

**OPTIMIZACIÓN DE IMÁGENES DE MUESTRAS BIOLÓGICAS OBTENIDAS
POR FLUORESCENCIA**

CARLOS JAVIER PERUCHO LOZANO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FISICA
BUCARAMANGA**

2011

**OPTIMIZACIÓN DE IMÁGENES DE MUESTRAS BIOLÓGICAS OBTENIDAS
POR FLUORESCENCIA**

CARLOS JAVIER PERUCHO LOZANO

***Trabajo presentado como requisito
Para optar al título de Magister en Física***

Director

Dr. ARTURO PLATA GOMEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FISICA
BUCARAMANGA**

2011

Dios Padre, Santa María

Gracias por ayudarme a cumplir esta etapa de mi vida, me siento muy afortunado de poder seguir avanzando, fortaleciéndome como profesional y como ser humano.

A mis padres y hermanos por apoyarme en esta nueva etapa haciendo que todo el esfuerzo y dedicación valiera la pena.

Maritza Maldonado

Por su paciencia, comprensión y apoyo para cumplir con mis ideales propuestos.

AGRADECIMIENTOS

*A mi director de proyecto **Dr. ARTURO PLATA GÓMEZ**, gracias por su apoyo, su paciencia, y estar ahí en cada momento que lo necesite y por incentivar me a avanzar cada vez más.*

*A mis amigos y compañeros **EDWIN F. MENDOZA, FREDY A. RODRÍGUEZ**, y **ELBER RODRÍGUEZ**, conté con ustedes a todo momento, gracias por ayudarme en mis desaciertos.*

***AI GRUPO DE OPTICA Y TRATAMIENTO DE SEÑALES, PROFESORES Y COMPAÑEROS**, por su colaboración y atención ayudándome en mis dudas y fallas.*

*Por la colaboración, para poder realizar este trabajo al **CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES TROPICALES (Cintrop)**.*

TABLA DE CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
<i>INTRODUCCION</i>	<i>17</i>
<i>1. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA</i>	<i>20</i>
<i>1.1 FENOMENO DE FLUORESCENCIA</i>	<i>20</i>
<i>1.2 MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO</i>	<i>22</i>
<i>1.3 MICROSCOPIA CONFOCAL</i>	<i>30</i>
<i>2. CARACTERISTICAS EN EL SISTEMA</i>	<i>35</i>
<i>2.1 APERTURA NUMERICA</i>	<i>38</i>
<i>2.2 RESOLUCION ESPACIAL</i>	<i>41</i>
<i>2.3 FUNCION DE DISPERSION (PSF)</i>	<i>50</i>
<i>2.4 RUIDO AGREGADO EN LA OPTICA</i>	<i>59</i>
<i>3. MEJORAMIENTO DE IMAGENES</i>	<i>67</i>
<i>4. CONCLUSIONES</i>	<i>96</i>

5. NOTAS DE REFERENCIA	98
6. BIBLIOGRÁFICA	101
7. ANEXO	104

LISTA DE TABLAS

	Pág.
<i>Tabla 1. Listado de fluoroforos usualmente utilizados en microscopia</i>	29

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
1. Diagrama de Jablonski	21
2. Luz recibida por un objetivo Epi-iluminador	24
3. Imágenes a diferente paso axial	26
4. Diferencia de Stokes	30
5. Sistema Confocal	31
6. Barrido axial de una muestra biológica	37
7. Apertura numérica y límite de resolución	39
8. Profundidad de campo	40
9. Distribución de intensidad según el tamaño del pinhole	45
10. Función de dispersión de un microscopio confocal y de campo claro	47
11. Resolución axial de una lente 40X	49
12. Imagen sometida a borrosidad	52

13. Angulo de abertura	54
14. Función de dispersión experimental	55
15. Perfil de la función de dispersión experimental	58
16. Ganancia y SNR	66
17. Montaje del sistema	69
18. Comparación de contrastes	70
19. Decaimiento exponencial	72
20. Diferencia de Stokes para el sistema	73
21. Células de THP1	74
22. Calidad de imagen con imagen promediada	77
23. Ampliación de imagen anterior	79
24. Wavelet Ingrid Daubechies	80
25. Calidad de imagen con uso de wavelet	83
26. Imágenes de máxima intensidad y topografía de células THP1	88
27. Imágenes de intensidad presentadas por Image surfer	89

28.Reconstrucción tridimensional de células THP1	90
29.Imagen de máxima intensidad por Image surfer	91
30. Imágenes de máxima intensidad y topografía de otra región	92
31.Reconstrucción tridimensional en otra región de las células	93
32.Segunda comparación con Image surfer	94
33.Representación adicional	95

PRÓLOGO

El trabajo realizado comprende en su mayoría, el estudio del efecto del microscopio de fluorescencia de campo claro sobre las imágenes obtenidas de una muestra biológica, con el fin de optimizar las imágenes. Lo anterior es debido a que usualmente las imágenes son de bajo contraste y presentan borrosidad. Al hablar de optimización de imágenes, lo que se trata, es presentar mejoras graduales en las imágenes tales como disminución del ruido aditivo en éstas, y también disminución de la auto-florescencia, a medida que las imágenes se analizan. Haciendo un aporte al mejoramiento de los resultados.

No se trata de adquirir la imagen que revela el microscopio captada por una cámara. En este proyecto se indaga en la interpretación del efecto proveniente del sistema de adquisición a la muestra, como por ejemplo la borrosidad y del ruido presente en la imagen resultante. El resultado se corrige y da una interpretación de la realidad de la muestra como aumento de contraste y una imagen de máxima intensidad de la misma.

La base del trabajo es el seguimiento a los procesos que ocurren al espécimen en el sistema a medida que surgen cambios en la imagen resultante estudiada, es muy aconsejable hacer el estudio teórico-experimental en las partes que conforman el sistema, ó secciones que aportan un cambio significativo a la muestra, trayendo como consecuencia un estudio con más razón experimental que de programación.

En el presente trabajo ha de tenerse en cuenta que aunque éste se analiza en paralelo con otra técnica como es la microscopia confocal (por ser este un buen método de adquisición de imágenes) no se manejan comparaciones directas, como el análisis del mismo espécimen por la microscopia de campo claro y confocal simultáneamente. No obstante, se considera la capacidad del sistema de microscopia confocal en comparación con el de esta tesis, ya que los resultados se comparan con un software que realiza mejoramientos a las imágenes obtenidas por las técnicas de microscopia de campo claro y confocal.

Carlos Perucho

TITULO: ___ OPTIMIZACIÓN DE IMÁGENES DE MUESTRAS BIOLÓGICAS OBTENIDAS POR FLUORESCENCIA ___ *

AUTOR: _CARLOS JAVIER PERUCHO LOZANO___ **

PALABRAS CLAVES: Microscopio de Fluorescencia, PSF, Tratamiento digital de imágenes.

CONTENIDO:

Haciendo uso de la microscopia de fluorescencia de campo claro, se desea obtener una secuencia de imágenes al recorrer una muestra biológica a lo largo del eje axial del microscopio. Gracias a que las partes que conforman la muestra llevan adheridas sustancias fluorescentes se pueden obtener detalles de la muestra y hacerse visible con respecto a otras partes de la misma, detalles difíciles de observar simplemente con el uso del microscopio de campo claro.

Esta secuencia de imágenes no solo representa imágenes de intensidad de un espécimen sino que también representa posiciones espaciales para esta, siendo una característica topográfica.

Al obtener una cantidad de imágenes de la muestra biológica, se pretende hacer uso del método de detección de máximos para conseguir imágenes en dos dimensiones; Aumentando el contraste de las imágenes o eliminando la borrosidad, se puede lograr una imagen en tres dimensiones de la muestra, haciendo favorable un modelo de la observación.

Obteniendo esta información tridimensional, se puede caracterizar tanto su topografía como su textura. Obteniendo una imagen sintética a partir de un conjunto de imágenes se puede cuantificar en iguales condiciones todos los componentes de la muestra.

Este mejoramiento llega a ser importante, ya que es un método aplicado a la fluorescencia en microscopia de campo claro, siendo esta una técnica asequible por sus bajos costos, que otras técnicas más avanzadas.

* Proyecto de Grado

** Facultad: _**CIENCIAS**_. Escuela: _**FÍSICA**_. Director: _**Dr. ARTURO PLATA GOMEZ**_

TITLE: ___ IMAGES OPTIMIZATION OF OBTAINED BIOLOGICAL SAMPLES FOR
FLUORESCENCE ___ *

AUTHOR: _CARLOS JAVIER PERUCHO LOZANO_ **

KEY WORDS: Fluorescence Microscope, PSF, Digital treatment of images.

SUMMARY:

Making use of the fluorescence microscopy of clear field, it is wanted to obtain a sequence of images traveling a biological sample along the axial axis of the microscope. Thanks to that parts of sample take stuck fluorescent substances, details of the sample can be obtained, and it can become visible in comparison with other parts of the same one, because the details are difficult to observe simply with the use of clear field microscope.

This non alone sequence of images represents images of intensity of a specimen but rather it also represents space positions for this, being a topographical characteristic.

Of biological sample, a quantity of images we obtain, these they are used in the method of maxima detection to obtain images of two dimensions with the best quality; Increasing the contrast of images or reducing the blurred, one can obtain an image in three dimensions of the sample, making favorable a model of the observation.

Obtaining this three-dimensional information, you can characterize as much their topography as their texture. Obtaining a synthetic image starting from a group of images you can quantify in equals conditions all the components of the sample.

This improvement ends up being interesting, because it is applied method to the fluorescence microscopy of clear field; being this an affordable technique for their low costs that other more advanced techniques.

* Work of degree

** Faculty of sciences, Physics, Arturo Plata Gomez.

INTRODUCCION

La fluorescencia en materiales orgánicos es un fenómeno que ha tenido un crecimiento en los últimos años como una metodología usada extensivamente en biotecnología. Su detección puede llegar a ser altamente sensitiva y para la mayoría de mediciones bioquímicas surge la necesidad de ocuparse de marcadores o tintes para realizar la fluorescencia.

El crecimiento en el uso de la fluorescencia se enfoca al análisis de imágenes celulares y moleculares, debido a que estas pueden revelar la localización y medida de moléculas intracelulares [9]. De allí, que los microscopios modernos de luz, sean instrumentos versátiles para el análisis microscópico; el diseño de estos dispositivos junto a un sistema de epi-iluminación, hace del microscopio de campo claro un instrumento útil para la microscopía de fluorescencia.

Siendo apto el sistema de microscopia para el estudio de muestras biológicas, se presenta la situación, que la fluorescencia observada sea débil [1]; Por ello, para llegar a realizar una microscopía de fluorescencia eficaz, el microscopista debe poder seleccionar un fluorocromo apropiado, filtros, y una fuente luminosa para una aplicación dada y poder evaluar la calidad de la señal obtenida por fluorescencia [2].

Una característica fuerte del microscopio de epi-fluorescencia es su iluminación de campo claro, permitiendo imágenes simultáneas en el plano focal, aunque cabe mencionar que la aplicación del microscopio de campo claro en la adquisición de datos tridimensionales no es tan bueno como se llegaría a esperar. Partiendo del hecho, que la muestra entera se ilumina simultáneamente, se tendría entonces, que no sólo se excitaría el fluoroforo ubicado en el plano focal sino también en las regiones de fuera de foco de la muestra.

La mejora en la capacidad de adquisición dado por los microscopios confocales, son una buena herramienta para adquirir imágenes microscópicas de muestras biológicas en dos dimensiones.

En esta técnica de alto costo viene incorporado un software que proporciona imágenes con una resolución óptima para el estudio de muestras biológicas. Pero, dado el elevado costo de esta técnica de resolución mejorada en comparación a la variedad de precios del microscopio de campo claro, se hace asequible el sistema óptico de campo claro.

El trabajo que se presenta busca optimizar las imágenes que se obtienen por microscopia de fluorescencia de campo claro, por ejemplo, analizando la manera como el sistema presenta estas imágenes y como se pueden mejorar al incrementar su relación de contraste, o disminución de ruido del sistema. También, se identifican los efectos del sistema óptico en las muestras y se mantienen los parámetros requeridos que necesita el microscopista para su estudio.

Para la optimización de imágenes se busca valorar los factores que intervienen en el proceso de la obtención de la imagen de fluorescencia, para así evaluar la calidad de las mismas y disminuir, aquellas componentes presentadas en las imágenes, que no hacen parte de la naturaleza de la misma, al apoyarse en las restricciones o inconvenientes ofrecidos por el montaje experimental; buscando así, las cualidades en las imágenes cercanas a la realidad del objeto (sin borrosidad y disminución de la dispersión de luz y de la señal de ruido, ya que ésta es un parámetro aceptado para describir la visibilidad y claridad de un objeto), presentando resultados aptos para el microscopista.

El proyecto se ha estructurado de la siguiente manera: la primera parte presenta la descripción teórica de la relación del microscopio de campo claro con la formación de la imagen de fluorescencia, estableciendo las situaciones a tener en cuenta para el funcionamiento del mismo; la segunda parte da a conocer los procesos que favorecen la obtención de resultados, y análisis experimental permitiendo cuantificar su eficiencia.

Los resultados mostrados se pueden presentar como una iniciativa para investigaciones posteriores basadas en microscopia de fluorescencia de campo claro que pretendan una dinámica en el manejo de muestras fluorescentes o de muestras tenidas con fluoroforos.

1. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

1.1 FENÓMENO DE FLUORESCENCIA

Cuando una molécula o un átomo fluorescente absorbe un fotón de una longitud de onda apropiada, un electrón es excitado a un estado de energía más alto y casi inmediatamente se precipita regresando a su estado base inicial; en el proceso de colapso de energía la molécula puede liberar la energía absorbida como un fotón fluorescente. A este fenómeno se le denomina fluorescencia. Sin embargo, alguna energía se pierde en el proceso, y el fotón fluorescente emitido normalmente presenta una frecuencia baja de vibración y una longitud de onda más larga que la del fotón que fue absorbido [2], El fenómeno de fluorescencia presenta típicamente un periodo de vida de 10^{-8} segundos. Entonces, el tiempo de vida de un material Fluorescente o Fluoroforo es el tiempo medio entre la excitación y el retorno a su estado base de los electrones [9].

Una representación del cambio de energía de los electrones de una molécula fluorescente es el diagrama de Jablonski; en el que en cada nivel de energía electrónico, los fluoroforos pueden llegar a existir en un número de niveles de energía vibracional, ilustrados como S0, S1, etc (figura 1). Las transiciones ocurren en aproximadamente 10^{-15} s, un tiempo demasiado corto para el desplazamiento significativo de núcleos. En el diagrama se excluye varios números de interacciones y se ilustran las transiciones entre los estados (líneas verticales que exponen la naturaleza instantánea de absorción de la luz).

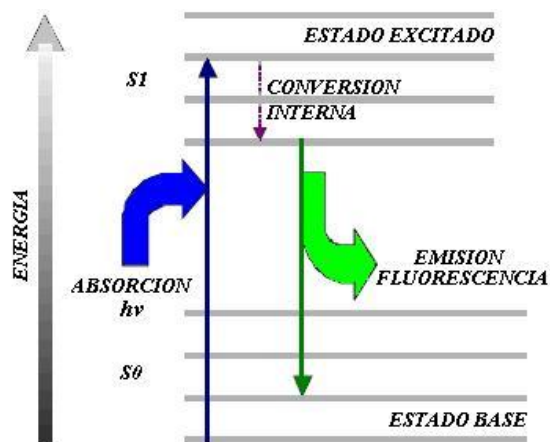


Figura 1. Diagrama de Jablonski para absorción y emisión
De una molécula de fluoroforo.

La absorción y emisión ocurren principalmente desde moléculas con energía vibracional muy baja y la diferencia de energía más grande entre el S0 y S1 es demasiado grande para la población termal de S1, por ello se usa la luz y no el calor para inducir la fluorescencia; aunque se podría decir que la emisión de fluorescencia es el resultado de un estado excitado termalmente equilibrado. Es decir, el más bajo nivel de energía del estado vibracional S1.

Examinando el diagrama (figura 1) se manifiesta que la energía de emisión es típicamente menor que la de absorción, y la fluorescencia comúnmente ocurre a bajas energías o longitudes de onda más largas [9].

1.2 MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

Con un microscopio adaptado a la microscopia de fluorescencia, es posible examinar la distribución de una especie molecular en un espécimen. Al respecto de otras formas de microscopia de luz basadas en las propiedades dependientes de objetos de absorción de luz, la microscopia de fluorescencia permite la visualización de moléculas específicas en presencia de luz excitatoria fluorescente; así, la cantidad, localización intracelular, y el movimiento de macromoléculas, pueden ser estudiados mediante esta técnica.

Debido a su gran especificidad y la relativa facilidad de uso, la microscopia de fluorescencia es el modo de microscopia de luz más empleado en la investigación biomédica, ya que este emplea filtros especiales y un método de iluminación para producir imágenes de luz fluorescente emitida por moléculas excitadas en un espécimen [2].

En la microscopia de fluorescencia se han desarrollado métodos como mejoras en la óptica, aplicación de filtros de interferencia, espejos dicróicos, incorporación de epi-iluminadores, e introducción de películas sensitivas y dispositivos de imágenes electrónicas.

Para cualquier aplicación los sistemas de detección de fluorescencia deben tener cuatro elementos compatibles: una fuente de excitación, un fluoroforo, un filtro de determinada longitud de onda que aísla los fotones de emisión de los fotones de excitación, y un detector que registra la emisión de fotones y produce una salida registrable, usualmente como una señal eléctrica o una imagen fotográfica [1].

Para este tipo de sistemas, la fuente de luz de excitación (iluminador) se puede utilizar una lámpara de mercurio o de arco de xenón, debido a un corto rango de longitudes de onda, que se usa para excitar el fluorocromo en el espécimen. El iluminador debe producir fotones de una longitud de onda apropiada y una intensidad suficientemente eficaz; por consiguiente, es importante que el microscopista empareje el iluminador al tinte fluorescente en cuestión. Para este tipo de microscopía, se usa normalmente una lámpara de mercurio de 100W ó una de arco de xenón de 75 W. Ambas lámparas dan una continua emisión luminosa sobre el espectro visible (400-700 nm), pero el mercurio contiene líneas definidas de emisión a los 366 (UV), 405, 436, 546, y 578 nm.

Para imágenes efectivas de alto contraste, el iluminador y el objetivo se posicionan en el mismo lado del espécimen. A esto se le llama epi-iluminación; Esto, hace que sea más eficaz que el modo transmitido de iluminación porque hay mucho menos iluminación de fondo en la imagen de fluorescencia (ver figura 2). La función del objetivo es como la de un condensador, que entrega la luz excitadora al espécimen, y como objetivo, que recoge la luz fluorescente y forma la imagen del objeto fluorescente en el plano imagen, este dispositivo es un componente incorporado en el cuerpo del microscopio.

Uno de los ajustes más importantes en la microscopía de fluorescencia es la alineación del iluminador. Partiendo de la amplitud de la señal de fluorescencia debido a la cantidad de excitación, la iluminación desigual del objeto por una lámpara desalineada resultará en regiones luminosas y oscuras en la imagen de fluorescencia. Esto es perjudicial para el trabajo cuantitativo.

Los filtros de fluorescencia que determinan las longitudes de onda a trabajar sobre la muestra están contenidos en una pieza del microscopio que incluyen tres filtros esenciales: filtro de excitación, espejo dicróico, y filtro de barrera (o emisión); en donde este último bloquea cualquier longitud de onda corta residual de excitación

mientras transmite la banda de longitudes de onda de fluorescencia que provienen de la muestra para formar la imagen en el ojo o cámara (figura 2) [2]. Por consiguiente se debe saber el espectro de emisión y absorción de los fluoróforos que se está utilizando para así poder escoger de forma correcta el filtro a trabajar. Presentándose una limitación en el uso de filtros y fluoróforos ya que solo se puede utilizar cierta cantidad de estos.

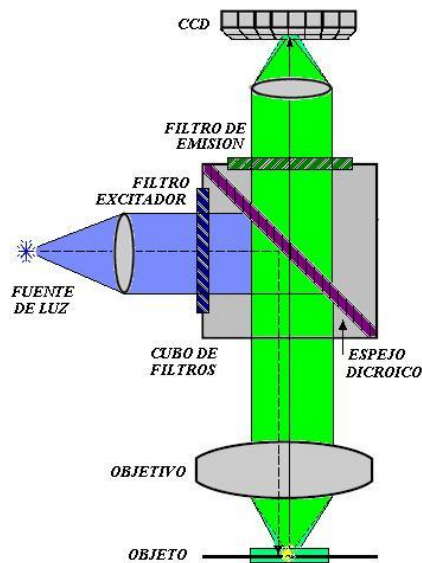


Figura 2. Luz recibida por un objetivo epi-iluminador y ubicación del conjunto de filtros, hay que tener en cuenta como la luz llega al objeto y retorna por el mismo objetivo.

Hay que mencionar que el espejo dicroico es un filtro especial de paso largo cubierto con múltiples capas de materiales dieléctricos similares a aquéllos contenidos en una delgada película de filtro de interferencia, pero es especialmente diseñado para la reflexión y transmisión a ciertas longitudes de onda; Teniendo en cuenta sus propiedades, el espejo dicroico se ubica a un ángulo de 45° con respecto al eje óptico dentro de un cubo de filtros. El espejo dicroico refleja las longitudes de onda corta de excitación a un ángulo de 90° a lo largo del eje óptico del espécimen, pero transmite longitudes de onda largas de fluorescencia que son reunidos por el objetivo y dirigidos al plano imagen.

Ocurriendo así una transición de una cercana reflexión total a la transmisión máxima sobre los 20-30 nm, permitiendo a los espejos actuar como discriminadores precisos, de excitación en longitudes de onda de fluorescencia.

Para la adquisición es importante que la transmisión, reflectancia, y características de emisión del filtro excitador y del espejo dicroico se emparejan estrechamente, y sean apropiados para la absorción y máxima emisión del tinte, porque las longitudes de onda de excitación pueden atravesar el dicroico y pueden opacar la imagen, o la fluorescencia de las longitudes de onda pueden ser reflejadas al dicroico reduciendo el brillo de la imagen. Incluso, cuando los filtros y fluoroforos son apropiadamente ajustados, el desempeño de este mejora un poco si el perfil de transmisión del excitador y el dicroico se superponen. Por otra parte, los adelantos en la tecnología de capas de películas delgadas permiten la creación de múltiples picos de transmisión, alternando la reflexión a través de un solo filtro de interferencia ó un espejo dicroico [2].

Una característica fuerte del microscopio en su iluminación de campo claro es su sistema interno de epi-iluminación, para el cual el recorrido de la iluminación que llega al espécimen, se encuentra del mismo lado para el objetivo que recoge la imagen, es decir, el objetivo funciona también como condensador; y este sistema aplicado a la fluorescencia se denomina sistema epi-fluorescente.

Éste habilita simultáneas imágenes del plano focal completo, aunque, la actuación de un microscopio de campo claro en la adquisición de datos tridimensionales no resultaría ser tan eficiente como se llegaría a esperar ya que con la totalidad de la muestra iluminada simultáneamente, no sólo se excitarán los fluoroforos en el plano focal sino también en las regiones encontradas fuera de foco de la muestra.

La cámara CCD usada en el microscopio adquirirá una imagen bidimensional de la intensidad de luz emitida; esta luz emitida desde las regiones fuera de foco no

puede llegar a distinguirse de la luz emitida de la región enfocada (figura 3); por consiguiente, la imagen puede ser una combinación de una imagen enfocada en el plano focal con una borrosidad, debido a la luz fuera de foco. La adquisición en el foco y fuera de ésta con respecto al eje óptico, resulta en la resolución muy pobre de un microscopio de fluorescencia convencional de campo claro [7].

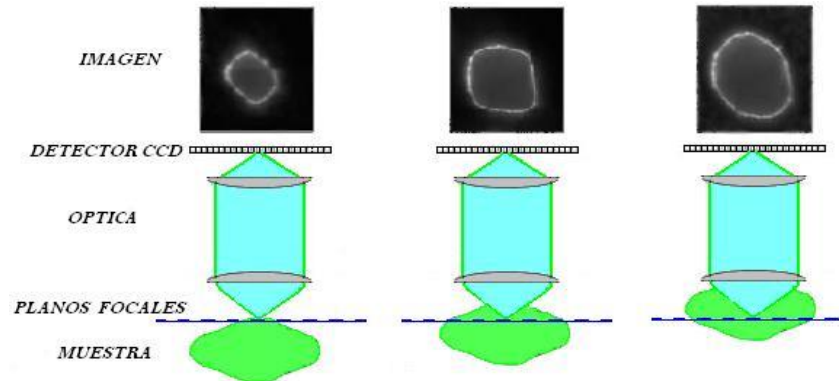


Figura 3. Imagen de una muestra biológica en el cual a medida que se avanza axialmente no se distingue la iluminación de fuera de foco del plano enfocado.

Una propiedad general de la fluorescencia es que el mismo espectro de emisión de fluorescencia frecuentemente es observado independientemente de la longitud de onda de la excitación. También puede observarse que la intensidad en la fluorescencia se puede disminuir por varias causas, a esta disminución en intensidad se denomina apagado.

Las medidas de fluorescencia pueden ser clasificadas en dos tipos: una es el estado sostenido, que es del tipo más común y es realizada con iluminación y observación constante; y en el cual la muestra es iluminada con un continuo rayo de luz, la intensidad o emisión espectral es registrada debido al tiempo de escala de fluorescencia de nanosegundos, llegando a ser las más usadas para hacer medidas.

El segundo tipo es el tiempo resuelto, usado para medir el decaimiento de intensidad o decaimiento anisotrópico; para estas medidas la muestra se expone a un pulso de luz donde el ancho del pulso es típicamente más corto que el tiempo de decaimiento de la muestra. Este decaimiento de intensidad se registra con un sistema de detección de gran velocidad; eso permite medir la intensidad o anisotropía en tiempo de escala en nanosegundos; la relación entre estas medidas es que en estado sostenido es simplemente un promedio del fenómeno 'tiempo resuelto' sobre la intensidad de decaimiento de la muestra [9].

En síntesis, la tarea básica del microscopio de fluorescencia es permitir a la luz de excitación irradiar el espécimen y separar la luz fluorescente re-radiada del brillo de la luz excitatoria más luminosa; así, sólo la luz emitida alcanza el ojo ó detector, resultando áreas fluorescentes que brillan contra un fondo oscuro con el contraste suficiente para permitir la detección; entonces, la luz ultravioleta (UV) de una longitud de onda específica es producida pasando la luz de una fuente de emisión UV a través de un filtro excitador, la luz UV filtrada ilumina el espécimen que emite luz fluorescente de longitudes de onda más largas mientras se ilumina con luz ultravioleta, la luz visible emitida del espécimen pasa a través de un filtro de barrera que no permite atravesar la luz UV reflejada, debe notarse que éste es el único modo de microscopía en que el espécimen subsecuente a la excitación, emite su propia luz, luz re-radiada esféricamente en todas las direcciones, sin tener en cuenta la dirección de la luz excitante (figura 2).

El uso de fluoróforos hace posible identificar células con sus componentes y entidades con un grado alto de especificidad entre los materiales no-fluorescentes, ya que son capaces de absorber y re-radiar la luz. A menudo, los fluoróforos son específicos en su marcaje y tiene un buen rendimiento en sus procesos de absorción y emisión. Por lo tanto, el crecimiento en el uso de microscopios de fluorescencia incentiva el desarrollo de centenares de fluoróforos con curvas de intensidad de excitación y emisión conocidas.

Se debe tener presente que los fluoroforos escogidos deben tener una probabilidad alta de absorber la luz excitante y deben permanecer ligados a las moléculas designadas; también deben ser capaces de proporcionar un rendimiento satisfactorio de luz de fluorescencia emitida [4]. Aunque, el microscopio de fluorescencia no proporciona una resolución espacial por debajo del límite de difracción de los objetivos respectivos, sigue habiendo presencia de moléculas por debajo de estos límites de difracción.

Dos características determinan la utilidad del fluoroforo: primero, su habilidad a ser excitada por una luz de cierta longitud de onda (el espectro de la excitación). Segundo, su habilidad de emitir luz de longitud de onda más larga después de la excitación (el espectro de la emisión). La tabla posterior resume algunos fluoroforos usados, su excitación y espectros de emisión [5].

La diferencia presentada entre la longitud de onda de absorción y de emisión (ver figura 4) se conoce como diferencia de Stokes la cual está en un intervalo de 30-70 nm, aunque puede ser extendida a 150-250 nm, la cual es una condición necesaria en algunas aplicaciones para separar el máximo de absorción del máximo de emisión en el espectro [1]. La diferencia de Stokes por ejemplo para el fluoroforo Fluorescein es de 20 nm, mientras que para el Porphyrins está sobre los 200 nm. Una gran diferencia de Stokes es ventajosa porque las bandas de excitación y longitudes de onda de fluorescencia son más fáciles de aislar usando los filtros de interferencia.

Otras características importantes de los fluoroforos son su resistencia al foto-blanqueado y al apagado, la solubilidad en los medios ácuos y la estabilidad química. El apagado y foto-blanqueado reducen la cantidad de fluorescencia, y cobran gran importancia práctica para el investigador. El apagado reduce el rendimiento cuántico de un fluoroforo sin cambiar su espectro de emisión de

fluorescencia, causado por las interacciones con otras moléculas que incluyen otros fluoroforos [2].

FLUOROFORO	EXCITACION	EMISION
<i>AMCA (aminometilcourmarina)</i>	350	450
<i>Cascade blue</i>	400	423
<i>Hoerchst 33342</i>	350	461
<i>DAPI</i>	358	461
<i>Cy2 (cianina)</i>	489	505
<i>FluoroGreen</i>	490	520
<i>Alexa 488</i>	491	515
<i>FITC (isotiocianato de fluoresceina)</i>	494	520
<i>Oregon Green 488</i>	496	524
<i>Alexa 532</i>	531	554
<i>7-Aminoactinomicina D (7AAD)</i>	546	647
<i>TRIC (isotiocianato de rodamina)</i>	554	576
<i>TMR (tetrametilrodamina)</i>	555	580
<i>Rodamina lisamina</i>	570	590
<i>Texas Red</i>	595	615
<i>PerCP (proteína clorofila peridinina)</i>	488	675
<i>APC</i>	635	670

Tabla1. Listado de fluoroforos usualmente utilizados en microscopia [17].

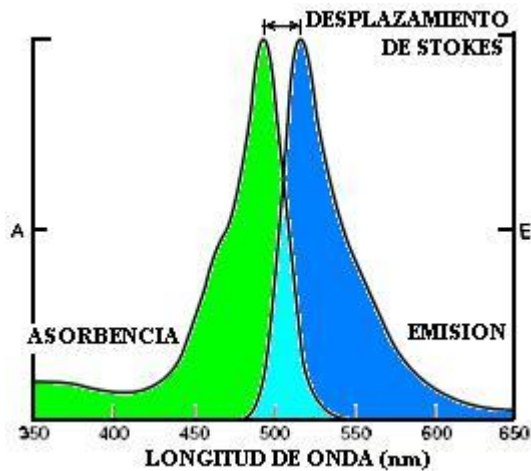


Figura 4. Diferencia de Stokes para un fluoróforo en general
Con respecto a su absorción y emisión.

1.3 MICROSCOPIA CONFOCAL

El microscopio confocal es un sistema de microscopía integrada, consistente de un microscopio de fluorescencia, múltiples fuentes de luz láser, una cabeza de escaneo con un equipo óptico y electrónico, una computadora y un software para adquirir, procesar, y analizar imágenes.

El principio de la microscopía confocal se describe como un sistema de epi-iluminación y un conjunto de filtro de fluorescencia (filtro excitador, filtro dicróico, filtro de emisión), realizando las mismas funciones con respecto a la microscopía de fluorescencia de campo claro, pero de cierta manera en un modo más eficiente. La fuente luminosa es un rayo láser que se extiende para llenar la abertura del objetivo y formar una intensa mancha de difracción que escanea de lado a lado haciendo un rastreo a la muestra (escaneo puntual), figura 5.

La característica más significativa de la óptica confocal es una abertura llamada pinhole, que acepta los fotones fluorescentes de la iluminación de la mancha enfocada. Esta excluye considerablemente las señales de fluorescencia de objetos sobre y bajo el plano focal, de manera que este elimina mucha de la luz perdida en el sistema óptico, bloqueando las señales del plano fuera de foco.

Las longitudes de onda fluorescentes emanadas de un punto excitado en el espécimen a cualquier momento son reunidos por el mismo objetivo y enfocados como una pequeña mancha de difracción, la cual llega a un pinhole de apertura variable ubicado frente a un detector PMT (Tubo Fotomultiplicador), en un plano que corresponde igualmente al plano imagen en un microscopio de fluorescencia de campo claro.

La combinación del escaneo puntual, el pinhole como filtro espacial, y el plano de la imagen conjugada, son esenciales para producir una imagen confocal.

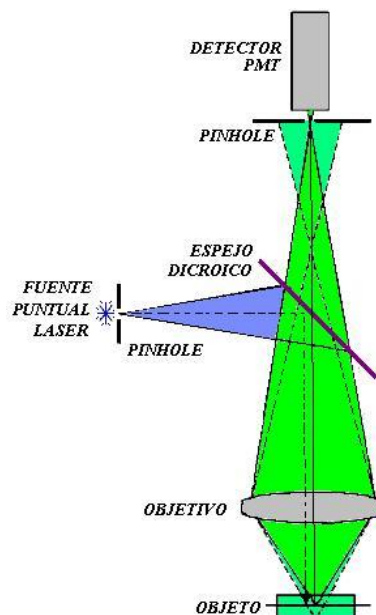


Figura 5. Características observadas del sistema confocal con respecto al sistema de iluminación de campo claro; el espejo dicroico va acompañado de los filtros de emisión y excitación

El Tubo fotomultiplicador no ve una imagen como corresponde al campo claro, éste recibe imágenes constantes de flujo de fotones cambiantes; la computadora percibe un voltaje de señales cambiantes del tubo fotomultiplicador, lo digitaliza, y extiende la señal en el monitor; las fluctuaciones en la intensidad de luz recibida se convierte en fluctuaciones de un continuo cambio de voltaje debido al detector del tubo fotomultiplicador. La señal análoga se digitalizada en intervalos regulares de tiempo por un conversor análogo a digital generado en pixeles, eso se guarda en un buffer de imagen y se muestra en el monitor; en sí, la imagen confocal nunca existe como una imagen real que puede verse a ojo en el microscopio.

La ganancia substancial en el uso del microscopio confocal es la habilidad para obtener imágenes de alto contraste de topologías de superficie usando la óptica de reflexión confocal, mejorando el contraste y definición considerablemente, debido a la reducción en la señal de fondo y una señal de ruido considerablemente mejorada.

Con un grupo de imágenes representando diferentes planos focales espaciados a intervalos regulares a lo largo del eje óptico (eje z), el objeto puede ser ilustrado en una variedad de formas:

- Como una vista de proyección, dónde toda la información contenida en un grupo o serie de imágenes tomada a una serie de planos focales a lo largo del eje z, se proyecta a una sola imagen enfocada. En paralelo, en una imagen de fluorescencia de campo claro, los procesos de fuera de foco parecen borrosos e indistintivos, una sola imagen del microscopio confocal muestra una vista compuesta de todos los planos focales contenidos en un grupo o serie de imágenes, presentado como proyecciones continuas bien definidas.

- La vista tridimensional de un objeto puede obtenerse de un grupo de imágenes confocales con ayuda de un software para la imagen mostrada.

Muchos software confocales pueden desplegar un objeto en perspectivas angulares diferentes o pueden girar sobre los ejes x, y, z, ó una combinación de ejes; para ver una célula en tres dimensiones. Este punto de vista es valioso para examinar tridimensionalmente objetos complejos.

-Vistas transversales xz o secciones cruzadas yz, pueden generarse por el software confocal; el objeto aparece como si hubiese sido cortado transversalmente, en un plano orientado paralelo al eje óptico.

-Una vista cinco-dimensional; para la inclusión de información en x, y, z, en una secuencia de tiempo, y en múltiples colores. Cada secuencia puede ser mostrada como una película multicolor tridimensional en tiempo real ó a modo de lapsos de tiempo. Esta vista puede llegar a ser más conveniente según la velocidad de procesamiento del computador y de su mejora en la capacidad de almacenamiento.

La señal de ruido y ruido electrónico del sistema de imágenes, define el grado de visibilidad o claridad de una imagen; para las imágenes luminosas, la señal de ruido es principalmente determinada por las intensidades del objeto y su fondo; sin embargo, para las imágenes oscuras, el ruido electrónico del sistema de imágenes se vuelve un factor determinante. En el pinhole, el brillo de la imagen es afectado por variables como: el poder del láser, la densidad del fluoroforo en el espécimen, la apertura numérica del objetivo, el factor de zoom del confocal, la rata de escaneo, la elección del grupo de filtros de fluorescencia, entre otros.

Otra característica del sistema es su resolución temporal, que depende de la rata de escaneo y la tasa de procesamiento del detector, el conversor análogo a digital, y la computadora.

Los Microscopios confocales están integrados a los sistemas de microscopio electrónicos, en los cuales la luz del microscopio es parte de un sistema electrónico que contiene un detector electrónico o cámara, una computadora y un software, con dispositivos electrónicos para el despliegue de la imagen, impresión y almacenado.

Estos dispositivos electrónicos realizan su tarea cuando la fuente puntual laser del microscopio confocal escanea al espécimen en una posición axial determinada, obtiene una imagen bidimensional en una sección de ésta, luego pasa a una nueva posición axial y repite el procedimiento, teniendo un sistema de barrido tridimensional sobre la muestra; de manera, que la computadora almacena un stack de imágenes para el análisis del espécimen facilitando la exploración en moléculas, células, y tejidos, que hasta el momento eran poco accesibles.

El desempeño de la óptica en el microscopio confocal es afectada por varias variables, las cuales deben evaluarse y deben ser controladas [2].

2. CARACTERÍSTICAS EN EL SISTEMA

Al estudiar una muestra podemos identificar que posee un volumen, y que en dicho volumen existen secciones que pueden ser enfocadas según como sea el paso del movimiento axial del microscopio. Así, la adquisición de la imagen de interés para el experimentador se puede realizar por el enfoque la región de la muestra. Para comprender esa idea, la figura 6 presenta una secuencia de imágenes a lo largo del eje axial que tiene posiciones diferentes de enfoque para la misma muestra. Se presentan diversos puntos de la muestra con claridad y borrosidad dependiendo de la imagen observada.

La luz fuera de foco es una consecuencia inevitable de la elección del microscopio convencional de fluorescencia, ya que el espécimen se ilumina en más de un plano focal. Así la imagen resultante representa la suma de la intensidad de puntos sobre y debajo del plano focal, incluyendo la imagen brillante del propio plano focal. Se piensa entonces en el re-asignamiento computacional de la luz a su punto correcto de origen en un conjunto de imágenes 3d, sin depender de una modificación al diseño del microscopio de campo claro [10].

También, Se puede analizar la difracción (fenómeno predominante en el stack de imágenes adquiridas), determinando la resolución espacial y el contraste de la imagen en el microscopio.

Según la teoría de Abbe para la formación de imágenes en el microscopio, se deben tener en cuenta tres acciones: la difracción de luz por el espécimen, la recolección de rayos difractados por el objetivo, y la interferencia del rayo difractado y no difractado en el plano imagen [2].

El elemento importante en el sistema de imágenes del microscopio es la lente objetiva, que determina la precisión con que estas acciones se efectúan. Para entender cómo se obtienen tales imágenes se examina un parámetro importante la apertura numérica, ésta es el ángulo sobre el cual el objetivo puede reunir los rayos difractados del espécimen y los parámetros claves, determinando la resolución espacial. Ha de tenerse en cuenta el efecto de la apertura numérica en la imagen contrastada; ya que es imposible obtener resolución espacial máxima y contraste óptimo usando solo una imagen del microscopio; este trabajo dejará alguna resolución espacial a cambio de un nivel aceptable de contraste [2].

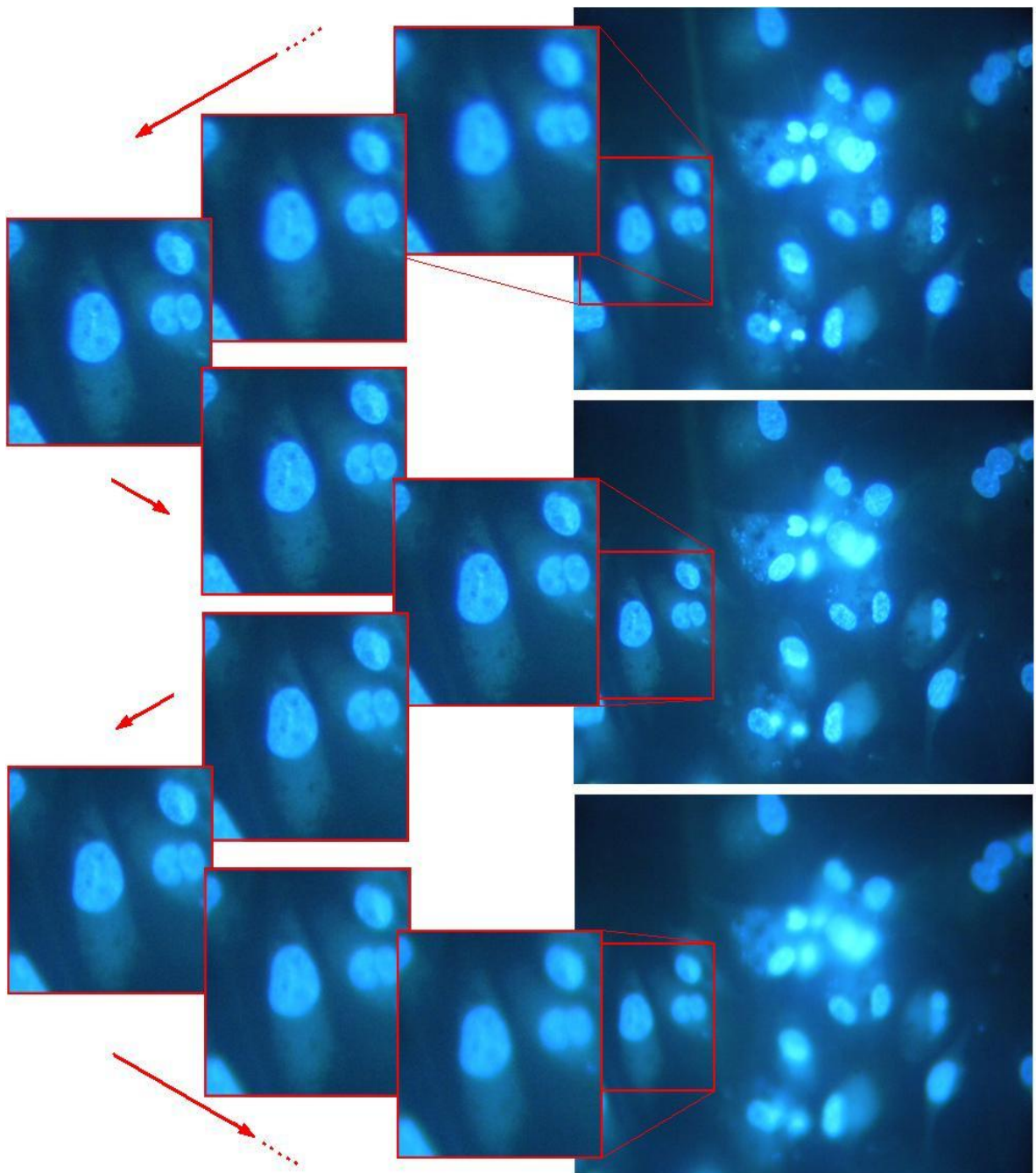


Figura 6. Observación de una muestra con un microscopio de campo claro, realizando un barrido axial de pasos de 1 micra en células sanguíneas; imágenes adquiridas gracias al centro de investigación en enfermedades Tropicales (Cintrop) de la Universidad Industrial de Santander. Hágase notar la diferencia entre una y Otra imagen debido a la borrosidad en puntos no focalizados.

2.1 APERTURA NUMÉRICA

La apertura numérica del objetivo debe capturar algunos de los rayos difractados del espécimen para formar una imagen, y las lentes pueden capturar la luz sobre un ángulo ancho. Ello da una buena resolución de un objetivo que recoge luz sobre un ángulo estrecho. En la óptica de fluorescencia, la resolución espacial es determinada por la longitud de onda de la luz fluorescente emitida. Aunque, en el modo confocal, la excitación y las longitudes de onda de emisión son importantes ya que el tamaño del escaneo del spot de difracción que induce fluorescencia en el espécimen depende directamente de la longitud de onda de la excitación.

La apertura angular está descrita por lo que se refiere a la apertura numérica (NA):

$$NA = n * \sin \theta \quad (1)$$

Donde el θ es el ángulo medio del cono de luz del espécimen aceptado por la lente objetiva y n es el índice refractivo del medio entre la lente y el espécimen (figura 7). Para lentes secas, se usa en aire $n=1$; para los objetivos de inmersión de aceite, $n = 1.515$. Aumentando el índice refractivo del medio entre la lente y el portaobjetos, el ángulo de rayos difractados recogidos por el objetivo se aumenta y la resolución se mejora [2].

Para una magnificación de un objetivo dado, si la abertura angular de un microscopio se aumenta, como ocurre al abrir el diafragma del condensador o al cambiar el objetivo para uno con la misma amplificación pero un NA más alto, la mancha de difracción en la imagen se hace más pequeña y la imagen queda bien resuelta. Así, los ángulos de abertura más grandes permiten a los rayos difractados ser incluidos en el objetivo, permitiendo una mejor resolución de detalles del espécimen.

La difracción y las ondas de luz determinan que la imagen de un objeto puntual es un disco de difracción de diámetro finito, las mismas leyes determinan que el disco tiene un espesor medible a lo largo del eje z, lo cual lleva a la profundidad de campo z en el plano objeto, que hace referencia al espesor de la sección óptica a lo largo del mismo eje en el cual los objetos del espécimen son enfocados, también dejando un espesor en el propio plano imagen conocido como profundidad de foco [2].

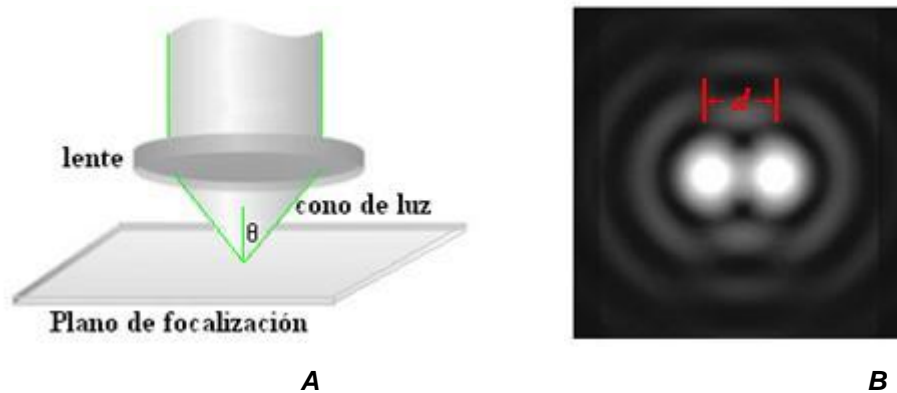


Figura 7. A. Apertura numérica para una lente, la resolución de la imagen mejora, si el ángulo del cono de luz también lo hace; **B.** Dos manchas de luz (conocidos como modelos de Airy) en su límite de resolución para dos objetos puntuales que pueden ser resueltos a una distancia d .

Considerando la resolución en la microscopía, el énfasis se hace en la resolución punto a punto en el plano perpendicular al eje óptico. Un aspecto importante a la resolución axial es el poder de resolución de un objetivo el cual es medido paralelo al eje óptico y es más frecuentemente referido a la profundidad de campo. La resolución Axial, como la resolución horizontal, es determinado por la apertura numérica del objetivo y con el ocular simplemente se magnifica los detalles resueltos proyectados en el plano imagen intermedio. Ahora, la profundidad de campo está determinada por la distancia entre los planos objetos más cercano y más lejano que son enfocados simultáneamente (figura 8). En la microscopía la profundidad de campo es muy corta y normalmente medida en términos de micrones.

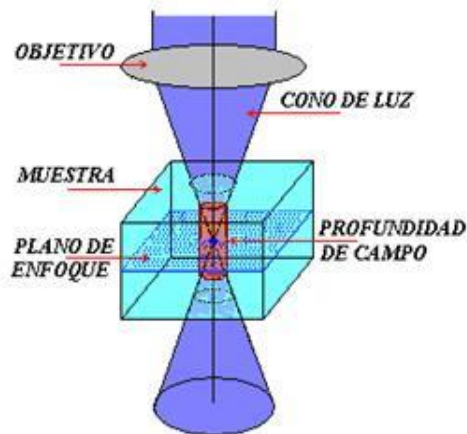


Figura 8. Profundidad de campo presente en la observación de una muestra (señalado como un cilindro de color rojo).

La geometría del plano imagen puede representar una sección infinitamente delgada del espécimen, pero incluso en ausencia de aberraciones, cada punto de la imagen es extendida en una figura de difracción que se extiende sobre y debajo de este plano. De allí, que la profundidad de foco varíe con la apertura numérica y la amplificación del objetivo. Bajo algunas condiciones, los sistemas de alta apertura numérica (normalmente con poder de amplificación superior) tiene la profundidad de foco más acentuada que aquellos sistemas de apertura numérica baja, aunque la profundidad de campo sea menor [4].

Los especímenes fluorescentes densos como las células redondeadas y secciones de tejido, pueden poner problemas para la óptica de fluorescencia convencional de campo claro, porque la señal de brillo fluorescente de los objetos fuera del plano focal incrementa el fondo y proporciona imágenes de bajo contraste. Lo anterior es resuelto por la microscopia confocal y la deconvolución rechazando las señales de fuentes cercanas sobre y debajo del plano focal, el concepto de deconvolución es discutido con mayor claridad, más adelante en el capítulo 2.3 – función de dispersión.

En la microscopía de deconvolución se utiliza un microscopio de fluorescencia normal de campo claro, en donde la imagen de una sección óptica es obtenida digitalmente con un computador que elimina la luz fuera de foco de la imagen (estas soluciones vienen dadas por el sistemas de microscopia que incorporan una caracterización del sistema como tal, al cual viene anexado un software que recopila la secuencia de imágenes y aplica los métodos de deconvolución programados para la óptica del mismo).

Las imágenes del alto contraste proporcionadas por los métodos confocal y de deconvolución pueden proporcionar las respuestas claras a las preguntas normalmente formuladas sobre los especímenes del microscopio fluorescente. Al usar un motor paso a paso, estos cambios de foco del microscopio en pasos de 100 nm a lo largo del eje z, hacen posible adquirir a los microscopios confocal y métodos de deconvolución un stack de imágenes a lo largo del eje z a diferentes planos focales, y generar una vista tridimensional del espécimen que usa un software [2].

2.2 RESOLUCIÓN ESPACIAL

Para objetos puntuales luminosos, el poder de resolución del microscopio se define con el criterio de Rayleigh, para la resolución de dos manchas de difracción espaciadas en el plano imagen xy. Para este criterio, dos objetos puntuales adyacentes están resueltos cuando la mancha de difracción central (disco Airy) de un punto coincide con el primer mínimo de la difracción del otro punto en el plano imagen (figura 7). La condición de estar resueltos asume que la imagen se proyecta adelante del detector con la amplificación adecuada, el límite de resolución de Rayleigh pertenece a dos puntos luminosos en un campo oscuro o a objetos iluminados por la luz incoherente.

Las irregularidades en las formas de partículas grandes que limitan el tamaño comienzan a resolverse. Aunque las partículas más pequeñas que este límite, aparecen como discos de difracción redondos, y, sin tener en cuenta sus verdaderos tamaños y formas, siempre tiene el mismo diámetro claro (La variabilidad clara en los tamaños de partículas del sub-resolución es debido a las variaciones en sus intensidades, y no a la variabilidad en el tamaño de su spot de difracción) [2].

La imagen de una muestra consiste en un modelo de solapamiento de manchas de difracción, la situación de cada punto xy en el objeto correspondiente al centro de la difracción, en la imagen xy ; entonces, un espécimen consistirá en un campo lleno de partículas sub-microscópicas (objetos puntuales).

Para los microscopios de investigación, la cantidad observada de fluorescencia de fondo en una imagen de un espécimen conteniendo un solo fluorocromo normalmente es del 15% al 30% del máximo brillo del espécimen; no 0% como podría esperarse. La fluorescencia en el fondo de la imagen siempre estará presente, por lo tanto es importante mantener la señal de fondo tan bajo como sea posible.

Se debe tener en cuenta que la microscopía de fluorescencia daña potencialmente las células vivientes, debido a que la fuente luminosa es intensa y rica en longitudes de onda UV e IR. Además, el grupo de filtros de fluorescencia no son totalmente eficaces eliminando estas longitudes de onda no deseadas [2].

Para determinar la resolución de un microscopio se involucra la imagen de sub-resolución, de objetos puntuales. La cual describe la distancia soluble más pequeña entre dos puntos en una imagen (figura 7).

La resolución entre dos puntos en el plano imagen y a lo largo del eje z depende de la excitación, longitudes de onda de fluorescencia, y la apertura numérica del objetivo, de esta manera la imagen de un objeto luminoso infinitamente pequeño formado por una lente objetiva no es infinitamente pequeño (debido a la difracción efectuada de la lente).

Todos los puntos del mismo frente de la onda tiene el mismo origen de fase, e interfieren juntos en la imagen plana, produciendo un patrón de difracción conocido como el modelo de Airy, consistiendo, en una serie de esferas concéntricas. Esto puede ser mostrado con dos puntos igualmente luminosos, separados una pequeña distancia d (ó r_{Airy}), estos pueden resolverse si los picos de sus modelos de Airy están separados por la distancia siguiente:

$$r_{Airy} = XY_{res}^{conv} = 0.61 \frac{\lambda}{NA_{obj}} \quad (2)$$

donde r_{Airy} es el radio del primer anillo oscuro en el modelo de Airy, que también puede ser considerado como la resolución lateral, XY , del microscopio. λ es la longitud de onda emitida y NA_{obj} es la apertura numérica de la lente objetiva. Debido a que el objeto es luminoso, no es necesario incluir la NA de la lente del condensador.

$$r_{Airy} = XY_{res}^{conv} = 0.6 \frac{0.420\mu m}{0.65} = 0.39\mu m \quad (3)$$

Conociendo las variables del microscopio utilizado para esta tesis, el valor $r_{Airy}=0.39$ micras será la resolución trasversal del microscopio de campo claro (planteado teóricamente) del que se adquirieron las imágenes de este proyecto y se toma como una constante para la adquisición.

La medida de la resolución axial (a lo largo del eje óptico) por el criterio de Rayleigh es difícil de lograr en la práctica, para ello un método alternativo es medir empíricamente la variación en la intensidad de luz; cuando una cuenta fluorescente es medida en intensidad a lo largo del eje axial, obteniéndose una variación en la intensidad relacionada con el diámetro de dicha cuenta fluorescente. Se obtiene entonces un perfil de intensidades a lo largo de la sección óptica axial. La capacidad máxima del ancho medio de este perfil determina el valor medio de la función de dispersión, referida más adelante como ΔZ_{RES}^{conv} .

La capacidad máxima del ancho medio es un parámetro conveniente para la caracterización de esta respuesta axial y también para la transversal, dando el 'espesor' de la sección óptica.

El ancho medio del máximo medio transversalmente está dado numéricamente por:

$$\Delta XY_{RES}^{conv} = 0.258 \frac{\lambda}{NA_{obj}} \quad (4)$$

La resolución espacial depende del tamaño de la apertura del pinhole en el detector (para el caso confocal), factor de zoom, apertura numérica del objetivo, índice de refracción y la rata de escaneo, que se ajusta usando el software que controla la cabeza de escaneo, según:

$$\Delta Z = \frac{0.45\lambda}{n \left(1 - \cos \left(\text{sen}^{-1} \left(\frac{NA_{obj}}{n} \right) \right) \right)} \quad (5)$$

Aunque, disminuyendo el tamaño del pinhole se reduce el espesor del plano focal a lo largo del eje z, permitiendo una alta resolución en el seccionamiento óptico.

Los microscopios confocales tienen un pinhole variable que permite al operador ajustar la cantidad de luz que llega al detector PMT, claramente el tamaño del pinhole tiene un efecto en la adquisición del microscopio, una pequeña apertura llega a limitar el seccionamiento dado por la ecuación anterior y afecta la cantidad de luz que alcanza al detector PMT.

Al hacer uso de un microscopio confocal de pinhole variable se obtiene la figura (9); como consecuencia la distribución de intensidad y por lo tanto la respuesta de la resolución axial (capacidad máxima del ancho medio) varía según el diámetro del pinhole usado [14].

Esto es esencial para las imágenes de proyección de alta calidad y alta resolución en la vista tridimensional [18]. También, al reducir el tamaño del pinhole mejora el contraste por la exclusión de los planos de la fuente luminosa fuera de foco, usualmente el detector del pinhole se ajusta para acomodar el diámetro del disco de difracción. [2]

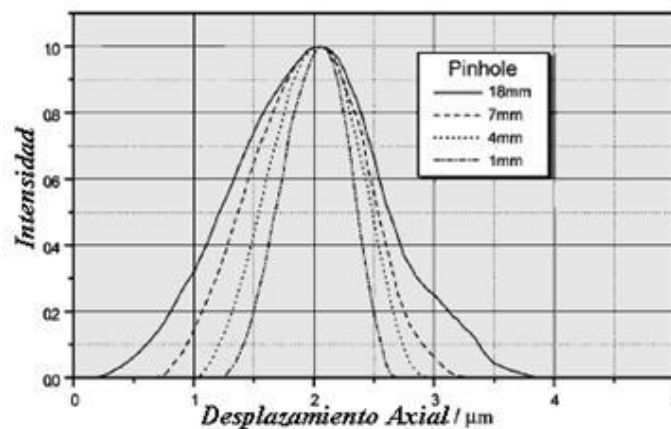


Figura 9. Según el tamaño del pinhole, la distribución de intensidades a lo largo del desplazamiento axial se puede ver afectada, ya que el ancho de esta distribución también va a cambiar

En el microscopio confocal se produce un pico más agudo en el disco central del patrón de Airy, en el caso del criterio de Rayleigh se define como:

$$XY_{res}^{conf} = 0.4 \frac{\lambda}{NA_{obj}} \quad (6)$$

Si se trabajara con un microscopio confocal, se obtendría una resolución mejorada; bajo las mismas condiciones de longitud de onda, pasaría de $0.39\mu\text{m}$ (dado por el microscopio de campo claro) a $0.26\mu\text{m}$ ofreciendo mayor detalle en la obtención de imagen.

Refiriéndose a la dirección axial (resolución a lo largo del eje óptico), la distribución de intensidad es similar al disco de Airy en la dirección lateral. Así como para la resolución lateral, la resolución axial define la distancia mínima que puede estar la separación en el eje z. Se describe por la distancia entre la intensidad máxima de la región luminosa central y el primer punto de intensidad mínima a lo largo del eje z. La intensidad del patrón de Airy por un microscopio convencional disminuye por un factor de n^2 , donde n es una medida de desplazamiento lateral en las unidades ópticas. En comparación con un microscopio confocal, la intensidad disminuye por un factor de n^4 . Esto tiene un efecto en la resolución del microscopio, dando una mejora en la resolución lateral para el confocal de 1.5 sobre el microscopio convencional cuando se aplica el criterio de Rayleigh.

El modelo de Airy, conocido también como función de dispersión del microscopio, da la apariencia observada de un objeto. La distribución de energía del patrón de Airy fue calculado como resultado de la observación de cuentas fluorescentes. Las funciones de dispersión para un microscopio convencional y confocal son radiales, las secciones transversal de la intensidades para ambos microscopios se muestra en la figura 10. Con un microscopio convencional, la función de dispersión es

cónica, y se extiende sobre y debajo del punto objeto; en el caso de un microscopio confocal, la función de dispersión es cilíndrica y no se dilata mucho en la dirección axial.

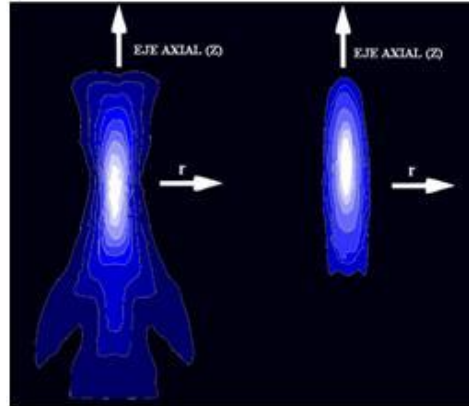


Figura 10. Funciones de dispersión experimentalmente determinadas para un microscopio convencional (lado izquierdo) y un microscopio confocal (lado derecho) [14].

En un microscopio de campo claro, la forma cónica de la función de dispersión representaría un objeto que, posicionado unas micras sobre o debajo del plano focal aparecería más grande y borroso. Sin embargo, en un microscopio confocal, los pequeños PSF cilíndricos significarían que cuando un objeto es movido fuera del plano focal, la intensidad es reducida, sin borrado, hasta que el objeto desaparece de la imagen [6], [14].

Para un microscopio de campo claro, dos objetos puntuales, separados por una pequeña distancia a lo largo del eje óptico, pueden ser resueltas si los picos de sus patrones de Airy están separados por la siguiente distancia:

$$Z_{res}^{conv} = 2 \frac{\lambda}{NA_{obj}^2} \quad (7)$$

Donde Z_{res}^{conv} es la resolución axial del microscopio de campo claro. Con los datos del microscopio trabajado para esta tesis, se puede encontrar teóricamente una resolución axial de $1.99\mu\text{m}$.

Hay que agregar que también la profundidad de resolución del microscopio puede definirse como la distancia entre los puntos del máximo medio.

En la aproximación paraxial con $n=1$, la ecuación es definida por la relación:

$$\Delta Z_{res}^{conv} = 0.886 \frac{\lambda}{NA_{obj}^2} \quad (8)$$

Las aberraciones en el sistema óptico hace que se incremente la respuesta de la profundidad y producen un modelo de lóbulo lateral asimétrico (es decir la distribución a la derecha e izquierda del punto máximo no es simétrico, ver figura 11). Aunque, el volumen focal tendrá siempre una forma elíptica; estos resultados son comunes en las lentes objetivas de un microscopio [17], [18].

El modelo de la curva de resolución axial es importante, ya que se busca un pico simétrico bien definido, picos más pequeños y valles a la izquierda de él, indicando los patrones de difracción para una lente aceptable, se obtiene de manera experimental y el resultado obtenido se utiliza como modelo para la obtención de la resolución axial de un sistema óptico, donde esta resolución es comparable con la ecuación definida anteriormente [12].

Una buena representación experimental de este hecho es la figura 11. La cual, haciendo uso de las imágenes adquiridas para este proyecto, se establece para el objetivo de 40x con el microscopio de campo claro, como el comportamiento en la intensidad de un punto transversal en el espacio, varía según el cambio en su posición axial. Pasos de una micra sobre un mismo punto iluminado.

Además, como en la gráfica se observa el patrón característico mencionado, de allí, para la resolución axial el ancho medio del lóbulo central es de aproximadamente 6μ . Este valor no es muy parecido a la resolución axial dada con las condiciones teóricas, sus diferencias se deben grandemente a la borrosidad presentada por el sistema de adquisición.

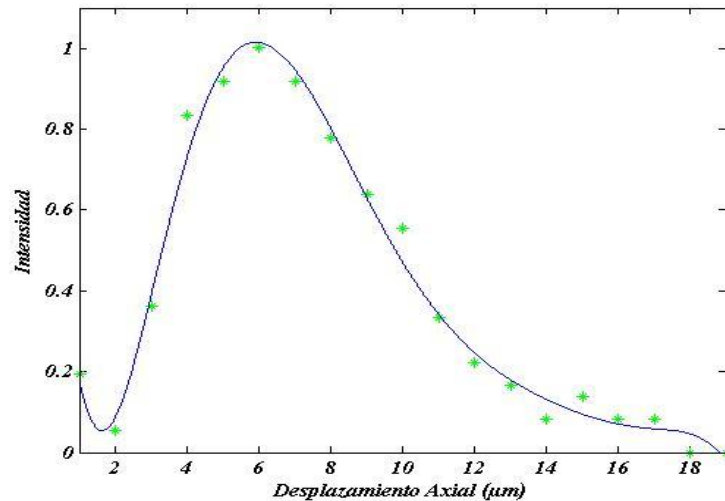


Figura 11. Resolución axial hecho con una lente 40x (NA 0.65), la intensidad del máximo-medio está medida en 6μ . Se muestra un pico mayor simétrico y un patrón de difracción que consisten en muy pequeños picos y valles. Este modelo es sugestivo para una lente de excelente-calidad.

En el microscopio confocal, el cambio en la distribución de energía del modelo de Airy para el criterio de Rayleigh lleva a un mejoramiento en la resolución de 1.4 (haciendo uso de las mismas variables como apertura numérica y longitud de onda, usados en el microscopio de campo claro), con dos puntos separados por la distancia:

$$Z_{res}^{conf} = 1.4 \frac{\lambda}{NA_{obj}^2} \quad (9)$$

Donde Z_{res}^{conf} es la resolución axial del microscopio confocal; y bajo las mismas condiciones del microscopio de campo claro, al comparar, se obtendría una resolución de $1.39\mu\text{m}$ [6], [14].

La resolución espacial óptima para la adquisición está dada por el teorema de Nyquist. Esta debe ser por lo menos dos veces la frecuencia espacial de la imagen con un objeto. En la práctica, esto significa imágenes obtenidas donde la resolución del pixel (0,3 micras) se ajusta para estar menos de la mitad de la dimensión de cualquier periodicidad dentro del espécimen.

Así, una lente objetiva de 10x con un $NA= 0.5$ es escasamente suficiente para resolver la línea periódica Z usando la luz visible (la resolución de XY $\approx 0.62/\mu\text{m}$ a 515 nm). Sin embargo, el teorema de Nyquist sólo establece los requisitos mínimos para la resolución espacial, el sobre muestreo ofrece ventajas distintas, particularmente resolviendo los rasgos más finos [12].

2.3 FUNCIÓN DE DISPERSIÓN (PSF)

Se puede obtener una mejoría en un resultado cuando se usan cuentas fluorescentes para generar un PSF (Función de Dispersión) para cada lente de apertura numérica particular, y reducir la aberración esférica que es más cuantitativo, y mejorar la resolución en el caso de otros métodos que remueven la información fuera de foco.

Como la convolución es el proceso por el que la imagen real se mancha por la suma de luz del fuera de foco para producir la imagen observada; el proceso de convolución afecta al 'microscopio ideal', Sin embargo, la convolución es ligeramente diferente en cada microscopio y varía entre los diferentes lentes de

alta NA. La deconvolución es un proceso computacional por el que la imagen real puede ser estimada de la imagen observada y la función de dispersión. Esta involucra procesos iterativos de cálculos en el espacio de Fourier, el cual es una descripción de imágenes como una serie de funciones de ondas [10].

La imagen formada se puede representar mediante la convolución de la señal original con la función de dispersión. Y se expresa matemáticamente:

$$g(x,y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} f(x,y)h(X-x,Y-y)dx dy \quad (10)$$

Donde la señal resultante $g(X_1,Y_1)$ en un punto (X_1,Y_1) en el espacio de salida es la superposición lineal de todas las contribuciones existentes en el punto (X_1,Y_1) , siendo $f(x,y)$ la señal original y $h(X-x,Y-y)$ la función de dispersión. Como consecuencia la señal de salida $g(X,Y)$ se una versión borrosa de la señal de entrada $f(x,y)$.

La ecuación anterior se escribe a menudo de una manera más concisa como:

$$g(X,Y) = f(x,y) * h(x,y) \quad (11)$$

El operador de convolución $*$ implica una integral en todo el espacio, es decir el volumen bajo la curva del producto $f(x,y)h(X-x,Y-y)$ (la región de superposición) es igual a $g(X,Y)$ en el espacio (X,Y) .

En realidad la imagen resultante es algo más compleja, teniendo en cuenta el ruido aditivo:

$$g(X,Y) = f(x,y) * h(x,y) + \varepsilon \quad (12)$$

En donde ε es el ruido agregado a la imagen que se adquiere [24].

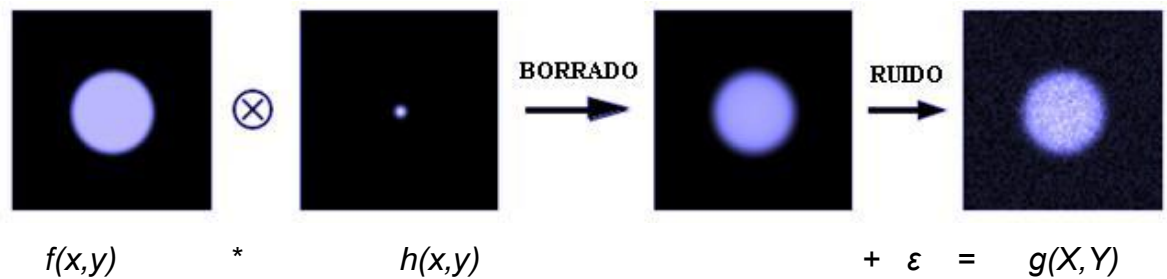


Figura 12. Vista de una imagen que es sometida a una borrosidad debido a la convolución de la función de dispersión con una imagen enfocada y al cual se le agrega ruido.

El proceso de deconvolución sigue un proceso inverso, en el cual se conoce la imagen $g(X,Y)$, la función de dispersión $h(x,y)$ y el efecto de ruido agregado, se busca obtener la señal original $f(x,y)$. El problema del uso de la deconvolución, es el conocimiento previo de la función de dispersión y del ruido agregado. Se usan entonces algoritmos repetitivos que busquen recoger la luz dispersa en las imágenes borrosas, o encontrar la función de dispersión experimentalmente en una deconvolución ciega, dando una claridad en la imagen resultante y estimar, como un derivado, la función de dispersión [7].

En un microscopio de fluorescencia se aplica dos tipos de distorsiones en la imagen, un borrado determinado por la función de dispersión y una distorsión estocástica (debido al ruido). Se puede formular una etapa de restauración de imagen, como la reconstrucción de la muestra original de la imagen adquirida que usa una función de dispersión y un modelo para el tipo de ruido de la imagen con a-priori conocimiento [7].

El punto más importante para apreciar, es que el software usado como herramienta en la deconvolución no afecta de manera importante la calidad de la imagen observada. La calidad de la imagen dependerá de la calidad del microscopio, la lente objetiva, la alineación y la igualdad de la iluminación, la estabilidad termal y mecánica del microscopio; la especificación de la cámara de CCD también puede ser importante.

En principio, los diferentes algoritmos de deconvolución deben producir los mismos resultados o similares, dando el mismo juego de imágenes de calidad superior y OTFs (función de transferencia óptica). Sin embargo, algunos paquetes comerciales no realizan una deconvolución 3D completa. Ellos usan en cambio un algoritmo de cercanía de vecindad o un algoritmo de deconvolución 2D que sólo reasigna la luz de fuera de foco o dentro de un solo plano focal, respectivamente [10].

En el microscopio la imagen de un punto producida por una lente es un spot extendido rodeada por una serie de anillos y un plano focal que está contenido en una tabla tridimensional de espesor finito. Estas propiedades son debido a la difracción de luz; la luz del iluminador esta difractada por el espécimen, recogido por la lente objetiva, y enfocado en el plano imagen, En donde las ondas interfieren constructivamente y destructivamente para formar una imagen de contraste.

Así, la imagen de un punto en un microscopio no es un punto en absoluto, pero es un patrón de difracción con un disco de diámetro finito.

Con especímenes iluminados en el microscopio, hay dos procesos de difracción: uno debido al propio espécimen y otro producido en la abertura del objetivo de la lente; la formación de la imagen por una lente es extremadamente dependiente en estos eventos. La difracción de luz en el espécimen permite a los objetos llegar a ser visibles y proporciona una base a la teoría de formación de imágenes. En cambio, la interferencia describe la recombinación y suma de dos o más frentes de ondas, siendo responsable de crear la imagen real intermedia de un objeto en el plano focal de un microscopio.

La difracción e interferencia son manifestaciones del mismo proceso, la manera tradicional de describir la interferencia es mostrando la recombinación de ondas

gráficamente en un trazado que ilustra su amplitud, la longitud de onda, y el desplazamiento de la fase relativa. Esta representación es muy similar a la descrita en el proceso de difracción de la luz. De acuerdo con construcciones de la onda del tipo mostrado en figura 13. [2]

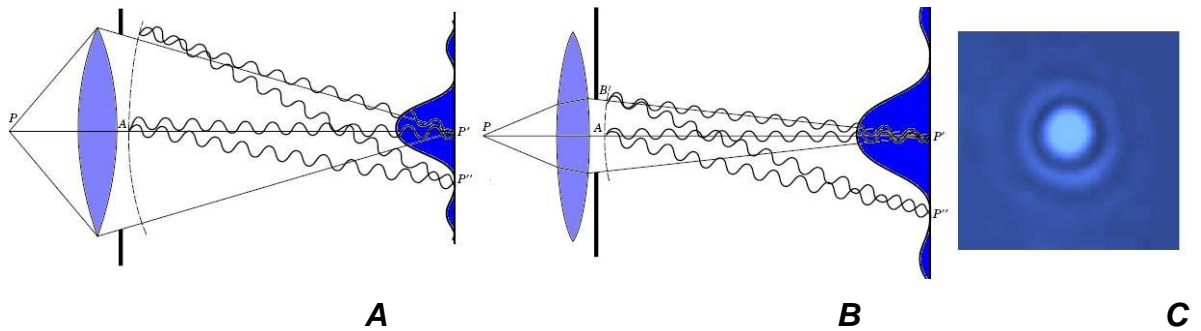


Figura 13. El ángulo de la abertura determina el tamaño de la mancha de difracción. **A.** Frente de onda con la apertura de la lente completa. **B.** Frente de onda con ángulo de la abertura reducido causado por la disminución parcial del diafragma. **C.** Mancha de difracción ó función de dispersión.

Para el caso experimental y según lo trabajado en esta tesis para la obtención de la función de dispersión, aunque no directamente, puede llegarse a adquirir transversalmente. Y es complicado para obtenerlo en una muestra biológica y en este caso por la distribución celular, ya que la respuesta del microscopio con una muestra fluorescente incoherente no se obtendrá una función de Airy, sino una superposición de intensidades en una región, y su imagen se difundirá con la función de dispersión; como resultado, la suma de todas estas superposiciones será la imagen definitiva registrada. Aún así transversalmente, se puede obtener de otra manera, y se liga al método de aumento de contraste trabajado en el presente proyecto con las imágenes que presentaron un mejoramiento en el contraste (ver capítulo tres) [7] [24].

Partiendo de una imagen borrosa, resultado de una imagen objeto recorrida a través del sistema y degradada por este. Se obtiene una imagen de mejor contraste, después del análisis y respectivo mejoramiento digital.

A la imagen resuelta no se le aplica el método de deconvolución con una función de dispersión ideal, sino el método de restitución de la iluminación a su posición ideal. Al disponer de una imagen borrosa, afectada por la función de dispersión y una imagen contrastada según este trabajo, se tiene la relación directa de convolución. Por este método se puede hallar una función de dispersión experimental partiendo de dichas imágenes.

En la figura 14 se encuentran tres funciones de dispersión del sistema en igualdad de condiciones (imagen obtenida del microscopio comparada con la imagen mejorada).

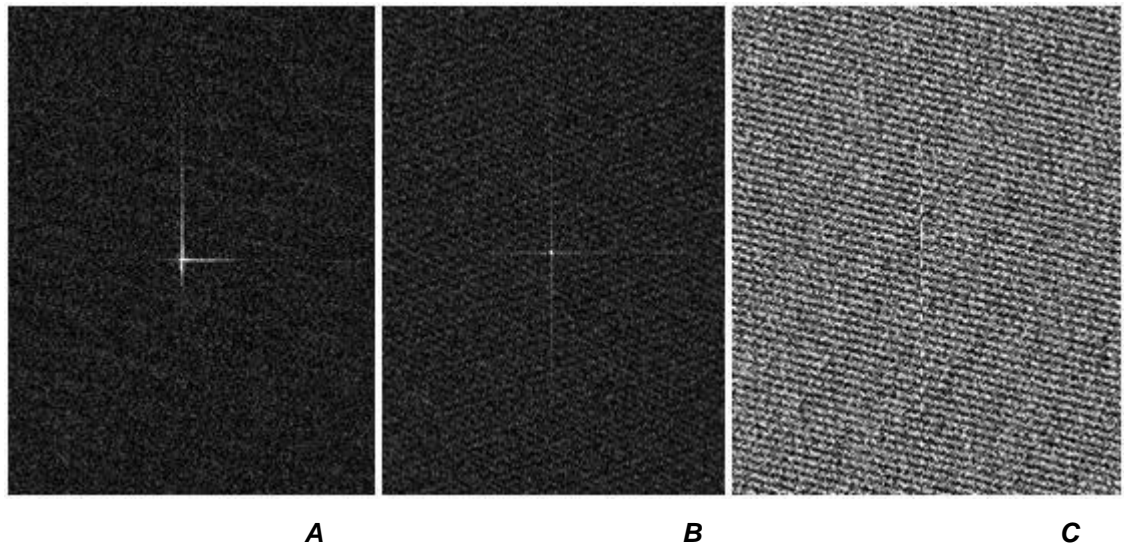


Figura 14. Funciones de dispersión obtenidas a partir de las imágenes borrosas y las imágenes corregidas presentadas al final de este trabajo, que corresponde al microscopio de campo claro trabajado en este proyecto. Esta función de dispersión es muy similar a la difracción de una rendija cuadrada y no a la difracción de una abertura circular como se esperaba.

La función de dispersión resultante no es presentada como la difracción de una abertura circular (una función sombrero), sino como la difracción de una abertura cuadrada y en su comportamiento presenta las fluctuaciones ondulatorias de la

función de dispersión circular. Dicha función es la responsable en la borrosidad de la imagen objeto en el sistema de adquisición hasta su captura dada por el sensor.

Debido a que la imagen borrosa se modela como una convolución de la imagen con la función de dispersión, en el dominio frecuencial, la convolución se transforma en una multiplicación de la transformada de Fourier de la muestra con la función de transferencia óptica (transformada de Fourier de la función de dispersión). Además, una simple forma de restauración de imagen es dividir la transformada de Fourier de la imagen por la función de transferencia óptica, este procedimiento es conocido como filtrado inverso.

El filtrado inverso como resultado no es tan usado debido a la gran amplificación de ruido; esta amplificación es causada por la reconstrucción del filtrado inverso de las altas frecuencias en el espectro de Fourier de la imagen. No solo están estas frecuencias dominadas por el ruido, también a estas frecuencias la función de transferencia óptica tiene bajas intensidades. Sin embargo, el filtro inverso divide las frecuencias del ruido dominante por valores bajos transferidos los cuales resultan en una fuerte amplificación del ruido en el resultado de restauración. El filtro inverso toma solo en cuenta la distorsión determinística, el borrado; el cual resulta en un inaceptable mejoramiento en imágenes ruidosas. Sin embargo se necesitan algoritmos sofisticados que tomen en cuenta, la distorsión determinística (borrosidad debido a la función de dispersión del microscopio de fluorescencia) y la distorsión estocástica (ruido aleatorio aditivo en la imagen, conocido como ruido de Poisson) [7].

Un camino común a restaurar la borrosidad en la presencia del ruido es la incorporación en la regularización del proceso de restauración de filtros lineales Wiener ó Tikhonov-miller. Ellos regularizan sus resultados por la restauración de frecuencias, las cuales son dominadas por el objeto y suprimen las frecuencias

que son dominadas por ruido. Así se evitan los problemas que surgen cuando se usa el filtro inverso.

Ambos filtros son espacialmente filtros invariantes, y no restringirán las intensidades en la restauración a valores positivos. Esta es una propiedad inaceptable de restauración de una imagen lineal, visto que las intensidades en una imagen fluorescente representan fotones del cual solo puede existir un número.

Sin embargo, estos filtros lineales restauran la imagen convolucionandola con un filtro de restauración. Estos filtros son aproximados al filtro inverso de las frecuencias dominadas por el ruido y a aquellas frecuencias a las cuales la función de transferencia óptica tiene valores bajos o cero. Restaurando frecuencias dentro del ancho de banda de la función de transferencia y sin ir más allá del ancho de banda de la función de transferencia [7].

Una buena función de dispersión tiene que ser simétrica, ver figura 14, la cual representa el resultados de obtención la función de dispersión del microscopio de campo claro aplicado a fluorescencia, utilizado en este proyecto. La figura 14-A, presenta una imagen, con su distribución de intensidad desviada, es decir la intensidad es menor hacia abajo e izquierda del punto central, en donde podemos obtener un perfil de dicha imagen (figura 15-A). En la figura 14-B la función de dispersión es centrada, pero el ruido sigue siendo un inconveniente. Aunque la función de dispersión es un óptimo resultado, tiende a mezclarse con el ruido de fondo reducido en el proceso de mejoramiento de contraste. Así en esta función de dispersión las ondulaciones se ven afectadas considerablemente con el ruido presente en la adquisición final.

La figura 14-C presenta un mejoramiento con respecto a las dos anteriores, es una función de dispersión centrada y aunque este en presencia de ruido, se puede

apreciar su comportamiento con ondulaciones predominantes. El perfil de dicha función se muestra en la figura 15-B.

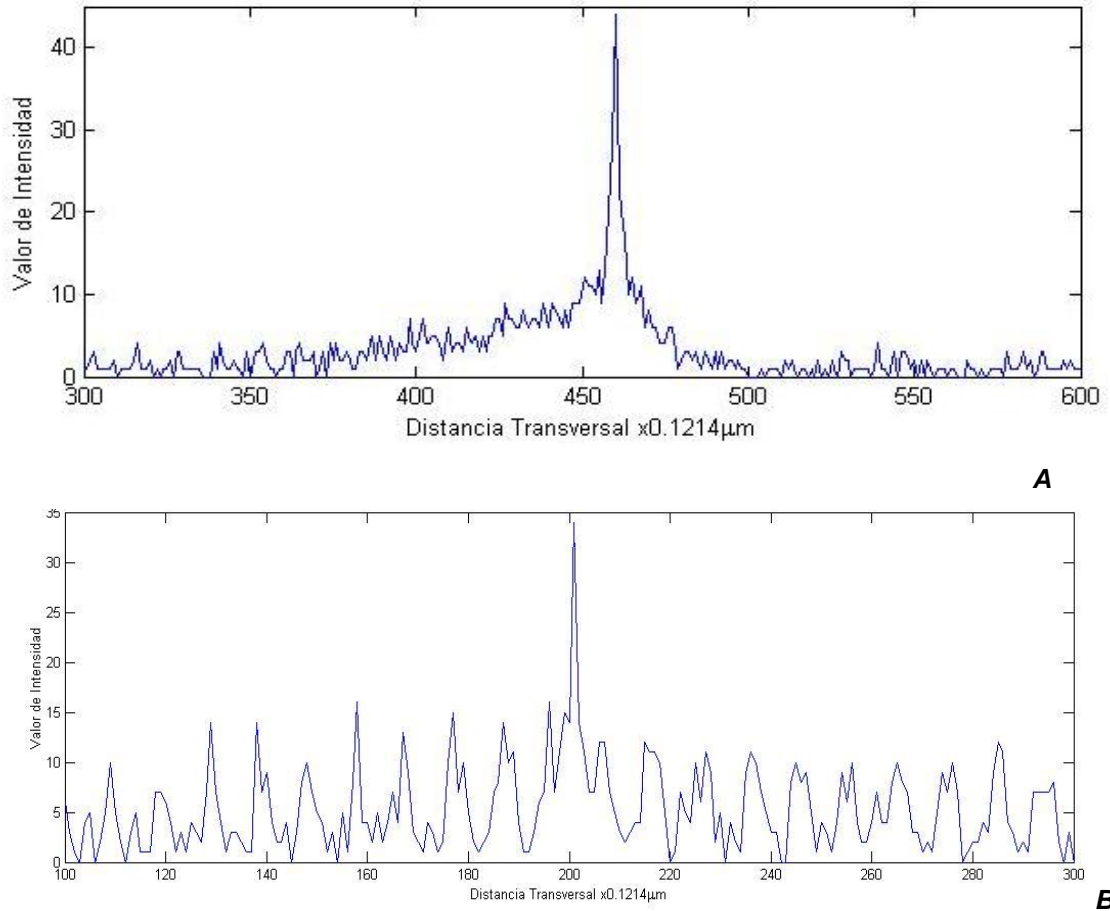


Figura 15. Perfiles de las funciones de dispersión experimentales de la figura 14-A y 14-C respectivamente. Nótese la periodicidad mas acentuada en la imagen B y el comportamiento del mismo.

La figura 15-B ilustra el perfil de la función de dispersión, y en el centro del perfil se encuentra el máximo de intensidad y en cual se puede apreciar un comportamiento similar al función de dispersión teórico (téngase en cuenta la presencia de ruido y como este afecta la distribución de la intensidad en la misma) [7].

A modo experimental y según el mejoramiento adaptativo final de las imágenes. Comparado este resultado con el obtenido en el disco de Airy, la resolución del sistema estará dada por r_{Airy} que es la distancia del punto central de máxima intensidad a su primer mínimo más cercano.

Así, para el perfil de la función de dispersión experimental, el primer mínimo a la derecha del pico más alto es de $4 \cdot 0.1214$ micras y el primer mínimo a la izquierda es de $3 \cdot 0.1214$ micras, lo cual se llega a una distancia media de:

$$r_{Airy} = 3.5 \cdot 0.1214 = 0.4249 \text{ micras} \quad (13)$$

Con 0.1214 como el factor de escala según la adquisición; en comparación con la resolución transversal establecida para el microscopio de campo claro trabajado (valor igual a 0.39 micras), se encuentra una diferencia alrededor de 0.03 micras. Valor apreciable para ser comparado con la función de dispersión de la óptica del sistema.

2.4 RUIDO AGREGADO EN LA ÓPTICA

Uno de los principales inconvenientes que presentan las cámaras digitales de todo tipo es el denominado ruido electrónico, debido a que tiene naturaleza aleatoria que no es posible anularlo. Este ruido depende principalmente del sensor y de la electrónica, de manera que los resultados varían entre distintas cámaras. Este aumenta con la “sensibilidad” o “ganancia” seleccionada (a mayor índice de sensibilidad, mayor ruido) y disminuye con el tiempo de exposición. En imágenes tomadas a plena luz de día, el ruido apenas es visible, porque la imagen contiene mucha más luz (señal) que ruido, pero al fotografiar objetos de poca iluminación, el ruido aditivo será considerable.

A menudo una cámara CCD se usa para registrar la intensidad de luz, esta consiste en una serie de detectores (píxeles); cada detector adquiere la luz que lo alcanza simultáneamente, y el número de fotones adquiridos se convierte a un valor discreto de brillo.

Esto permite modelar la adquisición de una imagen con una cámara CCD como una convolución de la imagen con la función de respuesta de un elemento de la CCD [7].

La señal de ruido es usada para describir la exactitud fotométrica de la señal de un objeto. En términos cualitativos, se usa la señal de ruido para describir la claridad y visibilidad de objetos en una imagen.

La señal de ruido es calculada como la señal del objeto (señal total menos la contribución de la señal de fondo) dividido por el ruido del fondo circundante (la desviación normal de la señal de fondo), cuando se describe la actuación de una cámara CCD, la señal de ruido, es calculado por lo referente a un solo píxel.

La importancia del ruido presente en una imagen se aprecia fácilmente cuando se hace una observación directa a una imagen tomada en la oscuridad, al examinarla con detalle, no se observa una intensidad nula uniforme, sino que se presentan variaciones de intensidad, con una sensación granosa; por lo tanto, el ruido que registra un sensor se convierte en el ruido principal para la imagen. Así, una cámara que posea una baja sensación granosa (bajo ruido leído) tendrá como consecuencia una imagen con más claridad [2].

La señal de ruido es un parámetro aceptado para describir la calidad de la imagen. Usando la teoría de señal de ruido, se puede:

- Proporcionar un descriptor cuantitativo de la calidad de imagen. El nivel de ruido se indica por la relación señal-ruido (también denotada como relación S/N o SNR). S/N es el parámetro aceptado para describir la visibilidad y claridad de un objeto en una imagen y comparar la calidad de imágenes entre ellos.

- Determinar la probabilidad que una señal débil es distinta del fondo. Esto puede ocurrir si se compara los cambios en la intensidad de fluorescencia en respuesta a una condición experimental y determina si un cambio en la fluorescencia fue estadísticamente significativo.

- Calcular el tiempo mínimo de exposición requerido para obtener una señal dentro de un cierto nivel de confianza, y determinar el tiempo medio de recuperación de fluorescencia de una secuencia de imágenes. Sin embargo, también es importante mantener el tiempo de exposición a un mínimo para evitar el daño fotónico. Por otra parte, las imágenes interesantes requieren exposiciones largas que pueden matar una célula viviente, pero no es necesario para el trabajo cuantitativo.

Para determinar la señal de ruido de un objeto en una imagen digital, hay que considerar la definición de señal de ruido y sus condiciones de componentes. La señal de ruido puede usarse para determinar el tiempo de la exposición mínima exigida para obtener una imagen con el criterio requerido, esta relación se define como el cociente entre la luz (señal) y el ruido captado.

A mayor señal (para un mismo ruido), la relación aumenta y se mejora la calidad de la imagen. En ciertas tomas para elevar la SNR se deben captar muchos frames individuales y sumarlas. Si se tiene n imágenes I con un ruido, σ , la imagen final será (aplicando la ley de propagación de errores):

$$\sigma = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \dots + \sigma_n^2} = \sqrt{n * \sigma^2} = \sigma\sqrt{n} \quad (14)$$

La SNR final será:

$$SNR = \frac{I_1 + \dots + I_n}{\sigma\sqrt{n}} = \sqrt{n} \frac{n \cdot I}{n \cdot \sigma} = \sqrt{n} * SNR_{original} \quad (15)$$

Es decir la señal-ruido final mejorará con la raíz cuadrada del número de imágenes. Por ejemplo, en un vídeo de 100 frames la SNR se mejorará 10 veces.

En las imágenes adquiridas del microscopio, las componentes de la señal principal son los fotoelectrones correspondientes al objeto, el fondo subyacente, y a las señales termal; los ruidos principales son el ruido del fotón y el ruido de lectura de cámara.

Las estadísticas del conteo de fotones son basados en el número de fotones convertido a los electrones por el detector, y correspondientemente, la señal de ruido siempre es calculada en electrones (nunca en términos de unidades análogo a digitales, el cual son los valores asignadas a pixeles en imágenes digitales). El electrón equivalente a un ADU (Analogic Digital Units – Unidades Analógicas Digitales también llamadas cuentas, que indica cuantos electrones son codificados por cada bit) está dado como ganancia por ADU, donde la ganancia es el número de electrones por unidad digital.

Pueden aplicarse las estadísticas de señal de ruido en un par de pixeles bases para describir la actuación de equipo, o a un grupo de pixeles cuando describen un objeto extendido en una imagen.

El número de fotones grabados por la cámara sobre un intervalo discreto de tiempo y espacio es estocástico, en donde las acumulaciones de las señales foto-electrónicas describen la distribución de Poisson. Si la señal del fotón es grande, el ruido se considera como el ruido del fotón principal, que se describe como la desviación normal de la señal de amplitud señalada en los fotoelectrones.

Para una distribución de Poisson, la desviación normal (y por consiguiente el ruido del fotón) simplemente es la raíz cuadrada de la señal. El hecho que el ruido del fotón sea la raíz cuadrada de la señal explica por qué la señal de ruido debe calcularse en electrones, y no en ADUs.

Una imagen es considerada a estar limitada por el fotón si el ruido fotónico de la señal del objeto es más grande que el ruido leído de la cámara. Por ejemplo, para una cámara CCD con ruido de 15 electrones, tenemos que esto ocurre cuando el fotón corregido cuenta los objetos alcanzados ≈ 255 electrones (≈ 20 ADU/pixel), sin embargo a este nivel el ruido fotónico es $\sqrt{255}$ o 15 electrones, ruido leído de la cámara.

Bajo las condiciones de fotón limitado, la S/N aumenta en proporción a la raíz cuadrada del tiempo de exposición o la raíz cuadrada del número promediado de imágenes. La S/N pobre de una imagen oscura puede mejorarse grandemente simplemente aumentando el tiempo de la exposición. Por esta razón, pueden ser adquiridas imágenes así esté el brillo en la imagen en la aproximación del nivel de saturación de la cámara [2].

Una propiedad importante de las cámaras CCD es su alto grado de linealidad en todo el rango de cuentas (definido por el número de bits soportado por cada píxel, píxeles de 12 bits soportarán un rango de cuentas de $2^{12} = 4096$). Sin embargo, si se quiere usar la cámara para medidas fotométricas de alta precisión, hay que averiguar si ésta realmente responde linealmente en todo el rango dinámico.

Para ello puede calcularse el factor de conversión entre electrones y ADU (llamado ganancia) y el ruido de lectura a partir de dos imágenes de bias (B1 y B2, imágenes de corriente de oscuridad con tiempo de exposición cero) y dos de flat (F1 y F2, normalmente flats de cúpula o dome flats) para distintos números de cuentas (calculadas a partir de medias de los flats).

El valor de estos parámetros será:

$$\begin{aligned} \text{ganancia}[e^-/ADU] \\ = \frac{((\text{media}F1 + \text{media}F2) - (\text{media}B1 + \text{media}B2))}{\text{sigma}^2(F1 - F2) - \text{sigma}^2(B1 - B2)} \end{aligned} \quad (16)$$

$$\text{ruido de lectura}[e^-] = \frac{\text{ganancia} * \text{sigma}(B1 - B2)}{\sqrt{2}} \quad (17)$$

Donde media y sigma (o desviación estándar) de una imagen se definen como:

$$\text{media}(Im) = \frac{1}{N * M} \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M Im(x, y) \quad (18)$$

$$\text{sigma}^2(Im) = \frac{1}{N * M} \sum_{x=1}^N \sum_{y=1}^M (Im(x, y) - \text{media}(Im))^2 \quad (19)$$

La medida en ADU para las imágenes de bias y de flat es:

$$ADU = \frac{\text{media}(F1 + F2 - B1 - B2)}{2} \quad (20)$$

Esta última ecuación resulta en un parámetro sin dimensiones, usado para realizar la gráfica de linealidad, ya que la capacidad de un sensor CCD es proporcionada por los electrones.

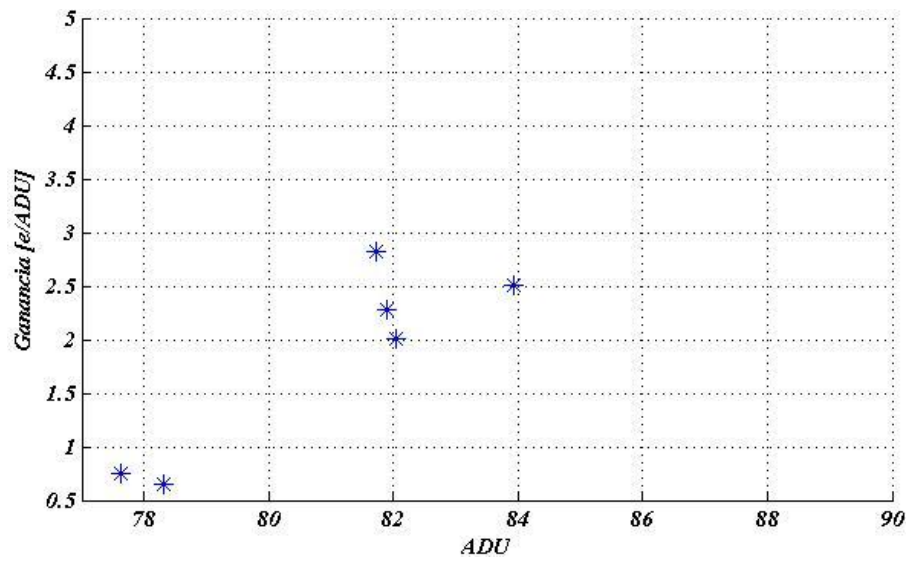
Los valores N, M representan las dimensiones de toda la imagen o de un área significativa. Variaciones bruscas de la ganancia o el ruido de lectura indican que se está fuera de la linealidad.

También es necesario que la cámara permita tomar corrientes de oscuridad a tiempo de exposición cero (bias) y campos de iluminación uniforme (flats) a distintos tiempos de exposición.

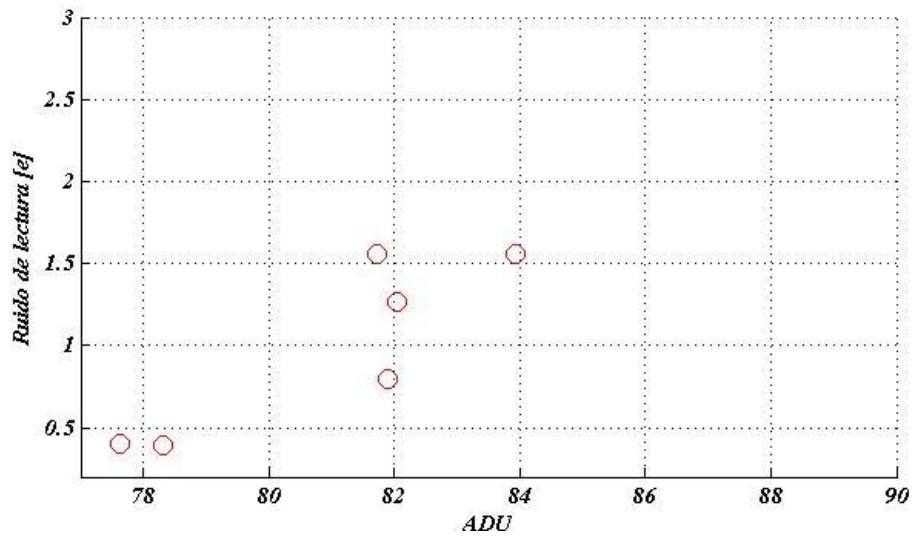
Los sensores CCD no tienen una respuesta lineal en todo su intervalo de registro, ya que si esta capacidad se supera en más de la mitad, se estaría empezando a perder la linealidad, una característica de ello, y para que no se pierda linealidad, es que los valores de la intensidad de las imágenes claras y por lo tanto de la ADU no sobrepasen la capacidad media del sensor, unos 128 ADUs.

Aplicando lo mencionado anteriormente al stack de imágenes que se adquirieron para esta tesis (aproximadamente de 400 x 300 pixeles), y como parte del estudio experimental del dispositivo de adquisición de las imágenes de muestras biológicas, el sensor de la cámara digital NIKON Coolpix presenta el mejor régimen de linealidad a bajo número de cuentas (figura 16). La linealidad se conservará por lo tanto, para los puntos (ganancia vs ADU) o conjuntos de imágenes en las cuales éstos se encuentren agrupados, si algún punto se separa del grupo se estaría perdiendo linealidad.

El punto equivalente a 84 ADU's (adquirido a un mayor tiempo de exposición) se va acercando al valor medio de la capacidad del sensor, por lo tanto, se empieza a separar del conjunto de valores obtenidos. Si se obtuvieran imágenes de bias y flats a un tiempo mucho mayor, se obtendrían puntos más distanciados del conjunto adquirido inicialmente [21].



A



B

Figura 16. A. Ganancia y B. SNR para la CCD de las imágenes adquiridas. Véase al punto más lejano del conjunto de datos (equivalente a 84 ADU's) fue tomado a un tiempo mucho mayor y como altera los resultados [21].

3. MEJORAMIENTO EN IMÁGENES

La microscopía de fluorescencia es una técnica excelente para estudiar materiales, los cuales pueden hacerse fluorescentes, o, en su forma natural (primaria ó auto fluorescente); ó, cuando tratados con químicos son capaces de ser fluorescentes (secundaria ó fluorescencia). Esta forma de microscopía óptica tiene un rápido crecimiento en las áreas de investigación que hacen uso del microscopio [4].

Para la microscopia confocal, se hace una estimación de la intensidad a percibir en base al TPM (tubo fotomultiplicador), el cual separa la intensidad de fluorescencia que puede aportar información de la intensidad de aquel que no lo haga; siendo este un discriminador para el contraste en la adquisición. Ahora, para la microscopia de campo claro, no se cuenta con este elemento y por lo tanto el registro en la adquisición será de todos los factores que aporten iluminación a la misma.

Para la adquisición de las imágenes presentadas en este proyecto, se uso el microscopio de campo claro **Nikon Eclipse ME-600** adaptado con un equipo para la adquisición de especímenes biológicos por fluorescencia, por transmisión y reflexión.

El montaje utilizado para trabajar con las muestras biológicas se presenta en la figura 17, y posee las siguientes características:

- Cámara de adquisición: Nikon Coolpix P6000
- Cubo de filtros: UV-2A, Ex 330-380nm, Em 420nm.
- Las muestras biológicas presentadas en este trabajo fueron donadas por el Centro de investigación en enfermedades tropicales (Cintrop), estas son:
 - Células carcinoma uterino

- Células sanguíneas (THP1)

Comparando directamente la microscopia de fluorescencia de campo claro y la microscopia de fluorescencia confocal, a diferencia de la microscopia de fluorescencia confocal, las imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia de campo claro poseen un decaimiento a partir del borde, que contiene información y decae radialmente hasta un espacio que no contiene información suficiente o nula de las características del espécimen. Pero debido a la auto-fluorescencia aporta un valor de intensidad (este valor va decayendo a medida que la distancia de separación del espécimen al espacio que le rodea se incrementa).

Haciendo la comparación con el proceso que tiene lugar entre la luz y un material en particular, se tiene la suposición que, siguiendo el recorrido a través de un material con un espesor determinado, se revela como la intensidad emergente (I que depende de la longitud de onda), se relaciona con la intensidad incidente (I_0) por medio de la expresión de Beer–Lambert:

$$I(\lambda) = I_0 e^{-k(\lambda)x} \quad (21)$$

Con k como el coeficiente de absorción del material, y x es el recorrido seguido.

La figura 18 muestra como se puede resaltar el contraste de la imagen al estudiar el comportamiento de la intensidad en sitios donde pertenece y no pertenece la intensidad a la muestra o precisamente secciones donde se presenta la fluorescencia y la auto-fluorescencia.

Si se entiende la auto-fluorescencia como el efecto de iluminación sobre el espacio debido a las moléculas fluorescentes que rodean dicho espacio, se puede interpretar que este no aporta información real del espécimen y que por lo tanto hace parte del ruido de la señal percibida, y ésta ha de suprimirse.

Al estudiar el espacio donde limita el borde de la muestra con su entorno, se presenta un decaimiento del nivel de intensidad hasta hacer parte del ruido de fondo de la imagen adquirida (línea azul figura 19).



Figura 17. Montaje realizado para la adquisición de las imágenes fluorescentes trabajadas.

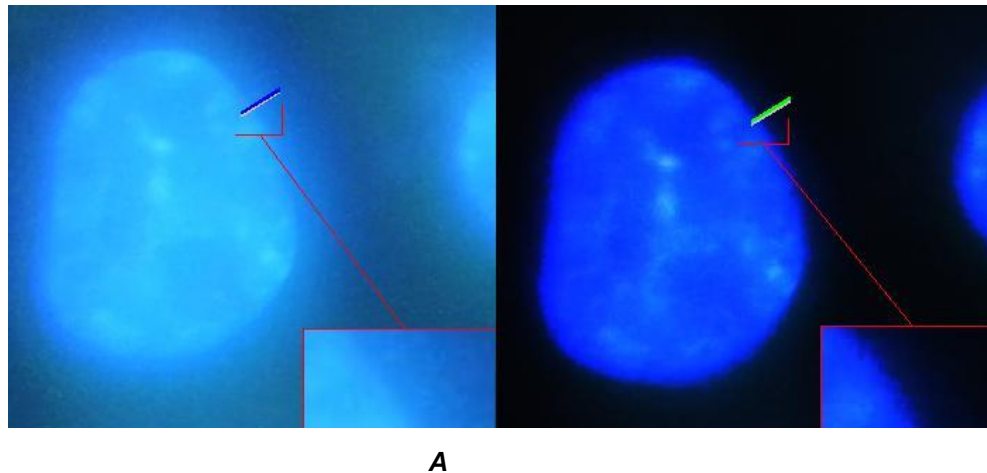


Figura 18. El contraste puede mejorarse partiendo de la imagen A y resultar en la imagen B al aplicarse un método para acentuar la fluorescencia de la muestra y reducir la auto-fluorescencia. Imágenes de dimensión $42.3\mu\text{m} \times 38.1\mu\text{m}$ aproximadamente

Para el caso estudiado aquí de auto-fluorescencia, el decaimiento de intensidad es similar a la expresión de Beer-Lambert, ya que esta depende de los pasos seguidos, y k seguirá siendo una constante para la sustancia en que se encuentra el fluoroforo. De esta manera el decaimiento espacial de la intensidad se puede interpretar matemáticamente como una caída exponencial (línea roja, figura 19), para ello se hace una interpretación general:

$$F(r, I_{fin.}) = I_o * e^{-k(r I_{ini.})} \quad (22)$$

Donde r es la variable independiente (recorrido espacial transversal), y el comportamiento en la caída de la intensidad (I_o , k) está directamente ligado a las condiciones ofrecidas en la adquisición del stack de imágenes. La ecuación anterior presenta un decaimiento de tipo exponencial, pero ligado a las condiciones de adquisición ($I_{fin.}, I_{ini.}$), punto de saturación, de mínima intensidad y comportamiento en la caída que puede ser adaptada a los datos obtenidos para así atenuar los factores de ruido que afectan a la imagen y pueden ser reducidos significativamente, sin afectar directamente las regiones pertenecientes a la fluorescencia absoluta del espécimen.

Las características de la intensidad en cualquier punto de la imagen no debe depender de la posición que se encuentre en ese momento, debe depender de la intensidad misma presentada en la imagen, lo cual conlleva a redistribuir la intensidad percibida por el sensor a lo largo del eje axial independientemente de la posición transversal. Por lo tanto para una posición determinada con una intensidad dada, va a tenerse para dicha posición un nuevo valor de intensidad, que decaerá fuertemente si no se encuentra con un valor cercano al de la intensidad predominante del fluoroforo, pero se mantendrá sin grandes cambios en el caso opuesto. En este caso el valor de la distribución está dado por la constante k que dependerá de las condiciones iniciales de toda la imagen.

De esta manera, las regiones del espécimen o muy cercanas a ellas mantienen sus características fluorescentes, mientras que aquellas que no pertenecen a dicha región, decaen considerablemente junto con algún factor de ruido haciendo que esta se despliegue al ruido de fondo presentado por la imagen (línea verde figura 19). La figura 18 ilustra el decaimiento exponencial de la fluorescencia como una característica manejable con un contraste adaptable, sin afectar considerablemente los detalles presentes en la imagen adquirida; cuyo trazo señalado esta mostrado en la figura 19.

Por consiguiente, la sección ampliada de la figura 18, ilustra cómo el contraste se puede incrementar al analizar los factores que intervinieron en el aumento de intensidad en la imagen, en regiones que corresponden al ruido de fondo, ó de intensidad nula.

Analizando las longitudes de onda que intervienen en el proceso, en la microscopía de fluorescencia las moléculas fluorescentes en el objeto iluminado están excitadas por una luz incidente λ_{ext} , las moléculas excitadas emiten luz de longitud de onda λ_{emi} que es reunido por el microscopio formando una imagen

fluorescente. La diferencia $\Delta\lambda$ entre el λ_{em} y λ_{ex} es la banda de Stokes de la molécula fluorescente.

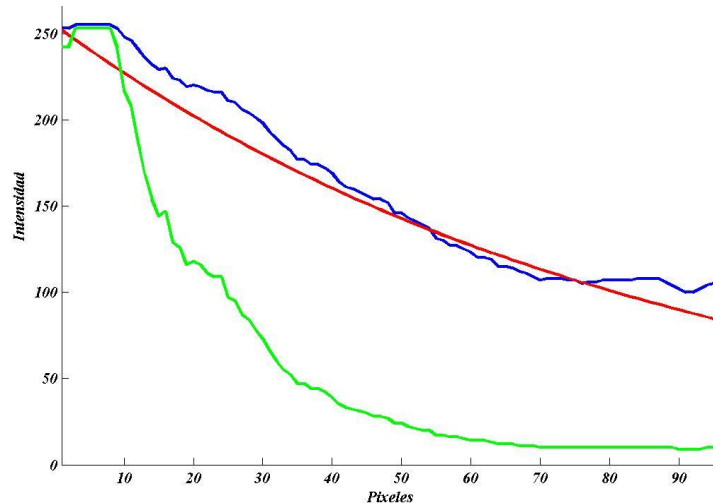


Figura 19. Representación del decaimiento exponencial en una región señalada de la figura anterior; la línea azul pertenece a la muestra biológica con borrosidad y auto fluorescencia, la línea roja pertenece a un decaimiento teórico de la máxima intensidad hasta la mínima con respecto a la línea azul, la línea verde pertenece a la imagen después de aplicar un decaimiento exponencial con respecto a la máxima intensidad experimental.

La banda estimada para el fluoroforo Hoechst 33342 es de aproximadamente 110nm y del cubo de filtros es de 65nm según lo trabajado de este proyecto (figura 20).

De la excitación y emisión, se puede interpretar la intensidad de iluminación como la cantidad de luz que se proyecta desde la fuente hacia la muestra. Esta iluminación determina la probabilidad que un fotón de excitación "golpee" una molécula fluorescente en un cierto punto en el objeto. Semejantemente la detección de la intensidad cuantifica la probabilidad en que un fotón fluorescente emitido desde un punto en el objeto se pueda propagar al sensor de la cámara.

La detección de intensidad es por consiguiente dependiente de la intensidad de excitación y de la luz de emisión. Un modelo general de epi-fluorescencia asume que la iluminación y la detección están limitadas por el tamaño finito de las aberturas.

En un microscopio de fluorescencia de campo claro, la apertura de iluminación es determinada por el tamaño del diafragma; en un microscopio confocal por la iluminación de un pinhole.

La apertura de detección es determinada por el tamaño del pinhole de detección en el caso de un microscopio confocal, y por la cámara en el caso de un microscopio de campo claro [7].

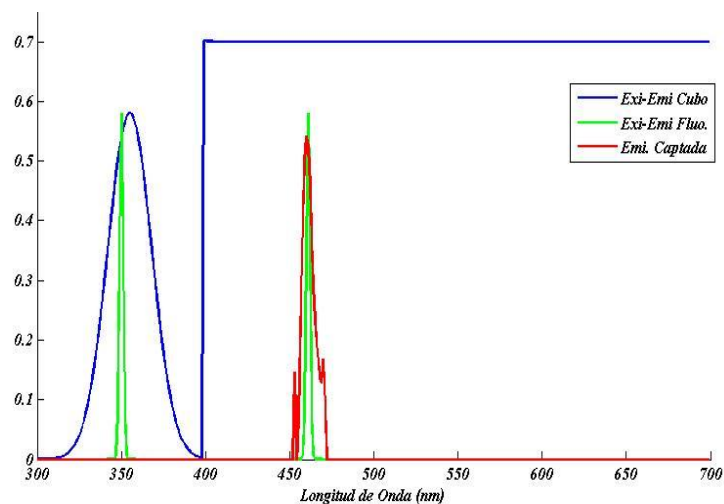


Figura 20. Bandas de Stokes referidas: línea azul por el cubo de filtros, línea verde por el fluoroforo Hoechst 33342, y la línea roja es la emisión percibida por la cámara.

Para las imágenes presentadas, no sólo la muestra iluminada contribuye a la intensidad adquirida en la imagen, también contribuye la intensidad de fondo originada con la auto-fluorescencia, la dispersión y compensación en la ganancia del detector. Además, el ruido puede distorsionar la imagen; una ilustración de la formación de la imagen registrada por un sensor en un microscopio de fluorescencia se da a continuación [7].

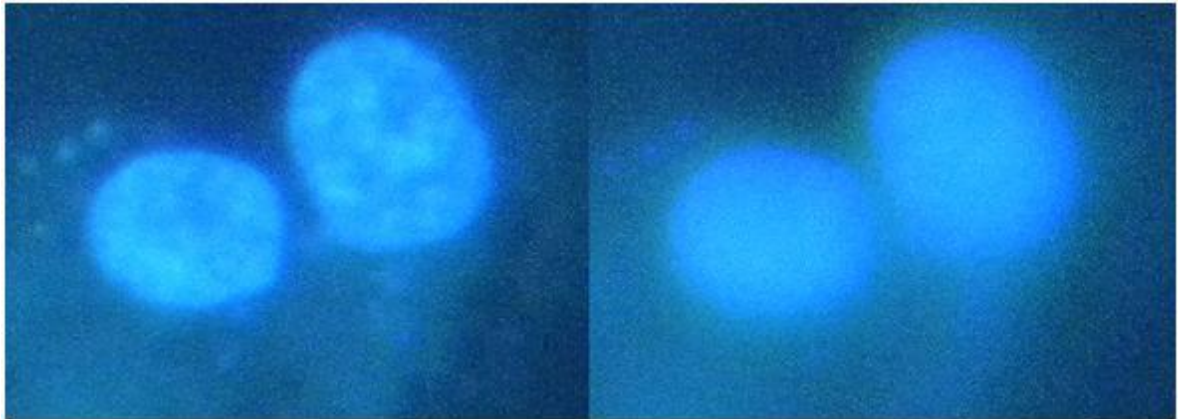


Figura 21. Células de THP1 adquirida a diferentes posiciones axiales en el cual se presenta pérdida de información debida a la cámara y al microscopio. Dimensiones de las imágenes: $60.7\mu\text{m} \times 48.6\mu\text{m}$ aproximadamente.

La microscopía de luz proporciona la única posibilidad al experimentador de examinar las muestras vivientes bajo las condiciones similares a aquéllos encontrados en su estado natural. El progreso en la biología celular, molecular y la microscopía, ha hecho posible la adquisición de datos multidimensionales que involucran las actividades celulares rápidas.

Estas observaciones se logran por medio de la microscopía de seccionamiento óptico en el que se graban imágenes cuando el plano focal es rápidamente movido a través de la muestra. El proceso tridimensional (3D) de adquisición se repite varias veces durante un período dado, llevando a un stack de imágenes; esto resulta en una adquisición cuatro-dimensional (4D): tres dimensiones espaciales más la dimensión de tiempo [6].

La microscopía confocal y la microscopía de campo claro involucran el seccionamiento óptico; aunque fundamentalmente diferente, ambos, son basados en el mismo proceso de formación de imagen producida por un objeto de fuente puntual.

Los adelantos en la microscopía de fluorescencia, detectores, motorización y procesamiento de imágenes digitales hacen posible la colección rutinaria de dos y tres dimensiones para las muestras biológicas; en tres dimensiones, el objeto está ópticamente seccionado plano por plano en un proceso que involucra el desplazamiento continuo del plano focal a lo largo del eje óptico. El objetivo o la muestra pueden ser movidos para cambiar el plano focal y adquirir la correspondiente imagen de la sección 2D.

Las adquisiciones de una célula viviente apuntan a capturar rápidos eventos en 3D, que tienen proporciones de señal de ruido bajas, para conservar la viabilidad celular y fluorescencia.

Un efecto muy notable del desvanecimiento es la diferencia en la distribución de intensidad entre los objetos pequeños y grandes. La teoría de formación de imagen clásica, asume que el proceso de formación de imágenes 3d de un microscopio de fluorescencia es lineal y de cambio invariante.

Esto implica, que una simple función de dispersión 3D (la imagen de una simple fuente puntual) es suficiente para describir la formación de la imagen completamente a lo largo del objeto espacio 3D. Desafortunadamente, el cambio de invariancia no siempre se demuestra, y la función de dispersión es a menudo una función de la locación de la fuente puntual en el espacio del objeto. Más frecuentemente, el cambio de invariancia no aplica en la dirección axial.

El cambio de la varianza axial resulta del uso de objetivos en condiciones no optimas, esto es el caso para la observación de especímenes biológicos, particularmente en la microscopía de células vivientes, en el cual los pasos de luz emitido a traviesan el medio con diferentes índices de refracción [6].

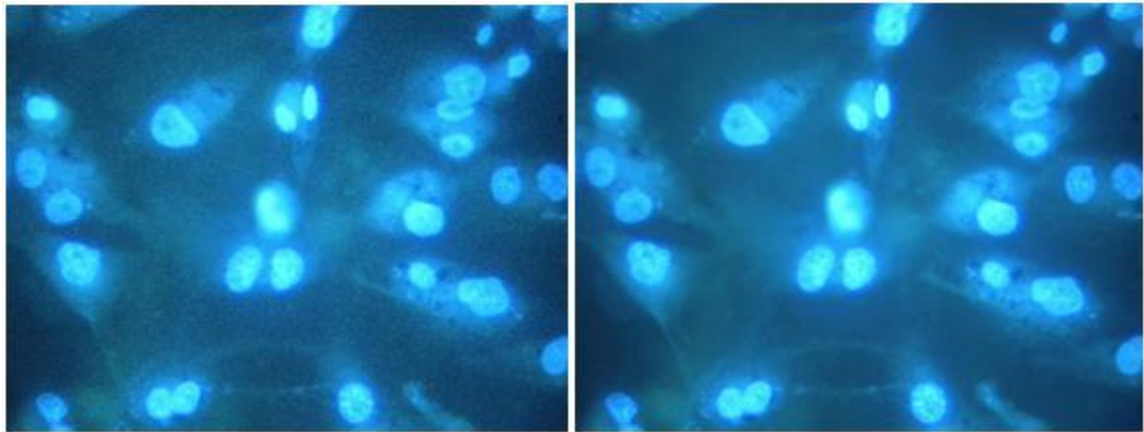
Es inevitable que la imagen final no sea perfecta, afortunadamente, hay muchas herramientas de procesamiento de imágenes que pueden ser aplicados a la imagen en orden para corregir algunos de estos defectos en la imagen final.

La primera técnica es la imagen promediada y una segunda la transformada wavelet. En la primera técnica, la imagen observada está compuesta por dos componentes: la señal verdadera, y una cantidad agregada de ruido al azar sobrepuesto a la señal. El término ruido hace referencia a las variaciones aleatorias en la señal de intensidad, caso diferente a las distorsiones como obscurecimiento o falta de enfoque.

La imagen se transforma varias veces durante su camino del microscopio a su eventual formato digital dentro del computador; en cada fase, el ruido puede estar simplemente introducido por el propio proceso de digitalización; es posible reducir los niveles de ruido, pero no se pueden eliminar totalmente.

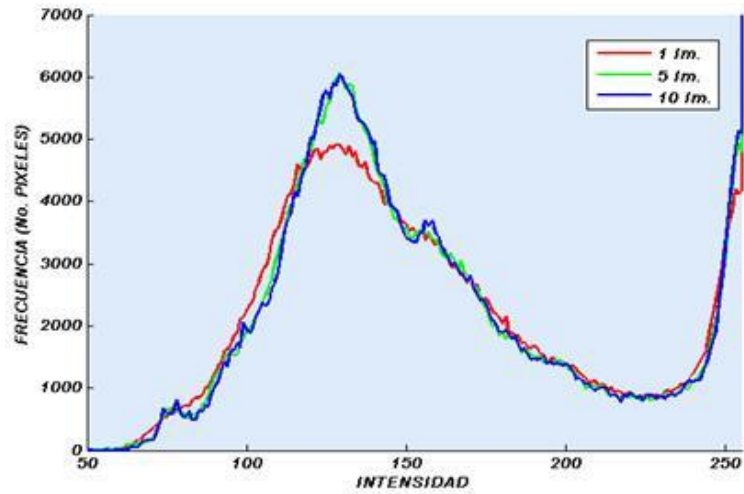
Este componente de ruido es estadísticamente aleatorio, este efecto en la imagen puede ser reducido promediando la imagen. Aumentando las imágenes en N aumentarán la intensidad del componente de ruido por la raíz cuadrada de N; sin embargo, al mismo tiempo, la intensidad de la verdadera señal puede ser incrementada por N. La proporción de la señal de ruido en las imágenes acumuladas aumentará por el factor siguiente [14]:

$$S_N = \frac{N}{\sqrt{N}} \quad (23)$$



A

B



C

Figura 22. Conjunto de imágenes de la misma region mostrando como la imagen promediada mejora la calidad de la misma: Superior, dos ilustraciones, **A**. con una sola imagen y **B**. con diez imágenes promediadas; **C**, histogramas integrados, línea roja (una imagen), línea verde (cinco imágenes) y línea azul (diez imágenes). Dimensiones de las imágenes A y B: 314.6 μ m x 236 μ m

Para la cantidad de N imágenes, la imagen resultante presentada en la figura 22-B estará dada por:

$$F_{fin.}(x,y) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N f_i(x,y). \quad (24)$$

Con N como el número de imágenes trabajadas, $f_i(x,y)$ representa cada imagen y $F_{fin.}(x,y)$ es la imagen definitiva.

Para este caso se tomaron diez imágenes de una misma región adquiridas secuencialmente; promediando las imágenes se puede disminuir la presencia de ruido. En la figura 22-A se encuentra una imagen con presencia de ruido aditivo y se realiza el promedio para diez imágenes (figura 22-B), la calidad de ésta mejora notablemente.

Un histograma puede verificar este hecho, como se observa en esta investigación (figura 22). Se extrae un histograma a una sola imagen y se representa como una línea roja, en cambio para las diez imágenes promediadas el histograma representado como la línea azul, tiene una descripción diferente de la distribución de intensidades para la misma región de píxeles, como resultado, la imagen presentará una diferencia más notable para la información perteneciente a la muestra biológica y el ruido aditivo se reducirá considerablemente, acentuando los núcleos de las células del fondo de la imagen.

Una ampliación de una región de la figura 22A-B se ve en la figura 23A-B respectivamente, con un tamaño aproximado de $120 \times 102 \mu\text{m}$, con claridad se encuentra una diferencia cualitativa para una y diez imágenes promediadas según la ecuación 24.

Cabe sintetizar, que el ruido es un problema propio de la naturaleza y se asocia a cualquier toma de datos de la realidad. El problema de su eliminación es muy común en la adquisición de imágenes, ya que el ruido en las señales electrónicas es ocasionado por diversas causas, muchas veces este no se pueden evitar, así mismo en el tratamiento de imágenes el ruido se presenta como una fluctuación aleatoria de los valores en los píxeles que componen dicha imagen.

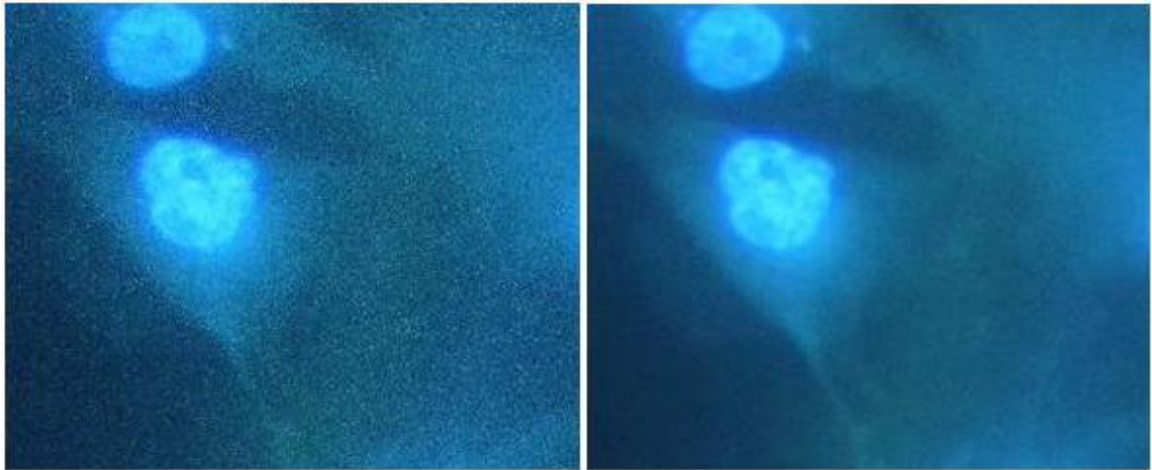


Figura 23. Ampliación de la región izquierda de las imágenes de la figura 21A-B, ilustrando el Aumento en la calidad de la imagen al reducir el ruido.

Una aplicación muy valiosa y considerada efectiva en la eliminación de ruido, es la aplicación del método de wavelets ó transformada Wavelet. Esta es una señal (o forma de onda) de duración limitada cuyo valor medio es cero, es irregular y asimétrica, diferente a una función sinusoidal por ejemplo.

Comparándola con la transformada de Fourier, que consiste en descomponer la señal original en funciones sinusoidales de diferentes frecuencias; El análisis de señales mediante Wavelet descompone la señal en versiones trasladadas y escaladas de la wavelet original (también conocida como wavelet madre), permitiendo el uso de intervalos grandes de tiempo en aquellos segmentos en los que se requiere mayor precisión de baja frecuencia, y regiones más pequeñas donde se requiere información en alta frecuencia [22].

La ventaja de la transformada wavelet es su facultad para el análisis de áreas localizadas de grandes señales. Existe una importante cantidad de familias de funciones Wavelets que han probado ser especialmente útiles; entre ellas se destacan: Daubechies (figura 24), Haar, Biortogonal, Coiflets, Sombrero mexicano entre otros.

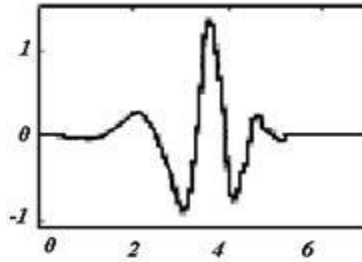


Figura 24. Representación de la wavelet Ingrid Daubechies (D4), utilizada para disminuir el ruido aditivo en la imagen dado por el sensor CCD.

En una señal, las componentes de baja frecuencia son las encargadas de otorgar a la señal la mayor parte de su información, mientras que las componentes de alta frecuencia se encargan de dar las características más particulares. Por ello una señal se descompone en dos señales: de alta y baja frecuencia, en la cual se guarda la mitad de los datos de cada una; teniendo entonces señales complementarias (la suma de las dos señales es igual a la original).

Si la señal es compleja entonces se hará una descomposición de más niveles para poder separar las características y analizarlas independientemente, este procedimiento es conocido descomposición multinivel o árbol de descomposición multinivel.

Para recuperar la señal original debe pensarse en volver a la señal original a partir de los datos de salida del árbol. Este proceso es conocido reconstrucción wavelet. A partir de los datos del árbol se obtiene la señal original.

De manera general, la transformada wavelet se define como:

$$W_{f(s,\tau)} = \int f(t)\psi_{s,\tau}(t)dt \quad (25)$$

Con $f(t)$ como la función a transformar y $\psi_{s,\tau}(t)$ es la función wavelet definida

Como:

$$\psi_{s,\tau}(t) = \frac{1}{\sqrt{s}} \psi\left(\frac{t-\tau}{s}\right) \quad (26)$$

Esta wavelet, es generada a partir de la traslación y cambio de escala de la wavelet madre $\psi(t)$. Con s como el factor de escala y τ es el factor de traslación.

Las wavelets generadas tienen la misma forma, aunque para $s > 1$ estas son dilatadas, y para $s < 1$ estas son contraídas.

La transformada wavelet de una función bidimensional $f(x,y)$ es:

$$W_f(s_x, s_y; u, v) = \frac{1}{\sqrt{s_x s_y}} \iint f(x, y) \psi\left(\frac{x-u}{s_x}; \frac{y-v}{s_y}\right) dx dy \quad (27)$$

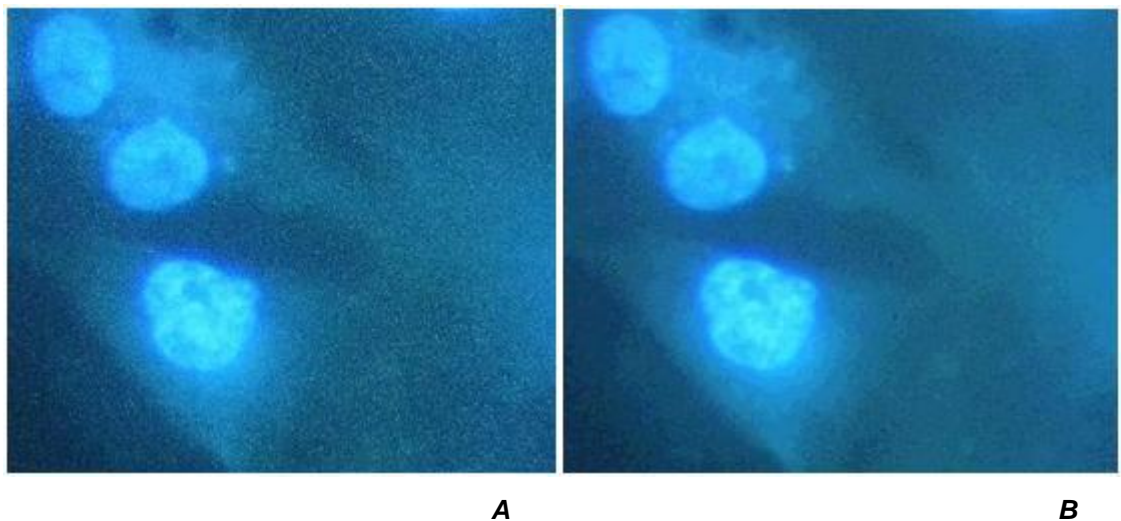
Esta es una función de cuatro dimensiones, que se reduce a un conjunto de funciones bidimensionales de (u,v) con diferentes escalas cuando los factores de escala son $s_x = s_y = s$ [23].

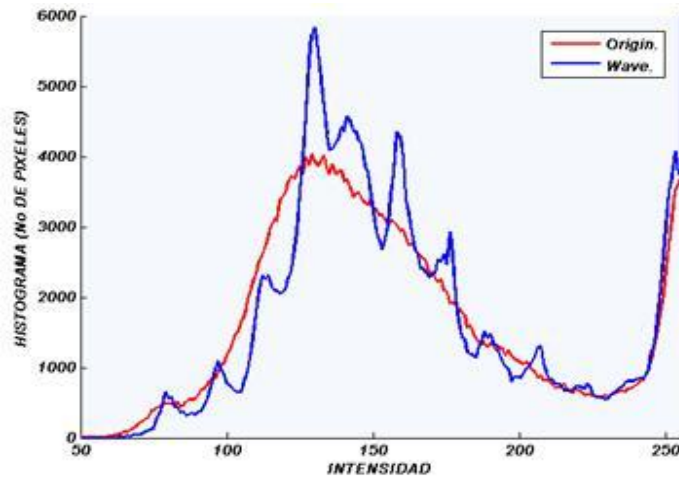
Al manipular imágenes o alguna señal, tanto para efectuar compresiones como para eliminar el ruido (filtrado), se tiene como efecto secundario la difusión o difuminación de la señal o imagen original, también llamada borrosidad. Al seleccionar la wavelet que mejor se adaptará a estas imágenes, también se seleccionó aquella que minimizaba la borrosidad.

Se hizo uso de la wavelet de Ingrid Daubechies, en la descomposición de 1 nivel; la cual funciona muy bien para imágenes de contrastes suaves, y se logró una eliminación muy eficiente del ruido. Observando en detalle es posible ver que se logra una buena calidad en el filtrado del ruido agregado a la imagen original. Aunque hay que tener en cuenta que en todo proceso de filtrado se tienen algunas pérdidas de la imagen original; en el detalle se aprecia el efecto de borrado de la imagen y un ligero pixelado, el cual es menor con esta wavelet (figura 25-B).

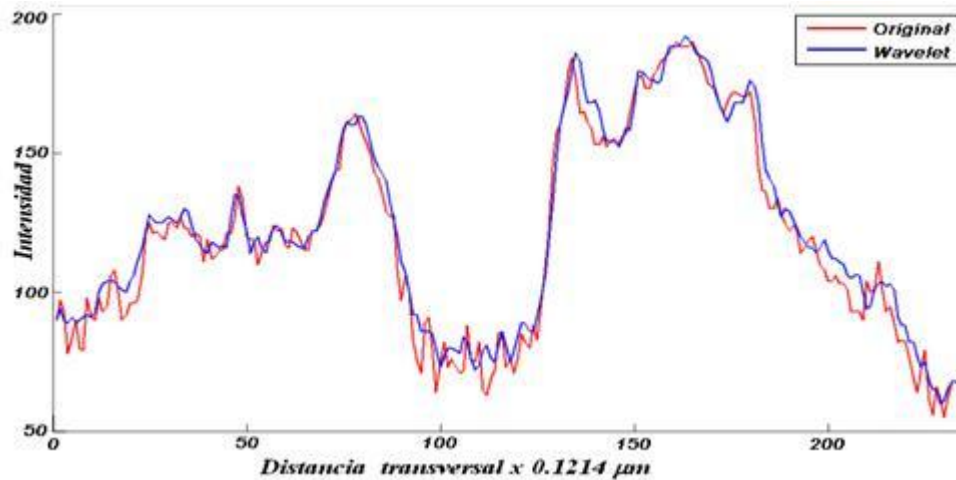
En la wavelet de Haar (otro tipo de wavelet que también es eficiente), se logra una buena eliminación de ruido en general, sin perder los detalles finos y con muy poco borrado para una imagen que tiene cambios abruptos de contraste, con detalles finos y bien definidos [13].

El software Matlab posee un conjunto de herramientas específicamente diseñadas para Wavelet, que facilitan e incluso automatizan el proceso de diseño tanto de la transformación directa, como de su inversa. Se aprecia el excelente desempeño de la transformada wavelet para suprimir el ruido de señales de medición, por lo que constituye una herramienta de gran utilidad; al tener el resultado del proceso de esta herramienta, cualitativamente puede encontrarse la diferencia en la disminución del ruido aditivo al observar las figuras 25-A y 25-B, si se hace un corte transversal a estas imágenes (figura 25-D) se puede encontrar como el ruido aditivo ha disminuido y la calidad de la imagen se conserva.





C



D

Figura 25. El método wavelet también hace su aporte para el mejoramiento de la calidad de imagen. A: ampliación de una región original, B: resultado de la aplicación de wavelets, C: comparación de los histogramas, línea roja histograma original, línea azul histograma al haber aplicado wavelet a la imagen original, D: Corte transversal realizado a las imágenes A y B, comparando la disminución de ruido aditivo en la imagen original A.

La figura 25 ilustra el mejoramiento de la imagen al usar el método wavelet para la supresión de ruido, este método se hace interesante porque a diferencia del método de imágenes promediadas, este solo necesita de una sola imagen para eliminar el ruido. Por lo tanto, para trabajar con una secuencia de imágenes es recomendado este método en contraste a querer adquirir una imagen con la mejor calidad posible [22].

Como las adquisiciones son digitales, muestreando se verifica para maximizar la resolución del objetivo; esto se logra con el teorema de Nyquist para un sistema de frecuencia limitada, y para cualquier objetivo de apertura numérica limitada con un dado límite de resolución r . Un muestreo de la mitad de la resolución, es suficiente para la grabación digital de la señal entera sin la pérdida de información.

Para la microscopia 3D, el teorema puede expresarse para las direcciones laterales y axiales como sigue:

$$XY_{tran} \leq \frac{r_{xy}}{2} \text{ y } Z_{axi} \leq \frac{r_z}{2} \quad (28)$$

Donde el r_{xy} y r_z denotan la resolución lateral y resolución axial, y XY_{tran} , Z_{axi} el muestreo lateral y axial; deben probarse las imágenes usando al menos dos puntos por elemento resoluble.

Este criterio produce el requisito mínimo de paso de muestreo para obtener una señal discreta de una señal continua real. No olvidar que los aspectos prácticos deben ser tomados en cuenta, al observar muestras vivas, ya que en la adquisición de este proyecto el paso mínimo en el eje axial fue de 1 μm por imagen.

Al realizar el sobre-muestreo, se aumenta el número de imágenes requeridas para una dada adquisición de volumen, y esto resulta en un aumento significativo en foto-toxicidad, tiempo de adquisición y foto blanqueado, cada uno de los cuales puede causar efectos en el seccionamiento de la óptica microscópica y ello debe ser minimizado.

Otro criterio importante está en el volumen de la muestra: idealmente, toda la luz emitida debe recogerse para la reasignación a su locación original. En la

microscopía de campo claro, el cono de emisión de luz se extiende a unas micras sobre y debajo del plano de emisión.

Esto implica que unas micras sobre y debajo los planos periféricos que contienen el objeto pueden ser alcanzados, así que toda la información fuera de foco puede tenerse en cuenta en el proceso de reconstrucción [6].

Las áreas de las regiones de interés son moderadas en cada sección y se multiplican por el espacio de sección para obtener una estimación del volumen para estas áreas. Las secciones uniformemente espaciadas de espesor fijo son usadas para estimar el volumen del objeto interpolando linealmente entre las secciones muestreadas. Lo que se busca de la restauración de la imagen es invertir las degradaciones que el microscopio da a la imagen. Esto requiere un modelo acorde a la formación de la imagen y presentando resultados como los mostrados a continuación [12].

Para hacer énfasis en la técnica de representación de una sola imagen de un stack de imágenes, se hace uso de la Detección de Máximos. Es una técnica que hace uso de la secuencia de imágenes obtenidas por focalización del sistema de epi-iluminación sobre el volumen del espécimen, en la cual se presenta un máximo de intensidad en los puntos donde el objetivo reúne toda la energía ultravioleta y la proyecta sobre un plano objeto de la muestra, como resultado la región focalizada irradiará luz con una intensidad diferente a las regiones no focalizadas.

La técnica consiste en localizar la posición de máxima intensidad de la muestra para todos los planos adquiridos en el desplazamiento axial de la muestra (ó objetivo) del microscopio. Así, la imagen obtenida contendrá la posición x-y de la imagen con la intensidad máxima registrada para dicha posición en el pack de imágenes, y será contenida en los 256 niveles de gris para el tratamiento de la imagen, asociando a cada nivel una altura respectiva [3].

Siguiendo el proceso para la obtención de máximos, al obtener para cada punto la máxima intensidad en una ubicación en píxeles, se guarda la altura de dicho máximo en el área x-y en que se está trabajando.

De esta manera, se conserva la relación que existe para las tres coordenadas x,y,z; y la altura de la superficie tiene correspondencia con el intervalo del paso límite entre los extremos (mínimo desplazamiento en el cual se encontró un máximo de intensidad y el máximo desplazamiento en el que se encontró el máximo de intensidad), en el que se encontraron todos los máximos de intensidad en el área x-y. Con estos parámetros se constituirá una imagen topográfica proporcionándonos un conocimiento de la superficie de la muestra [3].

Con las imágenes obtenidas de máxima intensidad de la muestra y al mismo tiempo una imagen de representación topográfica para la misma, se puede lograr una tercera representación basados en la textura, ya que cada punto de la superficie de la muestra tendrá su propia iluminación. Se obtendrá una imagen de textura ilustrando de otro modo las características propias del espécimen.

La observación de la textura dependerá sobre todo de las condiciones de iluminación, ángulos de visión y distancia; además del color y de la forma, esta ayudará a distinguir al objeto en algún escenario, y agregará realismo a las imágenes sintetizadas.

Las medidas de una imagen con respecto a su textura pueden utilizarse para dividir dicha imagen en segmentos; estos segmentos mostrarían las características presentes en la imagen, y de qué estas pueden depender. Las secciones que se estudian deben ser morfológicamente uniformes y tendrán aproximadamente la misma dimensión por todas las partes de la región texturada.

La descripción de la textura suele ser cualitativa por la desigualdad que esta presenta y que se da para las condiciones de visión; las desigualdades se distinguen en las inmediaciones de un punto en una imagen.

El estudio de la superficie de la muestra se realiza con herramientas que aportan de manera significativa descripciones concretas, así, se tendrá como resultado una superficie con cualidades que no puede ofrecer la imagen 2D, ni la tomografía.

Para encontrar los resultados requeridos para una observación adecuada de un espécimen, hay que tener en cuenta los métodos analizados con anterioridad e integrarlos para obtener características óptimas de la muestra.

Partiendo de un stack de imágenes que barren todo el espécimen, se obtuvo como resultado una sola imagen de este stack, y presenta detalles pertenecientes a cada imagen del volumen de la muestra, ó de un rango aceptable de imágenes.

Con el método de máxima intensidad para una imagen 2D de un paquete de imágenes con diferentes puntos de focalización se obtiene la primera imagen de la figura 26, la cual contiene todos los puntos de focalización y da una apreciación global del volumen del espécimen. Como ésta es una imagen de intensidad captada por el sensor, se puede pensar en reducir el ruido de fondo de la imagen aplicando el modelo de caída exponencial de la luz, lo cual hace que la luz de fondo se reduzca considerablemente junto con el efecto de iluminación en los bordes, como se puede ver en la figura 26-B.

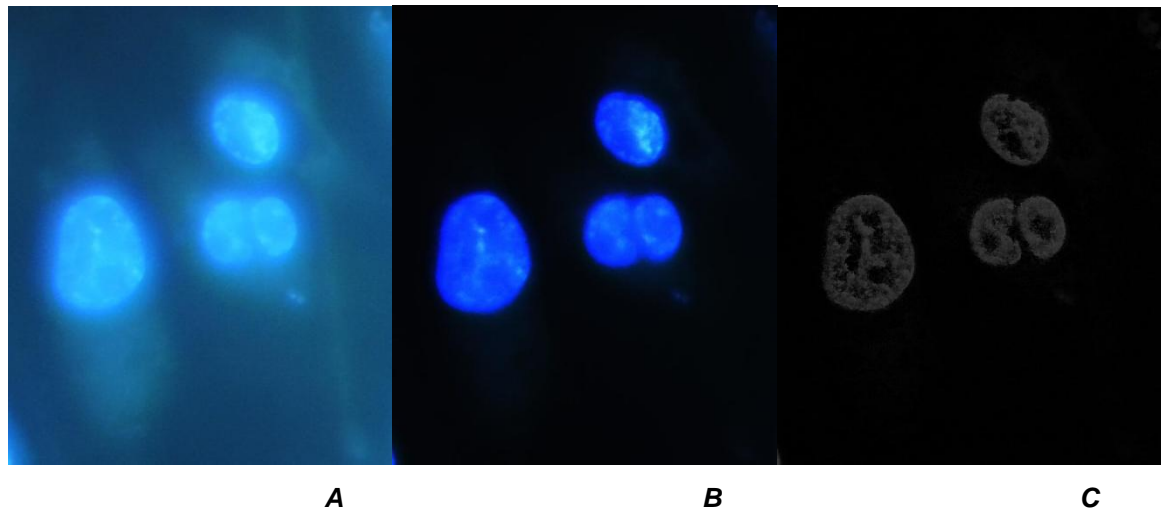


Figura 26. **A.** Presenta la imagen de máxima intensidad de la secuencia adquirida para una muestra de células sanguíneas, **B.** Imagen de máxima intensidad con la optimización realizada, **C.** Imagen de topografía. Dimensiones de las imágenes $93.6\mu\text{m} \times 111.5\mu\text{m}$ aproximadamente.

Al tener los puntos de focalización correspondientes a cada imagen del paquete adquirido y teniendo en cuenta que la distancia entre las imágenes es correspondiente a una micra, se puede obtener una sola imagen que contenga información de topografía de la muestra biológica (figura 26-C).

Así como este proyecto busca entender la formación de la imagen de una muestra biológica por parte de un microscopio de campo claro y su mejoramiento a partir de esta; se pueden comparar los resultados con un software conocido como ImageSurfer el cual es utilizado para tratar imágenes de especímenes obtenidos por microscopía y es compatible con el stack de imágenes de los sistemas Carl Zeiss (.lsm) y Leica (.lei); haciendo confiable la presentación de la optimización en los resultados (figura 27).

Para comparar los resultados obtenidos en este trabajo con las imágenes que obtiene un software profesional, se debe tener en cuenta que este software presenta imágenes volumétricas y no en 2D como aquí se ha hecho.

Por eso el software presenta una imagen de volumen con la intensidad de cada plano objeto y construye una proyección de máxima intensidad, o puede darle una iluminación diferente al stack de imágenes creando un volumen direccionalmente iluminado, dando otra percepción a la muestra estudiada. Hay que tener presente que la representación final de este software es diferente a los resultados en este trabajo.

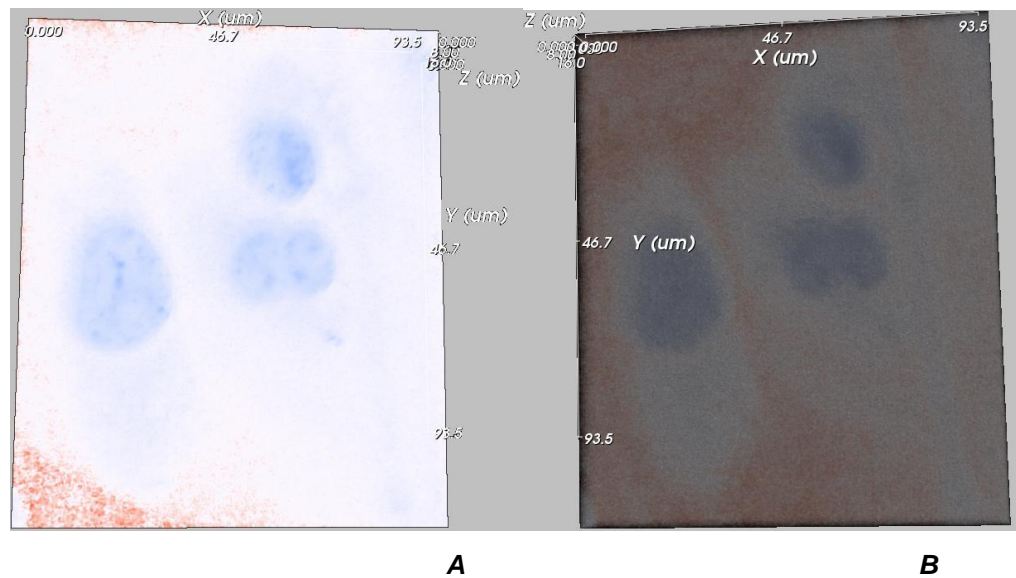
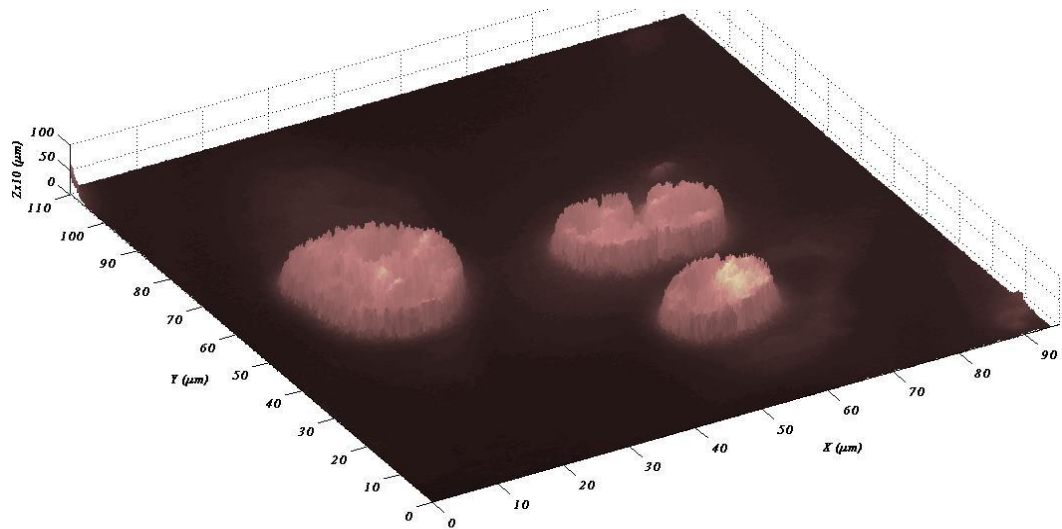
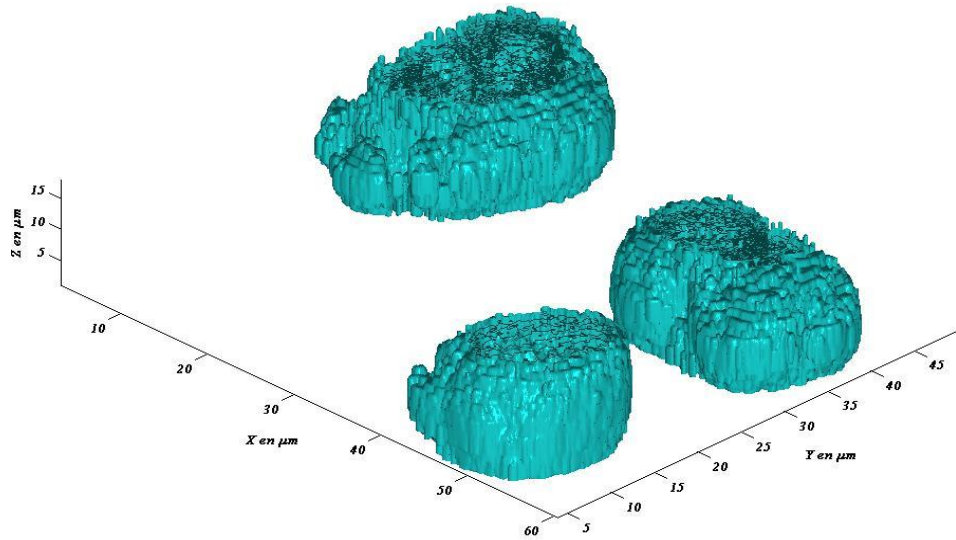


Figura 27. Imágenes presentadas por el software ImagenSurfer para ilustrar una posible comparación con las imágenes de la figura 25. **A.** Proyección en volumen de máxima intensidad, **B.** Direccionalmente iluminada.

Además, en esta investigación, aunque los resultados presentados anteriormente contienen una conveniente información del espécimen en dos dimensiones, puede hacerse también una representación en tres dimensiones como se muestra a continuación. Además la imagen resultante en tomografía es comparable con el resultado tridimensional que se obtiene para el programa ImageSurfer.



A



B

Figura 28. Con los datos obtenidos se puede realizar una reconstrucción Tridimensional de la textura y una imagen tomográfica de la misma.

Una presentación en 3D es indicada en la figura 28, ésta fue reconstruida en base al análisis realizado al stack de imágenes, a las variaciones de la intensidad debido a la difracción de la luz y a la presencia de fondo claro que dificultan aun más la presentación en volumen de las características encontradas en el espécimen.

La imagen superior (figura 28-A) es la representación de textura de una célula sanguínea; las características observadas se resaltan más según el espécimen, ya que esta integra a la intensidad de todo el volumen de la muestra con la topografía, como una nueva presentación de la imagen tridimensional de la célula. Así, se resaltan regiones de la muestra en 3D de una forma más agradable para el que trabaja con especímenes biológicos.

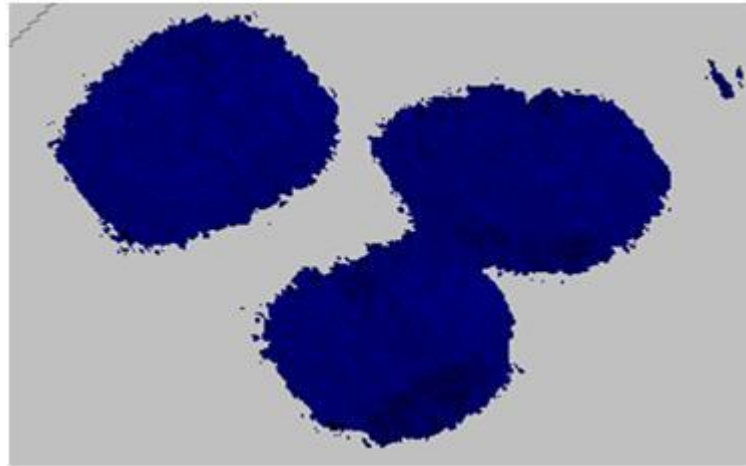


Figura 29. Imagen tomográfica realizada con el software ImageSurfer. Ha de tenerse en cuenta la similitud con la figura 28-B, en su representación.

Para la imagen de la figura 28-B, se logra una imagen tridimensional tomográfica del stack adquirido, dada por la intensidad percibida del sistema de adquisición; este método gráfico es bastante conocido y se encuentra en los software usados para la microscopía de fluorescencia.

Una representación tomográfica del programa Imagesurfer es la figura 29; el método gráfico es muy similar a la figura 28-B, aunque se presentan detalles entre las mismas imágenes tomográficas; estas imágenes tomográficas se obtienen al trabajar con las imágenes de intensidad, las cuales son segmentadas para obtener el contorno de cada una y hacer la respectiva reconstrucción.

Por una parte, la luminosidad (figura 28-B) crea una mejor representación de volumen tomográfico, por otro lado, pequeños elementos de la célula sobresalen en la imagen tomográfica de la figura 29, que no se muestra en la imagen tomográfica realizada con Matlab.

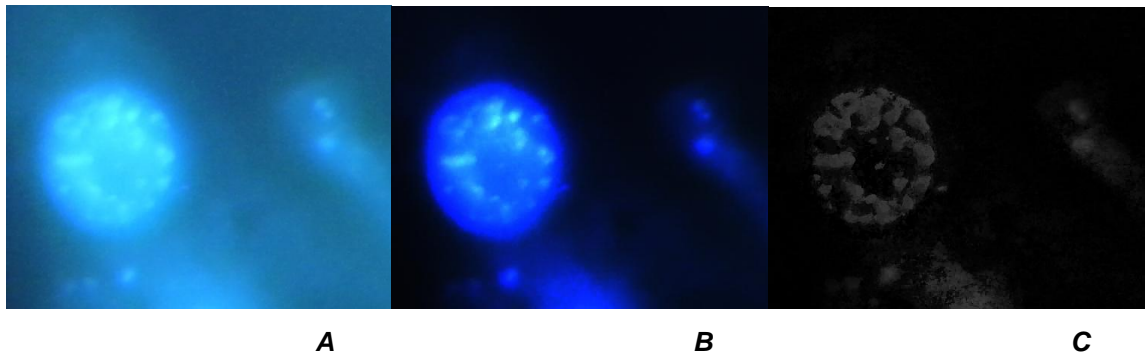


Figura 30. *A. Se presenta la imagen de máxima intensidad de la secuencia adquirida, B. imagen de máxima intensidad con la optimización realizada, C. Imagen topográfica de células sanguíneas. Dimensiones $48\mu\text{m} \times 62\mu\text{m}$ aproximadamente.*

Otra adquisición y mejoramiento de imágenes de células sanguíneas se presentan en la figura 29, de la misma manera como se indico para la figura 27. Puede observarse, y como se hace evidente en la figura 30 una buena distinción entre el contorno del núcleo celular y su interior. Ello puede ser usado para realizar una valiosa representación tomográfica de la muestra adquirida, e incluso señalar secciones de la misma al crear una transparencia en ella (diferente a la tomografía anterior). y/o identificarlas al hacer uso de diferentes colores (en este caso colores simulados, el contorno del núcleo con color verde y su interior con celeste).

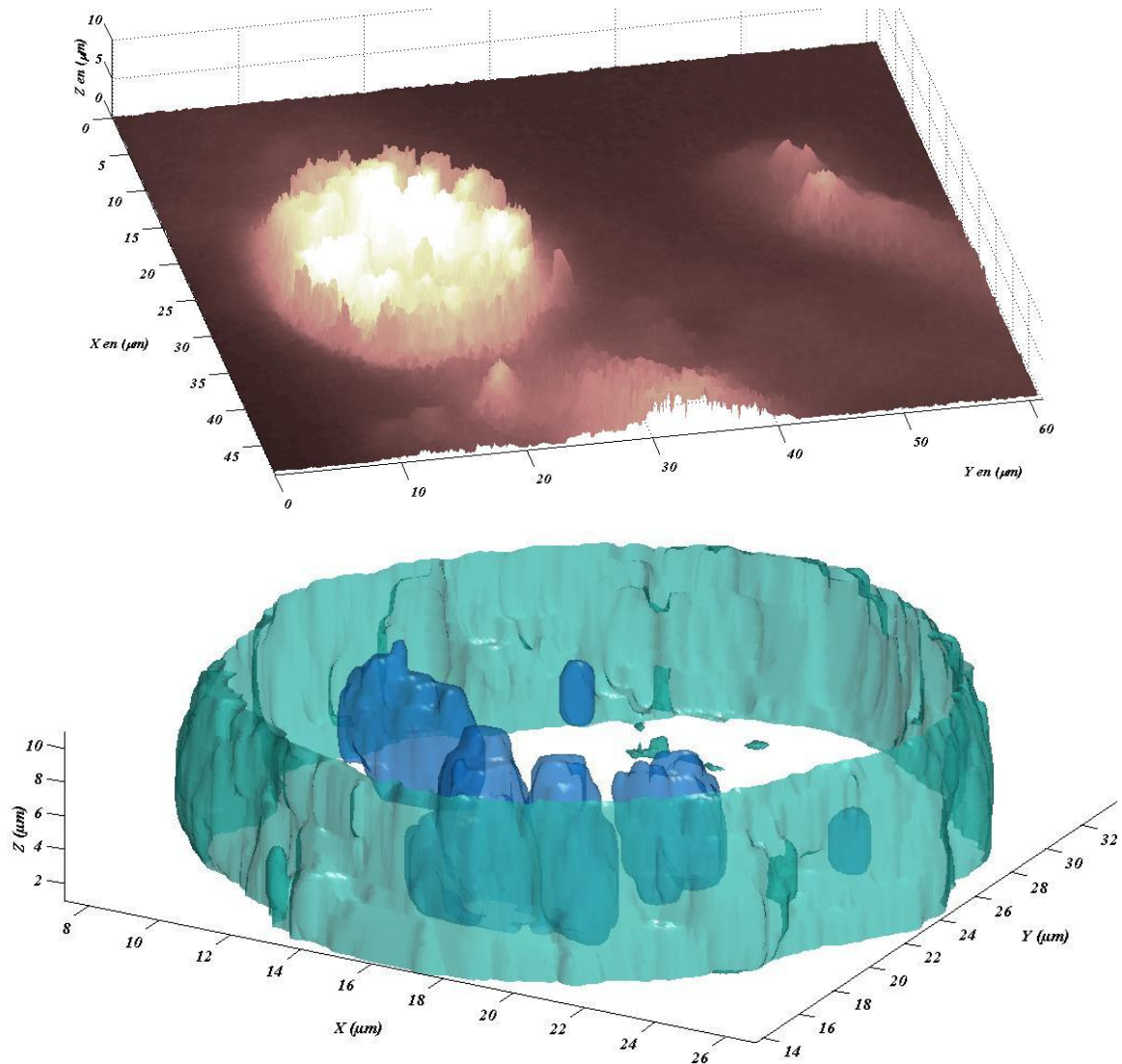
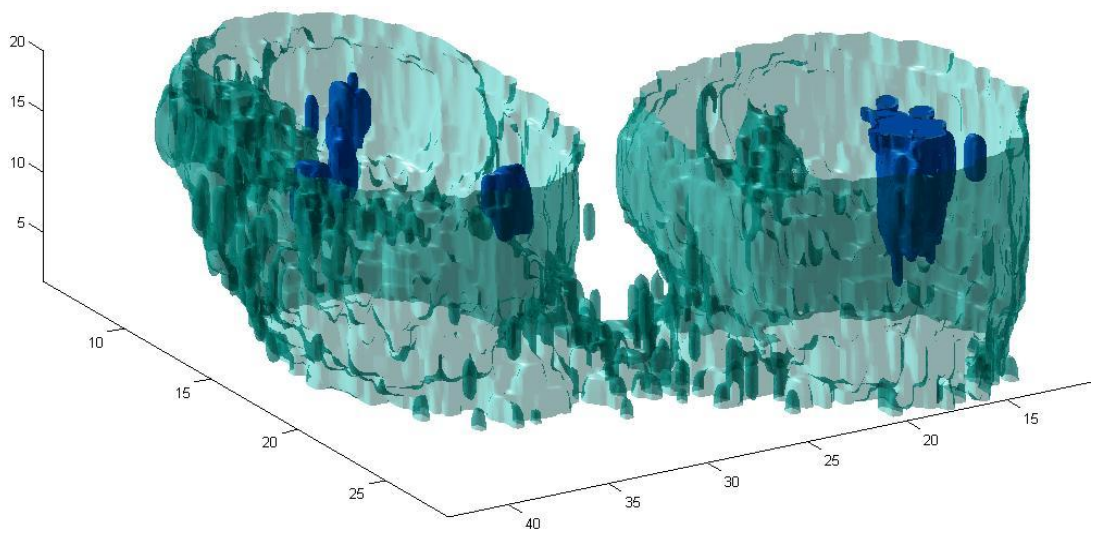
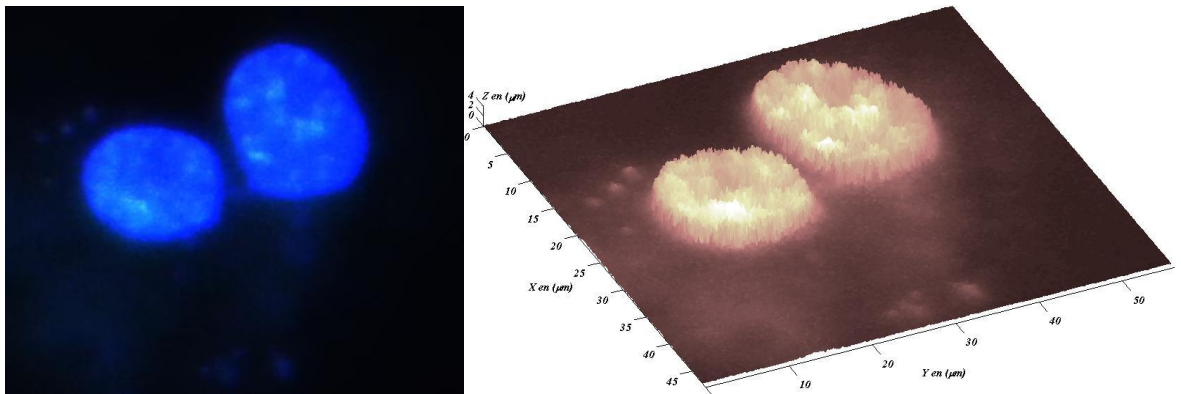


Figura 31. Otra representación para el núcleo teñido con Hoechst 33342 para las células sanguíneas; en este caso se puede ser un poco más riguroso en la selección tomográfica y se logra exaltar partes del núcleo dando una noción diferente de volumen.

Aunque se desee modelar y hacer una representación similar de los volúmenes anteriores con el software Imagesurfer, la presentación de este será muy similar a la realizada en la primera secuencia de este tipo (figuras 27 y 29), ya que posee parámetros fijos para las imágenes que se evalúan y no se pueden realizar sobre éste, cambios significativos (figura 32).



Figura 32. Segunda comparación en 2D y 3D con Imagesurfer para las figuras 30 y 31. Comprendiendo la imagen del núcleo, se puede hacer una mejor representación tomográfica de ésta (como se puede ver en fig.31 inferior vs fig.32-C).



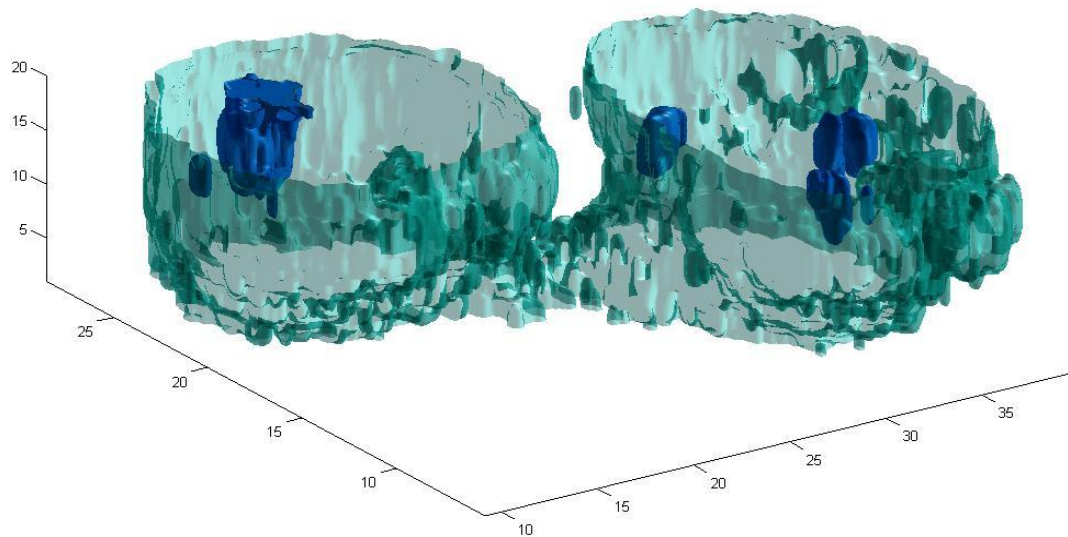


Figura 33. Representación adicional para el espécimen estudiado (células sanguíneas). Imagen de máxima intensidad, imagen de textura e imágenes tomográficas a diferentes ángulos de visión respectivamente.

Una representación adicional de lo mostrado es la figura 33, cuyo stack de imágenes de células sanguíneas produce una representación volumétrica de la muestra conteniendo los parámetros dimensionales de esta.

Al aplicar los métodos analizados en el transcurso del proyecto, e ideándolo como un modelo en el cual el espécimen fluorescente empieza a irradiar luz, se puede estudiar el comportamiento de esta a lo largo del sistema óptico, y como captaría la señal el sensor de la cámara. Obteniendo como resultado una imagen admisible al resultado del stack de imágenes, y racional para el microscopista; sin pérdida apreciable de la información proveniente del espécimen bajo el fluoroforo asociado.

Ha de tenerse en cuenta, la presencia en todo momento del ruido aditivo al sistema, aunque se reduce considerablemente, éste se hace notar para la representación topográfica y de textura. Por ello el criterio del microscopista es de gran importancia a la hora de realizar conclusiones finales.

4. CONCLUSIONES

Se ha descrito en este trabajo, una técnica para medidas en células basada en la combinación del microscopio de campo claro y la integración ó supresión de la luz disipada para el mismo, haciendo uso del decaimiento exponencial en la intensidad, aplicación de la transformada wavelet y obtención de imagen de máxima intensidad y topográfica. Con el fin de aportar una mejora en las técnicas de observación celular de imágenes tradicionales, utilizadas para investigar la morfología 3D y los estados bioquímicos de células dentro de su ambiente de tejido natural.

El tamaño y la forma de pequeñas estructuras en un espécimen celular, y la distancia entre ellas, pueden ser representadas por el microscopio de campo claro, en un rango de tamaños cuya representación bidimensional es bastante acertada como es el caso de las imágenes de máxima intensidad y topográficas; pero en cuestión de visualización tridimensional, la interpretación no está a la par con la bidimensional, pues hay detalles que la imagen de tomografía pierde en el proceso de reconstrucción.

Los resultados presentados en esta tesis, muestran que la obtención de una imagen de máxima intensidad para imágenes de iluminación débil, es de mejor contraste; y agregada la disminución de luz por decaimiento exponencial, se llega a la reducción de la borrosidad y aumento en el contraste.

Para lograr estos resultados se ha presentado una aplicación de reparación de la imagen en la microscopía de fluorescencia, al reducir la sensibilidad del ruido aditivo para una cantidad apreciable de imágenes como es la imagen promediada, basados en una serie de imágenes adquiridas para una misma región y a una misma posición axial. Y para el caso de una sola imagen, se obtiene una mejoría al reducir la influencia del ruido usando la transformada wavelet.

El trabajar con un stack de imágenes para obtener una representación única con información perteneciente a la muestra, junto a las técnicas presentadas en este proyecto, trae como resultado un modo de obtener información ajustable a las observaciones presentes en la fluorescencia, siendo competente con otros métodos que realizan tareas similares.

El estudio realizado proporcionará un crecimiento en el análisis en la observación de muestras biológicas, debido a que se posee una herramienta dedicada al mejoramiento de este tipo de información, tomando en consideración que los microscopios de campo claro en algunos casos, no cuentan con el soporte adecuado para en análisis de datos.

Este proyecto es base para nuevos trabajos y mejoramientos en técnicas de observación para la microscopía de campo claro usado en la fluorescencia, porque al aumentar de la capacidad de procesamiento en la información de los computadores, se puede hacer nuevos estudios de adquisición de imágenes y trabajar en un nuevo espacio: la cuarta dimensión, obteniendo un stack de imágenes para diferentes tiempos de observación, se da una representación tomográfica (tres dimensiones) variable en el tiempo (cuarta dimensión), revelando como una célula se comporta en el espacio, por ejemplo creciendo ó desplazándose.

5. NOTAS DE REFERENCIA.

- [1] **P. BAMFIELD** “Chromic Phenomena - The Technological Applications of Colour Chemistry”; The Royal Society of Chemistry; 2001
- [2] **D. B. MURPHY** “Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging”; Wiley-Liss. Inc.; 2001
- [3] **C. PERUCHO** “Caracterización de Materiales por Reflectividad en Amplitud y Fase con Microscopia interferencial”; Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander; 2007
- [4] **M. DAVIDSON** “Optical microscopy” National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University.
- [5] **Z. DARZYNKIEWICZ** “Cytometry - New Developments”; fourth edition; ELSEVIER Academic press; London; 2004.
- [6] **T. SCHEPER** “Advances in Biochem-BioTech”; Ed. Springer; Germany, 2005.
- [7] **V. KEMPEN** “Image Restoration in Fluorescence Microscopy” Delft University Press; Netherlands, 1998.
- [8] **H. ERNST KELLER** “Methods in Cell Biology”, Article 2, Elsevier Inc. New York, 2007
- [9] **J. R. LAKOWICZ** “Principles of Fluorescence Spectroscopy”, Third edition, Ed. Springer, Singapore, 2006.

- [10] **V. J. ALLAN** "Protein localization by fluorescence microscopy", Oxford University Press, New York 2000.
- [11] **D. J. TAATJES – B. T. MOSSMAN** "Cell Imaging Techniques-Methods and Protocols", Humana Press Inc.– Totowa, New Jersey, Department of Pathology-University of Vermont, 2006.
- [12] **P. M. CONN** " Methods in Enzymology " Vol.307 - Confocal Microscopy, Academic Press.
- [13] **V. F. CANDELA** "Aplicaciones de la Transformada Wavelet- Eliminación de Ruido" Artículo - Julio 2008.
- [14] **A. R. CLARKE – C. N. EBERHARDT** "Microscopy Techniques for Materials Science" Woodhead Publishing Limited, Cambridge - England, 2002.
- [15] **P. TOROK – FU-JEN KAO** "Optical Imaging and Microscopy", Second Edition, Springer Series, Berlin - German, 2007.
- [16] **R. K. KINOSHITA** "Fluorescence Microscopy – Optimize your System With the Right Filter Set", Article.
- [17] **T. R. CORLE – G. S. KINO** "Confocal Scanning Optical microscopy and Related Imaging Systems", Academic press, California - USA, 1996.
- [18] **W. SINGER – M. TOTZEK – H. GROSS**, "Handbook of Optical Systems - Physical Image Formation", Volumen 2, Wiley-VCH, Germany, 2005.
- [19] **N. YAO – Z. L. YHANG**, "Handbook of Microscopy for Nanotechnology", Kluwer Academic Publishers, NY- USA,2005.

[20] **A. GAGALOWICZ – W. PHILIPS** (Eds.), “Computer Vision/ Computer Graphics Collaboration Techniques”, Lecture Notes in computer Science 4418, Ed. Springer, Germany, 2007.

[21] **J. C. CASADO – M. SERRA-RICART**, “Observaciones Astronómicas con Webcam y CCD”, Instituto de Astrofísica de Canarias, Producciones Graficas, España.

[22] **S. KOURO R. – R. MUSALEM M**, “Tutorial introductorio a la teoría de Wavelet”, Técnicas Modernas en Automática, Artículo.

[23] **M. LESTER**, “Introducción a la transformada Wavelet”, Descomposición de señales, 2006, Curso.

[24] **HECHT E**, “Óptica”, Addison Wesley Iberoamericana, Tercera edición, Madrid - 2000.

6. BIBLIOGRAFIA.

ALLAN, V. J. “Protein localization by fluorescence microscopy”, Oxford University Press, New York 2000.

BAMFIELD, P; “Chromic Phenomena - The Technological Applications of Colour Chemistry”; The Royal Society of Chemistry; 2001

CANDELA, V. F. “Aplicaciones de la Transformada Wavelet- Eliminación de Ruido” Artículo - Julio 2008.

CASADO, J. C. – SERRA-RICART, M. “Observaciones Astronómicas con Webcam y CCD”, Instituto de Astrofísica de Canarias, Producciones Graficas, España.

CLARKE, A. R. – EBERHARDT, C. N. “Microscopy Techniques for Materials Science” Woodhead Publishing Limited, Cambridge - England, 2002.

CONN, P. M. “Methods in Enzymology ” Vol.307 - Confocal Microscopy, Academic Press.

CORLE, T. R. –KINO, G. S. “Confocal Scanning Optical microscopy and Related Imaging Systems”, Academic press, California - USA, 1996.

DARZYNKIEWICZ, Z; “Cytometry - New Developments”; fourth edition; ELSEVIER Academic press; London; 2004.

DAVIDSON, M; “Optical microscopy” National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University.

ERNST KELLER, H. “Methods in Cell Biology”, Article 2, Elsevier Inc. New York, 2007

GAGALOWICZ, A. – PHILIPS, W. (Eds.), “Computer Vision/ Computer Graphics Collaboration Techniques”, Lecture Notes in computer Science 4418, Ed. Springer, Germany, 2007.

HECHT E, “Óptica”, Addison Wesley Iberoamericana, Tercera edición, Madrid - 2000.

KEMPEN, V; “Image Restoration in Fluorescence Microscopy” Delft University Press; Netherlands, 1998.

KINOSHITA, R. K. “Fluorescence Microscopy – Optimize your System With the Right Filter Set”, Article.

KOURO R, S. –MUSALEM M, R. ;“Tutorial introductorio a la teoría de Wavelet”, Técnicas Modernas en Automática, Artículo.

LAKOWICZ, J. R. “Principles of Fluorescence Spectroscopy”, Third edition, Ed. Springer, Singapore, 2006.

LESTER, M. “Introducción a la transformada Wavelet”, Descomposición de señales, 2006, Curso.

MURPHY, D. B.; “Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging”; Wiley-Liss. Inc.; 2001

PERUCHO LOZANO, Carlos Javier; “Caracterización de Materiales por Reflectividad en Amplitud y Fase con Microscopia interferencial”; Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander; 2007

SCHEPER, T; “Advances in Biochem-BioTech”; Ed. Springer; Germany, 2005.

SINGER, W. – TOTZEK, M. – GROSS, H., “Handbook of Optical Systems - Physical Image Formation”, Volumen 2, Wiley-VCH, Germany, 2005.

TAATJES, D. J. – MOSSMAN, B. T. “Cell Imaging Techniques-Methods and Protocols”, Humana Press Inc.– Totowa, New Jersey, Department of Pathology-University of Vermont, 2006.

TOROK P. – FU-JEN KAO “Optical Imaging and Microscopy”, Second Edition, Springer Series, Berlin - German ,2007.

YAO, N. – YHANG, Z. L. “Handbook of Microscopy for Nanotechnology”, Kluwer Academic Publishers, NY- USA,2005.

7. ANEXO

En este anexo se presentan los elementos trabajados en el transcurso del proyecto que hicieron posible los resultados obtenidos:

- Se utilizó una reglilla de calibración : Improved Neubauer, deep 1/10 mm

- El objetivo utilizado es un 40X, con una apertura numérica de $NA=0.65$, al aire libre.
- El microscopio posee un cubo de filtros UV-2A con rango de longitudes de excitación 330-380 nm, un espejo dicróico de 400 nm, y una longitud de emisión de 420 nm.

- Las muestras biológicas presentadas en este trabajo fueron donadas por el Centro de investigación en enfermedades tropicales (Cintrop), éstas son:
 - Células carcinoma uterino
 - Células sanguíneas (THP1)

- Los fluoróforos utilizados en este trabajo fueron:
 - HOECHST 33342
 - PROTOPORFIRINA IX ó PpIX

- Se trabajaron con dos tipos de microscopios de campo claro:
 - Microscopio Eclipse ME400 de Nikon Instruments Inc.
 - Microscopio AO Spencer de American Optical Corporation.

- La cámara de adquisición es una NIKON coolpix P6000.

- Se compararon resultados con el Software ImageSurfer versión 1.20; Creado por el Centro UNC para los Sistemas Computación integrada para la Microscopía y Manipulación, miembro del UNC, Grupo de investigación de ciencia a Nanoescala. University of North Carolina al Chapel Hill.
- Las imágenes adquiridas se trabajaron con el software Matlab®, licenciado para el Grupo de Óptica y Tratamientos de Señales (GOTS) de la Universidad Industrial de Santander - UIS.