emisión de cada fluoróforo se grafica en base a su intensidad de emisión, en función de su longitud de onda. Dado que se asume que la forma del perfil de emisión es estable, se puede deducir la magnitud de la señal que se detectaría en el pico, utilizando una porción de la señal de emisión ubicada en la cola del espectro. Una vez detectados los distintos espectros de emisión se procede a deconvolucionar la imagen de la misma manera que se utiliza la deconvolución para separar la superposición de diferentes características estructurales.



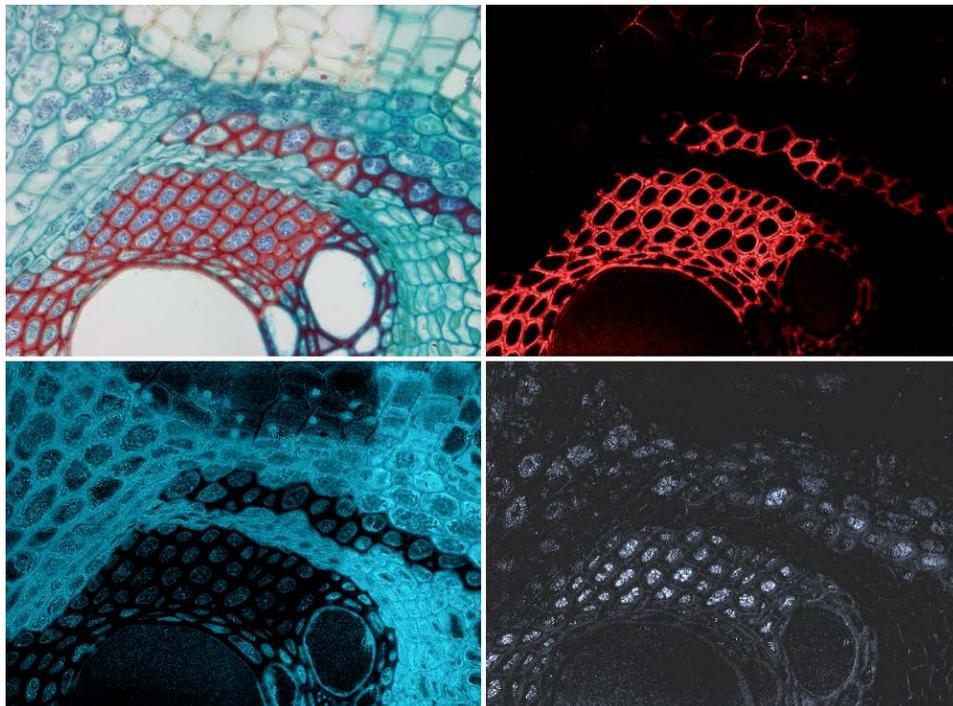
**Fig. 5-35.** Arriba izquierda: imagen espectral formada por la superposición de GFP e YFP. Arriba derecha: misma imagen después de la segmentación espectral. En las filas central e inferior se muestran los canales GFP e YFP separados, respectivamente.

El procedimiento de segmentación es de tipo lineal y se produce en dos etapas: en la primera se calibran los colores de los canales con la ayuda de una imagen de referencia por cada canal fluorescente. En la segunda, se produce la verdadera separación de los canales. La figura 5-35 muestra la separación de los canales GFP e YFP sobre células de línea HeLa. La figura 5-36 muestra los histogramas de los canales separados. Luego de la segmentación se observa claramente que el canal GFP tiñe al núcleo mientras que el YFP lo hace sobre el citoplasma.



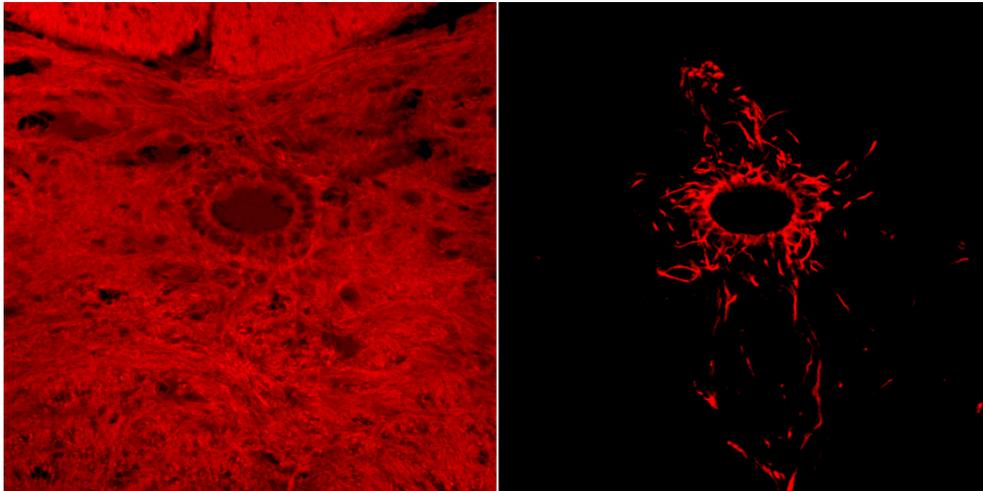
**Fig. 5-36.** Histogramas correspondientes a los canales separados de la figura 5-35 (líneas media e inferior), antes (izquierda) y después (derecha) del proceso de segmentación espectral.

La segmentación espectral también se puede utilizar sobre imágenes de color real (RGB) capturadas con un microscopio de luz. Al igual que con las imágenes fluorescentes, el primer paso consiste en determinar los colores pertenecientes a cada uno de los canales. Para que este procedimiento sea exitoso, los colores deben estar bien definidos y la imagen debe ser brillante, ya que de lo contrario se pueden producir fallas en el algoritmo. En el segundo paso se produce la separación espectral mediante un proceso lineal. A diferencia de la segmentación por color, aquí no se extraen los valores del RGB en cada uno de los píxeles de la imagen, sino que seleccionan patrones de color, que están formados por diversas tonalidades de cada uno de los tres canales (Fig. 5-37).



**Fig. 5-37.** Arriba izquierda: imagen original color RGB capturada con un microscopio de luz. A su derecha y abajo, la separación de los canales conteniendo los elementos rojos, verdes y azules, respectivamente, seleccionados en la imagen original.

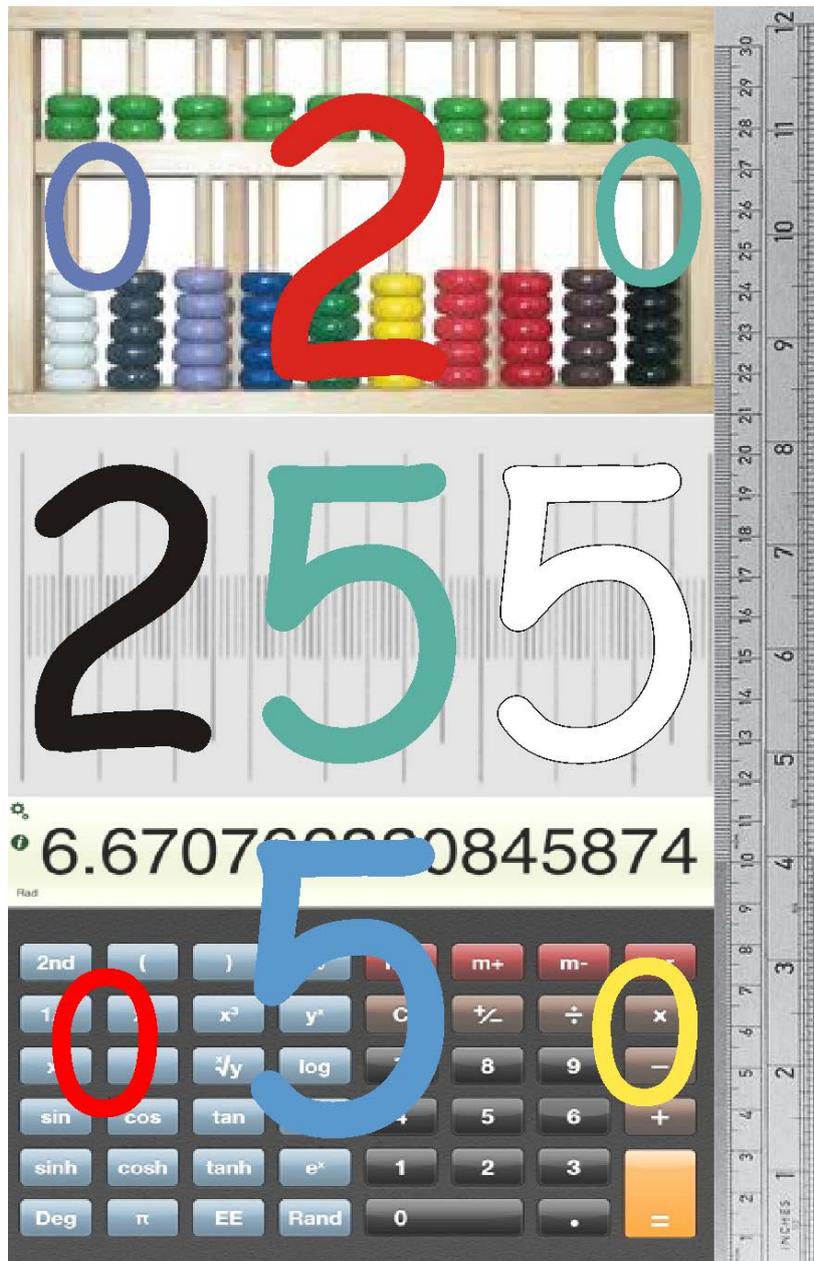
La separación espectral también puede ser utilizada para separar la autofluorescencia del tejido de la señal específica de las moléculas marcadas. En este caso, se puede tratar a la autofluorescencia como un fluoróforo endógeno que sería considerado como un canal separado luego de la separación espectral (Fig 5-38).



**Fig. 5-38.** Izquierda: La médula espinal de rata muestra autofluorescencia para el canal rojo (510-550 nm). El tejido había sido incubado con el anticuerpo monoclonal anti-vimentina, el cual fue revelado con un anticuerpo anti-ratón marcado con Alexa 555. Derecha: luego de un proceso de separación espectral, se logró visualizar el área de influencia del anticuerpo primario, alrededor del conducto del epéndimo del órgano.

# Capítulo 6

## Medición y Cuantificación de las Imágenes



Para cuantificar y medir es necesario contar con distintas herramientas de cálculo y medición, tanto para muestras microscópicas como macroscópicas, ya que los datos obtenidos son exclusivamente numéricos.

## ***Generalidades***

En los capítulos precedentes se especificaron las características fundamentales de las imágenes digitales multidimensionales, se detallaron los errores que se cometen al preparar las muestras y se describió la captura de las imágenes por diferentes medios. Asimismo, se pormenorizaron numerosos procesos que pueden ser aplicados a las imágenes para eliminar defectos o enaltecer virtudes. Finalmente, se mencionaron diferentes estrategias para separar los objetos de interés del fondo de la imagen, de manera virtual o real. Todos estos pasos son necesarios cuando se necesita extraer un valor numérico que dé cuenta de eventos, tales como la cantidad de células que se encuentran en un tejido, lo que indicará un estado de normalidad, de disminución o de aumento; cambios de las formas: para distinguir células tumorales o atróficas; o diferencias de intensidad: que indiquen un estado de normalidad o alteración. Porque el análisis de imágenes es finalmente eso: la ciencia de extracción de información numérica para la interpretación de fenómenos. Esto es válido tanto en el campo de la biología, como en las ciencias astronómicas, geológicas o cualquier otra ciencia que se base en las imágenes para la interpretación de los hechos.

De manera genérica, se emplea el término **morfometría** para englobar todos los procesos de extracción cuantitativa de datos a partir de imágenes. En su estricto sentido, es el análisis cuantitativo de las formas, término que engloba al tamaño y al aspecto o figura. El principal objetivo de la morfometría es probar, estadísticamente, las hipótesis sobre los factores que afectan las formas.

En biología, la morfometría se puede aplicar tanto a los objetos macroscópicos como microscópicos (histometría). Gran parte de la histología depende del reconocimiento de las formas; la apreciación visual directa sirve en gran medida a este propósito. Sin embargo, cuando se debe analizar la celularidad de un tejido, la observación directa carece del poder de discriminación, a diferencia de lo que ha demostrado tener la histometría. De la misma forma, es difícil determinar la intensidad de tinción de manera subjetiva. La histometría también resulta de gran valor cuando se quiere establecer con exactitud el grado de anormalidad de un tejido como por ejemplo, la determinación del punto final del grado de toxicidad de una droga o una toxina. Gracias a la histometría, es posible medir parámetros tridimensionales, tales como el volumen ocupado por una estructura dentro de un tejido, la densidad volumétrica de un citoplasma, el número de células por volumen, etc., a partir de un corte histológico. Muchos de estos parámetros están directamente relacionados con la función del tejido y, por lo tanto, la correlación con los datos biológicos y fisiológicos puede aportar una información relevante acerca de los mecanismos tisulares. Finalmente, la histometría permite estandarizar parámetros de un modo tal, que los resultados obtenidos puedan ser considerados universales.

Para que los resultados histométricos sean confiables se deben tener en cuenta varios aspectos:

- Dado que en muchas situaciones, la fijación y el procesamiento de la muestra son eventos que alteran el volumen del órgano y por ende conducen a errores de apreciación, se debe aplicar un factor de corrección de dicho error.
- El espesor del corte debe ser constante debido a que las variaciones pueden ser una fuente de error, no sólo en la densidad óptica sino también en la medición de las estructuras (obtención de volumen relativo). Cuanto más grueso sea el corte, más fragmentos contendrá y dichos cuerpos opacos inducirán a un erróneo aumento del tamaño del área. Estos errores se pueden subsanar mediante la implementación del método del disector óptico (ver más adelante), al analizar plano por plano de foco.
- El muestreo puede ser tomado en forma sistemática, es decir, a intervalos conocidos o en puntos determinados del órgano, o simplemente al azar. También se puede hacer una combinación de ambos.
- La confiabilidad del recuento o de las mediciones dependerá de la cantidad de secciones realizadas sobre el tejido procesado, la cantidad de campos microscópicos observados y de las lecturas realizadas dentro de cada campo.

Existen varias razones por las cuales resulta necesario cuantificar/describir objetos a través la morfometría:

- Para **reducir la variabilidad en la cuantificación de patrones de tejidos y células**. La cuantificación no morfométrica de los cambios titulares tiene una elevada tasa de variación dependiente del observador. Las fuentes de variabilidad entre los observadores puede provenir de su formación profesional, que los induce a trabajar con diferentes técnicas. Asimismo, puede provenir de su agudeza visual y de su capacidad para reconocer formas o distinguir tonalidades.
- Para **proveer una escala cuantitativa** que permita establecer determinados grados de variación en las estructuras de manera medible. Las mediciones morfométricas son más reproducibles que aquellas que se realicen subjetivamente, ya que son cuantitativas.
- Para **incrementar la sensibilidad en la identificación de cambios mínimos**. La morfometría ofrece la posibilidad de estratificar los procesos de cambios en un número mayor de categorías, en comparación con la estimación visual. Si una escala cuantitativa es más precisa y reproducible que otra basada en las determinaciones visuales, entonces la escala puede expandirse para incluir más categorías.
- Para **cuantificar los efectos producidos por el procesamiento del material**. La cuantificación morfométrica de los efectos de contracción de los tejidos procesados es más precisa que la aportada por la estimación visual.
- Para **proveer una referencia estandarizada en el diagnóstico**. Los métodos cuantitativos pueden ser utilizados para verificar la pertenencia de un patrón a una categoría u otra.
- Para ser utilizada como **herramienta de investigación**.

Existen diferentes maneras de implementar los estudios morfométricos y por ende, extraer información numérica de las imágenes uni o multidimensionales, las que se irán describiendo a continuación.

### ***Estereología***

Es la ciencia geométrica y estadística que permite obtener información tridimensional a partir de una imagen bidimensional. Esta ciencia permite determinar volúmenes, áreas, longitudes y número de estructuras presentes en la imagen, entre otras mediciones. Sin embargo, la estereología necesita de otras ciencias para cumplir sus objetivos. Así, se nutre de la contribución de la geometría integral, la probabilidad y la estadística.

Entre las características básicas de la estereología, cabe destacar que la metodología es esencialmente estadística, basada en muestras relativamente pequeñas obtenidas a partir de la intersección del objeto de interés con una grilla o plantilla geométrica de propiedades conocidas. Asimismo, no requiere ninguna condición en cuanto a la forma del objeto. Para que el análisis estereológico sea eficiente, el muestreo debe ser isotrópico, uniforme y aleatorio, es decir, que todas las porciones del objeto estén representadas de la misma manera (uniformidad), que la representación en la imagen de los objetos sea totalmente azarosa (aleatoriedad) y que todas las direcciones de medición estén igualmente representadas (isotropía). Si se elige la orientación de los objetos en la imagen, ésta ya no sería isotrópica. Si se trata de ubicar sectores donde se observen todos los núcleos en foco, ya no sería aleatorio. Una vez que se interpone la grilla sobre la muestra, ésta no debe quedar sesgada para que el resultado de la medición brinde un estimado no sesgado (estimación objetiva) del valor esperado.

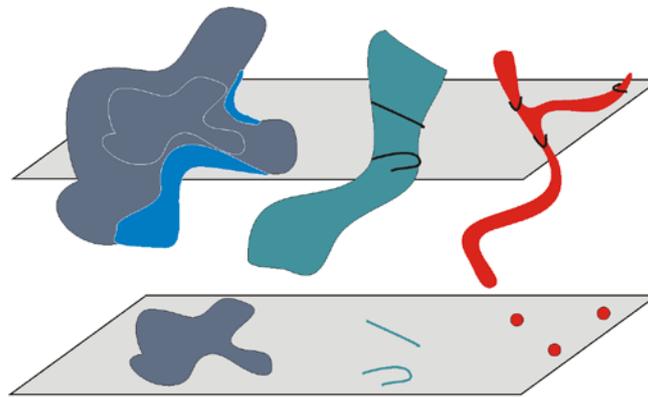
La estereología se aplica en distintas disciplinas biológicas como la Anatomía, Fisiología, Neurociencias, Patología, Botánica, Dendrología, Radiología, etc. También se aplica en ciencias no biológicas como la Edafología, Física, Metalografía, Mineralogía, Petrografía y, en cierta medida, en la Geografía, Geofísica y Astronomía.

Los primeros estudios estereológicos fueron realizados por el geólogo Delesse, quien descubrió que la fracción de volumen de un mineral en una roca coincidía con el valor medio de la fracción de área del mineral en una sección de la misma. Más tarde, el geólogo Glagolev propuso estimar el área de una figura plana contando los puntos de una rejilla regular que intersectaba con la figura.

Existen diversas estructuras básicas de distintas dimensiones que pueden ser utilizadas en el análisis estereológico:

- Todos aquellos objetos 3D que tienen volumen, como las células, partículas, fibras, etc.
- Superficies bidimensionales, como las membranas celulares que tienen un espesor finito, pero que al ser tan delgadas pueden ser consideradas como objetos 2D.
- Elementos unidimensionales que incluye las curvas, formadas por la intersección de superficies, o los bordes de un poliedro. Entre los elementos, también se cuenta con todos aquellos cuyas dimensiones laterales son tan pequeñas en comparación con su largo, que prácticamente pueden ser tratadas como unidimensionales, como pueden ser las fibras, poros, vasos de pequeño calibre, dependiendo de la magnificación de la imagen.
- 0D o cero-dimensionales, en donde se considera casi con exclusividad a los puntos en el espacio, que podrían provenir de la intersección de dos o más estructuras 1D. La precipitación de un colorante, o las nanopartículas fluorescentes pueden ser consideradas como 0D.

Cuando un plano de sección (imagen 2D) corta a cada uno de los objetos recién mencionados, su dimensión se reduce en un punto. Así, los volúmenes 3D se representan como áreas (2D), las superficies se representan como líneas (1D), las curvas se representan como puntos (0D) y los puntos no se observan ya que el plano de sección no los abarca (Fig.6-1).



**Fig. 6-1.** Seccionamiento de objetos 3D en un plano (plantilla gris) (arriba), mostrando (abajo) el área de intersección con un volumen (azul), las líneas de intersección con una superficie (verde) y la intersección de puntos con un objeto lineal (rojo).

Los parámetros presentes en una imagen 3D tienen propiedades geométricas que pueden ser topológicas o métricas. Estas últimas incluyen el volumen, el área de superficie, la longitud de línea y la curvatura. Las mediciones de estos parámetros se expresan como “por volumen” de la estructura.

La notación que se usa para expresar cada una de estas mediciones se refleja en las letras V (volumen), S (superficie), L (línea) y M (curvatura). Para denotar que se expresan por unidad de volumen la letra V se usa como subíndice. Existen otros subíndices que indican las unidades de medición en las que se está trabajando. Por ejemplo, las mediciones por unidad de área utilizan el subíndice A. De la misma manera, el subíndice L se utiliza para expresar los eventos que ocurren a lo largo de la línea. El subíndice P se utiliza para referir a la cantidad de puntos totales. La Tabla 6-1 muestra la relación entre las intersecciones de los objetos y las unidades de medición.

Las relaciones entre estas cantidades estructurales pueden ser utilizadas para calcular los valores promedio de los objetos. En la Tabla 6-2 se listan algunas relaciones para establecer estos valores. A modo de ejemplo, para calcular el diámetro promedio  $\langle D \rangle$  de una partícula esférica, generalmente expresado como altura de la partícula, se utiliza la relación:

$$D = \frac{M_V}{2\pi * N_V} \quad [6-1]$$

Tabla 6-1. Mediciones de las intersecciones de los objetos con el plano

Notación	Expresión	Unidades de Dimensión
$V_V$	Fracción de volumen (volumen por unidad de volumen) del objeto	Sin dimensión
$S_V$	Área de superficie (área por unidad de volumen) de la estructura superficial.	$m^{-1}$
$L_V$	Longitud de la línea (longitud por unidad de volumen) de la estructura lineal	$m^{-2}$
$M_V$	Curvatura de la superficie	$m^{-2}$
$N_V$	Cantidad de puntos por unidad de volumen	$m^{-1}$
$A_A$	Fracción de área	Sin dimensión
$L_A$	Longitud de las líneas por unidad de área	$m^{-1}$
$P_A$	Cantidad de puntos por unidad de área	$m^{-2}$
$L_L$	Fracción de longitud	Sin dimensión
$P_L$ o $N_L$	Cantidad de puntos por unidad de longitud	$m^{-1}$
$P_P$	Fracción de puntos	Sin dimensión

Tabla 6-2. Relación entre las propiedades para la obtención de valores promedio

Propiedad	Símbolo	Relación
Volumen	$\langle V \rangle m^3$	$\langle V \rangle = V_V / N_V$
Superficie	$\langle S \rangle m^2$	$\langle S \rangle = S_V / N_V$
Altura	$\langle D \rangle m^1$	$\langle D \rangle = M_V / 2\pi \cdot N_V$
Promedio de intercepción lineal	$\langle \lambda \rangle m^1$	$\langle \lambda \rangle = 4 \cdot V_V / S_V$
Promedio de sección transversal	$\langle A \rangle m^2$	$\langle A \rangle = 2\pi \cdot V_V / M_V$
Promedio de curvatura de superficie	$\langle H \rangle m^{-1}$	$\langle H \rangle = M_V / S_V$

Los estudios estereológicos se pueden desarrollar de manera manual, pero también mediante la ayuda de analizadores de imágenes. Más allá de cuál sea el método seleccionado, para realizar un análisis estereológico se necesitan plantillas que se superpongan sobre las imágenes, ya sea que estén impresas sobre hojas transparentes o acetatos, o estén expuestas en un monitor de la computadora. Las plantillas o grillas más comunes están compuestas por líneas y puntos.

Cuando los elementos de las grillas interactúan con los objetos producen “eventos”. Por ejemplo, la interacción de un plano con un objeto con volumen, producen un área de sección, como se observó en la figura 6-1. Algunos de los eventos producidos necesitan mediciones, mientras que otros pueden ser simplemente contados. El recuento de eventos es muy eficiente, tiene precisión estadística que puede ser calculada fácilmente y es el método de preferencia para los estudios estereológicos. El recuento de puntos o intersecciones se logra eligiendo la grilla más apropiada para los diferentes tipos de objetos particulares. La Tabla 6-3 resume el tipo de interacciones que se produce entre las plantillas y los objetos.

En la figura 6-2 se muestran ejemplos de superposición de plantillas de líneas y de puntos, tomando como modelo la proyección de los objetos de la figura 6-1 (plano de corte). Si se trabaja con una imagen digital, la superposición de la grilla sobre la misma se logra a través del conector lógico AND, lo que permite identificar cada uno de los eventos que se registren. De esta manera, la longitud de las líneas se establece fácilmente, lo mismo que el recuento de puntos (Fig. 6-3).

Tabla 6-3. Interacción entre las plantillas y los objetos para producir eventos

Objeto 3D	Plantilla	Evento	Medición
Volumen	Volumen	Terminaciones	Recuento
Volumen	Plano	Sección transversal	Área
Volumen	Línea	Intercepción de la cuerda	Longitud
Volumen	Punto	Intersección del punto	Recuento
Superficie	Plano	Línea de rastreo	Longitud
Superficie	Línea	Intersección del punto	Recuento
Línea	Plano	Intersección del punto	Recuento

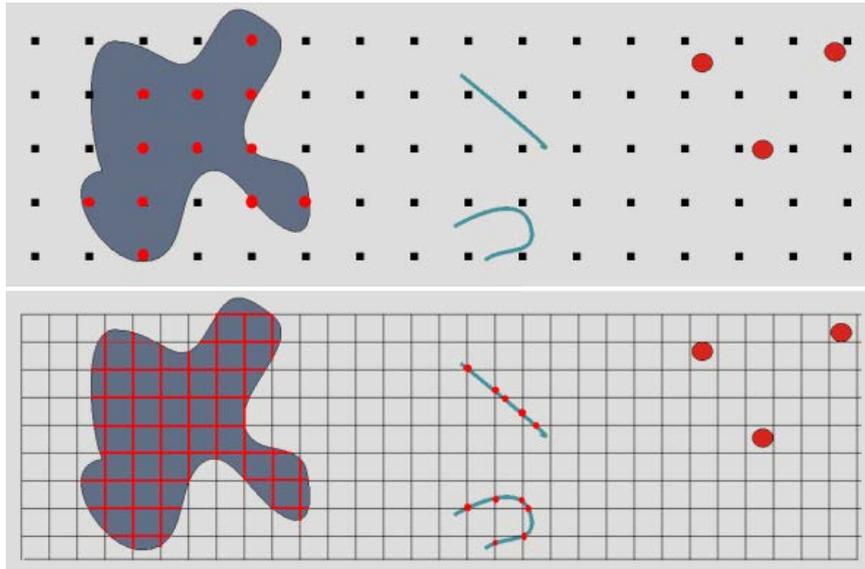


Fig. 6-2. Muestreo de los objetos en el plano de corte de la figura 6-1. Arriba: grilla de puntos que produce intersecciones puntuales con el área azul (en rojo), las que se distinguen fácilmente. Abajo: grilla de líneas que genera segmentos de rectas medurables dentro del área azul y puntos de intersección con las líneas proyectadas, que también pueden contarse.

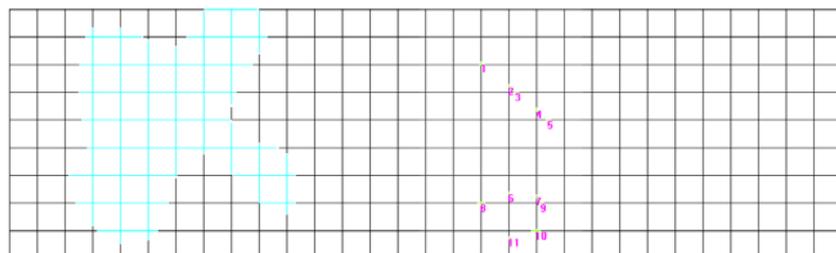


Fig. 6-3. Al relacionar el plano de la muestra con la grilla a través del operador lógico AND, se obtiene la intersección entre los objetos y la grilla (eventos). De esta manera, las líneas de intersección con el área (en celeste) se pueden medir, así como se pueden contar los puntos de intersección con las líneas (en verde). Los números indican el total de intersecciones puntuales encontradas.

Las relaciones fundamentales de la estereología son teoremas de valores esperados, que relacionan las mediciones que se obtienen usando distintas grillas, con los parámetros estructurales presentes en las tres dimensiones. El valor esperado (encuadrado entre  $\langle \rangle$ ) indica que las ecuaciones se aplican al valor promedio de la población de objetos en el espacio tridimensional. La Tabla 6-4 muestra las relaciones básicas que utilizan los parámetros mencionados previamente.

Una de las reglas fundamentales en la relación entre mediciones es que las fracciones de volumen, de área y de número son equivalentes:

$$V_V = A_A = P_P \quad [6-2]$$

Esto permite la interacción entre la forma de análisis y la evaluación de los datos finales. A continuación se brindan varios ejemplos de su implementación.

Tabla 6-4. Relaciones básicas para valores esperados

Medición	Relación	Propiedad
Recuento puntual	$P_P = V_V$	Fracción de volumen
Recuento de intercepción lineal	$P_L = S_V/2$	Densidad de área de superficie
Recuento de área puntual	$P_A = L_V/2$	Densidad de longitud
Recuento de patrón	$N_A = M_V/2\pi = N_V * \langle D \rangle$	Curvatura total
Recuento de área tangente	$T_A = M_V/\pi$	Curvatura total
Recuento de disector	$N_V = N_V$	Densidad de número
Fracción de línea	$L_V = V_V$	Fracción de volumen
Fracción de área	$A_A = V_V$	Fracción de volumen
Longitud por área	$L_A = (\pi/4) * S_V$	Densidad de área de superficie

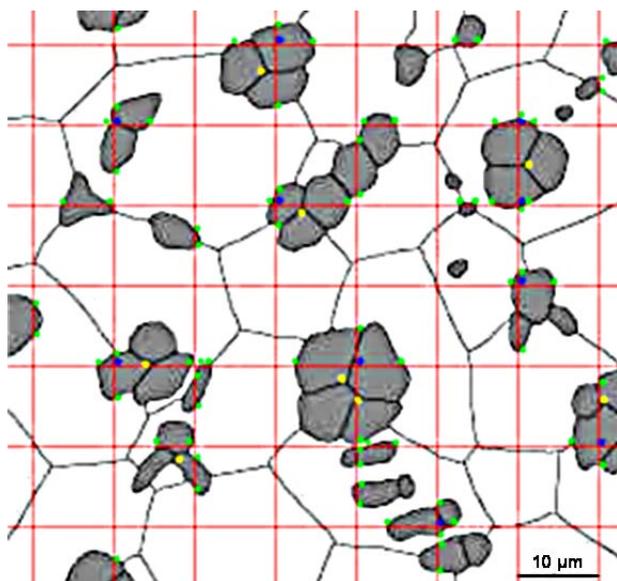


Fig. 6-4. La grilla o plantilla, formada por líneas rojas verticales y horizontales, está superpuesta sobre diferentes objetos a medir. La grilla contiene 56 intersecciones. Nueve de éstas (puntos azules) recaen sobre los objetos grises (fase  $\beta$ ) (las áreas blancas o sin objetos se identifican con la fase  $\alpha$ ). Esto genera un estimado de fracción de volumen de  $V_V = 9/56 = 16\%$  (usando la relación  $P_P = V_V$ ). La longitud total de la grilla es de  $1106 \mu\text{m}$ . Se producen 72 eventos entre los objetos y las líneas de la grilla (puntos verdes) que no son intersecciones de líneas (límite  $\alpha\beta$  - superficie de interfase en 3D). Si se usa la relación  $S_V = 2 * P_L$ , se obtiene un estimado de área de superficie [ $S_V = 2 * 72 / 1106 = 0,13 \mu\text{m}^2 / \mu\text{m}^3$ ]. Se observan 8 puntos amarillos que representan una triple unión entre objetos ( $\beta\beta\beta$ ) en el área de la imagen (área =  $(73.85 \mu\text{m})^2 = 5454 \mu\text{m}^2$ ). Si se usa la relación  $L_V = 2 * P_A$ , se obtiene un estimado de longitud de triples líneas [ $2 * 8 / 5454 = 2,9 \times 10^{-3} \mu\text{m} / \mu\text{m}^3$ ]. Obtenida de Russ and Dehoff. Practical Stereology. 1999.

La figura 6-4 muestra un ejemplo del uso de la estereología para la medición de eventos. En este caso se realiza el recuento de puntos que recaen sobre distintas estructuras de la imagen. La fracción  $P_P$  se obtiene al contar el número de puntos azules que se producen cuando la intersección de dos líneas rojas de la grilla contacta con los objetos grises y posteriormente, dividirlo por la cantidad total de intersecciones. Si este procedimiento se repite en varias regiones del tejido, el promedio de los valores obtenidos es el resultado de

la fracción de volumen del objeto seleccionado ( $V_V$ ). De la misma manera, las líneas de la misma grilla pueden ser utilizadas para contar los eventos donde estas se ponen en contacto con el borde de los objetos de interés. El número total de intersecciones (puntos verdes) dividido por la longitud total de las líneas en la grilla es igual a  $P_L$ , es decir, la cantidad de puntos por unidad de longitud. El valor promedio de  $P_L$  (que tiene unidades de  $m^{-1}$ ) es la mitad del área de superficie ( $S_V$ , área por unidad de volumen, que tiene la misma dimensionalidad:  $m^2/m^3 = m^{-1}$ ).

Los distintos patrones de clases se pueden establecer en dependencia con la cantidad de fases que se encuentran en una imagen (fondo +  $N$  objetos distintos). En la Tabla 6-5 se ejemplifican la cantidad de clases para muestras que tengan una o dos fases.

Tabla 6-5. Patrones de clases que se registran en microestructuras de una o dos fases

Patrón de Clase	Fase única ( $\alpha$ )	Dos fases ( $\alpha + \beta$ )
Volumen	$\alpha$	$\alpha, \beta$
Superficie	$\alpha\alpha$	$\alpha\alpha, \alpha\beta, \beta\beta$
Líneas triples	$\alpha\alpha\alpha$	$\alpha\alpha\alpha, \alpha\alpha\beta, \alpha\beta\beta, \beta\beta\beta$
Cuádruples puntos	$\alpha\alpha\alpha\alpha$	$\alpha\alpha\alpha\alpha, \alpha\alpha\alpha\beta, \alpha\alpha\beta\beta, \alpha\beta\beta\beta, \beta\beta\beta\beta$
Número de fases	4	14

A modo de ejemplo, en la figura 6-5 se considera la imagen de una estructura 2D conteniendo dos fases (fondo blanco [ $\alpha$ ] y objetos negros [ $\beta$ ]). La fracción de área de la estructura ocupada por la fase  $\beta$  es  $A_A^\beta$  y se mide utilizando una grilla de puntos formada por 4 cuadrados de lado, que dejan como resultado una intersección de 25 puntos.

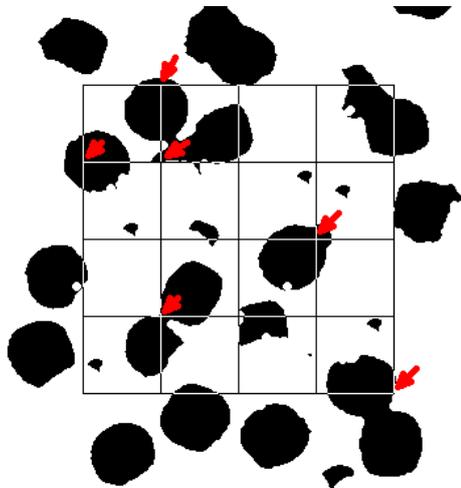


Fig. 6-5. Medición de la fracción de área de la fase  $\beta$ . Las flechas rojas indican la interacción entre las intersecciones y la fase  $\beta$ .

En esta grilla, los eventos se producen por interacción de las intersecciones con los objetos de la fase  $\beta$ . El total de eventos es de 6. Este recuento puntual se relaciona con la fracción de área de la fase  $\beta$  a través de la relación:

$$\langle P_P \rangle^\beta = A_A^\beta \quad [6-3]$$

donde  $\langle P_P \rangle$  es el valor esperado de la fracción de puntos que toquen a la fase  $\beta$  cuando se use esta grilla y  $A_A$  es la fracción de área de  $\beta$  en la estructura. En la figura 6-5, la fracción de puntos es  $6/25 = 0,24$ . Es decir, el recuento normalizado es  $\langle P_P \rangle = 0,24$  y la fracción de área es  $A_A = 0,24$ .

Durante un estudio estereológico, esta grilla debe ser ubicada en diferentes sectores de la muestra y en distintos campos, de manera tal que cada uno de esos movimientos genere diferentes recuentos de intersecciones que contacten con la fase  $\beta$ . La distribución del

número de contactos genera así un valor promedio. Este valor es el que se debe usar para estimar el valor esperado de la fracción de puntos  $\langle P_p \rangle$  en la fase  $\beta$  y por ende, la fracción de área ( $A_A$ ) de la misma fase. La fracción de área de la fase  $\alpha$  se puede calcular contando las intersecciones que contactan con dicha fase, o más simplemente, sustrayendo  $A_A^\beta$  de 1.

La mayoría de las pruebas estereológicas realizan mediciones sobre muestras representativas de objetos 3D, que se obtienen de secciones seriadas tomadas con un intervalo uniforme a través de toda la muestra. Por lo tanto, las cantidades encontradas se expresan por unidad de volumen. Las propiedades geométricas de todo el objeto también se pueden estimar utilizando grillas que cubran al mismo por completo. Cuando se utilizan imágenes 2D, es posible medir áreas de objetos irregulares únicos, como por ejemplo el mapa de Argentina que se observa en la figura 6-6.

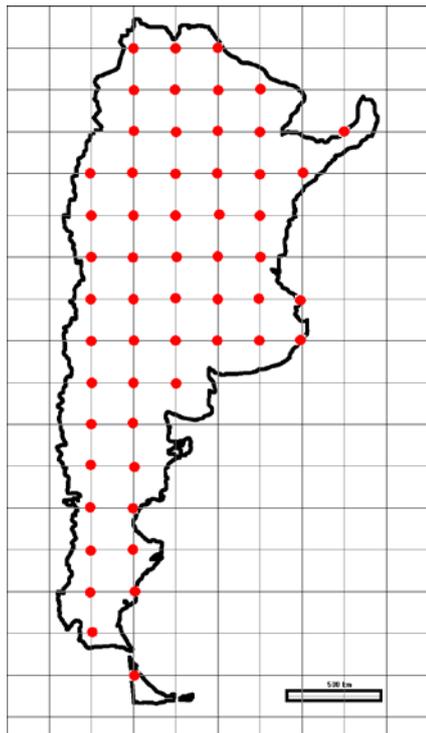


Fig. 6-6. Mapa continental de la Argentina con una grilla de líneas superpuesta. El espacio entre líneas es de 225 km. Se cuentan 55 puntos (en rojo) en la intersección de las líneas que producen eventos con el mapa. Por lo tanto, el área estimada es de  $55 \times (225)^2 = 2.784.375 \text{ km}^2$ . La superficie total oficial de la Argentina, en su porción continental, es de  $2.780.400 \text{ km}^2$  (probablemente calculada mediante un proceso similar a este). El área calculada en base al recuento automático de píxeles dentro del mapa fue de  $2.860.534 \text{ km}^2$ .

El valor esperado del recuento de puntos en dos dimensiones es la fracción de área del objeto ( $\langle P_p \rangle = A_A$ ). Dado que la fracción de puntos puede equipararse a la fracción de área, la cantidad de puntos que caen sobre el objeto multiplicado por la superficie de un solo cuadrado de la grilla, da el valor estimado de todo el objeto analizado. En el ejemplo del mapa de la figura 6-6, en donde cada cuadrado tiene una superficie de  $50625 \text{ km}^2$ , se contaron 55 eventos. Por lo tanto, la superficie estimada del objeto (territorio continental Argentino) es de  $55 \times 50625 = 2.784.375 \text{ km}^2$ .

Si un objeto con volumen se secciona en  $N$  planos paralelos de intervalo conocido, el volumen total se calcula como:

$$V = t * l^2 * \langle P_T \rangle \quad [6-4]$$

donde,  $t$  es el espacio entre los planos,  $l^2$  es la superficie de cada uno de los cuadros de la grilla y  $\langle P_T \rangle$  es el número total de puntos contados en todos los planos ( $N$ ) de sección del objeto.

Cuando se realiza una medición estereológica es necesario contar varios campos. Cada uno de los recuentos realizados se debe registrar para su posterior análisis estadístico. Los valores promedio y de desvío estándar se analizan mediante estadística simple. El desvío estándar es la base para estimar la "precisión" de la estimación del valor medio y decidir si el número de campos analizados fue suficiente. El valor medio de los recuentos en la

muestra se utiliza para estimar el “valor esperado” para los recuentos realizados en todos los campos.

Para establecer un correcto diseño estereológico, es decir, cuando se establece la cantidad y forma de medición de los campos, es indispensable crear una muestra que ofrezca una estimación imparcial “no sesgada” del valor esperado o de la media de la población de todos los campos analizados, de tal manera que el objeto pueda ser reconstruido en un espacio tridimensional. Si el diseño está bien formulado, todos los puntos que se reparten de manera uniforme dentro de una grilla recaerán sobre un objeto de manera proporcional al volumen total de ese objeto.

Para realizar una correcta medición estereológica se debe aplicar la grilla correspondiente al sistema que se quiere cuantificar o medir. Existen diversos tipos de grillas pero todas se basan en el mismo principio: están formadas por puntos, líneas, que pueden ser rectas o curvas, o planos, que pueden estar distribuidos de manera uniforme o al azar. La aplicación de cada una de estas plantillas dependerá de la muestra y deberá seguir los principios de mantenimiento de una distribución isotrópica, uniforme y aleatoria de las fases. La figura 6-7 muestra algunas de estas estructuras.

Estas grillas se pueden aplicar sobre las imágenes impresas, sobre el ocular del microscopio (como calcomanías), para realizar estudios estereológicos directamente sobre las muestras montadas en el portaobjetos o sobre la imagen digital.



Fig. 6-7. Grillas estereológicas. De izquierda a derecha: Zeiss II; Weibel I; Merz.

Existen otras plantillas para la realización de estudios más específicos, como la de “intercepción cicloidea”, que determina el área de superficies de secciones verticales y la de “intercepción del punto muestreado”, para la estimación de volúmenes celulares y diámetros nucleares, como se observan en la figura 6-8.

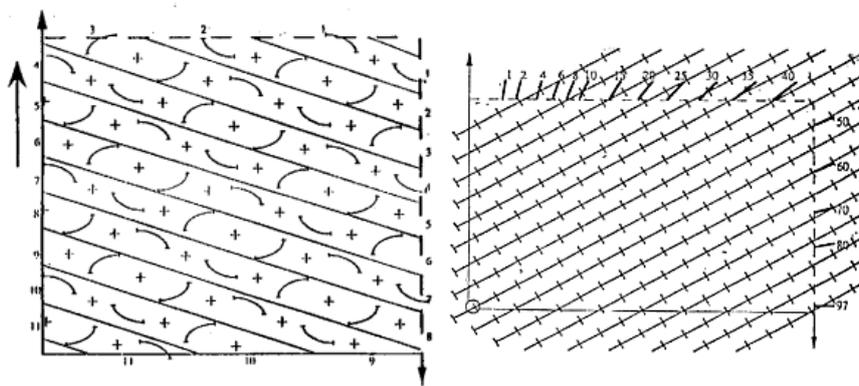


Fig. 6-8. Grillas estereológicas. Izquierda: plantilla para la intercepción cicloidea. En este caso, la longitud del arco cicloideo es igual al ancho del marco dividido 10. La flecha vertical de la izquierda señala la orientación del eje vertical. Derecha: plantilla de intercepción del punto muestreado.

En la grilla de intercepción cicloidea, se cuenta el número de intersecciones entre los arcos y los objetos, así como las intersecciones de las cruces con el fondo. Las líneas oblicuas y sus correspondientes números, ubicados en la periferia de la plantilla, sólo sirven como

referencia mientras se realiza el recuento. Los objetos que tocan los bordes izquierdo e inferior se descartan del recuento. Esta plantilla se usa específicamente para la morfometría de neuronas en cultivo de tejidos.

Para la determinación de la densidad de superficie ( $S_V$ ) se usa la siguiente ecuación:

$$S_V = 2 \left( \frac{p}{l} \right) (M) \left( \frac{\sum I}{\sum P} \right) \quad [6-5]$$

donde,  $p/l$  es la relación entre la frecuencia de puntos dentro del marco de muestreo y la longitud de calibrado de un arco cicloide, expresado en las unidades correspondientes (por ejemplo: 1/2,425 cm);  $M$  es la magnificación de la muestra;  $I$  es la cantidad de intercepciones de la muestra con los arcos y  $P$  es la cantidad de intersecciones de la muestra con las cruces.

La plantilla de intercepción de punto muestreado consiste en dos componentes superpuestos, una grilla de puntos espaciada de manera regular conectada con líneas paralelas y un recuadro con números indicadores distribuidos como el seno de  $\theta$ , desde el eje vertical del lado izquierdo. Cuando la grilla se interpone sobre la muestra se cuentan los puntos ubicados sobre las líneas que contacten con los puntos (Fig. 6-9).

Para determinar el volumen medio de la partícula se usa la siguiente ecuación:

$$V_N = \left( \frac{\pi}{3} \right) \left( \frac{1}{n} \right) \left( \sum l_0^3 \right) \quad [6-6]$$

donde,  $n$  es el número de células muestreadas y  $l_0^3$  es el promedio de la longitud de intercepción elevada al cubo (ajustada de acuerdo a la magnificación).

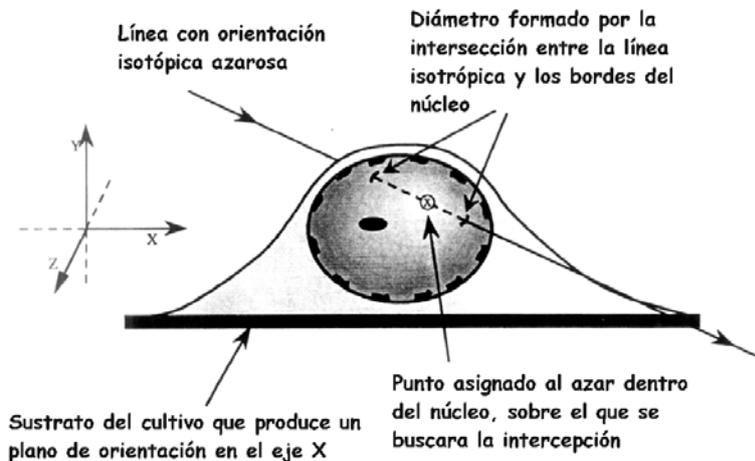


Fig. 6-9. Esquema de una célula de cultivo apoyada sobre un sustrato horizontal (en el eje X) sin poder ser distribuida con igualdad de posibilidades en todas las orientaciones del corte. Dado que los cultivos son anisotrópicos, existe una posibilidad de hacerlos isotrópicos para su estudio estereológico. Para ello se marca un punto dentro del núcleo de manera tal que su posición sea azarosa en las tres direcciones (X,Y,Z). Cuando se interpone la grilla del punto muestreado, la intersección de las líneas con el punto tomado al azar transforma la muestra en isotrópica. La línea de intersección con el punto demarca los bordes del núcleo, lo que permite establecer su diámetro. Modificada de Peterson and Jones. 1993.

Mediante la utilización de diferentes plantillas es posible hacer recuento de elementos, determinar volúmenes y estimar superficies. Una forma de tener todos esos elementos combinados es a través de la plantilla multipropósito de Weibel (Fig. 6-10). Esta grilla consiste en 21 segmentos de muestreo ( $L = 21 Z$ ) dispuestos de manera tal que la distancia entre cada extremo y los seis extremos próximos sea igual a un módulo fundamental  $Z$  (independientemente de cuál sea la longitud de este). De esta manera, la distribución de los 42 extremos o puntos de muestreo ( $P = 42$ ) es regular e independiente de los segmen-

tos que los unen, por lo que pueden usarse para métodos de recuentos de puntos. Los segmentos de muestreo, por su parte, permiten determinar el número de puntos de corte de superficies. El marco que limita la grilla encierra una superficie de muestreo  $F$  que equivale a  $F = 42a \approx 36,4Z^2$ . Cada punto de muestreo de la plantilla equivale a una superficie representada por la ecuación:

$$a = Z^2 \frac{\sqrt{3}}{2} \quad [6-7]$$

Cuando se superpone esta plantilla sobre un tejido se pueden establecer las mismas relaciones vistas con las otras grillas (Fig. 6-11).

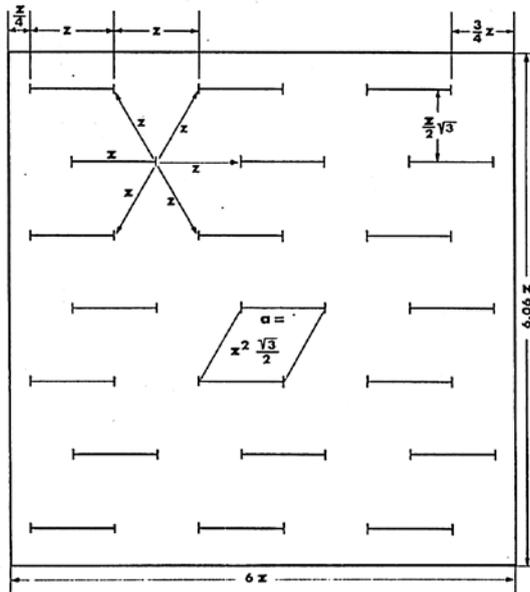


Fig. 6-10. Retículo de Weibel o plantilla multipropósito de la estereología.

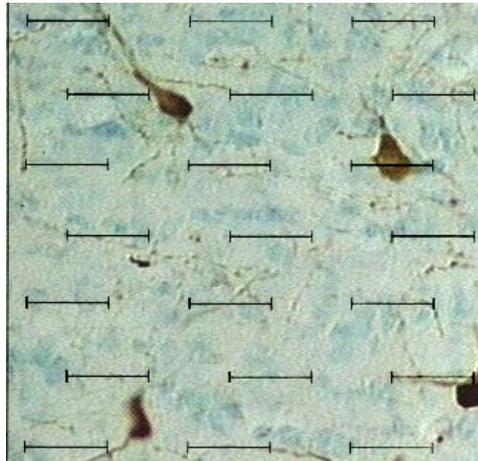
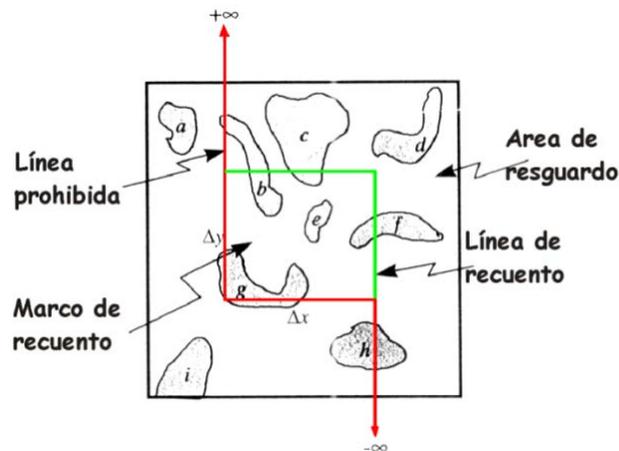


Fig. 6-11. Combinación de la plantilla multipropósito con un corte de tejido nervioso.

Un principio adicional a tener en cuenta al realizar un estudio estereológico es tratar de hacer bien el menor trabajo posible. Esto se logra eligiendo magnificaciones de las muestras y escalas de las grillas de tal manera que con menor cantidad de mediciones o recuentos se abarque una mayor cantidad de campo. Esto no sólo tiene el beneficio del menor trabajo sino que, además, reduce el error de análisis.

Uno de los métodos más sencillos y más populares para el recuento de células nerviosas y otras estructuras es el del disector óptico. Este es un método basado en el disector físico, en el que se cuentan los cuerpos celulares que no aparecen en dos cortes histológicos seriados consecutivos, obtenidos mediante una separación estandarizada. En cada una de las secciones histológicas se interpone una grilla para realizar el recuento de todo lo que se

encuentra dentro de la misma, pero que no se repite en el corte siguiente. Por su parte, el disector óptico no necesita de los cortes físicos para realizar el recuento. Para implementar el método, sólo basta con tener un corte grueso del tejido nervioso e interponer una grilla impresa sobre una transparencia por delante el monitor donde se proyecte la imagen del microscopio (Fig. 6-12).



**Fig. 6-12.** Corte 2D conteniendo objetos al que se le superpone un marco de recuento no sesgado, rodeado por un área de resguardo. El marco de recuento consiste en una línea prohibida (roja) que se extiende hacia arriba y abajo del campo de visión hasta el infinito, y una línea verde (línea de recuento). El área de recuento es  $\Delta x$  multiplicado por  $\Delta y$  unidades cuadradas. Cualquier objeto 2D que sea cortado por la línea prohibida será descartado del recuento (objetos b, g, h). Los objetos que se encuentren dentro del marco (objeto e) y aquellos que sean cortados por la línea de recuento (c y f) entrarán en la sumatoria. Esta aplicación llega a un estimado no sesgado del número de objetos 2D por unidad de área. Modificado de Gundersen, 1977.

El recuento se realiza en el sitio donde recae el marco. Si se mueve la imagen, por ejemplo al mover la platina, el marco recaerá sobre otro sector del mismo tejido, pero sólo se contarán aquellos objetos que no hubiesen sido contados en el sector anterior.

Este recuento 2D también se puede extender a un recuento 3D al utilizar el eje Z del microscopio. En este caso se mantienen las mismas reglas que para el disector óptico 2D, es decir, no se cuentan los objetos que recaen sobre la línea prohibida. A esto debe agregarse que aquellos objetos que se mantengan a lo largo del eje Z se deben contar solamente una vez. Si en el desplazamiento en vertical de la platina, un objeto “permitido” toca la línea prohibida, será descontado de la sumatoria final. Mediante este método el recuento está asociado con un espacio de volumen igual al área del recuadro, multiplicado por la distancia entre la primera y última posición de la platina. Esta forma de recuento es un estimador no sesgado de la densidad numérica.

Una de las preguntas que tal vez aflore en este tipo de estudios es acerca de cuál es la cantidad de muestras que deben ser analizadas para que los resultados sean confiables y precisos en el sentido estadístico. La precisión de un valor medio estimado está dada por el intervalo de confianza asignado al estimado de la media, definido por:

$$IC = \bar{X} \pm 2\sigma_{\bar{X}} \quad [6-8]$$

donde,  $\sigma$  es el error estándar de la media determinada para la muestra bajo análisis. Los 2 errores estandarizados abarcan el 95% de la muestra. El 95% de intervalo de confianza (IC) significa que la probabilidad que la verdadera media de la población se encuentre dentro de este rango es 0,95. Por lo tanto, la precisión con que se estima la media de la población está dada por  $\sigma_{\bar{X}}$ . Esta propiedad es computada desde la medición del desvío estándar de la muestra calculada a través de:

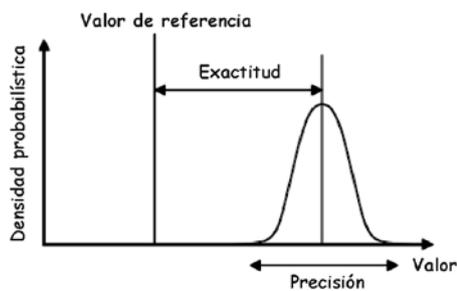
$$\sigma_{\bar{X}} = \frac{\sigma_x}{\sqrt{n}} \quad [6-9]$$

donde,  $n$  es la cantidad de lecturas realizadas en la muestra. Cuanto menor sea el intervalo de confianza, mayor será la precisión del estimado. Esta precisión puede ser incrementada de dos maneras:

- Incrementando el número de campos  $n$  a medir en la muestra. Si se toman cuatro veces más mediciones, se reduce el intervalo de confianza a la mitad, por lo que la estimación será el doble de precisa.
- Disminuyendo el desvío estándar de la muestra, que es un estimado de la raíz cuadrada de la varianza de la población.

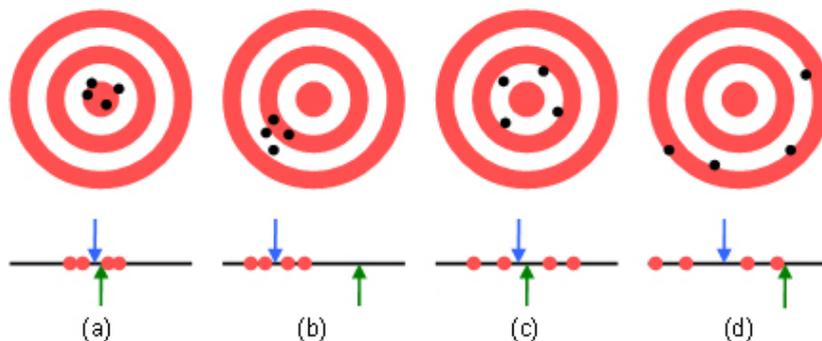
La precisión se define en términos de repetitividad o reproducibilidad. La primera es la capacidad del método de medición para obtener los mismos resultados utilizando los mismos métodos, durante un tiempo corto. La segunda, es la capacidad del método de medición para obtener los mismos resultados utilizando distintos métodos, durante largos períodos.

La exactitud se define como el acuerdo entre la medición y alguna norma objetiva tomada como "verdad". La figura 6-13 sugiere la diferencia entre precisión y exactitud. De esto se desprende que una medición muy precisa pero inexacta es, por lo general, bastante inútil. La figura 6-14 muestra estas diferencias sobre un gráfico 1D y 2D.



**Fig. 6-13.** La exactitud indica la proximidad de los resultados de la medición al valor real, mientras que la precisión los es a la repetitividad o la reproducibilidad de la medición.

Por lo general, los estudios estereológicos se realizan sobre fotografías o sobre el mismo material montado en el microscopio. Sin embargo, estos estudios también se pueden realizar con la ayuda de programas informáticos de análisis. Los sistemas informáticos no son mucho más precisos que los métodos manuales o visuales, ya que requieren de una programación específica para que en cada caso analizado se puedan encontrar los puntos de interacción entre la grilla y la muestra. No obstante, existen ciertas ventajas sobre los métodos manuales, que están dadas por la posibilidad de procesamiento de la imagen digital. Mediante la aplicación de filtros es posible agudizar los bordes de los objetos, modificar la luz y contraste, separar objetos unidos por defectos del sistema óptico, etc.



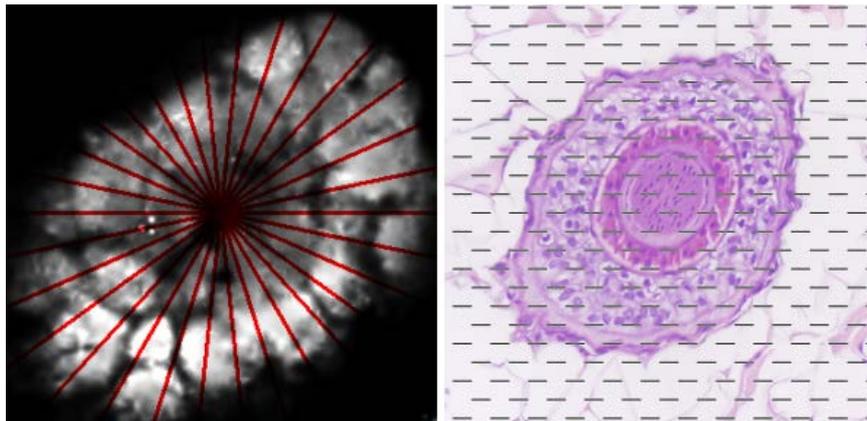
**Fig. 6-14.** Se ilustra las cualidades de la exactitud y la precisión en una gráfica 2D (blanco de tiro) y 1D (abajo). Para el blanco de tiro, la diana (punto central) es el valor esperado. Para las líneas, la flecha verde indica este valor, mientras que la flecha celeste indica el valor medio. a) alta exactitud, alta precisión; b) baja exactitud, alta precisión; c) alta exactitud, baja precisión; d) baja exactitud, baja precisión.

La superposición digital de las grillas también tiene ventajas sobre aquellas impresas sobre transparencias. En primera instancia, en un sistema de análisis digital no es necesario usar

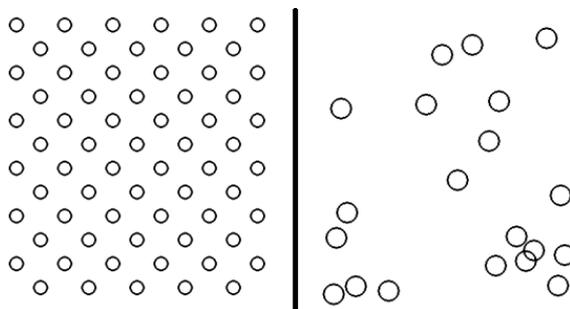
la impresora. Asimismo, la unión entre dos imágenes digitales es estable, a diferencia de la grilla transparente que puede desplazarse por descuido. Comparada con las grillas adheridas a los oculares microscópicos, la estereología digital permite observar la imagen en pantallas de diferentes tamaños y resoluciones, evitando el cansancio que implica la observación a través del dispositivo. Por otra parte, los puntos de intersección quedan registrados para un segundo control, situación que evidentemente no sucede mediante el método ocular.

Otra ventaja que ofrece la estereología digital es la posibilidad de utilizar la calibración espacial de la imagen para calcular datos tales como superficie de área o superficie del plano, volumen, etc. Asimismo, en los sistemas digitales se pueden generar distintos tipos y tamaños de grillas, con puntos o líneas distribuidas de manera uniforme o aleatoria y con diferentes intervalos de separación, de manera mucho más dinámica que con el proceso manual. Más aún, también se puede cambiar el color de los marcadores para su mejor identificación sobre imágenes monocromáticas o color. Finalmente, la grilla digital seleccionada se aplica matemáticamente sobre la imagen, independientemente de su contenido, mientras que la tendencia humana es a sesgar su ubicación de acuerdo a la conveniencia de los resultados esperados.

Por lo general, se interponen grillas blancas o negras sobre imágenes de color y plantillas de color sobre imágenes monocromáticas. Sobre estas últimas, lo conveniente es interponer grillas de color rojo ya que contrasta con los grises. El color azul es a veces indistinguible del negro y los colores verdes tienden a verse más anchos de lo que realmente son. En la figura 6-15 se muestran grillas superpuestas sobre una imagen color y otra monocromática.



**Fig. 6-15.** Izquierda: 30 líneas concéntricas superpuestas sobre una imagen monocromática mediante el operador matemático AND. Derecha: segmentos de líneas de disposición ortogonal superpuestos sobre una imagen color por medio del operador matemático XOR.



**Fig. 6-16.** Grillas con círculos. Izquierda: 72 elementos (radio 10 píxeles) de disposición ortogonal. Derecha: 20 elementos (radio: 15 píxeles) de disposición aleatoria.

Mediante la computadora se pueden generar diferentes tipos de grillas, dependiendo de las necesidades de la imagen sobre la que se está operando. Así, las plantillas pueden presentar pequeños círculos vacíos donde se considerarán los puntos de interés que se encuentren dentro de sus bordes. De esta manera, el evento es fácilmente reconocido. Si la distribución de los objetos dentro de la imagen es aleatoria, entonces la distribución de los marcadores en la grilla debe tener un patrón de distribución regular. Si por el contrario, la distribución de los objetos es regular, la plantilla deberá contener elementos distribuidos al

azar (Fig. 6-16). Estos mismos patrones se pueden reproducir para puntos y líneas, como lo muestra la figura 6-17.

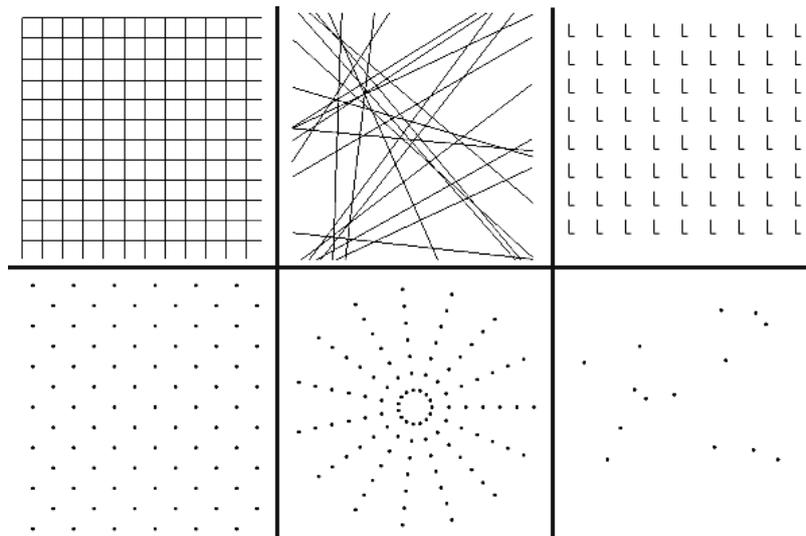


Fig. 6-17. Arriba: grillas con líneas. De izquierda a derecha: distribución ortogonal; aleatoria y segmentos ortogonales. Abajo: grilla de puntos (distribución ortogonal; concéntrica y aleatoria).

La forma de contar y medir a través de los estudios estereológicos sobre imágenes digitales puede variar dependiendo si los métodos son manual, semi-automatizados o totalmente automatizados, éstos últimos a través de algoritmos macros, que serán descriptos más adelante.

### Calibración

Como se describió en el Capítulo 1, toda medición realizada sobre imágenes digitales se basa en la estructura de los píxeles, ya sea por recuento de los mismos, por determinación de la distancia entre ellos o por sus valores de intensidad. Por ende, los resultados de cada una de estas mediciones podría expresarse en términos de unidades de píxel. Sin embargo, estos datos carecen de sentido en el mundo real. Para poder expresar los resultados numéricos en escalas reconocidas universalmente se debe establecer una relación entre las características de los píxeles (dimensión e intensidad) y las características de los objetos a cuantificar.

Las mediciones que se pueden realizar sobre los distintos objetos pueden ser encuadradas en cuatro determinaciones generales: localización (absoluta o relativa a otros objetos), tamaño, forma e intensidad (incluye el brillo del objeto, su densidad y su color). Para obtener los valores apropiados al utilizar las tres primeras evaluaciones se debe realizar una calibración espacial. Para el último análisis, se requiere una calibración de intensidad.

### Calibración espacial

Este proceso consiste en determinar la relación entre el tamaño real de un objeto y su representación en píxeles dentro de la imagen. De esta manera, no sólo se establece una fuente de medición en escala real, sino que además, se puede corregir la perspectiva de la cámara y la posible distorsión de las lentes.

Para imágenes capturadas con cámaras fotográficas, existen tres niveles de calibración espacial que permiten corregir diversos tipos de distorsiones.

1. Una calibración simple, que asume que la cámara está ubicada de manera perpendicular a la escena y muy lejos de ésta, por lo que la perspectiva y la distorsión de la lente son insignificantes. El único requerimiento para esta calibración es un objeto de referencia de unidades estructurales conocidas, como puede ser una regla o un calibre. En las imágenes satelitales se suele incluir una barra de calibración. De esta manera es fácil convertir píxeles a coordenadas del mundo real.

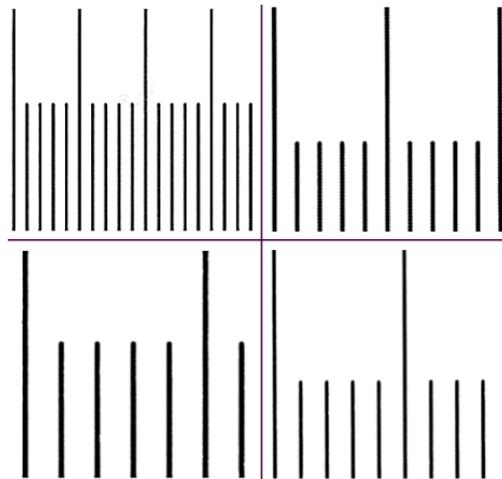
2. Una calibración perspectiva que corrige los efectos derivados de la cámara posicionada en un ángulo con respecto a la escena. En este caso, se aplica una corrección lineal basada en la geometría de la situación. Aquí también se requiere de un objeto de referencia orientado en la posición de la perspectiva
3. Una calibración no lineal, que es el tipo más abarcador y es capaz de corregir la distorsión radial de las lentes, así como cualquier otro tipo de distorsiones derivadas de defectos en las mismas, las condiciones atmosféricas, las superficies irregulares de la imagen, etc.

La calibración en las imágenes digitales obtenidas del microscopio es mucho más sencilla de realizar. Dado que la estructura del microscopio es fija, la relación entre el objetivo, el tubo de proyección, el adaptador de la cámara y la cámara puede ser fácilmente calculada para otorgar un valor lineal (micrómetros o milímetros) a los píxeles. Cuando varía alguno de estos componentes, los valores deben ser recalculados. En el Capítulo 3, la Tabla 3-11 muestra la calibración espacial de los píxeles de la imagen para los distintos tipos de objetivo seleccionados y los distintos tamaños de fotosensores del CCD, dependiendo de la magnificación de adaptador de la cámara. Para realizar el cálculo de la resolución espacial de los píxeles de una imagen digital microscópica, se recurre a la ecuación:

$$RE_{Px} = \frac{RE_{FCCD}}{M_O * M_A} \quad [6-10]$$

donde, la resolución espacial del píxel de la imagen ( $RE_{Px}$ ) se obtiene de la división entre el tamaño del fotosensor del CCD ( $RE_{F-CCD}$ ), la magnificación del objetivo ( $M_O$ ) y la magnificación del adaptador de la cámara ( $M_A$ ).

Cuando la imagen microscópica a analizar no fue almacenada con el mismo programa o cuando se desconocen las características del equipo donde fue adquirida, es necesario recurrir a una calibración manual. Si la imagen cuenta con una barra de calibración, ésta será tomada como referencia para establecer su calibración espacial. En este caso, la conversión es sencilla, ya que la longitud de píxel se establece por división directa entre el valor asignado a la barra y la cantidad de píxeles que la conforman. Por su parte, la cantidad de píxeles por unidad se obtienen invirtiendo el resultado anterior.



**Fig. 6-18.** Todas las reglas micrométricas fueron observadas con un objetivo de 20x con un tubo adaptador de la cámara de 1x. Arriba: Las imágenes fueron capturadas con las cámaras analógicas Sony A-151 (izquierda) y Sony DXC-390 (derecha). El tamaño de píxel de las cámaras es de  $12,7\mu\text{m} \times 12,7\mu\text{m}$  para la primera y  $7,4\mu\text{m} \times 7,4\mu\text{m}$  para la segunda, las que generan una resolución espacial de  $0,63 \mu\text{m}/\text{Px}$  y  $0,37 \mu\text{m}/\text{Px}$ , respectivamente. Abajo: imágenes capturadas con las cámaras digitales QImaging Evolution v7 (izquierda) y Olympus DP71 (derecha). El tamaño de píxel de las cámaras es de  $4,65 \mu\text{m} \times 4,65 \mu\text{m}$  para la primera y  $6,45 \mu\text{m} \times 6,45 \mu\text{m}$  para la segunda, lo que genera una resolución espacial de  $0,23 \mu\text{m}/\text{Px}$  y  $0,32 \mu\text{m}/\text{Px}$ , respectivamente.

Si no se dispone de barra de calibración pero se conoce la magnificación del sistema óptico con la que se obtuvo la imagen, se puede establecer la calibración de manera indirecta.

Para ello, se debe utilizar una regla micrométrica, cuya imagen debe ser capturada con cada uno de los objetivos que se quieran calibrar. De esta manera, se establecen las unidades de longitud sobre dicha regla como si fuera la barra de calibración. El valor espacial del píxel obtenido para cada magnificación es posteriormente asignado a la imagen que se vaya a analizar. En la figura 6-18, se comparan las imágenes de la misma regla micrométrica al utilizar un objetivo 20x, capturadas con cámaras cuyos fotosensores tienen diferentes dimensiones.

### Calibración de intensidad

El proceso de calibración de las imágenes por intensidad no es sencillo ya que la mayoría de los dispositivos de captura de imágenes no son perfectamente lineales o exactamente logarítmicos, ni siquiera completamente consistentes en la relación entre la expresión del valor numérico del píxel y la señal de ingreso (intensidad de los fotones). Muchas cámaras tienen funciones de salida de señal que varía en respuesta al nivel general de iluminación. Los programas de captura que regulan de manera automática la intensidad de la luz, en dependencia con las diferentes densidades del tejido observado, no permiten que exista uniformidad lumínica entre las imágenes. El problema con las cámaras color es que sus sensores para R, G y B responden a un rango relativamente amplio de longitudes de onda y por lo tanto, muchas combinaciones de diferentes longitudes de onda e intensidades reales pueden producir idénticos valores de color. Consecuentemente, no es recomendable realizar estudios de colorimetría (medición de color) usando este tipo de cámaras.

Cuando se pretende calibrar una imagen por su intensidad de luz, lo conveniente es agregar un patrón de intensidades estándar que permitan equiparar los valores adquiridos con los valores estandarizados. Estos estándares pueden introducirse simultáneamente con la muestra, en el mismo portaobjetos o junto al objeto escaneado, y utilizarlo para calibrar el sistema con cierta regularidad. Una de las formas de calibrar la intensidad de la imagen es de manera lineal, donde a un valor de píxel se le asigna aquel que corresponde a un patrón de medida, tal como la temperatura, altitud, concentración de proteínas, etc. Otras de las formas es a través de la densidad óptica (DO).

La DO se define como:

$$DO = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right) \quad [6-11]$$

donde,  $I/I_0$  es la fracción de la luz incidente que penetra a través de la muestra sin haber sido absorbida o dispersada.

La figura 6-19 muestra la asignación de valores de DO a cada uno de los intervalos de intensidad de una imagen monocromática de 8 bits, considerando que la fuente de luz de la cámara o el escáner están bien calibrados, de manera que todo el rango de valores de intensidad vaya de 0 a 2,4.

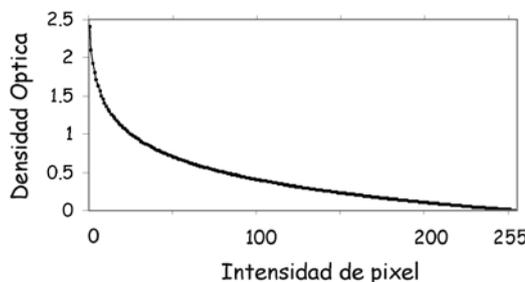
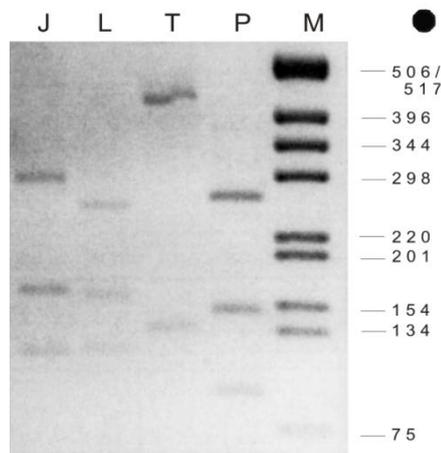


Fig. 6-19. Relación entre la densidad óptica (expresada como valores absolutos) y la intensidad de píxel.

En los valores altos de intensidad (baja densidad), las diferencias entre píxeles se encuentran en el orden de las milésimas de DO, mientras que en el otro extremo, se alcanzan diferencias de valor de píxel de hasta 0,3 DO. Esta gran diferencia indica que cuando se intentan realizar mediciones de DO con imágenes provenientes de cámaras o escáner lineales, se necesitan más de 8 bits de escala de grises. En estos casos, se debe utilizar un convertidor de la escala lineal a logarítmica para poder almacenar sus valores.

El uso de las escalas de calibración trae otros inconvenientes. Por lo general, la densidad o cualquier otra propiedad que se calibre en contra de la intensidad de píxel, no se registra de manera lineal. Los píxeles varían en intensidad dentro de la imagen. Si todos los píxeles dentro de la muestra fuesen promediados en intensidad y sus valores fueran posteriormente convertidos a través de la escala calibrada, se obtendrían datos erróneos. Lo correcto es convertir la intensidad de cada píxel en su correspondiente valor de acuerdo a la escala calibrada y, posteriormente, realizar las operaciones de promedio, suma o lo que correspondiera. Cuando se analiza un objeto en particular dentro de la imagen, es necesario delimitarlo por sus bordes para evitar que las intensidades del fondo puedan influir de manera negativa en los resultados. Si fuera posible, esta delimitación no debería ser manual debido a los posibles errores humanos. En su lugar, sería deseable recurrir a los procesos de delimitación antes mencionados (filtros, umbralización).

La determinación de la concentración de proteínas dentro de un gel de poliacrilamida se resuelve mediante estudios de DO (Fig. 6-20). Para ello, el sistema debe ser previamente calibrado. Si se circunscribe cada una de las bandas de la línea patrón, es posible determinar su densidad/intensidad promedio, su área y por ende, su densidad óptica integrada (densidad x área), lo que da un conocimiento de la cantidad total del marcador. Para construir una escala más precisa, se suele escanear el gel en forma conjunta con una tira de grises de intensidad conocida.



**Fig. 6-20.** Imagen escaneada de un gel de poliacrilamida. Se muestran las bandas de cada uno de los grupos experimentales (J-L-T-P). La línea M contiene los patrones de pesos moleculares conocidos (pares de bases). En el extremo superior derecho se encuentra la imagen de una moneda escaneada en forma conjunta con el gel para tomar de referencia como valor de máxima densidad. (Imagen gentilmente cedida por el Dr. G. Giovambattista, IGEVET, Universidad Nacional de La Plata).

Los colores que se observan en la imagen digital no son exactamente los mismos que se observan en la naturaleza. La cercanía a estos valores depende de la forma de digitalizar la imagen. Cuantos más bits se asignen por canal de color, mayor será la precisión entre el color digital y el real. La digitalización de los colores requiere un control más exhaustivo de los parámetros e iluminación de las cámaras de captura. Aún el escáner plano, que tiene mayor consistencia de iluminación que las cámaras y que, por lo general, usa un CCD lineal con filtros para obtener la imagen RGB, no es el ideal para medir la información de color. Dado que los filtros de estos dispositivos seleccionan amplios intervalos de longitudes de onda, puede suceder que, a pesar que se generen combinaciones enteramente diferentes de intensidad y de color, se obtengan los mismos resultados. Sin embargo, estos escáneres pueden ser calibrados para reproducir colores de manera apropiada a través del monitor de la computadora y en la impresora.

La calibración de los dispositivos de captura se puede realizar mediante el escaneo de un patrón de colores (GretagMacbeth ColorChecker®) que consiste en un cartón dividido en 24 sectores cuadrados dispuestos en 4 filas y 6 columnas, conteniendo pintura mate aplicada sobre un papel suave, separados por bordes de color negro (Fig. 6-21). Dentro de cada sector se observa un color particular que presenta una reflectancia espectral que trata de imitar aquella de los objetos naturales, de manera tal de tener una apariencia de color consistente, bajo diferentes condiciones de luz, y que sea estable en el tiempo. Estos patrones de color pueden ser capturados por las cámaras y escáneres y la imagen obtenida puede ser comparada con la tabla original. El sistema de color  $CieL^*a^*b$  permite adaptar los colores originales a las imágenes digitales. De todas maneras, es necesario recordar que estas curvas de calibración están diseñadas exclusivamente para lograr una correspon-

dencia visual pero no para la medición del color. Las imágenes digitales registran exclusivamente la intensidad integrada a través de un rango amplio de longitudes de onda que pasan a través de filtros RGB.

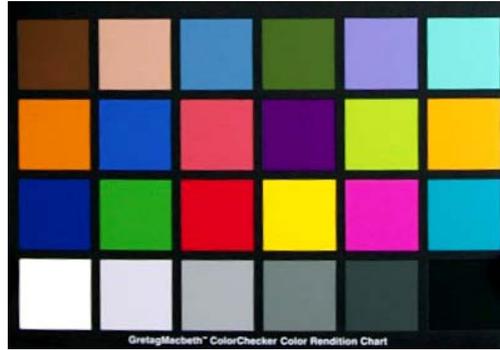


Fig. 6-21. Patrón de colores de GretagMacbeth ColorChecker®. La fila inferior contiene una escala de grises uniforme, con el blanco y el negro en sus extremos. La tercera fila contiene los colores primarios y secundarios. Las filas superiores contienen una gama de colores que representan intensidades de interés general para distintos propósitos. Así, en la primera fila se representan colores naturales. De izquierda a derecha: piel oscura, piel clara, cielo azul, follaje, flor azul y verde azulado. Los de la segunda fila son colores misceláneos. De izquierda a derecha: naranja, azul púrpura, rojo moderado, púrpura, verde amarillo (que representa al limón) y amarillo naranja (que representa a la naranja).

Las intensidades de los fluoróforos expuestos a la luz no sólo dependen de las técnicas de tinción y de las características del tejido sino además, del tiempo de exposición, ya que son frecuentes los procesos de fotoblanqueo. La calibración y la cuantificación de las imágenes fluorescentes no es sencilla. Una cuantificación confiable sería aquella que permitiera comparar imágenes tomadas con diferentes microscopios, diferentes objetivos o hasta en diferentes días. Una imagen fluorescente puede ser descrita en términos de:

$$P(x, y) = I(x, y) * D(x, y) * F(x, y) * t_i(s) \quad [6-12]$$

donde, para las coordenadas  $x, y$  de la imagen fluorescente  $P(x, y)$ ,  $I(x, y)$  es la distribución de la iluminación de todo el campo de visión;  $D(x, y)$  es la distribución de la eficiencia de detección;  $F(x, y)$  es la distribución de la fluorescencia en cada uno de los píxeles de la muestra y  $t_i(s)$  es el tiempo de exposición de la imagen en segundos. Por lo tanto, se deben tener presentes todos estos factores al momento de realizar la cuantificación.

La muestra de calibración de la fluorescencia consiste en la distribución uniforme de un fluoróforo sobre la superficie de un polímero (polivinil-alcohol). Por lo general, se utiliza el tiocianato de fluoresceína ya que presenta la particularidad de no recuperarse del fotoblanqueo luego de pocos minutos de exposición con una lámpara de mercurio. Si la muestra de calibración y la muestra experimental son capturadas bajo las mismas condiciones, es posible determinar la corrección de sombras de la imagen. Esto se debe a que en la relación entre ambas muestras, desaparecen la distribución de la iluminación y de la eficiencia de detección, de acuerdo a las siguientes relaciones que toman como base la ecuación [6-12]:

$$P_R(x, y) = I(x, y) * D(x, y) * F_R * t_{iR}(s) \quad [6-13]$$

Imagen de referencia

$$P_C(x, y) = \frac{P(x, y)}{P_R(x, y)} = \frac{F(x, y)}{F_R} * \frac{t_i(S)}{t_{iR}(S)} \quad [6-14]$$

Imagen calibrada

Por la misma razón, las imágenes fluorescentes tomadas bajo diferentes condiciones de captura pueden ser directamente cuantificadas en relación con la otra, si no se interponen otros factores, ya que se expresan en unidades de la muestra de fluorescencia estandarizada.

La distribución de la iluminación en un microscopio puede ser determinada a partir del comportamiento de fotoblanqueo producido en cada píxel de una serie de imágenes, tomadas en función del tiempo de exposición. Mediante estas pruebas es posible determinar la distribución de la intensidad de excitación y la eficiencia de detección. La intensidad de fluorescencia puede hallarse mediante la siguiente expresión:

$$I_f(t_b) = C + Ae^{[-kt_b]^\beta} \quad [6-15]$$

donde,  $I_f(t_b)$  expresa la intensidad de fluorescencia en cuentas;  $C$  es la intensidad de fluorescencia del fondo sin fotoblanquear;  $A_{exp}$  es la intensidad de fluorescencia fotoblanqueada;  $k$  es la relación de fotoblanqueo;  $t_b$  es el tiempo de exposición al fotoblanqueo y  $\beta$  es un coeficiente exponencial con valores entre 0 y 1, que corrige la curva de decaimiento mono-exponencial de la intensidad de fluorescencia, para un soporte de polímero. La relación de fotoblanqueo  $k$  es linealmente proporcional a la intensidad de iluminación, cuando se utiliza una lámpara de arco. Dado que la imagen de referencia posee características fotoblanqueantes espaciales muy uniformes, también es posible obtener la distribución de iluminación de la muestra  $I(x, y)$ , independientemente de la distribución de detección  $D(x, y)$ .

Esta distribución de la iluminación puede derivarse del análisis del comportamiento del fotoblanqueo de la muestra de calibración. Para esto, se toman una serie de imágenes de un testigo, durante el cual se produce hasta el 30% de fotoblanqueo desde su intensidad inicial. De esta manera, se puede derivar la distribución de la intensidad de iluminación  $I(x,y)$  de la relación de fotoblanqueo  $k$ , aparte del factor constante.  $k_0$  es una constante de fotoblanqueo para el material testigo utilizado. La distribución de la intensidad de iluminación  $I(x,y)$  puede ser utilizada para la determinación de las condiciones de iluminación del microscopio, tales como alineación y desigualdad de iluminación. Al dividir  $P_r(x,y)$  por  $I(x,y)$ , que se obtiene del proceso de fotoblanqueo, se consigue la distribución de detección de la sensibilidad  $D(x,y)$  del microscopio.

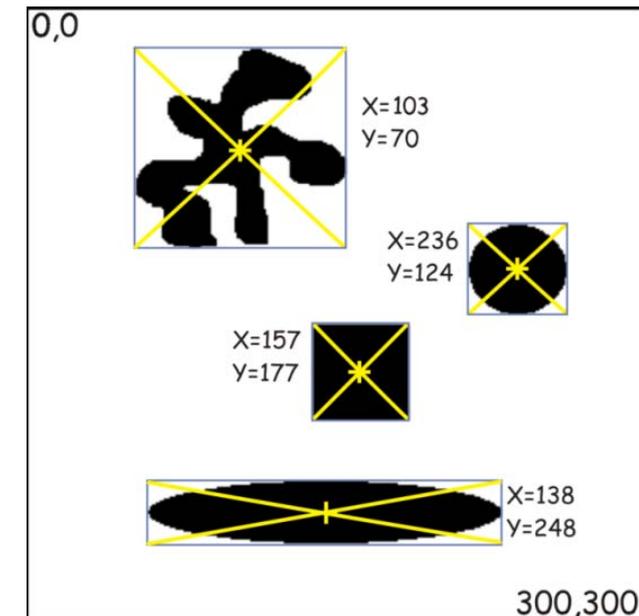
La calibración de la intensidad es de suma importancia para la medición de procesos biológicos a través de técnicas especializadas que incluyen la intensidad de fluorescencia, FLIM (“*Fluorescence Lifetime Imaging*”), FRET (“*Emission Depletion Fluorescence Resonance Energy Transfer*”), FRAP (“*Fluorescence Recovery After Photobleaching*”) y FCS (“*Fluorescence Correlation Spectroscopy*”), entre otras.

### ***Determinación de la localización***

Los objetos ubicados dentro de la imagen tienen un posicionamiento específico (posición absoluta) que está determinado por las coordenadas X,Y de sus puntos, en referencia con los píxeles que ocupa. Asimismo, tiene un posicionamiento relativo a otros objetos que también tienen sus propias coordenadas absolutas. El conocimiento de la posición de un objeto dentro de la imagen tiene muchas aplicaciones en las distintas ramas de la ciencia. Sirve para establecer una ubicación espacial dentro de todo un contexto y para determinar distancias, por ejemplo, entre células en un tejido, entre componentes electrónicos dentro de un circuito o entre estrellas en el cosmos.

Para establecer la distancia entre objetos, primero es necesario establecer el punto medio de los mismos. En un objeto regular como un círculo, el punto medio coincide exactamente con su centro (centro geométrico). Pero lo cierto es que en la mayoría de los objetos con los que se trabaja habitualmente, al menos en las ciencias biológicas, no tienen una forma regular.

La manera más sencilla de establecer las coordenadas X,Y del punto medio de un objeto se logra mediante la determinación de los límites máximos y mínimos de los píxeles que lo determinan. Estos límites son fácilmente calculados si se encuentran los píxeles con las coordenadas más grandes y más pequeñas en la posición horizontal y vertical. El valor de las coordenadas determina un rectángulo virtual alrededor del objeto. El punto de entrecruzamiento de las dos diagonales de dicho rectángulo es el punto central buscado.



**Fig. 6-22.** Las coordenadas X,Y del centro geométrico de los diferentes objetos regulares e irregulares se pueden localizar trazando un rectángulo virtual a su alrededor que toque todos sus puntos extremos. El entrecruzamiento de las dos rectas diagonales del rectángulo determina el centro geométrico del objeto. Los valores corresponden a las coordenadas en X e Y, con respecto a la disposición de los píxeles en una imagen con una resolución de 300x300.

Por lo general, la información está referida al posicionamiento del objeto respecto a la imagen que lo contiene y se expresa en números enteros o de punto flotante, considerando como punto inicial a aquel que se encuentre en el extremo superior izquierdo (más cercano a las posición 0,0 de la imagen). En la figura 6-22 se observan las coordenadas del centro geométrico de los objetos dentro de la imagen, siempre teniendo como referencia las coordenadas 0,0 de la misma. Si la imagen estuviese calibrada espacialmente, los valores de las coordenadas X,Y estarían expresados en las unidades de calibración ( $\mu\text{m}$ , mm, km, etc.).

Si el objeto estuviese circunscrito en un círculo en lugar de un rectángulo, la determinación del centro geométrico sería más precisa. Esto se debe a que solamente se usan los puntos que representan los vértices de un polígono inscrito, el que se consigue por determinación de los límites máximos y mínimos del objeto que gira en intervalos de 10 grados. Para un objeto no convexo o uno que contenga orificios en su interior, el centro geométrico podría caer por fuera de sus límites. Para los objetos irregulares es preferible tomar en cuenta la forma y la ubicación de todos los píxeles presentes. Esto define el centroide o centro de gravedad, que es el punto equidistante desde todos los bordes que conforman al elemento de análisis. Las coordenadas de este punto se obtienen a través del promedio de las coordenadas de cada píxel que lo conforma, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$CG_X = \frac{\sum_i X_i}{Area} \quad [6-16]$$

$$CG_Y = \frac{\sum_i Y_i}{Area} \quad [6-17]$$

donde el área es el número total de píxeles, tanto para la determinación del centro de gravedad (CG) de X como el de Y. Estas ecuaciones proveen coordenadas que no necesariamente tienen valores enteros.

El centro de gravedad o centroide puede ser determinado con exactitud a nivel de sub-píxel, hecho fundamental para localizar objetos en una imagen. En objetos no convexos, el centro de gravedad puede caer por fuera de los límites del mismo. La figura 6-23 muestra las diferencias entre el centro geométrico y el centro de gravedad de un objeto irregular.

Como se observa en la figura 6-24, el “peso” de los píxeles influencia la posición del centroide. Si sólo se consideran los bordes de un objeto, la posición del centroide será distinta a si en su cálculo intervienen todos los píxeles que lo constituyen.

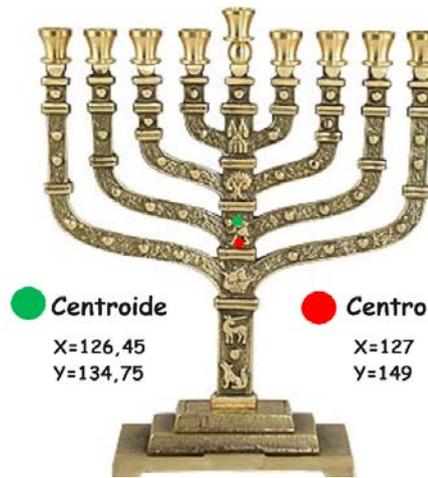


Fig. 6-23. Por lo general, el centro geométrico de un objeto irregular no coincide con el centro de gravedad (centroide).

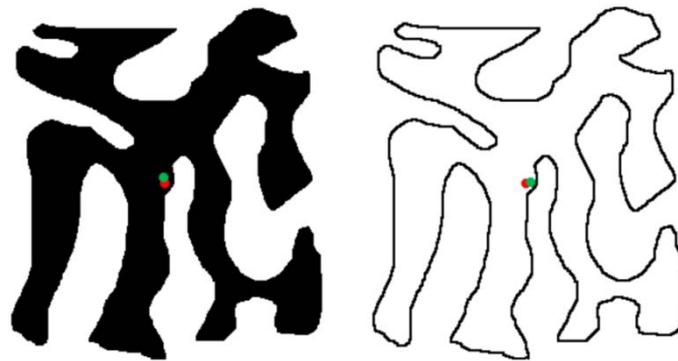


Fig. 6-24. Si bien el centro geométrico (punto rojo) de un objeto no se modifica, independientemente de si está representado en su totalidad o sólo por sus bordes, para el centro de gravedad (punto verde) estas diferencias pueden ser sustanciales. En la figura rellena, las coordenadas calibradas de X,Y del centroide son 143,34 y 146,42, mientras que las de la figura de bordes son 146,39 y 149,58.

Para la determinación del centro de gravedad, todos los píxeles son tratados de la misma manera, independientemente de su valor de intensidad. Sin embargo, para ciertos propósitos, los valores de intensidad calibrados o no, pueden determinar que el centro de gravedad se convierta en un centro de densidad, que no necesariamente ocupa el mismo lugar en el espacio. Este punto (centroide de densidad o centro de masa) puede ser calculado por sumatoria de los valores de intensidad/densidad de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$CD_X = \frac{\sum_i Valor_i * X_i}{\sum_i Valor_i} \quad [6-18]$$

$$CD_Y = \frac{\sum_i Valor_i * Y_i}{\sum_i Valor_i} \quad [6-19]$$

El denominador es ahora cualquier parámetro relacionado con la intensidad (densidad integrada, densidad media, etc.). Este cálculo requiere de la extracción del valor de cada uno de los píxeles que conformen el objeto, así como de una curva de calibración; por lo tanto, en este caso, no se puede utilizar el contorno de los mismos. En objetos no convexos, el centroide de densidad puede caer por fuera de los límites del mismo. La figura 6-25 muestra la ubicación espacial del centroide de masa en comparación con el centro de gravedad y el geométrico.

La localización relativa de un mismo objeto se establece mediante las diferencias entre su posición inicial y su posterior ubicación de haber existido desplazamiento. Este proceso se verá más adelante.

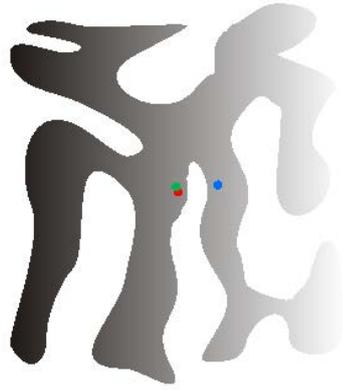


Fig. 6-25. Al variar las intensidades de los píxeles que conforman el objeto, el centroide de densidad (punto azul) no coincide con el centroide de gravedad (punto verde), ni con el centro geométrico del objeto (punto rojo).

### Determinación de la orientación

La orientación de un objeto está determinada por el ángulo que se forma entre su eje mayor y la vertical. Existen dos tipos de parámetros que permiten medir el eje mayor de un objeto: el primero es el que se forma trazando una línea entre sus puntos más extremos (también llamada “máxima dimensión de calibración” o máximo diámetro de Feret), que es independiente del momento angular. Esta línea está determinada por el rectángulo que lo circunscribe (Fig. 6-26). El segundo es el que corresponde a la línea que une los extremos de una elipse que circunscribe al objeto, teniendo en cuenta su momento angular. Este es el eje que mejor se adapta a todos los píxeles del objeto, en el sentido que se minimiza la suma de los cuadrados de las distancias individuales de los píxeles hacia esta línea. Este último parámetro es preferible al del diámetro de Feret, ya que toma en consideración todos los píxeles que forman la imagen y no sólo los de los extremos, máxime, cuando por errores de captura se pueden adicionar ruidos que modifiquen los bordes del objeto.

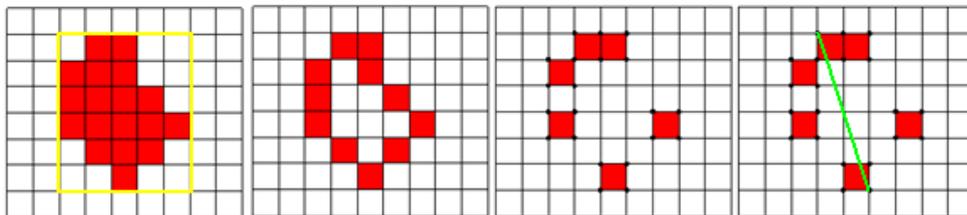


Fig. 6-26. Determinación del máximo diámetro de Feret. De izquierda a derecha: la imagen original; píxeles que forman el perímetro; píxeles que forman las esquinas; distancia entre puntos más distantes.

La determinación de la orientación se puede aplicar a objetos con superficie o solamente a líneas. En los primeros, es necesario encontrar el eje mayor basado en la sumatoria de posicionamiento con relación a este eje y luego calcular su ángulo con respecto a la vertical. La figura 6-27 muestra la distribución aleatoria de granos de cacao sobre una superficie. Luego de establecer sus ángulos de orientación, se los puede clasificar en base a éste parámetro y visualizar más fácilmente mediante colores de paleta.

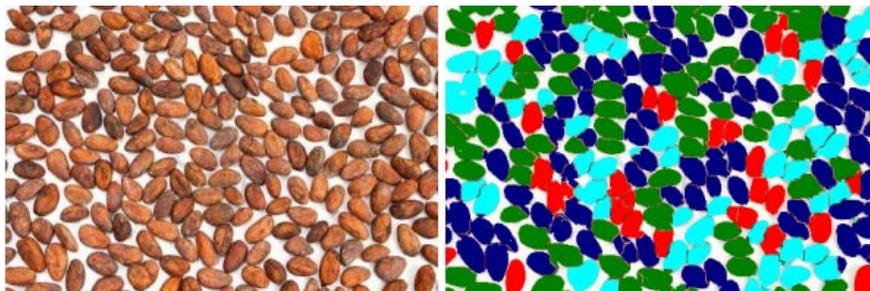
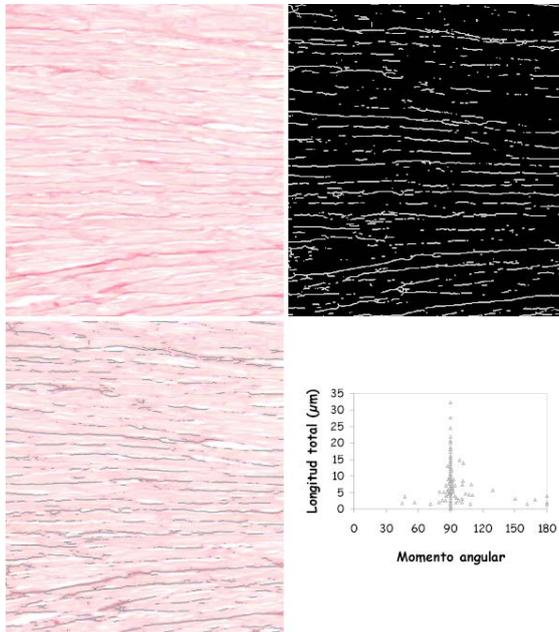


Fig. 6-27. Distribución aleatoria de granos de cacao (izquierda). Una vez determinado su ángulo de inclinación, se los puede clasificar de acuerdo al mismo. A la derecha se ve la clasificación en 4 grupos con ángulos promedio de 10° (rojo); 45° (celeste); 95° (azul) y 150° (verde).

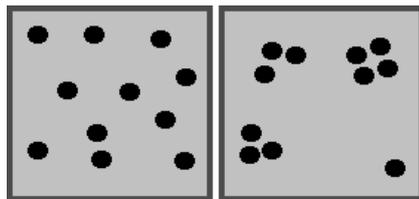
Las fibras de colágeno del miocardio pueden ser utilizadas como ejemplo de determinación de la orientación de líneas (Fig. 6-28). Pevio a su análisis, es necesario umbralizar y posteriormente eskeletonizar la imagen, para finalmente establecer el ángulo de inclinación entre la fibra y la vertical. Estos datos pueden ser graficados para tener un estimativo de su orientación.



**Fig. 6-28.** Arriba izquierda: miocardio teñido con Sirius red para la identificación de fibras de colágeno. Luego de su umbralización, se realizó la eskeletonización (arriba derecha). Al superponer ambas imágenes mediante el operador XOR se obtuvo la imagen inferior izquierda. El grafico muestra la distribución angular de las fibras, donde se observa que la mayoría de ellas tiene una orientación horizontal.

### ***Determinación de la proximidad***

En ciertos casos es necesario establecer cuan cerca están dos objetos (células, organoides, etc.) para poder comprender fenómenos biológicos. Para ello, se debe determinar el centroide de los mismos, trazar líneas hacia los centroides de los objetos cercanos y finalmente medir sus distancias de manera manual o automática. Estadísticamente, el conocimiento de la distancia entre los objetos permite establecer si la distribución de los mismos es aleatoria o se encuentran agrupados en regiones (Fig. 6-29).



**Fig. 6-29.** Distribución aleatoria (izquierda) o agrupada (derecha) de los objetos dentro de un área.

En una distribución aleatoria, la distancia promedio entre los objetos se puede estimar mediante la ecuación:

$$\bar{D} = 0,5 \sqrt{\frac{Area}{N}} \quad [6-20]$$

donde,  $N$  es la cantidad de objetos en el área. En este tipo de distribución, la frecuencia de eventos en función de la distancia promedio adquiere una distribución de tipo Poisson. Cuando los objetos se agrupan por áreas, la distancia promedio entre objetos se ve reducida.

El índice del “vecino cercano” (del inglés, “*Nearest-Neighbor*”) se expresa como la relación entre la distancia observada entre objetos, dividido por la distancia esperada de acuerdo a la ecuación anunciada. Si el índice es menor que 1, el patrón de distribución es regional; si el valor es mayor que 1, la tendencia de distribución es hacia la dispersión. El

uso de los centroides para la determinación de la distancia entre los vecinos cercanos es útil cuando el tamaño de los objetos es pequeño comparado con la distancia entre ellos. Si los objetos son más grandes que las distancias que los separan, es más apropiado medir las distancias de borde a borde de los mismos. La ecuación para la determinación la distancia promedio de los vecinos cercanos es:

$$\bar{D} = \frac{(\sum_{i=1}^N d_i)}{N} \quad [6-21]$$

donde,  $N$  es el número de objetos y  $d_i$  es la distancia al vecino cercano para el punto  $i$ .

En el Capítulo 4 se utilizó el filtro de Reducción o de Punto Final para establecer el centroide de los objetos (Fig. 4-70). La distancia entre estos puntos se puede establecer mediante la ecuación [6-21]. Los resultados obtenidos permiten determinar el tipo de agrupamiento de los objetos (Fig. 6-30).

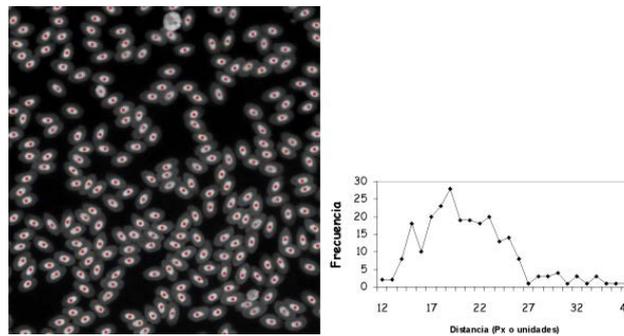


Fig. 6-30. Localización de los centroides y establecimiento de las distancias medias entre los objetos a través de la determinación de los vecinos cercanos. De acuerdo a la gráfica, la distribución de los puntos es de tipo Poisson y por lo tanto, la ubicación de los objetos es aleatoria.

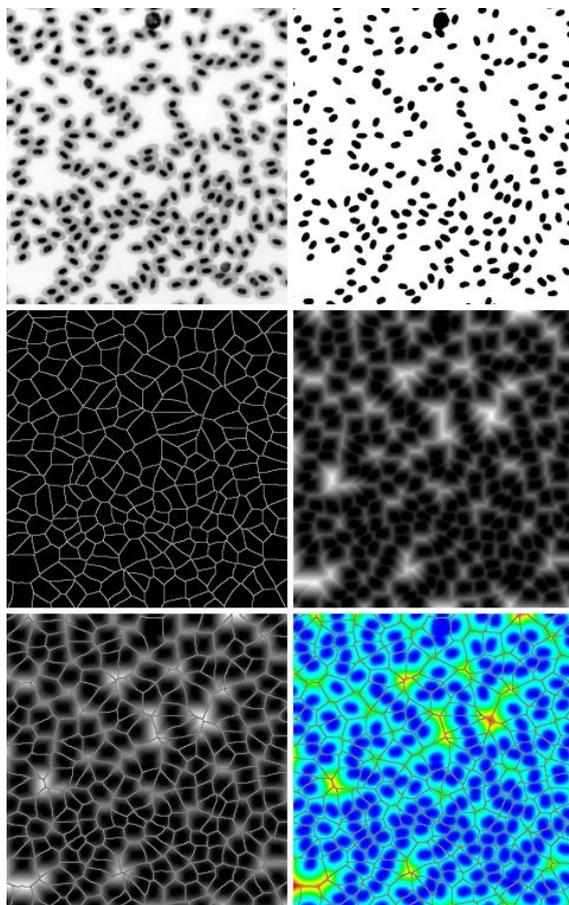


Fig. 6-31. Cálculo de la mínima distancia de separación. La imagen original (arriba izquierda) fue umbralizada (arriba derecha). Sobre esta última se aplicó el filtro Voronoi (centro izquierda) y el filtro Distancia o mapa de distancia Euclídeana (centro derecha). Estas dos últimas imágenes fueron unidas matemáticamente mediante el operador XOR (abajo izquierda) y la imagen resultante fue pseudo-coloreada para observar mejor las diferencias de intensidad (abajo derecha). El valor mínimo para cada objeto es la mitad de la distancia de borde a borde con su vecino más cercano.

Asimismo, en el Capítulo 4 se utilizó el filtro Voronoi para generar la eskeletonización del fondo que separa los objetos (Fig. 4-68 y 4-69) y el filtro Distancia para establecer la distancia Euclídeana (Fig. 4-55). La aplicación de estos filtros le otorga a cada uno de los píxeles que forman el objeto un valor mínimo, que representa la mitad de la distancia entre éste y el punto del borde más cercano del objeto vecino, dado que la eskeletonización producida por el filtro Voronoi pasa por el punto medio de ambos objetos (Fig. 6-31).

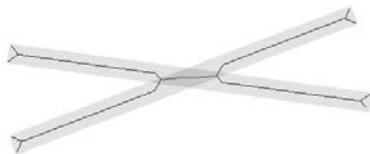
### ***Determinación de la alineación***

En muchas situaciones, los objetos no están alineados de la manera más apropiada para su cuantificación. Una opción sería “diluir” la muestra para que los mismos puedan tener una mejor distribución dentro de la imagen. Cuando esto no es posible se recurre a otras alternativas. Uno de los objetos que con mayor frecuencia genera dificultad para su cuantificación es el de las fibras, ya que éstas se disponen de las formas más variadas. Pueden estar paralelas, tocándose en un punto o entrecruzándose (Fig. 6-32).



**Fig. 6-32.** Fibras de *Salix matsudana*. Algunas fibras se aparean y contactan a lo largo de toda su estructura, otras se tocan en algún punto o se entrecruzan.

En la figura 4-151 del Capítulo 4 se mostró la forma de eskeletonizar las fibras para su posterior medición. Sin embargo, cuando se aplica el filtro sobre dos fibras que se encuentran entrecruzadas, se genera un fragmento común que, si bien no se ajusta a la orientación de ninguna de las dos, debe ser considerado en el cálculo de la longitud de ambas (Fig. 6-33). Para evitar estos inconvenientes, estas imágenes deben ser procesadas en un espacio frecuencial. En este caso, no se utiliza la transformada de Fourier, sino que se aplica la transformada de Hough, que es un método global para detectar bordes. Genera una transformación de líneas rectas u otras formas que tengan bordes, desde el espacio Cartesiano a un espacio parametrizado.



**Fig. 6-33.** Esquema de dos fibras entrecruzadas donde se observa un brazo común central del esqueleto. Este fragmento debe ser considerado de manera independiente para cada una de las fibras al momento de su medición.

Al considerar líneas rectas dentro de la imagen, se sabe que todas las que pasen por un punto  $X_i, Y_i$  van a satisfacer la ecuación de la recta:

$$y_i = m * x_i + c \quad [6-22]$$

para distintos valores de inclinación ( $m$ ) e interceptos ( $c$ ) (Fig. 6-34).

Si se invierten las variables y se tratan de representar los puntos  $m$  y  $c$  en función de las coordenadas de la imagen  $X_i, Y_i$ , la ecuación de la recta se transformaría en:

$$c = y_i - m * x_i \quad [6-23]$$

Esta ecuación describe una línea recta en un gráfico de  $c$  en función de  $m$  (Fig. 6-35). De aquí se desprende que cada línea diferente que pase por las coordenadas  $X_i, Y_i$  se corresponde con un punto de la línea en el espacio  $m, c$ .

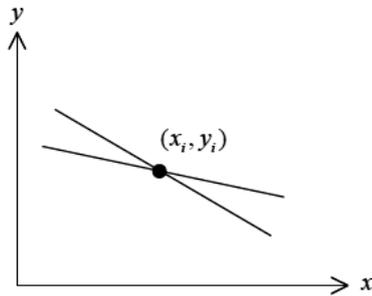


Fig. 6-34. Múltiples líneas pueden pasar a través de un punto en el dominio Cartesiano, de acuerdo a la ecuación de la recta.

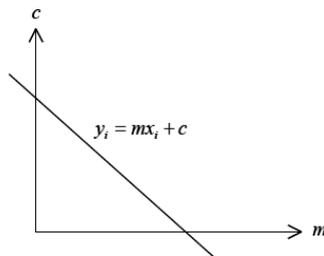


Fig. 6-35. La recta en el dominio  $m, c$ .

En una imagen digital (espacio  $X, Y$ ) se pueden representar dos píxeles ( $P_1$  y  $P_2$ ) que se encuentren sobre una misma línea. En el espacio  $m, c$  (frecuencia Hough), esta línea se corresponde con el punto de intersección de las rectas que representan a dichos píxeles. En otras palabras, una recta que pase a través de los píxeles  $P_1$  y  $P_2$ , debe coincidir con la intersección de las dos líneas  $P_1$  y  $P_2$ . Esto significa que, independientemente de la cantidad de píxeles que se encuentren en una recta en la imagen digital, ésta será representada por un solo punto en la frecuencia Hough (Fig. 6-36).

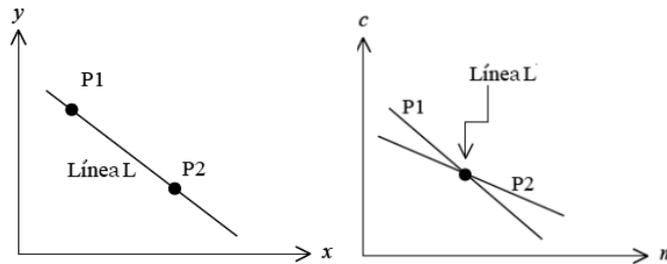


Fig. 6-36. Izquierda: Representación de dos píxeles ( $P_1, P_2$ ) sobre la misma recta en el espacio  $X, Y$ . Derecha: Mapeo de  $P_1$  y  $P_2$  en el espacio  $m, c$ .

Cuando se aplica un detector de bordes, como el filtro Sobel, es posible que queden expresados píxeles aislados. Si estos píxeles representan bordes de rectas, la combinatoria de posibilidades de unión entre estos es muy amplia. De esta manera, si se construye un algoritmo que analice los puntos en el espacio  $m, c$ , se podrán detectar cada uno de los bordes de las líneas rectas como un objeto individual, independientemente de su posición en la imagen y de su relación con otros objetos. En la figura 6-37 se representan algunos puntos y las posibles rectas que estos determinan.

La ventaja de la transformada de Hough para la detección de líneas rectas es que no necesita que todos los píxeles que recaen sobre la recta sean contiguos. Esto puede ser de utilidad al tratar de detectar líneas con pequeños cortes en ellas o que estén parcialmente ocluidas. Una de las desventajas de la transformada de Hough es que puede dar resultados erróneos cuando los objetos estén alineados por azar. Otra desventaja es que las líneas descritas por sus valores  $m, c$  son infinitas hacia ambos extremos en lugar de tener puntos

finales definidos. Para evitar el problema de las líneas verticales con valores de  $m$  infinitos, existe una ecuación alternativa:

$$r = x \cos \theta + y \sin \theta \quad [6-24]$$

lo que significa que un punto en el espacio  $X, Y$  ahora es representado por una curva en el espacio  $r, \theta$  en lugar de una línea recta (Fig. 6-38).

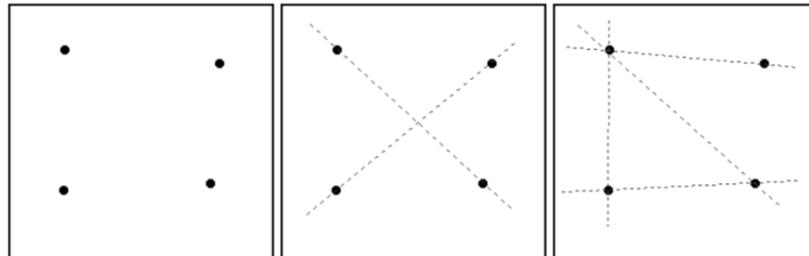


Fig. 6-37. Sobre coordenadas de puntos se pueden trazar diferentes rectas.

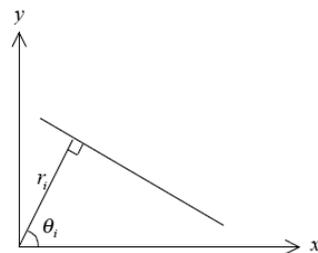


Fig. 6-38. Representación de una línea en el espacio  $X, Y$  utilizando  $r_i, \theta_i$ .

La transformada de Hough es una matriz con coordenadas de ángulo y radio. Cada punto en el espacio Hough define una única recta con su correspondiente ángulo  $\theta$  y su radio  $r$ , los que pueden ser graficados en el espacio real de la imagen. Las coordenadas de los puntos representados en la figura 3-37 pueden ser representados en el espacio Hough mediante sigmoideas, como se observa en la figura 6-39.

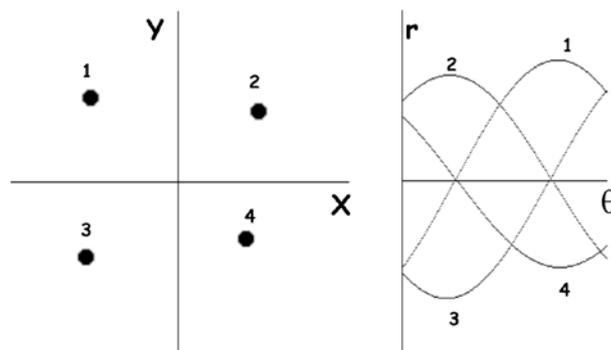


Fig. 6-39. Cada uno de los puntos del espacio Euclideo (izquierda) puede ser representado en el espacio Hough a través de sigmoideas (derecha). El número de la sigmoidea se corresponde con su correspondiente número de punto.

La transformada de Hough puede ser utilizada además, para detectar diferentes formas dentro de la imagen, tales como elipses y círculos. En este caso, la matriz debe ser modificada para que albergue tres parámetros: el radio y las coordenadas  $X$  e  $Y$  del centro. La ecuación paramétrica para la determinación de las coordenadas del círculo en el espacio Hough es:

$$r^2 = (x - a)^2 + (y - b)^2 \quad [6-25]$$

donde,  $a$  y  $b$  son las coordenadas del centro del círculo y  $r$  es el radio.

De la misma manera que un punto en el espacio Euclideo determina una sigmoidea en el espacio de Hough, dos puntos que en el primero determinan una recta, determinan otra sigmoidea que pasa por un mismo punto de encuentro. Si se considera a la recta como una sucesión de puntos, la representación de cada uno de ellos dará origen a su correspondiente sigmoidea, en donde todos ellos tienen un punto en común, como se observa en la figura 6-40.

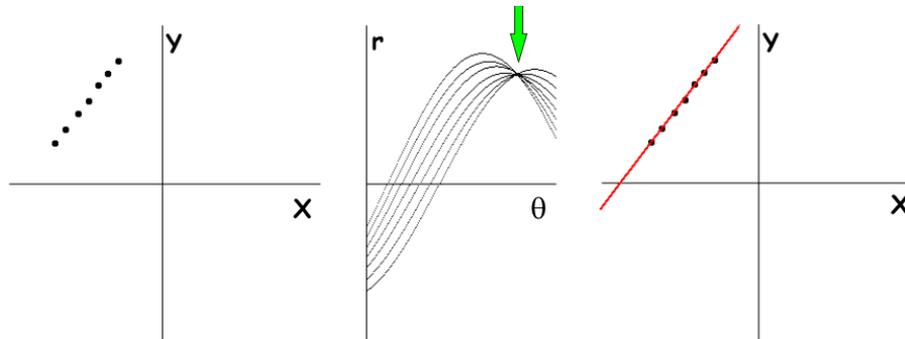


Fig. 6-40. Los puntos que determinan una recta en el espacio Euclideo (izquierda), generan una sucesión de sigmoideas que confluyen en un mismo punto (centro) en el espacio de Hough. La flecha verde indica el punto de confluencia de las sigmoideas. Revirtiendo la transformada de Hough, se obtiene la recta que pasa por los puntos (derecha).

Si la sucesión de puntos que determinan dos rectas se superponen en el espacio Euclideo, en el espacio de Hough se forma una sucesión de sigmoideas que establecen un punto en común para cada una de las mismas. Al revertir la operación se forma una recta que identifica cada una de las sucesiones de puntos (Fig. 6-41).

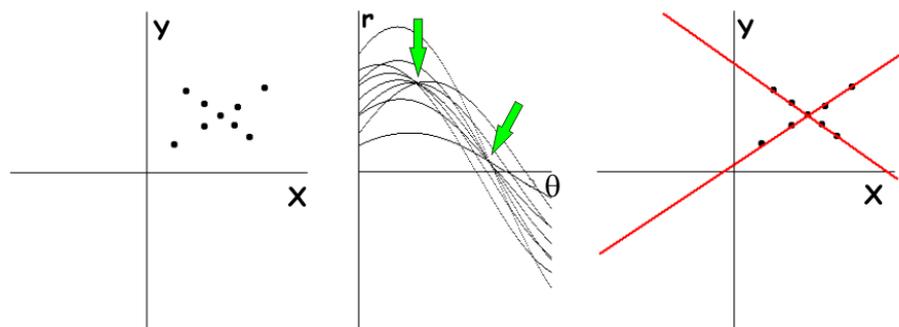


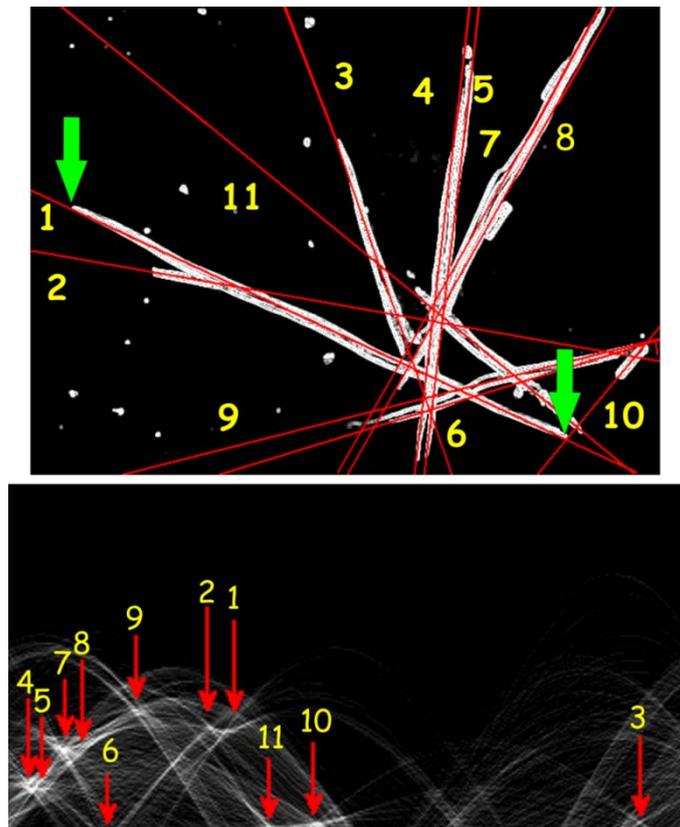
Fig. 6-41. Al superponer dos secuencias de puntos (izquierda) se forman sigmoideas por cada una de dichas secuencias (centro) conteniendo un punto en común para cada una de ellas (flechas verdes). Al revertir la operación se forma una recta independiente para cada una de las secuencias de puntos.

Dado que la mayoría de las estructuras biológicas no son rectas y, a su vez, pueden estar contaminadas con otros elementos que no pertenecen al objeto en estudio, como se observa en las fibras de la figura 6-32, es necesario recurrir a un detector de bordes o un algoritmo de esqueletonización para tratar de establecer una secuencia de puntos que representen a los objetos y que permita graficar sigmoideas que pertenezcan exclusivamente dichas estructuras. Cuando se establecen los bordes netos se puede aplicar la transformada de Hough para encontrar todas las rectas que coincidan con los mismos. Una vez graficadas, es posible establecer el inicio y el final de cada uno de los objetos que representan y determinar su longitud (Fig. 6-42).

### ***Determinación del tamaño***

La medición de los objetos dentro de una imagen digital se basa principalmente en el recuento de los píxeles que lo forman. La medición de los objetos con bordes rectos no crea mayores inconvenientes dado que su representación en la imagen digital es similar a su representación en la naturaleza. No obstante, para objetos irregulares esta medición no es

tan sencilla, ya que los píxeles cuadrados deben representar objetos curvos. Para que esta transición entre la naturaleza de los objetos irregulares y su representación en la imagen digital sea lo más similar posible, es necesario capturar imágenes con una resolución que permita obtener una frecuencia de muestreo tal, que los cambios transicionales pasen desapercibidos. Si bien la mayoría de las cámaras digitales no cuentan con una resolución apropiada, la tendencia se dirige hacia esa posibilidad. En la figura 6-43 se capturó la misma región de la imagen utilizando el mismo objetivo, pero variando la resolución de captura. Se tomó un núcleo al azar y con la herramienta ROI automatizada se circunscribió su contorno. Al aumentar la resolución de la imagen se obtuvo una delimitación de los objetos más precisa.

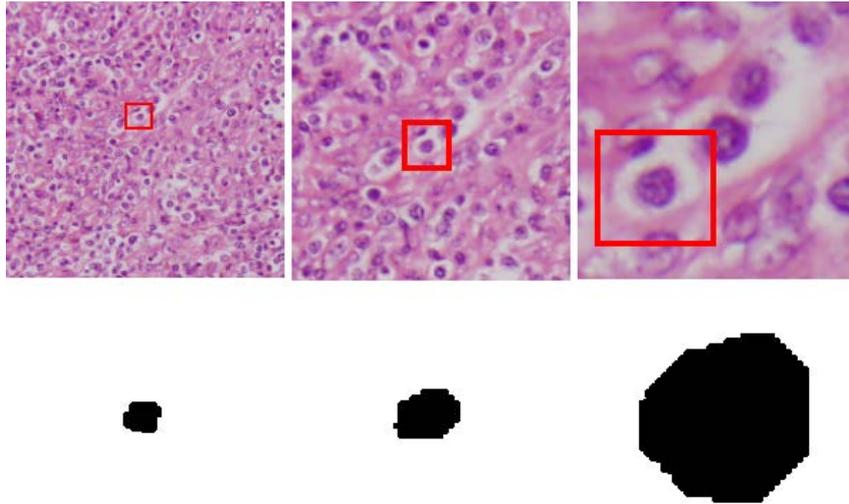


**Fig. 6-42.** Las fibras de la figura 6-32 fueron modificadas por el filtro Sobel para determinar sus bordes (arriba). Al aplicar la transformada de Hough se forman sigmoideas que representan cada una de esas estructuras (abajo). La reversión de la transformada genera líneas rectas (en rojo) que representan a los bordes de los objetos. Los números de las líneas rojas se corresponden con los números de las sigmoideas. Las flechas verdes indican el comienzo y el final en una de las estructuras, para poder analizar su longitud. Algunas rectas y sigmoideas fueron removidas para aclarar la imagen.

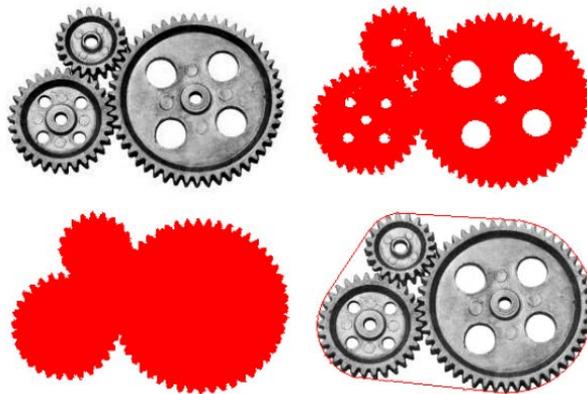
Si los objetos fueran más pequeños que los presentados en la figura 6-43, la posibilidad de medirlos sería menor, más aún, si la imagen fuera de menor resolución, probablemente desaparecerían de la misma al momento de umbralizarla.

Otra posibilidad para aumentar el tamaño de los objetos pequeños sería incrementando la magnificación óptica de la imagen capturada, con el inconveniente de poder dejar afuera a aquellos objetos que fueran más grandes.

Una de las mediciones características para establecer el tamaño de un objeto en un espacio 2D, es a través de la determinación de su área superficial. Esta representa la sumatoria de píxeles contenida dentro de los límites del objeto. Cuando se miden áreas hay que tener en cuenta ciertas circunstancias: si el objeto contiene orificios en su interior que son parte de la estructura, como podrían ser los alvéolos en el tejido pulmonar, el área debe incluirlos en su medición. Si dentro del área de interés los orificios corresponden a otras estructuras, estos no deben ser incluidos (Fig. 6-44).



**Fig. 6-43.** El mismo tejido (fila superior) fue capturado con los mismos parámetros microscópicos. La única variación fue la resolución de las imágenes capturadas. De izquierda a derecha: 680x512; 1360x1024; 4080x3072. En el recuadro rojo se observa el núcleo de la célula que fue utilizado para la comparación. Abajo, la representación de dicho núcleo aumentada 4 veces.



**Fig. 6-44.** El conjunto de los engranajes (arriba izquierda) constituye el objeto a medir. Arriba derecha: delimitación del área propia del material (sin inclusión de orificios). Abajo izquierda: inclusión de los orificios en la delimitación. Abajo derecha: delimitación del área convexa, donde se muestra un borde que circunscribe los puntos sobresalientes de los objetos. En este caso, los 3 engranajes son considerados como una unidad. La delimitación de las áreas mediante relleno o circunscripción del entorno es sólo a los efectos visuales.

Una forma particular de medición del área es la llamada **convexa**. Esta se aplica, principalmente, para “alisar” la medición de los bordes de objetos irregulares. Si la determinación de los bordes es crítica para el estudio, este tipo de medición no debe ser realizado. Para la determinación del área convexa los objetos deben experimentar una serie de pasos de erosión y dilatación para, finalmente, rellenar todas las irregularidades de los bordes. En este caso, se cuentan aún los píxeles que no forman parte del objeto.

En el Capítulo 4 se describió la conexión entre los píxeles vecinos para justificar la pertenencia o no a un objeto (ver Fig. 4-54). Al momento de determinar el área, es necesario establecer si dicha medición tendrá en consideración la conexión-4 o la conexión-8.

En la figura 6-45 se observa un objeto con una disposición particular dentro de la imagen, representada por los espacios negros. La selección de la conexión-4 u -8, en conjunto con la selección de la inclusión o exclusión de los orificios y la opción del área convexa, ofrece diferentes patrones de medición, los que se comparan en la Tabla 6-6. Estos valores corresponden al área total determinada (Área), independientemente de la cantidad de objetos hallados; al área encuadrada (Área/Box), que expresa la relación entre el área total de los objetos encontrados y el rectángulo que los contiene y al área poligonal (Área Polígo-

no), que es aquella incluida en el polígono que define el contorno del objeto. Este parámetro coincide con el polígono utilizado para determinar el perímetro.

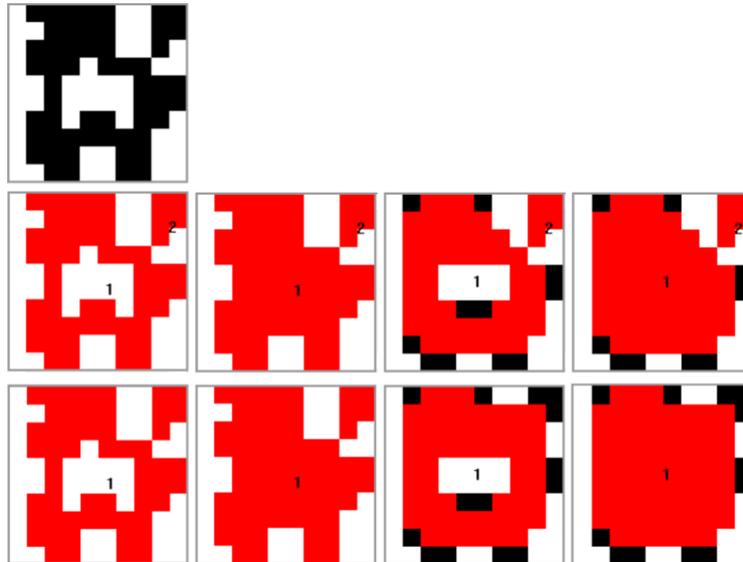


Fig. 6-45. El valor final del área dependerá si la conexión-4 u -8, el llenado de orificios y el área convexa fueron tenidos en cuenta. Dentro de la imagen original de 10x10 píxeles (fila superior), el objeto (negro) contiene 55 píxeles. En la segunda fila se expresa la medición del área (marcada en rojo) con conexión-4 y en la tercera, con conexión-8. De izquierda a derecha: área sin orificios; área con orificios incluidos; área convexa sin orificios; área convexa con orificios. Los números representan los objetos encontrados en cada imagen.

Tabla 6-6. Valores de área de los objetos de la figura 6-45

Conexión	Área convexa	Orificio	Objetos encontrados	Área <sup>a</sup>	Área/Box	Área polígono <sup>a</sup>
4	No	No	2	55	0,69	42,63
4	No	Si	2	65	0,76	42,63
4	Si	No	2	54	0,76	39,43
4	Si	Si	2	64	0,83	39,43
8	No	No	1	55	0,61	44,78
8	No	Si	1	66	0,73	44,78
8	Si	No	1	55	0,76	43,00
8	Si	Si	1	65	0,90	43,00

a. Valores expresado en mm<sup>2</sup>. La calibración fue de 1 mm/Píxel.

Otra forma de determinar el área de un objeto es a través del cálculo del diámetro del **círculo equivalente**, que representa el área total de un objeto irregular. De esta manera, se grafican y se comparan sólo los diámetros que representan a los objetos. La ecuación de conversión del área en el diámetro equivalente es la siguiente:

$$D = \sqrt{\frac{4}{\pi} * Area} \quad [6-26]$$

La medición de este diámetro es conveniente para la comparación de áreas, ya que es totalmente independiente de la forma del objeto que se está midiendo. La figura 6-46 muestra la inscripción del círculo sobre el objeto, que representa la misma área que éste. Dado que no todos los objetos tienen ejes equidistantes o que no se aproximan a la forma circular, estos también pueden ser representados por una elipse. Como estas figuras tienen dos ejes, permiten describir el tamaño de los objetos, su variación con respecto al círculo (redondez) y hasta su orientación. Los ejes de la elipse que inscriben al objeto pueden ser

medidos y utilizados para su comparación con otros objetos. La determinación del diámetro de Feret descrito anteriormente, no siempre coincide con el valor de estos ejes. En la Tabla 6-7 se muestran los valores de las mediciones del objeto de la figura 6-46, donde el Aspecto representa la relación entre el eje mayor y menor de la elipse equivalente.

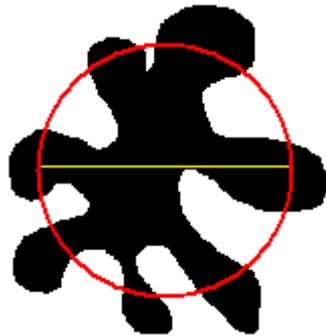


Fig. 6-46. El círculo inscripto (rojo), que ocupa la misma área que el objeto (negro), determina un diámetro (amarillo) de acuerdo con la ecuación [6-26].

Tabla 6-7. Mediciones del objeto de la figura 6-46

Area	Eje Mayor elipse	Eje Menor elipse	Aspecto	Feret Mayor	Feret Menor	Feret Promedio
12497	149,675	128,524	1,165	174,555	149,959	163,495

El valor del diámetro mayor de Feret tal vez sea más representativo que el del eje mayor, ya que mide la distancia entre los puntos más alejados de la elipse, indicando su máxima dimensión de calibración. A su vez, indica la orientación del objeto. Si este valor se toma como la mayor dimensión de la elipse, el diámetro de Feret menor debería ser tomado como la dimensión menor. Sin embargo, la máxima dimensión puede sobreestimar el tamaño real de la dimensión menor si el objeto es largo y estrecho, como podría ser el de una fibra. Por otro lado, la dirección de esta última no siempre es perpendicular a la de la primera. Como resultado, el área de la elipse resultante no es igual a la del objeto.

Para que el valor de área de la elipse coincida con el del objeto, en base a la equiparación del diámetro de Feret con el eje mayor de la elipse que lo determina, es necesario aplicar una ecuación de corrección. Si el área de la elipse es igual a:

$$Area = \left(\frac{\pi}{4}\right) * a * b \quad [6-27]$$

donde,  $a$  y  $b$  se corresponde con los ejes de la misma, conociendo el valor del eje mayor se puede calcular fácilmente el eje menor. A partir de estos datos es posible calcular el área real del objeto.

Para medir las características de una fibra o de un nematodo, es conveniente usar las mediciones de alto y ancho en lugar de los valores de diámetro de Feret. La medición del alto mide la longitud del objeto a lo largo del eje central del mismo, mientras que el ancho lo hace a su través. Una de las formas de medirlos es por medio de la esqueletonización del objeto (Fig. 6-47). La longitud del esqueleto puede ser estimada contando los píxeles que lo forman.

Se debe recordar no obstante, que el esqueleto es un poco más corto que la longitud real del objeto, aunque esto puede ser corregido al agregar el valor del mapa de distancia Euclideo (filtro Distancia), en cada punta del esqueleto.

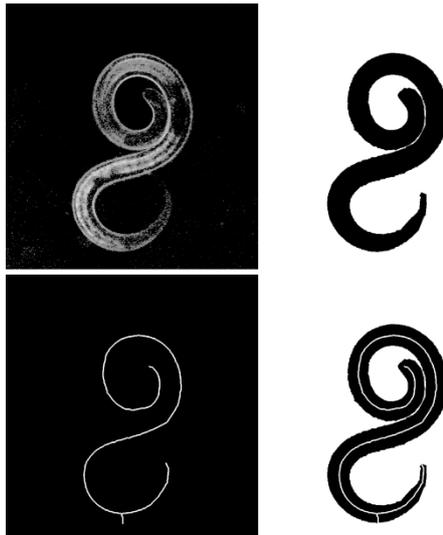


Fig. 6-47. Determinación de la longitud del nematodo *Strongyloides sp.* La imagen original (arriba izquierda) fue umbralizada (arriba derecha). Esta última fue esqueletonizada y sus puntos fueron posteriormente unidos mediante el filtro Dilatación (abajo izquierda). El esqueleto fue superpuesto sobre la imagen umbralizada mediante el operador XOR.

Otra forma de medir la longitud y el ancho de una fibra o un objeto oblongo es haciendo una suposición sobre la forma geométrica del mismo. Si se asume que el objeto simula una cinta con ancho uniforme, su área ( $A$ ) se puede calcular mediante la relación entre su largo ( $L$ ) y su ancho ( $N$ ) a través de la ecuación:

$$A = L * N \quad [6-28]$$

mientras que su perímetro se puede calcular como:

$$P = 2 * (L + N) \quad [6-29]$$

Si se conocen el área y el perímetro del objeto, se puede calcular fácilmente su largo y ancho a través de las ecuaciones:

$$N = \frac{P - \sqrt{(P^2 - 16 * A)}}{4} \quad [6-30]$$

$$L = \frac{A}{P} \quad [6-31]$$

Si bien estas últimas ecuaciones están diseñadas para una cinta de ancho uniforme, son totalmente aplicables a las fibras u objetos similares. En todo caso, si los bordes de los objetos fueran romos en lugar de rectangulares, habría que introducir ciertas modificaciones menores a las ecuaciones.

Dada la forma en que se representan los objetos en una imagen digital, el perímetro de un objeto es, probablemente, el parámetro más difícil de calcular con precisión. Todo depende de si se considera al píxel como un cuadrado o como un punto. Algunos sistemas estiman la longitud del contorno de un objeto contando los píxeles que están en contacto con el fondo. Esto es un error ya que depende de la orientación del objeto, donde la distancia entre los píxeles que tocan las esquinas es mayor que aquella donde tocan los bordes. La figura 6-48 muestra la variación en el perímetro obtenido por recuento de los bordes de los píxeles en comparación con el sistema más preciso de **código encadenado** (pequeños vectores), cuando se rota un cuadrado de tamaño constante.

De acuerdo a la resolución con que se capture la imagen, el objeto original puede ser representado con mayor o menor similitud. En la figura 6-49 se observa la representación

del objeto original en el espacio (análogo), su representación en la imagen digital y su perímetro.

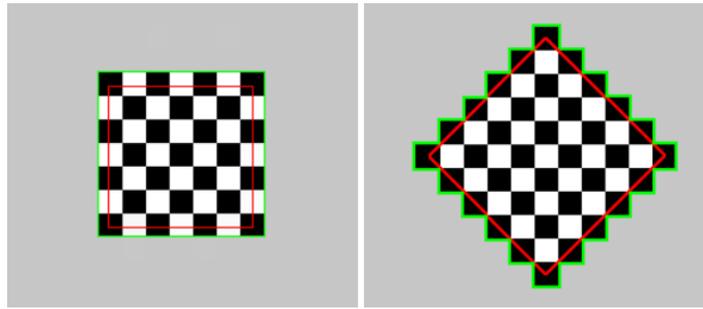


Fig. 6-48. Comparación de la estimación de perímetro mediante código en cadena o por la suma de las longitudes de píxeles del borde, en función de la orientación. Si se suman los bodes externos de los píxeles del cuadrado izquierdo (recuadro verde), el resultado es 28, mientras que si se suman los vectores (código encadenado) de centro a centro del píxel (recuadro rojo), el resultado es 24. Si se rota el cuadrado (imagen derecha), el valor de sumatoria externa es 44, mientras que el perímetro de acuerdo al código encadenado es 28,282 ( $20 \cdot \sqrt{2}$ ).

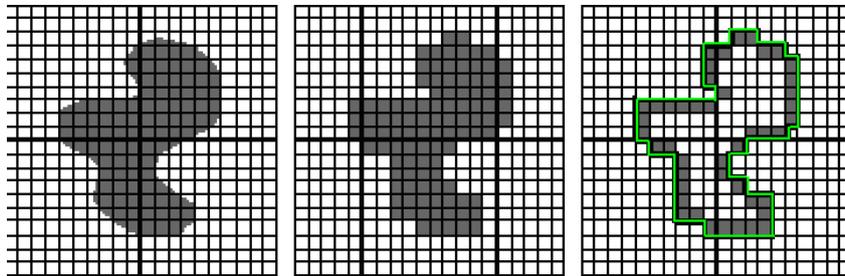


Fig. 6-49. Objeto original (izquierda), su representación en la imagen digital (forma discreta) (centro) y contorno del objeto con su límite escalonado (línea verde) (derecha).

El contorno de un objeto digitalizado se define como la secuencia de píxeles que lo delimitan. Este contorno a veces se representa por un código encadenado. No obstante, el mismo también se puede considerar como la línea existente entre los píxeles del objeto y el fondo. La codificación de esta línea (una secuencia de bordes horizontales y verticales de los píxeles) se obtiene mediante lo que se conoce como **código de grieta** (del inglés: “*crack code*”) del borde del objeto digitalizado (representado por la línea verde en la figura 6-49). La longitud obtenida mediante este código es más larga que la del perímetro del objeto original, especialmente para formas de objetos con muchas esquinas.

Una forma de estimar el perímetro del un objeto es descifrando los códigos de grieta horizontales y verticales y haciendo posteriores ajustes, tales como tomar en consideración las esquinas. Otra forma de hacerlo es por aproximación de los cálculos al valor del contorno del objeto original. Esto se logra mediante una línea que pase por el centro de los píxeles del contorno, como una secuencia de vectores horizontales, verticales y diagonales (código encadenado). Asumiendo que los píxeles son cuadrados, el perímetro puede ser estimado por la ecuación:

$$P = \sum_i \sqrt{(x_i + x_{i-1})^2 + (y_i + y_{i-1})^2} \quad [6-32]$$

donde, el perímetro ( $P$ ) es igual al número de vectores horizontales y verticales. Para obtener el código encadenado se debe sumar, además, la cantidad de vectores diagonales multiplicados por la raíz cuadrada de 2. Es decir, que los vectores que formen el perímetro tendrán una longitud de 1 píxel o 1.4142 píxeles.

Una forma de aproximar los bordes de los objetos digitales a los del original (análogo) es mediante la aplicación de un filtro como el Gaussiano, que suaviza los contornos. En la figura 6-50 se compara el efecto de la aplicación del filtro de Gauss sobre todo el objeto y su delimitación de perímetro. El perímetro del objeto sin modificar tuvo una diferencia

con el objeto filtrado de 18.82 unidades de píxel. Esta diferencia se justifica porque el límite en la imagen filtrada se construye mediante segmentos de línea recta que pasan a través de los píxeles suavizados. Estos segmentos se dibujan entre los puntos a lo largo de los bordes de los píxeles que se interpolan linealmente en base a los valores de escala de grises. Estos puntos se corresponden con el centro geográfico del píxel. El resultado es equivalente a agrandar la imagen usando súper resolución e interpolación bilineal, como se observa en los detalles de la figura.

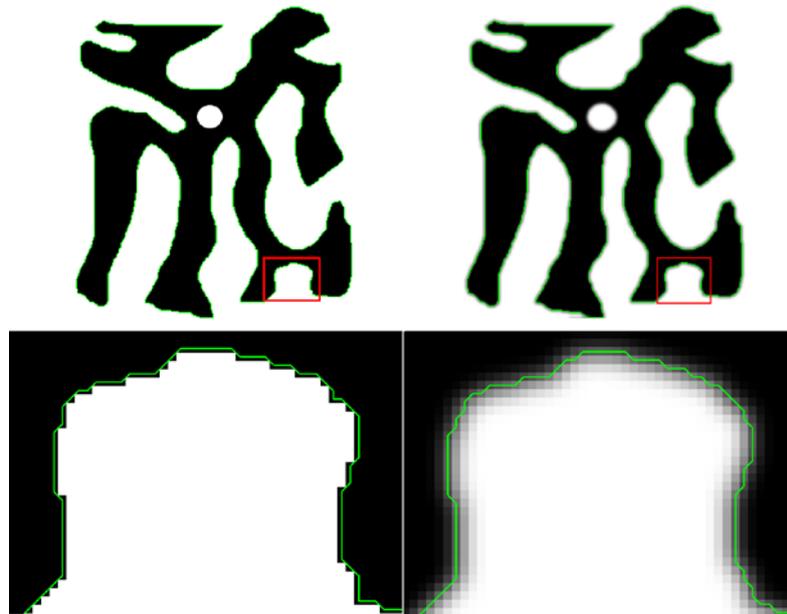


Fig. 6-50. La delimitación del borde sobre la imagen digital sin modificar (arriba izquierda) es, en apariencia, similar a la de la imagen modificada mediante el filtro Gauss (arriba derecha). Sin embargo, al magnificar los detalles de lo encuadrado en rojo se observa que los bordes netos se redondean suavemente y con ellos, la delimitación también se modifica.

De la misma manera que existen diferentes tipos de mediciones del área, también existen diferentes opciones para medir el perímetro. Así, el perímetro **total** incluye al contorno de los orificios que se encuentren en el interior del objeto; el **externo** excluye a dichos orificios; el **convexo** es el contorno convexo del objeto. Esta medición es menos sensible a los ruidos o la resolución de la imagen ya que no sigue a todos los puntos del contorno del objeto. Este parámetro puede ser calculado como la suma de las distancias entre los vértices del polígono delimitante del objeto utilizando la ecuación [6-32]. La Tabla 6-8 muestra las diferencias entre las mediciones de perímetro para ambas imágenes de la figura 6-50.

Tabla 6-8. Mediciones del perímetro de los objetos de la figura 6-50.

Area	Perímetro Total	Perímetro Convexo	Relación Perímetro Convexo- Perímetro Total	Perímetro Externo
38564 <sup>a</sup>	2566,690	2485,431	0,976	2546,206
38596 <sup>b</sup>	2547,869	2453,883	0,972	2523,300

a. Valores correspondientes a la imagen sin filtrar. b. Valores correspondientes a la imagen filtrada.

### ***Determinación de la forma***

Las formas, tal como se definen en la práctica cotidiana, no se pueden representar a través de números. La calificación de “célula periforme”, que intenta describir al contorno de una célula como el de una pera, es un concepto muy vago, máxime cuando dicho fruto puede adoptar diversas formas. De la misma manera, la adjetivación de “músculo piriforme”, que

trata de emular la forma del órgano al de una pirámide es errónea, en tanto no existen en él los bordes marcados y los planos rectos de la figura. Un modo de describir las formas sobre las imágenes digitales y que éstas tengan un sentido comparativo, es estableciendo relaciones. De esta manera, se obtienen números sin unidades, que solamente representan la relación entre medidas. El mejor descriptor de las formas será aquel que permita cuantificar, del modo más aproximado, las formas de la naturaleza. La Tabla 6-9 muestra los descriptores de formas más ampliamente utilizados.

Tabla 6-9. Descriptores de forma

Nombre	Ecuación	Nombre	Ecuación
Aspecto	$A = \frac{Eje\ Max}{Eje\ Min}$	Excentricidad	$Ex = \frac{Max\ Feret}{Min\ Feret}$
Compacticidad	$Cp = \frac{\sqrt{\left(\frac{4}{\pi}\right) * Area}}{Max\ diámetro}$	Factor de forma o Circularidad	$FF = \frac{4\pi * Area}{Perímetro^2}$
Convexidad	$Cx = \frac{Perímetro\ convexo}{Perímetro}$	Rectangularidad	$Rc = \frac{Area}{Box\ objeto}$
Elongación	$E = \frac{Alto\ box}{Ancho\ box}$	Redondez	$R = \frac{Perímetro^2}{4\pi * Area}$
Elongación de fibra	$E = \frac{Alto}{Ancho}$	Solidez	$S = \frac{Area}{Area\ convexa}$

Rangos: Aspecto >1; Compacticidad 0-1; Convexidad 0-1; Elongación >0; Excentricidad >1, Circularidad 0-1; Rectangularidad 0-1; Redondez >1; Solidez 0-1.

Para un círculo perfecto, todos los valores obtenidos mediante los diferentes descriptores de forma, exceptuando al de la rectangularidad, son iguales a 1. Para un cuadrado perfecto, el aspecto, convexidad, elongación, rectangularidad y la solidez son iguales a 1. Muchos de estos descriptores se basan en las formas que simulan a los círculos o al perímetro de los objetos. En párrafos anteriores se establecieron las condiciones necesarias para que una imagen digital, formada por píxeles cuadrados, pueda representar formas circulares y establecer bordes similares a los de los objetos en la naturaleza.

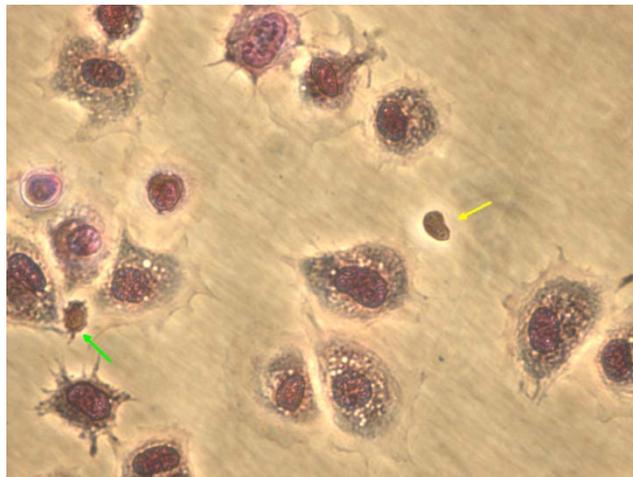
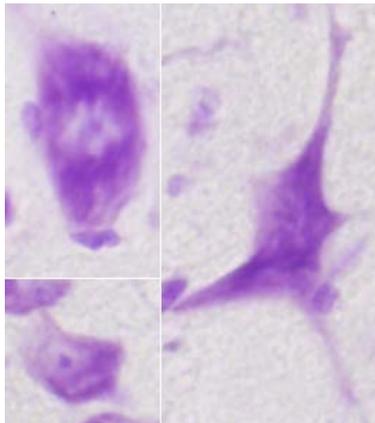


Fig. 6-51. Cultivo celular conteniendo pre-osteoblastos MC3T3E1 teñidos con Giemsa. La célula en suspensión (flecha amarilla) y aquellas fijadas a la placa durante los 15 minutos de iniciado el cultivo (resto), presentan tamaños y parámetros morfométricos distintos. La célula indicada con la flecha verde está comenzando a expandirse sobre la placa. Las células restantes se encuentran totalmente adheridas a la superficie (Imagen cedida gentilmente por la Dra. A. Cortizo - Grupo de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata).

Al momento de utilizar estos descriptores es necesario conocer su significado en la interpretación de los resultados. Cuando se los utiliza, por ejemplo, para comparar variaciones

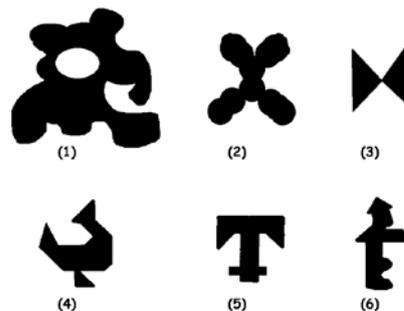
de un mismo objeto por efecto de inductores externos, dichos cambios pueden o no tener el peso suficiente para poder hacer afirmaciones concluyentes. Una célula en suspensión puede tener un contorno circular que permita ser descripta de esa forma. Sin embargo, cuando se deposita sobre una placa de cultivo comienza a adquirir diversas formas, de acuerdo a sus propias características. Es probable que si se midiera el volumen de la misma célula en el tiempo, no se encuentren mayores diferencias. No obstante, en el plano 2D puede cambiar tanto el área como la forma (Fig. 6-51).

En un corte de tejido también pueden operar variaciones de forma y tamaño pero que no sean tan concluyentes. Es necesario recordar que dos objetos pueden tener la misma área con distintos perímetros o viceversa, es decir, perímetros similares con distintas áreas, como se observa en la figura 6-52. En estos casos habrá que utilizar distintos parámetros para poder describir los cambios observados.



**Fig. 6-52.** Las motoneuronas de la medula espinal pueden variar su forma y tamaño con el tiempo o con respecto a otras células del mismo sector. Las neuronas del lado izquierdo tienen distinta área pero la misma redondez. La neurona superior izquierda y la de la derecha tienen distinta redondez pero la misma área.

Dado que los factores de forma se basan en el perímetro del objeto, aquellos con formas visualmente distintas pueden tener el mismo valor de descriptor. En la figura 6-53 todos los objetos tienen el mismo valor de redondez (3,51). Los datos morfométricos de los mismos se enlistan en la Tabla 6-10 y los de sus factores de forma, en la Tabla 6-11. El número de objeto se corresponde con aquel de la figura. Los valores están expresados en unidades de pixel.



**Fig. 6-53.** Objetos con formas visualmente diferentes tienen el mismo valor de redondez ( $R = 3,51$ ).

**Tabla 6-10.** Parámetros de los objetos de la figura 6-53

Objeto	Area	Area Convexa	Eje Menor	Eje Mayor	Perímetro	Perímetro Convexo
1*	37176	48788	233.85	246.01	1280.13	1219.58
2	13917	22576	134.78	169.64	783.10	752.75
3	6431	11928	84.48	127.99	532.31	519.91
4	7054	11127	65.21	161.00	557.65	520.02
5	9027	13788	115.62	122.74	630.89	613.21
6	8367	12061	108.55	122.91	607.16	571.34

Objeto	Diámetro Mayor	Ancho box	Alto box	Feret Mi-nino	Feret Máximo
1	293.61	264	249	248.00	297.63
2	197.57	156	165	154.64	199.25
3	156.98	114	116	109.86	157.68
4	165.87	102	166	94.73	166.17
5	158.27	131	157	126.44	159.05
6	126.19	121	120	119.00	142.21

\* El número de objeto corresponde con aquel de la figura 6-53, ordenados de arriba a abajo y de izquierda a derecha.

Tabla 6-11. Factores de forma de los objetos de la figura 6-53

Objeto	Aspecto	Compacticidad	Convexidad	Elongación	Excentricidad
1*	1.05	0.74	0.95	0.94	1.20
2	1.26	0.67	0.96	1.06	1.29
3	1.52	0.58	0.98	1.02	1.44
4	2.47	0.57	0.93	1.63	1.75
5	1.06	0.68	0.97	1.20	1.26
6	1.13	0.82	0.94	0.99	1.20

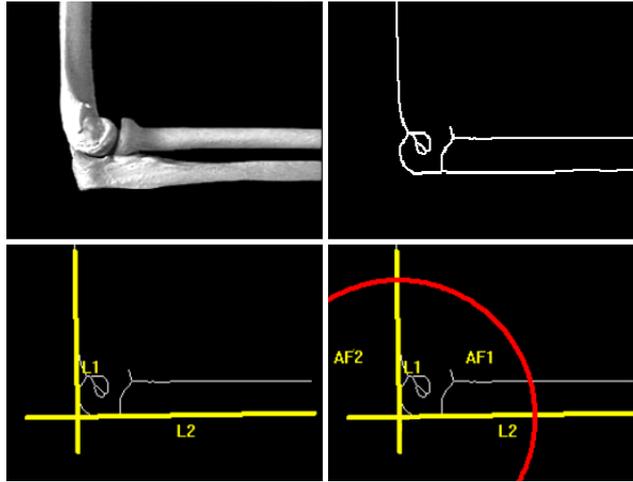
Objeto	Factor de forma	Rectangularidad	Redondez	Solidez
1	0.29	0.57	3.51	0.76
2	0.29	0.54	3.51	0.62
3	0.29	0.49	3.51	0.54
4	0.29	0.42	3.51	0.63
5	0.29	0.44	3.51	0.65
6	0.29	0.58	3.51	0.69

\* El número de objeto corresponde con aquel de la figura 6-53.

### ***Determinaciones manuales***

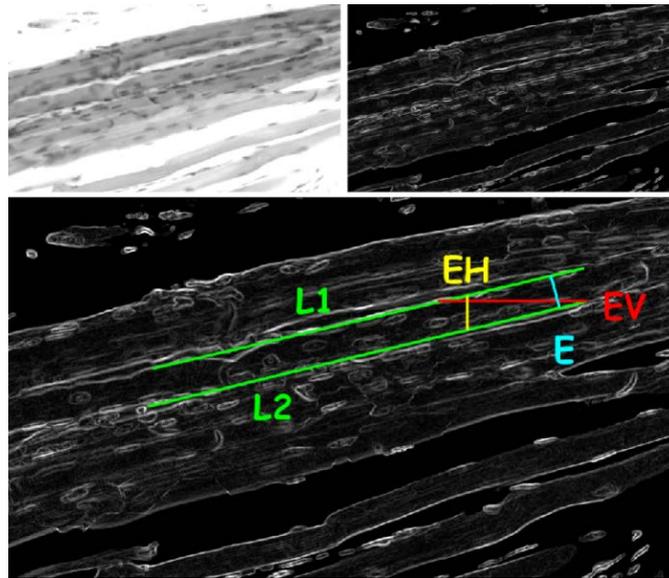
La mayoría de las mediciones que fueron descritas hasta el momento son el producto del reconocimiento automático de las formas de los objetos. Los programas de análisis aplican sus funciones de medición independientemente del procesamiento que se haya realizado sobre aquellos. Es decir, en tanto y en cuanto el usuario no colabore con las necesidades del programa para la medición de parámetros, los resultados pueden no coincidir con lo buscado.

Demás está decir que no siempre se logran procesar las imágenes de tal manera de exponerlas a una medición adecuada. En la medición de objetos estructurados, donde los límites y detalles pueden ser geométricos, el procesamiento puede lograr mejores resultados que sobre elementos biológicos, cuyos límites son dinámicos o dependen del ángulo de corte realizado con el micrófono. En estas circunstancias, es conveniente que algunas de las mediciones obtenidas de manera automática, se logren mediante operaciones manuales, tratando de acercar los resultados a la realidad. En la figura 6-54 se observa la imagen de una articulación en la que se quiere determinar el ángulo de flexión interno y externo entre los huesos húmero y cúbito (huesos vertical e inferior, respectivamente). Al producir la esqueletonización sobre la imagen umbralizada, se observa que las líneas formadas no son exactamente rectas. Más aún, la protuberancia en el extremo distal del húmero origina una especie de línea convoluta que impide que las líneas rectas que representan a los huesos puedan conectarse para establecer el ángulo. En estas circunstancias se puede recurrir al trazado manual de líneas que sigan la dirección del esqueleto y de esta manera, realizar las mediciones previstas.



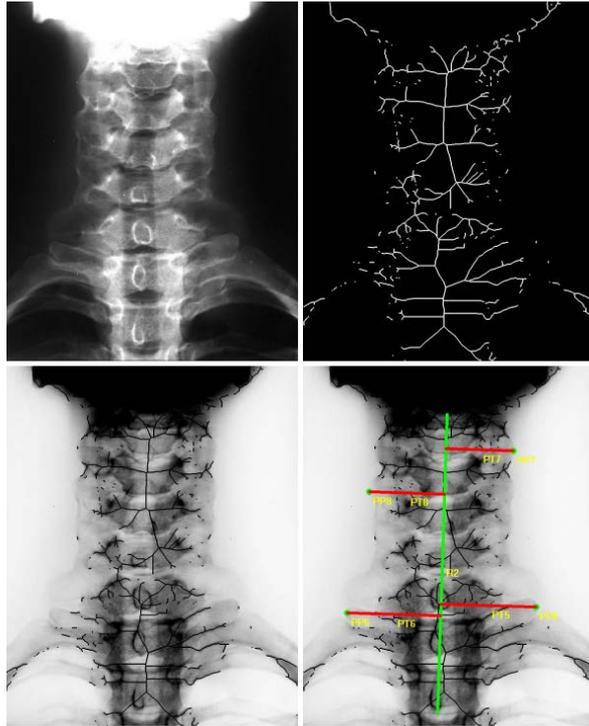
**Fig. 6-54.** Medición manual de ángulos. La articulación del codo, formada por el húmero (hueso vertical), el cúbito y el radio (huesos horizontales), tiene un desplazamiento desde los  $180^\circ$ , en extensión y menos de  $25^\circ$ , en flexión. Para medir estos ángulos se debe umbralizar y esqueletizar la imagen (arriba derecha). De forma manual se trazan dos rectas (L1 y L2) que se corresponden con las líneas que representan a los huesos (abajo izquierda). De esta manera, se delimitan dos ángulos: el interno (AF1) de  $90,07^\circ$  y el externo (AF2) de  $269,93^\circ$  (abajo derecha).

Bajo estas mismas condiciones, si se desea conocer el espesor de una fibra muscular, se pueden trazar dos líneas que sigan la dirección de los bordes de la misma y aplicar la perpendicular entre ellas o con respecto al eje horizontal o vertical de la imagen, para establecer sus distancias promedio, mínima y máxima, respectivamente (Fig. 6-55).



**Fig. 6-55.** Medición de espesores. La imagen mostrando fibras musculares cardíacas (arriba izquierda) fue filtrada mediante el filtro Sobel para remarcar los bordes de las mismas (arriba derecha). Posteriormente, se trazaron dos líneas (L1 y L2) (en verde) que recorren el borde de la fibra muscular. A partir de allí, se trazó la perpendicular entre las mismas (E) o la vertical (EV) u horizontal (EH) con respecto a los ejes de la imagen, para obtener los espesores promedio, máximo, mínimo entre las líneas, respectivamente.

Otra de las mediciones que se pueden realizar de manera manual es la determinación de las perpendiculares a la recta. Esta medición es muy útil para establecer distancias de diferentes objetos con respecto a un eje central. En la figura 6-56 se observa la radiografía de la región cervical humana. Para poder establecer ciertos defectos óseos, como el acortamiento de los procesos vertebrales laterales, es necesario determinar cuál es la línea media de las vértebras y a partir de allí, trazar perpendiculares hacia los mencionados procesos.



**Fig. 6-56.** Medición de líneas perpendiculares al eje central. La imagen radiográfica original (arriba izquierda) se debe procesar mediante umbralización y aplicación de filtros hasta obtener el esqueleto de la misma (arriba derecha). Al unir ambas imágenes mediante el operador NOR, se obtiene la superposición de la mismas (abajo izquierda). Se traza entonces una línea que siga el eje central del esqueleto (verde) y a partir de allí, las perpendiculares hasta la punta de los procesos laterales.

### ***Determinación de la intensidad***

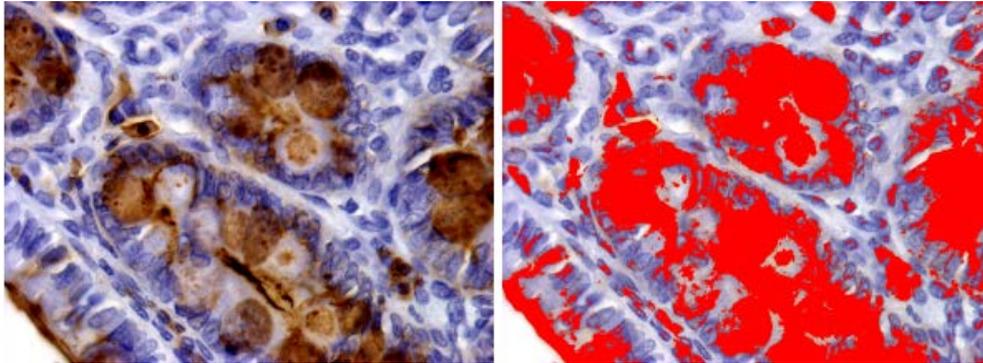
Para poder establecer un valor estandarizado de intensidad de los objetos que se están analizando, las imágenes deben haber sido previamente calibradas. De otra manera, los valores serán expresados en píxeles.

Existen diversas maneras para medir la intensidad de píxel de los objetos. Algunas son similares a las que fueron previamente descritas para las mediciones de longitud. Es decir, al igual que se puede circunscribir un objeto para determinar su área, se puede medir su intensidad. Esto resulta así debido a que de la misma manera que los algoritmos cuentan píxeles encuadrados en un área de interés, pueden sumar intensidades y establecer promedios, máximos y mínimos y relacionarlos con las unidades de calibración. La intensidad se puede medir tanto en imágenes monocromáticas como color. Más aún, en las imágenes policromáticas se puede establecer el grado de intensidad de cada uno de los canales del RGB.

La medición de la intensidad puede ser aplicada sobre las determinaciones inmunohistoquímicas. En las mismas, el depósito de un complejo formado entre un anticuerpo, una molécula reveladora y una sustancia colorante, delimita un área de densidad creciente acorde a la cantidad de proteínas reconocidas por el anticuerpo. El estudio de la densidad óptica de la muestra da una idea de la cantidad de proteínas específicas presentes. Al igual que la inmunohistoquímica, la lectinhistoquímica es una técnica colorimétrica que se basa en el depósito de complejos formados por una lectina, su glúcido de reconocimiento y una sustancia colorante junto con el sistema revelador. Las lectinas son proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto. Su papel principal consiste en el reconocimiento de sus residuos, tanto a nivel molecular como celular. Muchas de estas lectinas se extraen de vegetales. El complejo coloreado también genera un área de mayor densidad, que puede cuantificarse.

En la figura 6-57 se observa un tejido expuesto a una técnica lectinhistoquímica y su correspondiente segmentación basada en el color. A través de esta delimitación es posible

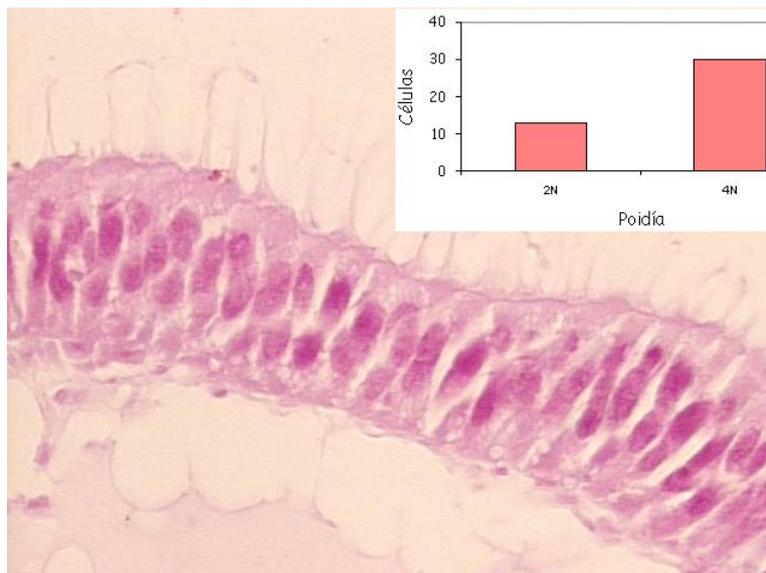
establecer valores de área inmunomarcada y densidad promedio. La comparación con controles de tinción y con tejidos conteniendo una concentración de residuos glucosídicos conocida, permite sacar conclusiones acerca de la muestra problema.



**Fig. 6-57.** Tinción lectinohistoquímica del intestino con la lectina SBA que permite reconocer residuos de  $\alpha$ -D-N-Acetil-galactosamina y  $\beta$ -D- N-Acetil-galactosamina presentes en las células caliciformes. A la derecha se observa la segmentación de la marcación basada en el color de la reacción.

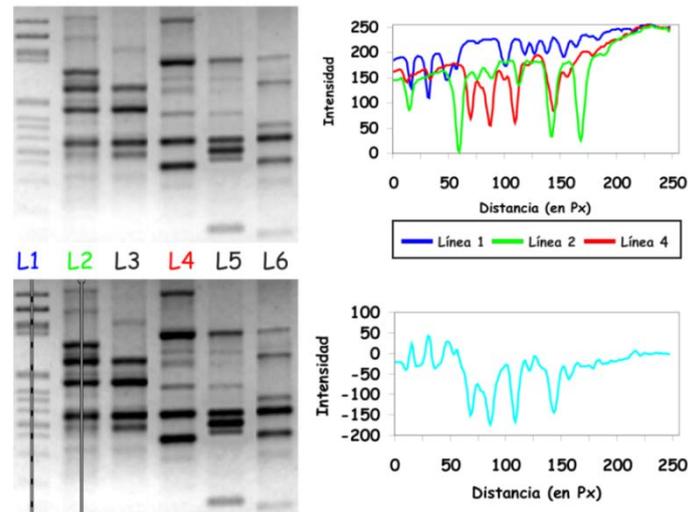
Los estudios de ploidía celular (recuento de cromosomas celulares) se basan en el principio de la densidad óptica que genera la técnica de Feulgen sobre los tejidos. Esta técnica es utilizada en histología para identificar material cromosómico o ADN en células. El material a analizar es sometido a una hidrólisis con ácido clorhídrico y una posterior tinción con el reactivo de Schiff. Esta técnica es cuantitativa ya que los únicos aldehídos que quedan en la célula son los producidos por la hidrólisis del ADN. A mayor cantidad de aldehídos, mayor concentración del reactivo de Schiff. Esta concentración se refleja por la densidad óptica que genera al ser observado en el microscopio.

Para este tipo de reacciones se utiliza la medición de la densidad óptica integrada, que resulta del producto entre el área nuclear y su densidad promedio. De esta manera, independientemente del tamaño del núcleo, se puede establecer la normalidad o anormalidad de todas las células nucleadas del organismo. En la figura 6-58 se observa la tinción de Feulgen sobre un ovario y su correspondiente representación de intensidades en el histograma.

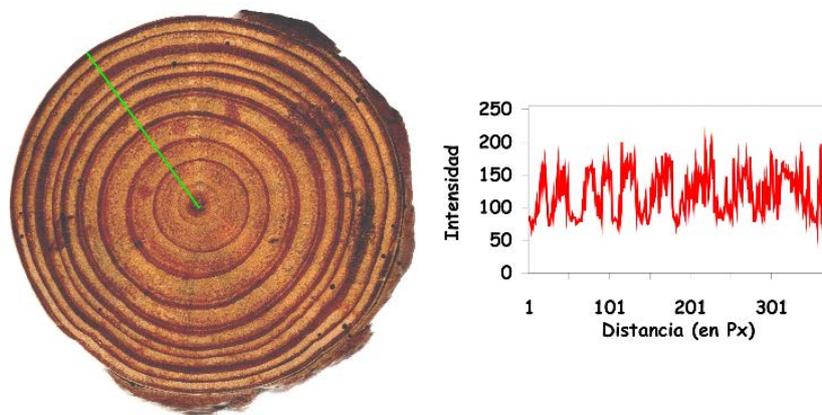


**Fig. 6-58.** Epitelio del ovario del pez *Gerypteris blacodes* (Schneider, 1801) (Abadejo) teñido con la técnica de Feulgen. De acuerdo al análisis de la densidad óptica integrada, se puede establecer el grado de ploidía celular.

La determinación de intensidad lineal es un procedimiento manual en donde una línea (recta, curva o irregular) atraviesa la muestra, determinando el valor del píxel que se encuentra debajo. A partir de allí se genera un histograma con picos positivos, negativos y valles que dan idea de la distribución de las intensidades. Esto puede ser aplicado, entre otros procesos, en una corrida electroforética para el análisis de pesos moleculares de las proteínas (Fig. 6-59), o sobre cortes transversales de madera para el estudio de la edad de la muestra (Fig. 6-60).

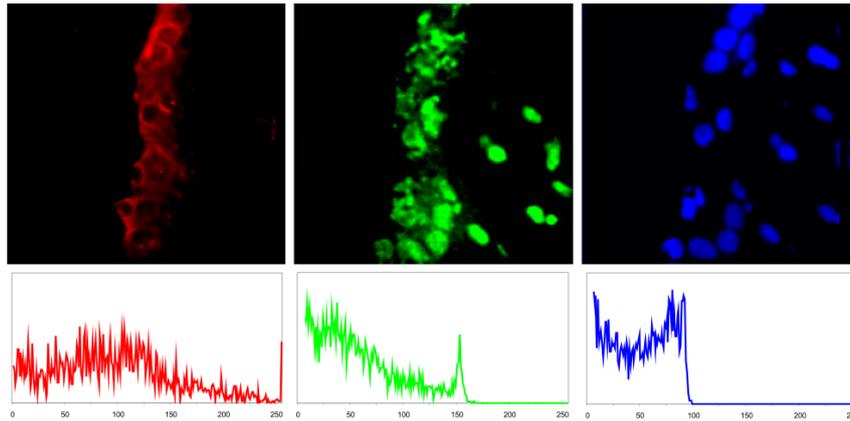


**Fig. 6-59.** Trazado de un perfil de línea para la determinación de la concentración de proteínas en una corrida electroforética (izquierda). En la gráfica de arriba derecha, sólo se representaron 3 de las 6 líneas. Para que los valores de intensidad se representen en unidades de concentración, es necesario calibrar previamente el sistema. Si se traza una línea de referencia (línea punteada en la imagen inferior izquierda), se obtiene la diferencia entre ésta y la línea testigo (línea llena). A su derecha se observa la gráfica que muestra estas diferencias.



**Fig. 6-60.** Corte transversal de *Pinus sp* (pino). La línea verde se traza desde el centro a la periferia (izquierda). A la derecha se grafican los valores de intensidad de los píxeles subyacentes a la línea. Las depresiones corresponden al leño tardío de los anillos que se forman al final de cada estación de crecimiento (zona oscura). Los picos se corresponden con el leño temprano del anillo de crecimiento (zona clara). Cada anillo (zona clara + zona oscura) corresponde a un año de vida. (Imagen cedida gentilmente por la Dra. S. Monteoliva, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata).

El estudio de la intensidad de los objetos también se realiza con mucha frecuencia sobre imágenes fluorescentes, para establecer diferencias de gradiente de expresión de diversas proteínas (Fig. 6-61). Asimismo, se las estudia en procesos in vivo, para determinaciones de funcionalidad celular. Las variaciones de la intensidad en el tiempo son estudiadas mediante los métodos de seguimiento (del inglés: “tracking”) que serán descriptos más adelante.



**Fig. 6-61.** Imagen confocal del epitelio endimario en el ventrículo lateral del encéfalo, donde se identifica a la vimentina (rojo), GFP transducido por terapia génica (verde) y núcleos (azul). El histograma de cada uno de los canales muestra la diversidad de intensidades de cada una de las tinciones. Imagen cedida gentilmente por el Dr. R. Goya - INIBIOLP. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata.

### ***Colocalización cuantitativa***

El término colocalización puede ser utilizado de diversas maneras. Desde el punto de vista netamente biológico, es la observación de dos o más objetos dentro de un mismo ambiente, como podrían ser dos o más moléculas dentro de un mismo citoplasma. Sin embargo, desde el punto de vista físico, trabajando con microscopía de fluorescencia y particularmente con microscopía confocal, el término colocalización se refiere a la coexistencia, en un mismo espacio físico, de dos fluoróforos que expresan distintas longitudes de onda. En el campo de la biología celular o subcelular esto se podría interpretar como la presencia de moléculas ancladas a su receptor. En el contexto de las imágenes digitales, puede ser descrito como el solapamiento espacial de dos o más tonalidades (ubicación en el mismo píxel/vóxel) en una imagen multidimensional.

La superposición de los colores virtualmente asignados a los fluoróforos, (colores primarios o aditivos: rojo, verde, azul), tomados de a dos, da origen a la observación de un tercer color (colores secundarios o sustractivos: cian, magenta, amarillo) (ver Capítulo 1). Este principio es el que permite interpretar los resultados de la colocalización.

Esta técnica es de suma importancia para los investigadores dedicados tanto a la fisiología celular como a los estudios estructurales, ya que permite identificar la posición exacta de estructuras de interés, y con ello, las correspondientes interpretaciones funcionales.

Cuando los estudios de colocalización se hacen cuantitativos, se obtienen datos relevantes, tales como la caracterización de cambios posicionales de las estructuras analizadas o la intensidad de expresión de cada uno de los fluoróforos en el punto de solapamiento. El propósito de establecer el coeficiente de colocalización de los fluoróforos es la caracterización global del grado de solapamiento entre las dos longitudes de onda analizadas, dentro de imágenes 2D o multidimensionales.

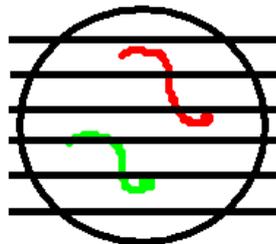
Es necesario tener en claro, no obstante, que la determinación cuantitativa del grado de colocalización depende de muchos factores, entre los que se encuentra la calidad de la imagen. Por ello, lo ideal es trabajar, al menos, con un microscopio confocal. Asimismo, es importante establecer que el uso de este sistema microscópico permite capturar imágenes en diferentes puntos focales, a diferencia del microscopio de fluorescencia convencional, cuya imagen única corresponde a la sumatoria de la fluorescencia emitida por todo el espesor de tejido analizado. Este último punto es crítico, ya que el solapamiento se podría deber a un efecto visual y no al solapamiento real de las diferentes longitudes de onda (Fig. 6-62).

Por el contrario, la imagen multidimensional 3D, obtenida mediante el microscopio confocal, permitiría establecer claramente la coexistencia o no de ambos fluoróforos (Fig. 6-63). El problema del microscopio de fluorescencia de campo ampliado podría solucionarse, al

menos parcialmente y para ciertos estudios, si el espesor de la muestra a analizar fuera delgada (menor a los 5  $\mu\text{m}$ ).



**Fig. 6-62.** Colocalización en microscopía de fluorescencia convencional. La imagen única obtenida con un microscopio de fluorescencia de campo ampliado puede generar confusiones al momento de analizar la colocalización de dos fluoróforos. El observador de la izquierda visualiza los fluoróforos como superpuestos (colocalizando), mientras que el de la derecha los ve como dos objetos independientes.



**Fig. 6-63.** Colocalización en microscopía de fluorescencia confocal. Cortes ópticos seriales en el eje Z, tomados mediante un microscopio confocal, permiten establecer claramente la ausencia de colocalización entre ambas estructuras marcadas con diferentes fluoróforos.

Otra condición necesaria al realizar el estudio cuantitativo de colocalización es la calidad de los objetivos con los que se toma la imagen. Es necesario que la apertura numérica (NA) de los mismos sea la más amplia disponible, ya que permite una mejor resolución de la imagen y por ende, de los objetos contenidos en la misma. Una buena resolución evita que los sistemas periféricos de captura (cámaras) consideren como únicos, a dos elementos que se encuentren separados. Finalmente, es primordial tener en cuenta que todas las imágenes que vayan a ser cuantitativamente analizadas deben ser adquiridas utilizando los mismos parámetros del microscopio (intensidad del láser, potencia del fotomultiplicador, tiempo de exposición, tamaño del pinhole, etc.). Las variaciones en estos parámetros modifican la intensidad de observación y captura de la luz emitida por el fluoróforo y por ende, del grado de participación en la colocalización de cada longitud de onda en las diferentes imágenes analizadas.

Es importante destacar que el entrecruzamiento o sangrado de dos fluoróforos, debido a la similitud de ambos en el espectro de emisión, puede generar errores de interpretación (ver Capítulos 2 y 5). Lo ideal es que las longitudes de onda emisión de ambos fluoróforos se encuentren diametralmente separadas, y aunque así no fuera, que pudieran capturarse independientemente. Esto se logra fácilmente en el microscopio confocal al capturar cada una de las diferentes longitudes de onda de manera secuencial. Otro detalle que debe tenerse en cuenta para la cuantificación de la colocalización es la ausencia de ruidos. En estos procesos, el ruido y todas las fuentes que contribuyen con el fondo (bruma, autofluorescencia, tinción inespecífica, reflexiones y sangrado) tienen un gran impacto sobre la cuantificación. Es necesario aclarar que previo a los estudios de colocalización cuantitativa se requiere emplear métodos de deconvolución cuantitativa para la corrección del fondo, como los algoritmos MLE, ya que la bruma de una imagen puede dar falsos positivos al estudio. La utilización de este tipo de algoritmos es fundamental para la conservación de la intensidad de la imagen (ver Capítulo 4).

La figura 6-64 muestra la colocalización del GFP (canal 1) y DAPI (canal 2) dentro de núcleos de células endimarias de un segmento de la médula espinal de la rata. La Tabla

6-12 muestra el análisis cuantitativo de colocalización realizado sobre el sector circunscrito (ROI) en la figura.

Tabla 6-12. Análisis cuantitativo de colocalización del ROI de la figura 6-63

Parámetro de colocalización	Valor
Coefficiente de correlación de Pearson R(r)	0.655
Coefficiente de superposición de Manders R	0.931
Coefficiente de superposición k1 (azul)	1.613
Coefficiente de superposición k2 (verde)	0.537

Los valores indican que existe un alto grado de colocalización entre ambas longitudes de onda para el sector (ROI) analizado.

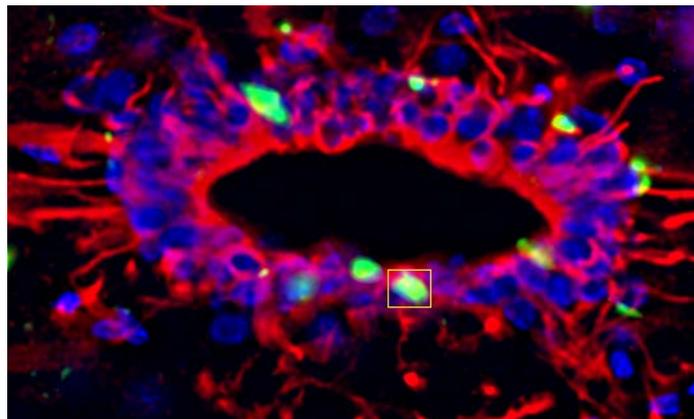


Fig. 6-64. Segmento C5 de la médula espinal de la rata joven mostrando la expresión de vimentina (rojo) y DAPI (azul). La fluorescencia verde corresponde a la expresión del gen para GFP acarreado por un vector adenoviral. En el recuadro amarillo se puede ver la colocalización de GFP y DAPI dentro de la estructura nuclear (cian). La imagen fue capturada con un microscopio de fluorescencia convencional con un objetivo de 40x NA 0.75. El espesor del corte fue de 4  $\mu\text{m}$ .

El análisis cuantitativo de colocalización produce un número de coeficientes para su estimación, a la vez que permite ver las áreas de colocalización en la imagen. La distribución de los píxeles de acuerdo a los canales puede verse en un gráfico de dispersión que representa su ubicación espacial, cantidad y concurrencia con respecto al otro canal. En el histograma, todas las intensidades de píxel de un canal se representan en uno de los ejes (X o Y) en contra de las intensidades de los mismos píxeles en el otro canal. Por esta razón, todos los píxeles de ambas imágenes que presenten valores de intensidad similares, se encontrarán en la diagonal que recorre el gráfico, con punto de origen en el valor 0 (abajo a la izquierda) y finalización en el valor 255 (arriba a la derecha).

El **coeficiente de Pearson** es una medición estándar en el reconocimiento de patrones. Este coeficiente se resuelve mediante la ecuación:

$$R = \frac{\sum_i (S1_i - \overline{S1_i}) * (S2_i - \overline{S2_i})}{\sqrt{\sum_i (S1_i - \overline{S1_i})^2 * \sum_i (S2_i - \overline{S2_i})^2}} \quad [6-33]$$

donde,  $S1$  representa la intensidad de los píxeles en el canal 1 y  $S2$ , la intensidad de los mismos del canal 2. Cada uno de los canales se resta de sus correspondientes valores promedio.

El coeficiente de correlación de Pearson ( $R$ ) describe la correlación entre la distribución de la intensidad, o patrón de solapamiento en los dos canales, de acuerdo al ajuste de los mínimos cuadrados. Sólo toma en consideración la similitud en las formas, ignorando las intensidades de las señales. El valor de  $R$  tiene el rango de -1 a 1, siendo el  $R = -1$  indicativo de una correlación negativa completa, mientras que el  $R = 1$  indica la total correlación entre ambos canales. Los valores comprendidos entre 0 y 1, indican un grado proporcional

de solapamiento entre los dos canales, mientras que los valores entre -1 y 0 indican cierta forma de relación inversa entre las señales, hecho que puede ocurrir cuando uno de las mismas es muy baja y la otra es brillante, o aún cuando no se solapan.

El **coeficiente de superposición de Manders** se refiere específicamente a la superposición de los canales y por lo tanto, representa el verdadero grado de colocación. Este valor se halla mediante la ecuación:

$$r = \frac{\sum_i (S1_i * S2_i)}{\sqrt{\sum_i (S1_i)^2 * \sum_i (S2_i)^2}} \quad [6-34]$$

donde,  $S1$  representa la intensidad de los píxeles en el canal 1 y  $S2$ , la intensidad de los mismos del canal 2.

Este coeficiente no es sensible a las limitaciones de las imágenes fluorescentes, tales como la eficiencia de hibridación, fotoblanqueo y eficiencia cuántica de la cámara. Es menos sensible a los desbalances de intensidad de los canales que el coeficiente de Pearson. Sin embargo, este último es menos sensible a los niveles de intensidad de los píxeles que conforman el fondo de la imagen. Sus valores se encuentran en un rango entre 0 y 1. Si la imagen tiene un valor de  $r = 0,5$  significa que el 50% de los píxeles de ambos canales están superpuestos. Un valor de  $r = 0$  significa que no hay píxeles superpuestos.

Ambos coeficientes ( $R$  y  $r$ ) se ven afectados por el número relativo de objetos marcados en cada canal de la imagen.

Los **coeficientes de superposición  $m1$  y  $m2$**  describen la contribución (proporción) de cada uno de los canales a la colocación de los píxeles. Estos coeficientes se obtienen de mediante las ecuaciones:

$$m1 = \frac{\sum_i S1_{i,coloc}}{\sum_i S1_i} \quad [6-35]$$

$$m2 = \frac{\sum_i S2_{i,coloc}}{\sum_i S2_i} \quad [6-36]$$

donde,  $S1_{i,coloc} = S1_i$  si  $S2_i > 0$  y  $S2_{i,coloc} = S2_i$  si  $S1_i > 0$ . En estas ecuaciones, el numerador representa los píxeles colocalizantes, es decir, la suma de las intensidades de los píxeles dentro de un canal que además contienen intensidades provenientes del otro canal. Los denominadores corresponden a la sumatoria de las intensidades de todos los píxeles de cada canal. Pueden ser determinados independientemente del balance entre el número de píxeles colocalizantes en cada canal o entre las intensidades promedio de los dos canales. Su única limitante radica en la necesidad de la existencia de un mínimo de colocación.

A modo de ejemplo, si se seleccionan los canales rojo y verde y  $m1 = 1,0$  mientras que  $m2 = 0,2$  significa que todos los píxeles rojos colocalizan con los píxeles verdes, pero solo el 20% de los verdes colocalizan con los rojos. Si el valor de ambos coeficientes fuera 1,0 indicaría que existe una colocación perfecta entre los canales.

Los **coeficientes de superposición  $k1$  y  $k2$**  dividen el valor de colocación en un par de parámetros separados. Estos valores se obtienen mediante las ecuaciones:

$$k1 = \frac{\sum_i S1_i * S2_i}{\sum_i (S1_i)^2} \quad [6-37]$$

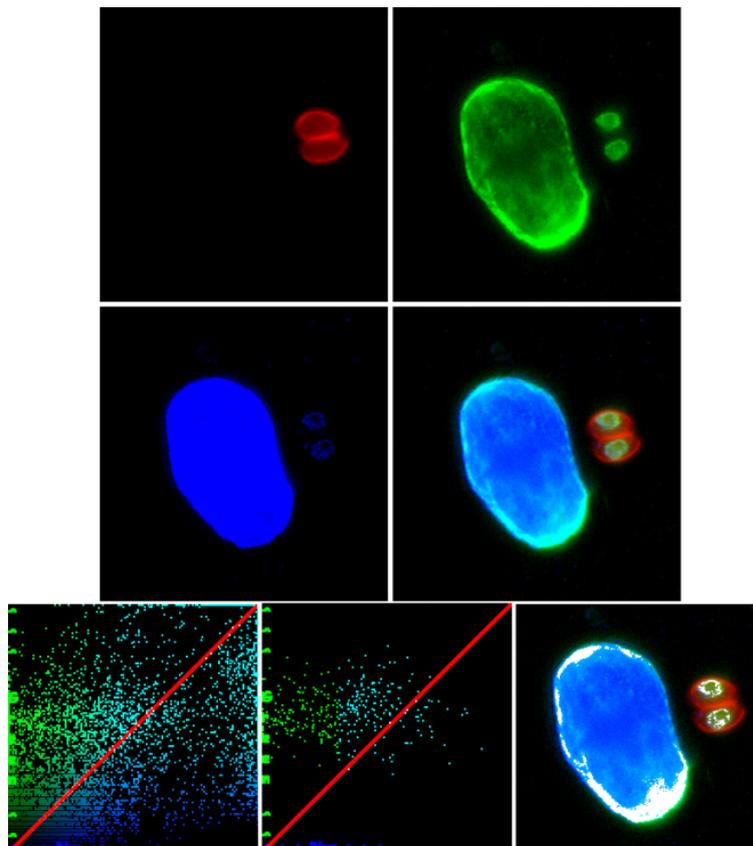
$$k2 = \frac{\sum_i S2_i * S1_i}{\sum_i (S2_i)^2} \quad [6-38]$$

donde,  $S1$  representa la intensidad de los píxeles en el canal 1 y  $S2$ , la intensidad de los píxeles del canal 2. Estos valores dependen de la suma de los productos de las intensidades de los dos canales analizados y son sensibles a las diferencias en la intensidad de las seña-

les. Estos coeficientes permiten determinar la contribución de cada sustancia marcada a las áreas de colocalización.

Todos estos coeficientes pueden ser utilizados en todas las pruebas de colocalización. El coeficiente de Manders se utiliza principalmente cuando existen marcadas diferencias entre la intensidad de uno de los canales con respecto al otro.

La figura 6-65 muestra una imagen fluorescente que identifica diversas proteínas en el citoplasma y núcleo de un parásito mediante la utilización de tres 3 canales. El estudio de colocalización sólo se lleva a cabo entre pares (rojo-verde; verde-rojo; rojo-azul; azul-rojo; verde-azul; azul-verde). El análisis de colocalización se puede realizar sobre toda la imagen o sólo en una región de interés (ROI). Como resultado de esto, se obtiene un diagrama de dispersión y el valor de los coeficientes mencionados anteriormente. La Tabla 6-13 muestra los valores de los coeficientes del estudio de colocalización entre los canales azul-verde, para toda la imagen y para el ROI que encierra al núcleo del parásito.



**Fig. 6-65.** El panel superior muestra los canales rojo (que identifica al complejo interno de membrana 1 - IMC-1 - del parásito *Toxoplasma gondii*) (arriba izquierda); verde (que identifica a la epicromatina) (arriba derecha) y azul (que se une al ADN) (abajo izquierda). Abajo derecha: unión de los tres canales precedentes (merge). El núcleo grande presente en la imagen corresponde a la célula huésped (fibroblasto humano) donde se cultivan los parásitos. En el panel inferior se observa el diagrama de dispersión de toda la imagen al colocalizar los canales azul y verde (izquierda). Los píxeles más colocalizantes de ambos canales se encuentran cercanos a la línea roja, teñidos de cian. Los píxeles más alejados y teñidos de verde o azul indican el menor porcentaje de colocalización. La imagen central representa la distribución de los píxeles colocalizantes dentro del núcleo de los parásitos. La imagen derecha es una máscara de los píxeles colocalizantes (marcados en blanco sobre la imagen original). Imagen cedida gentilmente por la Dra. L. Vanagas - Laboratorio de Parasitología Molecular. IIB-INTECH. CONICET-Universidad Nacional de San Martín.

La colocalización no sólo se puede realizar sobre la secuencia de imágenes 3D, sino que además, se la puede visualizar. El principio es el mismo que para las imágenes 2D, en donde los píxeles colocalizantes pueden observarse a lo largo de toda la secuencia. La ventaja de contar con un visualizador 3D es que todos los puntos colocalizantes se pueden

ver como una unidad. En aquellos programas que tengan la posibilidad de medir volúmenes, la colocalización también podrá ser cuantificada en sus correspondientes unidades (Fig. 6-66).

Tabla 6-13. Análisis cuantitativo de colocalización para los canales azul-verde de la figura 6-65 de toda la imagen o del ROI de núcleo parasitario

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Toda la imagen		ROI del núcleo	
Pearson (Rr)	0.854	Pearson (Rr)	0.161
Manders (R)	0.884	Manders (R)	0.858
k1 (azul)	0.505	k1 (azul)	1.322
k2 (verde)	1.546	k2 (verde)	0.557
m1 (azul)	0.997	m1 (azul)	1.000
m2 (verde)	0.923	m2 (verde)	0.958

Los valores indican que existe un alto grado de colocalización tanto en la imagen total como dentro del núcleo del parásito.

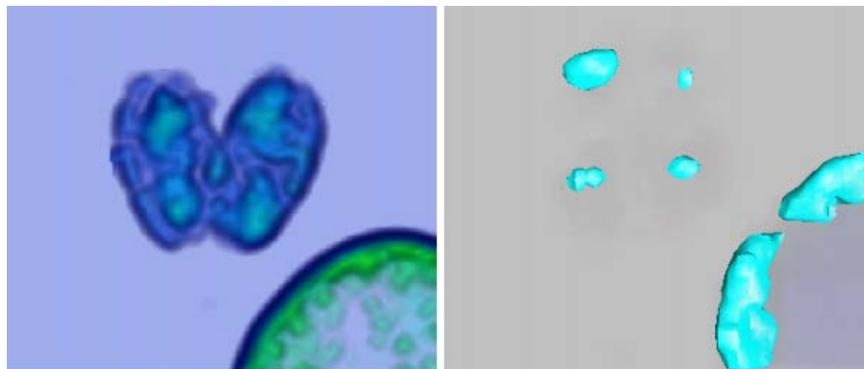


Fig. 6-66. Colocalización 3D. En el panel izquierdo se ve la imagen 3D de un marcador nuclear (azul) y una proteína colocalizante (verde). En el panel derecho se observan los puntos de colocalización entre ambos fluoróforos.

### Recuento

El recuento se basa en la identificación de un color o de una intensidad que represente a los objetos a cuantificar. Para automatizarlo, se requiere de la participación del usuario que determine, de acuerdo a su conocimiento, cual es el rango de intensidades que considera que forman parte de la estructura a cuantificar. Cuando se trabaja con imágenes binarizadas, el recuento se hace en base a los píxeles negros o blancos. En imágenes monocromáticas, se recurre al rango de intensidad de los píxeles, mientras que en las imágenes color, se puede elegir entre la intensidad de cada uno de los canales de color (RGB) o la resultante de su combinación. En este último caso, dado que el ojo humano es incapaz de percibir de manera discriminada cada una de las tonalidades que se pudieran formar por la combinación de los tres canales de color, es de buena práctica seleccionar las intensidades de los píxeles con el agregado de cierto grado de desvío con respecto al color inicial. Los colores o intensidades así seleccionados son identificados mediante un único color de paleta (Fig. 6-67).

Si el recuento consistiera simplemente en la sumatoria de píxeles seleccionados, el proceso sería sumamente sencillo. No obstante, al realizar un recuento de objetos es necesario reconocer los bordes de los mismos, para establecer si el conjunto de píxeles seleccionados puede ser considerado como una unidad. Aquí se ponen en práctica lo que fuera descrito previamente sobre factores de forma y tamaño. También se debe determinar si el recuento de los objetos considera la presencia o no de orificios dentro de su estructura; si los objetos pueden estar o no en contacto entre sí; si los que no se encuentran completa-

mente representados dentro de la imagen pueden ser incorporados o no en el recuento final, etc.



Fig. 6-67. Recuento basado en el color. Se realizó la selección de los dulces violeta, los que fueron identificados automáticamente por el programa mediante un color paleta (gris) y un número de orden que, por lo general, se asigna por filas (de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha).

En la figura 6-68 se observan 3 engranajes bien definidos. Si se hiciera el recuento manual sería muy sencillo identificar los límites de cada uno de ellos. Sin embargo, cuando se realiza un recuento automatizado no resulta tan fácil. En primera instancia, los tres objetos tienen las mismas intensidades, hecho que no permite distinguir unos de otros. La diferencia entre ellos se encuentra en su tamaño, sin embargo, los tres están unidos a modo de unidad a través de sus dientes encastrados. Esto se observa claramente al realizar la segmentación. Si el recuento se realiza con el relleno de orificios, la cuenta de objetos sigue siendo uno. Si en lugar de tomar la totalidad de las intensidades sólo se toman las más oscuras, que por otra parte no se tocan entre sí, al hacer el recuento con relleno de orificios y teniendo en cuenta la redondez similar a la del círculo, es posible identificar a los 3 objetos. Siguiendo este mismo procedimiento sobre una imagen binarizada, se obtienen los mismos resultados.

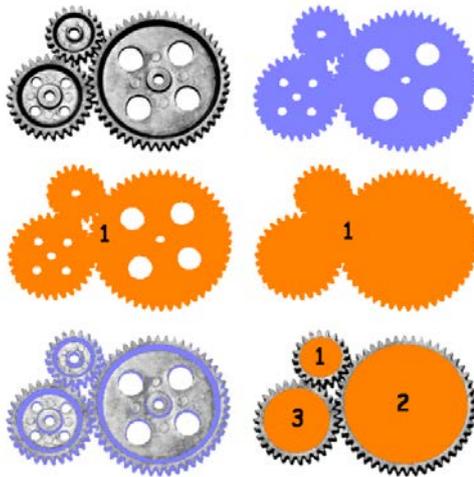
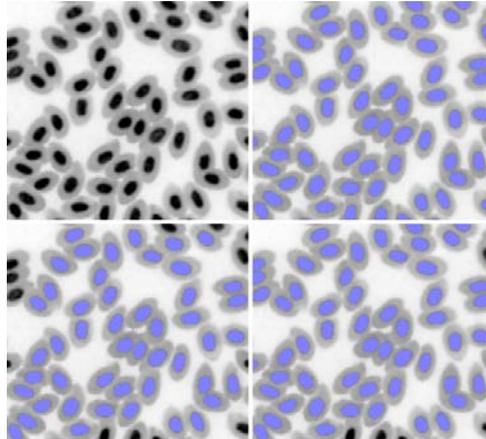


Fig. 6-68. Recuento de objetos en una imagen monocromática. La imagen original (arriba izquierda) fue segmentada para todas las intensidades de gris (arriba derecha). Durante el recuento sin el relleno de orificios (centro izquierda) o con él (centro derecha), sólo se identificó un objeto. Cuando se segmentó para ciertas intensidades comunes entre sí (abajo izquierda), el recuento detectó los tres objetos, pero sólo cuando se seleccionaron las opciones de relleno de orificios y redondez similar al círculo ( $R = 1$ ).

Existen ciertas controversias acerca de considerar los objetos que tocan los bordes de las imágenes para su recuento. Ciertamente, estos no pueden ser tomados en consideración para las mediciones ya que se estaría falseando el resultado. Para el recuento, sin embargo, la convención establece que se tomen en cuenta aquellos objetos que toquen el borde superior e izquierdo y se descarten los que contacten con el borde inferior y derecho (Fig. 6-69). Dado que cada objeto tiene sólo un extremo inferior y derecho, el recuento de este extremo sería como contar a toda la unidad. Por lo tanto, aquellos objetos en donde no se observe este sector, no podrán ser contados.

El recuento de objetos es relativamente sencillo cuando los objetos se encuentran separados. En el Capítulo 4 se describió la posibilidad del empleo de filtros (Sobel, Watershed, etc.) para delimitar objetos, haciéndolos separables unos de otros. No obstante, este proce-

dimiento no siempre es posible. También se describió la separación de elementos oblongos a través de la transformada de Hough (Fig. 6-42). Mediante este procedimiento se puede estimar la cantidad de fibras por campo visual.



**Fig. 6-69.** Recuento de núcleos celulares. En la imagen superior izquierda se observan 63 células nucleadas. En la imagen superior derecha se cuentan todos los núcleos que tiene características de tal en toda la imagen (total=63). Abajo izquierda, se descartan los que tocan cualquiera de los cuatro bordes de la imagen (total=48). Abajo derecha, se descartan los que tocan los bordes inferior y derecho (total=54).

En la figura 6-70 se observa la misma imagen de la figura 6-67 pero monocromática. Frente a estas circunstancias la selección individual de cada una de las intensidades correspondientes a los dulces resulta bastante difícil. Por lo tanto, en este caso sólo se pretende determinar la cantidad de unidades presentes.

Al hacer un recuento manual de los objetos, eliminando aquellos que toquen el borde derecho e inferior se llega a un total de 108. Para tratar de alcanzar este número mediante métodos automatizados hay que realizar cierto procesamiento sobre la imagen original. El empleo de estos procedimientos tiene la finalidad de identificar alguna región de cada uno de los objetos para que sean considerados como unidades. Luego de la aplicación de filtros y del proceso de umbralización, se puede comenzar con el recuento. En ciertos casos, puede ser necesario recurrir a una separación de objetos por métodos manuales o a través de filtros, como el Watershed. No obstante, no siempre los resultados son los esperados. Como recurso final, se puede realizar el estudio de las agrupaciones de objetos (del inglés: “clusters”). Este procedimiento consiste en el análisis estadístico del área promedio de los objetos individuales. Este valor es utilizado posteriormente para ser dividido por el área total de cada uno de los clusters. De esta manera, se obtiene el número de objetos contenidos en los mismos, que se suman al valor inicial de recuento automatizado.

Existe otra forma de realizar el recuento que resulta menos laboriosa que la anterior, aunque requiere de mayor atención final. Esto se logra al umbralizar la imagen inicial y aplicar sobre esta última el filtro de Punto final (Fig. 6-71). Cada uno de los puntos corresponde a un área de reconocimiento de objetos umbralizados. El recuento de puntos indica la cantidad de objetos. El inconveniente que se genera es que los puntos tienen una dimensión menor a la del objeto y, por lo tanto, durante el recuento automatizado probablemente no toque los bordes derecho e inferior. En este caso se puede proceder a la desactivación manual de los objetos que el usuario considere que no deberían entrar en el recuento.

### ***Seguimiento de objetos (Tracking)***

Este procedimiento consiste en identificar patrones del objeto que permitan reconocerlo a lo largo de una secuencia de imágenes en el tiempo. Se puede implementar sobre imágenes de time lapse, 4D y 5D. Mediante este tipo de análisis se puede establecer la velocidad de desplazamiento de un objeto, su trayectoria, aceleración y distancia recorrida. Por otra parte, y simultáneamente, se pueden determinar los cambios de forma, tamaño o intensidad, en el tiempo.

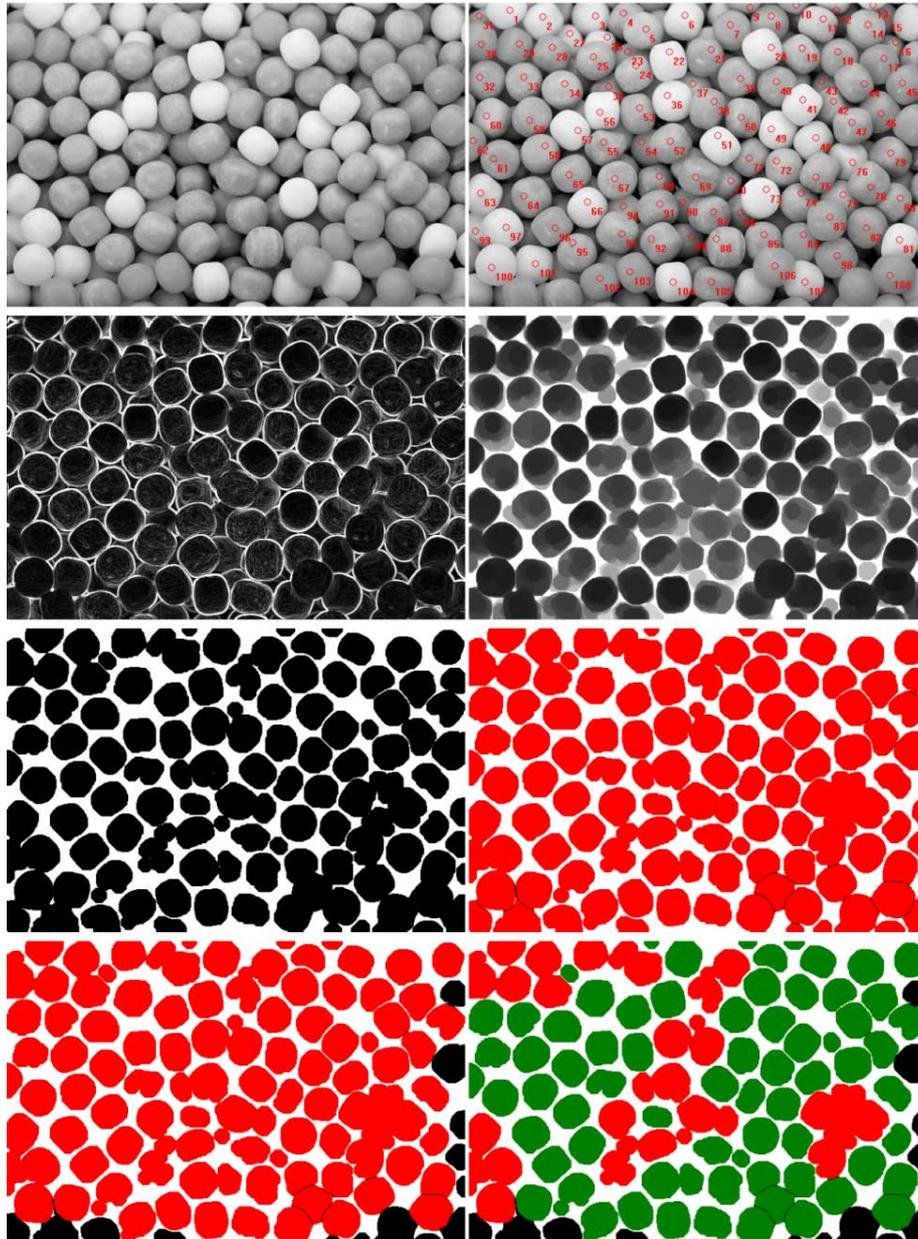
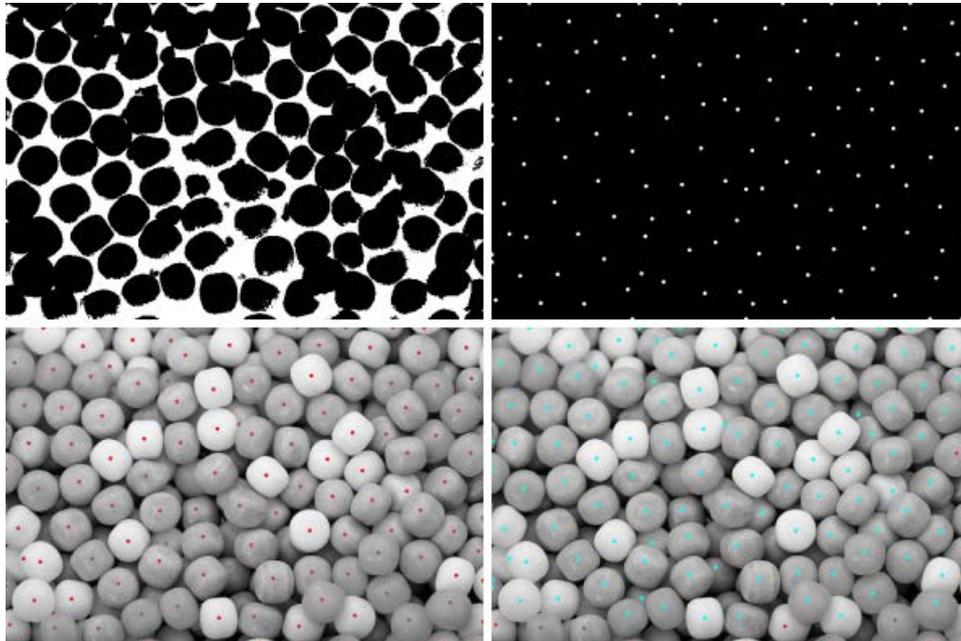


Fig. 6-70. Fila superior: se observa la imagen monocromática conteniendo dulces (izquierda). A su derecha, el recuento manual indicando la presencia de 108 objetos que no tocan los bordes inferior y derecho. Segunda fila: la imagen original fue procesada (filtro Sobel) para identificar los bordes de los objetos (izquierda). Sobre ésta, se aplicó el filtro Close para unificar el contenido de los objetos (derecha). Tercera fila: la última imagen fue umbralizada (izquierda). En ésta se reconocieron 94 objetos totales (derecha). Fila inferior: luego de realizar separaciones automáticas y manuales se contaron 80 objetos (72 unidades + 8 agrupaciones - clusters) (izquierda). Dentro de los clusters se contaron 36 objetos individuales (derecha), lo que lleva a una suma de 108, igual al número reconocido manualmente. Los objetos en clusters están marcados con rojo; los individuales, con verde.

Para realizar estos análisis se pueden aplicar algoritmos muy simples buscando discontinuidades. Esto se implementa a través de la utilización de filtros tales como el Laplace o el Gauss, la posterior umbralización y finalmente, la detección del movimiento teniendo una imagen de referencia. Si bien estos programas informáticos son sencillos, son muy sensibles al ruido y difíciles de generalizar. Una serie de programas más avanzados incluye iteraciones y/o transformaciones, tales como la transformada de Hough, segmentación por regiones y segmentación morfológica. Si bien estos algoritmos son más estables en lo concerniente al ruido, a medida que los objetos o las imágenes se vuelven más grandes, estos se tornan más lentos. Otras secuencias informáticas se basan en el reconocimiento de

patrones, tales como las redes neuronales, máxima probabilidad y las máquinas de soporte de vectores. Las redes neuronales son adaptativas y van cambiando en el tiempo conforme el objeto se va desplazando. En primera instancia es necesario traducir las imágenes en algo que los programas puedan comprender y por lo tanto, las mismas son procesadas como patrones vectoriales. La mayoría de estos algoritmos requiere de una serie de datos de entrenamiento para formar el límite de decisión, lo cual lo torna en un proceso lento. Sin embargo, el resultado final se obtiene rápidamente.



**Fig. 6-71.** La misma imagen original de la figura 6-70 fue sometida a un proceso de umbralización (arriba izquierda) y posterior aplicación del filtro de Punto final (arriba derecha). Los puntos fueron superpuestos sobre la imagen original mediante el operador XOR (abajo izquierda). Al realizar el recuento se contaron solo los puntos que no tocaban los bordes derecho e inferior, o cuyos objetos en la imagen original no los tocaban. De esta manera, se llegó a la cuenta de 108, como en el procedimiento anterior.

La figura 6-72 muestra un esquema de cómo se realiza el procedimiento básico para el seguimiento de objetos a lo largo del tiempo. Al comienzo, el usuario debe indicarle al sistema cual es y donde se encuentra el objeto a rastrear. La etapa de **detección** es la responsable de detectar y segmentar los diversos objetos de la imagen. La etapa de **reconocimiento** clasifica los objetos previamente identificados. La **actualización** es la etapa encargada de actualizar la representación del objeto rastreado, utilizando la información obtenida en la etapa de previa. La etapa final de **predicción** es la responsable de utilizar toda la información para predecir donde debe comenzar la segmentación en la próxima etapa de detección, para minimizar el tiempo de consumo y la probabilidad de error. En todos estos algoritmos, lo fundamental es el reconocimiento del objeto y su separación del fondo. Es allí donde entran en juego todos los procedimientos de filtración y transformaciones que fueron descriptos principalmente en el Capítulo 4.

Cuando se quiere realizar el seguimiento de objetos macroscópicos, como en el análisis del desplazamiento de las extremidades de un equino en carrera, el reconocimiento resulta más sencillo que el necesario para seguir a un protozoario en un cultivo, y a su vez este es menos complicado que el seguimiento de un organoide celular, que se basa exclusivamente en la intensidad del fluoróforo que lo determina. El inconveniente mayor no es el tamaño del objeto a rastrear sino la “contaminación” con otros objetos en el entorno. En la figura 6-73 se observa el seguimiento de un protozoario en el tiempo.

La figura 6-74 muestra el análisis del desplazamiento del protozoario de la figura 6-73. Allí se grafican los valores de la distancia recorrida, expresada en unidades de longitud (mm), de acuerdo a la calibración espacial de la imagen; también se grafica la velocidad de desplazamiento entre puntos y su aceleración.

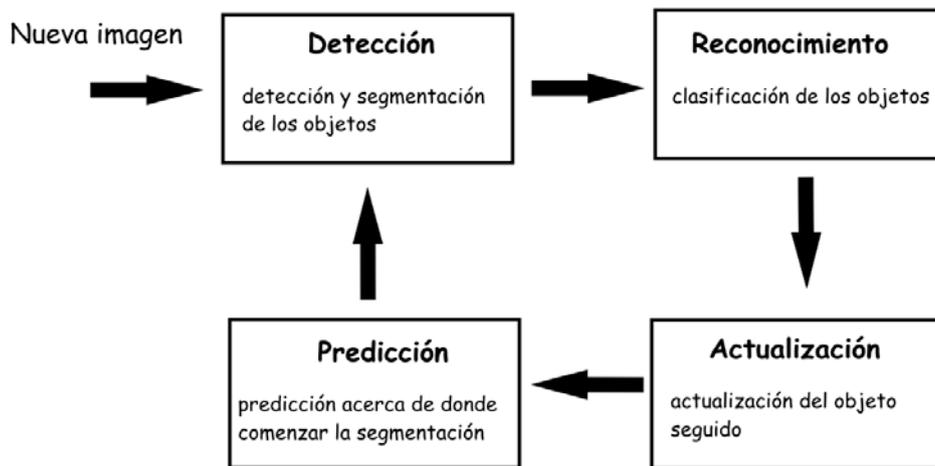


Fig. 6-72. Bloque principal del algoritmo para el seguimiento de objetos.

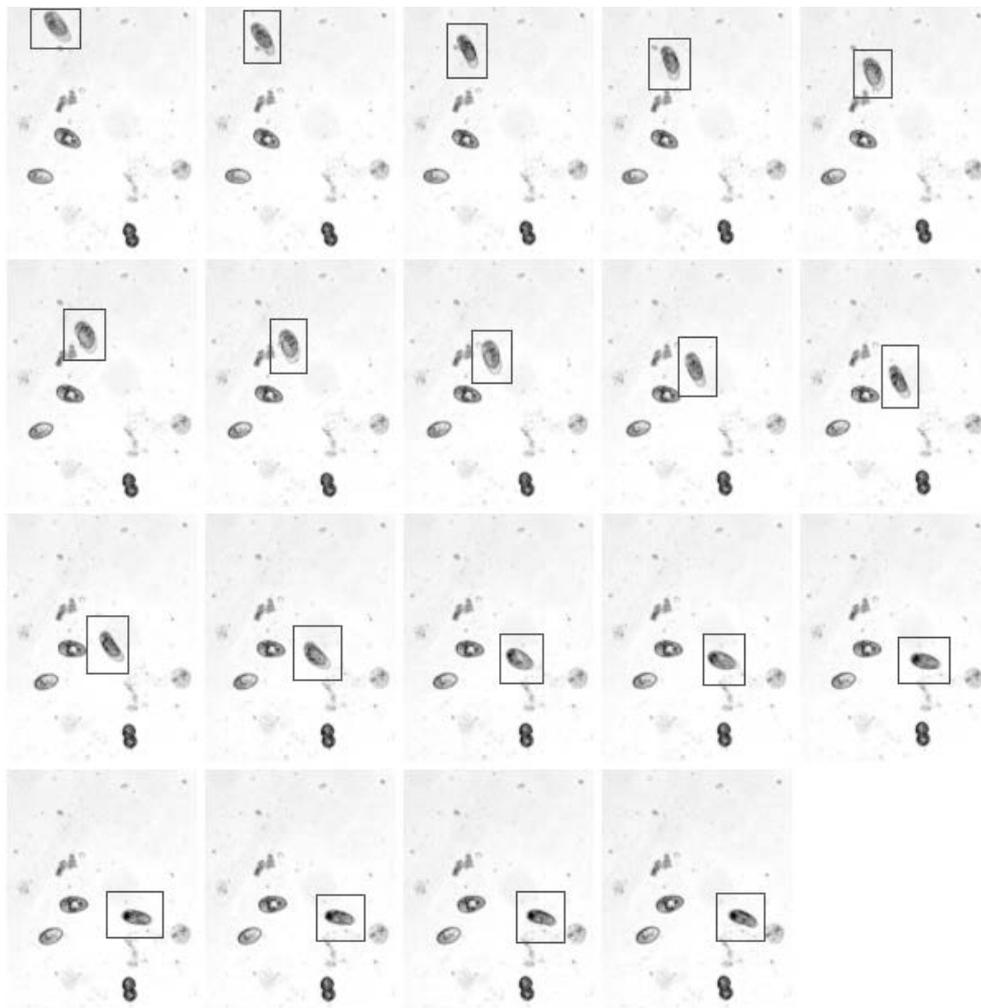


Fig. 6-73. Imágenes desglosadas de una imagen time-lapse, que muestra el desplazamiento de un protozoo (paramecio) (encuadrado en rojo). La secuencia se desarrolla de arriba a abajo y de izquierda a derecha.

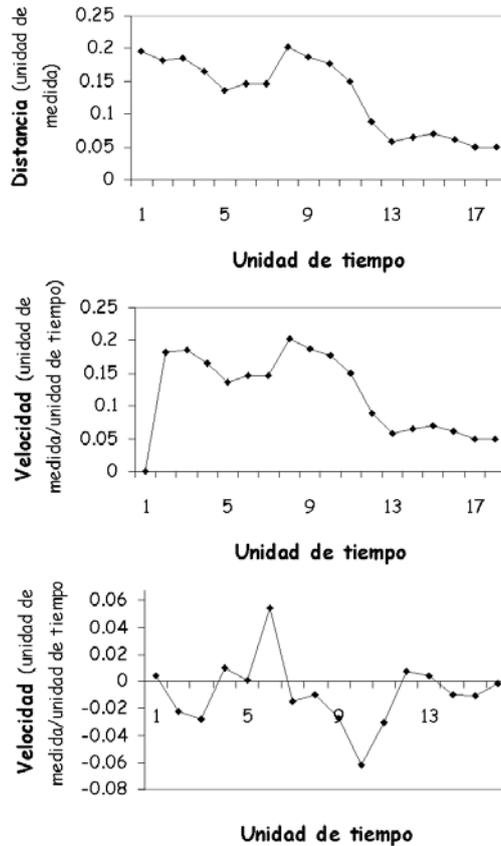


Fig. 6-74. Gráficas correspondientes al desplazamiento del protozoario de la figura 6-73. Arriba: distancia recorrida. Centro: velocidad. Abajo: aceleración.

Para calcular la velocidad de desplazamiento se recurre a la ecuación:

$$V = \frac{d}{t_2 - t_1} \quad [6-39]$$

donde, el dividendo  $d$  representa la distancia y el divisor  $(t_2 - t_1)$  representa la diferencia de tiempo entre el punto en consideración y el punto anterior. Por su parte, la aceleración del objeto en movimiento se obtiene mediante la ecuación:

$$a = \frac{V_2 - V_1}{t_2 - t_1} \quad [6-40]$$

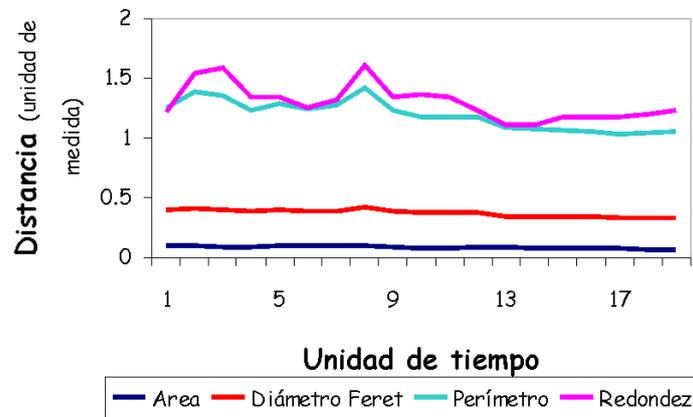
que relaciona las diferencias de velocidades entre puntos, con respecto al tiempo transcurrido. Finalmente, la distancia total recorrida se obtiene por la sumatoria parcial de todas las distancias:

$$D = \sum d_i \quad [6-41]$$

Simultáneamente con la determinación del desplazamiento, es posible determinar otros datos morfométricos como los analizados a lo largo del capítulo. De esta manera, se pueden establecer las diferencias de área, perímetro, diámetros, etc. En la figura 6-75 se visualizan algunos de los parámetros morfométricos registrados para el objeto seguido en la figura 6-73.

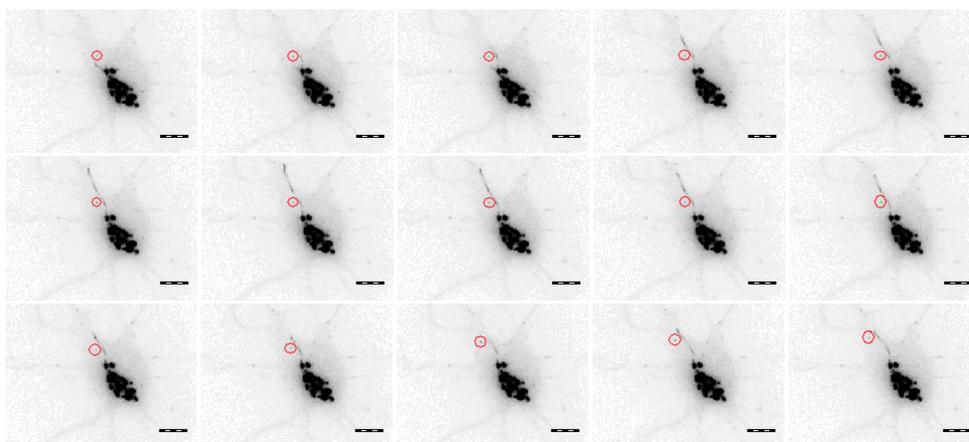
En el caso particular del seguimiento de partículas basada en la intensidad de un fluoróforo se suma la posible inestabilidad de este último en el tiempo, que puede determinar la falta de identificación del objeto rastreado. La alta densidad de partículas marcadas también puede contribuir con la inexactitud del seguimiento de un objeto en particular, no

sólo por el exceso de intensidad fluorescente que pueda detectarse, sino además, por la posibilidad de unión de las mismas en un punto, con falta de resolución microscópica o al contrario, su divergencia desde este punto. Esto se puede resolver, en parte, disminuyendo la densidad de partículas por unidad de superficie, de modo tal que cada una de ellas sea una unidad en todo momento.



**Fig. 6-75.** Gráfica mostrando la variación de los parámetros: área, diámetro Feret, perímetro y redondez. Los valores de área se expresan en mm<sup>2</sup>; el diámetro y perímetro en mm y la redondez sin unidades.

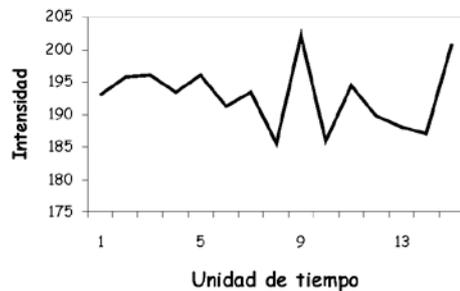
Otro punto que hay que considerar para el análisis de seguimiento es el espaciado temporal entre imágenes de la misma secuencia. Los algoritmos del reconocimiento de partículas pueden fallar en la interpretación de la dinámica de las células vivas, a menos que la adquisición de imágenes se ajuste al proceso de interés en términos de muestreo espacial y temporal, relación señal:ruido y duración de la secuencia necesaria para capturar todos los posibles estados del proceso. De todas maneras, estos parámetros son interdependientes y colisionan entre sí. Por ejemplo, un muestreo espacio-temporal alto implica una rápida adquisición a gran magnificación, lo que resulta en un número menor de fotones que lleguen al sensor de la cámara y por lo tanto, una baja relación señal:ruido. A la inversa, aunque esta relación pueda mejorarse mediante la prolongación de las exposiciones o aumentando la potencia de la iluminación, se incrementará el fotoblanqueo y la fototoxicidad, limitando el número de posibles exposiciones y por lo tanto, la extensión de la observación en el tiempo.



**Fig. 6-76.** Secuencia de una célula de cultivo capturada in vivo (time lapse). Se observa la liberación de vesículas producidas por el aparato de Golgi, que se dirigen hacia la membrana plasmática. Se realizó el seguimiento de una de estas vesículas para determinar sus variaciones de intensidad. La barra corresponde a 10 μm. Imagen cedida gentilmente por el Dr. A. Cáceres - Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes Y Martín Ferreira. CONICET. Córdoba, Argentina.

La figura 6-76 muestra el seguimiento de una vesícula producida por el aparato de Golgi celular, que se dirige hacia la membrana plasmática de la célula. El seguimiento fue realizado en base a la intensidad del fluoróforo. Las variaciones de intensidad del mismo a lo largo del tiempo se grafican en la figura 6-77.

La calidad de rastreo de una partícula fluorescente disminuye conforme aumenta la relación entre su desplazamiento cuadro a cuadro y su distancia en relación a las otras. Para mejorar la calidad del seguimiento, conservando la misma densidad de objetos, la imagen debe ser adquirida más rápidamente. Sin embargo, la adquisición más rápida reduce la relación señal:ruido de la imagen, así como la calidad de detección, lo que conduce a una mayor desaparición temporal de partículas. De manera similar, la desaparición temporal de partículas incrementa el riesgo de uniones erróneas entre las mismas a lo largo de los cuadros de la secuencia, cuando la densidad de éstas es alta. Por lo tanto, la adquisición de las imágenes y los parámetros de rastreo deben ajustarse iterativamente para optimizar la calidad de seguimiento y minimizar los errores de interpretación.



**Fig. 6-77.** Variaciones de intensidad a lo largo del tiempo de la vesícula rastreada en la figura 6-76.

### ***Mediciones y recuento 3D***

Muchos de los análisis descritos a lo largo del capítulo, y que fueron implementados para imágenes 2D, también se pueden realizar sobre imágenes 3D. Más aún, en estas últimas es posible medir otros parámetros tales como volumen, área de superficie, profundidad, etc., que no pueden determinarse sobre las primeras, a menos que se realicen estudios de estereología.

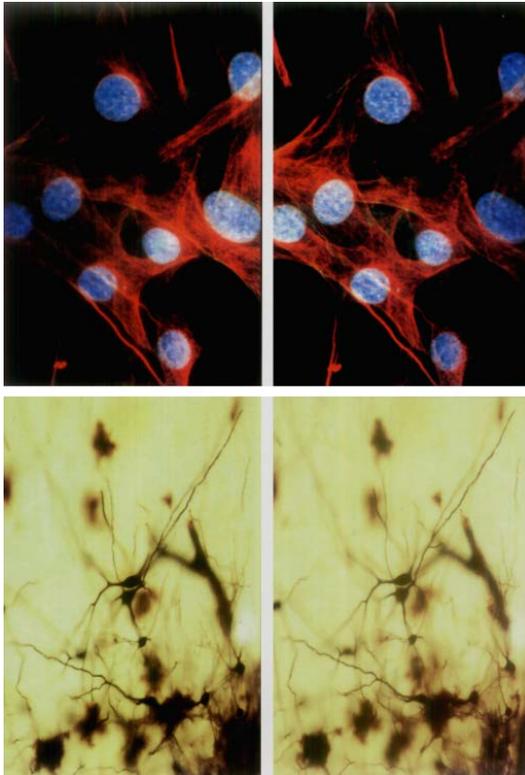
Para llevar a cabo con éxito un estudio 3D, es necesario haber capturado la imagen con la frecuencia correspondiente, tal como fuera descrito en el Capítulo 3. Esto hace que el muestreo genere una representación de continuidad lo más similar posible al objeto real.

No debe confundirse la representación 3D con la medición 3D de los objetos. En la primera, simplemente se realiza una visualización tridimensional de imágenes, que no necesariamente fueron capturadas como pilas. Las figuras 6-78, 6-79, 6-80 y 6-81 muestran formas diferentes de representación 3D utilizando imágenes 2D no secuenciales.

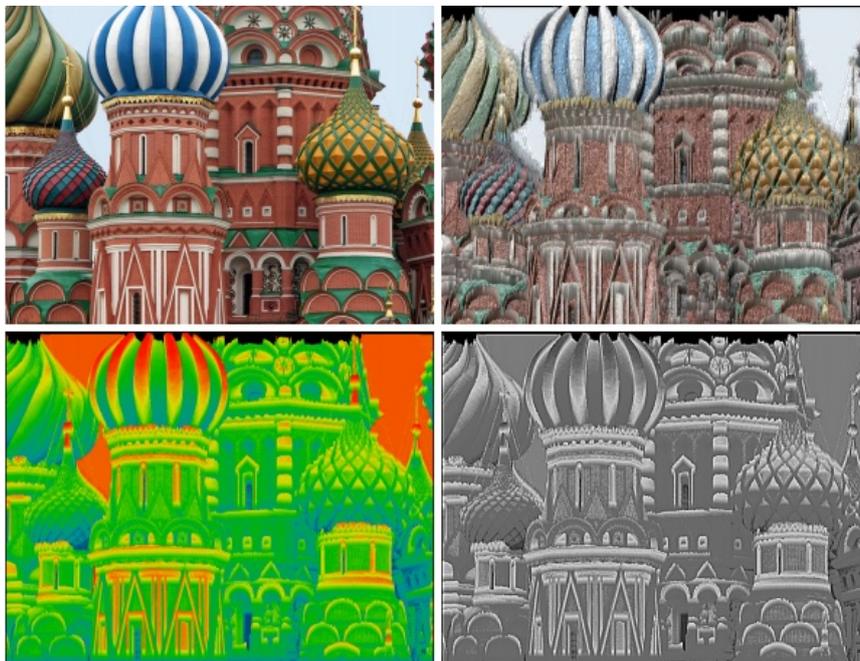


**Fig. 6-78.** Estereograma por superposición de dos imágenes con distinta pseudo-coloración (rojo y cian) y con una separación lateral de 100 píxeles de una con respecto a la otra. Para apreciar la tridimensionalidad es necesario utilizar gafas con una lente roja de un lado y verde o azul del otro. Lamentablemente, en este caso en particular, ni el efecto 3D pudo mejorar la calidad de la imagen.

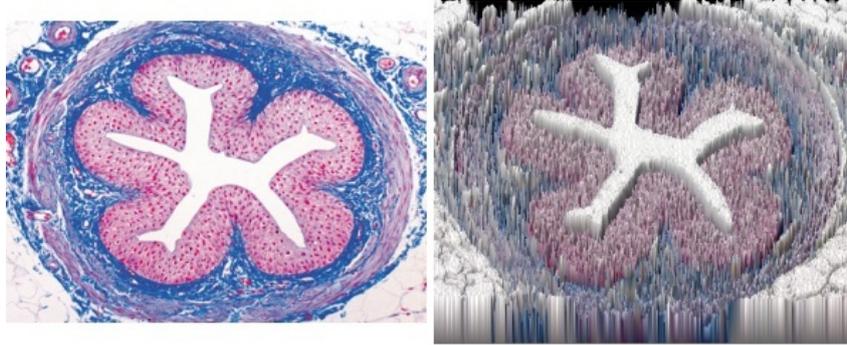
En la visión humana, el direccionamiento de los ojos hacia adelante, hace que el campo de visión de cada uno de ellos se solape con el del otro, de manera tal de obtener una perspectiva estereoscópica que permita juzgar la distancia relativa de los objetos. Esto se logra haciendo incidir la luz en la fovea retiniana, donde se encuentra la mayor concentración de conos y bastones, y acomodando los músculos oculares hasta lograr una convergencia que se hace consciente a nivel cortical (ver Capítulo 1). De esta manera, se puede discernir si un objeto está más cerca o más lejos que otro.



**Fig. 6-79.** Estereoidágenes apareadas. Arriba: células de cultivo con tinción fluorescente. Abajo: motoneuronas de la médula espinal en corte grueso (50  $\mu\text{m}$ ) con tinción de plata de Golgi. En ambos casos, las imágenes de la derecha muestran un plano focal distinto al de la izquierda. El efecto 3D se obtiene utilizando lentes estereoscópicas.



**Fig. 6-80.** Representación isométrica de la superficie de la imagen, que refleja las intensidades de los píxeles de la misma. Los píxeles claros están sobreelevados mientras que los oscuros se deprimen. Este efecto se observa tanto utilizando los colores reales de la imagen (arriba derecha) como los de paleta (abajo izquierda) o las intensidades monocromáticas (abajo derecha).



**Fig. 6-81.** Representación isométrica de la superficie de un tejido (uréter). Los píxeles claros están sobreelevados, mientras que los oscuros se deprimen.

Para obtener esta misma sensación en imágenes 2D, es necesario contar con una óptica particular que permita lograr la convergencia que, de manera natural, se produce en la vista humana. Para la observación de la figura 6-78 se requiere del uso de gafas con una lente roja del lado izquierdo y una azul o verde del lado derecho, como los utilizados para la observación de películas 3D en las salas de cine. Para la observación de pares de imágenes, como las que se muestran en la figura 6-79, se requiere de una lente estereoscópica que reduce el grado de convergencia ocular, lo que permite que ambas imágenes se visualicen en el plano central, obteniendo el efecto 3D deseado.

La estereoscopia crea una ilusión 3D a partir de las imágenes 2D. Esta técnica es utilizada por la fotogrametría, que es la práctica de determinación de las propiedades geométricas de los objetos a partir de imágenes fotográficas. Para que este proceso pueda llevarse a cabo se necesita:

1. Percepción simultánea;
2. Fusión (visión binocular unificada);
3. Estereopsis (fenómeno dentro de la percepción visual por el cual, a partir de dos imágenes 2D ligeramente diferentes proyectadas en la retina de cada ojo, el cerebro es capaz de recomponer una 3D).

Es necesario, además, que ambas imágenes paralelas estén a una distancia no mayor a los 65 mm, que es la distancia promedio entre los ojos humanos.

Si bien la estereoscopia puede percibirse a simple vista, el uso de un visor estereoscópico (o estereoscopio) tiene ciertas ventajas, entre las que se destacan:

- El uso de lentes magnificadoras con curvatura positiva permite que el punto focal de la imagen se cambie desde una de su distancia relativamente corta (aproximadamente 30 a 40 cm) a una distancia virtual en el infinito. Esto hace que el enfoque de los ojos esté en consonancia con las líneas paralelas de la vista, lo que reduce la fatiga visual.
- Las imágenes paralelas se magnifican, lo que ofrece un mayor campo visual y la capacidad de examinar el detalle de las muestras.
- El visor proporciona una partición entre las imágenes, evitando una distracción potencial para el usuario.

Las mediciones y recuento 3D se realizan exclusivamente sobre pilas de imágenes en donde se representan cada uno de los ejes (X,Y,Z). La figura 6-82 muestra la representación 3D (máxima proyección de intensidad) de una pila de imágenes, correspondiente al lóbulo olfativo del cangrejo. La imagen final se construyó en base a imágenes secuenciales (cortes ópticos), obtenidos con el microscopio confocal. En la figura 6-83 se observa cómo los diferentes componentes de su estructura varían a medida que se realiza el escaneo en el eje Z. La misma imagen puede ser representada de manera ortogonal, en donde se visualizan los ejes XY, XZ e YZ (Fig. 6-84).

La reconstrucción 3D se logra mediante la identificación de los puntos de mayor intensidad en los vóxeles y su unión a través de vectores. Cada punto se une con, al menos, dos puntos más, lo cual determina un triángulo formado por estos vectores. Estos triángulos determinan facetas que después serán utilizadas para el relleno de la superficie del objeto a

reconstruir. En la figura 6-85 se observan las facetas trianguladas que dan origen a la reconstrucción 3D de la figura 6-82.

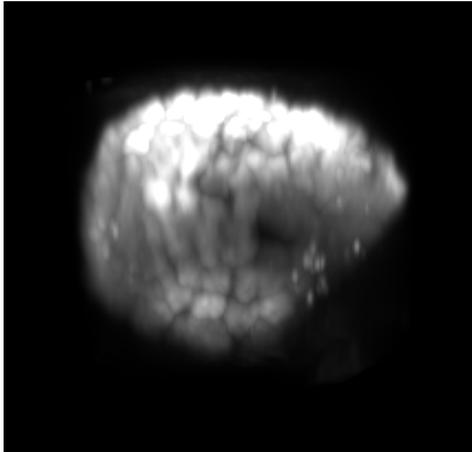


Fig. 6-82. Máxima proyección de intensidad del lóbulo olfativo del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*.

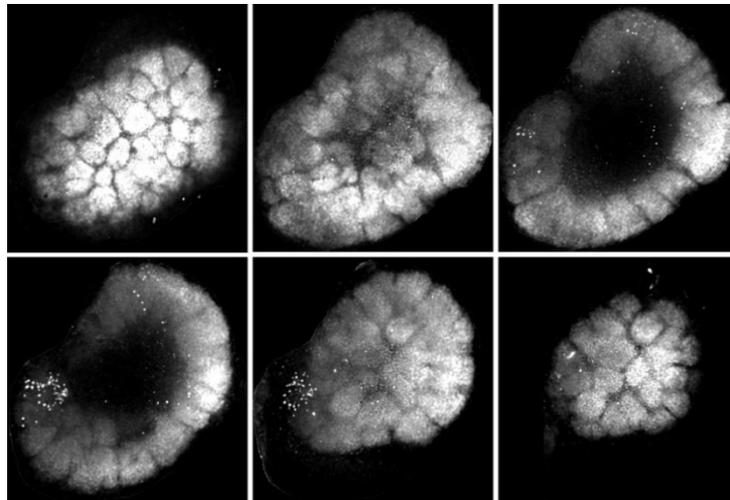


Fig. 6-83. Visualización 2D de distintos sectores del lóbulo olfativo del cangrejo. La secuencia comienza de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. La altura total del órgano es de aproximadamente  $235 \mu\text{m}$ . Cada imagen representa  $1/6$  de su altura.

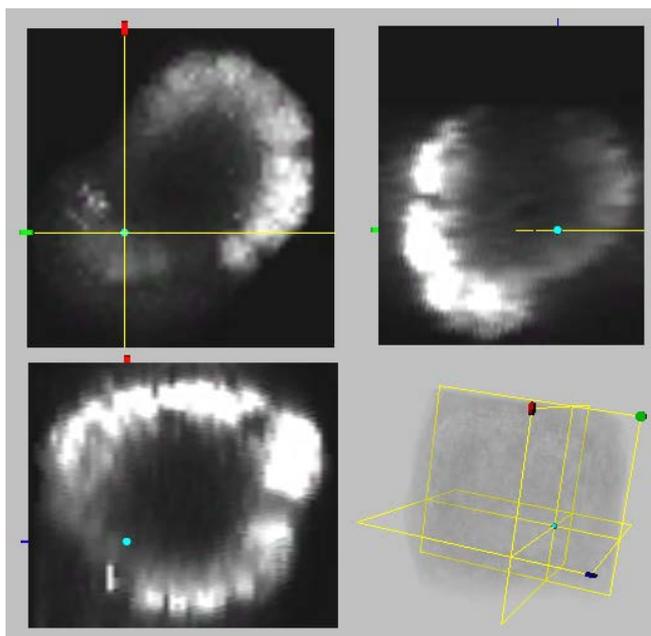
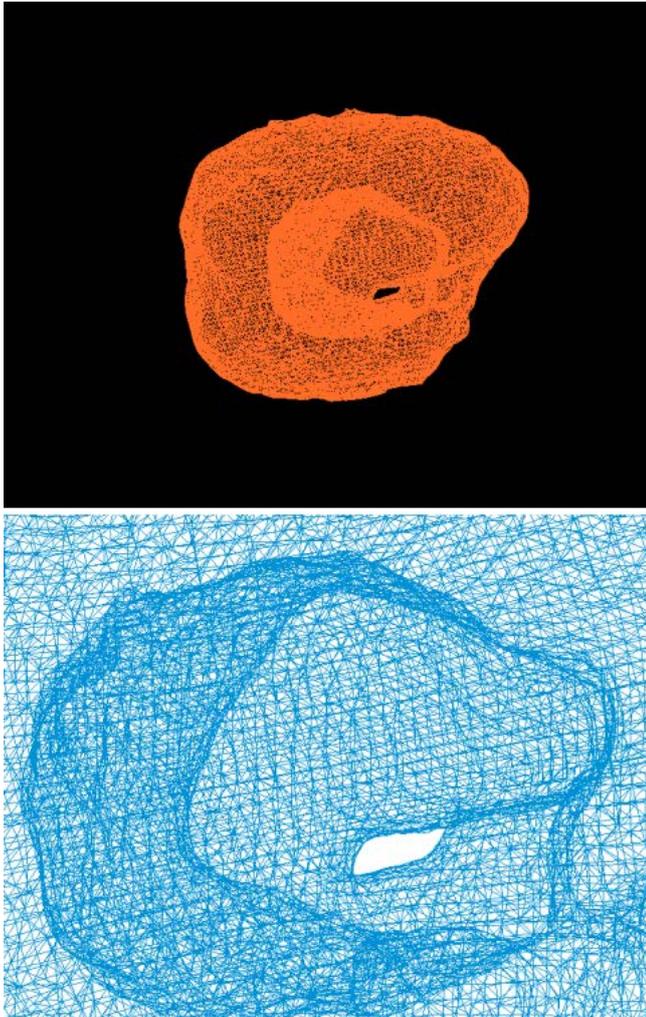
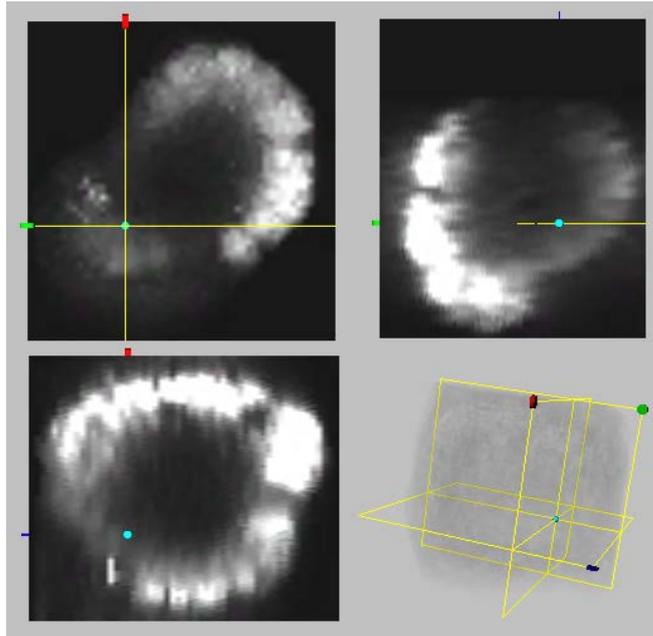


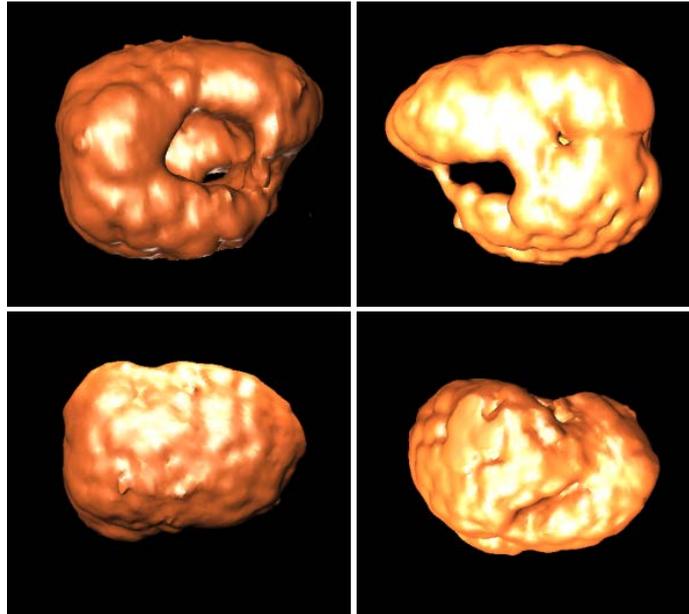
Fig. 6-84. Visualización ortogonal del lóbulo olfativo del cangrejo. Arriba izquierda: vista 2D en XY de un sector del órgano. A su derecha, la proyección XZ del mismo sector. Abajo izquierda: proyección YZ del mismo sector. Abajo derecha: representación 3D mostrando los planos de corte correspondientes a las proyecciones anteriores.

**Fig. 6-85.** Visualización ortogonal del lóbulo olfativo del cangrejo. Arriba izquierda: vista 2D en XY de un sector del órgano. A su derecha, la proyección XZ del mismo sector. Abajo izquierda: proyección YZ del mismo sector. Abajo derecha: representación 3D mostrando los planos de corte correspondientes a las proyecciones anteriores.



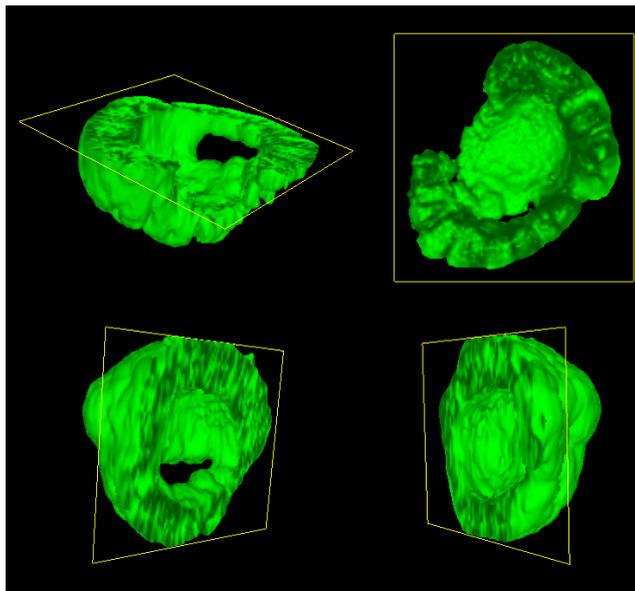
**Fig. 6-86.** Construcción de triángulos facetados, producto de la interacción entre los puntos con diferentes intensidades y los vectores que los contactan. Abajo se observa un detalle, donde se aprecian los triángulos formados. El color fue invertido para su mejor visualización.

Una vez configurada la malla, es posible realizar una reconstrucción superficial (del inglés: “*isosurface*”) del objeto. De esta manera se lo prepara para la posterior medición (Fig. 6-86).



**Fig. 6-87.** Reconstrucción superficial (isosurface) del lóbulo olfativo derecho del cangrejo, visto desde el lado derecho (arriba izquierda), izquierdo (arriba derecha), dorsal (abajo izquierda) y ventral (abajo derecha).

Otra gran ventaja que tiene la visualización de la imagen 3D es que se pueden realizar cortes tangenciales del objeto representado, para observar el interior de la estructura, tal como se muestra en la figura 6-87.



**Fig. 6-88.** Cortes tangenciales del lóbulo olfativo de cangrejo. Arriba, cortes en el plano medio, mostrado desde el lado derecho del órgano (izquierda) y de desde arriba (derecha). Abajo: cortes en el plano sagital, vistos desde el lado derecho (izquierda) o desde el izquierdo (derecha). El cuadro amarillo representa el plano de corte. El color de los objetos es el que corresponde al fluoróforo (Alexa 488) utilizado para la identificación de sinapsina.

El proceso de medición y recuento de objetos 3D se basa principalmente en el reconocimiento de cada uno de los cortes ópticos que forman la pila de la imagen. Si se suma ruido en la imagen capturada esto se va a traducir posteriormente en la presencia de objetos indeseables que se confunden con la representación volumétrica del objeto principal. Por esta razón, es necesario capturar las imágenes con un microscopio confocal y posteriormente deconvolucionar aquellas que vayan a ser medidas, de manera tal de evitar la presencia de elementos no deseados.

Las mediciones se realizan sobre la imagen facetada y reconstruida mediante el relleno de superficie (isosurface). Todos aquellos objetos que hayan sido recubiertos por el relleno serán cuantificados. Si estos objetos se encuentran unidos, serán tomados como unidad; de lo contrario, serán tomados como objetos individuales. En la figura 6-88 se observa la medición del objeto reconocido en las figuras precedentes. La Tabla 6-14 muestra los parámetros seleccionados y los valores obtenidos de esta medición.

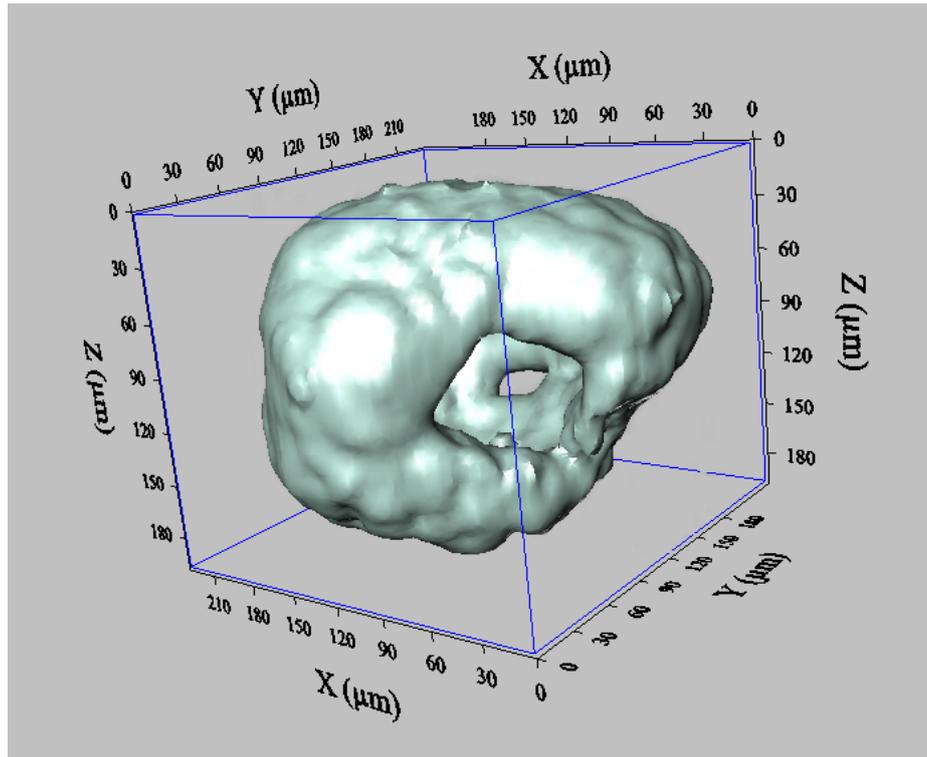


Fig. 6-89. Medición de los objetos reconocidos previamente.

Tabla 6-14. Mediciones y valores del objeto de la figura 6-88

Parámetro	Medición	Valor
Volumen	Volumen del objeto (en $\mu\text{m}^3$ )	3856942.19
Area de superficie	Area de la superficie de recubrimiento del objeto (en $\mu\text{m}^2$ )	183987.52
Ancho	Tamaño de la caja que contiene al objeto en la dirección X (en $\mu\text{m}$ )	227.71
Alto	Tamaño de la caja que contiene al objeto en la dirección Y (en $\mu\text{m}$ )	235.35
Profundidad	Tamaño de la caja que contiene al objeto en la dirección Z (en $\mu\text{m}$ )	197.13
Diámetro	Diámetro equivalente del objeto	194.57
Diámetro de Feret (max)	Distancia máxima entre dos planos paralelos que encierran al objeto	257.33
Diámetro de Feret (min)	Distancia mínima entre dos planos paralelos que encierran al objeto	189.37
Volumen de la caja	Volumen de la caja que envuelve al objeto $V = \text{Alto} * \text{Ancho} * \text{Profundidad}$	10564307.2
Fracción de volumen	Relación entre el volumen del objeto y el de la caja que lo contiene $R = V_{obj} / Vol_{box}$	0.36
Esfericidad	Esfericidad del objeto. Para objetos distintos a la esfera, $E < 1$ . $E = \frac{6 * Volumen_{obj}}{Diámetro_{obj} * AreaSuperficie_{obj}}$	0.65
Relación de Feret	Relación entre los valores máximos y mínimos de Feret	1.36

Una vez reconstruido el objeto 3D, no sólo se pueden realizar las mediciones volumétricas previamente mencionadas sino que además, es posible realizar mediciones manuales, tales como longitudes, ángulos, etc., como se observa en la figura 6-89.

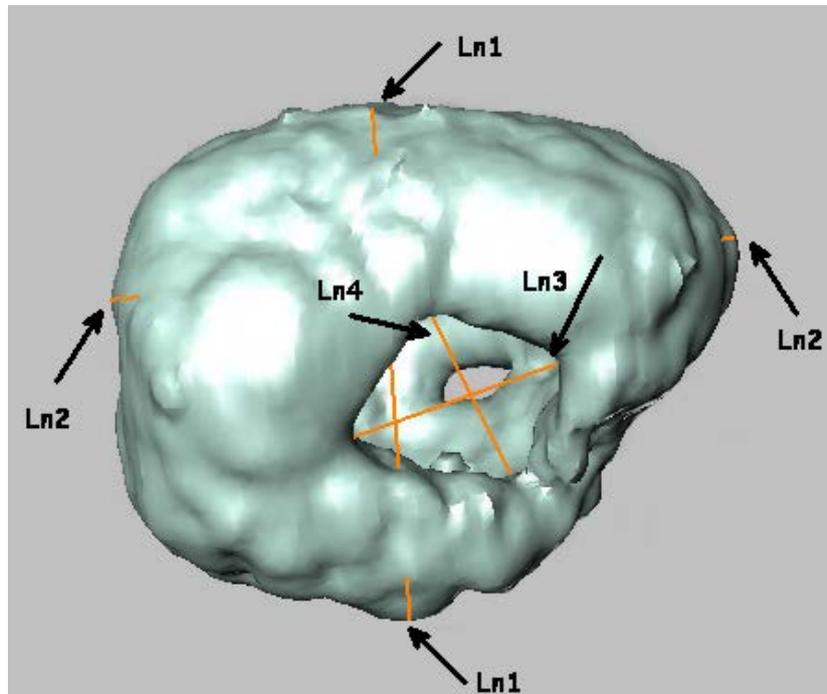


Fig. 6-90. Mediciones manuales realizadas sobre la reconstrucción 3D de la Fig. 6-88. Ln= longitudes expresadas en  $\mu\text{m}$ . Ln1=190.76; Ln2=239.31; Ln3=76.86; Ln4=66.82.

### **Macros**

La macro, abreviatura de macroinstrucción, es una serie de instrucciones que se ejecutan de manera secuencial mediante una sola llamada u orden de ejecución. Es una instrucción compleja formada por otras más sencillas. Esto permite la automatización de tareas repetitivas. Las macros tienden a almacenarse en el ámbito del propio programa que las utiliza y se ejecutan pulsando una combinación especial de teclas o simplemente señalando el nombre de la misma. La diferencia entre una macro y un programa es que en la primera, la ejecución es secuencial y no se permiten bifurcaciones, es decir, tiene un comienzo y un fin en las mismas instrucciones en que fue creada. Las instrucciones de las macros se pueden escribir en lenguaje de programación genérico, como Visual Basic® o C++®, o con lenguaje propio del programa que las utiliza.

En ciertos programas de análisis, existe la posibilidad de crear y utilizar macros que permiten capturar, procesar y analizar las imágenes, tal cual se haría manualmente, pero de forma automatizada. Así, se pueden procesar, simultáneamente, cientos de imágenes en un tiempo significativamente menor al que se emplearía de manera manual. Esto sin dudas es una ventaja, por un lado, por el menor tiempo empleado y por otro, porque se asegura que todas las imágenes sean procesadas de la misma forma. Esto último puede jugar a favor o en contra, ya que si bien estadísticamente es correcto, puede existir mucha disparidad entre las imágenes capturadas, lo que puede resultar en la obtención de un valor final de análisis errado. Para evitar la disparidad entre las imágenes se debe tener en cuenta todo lo expresado en los Capítulos 2 y 3 en cuanto a la forma de preparación de las muestras y la captura de las mismas. Una forma de compensar la presencia de los posibles elementos no deseados dentro de las imágenes sería incrementando el número de las mismas disminuyendo, de esta manera, el error estándar de la muestra. En el cuadro 6-1 se describe una macro sencilla que aplica un par de filtros y la posterior umbralización sobre la imagen activa, cada vez que se ejecuta. En el cuadro 6-2 se describe una macro para cambiar la calibración espacial de todas las imágenes que se encuentren dentro de una misma carpeta o directorio.

```

Sub filtrar_y_umbralizar()
' Abre la ventana de filtros
ret = IpFltShow(1)
' Aplica el filtro Sobel
ret = IpFltSobel()
' Aplica una vez el filtros Close con kernel 11x11
ret = IpFltClose(MORPHO_11x11OCTAGON, 1)
' Cierra la ventana de filtros
ret = IpFltShow(0)
' Abre la ventana de umbralización
ret = IpSegShow(1)
' Umbraliza la imagen
ret = IpSegSetAttr(SETCURSEL, 0)
ret = IpSegSetAttr(CHANNEL, 0)
ret = IpSegPreview(CURRENT_W_B)
ret = IpSegCreateMask(5, 0, 1)
' Cierra la ventana de umbralización
ret = IpSegShow(0)
End Sub

```

**Cuadro 6-1.** Macro para la filtración y umbralización de la imagen activa, realizados en el editor de macros del programa ImagePro Plus®. Los textos en verde son comentarios.

```

Sub CalibracionEspacial ()
' Asignar un valor de calibración espacial en todas las imágenes de una
' carpeta y reemplazar la imagen original con la imagen calibrada,
' utilizando el mismo nombre de archivo
'
Dim total As Integer
Dim y As Integer
Dim pname As String * 255
Dim qname As String * 255
y = 0
'*****
'Buscar la carpeta o directorio. Se puede cambiar el directorio
' y el formato de archivo
total = IpStSearchDir("F:\ANALISIS\", "*.TIF", y, pname)
'Comenzar la secuencia iterativa hasta encontrar la última imagen
'de la carpeta
'
Do While total = 1
' Cargar la imagen. Se puede cambiar la extensión del archivo
ret = IpWsLoad(pname, "TIF")
' Mostrar el menú de calibración
IpSCalShow(1)
'Cambiar la calibración especial utilizando el nombre de la
'calibración deseada
ret = IpSCalSelect("40x-DP71-BX50")
'Cerrar el menú de calibración
IpSCalShow(0)
'Guardar la imagen
ret = IpWsSave()
'Cerrar todas las imágenes y los menús y comenzar nuevamente el
'proceso
ret = IpAppCloseAll()
'Incrementar el valor del contador de archivos
y = y + 1
total = IpStSearchDir("F:\ANALISIS\", "*.TIF", y, pname)
Loop
End Sub

```

**Cuadro 6-2.** Macro para la asignación de una resolución espacial a todas las imágenes de una carpeta o directorio construido con el editor de macros del programa ImagePro Plus®. Los comandos de Visual Basic® se remarcan en celeste; los propios del programa de análisis, en rojo; la declaración de variables y su implementación, en magenta; los comentarios, en verde.

### ***Interpretación de los resultados***

Se han descrito diferentes métodos de extracción de información numérica a partir de las imágenes. Todos son procesos, que en su mayoría, se encuentran automatizados en los programas de análisis. El desafío para el usuario es determinar cuál es el procedimiento más apropiado para su propio beneficio. Pero más importante aún, es saber interpretar los resultados obtenidos. Es necesario recordar que, al menos, las ciencias biológicas no son exactas y, por lo tanto, el análisis de imágenes biológicas tampoco lo es. Esto no quiere decir que los datos obtenidos no sean exactos y repetibles sino que no basta con obtener un dato numérico de una imagen como para formular o responder a una hipótesis de trabajo. Por lo tanto, se deben seguir los patrones del método científico y analizar la cantidad de imágenes que sean necesarias para disminuir al mínimo el error estándar de las muestras. Todos los datos numéricos obtenidos de las imágenes deben ser analizados según el método estadístico, para recién después establecer los niveles de significación y finalmente confirmar o rechazar las hipótesis planteadas.

### ***Palabras finales***

Como hemos visto a lo largo de estos capítulos, el análisis de imágenes no es una tarea sencilla. Requiere de dedicación y de mucho entrenamiento. Requiere, además, de cierta afinidad con los sistemas informáticos. Por esta razón, tampoco es sencillo encontrar el programa de análisis que mejor se adapte a nuestro trabajo y que a su vez se maneje con el grado de sencillez o complejidad requerido. Lo fundamental es que, cualquiera sea el programa elegido, no dificulte aún más los procesos descritos en estos capítulos.

Es mi deseo que este libro haya esclarecido las dudas de aquellos usuarios que ya estaban inmersos en el mundo del análisis de imágenes o que haya sido el puntapié inicial para aquellos que quisieran trabajar en este campo. Pero más que nada, espero que haya generado interrogantes para seguir desafiando a los investigadores dedicados al área y a los programadores de software y que esta ciencia siga creciendo día a día, como lo viene haciendo desde hace muchos años.-

# Bibliografía consultada

- Acharya T. Integrated color interpolation and color space conversion algorithm from 8-bit Bayer pattern RGB color space to 12-bit YCRCB color space. United States Patent 6392699 B1. 1998.
- Ahmed RJ. Image enhancement and noise removal by using new spatial filters. U.P.B. Sci Bull, Series C, 73:65-74, 2011.
- Amenta N, Bern M, Kamvysselis M. A new Voronoi-based surface reconstruction algorithm. Siggraph '98. 415-421. 1998.
- Amenta N, Bern M. Surface reconstruction by Voronoi filtering. Discrete Comp Geom. 22:481-504. 1999.
- Andersen BB, Gundersen HJ. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. J Microsc 196:69-73. 1999.
- Ashburner J, Friston KJ. Morphometry. En Frackowiak RSJ, Friston KJ, Frith C, Dolan R, Friston KJ, Price CJ, Zeki S, Ashburner J, Penny WD (Eds): Human Brain Function. Academic Press, 2nd edition, 2003.
- Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry-the methods. Neuroimage. 11:805-821. 2000.
- Ayache N, Faverjon B. Efficient registration of stereo images by matching graph descriptions of edge segments. Int J Comp Vision. 1:107-131. 1987.
- Babalievski F. Cluster counting: The Hoshen-Kopelman algorithm vs. spanning tree approaches. Intern. J. of Modern Physics C. 1-18. 1997.
- Bancroft JD, Gamble M. theory and practice of histological techniques. 6<sup>th</sup> edition.
- Bancroft JD; Stevens A. Theory and practice of histological techniques. 3<sup>rd</sup> Edition. Churchill Livingstone. Edinburgh. 1994.
- Bandzuch P, Morhác M, Krištiak T. Study of the Van Cittert and Gold iterative methods of deconvolution and their application in the deconvolution of experimental spectra of positron annihilation. Nucl Inst Meth Phys Res A 384:506-515. 1997.
- Barbeito C; Woudwyk M; Cacciato C; Soto P; Portiansky E; Catena M; Echavarria H; Gimeno E; Monteavaro C. *Trichomonas foetus*: experimental infection in pregnant Balb/c mice. Experimental Parasitology. 120:156-160. 2008.
- Barbón JJ. Ilusiones ópticas arriba-abajo (s. XIX). Arch Soc Esp Oftalmol. 87:97-98. 2012.
- Baron VT, Welsh J, Abedinpour P, Borgström P. Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors. Am J Cancer Res. 1:674-686. 2011.
- Bergers E, van Diest PJ, Baak JP. Reproducibility of semi-automated cell cycle analysis of flow cytometric DNA-histograms of fresh breast cancer material. Anal Cell Pathol. 8:1-13. 1995.
- Bianchini P, Harke B, Galiani S, Vicidomini G, Diaspro A. Single-wavelength two-photon excitation-stimulated emission depletion (SW2PE-STED) superresolution imaging. Proc Natl Acad Sci USA. 109:6390-6393. 2012.
- Bigras G, Bonneau R, Dumont A. Spatial distribution of DNA ploidy in colorectal carcinoma. Anal Cell Pathol. 7:289-300. 1994.
- Bjugn R, Gundersen HJ. Estimate of the total number of neurons and glial and endothelial cells in the rat spinal cord by means of the optical disector. J Comp Neurol. 328:406-414. 1993.
- Blanco E, Mazo M, Bergasa L, Palazuelos S, Rodríguez J, Losada C, Martín J. Class separation improvements in pixel classification using colour injection. Sensors (Basel). 10:7803-7842. 2010.
- Born M; Wolf E. Principles of Optics, 7th edition, Cambridge University, 1999.
- Boudabous A, Ben Atitallah A, Khriji L, Kadionik P, Masmoudi N. FPGA implementation of vector directional distance filter. 2010 International Conference on Design & Technology of Integrated Systems in Nanoscale Era. 1-4. 2010.
- Bowditch HP, Hall GS. Optical illusions of motion. J Physiol. 3:297-312. 1882.
- Bright DS, Steel EB. Two-dimensional top hat filter for extracting spots and spheres from digital images. J Microsc. 146:191-200. 1987.
- Camilión MC; Portiansky EL Pérez NG; Rebolledo OR; Cingolani HE. Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. Cardiovasc Res. 53:862-868. 2002.

- Campilho A, Kamel M. (Eds). Image analysis and recognition. Springer. Berlin. 2004.
- Caselles V, Morel JM, Sbert C. An axiomatic approach to image interpolation. IEEE Trans. Image Process. 7:376-386. 1998.
- Chalkley HW. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. J Natl Cancer Inst. 4:47-53. 1943-1944.
- Chapman N, Witt N, Gao X, Bharath AA, Stanton AV, Thom SA, Hughes AD. Computer algorithms for the automated measurement of retinal arteriolar diameters. Br J Ophthalmol. 85:74-79. 2001.
- Chappelow J, Tomaszewski JE, Feldman M, Shih N, Madabhushi A. HistoStitcher(©): an interactive program for accurate and rapid reconstruction of digitized whole histological sections from tissue fragments. Comput Med Imaging Graph. 35:557-567. 2011.
- Cho EH, Lockett SJ. Calibration and standardization of the emission light path of confocal microscopes. J Microsc. 223:15-25. 2006.
- Climent J, Hexsel RA. Particle filtering in the Hough space for instrument tracking. Comput Biol Med. 42:614-623. 2012.
- Coates C. Using the CCD for light microscopy. Biophotonics International 11:38-41. 2004.
- Day RH, Dickinson RG. The Poggendorff illusion: apparent misalignment which is not attributable to apparent orientation of the transversals. Q J Exp Psychol. 27:551-557. 1975.
- de Gracia P, Marcos S, Mathur A, Atchison DA. Contrast sensitivity benefit of adaptive optics correction of ocular aberrations. J Vis. 11:5 1-10. 2011.
- Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. J Microsc. 204:232-246. 2001.
- Dowsey AW, Dunn MJ, Yang GZ. Automated image alignment for 2D gel electrophoresis in a high-throughput proteomics pipeline. Bioinformatics. 24:950-957. 2008.
- Du S, van Wyk BJ, Tu C, Zhang X. An improved Hough Transform neighborhood map for straight line segments. IEEE Trans Image Process. 19:573-585. 2010.
- Dubertret B. Boîtes quantiques en biologie: progrès récents. (Quantum dots in biology: recent applications). Med Sci (Paris); 20: 737-740. 2004.
- Ducros M, Moreaux L, Bradley J, Tiret P, Griesbeck O, Charpak S. Spectral unmixing: analysis of performance in the olfactory bulb in vivo. PLoS One.4:e4418. 2009.
- Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. Am J Physiol Cell Physiol. 300:C723-C742. 2011.
- Fathallah-Shaykh HM. Noise and rank-dependent geometrical filter improves sensitivity of highly specific discovery by microarrays. Bioinformatics. 21:4255-4262. 2005.
- Favreau OE, Cavanagh P. Color and luminance: independent frequency shifts. Science. 212:831-832. 1981.
- Flamini MA; Barbeito CG; Gimeno EJ; Portiansky EL. Histology, histochemistry and morphometry of the ovary of the adult plains viscacha (*Lagostomus maximus*) in different reproductive stages. Acta Zoologica. 90:390-400. 2009.
- Flamini MA; Barbeito CG; Gimeno EJ; Portiansky EL. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or parauretral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. Ann Anat. 184:341-345. 2002.
- Flamini MA; Díaz AO; Barbeito CG; Portiansky EL. Morphology, morphometry, histochemistry and lectin histochemistry of the vagina of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). Biotech Histochem. 87:81-94. 2012.
- Fleming RW, Holtmann-Rice D, Bülthoff HH. Estimation of 3D shape from image orientations. Proc Natl Acad Sci USA. 108:20438-20443. 2011.
- Freijo RO; García AM; Portiansky EL; Barbeito CG; Macchi GJ; Díaz AO. Morphological and histochemical characteristics of the epithelium of ovarian lamellae of *Genypterus blacodes* (Schneider, 1801). Fish Physiol Biochem. 35:359-367. 2009.
- Frenkel L; Dimant B; Portiansky E; Maldonado H; Delorenzi A. Both heat shock and water deprivation trigger Hsp70 expression in the olfactory lobe of the crab *Chasmagnathus granulatus*. Neurosci Lett. 443:251-256. 2008.
- Frenkel L; Dimant B; Portiansky EL; Imboden H; Maldonado H; Delorenzi A. Neuroanatomical distribution of angiotensin II-like neuropeptide within the central nervous system of the crab *Chasmagnathus*. Physiological changes triggered by water deprivation. Cell Tiss Res. 341:181-195. 2010.

- Frenkel L; Dimant B; Suárez LD; Portiansky EL; Delorenzi A. Food odor, visual danger stimulus and retrieval of an aversive memory trigger heat shock protein HSP70 expression in the olfactory lobe of the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Neuroscience*. 201:239-251. 2012.
- Frisch KE, Duenwald-Kuehl SE, Kobayashi H, Chamberlain CS, Lakes RS, Vanderby R Jr. Quantification of collagen organization using fractal dimensions and Fourier transforms. *Acta Histochem*. 114:140-144. 2012.
- Galer M, Horvat L. *Digital Imaging*. 2nd edition. Focal Press. Oxford. 2003.
- Gallippi CM, Kramer CM, Hu YL, Vido DA, Reichek N, Rogers WJ. Fully automated registration and warping of contrast-enhanced first-pass perfusion images. *J Cardiovasc Magn Reson*. 4:459-469. 2002.
- Gao L, Hagen N, Tkaczyk TS. Quantitative comparison between full-spectrum and filter-based imaging in hyperspectral fluorescence microscopy. *J Microsc*. 246:113-123. 2012.
- Girod B, Greiner G, Niemann H (Eds). *Principles of 3D image analysis and synthesis*. Kluwer Academic Publishers. USA. 2002.
- Goldsmith SJ. Image artifacts in tomographic gamma camera systems. *J Nucl Med*. 14:103-106.
- Goldstein D. *Polarized Light*, second edition, Marcel Dekker, 2003.
- González RC, Woods RE. *Digital Image Processing*. 3<sup>rd</sup> edition. Pearson. Prentice Hall. New Jersey. 2008
- Graef K, Schaefel F. Control of accommodation by longitudinal chromatic aberration and blue cones. *J Vis*. 12:14 1-12. 2012
- Grigorescu C, Petkov N. Distance sets for shape filters and shape recognition. *IEEE Trans Image Process*. 12:1274-1286. 2003.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Verteby A, West MJ. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 96:857-881. 1988.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 96:379-394. 1988.
- Gundersen HJ. Estimators of the number of objects per area unbiased by edge effects. *Microsc Acta*. 81:107-117. 1978.
- Gutierrez E, Tkachenko E, Besser A, Sundd P, Ley K, Danuser G, Ginsberg MH, Groisman A. High refractive index silicone gels for simultaneous total internal reflection fluorescence and traction force microscopy of adherent cells. *PLoS One*. 6:e23807. 2011.
- Hader D-P (Ed). *Image analysis. Methods and applications*. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press. Boca Raton. 2001.
- Hagen N, Gao L, Tkaczyk TS. Quantitative sectioning and noise analysis for structured illumination microscopy. *Opt Express*. 20:403-413. 2012.
- Hamarneh G, Althoff K, Abu-Gharbieh R. *Automatic Line Detection*. Project Report for the Computer Vision Course. Lund. 1-29. 1999.
- Hammerstrom K, Aldrich J, Alves L, Ho A. Recognition and prevention of computed radiography image artifacts. *J Digit Imaging*. 19:226-239. 2006.
- Hansen MW, Higgins WE. Watershed-based maximum-homogeneity filtering. *IEEE Trans Image Process*. 8:982-988. 1999.
- Haralick RM, Sternberg SR, Zhuang X. Image analysis using mathematical morphology. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*. 9:532-550. 1987.
- Hearn DR. Spatial calibration and imaging performance assessment of the advanced land imager. *Lincoln Lab J*. 15:225-250. 2005.
- Hibbs AR (Ed). *Confocal microscopy for biologists*. Springer. New York. 2004.
- Hong JH, Cho SB, Cho UK. A novel evolutionary approach to image enhancement filter design: method and applications. *IEEE Trans Syst Man Cybern B Cybern*. 39:1446-1457. 2009.
- Hou X, Cheng W. Detection of single fluorescent proteins inside eukaryotic cells using two-photon fluorescence. *Biomed Opt Express*. 3:340-353. 2012.
- Houben L, Bar Sadan M. Refinement procedure for the image alignment in high-resolution electron tomography. *Ultramicroscopy*. 111:1512-1520. 2011.
- Huang Y, Joiner M, Zhao B, Liao Y, Burmeister J. Dose convolution filter: incorporating spatial dose information into tissue response modeling. *Med Phys*. 37:1068-1074. 2010.

- Hutton C, Draganski B, Ashburner J, Weiskopf N. A comparison between voxel-based cortical thickness and voxel-based morphometry in normal aging. *Neuroimage*. 48:371-380. 2009.
- Ikuta A, Kumasaka S, Kashima I. Quantitative analysis using the star volume method applied to skeleton patterns extracted with a morphological filter. *J Bone Miner Metab*. 18:271-277. 2000.
- Instituto de Ramón y Cajal. Application of unbiased stereology. *Stereology short course*. Madrid. 2004.
- Jaqaman K, Danuser G. Computational image analysis of cellular dynamics: a case study based on particle tracking. *Cold Spring Harb Protoc*. 4:1-10. 2009
- Jia J, Tang CK. Image stitching using structure deformation. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*. 30:617-631. 2008
- Jimenez MM. Introducción al tratamiento digital y clustering de imágenes. *REE Marzo*:86-89. 2008.
- Kanade T, Yin Z, Bise1 R, Huh S, Eom S, Sandbothe MF, Chen M. Cell image analysis: algorithms, system and applications. *IEEE Workshop on applications of computer vision (WACV) 2011*:1-8. 2011.
- Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM. *Principles of Neural Science*, 4th ed., McGraw-Hill, New York. 2000.
- Kap M, Smedts F, Oosterhuis W, Winther R, Christensen N, Reischauer B, Viertler C, Groelz D, Becker KF, Zatloukal K, Langer R, Slotta-Huspenina J, Bodo K, de Jong B, Oelmuller U, Riegman P. Histological assessment of PAXgene tissue fixation and stabilization reagents. *PLoS One*. 6:e27704. 2011.
- Keshava N, Mustard JF. Spectral unmixing. *IEEE Signal Processing Magazine*. Jan:44-57. 2002.
- Khashman A, Sekeroglu B. Novel Thresholding Method for Document Analysis. *Proceedings of the IEEE International Conference on Industrial Technology (ICIT2006)*. 616-620. 2006.
- Konen CS, Kastner S. Sight. Cap. 8. En: *Neurobiology of Sensation and Reward*. Gottfried JA (Ed). Boca Raton (FL): CRC Press; 2011.
- Kong H, Gurcan M, Belkacem-Boussaid K. Partitioning histopathological images: an integrated framework for supervised color-texture segmentation and cell splitting *IEEE Trans Med Imaging*. 30:1661-1677. 2011.
- Korotcov A, Shan L, Meng H, Wang T, Sridhar R, Zhao Y, Liang XJ, Wang PC. A nanocomplex system as targeted contrast agent delivery vehicle for magnetic resonance imaging dynamic contrast enhancement study. *J Nanosci Nanotechnol*. 10:7545-7549. 2010.
- Kudela M, Pilka R, Lubusky M, Hejtmanek P, Dzubak P, Brychtova S. Prognostic importance of selected molecular immunohistochemical markers and DNA ploidy in endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 33:159-163. 2012.
- Lakowicz JR (Ed). *Principles of fluorescent spectroscopy*. 3<sup>rd</sup> edition. Springer. New York. 2006.
- Lavarias S; Heras H; Demichelis S; Portiansky E; Pollero RJ. Morphometric study of embryo development of *Macrobrachium borellii* (Arthropoda: Crustacea). *Invert Reprod Dev*. 41:157-163. 2002.
- Lee C, Eden M, Unser M. High-quality image resizing using oblique projection operators. *IEEE Trans Image Process*. 7:679-692. 1998.
- Lee YH, Hong K, KimAn S. Adaptive image bit-depth scaling method for displays. *International Conference on Consumer Electronics (ICCE)*. Digest of Technical Papers. pp 399-400. 2010.
- Lerner A, Sabbah S, Erlick C, Shashar N. Navigation by light polarization in clear and turbid waters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 366:671-679. 2011.
- Li JS, Randhawa S. Color filter array demosaicking using high-order interpolation techniques with a weighted median filter for sharp color edge preservation. *IEEE Trans Image Process*. 18:1946-1957. 2009.
- Li K, Miller ED, Chen M, Kanade T, Weiss LE, Campbell PG. Cell population tracking and lineage construction with spatiotemporal context. *Med Image Anal*. 12:546-566. 2008.
- Liao L, Fox D, Hightower J, Kautz H, Schulz D. Voronoi Tracking: Location Estimation Using Sparse and Noisy Sensor Data. *Proc. IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS)*. 1-6. 2003.
- Lin F, Liu Y, Zhong X, Chen J. An improved image alignment procedure for high-resolution transmission electron microscopy. *Micron*. 41:367-372. 2010.
- Loizou CP, Pattichis CS, Christodoulou CI, Istepanian RS, Pantziaris M, Nicolaides A. Comparative evaluation of despeckle filtering in ultrasound imaging of the carotid artery. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 52:1653-1669. 2005.

- Lotto RB, Williams SM, Purves D. An empirical basis for Mach bands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:5239-5244. 1999.
- Lugo JE, Doti R, Faubert J. Negative refraction angular characterization in one-dimensional photonic crystals. *PLoS One*. 6:e17188. 2011.
- Lushaj EB, Hu J, Haworth R, Lozonschi L. Intravital microscopy to study myocardial engraftment. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012. [Epub ahead of print]
- Majerová D. Image processing by means of Lukasiewicz algebra with square root. PhD Thesis. Prague. 2004.
- Majumder A, Stevens R. Color nonuniformity in projection-based displays: analysis and solutions. *IEEE Trans Vis Comput Graph*. 10:177-188. 2004.
- Mao J. Tracking a tennis ball using image processing techniques. MSc Thesis. University of Saskatchewan. Canada. 2006.
- Martin R, Thies B, Gerstner AO. Hyperspectral hybrid method classification for detecting altered mucosa of the human larynx. *Int J Health Geogr*. 11:21. 2012.
- Meghoufel A, Cloutier G, Crevier-Denoix N, de Guise JA. Tissue characterization of equine tendons with clinical B-scan images using a shock filter thinning algorithm. *IEEE Trans Med Imaging*. 30:597-605. 2011.
- Meijer GA, Beliën JA, van Diest PJ, Baak JP. Origins of ... image analysis in clinical pathology. *J Clin Pathol*. 50:365-370. 1997.
- Melo P; Escaffi JA. Bandas de mach en radiología. *Revista Chilena de Radiología* 2010; 16:86-89.
- Meesters LMJ. Predicted and perceived quality of bit-reduced gray-scale still images. Tesis Doctoral. Eindhoven University Press Facilities. Netherlands. 2002.
- Morhác M, Matoušek V, Kliman J. Efficient algorithm of multidimensional deconvolution and its application to nuclear data processing. *Digital Signal Processing*. 13:144-171. 2003.
- Mouton PR. Principles and practices of unbiased stereology. An introduction for bioscientists. Johns Hopkins University Press. Baltimore. 2002.
- Murrell P. Raster images in R graphics. *The R Journal* 3:48-54. 2011.
- Needleman DJ, Xu Y, Mitchison TJ. Pin-hole array correlation imaging: highly parallel fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*. 96:5050-5059. 2009.
- Nishida F; Morel GR; Hereñú CB; Schwerdt JI; Goya RG; Portiansky EL. Restorative effect of intracerebroventricular Insulin-Like Growth Factor-I gene therapy on motor performance in aging rats. *Neuroscience*. 177:195-206. 2011.
- Noek R, Knoernschild C, Migacz J, Kim T, Maunz P, Merrill T, Hayden H, Pai CS, Kim J. Multi-scale optics for enhanced light collection from a point source. *Opt Lett*. 35: 2460-2462. 2010.
- Or CC, Elder JH. Oriented texture detection: ideal observer modelling and classification image analysis. *J Vis*. 11:1-20. 2011.
- Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans Syst Man Cybern*. 9:62-66. 1979.
- Padfield D. Masked object registration in the Fourier domain. *IEEE Trans Image Process*. 21:2706-2718. 2012.
- Pappas M, Pitas I. Multichannel distance filter. *IEEE Trans Image Process*. 47:3412-3416. 1999.
- Passon O, Boltes M, Birmanas S, Zilken H, Wriggers W. Laplace-filter enhanced haptic rendering of macromolecules. *VMV*. 311-318. 2005.
- Pawley JB (Ed). *Handbook of biological confocal microscopy*. 3<sup>rd</sup> edition. Springer. New York. 2006.
- Pektas ZO, Keskin A, Günhan O, Karslioğlu Y. Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. *J Oral Maxillofac Surg*. 64:628-635. 2006.
- Pellett PA, Sun X, Gould TJ, Rothman JE, Xu MQ, Corrêa IR Jr, Bewersdorf J. Two-color STED microscopy in living cells. *Biomed Opt Express*. 2:2364-2371. 2011.
- Persson F, Bingen P, Staudt T, Engelhardt J, Tegenfeldt JO, Hell SW. Fluorescence nanoscopy of single DNA molecules by using stimulated emission depletion (STED). *Angew Chem Int Ed Engl*. 50:5581-5583. 2011.
- Pesce CM. Defining and interpreting diseases through morphometry. *Lab Invest*. 56:568-575. 1987

- Peterson DA, Jones DG. Determination of neuronal number and process surface area in organotypic cultures: a stereological approach. *J Neurosci Methods*. 46:107-120. 1993.
- Pinilla C; Alcalá A; Ariza FJ. Filtrado de imágenes en el dominio de la frecuencia. *Revista de Teledetección*. 8:1-5. 1997.
- Portiansky EL, Nishida F, Barbeito CG, Gimeno EJ, Goya RG. Increased number of neurons in the cervical spinal cord of aged female rats. *PLoS ONE* 6(7):e22537. 2011.
- Portiansky EL. Análisis computarizado de imágenes: Revolución de las últimas décadas. *Sin Fronteras*. Revista de Olympus Latin America Inc. (versión on line) <http://www.olympuslatinoamerica.com/sinfronteras> Marzo XIX:12-13. 2009.
- Portiansky EL. Colocalización cuantitativa. *Sin Fronteras*. Revista de Olympus Latin America Inc. (versión on line) <http://www.olympuslatinoamerica.com/sinfronteras> Septiembre XXIV:2-3. 2010.
- Portiansky EL. El conflictivo alcance de la Resolución. *Sin Fronteras*. Revista de Olympus Latin America Inc. (versión on line) <http://www.olympuslatinoamerica.com/sinfronteras> Septiembre XIX:2-3. 2009
- Portiansky EL. Hacia una Patología cuantitativa. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. LVI:56-67. 2002.
- Portiansky EL. Nuevas herramientas microscópicas e informáticas para el estudio de procesos biológicos. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. LXIV:382-387. 2010.
- Portiansky EL; Alonso CR; Costa EF; Gimeno EJ. Collagenous and elastic system fibres in the aorta of cattle poisoned by *Solanum glaucophyllum*. *Vet Rec*. 150: 42-45. 2002.
- Portiansky EL; Barbeito CG; Goya RG; Gimeno EJ; Zuccolilli GO. Morphometry of cervical segments grey matter in the male rat spinal cord. *J Neurosci Methods*. 139:217-229. 2004.
- Priestly Shan B, Madheswaran M. A Generalized despeckling filter for enhancing fetal structures to aid automated obstetric pathologies. *IJCTE*. 2:445-453. 2010.
- Princen JP, Bradley AB. Analysis/synthesis filter bank design based on time domain aliasing cancellation. *IEEE Trans. Acoust., Speech, Signal Processing*. ASSP-34:1153-1161. 1986.
- Pyrz WD, Buttrey DJ. Particle Size Determination Using TEM: A Discussion of Image Acquisition and Analysis for the Novice Microscopist. *Langmuir*. 24:11350-11360. 2008.
- Ramón y Cajal S; De Castro F. Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso. Segunda edición. Editorial Salvat. Barcelona. 1972.
- Rank K, Unbehauen R. An adaptive recursive 2-D filter for removal of Gaussian noise in images. *IEEE Trans Image Process*. 1:431-436. 1992.
- Recio T. La columna de matemática computacional. *Gaceta RSME*. 6.2: 469-513. 2003.
- Rego EH, Shao L, Macklin JJ, Winoto L, Johansson GA, Kamps-Hughes N, Davidson MW, Gustafsson MG. Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:E135-143. 2012.
- Rodrigues De Amorim MA; García-Segura LM; Goya RG; Portiansky EL. Decrease in PTEN and increase in Akt expression and neuron size in aged rat spinal cord. *Exp Gerontol*. 45:457-463. 2010.
- Rosbach KJ, Shin D, Muldoon TJ, Quraishi MA, Middleton LP, Hunt KK, Meric-Bernstam F, Yu TK, Richards-Kortum RR, Yang W. High-resolution fiber optic microscopy with fluorescent contrast enhancement for the identification of axillary lymph node metastases in breast cancer: a pilot study. *Biomed Opt Express*. 1:911-922. 2010.
- Ruby SG, McNally AC. Quality control of proliferation marker (MIB-1) in image analysis systems utilizing cell culture-based control materials. *Am J Clin Pathol*. 106:634-639. 1996.
- Russ JC, Dehoff RT. Practical stereology. 2<sup>nd</sup> edition. Plenum Press. New York. 1999.
- Russ JC. Seeing the Scientific Image. *Proceedings RMS*. 39:1-15. 2004.
- Russ JC. *The Image Processing Handbook*. 6th edition. CRC Press. Boca Ratón. FL. 2011.
- Sabatini AM. Kalman-filter-based orientation determination using inertial/magnetic sensors: observability analysis and performance evaluation. *Sensors (Basel)*. 11:9182-9206. 2011.
- Saito K, Arai Y, Zhang J, Kobayashi K, Tani T, Nagai T. Conjugation of both on-axis and off-axis light in Nipkow disk confocal microscope to increase availability of incoherent light source. *Cell Struct Funct*. 36:237-246. 2011.
- Saito K, Kobayashi K, Tani T, Nagai T. A mercury arc lamp-based multi-color confocal real time imaging system for cellular structure and function. *Cell Struct Funct*. 33:133-141. 2008.
- Sánchez HL; Silva LB; Acosta WG; Portiansky EL; Zuccolilli GO. Distribution of tyrosine hidroxylase-immunoreactive neurones in the diencephalon and mesencephalon of the coypu (*Myocastor coypus*). *Anat Histol Embryol (J Vet Med Serie C)*. 29:1-7. 2000.

- Sánchez HL; Silva LB; Portiansky EL; Goya RG; Zuccolilli GO. Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: a morphometric study. *J Comp Neurol*. 458:319-325. 2003.
- Sandberg B, Chan TF. Logic operators for active contours on multi-channel images. *UCLA Department of Mathematics CAM Report*. 33:2-12. 2002.
- Sandberg B, Kang SH, Chan TF. Unsupervised multiphase segmentation: a phase balancing model. *IEEE Trans Image Process*. 19:119-130. 2010.
- Santos S, Barcons V, Christenson HK, Font J, Thomson NH. The intrinsic resolution limit in the atomic force microscope: implications for heights of nano-scale features. *PLoS One*. 6:e23821. 2011.
- Sarko DK, Nidiffer AR, Powers III AR, Ghose D, Hillock-Dunn A, Fister MC, Krueger J, Wallace MT. Spatial and temporal features of multisensory processes: bridging animal and human studies. Cap. 11. En: Murray MM, Wallace MT (Eds). *The Neural Bases of Multisensory Processes*. Boca Raton (FL). CRC Press. 2012.
- Sarode VR, Han JS, Morris DH, Peng Y, Rao R. A comparative analysis of biomarker expression and molecular subtypes of pure ductal carcinoma in situ and invasive breast carcinoma by image analysis: relationship of the subtypes with histologic grade, Ki67, p53 overexpression, and DNA ploidy. *Int J Breast Cancer*. 2011:217060. 2011.
- Schmithorst VJ, Brown RD. Empirical validation of the triple-code model of numerical processing for complex math operations using functional MRI and group Independent Component Analysis of the mental addition and subtraction of fractions. *Neuroimage*. 22:1414-1420. 2004.
- Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*. 130:813-831. 2005.
- Sezgin M, Sankur B. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *J Elect Imaging* 13:146-165. 2004.
- Shaw PJ, Rawlins DJ. The point-spread function of a confocal microscope: its measurement and use in deconvolution of 3-D data. *J Microsc*. 163:151-165. 1991.
- Shi J, Malik J. Normalized Cuts and Image Segmentation. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*. 22:888-905. 2000.
- Shinaishin SF, Ghobashy SA, El-Bialy TH. Efficacy of light-activated sealant on enamel demineralization in orthodontic patients: an atomic force microscope evaluation. *Open Dent J*. 5:179-186. 2011.
- Sibarita JB. Deconvolution Microscopy. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 95: 201–243. 2005.
- Sifuzzaman M, Islam MR, Ali MZ. Application of Wavelet Transform and its Advantages Compared to Fourier Transform. *J Phys Sci*. 13:121-134. 2009.
- Sladoje1 N, Lindblad J. Perimeter estimation based on grey level object representation. *Swedish Symposium on image analysis*. Report 33. 2008.
- Smith DD, Kovats S, Lee TD, Cano L. Median filter algorithm for estimating the threshold of detection on custom protein arrays. *Biotechniques*. 41:74-78. 2006.
- Smith SW (Ed). *The scientist and engineer's guide to digital signal processing*. Second Edition. California technical Publishing. 1999.
- Sommerfeld J. *Image processing and object tracking from a single camera*. MSc Thesis. Stockholm. Sweden. 2006.
- Stark AK, Gundersen HJ, Gardi JE, Pakkenberg B, Hahn U. The saucor, a new stereological tool for analysing the spatial distributions of cells, exemplified by human neocortical neurons and glial cells. *J Microsc*. 242:132-147. 2011.
- Steinmetz T, Wilken T, Araujo-Hauck C, Holzwarth R, Hänsch TW, Udem T. Fabry-Pérot filter cavities for wide-spaced frequency combs with large spectral bandwidth. *Appl Phys B*. 96: 251-256. 2009.
- Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 134:127-136. 1984.
- Stone J, Stulz LW. Pigtailed high-finesse tunable fibre Fabry-Perot interferometers with large, medium and small free spectral ranges. *Elect Lett*. 23:781-783. 1987.
- Strehl R, Rombach-Riegraf V, Diez M, Egodage K, Bluemel M, Jeschke M, Koulov AV. Discrimination between silicone oil droplets and protein aggregates in biopharmaceuticals: a novel multiparametric image filter for sub-visible particles in microflow imaging analysis. *Pharm Res*. 29:594-602. 2012.
- Sum J, Chan Lw, Leung Cs, Young GH. Extended Kalman Filter-Based Pruning Method for Recurrent Neural Networks. *Neural Comput*. 10:1481-1505. 1998.

- Sumen C; Mempel TR; Mazo IB; von Andrian UH. Intravital Microscopy: Visualizing Immunity in Context. *Immunity*. 21:315-329. 2004.
- Sun K, Chen Z, Jiang S, Wang Y. Morphological multiscale enhancement, fuzzy filter and watershed for vascular tree extraction in angiogram. *J Med Syst*. 35:811-824. 2011.
- Sund T, Olsen JB. Detection of simulated microcalcifications in fixed mammary tissue: An ROC study of the effect of local versus global histogram equalization. *Acta Radiol*. 47:650-654. 2006.
- Suzuki K. Pixel-based machine learning in medical imaging. *Int J Biomed Imaging*. 2012:792079. 2012
- Taylor JR. An introduction to error analysis: the study of uncertainties in physical measurements. University Science Books. 1999.
- Teich DL. Mach bands: visual phenomenon of edge enhancement. *Radiology*. 222:577. 2002.
- Testa I, Wurm CA, Medda R, Rothermel E, von Middendorf C, Fölling J, Jakobs S, Schönle A, Hell SW, Eggeling C. Multicolor fluorescence nanoscopy in fixed and living cells by exciting conventional fluorophores with a single wavelength. *Biophys J*. 99:2686-2694. 2010.
- Toufik B, Mokhtar N. The Wavelet Transform for image processing applications. En: *Advances in Wavelet Theory and Their Applications in Engineering, Physics and Technology*. Baleanu D (ed). Cap. 17. pp 395-422. 2012.
- True LD. Morphometric applications in anatomic pathology. *Hum Pathol*. 27:450-467. 1996.
- Tsofe A, Spitzer H, Einav S. Does the chromatic Mach bands effect exist? *J Vis*. 9:20.1-29. 2009.
- Tsofe A, Spitzer H. Second-order Mach bands: chromatic and achromatic. *Vision Res*. 51:1109-1115. 2011.
- Wackermann J. Determinants of filled/empty optical illusion: Differential effects of patterning. *Acta Neurobiol Exp*. 72:89-94. 2012.
- Wang L, Liu P, Tan J, Wang L, Ding X. Note: How to design Gaussian filter with eccentricity and probe offset taken into account for roundness measurement of small radius. *Rev Sci Instrum*. 83:056105. 2012
- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol*. 30:23-38. 1966.
- Weigert R, Sramkova M, Parente L, Amornphimoltham P, Masedunskas A. Intravital microscopy: a novel tool to study cell biology in living animals. *Histochem Cell Biol*. 133:481-491. 2010.
- Weise D, Crew R. Programmable syntax macros. *Proceedings of the ACM SIGPLAN 1993 conference on Programming language design and implementation*. 156-165. 1993.
- West MJ, Ostergaard K, Andreassen OA, Finsen B. Estimation of the number of somatostatin neurons in the striatum: An in situ hybridization study using the optical fractionator method. *J Comp Neurol* 370:11-22. 1996.
- Westheimer G. Illusions in the spatial sense of the eye: geometrical-optical illusions and the neural representation of space. *Vision Res*. 48:2128-2142. 2008.
- Williams DR. Aliasing in human foveal vision. *Vision Res*. 25:195-205. 1985.
- Wu B, Klatzky RL, Stetten G. Visualizing 3D objects from 2D cross sectional images displayed in-situ versus ex-situ. *J Exp Psychol Appl*. 16:45-59. 2010.
- Wu Y, Zinchuk V, Grossenbacher-Zinchuk O, Stefani E. Critical evaluation of quantitative colocalization analysis in confocal fluorescence microscopy. *Interdiscip Sci*. 4:27-37. 2012.
- Yoo TS (Ed). *Insight into images. Principles and practice for segmentation, registration, and image analysis*. AK Peters Ltd. Canada. 2004.
- Yoshigi M, Clark EB, Yost HJ. Quantification of stretch-induced cytoskeletal remodeling in vascular endothelial cells by image processing. *Cytometry A*. 55:109-118. 2003.
- Zhang X, Bajaj C. Scalable isosurface visualization of massive datasets on commodity off-the-shelf clusters. *J Parallel Distrib Comput*. 69:39-53. 2009.
- Zinchuk O; Zinchuk V. Dynamics of cellular responses studied by quantitative colocalization analysis. *The Americas microscopy and analysis life sciences supplement*. September 2006. pp S5-S7.
- Zinchuk V, Zinchuk O, Okada T. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem*. 40:101-111. 2007.
- Zinchuk V; Grossenbacher-Zinchuk O. Recent advances in quantitative colocalization analysis: Focus on neuroscience. *Prog Histochem Cytochem*. 44: 125-172. 2009.

- Zwier, Van Rooij GJ, Hofstraat JW, Brakenhoff GJ. Image calibration in fluorescence microscopy. J Microsc. 216:15-24. 2004.

## *Páginas Web consultadas*

A Very Basic Introduction To Time/Frequency Domains  
<http://www.theparticle.com/cs/bc/mcs/signalnotes.pdf>

Adobe Developers Association. Digital image integrity.  
[http://www.adobe.com/digitalimag/pdfs/digital\\_image\\_integrity.pdf](http://www.adobe.com/digitalimag/pdfs/digital_image_integrity.pdf)

Adobe Developers Association. TIFF. Revision 6.0.  
<http://partners.adobe.com/public/developer/en/tiff/TIFF6.pdf>

Advance light microscopy core facility.  
<http://lightmicroscopy.ucdenver.edu/seminars.php>

Bellis M. History of the microscope. How the light microscope evolved  
<http://inventors.about.com/od/mstartinventions/a/microscope.htm>

Bourke P. Image Filtering in the Frequency Domain.  
<http://paulbourke.net/miscellaneous/imagefilter/>

Buchin MP. Low-light imaging: ICCD, EMCCD, and sCMOS compete in low-light imaging.  
<http://www.laserfocusworld.com/articles/print/volume-47/issue-7/features/low-light-imaging-iccd-emccd-and-scmos-compete-in-low-light-imaging.html>

Cabanes I. Representación binaria.  
<http://www.nachocabanes.com/redes/representacionBinaria.pdf>

Cámaras digitales y fotografía: artículos y reportajes.  
<http://www.quesabesde.com/camdig/pagarticulos.asp>

Cordero J. Ilusiones ópticas.  
<http://personal.us.es/jcordero/PERCEPCION/Cap02.htm>

Csetverikov D. Basic Algorithms for Digital Image Analysis: a course.  
[http://progmatt.uw.hu/oktseg/kepelemzes/lec04\\_highpass\\_4.pdf](http://progmatt.uw.hu/oktseg/kepelemzes/lec04_highpass_4.pdf)

Despeckle filtering.  
<http://www.websupergoo.com/helpie/source/2-effects/despeckle.htm>

Edwards J. Frequency Domain Theory And Applications  
<http://www.numerix-dsp.com/tutorials/DSP/FrequencyDomainProcessing.pdf>

Fluorocromos. Olympus.  
<http://www.olympusfluoview.com/theory/fluorochromedata.html>

Fluorocromos. Salk Institute for Biological Studies  
<http://flowcyt.salk.edu/fluo.html>

Fourier Transforms & the Frequency Domain.  
<http://astro.berkeley.edu/~jrg/ngst/fft/fourier.html>

Fundamentals of sampled data systems. Analog-digital conversion.  
<http://www.cse.psu.edu/~chip/course/analog/lecture/ADCsamplingCKTs.pdf>

García Alvarez JAE. Así funciona la conversión analógico digital.  
[http://www.asifunciona.com/electronica/af\\_conv\\_ad/conv\\_ad\\_1.htm](http://www.asifunciona.com/electronica/af_conv_ad/conv_ad_1.htm)

García E, Osuna R. Fundamentos de fotografía digital.  
[http://www.uned.es/personal/rosuna/resources/photography/ImageQuality/fundamentos\\_imagen\\_digital.pdf](http://www.uned.es/personal/rosuna/resources/photography/ImageQuality/fundamentos_imagen_digital.pdf)

Grunsbay R. Scientific CMOS (sCMOS) technology: An overview.  
<http://www.photonicsonline.com/doc/scientific-cmos-scmos-technology-an-overview-0001>

Hamamatsu. Concepts in Digital Imaging Technology.  
<http://learn.hamamatsu.com/articles/microscopyimaging.html>

Heckbert PS. Color Image Quantization for Frame Buffer Display. ACM SIGGRAPH '82 Proceedings.  
<http://web.archive.org/web/20050606233131/http://citeseer.ist.psu.edu/heckbert80color.html>

Hoffmann G. CIE Lab Color Space.  
<http://www.fho-emden.de/~hoffmann/cielab03022003.pdf>  
<http://www.tech-faq.com/vector-images.html>

Hyperphysics. Polarization of light.  
<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/phyopt/polarcon.html>

Imagemet. Smoothing filters.  
[http://www.imagemet.com/WebHelp/spip.htm#hid\\_filters\\_smoothing.htm](http://www.imagemet.com/WebHelp/spip.htm#hid_filters_smoothing.htm)

Kothe U. Primary Image Segmentation.  
[http://hci.iwr.uni-heidelberg.de/Staff/ukoethe/papers/primary\\_segmentation.pdf](http://hci.iwr.uni-heidelberg.de/Staff/ukoethe/papers/primary_segmentation.pdf)

Lindenberg T, Li M-X. Segmentation and classification of edges using minimum description length approximation and complementary junction cues.  
<http://ftp.nada.kth.se/pub/CVAP/reports/cvap186.pdf>

MaxIm DL. Kernel filters.  
[http://www.cyanogen.com/help/maximdl/HID\\_PROC\\_KERNFILTERS.htm](http://www.cyanogen.com/help/maximdl/HID_PROC_KERNFILTERS.htm)

Mc Master Biophotonics Facility. Image J for microscopy.  
<http://www.macbiophotonics.ca/imagej/>

Measurement Computing. Analog to digital conversion  
<http://www.mccdaq.com/PDFs/specs/Analog-to-Digital.pdf>

Molecular Expressions. Optical microscopy primer. Digital imaging in optical microscopy.  
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/digitalimaging/index.html>

Murata H, Mori X, Yamashita S, Maenaka A, Okada S, Oyamada K, Kishimoto S. A Real-Time 2-D to 3-D Image conversion technique using computed image depth.  
[http://www.loreti.it/download/pdf/3d/2dto3d\\_conv32\\_02.pdf](http://www.loreti.it/download/pdf/3d/2dto3d_conv32_02.pdf)

Nacional Diagnostics.  
<https://www.nationaldiagnostics.com/histology/articles>

Narváez Armas DJ. La microscopía. Herramienta para estudiar células y tejidos.  
[http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo4\\_5.htm](http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo4_5.htm)

NASA. Filtering.  
[http://idlastro.gsfc.nasa.gov/idl\\_html\\_help/Contrasting\\_and\\_Filtering.html](http://idlastro.gsfc.nasa.gov/idl_html_help/Contrasting_and_Filtering.html)

Nikon. Microscope Objective Specifications.  
<http://www.microscopyu.com/articles/optics/objectivespecs.html>

Object Recognition by Integrating Multiple Image Segmentations.  
[http://lear.inrialpes.fr/pubs/2008/PSH08/pantofaru\\_eccv08.pdf](http://lear.inrialpes.fr/pubs/2008/PSH08/pantofaru_eccv08.pdf)

Olympus microscopy resource center.  
<http://www.olympusmicro.com/>

Pascale D. A Review of RGB color spaces.  
<http://www.babelcolor.com/download/A%20review%20of%20RGB%20color%20spaces.pdf>

Poynton C. Frequently asked questions about color.  
<http://www.poynton.com/PDFs/ColorFAQ.pdf>

Reedy CL, Kamboj S. Image Analysis Protocol Instructions #1: Spatial Calibration of Images.  
<http://www.cmc-concrete.com/CMC%20Seminars/Petrographic%20Image%20Analysis.pdf>

Reis G. Digital Image Integrity. 2006.  
[http://www.adobe.com/digitalimag/pdfs/phscs2ip\\_digintegr.pdf](http://www.adobe.com/digitalimag/pdfs/phscs2ip_digintegr.pdf)

Rolls GO; Farmer NJ; Hall JB. Artifacts in Histological and Cytological Preparations. Leica Microsystems' Education Series.  
[http://issuu.com/leicamicrosystems/docs/artifacts\\_handbook](http://issuu.com/leicamicrosystems/docs/artifacts_handbook)

Scientific volume imaging.  
<http://www.svi.nl/>

Scribd. Iluminación Köhler <http://es.scribd.com/doc/37058774/Iluminacion-Kohler>

Sigma. The Sigma SD1 digital single lens reflex camera with full color image sensor.  
<http://www.sigma-sd.com/SD1/es/system.html>

Sympatec GmbH. Particle shape.  
[http://www.sympatec.com/Science/Characterisation/05\\_ParticleShape.html](http://www.sympatec.com/Science/Characterisation/05_ParticleShape.html)

Torres SA. Reducción del ruido en una imagen digital.  
<http://www4.ujaen.es/~satorres/practicas/practica2.pdf>

van Valen. Point Spread Function.  
[http://www.rpgroup.caltech.edu/courses/aph162/2010/files/handouts/2010/Point\\_Spread\\_Function\\_Workshop.pdf](http://www.rpgroup.caltech.edu/courses/aph162/2010/files/handouts/2010/Point_Spread_Function_Workshop.pdf)

Vectorial Images.  
<http://www.iconshock.com/icons-articles/vectorial-images-vs-bitmaps/>

VHTM Divulgación. Orígenes del ruido en el CCD y la relación señal/ruido.  
<http://www.vhtm.com>

Vitale T. Digital Image File Formats – TIFF, JPEG, JPEG2000, RAW and DNG. 2007.  
[http://cool.conservation-us.org/coolaic/sg/emg/library/pdf/vitale/2007-07-vitale-digital\\_image\\_file\\_formats.pdf](http://cool.conservation-us.org/coolaic/sg/emg/library/pdf/vitale/2007-07-vitale-digital_image_file_formats.pdf)

Ward DW, Nelson KA. On the physical origins of the negative index of refraction.  
<http://arxiv.org/pdf/physics/0409083v1.pdf>

Ward G. High Dynamic Range Image Encodings.  
<http://www.anywhere.com/gward/hdrenc/Encodings.pdf>

Ward G. High Dynamic Range Image Encodings.  
<http://www.pauldebevec.com/Research/HDR/Ward-HDRImaging-20010521.pdf>

Ward, G. The Hopeful Future of High Dynamic Range Imaging.  
<http://www.anywhere.com/gward/papers/sid2007.pdf>

Wikipedia la enciclopedia libre  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Wikipedia:Portada>

Wikipedia the free encyclopedia  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Main\\_Page](http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page)

Wilson T, Friedrich M, Diaspro A. Basics of light microscopy imaging. GIT Verlag GmbH & Co.  
<http://www.imaging-git.com/applications/basics-light-microscopy-imaging>

Zeiss. Education in Microscopy and Digital Imaging  
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/>

Zeiss. Education in Microscopy and Digital Imaging. Objectives.  
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/objectivecolorcoding/>

# Índice de términos

## A

**Aberración** .... 3, 50, 53, 62, 63, 64, 65, 69, 86, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 112, 113, 114, 116, 127, 153, 156, 219, 224  
Astigmatismo..... 94, 97, 98  
Cromática..... 98  
Curvatura de campo..... 94, 97, 98  
Esfericidad..... 65, 96, 97, 153  
**Aceite de inmersión** ..... 112  
**Algoritmo** 29, 163, 188, 189, 191, 198, 201, 207, 209, 210, 211, 212, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 256, 257, 258, 267, 273, 274, 275, 290, 319, 321, 346  
**Aliasing** ..... 110, 111, 255  
**Alineación**. 33, 37, 38, 62, 65, 69, 109, 153, 158, 252, 253, 254, 312, 318  
**Analógico**..... 3, 11, 23, 109, 123, 126, 132, 137, 138, 221, 327  
**Artefactos**. 26, 38, 39, 40, 42, 44, 46, 50, 52, 96, 117, 131, 139, 148, 207, 216, 217, 225, 263

## B

**Balance de blancos** ..... 129, 140, 149  
**Bandas de Mach**..... 9, 10  
**Bastones**..... 3, 4, 9, 20, 350  
**Binning** ..... 122, 135, 136, 147, 153  
**Bit** 12, 13, 14, 15, 16, 21, 23, 24, 26, 123, 134, 137, 138, 140, 145, 148, 149, 152, 157, 158, 163, 164, 165, 169, 182, 201, 216, 226, 229, 231, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 258, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 282, 불309, 310  
**Burbujas** ..... 36, 43, 46, 47, 272

## C

**Calibración** .... 23, 37, 38, 52, 147, 150, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 324, 325, 333, 345, 356, 357  
espacial 38, 147, 150, 306, 307, 308, 345, 356, 357  
**Cámara digital**..... 2, 11, 14, 22, 23, 37, 38, 54, 76, 79, 80, 83, 85, 87, 102, 105, 109, 110, 115, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 134, 135, 138, 139, 140, 142, 145, 146, 147, 148, 150, 151, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 174, 175, 213, 214, 216, 252, 253, 254, 262, 272, 307, 308, 309, 339, 348

**Captura**.. 23, 31, 32, 35, 37, 44, 51, 53, 54, 55, 63, 65, 68, 78, 79, 80, 83, 86, 87, 94, 106, 110, 114, 119, 121, 123, 124, 125, 126, 128, 129, 130, 134, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 153, 154, 156, 157, 160, 174, 213, 216, 224, 227, 251, 289, 293, 309, 310, 311, 315, 322, 337, 356  
**CCD**.... 3, 23, 79, 80, 86, 109, 110, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 214, 216, 221, 227, 308, 310  
Blooming ..... 123, 124, 127  
Filtro Bayer ..... 128, 139, 140, 141, 216  
gating ..... 125  
**Centroide**. 37, 188, 193, 274, 313, 314, 315, 316, 317  
**Clusters**..... 272, 274, 277, 343, 344  
**CMOS** ..... 121, 125, 126, 127, 130, 131, 140, 142  
Windowing ..... 126  
**Colores primarios**..... 16, 17, 19, 128, 140, 311, 336  
**Colores secundarios**..... 16, 17, 336  
**Compresión** .. 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 38, 201, 209, 211, 228, 259, 260, 269  
gamma ..... 228, 259, 260  
**Conos**..... 3, 4, 9, 20, 63, 99, 114, 350  
**Contaminantes** ..... 40, 43  
**Contraste**.... 11, 18, 55, 65, 68, 70, 76, 81, 91, 94, 99, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 113, 114, 133, 147, 148, 149, 155, 156, 157, 158, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 172, 175, 179, 180, 198, 212, 214, 217, 225, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 240, 242, 243, 244, 255, 274, 277, 280, 283, 284, 288, 305  
de fase diferencial (DIC) .. 55, 91, 92, 95, 107, 212, 217, 231, 240, 287, 288  
**Control de calidad**..... 86, 211, 237  
**Conversión**..... 19, 23, 70, 71, 87, 123, 132, 135, 137, 138, 158, 201, 221, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 267, 308, 324  
**Convolución** 61, 62, 63, 162, 163, 164, 173, 179, 180, 181, 182, 183, 193, 197, 206, 212, 213, 214, 216, 217, 233  
**Corrección** .. 35, 38, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 101, 113, 121, 127, 129, 156, 159, 160, 161, 206, 220, 221, 227, 241, 252, 281, 293, 308, 311, 325, 337  
fondo ..... 159, 160, 241, 337  
gamma ..... 227, 259  
registro..... 252  
**Correlación cruzada** ..... 252  
**Criterio** ... 24, 100, 103, 104, 109, 110, 111, 148, 220, 223, 241, 280, 286, 288  
Nyquist..... 24, 109, 110, 111, 148, 223  
Rayleigh..... 100, 103  
**Crominancia**..... 11, 23, 141, 260, 261

**Cuantificación** 9, 11, 26, 42, 52, 53, 55, 127, 137, 156, 159, 183, 239, 263, 269, 271, 272, 283, 285, 292, 293, 294, 301, 307, 311, 318, 329, 337, 341  
**Cubreobjetos** .... 36, 43, 45, 46, 47, 64, 65, 69, 80, 90, 91, 92, 93, 96, 97, 98, 111, 112, 114, 153, 159

## D

**Deconvolución** .. 63, 64, 106, 146, 157, 165, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 254, 289, 337  
 Blind..... 222  
 Gold ..... 220, 221  
 MLE..... 215, 221, 222, 223, 224, 337  
 MLE fast ..... 215, 222  
 Nearest Neighbors ..... 217, 218  
 No Neighbors..... 217  
 Van-Cittert..... 220  
 Wiener ..... 216, 217, 218  
**Digitalización** ..... 110, 123, 138, 142, 310  
**Dimensión** 2, 29, 30, 32, 33, 38, 55, 64, 144, 153, 189, 195, 252, 295, 296, 307, 315, 325, 343  
 axial..... 38  
**Disector óptico**..... 293, 303, 304  
**Dithering**..... 263, 266  
**Dominio** 145, 146, 156, 162, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 210, 213, 216, 217, 225, 252, 319  
 espacial .... 156, 162, 197, 199, 200, 201, 202, 203, 205, 206, 207, 213, 216, 225  
 espectral..... 204

## E

**Ecuación** .. 168, 169, 170, 171, 172, 196, 231, 232, 233, 240, 243, 278  
**Efecto Holmes**..... 53  
**Errores**.... 35, 37, 38, 51, 52, 53, 62, 65, 94, 128, 130, 135, 147, 150, 217, 272, 274, 277, 293, 304, 310, 315, 337, 349  
**Escalado**..... 12, 25, 209, 254, 263, 264, 265  
**Esqueletonización** 189, 190, 191, 195, 249, 316, 318, 321, 325, 331  
**Estereología**..... 53, 248, 294, 297, 298, 303, 306, 349  
**Expansión gamma**..... 228, 258

## F

**FFT**... 32, 146, 160, 161, 162, 174, 201, 202, 203, 205, 207, 213, 216, 318  
**Filtro Bayer** ..... 128, 139, 140, 141, 216  
**Filtros** ... 114, 118, 140, 155, 162, 164, 173, 180, 183, 197  
 Close ..... 184, 251, 271, 344, 357  
 Despeckle..... 175, 176, 177  
 Distancia..... 186, 187, 317, 318, 325  
 Ecuación Local ..... 168, 169, 170, 172, 196  
 Flatten..... 179, 207, 235, 236

Gauss 155, 162, 166, 173, 174, 175, 207, 236, 237, 284, 285, 327, 328, 344  
 HiGauss ..... 167, 168  
 HiPass..... 166, 167, 168, 197, 198, 199  
 Kernel 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 194, 197, 198, 199, 357  
 Laplace..... 182, 207, 344  
 LowPass..... 155, 173, 174, 194, 196, 197, 198, 199  
 Open ..... 25, 184, 271  
 Paso de Banda ..... 198, 199  
 Pruning..... 155, 191, 192, 194, 271, 285  
 Punto final..... 187, 193, 194, 195, 317  
 Roberts..... 181, 194, 235, 236, 249, 250  
 Sculpt ..... 31, 155, 193  
 Sobel 155, 180, 181, 197, 271, 276, 277, 319, 322, 332, 342, 344, 357  
 Thinning ... 189, 190, 191, 192, 194, 195, 197, 249, 271, 285  
 Thinning-3D..... 195, 197  
 Top Hat ..... 185, 186  
 Unsharp.... 164, 165, 166, 167, 168, 175, 207, 215, 216, 236  
 Voronoi ..... 187, 191, 192, 193, 195, 274, 317, 318  
 Watershed 187, 188, 251, 268, 271, 281, 285, 342, 343  
**Filtros espectrales**..... 164, 197, 198, 199  
**Fluorescencia**.... 15, 23, 32, 33, 37, 46, 49, 50, 64, 68, 70, 71, 72, 75, 79, 81, 82, 84, 85, 100, 104, 106, 107, 108, 118, 120, 124, 132, 141, 144, 148, 149, 153, 154, 156, 195, 218, 240, 288, 290, 295, 311, 335, 339, 340, 348, 349, 350  
 Autofluorescencia..... 50, 76, 119, 132, 291, 337  
 Emisión .. 50, 51, 55, 64, 65, 66, 67, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 84, 87, 95, 104, 119, 120, 126, 127, 141, 150, 214, 253, 288, 289, 337  
 Excitación 50, 67, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 95, 118, 119, 120, 154, 223, 312  
 Fluoróforo .... 15, 33, 50, 51, 65, 68, 71, 73, 78, 80, 82, 85, 118, 119, 148, 154, 287, 289, 291, 311, 337, 345, 347, 349, 354  
 Fotoblanqueo ... 48, 49, 50, 65, 79, 80, 81, 82, 111, 119, 153, 311, 312, 339, 348  
 Inmunofluorescencia..... 44  
 Inmunohistoquímica... 44, 45, 47, 48, 49, 280, 333  
 Jablonski..... 70, 71  
 Quantum dots ..... 287  
**Fotomultiplicador** ..... 50, 76, 77, 124, 133, 141, 337  
**Fotosensor**..... 23, 102, 110, 121, 122, 123, 126, 127, 131, 132, 134, 135, 138, 139, 140, 142, 308, 309  
**Fractal**..... 25  
**Función**.... 2, 9, 26, 57, 61, 63, 68, 70, 72, 80, 97, 100, 103, 104, 105, 113, 118, 120, 121, 125, 145, 157, 158, 159, 162, 164, 167, 169, 170, 173, 187, 199, 201, 208, 209, 212, 213, 219, 220, 222, 225, 226, 227, 243, 244, 249, 252, 277, 289, 293, 312, 316, 318, 319, 327  
 biyectiva ..... 252  
 inyectiva ..... 252  
 mapeo..... 225, 226, 227

---

## G

**Gestáltica**..... 269  
**Grilla**..9, 100, 101, 155, 248, 294, 296, 297, 298, 299,  
300, 301, 302, 303, 305, 306, 307

---

## H

**Histograma**29, 30, 104, 157, 165, 168, 169, 170, 177,  
185, 220, 222, 224, 228, 231, 232, 233, 244, 245,  
262, 264, 272, 273, 274, 277, 278, 279, 280, 281,  
282, 334, 335, 336, 338

---

## I

**Iluminación Köhler**..... 65, 68, 69, 70  
**Ilusiones ópticas** ..... 5, 6, 7, 9, 10  
**Imagen**.....  
binaria..... 193, 209, 244, 271, 276  
color. 10, 16, 17, 87, 128, 148, 149, 155, 172, 180,  
181, 195, 196, 216, 231, 232, 236, 242, 243,  
259, 260, 282, 283, 285, 306  
isométrica..... 30, 31, 350, 351  
JPEG2000..... 25, 28, 29, 30  
JPG ..... 25, 26, 28, 29, 30, 138, 139, 140  
monocromática 10, 14, 16, 17, 148, 155, 157, 183,  
185, 186, 188, 195, 202, 226, 229, 231, 233,  
234, 235, 241, 242, 243, 244, 258, 259, 271,  
276, 306, 309, 342, 344  
TIF23, 25, 26, 29, 140  
Time Lapse .32, 147, 154, 191, 217, 219, 239, 288,  
343, 348  
**Inmunofluorescencia**..... 44  
**Inmunohistoquímica** ..... 44, 45, 47, 48, 49, 280, 333  
**Interpolación** 128, 140, 141, 145, 161, 227, 254, 255,  
256, 257, 258, 328  
bicúbica..... 255, 257, 258  
bilineal..... 255, 256, 257, 258, 328

---

## L

**Límite de Abbe**..... 103, 104  
**Luminancia** . 11, 23, 26, 106, 128, 141, 227, 258, 259,  
260  
**LUT** 206, 207, 225, 226, 227, 228, 230, 237, 249, 251,  
253  
**Luz**.....  
Absorción ... 17, 49, 50, 51, 54, 59, 71, 72, 82, 104,  
105, 106, 112, 118, 141  
Difracción . 3, 22, 47, 59, 61, 62, 63, 65, 70, 81, 83,  
100, 101, 102, 103, 104, 127, 143, 213, 223  
Difuminación .... 61, 65, 94, 97, 212, 217, 219, 221  
Disco de Airy.. 22, 63, 79, 100, 101, 102, 103, 104,  
109, 149  
Electromagnetismo 3, 4, 21, 50, 51, 58, 66, 67, 69,  
70, 71, 78, 83, 85, 103, 112, 114, 119, 134,  
198, 199, 201, 202, 204, 205, 206, 211, 240,  
260, 288, 289, 337

Fotón.....2, 4, 60, 63, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 80, 82,  
85, 106, 119, 121, 122, 123, 124, 125, 126,  
127, 132, 133, 135, 139, 141, 142, 143, 144,  
148, 149, 153, 157, 214, 218, 221, 223, 224,  
289, 309, 348  
Láser .39, 49, 50, 57, 66, 67, 69, 70, 76, 78, 80, 81,  
82, 83, 84, 88, 107, 114, 119, 143, 144, 148,  
214, 337  
Luminancia.....11, 23, 26, 106, 128, 141, 227, 258,  
259, 260  
Patrón de Airy... 22, 62, 63, 79, 100, 101, 104, 109  
Polarización ..... 15, 39, 60, 61, 104, 106  
PSF..... 61, 62, 63, 64, 65, 82, 212, 213, 214, 216,  
217, 218, 219, 220, 222, 223, 224  
Reflexión .... 58, 59, 60, 63, 66, 69, 70, 75, 80, 104,  
116, 132  
Refracción .. 3, 7, 23, 58, 59, 60, 64, 65, 80, 83, 86,  
94, 95, 96, 97, 98, 101, 104, 106, 111, 112,  
113, 120, 127, 212  
Transmisión ..38, 58, 59, 60, 69, 74, 75, 80, 86, 87,  
91, 104, 105, 120, 135, 147, 158, 185, 188,  
213, 240

---

## M

**Macros**..... 146, 147, 154, 307, 356, 357  
**Mapa de Distancia Euclideana** ..... 186  
**Medición**5, 8, 11, 14, 23, 37, 38, 52, 53, 85, 101, 107,  
111, 122, 134, 137, 147, 148, 157, 159, 179, 186,  
187, 190, 216, 230, 247, 248, 251, 252, 269, 271,  
272, 292, 293, 294, 295, 297, 298, 299, 300, 301,  
304, 305, 307, 309, 310, 311, 312, 315, 316, 317,  
318, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 328, 331, 332,  
333, 334, 338, 341, 349, 353, 354, 355  
**Microscopio**.....  
Campo ampliado 50, 54, 61, 63, 64, 65, 75, 76, 77,  
78, 79, 81, 90, 95, 99, 103, 106, 108, 142, 212,  
213, 214, 215, 219, 225, 336, 337  
Campo claro ..... 70, 74, 75, 90, 95, 113, 114  
Confocal . 38, 50, 53, 54, 57, 62, 63, 64, 71, 75, 76,  
77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 92, 95, 97, 99,  
102, 103, 104, 106, 107, 124, 132, 142, 144,  
149, 150, 153, 212, 213, 214, 215, 216, 219,  
336, 337, 351, 354  
Disco giratorio ..... 57, 64, 76, 78, 79, 214  
Electrónico ..15, 75, 85, 86, 87, 100, 170, 185, 194  
Estereoscópico ..... 54, 75, 252  
Fuerza atómica .....57, 88  
intravital..... 82  
Multifotónico..... 38  
Simple ..... 74  
**Súper-resolución**..... 83  
TIRF ..... 76, 80, 81, 106, 221  
**Morfometría**.....56, 116, 156, 293, 294, 302  
Recuento 5, 35, 125, 147, 179, 182, 186, 190, 247,  
251, 293, 296, 297, 298, 299, 300, 302, 303,  
304, 307, 321, 326, 334, 341, 342, 343, 344,  
345, 349, 351, 354

---

## N

Nanopartícula ..... 64, 83, 240, 287, 295

---

## O

**Objetivo.** 23, 38, 53, 56, 61, 63, 64, 65, 68, 69, 74, 75, 76, 77, 79, 86, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 117, 118, 131, 132, 138, 142, 143, 146, 149, 150, 157, 159, 170, 180, 183, 213, 214, 215, 219, 223, 293, 308, 309, 322, 338  
Apertura numérica... 23, 38, 62, 64, 76, 78, 83, 90, 98, 100, 104, 127, 157, 223, 337  
Distancia parafocal..... 92, 93, 95, 96

**OCR**.....271, 274

### Operación matemática

Cuadrática .....243, 244  
Diferencia absoluta ..... 238  
División.....26, 241  
Exponencial ..... 169, 172, 233, 244, 245  
Inverso ..... 245  
Multiplicación ..... 240  
Operadores lógicos ..... 155, 233, 245, 246, 247  
Potencia ..... 244  
Promedio..... 241, 296, 325  
Raíz Cuadrada..... 243, 244, 245  
Substracción ..... 16, 233, 237, 238, 239  
Sumatoria..... 234, 235, 236  
Valores máximos.....203, 238, 241, 355

**Operadores lógicos** ..... 155, 233, 245, 246, 247

Operador AND ..... 107, 246, 247, 248, 249  
Operador NAND..... 248, 249, 250  
Operador NOR ..... 249, 251, 333  
Operador NOT ..... 249, 250, 276  
Operador OR..... 247, 248, 249  
Operador XOR.. 192, 197, 250, 251, 316, 317, 326, 345

**Orificios** .... 78, 80, 272, 313, 322, 323, 324, 328, 341, 342

---

## P

**Pinhole** .....63, 76, 77, 95, 149, 153, 337

**Pixelado**..... 12, 23, 24, 170, 171

**Platina** .... 34, 37, 39, 66, 68, 117, 118, 153, 160, 254, 304

**Polarización** ..... 15, 39, 60, 61, 104, 106

**Portaobjetos**... 36, 37, 38, 43, 44, 45, 69, 70, 93, 112, 114, 117, 159, 254, 301, 309

**Posterización** ..... 262

**Profundidad**.....134, 355

bit 13, 14, 23, 134, 146, 147, 148, 149, 157, 165, 216, 258, 263, 264, 265

campo .....37, 150

foco.....37, 150

**Punto focal** ..... 37, 65, 69, 76, 79, 81, 84, 94, 96, 106, 115, 116, 143, 214, 351

---

---

## R

**Rango dinámico** 13, 14, 122, 127, 131, 132, 134, 135, 137, 138, 139, 152, 157, 160, 169, 214, 226, 231, 233, 237, 238, 240, 264

**Reconocimiento óptico de caracteres** ..... 271, 274

**Reconstrucción 3D** . 37, 38, 78, 79, 81, 118, 254, 287, 351, 356

**Redimensionamiento**.....255, 256

**Región de interés**. 206, 270, 271, 286, 322, 338, 340, 341

**Renderización** .....30, 31

**Resolución** .....22, 24, 100, 131

Axial ..22, 23, 38, 63, 64, 65, 68, 75, 78, 79, 80, 82, 83, 95, 96, 101, 102, 103, 149

Espacial 12, 13, 23, 24, 38, 52, 76, 78, 83, 85, 100, 103, 104, 109, 110, 123, 131, 147, 149, 150, 151, 156, 162, 197, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 213, 214, 216, 225, 266, 272, 276, 288, 306, 307, 308, 309, 312, 314, 336, 338, 345, 348, 356, 357

Espectral..... 20, 23, 50, 51, 78, 104, 197, 198, 199, 206, 207, 288, 289, 290, 291, 310

Lateral..... 22, 38, 64, 82, 83, 100, 101, 149

Volumétrica..... 23

**Retina** ..... 2, 3, 4, 5, 22, 61, 351

**ROI** ..... 206, 270, 271, 286, 322, 338, 340, 341

**Ruido** .....14, 32, 64, 81, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 138, 139, 143, 144, 148, 149, 151, 152, 156, 157, 160, 162, 163, 164, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 188, 198, 199, 205, 206, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 262, 263, 278, 337, 344, 348, 349, 354

Blanco ..... 132

Corriente oscura . 23, 131, 132, 133, 134, 141, 157 de fondo (background)81, 125, 132, 133, 174, 175

Fotónico ..... 132

Lectura ..... 14, 124, 125, 132, 133, 138

Parpadeo.....37, 132

Poisson..... 143

Reseteo ..... 132

---

## S

**Seccionamiento** .....79, 295

Físico..... 38, 78, 254

Optico ..... 38, 78, 79, 286

**Segmentación**.....20, 35, 52, 146, 147, 187, 268, 269, 270, 271, 272, 278, 279, 280, 281, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 333, 334, 342, 344, 345

### Sistema

CMYK ..... 17, 18, 21

HSI ....18, 19, 20, 21, 155, 172, 180, 181, 195, 196, 232, 242, 243, 260, 272, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285

L\*a\*b\* .....20, 21

Peltier ..... 132

**Stitching** .....33, 153

---

---

## T

**Tabla de conversión (LUT)** ... 146, 206, 207, 225, 226, 227, 228, 230, 237, 249, 251, 253, 267  
**Tabla de verdad** ..... 246, 247  
**Teselación** ..... 254  
**Textura** ..... 11, 12, 195, 268, 270, 276, 283, 285  
**Tinción** .... 15, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 52, 57, 106, 148, 157, 197, 221, 280, 281, 282, 283, 287, 293, 311, 334, 337, 350  
**Transformada** ..... 26, 174, 199, 208  
  FFT ..... 32, 146, 160, 161, 201, 202, 203, 205, 207  
  Fourier ..... 155, 162, 174, 198, 199, 201, 208, 213, 216, 318  
  Hough ..... 318, 319, 320, 321, 322, 343, 344  
  Wavelet ..... 27, 29, 208, 209, 210, 211, 212

---

## U

**Umbral** .... 29, 175, 179, 185, 186, 189, 190, 192, 220, 227, 268, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 286  
**Umbralización** ..... 156, 158, 175, 188, 193, 227, 250, 251, 268, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 286, 310, 316, 333, 343, 344, 345, 356, 357  
  Adaptación local ..... 272, 277  
  Análisis de clusters ..... 272  
  Bordes coincidentes ..... 276, 277  
  Entropía ..... 272, 274, 275, 276, 277, 286  
  Entropía difusa ..... 275  
  Espacial ..... 272, 276

Máxima entropía ..... 275, 277, 286  
Método de las concavidades ..... 272, 277  
Método de Otsu ..... 272  
Método iterativo ..... 188, 272, 274  
Mínimos errores ..... 274  
Por diferencia de masas ..... 274  
Preservación de los momentos ..... 276  
Similitud difusa ..... 276, 277

---

## V

**Varianza** ..... 182, 183, 273, 277, 284, 285, 305  
**Vectorial** ..... 12  
**Vista** .... 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 30, 33, 36, 37, 45, 49, 50, 55, 57, 58, 59, 61, 65, 75, 79, 83, 85, 93, 95, 100, 102, 113, 116, 117, 127, 129, 131, 139, 154, 158, 168, 193, 211, 213, 217, 229, 230, 254, 261, 266, 269, 283, 284, 293, 294, 304, 311, 336, 341, 343, 350, 351, 356, 357  
**Vóxel** ..... 31, 32, 105, 216, 336

---

## W

**Warping** ..... 252

---

## Z

**Zoom** . 26, 78, 110, 111, 126, 142, 143, 144, 150, 153, 254, 255, 256