

APLICACIÓN ANDROID PARA EL PROCESAMIENTO DE IMÁGENES HISTOLÓGICAS Y SOPORTE PARA EL ACOPLAMIENTO DE UN SMARTPHONE A UN MICROSCOPIO

Informe de Proyecto Integrador



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - Córdoba - Argentina

Responsables:

Acuña, Lucas Nahuel
Carrera: Ing. Biomédica

Farias Falkiewicz, Matias Mirko
Carrera: Ing. Biomédica

Asesoras:

Dra. Rulloni, Valeria S.

Dra. Yasse, Elisa

AÑO 2018

Agradecimientos

En primer lugar quisiéramos agradecer al Hospital Municipal de Urgencias de la Ciudad de Córdoba por darnos el espacio para mediciones y ensayos con los microscopios del área de anatomía patológica y el laboratorio de análisis clínicos. En segundo lugar agradecer a nuestra tutora, la Dra. Valeria Rulloni y nuestra co-asesora, la Dra. Elisa Yasse, por su constante apoyo, compañía, predisposición, y por sobre todo su buen humor durante los meses en los que se llevó a cabo el desarrollo de este proyecto.

También agradecemos a todos los profesores y ayudantes que, durante todos estos años de cursado, contribuyeron a nuestra formación académica, solventando dudas, atendiendo consultas y transmitiendo sus conocimientos y experiencias profesionales.

Por último agradecemos a nuestros familiares y amigos por su constante apoyo, no solo durante el desarrollo de este proyecto, sino también a lo largo del cursado de la carrera. Nada de esto hubiera sido posible sin ellos.

Resumen

Normalmente para adquirir una imagen histológica, es necesario contar con un microscopio trinocular, donde dos de los oculares son empleados por el profesional para observar la muestra de tejido con la que está trabajando y el tercer ocular es para el acoplamiento de una cámara especial construida para este propósito. Una vez adquirida esta imagen, es transferida a una computadora para su eventual edición, procesado o medición de ciertos parámetros de interés patológicos con uno o más softwares.

Si bien lo explicado anteriormente cumple perfectamente los requerimientos médicos para trabajar con este tipo de imágenes, en Argentina y especialmente en la Ciudad de Córdoba, los hospitales públicos carecen del presupuesto necesario para la compra de microscopios trinoculares y del software necesario para tal fin. En estos establecimientos se cuenta mayormente con microscopios binoculares, que tienen un precio inferior a los trinoculares, pero no están preparados para el acople de una cámara. Además, esta cámara tendría que comprarse por separado a un alto costo. Es por ello que el personal de patología intenta adquirir estas imágenes usando la cámara de su propio smartphone, lo cual es muy complicado sin un soporte que limite los movimientos involuntarios de la mano para sostener el teléfono a una cierta distancia del ocular y con un paralelismo entre las superficies externas de la cámara y el ocular con el fin de lograr "hacer foco" en la imagen proyectada. Por otra parte los softwares utilizados por el personal, generalmente son programas de photoshop gratuitos de propósitos generales, por lo que los procesamientos de imágenes son muy básicos y disminuyen la calidad de la foto.

Con respecto a la medición de las estructuras histológicas, en general los métodos empleados por los patólogos, de estos establecimientos públicos, son muy rudimentarios y aumentan la probabilidad de un error en el diagnóstico.

Es por lo expuesto anteriormente que surge el presente proyecto para solventar estas dificultades, y podemos dividirlo en dos partes:

1. Desarrollo de aplicación android (app) para la captura, procesado, edición y medición de ciertos parámetros de interés en imágenes histológicas.
2. Diseño, construcción y ensayo de un soporte universal para el acoplamiento de un smartphone a un microscopio.

La primera parte del proyecto fue concebida para poder adquirir la imagen con el propio smartphone, y una vez obtenida, aplicar las funciones que el profesional de la salud desee, todo esto integrado en una aplicación, lo cual es beneficioso porque las mismas se encuentran en un mismo lugar sin necesidad de recurrir a otras aplicaciones o programas de computadora. Además la app no disminuye la calidad de imagen en contraste con las otras apps que se encuentran en la tienda de Google. Otra facilidad de almacenar estas imágenes en un smartphone es la posibilidad que tiene el usuario de

compartirlas rápidamente a otros dispositivos. En consecuencia el patólogo podrá pedir opiniones profesionales a otros colegas, o realizar análisis más profundos o complementarios y de esta manera facilitar el diagnóstico médico.

Cabe destacar que la aplicación no intenta sustituir el "ojo clínico" del médico, solo ofrece herramientas de ayuda para resaltar los parámetros deseados.

El desarrollo de esta aplicación se ha hecho con el entorno de desarrollo integrado (IDE) Android Studio, que es el programa oficial recomendado por Google para la creación de aplicaciones android.

La segunda parte del proyecto trata del soporte universal, que justamente intenta solventar el inconveniente mencionado anteriormente para la adquisición de la fotografía. El diseño propuesto es sólo un prototipo, por lo que algunas de sus partes son impresiones 3D y otras son perfiles de aluminio.

Si bien existen en el mercado otros soportes para el acoplamiento de smartphones a los oculares de microscopios y telescopios, estos tienen ciertas limitaciones con respecto a nuestro diseño, porque no en todos los casos son universales y además ninguno ofrece tres grados de libertad (movimiento en los ejes x , y , z) para el posicionamiento de la cámara del teléfono. En contraste con estos soportes, en este proyecto se ha contemplado que el prototipo cuente con los tres grados de libertad, ya que existe una enorme variabilidad de smartphones no solo en tamaño sino también en cuanto al tipo de cámara incorporada y la ubicación de ésta, las cuales no siempre "hacen foco" a la misma distancia. Es por ello que el prototipo tiene movimientos "finos" provistos por tornillos, lo cual permite posicionar el teléfono perfectamente para una fotografía idónea.

El diseño se realizó con el software SolidWorks.

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Histología	5
3.1.1 Preparación y estudio de tejidos	5
3.1.2 Técnica histológica	5
3.1.2.1 Toma de la muestra	6
3.1.2.2 Fijación	8
3.1.2.3 Lavado	9
3.1.2.4 Deshidratación	9
3.1.2.5 Diafanización o aclaramiento	9
3.1.2.6 Inclusión	9
3.1.2.7 Microtomía (obtención de los cortes)	10
3.1.2.8 Coloración o tinción	11
3.1.2.8.1 Técnicas de inmunohistoquímica	12
Proteína Ki-67 (También conocida como MKI67)	12
3.1.2.9 Montaje	13
3.2 Microscopía óptica	14
3.2.1 Conceptos básicos de óptica	14
3.2.2 Naturaleza de la luz	14
3.2.3 Óptica geométrica	15
3.2.3.1 Ley de la propagación rectilínea de la luz	15
3.2.3.2 Ley de independencia de los rayos luminosos	15
3.2.3.3 Ley de la reflexión y la refracción	15
3.2.3.3.1 Reflexión	16
3.2.3.3.2 Refracción	17
3.2.3.4 Ley de la reversibilidad o reciprocidad	18
3.2.3.5 Absorción nula de energía	19
3.2.3.6 Términos empleados en óptica geométrica	19
3.2.3.6.1 Objeto	19
3.2.3.6.2 Espejos	20
3.2.3.6.3 Lentes	20
3.2.3.6.4 Sistema óptico	21
3.2.3.6.5 Imagen	21
3.2.3.6.6 Eje óptico	22
3.2.3.7 Óptica por reflexión y óptica por refracción	22
3.2.3.7.1 Óptica por reflexión	22
Imágenes en los espejos planos	22
Elementos de los espejos esféricos	22
Imágenes en espejos esféricos	23
3.2.3.7.2 Óptica por refracción	25
Elementos de una lente	25
Imágenes producidas por las lentes	25
3.2.4 Imagen. Sistemas ópticos	27
3.2.4.1 Aumento y resolución	29
3.2.4.1.1 Aumento	29
3.2.4.1.2 Resolución	30

3.2.4.2 Factores que limitan la resolución de un sistema de formación de imágenes.	30
3.2.4.2.1 Difracción	30
3.2.4.2.2 Aberraciones ópticas	33
3.2.5 Microscopio óptico	35
3.2.5.1 Sistema mecánico del microscopio	36
3.2.5.1.1 Pie o base	36
3.2.5.1.2 Mecanismo de enfoque	36
3.2.5.1.3 La platina	37
3.2.5.1.4 El revólver	37
3.2.5.1.5 El tubo	37
3.2.5.2 Sistema óptico del microscopio	37
3.2.5.2.1 Los objetivos	37
Poder de resolución del objetivo	38
Clasificación de los objetivos	38
Óptica finita y óptica infinita	40
Estructura de los objetivos	41
Nomenclatura de los objetivos	41
3.2.5.2.2 El ocular	43
Clasificación de los oculares	44
Campo del microscopio	45
3.2.5.3 Sistema de iluminación del microscopio	47
3.2.5.3.1 Condensador	47
3.2.5.3.2 Diafragma o iris	49
3.2.5.4 Accesorios del microscopio	50
3.2.5.5 Formación de la imagen en el microscopio	50
3.2.5.6 Limitación en la resolución del microscopio óptico	51
3.3 Procesamiento de imágenes	54
3.3.1 Imagen	54
3.3.1.1 Imagen digital	54
3.3.2 Pasos fundamentales del procesamiento digital de imágenes	55
3.3.3 Conceptos de imágenes digitales	56
3.3.3.2 Cambios en el tamaño de una imagen digital	58
3.3.3.3 Algunas relaciones básicas entre píxeles	58
3.3.3.3.1 Vecinos de un píxel	58
3.3.3.3.2 Conectividad, Regiones y fronteras	59
Conectividad	59
Caminos, componentes conexas, conjuntos conectados, regiones	60
Distancia entre píxeles	60
Operaciones entre píxeles	61
3.3.4 Mejora de la imagen	61
3.3.4.1 Métodos de mejora en el dominio espacial	61
3.3.4.1.1 Transformaciones de intensidad o de niveles de gris	62
Procesamiento de punto	62
Modificación del histograma	67
3.3.4.1.2 Filtrado espacial	70
Filtros suavizantes	70
Filtros realzantes	71
Otros filtros espaciales	72

3.3.4.2 Métodos de mejora en el dominio de la frecuencia _____	74
3.3.4.2.1 Filtrado Pasa bajo _____	75
Filtro Ideal Pasa bajo Bidimensional _____	75
Filtro Butterworth Pasa bajo _____	76
3.3.4.2.2 Filtrado Pasa alto _____	76
Filtro Ideal Pasa alto Bidimensional _____	76
Filtro Butterworth Pasa alto _____	77
3.3.5 Procesamiento del color _____	78
3.3.5.1 Fundamentos del color _____	78
3.3.5.2 Los conos, los colores primarios y los colores secundarios _____	78
3.3.5.3 Tono, brillo y saturación _____	80
3.3.5.4 Modelos de color _____	81
3.3.5.4.1 Modelo RGB _____	81
3.3.5.4.2 Modelo HSI _____	82
Conversión de RGB a HSI _____	83
Conversión de HSI a RGB _____	84
3.3.5.5 Transformaciones de color _____	85
3.3.5.5.1 Complementos de color _____	85
3.3.5.5.2 Fraccionamiento del color _____	86
3.3.5.5.3 Correcciones de color y tono _____	87
3.3.5.5.4 Procesamiento del histograma _____	88
3.3.5.6 Suavizado y realce _____	89
3.3.5.6.1 Suavizado de imágenes a color _____	90
3.3.5.6.2 Realzado de imágenes a color _____	90
3.3.5.7 Segmentación de imágenes a color _____	91
3.3.5.7.1 Segmentación en HSI _____	92
3.3.5.7.2 Segmentación en el espacio vectorial RGB _____	92
Segmentación basada en agrupamiento (clustering) _____	95
3.4 Plataforma Android _____	98
3.4.1 Arquitectura de Android _____	100
3.4.1.1 Núcleo Linux _____	100
3.4.1.2 Runtime de Android _____	100
3.4.1.3 Librerías nativas _____	101
3.4.1.4 Entorno de aplicación _____	102
3.4.1.5 Aplicaciones _____	102
3.4.2 Versiones del sistema operativo Android _____	102
3.4.3 Componentes de una aplicación Android _____	103
3.4.3.1 <i>Vistas (Views)</i> _____	103
3.4.3.2 Layouts _____	104
3.4.3.3 Actividad (Activity) _____	104
3.4.3.4 Servicio (Service) _____	104
3.4.3.5 Intención (Intent) _____	104
3.4.3.6 Fragment _____	105
3.4.3.7 Receptor de anuncios (Broadcast Receiver) _____	105
3.4.3.8 Proveedores de Contenido (Content Provider) _____	105
3.4.4 Entorno de desarrollo _____	105
3.4.4.1 Android Studio _____	106
3.4.5 OpenCV _____	106
3.5 SolidWorks _____	108

3.5.1 Características de SolidWorks	108
3.5.1.1 Definición de parámetros clave	108
3.5.1.2 Asociatividad	108
3.5.1.3 Funciones geométricas inteligentes	109
3.5.1.4 Gestor de diseño	110
3.5.2 Módulos de SolidWorks	111
3.5.2.1 Pieza	111
3.5.2.2 Ensamblaje	112
3.5.2.3 Plano o Dibujo	112
3.5.2.4 Otras aplicaciones de SolidWorks	113
3.6 R (Software de Probabilidad y estadística)	114
3.6.1 Características de R	114
3.6.2 Extensiones y paquetes	115
3.7 Matlab	116
3.7.1 Características	116
3.7.1.1 Lenguaje	116
3.7.1.2 Toolboxes	116
3.7.1.3 Simulink	117
3.7.1.4 Interfaz con otros lenguajes de programación	117
4. DESARROLLO	119
4.1 Soporte universal	119
4.1.1 Paso 1: Relevamiento de microscopios ópticos	119
4.1.2 Paso 2: Relevamiento de smartphones en el mercado	119
4.1.3 Paso 3: Diseño del soporte en SolidWorks	120
4.1.3.1 Prototipo final	121
4.1.4 Paso 4: Fabricación del soporte	122
4.1.5 Paso 5: Prueba de desempeño del soporte	124
4.2 Aplicación Android	125
4.2.1 Cargar imagen a la aplicación	126
4.2.2 Recorte de la imagen	127
4.2.2.1 Recorte automático	127
4.2.2.2 Recorte manual	129
4.2.3 Rotación de la imagen	130
4.2.4 Edición de la imagen	131
4.2.5 Procesamiento de la imagen	133
4.2.5.1 Escala de grises	134
4.2.5.2 Binarizar	136
4.2.5.3 Invertir colores (negativo de la imagen)	137
4.2.5.4 Saturación	138
4.2.5.5 Brillo	140
4.2.5.6 Contraste	141
4.2.5.7 Nitidez	142
4.2.5.8 Temperatura de color	145
4.2.5.9 Ecuilización	148
<i>Función extra: Guardar el orden y los valores de procesado que se aplican a una imagen</i>	149
4.2.6 Recuento Ki-67	150

4.2.6.1 Recuento manual _____	151
4.2.6.2 Recuento semiautomático _____	151
4.2.7 Validación del recuento semiautomático por Ki-67 _____	156
4.2.7.1 Etapa 1 _____	156
4.2.7.2 Etapa 2 _____	160
4.2.8 Medición de longitudes en la imagen _____	162
4.2.8.1 Calibración _____	162
4.2.8.2 Medición _____	167
4.2.8.2.1 Determinación del error en la medición con la aplicación en imágenes recortadas automáticamente _____	168
4.2.9 Compartir imagen y almacenamiento _____	170
5. PRESUPUESTO _____	173
6. CONCLUSIÓN _____	175
7. APLICACIONES Y MEJORAS _____	179
Aplicaciones _____	179
Mejoras _____	179
8. ANEXOS _____	181
Anexo A: Creación de un nuevo proyecto en Android Studio _____	181
Interfaz de trabajo de Android Studio _____	185
Anexo B: Relevamiento de microscopios ópticos _____	189
Anexo C: Relevamiento de Smartphones en el mercado _____	191
Samsung Galaxy J1 mini _____	191
Xiaomi Mi Max 2 _____	192
Anexo D: Determinación del error en una medición _____	193
Error absoluto _____	194
Error relativo _____	195
Anexo E: Tablas de datos y cálculo para el contraste de diferencias de medias de poblaciones apareadas. _____	197
Histograma de las diferencias entre el recuento manual y el recuento semiautomático por superficie _____	197
Histograma de las diferencias entre el recuento manual y el recuento semiautomático por conteo _____	197
Tabla de datos _____	198
Tabla de cálculo _____	199
Cálculo de parámetros para ambos métodos semiautomáticos _____	199
Anexo F: Cálculo estadístico para la demostración de la similitud en tamaño de los núcleos positivos y los negativos. _____	201
Anexo G: Planos de diseño del soporte universal _____	203
9. BIBLIOGRAFÍA _____	233

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el hombre ha buscado solucionar problemáticas que afectan a la sociedad o a los miembros de la misma. Una de estas cuestiones fue la ciencia médica que trata de prevenir, diagnosticar y tratar patologías de diversa índole. Es por ello que a medida que fue avanzando el tiempo esta ciencia fue creciendo enormemente y apareciendo en ella nuevas especialidades.

Una tarea fundamental en el trabajo cotidiano de un médico es el correcto diagnóstico de una patología en particular, ya que con el mismo el profesional podrá determinar el tratamiento adecuado (en caso de ser necesario) para restablecer la salud del paciente. Antes el diagnóstico sólo se trataba de la observación de los signos y síntomas del paciente, y en base a los conocimientos anatómicos, fisiológicos y patológicos que el médico (o grupo de médicos) poseía, podía determinar la enfermedad. Si bien en muchos casos el diagnóstico era acertado, en algunos otros no. Es por ello que a medida que fue avanzando la ciencia y la tecnología, fueron apareciendo nuevos métodos de diagnóstico, y el avance se fue tornando multidisciplinario, es decir que empezaron a intervenir distintas profesiones como ingenieros, biólogos, químicos, etc.

Un gran avance ocurrió con la aparición de la microscopía óptica, la cual permite observar pequeñas estructuras que a simple vista no se pueden ver. Esto se logra por medio de la luz visible, que permite proyectar una imagen magnificada entre el observador y la muestra a través de lentes de distinto aumento.

Gracias a este avance no solo se pudo comprender cómo estaban conformados los distintos tipos de tejidos corporales, sino que también se pudo estudiar cómo se encontraban afectados en consecuencia a una determinada enfermedad. Es por ello que surge una nueva área del conocimiento médico denominada anatomía patológica, que justamente estudia las alteraciones que sufren los órganos o tejidos por diversas etiologías, y que en muchos casos es necesario de la microscopía óptica para determinar dicha alteración. Para ello fue necesario definir cómo tomar muestras de tejidos corporales y que tratamiento previo dar (en caso de ser necesario) a estos tejidos para poder ser observados en el microscopio.

En la actualidad, esta área es tan vital en el diagnóstico médico, que es necesario la adquisición de la microfotografía, no solo para nuevos estudios médicos, sino también para la elaboración de un informe patológico o guardarlos en una base de datos. Otra ventaja de tener una imagen magnificada es que permite procesarla digitalmente para realzar ciertos parámetros y minimizar otros, lo cual ayuda bastante a la hora de estudiarla.

Es en ésta última parte en la que se enfocará el presente trabajo, proponiendo una nueva metodología de adquisición y tratamiento digital de

la imagen. Previamente a esta propuesta los pasos a seguir para la obtención de la imagen era la utilización de un microscopio trinocular (tres oculares) en donde en uno de ellos va montada una cámara que permite tomar la foto. Obtenida la imagen, se procede a transferirla a una computadora para tratarla digitalmente con uno o más programas de escritorio.

La alternativa que se propone a lo mencionado anteriormente es la utilización de una tecnología que se encuentra ampliamente difundida a nivel mundial, los smartphones, que a día de hoy son como pequeñas computadoras con una enorme capacidad de procesamiento de datos, y que tienen numerosas funciones incorporadas, como manejo de cámaras, sensores de diversos tipos, utilización de internet, distintos tipos de aplicaciones, etc. y se encuentran en el bolsillo de gran parte de la población, lo cual los convierte en elementos muy potentes no solo para el entretenimiento y la comunicación sino también para la utilización de diversas aplicaciones que permiten solventar inconvenientes cotidianos, y por qué no profesionales. En esta temática, Android abarca una enorme variabilidad de aplicaciones y Google da muchas facilidades a los desarrolladores, como ser que el entorno de trabajo para el desarrollo de las mismas (Android Studio) es totalmente gratuito, además de una enorme documentación brindada por esta empresa, lo cual convierte a esta tecnología en una "mina de oro" para el desarrollo de nuevos tipos de apps. Bajo estos antecedentes, este proyecto propone usar esta tecnología para sustituir las cámaras digitales de los microscopios trinoculares por la cámara del smartphone, y reemplazar los programas de computadora por una sola aplicación android que capture, edite, procese y permita medir ciertos parámetros histológicos. Se añade además la posibilidad de compartir la imagen a otros usuarios, lo cual permite a los profesionales de la salud, en caso de ser necesario, pedir una segunda opinión profesional a la hora de visualizar o analizar una imagen histológica y determinar con mayor precisión el diagnóstico, todo esto de una manera muy rápida sin importar la distancia entre los usuarios.

Se propone también un nuevo prototipo de soporte universal para la adquisición de la imagen, de una manera rápida y eficaz, y se diferencia de los soportes comerciales en que tiene 3 grados de libertad de movimiento, lo que permite adaptar las diferentes tecnologías de smartphones al microscopio de manera satisfactoria.

El trabajo aquí presentado abarca gran parte de los conocimientos adquiridos durante la carrera de Ingeniería Biomédica de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y de la Facultad de ciencias Médicas, ambas de la Universidad Nacional de Córdoba. Se usaron para solventar diversos problemas de un área específica, que justamente es la labor del ingeniero.

2. OBJETIVOS

El trabajo propone desarrollar una aplicación android para la captura, edición, procesamiento y mediciones sencillas en la imagen histológica. Además del diseño, construcción y ensayo de un soporte universal que permita el ajuste de la gran mayoría de smartphones existentes en el mercado, para el acoplamiento con un microscopio y posteriormente la captura de la microfotografía.

Objetivos principales:

- ❖ En cuanto a la aplicación android:
 - Permitir el acceso a la cámara del dispositivo desde la aplicación desarrollada.
 - Facilitar la edición de la imagen tomada, entendiendo por esto a:
 - Recortar la imagen automática o manualmente
 - Delimitación de zonas de interés mediante trazos de distintos colores
 - Inserción de flechas de distintos colores para indicar estructuras tanto normales como anormales
 - Rotación de la imagen
 - Incorporación de texto a la imagen
 - Almacenamiento con los cambios realizados en la imagen
 - Permitir, de manera intuitiva y amigable, el procesamiento de la fotografía, entendiendo por esto a la aplicación de distintos algoritmos para poder:
 - Aumentar o disminuir el contraste
 - Aumentar o disminuir el brillo
 - Modificar la temperatura del color para obtener imágenes calidas o frias
 - Cambiar la imagen a escala de grises
 - Obtener el negativo de la imagen
 - Aumentar o disminuir la saturación
 - Aumentar la nitidez
 - Ecuilización de la imagen
 - Recuento manual y semiautomático de los núcleos anaplásicos en una imagen histológica cuya tinción se logró con la técnica Ki-67.
 - Permitir la realización de mediciones para:
 - Determinar las dimensiones de una estructura
 - Posibilidad de compartir la imagen a otros smartphones.
- ❖ En cuanto al soporte:

- Permitir una sujeción idónea del smartphone al ocular del microscopio.
- Que el soporte se pueda ajustar a la gran mayoría de los modelos de microscopios ópticos que existen en el mercado.
- Que el soporte se pueda ajustar a la gran mayoría de los smartphones que se comercializan.
- Permitir el movimiento del smartphone, una vez sujeto al soporte, en el espacio (x,y,z) , para poder ajustar las distancias en los tres ejes de la cámara al ocular.
- Mantener la configuración del soporte, una vez encontrada la posición para la toma de la imagen.

Objetivos secundarios:

- ❖ En cuanto a la aplicación android:
 - Demostrar que determinados algoritmos para el procesamiento de imágenes histológicas pueden ayudar a la diagnosis médica.
 - Si bien el procesamiento de imágenes no pretende sustituir el ojo clínico del médico, la aplicación intenta determinar ciertos parámetros objetivos en una imagen, eliminando las interpretaciones subjetivas por parte del profesional.
 - Incentivar a los profesionales de la salud para la utilización de nuevos algoritmos de procesado para el diagnóstico.
 - Disminuir el tiempo de trabajo del patólogo ya que al estar todo integrado en el teléfono se evita el uso de otros programas de computadora para modificar la imagen en caso de ser necesario.
 - Adentrarnos al desarrollo de aplicaciones Android, para proponer nuevas alternativas a la solución de determinadas dificultades en la labor médica.
 - Aportar una herramienta que facilite la enseñanza de la anatomopatología y otras disciplinas relacionadas con el uso del microscopio.
- ❖ En cuanto al soporte:
 - Adquirir conocimientos en el diseño 3D para proponer soluciones a determinados inconvenientes que se presentan en el ámbito hospitalario.
 - Mejora continua del soporte, y plantear nuevos diseños más sencillos y económicos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Histología

La palabra histología se refiere al estudio de los tejidos corporales, y más concretamente se refiere al análisis microscópico de los mismos.

Se forman tejidos cuando las células generalmente de distinto tipo (especialización) se agrupan para llevar a cabo determinadas funciones. Además de las células el tejido se compone de una matriz extracelular producida por las propias células, en la que se encuentran inmersas para conformar una organización estructural característica.

En la actualidad se definen 4 tipos de tejidos fundamentales:

- Tejido epitelial
- Tejido conectivo
- Tejido muscular
- Tejido nervioso

Cada uno de los tejidos fundamentales presenta gran cantidad de subtipos derivados, por ejemplo, la sangre y los tejidos linfoides son un subtipo de tejido conectivo ⁽¹⁾.

3.1.1 Preparación y estudio de tejidos

El estudio de células y tejidos vivos sólo puede efectuarse en forma limitada. Es difícil diferenciar los distintos componentes entre sí con la microscopía óptica dado que tienen igual grado de refracción de la luz. Además por lo general el tejido presenta un espesor tal que la penetración de la luz y el poder de resolución son insuficientes. Es por ello que se utiliza secciones delgadas del tejido que se mantienen con procesos químicos, como el formol al 10 %. Para lograr lo anteriormente expuesto se deben de seguir una serie de pasos que conforman la denominada técnica histológica ⁽²⁾.

3.1.2 Técnica histológica

Se denomina técnica histológica al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través del microscopio ⁽²⁾.

De manera general, para poder alcanzar este objetivo es necesario realizar los siguientes pasos ⁽²⁾:

1. Toma de la muestra
2. Fijación

3. Lavado
4. Deshidratación
5. Diafanización o aclaramiento
6. Inclusión
7. Microtomía
8. Coloración o tinción
9. Montaje

3.1.2.1 Toma de la muestra

La calidad y la fidelidad con la que una célula o tejido muestren las características morfológicas que poseían cuando estaban con vida, dependerá del cuidado y la técnica empleada para la obtención de la muestra ⁽²⁾.

Existen dos formas de obtener una muestra de tejido:

- Mediante una biopsia
- Mediante la necropsia

A continuación se detalla cada una de las formas.

a. Mediante la biopsia: Consiste en la toma de un fragmento de un tejido vivo por medio de alguna de las técnicas que se describen a continuación:

- i. *Biopsia incisional*: Es la biopsia en la que se corta o extirpa quirúrgicamente un trozo de tejido, masa o tumor ⁽²⁾ ⁽³⁾.

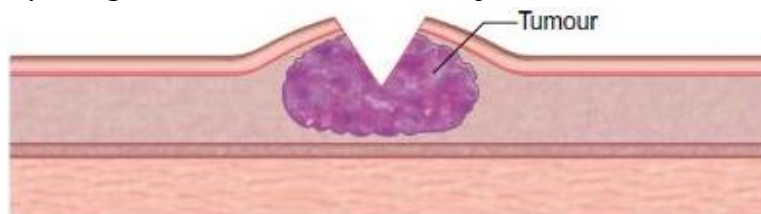


Fig. 3.1.1 Biopsia incisional ⁽³⁾.

- ii. *Biopsia excisional*: Es la biopsia en la que se extirpa completamente un órgano o tumor, generalmente sin márgenes ⁽²⁾ ⁽³⁾.

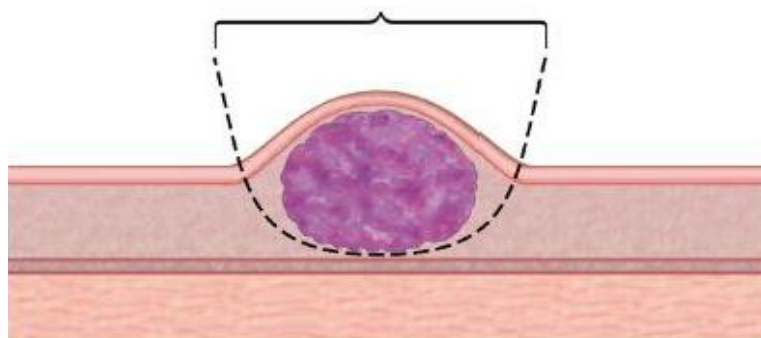


Fig. 3.1.2 Biopsia excisional ⁽³⁾.

- iii. *Biopsia por sacabocados*: Es la biopsia que se realiza en tejidos superficiales, como por ejemplo la piel, que por medio de una cuchilla cilíndrica hueca, se obtiene un cilindro de tejido de 2 a 4 mm ⁽²⁾ ⁽⁴⁾.

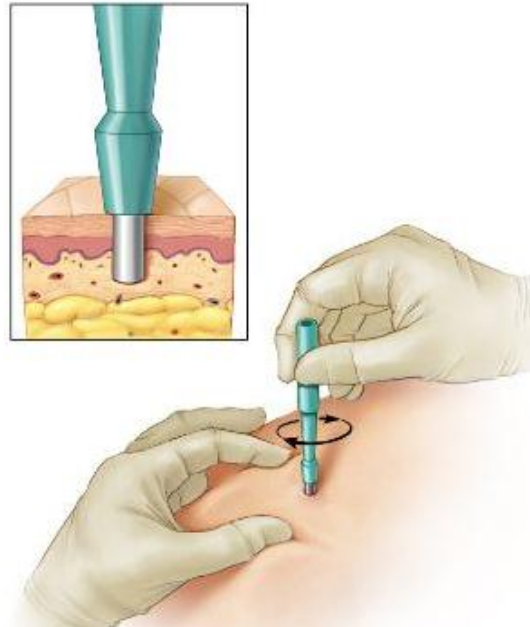


Fig. 3.1.3 Biopsia por sacabocados ⁽⁴⁾.

- iv. *Biopsia por punción*: Es la biopsia que se realiza mediante una aguja especial con la cual se obtienen las muestras. Se realiza con pistolas automáticas, y una vez que la aguja guiada por palpación o por imagen, se posiciona en el lugar deseado, se presiona el disparador que realiza una succión del tejido a evaluar ⁽²⁾ ⁽⁵⁾.

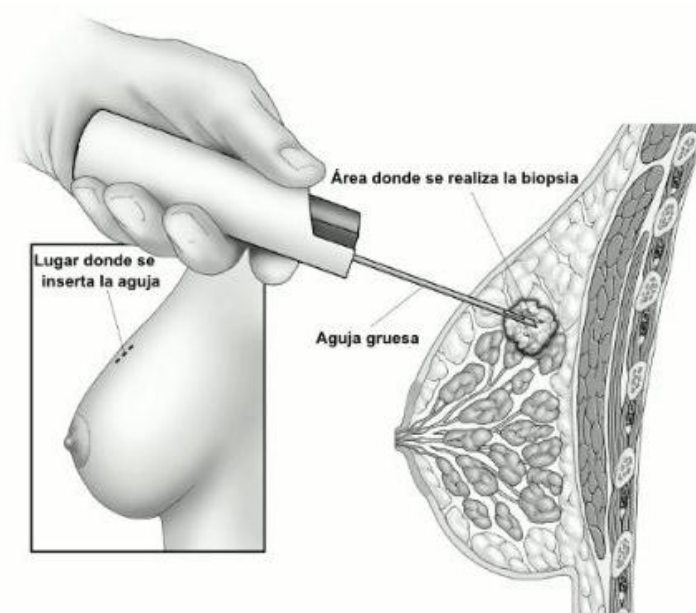


Fig. 3.1.4 Biopsia por punción ⁽⁵⁾.

- v. *Biopsia por raspado*: Es la biopsia correspondiente al raspado de un tejido para obtener capas superficiales ⁽²⁾ ⁽⁶⁾.

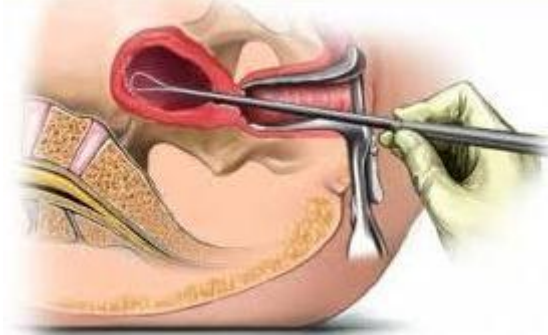


Fig. 3.1.5 Biopsia por raspado ⁽⁶⁾.

- vi. *Biopsia endoscópica*: Es la biopsia que consiste en la utilización de un endoscopio que se inserta por un orificio natural o por una pequeña incisión quirúrgica, para observar órganos huecos o cavidades corporales. El endoscopio tiene pequeñas pinzas que permiten la extirpación de tejido ⁽²⁾ ⁽⁷⁾.

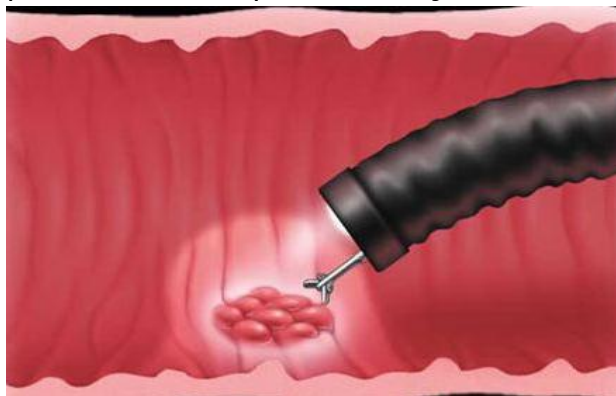


Fig. 3.1.6 Biopsia endoscópica ⁽⁷⁾.

- b. Mediante la necropsia: Las muestras se obtienen de seres muertos. En este caso es recomendable que los tejidos y órganos se obtengan inmediatamente después de producida la muerte ⁽²⁾.

3.1.2.2 Fijación

Es un procedimiento cuya finalidad es detener la vida de las células e impedir las modificaciones post mortem que puedan sufrir la célula (procesos autolíticos), manteniendo su estructura morfológica. Esto se consigue inmovilizando las enzimas, lo cual se puede lograr con agentes químicos fijadores que pueden ser de dos tipos:

- *Oxidantes*: ácido ósmico, ácido pícrico, ácido acético, ácido crómico, etc.
- *Reductores*: formaldehído, glutaraldehído, alcohol etílico, alcohol metílico.

Normalmente se utilizan mezclas fijadoras que acrecientan el efecto de fijación. El tiempo necesario para lograr este efecto varía dependiendo del tipo y tamaño de la muestra. Además según las características de la misma dependerá el tipo de fijador ⁽²⁾.

3.1.2.3 Lavado

Al concluir la fijación, el mismo debe ser eliminado de las muestras. Para tal fin se procede al lavado de los tejidos mediante agua destilada o alcohol. Se evita así que los tejidos se endurezcan demasiado o que ciertos componentes introduzcan modificaciones en ellos e impidan un adecuado procesamiento técnico ⁽²⁾.

3.1.2.4 Deshidratación

Se debe extraer o remover el agua de los tejidos fijados, porque de lo contrario la etapa de inclusión no será satisfactoria. Para lograrlo es necesario sumergir la muestra lavada, en sucesivos baños de alcohol etílico con concentraciones crecientes ⁽²⁾.

3.1.2.5 Diafanización o aclaramiento

En este paso se debe sustituir el alcohol del paso anterior por un disolvente de parafina. La sustancia más utilizada para este paso es el xilol, y como la muestra se encuentra deshidratada, el mismo penetrará correctamente. Finalizado este paso el tejido pierde color y adquiere un tono acaramelado ⁽²⁾.

3.1.2.6 Inclusión

Realizados los pasos anteriores, la muestra adquiere cierta consistencia y dureza, pero no la suficiente para obtener secciones delgadas. Estas son del orden de algunas milésimas de milímetro (4 a 10 μm), y para lograr estos cortes es necesario conferir a la muestra una dureza óptima. Esto se logra colocándola en las denominadas "sustancias de inclusión", donde la más utilizada es la parafina. Las mismas tienen la propiedad de infiltrarse en el interior de las células y tejidos, con la finalidad de servirles como soporte. De esta manera se logra formar un bloque homogéneo en dureza y consistencia para lograr los cortes idóneos.

El proceso de inclusión se realiza fundiendo un bloque de parafina en un recipiente dentro de una estufa, al que posteriormente se agrega la muestra perfectamente orientada para facilitar la obtención de las secciones o cortes ⁽²⁾.

3.1.2.7 Microtomía (obtención de los cortes)

En esta etapa, la muestra y la parafina integran un solo bloque que posee la dureza y consistencia suficiente para obtener secciones delgadas y transparentes.

Estos cortes se realizan con un instrumento mecánico que realiza los cortes con un espesor uniforme (4 a 10 μm), y se lo conoce como micrótopo ⁽²⁾.



Fig. 3.1.7 Micrótopo ⁽⁸⁾.

A medida que se van obteniendo los cortes, se van depositando en un baño termoregulado, para luego ser recogidas con un portaobjetos. Este "estiramiento" se logra por la dilatación de la parafina producto del calor.

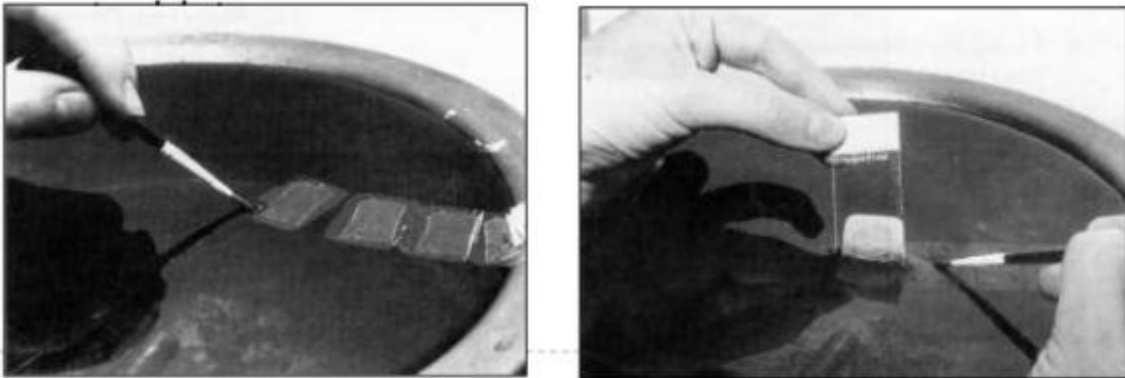


Fig. 3.1.8 Estiramiento de los cortes ⁽⁹⁾.

3.1.2.8 Coloración o tinción

Las estructuras tisulares y celulares no tienen una coloración, por lo que distinguir una estructura de otra no es fácil, esto se debe a que en la etapa de aclaramiento las estructuras tienden a igualar los índices de refracción.

Para solventar este inconveniente y delimitar las estructuras se hace necesario el uso de determinados colorantes, tanto naturales como artificiales. El tipo de colorante a usar dependerá de qué estructuras se deseen visualizar, debido a que cada estructura tiene una "química propia" que reaccionará de una manera específica a ciertos tipos de colorantes.

Para poder llevar a cabo este paso es necesario eliminar la parafina de los cortes, sumergiendo los portaobjetos en un solvente que puede ser xilol. Luego los cortes deben ser hidratados pasando por una serie decreciente de graduaciones de alcohol, hasta llegar a una solución que sea 100% agua. Una vez hidratados, los cortes pueden ser teñidos.

Algunos de los colorantes más comúnmente usados son:

- Hematoxilina - Eosina
- Tricrómico de Masson
- Ziehl - Neelsen
- Azul de toluidina
- Rojo congo, etc.

La tinción más usada es la de Hematoxilina - Eosina. La hematoxilina es un colorante básico que tiene afinidad por estructuras ácidas, como el núcleo celular que contiene ácido desoxirribonucleico (ADN), y la eosina que es una sustancia ácida tiñe componentes básicos como el citoplasma y otros gránulos citoplasmáticos.

Ejemplos:

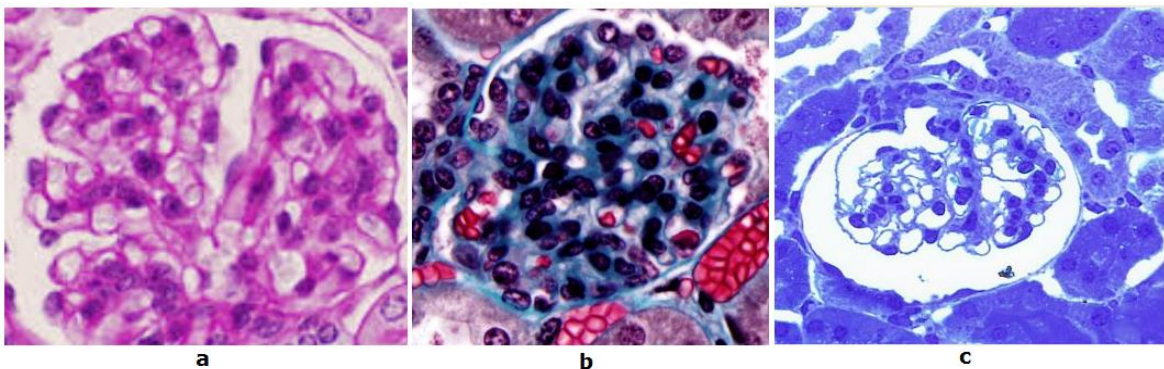


Fig. 3.1.9 (a) Hematoxilina - Eosina ⁽¹⁰⁾. (b) Tricrómico de Masson ⁽¹¹⁾. (c) Azul de Toluidina ⁽¹²⁾.

3.1.2.8.1 Técnicas de inmunohistoquímica

Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la tinción de tejido fijado e incluido en parafina con anticuerpos específicos marcados con una enzima que torna visible un sustrato.

El complejo antígeno-anticuerpo se identifica mediante la microscopía óptica, localizándolo allí donde se ha unido a moléculas específicas presentes en las células del tejido en estudio ⁽¹³⁾. Existen numerosas técnicas de este tipo, pero en este Proyecto Integrador analizaremos el caso específico de la técnica denominada Ki-67 que se explica a continuación.

Proteína Ki-67 (También conocida como MKI67)

El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear que está asociada a la proliferación celular, y a la síntesis de ARN ribosómico. Es utilizada por patólogos como marcador de proliferación celular para estimar el pronóstico de distintos tipos de carcinomas (principalmente en próstata, mama y cerebro) (14) ⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁶⁾.

El valor del Ki-67 se expresa en porcentaje, y cuanto más alto sea, mayor será su índice proliferativo, y por lo tanto peor pronóstico. Se debe tener en cuenta que los pacientes que tienen más de un tumor (a la vez), pueden tener un valor de Ki-67 distinto para cada tumor ⁽¹⁵⁾.

Esta técnica de inmunohistoquímica permite identificar los núcleos proliferativos en color marrón. En la siguiente figura se puede observar un preparado histológico con esta técnica:

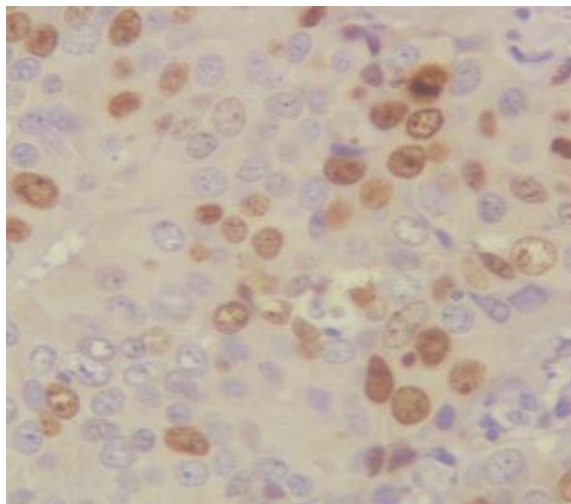


Fig. 3.1.10 Preparado histológico con la técnica Ki-67 (40X).

Los núcleos marrones indican núcleos proliferativos, y los celestes son núcleos no proliferativos. La imagen corresponde a un carcinoma ductal de mama con un Ki-67 del 47%. La imagen es obtenida en el Hospital Municipal de Urgencias.

Clasificación de los tumores según el valor del Ki-67

Generalmente hablando, niveles de Ki-67 entre 14% y 25% son considerados altos, dependiendo del tipo de cáncer de mama, mientras que niveles por encima del 40% son considerados muy altos ⁽¹⁷⁾.

Para determinar este valor porcentual, los patólogos deben estudiar 10 campos del preparado histológico en cuestión. En cada campo se cuentan 100 núcleos, y de éstos se determinan la cantidad de núcleos marrones; y en base a esto se puede saber el porcentaje para cada campo. Luego se promedian los porcentajes de los 10 campos y se obtiene el valor porcentual que permitirá clasificar el tumor.

3.1.2.9 Montaje

Luego de teñir el tejido, este debe ser deshidratado nuevamente, para ello hay que pasarlo por una serie de alcoholes con una concentración ascendente. Posteriormente se pasa por xilol, para hacerlo miscible con el medio de montaje que suele ser una resina cuyo índice de refracción es similar al del vidrio. Finalmente se coloca un cubreobjetos con bálsamo, teniendo cuidado en no dejar burbujas de aire.

Una vez finalizada esta etapa se está en condiciones de observar el tejido en el microscopio óptico ⁽²⁾.

3.2 Microscopía óptica

Para poder entender como es el funcionamiento de un microscopio óptico, se hace necesario dar un repaso a ciertos conceptos físicos, particularmente en el área de la óptica. A continuación se expondrá de una manera no muy profunda estos conceptos, ya que de hacerlo se extendería demasiado este informe. Se pretende expresar sólo los conceptos sin entrar en demostraciones matemáticas como en un curso de Física.

3.2.1 Conceptos básicos de óptica

Para poder entender cuáles son los principios físicos que gobiernan el funcionamiento del microscopio, es necesario recordar algunos conceptos clave de óptica.

3.2.2 Naturaleza de la luz

En la actualidad se sostiene que la luz tiene una doble naturaleza, corpuscular (fotones) y ondulatoria. Se propaga como ondas electromagnéticas y presenta fenómenos típicamente ondulatorios, pero en su interacción con la materia, en ciertos fenómenos de intercambio de energía tiene carácter corpuscular. Nunca se manifiestan las dos condiciones simultáneamente, en un fenómeno en concreto o es onda o es corpúsculo.

Dentro del espectro electromagnético la luz visible comprende un rango de longitudes de onda que va desde aproximadamente los 400 nm a los 700 nm ⁽¹⁸⁾.

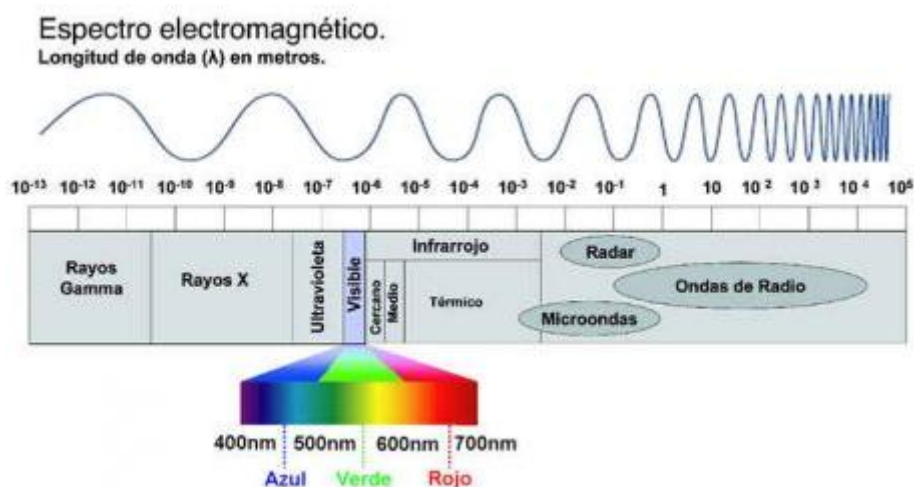


Fig. 3.2.1 Espectro electromagnético ⁽¹⁹⁾.

3.2.3 Óptica geométrica

La óptica geométrica es la parte de la Física que estudia los cambios de dirección de los rayos luminosos en los fenómenos de reflexión y refracción. Para esto considera a las fuentes luminosas como puntuales, de las cuales parten líneas rectas que representan la dirección de propagación de los rayos de luz. Este campo de estudio denomina a un conjunto de rayos luminosos como haz luminoso.

La óptica geométrica se rige por una serie de principios y aproximaciones que permiten explicar determinados fenómenos. A continuación se enuncian cada uno de ellos ⁽¹⁸⁾ ⁽²⁰⁾.

3.2.3.1 Ley de la propagación rectilínea de la luz

Los rayos se propagan en línea recta con la misma velocidad en todos los puntos y en todas las direcciones. Para que se cumpla esto es necesario que:

- Las dimensiones de los objetos sean mucho mayores que la longitud de onda de la luz, de esta manera no se produce difracción.
- Que el medio de propagación sea homogéneo e isótropo.

Medio homogéneo: Se dice que un medio es homogéneo cuando sus propiedades físicas y químicas son idénticas en todos sus puntos. Por ejemplo una solución salina.

Medio isótropo: Se dice que un medio es isótropo cuando todas sus direcciones de propagación de la luz son equivalentes. Por ejemplo, una solución salina es homogénea e isótropa, pero un cristal de calcita es homogéneo pero no isótropo ⁽²⁰⁾.

3.2.3.2 Ley de independencia de los rayos luminosos

Este supuesto supone que cada rayo luminoso es independiente de los demás y no interfieren entre sí ⁽²⁰⁾.

3.2.3.3 Ley de la reflexión y la refracción

A partir de estas dos leyes podemos prever el cambio en la dirección de los rayos ⁽²⁰⁾.

3.2.3.3.1 Reflexión

Es el cambio en la dirección de la luz que ocurre en un mismo medio después de incidir sobre la superficie de un medio distinto, y se rige por dos principios:

- El rayo incidente, el reflejado y la normal a la superficie están en un mismo plano.
- El ángulo del rayo incidente \hat{i} es igual al ángulo del rayo reflejado \hat{r} ⁽²⁰⁾.

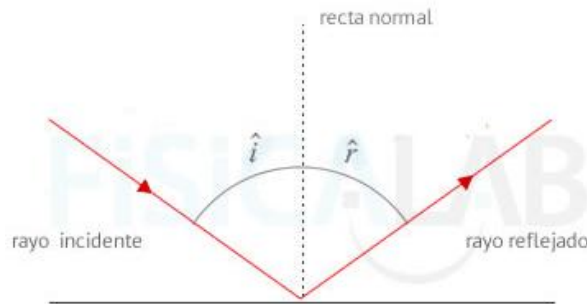


Fig. 3.2.2 Reflexión ⁽²⁰⁾.

De acuerdo con las características de la superficie reflectora, la reflexión luminosa puede ser regular o difusa. La reflexión regular tiene lugar cuando la superficie es perfectamente lisa. Un espejo o una lámina metálica pulimentada reflejan ordenadamente un haz de rayos conservando la forma del haz. La reflexión difusa se da sobre los cuerpos de superficies más o menos rugosas. En ellas un haz paralelo, al reflejarse, se dispersa orientándose los rayos en direcciones diferentes. Esta es la razón por la que un espejo es capaz de reflejar la imagen de otro objeto en tanto que una piedra, por ejemplo, sólo refleja su propia imagen ⁽²⁰⁾.

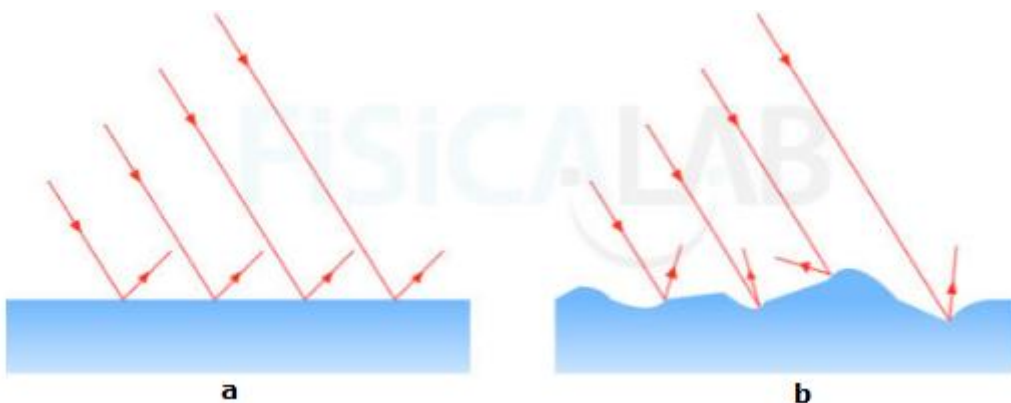


Fig. 3.2.3 (a) Reflexión regular. (b) Reflexión difusa ⁽²⁰⁾.

3.2.3.3.2 Refracción

La refracción es el cambio de dirección en los rayos luminosos al pasar oblicuamente de un medio a otro donde la luz se propague con distinta velocidad, y se rige por dos principios:

- El rayo incidente, el refractado y la normal están en un mismo plano.
- La ley de Snell de la refracción, que marca la relación existente entre el ángulo de incidencia \hat{i} y el de refracción \hat{r} según los índices de refracción de cada medio (n_1 y n_2) ⁽²⁰⁾.

$$n_1 \cdot \text{sen}(\hat{i}) = n_2 \cdot \text{sen}(\hat{r})$$

El índice de refracción de un medio se define como el cociente entre la velocidad de la luz en el vacío c y la velocidad de propagación de la luz en un medio transparente v ⁽²⁰⁾.

$$n = c/v$$

Además se sabe que el cambio de velocidad de un medio a otro es proporcional al cambio de ángulo en la dirección de propagación de la luz ⁽²⁰⁾.

$$\frac{\text{sen}(\hat{i})}{\text{sen}(\hat{r})} = \frac{v_1}{v_2}$$

De aquí se desprende que:

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{v_1}{v_2}$$

<i>Sustancia</i>	<i>Índice de refracción</i>
<i>Aceite</i>	<i>1.51</i>
<i>Agua</i>	<i>1.33</i>
<i>Aire</i>	<i>1.00</i>
<i>Cuarzo</i>	<i>1.54</i>
<i>Diamante</i>	<i>2.42</i>

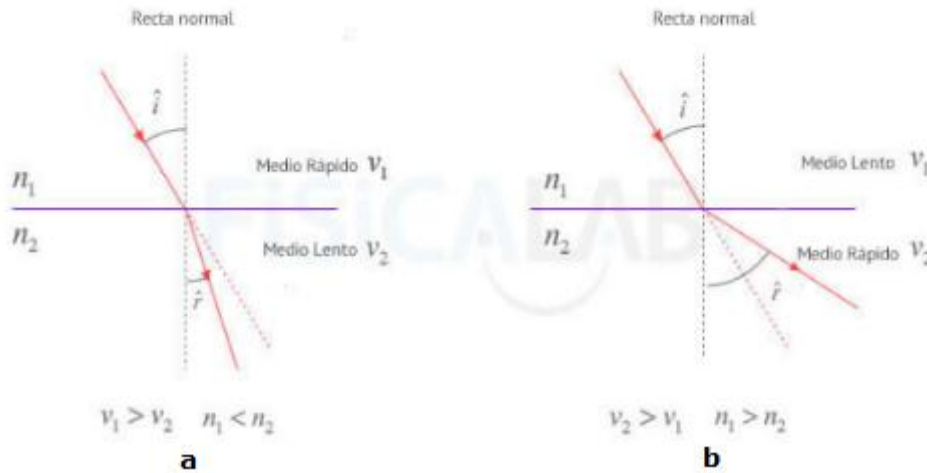
Tabla 3.2.1 Índices de refracción de algunas sustancias ⁽²¹⁾.

Fig. 3.2.4 Cambio de dirección de un rayo luminoso.

(a) De un medio rápido a un medio lento. (b) De un medio lento a un medio rápido ⁽²⁰⁾.

Refringencia: La refringencia de un medio transparente viene medida por su índice de refracción. Los medios más refringentes son aquellos en los que la luz se propaga a menor velocidad. Por regla general, la refringencia de un medio va ligada a su densidad de materia, pues la luz encontrará más dificultades para propagarse cuanto mayor cantidad de materia haya de atravesar para una misma distancia. Así pues, a mayor densidad, menor velocidad y mayor índice de refracción o grado de refringencia ⁽²⁰⁾.

3.2.3.4 Ley de la reversibilidad o reciprocidad

Este principio establece que la trayectoria de un rayo que parte de A y llega a B por una reflexión (o refracción) en un punto R es la misma que tendría un rayo que partiese de B en sentido contrario y se refleje (o refracte) en el mismo punto R llegando a A ⁽²⁰⁾.

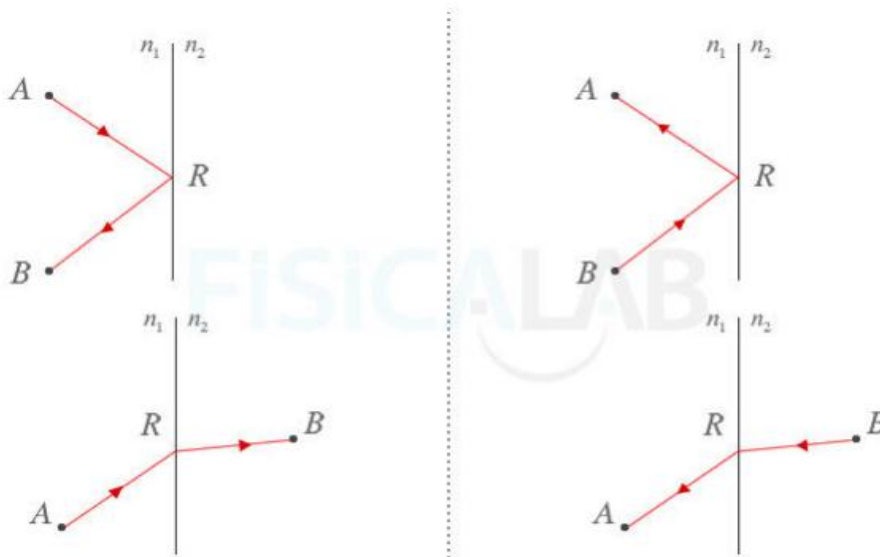


Fig. 3.2.5 Ley de reciprocidad ⁽²⁰⁾.

3.2.3.5 Absorción nula de energía

En general siempre que un haz luminoso se propaga por un medio transparente incidiendo en otro medio también transparente, parte de la energía se refleja, otra se refracta y otra se absorbe, que se pone en manifiesto por el calentamiento de la superficie. A continuación se muestra un esquema que resume lo explicado en este párrafo ⁽²⁰⁾.

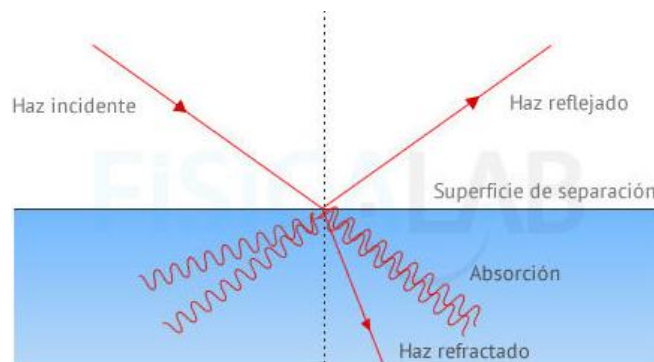


Fig. 3.2.6 Comportamiento real de un haz luminoso que pasa de un medio a otro ⁽²⁰⁾.

Para simplificar nuestro estudio en la formación de las imágenes, supondremos que la absorción de energía es nula.

3.2.3.6 Términos empleados en óptica geométrica

3.2.3.6.1 Objeto

En óptica geométrica llamamos objeto a cualquier fuente de la que proceden los rayos, bien sea por luz propia o reflejada. Los objetos pueden ser puntuales, cuando se supone que todo su volumen está concentrado en

un único punto o no. En este último caso, cada punto de la superficie puede ser considerado en sí mismo una fuente puntual de rayos⁽²⁰⁾.

3.2.3.6.2 Espejos

Un espejo es una superficie lisa y pulimentada que refleja todos los rayos que llegan a ella. Según su forma pueden ser:

- Espejos planos
- Espejos esféricos⁽²⁰⁾

3.2.3.6.3 Lentes

Las lentes son objetos transparentes limitados por dos superficies esféricas o una esférica y otra plana, que se encuentran sumergidas en un medio que normalmente es aire⁽²⁰⁾. A continuación se muestran qué tipos de lentes delgadas se utilizan:

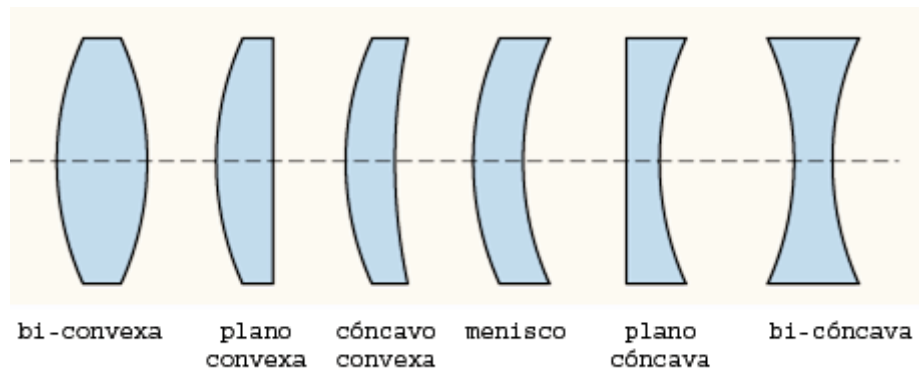


Fig. 3.2.7 Tipos de lentes comúnmente usadas⁽²²⁾.

Desde el punto de vista de sus efectos sobre la marcha de los rayos es posible agrupar los diferentes tipos de lentes en dos grandes categorías:

- *Lentes convergentes* se caracterizan porque hacen converger, en un punto denominado foco, cualquier haz de rayos paralelos que inciden sobre ellas. En cuanto a su forma, todas ellas son más gruesas en la zona central que en los bordes⁽¹⁸⁾.
- *Lentes divergentes*, por su parte, separan o hacen divergir los rayos de cualquier haz paralelo que incide sobre ellas, siendo las prolongaciones de los rayos emergentes las que confluyen en el foco. Al contrario que las anteriores, las lentes divergentes son menos gruesas en la zona central que en los bordes⁽¹⁸⁾.

Una forma simplificada de representar las lentes a fines prácticos es la siguiente:

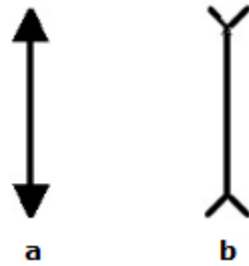


Fig. 3.2.8 Representación simplificada de lentes. (a) Lente convergente.
(b) Lente divergente ⁽²³⁾.

3.2.3.6.4 Sistema óptico

Se suele denominar sistema óptico al conjunto de dioptrios (superficies refractantes) y espejos. Se pueden distinguir:

- *Sistemas dióptricos*: Están constituidos solo por superficies refractantes. Prestaremos especial atención a los constituidos por lentes delgadas.
- *Sistemas catóptricos*: Formados por espejos.
- *Catadióptricos*: Formados tanto por superficies refractantes como reflectantes ⁽²⁰⁾.

3.2.3.6.5 Imagen

El objetivo principal de los sistemas ópticos es la formación de imágenes. Cuando todos los rayos de un objeto puntual que pasan por el sistema óptico convergen en un punto, decimos que dicho punto es la imagen del objeto.

En el caso de los objetos no puntuales, los distintos puntos de la superficie del mismo convergerán en distintos puntos de la imagen formando una réplica del objeto original. La imagen puede ser clasificada:

- Según su orientación:
 - *Derecha*: Tiene la misma orientación del objeto
 - *Invertida*: Tiene la orientación contraria al objeto
- Según su tamaño:
 - *Aumentada*: Es más grande que el objeto
 - *Tamaño natural*: Es tan grande como el objeto
 - *Disminuida*: Es más pequeña que el objeto
- Según la procedencia de los rayos:
 - *Real*: Se forma por la intersección *de los rayos convergentes* que provienen del objeto, tras pasar por el sistema óptico. En un espejo aparece delante y en una lente por detrás.
 - *Virtual*: Se forma por la intersección *de las prolongaciones de los rayos divergentes* que provienen del objeto, tras pasar por el sistema óptico. En un espejo aparece por detrás y en una lente delante ⁽²⁰⁾.

3.2.3.6.6 Eje óptico

También llamado eje principal, es el eje de simetría donde se colocan las lentes o espejos ⁽²⁰⁾.

3.2.3.7 Óptica por reflexión y óptica por refracción

Para simplificar el estudio, se divide este campo de estudio en:

- Óptica por reflexión: Formación de imágenes en espejos planos y espejos esféricos (cóncavos y convexos).
- Óptica por refracción: Imágenes formadas a través de lentes delgadas convergentes y divergentes ⁽²⁰⁾.

3.2.3.7.1 Óptica por reflexión

Imágenes en los espejos planos

La imagen obtenida es:

1. Virtual
2. Derecha
3. Simétrica respecto al espejo
4. Tamaño igual al objeto ⁽²⁴⁾

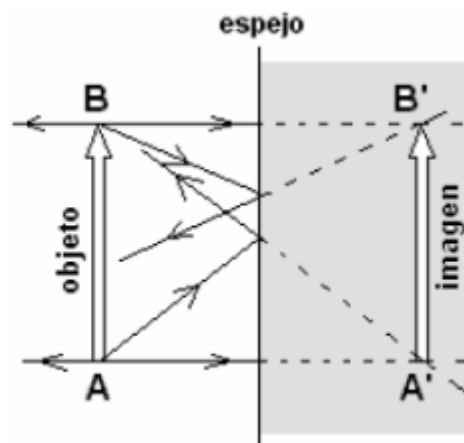


Fig. 3.2.9 Imagen en un espejo plano ⁽²⁴⁾.

Elementos de los espejos esféricos

- Centro de curvatura C: Es el centro geométrico de la esfera teórica a la que pertenece la superficie esférica.

- Radio de curvatura r: Es el radio de la esfera teórica.
 - Espejo cóncavo: $r < 0$
 - Espejo convexo: $r > 0$
- Vértice O: También se denomina centro óptico y es el punto de corte del espejo con el eje óptico. Se suele denotar con la letra O ya que constituye el origen de coordenadas.
- Eje principal: Es la línea imaginaria que pasa por el centro de curvatura y el vértice.
- Foco F: Es el punto situado sobre el eje principal, por donde pasan todos los rayos reflejados procedentes de los rayos paralelos que llegan al espejo.
- Distancia focal f: Es la distancia del foco al vértice del espejo, y se cumple que es la mitad del radio de curvatura ⁽²⁴⁾.

$$f = r/2$$

Imágenes en espejos esféricos

La construcción de imágenes en los espejos esféricos, se realiza aplicando las siguientes propiedades:

- Todo rayo proveniente del objeto paralelo al eje óptico se refleja pasando por el foco.
- Todo rayo proveniente del objeto que pasa por el foco, se refleja siguiendo una dirección paralela al eje óptico.
- Todo rayo proveniente del objeto que pasa por el centro de curvatura se refleja sobre sí mismo ⁽²⁴⁾.

Definimos como:

s = distancia del objeto al vértice del espejo. Por convenio siempre es negativa.

s' = distancia de la imagen al vértice del espejo.

f = distancia focal. Por convención es negativa en espejos cóncavos, y positiva en espejos convexos.

La imagen formada va a depender de:

1. La ubicación del objeto respecto al vértice del espejo
2. El tipo de espejo utilizado ⁽²⁴⁾

A continuación se muestran todos los casos posibles mediante una tabla y los correspondientes esquemas.

Clase de espejo	Situación del objeto	Características de la imagen
Cóncavo	$s > 2f$	Real, menor e invertida
Cóncavo	$s = 2f$	Real, igual e invertida
Cóncavo	$f < s < 2f$	Real, mayor e invertida
Cóncavo	$s = f$	No se forma imagen
Cóncavo	$s < f$	Virtual, mayor y derecha
Convexo	En cualquier punto	Virtual, menor y derecha

Tabla 3.2.2 Casos posibles en la formación de imágenes con espejos esféricos ⁽²⁴⁾.

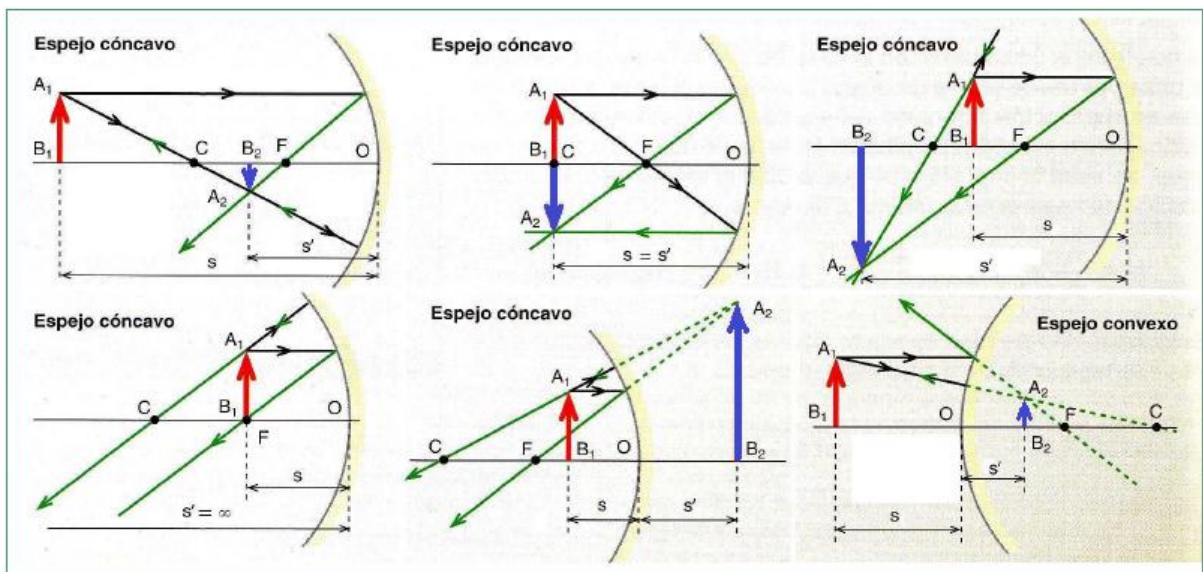


Fig. 3.2.10 Casos posibles en la formación de imágenes con espejos esféricos ⁽²⁴⁾.

La flecha roja representa el objeto, y la flecha azul la imagen formada.

3.2.3.7.2 Óptica por refracción

Elementos de una lente

- Centros de curvatura C y C' : Son los centros geométricos de las superficies esféricas que limitan el medio transparente.
- Eje principal: Es la línea imaginaria que une los centros de curvatura.
- Centro óptico O : Es el punto de intersección de la lente con eje principal.
- Foco F y F' : Todos los rayos que llegan a la lente siguiendo una trayectoria paralela al eje óptico, se refractan pasando por un punto llamado foco.
- Distancia focal f y f' : Es la distancia entre el foco y el centro óptico (24).

Imágenes producidas por las lentes

La construcción de imágenes en las lentes, se realizan aplicando las propiedades siguientes:

- Todo rayo paralelo al eje principal, se refracta pasando por el foco.
- Todo rayo que pasa por el centro óptico, no se desvía.
- Todo rayo que pasa por el foco, se refracta paralelo al eje principal (24).

Definimos como:

- s = distancia del objeto al centro óptico. Por convenio siempre negativa.
- s' = distancia de la imagen al centro óptico de la lente.
- f' = distancia focal de la imagen
- Si la lente es convergente, F' es un foco real y $f' > 0$
- Si la lente es divergente, F' es un foco virtual y $f' < 0$

La imagen formada va a depender de:

1. La ubicación del objeto respecto al centro óptico
2. Si la lente es convergente o divergente (24)

A continuación se muestran todos los casos posibles mediante una tabla y sus correspondientes esquemas.

Clase de lente	Situación del objeto	Características de la imagen
Convergente	$s > 2f$	Real, menor e invertida
Convergente	$s = 2f$	Real, igual e invertida
Convergente	$f < s < 2f$	Real, mayor e invertida
Convergente	$s = f$	No se forma imagen
Convergente	$s < f$	Virtual, mayor y derecha
Divergente	En cualquier punto	Virtual, menor y derecha

Tabla 3.2.3 Casos posibles en la formación de imágenes con lentes ⁽²⁴⁾.

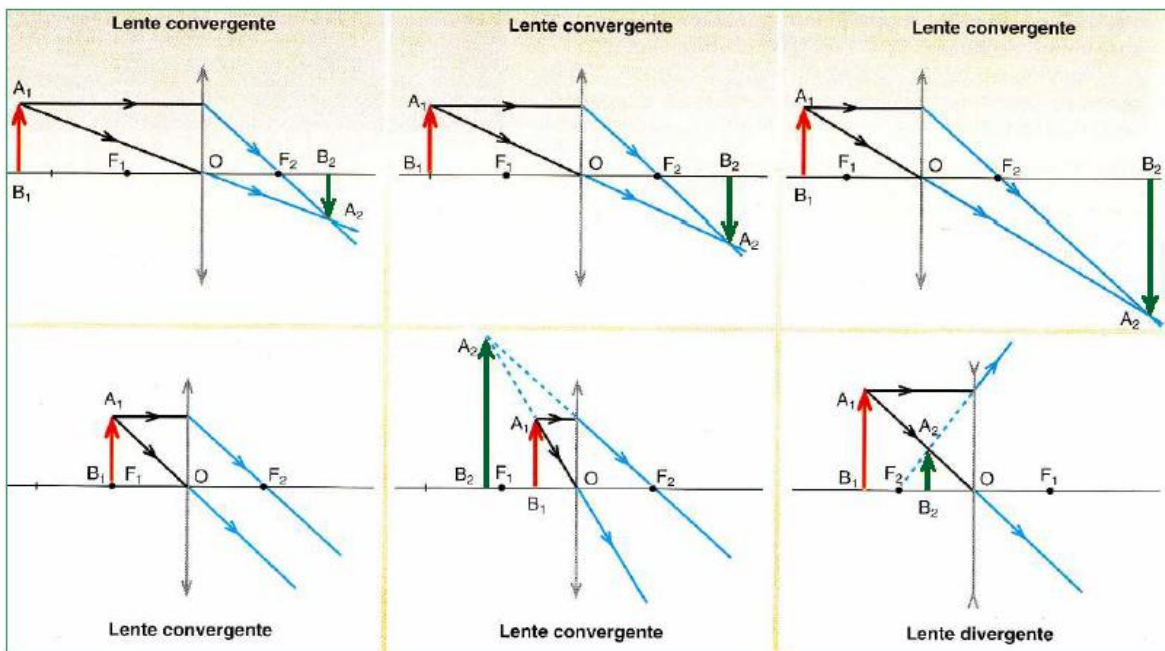


Fig. 3.2.11 Casos posibles en la formación de imágenes con lentes ⁽²⁴⁾.

La flecha roja representa el objeto y la verde la imagen formada.

3.2.4 Imagen. Sistemas ópticos

La lente es el instrumento principal para la formación de imágenes y los sistemas ópticos están constituidos a partir de lentes, combinadas o no, que permiten obtener imágenes de los objetos en estudio.

Los instrumentos para el enfoque (lentes) son necesarios porque la luz que incide sobre un objeto es irradiada y dispersada, de allí que la lente es imprescindible para "deshacer" este efecto de dispersión y en consecuencia lograr el enfoque de los rayos luminosos provenientes de cada punto del objeto.

Un sistema óptico ideal es aquel que permite que cada punto del objeto sea representado en un punto específico en la imagen ⁽²⁵⁾.

Basados en la lente como elemento de formación de imágenes se pueden citar los siguientes sistemas ópticos:

- Ojo humano
- Cámara fotográfica
- Lupa magnificadora
- Microscopio
- Telescopio

El ojo conjuntamente con el cerebro, es el sistema procesador de imágenes más eficiente disponible hasta la fecha. Todas las aplicaciones proporcionadas por la tecnología no son equiparables con el ojo en lo que concierne a velocidad y resolución. La estructura del ojo se relaciona con la de una cámara fotográfica ⁽²⁵⁾.

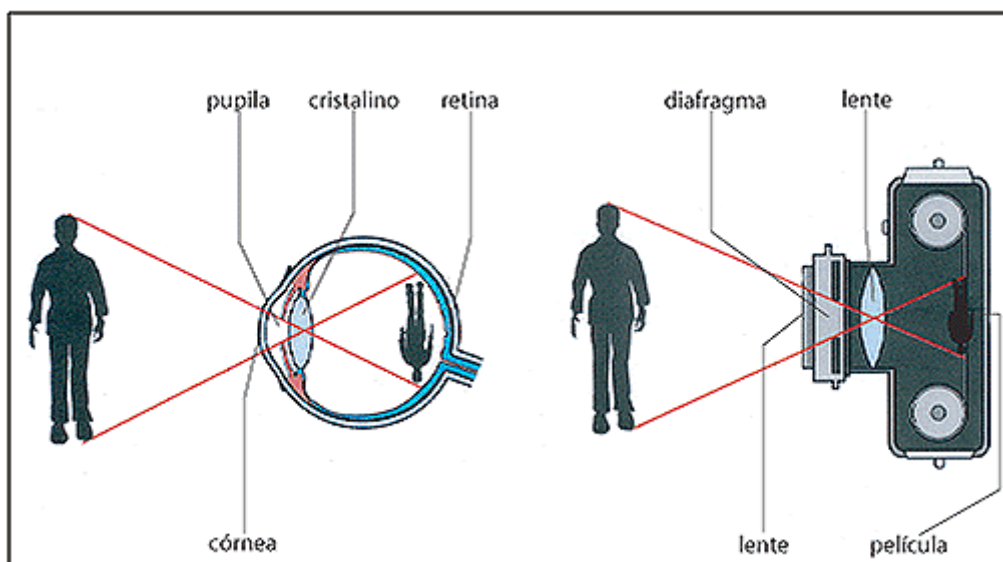


Fig. 3.2.12 Comparación del sistema óptico del ojo con el de una cámara fotográfica ⁽²⁵⁾.

Posee elementos transparentes (la córnea y el cristalino) que capturan y enfocan la luz hacia la retina, donde se localizan células especializadas

denominadas fotorreceptores (conos y bastones), y son capaces de detectar la intensidad y el color de la luz.

La luz que llega a la retina se convierte en señales nerviosas que son transmitidas al cerebro a través del nervio óptico ⁽²⁵⁾.

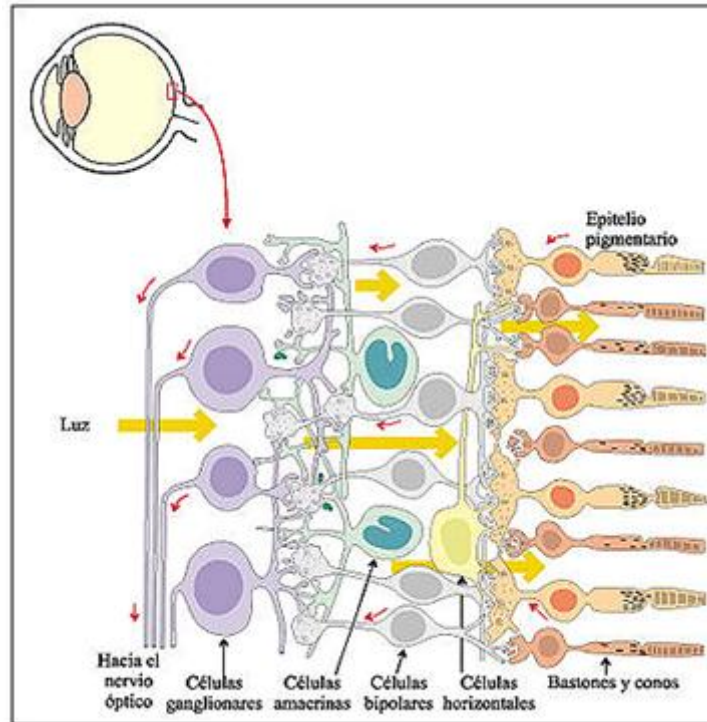


Fig. 3.2.13 Conversión de la energía lumínica a una respuesta nerviosa ⁽²⁵⁾.

Para lograr una visión nítida, el ojo debe "adaptarse" de acuerdo si el objeto observado se encuentra "cerca" o "lejos". Esta "adaptación" corre por cuenta del cristalino, que es una lente blanda que puede modificar la curvatura de sus superficies según se requiera o no. Esto se logra gracias a la acción de los músculos ciliares, que permiten el enfoque de cualquier objeto que se encuentre a una distancia comprendida entre 20 cm y el "infinito" ⁽²⁵⁾.



Fig. 3.2.14 Adaptación del cristalino por acción de los músculos ciliares ⁽²⁵⁾.

Siendo órganos pares, los ojos envían al cerebro dos imágenes discretamente diferentes y superpuestas. Es en el cerebro donde se integra la información, y de esta manera podemos percibir la profundidad y la distancia para lograr una visión tridimensional.

Si se desea realizar un examen más cercano de un objeto, es decir ver una imagen aumentada de algo pequeño, debemos recurrir a elementos que magnifiquen la imagen. Si una sola lente (lupa) no provoca la magnificación deseada, se pueden disponer de varias lentes alineadas, logrando de esta manera que se vayan multiplicando las magnificaciones individuales. Esta última configuración de varias lentes es la que se utiliza en los microscopios ⁽²⁵⁾.

3.2.4.1 Aumento y resolución

3.2.4.1.1 Aumento

El poder de aumento de una lente está determinado por el grado de curvatura de su superficie y la distancia focal. En las lentes convexas mientras mayor sea la curvatura, menor será la distancia focal y mayor será el aumento. El mismo se determina como el cociente entre el tamaño de la imagen (y') y el tamaño del objeto (y) ⁽²²⁾ ⁽²⁵⁾.

$$\text{Aumento} = y' / y$$

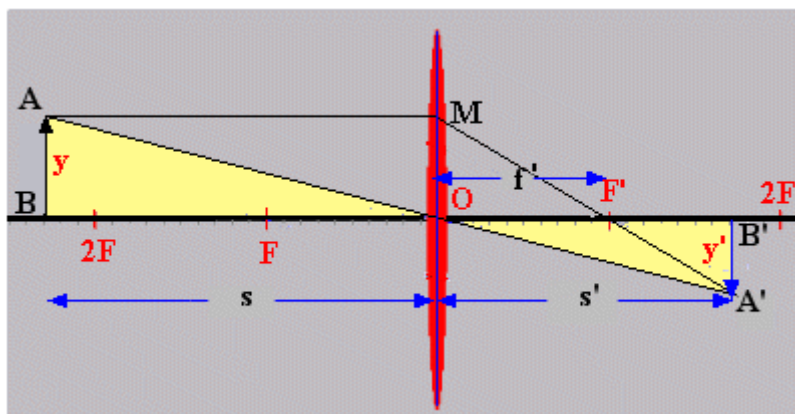


Fig. 3.2.15 Aumento de una lente ⁽²²⁾.

Como se mencionó anteriormente, cuando una sola lente no tiene el poder de magnificación deseado, se pueden colocar varias lentes en serie y alineadas bajo un mismo eje óptico, para lograr de esta manera el aumento deseado. Por ejemplo si se tiene tres lentes de aumento 1, aumento 2 y aumento 3, y las colocamos en serie, el aumento total del sistema será:

$$\text{Aumento total} = \text{aumento1} \cdot \text{aumento2} \cdot \text{aumento3}$$

El poder de aumento de un sistema óptico tiene sus límites y el aumentar las imágenes acarrea pérdida de información o detalles del objeto estudiado. Esto puede ser resuelto mediante otro principio: La resolución.

3.2.4.1.2 Resolución

Es la capacidad que tiene un sistema óptico de aislar dos puntos que se encuentran muy próximos entre sí, de manera que se puedan ver individualizados uno del otro. La riqueza de detalles que puede ser observada en un microscopio depende de la habilidad de este para hacer que los puntos del objeto que están muy cercanos aparezcan en la imagen como puntos separados. Mientras más corta sea esa distancia más finos serán los detalles observados, y por lo tanto mayor es el poder de resolución. De aquí surge el concepto de *límite de resolución*, que es la mínima distancia entre dos puntos del objeto para que el instrumento pueda "visualizarlos" por separado. Este es un indicador muy importante a la hora de escoger un tipo de microscopio de otro ⁽²⁵⁾.

3.2.4.2 Factores que limitan la resolución de un sistema de formación de imágenes.

Los sistemas ópticos y habitualmente los microscopios pueden presentar errores que producen distorsión de las imágenes. Son producidos mediante varios mecanismos, ya sea por el comportamiento de la luz al incidir sobre el objeto en estudio o por defectos propios de las lentes. Estos defectos son comúnmente conocidos como aberraciones. Algunos resultan de la esfericidad de la superficie de la lente y son derivados de la interacción de la luz con dicha superficie. Estos defectos producen alteraciones de los detalles de las imágenes y se pueden presentar combinados. En la actualidad, con el uso de técnicas de manufactura moderna ha permitido la elaboración de lentes más efectivas, logrado corregirlos estas aberraciones en gran medida ^{(25) (26)}.

3.2.4.2.1 Difracción

Se conoce como difracción a la tendencia de la luz de desviarse de la propagación rectilínea mientras se propaga o pasa a través de un obstáculo o apertura.

En el siguiente esquema se observa que si se hace incidir un haz luminoso por una ranura pequeña, la óptica geométrica predice que la imagen observada sobre la pantalla es de igual tamaño que la ranura. En la práctica

esto no ocurre, y debido a la difracción se ve una disposición de franjas de interferencia ⁽²⁶⁾.

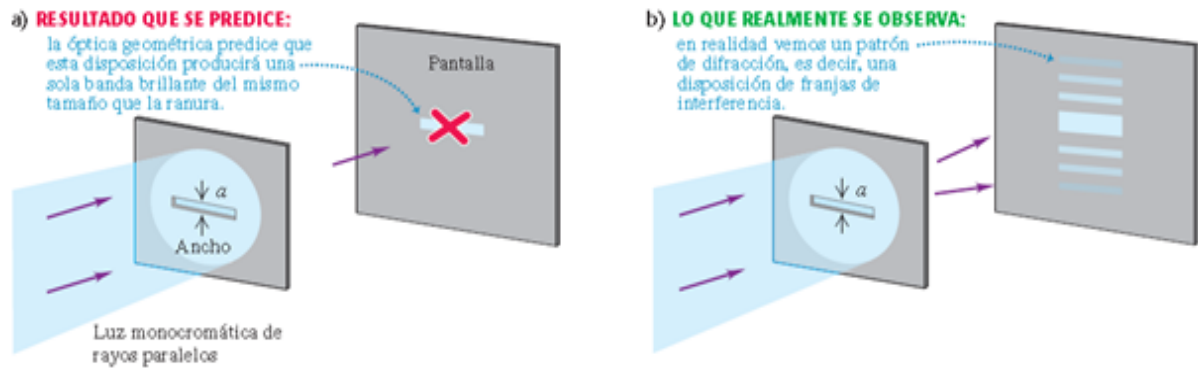


Fig. 3.2.16 Fenómeno de difracción sobre una ranura rectangular ⁽²⁶⁾.

Otro ejemplo es cuando se hace pasar un haz láser por un orificio circular, en lugar de observarse un punto brillante sobre la pantalla, se observa un patrón de difracción conocido como disco de Airy. Este patrón está formado por un punto central brillante y varios anillos brillantes separados por anillos oscuros ⁽²⁶⁾.

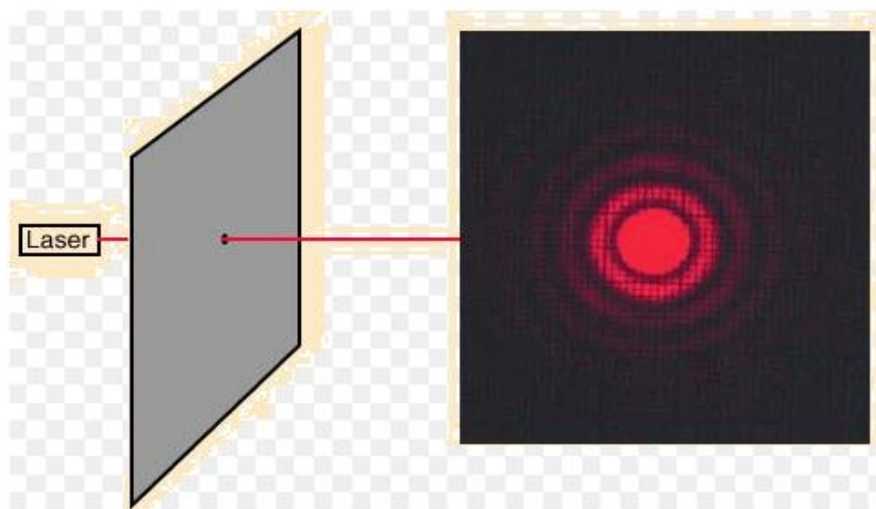


Fig. 3.2.17 Fenómeno de difracción sobre un orificio circular ⁽²⁶⁾.

La difracción tiene consecuencias muy importantes para la formación de la imagen en sistemas ópticos. En efecto, éstos están formados por lentes de tamaño finito y por diafragmas, normalmente circulares, por ejemplo, en el caso del ojo es el iris, el elemento que más limita la apertura del sistema completo. Cuando un haz de luz incide sobre el sistema, la imagen de un punto objeto no es un punto, como predice la óptica geométrica, sino una mancha de difracción ⁽²⁶⁾.

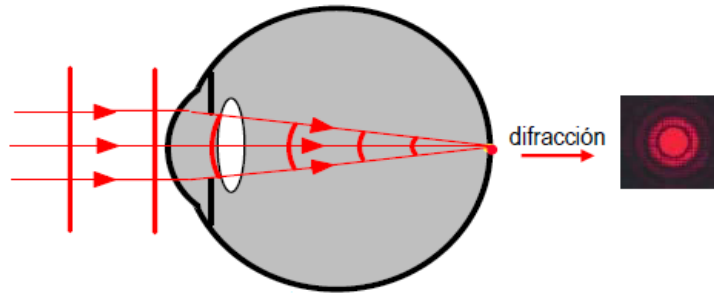


Fig. 3.2.18 Fenómeno de difracción en el ojo humano ⁽²⁶⁾.

La consecuencia inmediata es que dos puntos del objeto observado, que se encuentren separados a una distancia específica, pueden llegar a verse juntos en la imagen como se observa en la siguiente figura:

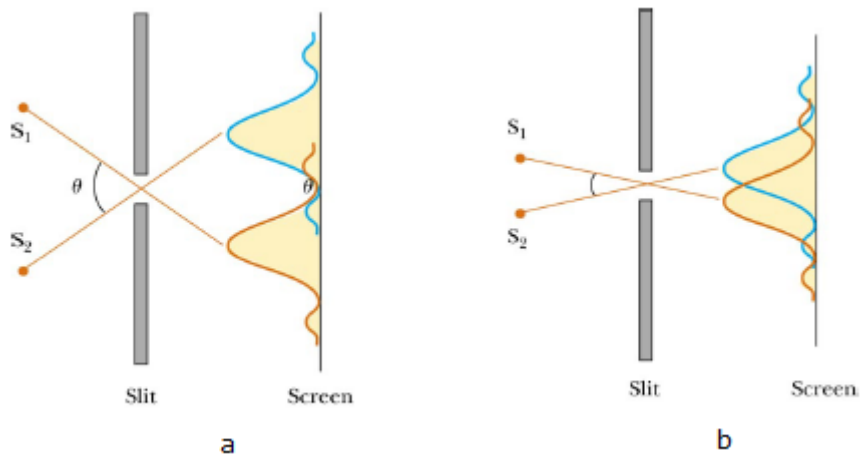


Fig. 3.2.19 Patrón de difracción entre dos puntos de un objeto ⁽²⁶⁾.

En el caso "a" los puntos S_1 y S_2 del objeto se encuentran lo suficientemente separados para que en la pantalla se observen dos discos de Airy separados uno del otro. En el caso "b" la menor separación de S_1 y S_2 provoca una superposición de los discos de Airy ⁽²⁶⁾.

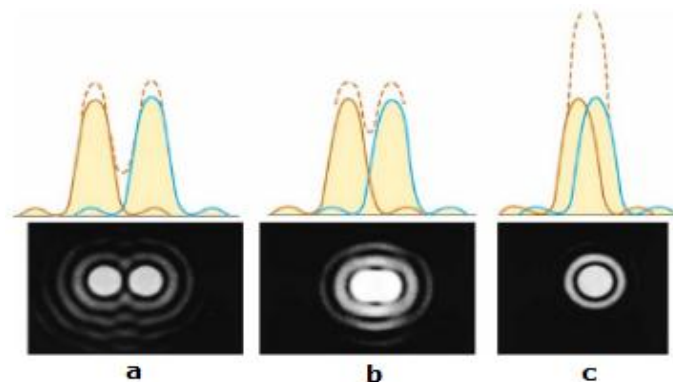


Fig. 3.2.20 Comparación del modelo matemático de la difracción con la imagen experimental ⁽²⁶⁾.

Como se observa en la figura anterior, si dos puntos del objeto están lo suficientemente próximos, en la imagen las manchas de Airy se solapan y suman sus intensidades, de manera que no podemos distinguir un punto del otro. De aquí se desprende que el fenómeno de difracción impone un límite en la resolución de los sistemas ópticos. Se puede demostrar que el ángulo mínimo de resolución de un sistema óptico de apertura D , e iluminado con una radiación de longitud de onda λ viene dado por:

$$\text{sen}\theta = \frac{1,22\lambda}{D}$$

Por lo tanto, cuanto mayor sea el diámetro de apertura, más pequeño será el ángulo de resolución ⁽²⁶⁾.

Criterio de Rayleigh: dos imágenes están resueltas cuando la distancia entre los centros de las manchas de Airy es igual al radio del disco central. Es decir que este criterio establece el límite de resolución, a partir del cual dos puntos dejan de verse separados ⁽²¹⁾.

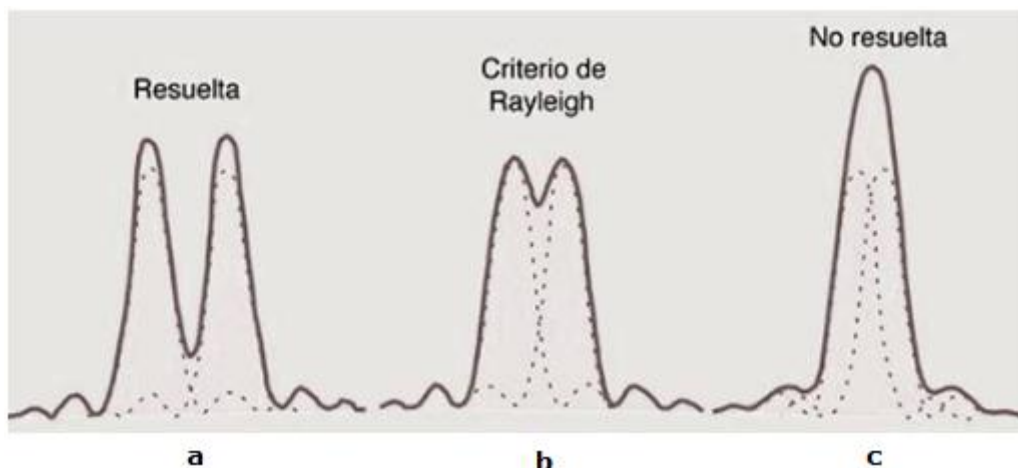


Fig. 3.2.21 Criterio de Rayleigh ⁽²¹⁾.

3.2.4.2.2 Aberraciones ópticas

Hay varios tipos de aberraciones en una lente:

- De esfericidad: Están relacionadas con la forma esférica de la lente, y se producen por falta de convergencia de las ondas luminosas que pasan por la periferia de la lente cuando no son enfocadas en el mismo punto que aquellas ondas que pasan por el centro, las cuales son refractadas ligeramente; mientras que las que inciden en la periferia son refractadas en mayor grado y convergen en diferentes puntos focales. Este es uno de los efectos más molestos y la imagen del objeto aparece dispersa y borrosa, en lugar de enfocada y nítida. Además de la lente, la lámina cubreobjeto empleada en la preparación histológica puede producir este tipo de

aberración. Una lámina de calidad debe tener 0,17 mm de espesor para poder ser utilizada con las lentes objetivo de la mayoría de microscopios, de lo contrario produce una marcada aberración de esfericidad ⁽²⁵⁾.

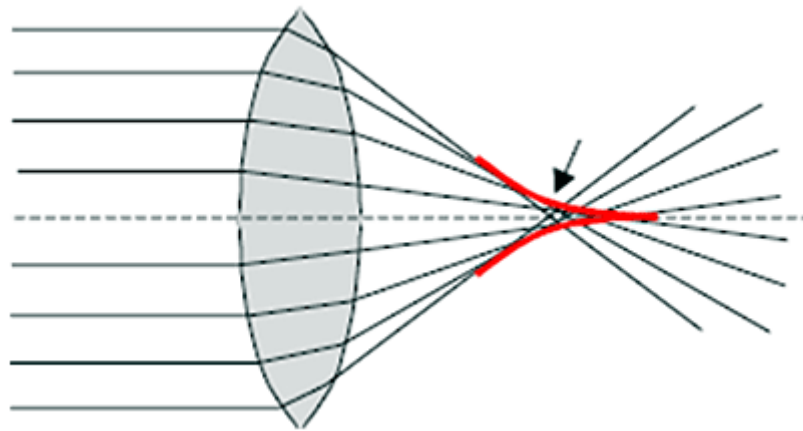


Fig. 3.2.22 Aberración de esfericidad ⁽²⁵⁾.

- **Cromáticas:** relacionadas con las variaciones en los índices de refracción de las distintas longitudes de onda que conforman la luz blanca visible. Cuando la luz blanca atraviesa una lente, los diferentes colores son refractados de acuerdo a su longitud de onda. Cada color tiene un camino y un foco diferente; la luz violeta es la más refractada y le siguen la azul, la verde y la roja, este fenómeno también se conoce como dispersión. La incapacidad de la lente de reunir nuevamente los rayos refractados en un punto focal común resulta en una discreta diferencia en el tamaño del objeto y en franjas de colores rodeando la imagen. Los sistemas ópticos que dan corregida esta aberración se denominan acromáticos ⁽²⁵⁾.

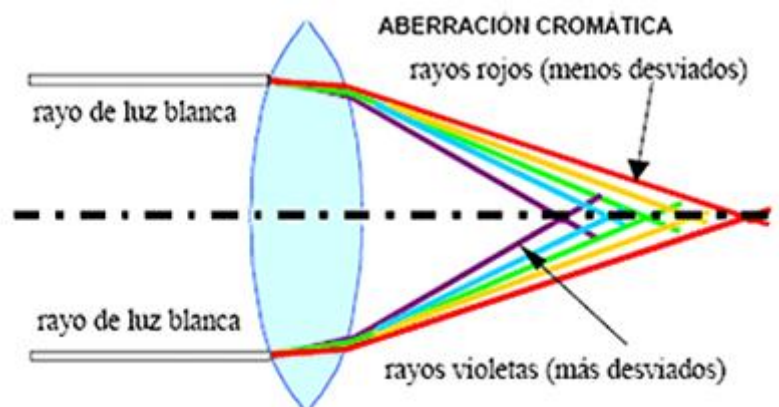


Fig. 3.2.23 Aberración cromática ⁽²⁵⁾.

- Otras aberraciones geométricas
 - ❖ *Astigmatismo*: No se puede enfocar simultáneamente líneas verticales y horizontales.
 - ❖ *Coma*: Se produce una degradación de la imagen de un punto, se ve similar a un cometa.
 - ❖ *Distorsión*: Se manifiesta en la forma del objeto, afectando particularmente a los bordes. El objeto se ve en forma de barril o de corsé.
 - ❖ *Curvatura del campo*: El campo se ve con bordes curvos, deformando la imagen ⁽²⁵⁾.

3.2.5 Microscopio óptico

El microscopio óptico es un instrumento que está constituido por cuatro sistemas articulados de tal manera que garantizan un funcionamiento óptimo y ergonómico. Estos sistemas son:

- Sistema mecánico: Conjunto de piezas que sirven de soporte a las lentes ópticas y demás elementos (base, columna mecanismo de enfoque, platina, revólver, tubo).
- Sistema óptico: Conjunto de lentes responsables del poder de aumento y resolución (objetivos y ocular).
- Sistema de iluminación: Elementos que producen las radiaciones (luz visible o no), transmiten, reflejan y regulan tanto la intensidad como la cantidad de rayos que van a incidir sobre la muestra en estudio (lámpara o fuente de iluminación, espejo, condensador y diafragma).
- Accesorios: Son aditivos que permiten extender las capacidades del instrumento (cámaras fotográficas, de video, etc.) ⁽²⁵⁾.

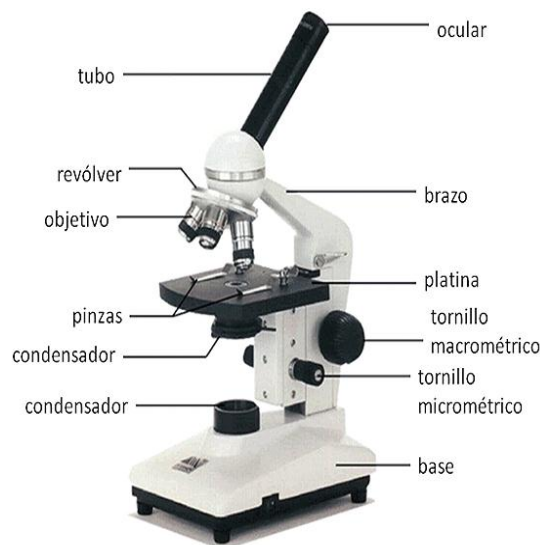


Fig. 3.2.24 Partes de un microscopio óptico ⁽²⁵⁾.

3.2.5.1 Sistema mecánico del microscopio

La parte mecánica del microscopio también se denomina montura, y es de dimensiones y formas muy variables dependiendo del fabricante, y pueden ser:

- ❑ *Grandes:* Poseen todos los elementos para un trabajo profesional dado que permiten el intercambio de piezas y accesorios.
- ❑ *Medianos:* No convienen para todo tipo de investigación, pero su precio es menor.
- ❑ *Pequeños o portátiles:* Responden a necesidades más restringidas y producen aumentos menores, en consecuencia se usan para observaciones superficiales.
- ❑

Toda montura por más complicada que sea posee los siguientes elementos:

3.2.5.1.1 Pie o base

Es de forma variable según el fabricante, pero en general tiene las siguientes características:

- ❖ Peso considerable que garantice la estabilidad del instrumento.
- ❖ Aloja la fuente de iluminación y puede contener un mecanismo para regular la intensidad luminosa.
- ❖ Sirve de soporte a la columna o brazo sobre la cual reposa el resto del aparato.
- ❖ La columna dispone de sentido inferior a superior los siguientes elementos:
 - Condensador
 - Platina
 - Revolver
 - Tubo
- ❖ La columna tiene una cremallera que permite el desplazamiento vertical de la platina o revólver ⁽²⁵⁾.

3.2.5.1.2 Mecanismo de enfoque

Se logra desplazando en sentido vertical ya sea la platina donde se coloca el preparado histológico o el revólver donde están colocados los objetivos, de modo que se pueda centrar del objetivo que se está utilizando en ese momento. Este enfoque se logra mediante dos mecanismos, uno de avance rápido brindado por un tornillo macrométrico y otro de avance lento dado por un tornillo micrométrico.

El tornillo macrométrico se utiliza para enfocar con objetivos de poco aumento, y para subir o bajar rápidamente la platina con la finalidad de colocar o sacar el preparado. El tornillo micrométrico por el contrario posee

un ajuste fino del orden de 0,001 mm generalmente, y se utiliza con los objetivos de mayor aumento ⁽²⁵⁾.

3.2.5.1.3 La platina

Es el soporte horizontal donde se colocan las preparaciones histológicas. Presenta en el centro un orificio circular por donde pasa el haz luminoso producido por la fuente de luz y proveniente del condensador.

Generalmente es de forma cuadrada y posee un sistema de fijación e inmovilización de la lámina portaobjeto compuesto por pinzas. Estas pinzas están adheridas a un mecanismo que permite el movimiento adelante - atrás y derecha - izquierda, lo que permite posicionar el preparado histológico donde desee el operario ⁽²⁵⁾.

3.2.5.1.4 El revólver

Es un implemento que permite el intercambio rápido de los objetivos mediante un movimiento de rotación.

Los objetivos van atornillados en el revólver, dando la posibilidad de cambiar los mismos según se requiera o no.

Va colocado en la parte inferior del tubo, y el número de objetivos que puede contener (dos, tres, cuatro o más) es variable según se trate de un fabricante u otro ⁽²⁵⁾.

3.2.5.1.5 El tubo

Soporta la porción óptica del microscopio. Es un cilindro hueco de longitud variable, cuyo interior es de color negro mate y posee un diafragma para impedir la formación de reflejos y facilitar la observación. El tubo puede ser doble y alojar dos lentes oculares (microscopio binocular). Para el caso de microscopios destinados a la microfotografía, hay un tercer tubo donde va alojada una cámara fotográfica especialmente construida para este propósito ⁽²⁵⁾.

3.2.5.2 Sistema óptico del microscopio

Los microscopios ópticos están diseñados para proporcionar imágenes aumentadas y nítidas de los preparados que se observan. El sistema óptico está constituido por dos juegos de lentes: El objetivo y el ocular ⁽²⁵⁾.

3.2.5.2.1 Los objetivos

Representan el componente óptico más importante del microscopio. Su principal función consiste en coleccionar la luz proveniente del preparado y

proyectar una imagen nítida, real, invertida y aumentada hacia el cuerpo del microscopio.

Constituyen un sistema óptico formado por una o varias lentes, las cuales deben estar centradas y los ejes ópticos de cada una deben coincidir exactamente para formar el eje óptico del sistema. Sus lentes están hechas a partir de cristales con un alto grado de calidad y funcionamiento; su precio depende del poder de aumento, resolución y de la corrección de las aberraciones ⁽²⁵⁾.

Poder de resolución del objetivo

Al observar pequeños objetos, la luz proveniente de ellos es desviada de su trayectoria inicial y mientras más pequeños sean, mayor será la desviación. Las lentes del objetivos deben recolectar como sea posible la mayor cantidad de rayos desviados para formar una imagen nítida; a más rayos capturados, mayor resolución ⁽²⁵⁾.

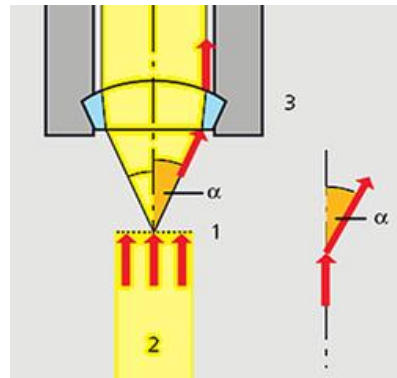


Fig. 3.2.25 Apertura numérica ⁽²⁵⁾.

En la figura anterior 1 corresponde al preparado, 2 al haz de iluminación y 3 al objetivo. De aquí se desprende la definición de apertura numérica (N.A), que es una cifra que permite cuantificar el rendimiento de un objetivo en términos de resolución.

$$NA = n . \text{sen} \alpha$$

Donde α es la mitad del ángulo de apertura del objetivo y n es el índice de refracción del medio que se encuentra entre el objeto y el objetivo. A mayor NA mayor rayos recolectados y por lo tanto mayor resolución ⁽²⁵⁾.

Clasificación de los objetivos

Tomando en cuenta el grado de corrección de las aberraciones hay distintas familias de objetivos para el microscopio, los objetivos acromáticos, semi -

apocromáticos y apocromáticos. Además en cada familia hay dos tipos de objetivos, los secos y los de inmersión ⁽²⁵⁾.

Objetivos	Usos	Corrección de aberraciones	
		Cromáticas	Esfericidad
Acromáticos	Para microfotografía en blanco y negro. Dan mejores resultados con un filtro de luz de color verde.	*Azul *Rojo	*Verde
Semi - apocromáticos o fluoríticos	Están diseñados para la microfotografía en colores. Dan buenos resultados con luz blanca. Suelen construirse con un mineral llamado fluorita.	*Azul *Rojo *Verde en cierta medida	*Verde *Azul
Apocromáticos	Poseen el mayor nivel de corrección a las aberraciones. Son los mejores para obtener imágenes a color.	*Azul oscuro *Azul *Rojo *Verde	*Corrección para 2 o 3 colores.

Tabla 3.2.4 Clasificación de los objetivos ⁽²⁵⁾.

Los tres tipos de objetivos proyectan imágenes con cierta distorsión que se manifiesta como curvaturas y al ser corregidos para este defecto se denominan plan-acromáticos, plan-fluoritas o plan-apocromáticos ⁽²⁵⁾.

Objetivos secos y objetivos de inmersión

Estos objetivos difieren entre sí por la naturaleza del medio interpuesto entre el cubre-objeto de la lámina histológica y la lente frontal del objetivo. En los objetivos secos el medio interpuesto es el aire cuyo índice de refracción ($n=1$) es muy diferente del índice del vidrio del porta y cubre-objeto ($n=1,5$). Por el contrario, en los objetivos denominados de inmersión el medio que separa al cubre-objeto de la lente frontal del objetivo es un líquido cuyo índice de refracción es lo más próximo al del vidrio. Este líquido puede ser agua destilada ($n=1,33$) o mejor aún aceite de cedro, que posee un índice de refracción ($n=1,515$) casi idéntico al del vidrio.

La ventaja de los objetivos de inmersión consiste en la disminución o eliminación de la refracción de los rayos luminosos entre el aire y el

objetivo, en consecuencia la luminosidad de la imagen está aumentada, mientras que en los objetivos secos, está disminuida. El empleo de la inmersión aumenta el ángulo de apertura del objetivo y permite mayor resolución gracias a la captura de una mayor cantidad de rayos luminosos refractados, y solo puede utilizarse con los objetivos de mayor aumento ⁽²⁵⁾.

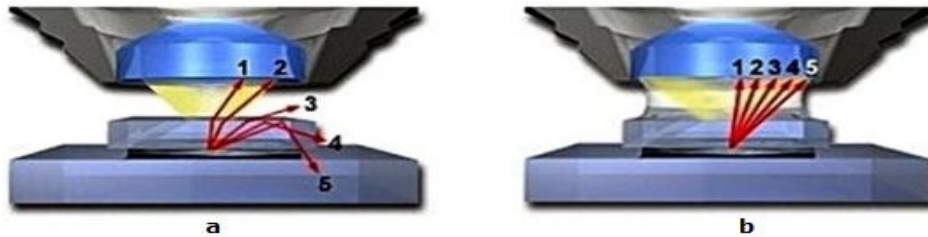


Fig. 3.2.26 (a) Objetivo seco. (b) Objetivo de inmersión ⁽²⁵⁾.

Óptica finita y óptica infinita

El tubo que soporta tanto el revólver por un extremo, como el ocular por el otro, se confeccionaba con una determinada longitud y los fabricantes elaboraban objetivos que funcionaban para esa longitud (longitud finita) que fue estandarizada a 160 mm y en algunos casos (Leitz) a 170 mm. En muchos modelos de microscopios modernos el tubo no es rectilíneo y los rayos de luz transmitidos desde el objetivo hacia el ocular son desviados por prismas, especialmente en los microscopios trinoculares para fotografía. Emplear objetivos diseñados para una determinada longitud de tubo en otro microscopio que no corresponda produce incremento en las aberraciones de esfericidad.

Los microscopios modernos poseen un ensamble complejo de lentes, espejos y prismas que transmiten la luz desde el objetivo al ocular y actualmente casi todos los fabricantes están elaborando microscopios que puedan aceptar objetivos diseñados para realizar una corrección infinita. Tales objetivos proyectan una imagen al infinito la cual es captada por otra lente que se introduce en el tubo y que a su vez la proyecta al punto focal del ocular. Los objetivos con esta corrección poseen el símbolo infinito grabado en la parte externa. Los sistemas corregidos al infinito son significativos porque corrigen la aparición de imágenes fantasma que con frecuencia se observaba en los microscopios anteriores, no obstante estos nuevos modelos son de mayor tamaño. A continuación se muestra como es el comportamiento descrito ⁽²⁵⁾.

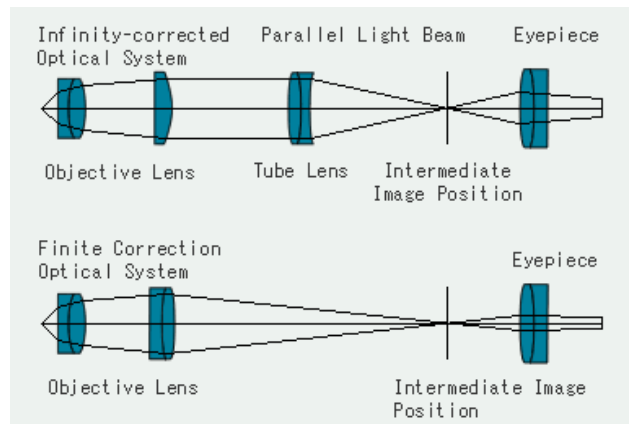


Fig. 3.2.27 Óptica infinita vs óptica finita ⁽²⁷⁾.

Estructura de los objetivos

El objetivo es un tubo cilíndrico que contiene en su interior un revestimiento anti-reflejos y diversas lentes colocadas en serie y alineadas. En la parte externa posee grabadas las especificaciones y características ⁽²⁵⁾.

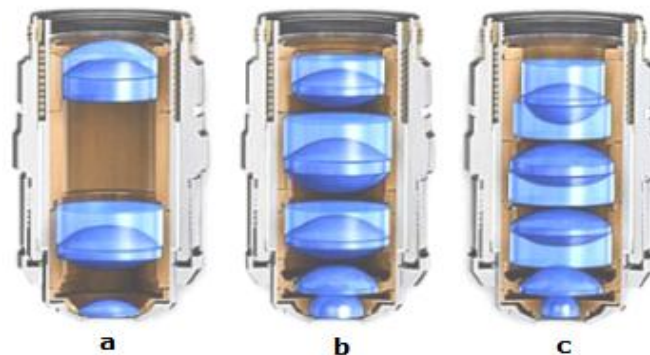


Fig. 3.2.28 (a) Objetivo acromático. (b) Objetivo semi - apocromático. (c) Objetivo apocromático ⁽²⁵⁾.

Nomenclatura de los objetivos

Nombre del fabricante	Cannon, Nikon, Leica, Zeiss, etc.
Aumento linear	0.5x - 200x
Correcciones ópticas	*Acho, Achromat (Acromático). *Fluar, Neofluar (Semi - apocromático). *Apo (Apocromático). *Plan, Plano (Corrige curvatura de campo).
Apertura numérica	Valor que indica el ángulo de apertura del cono luminoso.

Longitud del tubo	*Longitud que separa al objetivo del ocular. *Expresada en mm (160, 170, 220). * ∞ indica corrección óptica infinita
Espesor del cubre - objeto a emplear	Ha sido estandarizada a 0,17 mm
Distancia focal	Distancia entre el punto focal y la lente frontal del objetivo, expresada en milímetros.
Propiedades ópticas especiales	Indica si el objetivo tiene un buen desempeño para determinados escenarios: -Luz polarizada -Contraste de fase, etc.
Rosca del objetivo	La mayoría está estandarizada con un diámetro de 20 mm, aunque los fabricantes Leica y Nikon suelen tener roscas de 25 y 32mm.
Medio de inmersión	Oil (Aceite). W, Water, Wasser (Agua). Gly (glicerol).
Código de colores	Algunos fabricantes marcan sus objetivos con colores para identificar rápidamente el aumento

Tabla 3.2.5 Nomenclatura del objetivo ⁽²⁵⁾.



Fig. 3.2.29 Fotografía de un objetivo comercial ⁽²⁵⁾.

Código de color de inmersión	Medio de inmersión
Negro	Aceite
Naranja	Glicerol
Blanco	Agua
Rojo	Sustancia especial
Código de color de aumento	Aumento
Negro	1x, 2.5x
Marrón	2x, 2.5x
Rojo	4x, 5x
Amarillo	10x
Verde	16x, 20x
Azul turquesa	25x, 32x
Azul celeste	40x, 50x
Azul cobalto	60x, 63x
Blanco crema	100x, 200x, 250x

Tabla 3.2.6 Códigos de colores para el aumento y el medio de inmersión ⁽²⁵⁾.

3.2.5.2.2 El ocular

El ocular está formado por lentes que generalmente son separadas por un diafragma, montadas en las extremidades de un cilindro que va introducido en la parte superior del tubo del microscopio. El ocular sirve para observar la imagen real e invertida que produce el objetivo, ejerciendo dos funciones:

- Aumenta la imagen y la transforma en una imagen virtual, derecha con respecto a la imagen del objetivo, pero aun invertida, con respecto al objeto. Posteriormente el ojo endereza la imagen.
- Aplana y aclara el campo óptico o plano circular en el que aparece el objeto.

La lente superior se denomina lente ocular y es la que produce el aumento de la imagen real del objetivo; la lente inferior se denomina colectora y es la que aplana y aclara el campo ⁽²⁵⁾.

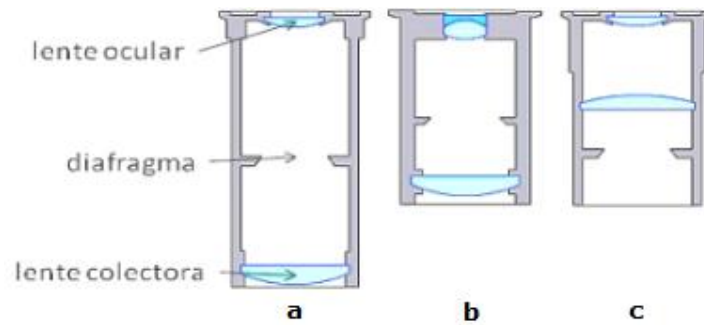


Fig. 3.2.30 Clases de oculares ⁽²⁵⁾.

Clasificación de los oculares

- Oculares de Huygens (a): Empleados con los objetivos acromáticos y formados por dos lentes plano-convexas cuya convexidad está dirigida hacia el objetivo y el diafragma se ubica entre ambas. También denominado ocular negativo porque la imagen se forma entre las dos lentes. Muy común en modelos de microscopios antiguos.

- Oculares de Ramsden (c): Conocido como ocular positivo, formado por varias lentes unidas entre sí y colocadas por encima del diafragma. Generalmente corrigen aberraciones y funcionan de manera óptima con los objetivos corregidos al infinito.

- Oculares compensadores (b): Son oculares que corrigen la diferencia de aumento para los diversos colores (diferencia cromática de aumento) que se aprecia en los objetivos apocromáticos. No tiene buen rendimiento con objetivos acromáticos secos.

- Oculares de proyección: Posee una lente que permite la proyección de la imagen en una pantalla colocada a cierta distancia del ocular, ideal para dibujar o para exhibición.

- Oculares aplanáticos: Tienen la propiedad de formar un campo perfectamente plano y el poder de resolución es igual tanto en el centro como en la periferia del campo óptico.

- Oculares peri-planáticos: Aplanan la curvatura de campo que se produce con objetivos de mayor aumento. Son semejantes a los oculares de tipo Huygens pero con una doble lente ocular ⁽²⁵⁾.

Uno de los diseños de oculares más avanzados es el ocular *Periplan* que contiene siete lentes que corrigen las aberraciones cromáticas, la curvatura de campo, y su empleo se recomienda combinado con objetivos de gran aumento ⁽²⁵⁾.

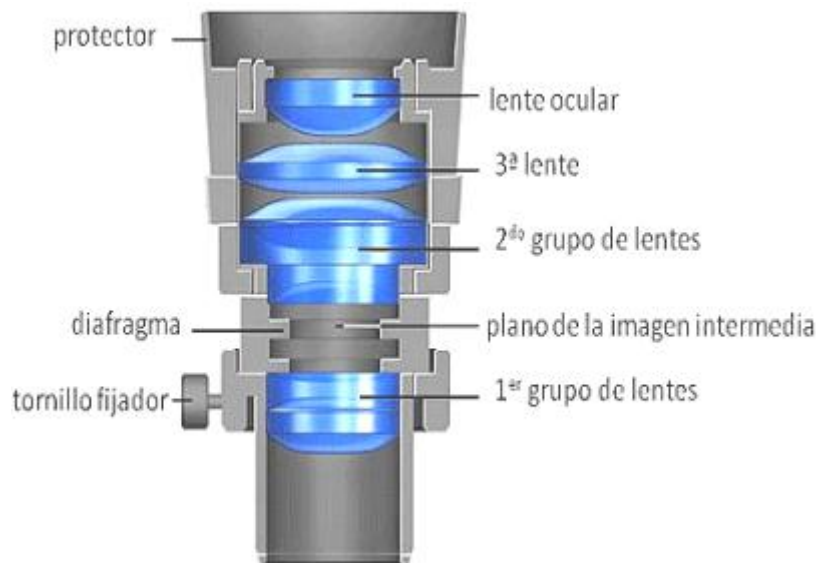


Fig. 3.2.31 Ocular Periplan ⁽²⁵⁾.

Campo del microscopio

Se denomina campo del microscopio al círculo visible que se observa en el ocular. Si el aumento es mayor, el campo disminuye, lo cual quiere decir que el campo es inversamente proporcional al aumento del microscopio. La forma del campo está determinada por el diafragma fijo del ocular, que generalmente es de forma circular, no obstante el campo puede ser cuadrado y esta forma es muy útil al realizar estudios de coprología o hematología

El ocular produce un aumento adicional a la imagen proporcionada por el objetivo. El valor de este aumento está inscrito en la superficie del ocular y generalmente es de 10x, 12.5x, 15x, 20x o 25x. Otro valor es el número de campo que consiste en el diámetro en milímetros de la apertura fija del diafragma, la cual puede variar desde 18mm hasta 26.5mm ⁽²⁵⁾.



Fig. 3.2.32 Fotografía de un ocular comercial ⁽²⁸⁾.

Los oculares modernos poseen otro tipo de inscripciones que denotan sus características:

- UW: Ultra Wide, en oculares que poseen un campo visual muy amplio.
- H: Para un alto punto focal del observador que usa lentes durante la observación microscópica.
- K, C, comp: Para oculares compensadores.
- Plan-comp: Objetivos que corrigen curvatura de campo y dan campos planos ⁽²⁹⁾.

Otra de las aplicaciones del ocular consiste en la cuantificación o medición de estructuras del preparado histológico. En ciertos casos es relevante conocer el número, tamaño o dimensiones de las células y demás elementos del tejido.

Usualmente se coloca en el plano de la apertura fija del diafragma una pieza circular de vidrio con una escala o gradilla, la cual aparece enfocada y superpuesta a la imagen del preparado al encontrarse en el plano de formación de la misma ⁽²⁵⁾.

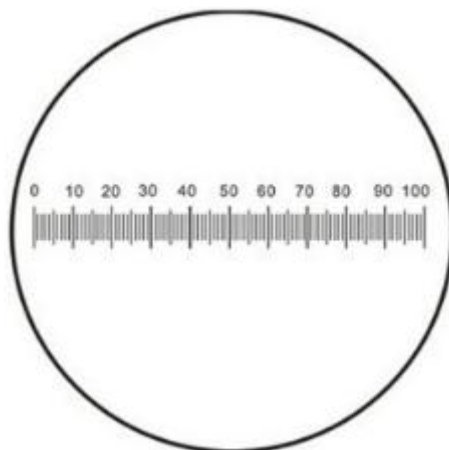


Fig. 3.2.33 Pieza de vidrio con escala calibrada ⁽³⁰⁾.

Muchos oculares modernos poseen una copa de goma cuya finalidad es, por una parte colocar los ojos a la distancia correcta de observación y por otra, impedir la formación de reflejos luminosos que dificulten la visualización. Algunos microscopios binoculares poseen un mecanismo de enfoque del ocular que ajusta las dioptrías en caso que el observador posea una disminución de su agudeza visual. El ajuste se realiza por separado tanto para el ojo derecho como para el izquierdo; de igual manera se ajustan a la distancia interpupilar del observador (usualmente entre 55 y 75 mm) ⁽²⁵⁾.

3.2.5.3 Sistema de iluminación del microscopio

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 preparado. Si la muestra es iluminada de manera inadecuada, la calidad de la imagen que se obtiene se verá afectada, aun cuando se disponga de un excelente sistema óptico. La iluminación óptima debe ser brillante, sin resplandores y en lo posible debe dispersarse de manera uniforme en el campo de observación.

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 está colocado debajo de la platina y la finalidad es de iluminar mediante luz transmitida. La fuente de luz (LED en los microscopios modernos) emite una radiación que es recogida por un dispositivo denominado condensador, que a su vez forma un cono luminoso necesario para la visualización con objetivos de mayor aumento.

La iluminación LED provee una luz brillante y fría, lo cual es una ventaja puesto que ahorra energía, y brinda una imagen muy nítida ⁽²⁵⁾.

3.2.5.3.1 Condensador

Otra manera de aumentar aún más la resolución, es colocando entre la fuente luminosa y el preparado un juego de lentes denominado condensador, el cual permite crear un cono luminoso hacia el espécimen como se muestra a continuación:

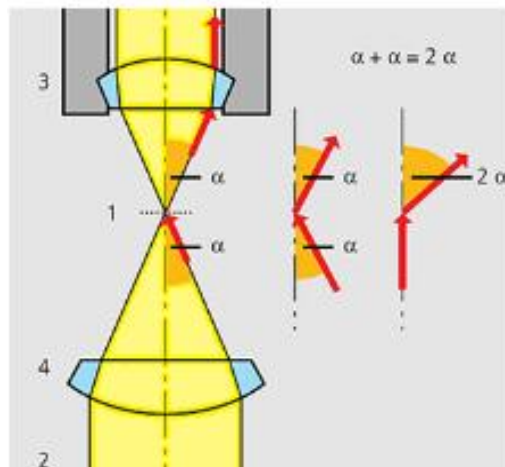


Fig. 3.2.34 (1) Preparado. (2) Haz luminoso. (3) Objetivo. (4) Lente condensadora ⁽²⁵⁾.

Como se ve en la figura si iluminamos al objeto con un cono luminoso con una apertura numérica igual al del objetivo, la resolución aumenta al doble, porque justamente se puede recolectar el doble de rayos luminosos por

parte del objetivo. Este tipo de iluminación se conoce como iluminación Kohler.

Al igual que en los objetivos, las lentes del condensador poseen poder de aumento y también producen aberraciones, sin embargo, éstas también pueden corregirse ⁽²⁵⁾.

Tipo de condensador	Características
Condensador de Abbe	<ul style="list-style-type: none"> *Es el más simple *No corrige aberraciones ópticas *Para observaciones de rutina *Compuesto por 2 o más lentes *Produce un cono de iluminación muy amplio
Condensador Aplanático	<ul style="list-style-type: none"> *Corrige aberraciones de esfericidad
Condensador Acromático	<ul style="list-style-type: none"> *Corrige aberraciones cromáticas para el azul y el rojo *Contiene 3 o 4 lentes *Para observaciones en blanco y negro y de rutina *Se debe utilizar con objetivos secos
Condensador Aplanático - Apocromático	<ul style="list-style-type: none"> *Posee el más alto nivel de corrección *Puede contener hasta 8 lentes *Ideal para la microfotografía a color *Uso óptimo con objetivos de inmersión

Tabla 3.2.7 Clasificación de condensadores ⁽²⁵⁾.

El cono de luz que produce el condensador debe ajustarse de manera apropiada para optimizar la intensidad y el ángulo de apertura. Cada vez que se cambia un objetivo se debe realizar un ajuste para obtener el cono de luz conveniente a la apertura numérica del nuevo objetivo. La altura del condensador es regulada mediante un mecanismo activado con un tornillo que lo baja o lo sube, acercándolo o no a la platina donde está colocado el preparado.

Además de los condensadores empleados en los microscopios de campo claro, existe una variedad de modelos de condensadores especializados que se utilizan en diferentes aplicaciones, cuya finalidad principal es el incremento del contraste entre los detalles de la estructura del espécimen. Se han desarrollado condensadores especiales para microscopía de campo oscuro, contraste de fase, luz polarizada, contraste de interferencia diferencial, etc ⁽²⁵⁾.

A continuación se observa el trayecto del haz luminoso a través de un condensador de tipo Abbe combinado con un objetivo de inmersión.

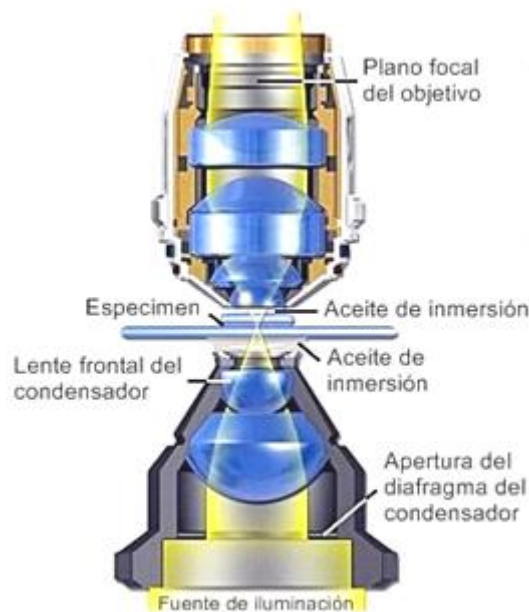


Fig. 3.2.35 Trayecto del haz luminoso a través de un condensador de tipo Abbe combinado con un objetivo de inmersión ⁽²⁵⁾.

3.2.5.3.2 Diafragma o iris

Es un dispositivo que se coloca inmediatamente debajo de la platina. Debe permitir cambios en la apertura numérica cuya finalidad es la de obtener conos luminosos cada vez más estrechos y eliminar los rayos de luz sobrantes. Los primeros diafragmas consistían en un disco de metal con agujeros de diferente diámetro, el cual se rotaba según la necesidad. Estos discos fueron sustituidos por el iris, otro dispositivo más elaborado y con un diseño que le permite cambiar de diámetro. La apertura del diafragma se regula en relación con el tipo de objetivo que se esté utilizando. El diafragma o iris está pintado de negro con la finalidad de eliminar los rayos de luz reflejada que pueden interferir con la iluminación del objeto ⁽²⁵⁾.



Fig. 3.2.36 Diafragma de diámetro variable ⁽³¹⁾.

3.2.5.4 Accesorios del microscopio

Existen diversos accesorios que permiten agregar funciones al microscopio óptico. A continuación se enumeran algunas de ellas:

1. Medir y cuantificar: Se pueden cuantificar longitudes, cantidades (conteo de células, núcleos, partículas) utilizando oculares de medición con retículos o gradillas, en combinación con cámaras de conteo, láminas calibradas, etc.
2. Fotografía y video: Se puede acoplar al tercer tubo del microscopio trinocular una cámara que permita la adquisición de imágenes y video del preparado histológico en estudio.
3. Incrementar el contraste: Para facilitar la observación de preparados con una estructura particular y con células vivas se emplean filtros, condensadores y otros dispositivos, que transforman el microscopio de campo claro en un instrumento de campo oscuro, contraste de fases, luz polarizada, etc.

A continuación se muestra un esquema de funcionamiento de un microscopio al que se le ha agregado dos filtros polarizadores, uno entre el condensador y la muestra, y otro entre la muestra y el observador ⁽²⁵⁾.

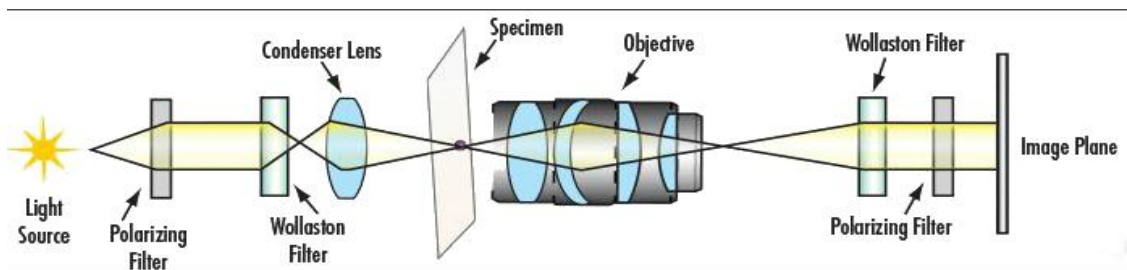


Fig. 3.2.37 Esquema de funcionamiento de un microscopio con luz polarizada ⁽³²⁾.

3.2.5.5 Formación de la imagen en el microscopio

Como se ha visto anteriormente, el microscopio se puede simplificar a los fines prácticos como un sistema óptico formado por dos lentes convergentes. El primer lente se encuentra cerca del objeto en estudio, el objetivo, y la segunda lente que se encuentra cerca del observador es el ocular.

El objetivo posee una distancia focal muy corta, de manera que se puede colocar el objeto un poco más allá del foco, y en consecuencia obtener una imagen real, invertida y aumentada. El ocular por otro lado funciona como una lupa que aumenta la imagen real brindada por el objetivo, para dar una imagen virtual y derecha ⁽²⁵⁾. Todo eso se resume en el siguiente esquema simplificado:

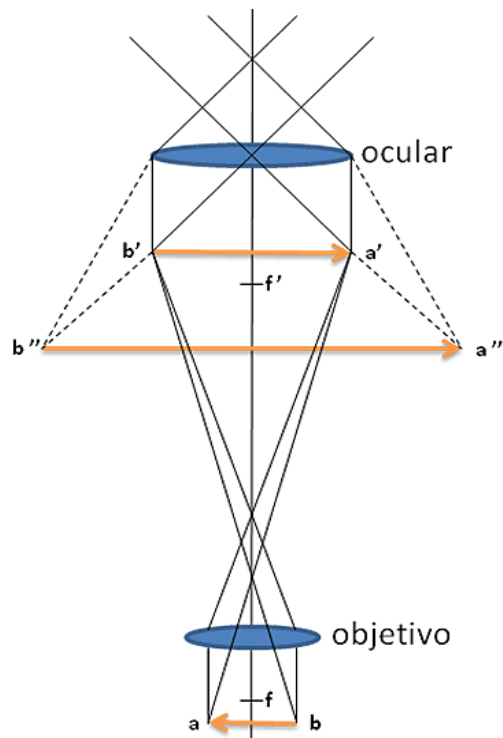


Fig. 3.2.38 Formación de la imagen en el microscopio ⁽²⁵⁾.

Como se puede observar en la figura anterior, el objeto en estudio ab se coloca más allá de la distancia focal f del objetivo, dando como resultado una imagen real, invertida y aumentada $a'b'$. La imagen $a'b'$ debe ser formada muy cerca del ocular, es decir a una distancia inferior a la distancia focal f' del mismo. De esta manera se obtiene una imagen virtual, derecha (respecto a $a'b'$) y aumentada $a''b''$.

Cuando el observador coloca su ojo en el ocular se termina de completar el sistema óptico. Es decir que se agrega una tercer lente convergente, el cristalino, que permite obtener una imagen real e invertida (respecto a $a''b''$), que es proyectada sobre la retina.

3.2.5.6 Limitación en la resolución del microscopio óptico

Para poder determinar la resolución de un instrumento óptico como lo es el microscopio, es necesario tener presente el fenómeno de la difracción de la luz como se vió anteriormente. Para determinar la separación mínima que el instrumento es capaz de resolver podemos aplicar el criterio de Rayleigh ⁽²⁶⁾.

Para simplificar el análisis de este caso, tomaremos dos puntos del objeto y sus correspondientes manchas de Airy en la imagen del mismo, como se muestra a continuación:

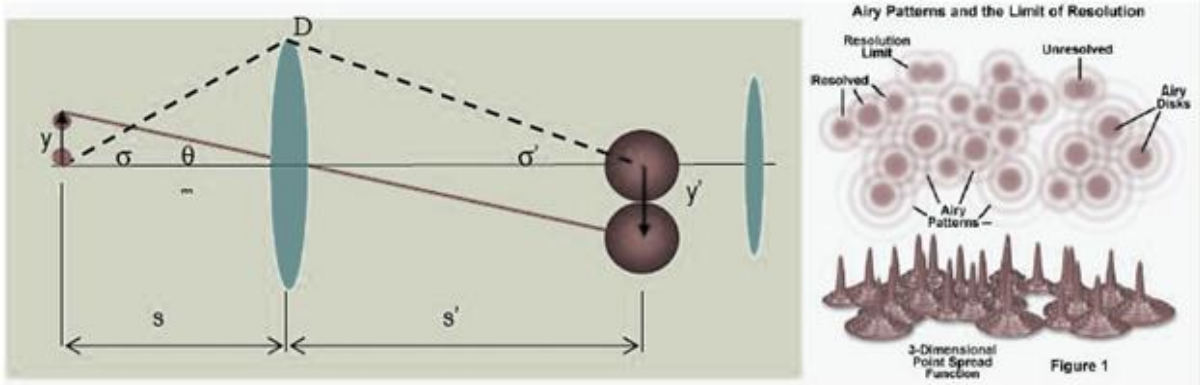


Fig. 3.2.39 Limitación en la resolución del microscopio óptico ⁽²⁶⁾.

La distancia mínima entre los centros de las imágenes será

$$y' = s' \text{sen} \theta_m = s' \frac{1,22\lambda}{D} = s' \frac{1,22\lambda_0}{n' D} = 0,61 \frac{\lambda_0}{n' \text{sen} \sigma'}$$

Teniendo en cuenta que un microscopio bien corregido de aberraciones se cumple la condición del seno de Abbe (Es una condición que deben cumplir las lentes u otros sistemas ópticos para poder producir imágenes definidas de objetos tanto en el eje óptico como fuera. Fue formulada por Ernst Abbe en el campo de los microscopios) ⁽²⁶⁾

$$n \text{ y } \text{sen} \sigma = n' y' \text{sen} \sigma'$$

La separación mínima que puede discriminar el microscopio es

$$y' = 0,61 \frac{\lambda_0}{n \text{ sen} \sigma} = 0,61 \frac{\lambda_0}{NA}$$

Siendo $NA = n \cdot \text{sen} \sigma$ la apertura numérica del objetivo.

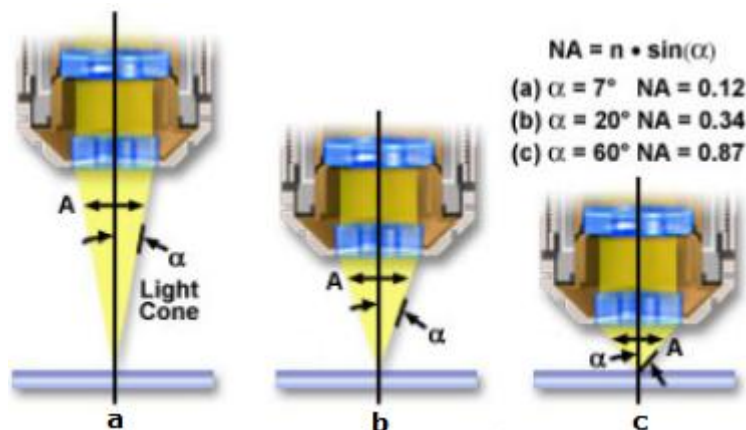


Fig. 3.2.40 Resolución en función de la apertura numérica ⁽²⁶⁾.

Normalmente el objeto se encuentra en aire, por lo que el índice de refracción es $n=1$, además el ángulo subtendido por el borde del objetivo toma valores tales que $\sigma \ll 90^\circ$, de modo que como máximo se tiene que $n \cdot \sin \sigma = 1$, por lo tanto para una longitud de onda $\lambda = 500 \text{ nm}$ se tiene que la resolución es $y' = 300 \text{ nm}$. Si se usa un objetivo de inmersión en aceite ($n=1.5$) se llega hasta $y' = 200 \text{ nm}$. En la siguiente tabla se muestra la resolución en micras para los tres tipos de objetivos (acromáticos, semi-apocromáticos y apocromáticos) para distintos aumentos y aperturas numéricas ⁽²⁶⁾.

Objective Type						
Magnification	Plan Achromat		Plan Fluorite		Plan Apochromat	
	N.A.	Resolution (µm)	N.A.	Resolution (µm)	N.A.	Resolution (µm)
4x	0.10	2.75	0.13	2.12	0.20	1.375
10x	0.25	1.10	0.30	0.92	0.45	0.61
20x	0.40	0.69	0.50	0.55	0.75	0.37
40x	0.65	0.42	0.75	0.37	0.95	0.29
60x	0.75	0.37	0.85	0.32	0.95	0.29
100x	1.25	0.22	1.30	0.21	1.40	0.20

N.A. = Numerical Aperture

Tabla 3.2.8 Resolución en función de la apertura numérica ⁽²⁶⁾.

Se puede notar en la tabla anterior que a medida que aumenta la magnificación del objetivo, aumenta su correspondiente apertura numérica y por lo tanto su resolución mejora.

Otro factor importante que determina la resolución del sistema es la longitud de onda utilizada. Cuanto más corta es la longitud de onda, mayor resolución se alcanza. El mayor poder de resolución se alcanza en el ultravioleta cercano (360 nm), que representa la longitud de onda más corta para microscopía óptica. En general, los microscopios usan una longitud de onda en torno a 550 nm, que es la longitud para la cual el ojo tiene una mayor respuesta fotométrica. En la tabla siguiente se muestra como es la variación de la resolución con diferentes longitudes de onda, donde se ha fijado la apertura numérica en $N.A = 0.95$ ⁽²⁶⁾.

Wavelength (Nanometers)	Resolution (Micrometers)
360	.19
400	.21
450	.24
500	.26
550	.29
600	.32
650	.34
700	.37

Tabla 3.2.9 Resolución en función de la longitud de onda ⁽²⁶⁾.

3.3 Procesamiento de imágenes

En esta sección se abordarán algunos conceptos clave en el procesamiento de imágenes, que son necesarios para la implementación de diversos algoritmos en las imágenes histológicas.

Se comenzará definiendo los conceptos de imagen e imagen digital, cuáles son las distintas etapas que componen el procesamiento de imágenes, y luego se definen las operaciones más importantes que se aplican en imágenes en escala de grises y en color. Se comienza primero con el procesamiento en escala de grises para comprender algunos conceptos, que luego pueden ser extendidos fácilmente a imágenes en color.

3.3.1 Imagen

Una imagen puede ser definida matemáticamente como una función bidimensional $f(x,y)$, donde x e y representan las coordenadas espaciales en el plano, y el valor de esta función en cualquier par (x,y) representa la intensidad o nivel de gris en ese punto ⁽³³⁾.

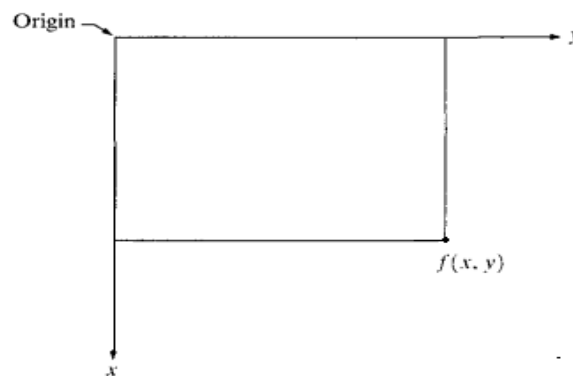


Fig. 3.3.1 Representación matemática de una imagen ⁽³⁴⁾.

3.3.1.1 Imagen digital

Cuando los valores de las coordenadas (x,y) son cantidades finitas y enteras, estamos hablando de una imagen digital, y se suele representar matemáticamente como $f(x,y)$ ⁽³³⁾.

$$f(x, y) = \begin{bmatrix} f(0,0) & f(0,1) & \dots & f(0, N-1) \\ f(1,0) & f(1,1) & \dots & f(1, N-1) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ f(M-1, 0) & f(M-1,1) & \dots & f(M-1, N-1) \end{bmatrix}$$

Se observa que se corresponde con una matriz $M \times N$, donde cada elemento de la matriz es una cantidad discreta y se conoce como píxel.

También suele usarse la representación tradicional de una matriz:

$$A = \begin{bmatrix} a_{0,0} & a_{0,1} & \dots & a_{0,N-1} \\ a_{1,0} & a_{1,1} & \dots & a_{1,N-1} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ a_{M-1,0} & a_{M-1,1} & \dots & a_{M-1,N-1} \end{bmatrix}$$

El valor de cada píxel representa un nivel de gris, que usualmente es una potencia de 2.

$$L = 2^k$$

El número necesarios de bits para almacenar una imagen digital es:

$$b = N.M.k$$

3.3.2 Pasos fundamentales del procesamiento digital de imágenes

Las partes fundamentales del procesamiento digital de imágenes (en general) son las que enumeran a continuación, aunque no siempre se aplican todos los pasos.

1. Adquisición de imágenes: En esta primera etapa, luego de adquirir la imagen, por lo general se aplica un preprocesado de la imagen.
2. Mejora de la imagen: Se aplican cambios subjetivos en la imagen para lograr realzar algunos parámetros de interés.
3. Restauración de la imagen: Es una etapa de mejora de la imagen, pero a diferencia del paso anterior, se restaura la misma usando métodos objetivos (modelos matemáticos).
4. Procesamiento del color: Se aplican determinados métodos para manejar los colores de los píxeles de la imagen.
5. Wavelets: Se utilizan para representar las imágenes en varios grados de resolución.
6. Compresión: Se reduce el almacenamiento requerido para guardar la imagen.
7. Procesamiento morfológico: Se utilizan herramientas para extraer componentes de la imagen útiles para la representación y descripción de formas.
8. Segmentación: Se divide una imagen en sus partes constituyentes.

9. Representación y descripción: Se elige una representación de los datos para poder observar información cuantitativa de interés o rasgos que permiten diferenciar una clase de objetos de otros ⁽³⁵⁾.

3.3.3 Conceptos de imágenes digitales

Como se mencionó anteriormente, se comenzará explicando conceptos y algoritmos de procesamiento para imágenes en escala de grises. Muchos de estos conceptos son aplicables directamente a las imágenes en color.

3.3.3.1 Resolución espacial y resolución en niveles de gris

La resolución espacial es el grado de detalle discernible en una imagen dado por el tamaño del píxel (picture element, el elemento más pequeño en una imagen) o la cantidad de píxeles. Y la resolución de nivel de gris se refiere al más pequeño cambio discernible en nivel de gris. La potencia de 2 que determina el número de niveles de gris es usualmente 8 bits, es decir, 256 diferentes niveles de gris ⁽³⁵⁾.

Usualmente decimos que una imagen digital de tamaño $M \times N$ con L niveles de gris tiene una resolución espacial de $M \times N$ píxeles y una resolución de nivel de gris de L niveles ⁽³⁵⁾.

En la siguiente figura se observa una misma imagen con una resolución de niveles de gris de 8 bits, pero con distintas resoluciones espaciales, las cuales son:

- a. 1024x1024
- b. 512x512
- c. 256x256
- d. 128x128
- e. 62x64
- f. 32x32

La imagen original tiene una resolución espacial de 1024x1024. Las sucesivas imágenes con resoluciones espaciales menores se obtienen de eliminar el número apropiado de filas y columnas de la imagen original.

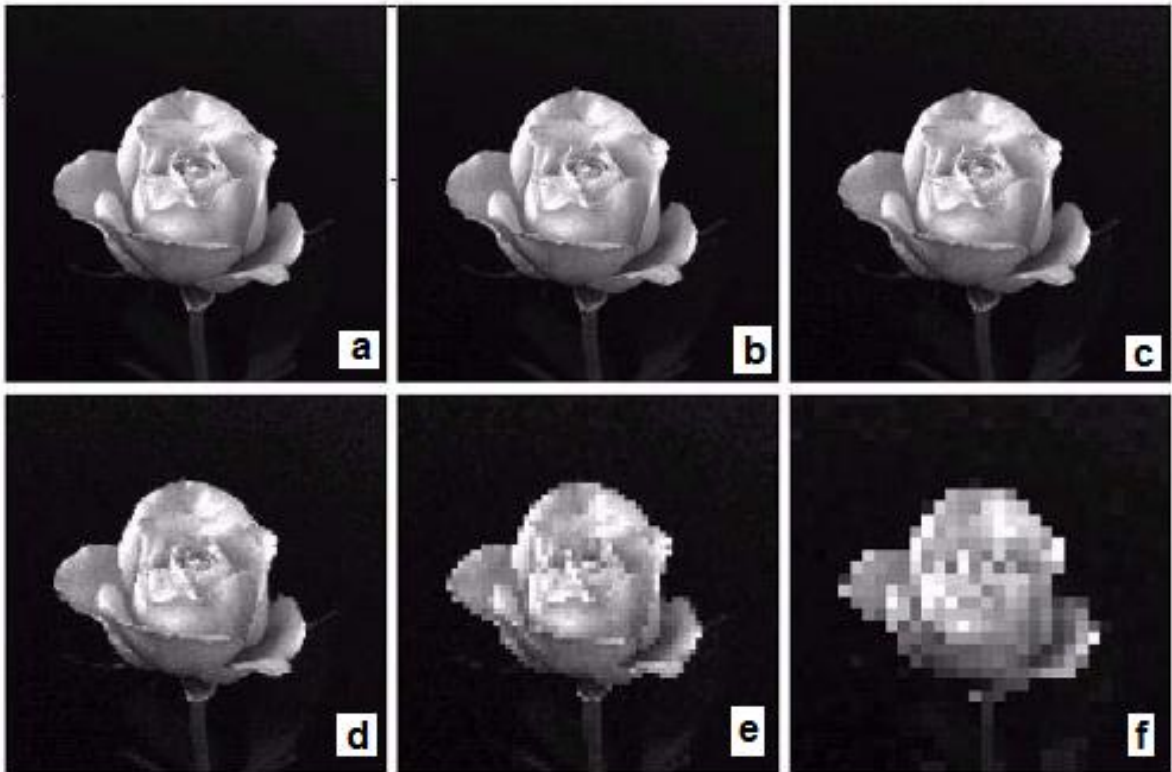


Fig. 3.3.2 Imágenes con distintas resoluciones espaciales ⁽³⁵⁾.

En la siguiente figura se observa el caso en el que la resolución espacial (472x374) se mantiene constante y lo que cambia es la resolución en los niveles de gris.

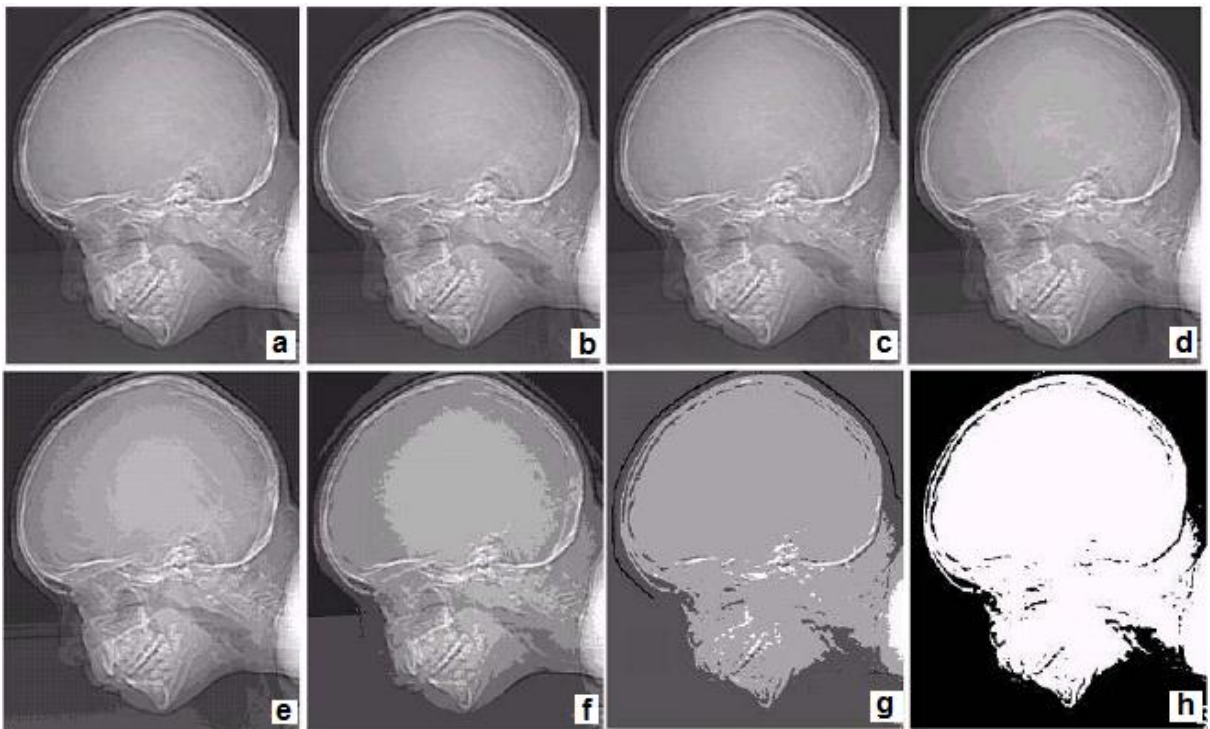


Fig. 3.3.3 Imágenes con distintas resoluciones en los niveles de gris ⁽³⁵⁾.

En la figura anterior:

- a. 256 niveles de gris
- b. 128 niveles de gris
- c. 64 niveles de gris
- d. 32 niveles de gris
- e. 16 niveles de gris
- f. 8 niveles de gris
- g. 4 niveles de gris
- h. 2 niveles de gris

3.3.3.2 Cambios en el tamaño de una imagen digital

Ampliar el tamaño de una imagen digital requiere de dos pasos:

1. La creación de nuevos lugares para píxeles
2. La asignación de niveles de gris para esos nuevos píxeles

Suponiendo que se tiene una imagen de 500x500 que queremos agrandar 1.5 veces a 750x750 píxeles, una de las maneras más fáciles de visualizar el proceso es superponer una malla imaginaria de 750x750 a la imagen original. Para asignar niveles de gris a cada punto en la malla sobrepuesta, se busca el píxel más cercano en la imagen original y le asignamos su nivel de gris al píxel de la malla. Este método de asignación de nivel de gris se llama interpolación por vecino más cercano ⁽³⁵⁾.

Un caso especial de la interpolación del vecino más cercano es la replicación de píxeles. Se puede aplicar cuando se quiere aumentar el tamaño de la imagen un número entero de veces. Por ejemplo, si se desea doblar el tamaño de la imagen, se duplica cada columna y a partir de la imagen resultante duplicamos cada renglón ⁽³⁵⁾.

La reducción de la imagen se logra con un proceso parecido. Si se quiere reducir a la mitad, se borra una columna sí y una no y lo mismo con los renglones. Si se desea reducir en un número no entero de veces, vamos a expandir la malla mencionada anteriormente, de manera que sea del mismo tamaño que la imagen original, y aplicamos la interpolación por vecino más cercano.

Cabe destacar que existen otros métodos de interpolación pero para fines prácticos se explicó utilizando el del vecino más cercano sin pérdida de generalidad ⁽³⁵⁾.

3.3.3.3 Algunas relaciones básicas entre píxeles

3.3.3.3.1 Vecinos de un píxel

Un píxel p en las coordenadas (x,y) tiene cuatro vecinos horizontales y verticales dados por:

$$(x + 1,y), (x - 1,y), (x,y + 1), (x,y - 1)$$

Este conjunto de píxeles, llamados los 4-vecinos de p , se denota como conjunto $N4(p)$.

Los cuatro vecinos diagonales de p tienen las coordenadas:

$$(x + 1, y + 1), (x + 1, y - 1), (x - 1, y + 1), (x - 1, y - 1)$$

Y se denota como conjunto $ND(p)$. Estos puntos, junto con $N4(p)$, son llamados los 8 vecinos de p , y se escriben como $N8(p)$. Algunos de ellos estarán fuera de la imagen si (x, y) está en el borde de la imagen ⁽³³⁾.

3.3.3.3.2 Conectividad, Regiones y fronteras

La conectividad entre píxeles es un concepto fundamental que simplifica la definición de numerosos conceptos de la imagen digital, como regiones y fronteras.

Para establecer si 2 píxeles están conectados, se debe determinar si son vecinos y si sus niveles de gris satisfacen un criterio predeterminado de similaridad (por ejemplo que sus niveles de gris sean iguales). En una imagen binaria (con valores 0 y 1), 2 píxeles pueden ser 4-vecinos, pero sólo se dice que están conectados si tienen el mismo valor ⁽³³⁾.

Conectividad

Si V es el conjunto de valores de niveles de gris que definen la conectividad entre píxeles de una imagen, podemos definir 3 tipos de conectividad:

a) 4-conectividad: 2 píxeles p y q con valores en V son 4-adyacentes si q está en el conjunto $N4(p)$.

b) 8-conectividad: 2 píxeles p y q con valores en V son 8-adyacentes si q está en el conjunto $N8(p)$.

c) m -conectividad (conectividad mixta): 2 píxeles p y q con valores de V son m -adyacentes si:

1 - q está en $N4(p)$ ó

2 - q está en $ND(p)$ y además el conjunto $N4(p) \cap N4(q)$ no tiene píxeles con valores de V .

La conectividad mixta es una modificación de la 8-conectividad que se introduce para eliminar las ambigüedades que surgen al utilizar 8-conectividad. Por ejemplo, considérese el arreglo de píxeles de la figura para $V = \{1\}$. Los 3 píxeles en la parte superior muestran múltiple 8-conectividad (ambigua), como se indica con las líneas punteadas. Esta ambigüedad desaparece al utilizar m -conectividad ⁽³³⁾.

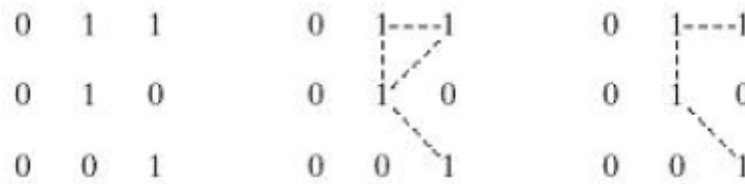


Fig. 3.3.4 Ejemplos de conectividad en una imagen binaria ⁽³⁵⁾.

Caminos, componentes conexas, conjuntos conectados, regiones

El camino de un píxel p con coordenadas (x,y) a un píxel q con coordenadas (s,t) es la secuencia de distintos píxeles con coordenadas $(x_0,y_0), (x_1,y_1), \dots, (x_n,y_n)$

Donde $(x_0, y_0) = (x, y)$ y $(x_n, y_n) = (s, t)$ y los píxeles (x_i, y_i) y (x_{i-1}, y_{i-1}) son adyacentes para todo $1 \leq i \leq n$. En este caso, n es la longitud del camino. Si $(x_0, y_0) = (x_n, y_n)$, el camino es cerrado ⁽³⁵⁾.

Sea S un subconjunto de píxeles en una imagen. Se dice que 2 píxeles p y q están conectados en S si existe un camino entre ellos que consiste enteramente de píxeles en S . Para cada píxel p en S , el conjunto de píxeles que está conectado a él en S se denomina componente conexas de S . Si sólo tiene un componente conexo, entonces el conjunto S se denomina conjunto conectado ⁽³⁵⁾.

Sea R un subconjunto de píxeles en una imagen. Llamamos R una región de la imagen si R es un conjunto conectado. La frontera (también llamada borde o contorno), de una región R es el conjunto de píxeles de la región que tienen uno o más vecinos que no están en R ⁽³⁵⁾.

Distancia entre píxeles

Para los píxeles p, q y z con coordenadas $(x,y), (s,t)$ y (v, w) respectivamente, D es una función de distancia si:

- $D(p,q) \geq 0$ -----> $D(p,q) = 0$ si y sólo si $p=q$
- $D(p,q) = D(q, p)$
- $D(p,z) \leq D(p,q) + D(q,z)$

La distancia euclidiana entre p y q se define como:

$$D_e(p,q) = [(x-s)^2 + (y-t)^2]^{1/2}$$

Lo que significa que los píxeles que tienen una distancia menor o igual al valor de r desde (x,y) son los que contiene un disco de radio r con centro en (x,y) ⁽³⁵⁾.

Operaciones entre píxeles

Existen básicamente dos tipos de operaciones entre píxeles:

- Operaciones aritméticas (suma, resta, multiplicación, división)
- Operaciones lógicas (AND, OR, NOT, XOR, etc.).

Por ejemplo, si se desea sumar dos imágenes, lo que se hace es sumar el píxel p de la imagen 1 con el píxel q de la imagen 2. Estos píxeles deben tener la misma posición en sus respectivas imágenes. De esta manera se obtiene una nueva imagen, y el valor de cada uno de sus píxeles es:

$$z(x, y) = p(x, y) + q(x, y)$$

De manera similar se hace con el resto de las operaciones aritméticas y las operaciones lógicas, estas últimas se aplican en su mayoría a imágenes binarias ⁽³⁵⁾.

3.3.4 Mejora de la imagen

La mejora de la imagen se refiere a la acentuación de algunas de sus características tales como bordes o contraste para permitir una más adecuada visualización y análisis de la misma, por lo que el objetivo fundamental de las técnicas usadas es procesar la imagen de manera tal que resulte más apta que la original para una aplicación específica.

Es de destacar que en este proceso no se añade información a la que ya poseen los datos, pero aumentando el rango dinámico de una característica elegida, ésta puede ser detectada y analizada con mayor facilidad.

Es importante tener en cuenta el tipo de imagen y para qué va a ser usada, ya que un método de mejora apto para imágenes de rayos X, puede no ser conveniente para el procesado de una imagen satelital.

Una primera aproximación de las técnicas de mejora permite agruparlas en:

1. Métodos en el dominio espacial
2. Métodos en el dominio de la frecuencia ⁽³⁵⁾

3.3.4.1 Métodos de mejora en el dominio espacial

El término dominio espacial se refiere al plano mismo de la imagen, y los métodos en esta categoría están basados en la directa manipulación de los píxeles de una imagen, y pueden clasificarse en:

- a. Transformaciones de intensidad o de niveles de gris
- b. Filtrado espacial o convolución espacial

Los métodos de referencia operan directamente sobre los píxeles y pueden expresarse como:

$$g(x, y) = T[f(x, y)]$$

Donde $f(x,y)$ es la imagen de entrada, $g(x,y)$ es la imagen procesada y T es un operador que actúa sobre f en algún entorno de (x,y) .

Normalmente el entorno se define como una área de subimagen cuadrada o rectangular centrada en (x,y) , aunque a veces se usan otros tipos tales como los círculos. El centro de la subimagen se mueve píxel a píxel y se aplica en operador en cada posición (x,y) para obtener la imagen de salida ⁽³⁵⁾.

3.3.4.1.1 Transformaciones de intensidad o de niveles de gris

Procesamiento de punto

La forma más simple de T corresponde a un entorno 1×1 , en cuyo caso g depende sólo del valor de f en el punto (x,y) . Como la mejora en cada punto depende sólo del nivel de gris en ese punto, las técnicas de esta categoría se designan como procesamiento de punto. En estas condiciones, T se convierte en una función de transformación del nivel de gris de la forma:

$$s = T(r)$$

Donde r y s indican el nivel de gris de $f(x,y)$ y $g(x,y)$ respectivamente. En la siguiente figura, se muestra en (a) el efecto de producir una imagen de mayor contraste que la inicial, al oscurecer los niveles de gris que se encuentran por debajo de m e iluminar los niveles por arriba de este valor en la imagen original. Esta técnica es conocida como de aumento de contraste ⁽³⁵⁾.

En la figura (b), $T(r)$ produce una imagen de dos niveles (binaria).

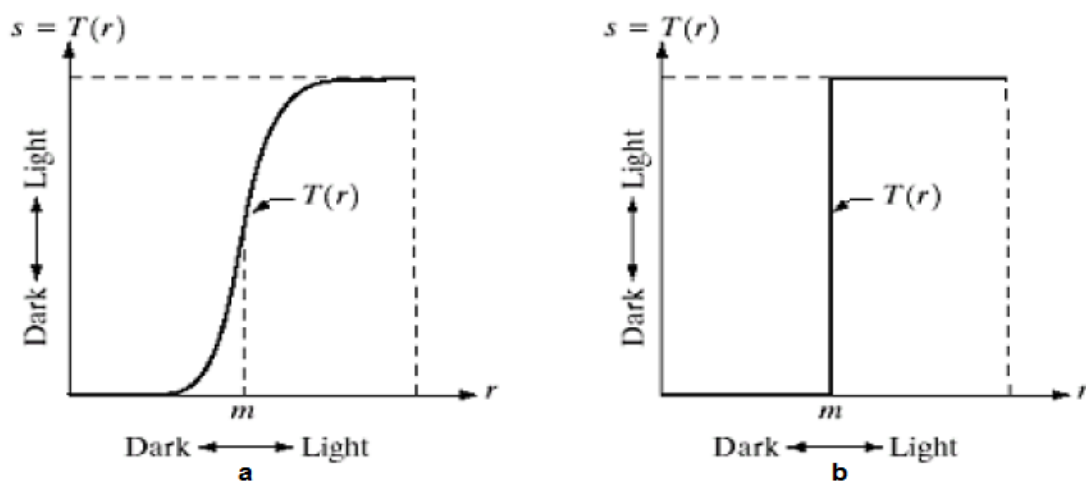


Fig. 3.3.5 (a) Aumento de contraste. (b) Imagen binaria ⁽³⁵⁾.

En la siguiente figura se muestran tres tipos de funciones básicas utilizadas frecuentemente en la mejora de la imagen:

- Lineal
- Logarítmica
- De potencia

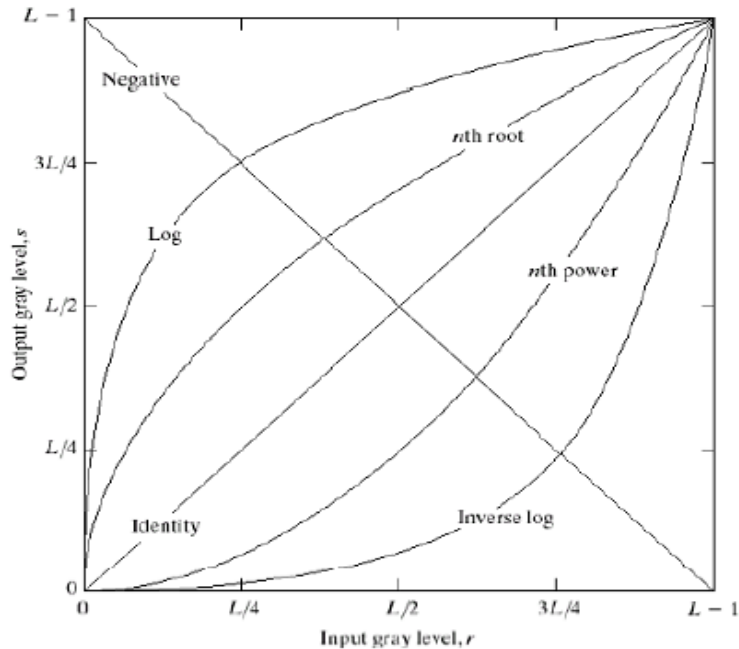


Fig. 3.3.6 Funciones básicas utilizadas en la mejora de la imagen ⁽³⁵⁾.

Transformación lineal

Como se observa en la figura anterior, hay dos tipos de transformaciones lineales:

- La lineal produce como resultado una imagen idéntica a la de entrada
- La negativa da como resultado el negativo de la imagen original ⁽³⁵⁾.

En la figura siguiente en (a) se ve la imagen original de una mamografía y en (b) el negativo de la misma.

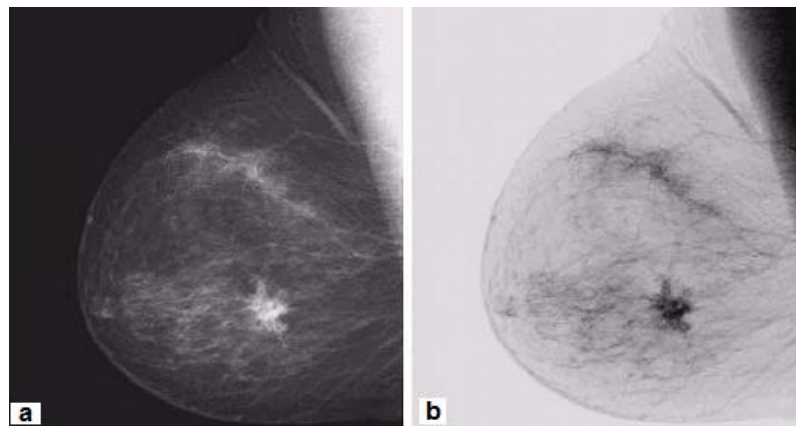


Fig. 3.3.7 Transformación lineal.

(a) Imagen idéntica a la de entrada. (b) Negativo de la imagen ⁽³⁵⁾.

Transformación logarítmica

Cuando el rango dinámico de una imagen excede la capacidad del dispositivo de presentación, en cuyo caso sólo las partes más brillantes de la imagen aparecerán en la pantalla, es usual recurrir a una transformación logarítmica del tipo:

$$s = c \cdot \log(1 + |r|)$$

Donde c es un factor de escala, y se asume que $r \geq 0$. Esta transformación realiza la compresión deseada.

Esta es la técnica usada para representar la Transformada de Fourier, donde el rango dinámico es habitualmente mucho mayor que el de los sistemas de visualización estándar que son capaces de reproducir fielmente, en consecuencia sólo las partes más brillantes de la imagen son visibles en la pantalla.

En la siguiente figura en (a) se observa la Transformada de Fourier de una imagen, y en (b) la transformación logarítmica de esta con $c=1$ ⁽³⁵⁾.

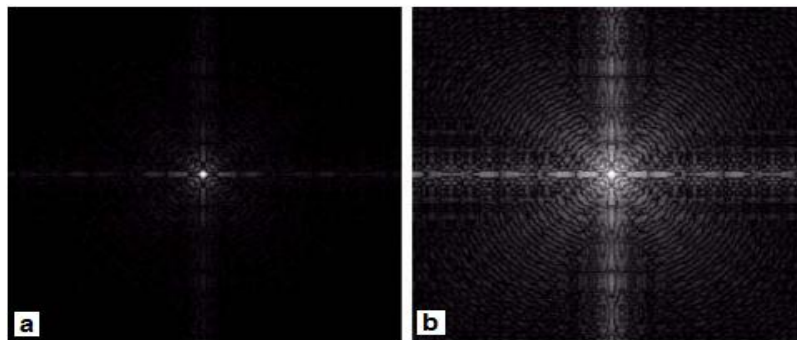


Fig. 3.3.8 (a) Transformada de Fourier de una imagen. (b) Transformación logarítmica de la imagen "a" ⁽³⁵⁾.

Como se puede ver la transformación logarítmica ayuda a visualizar niveles de gris antes no distinguibles.

La transformación logarítmica inversa lleva a cabo una transformación contraria a la anterior.

Transformación de potencia

Las transformaciones de función de potencia tienen la forma básica

$$s = c \cdot r^\gamma$$

Donde c y γ son constantes ⁽³⁵⁾.

En la siguiente figura se muestran los distintos gráficos de función para distintos valores de γ . Las curvas que corresponden a valores de $\gamma > 1$ tienen un efecto contrario sobre la imagen a las que tienen $\gamma < 1$.

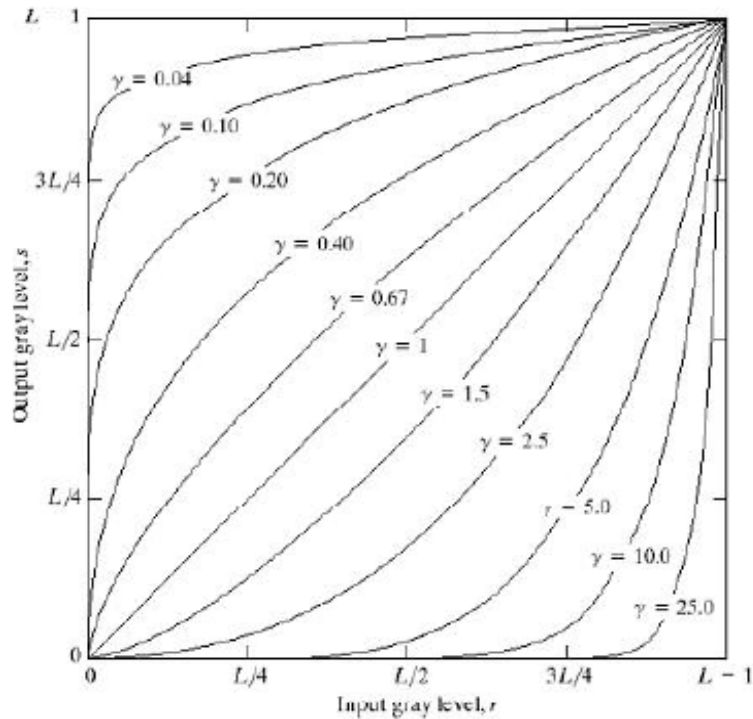


Fig. 3.3.9 Curvas de transformación de potencia ⁽³⁵⁾.

La aplicación de estas curvas sobre una imagen tiene un resultado similar a la transformación logarítmica.

Esta transformación también se utiliza para manipular el contraste de una imagen como se muestra en las siguientes figuras.

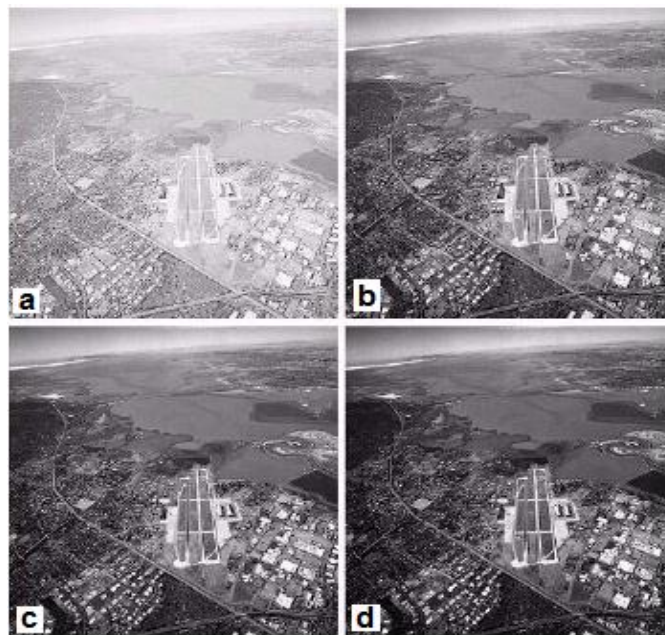


Fig. 3.3.10 Aumento de contraste Como resultado de aplicar distintas transformaciones de potencia ⁽³⁵⁾.

En la figura (a) se observa la imagen original, y en (b), (c) y (d) se muestra el aumento de contraste producido con $c=1$ y con valores de gamma de 3.0, 4.0 y 5.0 respectivamente.

Transformación lineal por partes

Fraccionamiento del nivel de gris

A veces se desea destacar un rango específico de nivel de gris en una imagen apoyándose la solución en una de estas dos ideas básicas:

1. Adjudicar un nivel alto a aquellos niveles de gris en el rango de interés, y un valor bajo para los restantes (Figura a).
2. Aumentar el nivel de gris del rango de interés, pero preservar el resto de los valores naturales (Figura b) ⁽³⁵⁾.

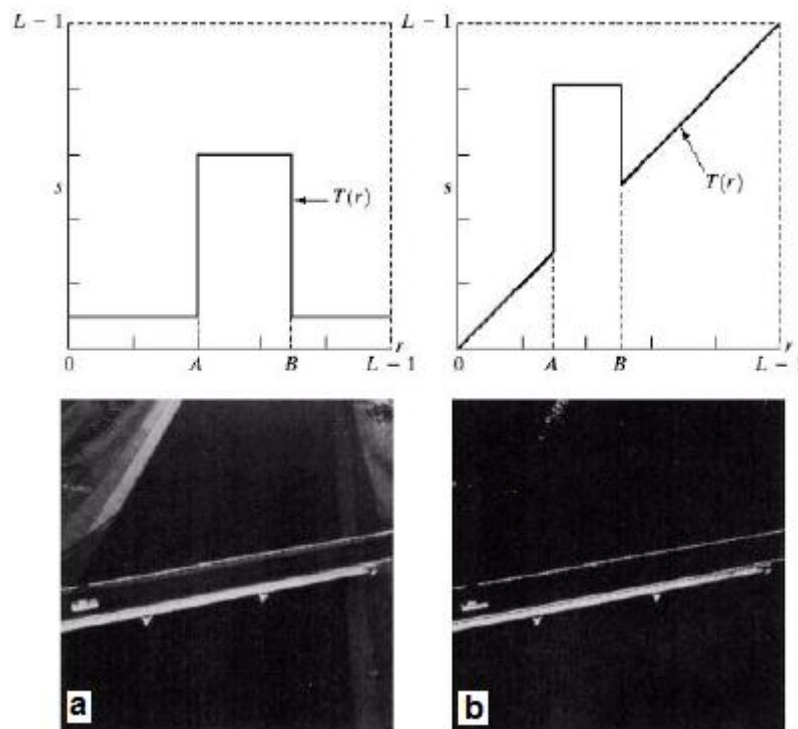


Fig. 3.3.11 Transformaciones lineales para el fraccionamiento del nivel de gris ⁽³⁵⁾.

Aumento de contraste

En la siguiente figura se observa una transformación típica de aumento de contraste. Los puntos de control (r_1, s_1) y (r_2, s_2) determinan la forma de la función de transformación.

- Si $r_1=s_1$ y $r_2=s_2$ la transformación es una función lineal que no produce cambios en el nivel de gris.

- Si $r_1=r_2$, $s_1=0$ y $s_2=L-1$, la transformación se vuelve una función de umbral cuyo resultado es una imagen binaria ⁽³⁵⁾.

Valores intermedios producen distintos grados de distribución del nivel de gris, afectando el contraste.

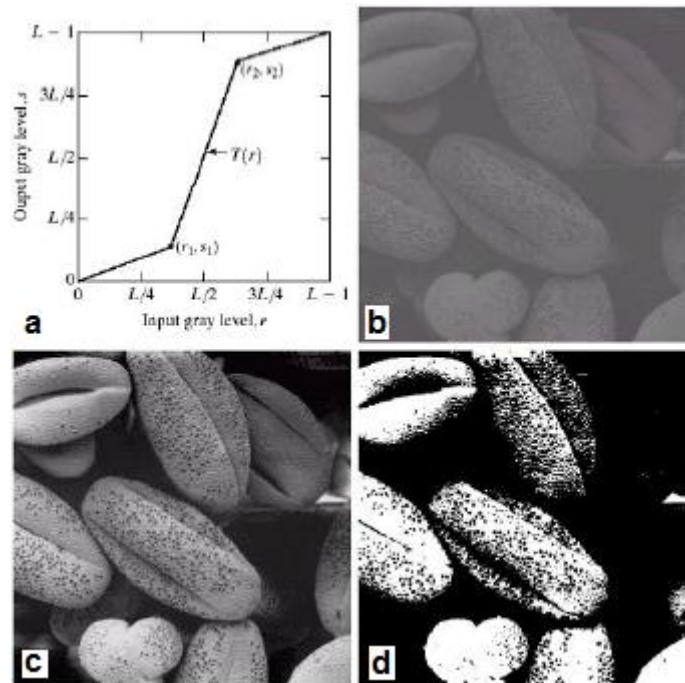


Fig. 3.3.12 Transformación lineal para el aumento del contraste ⁽³⁵⁾.

En la figura:

- Función de transformación
- Imagen con bajo contraste
- Resultado de aumento de contraste
- Resultado de aplicar la función de umbral

Modificación del histograma

Puede encararse el mejoramiento de la imagen actuando sobre el histograma. El histograma de una imagen digital con niveles de gris en el rango $[0, L-1]$ es una función discreta definida como:

$$p(r_k) = nk/n$$

Donde "rk" es el k-ésimo nivel de gris, "nk" es el número de píxeles de la imagen con ese nivel de gris, n es el número total de píxeles de la imagen y $k=0, 1, 2, \dots, L-1$ ⁽³³⁾.

A continuación en la figura se muestran 4 tipos de histogramas según la imagen sea:

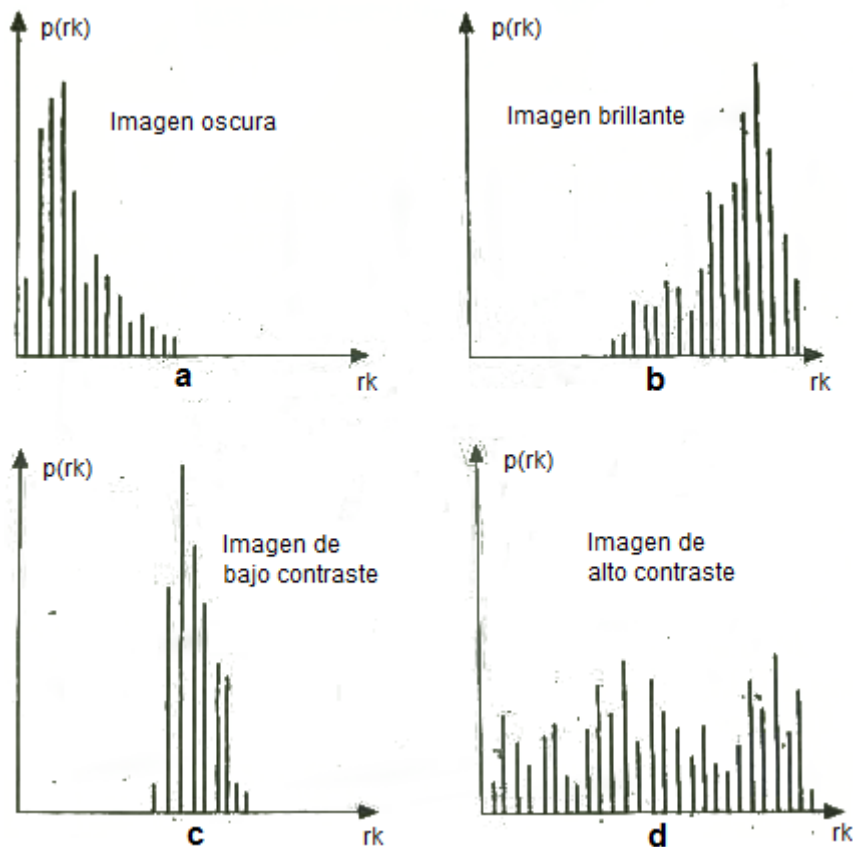


Fig. 3.3.13 Histogramas típicos según el tipo de imagen ⁽³³⁾.

Se observa que $p(rk)$ da una estimación de la probabilidad de que aparezca el nivel de gris "rk". La suma de los componentes de un histograma normalizado es igual a 1.

Si se parte de una formulación continua, para cada r del intervalo $[0,1]$, y nos centramos en las transformaciones de la forma $s = T(r)$ que producen un nivel de gris s para cada valor de píxel r de la imagen original, la función de transformación debe cumplir con las siguientes propiedades:

- a) $T(r)$ da un valor único y monótonamente creciente en el intervalo $0 \leq r \leq 1$
- b) $0 \leq T(r) \leq 1$ para $0 \leq r \leq 1$ ⁽³³⁾

La condición a) preserva el orden entre negro y blanco de la escala de grises, mientras que la condición b) garantiza una aplicación que es coherente con el rango de valores de píxeles permitidos. Los niveles de gris se pueden ver como cantidades que varían aleatoriamente, y pueden caracterizarse por su densidad de probabilidades $p_r(r)$ y $p_s(s)$ ⁽³³⁾.

De la teoría elemental de probabilidades, si $P_r(r)$ y $T(r)$ son conocidas y $T^{-1}(s)$ verifica la condición a), entonces se satisface:

$$p_s(s) = \left[p_r(r) \frac{dr}{ds} \right]_{r=T^{-1}(s)} \quad (1)$$

Una técnica de mejora se basa en la modificación de la apariencia de una imagen digital al controlar la función de densidad de probabilidad de sus niveles de gris por medio de una función de transformación $T(r)$ ⁽³³⁾.

Sea la función de transformación (función de distribución acumulada de r):

$$s = T(r) = \int_0^r p_r(w)dw \quad \text{para } 0 \leq r \leq 1$$

Y donde:

$$\frac{ds}{dr} = p_r(r)$$

Sustituyendo en (1) se tiene:

$$p_s(s) = \left[p_r(r) \frac{1}{p_r(r)} \right]_{r=T^{-1}(s)} = 1 \quad \text{para } 0 \leq s \leq 1$$

Que da una densidad uniforme en el intervalo de definición de la variable transformada s .

Esto significa que cuando se emplee una función de transformación igual a la función de distribución acumulada de r se produce una imagen cuyos niveles de gris tiene densidad uniforme ⁽³³⁾.

La técnica empleada se llama "*ecualización o linealización del histograma*". La ventaja que presenta este algoritmo frente a la manipulación manual del contraste es que su aplicación resulta completamente automática, esto es la información necesaria para implementar este proceso puede ser extraído de la propia imagen original, aunque sólo sea capaz de generar una aproximación a un histograma plano ⁽³³⁾.

A veces se desea tener la posibilidad de especificar determinados perfiles del histograma capaz de detectar determinados niveles de gris, lo que lleva a considerar el histograma original y el que se desea obtener, desarrollándose para este propósito un método llamado "*especificación del histograma*" ⁽³³⁾.

Estos dos métodos son globales, en el sentido de que los píxeles se modifican mediante una función de transformación basada en la distribución de los niveles de gris en toda la imagen ⁽³³⁾.

Aunque a veces resulta de interés la mejora general de la imagen, a menudo se requiere actuar sobre los detalles en un área pequeña de la misma. Una solución consiste en generar funciones de transformación

basadas en la distribución de los niveles de gris en una vecindad de cada píxel de la imagen ⁽³³⁾.

3.3.4.1.2 Filtrado espacial

El filtrado espacial plantea otra visión del problema. Se basa en el empleo de máscaras espaciales, también llamados filtros espaciales.

La idea es simple: Consiste en determinar g en el punto (x,y) a partir de los valores de f en un entorno predefinido en (x,y) .

Normalmente se basa en el empleo de *máscaras* (plantillas, ventanas o filtros), las cuales son una pequeña distribución bidimensional (por ejemplo 3x3) en la que los valores de los coeficientes determinan la naturaleza del proceso, el cual se llama procesamiento por máscaras o filtrado. En los filtros lineales la aproximación básica consiste en sumar productos entre los coeficientes de la máscara y las intensidades de los píxeles bajo la máscara en un punto determinado de la imagen ⁽³³⁾.

$$\begin{bmatrix} W1 & W2 & W3 \\ W4 & W5 & W6 \\ W7 & W8 & W9 \end{bmatrix}$$

La matriz anterior es una máscara 3x3 con pesos " w_i ". Con " z_i " se indican los píxeles de la imagen en los lugares correspondientes. El píxel que ocupa la posición 5 se reemplaza por R con:

$$R = w_1 z_1 + w_2 z_2 + \dots + w_9 z_9$$

Luego se traslada la máscara hasta el píxel siguiente y se repite el procedimiento.

Los filtros espaciales no lineales operan también en entornos, pero su operación se basa directamente en los valores de los píxeles y no utilizan explícitamente los coeficientes como en el caso lineal. Entre los más comunes se encuentran los que calculan la mediana del nivel de gris en el entorno, o el filtro de máximo con $R = \text{máx}\{z_i\}$ ⁽³³⁾.

Filtros suavizantes

Se emplean para lograr que la imagen aparezca algo borrosa en algunas etapas del preprocesado, para la eliminación de los pequeños detalles antes de la extracción de un objeto. También para la reducción de ruido mediante el aumento de la borrosidad ⁽³³⁾.

A modo ilustrativo se observa en la siguiente figura un filtro pasa bajo unidimensional.

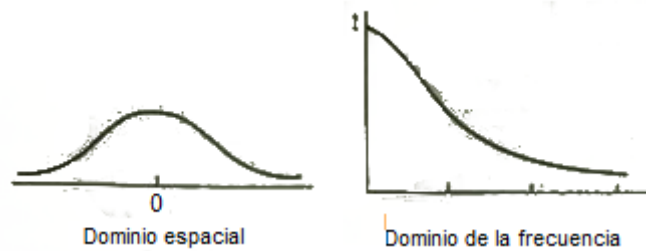


Fig. 3.3.14 Filtro suavizante ⁽³³⁾.

Se puede ver que en el dominio espacial todos los coeficientes son positivos. La construcción más simple sería como:

$$1/9 \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

La respuesta R en este caso será el valor promedio de todos los píxeles en el área de la máscara, por lo cual se suele llamar máscara de promediado. Una de las principales dificultades en este tipo de máscaras es que difumina los bordes y otros detalles de realce. Para eliminar ruido se puede usar un filtro de mediana el cual no es lineal pero más robusto al borrono ⁽³³⁾.

Filtros realzantes

El objetivo de estos filtros es destacar los detalles finos de una imagen o intensificar los detalles. Entre estos se encuentran los filtros pasa alto, un ejemplo unidimensional se muestra en la siguiente figura:

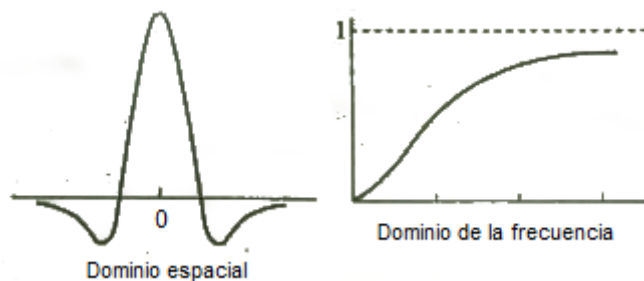


Fig. 3.3.15 Filtro realzante ⁽³³⁾.

Observando la figura en el dominio espacial, se deduce que la máscara debe tener valores positivos en su centro y negativos en la periferia. Por ejemplo:

$$1/9 \begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ -1 & 8 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix}$$

Se puede observar que la suma de todos los coeficientes es cero. Cuando la máscara está sobre un área de nivel de gris casi constante, la salida del filtro es cero o muy pequeña. Este filtro elimina el término de frecuencia cero y hace muy pequeñas las frecuencias bajas, por lo tanto provoca que la imagen queda muy oscura ⁽³³⁾.

Se obtienen sin embargo resultados mejores usando un filtro **high-boost**, el cual usa la idea de que una imagen filtrada pasa alto puede ser calculada como la diferencia entre la imagen original y la imagen filtrada pasa bajo ⁽³³⁾.

$$\text{Pasa Alto} = \text{Original} - \text{Pasa Bajo}$$

Multiplicando la imagen original por un factor de amplificación A se obtiene el filtro high-boost, y de aquí se deduce que:

$$\text{High-boost} = A \cdot \text{Original} - \text{Pasa Bajo}$$

$$\text{High-boost} = (A - 1) \cdot \text{Original} + \text{Original} - \text{Pasa Bajo}$$

$$\text{High-boost} = (A - 1) \cdot \text{Original} + \text{Pasa Alto}$$

- Si A=1 se tiene un filtro pasa alto normal.
- Si A>1 parte de la propia imagen original se añade al resultado del filtro pasa alto, lo que devuelve parcialmente las componentes de baja frecuencia, con lo que la imagen final se parece más a la original con un realce de los bordes, lo cual depende del valor de A ⁽³³⁾.

Otros filtros espaciales

Como se mencionó anteriormente el promediado de los píxeles en una región tiende a difuminar la imagen. Como esta operación es análoga a la integración, puede pensarse que la diferenciación produzca el efecto contrario, esto es aumentar la nitidez de una imagen. El método más común es el del gradiente ⁽³³⁾.

Para $f(x,y)$ el gradiente viene dado por:

$$\Delta f = \begin{bmatrix} \frac{\partial f}{\partial x} \\ \frac{\partial f}{\partial y} \end{bmatrix}$$

Y con un módulo:

$$mag(\Delta f) = \left[\left(\frac{\partial f}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial y} \right)^2 \right]^{1/2}$$

Se puede discretizar el problema y aproximarse por:

$$\Delta f = [(z5 - z8)^2 + (z5 - z6)^2]^{1/2}$$

A partir de la región de imagen:

$$\begin{bmatrix} z1 & z2 & z3 \\ z4 & z5 & z6 \\ z7 & z8 & z9 \end{bmatrix}$$

Otra opción es sumando los valores absolutos:

$$\Delta f = [|z5 - z8| + |z5 - z6|]$$

También puede usarse diferencias cruzadas:

$$\Delta f = [|z5 - z9| + |z6 - z8|]$$

Las cuales pueden ser implementadas con máscaras del tipo (máscaras de Roberts):

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ -1 & 0 \end{bmatrix}$$

Empleando un entorno 3x3 la aproximación al gradiente se puede hacer como:

$$\Delta f = |(z7 + z8 + z9) - (z1 + z2 + z3)| + |(z3 + z6 + z9) - (z1 + z4 + z7)|$$

Las máscaras generalmente usadas son:

$$\begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Máscaras de Roberts

$$\begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Máscaras de Sobel

Uno de los usos más frecuentes de estas máscaras es para destacar bordes.

3.3.4.2 Métodos de mejora en el dominio de la frecuencia

Los principios de filtrado en el dominio de la frecuencia son los estándares: Se calcula la Transformada de Fourier de la imagen a filtrar, se multiplica por la función de transferencia del filtro, y por antitransformada del producto se llega a la imagen mejorada ⁽³⁵⁾. A continuación la figura muestra este procedimiento:

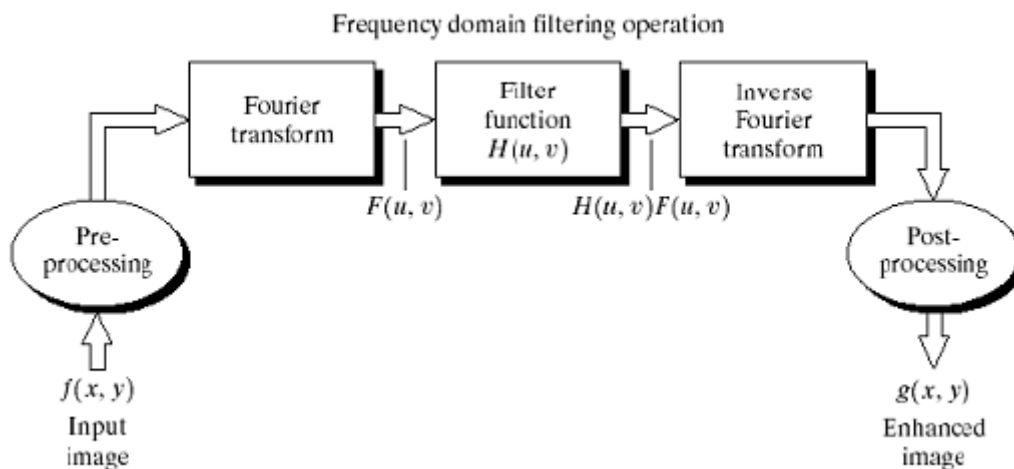


Fig. 3.3.16 Etapas de la mejora de la imagen en el dominio de la frecuencia ⁽³⁴⁾.

En el trabajo con imágenes se usan más a menudo las máscaras espaciales que sus correspondientes transformadas de Fourier porque resultan fáciles de implementar, aunque en algunos casos se necesita trabajar primero en el dominio de la frecuencia por resultar más adecuada su formulación inicial, considerando la correspondencia entre contenidos de frecuencia y la apariencia de la imagen ⁽³⁵⁾.

3.3.4.2.1 Filtrado Pasa bajo

Los bordes y otras transiciones bruscas en los niveles de gris contribuyen significativamente a los contenidos de alta frecuencia.

Luego el difuminado se consigue atenuando el rango específico de componentes de alta frecuencia en la transformada de la imagen con la aplicación de un filtro pasa bajo ⁽³³⁾.

$$G(u, v) = H(u, v) \cdot F(u, v)$$

Dónde:

- $F(u, v)$ es la T. de F. de la imagen a suavizar
- $G(u, v)$ es la T. de F. de la imagen suavizada
- $H(u, v)$ es la función de transferencia

Filtro Ideal Pasa bajo Bidimensional

$$H(u, v) = \begin{cases} 1 & \text{si } D(u, v) \leq D_0 \\ 0 & \text{si } D(u, v) > D_0 \end{cases}$$

Donde D_0 es una cantidad específica no negativa llamada frecuencia de corte, y

$D(u, v)$ es la distancia desde el punto (u, v) al origen de coordenadas del plano de frecuencias, y se expresa como:

$$D(u, v) = (u^2 + v^2)^{1/2}$$

Este filtro deja pasar todas las frecuencias (sin variación) dentro de un círculo de radio D_0 , mientras que todas las frecuencias de afuera quedan atenuadas completamente.

Para este tipo de filtro es suficiente especificar su sección transversal, donde la función de transferencia completa puede generarse haciendo girar esta sección 360° alrededor del origen ⁽³³⁾.

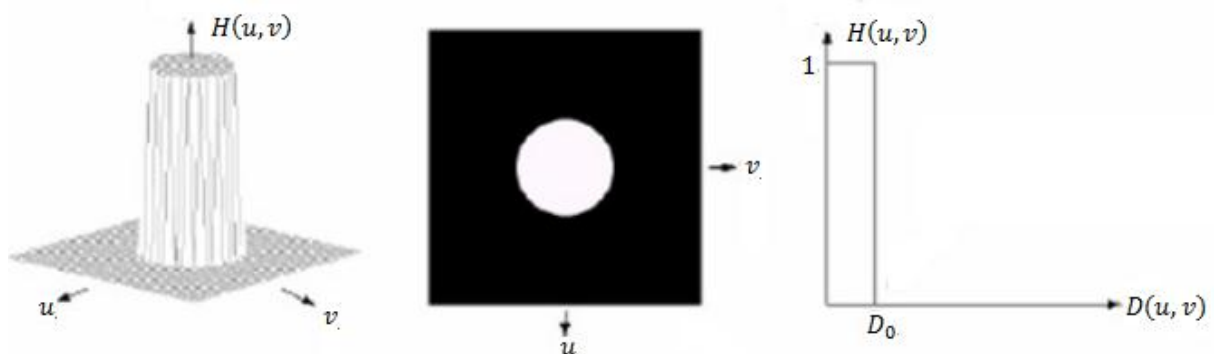


Fig. 3.3.17 Filtro pasa bajo ideal ⁽³⁴⁾.

Filtro Butterworth Pasa bajo

La función de transferencia de este filtro de orden n y con emplazamiento de la frecuencia de corte a una distancia D_0 del origen, está dada por:

$$H(u, v) = \frac{1}{1 + [D(u, v)/D_0]^{2n}}$$

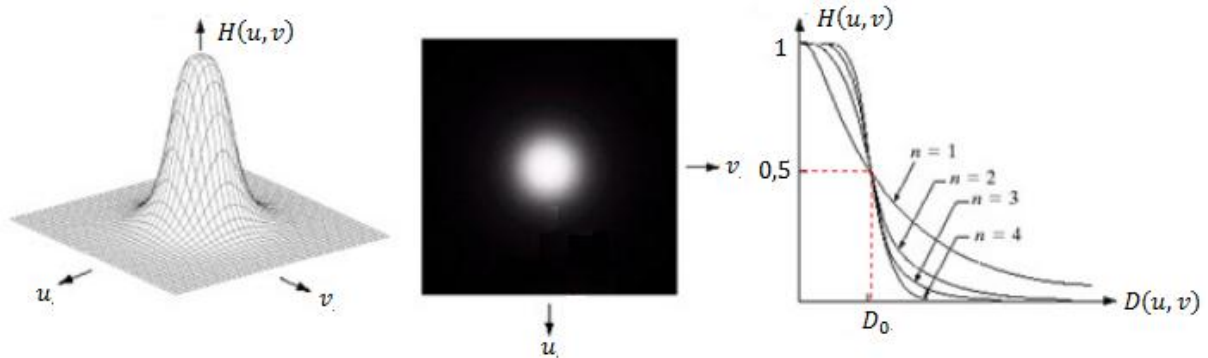


Fig. 3.3.18 Filtro Butterworth pasa bajo ⁽³⁴⁾.

A diferencia del filtro ideal, éste carece de una discontinuidad brusca, que establezca un corte claro entre las frecuencias transmitidas y las filtradas.

En estos casos es usual definir la frecuencia de corte a partir del lugar de los puntos donde la función $H(u, v)$ corresponde a una determinada fracción de su valor máximo ⁽³³⁾.

Valores comúnmente usados son:

- 0.5 del valor máximo de $H(u, v)$
- 0.7 del valor máximo de $H(u, v)$

3.3.4.2.2 Filtrado Pasa alto

Filtro Ideal Pasa alto Bidimensional

Así como el filtro pasa bajo conduce a un difuminado de la imagen, el filtro pasa alto ideal realiza una tarea de realce de la misma. Para el filtro ideal:

$$H(u, v) = \begin{cases} 0 & \text{si } D(u, v) \leq D_0 \\ 1 & \text{si } D(u, v) > D_0 \end{cases}$$

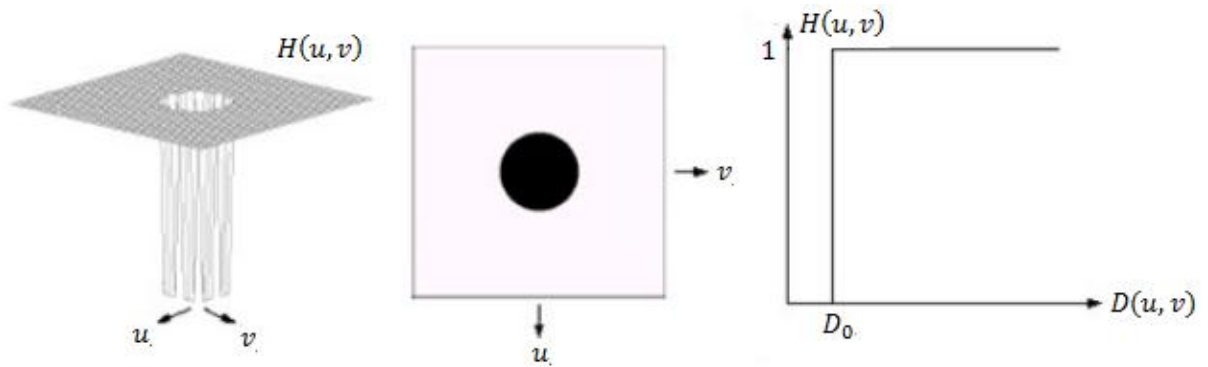


Fig. 3.3.19 Filtro pasa alto ideal ⁽³⁴⁾.

Filtro Butterworth Pasa alto

La función de transferencia de orden n y con frecuencia de corte a una distancia D_0 del origen está dada por:

$$H(u, v) = \frac{1}{1 + [D_0/D(u, v)]^{2n}}$$

Como en el filtro Butterworth pasa bajo, la frecuencia de corte se selecciona normalmente en los puntos en que $H(u, v)$ está por debajo de 0.70 de su valor máximo ⁽³³⁾.

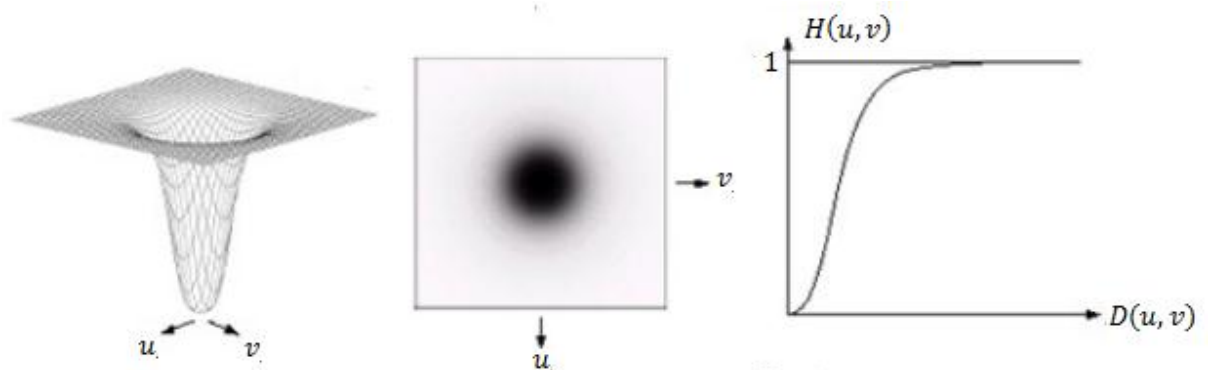


Fig. 3.3.20 Filtro Butterworth pasa alto ⁽³⁴⁾.

3.3.5 Procesamiento del color

El uso del color en el procesamiento de imágenes está motivado porque el mismo es un poderoso descriptor que simplifica la identificación de objetos y su extracción de una escena ⁽³⁵⁾.

3.3.5.1 Fundamentos del color

Los colores que los humanos perciben de un objeto, están determinados por la naturaleza de la luz reflejada desde el objeto. La luz visible se compone de una delgada banda de frecuencias dentro del espectro electromagnético. Un cuerpo que refleja luz balanceada en todas las longitudes de onda visibles será blanco. Sin embargo si un cuerpo refleja un rango limitado de longitudes de onda, mostrará algunos tonos de color ⁽³⁵⁾.

La luz cromática como se vio anteriormente ocupa el rango de las longitudes de onda que van desde los 400 nm a los 700 nm aproximadamente.

Se utilizan 3 cantidades básicas para describir la calidad de una fuente de luz cromática:

- ***Radiancia:*** Es el total de energía proveniente de la fuente, y se mide en Watts.
- ***Luminancia:*** Es una medida de la cantidad de energía percibida por un observador, y se mide en lúmenes.
- ***Brillo:*** Engloba la noción acromática de la intensidad, y es una medida altamente subjetiva.

Por ejemplo, la luz emitida por una fuente que opera en el infrarrojo lejano tendría una radiancia bastante significativa (energía), pero un observador apenas la percibirá (su luminancia sería casi cero) ⁽³⁵⁾.

3.3.5.2 Los conos, los colores primarios y los colores secundarios

Los conos son los sensores del ojo responsables de la visión a color. Experimentalmente se ha determinado que de los 6 a 7 millones de conos del ojo humano pueden subdividirse en tres tipos, que corresponden al rojo, verde y azul. Aproximadamente el 65% es sensible a la luz roja, el 33% a la verde y el 2% lo es a la azul, aunque los conos de la luz azul son los más sensibles ⁽³⁵⁾. A continuación se muestra la absorción de luz de los conos en función de la longitud de onda.

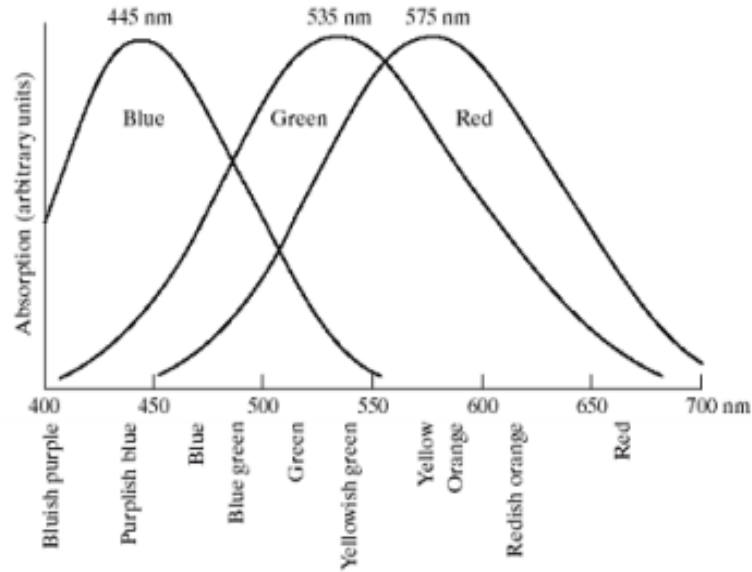


Fig. 3.3.21 Absorción de la luz según el tipo de cono en función de la longitud de onda ⁽³⁵⁾.

Debido a estas características de absorción, los colores se ven como combinaciones variables de los llamados colores primarios rojo (R), verde (G) y azul (B).

Los colores primarios pueden ser sumados para producir los colores secundarios:

- Magenta: Rojo + Azul
- Cian: Azul + Verde
- Amarillo: Rojo + Verde

Si sumamos todos los colores primarios (Rojo + Verde + Azul) se obtiene el blanco ⁽³⁵⁾.

Es importante diferenciar los colores primarios de la luz de los colores primarios de los pigmentos. Los colores primarios de los pigmentos (cian, magenta y amarillo) son consecuencia por un proceso de sustracción, es decir, cuando la luz incide sobre un determinado pigmento, se sustrae un color primario de la luz (rojo, verde o azul), y se reflejan los otros dos, observándose la correspondiente mezcla ⁽³⁵⁾.

Es por estos conceptos que surgen los siguientes modelos de colores:

1. RGB (Red, Green, Blue): Es un modelo de suma de colores.
2. CMY (Cian, Magenta, Yellow): Es un modelo de resta de colores.

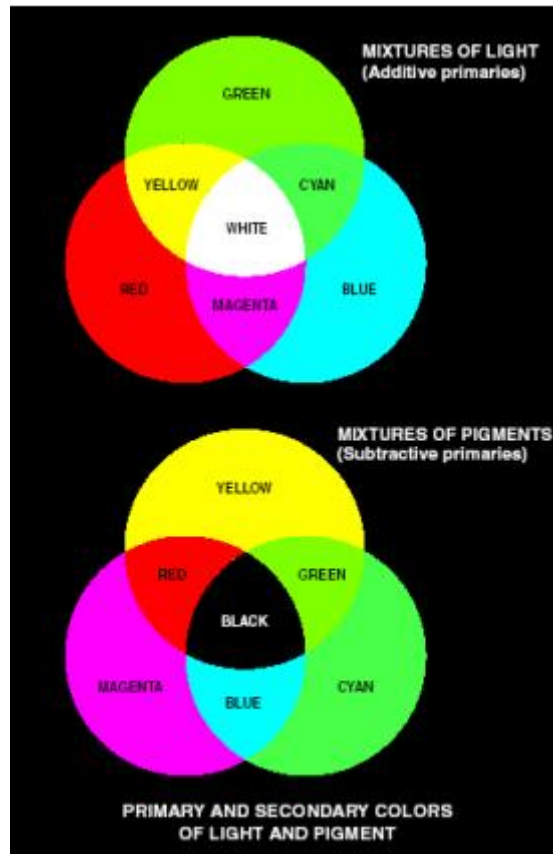


Fig. 3.3.22 Modelo RGB vs modelos CMY ⁽³⁵⁾.

3.3.5.3 Tono, brillo y saturación

Las características que generalmente se utilizan para distinguir un color de otro son el brillo, el tono y la saturación.

- **Brillo:** Se entiende como la capacidad de un color para reflejar la luz blanca que incide sobre él. Alude a la claridad u oscuridad de un tono.
- **Tono:** Es la longitud de onda dominante en una mezcla de ondas de luz. El color dominante que percibe un observador.
- **Saturación:** Se basa en la pureza de un color, un color muy saturado se ve vivo e intenso, y un color menos saturado parece descolorido y gris. Sin saturación un color se convierte en un tono de gris ⁽³⁵⁾.

Los colores puros del espectro están totalmente saturados. Se llama cromaticidad al tono y saturación juntos. Entonces podemos caracterizar un color por su cromaticidad y su brillo.

3.3.5.4 Modelos de color

El propósito de un modelo de color es facilitar la especificación de colores de un modo estándar. Un modelo de color es la especificación de un sistema de coordenadas y el subespacio dentro de él donde el color puede ser representado por un solo punto.

La mayoría de los modelos de color en uso se orientan ya sea al hardware, o a las aplicaciones donde la manipulación del color es el objetivo.

Los modelos orientados a hardware más comunes son el RGB (rojo, verde, azul), para monitores a color y cámaras; el CMY (cian, magenta, amarillo) y CMYK (cian, magenta, amarillo y negro) para impresión a color; y el HSI (tono, saturación, intensidad), que se acerca a la manera como el ojo humano describe e interpreta el color ⁽³⁵⁾.

3.3.5.4.1 Modelo RGB

En el modelo RGB, cada color aparece en sus componentes primarios de la luz (rojo, verde, y azul). Este modelo se basa en un sistema de coordenadas cartesianas que forma un cubo en el que los valores RGB están en 3 esquinas. Los valores de cian, magenta y amarillo están en las otras 3 esquinas, el negro está en el origen y el blanco está en el vértice más alejado del origen ⁽³⁵⁾.

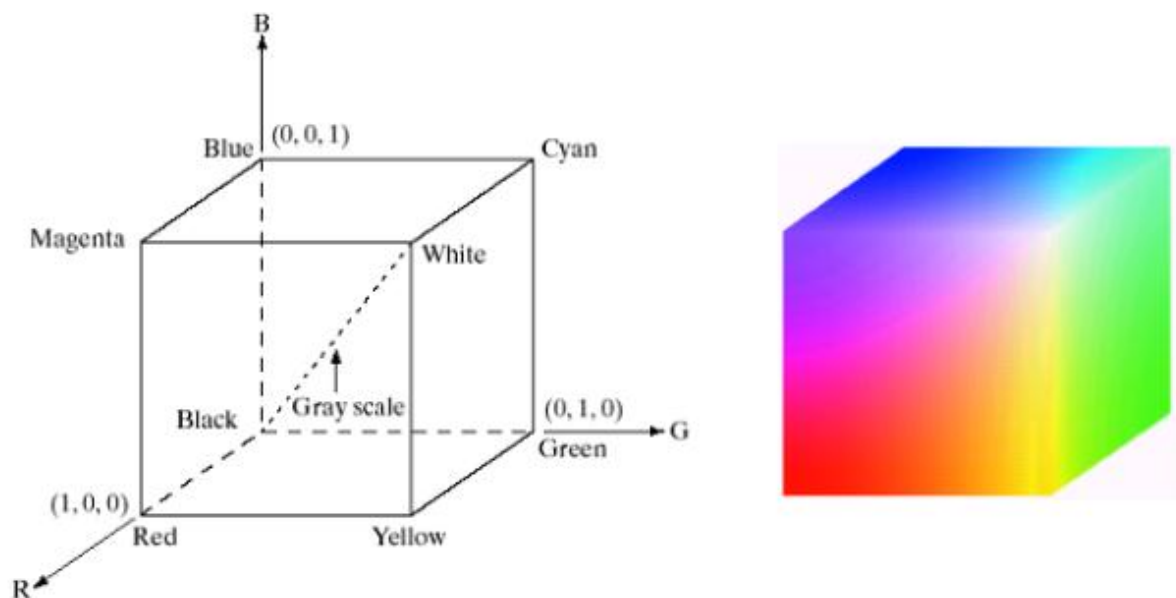


Fig. 3.3.23 Modelo RGB ⁽³⁵⁾.

La escala de gris (puntos con valores de RGB iguales) se extiende del negro al blanco en la línea que une los puntos negro y blanco. Los diferentes colores del modelo son puntos sobre o dentro del cubo, y se definen por medio de vectores que se extienden desde el origen. Las imágenes

representadas en el modelo RGB consisten en 3 imágenes componentes, cada una de un color primario ⁽³⁵⁾.

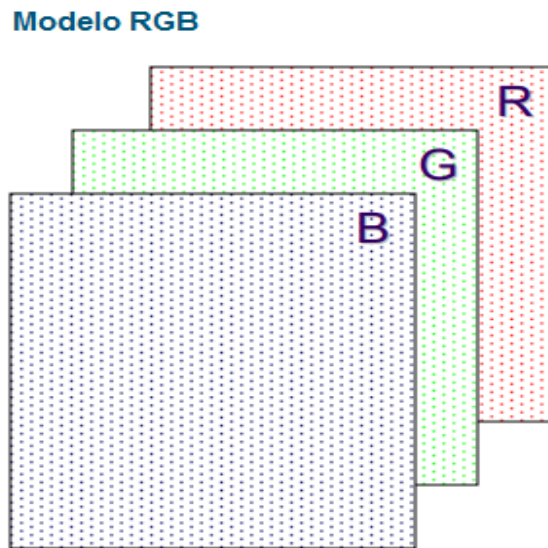


Fig. 3.3.24 Representación matricial de los tres canales del modelo RGB ⁽³⁵⁾.

El número de bits utilizado para representar cada pixel en el espacio RGB se llama profundidad de pixel. Suponiendo una imagen en la que cada una de las imágenes roja, azul y verde es una imagen de 8 bits. En estas condiciones se dice que cada pixel de color RGB tiene una profundidad de 24 bits. El número total de colores posibles en una imagen RGB de 24 bits es de $(2^8)^3 = 16.777.216$ ⁽³⁵⁾.

3.3.5.4.2 Modelo HSI

Como se vio anteriormente, crear los colores en los modelos RGB, CMY y cambiar de un modelo a otro es sencillo, además de que estos sistemas son muy convenientes para implementaciones de hardware. El sistema RGB también es compatible con el hecho de que el ojo humano es altamente perceptivo a los primarios rojo, verde y azul. Desgraciadamente este tipo de modelos de color no son convenientes para describir colores en los términos prácticos para la interpretación humana. Cuando un ser humano ve un objeto de color, lo describe por su tono, saturación y brillo. El modelo que se presenta en esta sección, llamado modelo de color HSI (hue, saturation, intensity: tono, saturación e intensidad) separa el componente de intensidad de la información de un color. Como resultado, este modelo es una herramienta ideal para desarrollar algoritmos basados en descripciones de color naturales e intuitivas para los seres humanos. El modelo RGB, después de todo, es ideal para generación de imágenes a color, pero su uso para la descripción de color es limitado ⁽³⁵⁾.

En esta transformación el cubo RGB se transforma en el cilindro HSI.

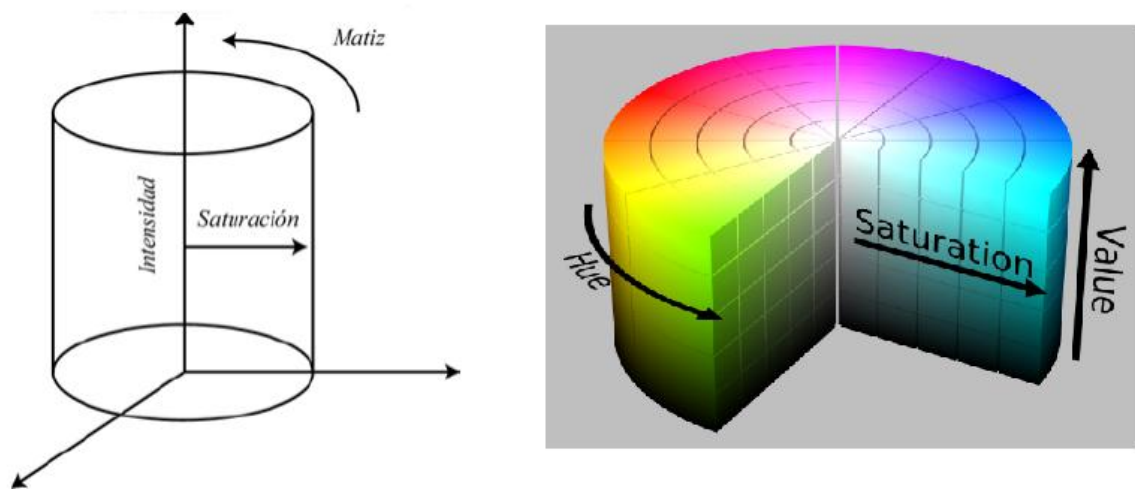


Fig. 3.3.25 Modelo HSI ⁽³⁶⁾.

La saturación corresponde a la distancia radial, la intensidad es la distancia perpendicular al plano de coordenadas polares y el tono o matiz corresponde al ángulo del sistema de coordenadas polares.

Los colores primarios están separados entre sí por 120°, y los secundarios están separados a 60° de los primarios.

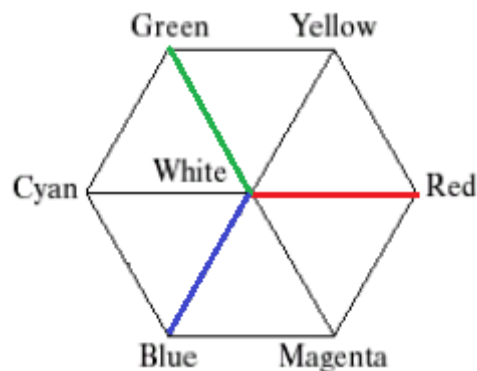


Fig. 3.3.26 Separación angular entre colores primarios y secundarios ⁽³⁵⁾.

Conversión de RGB a HSI

El componente H del tono está dado por:

$$H = \cos^{-1} \left[\frac{\frac{1}{2} [(R - G) + (R - B)]}{\sqrt{(R - G)^2 + (R - B)(G - B)}} \right]$$

Esta transformación para el tono supone que los valores RGB han sido normalizados al rango [0 - 1], y el ángulo se mide desde el eje rojo.

El valor tono es un valor comprendido entre $[0^\circ - 360^\circ]$.

"Si $B > G$ entonces $H = 360 - H_1$, donde H_1 es la ecuación anterior."

El componente S de saturación:

$$S = 1 - 3 \left[\frac{\min(R, G, B)}{R + G + B} \right]$$

Y el del componente I de intensidad:

$$I = \frac{R + G + B}{3}$$

Conversión de HSI a RGB

Dados los valores de HSI en el intervalo $[0, 1]$, para obtener los valores RGB, comenzamos multiplicando H por 360 para regresar al rango $[0 - 360]$. Tendremos 3 sectores de interés correspondiendo a los intervalos de 120° que separan los primarios ⁽³⁵⁾.

En el sector RG ($0^\circ \leq H < 120^\circ$):

$$B = I \cdot (1 - S)$$

$$R = I \cdot \left[1 + S \cdot \frac{\cos H}{\cos(60^\circ - H)} \right]$$

$$G = 3I - (R + B)$$

En el sector GB ($120^\circ \leq H < 240^\circ$):

(Se debe sustraer 120° de H)

$$H = H_0 - 120$$

$$R = I \cdot (1 - S)$$

$$G = I \cdot \left[1 + S \cdot \frac{\cos H}{\cos(60^\circ - H)} \right]$$

$$B = 3I - (R + G)$$

En el sector GB ($240^\circ \leq H < 360^\circ$):

(Se debe sustraer 240° de H)

$$H = H_0 - 240$$

$$G = I \cdot (1 - S)$$

$$B = I \cdot \left[1 + S \cdot \frac{\cos H}{\cos(60^\circ - H)} \right]$$

$$R = 3I - (G + B)$$

3.3.5.5 Transformaciones de color

De manera similar al procesamiento de imágenes en escala de gris, las imágenes RGB pueden ser procesadas aplicando máscaras u otra operación a cada banda de color por separado ⁽³⁵⁾.

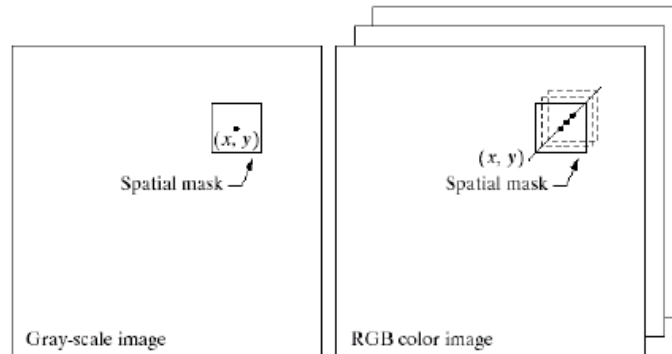


Fig. 3.3.27 Transformación de color por aplicación de máscaras en los tres canales ⁽³⁴⁾.

3.3.5.5.1 Complementos de color

Los tonos en posiciones opuestas del círculo de color son llamados complementarios o complementos. Son de interés ya que los complementos son análogos a los negativos en las imágenes de niveles de gris ⁽³⁵⁾.

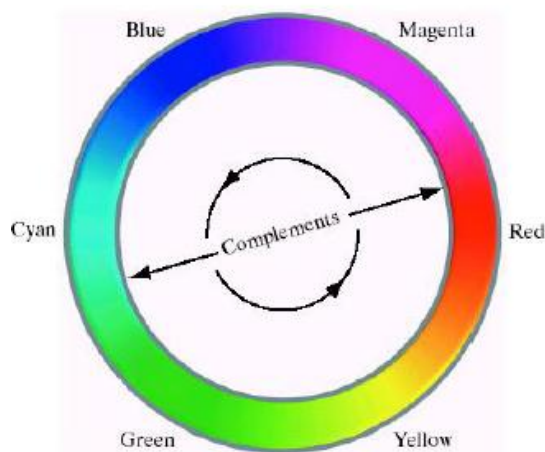


Fig. 3.3.28 Complementos de color ⁽³⁵⁾.

En la figura siguiente se observa la aplicación de una transformación de colores a una imagen:

- Imagen original
- Funciones de transformación a complementos
- Complemento de la imagen original usando funciones de mapeado en RGB

d. Aproximación del complemento RGB usando transformaciones del modelo HSI.

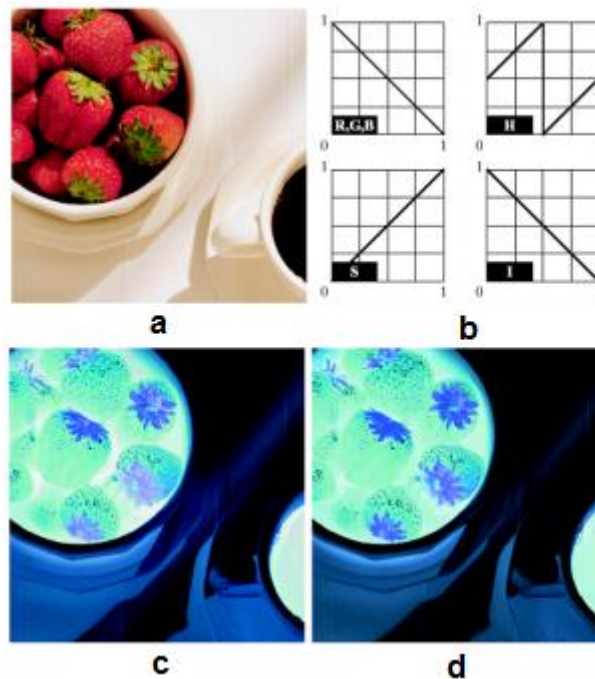


Fig. 3.3.29 Aplicación de transformaciones de color en el modelo RGB y en el modelo HSI (35).

3.3.5.5.2 Fraccionamiento del color

Subrayar un rango específico de colores en una imagen es útil para separar objetos de lo que los rodea. La idea básica es o mostrar los colores de interés para que sobresalgan del fondo, o usar la región definida por esos colores como máscara para procesamiento ulterior.

Una de las maneras más simples de fraccionar o dividir una imagen de color es mapear los colores fuera del rango de interés con un color neutral. Si los colores de interés están dentro de un cubo de ancho w y centrados en un color prototipo (por ejemplo el color promedio) de componentes $(a_1, a_2, a_3, \dots, a_n)$, la transformación necesaria es:

$$S_i = \begin{cases} 0,5 & \text{si } [|r_i - a_j| > w/2]_{\text{para todo } 1 \leq j \leq n} \quad i = 1, 2, \dots, n \\ r_i & \text{en los otros casos (rango de interés)} \end{cases}$$

Esta transformación subraya los colores alrededor del color prototipo forzando los demás al punto medio del espacio de referencia de color (un punto neutral arbitrariamente escogido), por ejemplo un gris $(0.5, 0.5, 0.5)$ (35).

Si se usa una esfera:

$$S_i = \begin{cases} 0,5 & \text{si } \sum_{j=1}^n (r_i - a_j)^2 > R^2 \\ r_i & \text{en los otros casos} \end{cases} \quad i = 1, 2, \dots, n$$

Donde R es el radio de la esfera y a_1, a_2, \dots, a_n son los componentes en el centro (el color prototipo).

En la figura siguiente se muestra el resultado de aplicar las transformaciones con un cubo y con una esfera a una imagen con el fin de aislar el componente rojo. Los valores para W y R se determinaron interactivamente ("prueba y error") ⁽³⁵⁾.

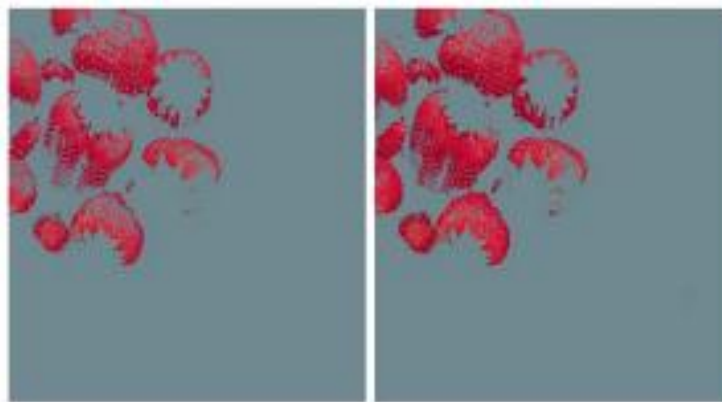


Fig. 3.3.30 Fraccionamiento del color ⁽³⁵⁾.

3.3.5.5.3 Correcciones de color y tono

Las transformaciones que modifican los tonos de una imagen son normalmente interactivas. La idea es ajustar experimentalmente los niveles de contraste y brillo de una imagen para conseguir la mejor presentación de detalles en un rango conveniente de intensidades. Los colores, en sí no son cambiados, esto significa que en RGB y CMYK, se utilizará la misma función de transformación para cada uno de los componentes. En HSI sólo se cambia el componente de intensidad.

En la figura siguiente se muestran transformaciones típicas para corregir 3 tipos comunes de desequilibrio tonal. La primera curva es ideal para aumentar el contraste, su punto medio está anclado para iluminar los brillos y oscurecer las sombras (se puede utilizar la curva inversa para la operación inversa). La segunda y tercera transformaciones corrigen imágenes claras y oscuras ⁽³⁵⁾.

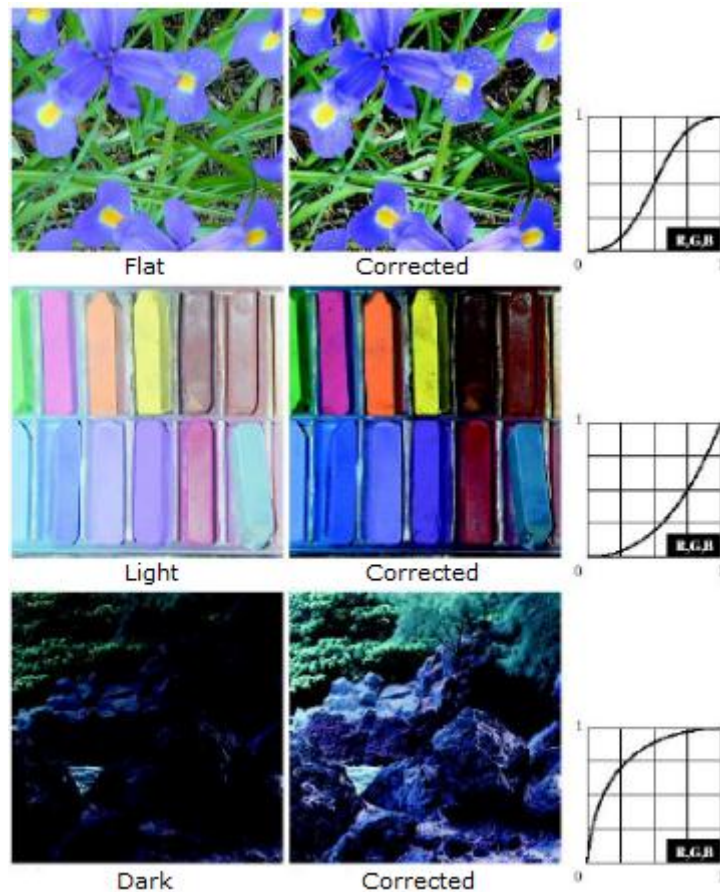


Fig. 3.3.31 Curvas de corrección para el desequilibrio tonal ⁽³⁵⁾.

Después de establecer correctamente las características tonales, se procede a corregir los desequilibrios de color (color por color). Esto puede automatizarse o, como en el caso anterior, realizarse de manera interactiva. Las curvas de corrección de imágenes que se deben aplicar para los distintos casos son:

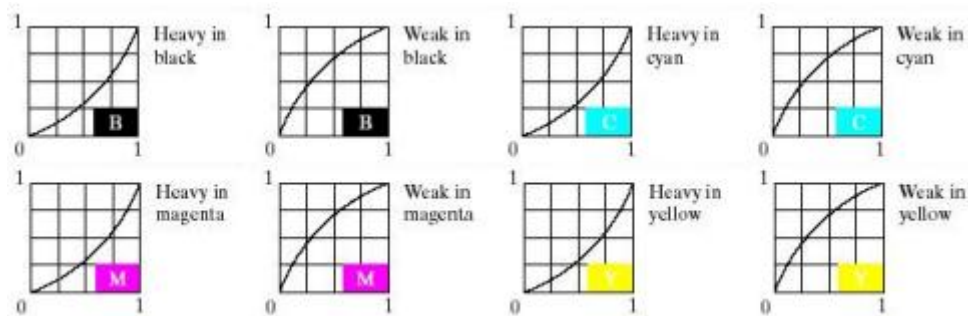


Fig. 3.3.32 Curvas de corrección para el desequilibrio en el color ⁽³⁵⁾.

3.3.5.5.4 Procesamiento del histograma

La transformación de ecualización del histograma utilizada para imágenes en escala de grises, puede aplicarse también para las imágenes en color. Sin embargo, no es conveniente aplicar ecualización del histograma directamente a los componentes de la imagen, ya que esto llevará a colores erróneos.

Un enfoque más lógico es ecualizar el histograma de las "intensidades" de color de manera uniforme, dejando los tonos sin cambiar ⁽³⁵⁾.

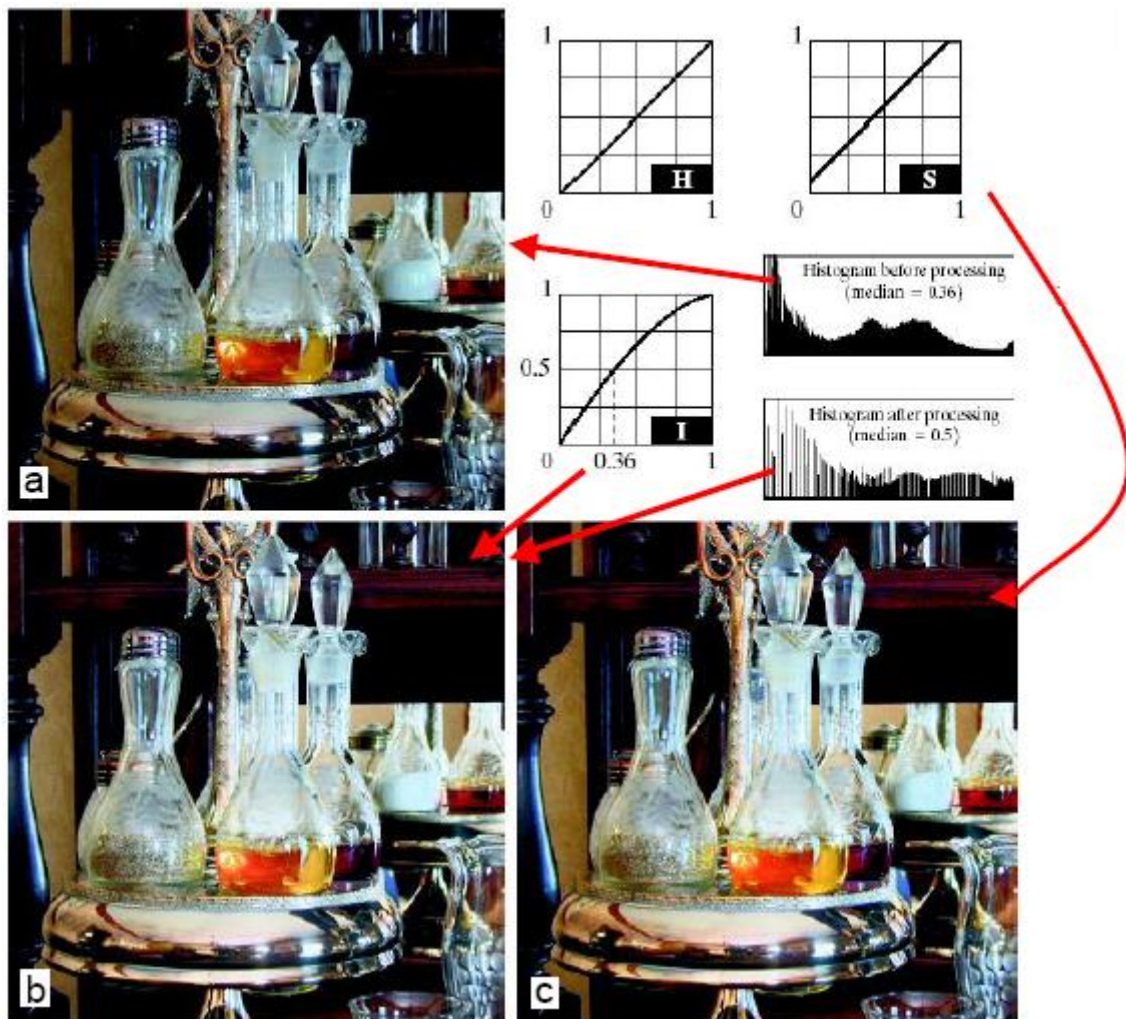


Fig. 3.3.33 Ecuación del histograma en el canal I del modelo HSI.

(a) Imagen original. (b) Ecuación del Histograma del parámetro intensidad en el espacio HSI. (c) Se corrige la imagen ecualizada aumentando ligeramente la saturación ⁽³⁵⁾.

3.3.5.6 Suavizado y realce

El siguiente paso en la transformación es el tomar en cuenta los vecinos del pixel a transformar.

3.3.5.6.1 Suavizado de imágenes a color

Se puede extender fácilmente el concepto de la máscara de promediado a imágenes de color. Como se ha visto, en lugar de valores escalares de nivel de gris utilizaremos los vectores componentes anteriormente mencionados. Si S_{xy} denota el conjunto de coordenadas que define una vecindad con centro en (x, y) en una imagen RGB, la media de los vectores componentes RGB es:

$$\bar{c}(x, y) = \frac{1}{K} \sum_{(x, y') \in S_{xy}} c(x, y')$$

Donde

$$\bar{c}(x, y) = \begin{cases} \frac{1}{K} \sum_{(x, y') \in S_{xy}} R(x, y') \\ \frac{1}{K} \sum_{(x, y') \in S_{xy}} G(x, y') \\ \frac{1}{K} \sum_{(x, y') \in S_{xy}} B(x, y') \end{cases}$$

Lo que es equivalente a suavizar cada plano RGB de manera independiente de la misma manera que se hace con una imagen en escala de grises. Se obtiene un resultado similar aplicando el filtro de suavizado al componente de intensidad de la imagen en HSI. Esto es aplicable también para otras técnicas de transformación de color ⁽³⁵⁾.



Fig. 3.3.34 Aplicación de máscara de promediado.

(a) En cada componente de la imagen RGB. (b) En el componente intensidad del espacio HSI. (c) Diferencia entre los dos resultados ⁽³⁵⁾.

3.3.5.6.2 Realzado de imágenes a color

En el sistema de color RGB, el laplaciano del vector c es

$$\nabla^2[c(x,y)] = \begin{cases} \nabla^2 R(x,y) \\ \nabla^2 G(x,y) \\ \nabla^2 B(x,y) \end{cases}$$

Se puede calcular el laplaciano de una imagen RGB, aplicándolo a los tres componentes. Un resultado similar es aplicar el laplaciano al componente intensidad de la imagen en el espacio HSI ⁽³⁵⁾.



Fig. 3.3.35 Aplicación del laplaciano.
(a) En cada componente de la imagen RGB. (b) En el componente intensidad del espacio HSI. (c) Diferencia entre los dos resultados ⁽³⁵⁾.

3.3.5.7 Segmentación de imágenes a color

La segmentación de una imagen se define como la división de la misma en diferentes regiones con atributos similares, de tal manera que los datos de interés queden bien distinguidos de la información irrelevante. Dependiendo de qué atributo sea al que queramos dar importancia, obtendremos una forma de segmentación diferente en cada caso mediante la utilización de diferentes algoritmos, y se puede hacer tanto en el espacio RGB como en el espacio HSI.

La segmentación de imágenes es un proceso clave en el análisis y comprensión de una imagen, por lo tanto es un apartado muy importante que tiene las más diversas aplicaciones como ser la visión artificial, análisis médicos, etc.

Existen varias categorías en la segmentación:

- Segmentación basada en píxeles
- Segmentación basada en regiones
- Segmentación basada en bordes
- Segmentación híbrida basada en regiones o bordes
- Segmentación basada en agrupamiento, etc.

En este proyecto integrador se utilizó la segmentación basada en agrupamiento en el espacio RGB, y más específicamente el algoritmo de K-

means que se explica más adelante, pero antes se explicará brevemente en qué consiste la segmentación en el espacio HSI como en el RGB ⁽³⁵⁾.

3.3.5.7.1 Segmentación en HSI

En este tipo de segmentación generalmente se utiliza la banda H para identificar los colores y la banda S como una máscara.

En la siguiente figura, para segmentar la región de interés roja de la imagen (a), se separa la imagen en sus componentes HSI. Luego se obtiene una máscara binaria a partir de la imagen de saturación con un umbral del 10% (ya que el rojo que interesa está en ese rango). La imagen (f) muestra el resultado de aplicar la máscara a la imagen H. La imagen (h) muestra el resultado de aplicar la máscara con un umbral del 9%. Esta última da una mejor aproximación de la región que se quiere obtener ⁽³⁵⁾.

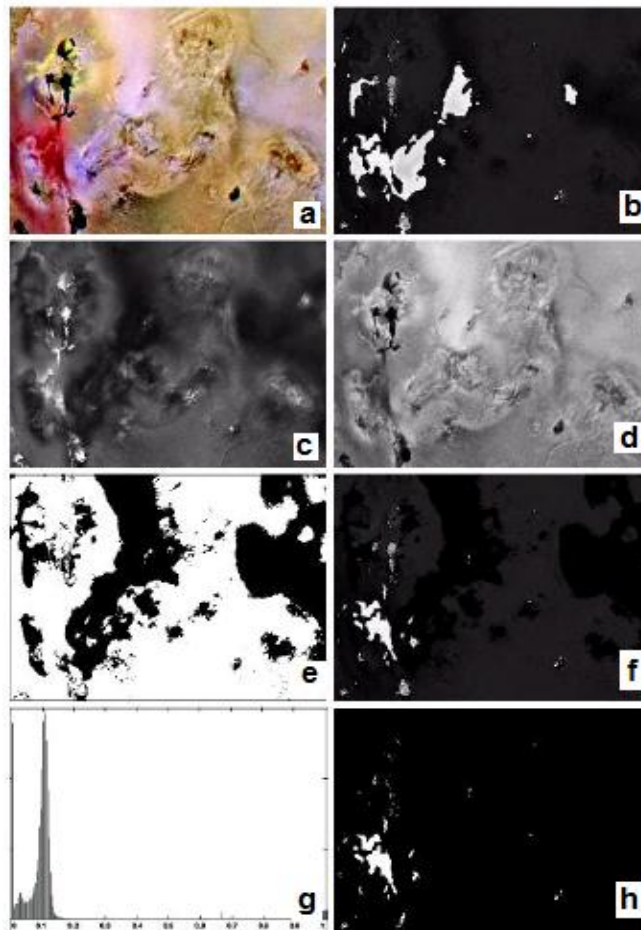


Fig. 3.3.36 Segmentación en el espacio HSI.

(a) Imagen original. (b) Componente H. (c) Componente S. (d) Componente I. (e) Binarización de (c). (f) Producto de (b) y (e) con umbral del 10%. (g) Histograma de (f). (h) Producto de (b) y (e) con umbral del 9% ⁽³⁵⁾.

3.3.5.7.2 Segmentación en el espacio vectorial RGB

La segmentación es una de las áreas donde el espacio RGB da mejores resultados. Suponiendo que se quiere segmentar un rango específico de un

color, podemos tomar una muestra y obtener el “promedio” de ese color. Se representará este color promedio por el vector **a** RGB.

El objetivo de la segmentación es clasificar cada píxel RGB en una imagen dada como parte del rango de color especificado o no. Es necesario entonces medir de alguna manera la similitud. Se puede utilizar la distancia euclidiana, dado un punto **z** del espacio RGB, decimos que **z** es similar a **a** si la distancia entre ellos es menor a un umbral especificado D_0 . La distancia euclidiana está dada por:

$$\begin{aligned} D(\mathbf{z}, \mathbf{a}) &= \|\mathbf{z} - \mathbf{a}\| \\ &= [(\mathbf{z} - \mathbf{a})^T (\mathbf{z} - \mathbf{a})]^{1/2} \\ &= [(z_R - a_R)^2 + (z_G - a_G)^2 + (z_B - a_B)^2]^{1/2} \end{aligned}$$

Donde los subíndices R, G y B denotan los componentes de los vectores **a** y **z**.

El volumen comprendido $D(\mathbf{z}, \mathbf{a}) \leq D_0$ es una esfera sólida de radio D_0 ⁽³⁵⁾.

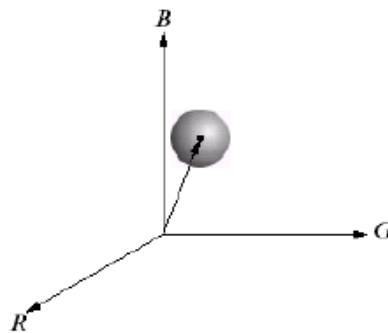


Fig. 3.3.37 Segmentación 1

La esfera representa el rango de interés para determinar si un píxel pertenece a una clase o no ⁽³⁷⁾.

Se puede trabajar con los cuadrados para evitar cálculo de raíces, sin embargo aun así es computacionalmente costoso para imágenes de tamaño práctico. Una buena aproximación es utilizar un cubo centrado en **a** con dimensiones a lo largo de cada eje de color, proporcionales a la desviación estándar de las muestras alrededor de cada eje ⁽³⁵⁾.

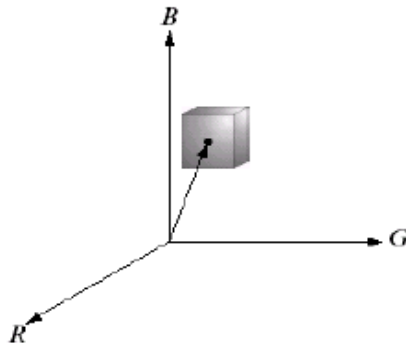


Fig. 3.3.38 Segmentación 2

El cubo representa el rango de interés para determinar si el valor de un píxel pertenece al rango en estudio. Este cubo es una aproximación al caso de la esfera y ofrece un costo computacional menor ⁽³⁷⁾.

El rectángulo de la figura 3.3.39 (a) contiene muestras de los colores rojizos que se desean segmentar. Se obtiene el vector **a** a partir de la media de estas muestras y después se calculan las desviaciones estándar de los valores rojo, verde y azul de estas muestras. Se centra un cubo en **a** y se le dan dimensiones correspondientes a un valor de 1.25 de la desviación estándar en cada eje (R, G, B) ⁽³⁷⁾.

$$[r \pm 1.25dsr, g \pm 1.25dsg, b \pm 1.25 dsb]$$

(En la expresión anterior "dsr", "dsg" y "dsb" son las desviaciones estándar de los valores rojo, verde y azul respectivamente).

De esta manera se puede obtener la imagen binaria que se muestra en la figura 3.3.39 (b).

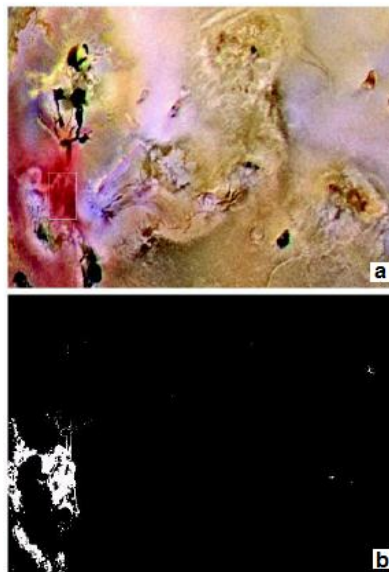


Fig. 3.3.39 Segmentación en el espacio RGB.

(a) El rectángulo es la muestra que se toma de la imagen original. (b) Binarización de la segmentación realizada ⁽³⁵⁾.

Si lo comparamos con la segmentación realizada en el espacio HSI con la del espacio RGB, este último da una mejor aproximación.

Segmentación basada en agrupamiento (clustering)

Los algoritmos de segmentación basados en *clustering* tratan de dividir un conjunto de datos de entrada en subconjuntos (clústeres), de tal manera que los elementos de cada subconjunto compartan cierto patrón. El agrupamiento se hace conforme a algún criterio, generalmente por distancia o por similitud.

Estos tipos de algoritmos no son supervisados, es decir, no requieren el conocimiento previo de aquellos objetos que se van a segmentar. Se requieren ciertas características previas en base a lo que se desea realizar. Estos algoritmos, resultan muy convenientes en aquellos ámbitos de aplicación en los que a priori, no se tiene mucha información, como en el caso de imágenes médicas o en el caso de segmentación de objetos sobre un fondo.

Las técnicas para agrupar datos son principalmente dos:

1. Agrupamiento jerárquico: Contempla la aglomeración y división de clústeres.
2. Agrupamiento no jerárquico: El número de clústeres se fija al inicio, y los criterios usados son respecto a las distancias ⁽³⁸⁾.

En este proyecto nos centraremos específicamente en el segundo de ellos, y específicamente analizaremos el algoritmo K-means.

Algoritmo K-means

El algoritmo de K-medias es un método de clustering o agrupamiento que, como hemos dicho, consiste en clasificar un conjunto de elementos en base a las propiedades de estos y en forma iterativa.

La técnica de agrupamiento es no jerárquica, por lo que se fija un número k de clústeres al inicio de su ejecución y se asignan elementos a un clúster en función de la distancia, empleando por ejemplo la distancia euclidiana (la más comúnmente usada), aunque puede ser otra.

Otra característica importante de este algoritmo, es que emplea la media estadística para el cálculo de los nuevos clústeres. Concretamente, lo que se calcula del clúster es su centroide, esto es, el punto resultante de la media de todos los elementos asignados al clúster en cuestión ⁽³⁸⁾.

El algoritmo consta de los siguientes pasos:

1. Inicialización del número de los clústeres K y sus respectivos centroides.
2. Para cada píxel de la imagen, calcular la distancia euclidiana entre el centroide de la clase k y cada píxel usando la siguiente ecuación:

$$d = |p(x, y) - c_k|$$

$p(x, y)$ corresponde al nivel de gris del píxel en las coordenadas x e y .

3. Asignar todos los píxeles al centro más cercano basado en la distancia d .
4. Después de que todos los píxeles se han asignados, se recalcula la posición del centroide de cada clúster mediante la siguiente relación:
- 5.

$$c_k = \frac{1}{N_k} \sum_{y \in C_k} \sum_{x \in C_k} p(x, y)$$

Donde N_k es el número de total de puntos asignados a la clase k -ésima en el paso 3.

Las ecuaciones anteriores se aplican directamente en una imagen en escala de grises. Si se trabaja con imágenes en color, se debe aplicar estas las fórmulas en cada uno de los canales ⁽³⁸⁾.

En la siguiente figura se muestra un gráfico que ilustra cómo funciona este algoritmo:

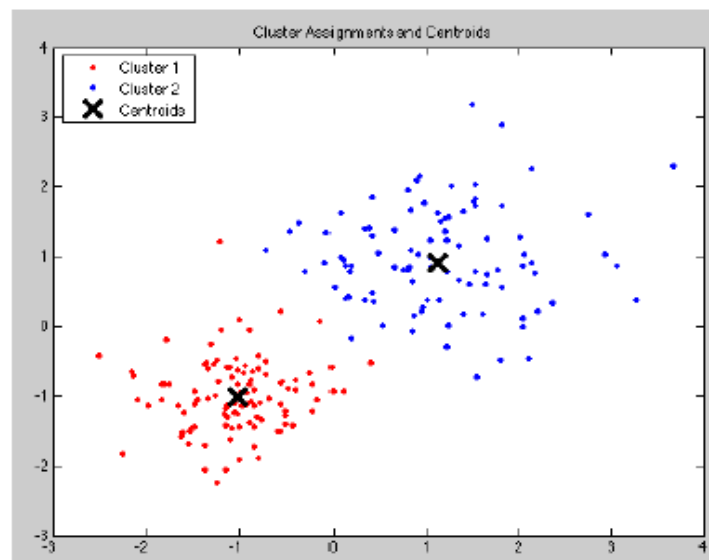


Fig. 3.3.40 Agrupamiento de muestras aleatorias según dos etiquetas ⁽³⁹⁾.

A pesar de que k -means tiene una gran ventaja por ser fácil de implementar, tiene ciertos inconvenientes. La calidad del resultado final del

agrupamiento, depende de una selección arbitraria de los centroides iniciales. Por lo tanto, si los centroides son elegidos aleatoriamente, el método devolverá diferentes resultados cada vez que se escojan diferentes centroides iniciales. Sabiendo esto, se debe elegir cuidadosamente los centroides iniciales para obtener la segmentación idónea. Este algoritmo es computacionalmente costoso ya que depende del número de elementos dato, el número de clústeres y el número de iteraciones ⁽³⁸⁾.

3.4 Plataforma Android

La telefonía móvil está cambiando la sociedad actual de una forma tan significativa como lo ha hecho internet. Los nuevos terminales ofrecen unas capacidades cada vez más similares a los de una computadora, pero se encuentran siempre en el bolsillo del usuario y ofrecen además un abanico de aplicaciones muy amplio. De hecho, muchos autores coinciden en afirmar que la nueva computadora del siglo XXI será un terminal móvil.

El lanzamiento de Android como nueva plataforma para el desarrollo de aplicaciones móviles ha causado gran expectación y está teniendo una importante aceptación tanto por parte de los usuarios como por parte de la industria. En la actualidad se ha convertido en una alternativa dominante frente a otras plataformas ⁽⁴⁰⁾.

Existen muchas plataformas para móviles:

- Apple iOS
- Windows Phone
- BlackBerry
- Palm
- Java Micro Edition
- Linux Mobile (LiMo)
- Firefox OS, etc.

Sin embargo Android presenta una serie de características que lo hacen diferente. Es el primero que combina en una misma solución las siguientes cualidades:

- Plataforma realmente abierta: Es una plataforma de desarrollo libre basada en Linux y de código abierto. Una de sus grandes ventajas es que se puede usar y customizar el sistema sin pagar regalías.
- Adaptable a cualquier tipo de hardware: Android no ha sido diseñado exclusivamente para su uso en teléfonos y tabletas. Hoy en día podemos encontrar relojes, cámaras, electrodomésticos y gran variedad de sistemas que se basan en este sistema operativo. La aplicación ha de funcionar correctamente en dispositivos con gran variedad de tipos de entrada, pantalla, memoria, etc. Esta característica contrasta con la estrategia de Apple. En iOS tenemos que desarrollar una aplicación para iPhone y otra diferente para iPad.
- Portabilidad asegurada: Las aplicaciones finales son desarrolladas en Java lo que nos asegura que podrán ser ejecutadas en cualquier tipo de CPU, tanto presente como futuro. Esto se consigue gracias al concepto de máquina virtual.
- Arquitectura basada en componentes inspirados en Internet: Por ejemplo, el diseño de la interfaz de usuario se hace en XML, lo que permite que una misma aplicación se ejecute en un reloj de pantalla reducida o en un televisor.

- Filosofía de dispositivo siempre conectado a Internet: Muchas aplicaciones solo funcionan si disponemos de una conexión permanente a Internet. Por ejemplo, comunicaciones interpersonales o navegación con mapas.
- Gran cantidad de servicios incorporados: Por ejemplo, localización basada tanto en GPS como en redes, bases de datos con SQL, reconocimiento y síntesis de voz, navegador, multimedia, etc.
- Aceptable nivel de seguridad: Los programas se encuentran aislados unos de otros gracias al concepto de ejecución dentro de una caja que hereda de Linux. Además, cada aplicación dispone de una serie de permisos que limitan su rango de actuación (servicios de localización, acceso a Internet, etc.). Desde La versión 6.0 el usuario puede conceder o retirar permisos a las aplicaciones en cualquier momento.
- Optimizado para baja potencia y poca memoria: En el diseño de Android se ha tenido en cuenta el hardware específico de los dispositivos móviles. Por ejemplo, Android utiliza la Máquina Virtual ART(o Dalvik en versiones antiguas). Se trata de una implementación de Google de la máquina virtual de Java optimizada para dispositivos móviles.
- Alta calidad de gráficos y sonido: Gráficos vectoriales suavizados, animaciones, gráficos en 3D basados en OpenGL. Incorpora codecs estándares más comunes de audio y vídeo, incluyendo H.264 (AVC), MP3, AAC, etc ⁽⁴⁰⁾.

Android ha alcanzado un 80% del mercado, y ofrece una sencilla y novedosa forma de implementar aplicaciones para diferentes tipos de dispositivos. A continuación se observa una gráfica comparativa del mercado de teléfonos inteligentes a través del tiempo:

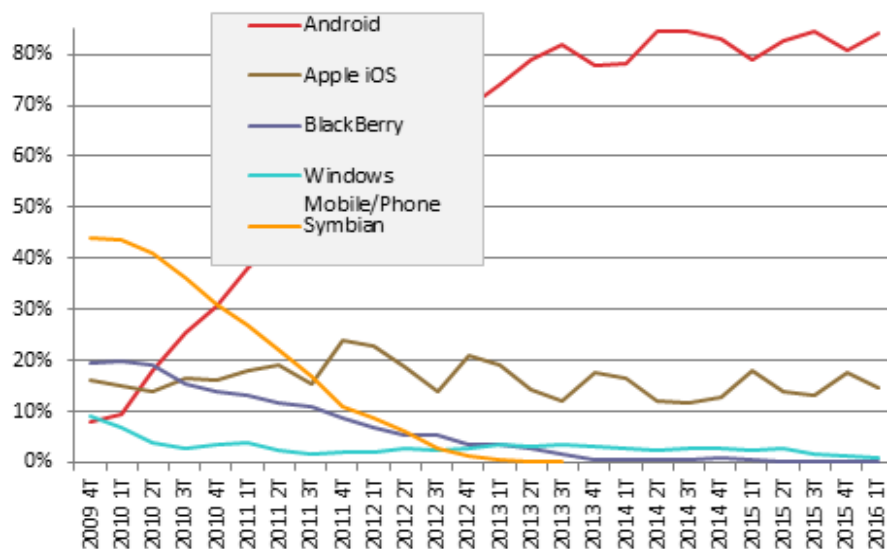


Fig. 3.4.1 Volumen de ventas de las distintas plataformas de teléfonos inteligentes ⁽⁴⁰⁾.

3.4.1 Arquitectura de Android

En la siguiente figura se muestra como es la arquitectura de Android. Está formada por 4 capas, y cada una de ellas está basada en software libre.

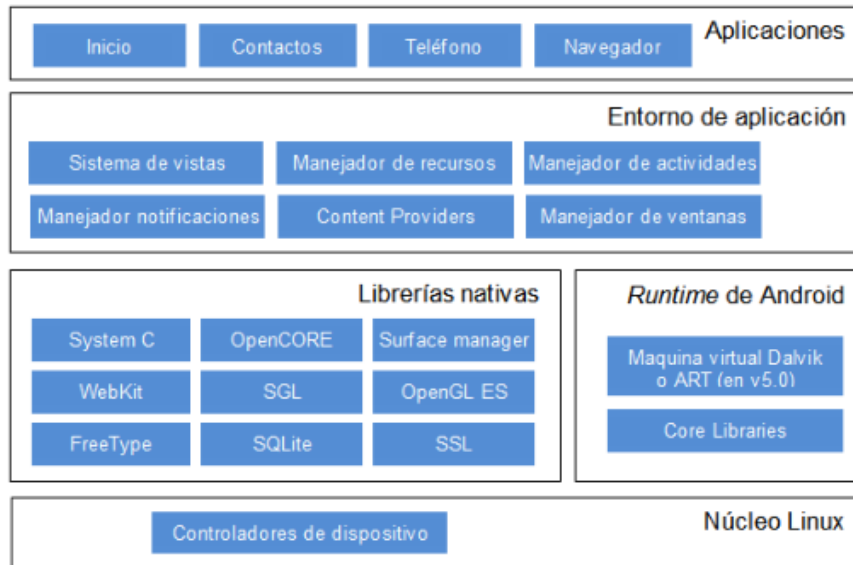


Fig. 3.4.2 Arquitectura de Android ⁽⁴⁰⁾.

A continuación se da una breve descripción de cada una de la capas de esta arquitectura.

3.4.1.1 Núcleo Linux

El núcleo de Android está formado por el sistema operativo Linux, y esta capa actúa como una capa de abstracción entre el hardware y el resto de la pila de software. Por lo tanto, es la única que es dependiente del hardware. Esta capa proporciona servicios como la seguridad, el manejo de la memoria, el multiproceso, la pila de protocolos y el soporte de drivers para dispositivos ⁽⁴⁰⁾.

3.4.1.2 Runtime de Android

Está basado en el concepto de máquina virtual utilizado en Java. Dadas las limitaciones de los dispositivos donde ha de correr Android (poca memoria y procesador limitado), no fue posible utilizar una máquina virtual Java estándar. Google tomó la decisión de crear una nueva, la máquina virtual Dalvik, que respondiera mejor a estas limitaciones.

Entre las características de la máquina virtual Dalvik que facilitan esta optimización de recursos se encuentra la ejecución de ficheros Dalvik ejecutables (.dex) –formato optimizado para ahorrar memoria–. Además,

está basada en registros. Cada aplicación corre en su propio proceso Linux con su propia instancia de la máquina virtual Dalvik. Delega al kernel de Linux algunas funciones como threading y el manejo de la memoria a bajo nivel. A partir de Android 5.0 se reemplaza Dalvik por ART. Esta nueva máquina virtual consigue reducir el tiempo de ejecución del código Java hasta en un 33%. También se incluye en el runtime de Android el módulo Core Libraries, con la mayoría de las librerías disponibles en el lenguaje Java ⁽⁴⁰⁾.

3.4.1.3 Librerías nativas

Incluye un conjunto de librerías en C/C++ usadas en varios componentes de Android. Están compiladas en código nativo del procesador. Muchas de las librerías utilizan proyectos de código abierto. Algunas de estas librerías son:

- ❖ System C library: una derivación de la librería BSD de C estándar (libc), adaptada para dispositivos embebidos basados en Linux.
- ❖ Media Framework: librería basada en OpenCORE de PacketVideo. Soporta codecs de reproducción y grabación de multitud de formatos de audio y vídeo e imágenes MPEG4, H.264, MP3, AAC, AMR, JPG y PNG.
- ❖ Surface Manager: maneja el acceso al subsistema de representación gráfica en 2D y 3D.
- ❖ WebKit/Chromium: soporta un moderno navegador Web utilizado en el navegador Android y en la vista Webview. En la versión 4.4, WebKit ha sido reemplazada por Chromium/Blink, que es la base del navegador Chrome de Google.
- ❖ SGL: motor de gráficos 2D.
- ❖ Librerías 3D: implementación basada en OpenGL ES 1.0 API. Las librerías utilizan el acelerador hardware 3D si está disponible, o el software altamente optimizado de proyección 3D.
- ❖ FreeType: fuentes en bitmap y renderizado vectorial.
- ❖ SQLite: potente y ligero motor de bases de datos relacionales disponible para todas las aplicaciones.
- ❖ SSL: proporciona servicios de encriptación Secure Socket Layer (capa de conexión segura) ⁽⁴⁰⁾.

3.4.1.4 Entorno de aplicación

Proporciona una plataforma de desarrollo libre para aplicaciones con gran riqueza e innovaciones (sensores, localización, servicios, barra de notificaciones, etc.). Esta capa ha sido diseñada para simplificar la reutilización de componentes. Las aplicaciones pueden publicar sus capacidades y otras pueden hacer uso de ellas.

Los servicios más importantes que incluye son:

- Views: extenso conjunto de vistas, (parte visual de los componentes).
- Resource Manager: proporciona acceso a recursos que no son en código.
- Activity Manager: maneja el ciclo de vida de las aplicaciones y proporciona un sistema de navegación entre ellas.
- Notification Manager: permite a las aplicaciones mostrar alertas personalizadas en la barra de estado.
- Content Providers: mecanismo sencillo para acceder a datos de otras aplicaciones (como los contactos) ⁽⁴⁰⁾.

3.4.1.5 Aplicaciones

Este nivel está formado por el conjunto de aplicaciones instaladas en una máquina Android. Todas las aplicaciones han de correr en la máquina virtual Dalvik (o ART) para garantizar la seguridad del sistema. Normalmente las aplicaciones Android están escritas en Java, y para desarrollar aplicaciones en Java podemos utilizar el Android SDK (Software Development Kit).

Existe otra opción consistente para desarrollar aplicaciones utilizando C/C++, esto se puede lograr usando el Android NDK (Native Development Kit) ⁽⁴⁰⁾.

3.4.2 Versiones del sistema operativo Android

Nombre código	Número de versión	Fecha de lanzamiento	Nivel de API
Android 1.0	1.0	23/09/2008	1
Android 1.1	1.1	09/02/2009	2
Cupcake	1.5	27/04/2009	3

Donut	1.6	15/09/2009	4
Eclair	2.0 – 2.1	26/10/2009	5 – 7
Froyo	2.2 – 2.2.3	20/05/2010	8
Gingerbread	2.3 – 2.3.7	06/12/2010	9 – 10
Honeycomb	3.0 – 3.2.6	22/02/2011	11 -13
Ice Cream Sandwich	4.0 – 4.0.5	18/10/2011	14 – 15
Jelly Bean	4.1 – 4.3.1	09/07/2012	16 – 18
KitKat	4.4 – 4.4.4	31/10/2013	19 – 20
Lollipop	5.0 – 5.1.1	12/11/2014	21 – 22
Marshmallow	6.0 – 6.1	05/10/2015	23
Nougat	7.0 – 7.1.2	15/06/2016	24 – 25
Oreo	8.0	21/08/2017	26

Tabla 3.4.1 Versiones del sistema operativo Android ⁽⁴⁰⁾.

3.4.3 Componentes de una aplicación Android

Existe una serie de elementos clave que resultan imprescindibles para desarrollar aplicaciones en Android

3.4.3.1 Vistas (Views)

Las vistas son los elementos que componen la interfaz de usuario de una aplicación, por ejemplo un botón o una entrada de texto. Todas las vistas van a ser objetos descendientes de la clase View, y por tanto, pueden ser definidas utilizando código Java. Sin embargo, lo habitual es definir las vistas utilizando un fichero XML y dejar que el sistema cree los objetos a partir de este fichero. Esta forma de trabajar es muy similar a la definición de una página web utilizando código HTML ⁽⁴⁰⁾.

3.4.3.2 Layouts

Un layout es un conjunto de vistas agrupadas de una determinada forma. Se disponen de diferentes tipos de layouts para organizar las vistas de forma lineal, en cuadrícula o indicando la posición absoluta de cada vista. Los layouts también son objetos descendientes de la clase View, y al igual que las vistas, los layouts pueden ser definidos en código, aunque la forma habitual de definirlos es utilizando código XML ⁽⁴⁰⁾.

3.4.3.3 Actividad (Activity)

Una aplicación en Android va a estar formada por un conjunto de elementos básicos de visualización, coloquialmente conocidos como pantallas de la aplicación. En Android cada uno de estos elementos, o pantallas, se conoce como actividad. Su función principal es la creación de la interfaz de usuario. Una aplicación suele necesitar varias actividades para crear la interfaz de usuario. Las diferentes actividades creadas serán independientes entre sí, aunque todas trabajarán para un objetivo común. Toda actividad ha de pertenecer a una clase descendiente de Activity ⁽⁴⁰⁾.

3.4.3.4 Servicio (Service)

Un servicio es un proceso que se ejecuta “detrás”, sin la necesidad de una interacción con el usuario. En Android disponemos de dos tipos de servicios: servicios locales, que son ejecutados en el mismo proceso y servicios remotos, que son ejecutados en procesos separados. Ejemplos de servicios son:

- Reproducir música
- Ejecutar transacciones de red
- Ejecutar archivos, etc ⁽⁴⁰⁾.

3.4.3.5 Intención (Intent)

Una intención representa la voluntad de realizar alguna acción; como realizar una llamada de teléfono, visualizar una página web, etc. Se utiliza cada vez que queremos:

- Lanzar una actividad
- Lanzar un servicio
- Enviar un anuncio de tipo broadcast
- Comunicarnos con un servicio

Los componentes lanzados pueden ser internos o externos a nuestra aplicación. También se usan las intenciones para el intercambio de información entre estos componentes ⁽⁴⁰⁾.

3.4.3.6 Fragment

La llegada de las tabletas trajo el problema de que las aplicaciones de Android ahora deben soportar pantallas más grandes. Si diseñamos una aplicación pensada para un dispositivo móvil y luego la ejecutamos en una tableta, el resultado no suele resultar satisfactorio.

Para ayudar al diseñador a resolver este problema, en la versión 3.0 de Android aparecen los fragments. Un fragment está formado por la unión de varias vistas para crear un bloque funcional de la interfaz de usuario. Una vez creados los fragments, podemos combinar uno o varios fragments dentro de una actividad, según el tamaño de pantalla disponible ⁽⁴⁰⁾.

3.4.3.7 Receptor de anuncios (Broadcast Receiver)

Un receptor de anuncios recibe anuncios broadcast y reacciona ante ellos. Los anuncios broadcast pueden ser originados por el sistema (por ejemplo: Batería baja, Llamada entrante) o por las aplicaciones. Las aplicaciones también pueden crear y lanzar nuevos tipos de anuncios broadcast. Los receptores de anuncios no disponen de interfaz de usuario, aunque pueden iniciar una actividad si lo estiman oportuno ⁽⁴⁰⁾.

3.4.3.8 Proveedores de Contenido (Content Provider)

En muchas ocasiones las aplicaciones instaladas en un terminal Android necesitan compartir información. Android define un mecanismo estándar para que las aplicaciones puedan compartir datos sin necesidad de comprometer la seguridad del sistema de ficheros. Con este mecanismo podremos acceder a datos de otras aplicaciones, como la lista de contactos, o proporcionar datos a otras aplicaciones ⁽⁴⁰⁾.

3.4.4 Entorno de desarrollo

Google ha preparado el paquete de *software* Android SDK, que incorpora todas las herramientas necesarias para el desarrollo de aplicaciones en Android. En él se incluye:

- Conversor de código
- Depurador
- Librerías
- Emuladores
- Documentación
- Ejemplos de código, etc.

Todas estas herramientas son accesibles desde la línea de comandos. No obstante, la mayoría de los programadores prefieren utilizar un IDE (entorno de desarrollo integrado), que es un software que agrupa las siguientes características:

- Entorno visual adecuado
- Editor de código con todas las herramientas de desarrollo ⁽⁴⁰⁾

Hay dos IDE que se utilizan en la actualidad:

1. Android Studio que es el recomendado por Google
2. Eclipse (+ plug-in ADT)

En nuestro proyecto utilizamos Android Studio.

3.4.4.1 Android Studio

En el 2014 Google lanzó la primera versión estable del Android Studio, que está basado en el IDE IntelliJ IDEA. Se trata de un nuevo entorno de desarrollo que incorpora nuevas características que no encontrábamos en el tradicional IDE basado en Eclipse. Google ha anunciado que va a potenciar este nuevo IDE para el desarrollo de aplicaciones, en detrimento del entorno basado en Eclipse, que va a dejar de mantenerse. Entre las novedades introducidas destacamos:

- Construcción de proyectos usando la herramienta Gradle.
- Pre visualización simultánea de un *layout* en varios tipos de dispositivos.
- Facilidades para el testeo de código basado en JUnit.
- Importación de ejemplos de código desde GitHub ⁽⁴⁰⁾.

En el anexo A describe la interfaz de trabajo Android Studio y los pasos necesarios para la creación de un nuevo proyecto.

3.4.5 OpenCV

OpenCV es una biblioteca libre dedicada a la visión artificial originalmente desarrollada por Intel. Esta biblioteca tiene una enorme cantidad de funciones de procesamiento de imágenes totalmente depuradas y optimizadas, que pueden ser aplicadas desde sistemas de seguridad de movimiento, hasta aplicaciones de control de procesos donde se requiere reconocimiento de objetos.

Su publicación es bajo la licencia BSD, que permite que sea usada libremente para propósitos comerciales y de investigación con las condiciones en ella expresadas.

OpenCV es multiplataforma, y existen versiones para GNU/Linux, Mac OS X y Windows.

Esta biblioteca pretende proporcionar un entorno de desarrollo fácil de utilizar y altamente eficiente, ya que su programación está realizada en C y C++, aprovechando además las capacidades que proveen los procesadores multinúcleo.

Los lenguajes de programación que pueden incorporar esta biblioteca son C++, Python y Java, este último es el utilizado para el desarrollo del proyecto.

OpenCV opera las imágenes a través de la clase *Mat*, y por medio de las clases *ImgProc*, *Utils*, *CvType*, *Core* e *Imgcodecs* se procesan las imágenes pixel por pixel ⁽⁴¹⁾.

3.5 SolidWorks

SolidWorks es un programa de diseño mecánico en 3D, que utiliza un entorno gráfico basado en Microsoft Windows, intuitivo y fácil de manejar. Integra un gran número de funciones avanzadas para facilitar el modelado de piezas, crear grandes ensamblajes, generar planos y otras funcionalidades que le permiten validar, gestionar y comunicar proyectos de forma rápida, precisa y fiable ⁽⁴²⁾.

3.5.1 Características de SolidWorks

Las características que integra este software son:

- Definición de parámetros clave
- Asociatividad
- Funciones geométricas inteligentes
- Gestor de diseño ⁽⁴²⁾

3.5.1.1 Definición de parámetros clave

Los parámetros clave son las dimensiones (cotas) y las relaciones geométricas que definen un modelo tridimensional. SolidWorks asocia a cada una de las cotas de un croquis así como a las relaciones tridimensionales, un nombre que permite la modificación en cualquier momento ⁽⁴²⁾.

3.5.1.2 Asociatividad

SolidWorks contiene tres módulos: Pieza, ensamblaje y dibujo. La creación de un documento en cada uno de ellos genera un fichero con distinta extensión, pero se encuentran asociados y vinculados.

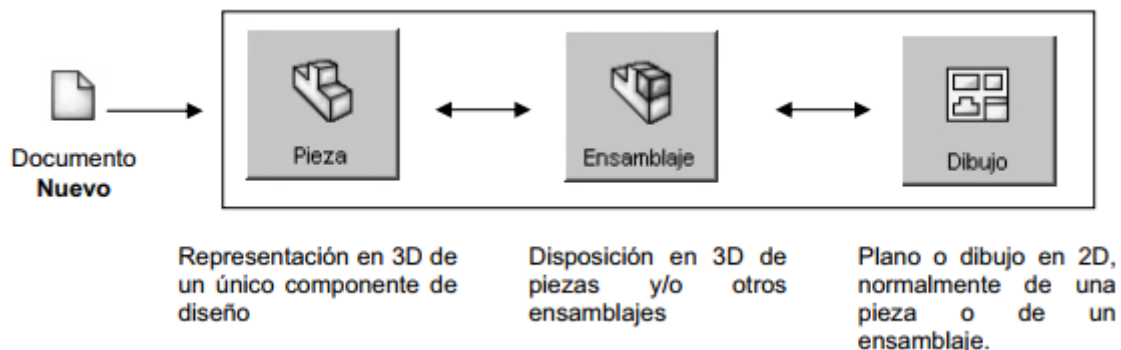


Fig. 3.5.1 Módulos de SolidWorks ⁽⁴²⁾.

Para realizar un ensamblaje se debe diseñar cada una de las piezas que lo conforman y guardar cada una en un fichero independiente. El módulo

ensamblaje permite insertar cada una de las piezas y asignar relaciones geométricas de posición para definir tridimensionalmente el ensamble. Finalmente, se puede obtener los planos de las piezas o el ensamble de forma automática.

Cuando se dice que SolidWorks es asociativo, significa que alguna modificación en una pieza, modificará automáticamente el ensamblaje y el plano de dicha pieza en forma automática. Los ficheros se actualizan aunque se encuentren cerrados ⁽⁴²⁾.

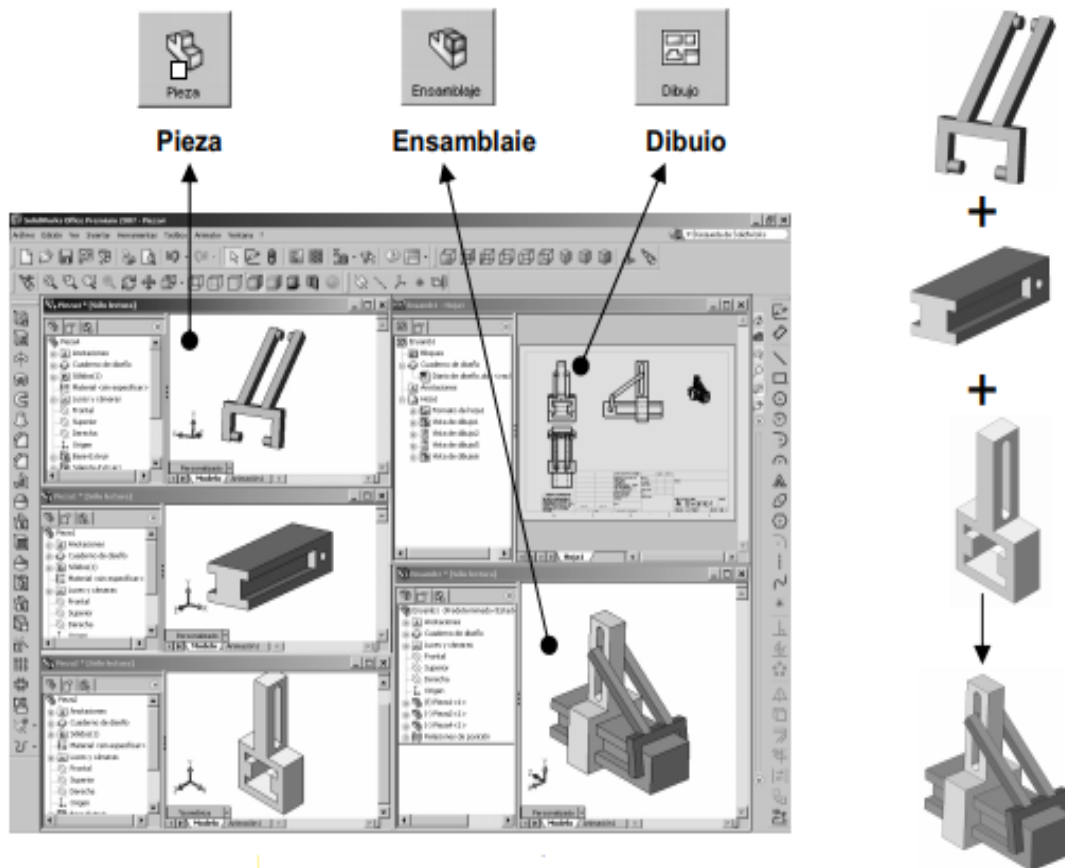


Fig. 3.5.2 Asociatividad de los tres módulos ⁽⁴²⁾.

3.5.1.3 Funciones geométricas inteligentes

La creación de taladros, chaflanes, redondeos, vaciados o la creación de nervios, entre otras operaciones, son creadas de forma rápida, fácil, ágil e intuitiva. En muchas operaciones el proceso de definición está guiado y se puede "previsualizar" la operación antes de su aceptación definitiva ⁽⁴²⁾.

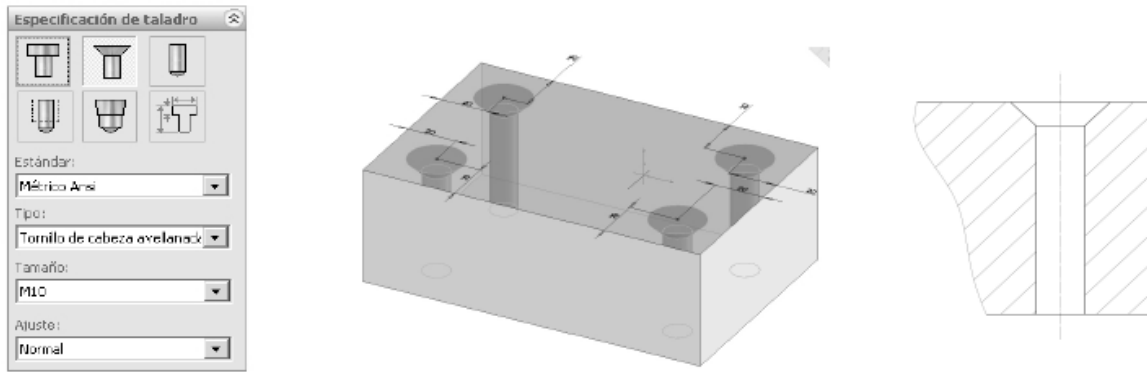


Fig. 3.5.3 Funciones geométricas inteligentes ⁽⁴²⁾.

3.5.1.4 Gestor de diseño

También es conocido como árbol de operaciones o FeatureManager. En él se incluyen de forma histórica todas las operaciones que han sido necesarias efectuar para conformar la pieza durante su diseño. Las operaciones recientes se encuentran al final del árbol, mientras que las más antiguas son las primeras en aparecer. El gestor de diseño permite:

- Visualizar u ocultar operaciones
- Eliminar operaciones
- Cambiar parámetros de definición de una operación ⁽⁴²⁾

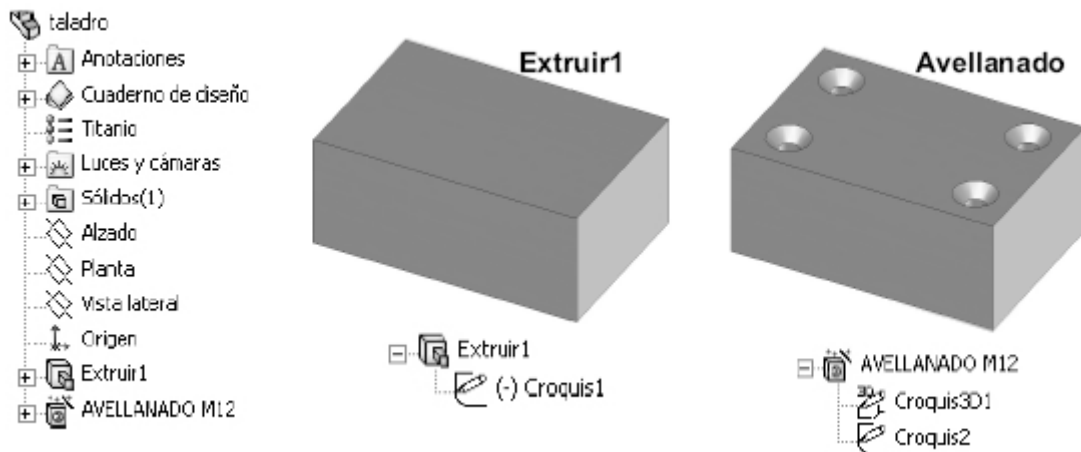


Fig. 3.5.4 Gestor de diseño ⁽⁴²⁾.

3.5.2 Módulos de SolidWorks

Como se mencionó anteriormente, SolidWorks contiene tres módulos:

- Pieza
- Ensamblaje
- Dibujo

En cada uno de ellos se disponen de múltiples herramientas de trabajo. A continuación se describe brevemente cada módulo ⁽⁴²⁾.

3.5.2.1 Pieza

El módulo pieza constituye un entorno de trabajo dónde se puede diseñar modelos mediante el empleo de herramientas de diseño ágiles e intuitivas. Su facilidad de uso se debe al empleo de un entorno basado en Microsoft Windows y en el uso de funciones clásicas como arrastrar y colocar, cortar y pegar o marcar y hacer clic con el ratón.

El conjunto de funciones e iconos permiten crear modelos tridimensionales (3D) partiendo de geometrías de croquis (2D) y obtener sólidos, superficies, estructuras metálicas, piezas de chapa, piezas multicuerpo, etc.

Los modelos creados se gestionan mediante el Gestor de Diseño donde se incluyen todas las operaciones 3D y 2D utilizadas en la obtención de la pieza.

El módulo pieza está totalmente integrado con el resto de módulos y funcionalidades de forma que cualquier cambio en su modelo 3D se actualiza en el resto de ficheros asociados (Ensamblajes, Dibujo, etc.) de forma bidireccional ⁽⁴²⁾.

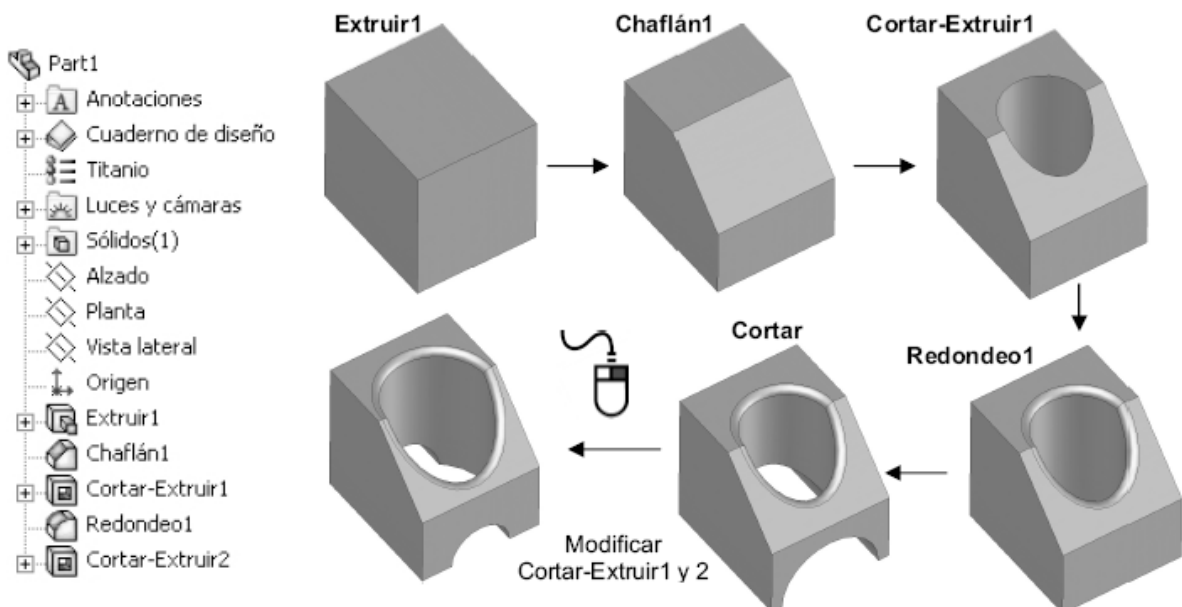


Fig. 3.5.5 Pieza ⁽⁴²⁾.

3.5.2.2 Ensamblaje

En módulo ensamblaje está formado por un entorno de trabajo preparado para la inserción de las piezas creadas previamente. Los ensamblajes se definen por el establecimiento de Relaciones Geométricas entre las piezas integrantes. La creación de ensamblajes permite analizar las posibles interferencias o choques entre los componentes móviles insertados, así como simular el conjunto mediante motores lineales, rotativos, resortes, gravedad y evaluar la correcta cinemática del conjunto ⁽⁴²⁾.

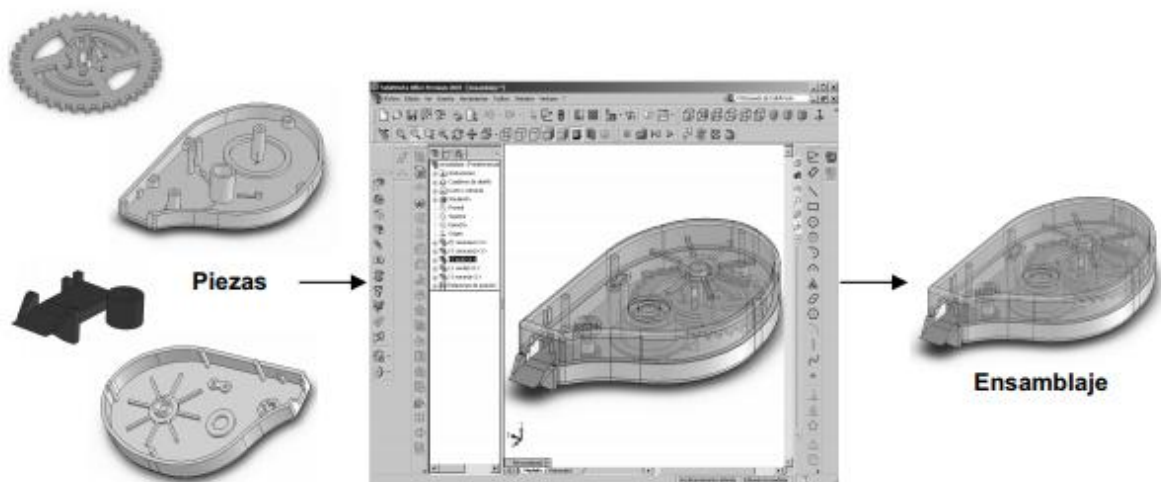


Fig. 3.5.6 Ensamblaje ⁽⁴²⁾.

3.5.2.3 Plano o Dibujo

Es el tercer módulo integrado en SolidWorks que permite crear planos con las vistas de los modelos o ensamblajes de forma automática y en muy poco tiempo. La obtención de las vistas, alzado, planta y perfil requiere únicamente pulsar sobre un icono o arrastrar la pieza 3D desde su ventana hasta la ventana del dibujo ⁽⁴²⁾.

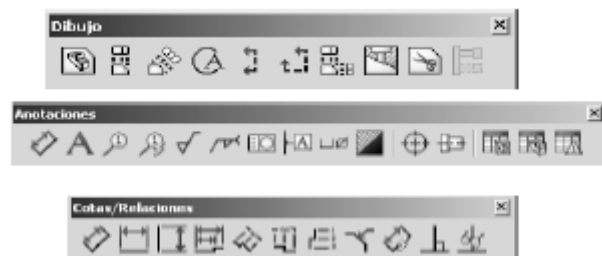


Fig. 3.5.7 Barra de herramientas ⁽⁴²⁾.

Este módulo permite obtener:

- proyecciones ortogonales (Vistas Estándar)
- Secciones y cortes
- Perspectivas
- Acotación
- Lista de materiales
- Vistas Explosionadas, etc.

Los documentos de dibujo están totalmente asociados a las piezas y ensamblajes de forma que cualquier cambio en ellas se actualizan en tiempo real en sus planos, sin tener que modificarlos de forma manual ⁽⁴²⁾.

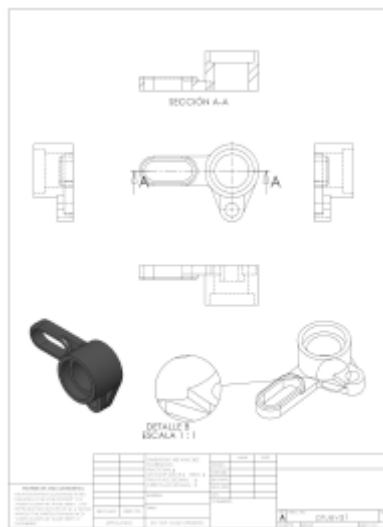


Fig. 3.5.8 Plano de una pieza ⁽⁴²⁾.

3.5.2.4 Otras aplicaciones de SolidWorks

SolidWorks contiene numerosas funciones incorporadas que permiten no solo el diseño y ensamblaje de piezas, sino también:

- Simulación y movimiento
- Análisis de interferencia
- Creación de superficies complejas
- Tablas de diseño
- Moldes
- CosmosXpress (Herramienta que permite conocer las deformaciones y tensiones de una pieza al ser sometida a un esfuerzo).
- Chapa metálica
- Lista de materiales, etc ⁽⁴²⁾.

3.6 R (Software de Probabilidad y estadística)

R es un entorno y lenguaje de programación con un enfoque al análisis estadístico. Es una implementación de software libre y es uno de los lenguajes más utilizados en investigación por la comunidad estadística, siendo muy popular en el campo de la minería de datos, la investigación biomédica, la bioinformática, etc. A esto se le adhiere la posibilidad de cargar diferentes bibliotecas con funcionalidades de cálculo y gráficas ⁽⁴³⁾
⁽⁴⁴⁾.

Está disponible para los sistemas operativos:

- Windows
- Macintosh
- Unix
- GNU/Linux

3.6.1 Características de R

- R proporciona un amplio abanico de herramientas estadísticas como ser:
 - Modelos lineales y no lineales
 - Tests estadísticos
 - Análisis de series temporales
 - Algoritmos de clasificación y agrupamiento, etc.
- Es un lenguaje de programación, lo que permite que los usuarios creen sus propias funciones, y de hecho gran parte de las funciones de R están escritas en R, aunque para algoritmos computacionalmente exigentes se pueden crear bibliotecas en C o C++.
- R es un lenguaje orientado a objetos, siendo esta característica heredada de S.
- Puede integrarse con distintas bases de datos, lo que facilita su utilización desde otros lenguajes de programación interpretados como Python.
- Puede usarse como herramienta de cálculo numérico, campo en el que puede ser tan eficaz como GNU/Octave ⁽⁴³⁾ ⁽⁴⁴⁾.

3.6.2 Extensiones y paquetes

- R forma parte de un proyecto colaborativo y abierto. Sus usuarios pueden publicar paquetes que extienden su configuración básica.
- Dado el enorme número de paquetes, éstos se han organizado según su naturaleza y función como ser la estadística bayesiana, series temporales, etc ⁽⁴³⁾ ⁽⁴⁴⁾.

3.7 Matlab

MATLAB (*Matrix Laboratory*, "Laboratorio de Matrices") es un entorno de desarrollo (IDE) con un lenguaje de programación propio (Lenguaje M).

Tiene numerosas prestaciones básicas, entre las cuales se encuentran:

- Manipulación de matrices
- Representación de datos y funciones
- Creación de interfaces de usuario
- Comunicación con programas en otros lenguajes
- Comunicación con otros dispositivos hardware, etc ⁽³⁹⁾.

Adicionalmente se pueden ampliar las capacidades MATLAB con las cajas de herramientas (*toolboxes*) y las de Simulink con los paquetes de bloques (*blocksets*).

En las versiones más recientes se han agregado nuevas prestaciones, como ser la programación directa de Procesadores digitales de señal (DSP) o crear código VHDL ⁽³⁹⁾.

Está disponible para los sistemas operativos:

- Windows
- Unix
- Macintosh
- GNU/Linux

En este Proyecto integrador se usó la *versión R2015a*.

3.7.1 Características

3.7.1.1 Lenguaje

Las aplicaciones de MATLAB se desarrollan en un lenguaje de programación propio que es del tipo interpretado, y puede ejecutarse tanto en un entorno interactivo, como a través de un archivo de script. Este lenguaje permite operaciones de vectores y matrices, funciones, programación orientada a objetos ⁽³⁹⁾ ⁽⁴⁴⁾.

3.7.1.2 Toolboxes

MATLAB incorpora numerosas cajas de herramientas, algunas de las cuales se enumeran a continuación:

1. Procesamiento de imágenes y visión artificial
2. Sistemas de control
3. Procesamiento de señales y comunicaciones inalámbricas
4. Prueba y medición

5. Finanzas computacionales
6. Generación de código
7. Acceso a base datos e informes, etc ⁽³⁹⁾.

3.7.1.3 Simulink

La herramienta Simulink permite realizar numerosos tipos de simulaciones basado en modelos diseñados por el usuario. Tiene numerosas aplicaciones como ser:

1. Modelado de sistemas físicos
 - a. Sistemas mecánicos
 - b. Sistemas hidráulicos
 - c. Sistemas electrónicos y mecatrónicos, etc.
2. Sistemas de control
3. Procesamiento de señal y comunicaciones
4. Simulación en tiempo real y test.
5. Informes y gráficos de simulación, etc ⁽³⁹⁾.

3.7.1.4 Interfaz con otros lenguajes de programación

MATLAB puede llamar y subrutinas escritas en C y Fortran. Se crea una función envoltorio que permite que sean pasados y devueltos tipos de datos de MATLAB. Los archivos de objetos dinámicamente cargables creados compilando esas funciones se denominan "*MEX-files*", aunque la extensión del archivo depende del sistema operativo y del procesador ⁽³⁹⁾.

4. DESARROLLO

El desarrollo del proyecto se dividió en dos grandes etapas:

- Desarrollo del soporte universal
- Desarrollo de la aplicación Android

A continuación se describe detalladamente los pasos que se siguieron para completar cada una de las etapas.

4.1 Soporte universal

El desarrollo del soporte se realizó en los pasos que se enumeran a continuación:

1. Relevamiento de microscopios ópticos
2. Relevamiento de smartphones en el mercado
3. Diseño del soporte en SolidWorks
4. Fabricación del soporte
5. Prueba de desempeño del soporte

4.1.1 Paso 1: Relevamiento de microscopios ópticos

Para poder realizar un diseño de un soporte que se adapte a la mayoría de los microscopios ópticos, fue necesario hacer un relevamiento de algunos microscopios ópticos; para ello se concurrió al Hospital Municipal de Urgencias de la Ciudad de Córdoba donde se realizaron las mediciones de interés.

El diseño del soporte se concibió desde un principio, para ser acoplado al ocular o porta ocular del microscopio, porque es en estas dos partes en donde los microscopios ópticos presentan mayor similitud independientemente de la marca o modelo.

En el Anexo B se presentan los datos de manera tabulada, con los cuales se pudo realizar el diseño propiamente dicho.

4.1.2 Paso 2: Relevamiento de smartphones en el mercado

Otra variable importante para el diseño del soporte, fue contemplar los distintos tipos de smartphones que se encuentran en circulación, ya que hay una gran variedad de marcas y modelos.

Los datos de interés para esta etapa de desarrollo fueron:

- Dimensiones del smartphone
- Ubicación de la cámara trasera del smartphone

- Ubicación del botón encendido/apagado
- Ubicación los botones de volumen

En el Anexo C se adjuntan los datos estudiados, que permitieron determinar las dimensiones del soporte.

4.1.3 Paso 3: Diseño del soporte en SolidWorks

Una vez realizados los dos pasos anteriores se comenzó con el diseño del soporte. Para ello se utilizó el software CAD (Diseño Asistido por Computadora) SolidWorks.

Como se mencionó previamente, se consideró desde el inicio un diseño que permita acoplar el soporte al ocular o porta ocular del microscopio, y en base a esto se planteó el siguiente esquema general que sirvió como punto de partida para los distintos prototipos que se desarrollaron.

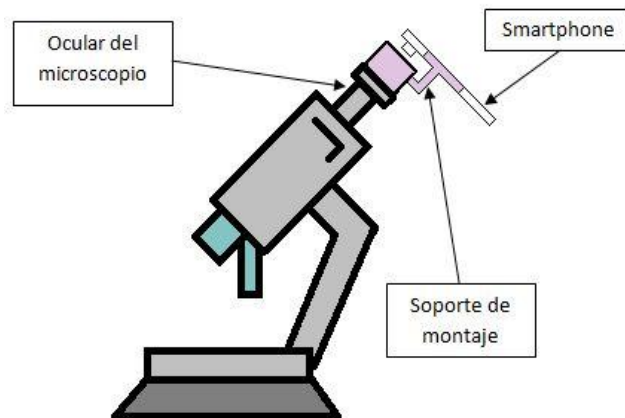


Fig. 4.1.1 Esquema general del soporte universal.

A lo largo de esta etapa se pasaron por varios prototipos hasta llegar al diseño final, ya que algunos no funcionaron de la manera esperada por ser demasiado sencillos y otros que si eran funcionales eran más complejos y costosos de fabricar.

Gran parte del diseño del prototipo final se ajustó a materiales que se pueden encontrar fácilmente en el mercado como ser:

- Perfiles de aluminio estandarizados
- Varillas roscadas estandarizadas
- Tuercas estandarizadas

Para las partes más complejas de fabricar se optó por el uso de una impresora 3D.

A continuación se enumeran los materiales estandarizados usados para el diseño y construcción de este soporte, los cuales son:

1. Varilla cilíndrica de aluminio de ½ pulgada
2. Varilla cilíndrica de bronce de ½ pulgada
3. Perfil L de aluminio de 100x50x2,5 mm

4. Perfil L de aluminio de 80x20x1,25 mm
5. Barra cuadrada de aluminio de 28x28 mm
6. Planchuela de aluminio de 38 mm de ancho y 3 mm de espesor
7. Varilla roscada 3/16
8. Tornillos de 1/8
9. Tuercas 3/16

4.1.3.1 Prototipo final

En la siguiente figura se muestra el prototipo diseñado, el cual está constituido por distintos subconjuntos, que en la imagen se representan de distintos colores para su mejor visualización.

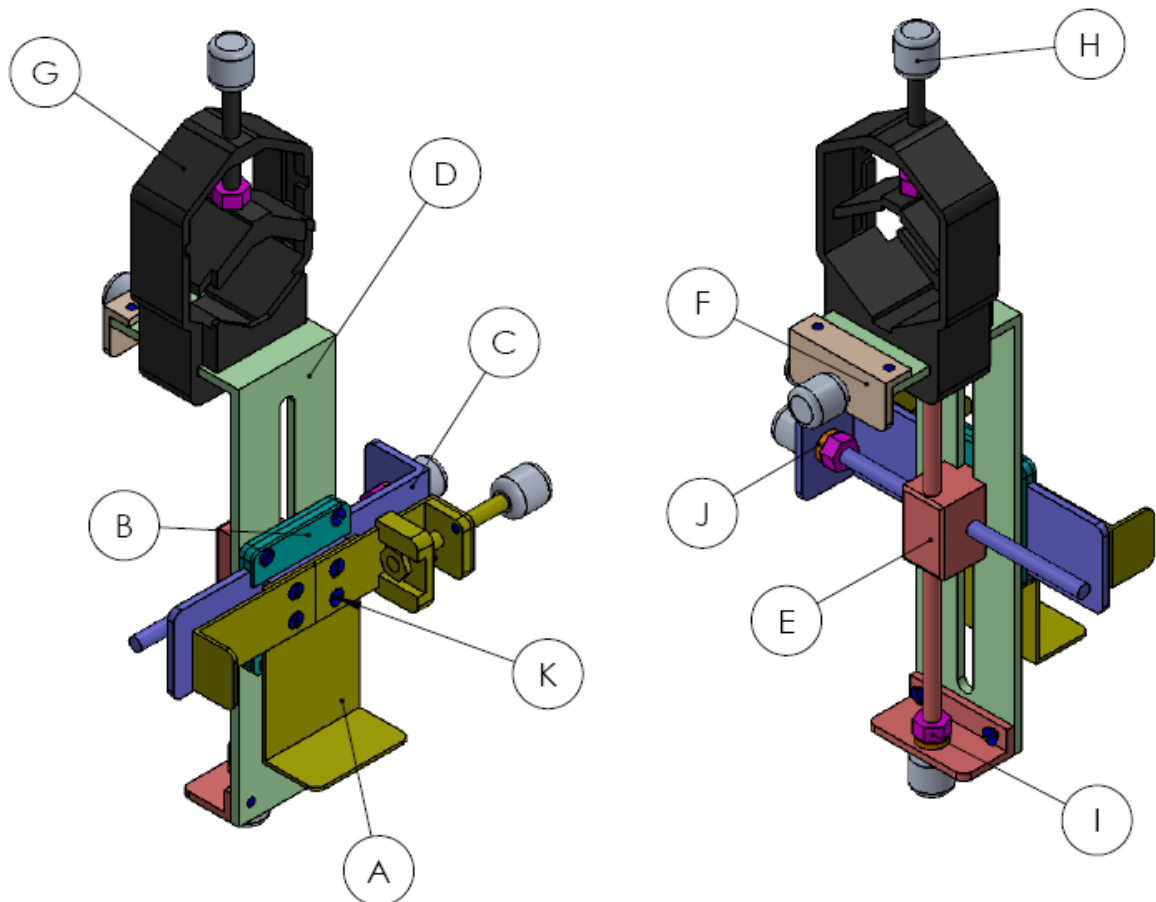


Fig. 4.1.2 Prototipo del soporte universal.

Como se observa en la figura anterior, cada subconjunto está conformado por una serie de piezas representadas con un mismo color. Estos subconjuntos realizan una función específica e independiente de los otros subconjuntos.

En la siguiente tabla se enumeran y describen brevemente los subconjuntos indicados en la figura.

Código subconjunto/pieza	Nombre del subconjunto/pieza	Descripción
A	Agarradera	Sujeta el smartphone
B	Guía lateral	Guía del deslizante lateral
C	Deslizante lateral	Permite el movimiento horizontal del smartphone
D	Cuerpo principal	Sirve como guía de los subconjuntos deslizantes vertical y antero-posterior (A-P)
E	Deslizante vertical	Permite el movimiento vertical del smartphone
F	Deslizante A-P	Permite el movimiento antero-posterior del smartphone
G	Cabezal	Permite sujetar el soporte al ocular o porta ocular del microscopio
H	Perillas	Permite la rotación de las varillas roscadas
I	Tuercas 3/16	Funcionan como anillos de retención
J	Bujes	Disminuye el rozamiento de las perillas con las superficies metálicas de los perfiles en L
K	Tornillos 1/8	Permiten la integración y sujeción de las piezas.

Tabla 4.1.1 Subconjuntos del prototipo.

En el anexo G se encuentran los planos de cada uno de los subconjuntos y cada una de las piezas.

4.1.4 Paso 4: Fabricación del soporte

Las herramientas que fueron necesarias para la fabricación del soporte fueron:

- Torno
- Fresadora
- Taladro de banco
- Morza
- Sierra
- Marcadores indelebles
- Regla de precisión
- Calibre digital
- Destornilladores

- Tarrajas macho
- Adhesivo traba roscas
- Impresora 3D

Las dos piezas del cabezal se fabricaron con una impresora 3D con un paso de 0,2 mm y con un filamento PLA (Polilactida). El resto de los subconjuntos son perfiles de aluminio.

El PLA es un termoplástico que se obtiene a partir del almidón de maíz, mandioca o caña de azúcar. Es utilizado para la fabricación de algunos tipos de envases, y además es biodegradable (se degrada en agua y óxido de carbono).

Se utiliza ampliamente en la impresión 3D bajo el proceso de modelado por deposición de hilo fundido (FDM), que utiliza una técnica aditiva que deposita el material en capas para conformar la pieza. El material (que se almacena en rollos), es introducido en una boquilla que se encuentra por encima de la temperatura de fusión del material (180–200 °C), y deposita en el mismo sobre una plataforma. El esquema siguiente resume de manera sencilla como es el funcionamiento de la impresión 3d con este tipo de filamentos:

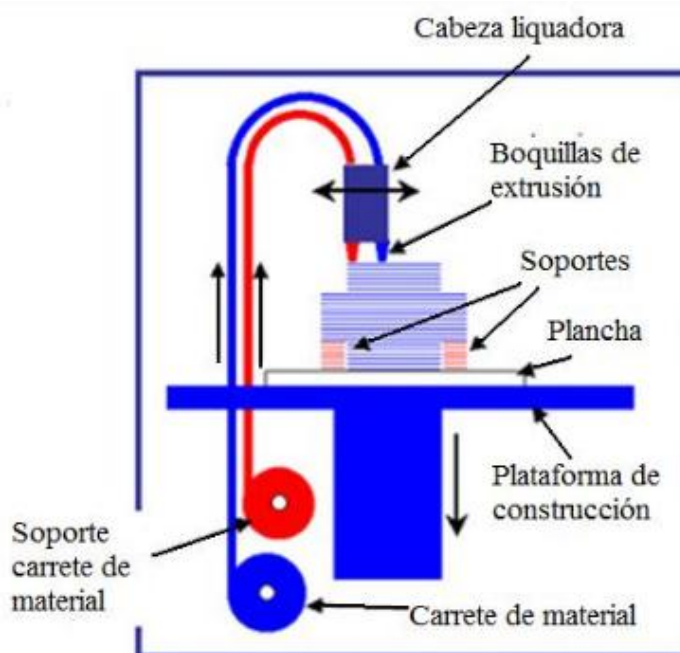


Fig. 4.1.3 Esquema de la máquina FDM ⁽⁴⁵⁾.

4.1.5 Paso 5: Prueba de desempeño del soporte

El soporte se desempeñó satisfactoriamente en el microscopio, obteniéndose la imagen de una manera muy sencilla una vez que se ajustó al ocular. El soporte puede controlar el movimiento en los tres ejes espaciales de manera "precisa", gracias a que la rosca de la varilla 3/16 tiene un paso fino, el cual es necesario para el correcto ajuste de la cámara en la posición adecuada.

Las pruebas se realizaron con los siguientes smartphones:

- LG G4 H815
- Motorola G5 Plus
- Motorola G3 XT1542

En la siguiente figura se muestra el ensamble completo del soporte con el smartphone al microscopio óptico:

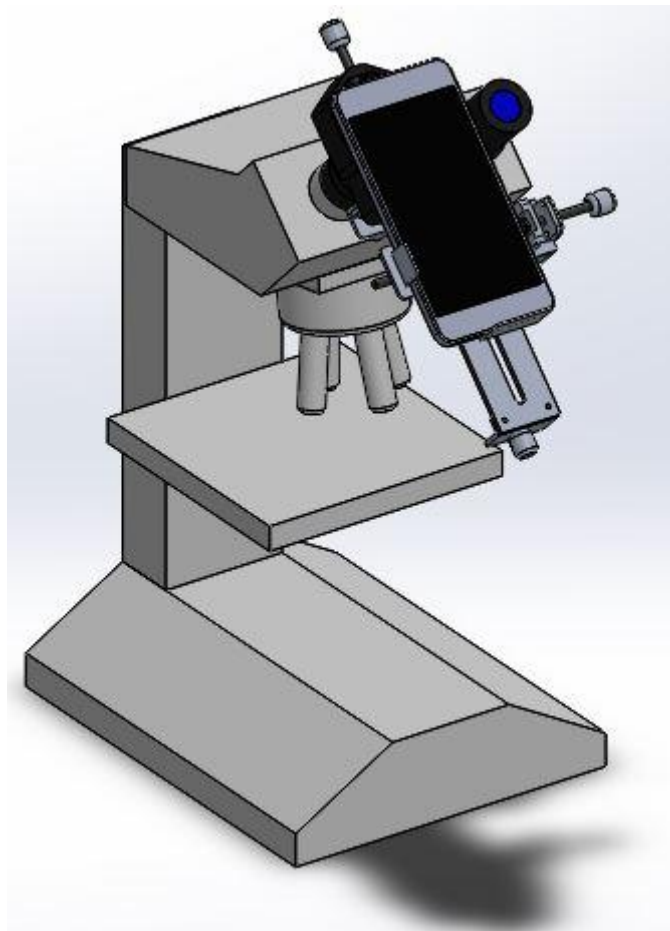


Fig. 4.1.4 Ensamble completo del soporte y smartphone al microscopio óptico.

4.2 Aplicación Android

El nombre elegido para esta app es HistoSoft y el ícono con el cual el usuario puede encontrarla en su smartphone es:



Fig 4.2.1 Ícono de la aplicación HistoSoft.

Como se puede observar, el icono corresponde a un smartphone donde en la pantalla del mismo se puede ver una fotografía del campo de un microscopio óptico. Esto indica al usuario de manera general a que se dedica la app HistoSoft. La confección de la imagen central del ícono se hizo usando una imagen histológica tomada en el Hospital Municipal de Urgencias, y el smartphone se dibujó con el software Paint de Microsoft. Una vez realizado este primer esquema, se usa la función Image Asset de Android Studio, que permite al usuario crear íconos personalizados. Android Studio se encarga de generar todos los tamaños de íconos que se ajusten de la mejor manera a la densidad de pantalla del dispositivo que tenga instalada la aplicación.

Una vez iniciada por primera vez la aplicación, se presenta un formulario con los siguientes ítems: Nombre y apellido del usuario, el área de trabajo y la muestra a analizar. Estos campos deben completarse correctamente para poder utilizar la aplicación, ya que los nombres de las carpetas donde se ubican las imágenes adquiridas y procesadas dependen de estos campos, con el fin de tener un mejor ordenamiento. Esta opción puede seleccionarse nuevamente con la opción "agregar muestra" como se observa en la figura 4.2.44 para el caso de que se cambie de usuario, área o muestra.

Las funciones principales que pueden realizarse en esta aplicación son:

1. Cargar imagen a la app
2. Recorte de la imagen
3. Rotación de la imagen
4. Edición de la imagen
5. Procesamiento de la imagen
6. Medición de longitudes en la imagen
7. Recuento de Ki-67
8. Compartir imagen

A continuación se describe cada una de estas funciones detalladamente.

4.2.1 Cargar imagen a la aplicación

Cargar la imagen de interés a la aplicación se puede hacer de dos formas:

1. Accediendo a la galería del smartphone y abrir la imagen deseada, o
2. Usar la cámara del smartphone para tomar la fotografía desde la aplicación.

Estas dos tareas se realizan en la actividad principal de la aplicación, que es la que se muestra a continuación:



Fig. 4.2.2 Actividad principal de la aplicación.

Una vez cargada la imagen, se lanzará la segunda actividad de la app. En esta sección de la aplicación se puede seleccionar que función se desea aplicar a la imagen. Esta segunda actividad se visualiza de la siguiente manera:

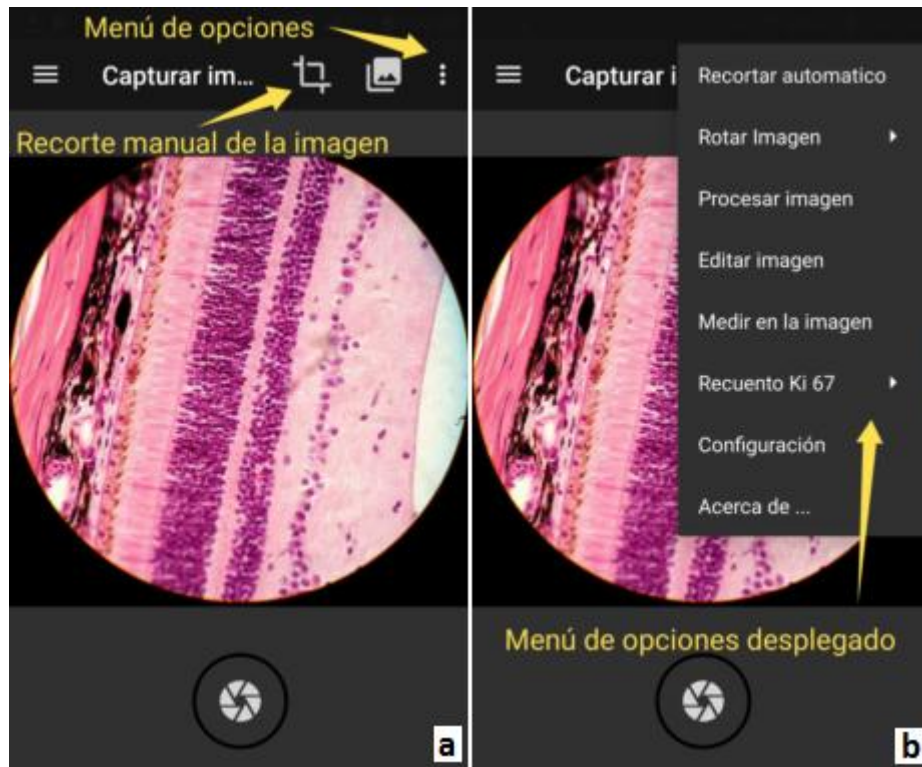


Fig. 4.2.3 Segunda Actividad.

(a) Se indican los símbolos del recorte manual y el menú de opciones. (b) Se muestra el menú de opciones desplegado.

En la figura anterior se indican los botones de recorte manual y el menú de opciones. Cuando se despliega el menú de opciones, se pueden observar las funciones principales que se mencionaron anteriormente, y seleccionando cualquiera de éstas, se lanza una actividad dedicada a dicha función, excepto para el caso de la función "Rotar imagen", que aplica los cambios en esta misma actividad.

En la segunda actividad también se siguen teniendo los botones para tomar una fotografía o cargar una imagen desde la galería. Esto es así porque se deja la opción al usuario que cambie la imagen rápidamente en caso de no estar satisfecho con la imagen que ingresó a la aplicación previamente.

4.2.2 Recorte de la imagen

4.2.2.1 Recorte automático

En el menú desplegado de la figura 4.2.2 (b) se observa la opción de "Recorte automático", que permite recortar la imagen automáticamente solo en los casos en el que en la fotografía se observa una circunferencia perfecta del campo del microscopio, ya que el algoritmo que realiza esta función fué pensado para este caso en concreto. El algoritmo que realiza esta tarea, centra un cuadrado en el centro de la circunferencia, y en base

al radio de la misma se calcula los lados del cuadrado de mayor área que pueda contener el círculo.

En la siguiente figura se observa un esquema de lo que realiza el algoritmo de recorte automático:

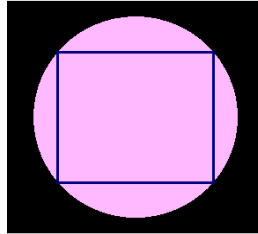


Fig. 4.2.4 Esquema de funcionamiento del algoritmo de recorte automático.

Los pasos lógicos usados para crear esta función fueron:

1. Convertir la imagen en escala de grises
2. Binarizar la imagen
3. Rellenar los huecos que queden en el campo binarizado con el método de OpenCv *floodfill()*.
4. Recorrer la imagen buscando la máxima distancia horizontal entre los píxeles blancos correspondientes a la circunferencia.
5. Calcular el radio y centro de la circunferencia.
6. Determinar las coordenadas de los lados del cuadrado para hacer el recorte.

Para binarizar la imagen utilizamos la binarización de Otsu que se explica a continuación.

Binarización de Otsu

Este tipo de binarizado sirve para imágenes bimodales, es decir, aquellas imágenes cuyo histograma tiene dos picos como se muestra en la siguiente figura:

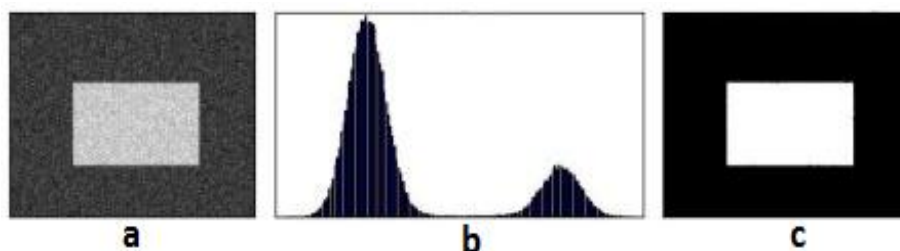


Fig. 4.2.5. A. Binarización 1

(a) Imagen original en escala de grises. (b) Histograma de la imagen original. (c) Resultado de la binarización de Otsu ⁽⁴⁶⁾.

Para esa imagen podemos tomar un valor entre medio de esos dos picos como umbral. En otras palabras la binarización de tipo Otsu determina el umbral automáticamente en base a su histograma.

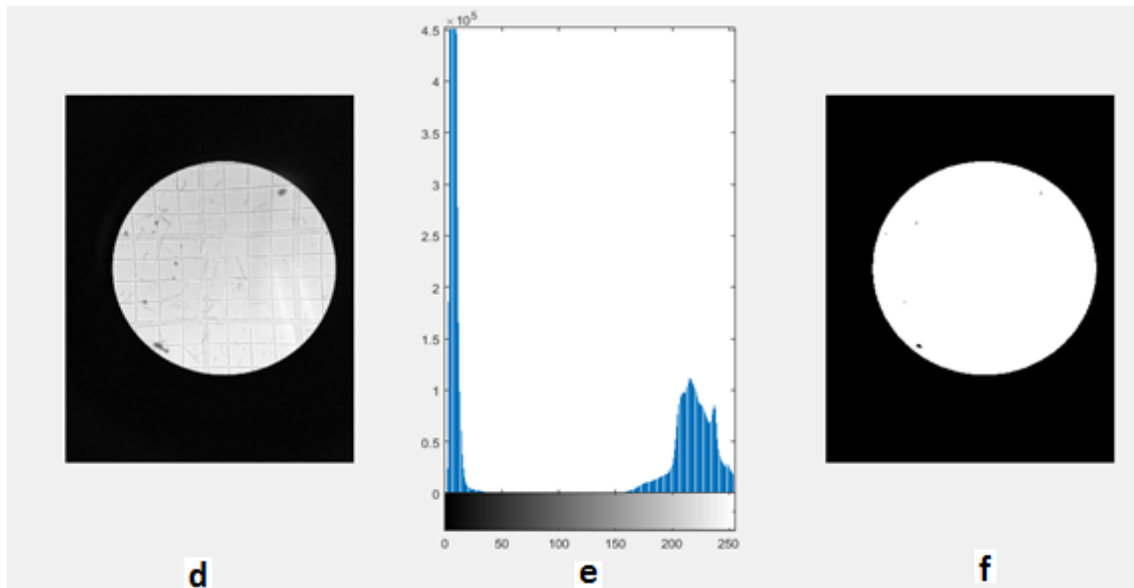


Fig. 4.2.5. B. Binarización 2

(d) Imagen original. (e) Histograma obtenido con Matlab. (f) Resultado de la binarización de Otsu con la aplicación.

En Android Studio se utiliza la clase de OpenCv *ImgProc*, y concretamente la función *threshold()* que recibe los siguientes parámetros:

```
ImgProc.threshold(imagen_entrada, imagen_salida, valor_umbral, maximo_valor,
                 tipo_de_umbral);
```

- *imagen_entrada*: imagen en escala de grises (8 bits).
- *imagen_salida*: imagen binarizada.
- *valor_umbral*: es el valor que determina el límite de binarización, se coloca el valor cero por defecto cuando se emplea el tipo de umbral Otsu.
- *maximo_valor*: es el valor que será asignado a los píxeles que superan el *valor_umbral*, en nuestro caso se seleccionó 255.
- *tipo_de_umbral*: se utiliza la bandera `THRESH_BINARY + THRESH_OTSU` porque utilizamos el umbral binario combinado con el binarizado de Otsu.

La línea de código en la aplicación para esta tarea es:

```
ImgProc.threshold(imagen_entrada, imagen_salida, 0, 255, ImgProc.THRESH_BINARY
+ ImgProc.THRESH_OTSU);
```

4.2.2.2 Recorte manual

Cuando el usuario utiliza el "Recorte manual" se lanza una actividad exclusiva para esta tarea, en la cual el usuario puede "trazar" con el uso del touch de la pantalla un recuadro de la región de la imagen con la que desea trabajar. Se agrega además en esta actividad, la función de "Zoom" que permite visualizar estructuras más pequeñas y realizar un recorte más preciso. En la siguiente figura se puede ver esta actividad:

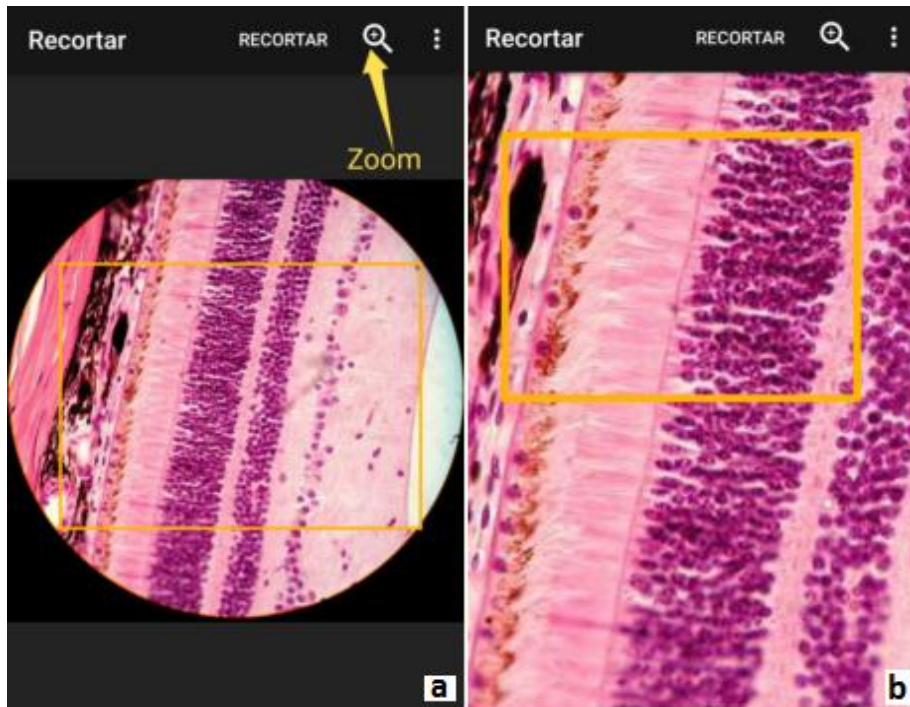


Fig. 4.2.6 Actividad para el recorte manual.
(a) Recorte de la imagen sin zoom. (b) Recorte de la imagen con zoom.

En esta actividad se deben ir alternando los botones de "Zoom" y "Recorte" para acercar o alejar la imagen y para dibujar el recuadro de recorte respectivamente.

4.2.3 Rotación de la imagen

Si se selecciona la opción rotar imagen del menú desplegable de la figura 4.2.2 (b), se encuentran dos posibilidades:

- Rotar hacia la derecha
- Rotar hacia la izquierda

En cualquiera de los dos casos la rotación es de 90°.

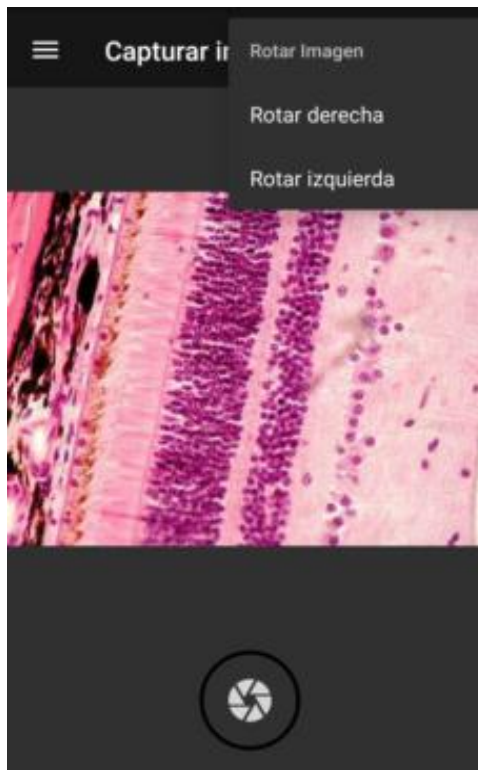


Fig. 4.2.7 Rotación de imagen hacia la derecha o la izquierda.

4.2.4 Edición de la imagen

En esta sección de la aplicación se pueden realizar las siguientes operaciones:

1. Zoom
2. Dibujar trazos de distintos colores
3. Insertar flechas de distintos colores
4. Insertar texto de distintos colores
5. Cambiar el tamaño de los trazos, flechas y texto
6. Descartar los cambios realizados
7. Guardar imagen con los cambios realizados

En la figura siguiente se muestran capturas de pantalla de esta actividad indicando las funciones de cada botón.

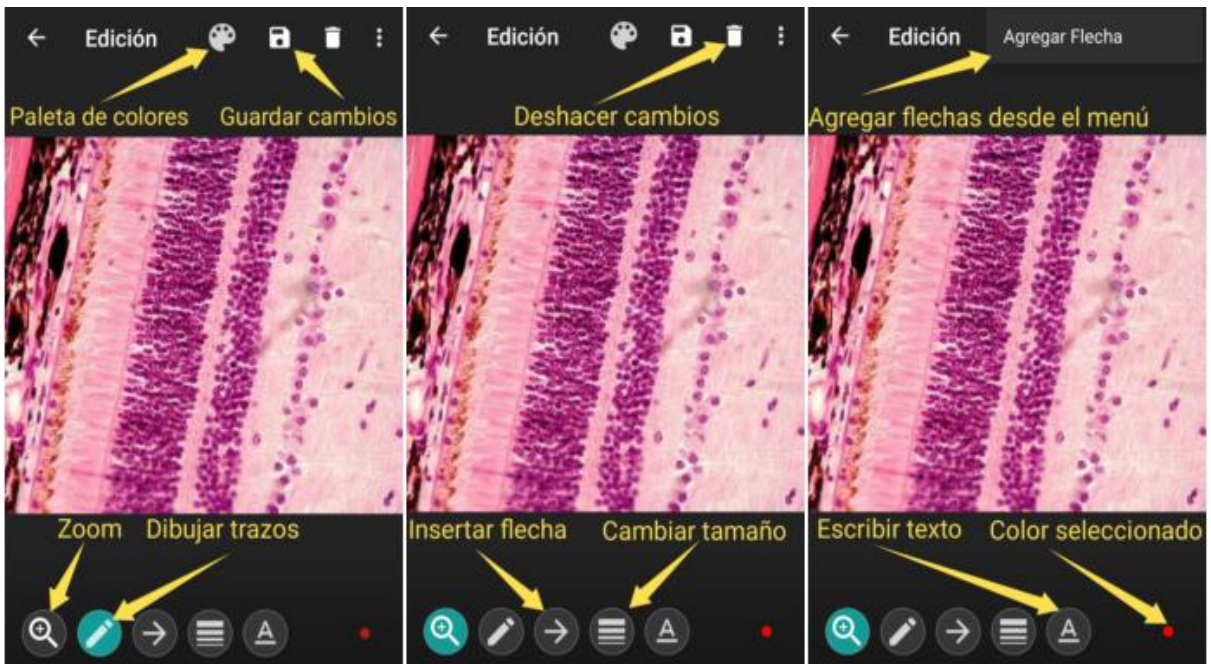


Fig. 4.2.8 Actividad para la edición de imágenes.

Cuando se inserta una flecha aparecen dos nuevos botones que permiten la rotación de la flecha insertada como se muestra en la siguiente figura:



Fig. 4.2.9 Botones de rotación en sentido horario y anti horario de la flecha insertada.

4.2.5 Procesamiento de la imagen

Una vez que se selecciona la opción de "Procesar imagen" se lanza una actividad que permite realizar los procesamientos básicos de una imagen, que son los que se enumeran a continuación:

1. Escala de grises
2. Binarizado
3. Invertir colores (negativo de la imagen)
4. Saturación
5. Brillo
6. Contraste
7. Nitidez
8. Temperatura del color
9. Ecuación

En la siguiente figura se muestra esta actividad:

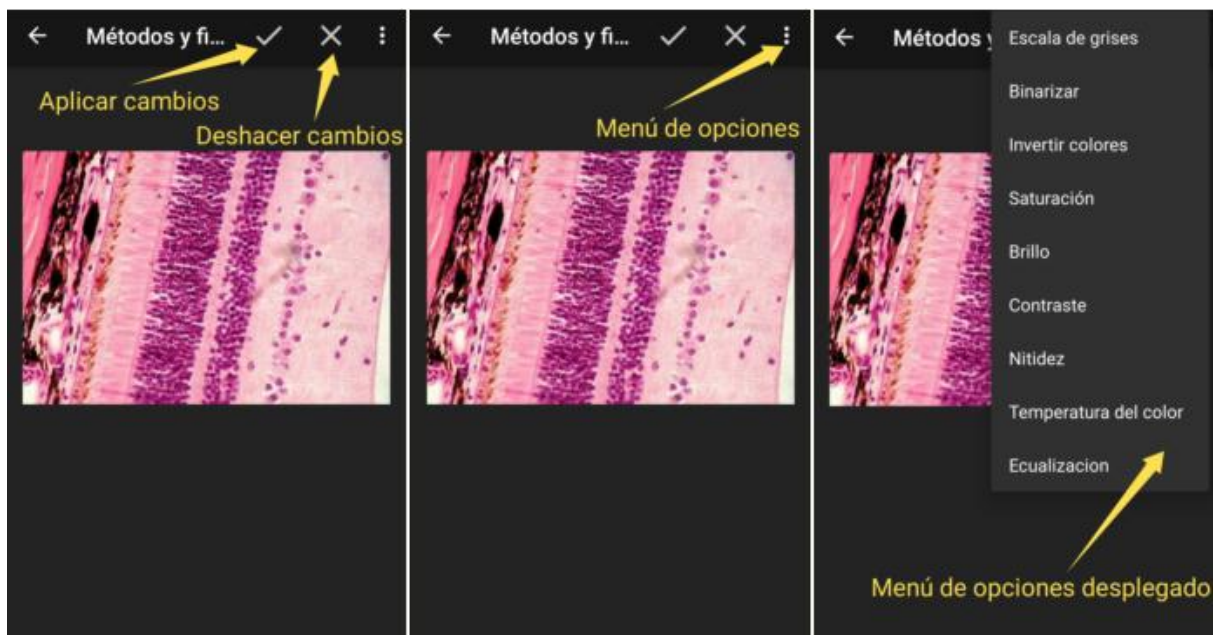


Fig. 4.2.10 Actividad dedicada a los procesamientos básicos de imágenes.

Cabe aclarar que los algoritmos de procesamientos básicos que se utilizaron para el desarrollo de esta aplicación no degradan la calidad de la imagen, como sí ocurre con otras aplicaciones que se encuentran disponibles en la tienda de Google. Estos algoritmos de procesamiento provienen de la librería OpenCV en C++. Esto permite obtener mayor velocidad de procesamiento que usando Java, ya que en C++ las operaciones se hacen 15 veces más rápido.

El único procesamiento que se realizó completamente en código Java fue el de la modificación de la saturación de la imagen, ya que en OpenCV aún no se ha implementado un algoritmo para esta tarea.

Android Studio opera las imágenes a través de la clase *Bitmap* entre otras. Esta clase representa la imagen en una matriz de idénticas dimensiones con los formatos básicos de información de píxeles, tales como RGB, HSI, ARGB, etc. Una vez que se tiene la imagen cargada en una instancia de esta clase, ésta puede ser procesada. Como se mencionó anteriormente el procesamiento se realiza en OpenCV porque brinda una cantidad considerable de métodos en Java, cuyo algoritmo se ejecuta en C++ a través de la interfaz nativa de Java (JNI). OpenCV brinda una amplia gama de operaciones con matrices, manejo de lectura y escritura de imágenes, operaciones morfológicas, etc., y como se mencionó anteriormente en la sección 3.4.5, OpenCv opera las imágenes a través de la clase *Mat*, que permite procesar las imágenes pixel a pixel por medio de las siguientes clases:

- *ImgProc*
- *Utils*
- *CvType*
- *Core*
- *Imgcodecs*

A continuación se explica brevemente cada uno de los procesamientos básicos que realiza la aplicación y se muestra el resultado que se obtiene. Se explica brevemente qué funciones y clases de OpenCv se utilizaron en cada caso.

4.2.5.1 Escala de grises

Este procesamiento permite pasar de una imagen a color que contiene tres canales (RGB), cada uno con 256 valores posibles, a una imagen en escala de grises (de un canal) de 256 valores posibles ⁽⁴⁶⁾.

La clase de OpenCV utilizada para realizar el procesamiento es *ImgProc* y se utiliza el siguiente método de clase y constante de clase:

```
ImgProc.cvtColor(input,output,constante_de_transformacion);
```

El *input* corresponde a la imagen dato que va a ser procesada, el *output* es la imagen procesada, y la constante de transformación corresponde al tipo de procesamiento que se desea realizar. Los argumentos *input* y *output* deben ser objetos de la clase *Mat*.

El método anterior en Android Studio quedaría de la siguiente manera:

```
ImgProc.cvtColor(imagen_a_procesar,imagen_procesada,  
                ImgProc.COLOR_BGR2GRAY);
```

La constante de transformación *COLOR_BGR2GRAY* es la que determina que el procesamiento es pasar de una imagen a color de RGB a otra en escala de grises.

Una vez procesada la imagen lo que se hace es usar un método estático de la clase *Utils* que permite el pasaje de un objeto de tipo *Mat* a otro objeto de tipo *Bitmap*. La siguiente línea de código realiza esta tarea:

```
Utils.matToBitmap(imagen_procesada, imagen_a_visualizar);
```

En la línea anterior, *imagen_procesada* es un objeto tipo *Mat* e *imagen_a_visualizar* es de tipo *Bitmap*. Este pasaje es de un tipo de objeto a otro es necesario porque Java puede soportar objetos de la clase *Bitmap* para el manejo de imágenes y no del tipo *Mat*. En los siguientes procesamientos se debe usar este mismo método.

A continuación se muestra como realiza este procesamiento la aplicación:

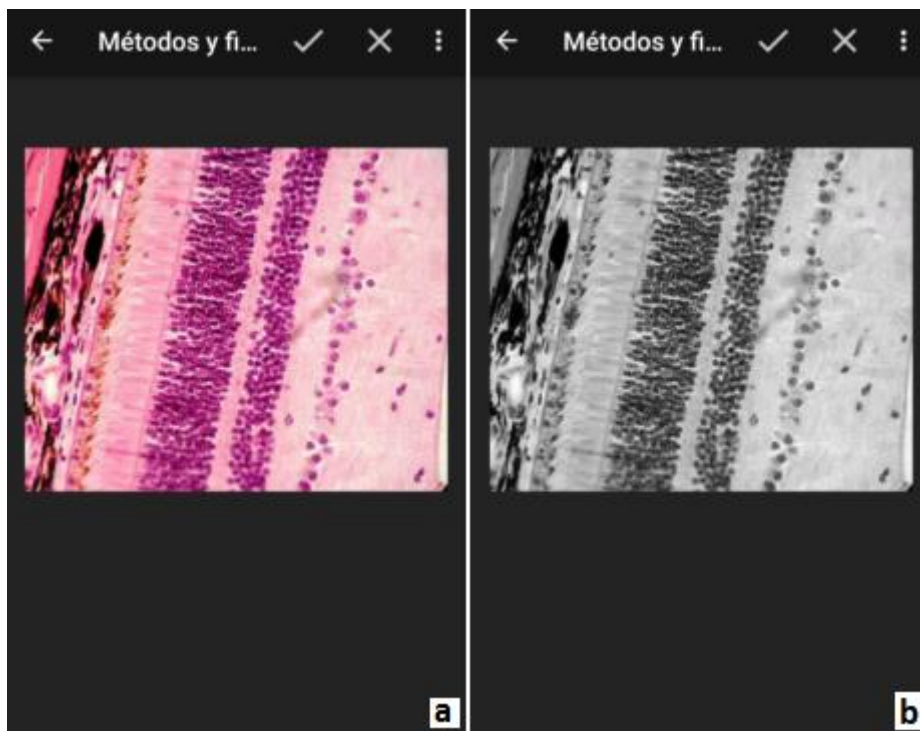


Fig. 4.2.11 (a) Imagen original. (b) Imagen en escala de grises.

4.2.5.2 Binarizar

Este tipo de procesamiento de imagen permite al usuario pasar de una imagen en escala de grises con 256 valores, a una imagen con dos valores posibles, es decir, 0 y 1 ó 0 y 255 dependiendo de la escala utilizada. El algoritmo de procesamiento permite al usuario elegir qué valor en la escala de grises funcionará como límite. Los valores de los píxeles que se encuentren por encima de este límite se visualizarán en blanco y los que se encuentren por debajo se visualizarán en negro. Se trata del tipo más sencillo de segmentación ⁽⁴⁶⁾.

La clase de OpenCV utilizada para esta tarea fué *ImgProc*, y el método de clase usado requiere 5 argumentos y es:

```
ImgProc.threshold(input,output,umbral_de_binarización, máximo valor,  
                 tipo_de_threshold);
```

El *input* corresponde a la imagen dato a ser procesada, el *output* es la imagen resultado del procesamiento, el *umbral de binarización* es el valor seteado por el usuario para definir a partir de que valor en la escala de grises se realiza la binarización, es decir que por debajo de este umbral se visualiza en negro y por encima se visualiza en blanco, el *máximo valor* corresponde al máximo de la escala que se está usando (generalmente se usa la escala de 0 - 255), y el tipo de *threshold* corresponde al tipo de segmentación que es utilizada para realizar el procesado. El método de clase anterior escrito en Android Studio es:

```
ImgProc.threshold(imagen_a_procesar,imagen_procesada,umbral_de_binarización  
                 ,255, ImgProc.THRESH_BINARY);  
Utils.matToBitmap(imagen_procesada,imagen_a_visualizar);
```

La imagen a procesar y la imagen procesada deben ser objetos de la clase *Mat*.

A continuación se muestra una demostración de cómo es el funcionamiento del algoritmo:

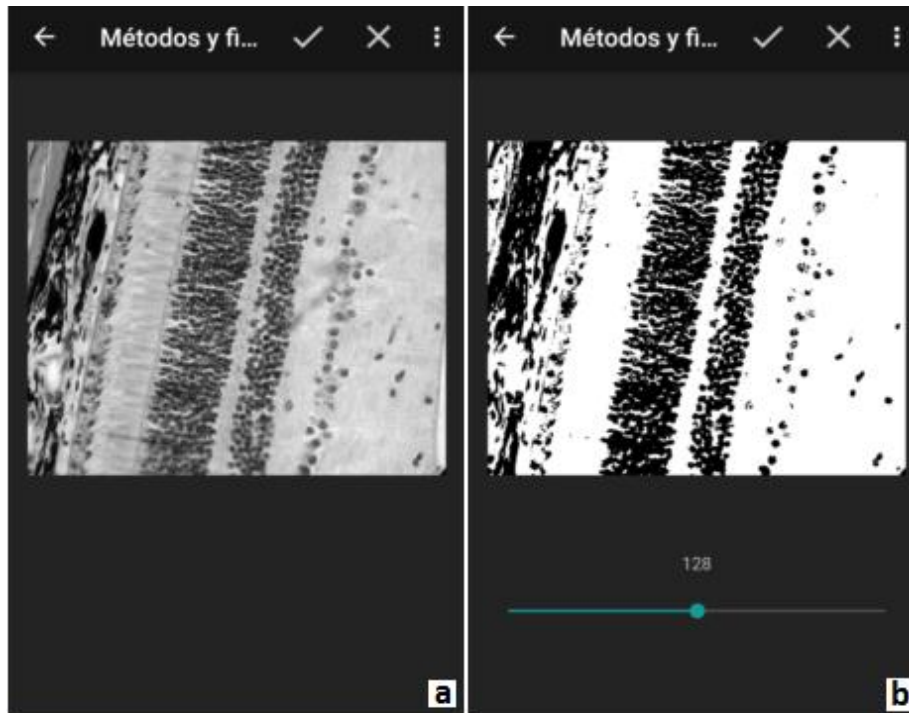


Fig. 4.2.12 Binarizar imagen en escala de grises

(a) Imagen en escala de grises. (b) Imagen binarizada tomando como límite el valor 128 en la escala de grises. Todo valor que se encuentre por encima de 128 se visualiza como blanco y lo que se encuentre por debajo se visualiza en negro.

La barra de progreso que se encuentra en la Fig. 4.2.10 (b) es la que permite ajustar el umbral de binarización por parte del usuario.

4.2.5.3 Invertir colores (negativo de la imagen)

Este algoritmo permite reemplazar el valor de un pixel por su complementario, es decir si se trata de una imagen binaria por ejemplo se reemplaza el valor 1 (o 255) por el 0 y viceversa ⁽⁴⁶⁾. En la sección 3.3.5.5.1 se explica detalladamente este procedimiento.

La clase de OpenCV que permite realizar esta tarea es *Core*, y se utiliza el siguiente método de clase:

```
Core.bitwise_not(input,output);
```

El *input* es la imagen a procesar y el *output* es la imagen procesada, ambos son objetos de la clase *Mat*. En Android Studio el código que realiza este proceso es:

```
Core.bitwise_not(imagen_a_procesar,imagen_procesada);  
Utils.matToBitmap(imagen_procesada,imagen_a_visualizar);
```

A continuación se muestra el resultado de aplicar este algoritmo a una imagen:

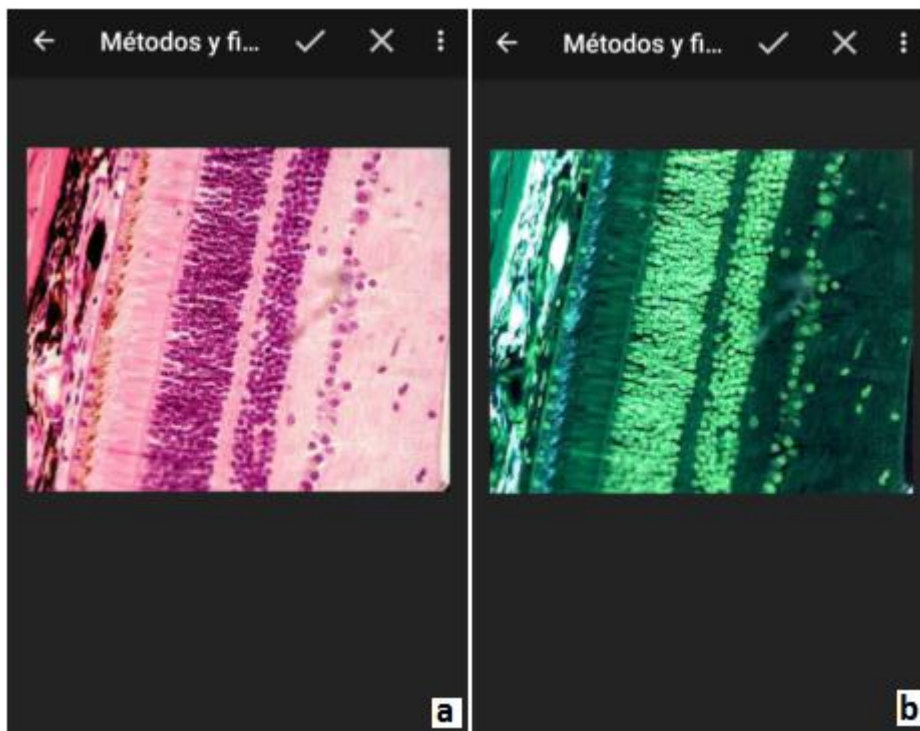


Fig. 4.2.13 (a) Imagen original. (b) Negativo de la imagen.

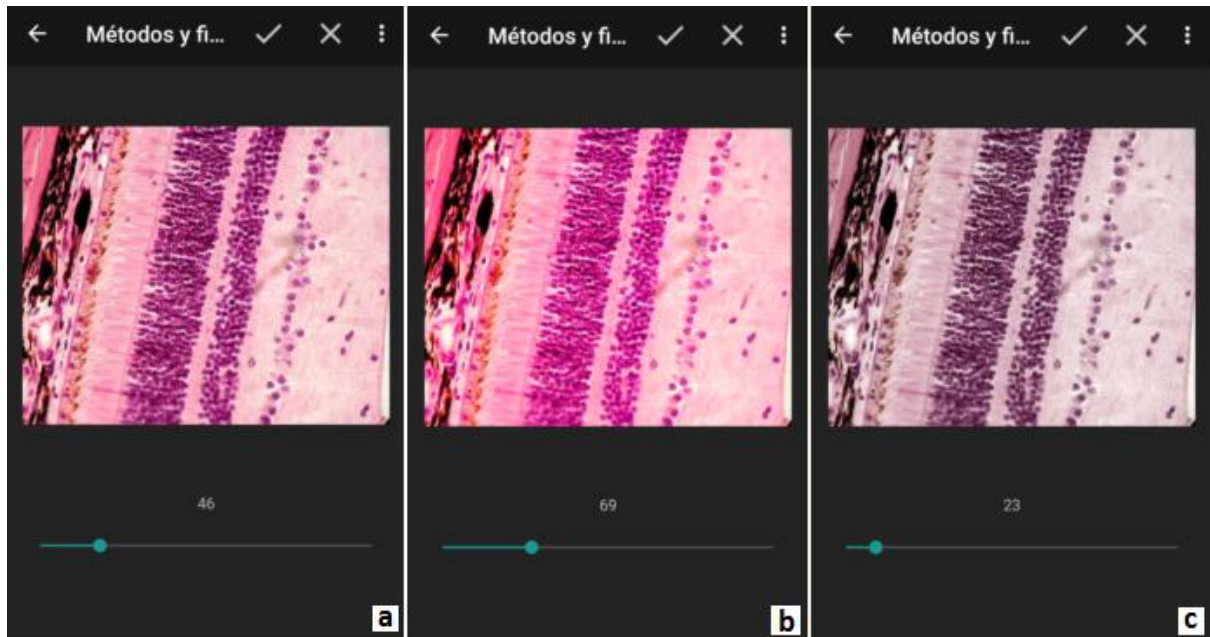
4.2.5.4 Saturación

La saturación es la intensidad de un tono específico. Un color muy saturado tiene un color vivo e intenso, y mientras que un color poco saturado parece más descolorido y gris. Sin saturación un color se transforma en un tono de gris ⁽⁴⁶⁾.

El procesamiento utilizado para este caso fue realizado íntegramente en código Java, porque no hay en la documentación oficial de OpenCv un método que realice este trabajo, por lo que a continuación se describe brevemente los pasos usados para hacer esto:

1. Se crea un *Bitmap* con el tamaño de la imagen a procesar.
2. Se establece un objeto de la clase *Canvas* (Lienzo).
3. Se crea un objeto de la clase *Paint* que permite "dibujar" en el *Canvas*.
4. Se crea un objeto de la clase *ColorMatrix*, y luego a través del método *setSaturation()* se establece el valor deseado.
5. Se crea un objeto de la clase *ColorMatrixColorFilter*, pasándole como argumento del constructor el objeto de la clase *ColorMatrix* creado anteriormente.

A continuación se muestra el resultado obtenido en la aplicación:



4.2.14 (a) Imagen original. (b) Imagen con aumento de la saturación. (c) Imagen con disminución de la saturación.

El código Java utilizado es:

```
Bitmap bitmap = Bitmap.createBitmap(imagen_a_procesar.getWidth(),
imagen_a_procesar.getHeight(), Bitmap.Config.RGB_565);
Canvas canvas= new Canvas(bitmap);
Paint paint = new Paint();
ColorMatrix colorMatrix = new ColorMatrix();
colorMatrix.setSaturation((float)progreso/50);
ColorMatrixColorFilter filter = new
ColorMatrixColorFilter(colorMatrix); paint.setColorFilter(filter);
canvas.drawBitmap(imagen_a_procesar, 0, 0, paint);
```

En el método *setSaturation()* la variable *progreso* indica el valor seteado por el usuario en la barra de progreso, como se observa en la figura anterior.

4.2.5.5 Brillo

Se entiende como brillo a la capacidad de un color para reflejar la luz blanca que incide en él. Alude a la claridad u oscuridad de un tono. El algoritmo de procesamiento trabaja aumentando (o disminuyendo) de manera proporcional la intensidad de los píxeles ⁽⁴⁶⁾.

La clase de OpenCV que permite realizar esta tarea es *Mat*, y se utiliza el siguiente método:

```
input.convertTo(output, tipo_de_salida, alpha, beta);
```

En la línea anterior el método convierte los píxeles de la imagen de origen a otro tipo de datos con un escalamiento y traslación opcional. El *input* es la imagen dato y el *output* es la imagen resultado del procesamiento. El *tipo_de_salida* hace referencia si tanto la entrada como la salida tienen el mismo tipo de datos o son distintas; y *alpha* es un factor de escala opcional y *beta* es una traslación opcional a los valores escalados.

En la figura siguiente se muestra este tipo de procesamiento:

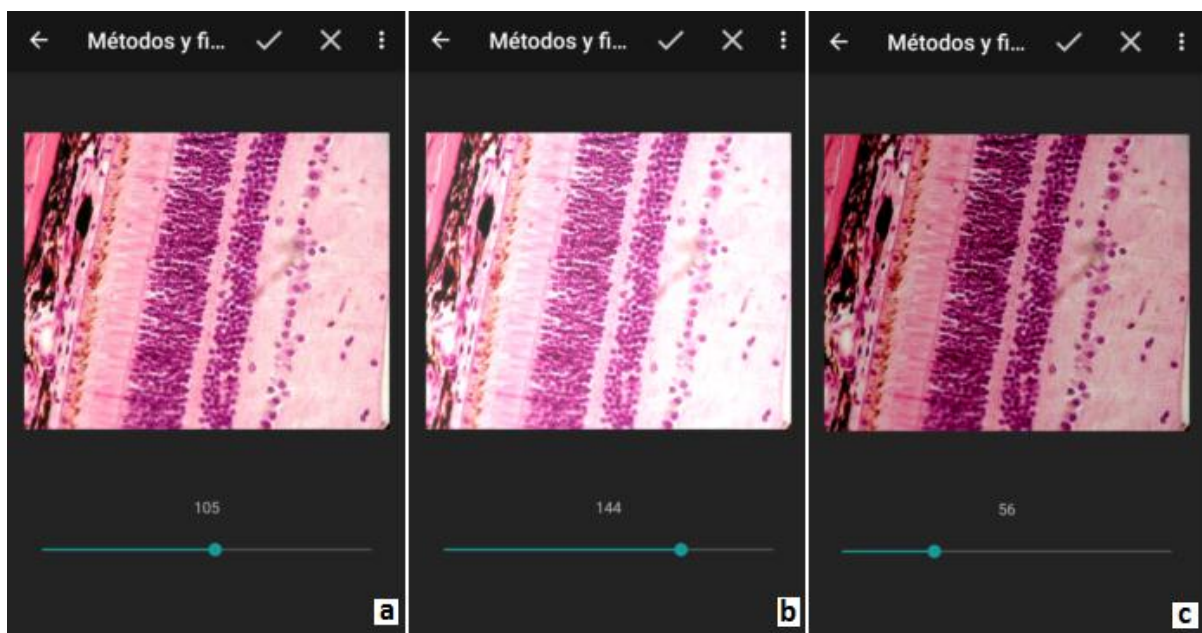


Fig. 4.2.15 (a) Imagen original. (b) Imagen con aumento del brillo. (c) Imagen con disminución del brillo.

En Android Studio el código es:

```
imagen_a_procesar.convertTo(imagen_procesada, imagen_a_procesar.type(),  
                             1, progreso-100);  
Utils.matToBitmap(imagen_procesada, imagen_a_visualizar);
```

En el código anterior, *imagen_a_procesar* e *imagen_procesada* son dos objetos de la clase *Mat*. El argumento *imagen_a_procesar.type()* hace

referencia a que la salida tiene el mismo tipo de datos que la entrada en este caso. El tipo de datos se refiere a cómo se almacena la información de los píxeles, es decir el número de bits empleados para cada píxel, si son con signo o no, y si son valores enteros o flotantes. Por ejemplo:

- CV_8U es un píxel con un espacio de memoria de 8 bits y sin signo.
- CV_32F es un píxel con un espacio de memoria de 32 bits y de tipo flotante.
- CV_32S es un píxel con un espacio de memoria de 32 bits y con signo.

Cada uno de estos tipos de datos se utilizará según el tipo de operación que se desee realizar.

La variable progreso es el valor que el usuario establece al hacer uso de la barra de progreso que se observa en la figura anterior. En este caso, la barra de progreso modifica a *beta* y el *alpha* se deja con un valor constante, en este caso 1.

4.2.5.6 Contraste

El término contraste se refiere a la diferenciación de color (o escala de grises) que existen entre los diferentes puntos de una imagen. Las imágenes que tienen un alto contraste generalmente muestran un mayor grado de variación de color (o escala de grises) que las de menor contraste ⁽⁴⁶⁾.

Al igual que en el caso del procesamiento del brillo, para el caso del contraste en OpenCV se utiliza la misma clase *Mat* y el mismo método, pero en este caso se varían tanto el parámetro *alpha* como en *beta*. El código que realiza esta función en Android Studio es:

```
imagen_a_procesar.convertTo(imagen_procesada, CvType.CV_8U,  
progreso/100,  
                                -((progreso/100)*150-150));  
Utils.matToBitmap(imagen_procesada, imagen_a_visualizar);
```

CvType.CV_8U es un tipo de dato almacena el valor de cada píxel en 8 bits y sin signo. Esto permite operar los valores de los píxeles de la imagen con un rango de 0 a 255. La variable progreso la ajusta el usuario con la barra de progreso.

En la siguiente figura podemos observar cómo funciona este tipo de procesamiento en la aplicación:

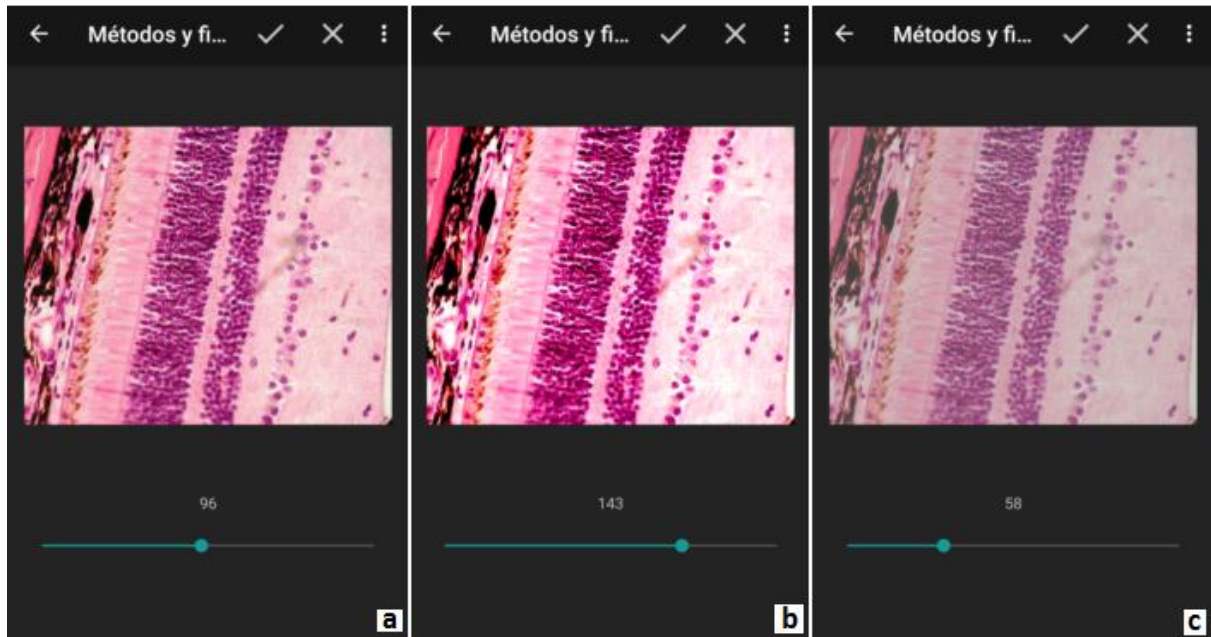


Fig. 4.2.16 (a) Imagen original. (b) Imagen con aumento de contraste. (c) Imagen con disminución de contraste.

4.2.5.7 Nitidez

La nitidez es uno de los factores de calidad de imagen más importantes. Este parámetro se define por los límites entre zonas de diferentes tonos o niveles de gris. Para poder visualizar este concepto, se ilustra este concepto mediante un patrón de barras. La parte superior es nítida, porque sus límites son pasos claros entre el negro y el blanco, no siendo así en la parte inferior, donde el paso es gradual ⁽⁴⁶⁾ ⁽⁴⁷⁾.



Fig. 4.2.17 Patrón de barras. La parte superior es nítida y la inferior no lo es ⁽⁴⁷⁾.

En OpenCv para mejorar la nitidez de la imagen se usa el *GaussianBlur* y el método *addWeighted*, de las clases *Improc* y *Core* respectivamente.

El método *GaussianBlur()* lo que hace es desenfocar una imagen usando un filtro gaussiano y se usa de la siguiente manera:

```
Improc.GaussianBlur(input,output,tamaño_kernel,desvio_x,desvio_y);
```

El *input* es la imagen a procesar y el *output* es la imagen procesada, y son objetos de la clase *Mat*. El tamaño del kernel determina que tan desenfocada será la imagen resultado y si es seteado en 0, el tamaño será determinado a través de las desviaciones estándar del eje x como el del eje y.

Este filtro actúa al convolucionar el kernel gaussiano con cada punto de la imagen de entrada y luego sumarlos para producir la imagen de salida.

El gaussiano 2D es:

$$G_0(x,y) = A \cdot e^{-\frac{(x-\mu_x)^2}{2\sigma_x^2} - \frac{(y-\mu_y)^2}{2\sigma_y^2}}$$

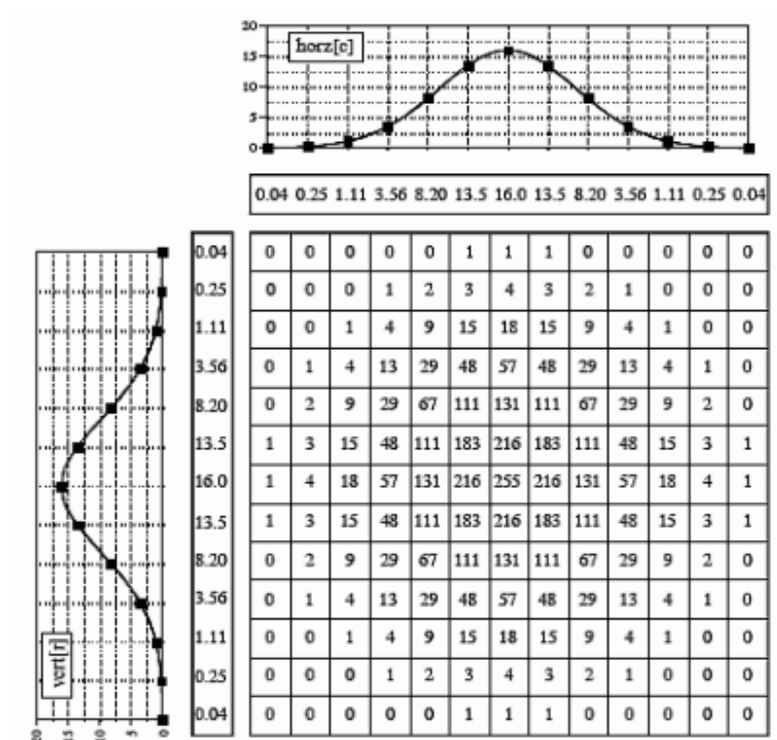


Fig. 4.2.18 Máscara gaussiana ⁽⁴⁸⁾.

El método *addWeighted()* calcula la suma ponderada de dos imágenes y se usa de la siguiente manera:

```
Core.addWeighted(input_1,alpha, input_2, beta, gamma, output);
```

Los parámetros *input_1* e *input_2* corresponden a la imagen original (sin procesar) y a la imagen que se le aplicó el filtro gaussiano respectivamente. *Alpha* y *beta* se corresponden con los factores que determinan el peso de cada elemento de las imágenes datos y *gamma* es un escalar que se agrega a la suma ponderada. El *output* es la imagen resultado, y resulta de aplicar la siguiente ecuación:

$$output = \alpha \cdot input_1 + \beta \cdot input_2 + \gamma$$

En Android Studio el código que aplica estos dos métodos son:

```
Imgproc.GaussianBlur(imagen_a_procesar, imagen_procesada_1,  
Size(0,0), 3, 3);  
Core.addWeighted(imagen_a_procesar, 1+progreso/3, imagen_procesada_1,  
-progreso/3, 0, imagen_procesada_2);  
Utils.matToBitmap(imagen_procesada_2, imagen_a_visualizar);
```

En el método *addWeighted()* se observa que el factor beta es negativo y gamma es 0, por lo que el resultado es una resta de dos imágenes, una es la imagen original y la otra es la imagen que se le aplicó el filtro gaussiano, el resultado final es una imagen de mayor nitidez.

En este mismo método los parámetros *imagen_a_procesar*, *imagen_procesada* e *imagen_a_visualizar* son objetos de la clase *Mat*.

En la figura siguiente se muestra el resultado de aumentar la nitidez de una imagen con la aplicación:

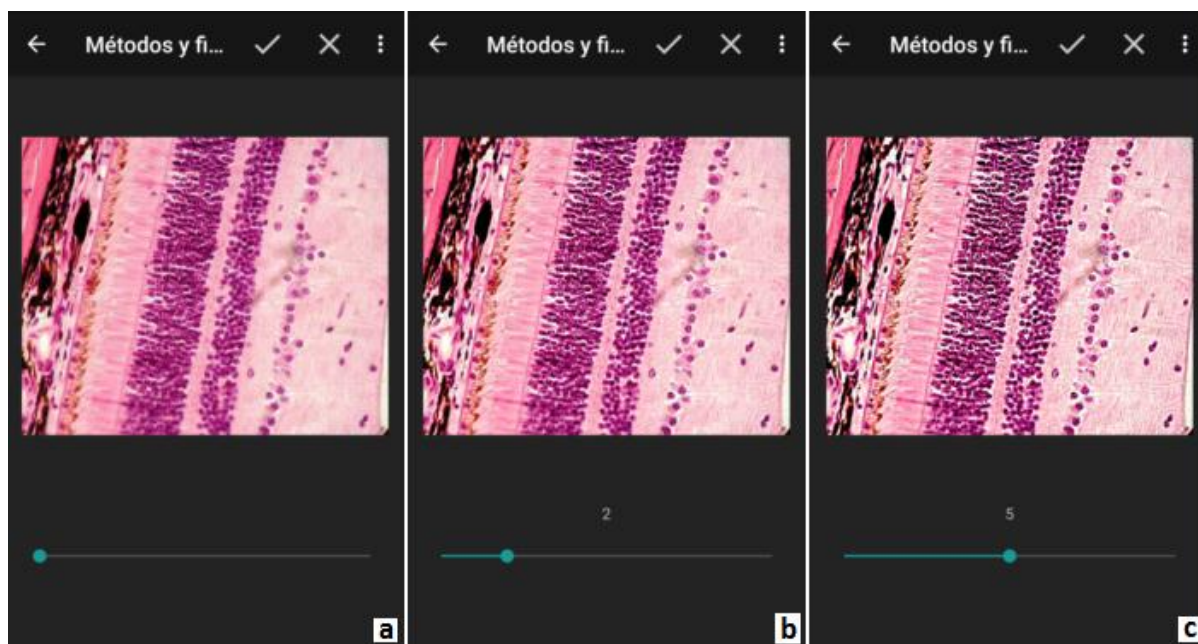


Fig. 4.2.19 (a) Imagen original. (b) y (c) Imagen con aumento de la nitidez.

4.2.5.8 Temperatura de color

La temperatura de color es un término que hace referencia a la calidez o frialdad de la luz emitida por una fuente.

Cada fuente luminosa emite una luz con distinto color o temperatura de color. Esta temperatura de color se mide en grados Kelvin y varía desde el rojo (luz cálida) hasta el azul (luz fría) ⁽⁴⁶⁾ ⁽⁴⁹⁾. En la siguiente figura se muestra una figura que ilustra claramente lo explicado:

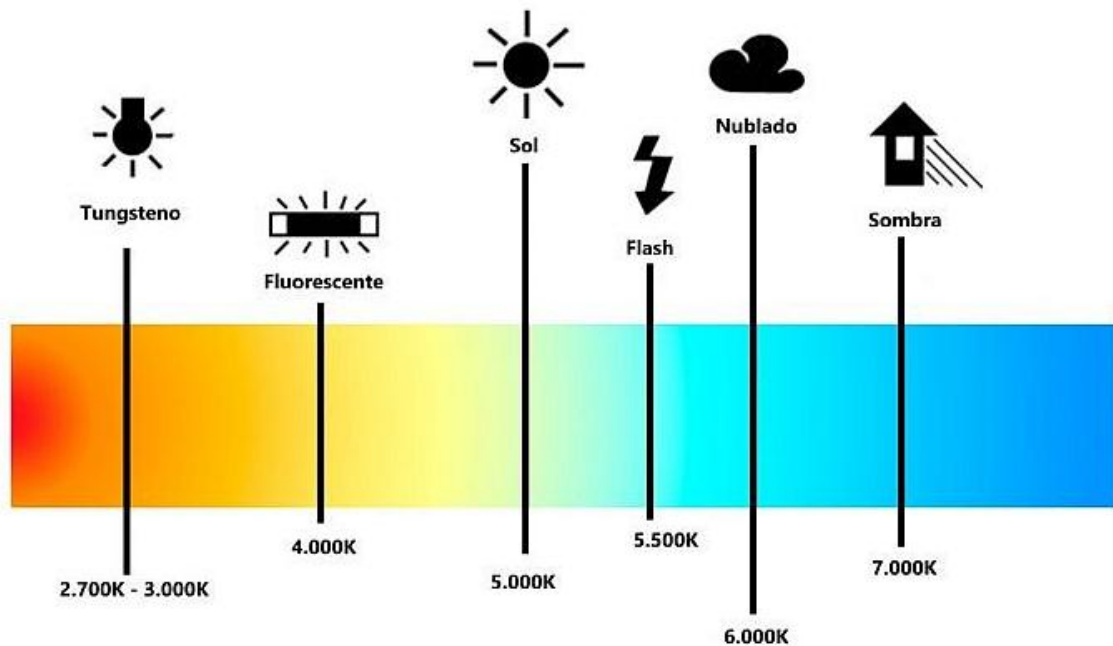


Fig. 4.2.20 Temperatura de color ⁽⁴⁹⁾.

El efecto cromático que emite la luz a través de una fuente luminosa depende de su temperatura. Si la temperatura es baja, se intensifica la cantidad de amarillo y rojo contenido en la luz, pero si la temperatura de color se mantiene alta habrá mayor número de radiaciones azules ⁽⁴⁹⁾.

En este tipo de procesamiento se debe trabajar con los tres canales RGB de la imagen. Para obtener una imagen cálida, lo que se hace es mantener constante los niveles de G, se aumentan los valores de R y se disminuyen los de B. Para el caso de una imagen fría, se mantienen los niveles de G, se aumentan los de B y se disminuyen los de R.

En la aplicación se aumenta o disminuye cada canal multiplicando y dividiendo por un escalar. En el código se separan los canales de la imagen y se realizan las correspondientes operaciones en cada canal y luego se los unifica para obtener la imagen final. Las clases de OpenCV utilizadas para este tipo de procesamiento son *Mat* y *Core*. En Android Studio el código empleado es:

```

Vector<Mat> canales = new Vector<Mat>();
imagen_a_procesar.convertTo(imagen_a_procesar, CvType.CV_32FC3);
imagen_procesada=imagen_a_procesar.clone();
Core.split(imagen_a_procesar, canales);
Mat canal_rojo=new Mat();
canal_rojo=canales.get(0).clone();
Mat canal_azul=new Mat();
canal_azul=canales.get(2).clone();
Core.divide(canales.get(0), new Scalar(progreso/50f), canal_rojo);
Core.multiply(canales.get(2), new Scalar(progreso/50f), canal_azul);
canales.set(0, canal_rojo);
canales.set(2, canal_azul);
Core.merge(canales, imagen_procesada);
imagen_procesada.convertTo(imagen_procesada, CvType.CV_8UC3);
Utils.matToBitmap(imagen_procesada, imagen_a_visualizar);

```

En el código anterior lo primero que se hace es crear un vector que almacenará los tres canales de la imagen. Luego se cambia el tipo de datos de la imagen de entrada a *CV_32FC3* (donde cada pixel se almacena en 32 bits, el tipo de dato es flotante y corresponde a una imagen de 3 canales). El método *split()* de la clase *Core* recibe como parámetros, la imagen dato y un vector que almacena objetos de tipo *Mat*; su función es separar la imagen de entrada en tres canales que luego son almacenados en el vector. Luego se crean los dos matrices que almacenarán los canales para el rojo y el azul procesados.

Para producir una imagen cálida se debe aumentar el valor de los píxeles del canal R y disminuir el valor de los píxeles del canal azul. Esto se logra por medio de los siguientes métodos que reciben los siguientes parámetros:

- `divide(canal_rojo_sin_procesar, escalar, canal_rojo_procesado);`
- `multiply(canal_azul_sin_procesar, escalar, canal_azul_procesado);`

En las dos líneas anteriores el parámetro escalar es:

$$\text{escalar} = \text{progreso}/50$$

La variable *progreso* la ajusta el usuario al hacer uso de la barra de progreso de la actividad. Cuando la barra de progreso se encuentra al 50% no se produce ningún cambio en los canales porque el valor de *escalar* es 1. El método *divide()* se encarga de dividir los píxeles del canal R por el *escalar*. El método *multiply()* se encarga de multiplicar cada pixel del canal B por el *escalar*. De acuerdo al valor del *escalar*, se tienen 3 casos posibles:

1. *Escalar* = 1. Cuando el progreso es del 50%, el cociente da como resultado 1, por lo tanto al multiplicar o dividir los píxeles de ambos canales por este valor no se producen cambios.
2. *Escalar* < 1. Cuando el progreso es menor al 50%, el cociente da un resultado menor que 1, por lo que cuando se divide el canal R por

este valor se aumentan los valores de los píxeles rojos, y cuando se multiplica el canal B por este valor se disminuyen los valores de los píxeles azules, dando como resultado final una imagen cálida.

3. Escalar > 1 . Cuando el progreso es mayor al 50%, el cociente da un resultado mayor que 1, por lo que cuando se divide el canal R por este valor se disminuyen los valores de los píxeles rojos, y cuando se multiplica el canal B por este escalar se aumentan los valores de los píxeles azules, dando como resultado final una imagen fría.

Luego se reemplazan canales R y B procesados por los canales R y B sin procesar en el vector de canales, para después combinar los tres canales con el método `merge()` y obtener la `imagen_procesada`. A esta `imagen_procesada` se le cambia al tipo de datos `CV_8UC3` (donde cada píxel se almacena en 8 bits, es un entero sin signo y es para una imagen de 3 canales). Finalmente se cambia de la `imagen_procesada` de un tipo de objeto `Mat` a uno `Bitmap` para poder visualizar la imagen.

En la figura siguiente se puede observar el efecto que se obtiene al aplicar este procesamiento en la aplicación:

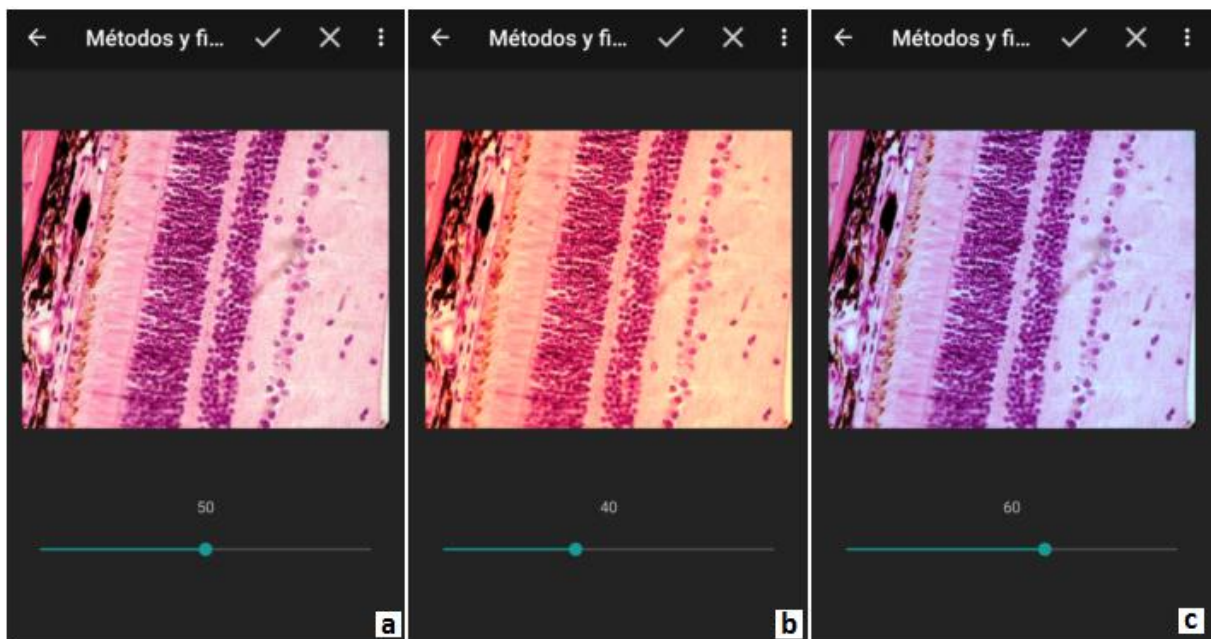


Fig. 4.2.21 (a) Imagen original. (b) Imagen cálida. (c) Imagen fría.

4.2.5.9 Ecualización

Esta función se encarga de ecualizar el histograma de la imagen, y el efecto que se obtiene es aumentar el contraste, como se mencionó previamente para una imagen en escala de grises en la sección 3.3.4.1.1 - Modificación del histograma. El histograma de una imagen a color puede entenderse como la superposición de los tres histogramas (un histograma para cada canal en RGB) o bien el histograma de la imagen o canal Intensidad ⁽³³⁾ ⁽⁴⁶⁾.

Para realizar este procesado se utilizaron las clases *Imgproc*, *Core* y *Mat* de OpenCV. Los pasos que se siguieron para lograr esta tarea son:

1. Se crea un vector de canales para albergar los canales de la imagen.
2. Se convierte el modelo de color RGB de la imagen al modelo HSI con el método *cvtColor()*.
3. Se separan los canales de la imagen y se los asigna al vector con el método *split()*.
4. Se ecualiza el canal I (canal intensidad) que representa la intensidad de cada pixel del modelo HSI con el método *equalizeHist()*.
5. Se unifican los 3 canales con el método *merge()* para formar la imagen procesada.
6. Se convierte del modelo HSI a RGB de la imagen procesada para visualizarla utilizando nuevamente el método *cvtColor()*.

El código en Android Studio para realizar esta tarea es:

```
Vector <Mat> canales = new Vector <Mat> ();
Imgproc.cvtColor(imagen_a_procesar, imagen_procesada, Imgproc.COLOR_RGB2
HSV);
Mat canal_ecualizado=new Mat();
canal_ecualizado=canales.get(2).clone();
Core.split(imagen_procesada, canales);
Imgproc.equalizeHist(canales.get(2), canal_ecualizado);
canales.set(2, canal_ecualizado);
Core.merge(canales, imagen_procesada);
Imgproc.cvtColor(imagen_procesada, imagen_procesada_2,
Imgproc.COLOR_HSV2RGB);
Utils.matToBitmap(imagen_procesada_2, imagen_a_visualizar);
```

En la siguiente figura se muestra el resultado de aplicar esta función en la aplicación:

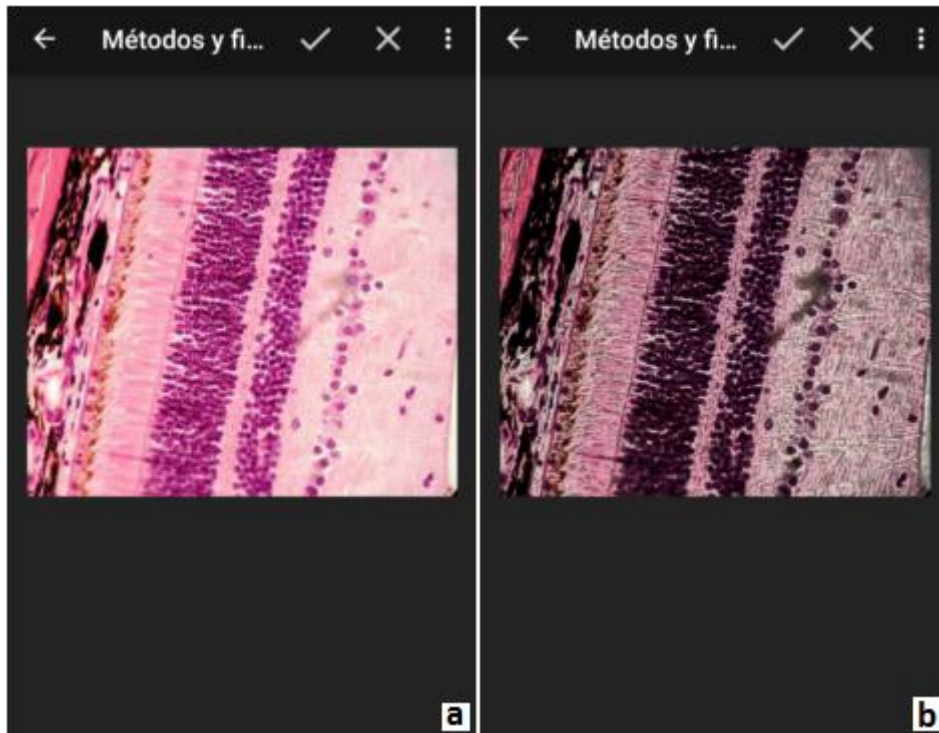


Fig. 4.2.22 (a) Imagen original. (b) Imagen ecualizada.

Función extra: Guardar el orden y los valores de procesado que se aplican a una imagen

La aplicación tiene una función extra que le permite al usuario almacenar el orden y los valores de procesamiento que se aplican sobre una determinada imagen. Esto permite replicar el mismo procesado a una imagen nueva y obtener el mismo ajuste de valores que en la imagen anterior. Esto es de gran utilidad para el caso del recuento Ki - 67 semiautomático, ya que en muchos casos las imágenes que se pretenden estudiar no presentan un contraste, nitidez, temperatura de color, etc. óptimas. Es por ello que esta función otorga la posibilidad de realizar el mismo ajuste de parámetros en todas las imágenes de una misma muestra, y por lo tanto se obtendrán resultados más fiables, ya que como se verá más adelante, este tipo de procesamiento se realiza por color.

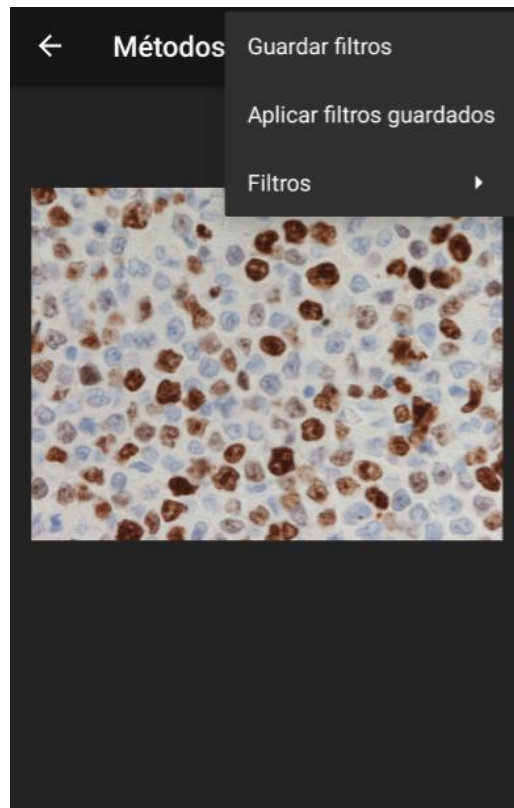


Fig. 4.2.23 En la captura se observa en el menú desplegable las opciones “Guardar filtros” y “Aplicar filtros guardados”. Esto permite al usuario guardar los valores de procesado que aplicó sobre una imagen, y luego volver a realizar el mismo ajuste sobre otra imagen.

4.2.6 Recuento Ki-67

Como se mencionó anteriormente en la sección 3.1.2.8, esta técnica sirve para evaluar, entre otras cosas, el grado de malignidad en ciertos tipos de tumores de acuerdo a la actividad proliferativa de sus células. La técnica permite identificar los núcleos con mayor actividad proliferativa en color marrón y los otros núcleos en color celeste o lila. De esta manera los patólogos pueden determinar la agresividad a través de un valor porcentual, que lo calculan en base a la cantidad de núcleos marrones y celestes que hay cada 100.

La aplicación dedica dos actividades distintas para este propósito, uno para el conteo de forma manual y otro para el conteo semiautomático.

4.2.6.1 Recuento manual

La actividad que se encarga de esta tarea es la siguiente:

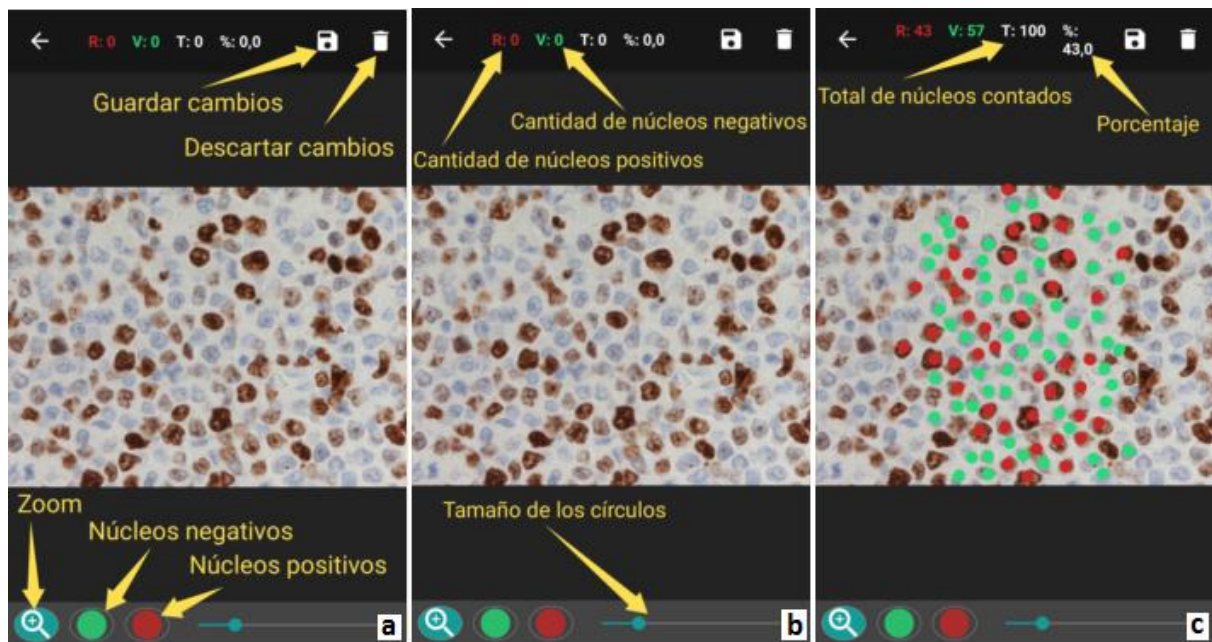


Fig. 4.2.24 Descripción y funcionamiento de la actividad para el conteo manual.

En esta actividad lo que el patólogo debe hacer es seleccionar los círculos rojos para marcar aquellos núcleos que considere como positivos, y seleccionar los verdes para los núcleos negativos. Automáticamente se irán contando los núcleos positivos, negativos, la cantidad total (suma de ambos) y el valor porcentual que resulta de la cantidad de núcleos positivos respecto del total.

En la figura (c) se muestra el resultado del conteo, y se observa que se marcaron en verde los núcleos celestes y en rojo los marrones. Se contabilizaron un total de 100 núcleos en la región central de la fotografía simulando la manera tradicional con la que los patólogos trabajan en cada campo, aunque se pueden tomar todos los núcleos que se consideren necesarios.

4.2.6.2 Recuento semiautomático

Para realizar esta tarea se usó el algoritmo de k-means que se explicó en la sección 3.3.5.7.2. Este algoritmo permite clasificar una imagen en un número k de clústeres definidos por el usuario, y en esta aplicación el número de clases son tres, y corresponden a:

1. Núcleos positivos (proliferantes)
2. Núcleos negativos (no proliferantes)
3. Fondo (corresponde al espacio extracelular, conductos galactóforos y citoplasma)

El usuario debe tomar varias muestras de cada color para cada clase, y una vez obtenidos estos datos se puede clasificar la imagen y por lo tanto determinar el grado de malignidad del tumor.

Para hacer uso de esta función de procesamiento en la aplicación, se debe seleccionar la opción Recuento Ki 67 y luego elegir semi automático. Una vez hecho esto el usuario visualizará una actividad como la que se muestra a continuación:

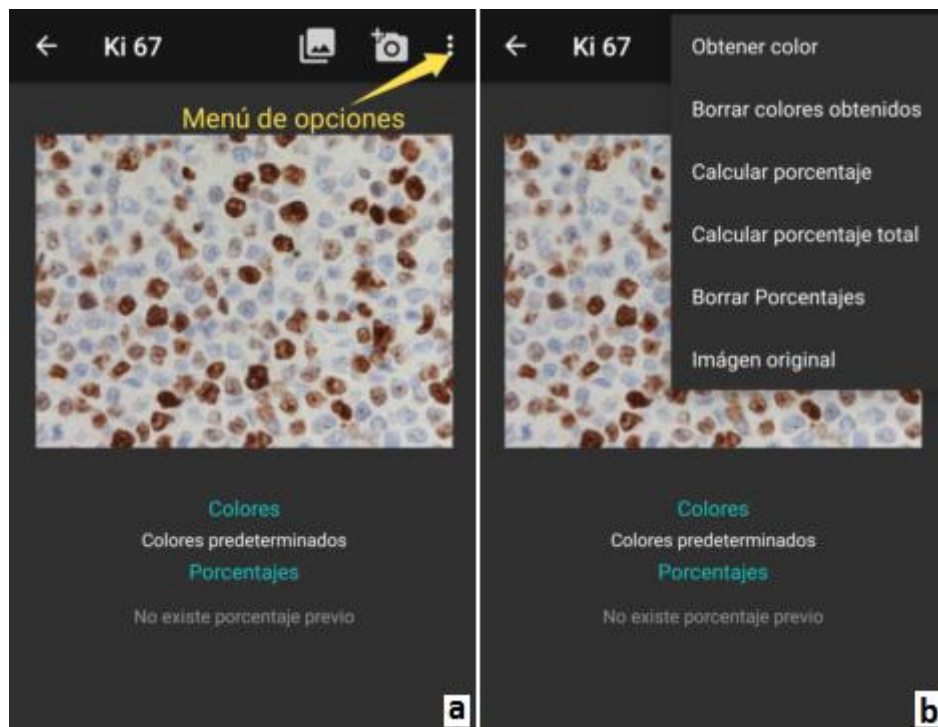


Fig. 4.2.25 (a) Actividad inicial para el recuento semiautomático. (b) Se muestra el menú de opciones desplegado.

En la figura anterior, (b) muestra el menú de opciones desplegado, en el cual se puede ver la opción "obtener color". Cuando se selecciona esta opción, se lanzará una nueva actividad que permite al usuario obtener los colores de los núcleos positivos, negativos y el fondo.

Si el usuario selecciona la opción "calcular porcentaje" sin previamente haber elegido los colores para cada clase, la aplicación realizará el procesamiento de la misma con unos valores predeterminados, que resultan del promedio de varias imágenes de distintas muestras que fueron suministradas por el Hospital Municipal de Urgencias de la Ciudad de Córdoba. El resultado con estos valores predeterminados no es el óptimo debido a la variabilidad entre los colores de una imagen de una muestra y la de otra muestra. Es por ello que se implementa la opción de obtención de color para una imagen que sea representativa de la muestra en estudio.

Como se explicó anteriormente, para una muestra se deben estudiar 10 campos. Cada campo de una muestra es similar al otro en cuanto a los colores de los núcleos y el fondo. La aplicación permite al usuario

seleccionar una imagen de los 10 campos y obtener los colores para cada clúster, una vez hecho esto se puede aplicar el procesamiento a la imagen y a las 9 restantes. De esta manera se obtienen porcentajes más fiables.

La siguiente figura muestra la actividad lanzada al seleccionar la opción "obtener color":

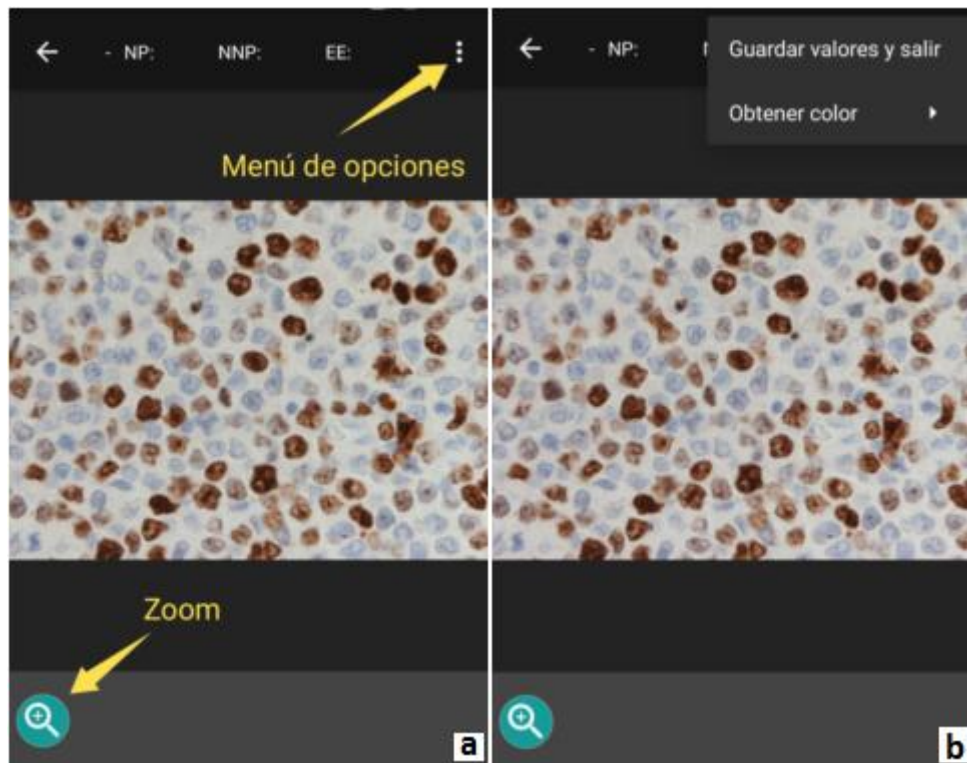


Fig. 4.2.26 Actividad que permite al usuario seleccionar el promedio de cada color. En (a) y (b) se observa las abreviaciones NP, NNP y EE que corresponden a núcleos proliferantes, núcleos no proliferantes y espacio extracelular respectivamente.

Cuando el usuario seleccione la opción "obtener color" de la figura (b), a medida que el mismo tome datos para cada clase, se representa al lado de cada abreviación un cuadrado con el color promedio de los datos obtenidos. Esto se hace para indicar que se han tomado los datos de manera satisfactoria, y además visibilizar a simple vista el color promedio de cada clase antes de procesar la imagen.

En el menú desplegable de la figura (b), el usuario puede guardar los datos de los colores tomados o tomar nuevos datos. Cuando selecciona la opción "obtener color" se puede elegir entre las tres alternativas que se mencionaron anteriormente:

- Núcleos proliferantes
- Núcleos no proliferantes
- Fondo

Cuando se selecciona alguna de las alternativas anteriores, el usuario podrá tomar los datos de la clase elegida dibujando un rectángulo sobre el área de

interés mediante el uso del touch de la pantalla, como se muestra en la siguiente figura:

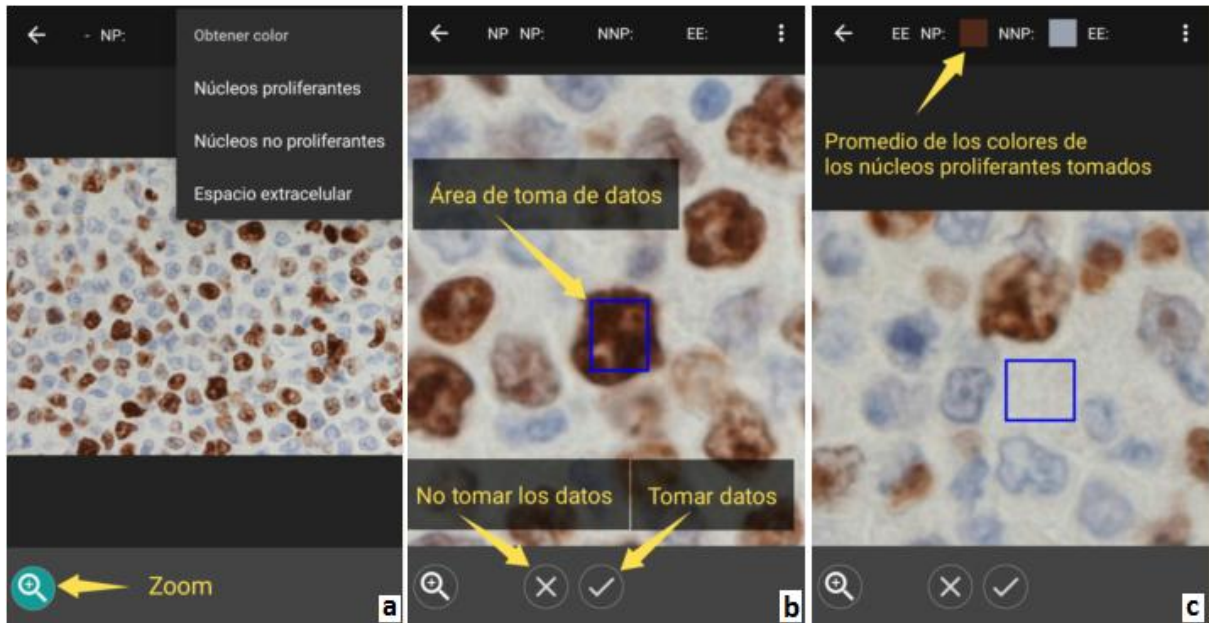


Fig. 4.2.27 Actividad dedicada a la toma de datos de las distintas clases.

En la figura anterior, en (a) el usuario tiene la posibilidad de elegir la clase de interés de la cual va a tomar los datos. En (b) se puede observar que se toman los colores de un núcleo marrón con el rectángulo azul. Se deben tomar los datos de tantos núcleos marrones como el usuario considere necesarios, teniendo en cuenta que debe abarcar el mayor rango de colores marrones que considere como positivos, es decir, debe tomar núcleos marrones oscuros y núcleos marrones claros. De esta forma el promedio de los marrones será más representativo, y por ende en procesamiento posterior arrojará un resultado más fiable.

De la misma manera se procede con los núcleos celestes y con el fondo. En la parte superior de la actividad (figura c) se observan cuadrados con el color promedio de los datos tomados para cada caso.

Una vez que se han tomado todos los datos, se debe seleccionar la opción del menú desplegable "Guardar valores y salir", y ya se puede aplicar el procesamiento sobre la imagen de la cual se tomaron los datos y sobre las 9 imágenes restantes de la muestra que se está estudiando.

El resultado de aplicar este procesado se observa en la siguiente figura:

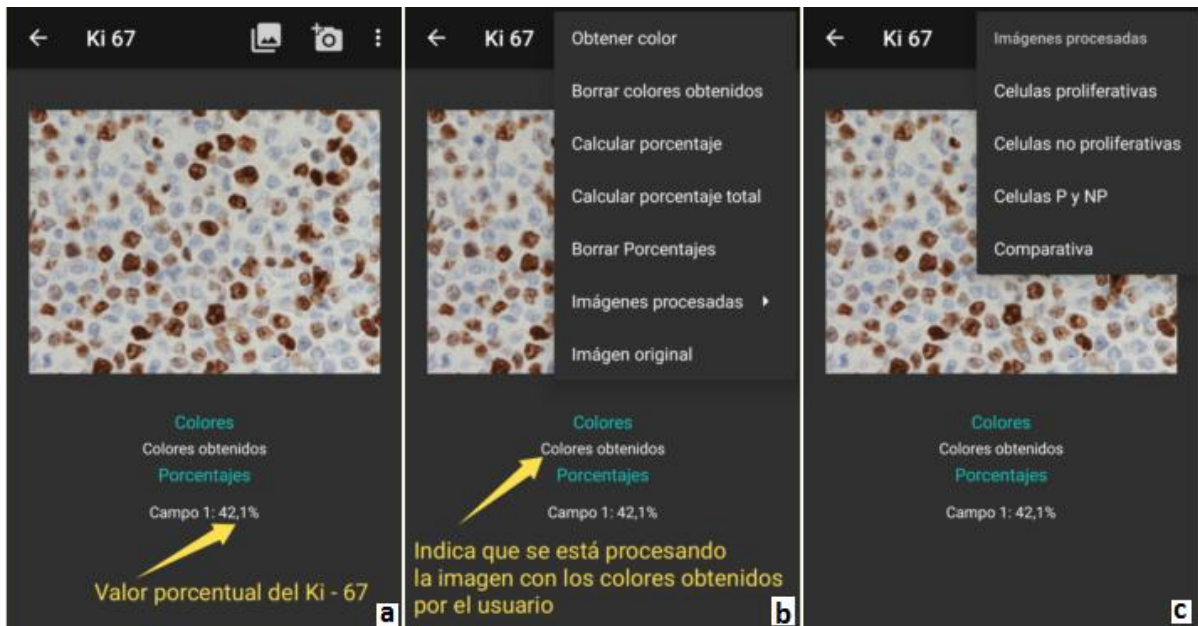


Fig. 4.2.28 En esta actividad se puede visualizar el porcentaje del Ki - 67 de la imagen procesada.

Si se despliega el menú de la parte superior derecha (b), se tienen varias opciones para el usuario, y si se selecciona la opción "imágenes procesadas" aparece otro submenú como en la figura (c).

En la figura (c) el usuario puede visualizar la imagen procesada de diferentes maneras. Puede ver los núcleos proliferativos o no proliferativos por separado, juntos, y también se puede visualizar la comparación entre la imagen original y la procesada como se muestra a continuación:

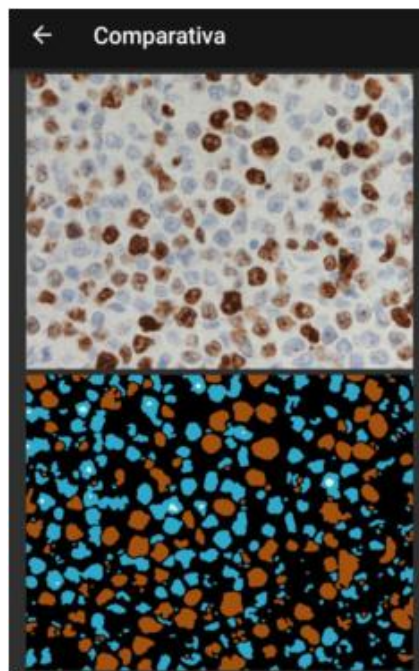


Fig. 4.2.29 Comparación entre la imagen original y la imagen procesada.

Como se puede ver en figura 4.2.25, hay una gran similitud entre la imagen original y la imagen procesada. El color negro representa el fondo, el marrón los núcleos positivos y el celeste se corresponde con los núcleos negativos.

El valor porcentual se obtiene por área, es decir, conociendo el área total de marrón y el área total de celeste se calcula el resultado. Se hace de esta manera porque el tamaño de los núcleos marrones y celestes son similares (supuesto demostrado en el Anexo F).

No se aplica el procesamiento por conteo de cada uno de los núcleos porque el resultado se aleja del valor real. Esto sucede porque cuando se procesa la imagen algunos núcleos no se diferencian muy bien del fondo, entonces en lugar de detectar completamente un núcleo, se lo detecta parcialmente. Esto ocurre porque cada núcleo no es uniforme en color y forma, y por lo tanto el resultado del procesado da pequeños puntos en lugar de un núcleo completo. Cuando se trabaja por área se compensa los puntos "extras" con los núcleos que no se marcaron completamente.

Se obtienen buenos resultados cuando la imagen es "muy buena". Definimos como imagen "muy buena" a una imagen que tiende a la imagen "ideal". Una imagen "ideal" es la que se puede diferenciar claramente los núcleos positivos, los negativos y el fondo. Cuando esto no ocurre el algoritmo de procesamiento presenta algunos inconvenientes.

A continuación se explicará la validación del algoritmo k-means en este tipo de imágenes, explicitando sus fortalezas y debilidades.

4.2.7 Validación del recuento semiautomático por Ki-67

La validación del algoritmo de recuento semiautomático por Ki - 67 se hizo en dos etapas:

- *Etapa 1:* Utilización de imágenes ideales para demostrar la eficacia de la clasificación de la imagen.
- *Etapa 2:* Utilización de imágenes reales para demostrar la eficacia del método por medio de un test estadístico de diferencia de medias de poblaciones apareadas.

4.2.7.1 Etapa 1

Como se mencionó anteriormente, en esta primera etapa se demostrará como el algoritmo funciona muy bien cuando se trata de imágenes "ideales". Con esto se pretende explicitar que el procesamiento de la imagen arroja resultados fiables.

Lo que se hizo fue trabajar con tres imágenes ideales creadas artificialmente con formas y colores bien definidos. Los núcleos proliferantes y no proliferantes son de idéntico tamaño. Éstas se procesaron con los

métodos manual y semiautomático de la aplicación y se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación:

Imagen 1

Corresponde a una imagen con las siguientes características:

- Núcleos proliferantes: Son todos de un mismo tono, saturación e intensidad.
- Núcleos no proliferantes: Son todos de un mismo tono, saturación e intensidad.
- Fondo: El fondo es uniforme en toda su extensión, es decir que tiene el mismo tono, saturación e intensidad.

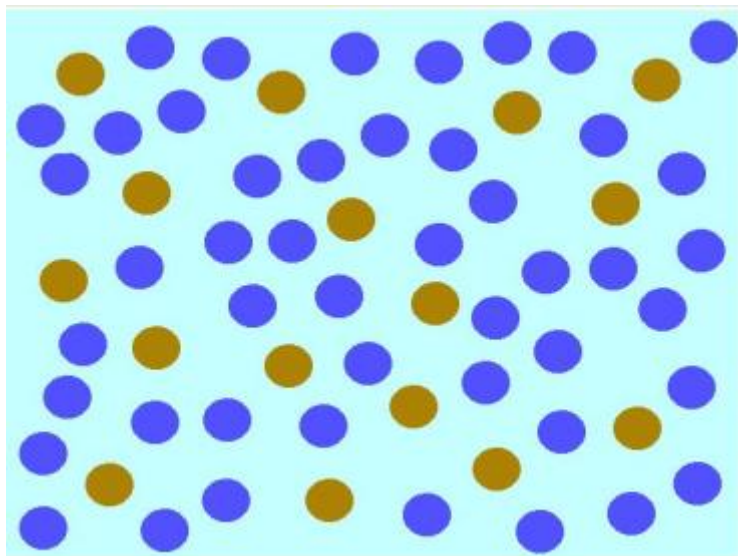


Fig. 4.2.30 Imagen 1.

Cuando se procesó la imagen se obtuvieron los siguientes valores porcentuales de Ki - 67:

- *Recuento manual:* **25,4%**
- *Recuento semiautomático por conteo:* **25,4%**
- *Recuento semiautomático por superficie:* **25,3%**

En la siguiente figura se muestra como la aplicación procesa la imagen:

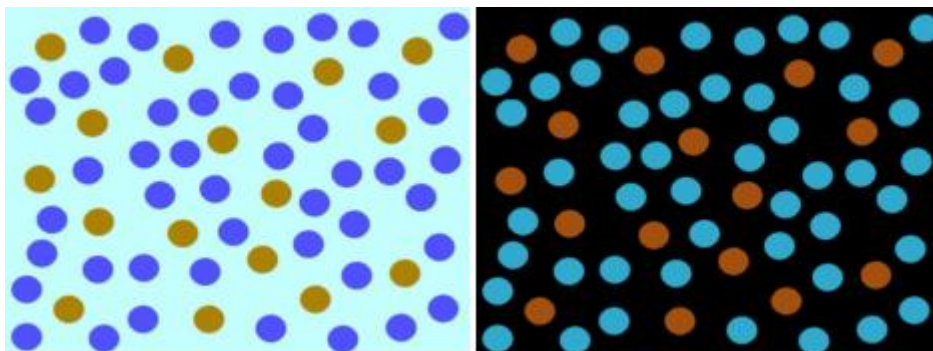


Fig. 4.2.31 Imagen 1 original vs Imagen 1 procesada.

Imagen 2

Corresponde a una imagen con las siguientes características:

- Núcleos proliferantes: Hay dos tipos de núcleos que varían uno respecto del otro en cuanto a tono, saturación e intensidad.
- Núcleos no proliferantes: Hay tres tipos de núcleos que varían uno respecto de los otros en cuanto a tono, saturación e intensidad.
- Fondo: El fondo es uniforme en toda su extensión, es decir que tiene el mismo tono, saturación e intensidad.

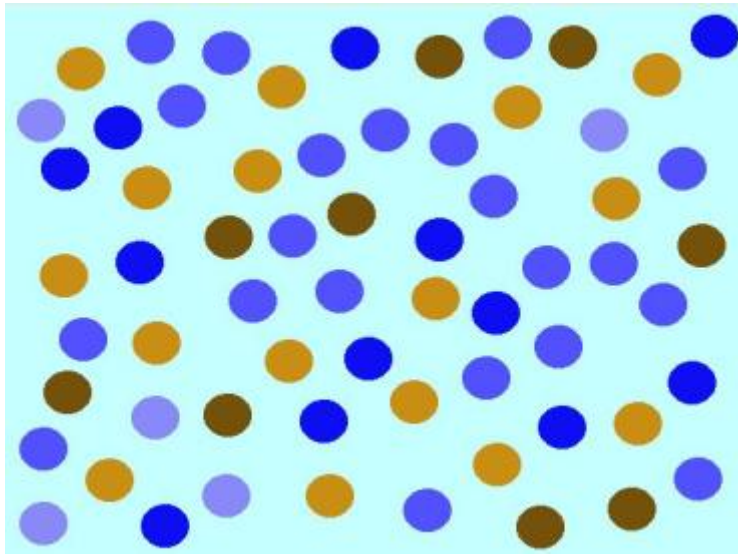


Fig. 4.2.32 Imagen 2.

Cuando se procesó la imagen se obtuvieron los siguientes valores porcentuales de Ki - 67:

- *Recuento manual:* **39,7%**
- *Recuento semiautomático por conteo:* **39,7%**
- *Recuento semiautomático:* **39,5%**

En la siguiente figura se muestra como la aplicación procesa la imagen:

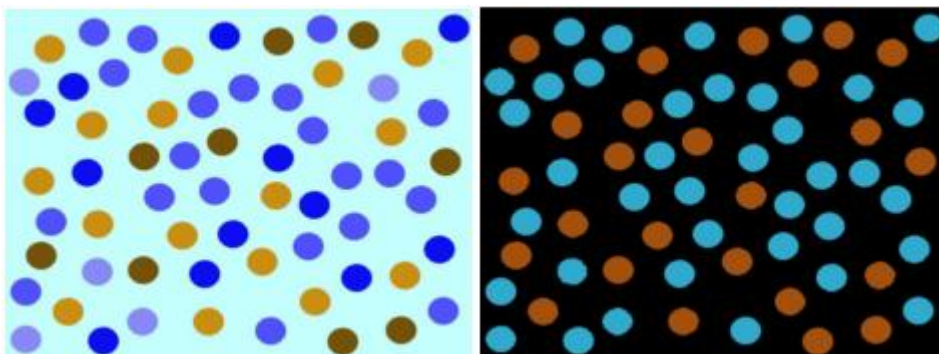


Fig. 4.2.33 Imagen 2 original vs Imagen 2 procesada.

Imagen 3

Corresponde a una imagen con las siguientes características:

- Núcleos proliferantes: Hay tres tipos de núcleos que varían uno respecto de los otros en cuanto a tono, saturación e intensidad.
- Núcleos no proliferantes: Hay tres tipos de núcleos que varían uno respecto de los otros en cuanto a tono, saturación e intensidad.
- Fondo: El fondo tiene 3 zonas bien definidas donde varían una respecto de las otras en cuanto a tono, saturación e intensidad.

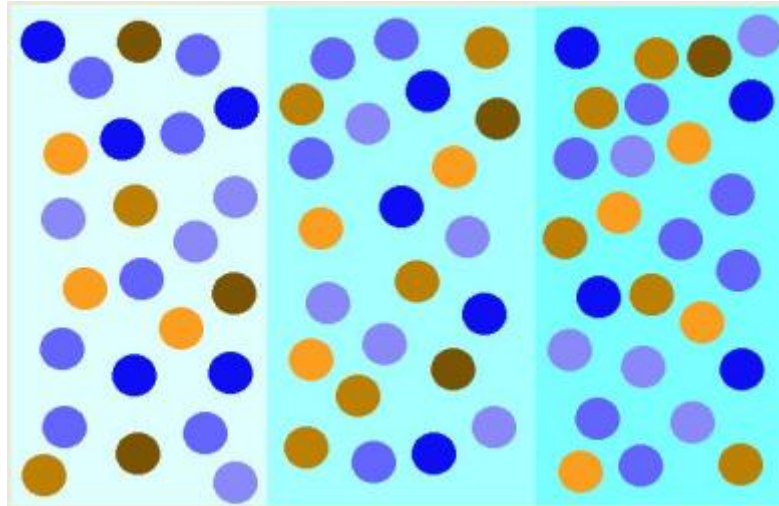


Fig. 4.2.34 Imagen 3.

Cuando se procesó la imagen se obtuvieron los siguientes valores porcentuales de Ki - 67:

- *Recuento manual:* **38,4%**
- *Recuento semiautomático por conteo:* **38,4%**
- *Recuento semiautomático:* **37,8%**

En la siguiente figura se muestra como la aplicación procesa la imagen:

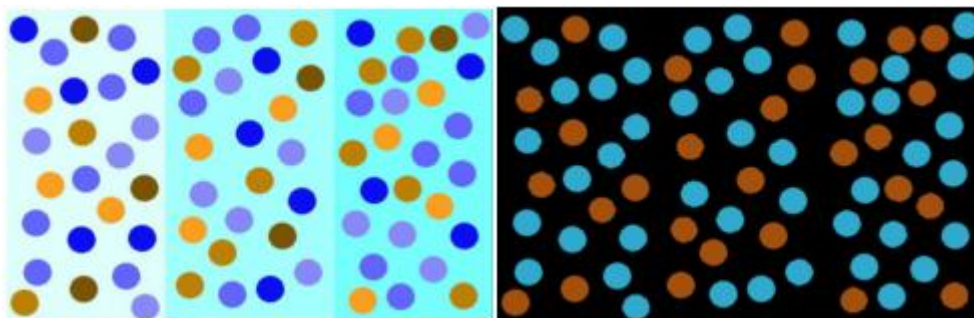


Fig. 4.2.35 Imagen 3 original vs Imagen 3 procesada.

4.2.7.2 Etapa 2

Para poder validar el algoritmo de procesamiento de una manera adecuada, lo que se hizo fue procesar un total de 15 imágenes procedentes de 5 muestras distintas, es decir 3 fotografías por cada muestra. A estas imágenes se las estudió de la siguiente forma:

1. Recuento manual del Ki - 67.
2. Recuento semiautomático por superficie del Ki - 67.
3. Recuento semiautomático por conteo del Ki - 67.

Por cada imagen se obtuvieron tres valores porcentuales diferentes según el método usado, que fueron tabulados para un posterior análisis estadístico. Consideramos como valor porcentual control al resultado que arroja el recuento manual, porque es el patólogo el que determina, en base a sus conocimientos y experiencia, que núcleos deben marcarse como positivos y cuales como negativos. Es por ello que para estudiar en profundidad los dos recuentos semiautomáticos, se hace un estudio de contraste de la diferencia de medias de poblaciones apareadas con el recuento manual. Es decir que a cada uno de los recuentos semiautomáticos se los contrastó con el recuento manual para determinar cuál de los dos arroja una mejor aproximación.

Contraste para diferencia de medias de poblaciones apareadas

En este procedimiento se realiza un estudio basado en dos hipótesis, la primera supone que las medias de los recuentos semiautomáticos son iguales a la media del recuento manual, y la segunda hipótesis supone que las medias son distintas. Esto tiene como propósito aceptar o rechazar alguna de las hipótesis y poder llegar a una conclusión de esta comparación.

Se supone que las poblaciones en estudio se ajustan a una distribución normal analizado en el anexo E, y como el número de muestras es menor a 30, se emplea el estadístico t-student. En la siguiente tabla se resume el procedimiento para realizar este contraste:

Tipo	A la izquierda	Bilateral	A la derecha
Hipótesis	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = D_0$ $H_1: \mu_1 - \mu_2 < D_0$	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = D_0$ $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq D_0$	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = D_0$ $H_1: \mu_1 - \mu_2 > D_0$
Estadístico		$t = \frac{d - D_0}{\frac{s_{n-1}^d}{\sqrt{n}}}$	
Rechazo	$t < t_{\alpha;n-1}$	$ t > t_{1-\frac{\alpha}{2};n-1}$	$t > t_{1-\alpha;n-1}$
P - valor	$P[T_{n-1} < t]$	$2P[T_{n-1} > t]$	$P[T_{n-1} > t]$
Supuestos	$D = X - Y$, es aproximadamente normal		

Tabla 4.2.1 Resumen del estadístico t - student ⁽⁵⁰⁾.

En nuestro caso se tomaron como hipótesis nula y alternativa:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

Esto es debido a que se quiere comprobar que la media de la muestra dada por el método manual es la misma que la media de la muestra dada por el método semiautomático, y en caso contrario que son distintas. Por lo tanto se utiliza la distribución t-student bilateral para la obtención del valor crítico.

Los datos de las imágenes estudiadas y resultados de los cálculos se muestran en el Anexo E.

Los intervalos de $(1-\alpha)100\%$ de confianza correspondientes a la media de las diferencias se calculan con la siguiente fórmula:

$$\bar{X} \pm t_{1-\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

Donde \bar{X} es el promedio muestral y σ es el desvío muestral y N es la cantidad de la muestra.

Por último como se asume que las diferencias provienen de una distribución normal, se estima con una probabilidad de $(1-\alpha)$, que las nuevas diferencias pertenecerán al siguiente intervalo:

$$\bar{X} \pm z_{1-\alpha/2} \sigma$$

Valores obtenidos

En ambos métodos semiautomáticos no se rechaza la hipótesis nula, es decir que se puede afirmar que ambas medias se consideran iguales a la media del procedimiento manual en un 95% de confianza.

Asumiendo que las diferencias provienen de una distribución Normal, los intervalos de confianza (con un 95% de confianza) para las diferencias de las medias son:

- Manual - Superficie:

$$0,540 \pm 1,878 \% \\ [1,338 ; 2,418]$$

- Manual - Conteo:

$$-3,847 \pm 7,262 \% \\ [-11,109 ; 3,415]$$

$$-3,847 \pm 7,262 \%$$

$$[-11,109 ; 3,416]$$

Es decir que la media de las diferencias en ambos procedimientos se encuentra entre los intervalos calculados con un 95% de confianza.

Se infiere además que el 95% de las (futuras) diferencias en los cálculos pertenecen a los siguientes intervalos estimados:

- Manual - Superficie:

$$0,540 \pm 6,645\%$$

$$[-6.105,7.185]$$

- Manual - Conteo:

$$-3.847 \pm 25.832\%$$

$$[-29.679,21.986]$$

Es decir que la probabilidad de que la diferencia del método semiautomático con el método manual pertenezca a cada intervalo es de 0.95.

4.2.8 Medición de longitudes en la imagen

La aplicación dedica una actividad para esta función, en la cual el usuario podrá hacer mediciones sobre la imagen con el uso del touch. Para poder medir, es necesario previamente establecer un patrón conocido, el cual será provisto por una cámara neubauer, con la cual el usuario podrá establecer la cantidad de pixeles que tiene una determinada longitud en una imagen de la misma. Una vez realizada la calibración, se podrá medir sobre la imagen histológica en base al conteo de pixeles. A continuación se explica detalladamente como es esta función.

4.2.8.1 Calibración

Como se mencionó anteriormente, para poder medir sobre la imagen, es necesario realizar una calibración previa con una cámara neubauer.

Cámara neubauer o hemocitómetro

Se trata de una cámara de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de espesor. Comercialmente se pueden conseguir de dos tipos que son:

- Simple: Una región de conteo.

- Doble: Dos regiones de conteo (la más común en el mercado) ⁽⁵¹⁾.

En la siguiente figura se muestra una cámara doble comercial:

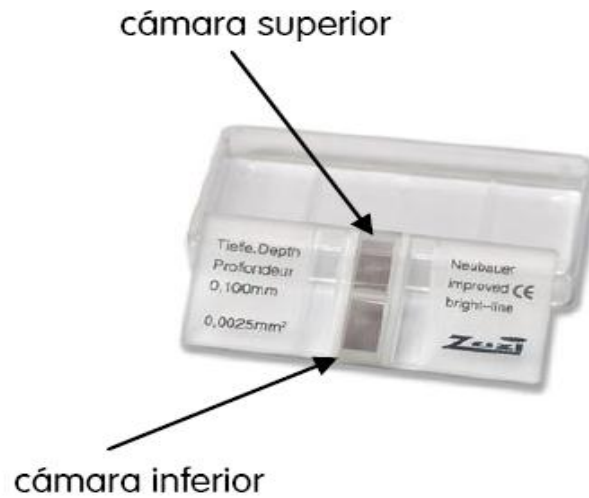


Fig. 4.2.36 Cámara neubauer comercial doble ⁽⁵¹⁾.

La región de conteo está formada por una retícula cuadrículada de 3 x 3 mm. Esta retícula a su vez está dividida en 9 cuadrados de 1 mm de lado. El cuadrado central está formado por 25 cuadrados de 0,2 mm de lado, y los cuadrados que se encuentran en las esquinas están subdivididos en 16 cuadrados de 0,25 mm de lado. Al cuadrado central de 1mm de lado también se lo subdivide 400 cuadrados de 0,05 mm de lado ⁽⁵¹⁾. En la figura siguiente se muestra un esquema de facilita la comprensión de lo explicado:

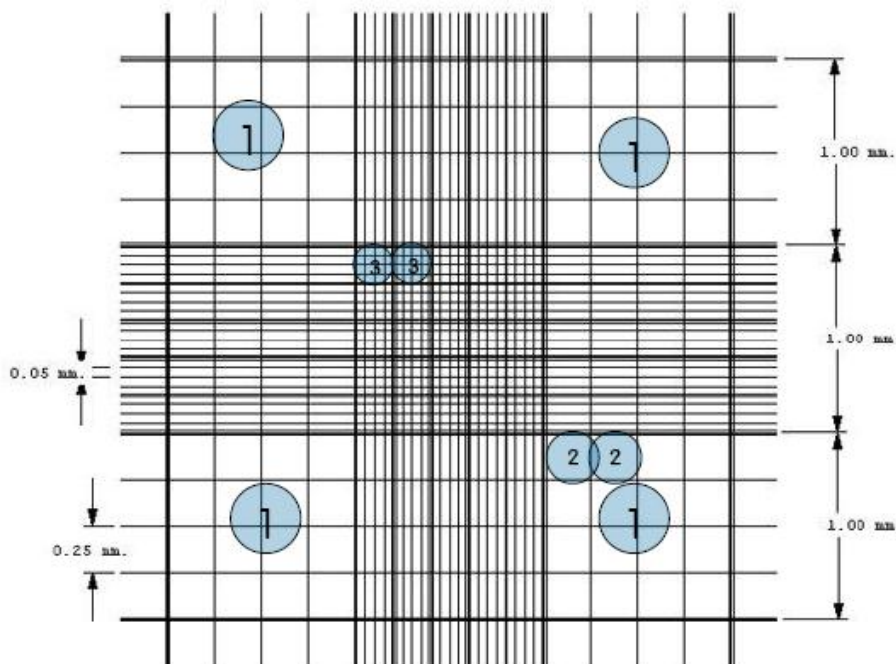


Fig. 4.2.37 Región de conteo de la cámara neubauer ⁽⁵¹⁾.

Conociendo estas medidas, se tiene un patrón fiable para calibrar la aplicación. El usuario debe trazar una recta de manera manual entre líneas paralelas para contar la cantidad de píxeles que hay entre ellas, como se muestra en la siguiente figura:

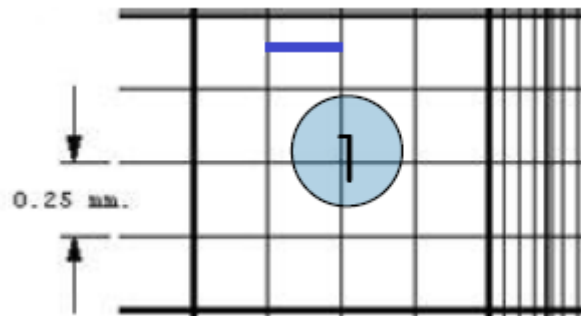


Fig. 4.2.38 Ajuste del patrón de calibración

Ajuste del patrón de calibración. La línea azul la traza el usuario con el uso del touch entre dos líneas paralelas de distancia conocida, es este caso se toma un cuadrado de 0.25 mm de lado.

La aplicación permite contabilizar la cantidad de píxeles horizontales que tiene la línea azul y almacenar este valor en una variable "patrón" que será utilizada como referencia cuando se realice la medición sobre una imagen histológica.

Los pasos que debe seguir el patólogo para una correcta calibración y posterior medición son:

1. Asegurarse de que la cámara del smartphone, los oculares y el objetivo se encuentren limpios para garantizar una imagen idónea.
2. Ajustar correctamente el smartphone al soporte.
3. Ajustar correctamente el soporte al ocular del microscopio.
4. Seleccionar el objetivo a utilizar.
5. Colocar la cámara neubauer en la platina.
6. Capturar una fotografía de alguna parte del reticulado.
7. Calibrar manualmente la aplicación, mediante el trazado de una recta entre dos líneas paralelas del reticulado. Previamente a esto se debe establecer en la aplicación el aumento del objetivo que se está usando y la longitud patrón que se tomará como referencia y de manera opcional ingresar la marca y modelo del microscopio.
8. Una vez calibrada la aplicación, se retira la cámara neubauer de la platina y se coloca la muestra histológica que se desea estudiar.
9. Capturar una fotografía de la muestra y luego medir sobre la misma.

Se deben realizar estos pasos cada vez que se coloque el soporte al ocular y el smartphone al soporte, debido a que cada vez que se ajustan, las distancias entre la cámara y el ocular en los tres ejes espaciales no son siempre las mismas (hay pequeñas variaciones en el ajuste porque se hace de manera manual). Estas pequeñas variaciones hacen que se produzcan distintos valores de calibración. Es por ello que para poder garantizar una

calibración confiable, el ajuste del campo de la retícula de la cámara neubauer y de la muestra histológica debe ser el mismo en la pantalla del smartphone.

La cámara neubauer de la que se tomaron las fotografías para hacer las pruebas en la aplicación, fue suministrada por el Hospital Municipal de Urgencias, y es la que se muestra a continuación:

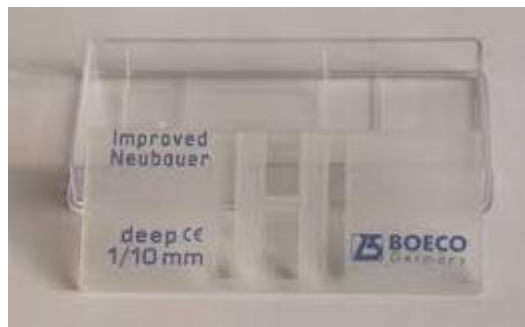


Fig. 4.2.39 Cámara neubauer BOECO ⁽⁵²⁾.

A continuación se muestra como es la actividad dedicada a la medición de longitudes dentro de la aplicación. La imagen que se observa al fondo de las capturas de pantalla es un recorte de una fotografía tomada a la cámara neubauer BOECO. Se hizo un recorte de la región de la retícula donde cada cuadrado que se observa en la imagen mide 0,25 mm de lado (es decir 250 μm).

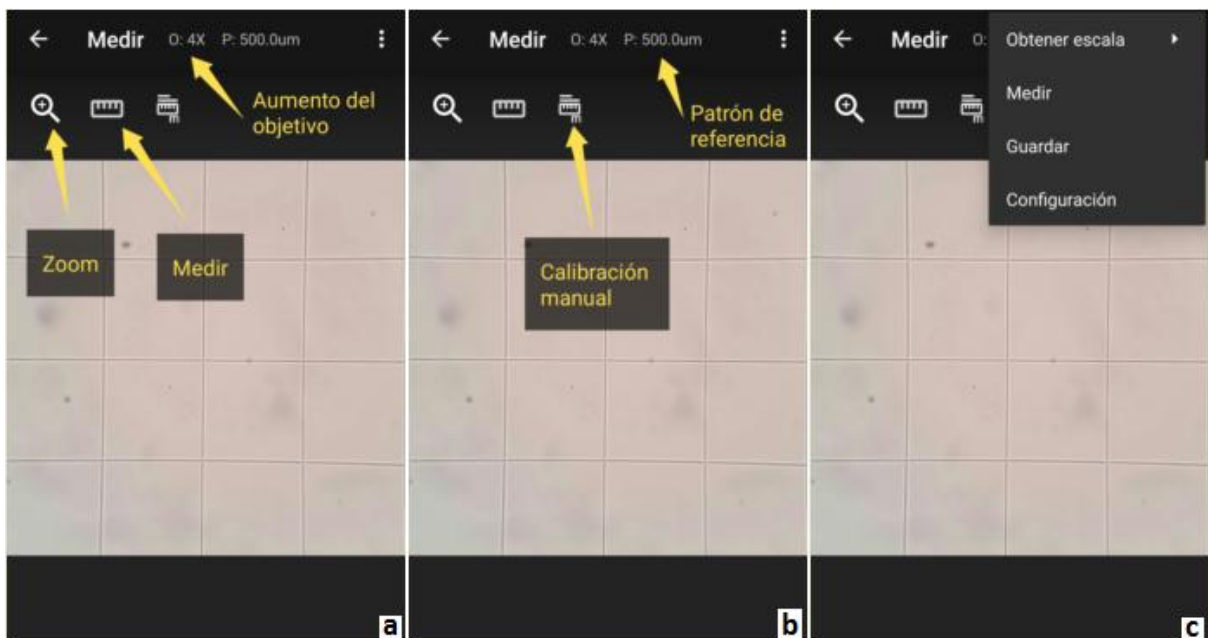


Fig. 4.2.40 Actividad dedicada a la calibración y medición sobre la imagen. La retícula observada proviene de un recorte de una fotografía tomada de una cámara neubauer BOECO.

En la actividad se puede observar que en la parte superior se tiene información del aumento del objetivo usado y del patrón de calibración establecido por el usuario. En este caso se tomó la fotografía con un objetivo de 4X y se ajustó a un patrón de 500 μm .

Si se selecciona la opción "Configuración" se puede modificar:

- El patrón de calibración
- El objetivo utilizado
- El color del trazo para las mediciones

La opción "obtener escala" permite al usuario calibrar manualmente la aplicación. En la actividad hay atajos para la calibración manual y para la medición como se muestran en las figuras (a) y (b).

En la siguiente figura se observa la actividad lanzada cuando se elige la opción "Configuración":

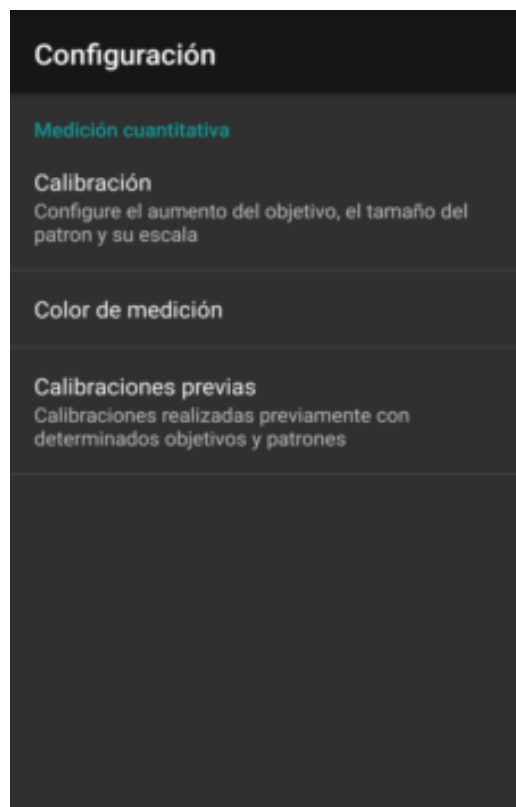


Fig. 4.2.41 Opciones de configuración de la calibración y las mediciones.

Una vez fijados los valores de la configuración, ya se está en condiciones de realizar la calibración manual, la cual como se dijo anteriormente, consiste en trazar una recta con el uso del touch entre dos puntos de distancia conocida en la imagen como se muestra en la siguiente figura:



Fig. 4.2.42 Calibración manual.

En la figura anterior el trazo color magenta realizado por el usuario con el uso del touch representa una recta de longitud $500\ \mu\text{m}$. Esto es así porque el recorte de la fotografía corresponde a la región de conteo donde cada cuadrado mide $250\ \mu\text{m}$ de lado. En este caso la aplicación lo que hace es contar la cantidad de píxeles que hay en el eje x del trazo magenta, obtiene una relación con la medida real y guarda este valor en una variable "patrón" que luego la utilizará para la comparación con las sucesivas mediciones.

4.2.8.2 Medición

Una vez que se realizó la calibración, ya se está en condiciones de medir estructuras en una imagen histológica. Al igual que en el caso de la calibración, lo que debe hacer el usuario para poder medir es trazar una recta entre dos puntos de la imagen también con el uso del touch, luego la aplicación determinará la cantidad de píxeles que hay entre esos dos puntos, y en base a una comparación con la variable "patrón" obtenida en el paso anterior, se determina la longitud entre los puntos.

En la siguiente figura se muestran capturas de pantalla con distintas medidas sobre la imagen. Se utiliza la misma imagen que para el caso de la

calibración para ilustrar que la aplicación arroja resultados correctos. Recordamos nuevamente que cada cuadrado de la imagen mide $250\ \mu\text{m}$ de lado.

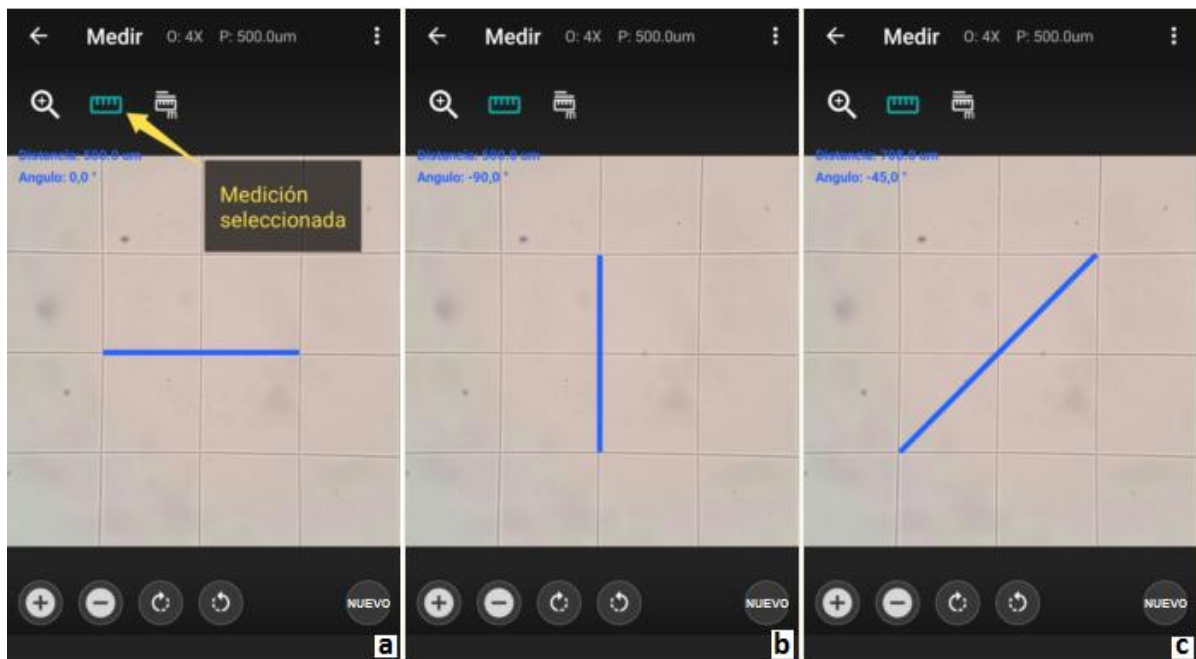


Fig. 4.2.43 En las capturas se observan tres mediciones sobre la imagen. (a) $500\ \mu\text{m}$. (b) $500\ \mu\text{m}$. (c) $708\ \mu\text{m}$.

En los tres casos el resultado es el correcto. En la figura (c) si se calcula por Pitágoras la diagonal de un cuadrado de $500\ \mu\text{m}$ de lado se obtiene $707,10\ \mu\text{m}$, lo cual se aproxima bastante al valor medido.

Cabe aclarar que en la retícula de la imagen no son cuadrados perfectos, debido a que hay una deformación del campo del microscopio porque el ocular del mismo no tenía corrección para la curvatura del campo. Es por ello que se observa una ligera curvatura en las rectas de la retícula.

4.2.8.2.1 Determinación del error en la medición con la aplicación en imágenes recortadas automáticamente

Para la calibración y posterior medición de una imagen es aconsejable no realizar ningún recorte manual, tanto en la imagen de calibración como para las demás fotografías posteriores a medir, ya que provocaría diferentes tamaños de imágenes, y por ende las mediciones no serían representativas. Por tal motivo para recortar la imagen es recomendable utilizar el recorte automático, el cual se realiza de manera idéntica en todas las imágenes tomadas por el smartphone posicionado en el soporte.

Para validar el método de recorte automático se realizaron los siguientes pasos:

1. Captura de la imagen de la cámara neubauer.

2. Recorte automático de la imagen adquirida.
3. Calibración de la app con la imagen.
4. Mediciones sucesivas con diferentes imágenes recortadas automáticamente.
5. Cálculo del error absoluto y relativo.

Para poder estimar el error que se comete al efectuar una medición en la aplicación fue necesario hacer un pequeño análisis estadístico de 15 mediciones realizadas con la aplicación. Estas mediciones se realizaron sobre nueve imágenes de la retícula de la cámara neubauer con los cuadrados de $50\ \mu\text{m}$ de lado que se encuentran en la región central. En la siguiente tabla se resume las mediciones efectuadas:

<i>Medición</i>	<i>Valor medido</i>	<i>Error absoluto</i>
1	50,60	-0,35
2	50,30	-0,05
3	50,40	-0,15
4	50,60	-0,35
5	50,40	-0,15
6	50,20	0,05
7	49,80	0,45
8	50,20	0,05
9	50,70	-0,45
10	50,00	0,25
11	49,70	0,55
12	50,30	-0,05
13	49,90	0,35
14	50,20	0,05
15	50,40	-0,15
Promedio	50,25	0,23

Tabla 4.2.2 Mediciones efectuadas con la aplicación en un cuadrado de $50\ \mu\text{m}$ de lado de la cámara neubauer.

El error relativo y la incertidumbre absoluta son:

$$E_a = 0,23\ \mu\text{m}$$

$$\varepsilon_r = 0,46\%$$

La medición puede expresarse como:

$$50,25 \pm 0,23\ \mu\text{m}$$

Estos resultados contemplan la suma de varios factores:

- Error propio del usuario al medir.
- Error por defecto de la grilla de la cámara neubauer.
- Error por la falta de corrección de la curvatura de campo del ocular.
- Error introducido por el recorte automático, propio de la binarización de Otsu, ya que el valor umbral lo determina en base a un cálculo en base al histograma de la imagen que se está procesando.

Para más información para el cálculo de estos dos valores ver el Anexo D.

4.2.9 Compartir imagen y almacenamiento

La aplicación permite al usuario la posibilidad de almacenar no solo la imagen original, sino también los cambios que se apliquen sobre la misma. Esto posibilita compartir la imagen que desee desde la aplicación a otros colegas por las principales vías utilizadas a día de hoy:

- E-mail
- Facebook
- Instagram
- Twiter
- Whatsapp
- Google Drive
- Bluetooth, etc.

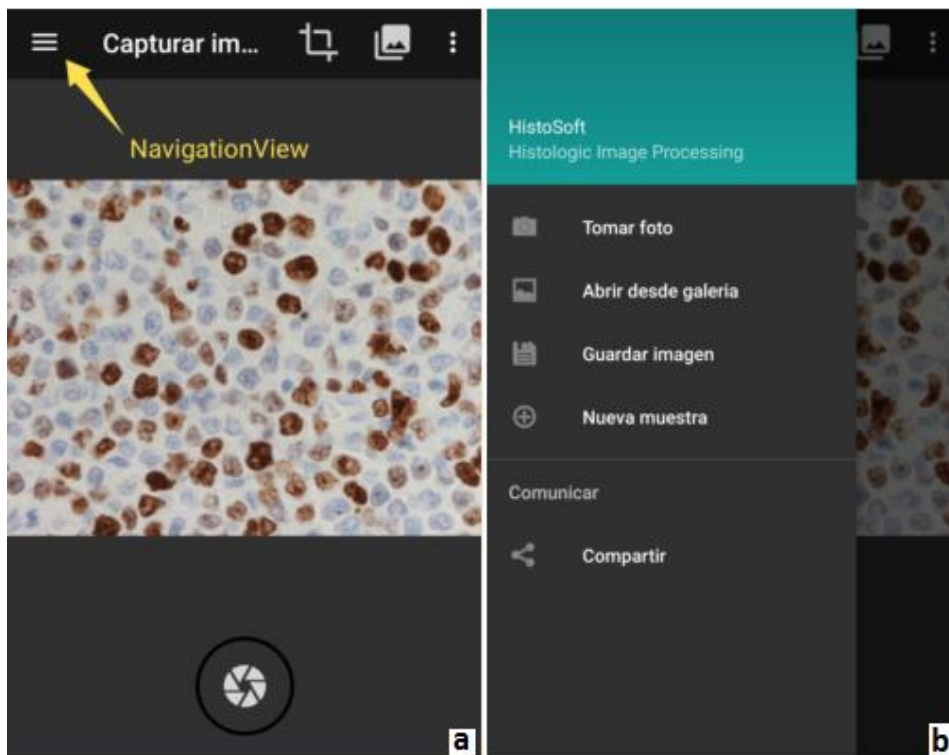


Fig. 4.2.44 En la esquina superior izquierda se encuentra el NavigationView que es un menú lateral deslizante. En él se encuentran varias funciones, entre ellas "Guardar imagen" y "Compartir".

La aplicación almacena las fotografías en la raíz de la memoria interna no extraíble del Smartphone en diferentes carpetas que siguen la siguiente ruta:

```
/memoria interna/HistoSoft/nombre y apellido/área/muestra/imagen.jpg
```


Cada una de las carpetas creadas después de la denominada HistoSoft, poseen el nombre colocado del campo correspondiente en el formulario de la sección "agregar muestra".

5. PRESUPUESTO

El presupuesto se resume en la siguiente tabla

Rubro	Pieza	Costo Total del proyecto(\$)	Cantidad utilizada	Longitud utilizada [cm]	Costo soporte (\$)
	Cámara Neubauer	610.00	1.00		0.00
Impresión 3D	Cabezal del soporte	320.00	1.00		320.00
Perfiles de Aluminio	Varilla cilíndrica de 1/2" X 20cm	120.00		7.50	16.00
	barra cuadrada de 28X28 mm X 5cm	80.00		2.50	32.00
	Perfil en L de 100X50X2,5 mm X 50cm	45.00		14.30	3.15
	Perfil en L de 80X20X1,25 mm X 30cm	24.00		7.60	3.16
	Planchuela de 38X3 mm X 80 cm	56.00		20.00	2.80
Perfiles de Bronce	Varilla cilíndrica de 1/2" X 10 cm	90.00		1.20	75.00
Ferretería	Varilla roscada de 3/16" x 1 m	11.00		40.50	0.27
	Varios Tornillos 1/8 y Tuercas 3/16	36.00	19.00		15.00
	Trabarrosca	89.00	1.00		89.00
	Tarraja macho 1/8"	45.00	1.00		45.00
Total		1526.00			601.38

Tabla 5.1 Análisis de costos. Se puede apreciar claramente que el costo total de materiales y elementos necesarios para el desarrollo del proyecto integrador fue de \$1526,00. El costo de materiales para la realización de un solo soporte es de \$601,38.

6. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se presenta una solución alternativa e innovadora a la problemática planteada en algunos hospitales públicos en la adquisición de imágenes histológicas de microscopios ópticos binoculares, se diseña y construye un soporte universal para el acoplamiento de un smartphone al ocular del microscopio y se desarrolla una aplicación Android para el procesamiento de las imágenes histológicas adquiridas.

En cuanto al soporte universal podemos concluir que el mismo se desempeña correctamente, ya que se puede ajustar fácil y firmemente al ocular del microscopio. El diseño realizado permite efectuar movimientos finos en los tres ejes espaciales, permitiendo posicionar la cámara del smartphone en la ubicación idónea para la toma de la fotografía.

El diseño del soporte fue concebido para que el posicionamiento del smartphone en el espacio se haga con tornillos independientes para cada eje. Las otras dos perillas solo sirven para la fijación del soporte al ocular y del teléfono al soporte. Una vez que se hicieron los ajustes de los tornillos para la ubicación de la cámara en el lugar correcto, es posible retirar y colocar el teléfono al soporte (con el solo desajuste y/o ajuste del tornillo que contiene la mordaza móvil lateral), sin que se pierda la configuración general del soporte. Esto permite al patólogo hacer solamente una vez el ajuste grueso, permitiendo sacar y colocar el teléfono las veces que se desee, siendo solo necesario hacer un pequeño ajuste fino. Lo mismo ocurre sacando el soporte del ocular y colocándolo nuevamente.

Otro punto a favor que tiene el soporte es su bajo peso (245 grs.), ya que el mismo está construido en su mayoría por perfiles de aluminio, y dos piezas del cabezal impresas en 3d de resina de plástico, las cuales son también livianas.

La aplicación Android cumple con todas las prestaciones que se plantearon en los objetivos de este proyecto integrador. En cuanto a la adquisición de la imagen desde la aplicación, ya sea cargándola desde la galería del teléfono o utilizando la cámara, funciona de la manera esperada.

La edición de la imagen tiene varias funciones propias. El recorte manual se desempeña correctamente, siendo su uso muy intuitivo para el usuario. El algoritmo de recorte automático de la imagen funciona bien siempre y cuando en la fotografía tomada se observe el campo visual del microscopio como un círculo completo. Si esto no ocurre, el algoritmo entrega un recorte que no es el idóneo porque el mismo fue pensado para este caso en particular.

La delimitación de zonas con el uso de trazos, la inserción de flechas de distintos tamaños y la incorporación de texto en la imagen, se puede hacer de manera muy intuitiva, sin que presente ningún tipo de inconveniente.

Se puede rotar la imagen a 90° en sentido horario y anti horario, las veces que el usuario considere necesario. El usuario puede guardar satisfactoriamente la imagen con todos los cambios que introdujo en la misma.

Cabe aclarar que en la edición de la fotografía, el tamaño de la imagen disminuye ajustándose a las dimensiones del lienzo de edición.

En lo que respecta al procesamiento de imágenes, podemos concluir que los mismos se realizan de la manera correcta. El tiempo de procesamiento es bajo debido a que los procesamientos se realizan en C++. Esto permite obtener un rendimiento de hasta 15 veces más rápido que en el lenguaje Java. Es por ello que se optó por usar la librería de funciones de OpenCV, además de que la misma proporciona una gran variedad de métodos y algoritmos para el procesamiento de imágenes totalmente depurados y documentados.

El uso de estos procesamientos de imagen se realiza de manera muy intuitiva para el usuario, ya que en algunos casos solo basta con presionar un botón y en otros se ajusta con el uso del touch usando una barra de progreso en la cual se modifica el parámetro deseado. El tiempo de refresco de la imagen cuando se mueve la barra de progreso es casi instantáneo, no demostrando demoras en los smartphones LG G4 H815 y Motorola G5 plus.

Los resultados obtenidos en cuanto a la medición son satisfactorios. En la actividad dedicada para esta función el usuario puede de manera sencilla e intuitiva calibrar y medir en la imagen tomada. El requisito para hacer una medición confiable, es que la imagen de la cuadrícula de la cámara neubauer sea tomada en las mismas condiciones que la imagen de la muestra histológica, es decir que el teléfono debe estar ajustado de tal manera que el campo visual del microscopio sea de igual tamaño en ambas fotografías. Por lo tanto, para minimizar el error es necesario tomar consecutivamente las fotografías una vez que se ajustó el soporte al ocular y el smartphone al soporte, ya que si el usuario saca una fotografía, luego quita el teléfono del soporte y lo vuelve a colocar para otra adquisición, no se puede asegurar que el tamaño del campo sea el mismo.

El error que se comete al realizar una medida con la app es muy pequeña, es de apenas de 0,47%, lo cual permite realizar mediciones muy precisas sobre la imagen. Esto es una gran ventaja en contraste con los métodos de medida aproximados que se utilizan en algunos hospitales públicos, en los cuales se utiliza una pequeña regla u hoja milimetrada para estimar de forma aproximada la dimensión de una estructura.

La aplicación también permite medir exitosamente en imágenes de distintos aumentos, es decir, si el usuario calibra la aplicación con una imagen de 40x, puede medir de manera confiable en otra imagen de 10x, esto es así porque existe una proporcionalidad entre el aumento de la imagen y el aumento del objetivo.

La función de recuento Ki-67 se puede hacer de manera manual y de manera semiautomática. En ambos casos la interfaz de usuario es bastante amigable, lo que permite al profesional aprender rápidamente la mecánica de uso de estas actividades. En cuanto a los resultados obtenidos en el recuento manual podemos decir que es el método más confiable, porque es el patólogo el que determina que núcleo debe marcar como positivo y como negativo.

En cuanto al método de recuento semiautomático se puede concluir que el mismo entrega resultados aceptables siempre que en la imagen se encuentren bien diferenciados los colores tanto para los núcleos proliferativos como para los no proliferativos del fondo. En otras imágenes se confunden los colores del núcleo con el fondo, por lo tanto el

procesamiento entrega un resultado que se aleja del valor real, no siendo recomendable usar este algoritmo en estos casos. Otra consideración importante es que las imágenes obtenidas de una misma muestra deben mantener en forma homogénea la temperatura y tonalidad de sus colores, ya que solo se podrían obtener los centroides correspondientes en la primera imagen, y así poder utilizar los mismos en los demás campos de manera fiable y sin tener que obtenerlos nuevamente.

Otra limitación que tiene el algoritmo de k-means es que depende mucho de cómo se tomen los datos para la determinación de los centroides iniciales. Es por ello que el patólogo deberá aprender como tomar los datos con la aplicación para lograr un procesamiento óptimo. Como ayuda, en la actividad se muestran cual es el color promedio para cada centroide a medida que se toman los valores para cada clúster. El profesional deberá tomar datos de los valores extremos del rango de un color, y los valores intermedios. De esta manera la segmentación de la imagen otorga una mejor aproximación.

De manera general, podemos decir que este Proyecto Integrador ha sido muy abarcativo en cuanto al uso de conocimientos necesarios para llevarlo a cabo, ya que muchos temas de las asignaturas cursadas durante la carrera de Ingeniería Biomédica fueron utilizados. Estamos satisfechos con los resultados obtenidos en general, porque proponemos una solución alternativa e innovadora a la problemática mencionada en el área de la Ingeniería Biomédica. Aunque este proyecto tiene muchas mejoras por realizar, creemos que los resultados son prometedores.

Fue muy provechosa la experiencia adquirida durante la ejecución de cada una de las etapas del proyecto, ya que nos enfrentamos al "mundo real", en el cual la búsqueda de información no siempre se encuentra fácilmente en libros o internet, sino que la misma es extraída de la experiencia de otras personas. También aprendimos a trabajar de manera interdisciplinaria con otros profesionales, tales como anatomo-patólogos, matemáticos, ingenieros, técnicos, etc., los cuales hicieron que este proyecto fuera posible, porque cada uno nos guio por el sendero correcto para solucionar de la mejor manera los obstáculos que nos encontramos a lo largo del desarrollo de ambas etapas.

Otra de las experiencias adquiridas fue el aprendizaje en el uso de herramientas que escapaban a la formación académica de nuestra carrera, tales como el uso del torno y fresa, la manipulación de distintos materiales para la construcción del soporte, impresión 3d, diseño en SolidWorks, Programación orientada a objetos, Programación android, etc.

7. APLICACIONES Y MEJORAS

Aplicaciones

Además de la aplicabilidad demostrada en este proyecto, se citarán a continuación los distintos destinos donde podría ser aplicado el procesamiento de imágenes en general con el uso del smartphone y el soporte universal para el microscopio:

- Adquisición de imágenes de fibras de colágeno para la posterior determinación de sus dimensiones, como nos sugirió la Cátedra de Química Orgánica y Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.
- Elaboración de otros procesamientos específicos para otros tipos de imágenes histológicas a las abordadas en este proyecto, para la cuantificación de ciertos parámetros de interés médico.
- Procesamiento de imágenes radiológicas con otra aplicación Android. Un médico podría descargar de un servidor una imagen de un paciente y procesarla para poder visualizar parámetros que no se observan fácilmente.
- Adquisición y procesamiento de imágenes de distintos minerales que se observan en el microscopio óptico, como se sugirió en Departamento de Geología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.
- Adquisición, procesamiento y edición de imágenes observadas con un telescopio.
- Utilización con fines educativos, ya que permite la observación simultánea de varios individuos a la pantalla del Smartphone con el campo del microscopio.

Mejoras

Al tratarse de un primer proyecto hay muchas mejoras por realizar tanto en la aplicación como en el soporte. A continuación se detallan cada una de ellas:

- Soporte
 - Realizar un diseño que permita disminuir la cantidad de piezas de manera tal que se pueda automatizar la fabricación de cada una de las mismas y reducir los costos de producción.
 - Mejora en cuanto a la ergonomía y desempeño del soporte, modificando el sistema de perillas – tornillos.
 - Realizar un relevamiento mayor de microscopios ópticos (al que se realizó en este proyecto) para lograr una mayor universalidad del mismo.
- Aplicación
 - Estudiar la eficacia y eficiencia de distintos algoritmos de Inteligencia Artificial en el recuento semiautomático del Ki-67. De esta manera se podrían mejorar los resultados obtenidos de la aplicación actual.
 - Realizar un estudio más profundo para una mejor validación del recuento semiautomático. Para esto sería necesario contar con

una gran base de datos con imágenes procedentes de la técnica Ki-67.

- Utilizar un ocular graduado para la calibración de la aplicación. Si bien los mismos son costosos, son más fáciles de conseguir que la cámara neubauer y además son más intuitivos para el patólogo a la hora de realizar la calibración, eliminando también la necesidad de hacer ajustes de cálculo a la hora de determinar el patrón de calibración definitivo para una posterior medición.
- Agregar nuevas herramientas en la edición de imágenes y mejorar las existentes, ya que las herramientas proporcionadas son muy básicas.
- En un futuro podría crearse un servidor específico donde el profesional pueda subir la imagen que desea procesar, y seleccionar el tipo procesamiento a efectuar. De esta manera se realizarían algunos nuevos tipos de procesamientos (uso de redes neuronales por ejemplo) que podrían ser muy costosos computacionalmente para un smartphone. Una vez finalizada esta tarea, se podría descargar la fotografía procesada.
- Acortar los tiempos de procesado de las imágenes utilizando más código nativo en C++ y menos código en Java.
- Ampliar el mercado de clientes con una aplicación para Apple.

8. ANEXOS

Anexo A: Creación de un nuevo proyecto en Android Studio

1) Al ejecutar el programa Android Studio aparece la siguiente pantalla:

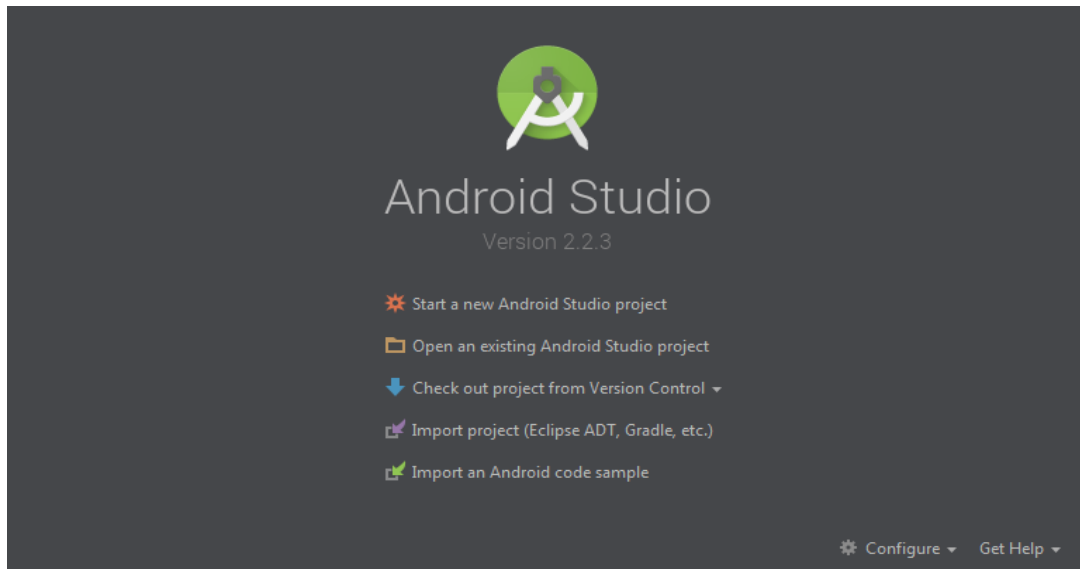


Fig. A1 Pantalla de inicio de Android Studio ⁽⁴⁰⁾.

2) Seleccionamos la primera opción (Start a new Android Studio project) y se abre la siguiente ventana:

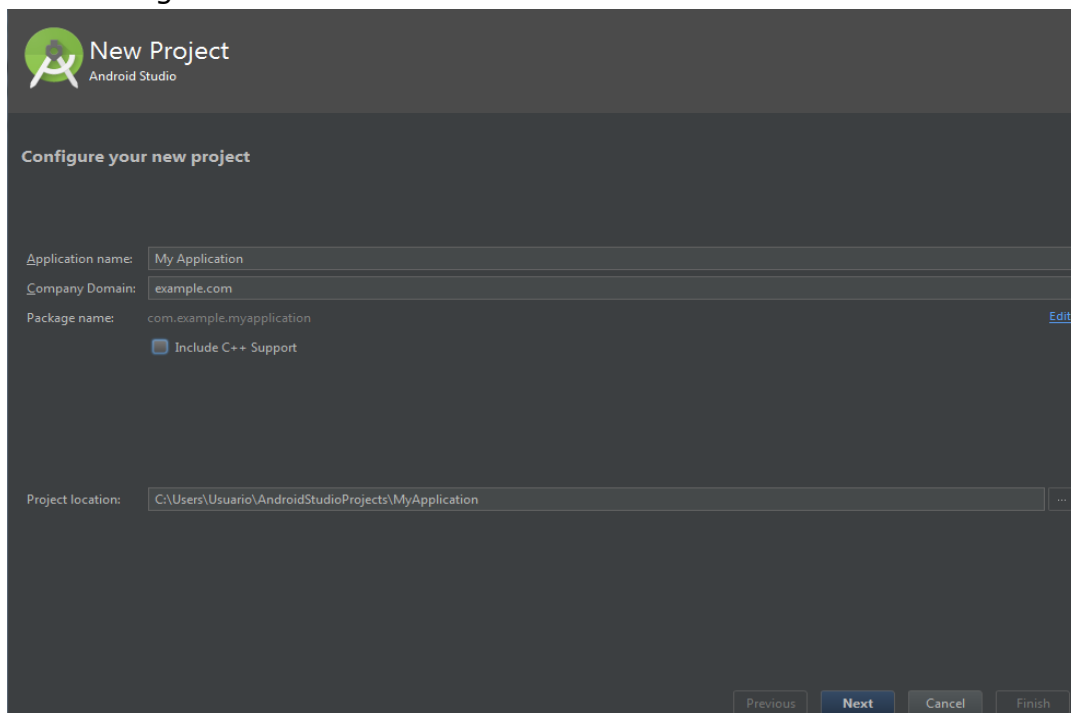


Fig. A2 Creación de nuevo proyecto. Definición del nombre de la aplicación ⁽⁵³⁾.

En este paso debemos especificar el nombre que tendrá nuestra aplicación y el dominio. Con esto el software crea automáticamente el paquete que contendrá las clases del proyecto.

Determinamos la localización del proyecto y presionamos Next.

3) Se debe determinar a qué dispositivos está dirigida nuestra aplicación:

- Smartphones y Tablets
- Smartwatches
- Smart TV
- Android Auto
- Smart Glasses

Una vez seleccionado el dispositivo, es necesario especificar el SDK mínimo. Esto significa que rango de dispositivos queremos que abarque nuestra aplicación. Como se mencionó anteriormente hay una enorme cantidad de dispositivos en el mercado, y además existen numerosas versiones del sistema operativo Android, esto implica que cada versión tiene sus propias características respecto de las otras. En general, salvo marcadas excepciones, cada nueva versión agrega algunas nuevas funcionalidades y mejoras respecto a la anterior.

En resumen, cuando especificamos el SDK mínimo, estamos diciéndole al programa desde que version de Android nuestra aplicación debe funcionar, a continuación vemos la ventana que Android Studio nos muestra.

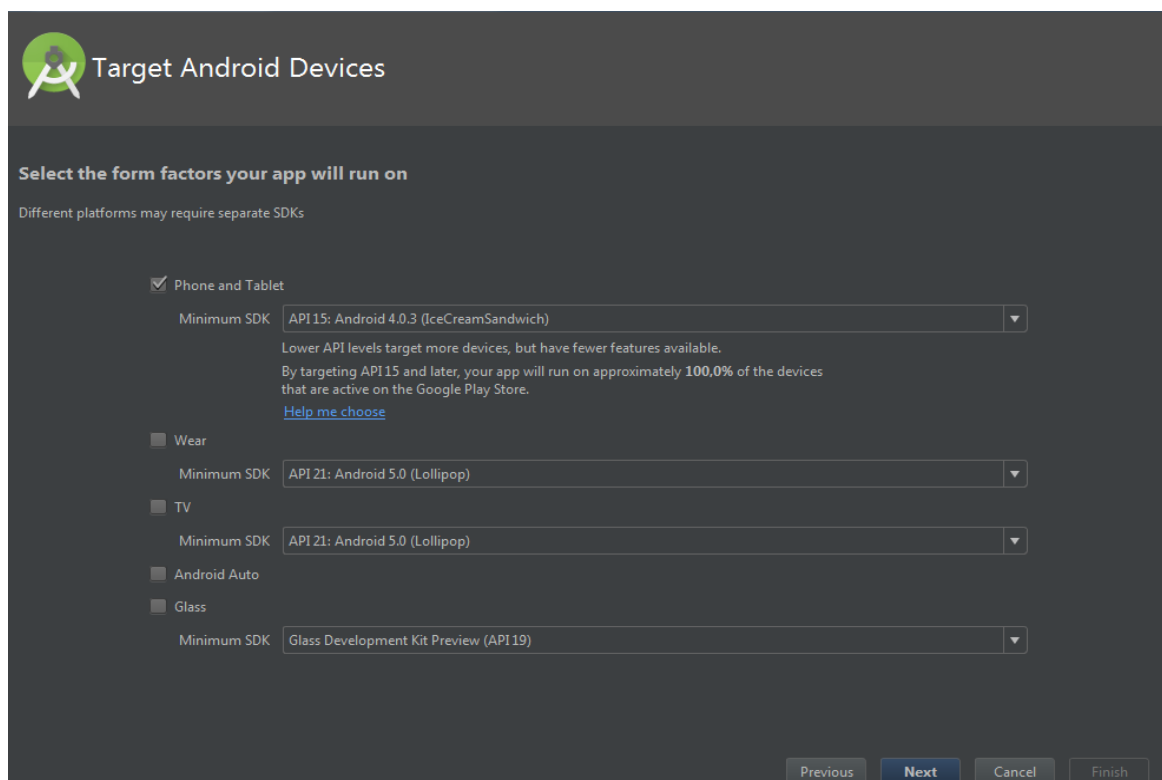


Fig. A3 Determinación de las versiones de Android que se pretende abarcar con la aplicación (40).

Android Studio incorpora una opción para mostrarnos el porcentaje de smartphones cubiertos con el SDK especificado. Esto lo hacemos con la opción *Help me choose* (de la figura anterior), dando como resultado el siguiente gráfico:

ANDROID PLATFORM VERSION	API LEVEL	CUMULATIVE DISTRIBUTION
4.0 Ice Cream Sandwich	15	
4.1 Jelly Bean	16	99,2%
4.2 Jelly Bean	17	96,0%
4.3 Jelly Bean	18	91,4%
4.4 KitKat	19	90,1%
5.0 Lollipop	21	71,3%
5.1 Lollipop	22	62,6%
6.0 Marshmallow	23	39,3%
7.0 Nougat	24	8,1%
7.1 Nougat	25	1,5%

Fig. A4 Visualización del porcentaje de smartphones potenciales que podrían utilizar la aplicación, según el SDK mínimo al que se apunte ⁽⁴⁰⁾.

Por ejemplo, si compilamos nuestra aplicación con la API 19 (KitKat), estamos cubriendo el 90,1% de los smartphones en circulación. Si compilamos con la API 23 (Marshmallow), cubrimos solo el 39,3% de los teléfonos inteligentes.

Aquí se determina a quién estará dirigida nuestra App, y se debe tener en cuenta que a medida que sea más amplio el rango de teléfonos cubiertos, menos funcionalidades podrá tener nuestra aplicación, ya que las nuevas versiones incorporan funciones que las anteriores no tienen.

4) En este paso se debe seleccionar la Actividad principal de nuestra App. Hay distintas plantillas precargadas en el software, y se selecciona la más adecuada a nuestras necesidades. En este caso seleccionamos Empty Activity y presionamos Next.

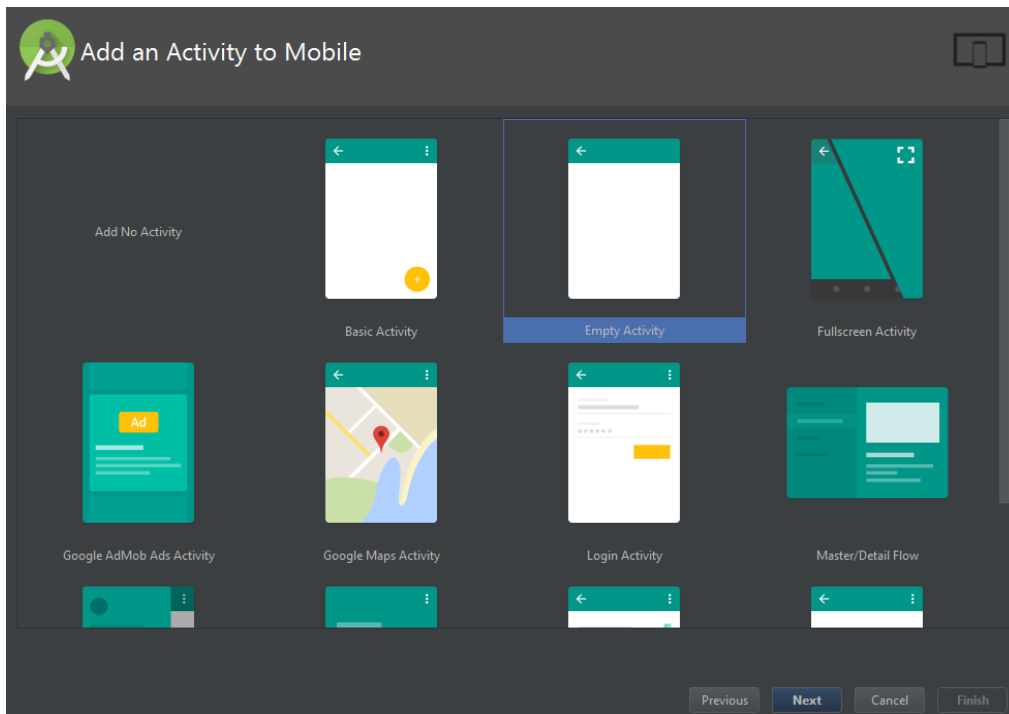


Fig. A5 Elección del tipo de actividad principal de la aplicación ⁽⁴⁰⁾.

5) En la ventana siguiente Android Studio nos solicita el nombre de la Actividad principal, que coincidirá con el nombre de la clase que controla esta Actividad. Además se debe especificar el nombre del fichero XML Layout, donde se define el aspecto visual que tendrá la actividad.

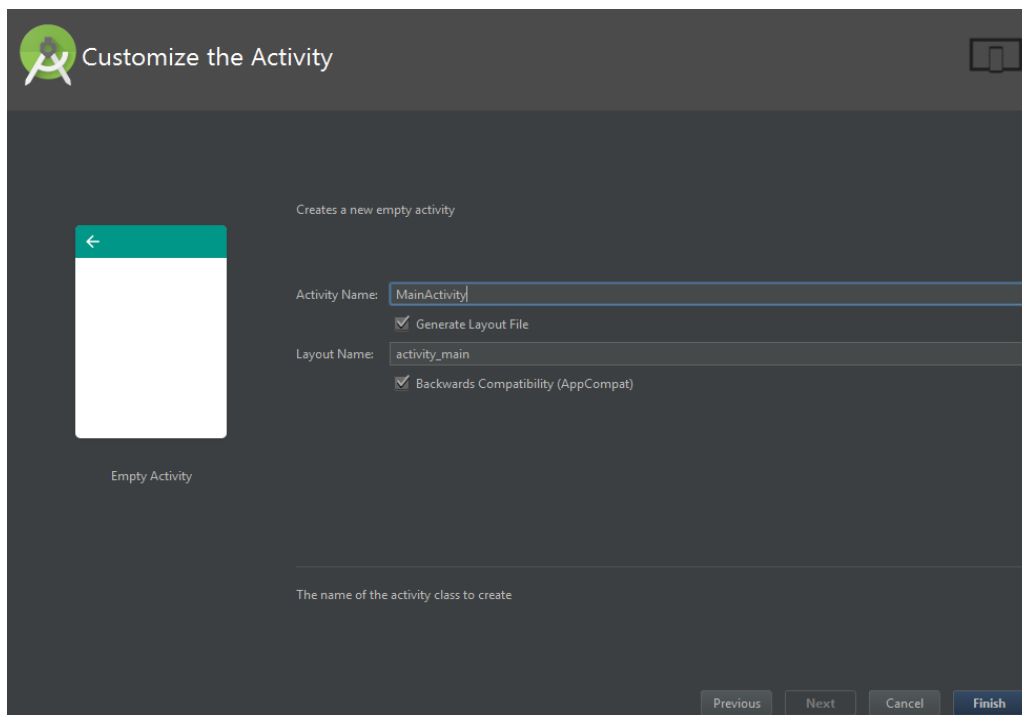


Fig. A6 Definición del nombre de los nombres de la clase y el layout de la actividad principal ⁽⁴⁰⁾.

Presionamos el botón Finish y podemos comenzar a desarrollar la aplicación.

Interfaz de trabajo de Android Studio

En la figura A8 se muestra una imagen apaisada (para mayor claridad) de cómo es la interfaz gráfica de Android Studio.

En la parte izquierda de esta interfaz se observa la carpeta app, que es donde están almacenados todos los ficheros necesarios para nuestra aplicación, y están separados en distintas subcarpetas.

En la carpeta "manifest" se encuentra un fichero denominado AndroidManifest.xml, y en él se establecen las características generales de nuestra app, como ser:

- Nombre de la aplicación
- Cantidad y nombre de cada una de las actividades que tiene nuestra app
- Tema de la aplicación
- Icono de la aplicación
- Los permisos
- Los servicios
- Los proveedores de contenido, etc ⁽⁴⁰⁾.

La carpeta "java" va a contener las clases que necesite nuestra aplicación para funcionar. Desde las clases que controlan cada una de las actividades, como las clases extras que el programador escriba.

La carpeta "res" es una carpeta que contiene todos los recursos de la app, y está compuesta por las siguientes carpetas con sus respectivos ficheros como se muestra en la figura:

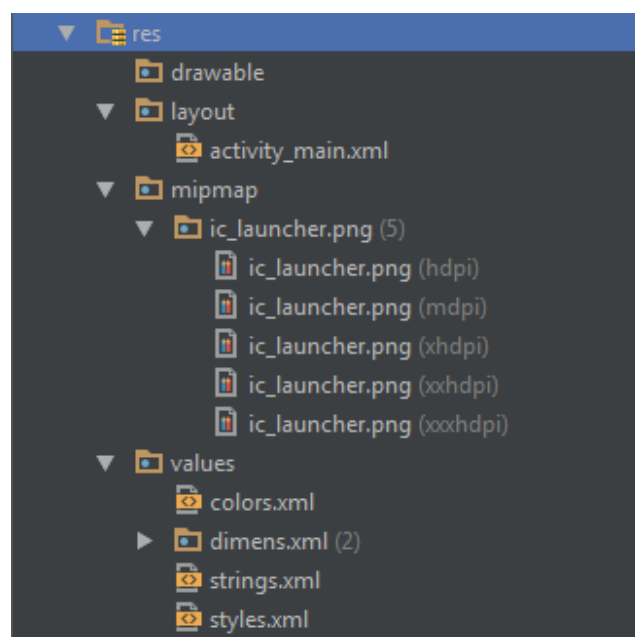


Fig. A7 Conjunto de carpetas y archivos que componen los recursos de la aplicación ⁽⁴⁰⁾.

- *drawable*: Contiene todas las imágenes (JPG o PNG) y/o descriptores de imágenes (XML).
- *layout*: Contiene los ficheros XML que definen la interfaz gráfica de cada una de las actividades de la aplicación.
- *mipmap*: Contiene la imagen del icono de la aplicación. En la figura se observa que son cinco ficheros con extensión png, cada uno con una resolución diferente. Esto es así porque es el sistema quien determina qué resolución de imagen es la idónea para el dispositivo que tiene instalada la aplicación, ya que en el mercado existen muchas variedades de dispositivos, cada uno con una resolución y una densidad de píxeles (píxeles por pulgada) diferente. En base a esta densidad de pantalla el sistema escoge la imagen para que el ícono se observe lo más nítido posible.
- *values*: Contiene cuatro ficheros XML donde se definen los colores, dimensiones de las vistas, las cadenas de textos y los estilos en nuestra aplicación ⁽⁴⁰⁾.

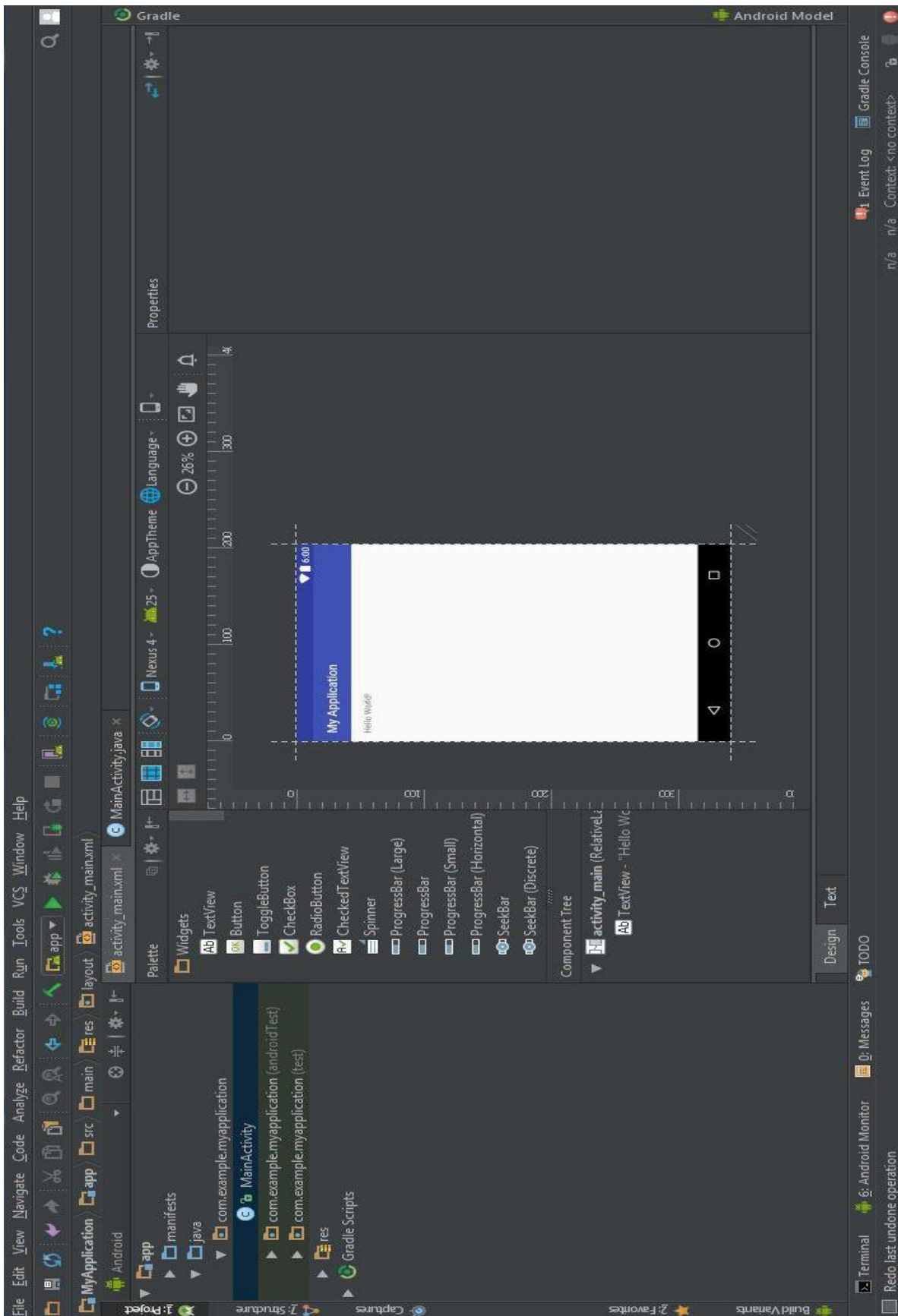


Fig. A8 Pantalla principal del IDE Android Studio ⁽⁴⁰⁾.

Las carpetas anteriores son las que Android Studio crea por defecto, pero el programador puede definir otras nuevas carpetas con sus respectivos ficheros para animaciones, menús, etc ⁽⁴⁰⁾.

Más abajo se encuentra la carpeta Gradle Scripts, donde se almacenan una serie de ficheros Gradle que permiten compilar y construir la aplicación. Algunos de estos ficheros hacen referencia al módulo de la aplicación y el resto son para configurar el proyecto ⁽⁴⁰⁾.

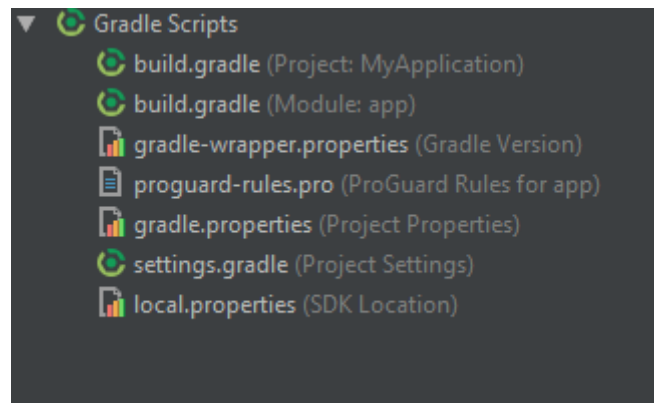


Fig. A9 Carpeta de archivos Gradle Scripts ⁽⁴⁰⁾.

El fichero más importante es *build.gradle (Module:app)* donde se configuran las opciones de compilación del módulo.

En la parte central de Android Studio se van localizando las diferentes pestañas con el contenido de cada uno de los ficheros abiertos. Para el caso de ficheros XML de los layout, se observa en la parte inferior izquierda dos pestañas:

- Design: Es una vista previa de los elementos gráficos que tiene la actividad.
- Text: Se encuentra el código XML que define las propiedades de cada vista en el layout.

Anexo B: Relevamiento de microscopios ópticos

Para el diseño del soporte, fue necesario hacer un relevamiento de algunos microscopios ópticos. Para ello se concurrió al Hospital Municipal de Urgencias de la Ciudad de Córdoba para tomar las medidas de interés.

Como se mencionó anteriormente, el soporte se acopla en el ocular o en el porta ocular del microscopio, ya que estos segmentos es donde estos instrumentos tienen mayor similitud entre sí, se trate de una marca u otra. Es por eso que se decidió diseñar el soporte para este propósito.

Los oculares y portaoculares de estos instrumentos, varían en algunas de sus características morfológicas, pero en general responden a los siguientes esquemas que se muestran a continuación:

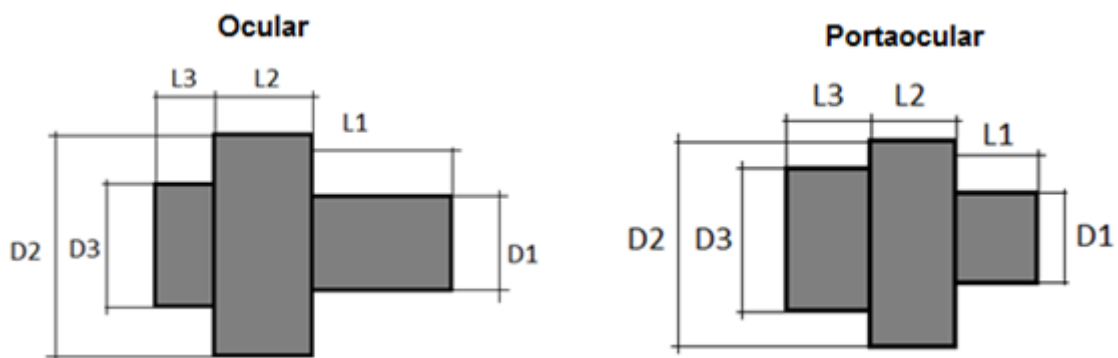


Fig. B1 Esquema general del ocular y portaocular de un microscopio óptico.

Otra dimensión necesaria para el diseño del soporte es la distancia entre las portas oculares como se muestra a continuación:

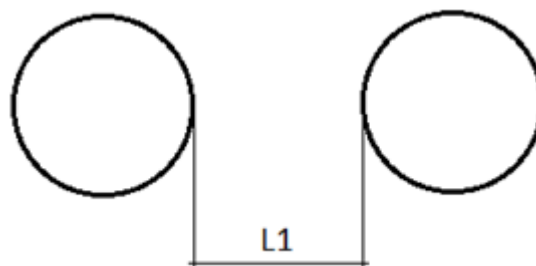


Fig. B2 Distancia entre portaoculares (DPO).

En la siguiente tabla se resumen las medidas tomadas en los microscopios disponibles en el Hospital Municipal de Urgencias, en el área de Anatomía Patológica y en el Laboratorio de análisis clínicos.

Modelo	Pieza	D1(mm)	D2(mm)	D3(mm)	L1(mm)	L2(mm)	L3(mm)	DPO(mm)
Leitz	Ocular	23.5	25.4		31.55	22.75		23.5 - 43.93
	Porta ocular	25.1	32.94	25	10	15	8	
Bausch&Lomb	Ocular	23.15	31.96		25.21	26.6		23.90 - 42.50
	Porta ocular	25	34.9	32	11.5	5	8.5 - 18.5	
Motic B1 Series	Ocular	23.14	29.93		24.44	38.6		21.26 - 43.88
	Porta ocular		33.88	31.88		7	21.5	
Motic BA210	Ocular	29.96	41.96	37.2	32.5	21.77	11	20.22 - 41.23
	Porta ocular	30.94	35.94	34.06	2.5	20	20.5	
Zeiss Axiostar plus	Ocular	29.93	43.86	36.44	28	19.38	8.5 - 17.5	18.10 - 40.04
	Porta ocular	36.5			22			
Meiji	Ocular	23.13	30		25.4	31.66		25 - 45
	Porta ocular	25	34.44	32.84	7	8	6.5 - 21.5	
Mínimo		23.13	25.4	25	2.5	5	6.5	18.1
Máximo		36.5	43.86	37.2	32.5	38.6	21.5	45
Diferencia		13.37	18.46	12.2	30	33.6	15	26.9

Tabla B1 Registro de las mediciones tomadas.

En la tabla anterior en el caso de la distancia entre los porta oculares (DPO), se especifica el mínimo y máximo del rango de movimiento que permite el modelo de microscopio. Por ejemplo, en el caso del modelo Leitz, el rango es de 23,5 mm a 43,93 mm. Esta variación voluntaria de la distancia permite ajustar los oculares a la distancia interpupilar del usuario.

En la tabla anterior se observan los diámetros y longitudes de los oculares, porta oculares y la distancia entre porta oculares (DPO). En ciertas marcas y modelos, como se mencionó anteriormente, existe una variación en la morfología del ocular y porta ocular, por lo que algunas dimensiones presentadas en los esquemas anteriores, se encuentran en algunos y en otros no; es por ello que algunas celdas de la tabla se observan en color gris.

Con el propósito de diseñar el prototipo, se obtienen los mínimos, máximos y sus diferencias.

Las mediciones se realizaron con:

- Calibre digital marca ESSEX: de rango 0 - 200 mm y una precisión ± 0.03 mm.
- Regla de precisión: de rango 0 - 305 mm y precisión ± 0.25 mm.

Anexo C: Relevamiento de Smartphones en el mercado

Para el diseño del soporte se tuvo en cuenta la enorme cantidad de teléfonos que se comercializan a día de hoy y sus diferentes especificaciones tomando interés especial en las siguientes:

- Las dimensiones (ancho, alto y espesor)
- Tamaño de la pantalla (pulgadas)
- Resolución de pantalla (HD, Full HD, 2K, etc.)
- Resolución de la cámara
- Ubicación de la cámara en el teléfono, etc.
- Ubicación de los botones de volumen y apagado/encendido

Los tamaños de pantalla más comercializados en la actualidad, comprende un rango que va desde las 4" hasta aproximadamente las 6.4" con una media estándar de 5".

Este dato no es menor, ya que se debe poder ajustar a la gran mayoría de los smartphones en circulación al soporte. No consideramos teléfonos con un tamaño de pantalla menor a 4" ya que prácticamente se encuentran en desuso, debido a que el manejo de aplicaciones en una pantalla pequeña se hace difícil y limita las prestaciones del dispositivo.

A continuación se muestran dos ejemplos que comprenden los extremos de este rango que utilizamos para el diseño.

Samsung Galaxy J1 mini

Tiene una pantalla de 4" y sus dimensiones son:

- Alto: 121,6 mm
- Ancho: 63,1 mm
- Espesor: 10,8 mm



Fig. C1 Samsung Galaxy J1 mini ⁽⁵⁴⁾.

Xiaomi Mi Max 2

Tiene una pantalla de 6,44" y sus dimensiones son:

- Alto: 174 mm
- Ancho: 89 mm
- Espesor: 7,6 mm



Fig. C2 Xiaomi Mi Max 2 ⁽⁵⁵⁾.

Anexo D: Determinación del error en una medición

Cada vez que se realiza una medición, se tiene una probabilidad de cometer algún error que nos introduzca más o menos alejado del valor que realmente deseamos obtener. Entre los errores más comunes podemos distinguir dos grandes grupos:

- **Errores sistemáticos:** Son los errores relacionados con la manera que se utiliza el instrumento de medida, y dentro de esta categoría se pueden distinguir dos tipos:
 - **Error de calibrado:** Se trata de unos de los errores más frecuentes y está directamente ligado al instrumento. Los mismos deben ser configurados de la forma apropiada antes de ser utilizados (calibrado), si esto no se hace correctamente todas las medidas realizadas tendrán añadidas un sesgo.
 - **Error de paralaje:** Es propio de los instrumentos de medida analógicos que poseen agujas para indicar los valores. Dos observadores situados en posiciones oblicuas a la aguja pueden leer valores diferentes.
- **Errores aleatorios o accidentales:** Se trata de errores que se producen debido a causas que no se pueden controlar. Para intentar reducir el efecto de este tipo de errores se suele medir varias veces en las mismas condiciones, y se considera como valor final más probable la media aritmética de los datos obtenidos ⁽²⁰⁾.

Dado que todas las medidas están afectadas por un error experimental, es común hacer constar cada resultado obtenido en una medición junto con la incertidumbre sobre esa medida. La incertidumbre es un valor numérico que se obtiene por medio del error absoluto y el error relativo ⁽²⁰⁾.

La medición científica se expresa:

$$\text{magnitud} = \text{valor} \pm \text{incertidumbre} [\text{unidad}]$$

Un ejemplo de esto es:

$$\text{longitud} = 2,456 \pm 0,001 \text{ m}$$

Error absoluto

El error absoluto de una medida es la diferencia entre el valor real de la medida \bar{X} y el valor que se ha obtenido de la medición X_i .

$$\varepsilon_a = \bar{X} - X_i$$

Se considera como valor real de la medición a la media aritmética de un número n de mediciones en las mismas condiciones. El error absoluto puede ser un valor positivo o negativo.

Con el fin de facilitar su cálculo cada uno de los valores obtenidos X_i se suele escribir en una tabla junto con las frecuencias de cada medida ⁽²⁰⁾.

Ejemplo: Se pesa un objeto 20 veces y se obtiene la siguiente tabla:

Medida (X_i)	Frecuencia (f_i)
3,45 g	2
3,40 g	3
3,52 g	5
3,50 g	5
3,51 g	5

Tabla D1 Agrupación de datos por frecuencia ⁽²⁰⁾.

A continuación añadimos una columna con la multiplicación de cada medida por su respectiva frecuencia:

Medida (X_i)	Frecuencia (f_i)	$X_i \cdot f_i$
3,45 g	2	6,90 g
3,40 g	3	10,20 g
3,52 g	5	17,60 g
3,50 g	5	17,50 g
3,51 g	5	17,55 g

$$\Sigma X_i \cdot f_i = 69,75 \text{ g}$$

Tabla D2 Cálculo de la sumatoria de los datos ⁽²⁰⁾.

La media aritmética de estas medidas (valor que consideraremos como real \bar{X}) es:

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^n \frac{X_i \cdot f_i}{n} = \frac{\Sigma_{i=1}^{20} X_i \cdot f_i}{20} = \frac{69,75}{20} = 3.4875$$

A continuación agregamos otra columna con el error absoluto de cada medida:

Medida (X_i)	Frecuencia (f_i)	$X_i \cdot f_i$	$\varepsilon_a = \bar{X} - X_i$
3,45 g	2	6,90 g	0,0375 g
3,40 g	3	10,20 g	0,0875 g
3,52 g	5	17,60 g	-0,0325 g
3,50 g	5	17,50 g	-0,0125 g
3,51 g	5	17,55 g	-0,0225 g
		$\Sigma X_i \cdot f_i = 69,75 \text{ g}$	

Tabla D3 Cálculo del error absoluto ⁽²⁰⁾.

Ahora ya se está en condiciones de expresar la imprecisión absoluta E_a en la medición, que es la media de los errores absolutos tomados con signos positivos:

$$E_a = \frac{\sum_{i=1}^n |\bar{X} - X_i|}{n} = \frac{\sum_{i=1}^{20} |\bar{X} - X_i|}{20} = \frac{0,1925}{20} = 9,625 \cdot 10^{-3} \text{ g}$$

El resultado final se expresa entonces:

$$3,4875 \pm 0,0096 \text{ g}$$

Error relativo

Es el cociente entre el error absoluto y el valor que consideramos como verdadero. Al igual que el error absoluto este puede ser positivo o negativo ⁽²⁰⁾. Se determina de la siguiente manera:

$$\varepsilon_r = \frac{\varepsilon_a}{\bar{X}} \cdot 100\%$$

Siguiendo con el ejemplo anterior se obtiene un error relativo del:

$$\varepsilon_r = \frac{9,625 \cdot 10^{-3}}{3,4875} \cdot 100\% = 0,27\%$$

El error relativo sirve como un indicador de la calidad de una medición.

Anexo E: Tablas de datos y cálculo para el contraste de diferencias de medias de poblaciones apareadas.

Para poder emplear el test t de student en las muestras siguientes, este debe seguir una distribución normal y tener un tamaño muestral pequeño, menor a 30. Los tamaños de las muestras obtenidas en los dos métodos de recuento Ki67 semiautomático son de 15. Por otro lado se realiza el histograma de las mismas para visualizar su distribución y así poder comprobar si presentan una distribución normal.

Histograma de las diferencias entre el recuento manual y el recuento semiautomático por superficie

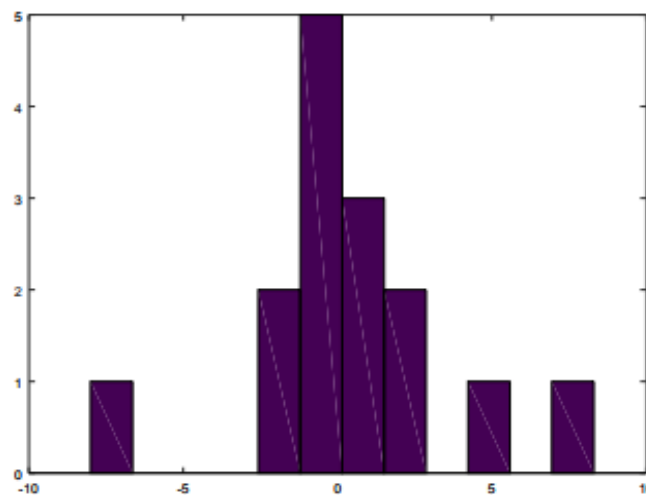


Fig. E1 Histograma: manual-superficie.

Histograma de las diferencias entre el recuento manual y el recuento semiautomático por conteo

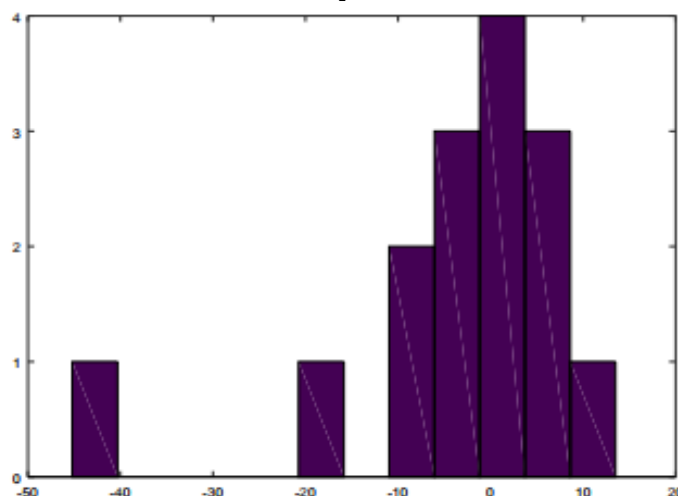


Fig. E2 Histograma: manual- conteo

En ambos histogramas se puede observar que siguen una distribución aproximadamente normal. Salvo un caso atípico en el segundo histograma, que se explicará luego, los histogramas avalan el supuesto mencionado para la realización de la prueba de t de student.

Tabla de datos

Muestra 1 (%)			
	<i>Campo 1</i>	<i>Campo 2</i>	<i>Campo 3</i>
<i>Manual</i>	33	30,6	13,5
<i>Semiautomático superficie</i>	35,2	28,1	8
<i>Semiautomático conteo</i>	19,5	28,2	20,7
Muestra 2 (%)			
	<i>Campo 1</i>	<i>Campo 2</i>	<i>Campo 3</i>
<i>Manual</i>	11	7,6	14
<i>Semiautomático superficie</i>	10,9	6,3	15,2
<i>Semiautomático conteo</i>	13,2	8,1	20,8
Muestra 3 (%)			
	<i>Campo 1</i>	<i>Campo 2</i>	<i>Campo 3</i>
<i>Manual</i>	9	10,1	2,8
<i>Semiautomático superficie</i>	9,9	18	1,5
<i>Semiautomático conteo</i>	26,8	55,2	8,8
Muestra 4 (%)			
	<i>Campo 1</i>	<i>Campo 2</i>	<i>Campo 3</i>
<i>Manual</i>	6,4	2,9	3,8
<i>Semiautomático superficie</i>	6,3	1,7	4,8
<i>Semiautomático conteo</i>	12,3	2,9	2,6
Muestra 5 (%)			
	<i>Campo 1</i>	<i>Campo 2</i>	<i>Campo 3</i>
<i>Manual</i>	45,9	27	24,2
<i>Semiautomático superficie</i>	37,6	24,2	26
<i>Semiautomático conteo</i>	37,9	22,7	19,8

Tabla E1 Porcentajes obtenidos del Ki – 67.

Tabla de cálculo

Los datos de la tabla y los cálculos posteriores, son valores porcentuales:

	<i>Manual</i>	<i>Superficial</i>	<i>Conteo</i>	<i>di superficial</i>	<i>di^2 superficial</i>	<i>di conteo</i>	<i>di^2 conteo</i>
	33,000	35,200	19,500	-2,200	4,840	13,500	182,250
	30,600	28,100	28,200	2,500	6,250	2,400	5,760
	13,500	8,000	20,700	5,500	30,250	-7,200	51,840
	11,000	10,900	13,200	0,100	0,010	-2,200	4,840
	7,600	6,300	8,100	1,300	1,690	-0,500	0,250
	14,000	15,200	20,800	-1,200	1,440	-6,800	46,240
	9,000	9,900	26,800	-0,900	0,810	-17,800	316,840
	10,100	18,000	55,200	-7,900	62,410	-45,100	2034,010
	2,800	1,500	8,800	1,300	1,690	-6,000	36,000
	6,400	6,300	12,300	0,100	0,010	-5,900	34,810
	2,900	1,700	2,900	1,200	1,440	0,000	0,000
	3,800	4,800	2,600	-1,000	1,000	1,200	1,440
	45,900	37,600	37,900	8,300	68,890	8,000	64,000
	27,000	24,200	22,700	2,800	7,840	4,300	18,490
	24,200	26,000	19,800	-1,800	3,240	4,400	19,360
<i>Promedio</i>				0,540		-3,847	
<i>Suma</i>					191,810		2816,130
<i>n</i>	15						

Tabla E2 Cálculo de parámetros para la prueba t de student.

Cálculo de parámetros para ambos métodos semiautomáticos

	<i>Superficie</i>	<i>Conteo</i>
<i>desvío (σ)</i>	3,391	13,113
<i>t</i>	0,617	-1,136
<i>a</i>	0,050	0,050
<i>t(0.025;14)</i>	2,145	2,145

Tabla E3 Parámetros obtenidos de la prueba t de student.

Anexo F: Cálculo estadístico para la demostración de la similitud en tamaño de los núcleos positivos y los negativos.

Para poder realizar el cálculo del valor porcentual del Ki-67 por superficie, se supone que las medias de los tamaños de los núcleos proliferantes y no proliferantes son iguales. Es por ello que se construyó una tabla con 30 datos tanto para los núcleos positivos como los negativos de las áreas en pixeles y luego se realiza el método de contraste de la diferencia de medias de poblaciones independientes para pequeñas muestras, varianzas distintas y mismo tamaño muestral. En la siguiente tabla se pueden observar los datos tomados:

<i>Proliferantes</i>	<i>No proliferantes</i>	$(X_1 - \bar{X}_1)^2$	$(X_2 - \bar{X}_2)^2$
181	165	1,868	0,018
189	189	87,734	569,618
168	119	135,334	2128,284
178	93	2,668	5203,218
252	119	5236,934	2128,284
235	112	3065,468	2823,151
110	121	4848,801	1947,751
123	124	3207,334	1691,951
145	213	1199,468	2291,218
206	141	695,201	582,418
207	105	748,934	3616,018
142	197	1416,268	1015,484
92	165	7679,601	0,018
154	235	657,068	4881,351
210	202	922,134	1359,151
169	140	113,068	631,684
202	159	500,268	37,618
168	157	135,334	66,151
250	135	4951,468	908,018
109	159	4989,068	37,618
85	144	8955,468	446,618
191	166	129,201	0,751
226	207	2149,868	1752,818
205	247	643,468	6702,151
196	245	267,868	6378,684
168	180	135,334	221,018
178	221	2,668	3121,084
292	217	12626,268	2690,151
122	150	3321,601	229,018
236	127	3177,201	1454,151

Promedio	179,633	165,133		
Desvío	49,828	43,516		
Suma			72002,967	54915,467
n	30			

Tabla F1 Cálculo de parámetros para la prueba.

El siguiente cuadro incluye un resumen del procedimiento elegido:

Tipo de prueba	Unilateral a la izquierda	Bilateral	Unilateral a la derecha
Hipótesis	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = D_0$ $H_1: \mu_1 - \mu_2 < D_0$	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = D_0$ $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq D_0$	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = D_0$ $H_1: \mu_1 - \mu_2 > D_0$
Estadístico de contraste	$t = \frac{(\bar{x} - \bar{y}) - D_0}{\sqrt{\frac{1}{n}((s_{n-1}^1)^2 + (s_{n-1}^2)^2)}}$		
Región de rechazo	$t < t_{\alpha;2(n-1)}$	$ t > t_{1-\alpha/2;2(n-1)}$	$t < t_{1-\alpha;2(n-1)}$
p-valor	$P[T_{\alpha;2(n-1)} < t]$	$2P[T_{\alpha;2(n-1)} > t]$	$P[T_{\alpha;2(n-1)} > t]$
Supuestos	Las dos muestras se recogen de forma independiente y aleatoria. Ambas variables siguen distribuciones aproximadamente normales. Las muestras tienen el mismo tamaño, $n_1 = n_2 = n$		

Tabla F2 Resumen de la prueba aplicada (50).

Valores obtenidos

t	1.2005086
α	0.05
h0	$\mu_1 - \mu_2 = 0$
h1	$\mu_1 - \mu_2 > 0$
t(0.95,58)	1.67

Tabla F3 Valores obtenidos.

Se concluye que la media muestral de los datos de los núcleos no proliferativos es igual al de los núcleos proliferativos en un 95 por ciento de confianza debido a que no se rechaza la hipótesis nula con este tamaño de datos. Por lo tanto es posible suponer que las áreas de ambos tipos de núcleos son iguales en un 95% de confianza ya que no hay evidencia en esta cantidad de datos que demuestren lo contrario.

Anexo G: Planos de diseño del soporte universal

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

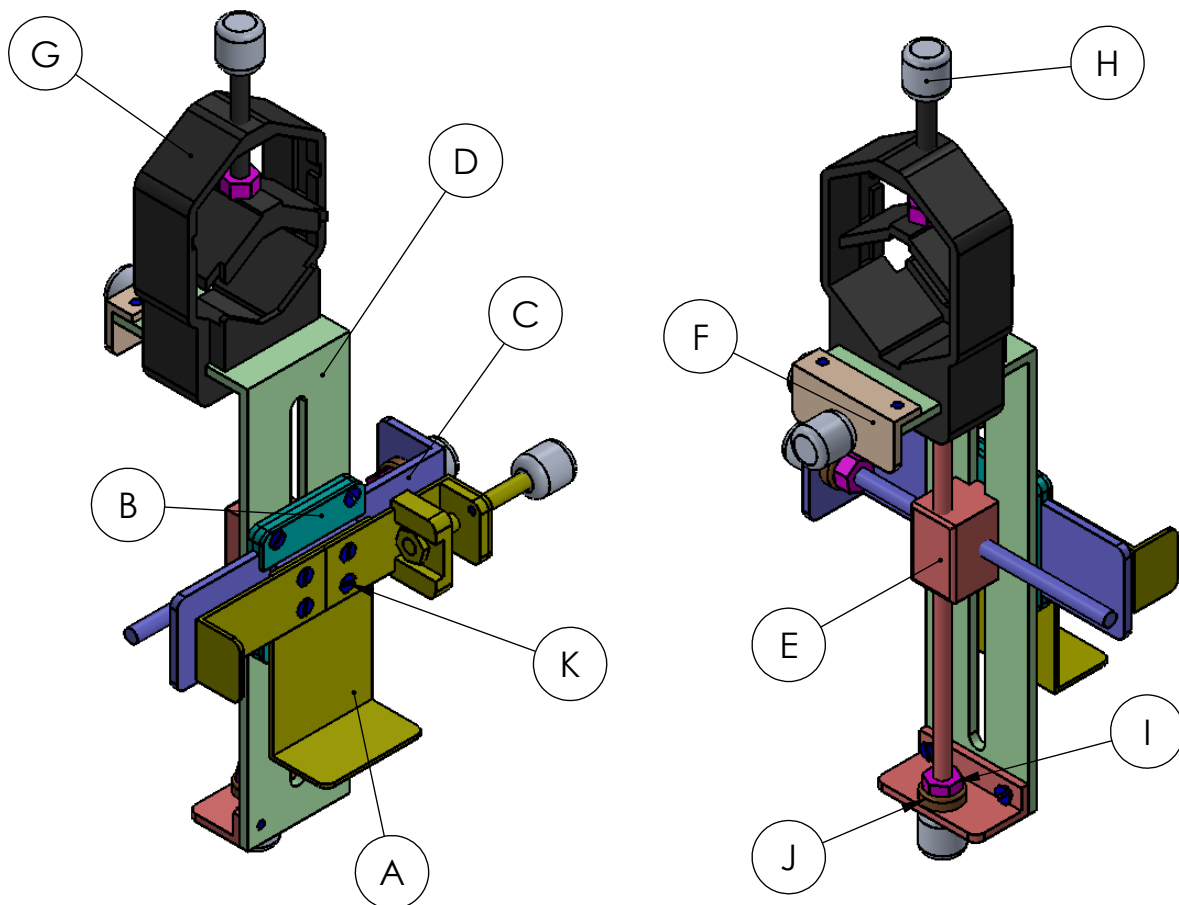
C

B

B

A

A



K	Tornillos 1/8	Hierro zincado	16	
J	Bujes	Bronce	2	
I	Tuercas 3/16	Hierro zincado	6	
H	Perillas	Aluminio	5	
G	Cabezal	PLA	1	
F	Deslizante A-P	Aluminio - Hierro zincado	1	
E	Deslizante vertical	Aluminio - Hierro zincado - Bronce	1	
D	Cuerpo principal	Aluminio	1	
C	Deslizante lateral	Aluminio - Hierro zincado- Bronce	1	
B	Guía lateral	Aluminio	1	
A	Agarradera	Aluminio	1	
	Código subconjunto/pieza	Subconjunto/pieza	Material	Cantidad



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Nombre:

Soporte universal

Título:

Plano conjunto, subconjuntos y piezas

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

1:2

Unidad

mm

Revisado:

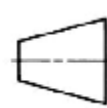
Ing. Nestor Muguero

Hoja

1 de 28

Material

-



4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

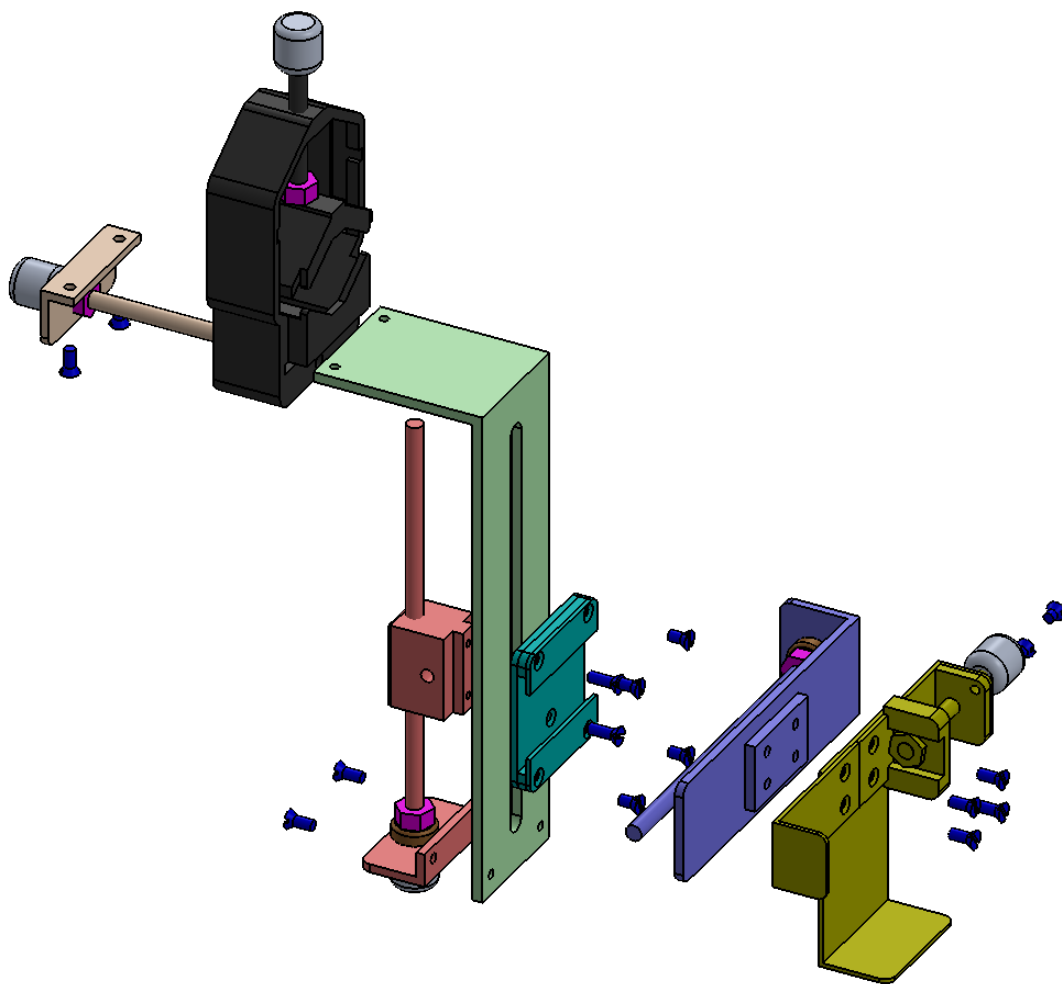
C

B

B

A

A



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Nombre:

Soporte universal

Título:

Plano conjunto explosionado

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

1:2

mm

Revisado:

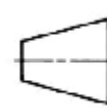
Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

2 de 28

-



4

3

2

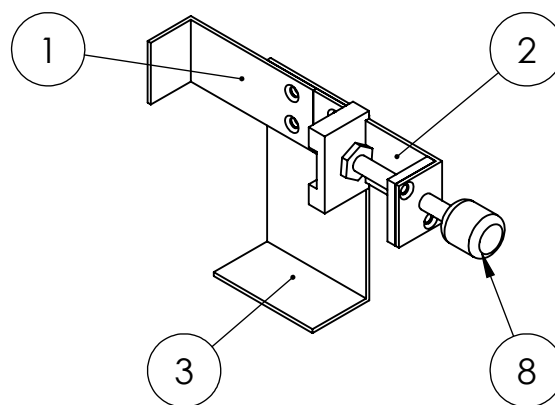
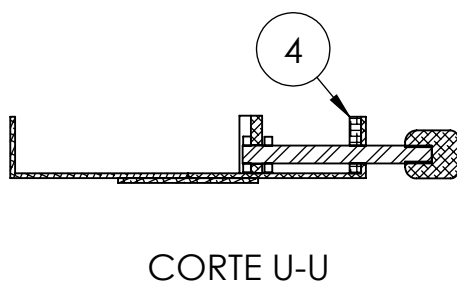
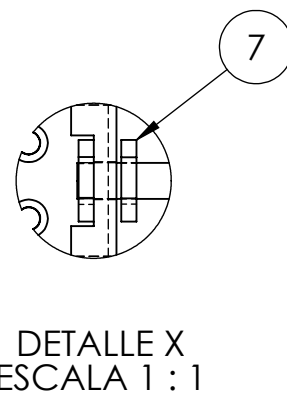
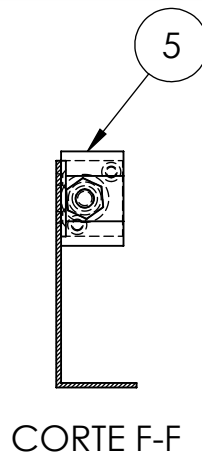
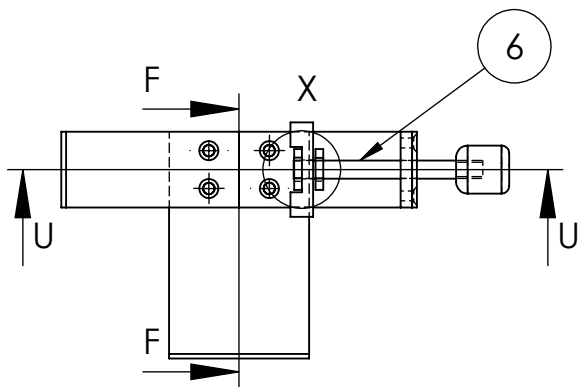
1

4

3

2

1



Tuerca 3/16 comercial rebajada en su espesor a 2mm.

8	Perilla	1
7	Tuerca 3/16	2
6	Varilla roscada 3/16-AG	1
5	Mordaza móvil-A5	1
4	Pieza roscada-A4	1
3	Pieza L-A3	1
2	Pieza L-A2	1
1	Pieza L-A1	1
N° elemento	Descripción elemento	Cantidad



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Nombre:

Agarradera de smartphone

-

Subconjunto A

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

1:2

Unidad

mm

Revisado:

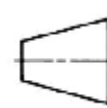
Ing. Nestor Muguero

Hoja

3 de 28

Material

Aluminio



4

3

2

1

F

E

D

C

B

A

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

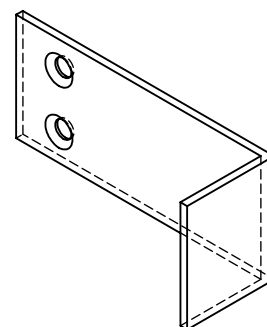
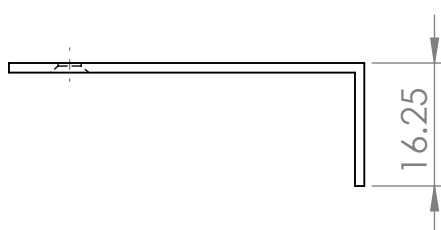
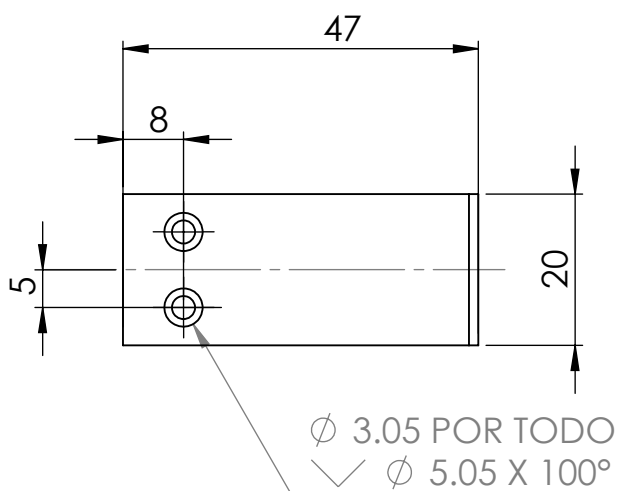
C

B

B

A

A



Planchuela de espesor constante de 1.25 mm



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
 Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Pieza L-A1

-

Subconjunto A

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
 Farías Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

1:1

mm

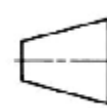
Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

4 de 28

Aluminio



4

3

2

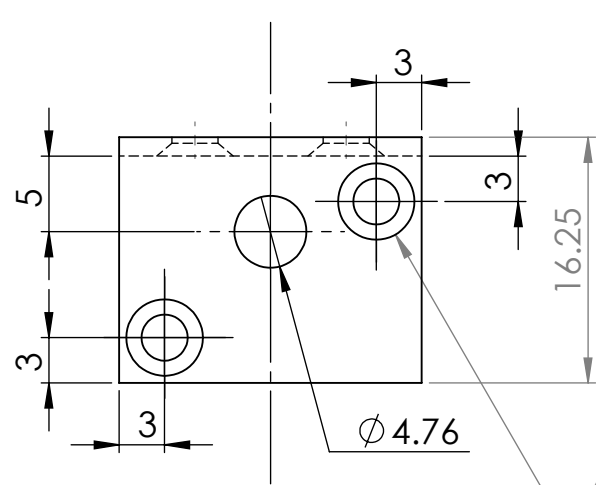
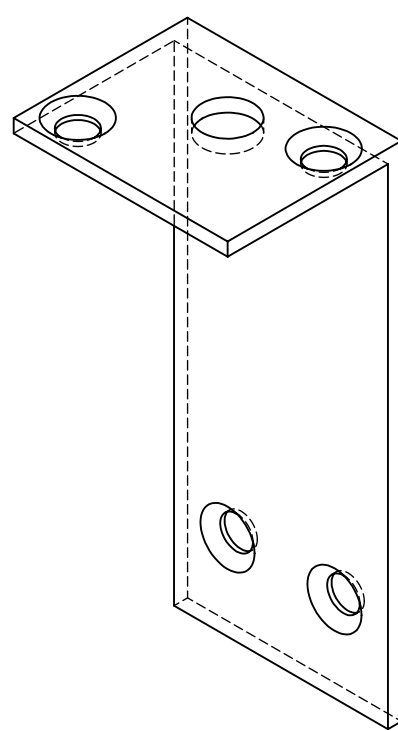
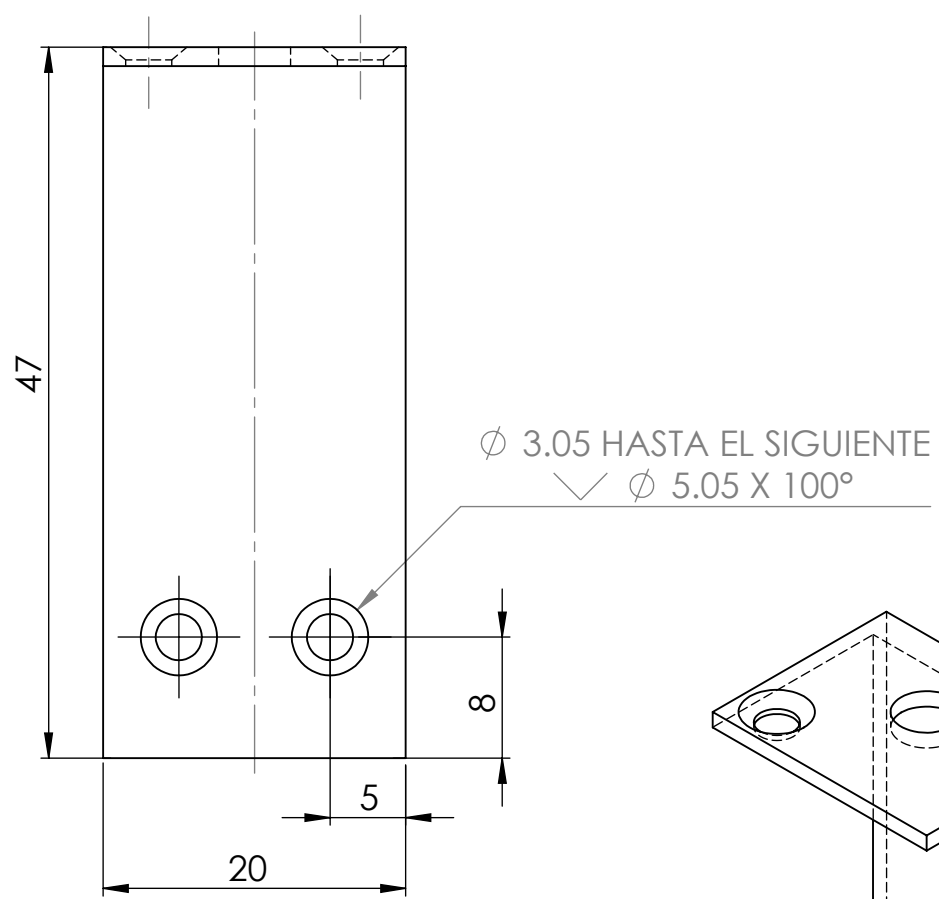
1

4

3

2

1



Planchuela de espesor constante de 1.25mm



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
 Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:		Pieza L-A2		
-		Subconjunto A		
Diseñado:	Acuña, Lucas Nahuel Fariás Falkiewicz, Matías M.	Escala	Unidad	
		2:1	mm	
Revisado:	Ing. Nestor Muguiri	Hoja	Material	
		5 de 28	Aluminio	

4

3

2

1

F
E
D
C
B
AF
E
D
C
B
A

4

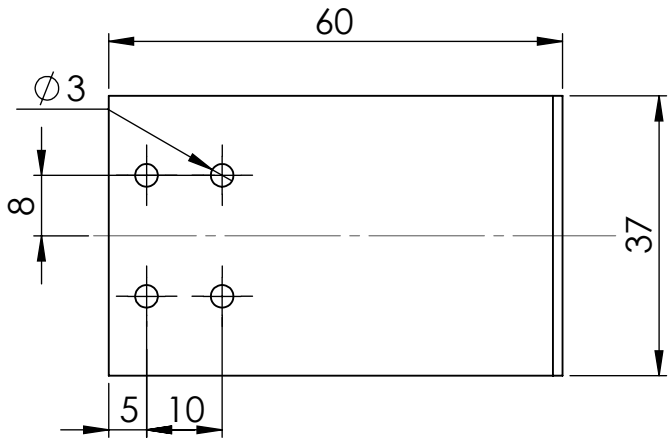
3

2

1

F

F

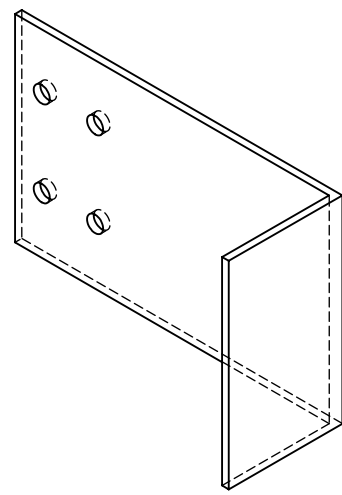


E

E

D

D



C

C

B

B

Planchuela de espesor constante de 1.25 mm.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:		Pieza L-A3		
-		Subconjunto A		
Diseñado:	Acuña, Lucas Nahuel Farías Falkiewicz, Matías M.	Escala	Unidad	
		1:1	mm	
Revisado:	Ing. Nestor Muguero	Hoja	Material	
		6 de 28	Aluminio	

A

A

4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

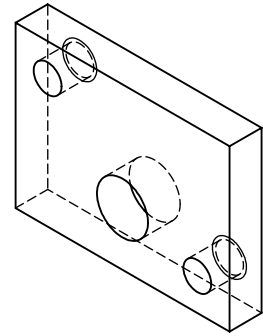
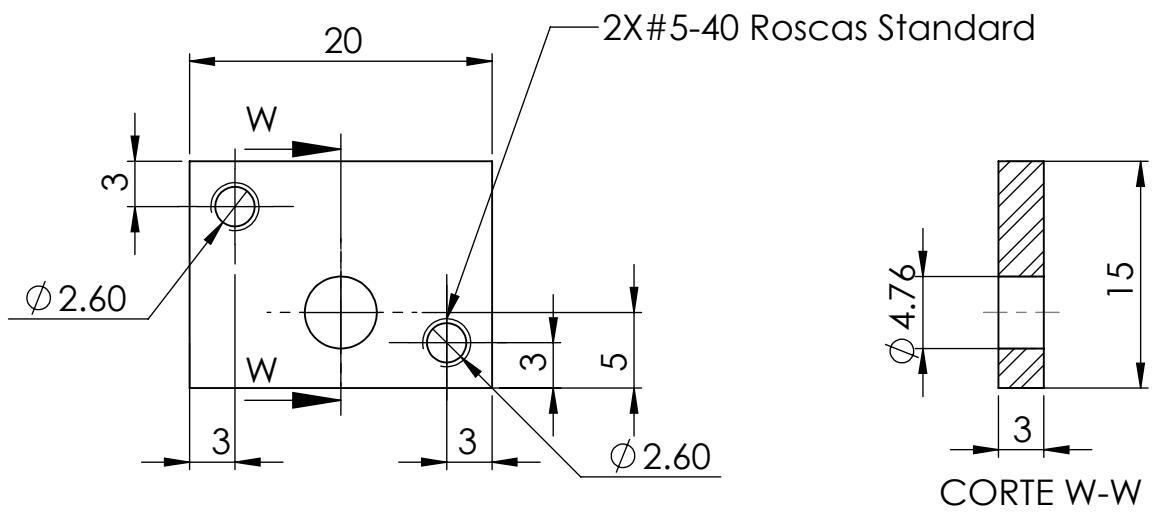
C

B

B

A

A



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de las piezas:

Pieza roscada-A4

-

Subconjunto A

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Farías Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

2:1

mm

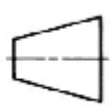
Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

7 de 28

Aluminio



4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

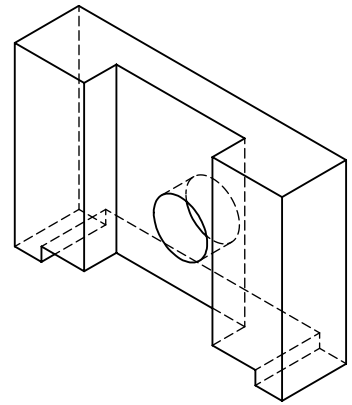
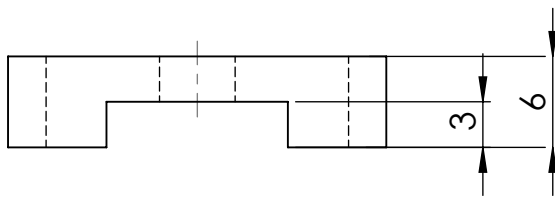
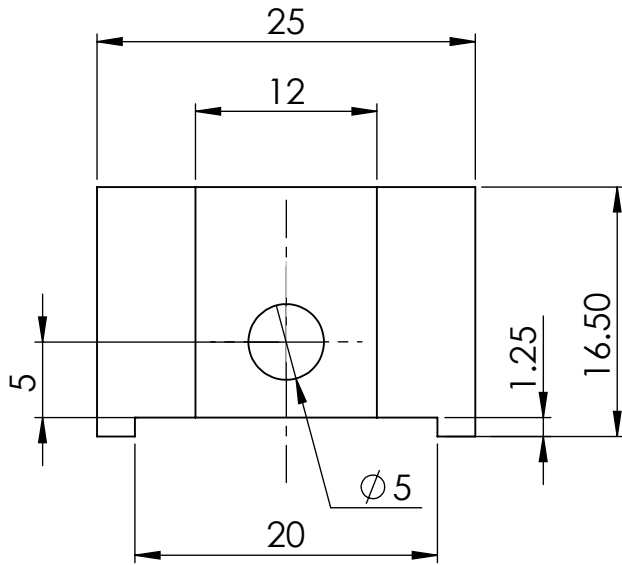
C

B

B

A

A



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Mordaza móvil-A5

-

Subconjunto A

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Farías Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

2:1

mm

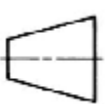
Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

8 de 28

Aluminio



4

3

2

1

4

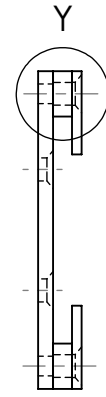
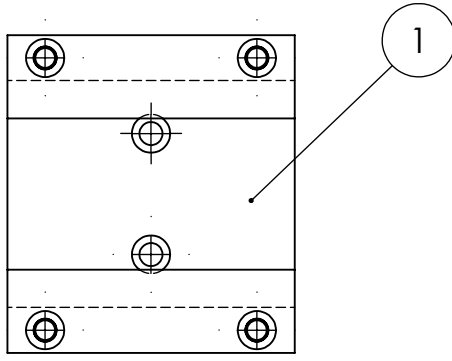
3

2

1

F

F

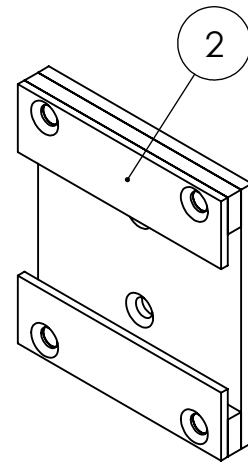
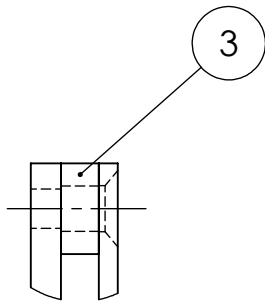


E

E

D

D



DETALLE Y
ESCALA 2 : 1

C

C

Dos tornillos 1/8 de 9mm y cuatro de 5.75mm de longitud

4	Tornillos 1/8	6
3	Pieza-B3	2
2	Pieza-B2	2
1	Base-B1	1
N° elemento	Descripción elemento	Cantidad

B

B



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Nombre:

Guía lateral

-

Subconjunto B

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

1:1

mm

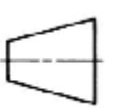
Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

9 de 28

Aluminio



A

A

4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

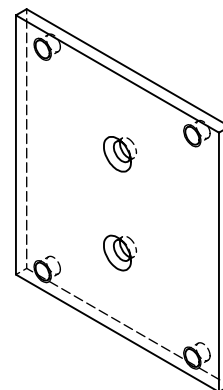
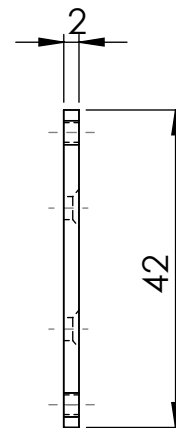
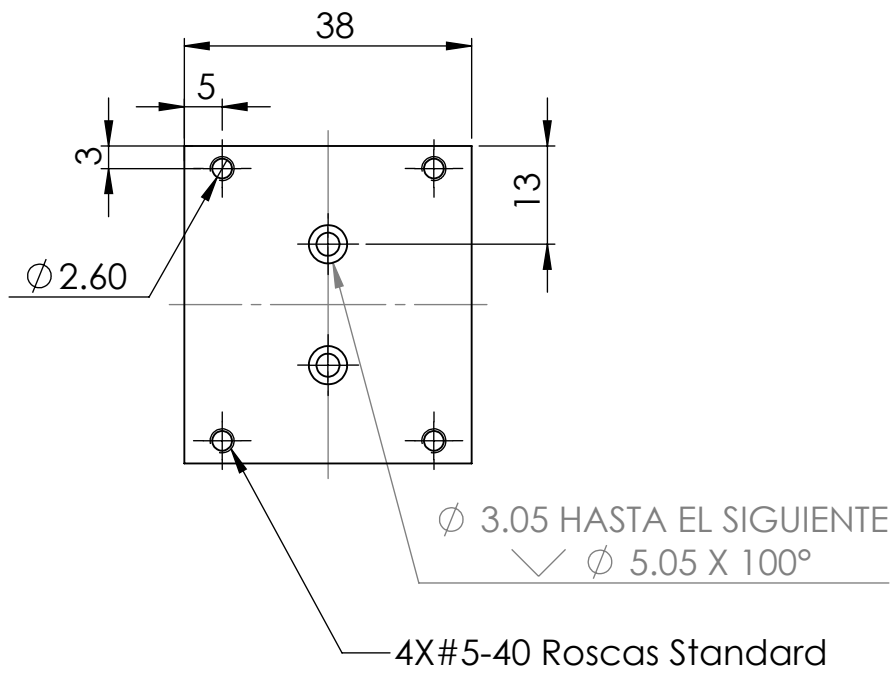
C

B

B

A

A



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Base-B1

-

Subconjunto B

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

1:1

Unidad

mm

Revisado:

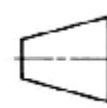
Ing. Nestor Muguero

Hoja

10 de 28

Material

Aluminio



4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

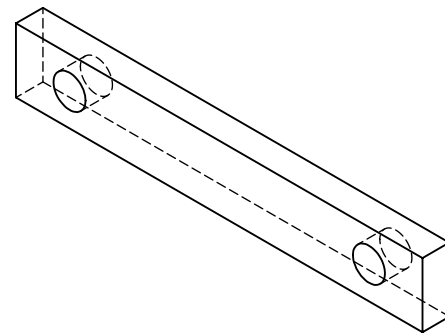
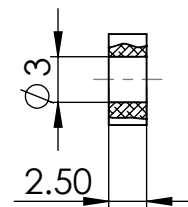
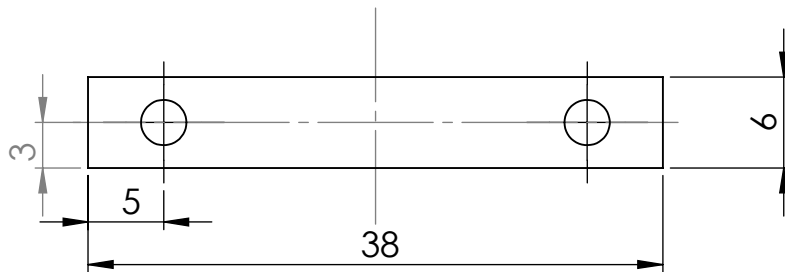
C

B

B

A

A



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Pieza-B3

-

Subconjunto B

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Farías Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

2:1

mm

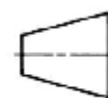
Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

11 de 28

Aluminio



4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

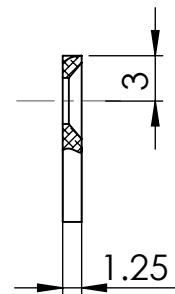
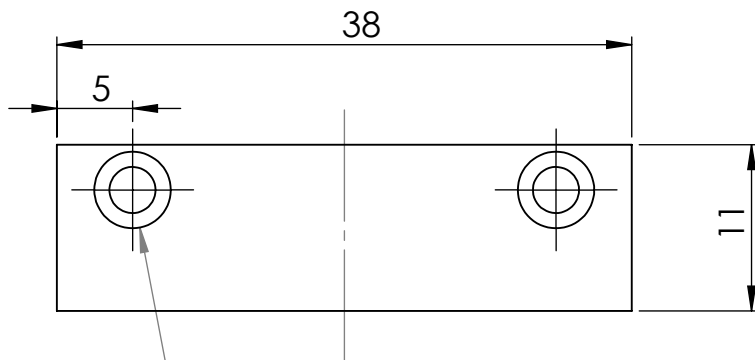
C

B

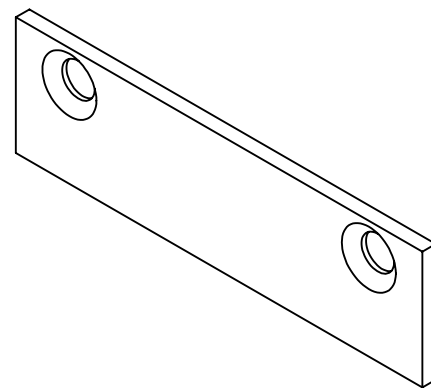
B

A

A



ϕ 3.05 POR TODO
 \sphericalangle ϕ 5.05 X 100°



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
 Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Pieza-B2

-

Subconjunto B

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
 Farías Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

2:1

mm

Revisado:

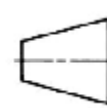
Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

12 de 28

Aluminio



4

3

2

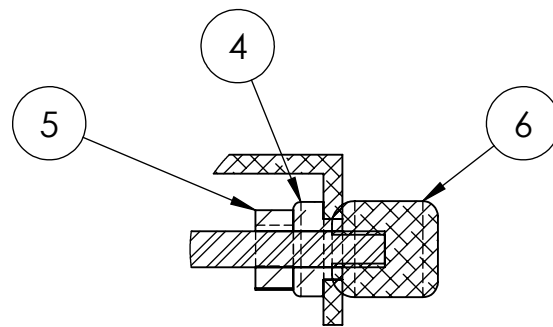
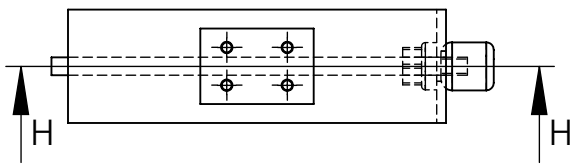
1

4

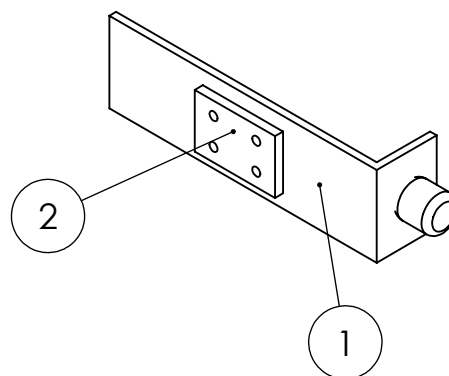
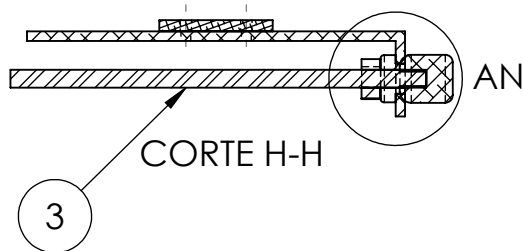
3

2

1



DETALLE AN
ESCALA 1 : 1



Tornillos 1/8 de longitud 7.33mm

7	Tornillos 1/8	4
6	Perilla	1
5	Tuerca 3/16	1
4	Buje	1
3	Varilla roscada-C3	1
2	Pieza-C2	1
1	Pieza L-C1	1
Nº elemntos	Descripción elementos	Cantidad



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Nombre:

Deslizante lateral

-

Subconjunto C

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

1:2

mm

Revisado:

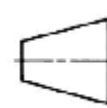
Ing. Néstor Muguero

Hoja

Material

13 de 28

-



4

3

2

1

F

E

D

C

B

A

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

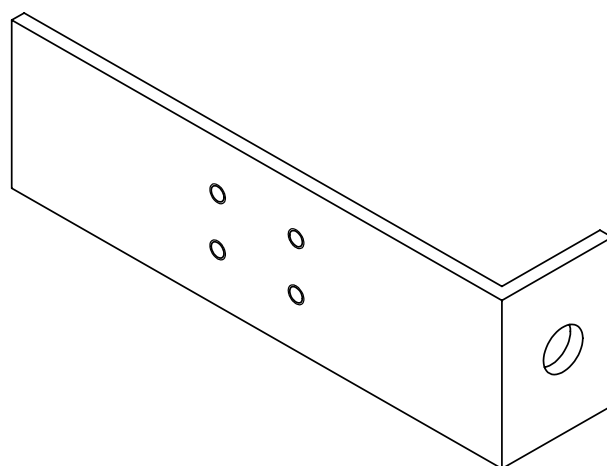
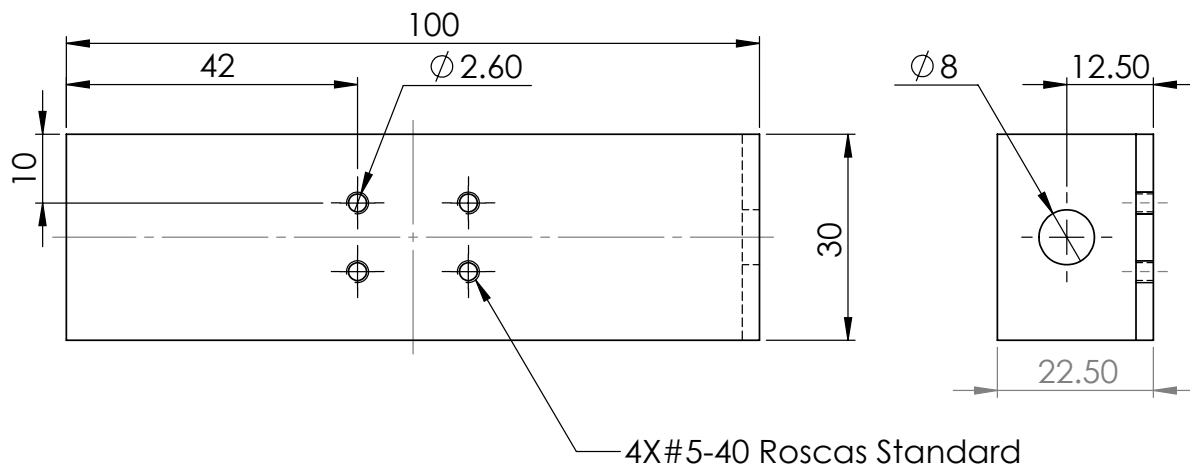
C

B

B

A

A



Planchuela de espesor constante de 2.50 mm



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Pieza L-C1

-

Subconjunto C

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Farías Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

1:1

mm

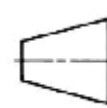
Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

14 de 28

Aluminio



4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

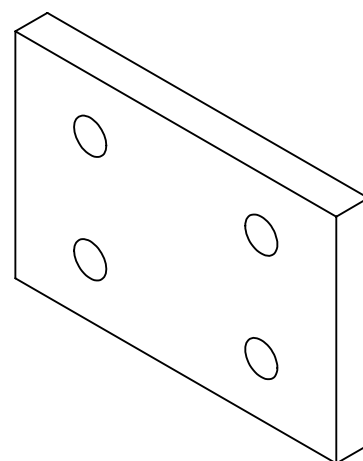
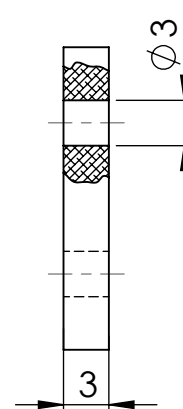
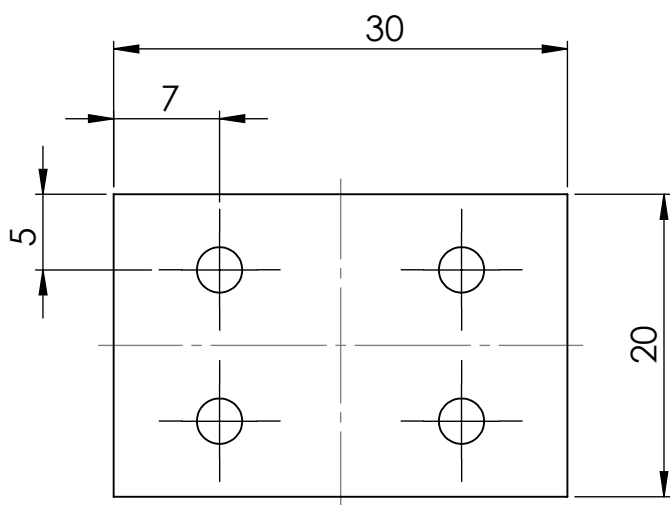
C

B

B

A

A



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Pieza-C2

-

Subconjunto C

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Farías Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

2:1

mm

Revisado:

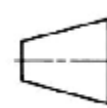
Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

15 de 28

Aluminio



4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

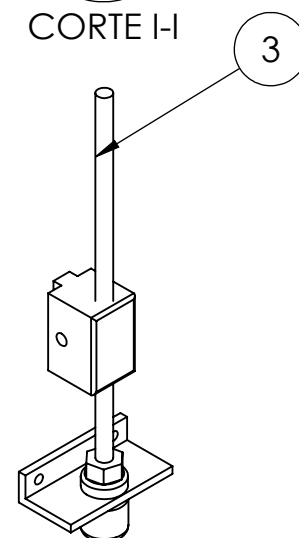
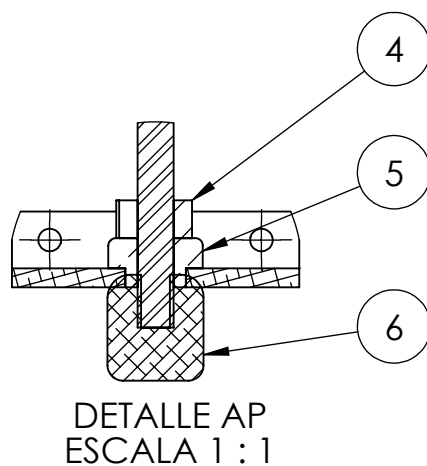
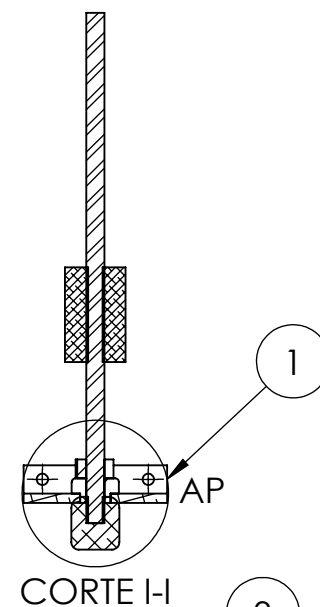
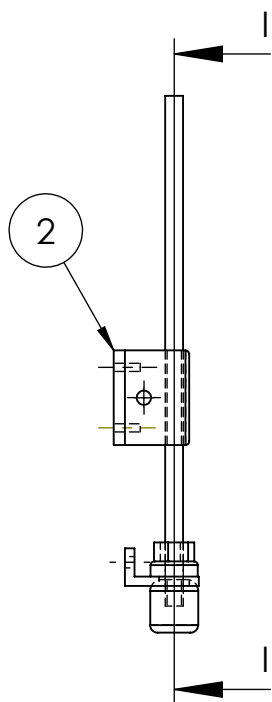
C

B

B

A

A



Dos tornillos de 1/8 de 7.33mm y dos de 9mm de longitud.

7	Tornillos 1/8	4
6	Perilla	1
5	Buje	1
4	Tuerca 3/16	1
3	Varilla roscada 3/16-E3	1
2	Macizo roscado-E2	1
1	Pieza L-E1	1
N° elementos	Descripción elemento	Cantidad



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Nombre:

Deslizante vertical

-

Subconjunto E

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

1:2

mm

Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

16 de 28

-



4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

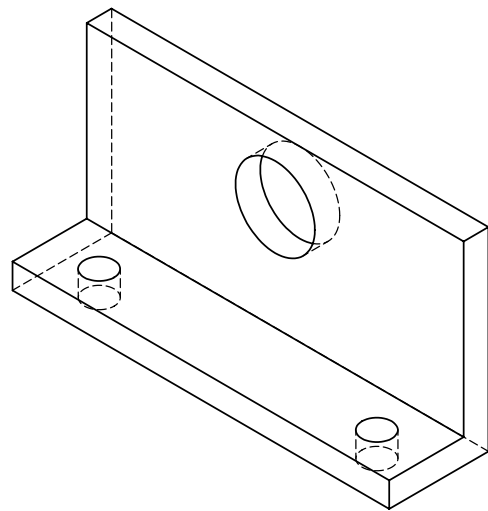
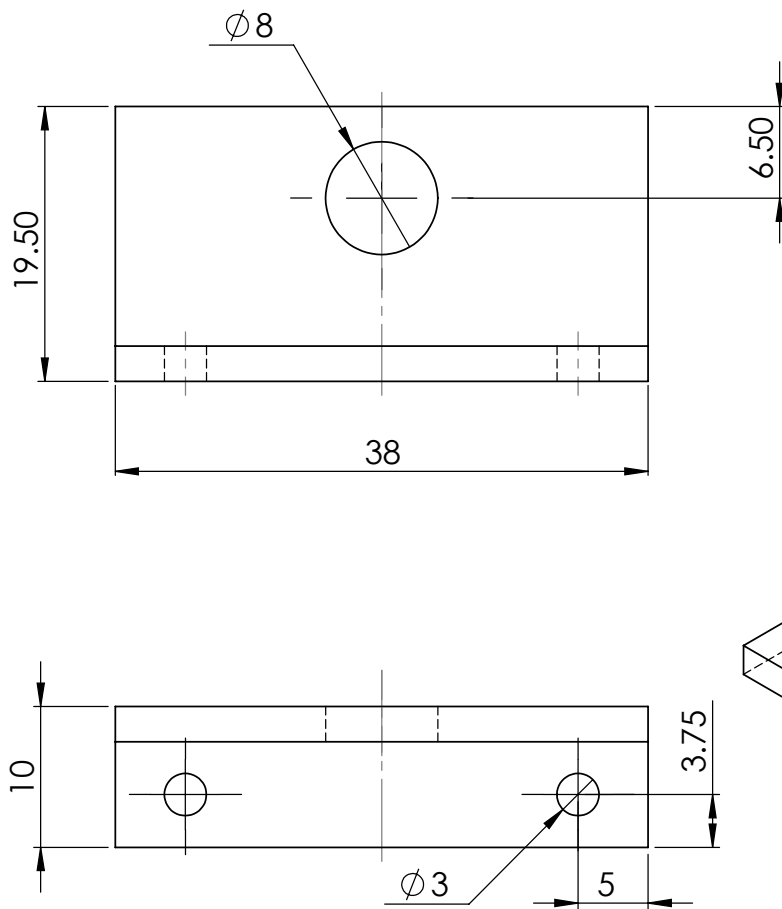
C

B

B

A

A



Planchuela de espesor constante de 2.50 mm



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Pieza L-E1

-

Subconjunto E

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

2:1

Unidad

mm

Revisado:

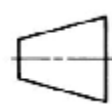
Ing. Nestor Muguero

Hoja

17 de 28

Material

Aluminio



4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

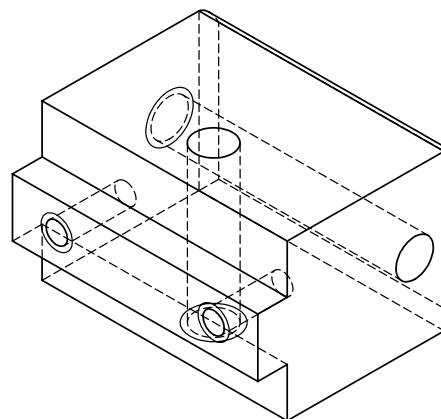
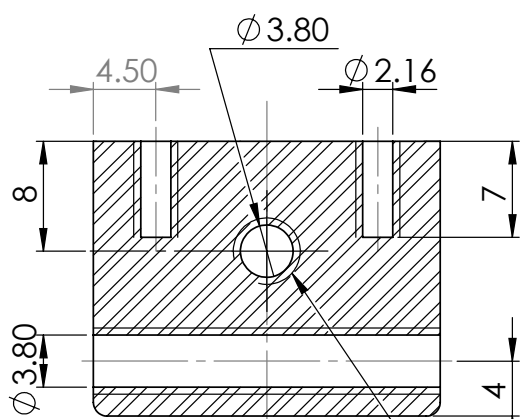
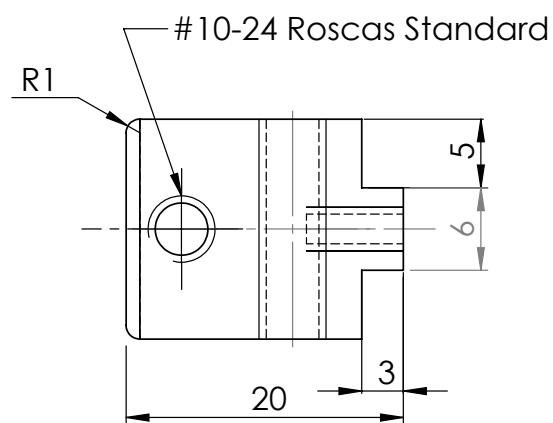
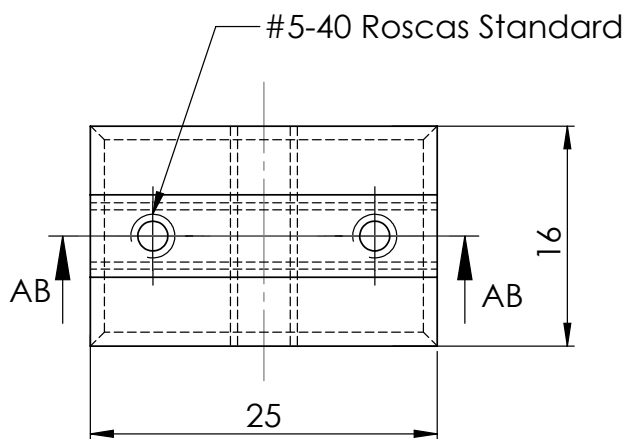
C

B

B

A

A



CORTE AB-AB

#10-24 Roscas Standard



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Macizo roscado-E2

-

Subconjunto E

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

2:1

mm

Revisado:

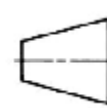
Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

18 de 28

Aluminio



4

3

2

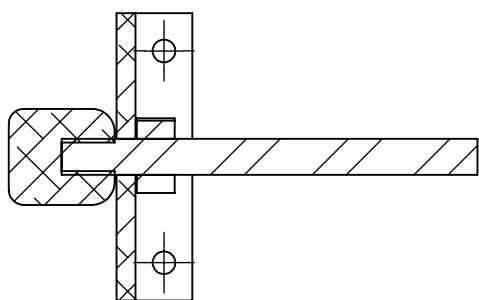
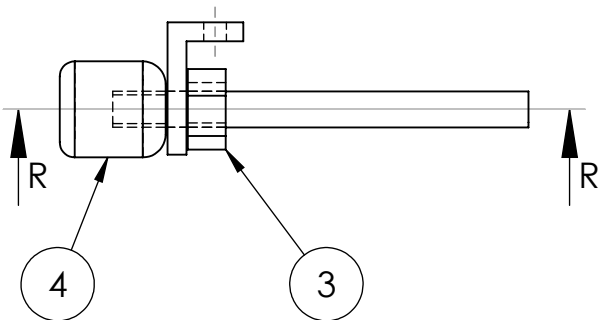
1

4

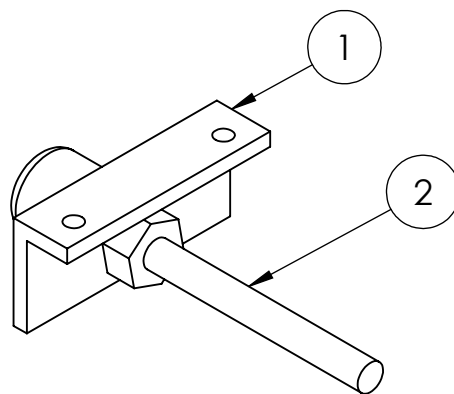
3

2

1



CORTE R-R



Tornillos de 1/8 de 7.33mm de longitud.

5	Tornillos 1/8	2
4	Perilla	1
3	Tuerca 3/16	1
2	Varilla roscada 3/16-F2	1
1	Pieza L-F1	1
N° elementos	Descripción elementos	Cantidad



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Nombre:

Deslizante antero-posterior

-

Subconjunto F

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

1:1

Unidad

mm

Revisado:

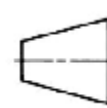
Ing. Nestor Muguero

Hoja

19 de 28

Material

-



4

3

2

1

F

E

D

C

B

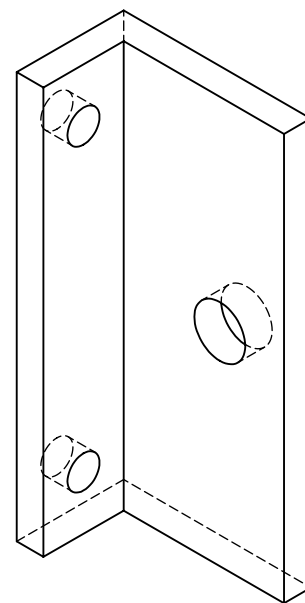
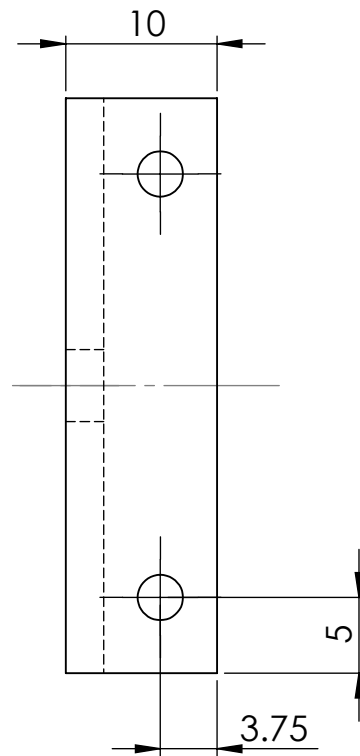
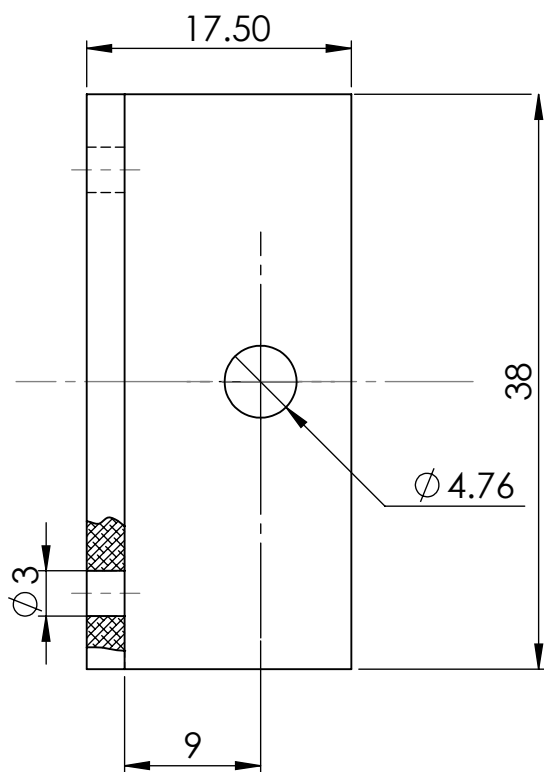
A

4

3

2

1



Planchuela de espesor constante de 2.50 mm



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Pieza L-F1

-

Subconjunto F

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Farías Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

2:1

mm

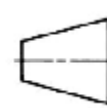
Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

20 de 28

Aluminio



4

3

2

1

F

E

D

C

B

A

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

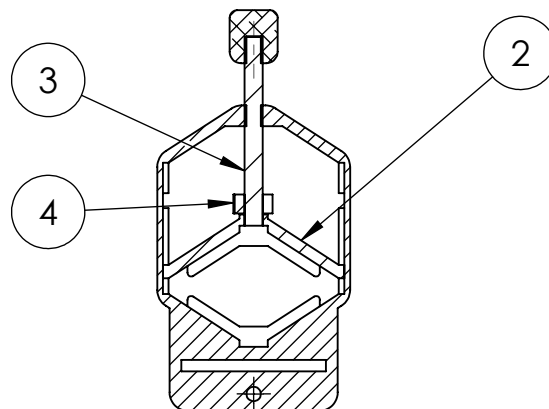
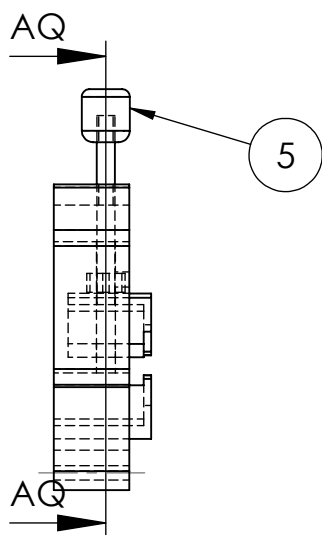
C

B

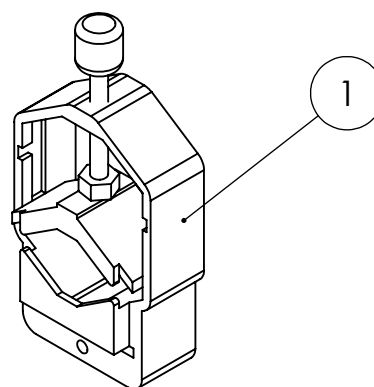
B

A

A



CORTE AQ-AQ



5	Perilla	1
4	Tuerca 3/16	1
3	Varilla roscada 3/16-AG	1
2	Mordaza en V-G2	1
1	Cuerpo-G1	1
N° de elementos	Elementos	Cantidad



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Nombre:

Cabezal

-

Subconjunto G

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Farías Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

1:2

mm

Revisado:

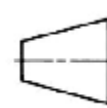
Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

21 de 28

-



4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

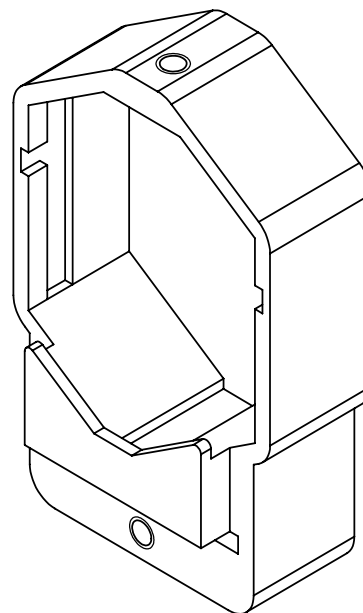
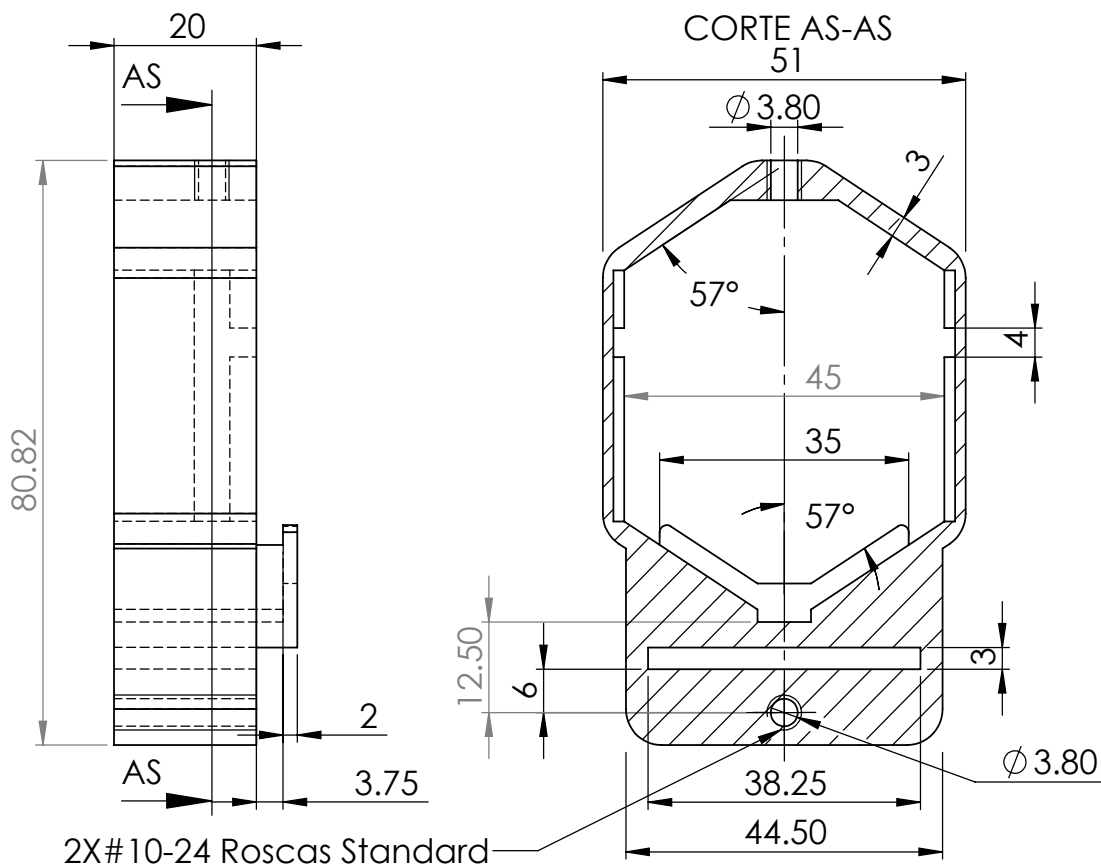
C

B

B

A

A



Esta pieza es fabricada por una impresora 3D



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Cuerpo-G1

-

Subconjunto G

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Farías Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

1:1

mm

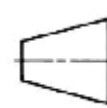
Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

22 de 28

PLA



4

3

2

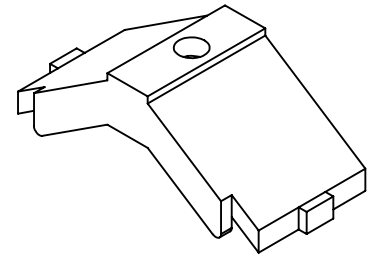
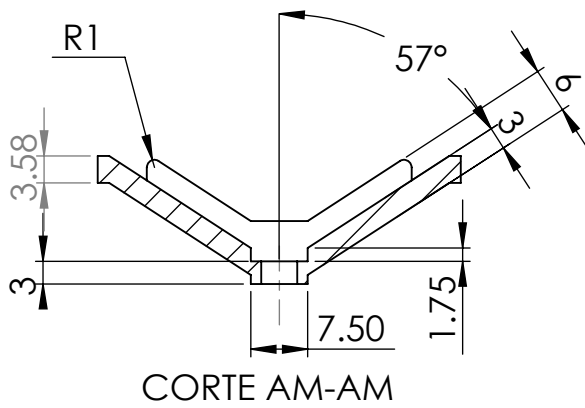
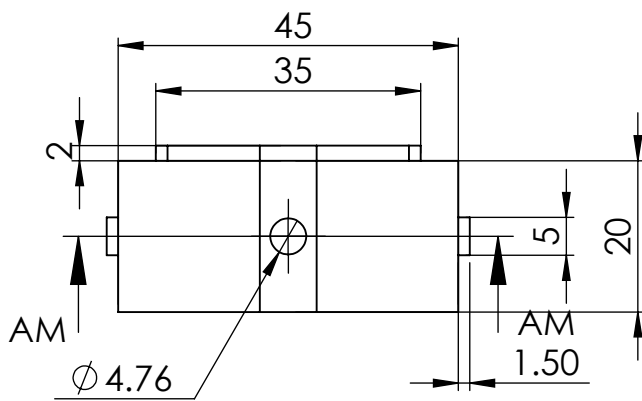
1

4

3

2

1



Esta pieza es fabricada por una impresora 3D



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Mordaza en V-62

-

Subconjunto G

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

1:1

mm

Revisado:

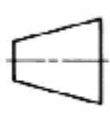
Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

23 de 28

PLA



4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

C

B

B

A

A

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

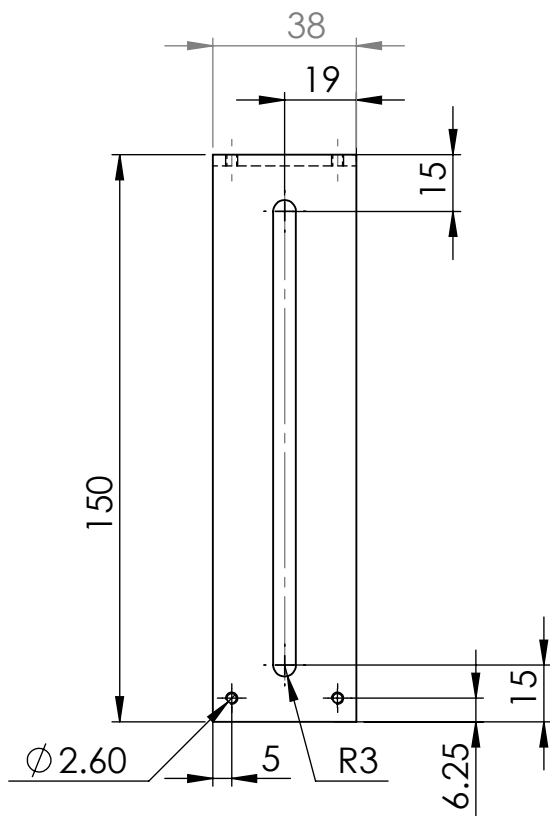
C

B

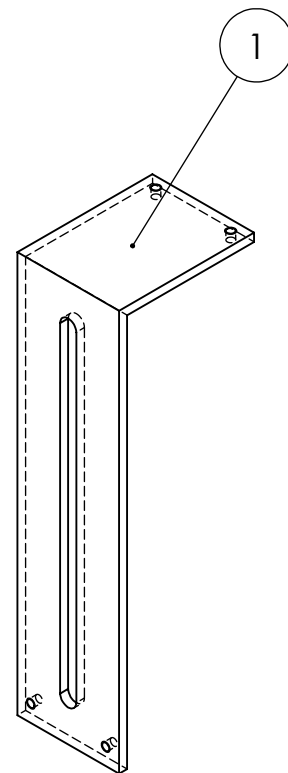
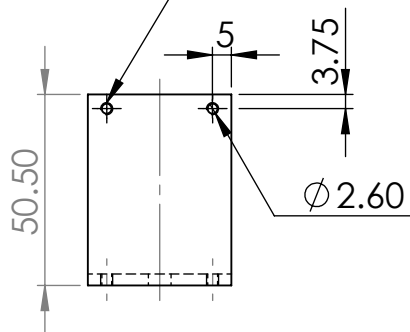
B

A

A



4X#5-40 Roscas Standard



Planchuela de espesor constante de 3mm.
Tornillos 1/8 de 7.33mm de longitud.

2	Tornillos 1/8	4
1	Cuerpo principal	1
N° elemento	Descripción elemento	Cantidad



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Cuerpo principal

-

Pieza D

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

1:2

mm

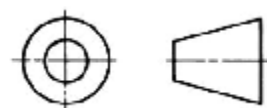
Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

24 de 28

Aluminio



4

3

2

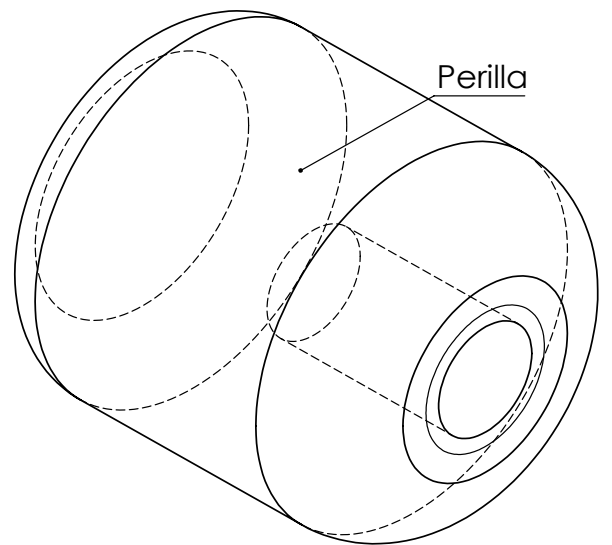
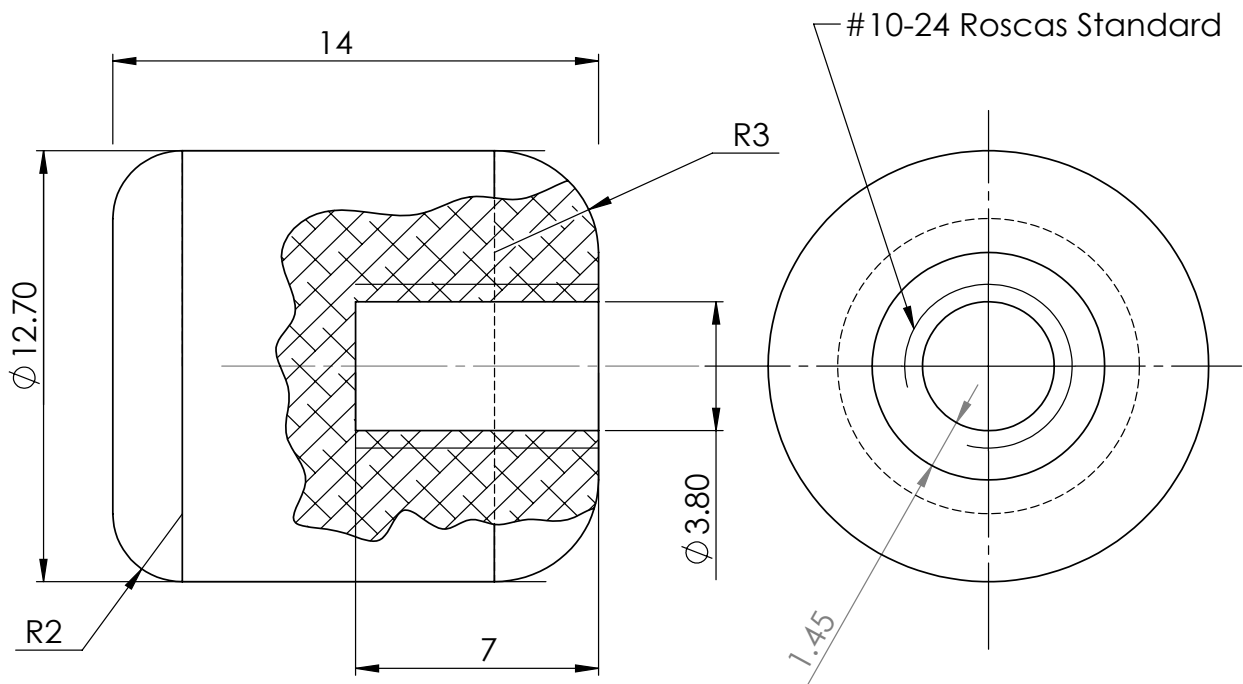
1

4

3

2

1



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de las piezas:

Perillas

-

Pieza H

Diseñado:

Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

5:1

Unidad

mm

Revisado:

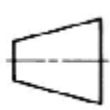
Ing. Nestor Muguiro

Hoja

25 de 28

Material

Aluminio



4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

C

B

B

A

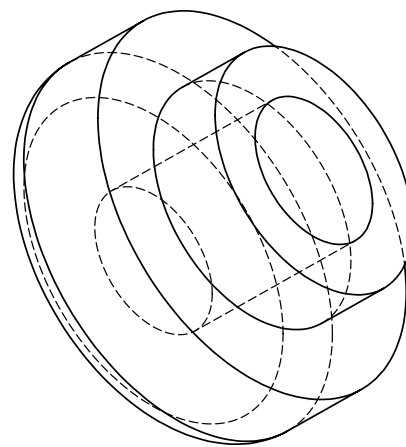
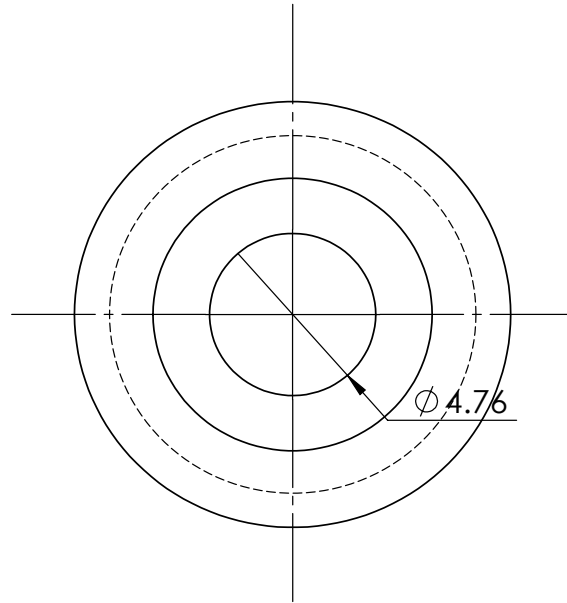
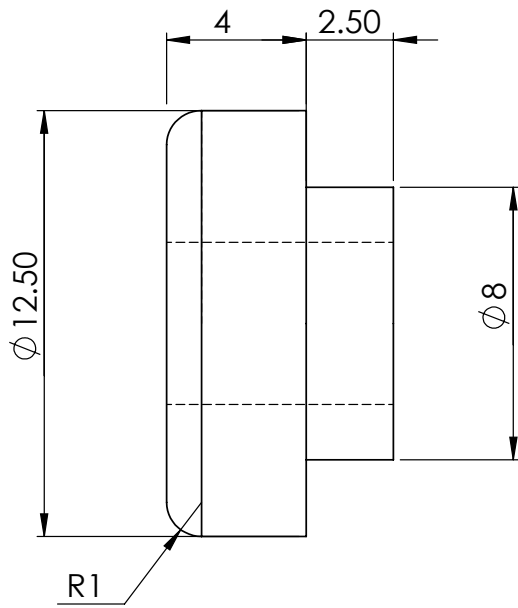
A

4

3

2

1



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Código de la pieza:

Bujes

-

Pieza J

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

5:1

mm

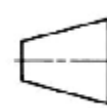
Revisado: Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

26 de 28

Bronce



4

3

2

1

F

E

D

C

B

A

F

E

D

C

B

A

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

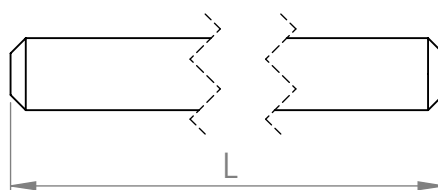
C

B

B

A

A



Varilla roscada comercial de diámetro 4.76mm.
Realizar chaflán en extremos 45°x1

Varilla roscada 3/16 - C3	Subconjunto C	1	110
Varilla roscada 3/16 - E3	Subconjunto E	1	135
Varilla roscada 3/16 - F2	Subconjunto F	1	55
Varilla roscada 3/16 - AG	Subconjuntos A y G	2	50
Denominación	Ubicación	Cantidad	L



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Piezas:

Varillas roscadas varias

-

-

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

-

mm

Revisado:

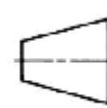
Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

27 de 28

Hierro zincado



4

3

2

1

4

3

2

1

F

F

E

E

D

D

C

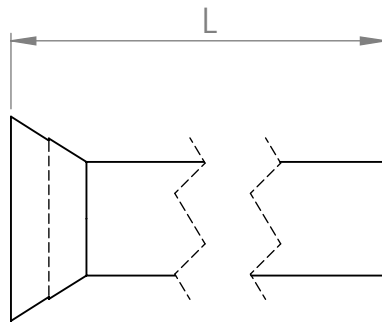
C

B

B

A

A



Tornillo D	A	2	4.25 mm
Tornillo C	B y E	2	9.00 mm
Tornillo B	B	4	5.75 mm
Tornillo A	A, C, F, D y E	8	7.33 mm
Denominación	Ubicación	Cantidad	L



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Título:

Tornillos 1/8 comerciales

-

-

Diseñado: Acuña, Lucas Nahuel
Fariás Falkiewicz, Matías M.

Escala

Unidad

-

mm

Revisado:

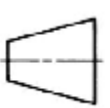
Ing. Nestor Muguero

Hoja

Material

28 de 28

Hierro zincado



4

3

2

1

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Brüel A, Christensen E, Tranum-Jensen J, Qvortrup KGF. Geneser Histología. Cuarta ed. España: Panamericana; 2012.
2. Montalvo Arenas C. Técnica Histológica: UNAM; 2010.
3. Kujman S. Servicio de Anatomía Patológica Veterinaria. [Online].; 2012 [cited 2017 11 12]. Available from: <http://histopat.blogspot.com.ar/2012/08/biopsia-incisional.html>.
4. Mayo Clinic. [Online].; 2017 [cited 2017 11 12]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/skin-biopsy/multimedia/punch-biopsy/img-20005764>.
5. American Cancer Society. [Online].; 2017 [cited 2017 11 12]. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-y-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno/biopsia-del-seno/biopsia-del-seno-por-puncion-con-aguja-gruesa.html>.
6. André D. [Online].; 2012 [cited 2017 11 12]. Available from: <http://dayaandre.blogspot.com.ar/2012/06/v-behaviorurldefaultvml.o.html>.
7. Clínica de Endoscopia. [Online].; 2017 [cited 2017 11 12]. Available from: <http://www.endoscopiasmonterrey.com/biopsia-por-endoscopia.html>.
8. Lupetec. [Online].; 2017 [cited 2017 11 12]. Available from: <https://lupetec.com.br/es/productos/lupetec/microtomo-mrp09-lupetec>.
9. SlideShare. [Online]. Available from: <https://es.slideshare.net/pameland/pasos-de-la-tecnica-histologica-bsica>.
10. Prof. Francisco O'Valle Ravassa , Dr. David Martín Oliva , Dra Virginia Chamorro , Dra. Mercedes Gómez Morales , Dra. María del Carmen Benítez García , Prof. Felix Vargas Palomares , Dr. Francisco Javier Oliver Pozo y Prof. Raimundo García del Moral Garri. VI Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. [Online].; 2004 [cited 2017 11 12]. Available from: <https://conganat.uninet.edu/6CVHAP/autores/trabajos/T208/index.html>.
11. Universidad Autónoma de Madrid. [Online]. [cited 2017 11 12]. Available from: https://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/Practica_5.htm.
12. Manuel Megías Pacheco, Pilar Molist García, Manuel Angel Pombal Diego. Atlas de histología animal y vegetal. [Online]. [cited 2017 11 12]. Available from: <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php>.
13. Centro de Diagnóstico Biomédico. Clinic Barcelona Hospital Universitari. [Online].; 2017. Available from: <http://cdb.hospitalclinic.org/laboratorios/anatomia-patologica/tecnicas/inmunohistoquimica-tecnica/>.
14. Colectivo Gist. [Online].; 2017 [cited 2017 11 12]. Available from: <https://colectivogist.wordpress.com/2013/04/16/que-significa-en-un-informe-patologico-el-indice-ki-67/>.
15. Enfermera.io. [Online].; 2017 [cited 2017 Diciembre]. Available from: <https://enfermera.io/ki-67/>.
16. Leica BioSystems. [Online].; 2017 [cited 2017 11 12]. Available from: <https://www.leicabiosystems.com/es/ihc-ish/reactivos-novocastra/anticuerpos-primarios/detalles/product/ki67/>.
17. Food for Breast Cancer. [Online].; 2018 [cited 2018 02 27]. Available from: <http://foodforbreastcancer.com/articles/tumor-proliferation%2C-as-measured-by-ki-67%2C-predicts-breast-cancer-outcomes>.
18. Bautista L. Físicanet. [Online].; 2017 [cited 2017 12 17]. Available from: https://www.fisicanet.com.ar/fisica/ondas/ap08_luz.php.

19. Info - Radiofrecuencia. [Online].; 2017 [cited 2017 12 17. Available from: <http://info-radiofrecuencia.es/propiedades-de-la-radiofrecuencia/>.
20. FísicaLab. [Online].; 2017 [cited 2017 12 17. Available from: <https://www.fisicalab.com/>.
21. M Olmo RN. Hyperphysics. [Online].; 2016 [cited 2017 12 17. Available from: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/index.html>.
22. G.I.S Ibérica. [Online].; 2014 [cited 2017 12 17. Available from: <http://www.gisiberica.com/LUPAS/lentes.htm>.
23. DEMO E-DUCATIVA CATEDU. [Online].; 2016 [cited 2017 12 17. Available from: http://e-ducativa.catedu.es/44700165/aula/archivos/repositorio/3000/3237/html/41_cculos_en_lentes_delgadas.html.
24. Lanza S. [Online].; 2009 [cited 2017 12 17. Available from: <http://www.educa.madrid.org/web/ies.silveriolanza.getafe/Ens/DptoFisicaQuimica/Bachillerato/Optica11May09.pdf>.
25. Armas DJN. LA MICROSCOPIA: HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR CÉLULAS Y TEJIDOS. [Online].; 2007 [cited 2017. Available from: <http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/inicio.htm>.
26. Carreño F. Grupo de enseñanza de la óptica. [Online].; 2011. Available from: http://webs.ucm.es/info/opticaf/OPT_FIS/index.php.
27. Olympus. [Online].; 2017 [cited 2017 12 19. Available from: <https://www.olympus-ims.com/es/microscope/terms/feature15/>.
28. Pidiscat. [Online].; 2017 [cited 2017 12 19. Available from: <http://www.pidiscat.cat/es/oculares-microscopio/9767-ocular-microscopio-microblue-mb-60-m-gran-campo-micrometro-wf10x-18.html>.
29. Bastidas O. Conteo celular con hematocitómetro: Compañía Celeromics.
30. AliExpress. [Online].; 2017 [cited 2017 12 19. Available from: <https://nl.aliexpress.com/item/0-05MM-Glass-Slide-Scale-Measuring-Microscope-Micrometer-Calibration-for-Microscope-Stage-Eyepiece-Objective-Lens/32815167383.html>.
31. ThorLabs. [Online].; 2005 [cited 2017 12 19. Available from: <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=D25SZ>.
32. Edmund Optics. [Online].; 2017 [cited 2017 12 19. Available from: <https://www.edmundoptics.com/resources/application-notes/microscopy/optical-microscopy-application-differential-interference-contrast/>.
33. Payer E. Procesamiento de Señales Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Cordoba, Cordoba; 2013.
34. Gonzalez R, Woods R. Digital Image Processing. Tercera ed.: Pearson Prentice Hall; 2008.
35. Mejía Vilet J. Procesamiento Digital de Imágenes Facultad de ingeniería, Universidad Autónoma de San Luís de Potosí; 2005.
36. Codepath. [Online]. Available from: <https://guides.codepath.com/android/>.
37. Roncagliolo P. Procesamiento Digital de Imágenes. ; 2007.
38. Nameirakpam Dhanachandra KMaYJC. Image Segmentation Using K-means Clustering Algorithm and Subtractive Clustering Algorithm. 2015.
39. MathWorks. [Online].; 2017 [cited 2017 12 21. Available from: <https://la.mathworks.com/help/stats/kmeans.html?requestedDomain=true>.
40. Gironés J. El gran libro de Android. Quinta ed.: Alfaomega; 2016.
41. Open CV team. Open CV. [Online].; 2018. Available from: <https://opencv.org/>.

42. Gomez Gonzalez S. El gran libro de SolidWorks. segunda ed.: Alfaomega; 2014.
43. Santana A. Introducción al uso de R-commander. 2006..
44. Fundación Wikimedia, Inc. Wikipedia. [Online].: [https://es.wikipedia.org/wiki/R_\(lenguaje_de_programaci%C3%B3n\)](https://es.wikipedia.org/wiki/R_(lenguaje_de_programaci%C3%B3n)); 2018. Available from: [https://es.wikipedia.org/wiki/R_\(lenguaje_de_programaci%C3%B3n\)](https://es.wikipedia.org/wiki/R_(lenguaje_de_programaci%C3%B3n)).
45. TFM RIMUNED. [Online].; 2012 [cited 2018 01 25. Available from: <https://tfmrimunad.wordpress.com/modelado-por-deposicion-de-hilo-fundido-fdm/>.
46. Mallick S. Learn OpenCV. [Online].; 2015. Available from: <https://www.learnopencv.com/filling-holes-in-an-image-using-opencv-python-c/>.
47. Milan JJ. Wikimedia commons. [Online].; 2012 [cited 2018 01 05. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MTF_bars_variable.PNG.
48. Smith SW. The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing. [Online].; 2011 [cited 2018 01 05. Available from: <http://www.dspguide.com/ch24/3.htm>.
49. LEÓN N. dzoom. [Online].; 2018. Available from: <https://www.dzoom.org.es/la-temperatura-del-color/>.
50. Sáez Castillo A. Estadística para ingenieros Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Universidad de Jaén; 2012.
51. Celeromics. Celeromics. [Online].; 2018. Available from: <http://www.celeromics.com/en/index.php>.
52. BOECO. BOECO. [Online].; 2018 [cited 2018 02 18. Available from: <http://www.boeco.com/artikelShow.php?ID=169>.
53. Gironés J, Carbonell V, García M. El gran libro de android avanzado. Tercera ed.: Alfaomega; 2017.
54. Samsung. [Online].; 2017 [cited 2017 06 30. Available from: <http://www.samsung.com/ar/smartphones/galaxy-j1-j105m/>.
55. MI. [Online].; 2017 [cited 2017 06 30. Available from: <http://www.mi.com/en/max2/>.
56. Deitel P, Deitel H. Cómo Programar en Java. Novena ed.: Pearson; 2012.
57. Walpole R, Myers R, Myers S, Ye K. Probabilidad Y Estadística para Ingeniería y Ciencias. Novena ed.: Pearson; 2012.
58. Facultad de Mecánica de Fluidos, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Manual de SolidWorks nivel 1. 2010..
59. SolidWorks. Conceptos básicos de Solidworks: Piezas y ensamblajes. 2006..
60. GRADO CJG. SolidWorks para dibujo y diseño mecánico..
61. SolidWorks. www.solidworkstutorials.com. [Online].; 2010.
62. Google. Android Developers. [Online]. Available from: <https://developer.android.com/training/camera/photobasics.html>.
63. El Color: Tono, saturación, brillo e iluminación. [Online].; 2011. Available from: <http://tonosatubrilloilu.blogspot.com.ar/>.
64. Stack Exchange Inc. Stackoverflow. [Online].; 2018. Available from: <https://es.stackoverflow.com/>.
65. Fotonostra. Fotonostra. [Online]. Available from: <http://www.fotonostra.com/fotografia/temperatura.htm>.
66. Tutorials Point (India) Pvt. Ltd. tutorialspoint simply easy learning. [Online].; 2018. Available from: https://www.tutorialspoint.com/java_dip/index.htm.
67. Houston P. Android Newbie Android Code Breaker Diary. [Online]. Available from: <https://xjaphx.wordpress.com/learning/tutorials/>.
68. Elkan M. Tutor de programación. [Online].; 2017. Available from: <http://acodigo.blogspot.com.ar/p/tutorial-opencv.html>.

69. w3ii.com. [Online].; 2017. Available from:
http://www.w3ii.com/es/java_dip/enhancing_image_sharpness.html.
70. Roncagliolo P. [Online].; 2007. Available from:
http://www2.elo.utfsm.cl/~elo328/pdf1dpp/PDI13_Color_1dpp.pdf.
71. Kit Printer 3D. [Online].; 2014 [cited 2018 01 25]. Available from:
<https://kitprinter3d.com/es/blog/abs-o-pla-n23>.
72. codeitdown. [Online].; 2013 [cited 2017 12 21]. Available from:
<https://codeitdown.com/hsl-hsb-hsv-color/>.