

ANÁLISIS Y DESARROLLO DE UN ALGORITMO PARA LA GENERACIÓN DE
IMÁGENES DE PROFUNDIDAD DE CAMPO EXTENDIDO BASADO EN
MICROSCOPIA DE ALTA RESOLUCIÓN

NATALIA BARRETO GARZÓN

CARLOS ANDRÉS RODRÍGUEZ NUÑEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-MECANICAS

ESCUELA DE INGENIERIA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA

BUCARAMANGA

2013

ANÁLISIS Y DESARROLLO DE UN ALGORITMO PARA LA GENERACIÓN DE
IMÁGENES DE PROFUNDIDAD DE CAMPO EXTENDIDO BASADO EN
MICROSCOPIA DE ALTA RESOLUCIÓN

NATALIA BARRETO GARZÓN

CARLOS ANDRÉS RODRÍGUEZ NUÑEZ

Trabajo de Grado para optar al título de
Ingeniero de Sistemas e Informática

Director

MSc. LOLA XIOMARA BAUTISTA ROZO

Codirector

Ph. D. ARTURO PLATA GOMEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-MECANICAS
ESCUELA DE INGENIERIA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA
BUCARAMANGA

2013

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a todos los que nos ayudaron a llevar a cabo esta tesis:

A nuestras familias por infinito su apoyo y cariño.

A nuestra directora de proyecto, Profesora Lola Bautista. Por su apoyo, su paciencia, sinceridad y buen ánimo, en los momentos grises y en los claros por igual.

A nuestro codirector Profesor Arturo Plata, por su entusiasmo, apoyo y confianza.

A los grupos de Investigación en Ingeniería Biomédica y de Óptica y Tratamiento de Señales; los cuales nos cobijaron y aportaron su gran conocimiento.

A los amigos y compañeros que nos acompañaron y apoyaron en este tiempo.

DEDICATORIA

Mis padres, Luz María y Jaime, me enseñaron que el legado máspreciado es la educación, hoy les dedico este libro, mi esfuerzo y entrega, descrito en él. Ellos con su vida me enseñan lo valioso que es aprender siempre algo nuevo, superarse cada día, nunca rendirse y soñar alto. Gracias.

A mis hermanas, Adriana y Marcela, que sin importar en donde estén, siempre estarán presentes en cada paso, la vida nos hizo hermanas pero nosotras nos hicimos amigas.

A mi Familia, por su apoyo incondicional, su buen ánimo y buena energía.

Natalia Barreto Garzón

A mis padres María Rosalba y Hernando; por su inmenso amor, apoyo interminable y gran ejemplo que me han sido fundamentales para culminar esta etapa.

A mis hermanos Martha y Luis por su guía, paciencia y enseñarme a ser fuerte y dedicado ante cualquier problema.

A toda mi familia, por estar siempre a mi lado y brindarme su cariño día a día.

A mis amigos, que sin importar qué siempre me han brindado su alegría y entusiasmo en los buenos y malos momentos.

Carlos Rodríguez Núñez

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	15
1. JUSTIFICACION.....	16
2. MARCO TEORICO	17
2.1 MICROSCOPIA OPTICA.....	17
2.2 TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES.....	18
2.3 IMAGEN DIGITAL.....	18
2.4 COLORES RGB	19
2.5 RUIDO.....	19
2.6 NITIDEZ	19
2.7 PROFUNDAD DE CAMPO	20
3. PLANIFICACION - ACCION	22
3.1 PLANTEAMIENTOS GENERALES	22
3.2 ALGORITMO BASE.....	23
3.3 METODOLOGIAS DE ARMADO	24
3.4.1 MATRIZ DE VARIANZA	26
3.4.2 PCA.....	28
3.5.1 WAVELET	32
3.5.2 COMBINACION WAVELET – PCA.....	53
4. REFLEXIÓN	57
4.1 DEFINICIONES.....	57
4.2 METRICAS DE EVALUACIÓN	58
4.2.1 MÉTRICAS DE EVALUACIÓN CON IMAGEN DE REFERENCIA.....	58
4.2.2 MÉTRICAS DE EVALUACIÓN SIN IMAGEN DE REFERENCIA.....	59

4.3	RESULTADOS	60
4.3.1	MÉTRICAS DE EVALUACIÓN CON IMAGEN DE REFERENCIA.....	60
4.3.2	MÉTRICAS DE EVALUACIÓN SIN IMAGEN DE REFERENCIA.....	66
5.	HERRAMIENTA SOFTWARE.....	68
5.1	DOCUMENTACIÓN MÓDULOS.....	68
5.1.1	MÓDULO CAPTURA Y RECEPCIÓN DE DATOS.....	68
5.1.2	MÓDULO GENERAL Y METODOLOGÍA	78
6.	CONCLUSIONES	80
7.	RECOMENDACIONES Y PUNTOS CRÍTICOS.....	82
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagen de una moneda en 20X	21
Figura 2: Moneda a un aumento de 20x.....	22
Figura 3: Proceso general del tratamiento de las imágenes.	23
Figura 4: Diagrama de flujo de la metodología general.....	24
Figura 5: Imágenes microscópicas a una moneda con un objetivo 5X.....	25
Figura 6: Diagrama del Algoritmo para fusión por matrices de varianza.	27
Figura 7: Imagen focalizada Metodología Matriz de Varianza.....	28
Figura 8: Procedimiento general del tratamiento de imágenes por medio de PCA.	29
Figura 9: Diagrama del Algoritmo para fusión PCA.....	30
Figura 10: Imagen focalizada Metodología PCA.	32
Figura 11: Banco de filtros de la Transformada Discreta de Wavelet en la descomposición de una imagen.	33
Figura 12: Pirámide de descomposición de 2 niveles.	34
Figura 13: Banco de filtros de la Transformada Discreta de Wavelet en la reconstrucción de una imagen.	35
Figura 14: Diagrama del Algoritmo para fusión Wavelet.	36
Figura 15: Imagen a escala de grises de entrada vista microscopio Moneda 100x.	38
Figura 16: Filtro Wavelet Haar.....	38
Figura 17: Pirámide de descomposición de 2 niveles Wavelet Haar.....	39
Figura 18: Matriz de descomposición de dLH de 2° Nivel Filtro Haar Vertical.	39
Figura 19: Matriz de descomposición de dHL de 2° Nivel Filtro Haar Horizontal ..	40
Figura 20: Filtro Wavelet Daubechies	40
Figura 21: Pirámide de descomposición de 2 niveles Wavelet Daubechies.....	41
Figura 22: Matriz de descomposición de dHL de 2° Nivel Filtro Daubechies Horizontal	42
Figura 23: Filtro Wavelet Symlets orden 4	42
Figura 24: Pirámide de descomposición de 2 niveles Wavelet Symlets orden 4...	43

Figura 25: Matriz de descomposición de dHL de 2° Nivel Filtro Symlets orden 4 Horizontal	43
Figura 26: Filtro Wavelet Biortogonal	44
Figura 27: Pirámide de descomposición de 2 niveles Wavelet Biortogonal	44
Figura 28: Filtro Wavelet JPEG	45
Figura 29: Pirámide de descomposición de 2 niveles Wavelet JPEG	46
Figura 30: Matriz de descomposición de dHL de 2° Nivel Filtro JPEG Vertical	46
Figura 31: Matriz de descomposición de dHL de 2° Nivel Filtro JPEG Horizontal	47
Figura 32: Imagen Fusionada, Actividad Basada en Coeficientes.	50
Figura 33: Imagen fusionada, Actividad con el método de la frecuencia espacial.	50
Figura 34: Imagen focalizada Metodología Wavelet.....	52
Figura 35: Diagrama del algoritmo para la fusión Wavelet-PCA.	54
Figura 36: Imagen focalizada Metodología Wavelet-PCA.	56
Figura 37: Imagen Focalizada EPFL	61
Figura 38: Imagen Focalizada EPFL	62
Figura 39: Imagen focalizada Metodología Matriz de Varianza.....	62
Figura 40: Imagen Focalizada EPFL	63
Figura 41: Imagen focalizada Metodología PCA	63
Figura 42: Imagen Focalizada EPFL	64
Figura 43: Imagen focalizada Metodología Wavelet.....	64
Figura 44: Imagen Focalizada EPFL	65
Figura 45: Imagen focalizada Metodología Wavelet-PCA	65

RESUMEN

TITULO: ANÁLISIS Y DESARROLLO DE UN ALGORITMO PARA LA GENERACIÓN DE IMÁGENES DE PROFUNDIDAD DE CAMPO EXTENDIDO BASADO EN MICROSCOPIA DE ALTA RESOLUCIÓN. ¹

AUTORES: Natalia Barreto Garzón - Carlos Andrés Rodríguez Núñez. ²

PALABRAS CLAVE: Tratamiento Digital de Imágenes, Microscopía Óptica, Profundidad de Campo, Fusión de Imágenes, Transformada de Wavelet.

DESCRIPCION: La adquisición de imágenes digitales por medio de un microscopio óptico automatizado, es una de las herramientas más usadas y eficientes para diferentes investigadores; con el fin de obtener información más detallada de diferentes materiales y organismos que puedan llegar a ser analizados, una sola imagen no contiene la información necesaria, dado que la profundidad de campo que posee es limitada y dentro de su espacio solo un porcentaje se encuentra focalizado, fusionando varias imágenes del mismo objeto con diferente campo espacial, es posible reconstruir una imagen que posee gran parte de su espacio focalizado y logra cumplir el objetivo del investigador.

En la actualidad el tratamiento digital de imágenes ofrece diferentes procedimientos que permiten fusionar dos o más imágenes, el uso de transformadas resulta ser uno de los más interesantes y eficientes, la Transformada de Wavelet por medio del uso de filtros en paso bajo y paso alto permite aislar los detalles de una imagen, minimizando el ruido y las zonas que no se encuentran focalizadas, para posteriormente lograr una fusión que permite obtener las características deseadas.

En este trabajo se presenta la investigación de diferentes metodologías de fusión y uso de filtros para la transformada de Wavelet, y el desarrollo de un algoritmo que a partir de una pila de imágenes permite la obtención de una imagen focalizada en todo su campo espacial, mediante el uso de la metodología de investigación – acción generando prototipos que permiten la obtención de diferentes técnicas de segmentación y armado, a través de la evolución investigativa.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ingenierías Físico-Mecánicas. Escuela de Ingeniería de Sistemas e Informática.
Directora Lola Xiomara Bautista Rozo. CoDirector Arturo Plata Gómez.

SUMMARY

TITLE: ANALYSIS AND DEVELOPMENT OF AN ALGORITHM FOR IMAGES IN EXTENDED DEPTH OF FIELD BASED HIGH RESOLUTION MICROSCOPY. ¹

AUTHORS: Natalia Barreto Garzón - Carlos Andrés Rodríguez Núñez. ²

KEYWORDS: Digital Image Processing, Optical Microscopy, Extended Depth of Field, Images Fusing, Wavelet Transform.

DESCRIPTION:

Acquiring digital images through an optical microscope automated, is one of the most used and effective tools for different investigators; to obtain more detailed information from different materials and organisms which can be analyzed, but a single image does not contain the information necessary for this work, because the depth of field is limited and has within its space only a percentage is focused, merging several images of the same object with different spatial field, is possible to fuse an image that owns much of its space focused and fails to meet the goal of the researcher to appreciate its features and details as they need it.

Currently, the digital image processing offers different procedures that allow merging two or more images, the use of transformed is now one of the most interesting and efficient through the use Wavelet filters in low-pass and high-pass to isolate the details of an image, minimizing noise and find areas not targeted, later achieve fusion allows obtaining a fuse image that is focused.

In this research thesis presents fusion of different methodologies and using filters for the wavelet transform, and the development of an algorithm from a stack of images allows obtaining a focused image in its entire spatial field by using the methodology action - research to develop prototypes allowed obtaining different segmentation and assembly techniques, through research developments.

*Work Degree

**Faculty of Fisicalmechanics Engineering. School of System Engineering. Directress: Lola Xiomara Bautista Rozo. Co-Director: Arturo Plata Gómez.

INTRODUCCIÓN

Durante La adquisición de imágenes microscópicas, la profundidad de campo debido al aumento generado hace imposible que el observador logre apreciar los detalles que contiene el objeto analizado, y por el contrario la cantidad de información que es omitida desfavorece la labor investigativa que se tiene como finalidad.

Para realizar un estudio satisfactorio es necesario analizar un gran grupo de imágenes, cada una con diferente profundidad de campo y por consiguiente diferente información dentro del campo espacial para cada una de ellas; volviendo así tediosa la labor del observador, dado que plasmar todos los detalles de diferentes vistas se hace subjetivamente. Así mismo las licencias de software especializados en la fusión de imágenes se hacen una opción poco rentable, dado su elevado costo. La implementación de algoritmos que suplan estas labores, acercaría más a resultados altamente eficientes para los entes investigativos, que usen la microscopia óptica como fuente de análisis de sus estudios.

1. JUSTIFICACION

Este proyecto contempla la investigación, desarrollo e implementación de un algoritmo, que permite la visualización de imágenes microscópicas de alta resolución,, focalizadas en su campo espacial, lo cual sirve de base investigativa para diferentes grupos que requieran el uso de la microscopía óptica; El algoritmo mencionado contempla el tratamiento de las imágenes solucionando problemas de ruido, enfoque y nitidez con resultados altamente eficientes, investigando y perfeccionando estudios anteriores.

Desarrollar algoritmos capaces de tratar imágenes de profundidad de campo extendido, solucionando problemas de ruido y enfoque, con resultados altamente eficientes y perfeccionar estudios anteriores es nuestra misión en este proceso investigativo, aportando así nuestro conocimiento adquirido durante nuestra vida universitaria, a facilitar la labor de quienes hacen uso de los laboratorios del Grupo de Óptica y Tratamiento de Señales de la Universidad Industrial de Santander y que posteriormente pueda ser extendido a otras áreas o grupos que requieran una herramienta con las mismas características.

2. MARCO TEORICO

2.1 MICROSCOPIA OPTICA

La microscopía es un conjunto de técnicas empleadas para lograr hacer visibles objetos o características que no pueden ser normalmente apreciables al ojo humano, uno de los microscopios más usados es el óptico [1], en este la luz pasa por medio de los lentes para lograr una vista ampliada de la muestra la cual puede ser apreciada directamente por el ojo humano, impresa en placas fotográficas o capturada en medios digitales.

Existen diferentes microscopios ópticos, de los cuales cada uno de ellos cumple con resaltar o permitir apreciar características diferentes de un mismo objeto, expuesto a distintas condiciones, entre los filtros más usados se encuentran [2]:

- Microscopía de campo brillante.
- Microscopía de campo oscuro.
- Microscopía en contraste de fase.
- Microscopía DIC - diferencial de contraste de interferencia (Nomarski).

La capacidad que tienen los objetivos de formar imágenes en donde se distingan más detalles del objeto examinado depende de una serie de factores como lo son el índice de refracción, campo espacial, aumento, apertura numérica y el poder de resolución entre otros [3].

Las múltiples aplicaciones de la microscopía en las ciencias han sido de gran ayuda, y en la actualidad su uso versátil e interdisciplinario, aplicable a muchos tipos de muestras y procesos, permite la captura de valiosa información local a partir de una imagen y relacionando el material con sus propiedades y estructura interna.

2.2 TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

El tratamiento digital de imágenes es una metodología aplicable la Informática Biomédica, dedicada al procesamiento de imágenes con el fin primordial de mejorar la calidad o facilitar la búsqueda de información. [4]

A través del tiempo las técnicas de tratamiento de imágenes se han usado en múltiples disciplinas científicas, específicamente para la microscopia ha representado un avance para la adquisición de información relevante para el estudio de materiales y organismos; el uso correcto de procesamientos de imágenes optimizan los estudios científicos que se puedan llevar a cabo a partir los resultados de mencionadas técnicas.

A continuación se presentan algunas terminologías y teorías que soportan el procedimiento llevado a cabo durante la realización de este proyecto.

2.3 IMAGEN DIGITAL

Una imagen digital representa por medio de una matriz numérica a un objeto, cada par de coordenadas de dicha matriz (x,y) , representan un punto en la imagen con un valor correspondiente que indican el nivel de gris en ese punto. Así mismo dentro de la distribución digital, a cada elemento se le denomina elemento de la imagen o pixel [5].

Una imagen digital puede ser definida por su altura y anchura en valor de pixeles y por su profundidad en bits por pixel, lo que determina la coloración distinta que puede ser almacenada en un punto particular, por lo tanto determinan también la calidad de color de la imagen.

2.4 COLORES RGB

Cada punto o pixel de la imagen contiene un color en particular, dicho color esta descrito por una cantidad de rojo, verde y azul; cada uno de estos componentes tiene un rango de 0 a 255 esto da un total de $255^3 = 16'777.216$ diferentes colores posibles dentro de mismo punto y dado que 24 es el número total de bits para representarlos son conocidos como imágenes de 24 bits. Los modelos orientados hacia dispositivos hardware especifican un sistema de coordenadas tridimensional y de un sub espacio de un sistema en el que cada color puede ser presentado en un mismo pixel. [6]

2.5 RUIDO

Considerado como señales no deseadas dentro de una imagen, existen diferentes tipos de ruido, entre otros: ruido aislado, ruido al azar, ruido periódico y estacionario y el ruido periódico pero no estacionario. La forma más eficiente de eliminar el ruido en una imagen es mediante el procesamiento digital de la misma, implementando filtros paso bajo y paso alto en algunos de los casos, es recomendable realizar un estudio del tipo de ruido presentado, para así elegir la mejor forma de aislarlo de la imagen. [6]

2.6 NITIDEZ

Consiste en el grado de calidad con que una imagen puede ser observada, depende directamente del foco y de la distancia ocular, generalmente se asocia al campo espacial apreciable desde la misma profundidad de campo del objeto.

Uno de los problemas más frecuentes de la observación con microscopios es la focalización de los mismos. Se ha comprobado que muchos profesionales tienen dificultad para observar con la nitidez necesaria debido a una calibración incorrecta de sus instrumentos, más aún cuando estos son compartidos por varias personas. [7]

Cada persona tiene una graduación óptica diferente, y aún nuestros propios ojos tienen una visión distinta, además las personas tienen una distancia interocular diferente, por lo tanto para observadores diferentes el mismo objeto en las mismas circunstancias puede ofrecer características diferentes, o más aun no presentarse en algunos casos.

2.7 PROFUNDAD DE CAMPO

La profundidad de campo representa el rango de distancias donde la nitidez de una imagen es aceptable, dado que al obtener la imagen del microscopio la imagen presentará zonas que se encuentran focalizadas y otras que por el contrario no logran ser apreciadas, limitando así la totalidad de los detalles que se desean obtener, por lo tanto muchas veces se hace necesario valerse de varias imágenes con diferente profundidad de campo, donde cada imagen ofrece nitidez diferente en su campo espacial. Representa el espesor del espacio que se observa con nitidez, con planos que están en foco en un momento dado. Mientras más grande sea el aumento con que se observa el objeto, solo pequeños espesores con nitidez se podrán apreciar, mientras que por encima y debajo de estos espacios la imagen se desvanece, por lo cual la profundidad de campo se hace inversa al aumento.

En la imagen de la figura1 se aprecia una imagen tomada con un microscopio óptico automatizado en aumento de 20X, la zona borrosa corresponde a las partes donde el foco no logra captar con nitidez los detalles de la imagen, mientras que la parte que se hace visible representa el espacio visible de la profundidad de campo.

Figura 1: Imagen de una moneda en 20X



Fuente: Autores

3. PLANIFICACION - ACCION

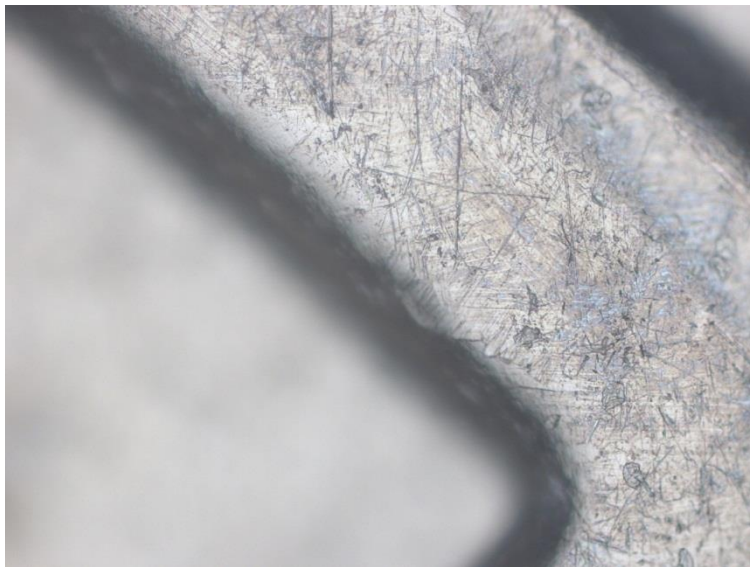
3.1 PLANTEAMIENTOS GENERALES.

Las imágenes que se adquieren de los microscopios generan una escasa vista de lo que es la muestra en general.

Debido a la profundidad de campo de cada lente cada vez puede ser más pequeña la parte nítida del objeto analizado [1].

A continuación se realiza un resumen de la investigación realizada durante el desarrollo de este proyecto. El algoritmo general comienza a partir de un set de imágenes microscópicas como la Figura 2.

Figura 2: Moneda a un aumento de 20x.



Fuente: Autores.

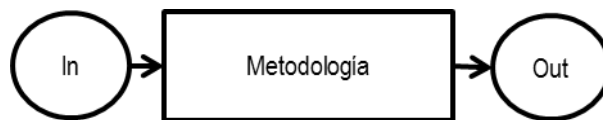
Se observa que la zona focalizada cuenta con un grado de detalle superior a las partes sin focalizar. La finalidad del algoritmo es generar una imagen con focalización de campo extendido, tomando la parte focalizada de cada plano y llevándola a un mismo plano de observación. Una solución automatizable para

este problema es generar un barrido por la muestra y fusionar las partes focalizadas de cada una.

3.2 ALGORITMO BASE

Se presenta entonces a continuación la base del algoritmo, cuyos valores de entrada serán la pila de imágenes y su resultado esperado es una imagen de focalización extendida, la metodología corresponde al procedimiento mediante el cual se desea generar la imagen focalizada, es determinada por la calidad del resultado luego de implementado el proceso de armado y aislamiento de ruido. Podemos ver el diagrama del proceso general en la Figura 3.

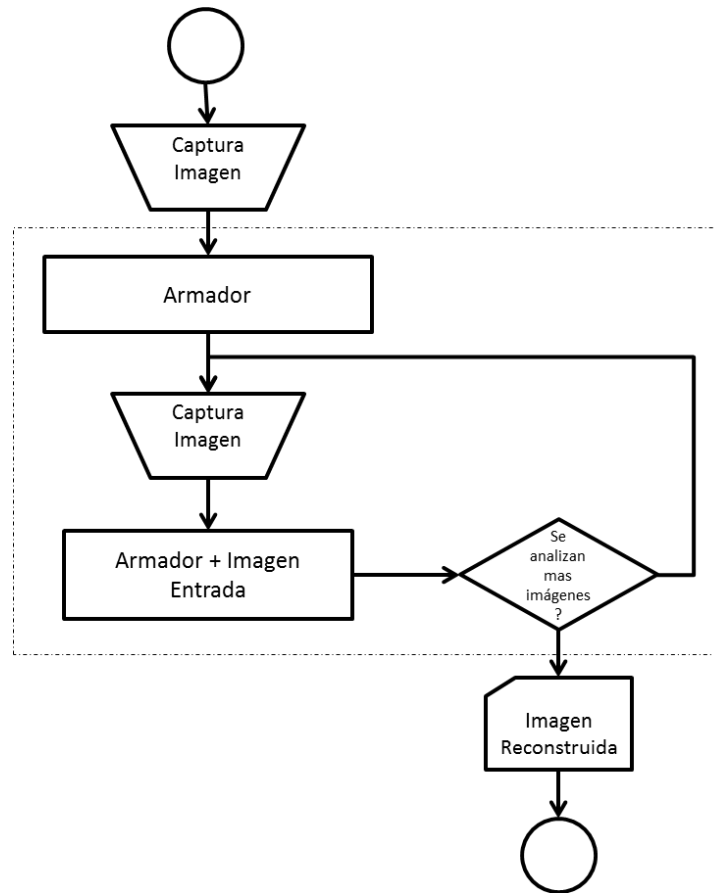
Figura 3: Proceso general del tratamiento de las imágenes.



Fuente: Autores

Las imágenes son adquiridas directamente de la muestra original, dado que se cuenta con un microscopio óptico automatizado, por lo tanto el proceso requiere que se fusione cada 2 imágenes, luego obtendremos como resultado una matriz representativa con los detalles de las dos originales, que equivalen a la imagen resultado parcial, que junto con una nueva imagen que entra al ciclo, son los dos nuevos valores iniciales; continuando la iteración hasta que culmine el recorrido de todas las imágenes. Como se ve en la figura 4.

Figura 4: Diagrama de flujo de la metodología general.



Fuente: Autores

Dentro de la región punteada se realiza el tratamiento a las imágenes para lograr la fusión. Esta parte del algoritmo contendrá la Metodología de Armado.

3.3 METODOLOGIAS DE ARMADO

El armado de las imágenes fusionadas puede ser Espacial o Espectral, para realizar la Metodología de Armado se plantean varias opciones de desarrollo [2]; se detallan a continuación las opciones objeto de estudio de este proyecto, donde se explica de forma puntual para cada uno de los métodos de armado los conceptos generales, su diagrama y el proceso en detalle de los diferentes

experimentos generados en la realización del proyecto, se expondrán las diferentes imágenes focalizadas resultantes para una muestra específica con las mismas condiciones externas a la cual se le aplican los procesos de fusión con todas las metodologías de armado.

La finalidad de los experimentos es determinar la metodología de armado con mejores resultados, este resultado será determinado por la prueba ERM de comparación con una imagen generada por la matriz de varianza objeto fuente de este trabajo.

Cada una de las metodologías contará con la misma cantidad de imágenes que para este procedimiento corresponden a una pila de 60 imágenes iniciales del mismo objeto como se ven ejemplarizadas en la figura 4, iluminación constante e igual distancia en z y número de intervalos.

Figura 5: Imágenes microscópicas a una moneda con un objetivo 5X.



(a)

(b)

Fuente: Autores.

Aquí podemos ver una muestra de la pila de imágenes iniciales, la Figura 4.1 (a) presenta una focalización en el fondo. Mientras que la Figura 4.2 (b) muestra la focalización en la parte superior de la letra.

3.4 ESPACIAL

Como tratamiento espacial usaremos a PCA y Matrices de Varianza.

3.4.1 MATRIZ DE VARIANZA

Las imágenes multiespectrales contienen abundante información, que con el uso de la estadística se logran cuantificar las características contenidas en los datos de la imagen.

El proceso se basa en la varianza, esta operación calcula las variaciones de intensidad en un pixel teniendo en cuenta a los pixeles vecinos [3]. Se define una máscara para el cálculo de la varianza de las imágenes entrantes. Estas varianzas se analizan entre ellas para determinar los puntos más altos. El punto más alto será remplazado en la matriz de varianzas. Se genera la focalización con los elementos de las imágenes donde el valor ha generado mayor varianza. El proceso se puede observar en la siguiente figura. Si la mayoría de los valores son cercanos a la media, la varianza es pequeña, por el contrario si los valores tienen a distribuirse lejos de la media, la varianza es grande.

La ecuación general de la varianza es representada por:

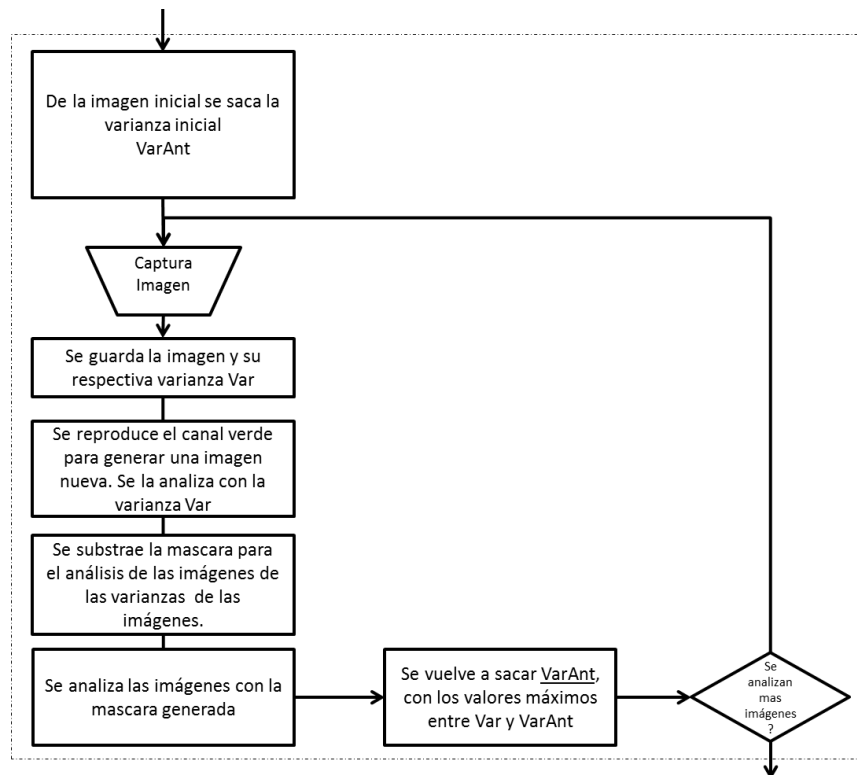
$$var = \frac{\sum_{i=1}^m (x_i - \mu)^2}{m - 1}$$

Donde x_i es el valor contenido dentro del pixel, m el número total de pixeles en la imagen y μ la media aritmética de la imagen.

Cada valor puede ser representado en una matriz junto con la covarianza; convirtiéndose en uno de los conceptos matemáticos más importantes en el análisis de los datos que son contenidos en una imagen, donde si existe una correlación entre los puntos analizados los valores son cercanos a cero, lo cual puede ser también observado en la matriz de correlación.

Luego de generar la matriz de varianza que contiene los detalles en los cuales las imágenes tienen relación o no, seleccionamos aquellos píxeles que representan una variación representativa, comparando las dos varianzas generadas y posteriormente este punto corresponderá a las nuevas coordenadas pixel, que al final del procedimiento contendrá las dos partes detalladas de cada imagen y generará el resultado focalizado en el campo espacial que corresponda a las matrices entrantes.

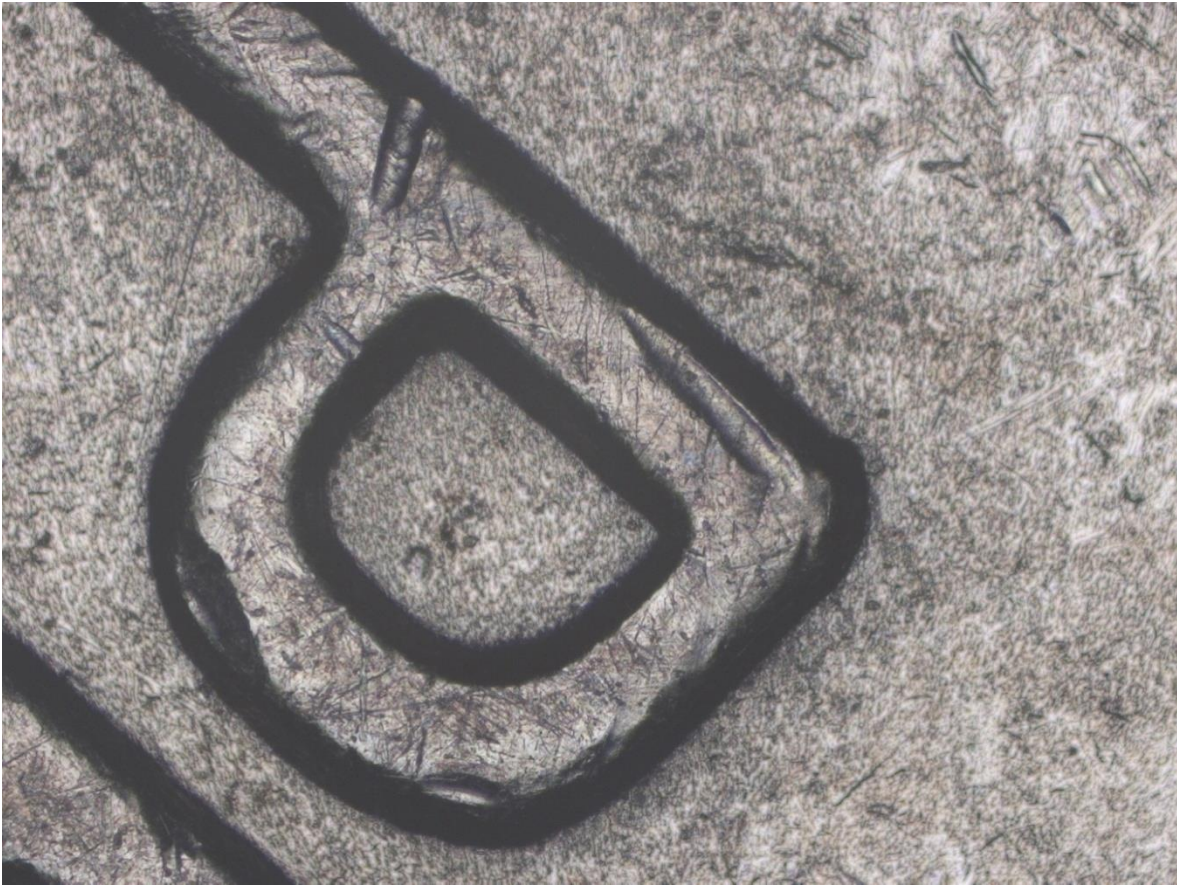
Figura 6: Diagrama del Algoritmo para fusión por matrices de varianza.



Fuente: Autores

La figura 7 corresponde al resultado del procedimiento de fusión por medio de la metodología de matriz de varianza, la cual será objeto fuente de estudio de este proyecto, por lo tanto las demás imágenes obtenidas por las metodologías de armado serán comparadas con la presentada a continuación.

Figura 7: Imagen focalizada Metodología Matriz de Varianza.



Fuente: Laboratorio GOTS-UIS

3.4.2 PCA

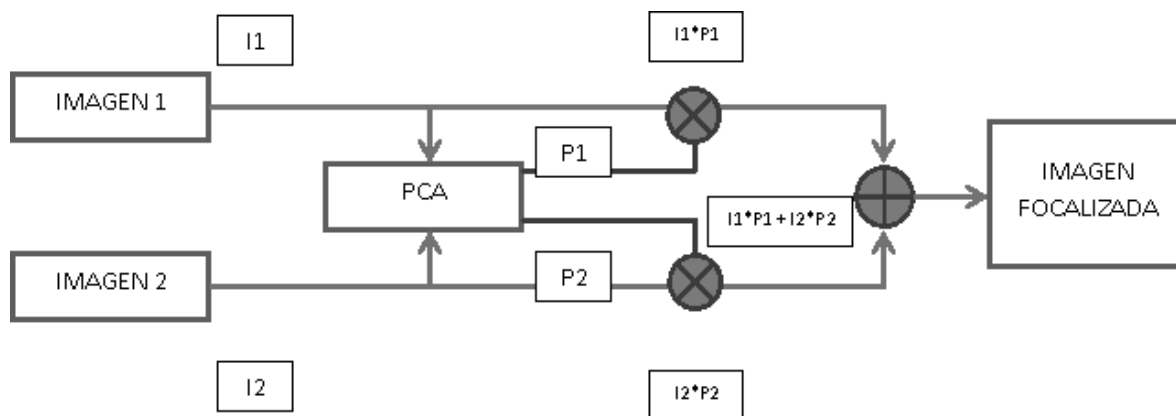
El Análisis de Componentes principales consiste en hallar transformaciones de las variables de origen con el fin de conseguir un nuevo conjunto de variables relacionadas entre sí, denominadas Componentes Principales [4].

Las componentes son combinaciones de las variables origen y solo unas pocas contienen la mayor parte de la variabilidad de los datos, obteniendo una disminución de la dimensión en los mismos. El propósito fundamental de la técnica

consiste en la reducción de la dimensión de los datos con el fin de simplificar el problema en estudio.

Este procedimiento por sí solo, es uno de los más usado para la fusión de imágenes multispectrales y pancromáticas, dado que la información espacial es tomada como componente principal, seguido de la información espectral; pero una de las desventajas es que sin un tratamiento previo de las imágenes de entrada, el ruido y las imperfecciones propias de las imágenes pueden alterar la información espacial y hacer que el resultado de la imagen no sea óptimo. Por tal motivo se hace necesario el uso de transformadas previas para garantizar el análisis de la información concerniente a la fusión de las imágenes. [5]

Figura 8: Procedimiento general del tratamiento de imágenes por medio de PCA.



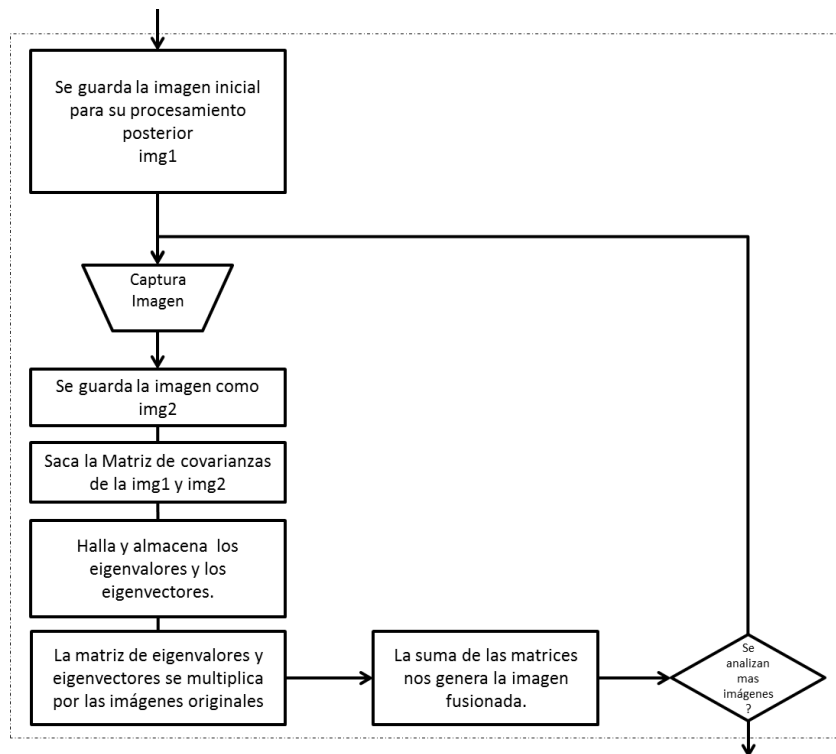
Fuente: Autor

El procedimiento general está descrito en la figura 8; donde a dos imágenes entrantes (I_1 , I_2) se les halla la matriz de covarianza, posteriormente los eigenvalores y eigenvectores de la matriz de covarianza generaran un nuevo conjunto de datos denominados componentes principales, que será multiplicado por cada una de las imágenes originales, de la suma de las anteriores obtengo la

imagen resultante que contendrá la información relevante, que este caso contendría los detalles o partes focalizadas de la imagen [6].

El procedimiento donde se describe la fusión de imágenes mediante el análisis de componentes principales viene descrito por el diagrama del Algoritmo para la fusión en la figura 9.

Figura 9: Diagrama del Algoritmo para fusión PCA



Fuente: Autores

OBJETIVO:

Implementar el método de análisis de componentes principales para dos imágenes, tomadas desde diferente campo espacial (z), y fusionarlas obteniendo

como resultado una sola imagen que contiene las partes focalizadas de las dos anteriores.

PROCEDIMIENTO:

A partir de las 60 imágenes iniciales, se genera un proceso iterativo donde al comenzar un par de imágenes es analizada y se genera una imagen resultante que contiene los detalles de ambas, para los siguientes ciclos esta imagen resultante, será nuevamente analizada con una nueva imagen entrante con el fin de que al final de las iteraciones, todas las imágenes queden contenidas en una única imagen final, la cual contendrá el detalle de todas las comparaciones anteriores.

Código de Matlab

```
C = cov([im1(:) im2(:)]);  
[V, D] = eig(C);  
if D(1,1) >= D(2,2)  
    pca = V(:,1)./sum(V(:,1));  
else  
    pca = V(:,2)./sum(V(:,2));  
end  
imf = pca(1)*im1 + pca(2)*im2;
```

Figura 10: Imagen focalizada Metodología PCA.



Fuente: Autores

3.5 ESPECTRAL

Como tratamiento espectral generaremos escenarios con la Transformada de Wavelet discreta.

3.5.1 WAVELET

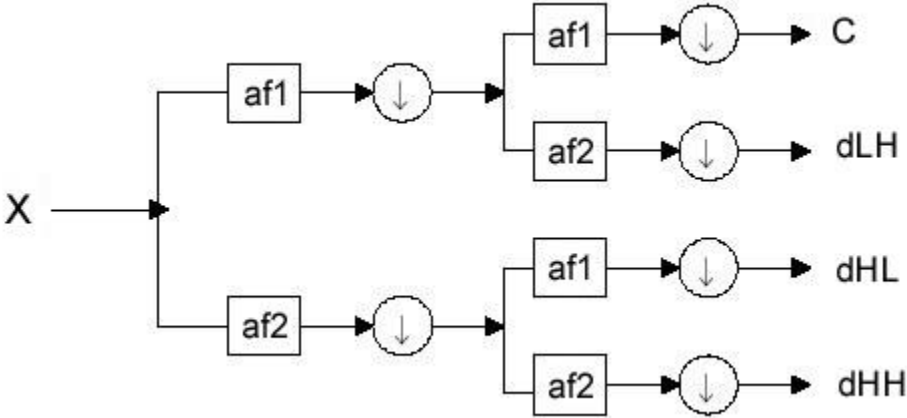
La transformada Wavelet [7] [8] es una herramienta matemática para la descomposición jerárquica de funciones. Siendo un modelo multiresolución con los diferentes niveles de detalle de un objeto. Como lo define Mallat es un conjunto de espacios de funciones multiresolución que proveen una aproximación de todas las funciones. [9]

La fases de los coeficientes de wavelet pueden ser interpretados como portadores de detalles de la imagen, donde las amplitudes componen los valores de la misma. [10],

La metodología de descomposición (o análisis) a una imagen mediante un banco de filtros (af, sf para la figura 1.1) de la Transformada Discreta de Wavelet comienza con una imagen original la cual es filtrada con dos funciones y generando un sobre muestreó, para el caso de la figura las funciones son af1 (Paso Bajo) y af2 (Paso Alto). Este filtrado se realiza primero en las columnas y luego a las 2 imágenes resultantes se les realiza el filtrado en las filas generando de esta manera 4 imágenes resultantes. [17]

C (Paso Bajo-Bajo), dLH (Paso Bajo-Alto), dHL (Paso Alto-Bajo) y dHH (Paso Alto-Alto). Como se observa en la figura 11.

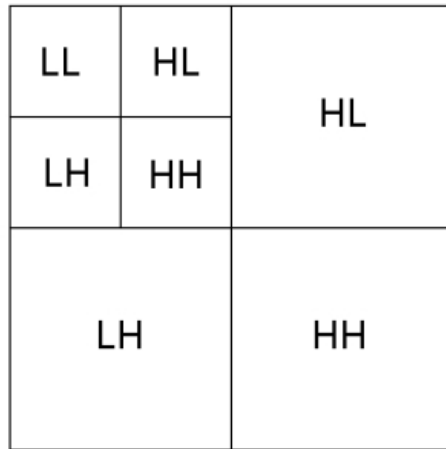
Figura 11: Banco de filtros de la Transformada Discreta de Wavelet en la descomposición de una imagen.



Fuente: Polytechnic Institute of New York University

Estos resultados se representan una forma piramidal de función que posibilita un cambio más eficiente en cada nivel, como se muestran en la figura 12.

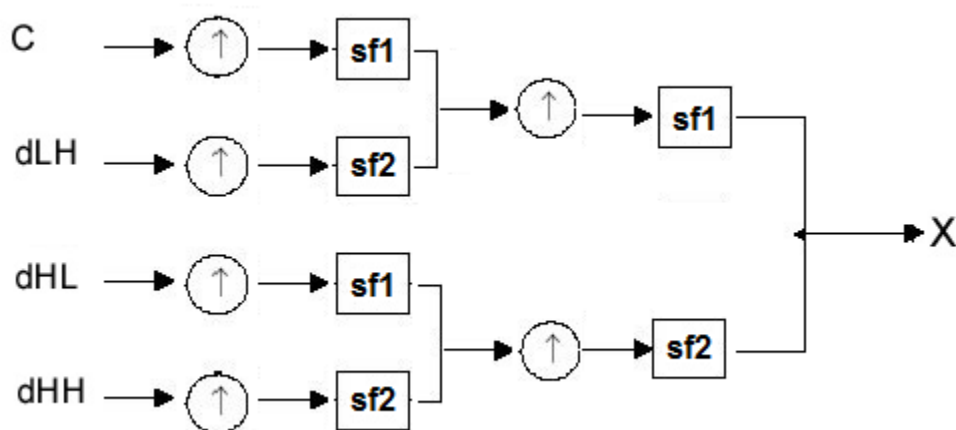
Figura 12: Pirámide de descomposición de 2 niveles.



Fuente: Digital Image Processing Using Matlab.

La metodología de composición (o síntesis) a partir de las imágenes resultado de la descomposición (C (Paso Bajo-Bajo), dLH (Paso Bajo-Alto), dHL (Paso Alto-Bajo) y dHH (Paso Alto-Alto)) tomamos las dos descomposiciones (x-bajo, x-alto) y las filtramos con la función correspondiente generando un downsampling, en para el caso de la figura las funciones son sf1 (Paso Bajo) y sf2 (Paso Alto). Este filtrado se realiza primero en las columnas y luego a las 2 imágenes resultantes se les realiza el filtrado en las filas generando de esta manera una imagen resultante [17]. Como se observa en la figura 13.

Figura 13: Banco de filtros de la Transformada Discreta de Wavelet en la reconstrucción de una imagen.



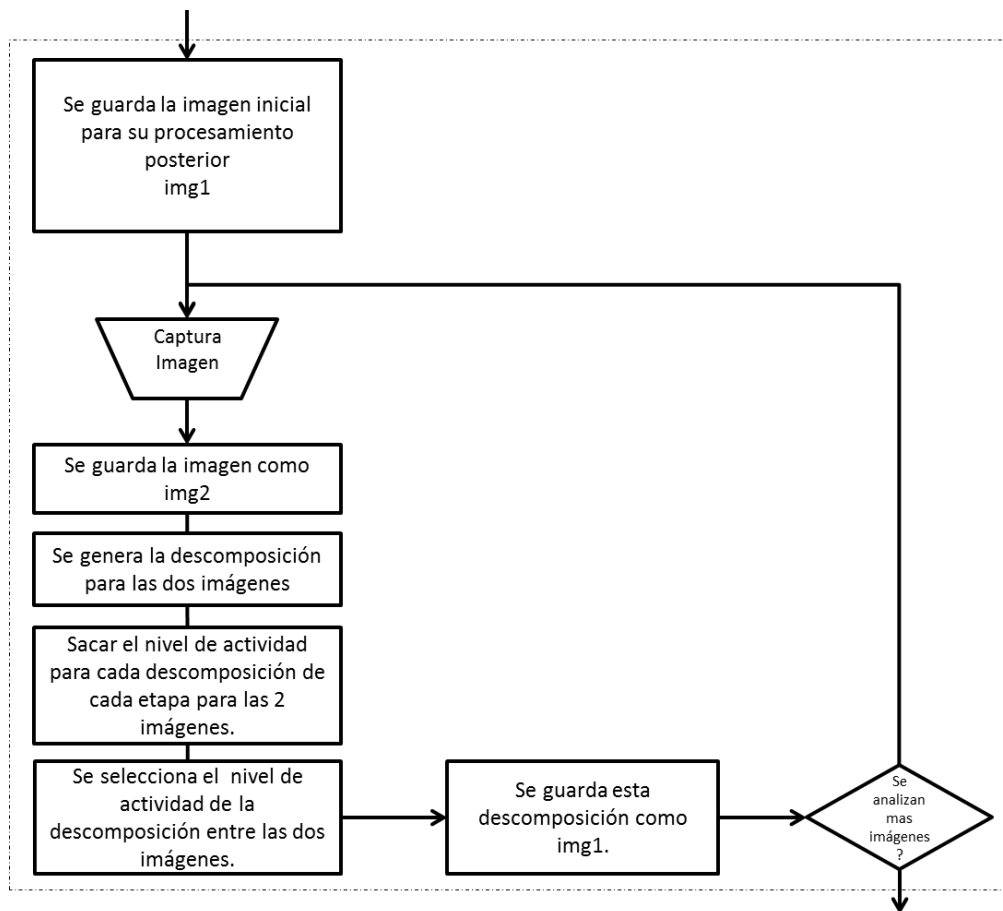
Fuente: Polytechnic Institute of New York University

Dentro de los usos más comunes de Wavelet se encuentran la compresión de datos, detección de características y contornos, análisis de texturas y segmentación, niveles de detalle manejables y la edición de imágenes, control de niveles de detalle para una posterior edición de las mismas. [10]

El algoritmo de fusión se basa en la generación de las multiresoluciones de detalle para formar una estructura focalizada, formando un subconjunto del compendio de los detalles de la pila de imágenes procesadas para su posterior reconstrucción.

El funcionamiento se puede observar en el siguiente figura 14.

Figura 14: Diagrama del Algoritmo para fusión Wavelet.



Fuente: Autores

EXPERIMENTOS.

Para lograr la implementación de la transformada de Wavelet discreta para la focalización extendida de imágenes microscópicas, se deben tener en cuenta algunas variables tanto externas como internas que afectan directamente los resultados. La función base para generar las descomposiciones, el método para determinar el nivel de actividad para las descomposiciones son los puntos críticos de los que depende el funcionamiento del proceso.

Se presentan a continuación los experimentos realizados para cada punto y por ultimo las pruebas a la fusión realizadas con resultados previos.

LA FUNCIÓN BASE PARA GENERAR LAS DESCOMPOSICIONES

OBJETIVO:

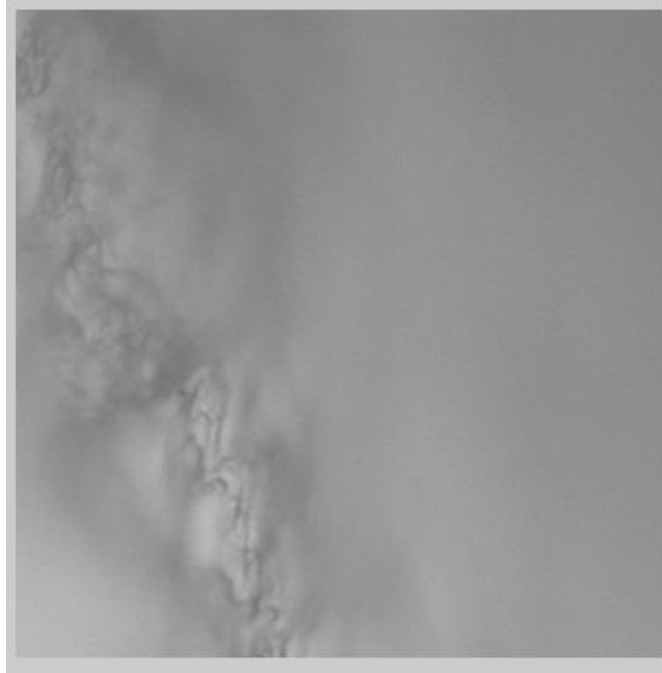
Se utilizará la herramienta matemática Transformada Discreta de Wavelet con diferentes bancos de filtros descomponiendo una imagen de entrada del microscopio, con el fin de saber que filtro proporciona una mejor descripción de los detalles de la imagen para poder filtrar el ruido detallando únicamente las zonas con focalización definida y aplanando las zonas no focalizadas para que puedan generar ruido en la formación de la estructura en el armado de la focalización completa. Se presenta un breve examen sobre cada filtro y su resultado. La finalidad del experimento es encontrar un filtro con el cual la imagen resultante pueda ser detallada en la zona de focalización.

PROCEDIMIENTO

Se realizó el experimento usando como filtros af1 y af2 diferentes funciones, Haar /Daubechies orden1, Daubechies Orden 4, Symlets Orden 4, Cohen-Daubechies-Feauveau Biortogonal, Antonini-Barlaud-Mathieu-Daubechies wavelet con la misma imagen base en escala de grises y generando para todos una profundidad de 2

Etapas. La imagen de muestra se encuentra en escala de grises para facilitar el proceso.

Figura 15: Imagen a escala de grises de entrada vista microscopio Moneda 100x.



Fuente: Autores

RESULTADOS:

Como resultado para cada filtro se presenta una imagen de la matriz del filtro de análisis aplicado (Columna 1 Paso Bajo, Columna 2 Paso Alto). Luego se mostrará la imagen resultante del paso bajo y las diferentes etapas de profundidad

Filtro HAAR /Daubechies orden1

Figura 16: Filtro Wavelet Haar.

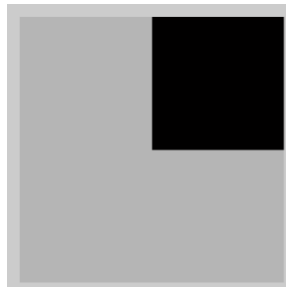
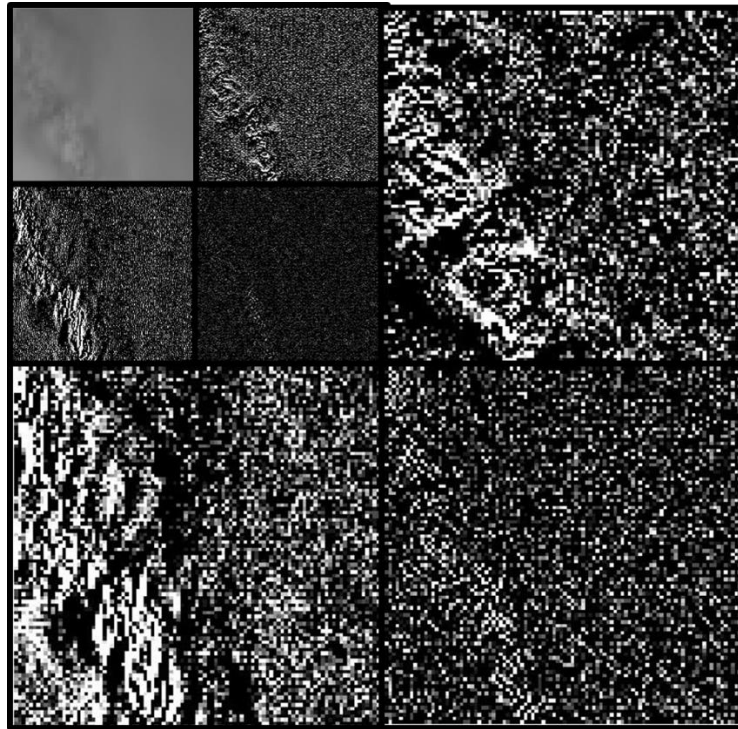


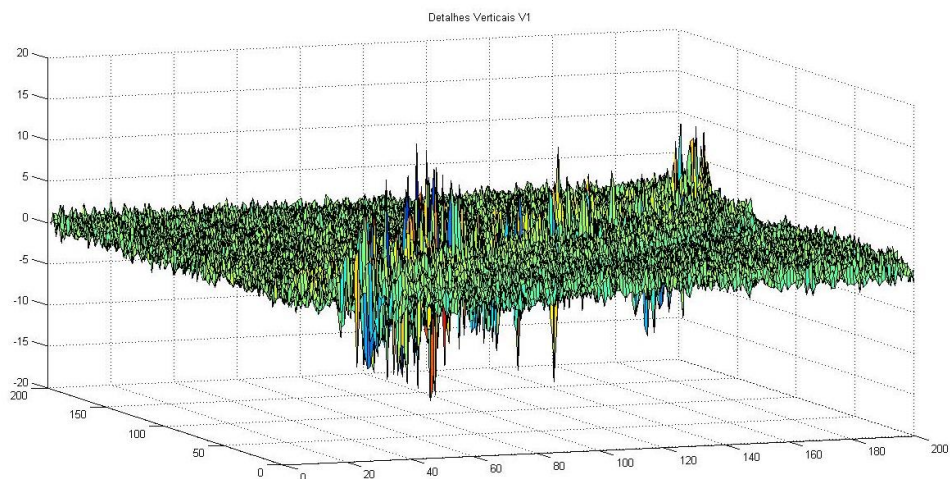
Figura 17: Pirámide de descomposición de 2 niveles Wavelet Haar



Puede observarse la formación de irregularidades en el detalle en la zona de focalización. Tanto en HL como en LH en la 2° etapa.

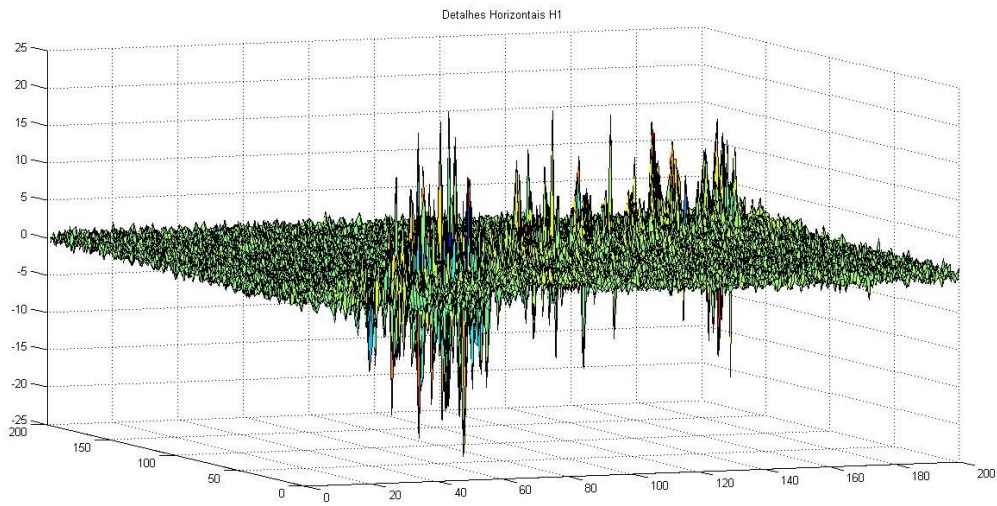
Para verlas con mayor detalle veremos las matrices con respecto a sus amplitudes.

Figura 18: Matriz de descomposición de dLH de 2° Nivel Filtro Haar Vertical.



Fuente: Autores

Figura 19: Matriz de descomposición de dHL de 2° Nivel Filtro Haar Horizontal



Fuente: Autores

DaubechiesOrden 4

Figura20: Filtro Wavelet Daubechies

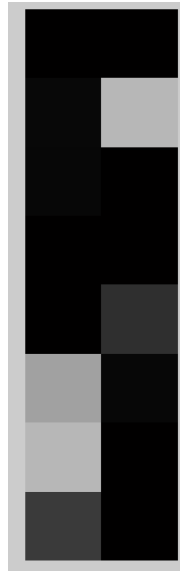
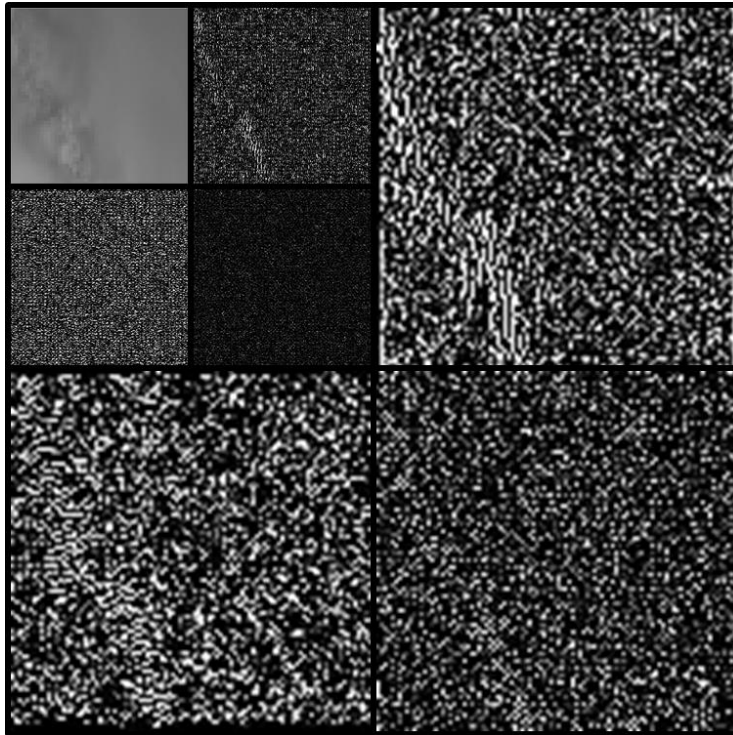


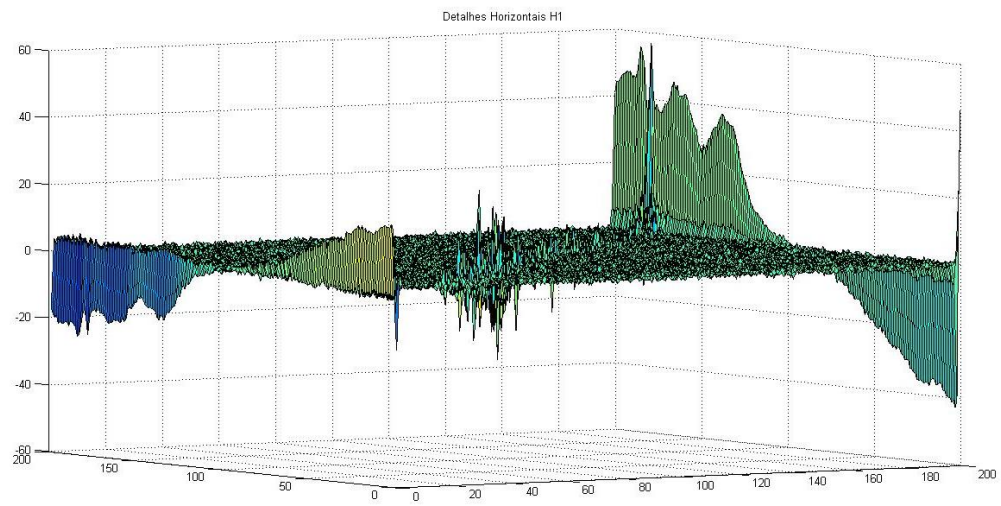
Figura 21: Pirámide de descomposición de 2 niveles Wavelet Daubechies.



Fuente: Autores

En este caso podemos ver que el detalle horizontal o HL tiene presencia de cambios en las partes focalizadas. Al verla al detalle tenemos.

Figura 22: Matriz de descomposición de dHL de 2° Nivel Filtro Daubechies Horizontal



Fuente: Autores

Symlets Orden 4

Figura23: Filtro Wavelet Symletsorden 4

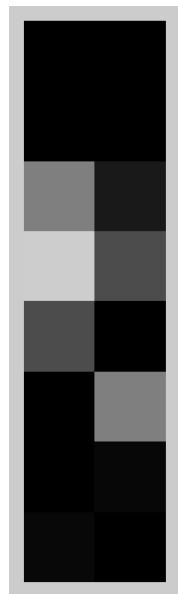
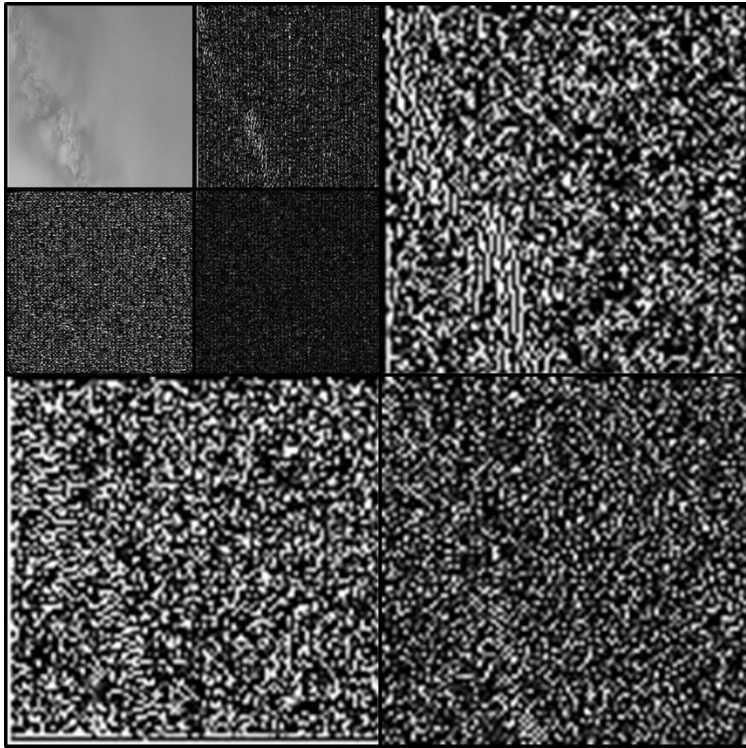
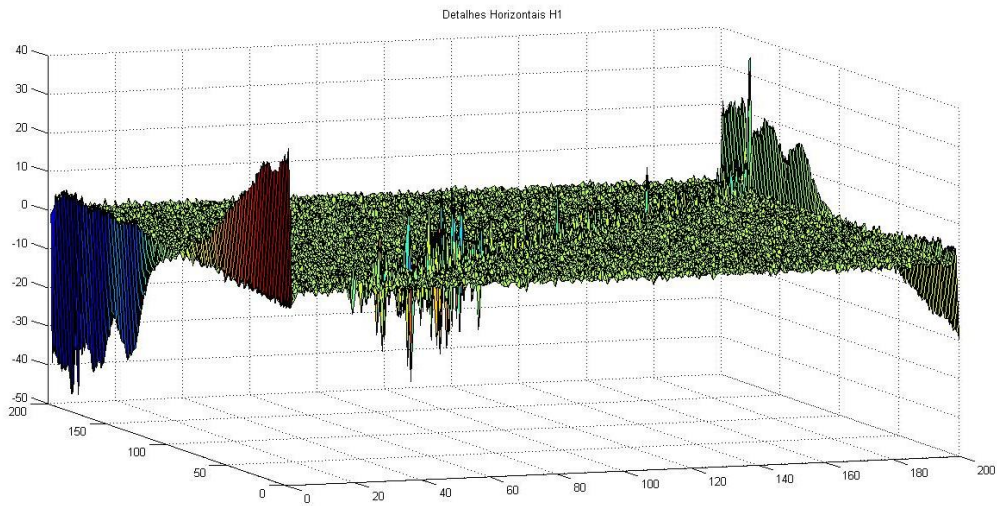


Figura 24: Pirámide de descomposición de 2 niveles Wavelet Symlets orden 4.



Aquí observamos un leve grado de detalle en la figura que corresponde a dHL, al verla con los valores de las amplitudes tenemos:

Figura 25: Matriz de descomposición de dHL de 2° Nivel Filtro Symlets orden 4 Horizontal .



Fuente: Autores

Cohen-Daubechies-Feauveau -Biortogonal

Figura 26: Filtro Wavelet Biortogonal

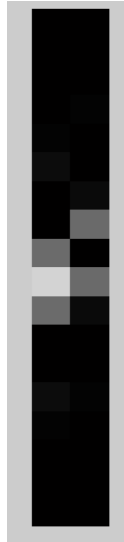
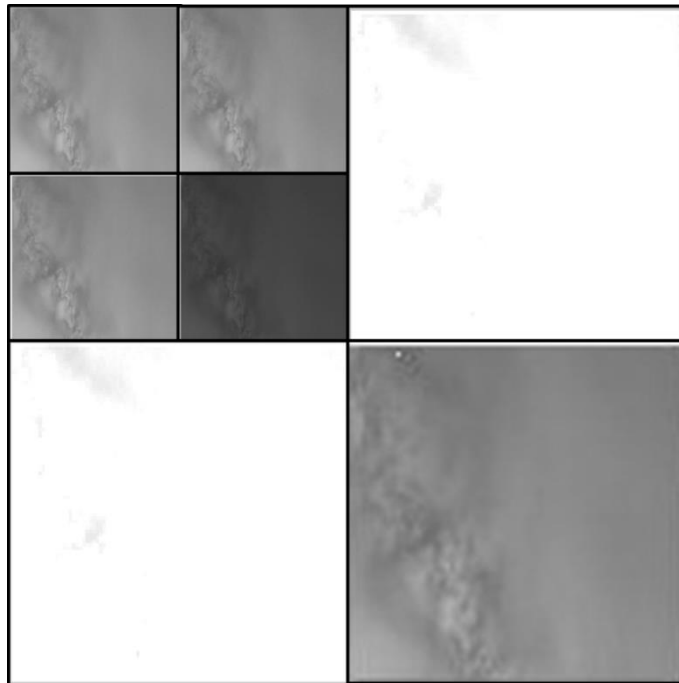


Figura 27: Pirámide de descomposición de 2 niveles Wavelet Biortogonal



Fuente: Autores

Podemos observar a simple vista que la mayoría de los detalles no fueron filtrados por los Paso-Bajo y paso-Alto

Antonini-Barlaud-Mathieu-Daubechies (*JPEG*)

Figura 28: Filtro Wavelet JPEG

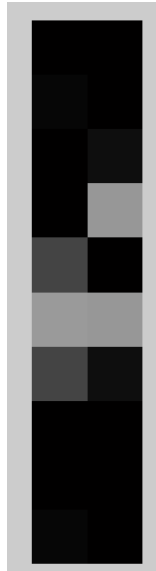
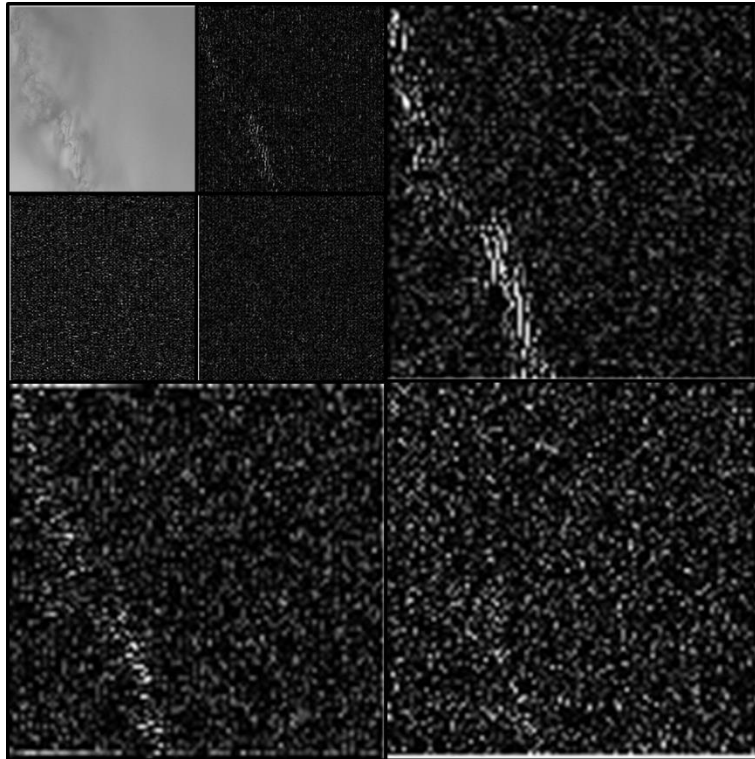


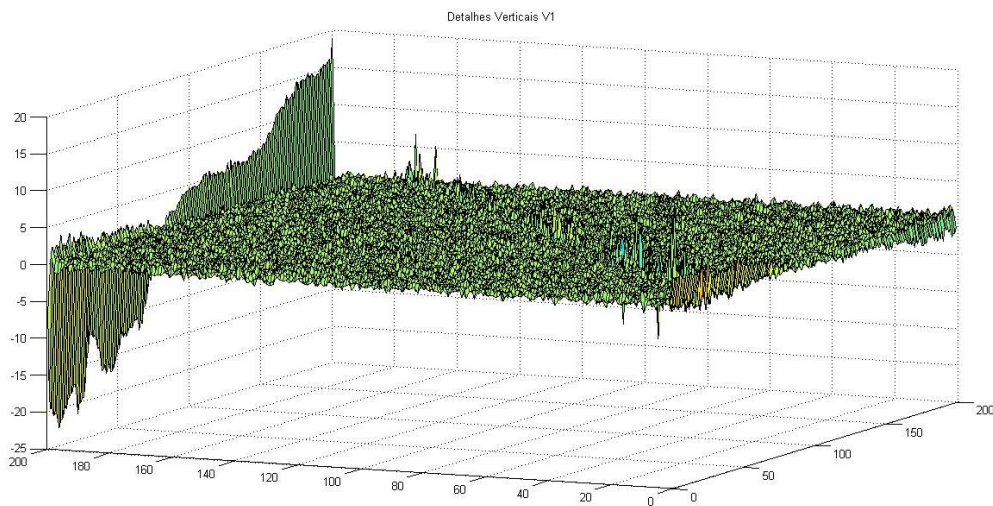
Figura 29: Pirámide de descomposición de 2 niveles Wavelet JPEG



Fuente: Autores

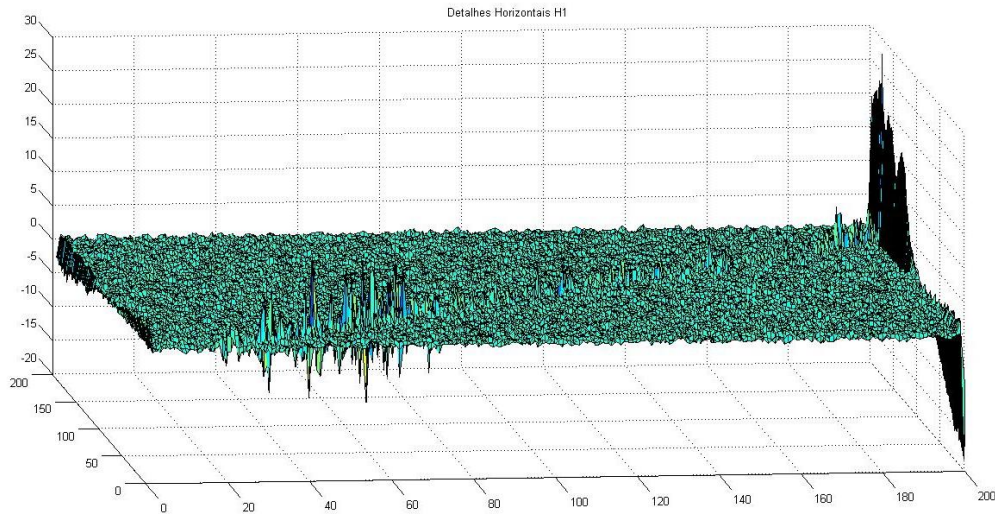
Se pueden apreciar a simple vista que tanto el detalle horizontal dLH como el vertical dHL contienen información sobre la zona focalizada.

Figura 30: Matriz de descomposición de dHL de 2° Nivel Filtro JPEG Vertical



Fuente: Autores

Figura 31: Matriz de descomposición de dHL de 2° Nivel Filtro JPEG Horizontal



Fuente: Autores

Cuando se observa al detalle a las diferentes matrices de detalle se puede observar que en la mayoría las zonas borde de la imagen tienen un valor superior al generado por el detalle de las focalizaciones. Mas sin embargo con el filtro Haar esta anomalía no ocurre. Por este motivo se toma el Filtro Haar como el banco de filtros para la descomposición.

El método para determinar el nivel de actividad para las descomposiciones y el procedimiento de selección con el que se determina que puntos son más relevantes

MÉTODO PARA DETERMINAR EL NIVEL DE ACTIVIDAD PARA LAS DESCOMPOSICIONES

OBJETIVO:

Durante el proceso de fusión de una imagen con la metodología Wavelet, a la descomposición de la imagen se le debe generar una matriz con el mismo tamaño que en vez de sus valores originales contenga el nivel de actividad de la misma. [28]

PROCEDIMIENTO:

Se generarán dos imágenes fusionadas utilizando la misma pila de imágenes iniciales y la misma metodología de armado, su única diferencia es la función que determina el nivel de actividad. La imagen con mejor resultado será la escogida.

La medición del nivel de actividad se realizará en este experimento en 2 categorías, Nivel de Actividad basada en Coeficientes y Nivel de Actividad basada en Ventanas. [28]

El Nivel de Actividad basada en Coeficientes (CBA) considera la importancia de cada coeficiente por separado. Se usará la ecuación:

$$A_i = (D_i(p))^2$$

Donde $p = (m, n, k, l)$ es el índice que corresponde a un coeficiente de la descomposición multiescala (MSD) en particular, m y n es la posición espacial en una banda de frecuencia, k el nivel de descomposición y l la banda de frecuencia (dLH, dHLdHH o dLL). De esta manera D_i es la representación el MSD la imagen original y A_i su correspondiente nivel de actividad.

El Nivel de Actividad basada en Ventanas (WBA) tiene diferentes alternativas, escogeremos la opción de la Frecuencia Espacial (SF-WBA) ya que nos encontramos tratando con imágenes cuyo contenido es una superficie de una misma muestra. Se usará la Ecuación:

$$A_I = \sqrt{R^2 + C^2}$$

$$R = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{n=1}^N \sum_{m=2}^M [D_I(m, n, k, l) - D_I(m, n - 1, k, l)]^2}$$

$$C = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{n=1}^N \sum_{m=2}^M [D_I(m, n, k, l) - D_I(m - 1, n, k, l)]^2}$$

RESULTADOS:

Figura 32: Imagen Fusionada, Actividad Basada en Coeficientes.



Fuente: Autores

Figura 33: Imagen fusionada, Actividad con el método de la frecuencia espacial.



Fuente: Autores.

Como resultado y comparando la complejidad computacional se decide que la actividad basada en coeficientes entrega mejores resultados.

FUSIÓN DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS PARA MEDIANTE FUSIÓN CON TRANSFORMADA DISCRETA DE WAVELET.

OBJETIVO:

Implementar la transformada discreta de Wavelet para fusionar las imágenes tomadas desde diferente campo espacial (z), obteniendo como resultado una sola imagen focalizada.

PROCEDIMIENTO:

El algoritmo al realizar la selección de datos, comparando los diferentes niveles de actividad, genera una nueva pirámide de descomposición que contiene los detalles (focalizaciones) de las demás imágenes. Esta nueva pirámide al ser sintetizada nos genera la imagen con focalización extendida.

Código en Matlab

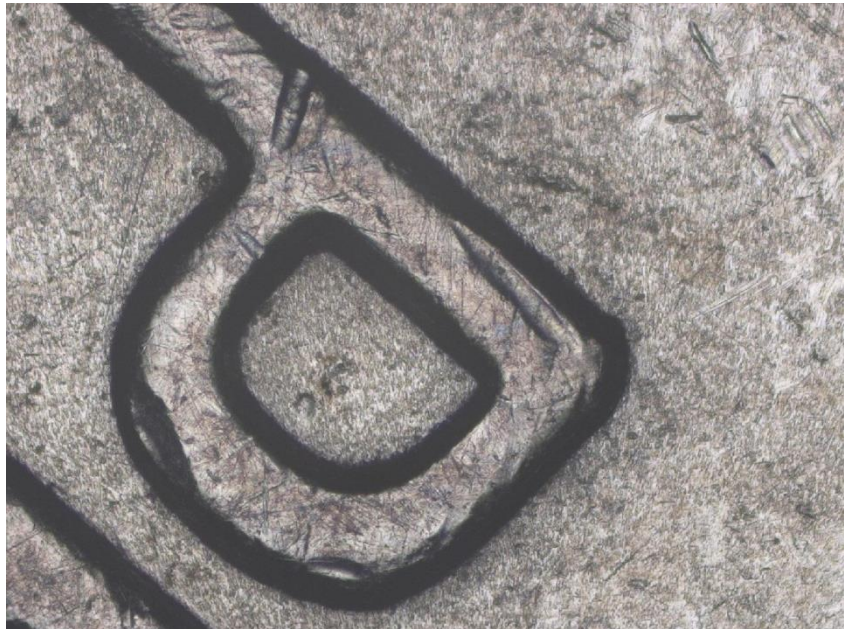
```
W1 = dwt2D(x,u,af);  
w2 = dwt2D(x,u,af);  
w3 =selection(u,w2,w1);  
y1 = idwt2D(w3,u,sf);
```

```
function wz=selection(u,wx,wy)  
  
for i=1:u  
for a=1:3  
ax=ActLevel(wx{1,i}{1,a});
```

```
    ay=ActLevel(wy{1,i}{1,a});  
mb=mapabinario(ax,ay,1);  
wz{1,i}{1,a}=CMS(mb,wx{1,i}{1,a},wy{1,i}{1,a});  
end  
end  
ax=ActLevel(wx{1,u+1});  
ay=ActLevel(wy{1,u+1});  
mb=mapabinario(ax,ay,1);  
wz{1,u+1}=CMS(mb,wx{1,u+1},wy{1,u+1});
```

La imagen focalizada resultado del experimento se muestra en la figura 31.

Figura 34: Imagen focalizada Metodología Wavelet.



Fuente: Autor

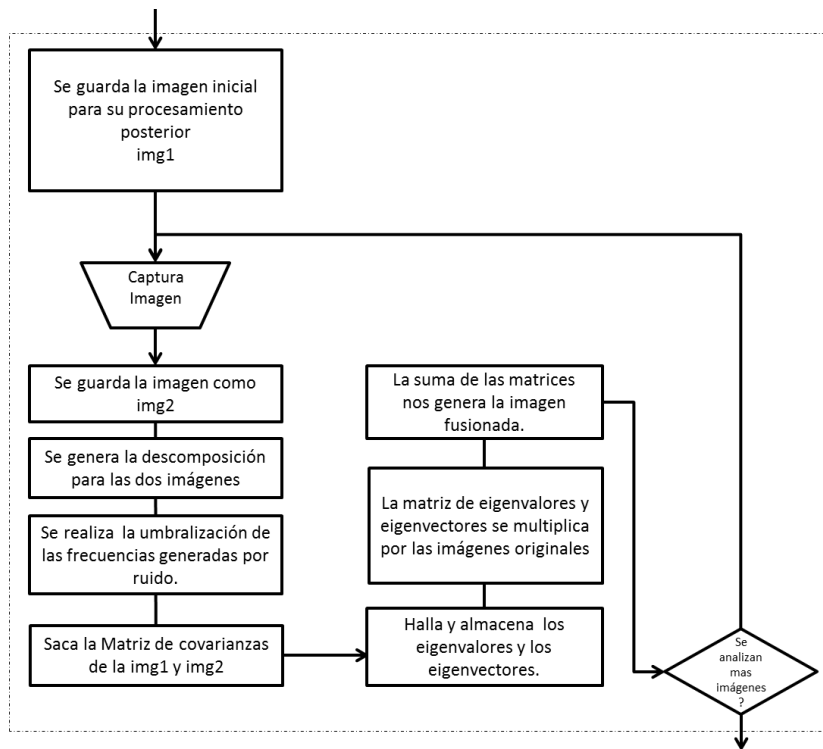
3.5.2 COMBINACION WAVELET – PCA

Se tendrá un escenario adicional, una combinación de PCA y wavelet. Se realiza buscando que wavelet produzca una minimización del ruido y que el análisis de componentes principales genere la focalización.

En los métodos usados para reducir el ruido presente en la señal de una imagen, la característica común es el uso de un cambio en el dominio de la señal, donde se lleva a cabo una serie de operaciones sobre los coeficientes, lo anterior por medio de filtros cuidadosamente estudiados que permiten la distinción, entre el detalle de una imagen y el posible ruido que pueda estar presente; posterior a esta descomposición, la transformada inversa se encarga de rearmar las imágenes descompuestas para lograr obtener una imagen con la mayor cantidad de detalles que aportan a información dejando a un lado el ruido o no nitidez de la imagen.

En dicho escenario se utilizan lamultiresolución para realizar una umbralización a los detalles y posteriormente estas imágenes son procesadas con PCA para su fusión. Podemos observar el proceso en la figura 35.

Figura 35: Diagrama del algoritmo para la fusión Wavelet-PCA.



Fuente: Autores

OBJETIVO:

Implementar la transformada discreta de Wavelet para eliminación de ruido a las imágenes tomadas desde diferente campo espacial (z) y el análisis de componentes principales para fusionarlas, obteniendo como resultado una sola imagen focalizada, se realiza este proceso para todas las imágenes tomadas por el microscopio.

PROCEDIMIENTO:

Se adquiere la primera imagen, se descompone con el filtro wavelet, luego se umbralizan las frecuencias encontradas en la descomposición de detalle de la wavelet, para la imagen. Se reconstruye la imagen con las nuevas aproximaciones de wavelet. Esta imagen se pasa al proceso de PCA, si es la primera imagen se

guarda y se toma la siguiente imagen, de lo contrario se analiza con respecto a la imagen guardada. Luego de ser fusionadas todas las imágenes se tiene la imagen con focalización extendida, como la que se ve en la Figura 36.

La secuencia del código muestra la función `dwt2D`, la cual es llamada para retornar los valores correspondientes a los datos resultados del paso de los filtros, que luego van a ser usados como información que ingresa en la implementación de PCA, con los detalles de la imagen ya seleccionados, logrando así un armado de partes de detalles de imágenes que son almacenados en una nueva imagen resultante, este proceso es igualmente cíclico y evalúa en la primera iteración dos imágenes entrantes y luego el resultado de estas dos imágenes con una nueva entrante corresponderán a los nuevos dos valores iniciales para repetir todo el ciclo.

Código en Matlab

```
w = dwt2D(x,u,af);
j=w{1,r}{1,0};
[h g]=size(j);
[Mf Vf]=muestreo(j,1);
[MinfMaxf]= rango(Mf, Vf,t);
for q = 1 : r
e{1,q}{1,1}=analiza(w{1,q}{1,1},Minf,Maxf,1,1);
e{1,q}{1,2}=analiza(w{1,q}{1,2},Minf,Maxf,1,1);
e{1,q}{1,3}=analiza(w{1,q}{1,3},Minf,Maxf,1,1);
end
e{1,r+1}= w{1,r+1};
y1 = idwt2D(e,u,sf);
im2 = y1 ;
    C = cov([im1(:) im2(:)]);
    [V, D] = eig(C);
if D(1,1) >= D(2,2)
    pca = V(:,1)./sum(V(:,1));
else
    pca = V(:,2)./sum(V(:,2));
end
```

$$\text{imf} = \text{pca}(1) * \text{im1} + \text{pca}(2) * \text{im2};$$

Figura 36: Imagen focalizada Metodología Wavelet-PCA.



Fuente: Autores

4. REFLEXIÓN

4.1 DEFINICIONES.

Luego de realizar el análisis y experimentos de los diferentes métodos que pueden ser utilizados en la generación de la imagen focalizada, se dedicará este capítulo al análisis de los resultados.

La finalidad del experimento es la focalización extendida de una muestra microscópica. El proceso comienza con la adquisición de las imágenes extraídas de la muestra por un microscopio óptico confocal. Al utilizar este tipo de microscopio estamos reduciendo notablemente la luz desenfocada y los destellos de la lente en muestras mayores al plano focal [1], con lo que evitamos el ruido por iluminación en las muestras.

Al tener la secuencia de imágenes utilizamos un método de armado para la fusión de las mismas, los diferentes métodos de armado fueron motivo de análisis y experimentación en el capítulo anterior.

Se procede a continuación a analizar los resultados de las experimentaciones.

Cada imagen fusionada será analizada por 6 métricas diferentes [21]; Las 3 primeras comparan a las imágenes resultado con la imagen perfecta, en este caso se realiza la comparación con la imagen resultado de otro software experto en profundidad de campo extendido [20], luego analizaremos a las imágenes por sus características propias.

4.2 METRICAS DE EVALUACIÓN

4.2.1 MÉTRICAS DE EVALUACIÓN CON IMAGEN DE REFERENCIA.

Raíz del error cuadrático (RMS)

Calcula como la raíz del error cuadrático medio de los píxeles correspondientes en la imagen de referencia r I y la imagen fusionada f I . [22]

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N (I_r(i,j) - I_f(i,j))^2}$$

La Media Absoluta (MAE)

Calcula como el error absoluto medio de los píxeles correspondientes de referencia y las imágenes fusionadas.[22]

$$MAE = \frac{1}{MN} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N |I_r(i,j) - I_f(i,j)|$$

Relación Señal-Ruido (SNR)

Esta medida será alta cuando la referencia y las imágenes fundidas son iguales. Un valor más alto implica una mejor fusión. [23]

$$SNR = 20 \log_{10} \left(\frac{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N (I_r(i,j))^2}{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N (I_r(i,j) - I_f(i,j))^2} \right)$$

4.2.2 MÉTRICAS DE EVALUACIÓN SIN IMAGEN DE REFERENCIA.

Desviación Estándar.

Se sabe que la desviación estándar se compone de la señal y de las partes de ruido. Esta métrica sería más eficiente en la ausencia de ruido. Se mide el contraste en la imagen fusionada. Una imagen con alto contraste tendría una alta desviación estándar.[24]

$$\sigma = \sqrt{\sum_{i=0}^L (i - \bar{i})^2 h_{I_f}(i)} , \quad \bar{i} = \sum_{i=0}^L i h_{I_f}$$

Donde $h_{I_f}(i)$ es el histograma normalizado de la imagen fusionada. Y L el número de la frecuencia contenida en el histograma.

Entropía

La entropía se utiliza para medir el contenido de información de una imagen. La entropía es sensible al ruido y otras fluctuaciones rápidas no deseadas. Una imagen con alto contenido de información tendría alta entropía. [25]

La entropía de una imagen focalizada está dada por:

$$He = - \sum_{i=0}^L h_{I_f}(i) \log_2 h_{I_f}(i)$$

Frecuencia Espacial

Esta frecuencia en el dominio espacial indica el nivel de actividad global de la imagen fusionada.[26]

El criterio de frecuencia espacial SF es:

$$SF = \sqrt{RF^2 + CF^2}$$
$$RF = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{x=1}^M \sum_{y=2}^N [I_f(x, y) - I_f(x, y - 1)]^2}$$
$$CF = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{y=1}^M \sum_{x=2}^N [I_f(x, y) - I_f(x - 1, y)]^2}$$

Donde RF es la frecuencia de la imagen por filas y CF la frecuencia de la imagen por columnas.

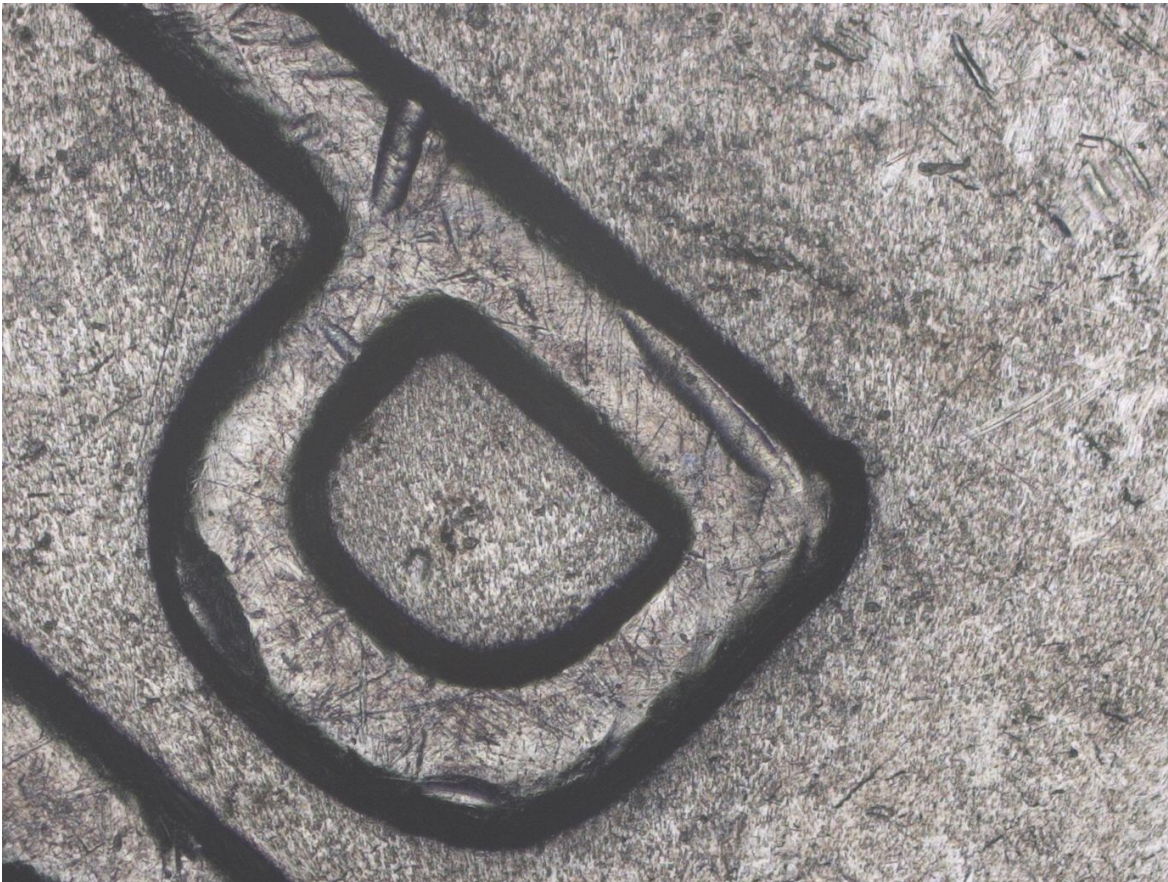
4.3 RESULTADOS

4.3.1 MÉTRICAS DE EVALUACIÓN CON IMAGEN DE REFERENCIA.

Para presentar los resultados se mostrará las comparaciones de las dos imágenes y luego se expondrán las tablas de resultados. La imagen perfecta es el resultado del procesamiento de la misma secuencia de imágenes iniciales que se ha utilizado en las diferentes metodologías, siendo el proceso realizado con el pluginExtended_Depth_Field.jar (versión 11.07.2011) para ImageJ por la

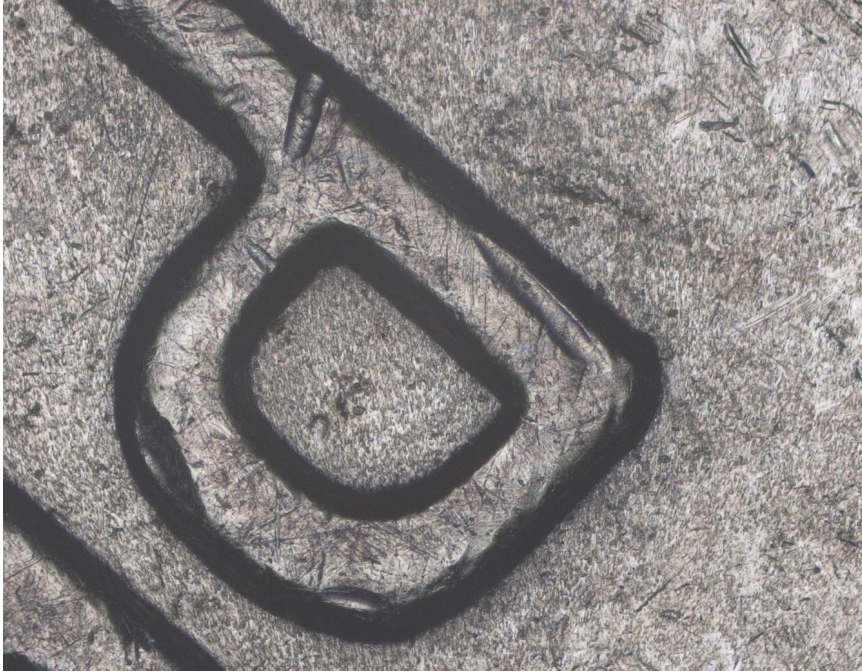
École Polytechnique Fédérale de Lausanne, por el grupo de imágenes biomédicas [20]. El resultado puede observarse en la Figura 37.

Figura 37: Imagen Focalizada EPFL



Fuente: Autor

Figura 38: Imagen Focalizada EPFL



Fuente: Autor

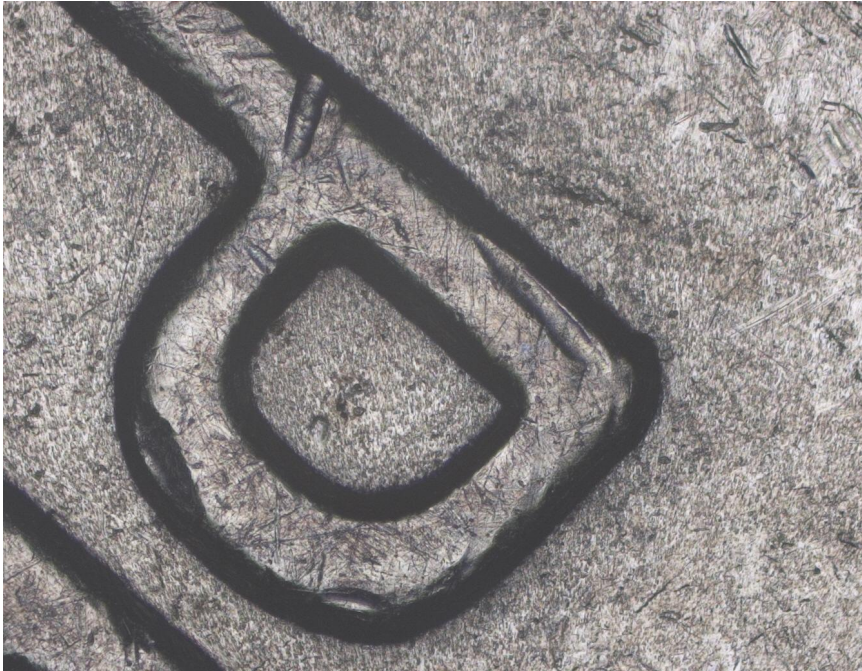
Figura 39: Imagen focalizada Metodología Matriz de Varianza.



Fuente: Laboratorio GOTS-UIS

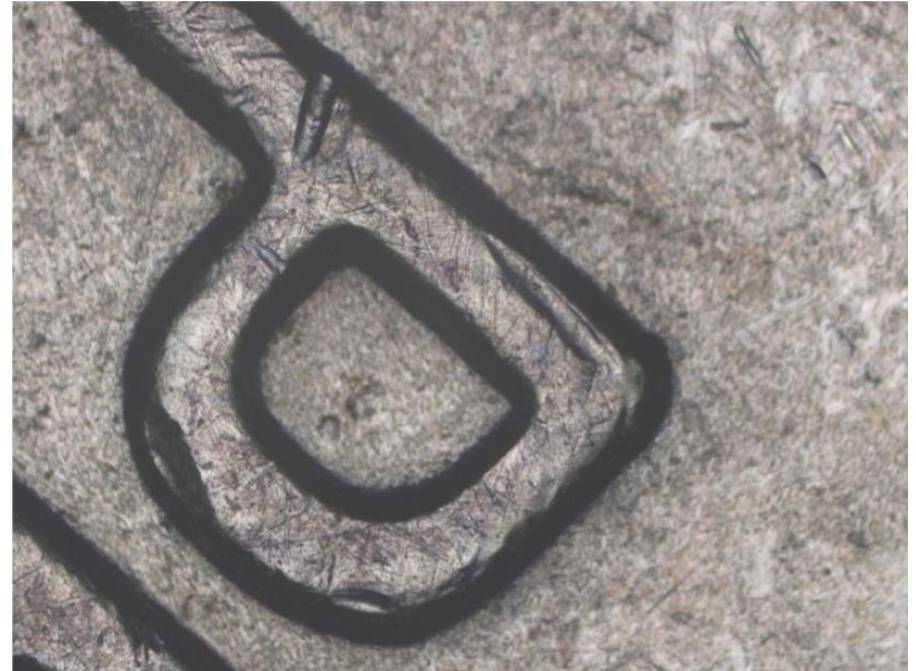
Las imágenes poseen características muy similares sin embargo en los pequeños detalles de las hendiduras puede observarse un poco de desenfoque en la Figura 39.

Figura 40: Imagen Focalizada EPFL



Fuente: Autor

Figura 41: Imagen focalizada Metodología PCA



Fuente: Autores

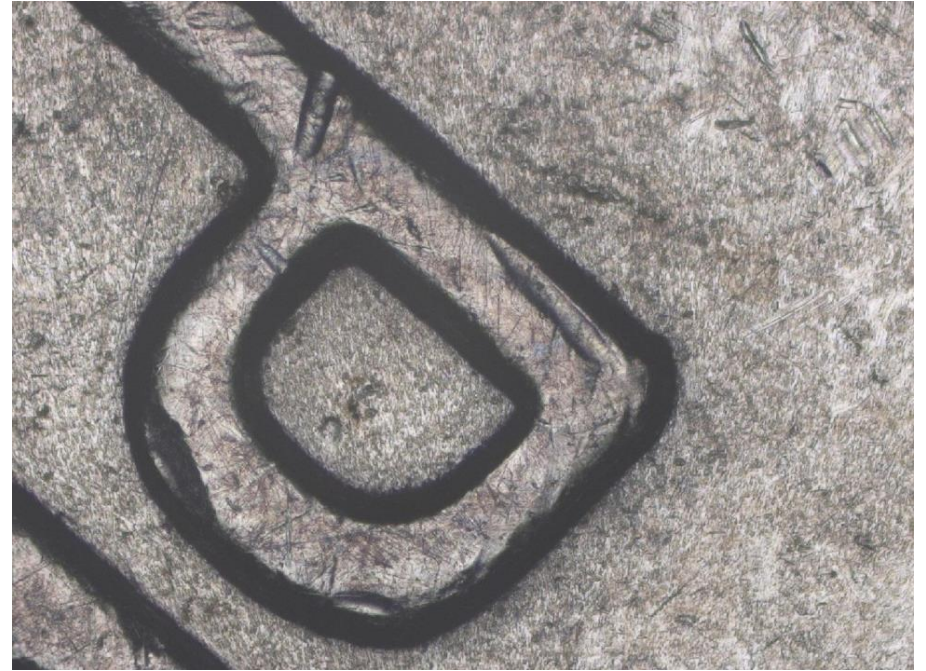
Al detallar estas imágenes podemos observar que la Figura 41 no posee una focalización completa de fondo, se encuentra borroso y se pierden los detalles

Figura 42: Imagen Focalizada EPFL



Fuente: Autor

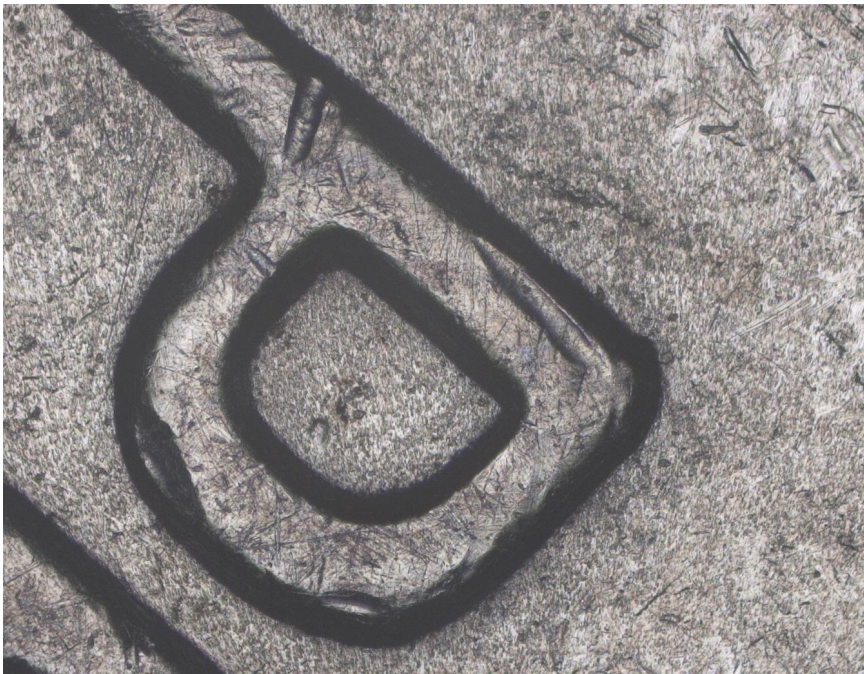
Figura 43: Imagen focalizada Metodología Wavelet.



Fuente: Autor

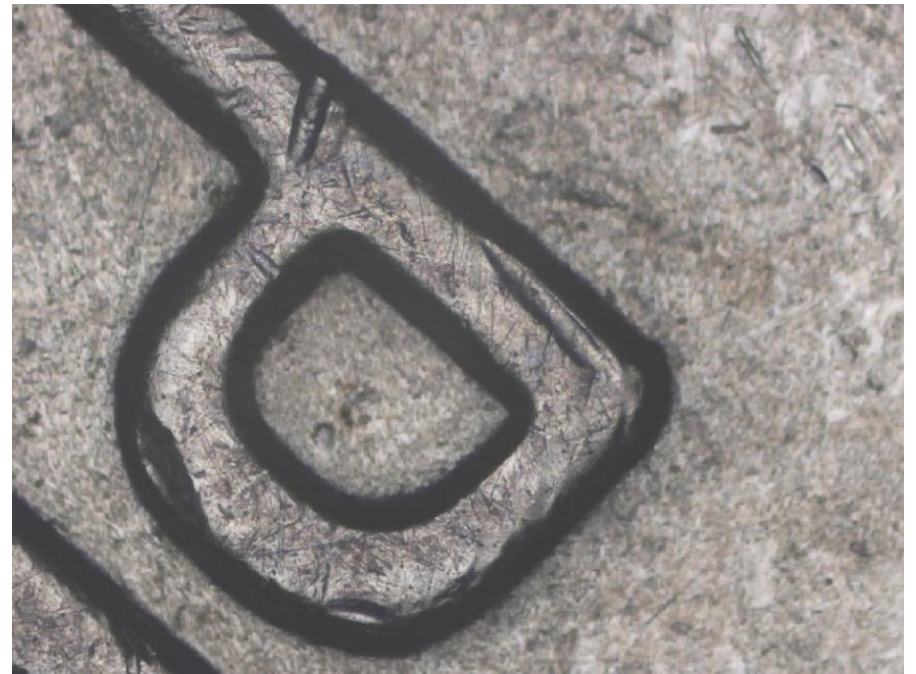
Análisis Visual: Estas imágenes son muy similares visualmente parecen iguales.

Figura 44: Imagen Focalizada EPFL



Fuente: Autor

Figura 45: Imagen focalizada Metodología Wavelet-PCA



Fuente: Autores

La imagen Figura 45, producto del proceso Wavelet-PCA tiene visibles desenfoques en la parte inferior.

Tabla 1: Métricas de evaluación de desempeño para evaluar los algoritmos de fusión de imágenes con imagen de referencia.

	MAE	SNR	RMSE
MatrizVarianza	0.0379	41,2611	0.0518
Pca + Wavelet	0.0499	36,7342	0.0673
PCA	0.0376	41,0035	0.0526
Wavelet	0.0252	48,4463	0.0343

Fuente: Autor

Se confirma las observaciones generadas a priori con los datos obtenidos, La metodología de armado cuyo resultado es más parecido a la imagen perfecta es Wavelet. Siendo mejor que el procedimiento de Matriz de Varianza, algoritmo base de este proyecto.

4.3.2 MÉTRICAS DE EVALUACIÓN SIN IMAGEN DE REFERENCIA.

Analizaremos a continuación las imágenes en sus métricas comparando sus características propias.[21]

Tabla 2: Métricas de evaluación de desempeño para evaluar los algoritmos de fusión de imágenes sin imagen de referencia

	σ	He	SF
Perfecto	42,8804	7,2380	19,6520
MatrizVarianza	41,5994	7,1630	16,1762
Pca + Wavelet	40,6110	7,0472	10,0124
PCA	40,0827	7,0154	10,4663
Wavelet	43,4598	7,2145	16,7390

Fuente: Autor

SF: En percepción remota las imágenes se caracterizan por un parámetro denominado frecuencia espacial. Esta puede definirse como el número de cambios que ocurren en el valor del píxel (o brillo) por unidad de distancia para alguna región particular de la imagen.

He: La entropía es una medida estadística de aleatoriedad que se puede utilizar para caracterizar la textura de la imagen de entrada. Se puede calcular la entropía de una imagen como la probabilidad de su ocurrencia.

σ : Permite determinar el promedio aritmético de fluctuación de los datos respecto a su punto central o media. La desviación estándar nos da como resultado un valor numérico que representa el promedio de diferencia que hay entre los datos y la media.

Al observar las diferencias en las métricas expuestas podemos concluir que el proceso actual (Matrices de Varianza) posee un alto grado de calidad en promedio. Más sin embargo la metodología de armado basado en Wavelet genera el mejor resultado.

5. HERRAMIENTA SOFTWARE

Al realizar un algoritmo de Focalización de Campo Extendido se debe tener en cuenta dos actividades principales. La adquisición de las imágenes y el procesamiento de las mismas.

Cuando hablamos de la adquisición de imágenes hablamos de la manipulación de un microscopio, esa adquisición puede realizarse de manera manual o automatizada.

Hablaremos ahora del proceso de adquisición de imágenes de un microscopio óptico automatizado. Se expondrán la documentación de los módulos que permitirían la implementación del software.

5.1 DOCUMENTACIÓN MÓDULOS.

5.1.1 MÓDULO CAPTURA Y RECEPCIÓN DE DATOS.

DEFINICIÓN

Descripción de la situación a resolver

Los microscopios de luz motorizados son aquellos que incorporan un número de componentes motorizados (por ejemplo, platinas, cambiadores de filtros, foco, cambiador de aumento) que se puede operar remotamente a través de una PC equipada con el software apropiado. Las funciones motorizadas son fundamentales para la operación de microscopio automatizada, operación remota a través de terceras partes y para funciones precisas y repetibles. [27]

Utilizando uno de estos microscopios puede implementarse una herramienta que opere los componentes permitiendo la adquisición y posterior procesamiento de las imágenes de una muestra.

Alcance funcional esperado

Se debe generar una interfaz gráfica que permita la recepción de los datos básicos para la generación de la imagen focalizada. Será la parte inicial del proceso de generación de imágenes focalizadas. Y el único contacto con el usuario.

Debe ser amigable y contener mensajes de ayuda al Usuario, que me permitan guiarlo sin necesidad de una ayuda adicional.

Podrá visualizar y manipular la imagen de recepción desde el microscopio. Se debe crear una funcionalidad que interactúe con el microscopio y realice la captura de imágenes, que haga el re-posicionamiento y realice una focalización anterior a la fotografía

Sus datos de ingreso serán:

- Imagen Inicial, I_o y/o la respectiva Ubicación Inicial I_o
- Imagen Final, I_f y/o la respectiva Ubicación Final I_f

Al establecer estos datos el software debe encontrar los valores por default teniendo en cuenta el lente actual y permitir la modificación de los siguientes datos:

- Cantidad de fotos
- Número de pasos y/o Distancia entre pasos
- Total distancia Focal (micras* en Z)

Cada uno de estos datos al ser modificado tendrá dependencia con los otros, razón por la cual deben validarse.

Se debe integrar la posibilidad de que la distancia Z de la profundidad pueda ser negativa entendiendo el cambio de los valores Imagen Inicial y Final

Procesos pre.

Deberá validar el lente que con el que enfoca en el momento de para determinar el valor f de las fotos que se tomarán

Y para validar el valor mínimo de los pasos en la distancia a enfocar.

Captura de Fotos

Se debe crear una funcionalidad que interactúe con el microscopio y realice la adquisición de las imágenes.

Luego se debe reposicionar la plantilla (distancia Z) para la siguiente imagen.

EVALUACIÓN

Alcance Funcional

Interfaz Grafica

Se generará una interfaz gráfica que nos permita la manipulación del microscopio para la creación de las diferentes imágenes de profundidad de campo.

Los valores de inicio solicitados serán registrados de forma dinámica utilizando de manera interactiva la selección del lente del microscopio y su posición para esto se tendrá una vista en vivo de la muestra del microscopio, esta imagen será

visualizada desde la aplicación para comodidad y exactitud en la toma de los datos.

Para lanzar el proceso se pedirá que se tenga registrado el valor origen y se tomará la posición actual en el momento del registro como valor destino. Como valores de modificación opcional por el usuario se tendrá el número de fotos, durante el proceso de evaluación la opción de modificar la distancia entre saltos fue modificada de opcional a en vista. Razón por la cual si el usuario desea modificar la distancia entre los saltos podrá hacer lo al modificar el número de fotos y podrá ver al en vivo cuanto a sido modificada esa distancia.

La principal validación se realizará sobre la distancia mínima a ser tomada en cuanta dependiendo de tipo de lente que se esté utilizando, y la distancia que exista entre el punto origen y el punto destino. Por esta razón esta validación se realizará en el momento del lanzamiento del proceso y en el momento de generar un re-establecer de los datos, dado que el valor destino puede cambiar por factores externos al propio software (microscopio), se ubicará como mínima cantidad de fotos las determinadas cada mínimo salto entre fotos y la distancia escogida.

Si el número de fotos que se vayan a realizar excede el número máximo estimado para la capacidad del hardware el software no permitirá la toma pidiendo una nueva posición destino.

Si el número de fotos que se vayan a realizar excede el número excede en su procesamiento un determinado tiempo el software lanzará la alarma para que el usuario lo tenga en cuenta y si así lo desea pueda modificar el número de fotos o la posición destino.

Estas validaciones se realizarán en el momento del registro.

La pantalla de entrada contiene la posición inicial (posición Z) de la bandeja del microscopio y una vista en vivo de recepción del microscopio.

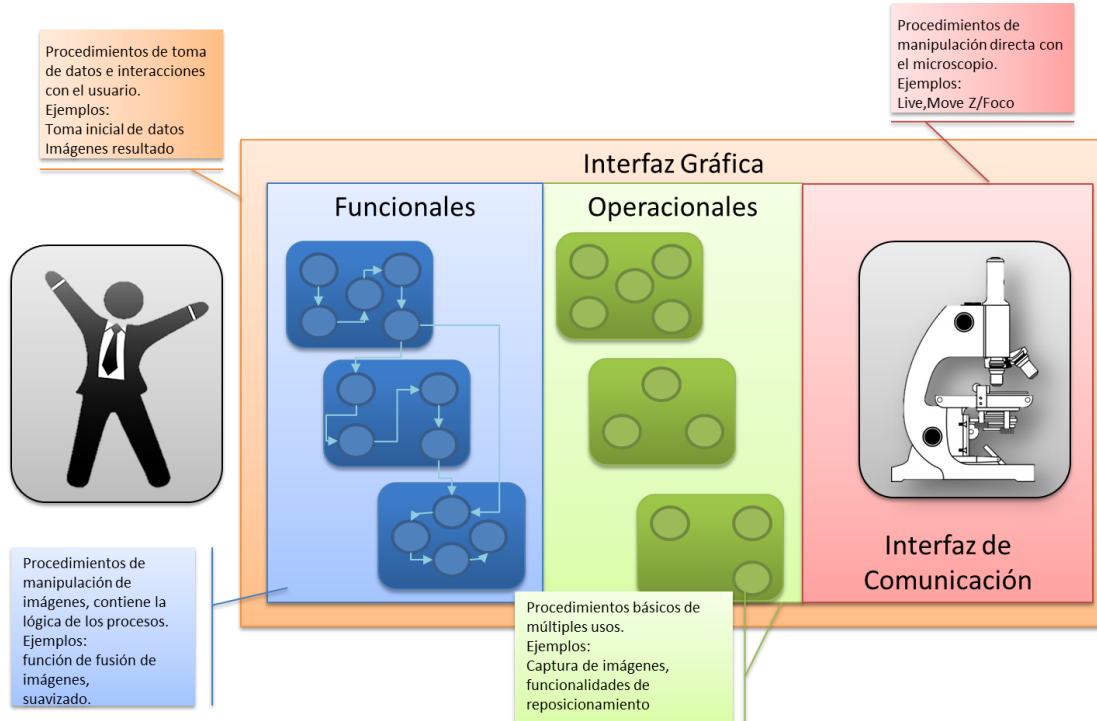
Al comenzar el proceso se llamará a la función principal de la clase que contendrá la metodología y que se encargará de realizar el procesamiento de las imágenes. Enviándole los datos básicos necesarios y dejando como constantes Globales los datos más relevantes del proceso.

Adquisición de Imágenes

Se plantea posteriormente al proceso de interfaz, se cuenta con el valor inicial y final en Z. Se debe determinar cuál valor es el menor y ascender a partir de este, por lo tanto se debe reubicar el foco (posición z de la plantilla) en el punto focal más bajo, se adquiere la imagen se transforma desde el formato original de la cámara y/o determinada por el software del microscopio y se inicia el proceso de armado. Al finalizar el ciclo se vuelve a reposicionar el foco y se repite el ciclo, hasta que al reposicionar el foco la posición en Z sea mayor a la posición Final establecida por el usuario, se publica la imagen resultado y se termina el algoritmo.

Arquitectura Funcional

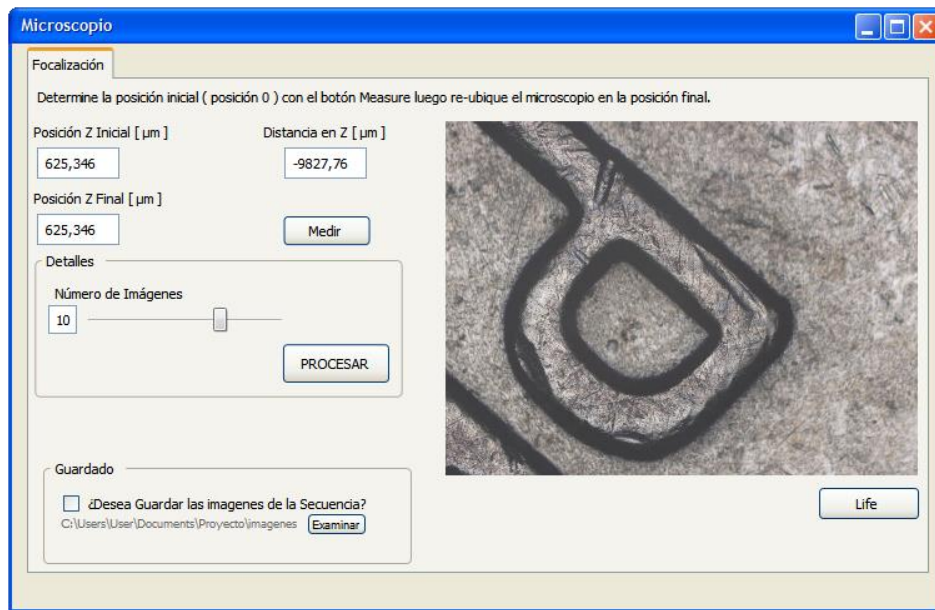
Figura 4.1. Arquitectura Funcional propuesta



Fuente: Autores

Prototipo Interfaz Gráfica de Usuario

Figura 4.2. Prototipo de interfaz grafica



Fuente: Autor

Nota: En la evaluación se puede presentar un prototipo que implica la propuesta de formas o pantallas. Tal propuesta es susceptible de cambios en la etapa de diseño, que no impactan el alcance funcional comprometido, sino la forma de presentar la información.

Casos de Uso

Tabla 3. Caso de Uso: Imágenes Iniciales

Caso de Uso	Imágenes Iniciales	
Actor	Usuario	
Propósito	Permite al usuario determinar de la muestra, cual es la sección que desea ver focalizada	
Descripción	El usuario se ubica en uno de los extremos (en la coordenada Z) y lo define como puntos de referencia.	
Precondición	El microscopio debe estar en funcionamiento, la muestra ubicada y la camara prendida.	
Flujo Principal	Acciones de Actor	Respuesta del Sistema
	<p>1. Se debe ubicar la plantilla del microscopio en el extremo (superior o inferior) de la muestra a focalizar.</p> <p>3. Luego se ubica en el extremo opuesto (Inferior o superior) de la muestra.</p>	<p>2.El sistema registra esta altura como valor de inicio.</p> <p>4. El sistema registra esta altura como valor final, se registra el lente ubicado, se determina la profundidad de campo del lente y se calcula el numero de imágenes minimo requerido para realizar el proceso.</p>
Sub-Flujos	Linea 4. se valida que el numero de imágenes minima necesaria sea menor a la maxima establecida por capacidad de computo.	
Poscondición	El usuario a establecido los valores iniciales y finales del proceso	

Tabla 4. Caso de Uso: Cantidad de imágenes

Caso de Uso	Cantidad de imágenes	
Actor	Usuario	
Propósito	Permite al usuario determinar cuantas imágenes desea tomar de la muestra.	
Descripción	El usuario cuenta con un scrollbar o una caja de texto para escribir cuantas imágenes desea generar de la muestra. (opcional)	
Precondición	La posición inicial y final deben estar declaradas.	
Flujo Principal	Acciones de Actor	Respuesta del Sistema
	1. El usuario modifica la cantidad de imágenes que serán parte del stack.	2. Se registra el nuevo número de saltos
Sub-Flujos	Linea 2. Se valida que el número sea mayor al mínimo necesario establecido por el lente (objetivo) ubicado en el microscopio. Y que sea menor que el máximo establecido por la capacidad de cómputo.	
Poscondición	El usuario ha establecido el número de imágenes a tomar de la muestra	

Tabla 5. Caso de Uso: Generar Imagen

Caso de Uso	Generar Imagen	
Actor	Usuario	
Propósito	Permite al usuario obtener la imagen focalizada	
Descripción	El usuario selecciona la opción Procesar, el sistema va a analizar las imágenes de muestra	
Precondición	Los valores iniciales deben estar registrados.	
Flujo Principal	Acciones de Actor	Respuesta del Sistema
	1. En este caso el uso empieza cuando el usuario selecciona Procesar 3. Si el usuario desea Guardar la imagen fusionada, selecciona la opción guardar.	2.El sistema le presenta la imagen fusionada. Permite guardar o descartar la imagen. 4. Si el usuario decide Guardar la imagen, el sistema la almacenará, o por el contrario la descartará.
Sub-Flujos	Ninguno	
Poscondición	Se a generado una imagen focalizada	

Consideraciones Especiales

Se debe utilizar un microscopio óptico automatizado, que permita como mínimo la manipulación de la plantilla en su posición en Z.

5.1.2 MÓDULO GENERAL Y METODOLOGÍA

Descripción de la situación a resolver

Se debe generar un proceso que permita la fusión de imágenes para lograr una focalización extendida. El proceso será llamado con el ingreso de cada fotografía, y debe acoplar de a una imagen por vez.

Alcance funcional esperado

En cada llamado del proceso metodología (a excepción del ultimo llamado) el resultado será la estructura de descomposición de wavelet de la imagen focalizada

Se usará la metodología de armado Wavelet, con el filtro Haar, su nivel de actividad será basada en coeficientes.

El procesamiento de la imagen en un vector-escalar con una combinación lineal ponderado a las diferentes canales.

Evaluación

Alcance Funcional

El proceso será llamado desde el formulario entrada de la herramienta. Tendrá a la imagen tomada del microscopio como valor de entrada y una variable que identifica si es la primera o la última imagen que será tomada.

En caso de ser la primera, el proceso descompondrá a la imagen generando la estructura de descomposición base.

En caso de ser la última el proceso se llevará a cabo normalmente pero al final se realizará la síntesis de la imagen focalizada.

En todos los casos adicionales el proceso se realizará normalmente. Se descompone la imagen de entrada

Se recorre la descomposición punto a punto se le determina el nivel de actividad. Se compara con el nivel de actividad de la descomposición base y se registra en caso de ser seleccionada.

6. CONCLUSIONES

- Se realizó la investigación concerniente a las diferentes metodologías de segmentación y fusión de imágenes que pudiesen resolver problemas de focalización y ruido, para un conjunto de imágenes.
- Se estudió la metodología de matriz de varianza para fusión de imágenes, se observa que el número de veces que las imágenes deben ser recorridas hace deficiente el proceso, se determina que los resultados son buenos, pero la metodología requiere ser eficiente, por lo cual es tomada como base para realizar la investigación en pro de una mejora significativa.
- Por medio de la metodología de investigación - acción, se realizaron diferentes prototipos concernientes a la teoría y análisis encontrada, con el fin de generar resultados parciales que permitieran decidir más fácilmente la eficiencia de cada metodología de fusión desarrollada. Luego de analizar cada prototipo se realizaba un nuevo replanteamiento de metodologías a partir de los resultados y posteriormente se continuaba con el proceso investigativo con el fin de optimizar cada prototipo, hasta alcanzar la mejora planteada en un comienzo.
- Se analizó la pila de sesenta (60) imágenes, implementando las diferentes metodologías investigadas, donde se midieron características intrínsecas como la desviación estándar, entropía y frecuencia espacial; como de comparación con imágenes obtenidas mediante la implementación de software especializados, entre ellas la raíz de error cuadrático, la media absoluta y la relación señal-ruido.

- Se implementó la metodología de análisis de componentes principales, disminuyendo significativamente la cantidad de datos a analizar, pero se detectó una gran pérdida de información que se ve reflejada en los resultados, donde la imagen final termina con problemas de pixelación, en las zonas en las cuales la información no estaba totalmente definida.
- Se decidió implementar un complemento entre la metodología de transformada de Wavelet, la cual hace uso de filtros que disminuyen la cantidad de datos y ruido en cada una de las imágenes particulares, y la de análisis de componentes principales, siendo esta la encargada de fusionar las imágenes segmentadas, pero se presentó la misma disminución de datos que terminan con un deterioro en la imagen resultante y reduce la cantidad de datos iniciales, ofreciendo un pobre resultado en términos de detalles de imagen. Ya que la mejora planteada con la transformada de wavelet, fue enfocada en la disminución de ruido. Mas sin embargo las imágenes tomadas con un microscopio confocal no poseen cantidades de ruido significativas. Y las zonas sin focalizar no son parte del ruido de una imagen.
- Se concluye que la metodología de la transformada de Wavelet ofrece mejores resultados en cada uno de los parámetros analizados, incluyendo el uso por medio de la matriz de varianzas; por medio del uso de filtros, se disminuye la cantidad de ruido y datos y durante el proceso de reconstrucción y fusión conserva aquellos detalles que son importantes para la calidad de la imagen final, demostrando una significativa mejora, frente a las imágenes fusionadas con Matrices de Varianza. Lo cual es el objetivo inicial del proyecto.

7. RECOMENDACIONES Y PUNTOS CRÍTICOS

- Continuar con la fase paralela del proyecto que contiene la opción de realizar mosaicos completos focalizados de muestras, con fin de optimizar los resultados obtenidos en este trabajo.
- Desarrollar un proyecto de implementación del algoritmo aquí generado con arquitecturas paralelas con el fin de agilizar los procesos y producir disminución en los tiempos requeridos.
- Uno de los limitantes encontrados durante la implementación de las metodologías investigadas, concierne en que la capacidad de cómputo requerida, para el análisis de este tipo de imágenes digitales es elevada, y no es soportada por el hardware de equipos con características convencionales.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] MONTALVO, Cesar. Microscopía. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. 2010. 1-4 p.
- [2] BROCK T., MADIGAN M. Microbiología (1993) Prentice-Hall Hispanoamericana.
- [3] GONZALEX , J., Visión amplia por computador. Facultad de Microbiología. Madrid Paraninfo. España. 2000.
- [4] JENSEN, J. R., Introductory Digital Image Processing. A Remote Sensing Perspective, ed. Prentice Hall, 1995.
- [5] MARION, A., An Introduction to Image Processing, ed. Chapman and Hall, London, 1991.
- [6] DE LA ROSA, R. Procesamiento de Imágenes Digitales. Facultad de Computación. Universidad Autónoma de Puebla. México. 2007
- [7] CONRAD, Jeff. Depth of Field in Depth. Proceedings of the Royal Society. Alemania. 2008.
- [8] SINGH, Abhishek. SAINI, Mandeep. NAYYER, Pallavi. Implementation and comparative study of different fusion techniques. International Refereed Journal of Engineering and Science. 2012. 37-41 p.
- [9] ZHU, Yang. Y, Pu. Parallel Image Processing Based on CUDA. In Proceedings of the 2008 international Conference on Computer Science and Software Engineering. 2008.
- [10] RICHARDSON, Mark. Principal Component Analysis Study. University of Oxford. Mathematical Institute. 2009.
- [11] GHITA, Ovidiu. WHELAN, Paul. Object Recognition Using Eigenvectors. Dublin City University. Irlanda. 2007.

- [12] Intelligent Data Analysis and Probabilistic Inference. Imperial College London. Lecture 15. Principal Component Analysis. <http://www.doc.ic.ac.uk/~dfg/ProbabilisticInference/IDAPILecture15.pdf>
- [13] RENIKOFF, H. WELLS, R. Wavelet Analysis. The Scalable Structure of Information. Springer-Verlag New York. 2004
- [14] SCHODER, Peter. SWELDENS, Wim. Building Your Own Wavelets At Home: First Generation Wavelets. Second Generation Wavelets. 1996.
- [15] FERNANDEZ, Alfonso. RUIZ, Luis. Estudio de las Tecnicas Basadas en la Transformada de Wavelet y Optimizacion de sus Parametros para la Clasificación por Texturas de Imágenes Digitales. Universidad Politecnica de Valencia. España. 2007. 4-20 p.
- [16] YAMASAKI, Leonardo. Aplicaciones de la Transformada Wavelet, Eliminación de Ruido. Universidad de Valencia. España. 2008. 1-4 p
- [17] Polytechnic Institute of New York University. Matlab Implementation of Wavelet Transforms. <http://eeweb.poly.edu/iselesni/WaveletSoftware/standard2D.html>
- [18] BUCKHEIT, J. B., DOHONO, D. L., "Wavelab and reproducible research," Acceso online: http://www-stat.stanford.edu/wavelab/Wavelab_850/wavelab.pdf. 2008
- [19] PAWŃEY, JB. Handbook of Biological Confocal Microscopy. Springer. Springer. 2006. ISBN 038725921x.
- [20] FORSTER, B., VAN DE VILLE, J., BERENT, D. Complex Wavelets for Extended Depth-of-Field: A New Method for the Fusion of Multichannel Microscopy Images, 65(1-2), pp. 33-42, 2004. Disponible Online <http://bigwww.epfl.ch/demo/edf/>

- [21] MORE, V., APTE, S.D., Pixel-level Image Fusion using Wavelets and Principal Component Analysis. RajarshriShahu College of Engineering, E&TC Department, Tathawade, Pune, India. 2006.
- [22] NAIDU, V.P., GIRIJA, G., RAOL, J.R. Evaluation of data association and fusion algorithms for tracking in the presence of measurement loss. In AIAA Conference on Navigation, Guidance and Control, Austin, USA, August 2003, pp. 11-14.
- [23] ARCE, Gonzalo. Nonlinear signal processing A statistical approach. Wiley-Interscience Inc. Publication, USA, 2005.
- [24] BLUM, Rick., ZHENG, Liu. Multi-sensor image fusion and its applications. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006.
- [25] LEUGN, lauWai., KING, Bruce, VOHORA, Vijay. Comparison of image data fusion techniques using entropy and INI. In 22nd Asian Conference on Remote Sensing, Singapore, Nov. 2001, pp. 5-9.
- [26] ESKICIOGLU, A.M., FISHER, P.S. Image quality measures and their performance. IEEE Trans. Commu., 1995, 43(12), 2959-965.
- [27] Nikon Instruments, Centro de Información. Disponible Online: http://www.nikoninstruments.com/es_AMS/Centro-de-Informacion/Microscopio-Motorizado
- [28] Gonzalo, Pajares & Jesús Manuel, de la Cruz. A wavelet-based image fusion tutorial. Pattern Recognition, 2004, 37, 1855-872.