



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias de la Computación
Licenciatura

Tesis:

“Sistema Analizador y Métrico de una
Fotografía a Nivel Celular”

Para obtener el Título de:
Licenciado en Ciencias de la Computación

Presenta:

Juan Carlos Olivares Morales

Asesor

Dr. Manuel Martín Ortiz

Coasesor

Dr. Gonzalo Flores Álvarez

PUEBLA, PUE. ABRIL 2008

Agradecimientos

Quiero agradecer a...

Primero a Dios por permitirme llegar hasta aquí y cumplir este paso en mi vida.
Con El todo sin El nada.

A mis padres Juan Cuauhtémoc y Estela por su gran paciencia, dedicación
y amor que siempre me impulsaron a cumplir esta meta y otras mas en la vida.

A mis hermanos por el apoyo y compañía que me han dado en todo momento de
mi vida.

A MaryTere Solís por su amor, su compañía, su perseverancia y su paciencia
que siempre me impulsaron.

A mi Universidad y mis maestros ya que ellos me acogieron y me compartieron
su conocimiento y su disposición para prepararme profesionalmente.

A todos mis familiares y amigos que de alguna forma me apoyaron
para lograr este objetivo.

Y a esta nación de México que es rica en conocimiento y gente capaz de lograr todo lo que desee,
solo es cuestión de voluntad, decisión y empeño al hacer bien las cosas.

Y gracias al

Dr. Manuel Martín Ortiz
Catedrático de la Facultad de Ciencias de la Computación

Dr. Gonzalo Flores Álvarez
Catedrático del Instituto de Fisiología

Lic. José Luís Meza León
Catedrático de la Facultad de Ciencias de la Computación

Por su paciencia, tiempo y dedicación para la culminación de esta tesis.

Tesis desarrollada por Juan Carlos Olivares Morales
Realizada en la Ciudad de Puebla, México
Todos los derechos reservados 2008
jcomnetw@hotmail.com

Índice

Portada	
Dedicatorias	
Índice	I
Introducción	1
Capítulo 1 La parte científica a Estudiar	7
1.1 La Morfología y la Histología como ciencias	7
1.2 La ciencia de la Fisiología	9
1.3 Preparación e interpretación de los cortes histológicos	10
1.3.1 La Microtécnica	10
1.4 La Autoradiografía	13
1.5 Obtención de las Imágenes por medio del Microscopio	14
Capítulo 2 La parte computacional a estudiar	15
2.1 El microscopio y la computadora	16
2.2 Las Imágenes Digitales	16
2.3 Imágenes en Formato TIFF	17
2.4 Imágenes en Formato JPG	18
2.5 Imágenes en Formato BMP	18
2.6 Imágenes monocromáticas y a color	19
2.7 Imágenes en falso color	20
2.7.1 Por División de Intensidad	20
2.7.2 Por Transformaciones de color de nivel de gris	21
Capítulo 3 Antecedentes del Sistema SAGEFH	23
3.1 Objetivo General	23
3.2 Objetivos Particulares	24
3.3 Metodología	24
3.4 Requisitos de Sistema	26
3.5 Análisis	26
3.6 ¿Por qué Delphi?	27
Capítulo 4 El Sistema SAGEFH	29
4.1 Diseño	29
4.1.1 El Método Scanline	30
4.1.2 Estructura del Programa	30
4.1.2.1 La clase TForm1	33
4.1.2.2 Metodología de la Selección	35
4.1.2.3 Herencia de la selección	42
4.1.2.4 La Calibración de la Curva	43
4.1.2.5 Los Histogramas	45
4.1.2.6 Edición de valores por punto y por región	46

4.1.3	Los procesos en las imágenes	47
4.1.4	La ampliación de las imágenes	51
4.1.5	La Calculadora de Imágenes	53
Capítulo 5	El desarrollo del sistema SAGEFH Versión 1.0	55
5.1	Diseño Arquitectónico	55
5.2	Diseño e Implementación de la Interfaz Usuario-Maquina	56
5.2.1	Modelo del Usuario y Percepción del Sistema	57
5.2.2	Herramientas de Implementación para el sistema Sagefh	57
5.2.3	Implementación de la Interfaz Final	58
5.3	Implementación estructurada y técnica de SAGEFH	62
5.3.1	Del manejo de Imágenes	64
5.3.2	De Implementación de Form1	65
5.3.3	De la Calibración de la Curva	66
5.3.4	De las demás ventanas de Sagefh	67
5.3.5	Los Filtros de las imágenes	67
5.3.6	Aplicación de las selecciones entre las Form1	69
Capítulo 6	Pruebas, Resultados y Comparativas del Sistema Sagefh	73
6.1	Funcionamiento interno y externo de Sagefh	73
6.2	Requisitos Finales de Funcionamiento de Sagefh	74
6.3	Prueba de la Caja Negra	75
Conclusiones		87
C.1	Conclusiones del Proyecto	87
C.2	Limitancias	88
C.3	Perspectivas	89
Apéndices		
A	Operaciones Matriciales	91
B	El Método de Mínimos Cuadrados	95
C	Datos de Amersham Life Sciencie sobre los isótopos	101
D	Manual del Usuario - Sagefh	105
Bibliografía		
		127

Introducción

Desde los inicios de la humanidad el hombre ha tenido la curiosidad de saber como funciona cada objeto o cada relación que hay en la naturaleza para ir aprendiendo más cosas día a día; el saber del funcionamiento de su cuerpo no ha sido una excepción, era una prioridad para el mismo hombre, ya que el saber como funciona su cuerpo y las partes que lo conforman llegaría a descubrir curas para sus diversas dolencias, enfermedades, debilidades y cosas que le afectaran para llegar con ello a ser personas plenamente sanas.

Para conocer más sobre su cuerpo, el hombre se ha valido del uso de la tecnología para poder llegar una fase que abarque de manera total su conocimiento, cosa que antes era muy limitada; pero el paso del tiempo hizo que fuera descubriendo ese conocimiento iniciando de manera rústica e implementando maneras modernas, el ser humano ha ido descubriendo y estructurando esas relaciones de funcionamiento del cuerpo y con ello ha ido creando varias ramas de la medicina, para que cada una de ellas investigue una parte del cuerpo. Una de esas ramas es muy importante para que las demás puedan hacer su trabajo y es la Anatomía, la cual es precisamente la que se encarga de estudiar cada una de las partes del cuerpo humano y como se relacionan entre sí de forma directa con los tejidos. De ahí otras ciencias que se derivan y con el avance tecnológico y la aparición del microscopio surgen ramas como la anatomopatología, la histología, neurohistología, fisiología, microbiología entre otras más. Pero al final hoy en día la histología es la ciencia biomédica que se encarga de estudiar la composición y forma de los diferentes tejidos orgánicos, los cuales están formados por células que poseen diferentes funciones específicas o tienen funciones relacionadas y esto último lo estudia la fisiología, la relación de cada parte orgánica y sus funciones para conformar y dar vida a un ser vivo.

Uno de los dispositivos usados y que en realidad no ha habido mucho cambio desde sus inicios y que nos servirá para poder estudiar de cerca los tejidos humanos, animales y vegetales, es el microscopio. El primer descubrimiento de fabricación del microscopio fue en 1847, cuando se descubre una lente plano convexo tallado; pero no fue hasta en 1590 que se registra el primer microscopio compuesto hecho por Juan y Zacharias Janssen en Holanda el cual media 25cm. En 1612 el matemático, físico y astrónomo Galileo Galilei gracias a sus técnicas de tallado en la fabricación de lentes para su telescopio, permite el mejoramiento del microscopio, en visualización y acercamiento. Pero fue hasta 1632 que Antoni Van Leeuwenhoek mejora aun más el microscopio de 10 cm., dejándole hacer acercamientos más directos permitiéndole ser uno de los primeros en descubrir algunas células como infusorios, protozoos, eritrocitos y algunas bacterias.

El italiano Giuseppe Campana en 1665, mejora aun mas el microscopio, reduciéndolo a 9 cm., mejorando el tubo para ajustar los lentes entre si, por medio de un tornillo y con un disco de madera con un agujero, con lo cual se ponían los objetos a estudiar, dejando ver así su transparencia. Tres años después Eustaquio Divini hace su versión del microscopio.

En 1670, Robert Hooke hace un microscopio de 70 cm. mucho más potente con un alcance de 30x o más permitiéndole a Hooke ver celdas que conformaban el corcho denominándoles células, término que se uso mas adelante para denominar a la parte mínima que conforman a las plantas y animales. Más adelante junto con Christopher Coock hacen un microscopio compuesto de 3 lentes que no tuvo mucho auge.

Para el año de 1680, el español Juan Crisóstomo Martínez a través de un microscopio de 28 cm. describe la estructura microscópica del tejido óseo.

Siguieron después John Marshall en 1700, Edmund Culpeper en 1720, Benjamín Martín en 1770, Nuremberg y John Cuff en 1750 y así, continuaron en la mejora de este dispositivo, como el manejo de las lentes a través de un tubo que se ajustaba por un tornillo, el tallado de los lentes, la base donde colocaba el objeto a estudiar, hecho de madera o cristal, además de sumar unos lentes tipos binoculares aparte de los lentes grandes. Fue hasta 1880 cuando se fabrica el microscopio moderno que hasta hoy en día esta, donde se agrega un revolver que es una base giratoria que permite cambiar en el objetivo diferentes graduaciones de lentes. En 1920 Leitz Wetzlar le incorpora un sistema eléctrico de iluminación sobre el objetivo, que permite ver la muestra con luz incidente. Fritz Zernike en 1938 crea el microscopio de contraste de fase, el cual permitía ver microorganismos transparentes sin necesidad de teñirlos. De ahí solo se mejora dicho sistema, la platina donde se colocan las muestras, el sistema de revolver y los lentes en su ajuste a través de un tornillo macro y micrométrico. Hoy en día existe el microscopio electrónico (inventado en 1931 por Max Knoll y Ernst Ruska) que a través de un haz de electrones inciden en la muestra para ver el objeto, limitado al rango visual de la luz, lo que permite tener un rango visual de hasta 10000x (unos 2 nm) en comparación de los óptico que alcanzaba a lo mas 1000x de acercamiento (unos 200 nm o 0.2 um aproximadamente).

Ahora bien hasta aquí hemos visto un poco de historia del microscopio, que sin duda ha sido uno de los instrumentos ópticos más importantes en la historia aparte del telescopio, que hace la función inversa del microscopio, ver objetos lejanos muy distantes. Sin embargo mientras unos perfeccionaban más este instrumento, otros se dedicaban a utilizarlo y hacer investigaciones y descubrimientos, a nivel anatómico, histológico y fisiológico, ramas que entre si se ayudaron para resolver muchas incógnitas de funcionamiento de muchos seres vivos, además de obtener las curas para sus enfermedades.

Hooke fue unos de los primeros en ver la composición de un elemento que fue el corcho donde a cada parte denomino célula; término hoy en día que se usa para determinar al elemento fundamental de conformación de los seres vivos. En 1833 Brown describe el núcleo celular de una orquídea. Schleiden y Schwann en 1838 proponen la teoría celular, afirmando que la célula es la unidad estructural y funcional de las plantas y los animales. En 1879 Alexander Flemming describió con gran claridad el comportamiento de los cromosomas durante la mitosis de las células animales. En 1881 Magnus Gustav Retzius uno de los grandes histólogos y que nadie lo ha superado ya que describió varios tejidos animales con una excelente precisión, explicó el sistema nervioso y el tejido conjuntivo del ser humano al aportar técnicas para teñir los tejidos y poder estudiarlos en el microscopio. Su padre Anders Retzius hizo varias investigaciones que le ayudaron mucho. Para 1882 Robert Koch aplica colorantes de anilina para teñir microorganismos y así pudo identificar bacterias que causaban la tuberculosis y el cólera. Klebs y Pasteur siguieron esa técnica que les permitió descubrir otras bacterias como la de la rabia. En 1843 Camillo Golgi descubre un conjunto de membranas conformando todo un sistema dentro de una célula, conformado por dictiosomas y vesículas, llamándole en conjunto aparato de Golgi, que sirve para procesar las proteínas. Para el año de 1924 el biólogo francés Antoine Lacassagne aplica inyecciones de polonio a ratones y conejos para ver sus efectos y para poder estudiar sus tejidos en el microscopio y con ello ver las estructuras radioactivas en el sistema biológico de los mismos lo que llamo autohistoradiografía. Antoine fue unos de los incursores de la radiología, término usado para las aplicaciones médicas por medio de radiaciones como los Rayos X (descubiertos por Röntgen en 1895) y la autoradiografía.

Previamente Pierre y Marie Curie descubren el Polonio y el Radio con lo cual son los precursores de la radioactividad, además hicieron investigaciones en radioquímica y aislaron otros radioisótopos y dieron las bases para la energía atómica. Marie y su hija Irene años mas adelante descu-

bre que la radiación produce una rápida cura a las heridas por lo cual empezó a usarla en aplicaciones médicas que se utilizó en la primera Guerra Mundial. Para 1913, Georg Karl Von Hevesy aplica isótopos radioactivos, que le sirvieron como marcadores para ver procesos químicos y biológicos.

Ya solo con el tiempo los investigadores fueron mejorando las técnicas de preparación de los tejidos, como el teñirlos de colores para ver algunas sustancias orgánicas como proteínas, vitaminas, minerales y enzimas entre otros; que se usan para poder estudiar su relación, funcionamiento a nivel celular y poder verlo así en el microscopio. Pero como vemos la radiación a través de isótopos radioactivos se utilizó también como marcadores para ver esos funcionamientos, lo que permitía ver los tejidos mucho más reales, ya que el colorante en ocasiones dañaba u ocultaba otras funciones celulares. Para cuando se utilizan radioisótopos se aplica una técnica diferente, ya que primero se “marca” el tejido en cuestión y se pasa después por una placa sensible a la radiación logrando así obtener una autoradiografía.

Para 1970, la escintigrafía o gammagrafía (técnica aplicada a un órgano o tejido o hueso para atrapar alguna sustancia biológica a través de un elemento radioactivo) y las cámaras de centelleo mejoran la visualización de los tejidos y órganos. Después aparecieron las cámaras de positrones, la tomoescintigrafía y el diagnóstico funcional por imagen, hicieron de la histología y la fisiología una de las ramas modernas de la medicina.

Pero a pesar de todos estos avances algo faltaba para poder estudiar a detalle lo que el investigador veía en el microscopio, además de poder conservar esas imágenes que veía para estudios posteriores o discutirlo con otros científicos o simplemente detener el tiempo en lo que se veía en el proceso fisiológico.

Para 1826 Joseph Nicéphore Niépce y Louis Daguerre logran fijar una imagen a través de una placa fotosensible a la luz hecha de nitrato o cloruro de plata que estaba en una especie de caja oscura con un agujero por donde pasaba la luz y la imagen misma y que en 1837 Daguerre la mejora, que lo que se conocería después como cámara fotográfica. Después de eso surgieron varios modelos sencillos de cámaras fotográficas, pero la revolución vino entre los años 1888-1895 con George Eastman quien fue el inventor de las primeras cámaras fotográficas portátiles en su modelo llamado Kodak, además invento el primer rollo fotográfico en carrete. En 1835 William Henry Fox logro conseguir obtener una imagen positiva a través de una negativa, proceso llamado calotipo, y este proceso se aplicó con Daguerre. Para 1907 gracias a Auguste y Louis Lumière sale las primeras películas de fotos a color. Para 1936 sale la primera cámara reflex SLR de 35mm. Con el avance tecnológico las películas fotográficas, su sensibilidad y la velocidad de captura hicieron la mejora de estos equipos, hasta llegar hoy en día a la cámara digital, donde ahora se incorpora un visor LCD para poder ver la fotografía y poder guardarla en un dispositivo de almacenamiento como una memoria, ya sin necesidad del rollo fotográfico, gracias a la tecnológica CCD o CMOS. (CCD inventada por Willard Boyle y George Smith en 1969 en los laboratorios Bell).

Es con este instrumento que se empieza a usar a nivel científico entre 1930 y 1940, y que se incorpora al microscopio para tener fotografías de células y poder así estudiarlas y que hoy en día ambas herramientas son una poderosa opción en el estudio a nivel celular de los seres biológicos. Con el avance de los años se perfeccionaría otro sistema que también se utiliza con el microscopio que sería la cámara de video, la cual permite grabar toda la vida y procesos que en un momento dado tiene un tejido y organismo en estudio, incluso hasta las propias células, este dispositivo se adicionó a los microscopios en los años de 1970.

Y por último, para completar la mejora en lo que se visualiza a través del microscopio y poder realizar un análisis más completo, se comenzó a utilizar la computadora, la cual actualmente se le conecta una cámara digital o de video, y por esos dispositivos se recibe la señal o imagen de lo que a través del microscopio se está viendo. Siendo la cámara del tipo digital o video, para los estudios biológicos se usa comúnmente la CCD ya que tienen una mejor resolución, porque emplea sensores fotoeléctricos que son al final los píxeles que se representarán en la imagen y por lo cual se pueden traducir en bytes entendibles para la computadora para que puedan ser procesados o guardados según se requiera.

Al momento de hablar de un proceso, se deberá entender la obtención de la propia imagen y su manipulación en la computadora, además de perfeccionarla por si tuviera alguna deficiencia, esto último se logra gracias a procesos matemáticos con los píxeles, para obtener la mejora, que comúnmente se llama filtro digital.

Cabe hacer mención que la historia de la computadora desde sus inicios hasta como esta en nuestros días, se dio a mediados y finales del siglo XX, la cual paso por 4 generaciones, de donde paso de una computadora que ocupaba grandes espacios que oscilaban de los 80 a los 120 metros cuadrados y consumía varios cientos de kilo watts de energía eléctrica por día, hasta llegar a las actuales reducidas al tamaño de menos de medio metro cuadrado, además de que antes solo procesaba información como 5000 operaciones aritméticas comparadas con los millones de operaciones que se logran con las actuales.

En el siglo XXI los microscopios, las cámaras digitales de foto o video y las computadoras son las mejores herramientas en conjunto que se tiene para poder estudiar con detalles las características y funcionalidades de las diferentes células que hay en los tejidos, lo que permite descubrir las causas de las enfermedades y sus curas.

La Neuropsiquiatría es una rama más de la medicina que usa mucho estas tecnologías, específicamente en nuestro caso el Laboratorio de Neuropsiquiatría de la BUAP continuamente se hacen estudios para saber las causas que originan algunas deficiencias o alteraciones en el comportamiento, para poder así aportar explicaciones a diversos problemas que enfrenta la humanidad, como son la esquizofrenia. Continuamente con ratones se hacen estos estudios, que investigadores y alumnos realizan para poder conocer más la forma y trabajo del cerebro.

En esta introducción se quiso mostrar el avance que ha tenido cada una de las 3 tecnologías que ayudan en el laboratorio, ya que de esas tecnologías el investigador obtendrá imágenes digitales, las cuales estudiará planteará hipótesis y llegará conclusiones. En nuestro proyecto de tesis, se darán más herramientas para que el estudio se mucho más adecuado a nivel de las imágenes digitales, además de que se ahorrarán costos y tiempo de trabajo.

En esta tesis veremos en el Capítulo 1, un poco más de las ramas que ayudan a la Neuropsiquiatría, como lo es la Histología y la Fisiología, ya que algunos de sus conceptos se usarán para poder trabajar con las imágenes, además de la forma en que se obtienen las mismas y que es por medio de la autoradiografía. Pero previamente se verá un poco de cómo se preparan los tejidos y muestras a ser analizadas así como los factores que influyen, ya que, algunas de sus etapas las usaremos para deducir resultados en la autoradiografía.

Siguiendo después el Capítulo 2, donde conoceremos un poco más de cómo la computación ayuda, además de algunas características que tienen las imágenes que se obtienen, los principales tipos que hay, y de cómo procesarlas cuando estas no presentan algún color.

El Capítulo 3, se presentan ya las bases de las herramientas que esta tesis provee al investigador para ayudarlo en sus estudios, los objetivos a cumplir, la metodología a seguir así como un análisis previo de los problemas que se tienen y que se resuelven con este proyecto.

En el Capítulo 4, presenta la forma en como se diseñaron cada una de las herramientas u opciones del proyecto, los algoritmos que se siguen con base a la metodología del Capítulo 3 así como quedaron integrados.

Para el Capítulo 5, viene ya la implementación de todo lo visto en los capítulos anteriores, como se diseñaron e implementaron y programaron cada una de las herramientas que este proyecto de tesis provee para el investigador.

Para concluir con el Capítulo 5, se presentan algunas pruebas y resultados del proyecto de esta tesis, que se denomina Sagefh, además de algunas características de trabajo del mismo.

Al final de esta tesis, se presentan las conclusiones a las que se llegó con este trabajo, los objetivos cumplidos así como algunas de las limitaciones que se presentaron al realizar las pruebas con el programa, que no representan por el momento alguna inconveniencia para el investigador al realizar sus estudios.

En otros apartados de esta tesis, se presentan como anexos, en los cuales se proporciona información a detalle de las principales ecuaciones y fórmulas matemáticas aplicadas, un manual de usuario y algunas tablas de radioactividad de los isótopos que se usan para la obtención de una autoradiografía. Como final se presenta la Bibliografía empleada.

**“En la ciencia como en el campo de la observación,
la casualidad sólo favorece a la mente preparada”
Louis Pasteur**

Capítulo 1

LA PARTE CIENTIFICA A ESTUDIAR

En este capítulo se describen los diferentes conceptos y elementos relacionados con la tesis desarrollada, que se basa en un Sistema de Análisis Morfológico de Medición de Células y Estructuras Biológicas; desde un punto de vista científico de investigación a nivel microscópico, aunque nuestro software para mayor exactitud lo llamaremos Sistema Analizador Grafico para Estudios Fisiológicos e Histológicos.

Esta tesis consistió en desarrollar un sistema capaz de analizar una fotografía tomada a células o estructura biológica de cortes histológicos de animales y por medio del procesamiento digital de imágenes dar al científico otra perspectiva de las mismas células de lo que hay a su alrededor, también se realizan ciertas operaciones algebraicas con base a características que tiene la fotografía que se analiza, dando herramientas al científico para poder obtener mejores resultados de su estudio.

Los estudios en este tipo de investigaciones comenzó desde el siglo XVIII con Robert Hooke, cuando construyó un microscopio compuesto y analizó con el una rebanada delgada de corcho y observó que estaba conformada por diminutos compartimientos vacíos, separados por paredes delgadas de lo que hoy sabemos que es celulosa. También con el anatomista y fisiólogo francés Bichat (1771-1802) que escribió una obra sobre los tejidos del organismo con base a estudios del microscopio en la cual dio su nombre a más de 20 tejidos. Estos son tan solo unos ejemplos de lo que esta área implica, y mas aún más adelante fue creciendo, basta decir que el biólogo y químico francés Luis Pasteur (1822-1895) por sus grandes investigaciones en enfermedades contagiosas y fermentaciones, es el descubridor de la profilaxis de la rabia del carbunco y creador de la microbiología, quien dio inicio a la creación de vacunas y medicinas.

Por lo que en éste capítulo se explican ciertos detalles necesarios para ir comprendiendo y desarrollando la temática de la presente tesis.

1.1 La Morfología y la Histología como ciencias

Para ubicarnos y entender mejor lo que se trata de hacer, primero se procede a dar ha entender cada palabra o término que se aplica dentro de esta tesis.

Aquí las imágenes obtenidas del microscopio a un nivel celular se obtienen de cortes muy delgados hechos a tejidos animales y de hecho de un tejido pueden salir varios cortes, eso dependiendo del grueso del mismo y también dependen de lo que se desea estudiar.

También para el desarrollo de esta tesis involucraron conocimientos de varias ciencias, para tomar características de cada una de ellas y conformar la programación necesaria a un nivel computacional.

Empezamos primero con la palabra Morfología que viene del griego Morphe que significa Forma y Logos es Tratado, lo que nos dice que la Morfología, se encarga del estudio de algo que se basa a su forma y su estructura; para nuestro caso, es el estudio de las formas de las células o conjuntos de células como son en una estructura o un órgano. Se hace esta última especificación, porque la Morfología es usada en muchas otras áreas como en la Gramática, donde reconoce formas de escritura, la Minería reconociendo piedras y productos en las excavaciones, en estudios de imágenes de satélite, para el pronóstico del tiempo, en la Medicina, en la Antropología y Arqueología, etc., en fin la Morfología es un área muy usada en todos los ámbitos científicos. Por mencionar también el análisis de las imágenes radiográficas y estudios de ultrasonido (Ecografía) en relación con las ciencias médicas, de las fotografías aéreas en ciencias naturales, de imágenes satelitales en meteorología, de las escenas a través del microscopio en biología etc., son ejemplos de algunas de las aplicaciones más difundidas.

En esta tesis nos encargaremos de estudiar las características de la fotografía tomada a las células por el microscopio, a los cortes histológicos de los tejidos, buscando efectos en ella que den más de sus detalles; se hacen operaciones algebraicas y obtienen resultados que el científico necesita en sus investigaciones.

Para nuestro estudio también nos involucramos en una subárea de la Morfología; la Morfometría, que es la Morfología donde se usan medidas, esta palabra proviene de las raíces griegas Morphe que significa Forma y de la palabra Metrón que es Medida. En la morfometría se conocen o buscan parámetros tales como longitud, área, perímetro, etc. a nivel celular de diferentes tejidos histológicos o cortes, en nuestro caso solo usamos la longitud y las intensidades de color de la fotografía para realizar varias operaciones matemáticas, así como la obtención de los Histogramas.

Es importante aclarar otro concepto ya antes utilizado, el histológico, que viene de la palabra y ciencia Histología, que a su vez esta viene de Histos que es Tejido y Logos es Tratado, por consiguiente es la ciencia que estudia los tejidos; al decir tejidos histológicos se refiere al tipo de cortes que se hacen a nivel de tejido celular.

El estudio de la Histología y la Morfología exigen aprender no sólo temas nuevos, sino también un nuevo lenguaje, pues en ellas se aprenden e involucran los nombres de todo aquello que mediante el microscopio puede ser identificado, en todas las características del tejido u organismo.

Ahora bien para la obtención de los parámetros antes mencionados u otros donde se requiera medir algo de las células se hace necesario el uso de técnicas de medición u operaciones algebraicas y que antes de este sistema se hacían a mano o con otros programas impidiendo el rápido y excelente desempeño de la investigación, lo que da otra finalidad de este tema de tesis y la necesidad de realizar un programa que contenga todo lo necesario para poder trabajar adecuadamente.

Por ejemplo, para el cálculo del tamaño lineal de una célula, que es una característica de la misma Morfología y Morfometría a un nivel celular, se realiza mediante la obtención de una imagen tomada del microscopio en forma digital mediante el uso de una cámara; una vez que se tiene la imagen en el monitor de una PC se procede a la ubicación y medición de una célula específica y esto se hace a simple vista. Se ha demostrado que lo que nuestra vista ve a veces es inexacto, por consiguiente se requiere automatizar este proceso para tener resultados reales y fidedignos y mucho más a un nivel microscópico y celular.

Otra forma del cálculo que se hacía antes consistía y en muchos lugares todavía se hace es dibujar el tejido en observación sobre una tableta digitalizadora, la cual iba a mandar el dibujo trazado al programa de la computadora, de ahí se llevarán a cabo las operaciones de cálculo que se requieran. Dado que este programa cuenta con coordenadas (x, y), lo cual facilita un poco más las operaciones, pero la situación es que debe realizarse previamente un dibujo para poderlo colocar en la tableta digitalizadora y eso también a veces es inexacto.

Los ejemplos anteriores de medición son poco confiables dependiendo de la destreza del investigador, ya que todos los estudios se realizan a nivel celular de forma manual y esto implica manejar unidades de medición muy pequeñas. A continuación se muestran las medidas más usuales que utiliza la Morfometría y la Histología, para darnos una idea de cómo se trabaja en esta área y la importancia de la exactitud:

Unidad	Símbolo y valor
Micrómetro o micra	$1\mu\text{m} = 0.001\text{mm} = 10^{-6}\text{ m}$
Nanómetro	$1\text{nm} = 0.001\text{ micrómetro}$

Por ello la necesidad de usar la computadora para este campo de la Morfometría, parte necesaria de la Morfología e Histología. Hoy en día hay técnicas más avanzadas y se toman las medidas en el momento del corte y son asignadas en la imagen en el momento de la captura de la imagen y pasarla a la computadora.

Estos son tan solo ejemplos sencillos, de la cual la ciencia de la Morfología junto con la Histología se encargan de estudiar este mundo fascinante de los tejidos animales y más aún a un nivel celular.

Actualmente en el Laboratorio de Fisiología se utiliza una computadora conectada a una cámara que tiene el microscopio, con ello se quita el problema de obtener una imagen celular a ciertas medidas, pero el proceso de analizar células, estudiar la fotografía de las mismas y hacer operaciones especializadas para este campo o unidos en un solo programa, fueron la finalidad de este proyecto.

1.2 La ciencia de la Fisiología

Otra de las áreas y ciencias de interés para nuestra tesis es la Fisiología que viene del griego Physis: Naturaleza y Logos que es Tratado. [9] y que por consiguiente la Fisiología es la ciencia que estudia la vida y las funciones orgánicas, es decir, estudia las relaciones que hay entre los diferentes componentes orgánicos para formar un ser viviente, incluso estudia las células y como interactúan entre ellas para formar componentes de los seres vivos, tal como ocurre con los tejidos orgánicos ya sea animales o vegetales.

Esta ciencia nos permite con su estudio, conocer más las relaciones que tienen las diferentes partes que conforman un ser, por ejemplo al mover un brazo o un pie, se mueven más de 100 músculos en el ser humano, cada uno tiene una función, pero el conjunto de todas esas funciones son el movimiento. Otro ejemplo es cuando se produce un bostezo, hay diversas funciones, como el movimiento de los músculos de la boca, las ordenes del cerebro a través de pulsos eléctricos para coordinar todos esos músculos entre otras funciones orgánicas, de todo eso se encarga de estudiar la fisiología, los detalles de esas funciones, sus fallas o sus curas, ya las estudian áreas específicas, como la medicina.

1.2. Preparación e interpretación de los cortes histológicos

Como se mencionó anteriormente, las fotografías que se procesaron en la presente tesis, se obtuvieron de cortes muy delgados, hechos a tejidos de animales.

Para empezar veamos los pasos que se hacen para obtener esos cortes histológicos.

1.2.1 La Microtécnica

Para la visualización de los organismos vivos, sus tejidos y estructuras celulares, mediante el microscopio, se requiere una serie de manipulaciones y procedimientos ya que muchas veces esas estructuras son transparentes o bien se encuentran formando volúmenes macizos tridimensionales donde se superponen unas a otras, impidiendo ser observadas de manera correcta, no obstante algunas por su delgadez y color, si se pueden observar directamente, como es el caso de la oreja, el peritoneo, la membrana interdigital de la rana, etc. donde se ven los vasos sanguíneos con los eritrocitos circulando por ellos [7]. Las células en cultivo también se pueden observar directamente. Pero la forma más estable y clara de observar las estructuras es en tejidos muertos y coloreados.

Ahora bien, la muerte que es la interrupción irreversible de los procesos biológicos ya sea animal o vegetal cuando llega a ocurrir comienzan los procesos degradativos a los tres niveles: Químico (descendiendo el pH y activándose los sistemas hidrolíticos); Celular (alterándose las membranas difundiendo los elementos); y Orgánico (microorganismos que empiezan la degradación) [6] [7].

Con todo lo anterior se siguen una serie de procedimientos para poder detener esa situación degradante de los tejidos, para tenerlos preparados y así poder ser visualizados en el microscopio de manera correcta; a esa serie de procesos se le llama Microtécnica y existen muchos tipos de ella dependiendo de lo que se quiere ver en la imagen o de los procesos de los tejidos que se quieren analizar. La Microtécnica puede ser aplicada con el animal anestesiado previamente para después realizar los cortes o bien se realizan los cortes y después se aplica la Microtécnica.

Existen dos tipos de microtécnicas esenciales:

- 1- Por Congelación a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (el ideal, no siempre aplicable por problemas técnicos y de procesamiento posterior).
- 2- Por Fijación, empleando sustancias químicas (fijadores) que mantiene la forma de las estructuras y de las cuales hay varias formas de hacerlo, además de que elimina las enzimas autolíticas las cuales impiden que haya descomposición bacteriana.

Ahora bien, existen dos momentos para la obtención de las muestras o tejidos, uno se hace directamente del ser vivo, llamándosele biopsia; o bien después de su muerte que es la necropsia o autopsia. Tan pronto como son obtenidas las muestras se someten a cualquiera de las dos microtécnicas para evitar su descomposición. Para el caso cuando se hace por la técnica de Fijación se realiza de la siguiente manera:

- a).- Fijación por Inmersión. Esto se hace extrayendo la muestra y cortándola en pedazos de 5 mm de grosor o menos para después sumergirla en el fijador con un volumen veinte veces mayor que de la muestra.
- b).- Fijación por Perfusión. Esto se hace directamente con el ser vivo, donde el animal primero es anestesiado y después es directamente abierto, para que después por un gotero sea conectado al sistema circulatorio del animal directamente en el corazón y sea lavado por medio de un sistema que aplica una solución lavadora, así ya limpio sea aspirado y le sea agregada en seguida la solución fijadora.

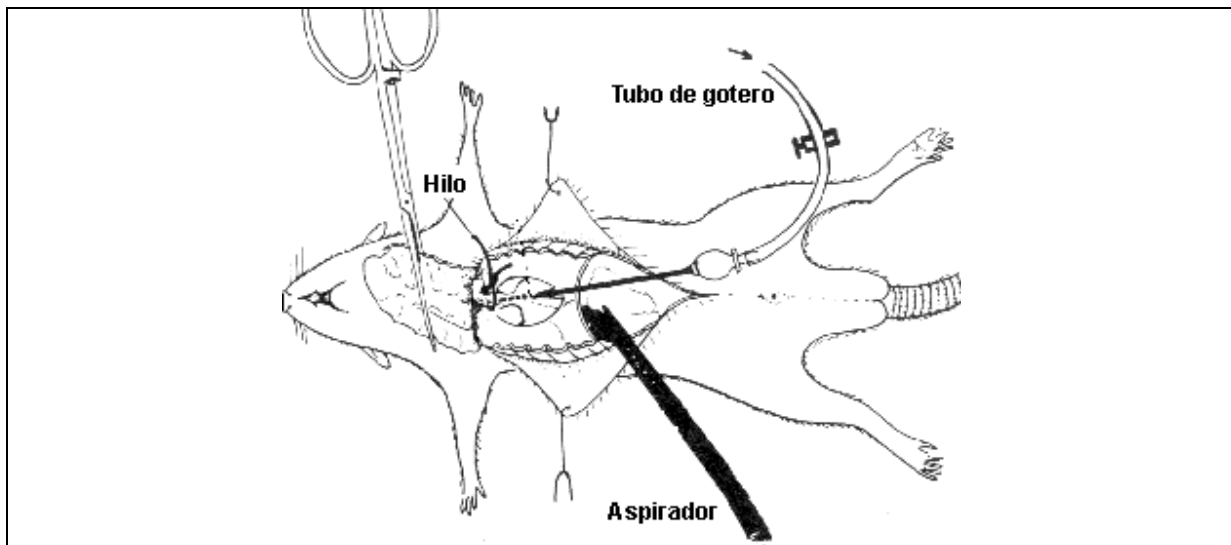


Fig. 1.1 Ratón sometido a la técnica de Fijación por Perfusión para poder extraer muestras para su estudio posterior.

Al final de este proceso de fijación y si se desea, solo se hará el proceso de corte de los tejidos que se requieran, ya que los tejidos o muestras pueden ser cortados antes o después de la fijación según los procesos metabólicos y biológicos que se desean conocer.

Después de obtenido el tejido, se procede a congelarlo o bien a realizar los cortes a detalle de los mismos con la ayuda de un Criostato, un microtomo dentro de una cámara refrigerada. Esta operación puede durar de 30 minutos a varias horas.

Por consiguiente para estudiar un corte histológico al microscopio es necesario tener en cuenta que la estructura de las células y tejidos, puede estar alterada hasta cierto punto, por la técnica histológica o de fijación; o en otros casos las mismas células ya pueden estar muertas debido a que el tejido, ya no está en el animal vivo.

Ahora bien hay varios tipos de fijadores, dependiendo de la estructura que se quiere conservar y analizar, hay fijadores que mantienen las proteínas, los hidratos de carbono, las grasas o lípidos o células de enfermedades que se estén estudiando; además algunos fijadores que se usan, precipitan las proteínas de los tejidos, transforman el protoplasma, que *in vitro* es un coloide hidrófilo en un precipitado irregular (precipitado: recipiente de vidrio de laboratorio) que son así requeridos para su estudio. Para la obtención de cada estructura se siguen pasos necesarios, por decir para la obtención de los hidratos de carbono es necesario evitar que la muestra se disuelva en agua, para ello hay que extraer el agua mediante fijadores, cuya avidéz por el agua sea mayor que ellos, por lo se emplea alcohol etílico (alcohol etílico al 70% en agua), y acetona, aunque esto tienen el inconveniente ya que retraen los tejidos y los endurecen para el procesamiento posterior.

Las etapas de la técnica histológica subsiguientes a la fijación como la deshidratación, la aclaración, inclusión y coloración de la estructura de los tejidos también introducen algunas modificaciones en los tejidos, principalmente la inclusión en parafina que se hace a 60 grados °C, provocando retracción de las células y reduciendo su volumen en aproximadamente un tercio.

Tiene cabida hacer un poco de detalle en los procesos mencionados anteriormente después de la fijación. Para la coloración después de la fijación, se procede a poner el tejido en el portaobjetos y acto seguido se procede a teñir, colocando sobre él el colorante poco a poco. Se deja durante unos minutos, a continuación se inclina el portaobjetos para eliminar el excedente de colorante, siguiendo el procedimiento se pasa a deshidratar, añadiendo alcoholes de concentración creciente, 70%, 90% y 100%, 2 minutos cada uno hasta que esté deshidratado, según como se requiera y según la estructura a analizar. Los colorantes permiten cambiar el contraste entre los distintos componentes de las células y los tejidos para poderlos diferenciar o ver mejor con el microscopio o bien para poder ver algunas células específicas a estudiar; proceso que dura hasta 3 horas de preparación. Aquí también existen diversos tipos de colorantes según el tejido o para lo que se requiera. En algunos casos, será necesario tomar la imagen a grises y con el programa adicionar colores falsos.

Del mismo modo se procede a aclarar, dar transparencia añadiendo xileno, durante 5 minutos, para no dejar excesos de colorante que impida con ello ver las estructuras celulares. Una vez aclarado se procede a montar el tejido sobre otro portaobjetos o en el mismo para después ser colocado en el microscopio y así empezar a tomar las fotografías para su estudio.

Cabe hacer mención que estas últimas características se tomaron en consideración en la presente tesis. Por mencionar la coloración que se hizo en algunos tejidos o células, fue necesario aplicar filtros computacionales para poder comparar una fotografía con otras, como el poner color falso a una imagen en gris según sus tonalidades y reducir a grises una imagen a color, además de la calibración de las tonalidades de gris, con base al elemento fijador usado en el corte histológico.

Una dificultad en el estudio de la Histología, consiste en que cuando se tiñe una preparación histológica o corte, sólo algunos aspectos de las estructuras de los tejidos son puestos en evidencia, dependiendo de la técnica aplicada, ya que existen muchas. Es imposible hacer una preparación que muestre la totalidad de los componentes celulares y todos los detalles de los tejidos que se visualizaran en la fotografía que obtendrá el microscopio. Es necesario en consecuencia, examinar varias preparaciones, coloreadas por diferentes métodos, para tener una idea más completa de la composición y estructura del tejido u órgano que queremos estudiar. En la última parte de la tesis, se aplicaron algunas técnicas para poder componer en cierta forma la imagen.

Supongamos que se aplica un método de coloración al corte y se obtuvo una fotografía muy oscura o borrosa, debido a que el colorante o fue muy oscuro o reaccionó de esa forma con el tejido; entonces se puede proceder con algoritmos para poder quitar lo oscuro o poco nítido de la imagen desde un punto de vista computacional.

La obtención de un corte para ser analizado en el microscopio y después con el programa, necesita ser preparado con mucha precisión, ya que pinzar o exprimir el tejido de forma innecesaria lo deforma. De un tejido se obtienen secciones o cortes llamados bloques, su grosor varía desde una hasta 10 micras (μm).

Otro detalle, después de tener preparado el corte y listo para ser analizado en el microscopio, el portaobjetos deberá estar limpio para evitar errores al momento de analizar el bloque. En algunos casos también al bloque se le coloca encima un cubreobjetos para poder ser estudiado mejor. Con esta última observación la Microtécnica se completa y ahora solo se procede a analizar el tejido.

En la BUAP en general el proceso más común es anestesiar el animal que son ratas o ratones, y después se les aplica el proceso de fijación por perfusión, para seguir con el proceso de corte del tejido a estudiar y por el ultimo se tiñe para su observación en el microscopio, aunque también se utiliza la técnica por congelación donde su nombre lo dice los tejidos se congelan en isopentano a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después se procede al corte del mismo para posteriormente ser estudiados. En cualquiera de las 2 microtécnicas si los tejidos no se requieren en ese momento, se mantienen en congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cabe hacer mención que uno de los estudios que se realizan en nuestra universidad, es analizar las anomalías tempranas en el neurodesarrollo que conducen a los cambios del comportamiento ligados a problemas de esquizofrenia o epilépticos y para ello el cerebro del animal se daña por así decirlo con drogas, tales como el ácido íbotenico ($\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4$) o kainico ($\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4$); pero estas drogas lamentablemente ocasionan daños mas severos y no de forma como se requieren. Por ello existe una reciente innovación para dañar el cerebro del animal para estudiar la esquizofrenia y que se aplica en los laboratorios de Fisiología, la cual consiste en realizar el daño del animal por medio de un láser de CO_2 , con un lente para reducir la amplificación del láser y enfocarla hacia un solo punto; con ello se tienen lesiones finísimas de algunas micras y sin mucho daño al tejido de la corteza prefrontal (PFC) del cerebro del animal, acción que se hace durante aproximadamente 30 minutos. [8] Con ello después se procede a la parte de la Microtécnica, para así poder estudiar en microscopio lo que se busca acerca de esas anomalías y de lo que conduce a la esquizofrenia o a los ataques epilépticos o de lo que ello derive.

Ahora bien existen una gran diversidad de microscopios como el microscopio fotónico, el electrónico, el de luz, el de contraste de fase y el de interferencia entre otros más. Estos varían por el factor de amplificación y por la incidencia de luz que dan al objeto de estudio. Para nuestro caso, en el Instituto de Fisiología, se usa el microscopio de luz clara marca Leica modelo DMLS hecho en Alemania, adicionado con una video cámara CCD marca JVC, modelo TK 1380 o una similar, con la opción de usarlo también con fluorescencia, luz oscura y luz con contraste. Fig. 1.2. En el caso de uso de láser de CO_2 se tiene un Synrad, modelo 48-II 28W US; para el criostato un Leica, modelo CM1100 también hecho en Alemania, en el cual se pueden obtener secciones o cortes de hasta 50 micras en el tejido coronario.

La interpretación final del corte, después de todo, dependerá del investigador ya que el sabe lo que esta buscando y analizando.

1.3 La Autoradiografía

Por ultimo hablaremos de la Autoradiografía o Histoautoradiografías que es aquella imagen fotográfica tomada por decaimiento radioactivo mediante una placa sensible a la radioactividad; utilizada para detectar moléculas radioactivas en células, tejidos, y moléculas separadas por electroforesis (DNA, RNA, proteínas y otros elementos orgánicos que encontramos en los tejidos), usado con el fin de delimitar ciertas células o áreas del tejido en estudio o bien sus formas de estructura y evolución de los mismos. También se pueden marcar determinadas sustancias orgánicas del tejido con un isótopo radioactivo que emite rayos partículas alfa, beta o rayos gamma, de modo que se puede seguir su trayectoria metabólica detectando el isótopo mediante una emulsión fotográfica enfrentada a él y que posteriormente se revela, por tan solo decir Timidina tritiada que se incorpora al DNA para que pueda ser visualizada [7], es decir, la autoradiografía es un poderoso y moderno método en cierta forma económico realizado, para revelar la distribución espacial de sustancias radio-etiquetadas en materiales biológicos en forma clara. [10] Aquí también se aclara que el isótopo radioactivo al final tiende a afectar el tejido orgánico es por ello, que hay tiempos en que el tejido puede estar en contacto con el isótopo y dependiendo del mismo se pueden encontrar elementos biológicos en el tejido en cuestión de días o meses. La Auto-

radiografía se puede catalogar como un método de fijación, ya que como se menciono permite ver ciertas células y su interactividad previamente señalados con los isótopos radioactivos.

Los elementos radioactivos comunes que se utilizan en el Instituto de Fisiología son Tritium (^3H), Fósforo 32 (^{32}P), Fósforo 33 (^{33}P), Yodo 125 (^{125}I), entre otros con menos uso con las características y recomendaciones que da la compañía Amersham Life Science, para dar seguridad a los científicos que usan estos elementos radioactivos [11]. En nuestro programa se utilizaron mucho ese tipo de fotografías y se hicieron cálculos matemáticos para ver el funcionamiento que sigue el proceso del isótopo al ir descomponiendo poco a poco el tejido o así mismo, que se calculó por medio de factores dados en las propias tablas de la Amersham Life Science, que por más de 50 años ha estudiado estos elementos radioactivos y que se realiza a través de un proceso de Calibración de la Curva que más adelante se explicará a detalle.

1.4 Obtención de las Imágenes por medio del Microscopio

Otro elemento de interés por el cual se desarrolla un sistema de este tipo, es que los microscopios no han cambiado mucho desde el siglo XIX, a lo más han cambiado la forma de hacer los lentes del mismo permitiendo una mayor potencia de amplificación. Sin embargo, junto a esta herramienta que continúa casi inalterable, en los últimos años el entorno de trabajo del científico ha incorporado progresivamente un nuevo utensilio: la computadora u ordenador. Hoy en día ya es habitual disponer en las mesas de trabajo una computadora junto al microscopio. Y esta incorporación ha tenido lugar en un periodo muy breve. Prácticamente hace diez años la informatización de este tipo de trabajo era casi desconocida. Como se observa esta área todavía esta en pleno desarrollo desde un punto de vista de tecnología computacional.

Ahora bien, como se mencionó anteriormente el microscopio cuenta con una computadora conectada al mismo, lo cual por medio de un software especial, en nuestra caso QWIN Software, obtiene la imagen vista por el microscopio y es almacenada en formato TIFF, ya que dicho formato conserva mejor las características de la fotografía. De ahí ya se procede a analizar por parte del investigador.



Fig. 1.2 Microscopio Leyca modelo DMLS

Capítulo 2

LA PARTE COMPUTACIONAL A ESTUDIAR

Como hemos visto, esta tesis trata de desarrollar un sistema capaz de analizar imágenes digitalizadas de células o sus partes que se encuentran en tejidos animales tomadas desde un microscopio. Al referirnos a imágenes digitales nos enfocamos a fotografías que se encuentran bajo un formato para la computadora.

Durante los últimos años la Ciencia de la Computación se ha ido adentrando a esta área; con el estudio y ayuda de la Morfología en las imágenes, las redes neuronales, el procesamiento de imágenes a color, la comprensión, el reconocimiento de imágenes y los sistemas inteligentes de análisis de imágenes entre otras mas ha ido creciendo. Incluso esta área se ha mezclado mucho con las matemáticas, ya que día a día los algoritmos se hacen más complejos y utilizan integrales y series de Fourier entre otros métodos. Para nuestro caso usaremos mucho de estas operaciones y otras más; así también se aplican otro tipo de operaciones para obtener resultados particulares y específicos que el investigador requiera según su área de estudio.

Se han hecho varios algoritmos conocidos dentro de esta área para cambiar o procesar las imágenes digitales llamados filtros. Entre los filtros más comunes están los de binarización, de negativo, de promedio, suavizantes, realzantes, modelados a color, modelado a grises, entre otros que explicaremos más adelante, según se utilicen en esta tesis. El área de procesamiento digital de imágenes ha estado en continua evolución y día a día se hacen diferentes algoritmos más poderosos y rápidos para poder procesarlas. Y que estos han ido mejorando conforme mejoran los avances tecnológicos del hardware de la computadora.

Cabe hacer mención, que la tesis se desarrolló haciendo uso del lenguaje de programación Borland Delphi versión 5; ya que este lenguaje proporciona una interfaz e instrucciones relativamente fáciles para procesar imágenes.

Es entonces que este segundo capítulo trata sobre los conceptos relacionados y fundamentales, así como algunos antecedentes a este proyecto desde un punto de vista computacional para poder entenderlo conforme se vaya avanzando en este escrito y según el desarrollo de nuestro programa.

2.1 El microscopio y la computadora

Actualmente el tener una computadora en estudios como estos, agiliza los diferentes procesos, aparte de hacer más exacta la investigación celular, permite guardar resultados del experimento, al almacenar las imágenes, lo que antes no era posible. Esto porque se hacía un experimento y después las muestras eran destruidas, ya que no había cámaras digitales capaces de ser conectadas al microscopio para guardar el experimento, cuando ya se adaptaron las cámaras al microscopio las imágenes tomadas eran muy grandes para poder ser guardadas, esto por limitaciones de capacidad. Hoy sólo basta guardar los resultados teóricos y experimentales, así como sus imágenes en la computadora o en un simple CD, permitiendo volver a observar y analizar más tarde esos mismos resultados. Incluso hoy en día estos experimentos y sus resultados pueden ser consultados vía remota, ya sea por Internet o por videoconferencia.

La computadora al contar con periféricos extra como una tarjeta digitalizadora, buena memoria, una cámara de video digital o de fotografía digital interconectada al microscopio y a la computadora, permiten hacer la captura de la imagen a ser procesada, es decir, obtener una imagen digital. Después de obtenerse dicha imagen se procede a analizarla ya sea con un software comercial para imágenes como Adobe PhotoShop, Corel Photo Paint o Paint Shop Pro; o bien con algún software especializado para el área como VisioScan o Morpheus de CVB, Módulos para análisis morfológico de imagen o Ramses, Tool for image detection with normalize correlation o Manto - Software for general Object Recognition entre otros más que existen en el mercado y que en su mayoría emplean el idioma inglés.

Lamentablemente todos estos programas o software basados en un microscopio tienen un costo para su uso, por decir en el Laboratorio de Fisiología se maneja un software especial llamado LEICA Qwin v. 2.5 el cual tiene un costo muy elevado y su compra se limita a que se use en una sola máquina lo cual limita su uso. También cabe mencionar que anteriormente había software hecho bajo plataforma DOS y de forma libre, pero debido a la rápida evolución de las computadoras y a la inclusión de gráficos en todos los programas destinados a usuarios, esto ocasionó que se volvieran obsoletos, ya que hoy en día todos usan gráficos. Esta tesis propone y da una herramienta en español y bajo un formato gráfico para poder ser usado en el área de la Histología y Morfología del Instituto de Fisiología, pero sobre todo de forma libre o sin costo alguno pudiendo ser mejorado para otros fines y se puede usar en varias computadoras.

Por último cabe hacer mención en esta sección que existe un microscopio (especificado anteriormente) en el Laboratorio de Fisiología que se encuentra conectado a una computadora u ordenador y que por medio del software LEICA Qwin versión 2.5 se obtiene la fotografía o imagen digital que se observa en un instante determinado en el microscopio. Dicho software obtiene la imagen digital bajo el formato computacional de imágenes llamado TIFF (Tag Image File Format) y que hizo necesario implementar en la tesis para poder abrir, guardar, y modificar ese tipo de imágenes.

2.2 Las Imágenes Digitales

Pero comprendamos primero cada parte de esta área con más exactitud: Las Imágenes Digitales son fotos electrónicas tomadas de una escena o escaneadas de documentos, fotografías, manuscritos, textos impresos e ilustraciones, etc. Se realiza una muestra de la imagen digital y se confecciona un mapa de ella en forma de cuadrícula de puntos o elementos de la figura llamados píxeles. Un píxel es la unidad más pequeña para representar un gráfico en una computadora. A cada píxel se le asigna un valor tonal (negro, blanco, matices de gris o color), el cual está representado en un código binario (ceros y unos) y se le ubica bajo una pareja de coordenada (x,y) sobre el mapa total de la imagen. Los dígitos binarios ("bits"), para cada píxel son almacenados

por una computadora en una secuencia, y con frecuencia se los reduce a una representación matemática (comprimida). A mayor compresión de la imagen menor calidad de la misma, pero también ocupa menor espacio en disco y en memoria. Luego al abrir una imagen la computadora interpreta y lee los bits para producir una versión analógica para su visualización o impresión, de esta parte salen los diferentes tipos de formatos o algoritmos que pueden comprimir o descomprimir una imagen como JPG, BMP, TIFF, PCX, PNG, GIF entre otros más. En nuestro caso se manejaron imágenes principalmente del tipo JPG, BMP y TIFF. Con lo anterior hacemos notar que una imagen digital se conservara mejor con el tiempo, ya que la secuencia de 0's y 1's nunca cambiará, mientras una imagen o fotografía convencional como es de papel se deteriora con el tiempo. Ahora bien, una imagen digital según la cantidad de píxeles que se necesiten para representarla se le llama resolución, y así a mayor resolución mayor calidad, nitidez y exactitud de la imagen tomada, pero también ocupan más espacio en memoria y en disco; la imagen en el proceso digital maneja un ancho y un alto y el cual para mencionar la dimensión de la imagen se tomara así ancho por alto. En la presente tesis, se manejaron imágenes con resoluciones en su mayoría superiores de 800x600 píxeles.

2.3 Imágenes en Formato TIFF

El formato de imágenes TIFF (Tag Image File Format) es el tipo de archivo de la imagen digital que se obtendrá en el microscopio, después de ser analizado el corte histológico, ya que conserva mejor las características originales del experimento debido a su formato a comparación de otros; por ello se utilizó este tipo de formato en esta tesis. Las Imágenes TIFF tienen las siguientes propiedades:

- Tipo: Bitmap.
- Colores que soporta: 1 a 24-bit.
- Se comprimen y descomprimen (visualizar y guardar) con los algoritmos: RLE, LZW, CCITT Grupo 3 y Grupo 4, JPEG.
- Medida máxima que alcanza la imagen: $2^{32} - 1$ bytes
- Soporta imágenes múltiples por archivo.
- TIFF fue creado por: Aldus Corporation
- Plataformas de sistemas operativos que soportan TIFF: MS-DOS, Windows, Macintosh, UNIX entre otros.

Las imágenes TIFF también son usadas para el almacenamiento e intercambio de datos ya que estas imágenes pueden ser comprimidas varias veces, y según requiera el usuario, lo que permite que esté en varios sistemas operativos.

El formato TIFF fue creado en 1986 por la Corporación Aldus como un método para almacenar las imágenes de los escáners de aquel tiempo, las cuales eran en blanco y negro y se usaba para almacenar las imágenes de las aplicaciones de publicidad. En un principio hubo 3 versiones de imágenes TIFF, pero fue hasta la 4 en Abril de 1987, cuando se incluyó la versión a color bajo la forma RGB que es una forma de combinación de colores que puede tomar un píxel. Para Agosto de 1988 sale TIFF 5.0 el cual ya incluía una paleta de colores y soportaba el formato de compresión LWZ. TIFF 6.0 en Junio de 1992 soportaba la forma CMYK y YCbCr y soportaba el método de compresión JPEG.

Hoy TIFF es usado por algunas aplicaciones que procesan imágenes y es una forma nativa para Microsoft Windows GUI; tiene la capacidad de utilizar múltiples mapas de bits como imágenes para cualquier profundidad de píxel, es decir, el número de bits necesarios para representar un píxel, según como el usuario necesite para su resolución, por esta flexibilidad TIFF es un formato

algo confuso y complicado para usarse en las aplicaciones, ya que no hay un formato estándar de compresión y descompresión

Por otra parte la organización de un archivo TIFF esta formada por tres partes: Image File Header (IFH) o Cabecera del archivo que está en los primeros 8 bytes del archivo TIFF, Image File Directory (IFD) o Directorio del archivo de Imagen y por último los datos de la imagen.

Un archivo TIFF que maneje múltiples imágenes, maneja un IFD (llamado también subarchivo TIFF) y sus datos por cada imagen, donde cada IFD contiene una estructura de datos llamado tag o etiqueta y es puesta en 12 bytes y contiene información sobre su propia imagen.

En la FIG 2.1 podemos observar como un archivo TIFF con múltiples imágenes puede ser trabajado de 3 formas diferentes, donde cada parte tiene un apuntador u offset para poder ser accedido, he ahí una gran dificultad para crear un algoritmo específico para poder abrir o guardar una imagen TIFF.

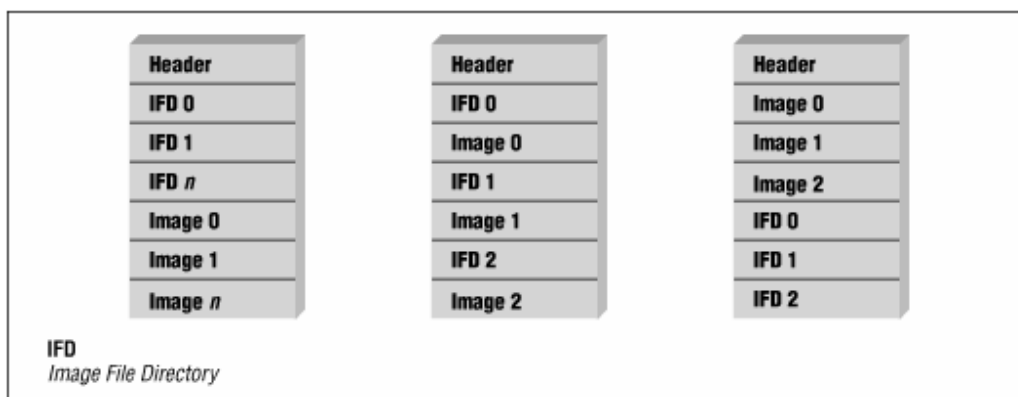


FIG 2.1 Las diferentes formas en que trabaja un archivo TIFF con varias imágenes.

2.4 Imágenes en Formato JPG

El formato JPG es uno de los formatos más populares usado en todo el mundo, ya que casi la mayoría de las imágenes que vemos en el Internet son en JPG, es un formato que guarda imágenes con resolución relativamente clara y ocupando poco espacio en disco y en memoria. El formato JPG o JPEG también así conocido por sus creadores el Joint Photographic Experts Group, puede soportar hasta 16.7 millones de colores y es muy usado para las fotografías a color. Como desventajas de este formato es que a mayor compresión tiene una gran pérdida de información, claridad y nitidez.

2.5 Imágenes en Formato BMP

Otros de los formatos para comprimir y descomprimir las imágenes y que usamos en este proyecto de tesis, es el más conocido y uno de los más antiguos, desarrollado e impulsado por Microsoft Corporation, el formato BMP, que es una abreviatura de BitMap (Mapa de Bits de Windows), y que en realidad efectivamente es eso, una sucesión de puntos o bits coloreados, guardados cada uno independientemente en forma de un mapa. Esto le convierte en el formato gráfico más simple que existe. Se manejan diferentes cantidades de bits o bytes para representar tan solo un píxel, dependiendo de la resolución de la misma imagen, lo que la hace una imagen que

ocupe mucho espacio en disco y en memoria, y eso tiene una gran desventaja. Entre sus ventajas el Formato BMP es usado en muchos programas para ser procesado y de ahí convertirlo en otros formatos.

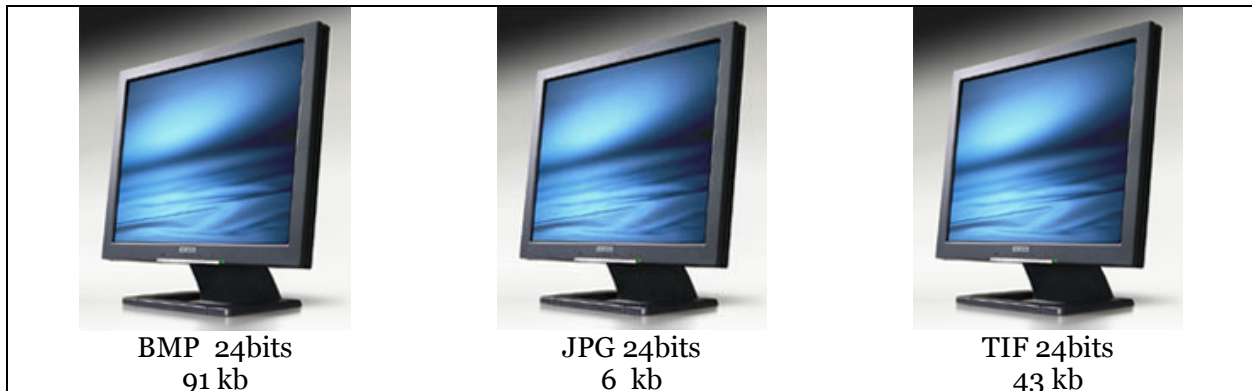


Fig. 2.2 Imágenes en formatos BMP, JPG y TIF, todas de dimensiones 160x192 píxeles.

2.6 Imágenes monocromáticas y a color

Otro factor importante en las imágenes y que es muy destacado en el Instituto de Fisiología y que por consiguiente aplicaremos en nuestro tema de tesis, es el uso de imágenes monocromáticas y las imágenes a color.

Una imagen monocromática se refiere a aquella que tiene solo dos colores: blanco o negro o bien una escala de valores intermedios entre esos dos colores denominada escala de grises. [1] Para representar un blanco o negro 1 en un píxel solo necesitamos de 1 bit y para representar la escala de grises se necesitan de hasta 8 bits por píxel lo que permite que haya 256 diferentes tonalidades de grises (2^8), que van desde 0 que es el negro hasta al 255 que es el blanco. En ocasiones al nivel de grises de la imagen se le llama intensidad o brillo de la imagen.

Las imágenes en gris son las que más se usaron en nuestro tema de tesis, ya que debido a su brillo o intensidad de las mismas, permiten reconocer ciertas características del objeto original, tal como encontrar un patrón orgánico celular por medio de una reacción química o radioactiva, por tan solo decir, ya que por medio del brillo de la imagen y mediante algunas operaciones matemáticas permite obtener los resultados que busca el científico.

En el laboratorio de Neuropsiquiatría de la BUAP se realizan análisis de imágenes obtenidas por diversas técnicas, tanto bioquímicas como de biología molecular; como son imágenes de experimentos de inmunohistoquímica, que permite estudiar alguna molécula, o bien estudios de autoradiografía para estudiar proteínas tipo receptores o transportadores de alguna otra molécula o neurotransmisor, otro ejemplo son imágenes que se obtienen de tinciones como la técnica de Golgi-Cox, que al final nos permiten estudiar la morfología dendrítica y que con un programa de análisis de imágenes es posible acelerar su estudio. En muchas ocasiones las imágenes se obtienen en blanco y negro y es preferible utilizar falsos colores, para la enseñanza de los estudiantes o a la inversa.

Otro tipo de imágenes son las de a color, y que son aquellas que para ser representadas utilizan varios canales o tintes, esto último lo da el elemento electrónico que las representa. Antes las pantallas solo permitían representar las imágenes a grises por su deficiencia en calidad, pero a medida que avanza la tecnología los dispositivos de despliegue de imágenes se hicieron avanza-

dos, permitiendo incorporar los canales o tintes. Existe el modelo de 3 canales llamado RGB (Red, Green, Blue) y que este utiliza esos 3 colores primarios (Rojo, Verde y Azul) para representar todos los colores en un píxel, cada canal tiene 256 tonalidades, por consiguiente se requieren 24 bits, lo que permite representar hasta 16.7 millones de colores (2^{24}) y que muchos de esos colores al ojo humano no son visibles; es muy usado en pantallas a color y en cámaras de video. Otro modelo ocupa 4 canales como el CMYK (Cyan, Magenta, Amarillo y Negro), donde cada canal tiene 8 bits, por consiguiente se necesitan 32 bits por píxel, se usa más en impresoras y fotocopiadoras a color.

Existe también el modelo HSI (Hue, Saturation, Intensity) que se basa en el Tono, Saturación e Intensidad de los colores o grises de la imagen. Este modelo es usado para desarrollar algoritmos de procesamiento de imágenes basados en alguna de las propiedades de la percepción del color del sistema visual humano, recordemos que: Brillo es la sensación de que un área está más o menos iluminada. Tono es la sensación que indica si un área parece similar al Rojo, Amarillo, Verde o a una proporción de dos de ellos. Coloración es la sensación de que un área tiene más o menor tono. Luminosidad es el brillo de una zona respecto a otra blanca en la imagen. Saturación es la relación entre la coloración y el brillo.

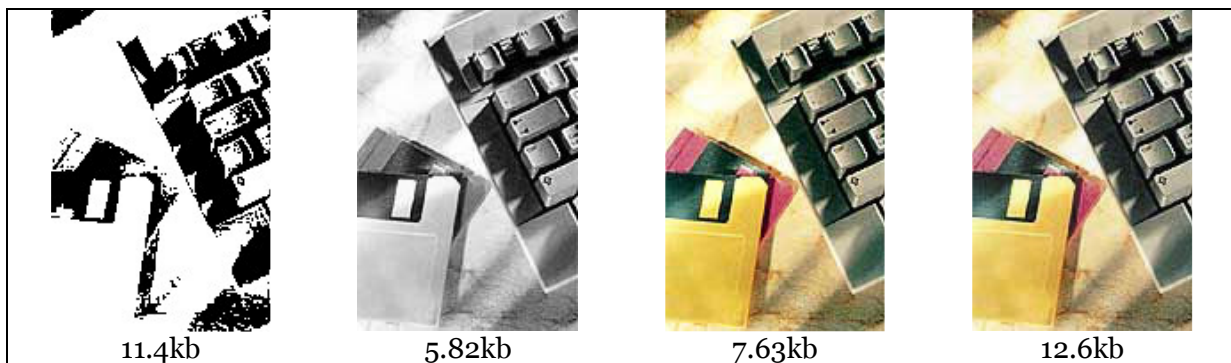


Fig. 2.3 Imágenes JPG de 124x181 píxeles en diferentes modelos de color. Blanco y Negro, Escala de Grises, RGB y CMYK

Hay otros modelos como el Lab, HSV, HCl, HVC estos tres últimos son variaciones del HSI, el YIQ (Yellow, Fase y Cuadratura) usado para las emisiones comerciales de televisión y es una recombinación de RGB que lo hace compatible con televisiones de blanco y negro y a color.

En esta tesis usamos el modelo RGB porque emplea las tonalidades de grises para hacer operaciones, y las imágenes a color en su mayoría solo para hacer presentaciones.

2.7 Imágenes en falso color

En los programas empleados en esta tesis, también manejamos las imágenes en falso color, que son aquellas imágenes en escala de grises, que se les asigna un color con base a características de la misma imagen y/o con base a un método de aplicación de colores falsos. Existen varios métodos, ya que la asignación de colores nunca llegará a ser real, ya que la imagen a color obtenida de manera natural es insustituible, además de que muchos autores manejan sus propios métodos. Aquí explicaremos, los métodos que se aplicaron en esta tesis.

2.7.1 Por División de Intensidad

Este método es uno de los más sencillos, [1] consiste en dividir la escala de los 256 tipos de grises a intervalos, y dentro de cada intervalo se asignará a los canales RGB un color que el usuario

defina. Por decir dividamos la escala de grises en 2 intervalos, esto es, $256/2=128$ entonces los grises con valores entre 0 a 128 se les asigna un color y los de 129 a 255 se les asigna otro color. Obsérvese que mientras más intervalos se hagan, más colorida quedara la imagen con base a su densidad de grises. En nuestro programa manejaremos 8 niveles, donde en cada nivel el usuario puede elegir cada color que requiera según sus necesidades.

2.7.2 Por Transformaciones de color de nivel de gris

Este es otro método relativamente muy sencillo, el cual consiste en tomar por separado cada canal RGB y aplicar una función independientemente, es decir al rojo una función, al verde otra y al azul otra con base al nivel de gris que tiene la imagen. Este método produce una imagen compuesta cuyo contenido de color esta modulado por la naturaleza de las funciones de transformación [1].

Otros métodos trabajan de igual manera de forma independiente en cada canal RGB, tienen la misma entrada de gris, pero cada canal tiene una diferente salida, según la función, y se aplica la imagen. Entre otras funciones son aplicar filtros paso-alto o paso-bajo, luego una transformada de Fourier, para venir el ajuste de rango y así aplicarla a la imagen. Pero al final, se vuelve a repetir que existen varios métodos, dependiendo de la naturaleza de la imagen y agudeza del programador. En nuestro proyecto de tesis, aplicamos el de división de intensidad y el de transformación de grises, y algunas variantes del mismo, que analizaremos más adelante.

Capítulo 3

ANTECEDENTES DEL SISTEMA SAGEFH

Hasta el momento, hemos visto varios conceptos necesarios para entrar ya de lleno a lo que concierne a este tema de tesis. Vimos algunos conceptos de Fisiología e Histología que usaremos en este programa y otros más que definiremos más adelante y que requieren su mención y explicación conforme vayamos desarrollando este tema de tesis y conforme fuimos programando nuestro software. También vimos varios conceptos computacionales como los formatos de imagen a nivel general para poder visualizarlas y para poder guardarlas, las imágenes en color y color falso.

En las ramas de Fisiología, Histología y Computación aplicada a estas áreas vimos algunos antecedentes, lo que las fue uniendo conforme avanzó la tecnología en el tiempo para hacer la vida más fácil a la investigación celular y que es un área en gran crecimiento en nuestros días.

Ahora con toda esta información que hemos visto previamente, entraremos de lleno en nuestro programa llamado SAGEFH en su versión 1.1, palabra conformada por su nombre completo: Sistema Analizador Grafico para Estudios Fisiológicos e Histológicos, llamado así porque nuestro programa en la mayoría de sus operaciones utilizara las imágenes tomadas de los cortes histológicos realizadas a los tejidos animales.

Para el desarrollo de SAGEFH y su correspondiente explicación, aplicaremos varios conceptos de la Ingeniería del Software, para cumplir con estándares en la forma de realizar un software y los cuales veremos en este capítulo.

Además de lo anterior veremos los objetivos generales y específicos del sistema, así como su Análisis y Planeación para poder desarrollarlo. La parte explicativa del programa en general lo veremos en el Capítulo 4.

3.1 Objetivo General

Este fue crear una herramienta de software para el Instituto de Fisiología, capaz de abrir imágenes obtenidas por el microscopio o algún tipo de video de alta resolución, más el software adicional para el manejo de ciertas características, con el fin de obtener resultados estandarizados a fentomoles por miligramo de tejido; para estudios autoradiograficos, la densidad óptica para estudios de western bot, hibridización in situ, análisis comparativo de imágenes de células, etc. Lo que reduce con ello los gastos de software comercial y la disminución del tiempo en la obtención de datos, que el investigador necesita analizar de la imagen.

3.2 Objetivos Particulares

- 1.- La creación de un programa capaz de manipular imágenes de células para agilizar su tratamiento y estudio en Fisiología.
- 2.- Incorporación de tablas de radioactividad de los isótopos, de donde se obtienen las autoradiografías en el programa para agilizar el proceso de estudio en Fisiología.
- 3.- Incorporación del Método de Mínimos Cuadrados en nuestro programa para ajustar cualquier graficación de datos, bajo un cuadrante x e y .
- 4.- Inserción de la selección cuadrada, circular y libre, para poder delimitar ciertas zonas de la imagen celular, haciendo más fácil el estudio de las imágenes obtenidas por el microscopio.
- 5.- Crear un programa libre, sin uso de licencias costosas en idioma español, para uso exclusivo del Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla.
- 6.- Proveer de una herramienta a la sociedad para poder estudiar células o cortes histológicos, a través de imágenes digitalizadas.
- 7.- Ofrecer un programa a esta área, donde se puede dar colorido a imágenes en grises o en blanco y negro.

Con todo ello se lograra una herramienta única en el área de Fisiología que reúna todas esas características y que beneficiará en mucho a la Universidad, al Instituto de Fisiología, a los investigadores y a uno mismo como programador y profesionalista.

3.3 Metodología

Como mencionamos en la introducción de este capítulo para explicar nuestro programa en el diseño y la programación, así como la verificación de errores, nos basaremos mucho en la metodología de la Ingeniería del Software, ya que cualquier software que se realice sin esta área, carece de calidad y de una estructura adecuada para poder cumplir las expectativas del usuario final. En nuestro caso investigadores y estudiantes que estén en el Instituto de Fisiología. Además de cumplir con calidad desde el punto de vista en la estructura del programa, el diseño, posible mantenimiento y crecimiento del mismo software, para así obtener los resultados rápidos y eficientes.

Para empezar a explicar el diseño de nuestro software, diremos que el desarrollo de nuestro sistema se baso en la metodología de L.B.S. Raccoon (RAC95) [3] (Fig. 3.1) el cual utiliza fractales como base de estudio de la verdadera naturaleza en la realización de un software, además de que, conforme progresa el trabajo hacia un sistema completo, las etapas que describen el método se aplican recursivamente a las necesidades del usuario y a la especificación técnica del desarrollador del software. Nosotros manejaremos el Modelo Rac95 de forma única Fig. 3.1. Izquierda para cada proceso o parte del programa que se vaya realizando; para que al final se una en un todo, o en su caso, dada la complejidad usarlo de manera recursiva.

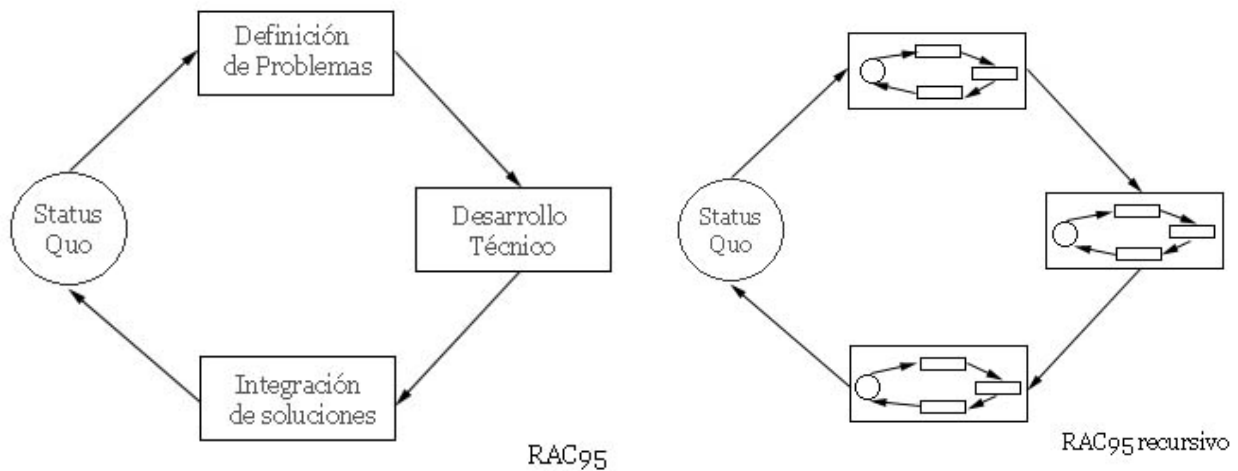


FIG 3.1-Izquierda: Las partes del modelo de proceso de software RAC95: Definición de Problemas, Desarrollo Técnico, Integración de Soluciones y el Status Quo. Derecha: Ahí se muestra el método RAC95 de manera recursiva. [3]

Definición de Problemas: Identifica el problema específico a resolverse.

Desarrollo Técnico: Es la resolución del problema mediante alguna aplicación o tecnología.

Integración de Soluciones: Muestra los resultados, en documentos, programas datos y/o producto nuevo.

El Status Quo: Muestra la situación actual de los sucesos a resolverse, o el estado como se encuentra nuestro problema.

A lo largo de la realización de nuestra tesis y de este capítulo como se mencionó anteriormente usaremos este modelo, ya sea en una forma única o de forma recursiva, para dar solución a los problemas planteados. Al modelo RAC95 también se le agregó el modelo lineal secuencial [3], también llamado ciclo de la vida clásica o modelo en cascada, ya que nos fue de gran ayuda en todo el proceso de realización de nuestro programa de tesis.

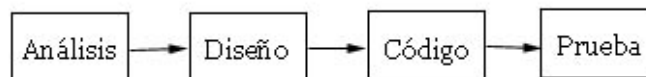


Fig. 3.2 Fases del modelo secuencial o vida básica para hacer software. [3]

Análisis: Esta parte consiste en los requisitos de nuestro programa y de lo que hará y como lo hará, su comportamiento, rendimiento e interconexión; en donde el cliente o usuario documenta y repasa los requisitos del sistema y del software, por que el será quien lo utilice.

Diseño: El diseño del software es un proceso que se centra en 4 puntos fundamentales: estructura de datos, arquitectura del software, representaciones de interfaz y detalle procedimental (algoritmo). El diseño traduce requisitos en una representación del software antes de empezar su codificación.

Código: Es la traducción del diseño a una forma entendible para la computadora, es decir, la aplicación de la programación.

Pruebas: Una vez realizado el código empiezan las etapas del programa, donde se comprueban todas las sentencias y sus correspondientes resultados internos y externos, en otras palabras, se hace la detección de errores, para así obtener resultados reales y seguros según haya requerido el usuario en sus planteamientos.

Nuestro programa y cada parte de él, maneja también este método para el completo funcionamiento del mismo.

Cabe hacer mención que en algunas ocasiones el método de cascada, a veces tiene inconvenientes, ya que a veces no es posible seguir extintamente dicha manera secuencial, ya que por decir, a veces el usuario cambia sus requisitos, ya sea que les agregue o quite algo y no los plantee completamente, o bien a veces hay que codificar para obtener el algoritmo adecuado o sus propios requisitos, por lo cual nos auxiliamos aquí con el método de RAC95; pero a pesar de ello, el Método en Cascada es el más usado en la Ingeniería de Software, porque reúne las partes básicas para hacer cualquier software.

3.4 Requisitos de Sistema

Para nuestro programa de tesis necesitaremos del siguiente equipo, para que funcione el programa eficientemente. Aunque se pueda usar con requisitos menores, el software puede trabajar de manera más lenta, tomemos en cuenta que se manejan imágenes superiores a los 1500x1500 píxeles:

- a).- Computadora Pentium III 1.2 Ghz o superior.
- b).- Memoria RAM 128Mb o superior.
- c).- Disco Duro con 6Mb para instalación y procesado de imágenes.
- d).- Sistema Operativo Windows 98, 2000 o XP.
- e).- Sistema Operativo con resolución en pantalla a 800 x 600 píxeles con modo a 24 bits, para visualizar la interfaz del sistema SAGEFH de forma correcta y visualizar las imágenes en color real.

3.5 Análisis

De aquí en adelante y continuando en el capítulo 4, seguiremos el método de ciclo básico de vida del software o método en cascada, ayudándonos con el método RAC 95 en los procedimientos del programa.

Para empezar definiremos que el solicitante de este software es el profesor el Dr. Gonzalo Flores Álvarez investigador del Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla, quien nos solicito una herramienta o aplicación que pudiera abrir imágenes en especial en formato TIFF, ya que dichas imágenes conservan con mayor calidad su información que se visualiza, y que además en su mayoría se obtienen así en ese formato por el programa que las toma directamente de microscopio. Por otra parte las revistas científicas solicitan que las imágenes sean enviadas en dicho formato por las características ya mencionadas. Para ello se utilizara y programa en lenguaje Delphi, ya que permite manipular las imágenes de una forma más fácil, permitiendo hacer menos código para tal propósito. En segunda instancia se pide que la aplicación a desarrollar permita la selección de una parte de la imagen, en varias formas comunes, como circular, cuadrada, lineal libre y libre. Se pide también que la aplicación mediante ciertos datos y en base a una región seleccionada o toda la imagen permita hacer ciertas operaciones matemáticas y su graficación de los mismos datos, así como su aproximación bajo una ecuación y que esto último se hace con el Método de los Mínimos Cuadrados. En el Método de los Mínimos Cuadrados nos ayudamos de la herramienta de Maple V, para comprobar que efectivamente las operaciones y sus resultados fueran los deseados. A todo esto se le llamara Calibración de la Curva.

También se requirió que cada vez que se hiciera un efecto en las imágenes, ya sea con alguna parte seleccionada o con toda la imagen, que el resultado se visualizara en otra ventana, llevando consigo la selección, si es que la hay, para no volver a hacerla. Para ello dentro de Delphi, se ma-

nejaran lo que se conoce como ventana madre y ventanas hijas y que se explicará más adelante, pero anticipando, nuestro programa principal, será la ventana madre y las aberturas de las imágenes serán ventanas hijas heredadas. El resto serán ventanas simples.

Por otro lado también se pide realizar una sección donde al seleccionar una parte de una imagen, de su cantidad de grises y de también su valor aproximado en la Calibración de la Curva en base a su cantidad de grises; esto se hará por punto y por región.

Otra utilidad más, serán los Histogramas Absoluto, Relativo y Logarítmico, los cuales se harán con toda la imagen o solo con una parte seleccionada en la imagen; adicionándoles, la parte de su cantidad de grises y su error estándar (SEM).

El sistema también cuenta con la opción de medir la imagen y de poder adicionarle texto al gusto del usuario, además de aplicarle los filtros más comunes como conversión a gris de una imagen, dar pseudocolores a imágenes en gris, su negativo, cambiar su brillo u oscuridad, entre otros más, hacer imágenes nuevas, guardarlas en formatos BMP, JPG y TIF, hacer operaciones lógicas y de suma, resta, multiplicación entre imágenes, incluso entre el Clipboard.

3.6 ¿Por qué Delphi?

Ahora explicaremos otros puntos aparte del anterior de el por qué se escogió el lenguaje de programación Delphi. Las aplicaciones en Borland Delphi pueden colocarse de forma muy sencilla en la pantalla según el principio de módulos o partes o formularios completos. Para ello se dispone de una paleta dotada de una gran variedad de componentes, algo así como los bloques de construcción de cada programa. Esta paleta es denominada por Borland como VCL (Visual Component Library), o biblioteca de componentes visuales. Tiene un aspecto similar al lenguaje Visual Basic, pero aunque el aspecto externo indica la misma facilidad de uso que Visual Basic, el corazón del sistema Delphi es mucho más potente.

Esta VCL es mucho más amplia que la de Turbo Pascal para Windows (el antecesor de Delphi) o la conocida OWL 1.0 (Object Windows Library) de Borland Pascal, y ofrece además una abstracción mucho más alta del sistema operativo ya que el programador es totalmente independiente de las particularidades de Windows, tales como manejadores (Handlers), punteros y funciones del API de Windows (Application Programming Interface). La programación se realiza con los cómodos componentes de Delphi y no con las complejas llamadas al sistema de Windows. Esto simplifica enormemente la hasta ahora poco clara programación bajo Windows.

Además Delphi entre otras características de interés incorpora una amplia variedad de instrucciones para el desarrollo de bases de datos en varias interfaces ya existentes; las aplicaciones terminadas quedan disponibles como archivos ejecutables (.EXE) que pueden utilizarse solos y sin bibliotecas adicionales a excepción de aquellos que incorporan herramientas o unidades de código externas necesarias para el funcionamiento del programa principal, tal como en un momento dado ocurrirá con el Sistema SAGEFH.

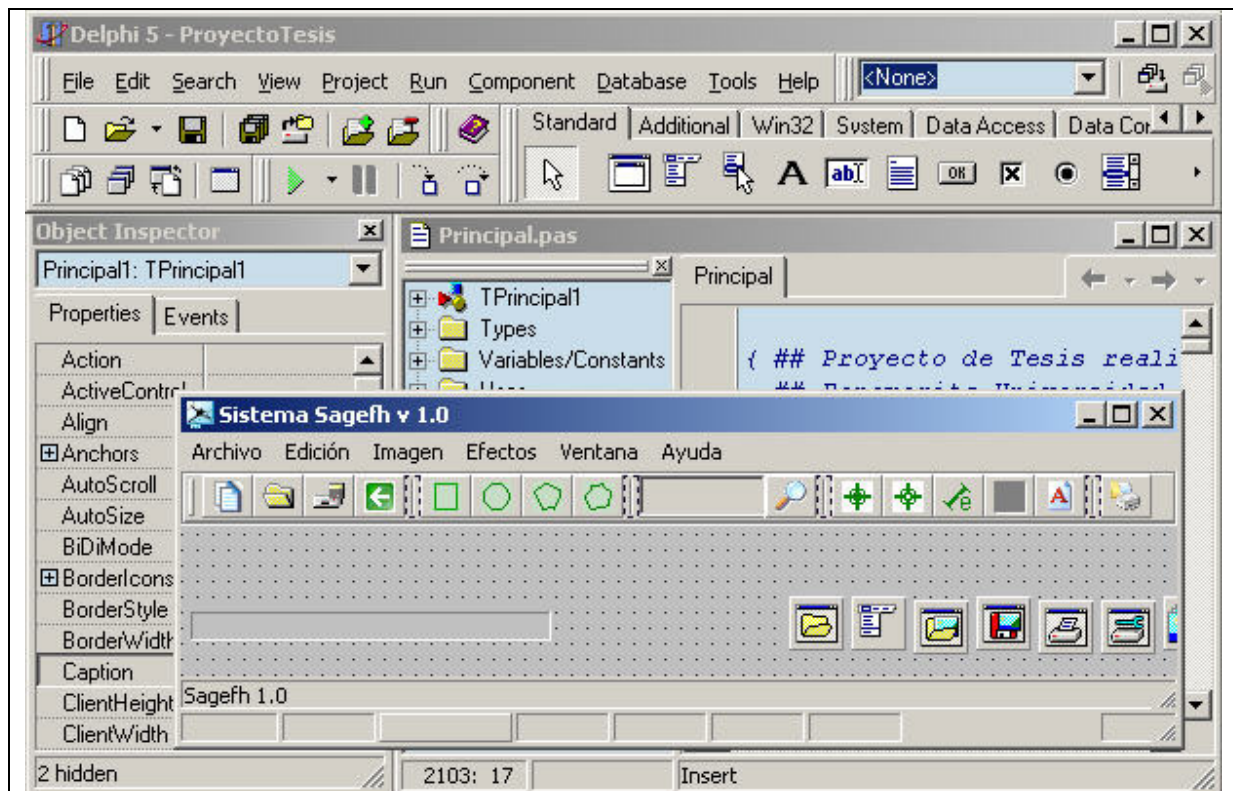


Fig. 3.3 El entorno de trabajo de Borland Delphi Enterprise 5. El programa Delphi 5, la Form1 donde se desarrollara con componentes cualquier aplicación, Unit1.pas donde se establecerá el código de la aplicación y el Object Inspector donde se ven las propiedades de la Form1 o de los componentes que se coloquen encima de ella.

Delphi por último y no por ello su última característica, es una "Two-Way-Tool", es decir, una herramienta de dos direcciones, porque permite crear el desarrollo de programas de dos formas: una de forma visual en la pantalla, por medio de las funciones de Drag & Drop (Arrastrar y colocar) y la otra a través de la programación convencional, escribiendo el código. Ambas técnicas pueden utilizarse de forma alternativa o simultánea.

Nuestro sistema SAGEFH reúne las características básicas requeridas por un manejador gráfico, más aparte las necesidades que requiere el investigador en su área de estudio en cuestión; aunque puede ser utilizado en otras áreas con capacidad de aumentarle opciones y mejorarlo donde se requiera y necesite.

Estos son nuestros requisitos de sistema, es decir, lo que se requiere que se haga, ahora en nuestro capítulo IV empezaremos a diseñarlo y a programarlo, para darle forma a nuestro Sistema Analizador Grafico para Histología y Fisiología.

Capítulo 4

EL SISTEMA SAGEFH

Se ha llegado a la parte fundamental de esta tesis, y ya contando con los antecedentes más importantes, fue la parte que requirió de más tiempo.

Habiendo visto ya varios conceptos relacionados al tema, éstos nos permitirán entender de aquí en adelante lo que realiza nuestro programa, recalcando que sus funciones principales fueron definidas por el usuario y expuestas en el capítulo anterior, ahora en éste, definiremos a detalle tanto la programación, su respectiva interfaz gráfica, así como los resultados esperados.

También hemos definido nuestra metodología de trabajo y que será base y estructura de todo nuestro programa incluida en este capítulo IV, para que dar cumplimiento con la normatividad de ética, eficiencia y calidad en nuestro software y así reunir todas las expectativas del usuario final. Su estudio, implementación, programación y pruebas nos permitieron dar cumplimiento a las demandas solicitadas. Recordemos que usaremos el modelo de ciclo básico de software y del modelo RAC 95 [3].

Definimos también las necesidades de sistema y hardware que requerirá nuestro software para tener un óptimo desempeño del mismo, para no provocar fallos o resultados inesperados. Más adelante en los apéndices, se agrega el manual del usuario para hacer eficiente más aun el uso del sistema SAGEFH.

En este capítulo, nos ayudaremos mucho de diagramas de flujo, pseudo código e imágenes gráficas para explicar el desarrollo y funcionamiento de todo nuestro software y en algunos casos pequeños fragmentos de código usado en Delphi.

Pasemos adelante con la creación y nacimiento ya en forma de nuestro software SAGEFH.

4.1 El Diseño

Para nuestro software SAGEFH se requirió de la continua explicación del proyecto, para que pudiera cumplir con las expectativas del investigador y de los objetivos que se perseguían (que es la Definición de Problemas), además de que la interacción hombre-máquina fuera de lo más sencilla y entendible.

Como se menciona en el Capítulo anterior, nuestro proyecto de tesis, fue hecho con el lenguaje Borland Delphi 5, sucesor del lenguaje Pascal; ya que nos permite manejar las imágenes de alguna forma fácil, además de que su estructura de lenguaje también es sencilla, lo que haría posible su mejora y mantenimiento en el futuro. Aquí cabe hacer mención también que Delphi de manera interna a nivel programación solo se manejan imágenes BitMap, adicionándole el hecho de que estas fueran en 24 bits para permitir la facilidad del uso de colores RGB y para usar el méto-

do de Scanline. Cuando se abren imágenes JPG o TIF, se convierten a BMP por el programa, se procesan y después se visualiza el resultado en una ventana contenedora de la imagen, que se le denomina Form1. El proceso de conversión no la hace el usuario. Por cada imagen que se abra o se ejerza un proceso se abre una ventana. Básicamente nuestro programa trabaja de acuerdo al siguiente esquema:

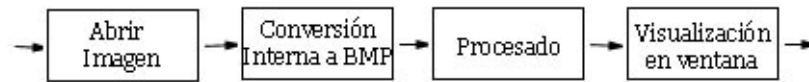


Fig. 4.1 Procesado en General de cualquier imagen.

Dentro del procesado de la Fig. 4.1 podemos encontrar la creación de un Mapa de Bits que representa el área donde se pintara la imagen, la aplicación del Método Scanline y la aplicación en su caso de un Filtro para poder modificar la imagen.

4.1.1 El Método Scanline

En el procesado de imágenes existen varias formas para poder trabajar con ellas, y acceder a la parte mínima de la imagen que es el píxel. Para nuestro caso explicaremos con Delphi algunos formas de realizar esto, aunque en realidad se válida para la mayoría de los lenguajes, solo cambia la sintaxis. Existen dos formas principales para trabajar con las imágenes; accediendo píxel por píxel o por scanline. El acceso de píxel a píxel directamente de la imagen es algo lento y mas aun para poder convertirlas a RGB se necesitan operaciones lógicas que lo hacen más lento, impidiendo trabajar de manera rápida imágenes de grandes dimensiones. El acceso por Scanline, toma por medio de un arreglo de bits toda una línea de píxeles de la imagen y se cargan en memoria por lo cual se procesa de una forma más rápida. A continuación en Delphi vemos como se tiene acceso a cada forma:

```

Bitmap.Canvas.Pixels[x,y]; // Acceso por píxel
Bitmap.Scanline[y]; // Acceso por Scanline; por líneas horizontales de píxeles
  
```

Existen otras formas más de trabajo con las imágenes pero son más avanzadas. Como mencionamos en el Capítulo 2, nuestro programa usa el sistema de color RGB, por lo tanto, se necesitarán de hasta 8 bits para representar un solo color del RGB, por consecuencia para los tres colores básicos las imágenes se trabajaran con formato de 24 bits y por cual el Scanline también trabajará a 24 bits. Por lo que antes de emplear el Scanline en una imagen, pondremos la instrucción `Bitmap.PixelFormat:=pf24bit;` para convertirla a formato de 24 bits.

4.1.2 Estructura del Programa

Ahora bien, entraremos a la parte más importante del programa, lo que nos muestra la real funcionalidad del mismo y su coexistencia de sus diferentes procedimientos y funciones en un todo. Más en cambio aquí explicaremos solo los procedimientos o subestructuras más importantes del mismo y que son parte vital del programa SAGEFH.

Como cualquier aplicación de Windows, el sistema SAGEFH maneja una interfaz de ventanas, habiendo una principal, a la que denominamos ventana madre, y donde se visualizarán las imágenes las cuales llamaremos ventanas hijas y que en nuestro programa se denominan Principal y Form1 respectivamente. Esta forma de trabajo sigue el modelo MDI (Interfaz de Documentos Múltiples), donde las ventanas hijas están confinadas dentro de la principal. [4] En Delphi se

permiten crear varios tipos de formularios, para lo cual solo basta cambiar la propiedad `FormStyle` a `fsMDIForm` para crear una ventana principal y a `fsMDIChild` para crear ventanas hijas. Ahora bien la ventana `Form1` que contiene la imagen se le considera una clase, ya que pueden crearse varias instancias `Form1` heredándose los mismos métodos y propiedades que la primera ventana `Form1` hija. Recordemos que una clase es una colección de campos y métodos (funciones y procedimientos) que trabajan juntos para llevar a cabo una tarea específica [4]. Por lo consiguiente todas las ventanas hijas se llaman `Form1` y que para poder diferenciarlas una de otra basta con tomar su número asignado por el programa Delphi según se creación y uso o bien por el nombre de la imagen que se almacena en una variable local `Nombre` y que la contienen todas las demás instancias `Form1`. Un poco más adelante explicaremos las principales funciones que tienen las ventanas hijas en este programa, que permiten interactuar con todos los formularios que las soliciten incluyendo el principal.

Otra herramienta, de la cual nos ayudamos mucho, fue con los Diagramas de Flujo de Datos o DFD, los cuales nos ayudan ver el camino secuencial que llevan los datos o como una imagen ha de ser procesada, desde su inicio hasta el final cuando se visualizan los resultados. Los DFD siguen una notación en las figuras. Una elipse marca un principio y un final, un rombo una decisión, un rectángulo un proceso y las líneas con flechas para el seguimiento del flujo de los datos.

Por consiguiente, con todo lo anterior y como se vio en la Fig. 4.1 la forma de abrir una imagen cualquiera que cumpla el formato JPG, BMP y TIFF es muy sencillo. Para poder entender mejor esto, veamos la Fig. 4.2, en la cual el DFD visualiza los pasos internos que sigue una imagen al visualizarse por primera vez en el programa.

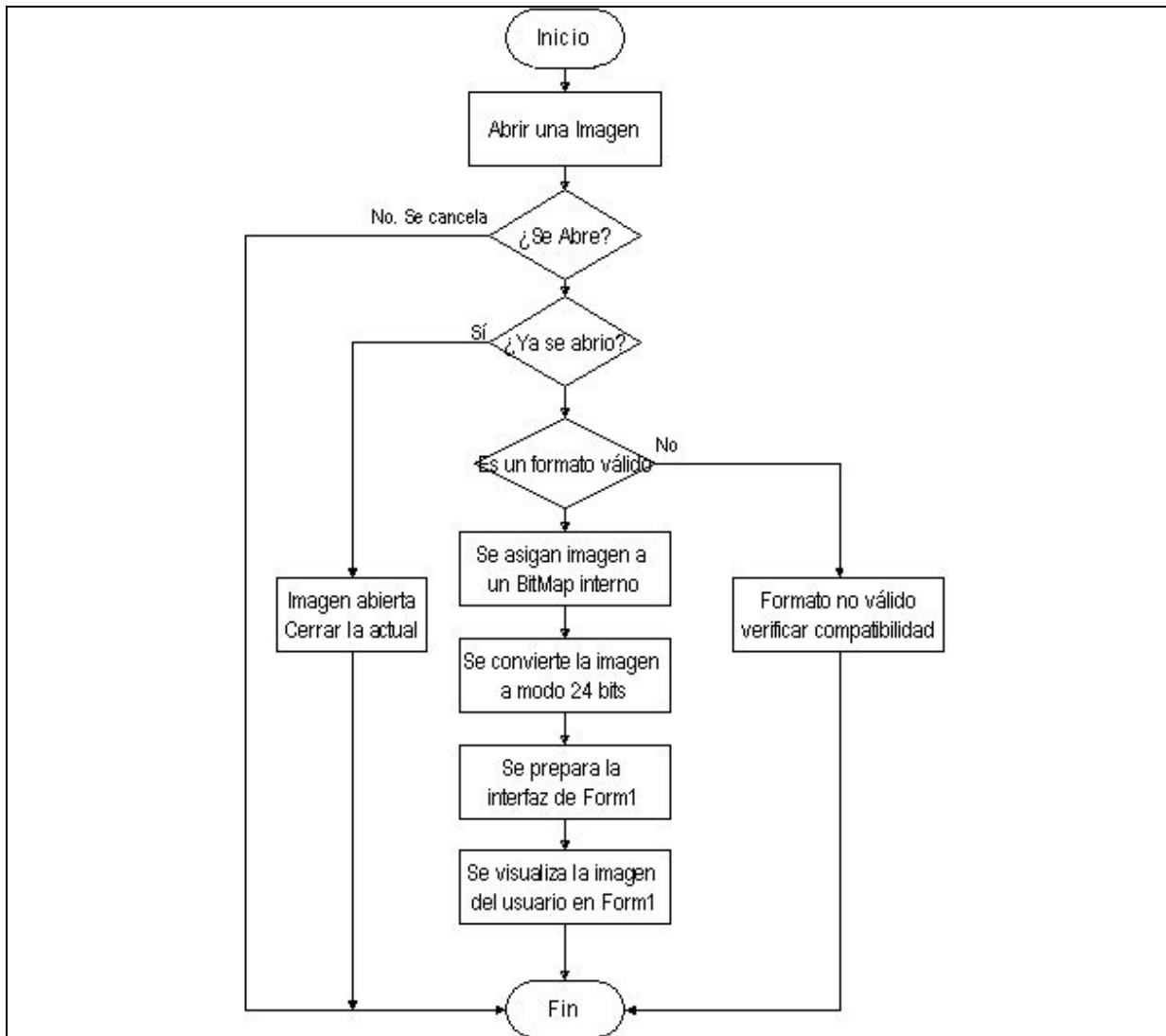


Fig. 4.2. Diagrama de Flujo de Datos para poder Abrir una imagen

En Delphi 5, ya se manejan formularios de sistema así como cuadros de diálogos predefinidos, tales como al abrir cualquier archivo en cualquier programa, aparece un cuadro de diálogo donde se puede escoger el archivo mediante Aceptar o Cancelar; también cuando en una aplicación podemos cambiar de color algo, aparece un cuadro de diálogo con colores que podemos cambiar y mezclar y luego Aceptar o Cancelar, etc.

Por ello en la Fig. 4.2 vemos un proceso Abrir una Imagen, el cual es el cuadro de dialogo que se muestra al usuario, éste solo escogerá una imagen que se podrá visualizar y luego con un clic aceptará la imagen para abrirla o bien solo cerrará el cuadro de diálogo con cancelar. Además se verifica también que la imagen no esté abierta en el programa, esto con el fin de evitar conflictos de nombres. Después de verificar que no esté abierta en el programa, la imagen pasa a un proceso de validación, de que sea un formato válido, es decir, sea una imagen BMP, TIF y JPG. Si después de lo anterior se cumple de manera correcta, la imagen se pasa a un mapa de bits para poder manejarlo de manera interna en el programa SAGEFH y se facilite su proceso, ya que Delphi permite manejar de forma fácil los Mapas de Bits o BitMap, además que el Scanline maneja ma-

pas de bits y por ello también se convierte a un formato de 24 bits. Acto seguido se prepara la forma donde se visualizará la imagen y después de visualizada en el programa.

Ahora bien otro parte del programa es cuando se guarda una imagen, también en formato JPG, TIF o BMP. Para solo guardar una imagen que se abrió, basta con solo revisar la extensión del nombre de la imagen y escoger el proceso de formato adecuado para esa extensión y listo. Para guardar una imagen con otro nombre o una creada dentro del programa SAGEFH se utilizará la opción Guardar como; su DFD se presenta en la Fig. 4.3

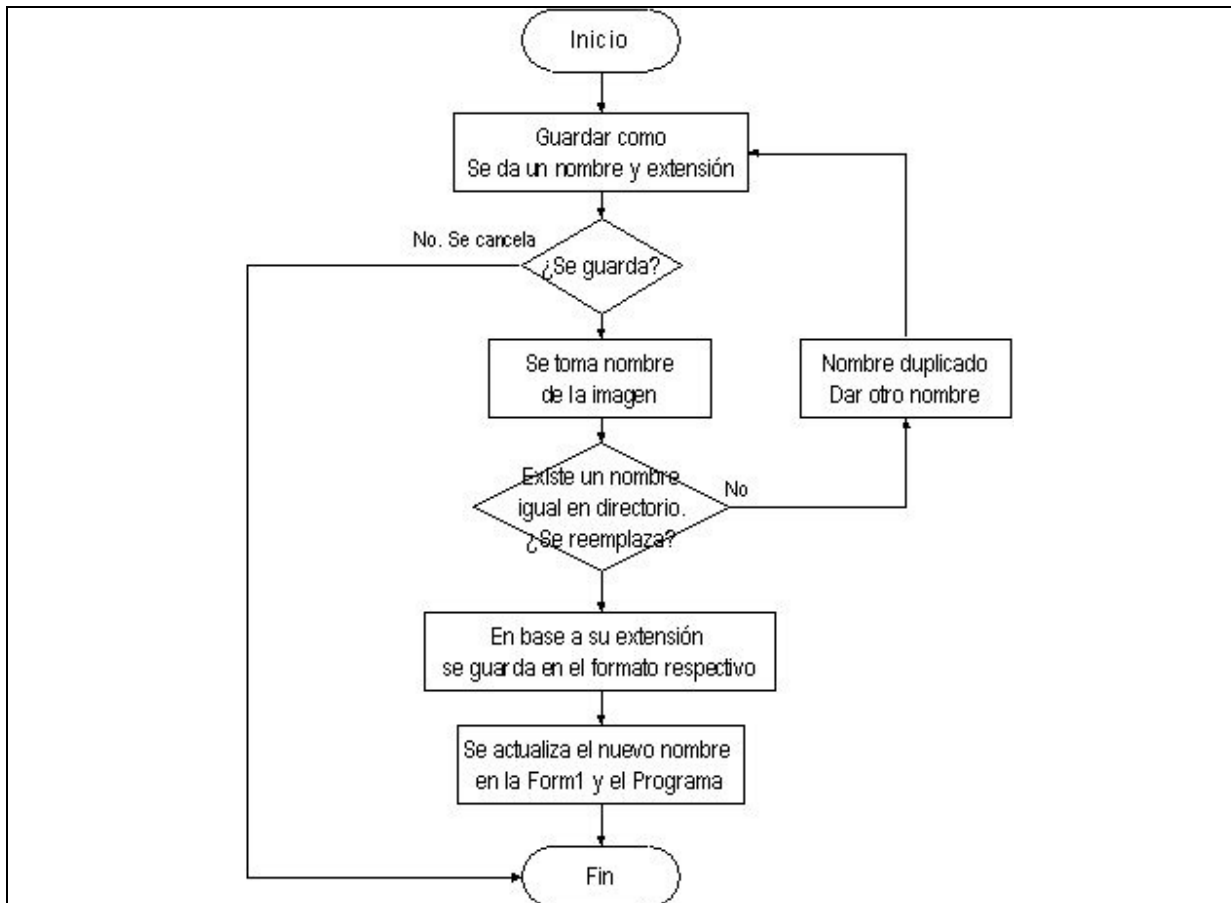


Fig. 4.3. Diagrama de Flujo de Datos para Guardar una imagen dando un nombre.

Nótese que en el proceso Guardar como, se utiliza nuevamente un cuadro de diálogo de Delphi, en el cual, el usuario escribirá un nombre para la imagen y opcionalmente escribirá una extensión o bien la seleccionará de una opción, pudiendo escoger entre JPG, BMP o TIF. Se verifica además que no exista un nombre duplicado en el directorio de trabajo actual para evitar pérdidas de datos de otros archivos.

4.1.2.1 La clase TForm1

Ahora hablaremos de una de las partes principales del programa y que por así decirlo, engloba a las funciones principales para poder procesar una imagen, además de que se comunica con casi todas las formas y cuadros de diálogo de nuestro programa de tesis.

La clase TForm1 deriva de la clase TForm, ya que este es un formulario común de Delphi, mas sin embargo TForm1 ya no es un formulario simple, consta de varias funciones, procedimientos así como de objetos para poder visualizar, seleccionar, procesar y mostrar resultados de las imágenes. Aquí solo explicaremos las funciones y procedimientos más importantes.

Para empezar hablaremos de la visualización de imágenes que ya se manifestó en la Fig. 4.2. En TForm1 podemos encontrar tres objetos contenedores de mapas de bits derivadas de la clase TImage llamadas, primero ImageForm1 la cual contiene el mapa de bits de la imagen en la que se esta trabajando, segundo ImageEspejo el cual contiene un mapa de bits transparente donde se puede dibujar un cuadrado o un círculo o una figura libre para poder seleccionar una porción de la imagen de trabajo, esto se hace para no pintar directamente sobre la propia imagen y perder información de la misma y por último se tiene el ImagePaste la cual contendrá imágenes que se pegan o adicionan a la imagen actual de trabajo.

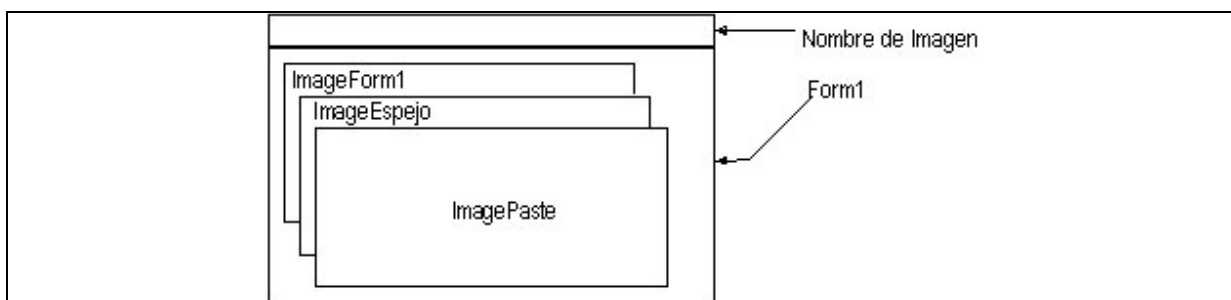


Fig. 4.4 Visualización de la imagen en Form1.

Aquí mencionamos que al cargar una imagen, esta se coloca en forma de mapa de bits en ImageForm1 y automáticamente esta se redimensiona al tamaño real de la imagen, lo mismo ocurre con Form1 e ImageEspejo, se redimensionan al tamaño de la imagen cargada. En ImagePaste esta solo será visible cuando se cargue una imagen en ella y esto solo ocurrirá cuando se pegue una imagen o pedazo de una imagen y se ocultará cuando se acepte o cancele el pegado de la imagen. Si se llega a aceptar la imagen, esta por medio de varios pasos se fundirá con la imagen cargada en ImageForm1 y se visualizara automáticamente el resultado. La ImageEspejo tiene un mapa de bits transparente lo que permite ver la ImageForm1, que como se dijo permitirá seleccionar cualquier parte de la imagen.

La mayoría de los procesos que se le hacen a la imagen para poder analizar sus características requieren de una selección parcial o total de la misma y todas ellas se realizaron sobre ImageEspejo. Es por ello que los métodos de selección Cuadrada, Circular, Libre con líneas y Libre Total requirieron planearse bien y mas aun dada la exactitud que el investigador requiere en los resultados, y que la mayoría de los procesos de nuestro programa requerirán de estos métodos, se explicara a continuación la metodología implantada en SAGEFH para poder cumplir este requisito.

Cabe hacer aquí mención que internamente en nuestro programa manejaremos otro mapa de bits del mismo tamaño que la imagen actual o que se esta viendo en nuestro programa, este mapa nos permitirá decidir que parte de la imagen esta seleccionada y cual no, y qué parte será procesada y cual no; ya sea que haya alguna selección o no. Este mapa de bits será sencillo y tan solo con un valor definido dirá que píxel será procesado en la imagen y con otro valor definido nos dirá que píxel no será procesado. Este mapa de bits será colocado en una matriz para poder procesarla rápidamente, que llamamos MatSel., donde el valor 1 o color blanco serán píxeles a ser procesados y el valor 0 o color azul serán píxeles no procesados, según donde se requieran.

MatSel será usada en todo el programa y procesos que requieran hacer uso de la imagen y se auxiliará de ciertos valores como coordenada x e y de inicio de selección y coordenada x e y final de la selección, es decir, la esquina superior izquierda y la esquina inferior derecha. Esto para no recorrer toda la imagen y hacer lento y tardado el proceso en curso. MatSel siempre por default, con excepción en selecciones, serán todos sus puntos igual a 1, es decir, toda es válida para ser procesada.

4.1.2.2. Metodología de la Selección

El método para poder seleccionar una parte de la imagen es relativamente sencillo y que según la selección cuadrada, circular, libre con líneas o libre total, se verá reflejado en la matriz MatSel la cual tendrá los píxeles a procesar; pero para ello se tendrá que designar los valores de esos píxeles que si se procesarán; y que para ello se seguirá el método que a continuación se describe:

Para las selecciones Cuadrada y Circular se sigue así:

- 1.- Se da clic en Selección Cuadrada o Circular
- 2.- El usuario empieza a seleccionar y define el tamaño de la selección sobre la imagen, manteniendo presionado el botón izquierdo del mouse. Se toma nota de la coordenada de inicio de selección.
- 3.- Al final de seleccionar, el usuario suelta el botón de mouse.
- 4.- Automáticamente se toma nota de la coordenada donde se soltó el botón del mouse. Con ello se obtiene un cuadrado de trabajo definido con una coordenada inicial superior izquierda y una coordenada final inferior derecha.
- 5.- Se pinta la selección final en la imagen, un cuadrado o un círculo o elipse, según la selección; tomando en cuenta si hay zoom en la imagen, si hay un desplazamiento vertical u horizontal en la imagen.
- 6.- Se respaldan valores del cuadrado quitándole el zoom respectivo si es que lo hay, es decir se guardan coordenadas reales sobre la imagen.
- 7.- Se obtiene el tamaño de MatSel con base a la selección y el tamaño real de la imagen. MatSel será de la misma medida que el Cuadrado de trabajo.
- 8.- Se aplica el método Matriz-Selección la cual pintará en MatSel cuales píxeles si se tomarán en cuenta y cuales no, en cualquier proceso que tome la selección.

El Método Matriz-Selección lo explicaremos más adelante.

Para una selección Libre con líneas y Libre total la forma se sigue así:

- 1.- Se da clic en Selección Libre con Líneas o Libre Total.
- 2.- El usuario con un clic va seleccionando con líneas lo que desea, mientras en libre total, con un solo clic inicial se empieza la selección y moviendo el puntero del mouse se esta seleccionando y con otro clic se finaliza esa selección. Con Libre con Líneas el proceso final de selección termina uniendo la línea final con la línea inicial que delimita un polígono o contorno.
- 3.- A medida que se estuvo seleccionando y moviendo el cursor se van obteniendo y actualizando las coordenadas inicial superior izquierda y final inferior derecha de un cuadrado de trabajo que nos auxiliará en procesos más adelante. También se van guardando cuantos puntos o líneas se están dando en la selección.
- 4.- Para el caso de la Selección con líneas se define que para que haya una selección debe haber por lo menos con 3 líneas y para la selección libre total se definen 4 píxeles para poder tomar ya una selección. Aquí vemos que 4 píxeles da una selección muy pequeña, aunque el número de píxeles podrá variar un poco, según se requiera.
- 5.- El usuario cierra la selección uniendo el punto final con el punto inicial.

6.- Se pinta ya sobre ImageEspejo la forma de la selección con base a los puntos o líneas obtenidos en el paso 4.

7.- Se guardan los puntos del polígono obtenido con la selección con líneas o libre total quitándole el zoom respectivo si es que lo hay, es decir, se guardan coordenadas reales sobre la imagen.

8.- Se obtiene el tamaño de MatSel con base a la selección y el tamaño real de la imagen. MatSel será de la misma medida que el Cuadrado de trabajo.

9.- Se aplica el método Matriz-Selección la cual pintara en MatSel cuales píxeles si se tomarán en cuenta y cuales no, en cualquier proceso que tome la selección.

Ahora bien el método que sigue Matriz-Selección es de vital importancia para el programa y necesario, para que en verdad se tomen los píxeles internos de la selección realizada. Para poder explicarlo e ir entendiéndolo veamos la imagen 4.5.

En dicha imagen vemos del lado izquierdo una selección realizada a una célula cerebral, dicha selección es sacada del resto de la imagen y la cual podemos ver en la parte media.

De lado derecho y de donde partiremos para explicar la acción que realiza Matriz-Selección para definir que píxeles serán realmente procesados en la imagen, es decir, todos aquellos que se encuentren dentro de la selección, es decir, dentro de límite de color azul mostrado en la imagen.

Básicamente Matriz-Selección empieza un recorrido de izquierda a derecha, primero de arriba hacia abajo y luego de abajo hacia arriba sobre la parte seleccionada y que se encuentra confinada en un cuadrado de trabajo que se obtuvo mientras se seleccionaba. En otras palabras el recorrido de arriba hacia abajo, mostrado con la letra A de la Fig. 4.5, empezará desde la esquina superior izquierda del cuadrado de trabajo y el recorrido de abajo hacia arriba, mostrado con B en la Fig. 4.5, terminará en la esquina inferior derecha de dicho cuadrado.

Recordemos que todos estos recorridos y lo que se explique para Matriz-Selección se hace sobre la ImageEspejo, porque es en ella donde se pinta la selección; de hecho en la parte derecha de la imagen, donde se ven los recorridos, solo tomaremos en cuenta el contorno azul que es la selección que realiza el usuario, y que será nuestros toques en cada recorrido que se hace en la imagen seccionada. Como nota si se pintara sobre la imagen original, podría haber errores ya que el color del contorno azul se podría confundir con alguna característica propia de la imagen.



Fig. 4.5 Imagen donde se ven los principales pasos para poder tener una Matriz de selección.

Ahora bien ¿cómo funcionan estos recorridos? Empezaremos explicando el recorrido de A, donde se ven 5 flechas aunque claro serían más, ya que el recorrido se hace en todos los píxeles. Por tan solo decir, si el cuadrado de trabajo, denotado con color gris en la imagen de la derecha, tiene 400 píxeles de ancho, entonces se hacen 400 recorridos de arriba hacia abajo, píxel por píxel, en la imagen, teniendo como tope de recorrido el largo total de cuadrado o el azul del límite de selección, por ejemplo en la línea 1 el recorrido finaliza en el largo total del cuadrado y las líneas 2, 3, 4 y 5 terminan en el contorno azul de la selección.

En la Fig. 4.6 vemos un poco más ampliada la parte superior de la imagen de la derecha de la Fig. 4.5., ahí veremos a detalle los recorridos. Ahí vemos 11 líneas y entre ellas hay aún más líneas pero destacamos esas de los demás píxeles. Los píxeles entre las líneas 1 y 3 se validan para no ser procesadas, es decir, se ponen a 0 en MatSel; y el fin de su recorrido es hasta la selección. Al final de cada recorrido, en este caso, al final de cada línea, en una coordenada (x,y) se toman las coordenadas $(x-1,y-2)$ y $(x+1,y-2)$ y se verifican si son píxeles que se procesan o que ya fueron procesados en un recorrido previo.

Si son píxeles que se procesan se guardan las coordenadas en un arreglo, el punto de la izquierda en un arreglo y el de la derecha en otro, esto, porque no puede haber píxeles que se procesen arriba de un tope de selección porque estarían fuera de la selección. En la línea 3 se denota con rojo de lado derecho un punto que es un punto que es marcado como que si se procesara, pero esta fuera de la selección. La línea 4 ya no alcanza a marcar ese punto rojo porque se encuentra antes el límite de la selección. Del lado inferior izquierdo no se marca en rojo ya que fue procesada con la línea anterior.

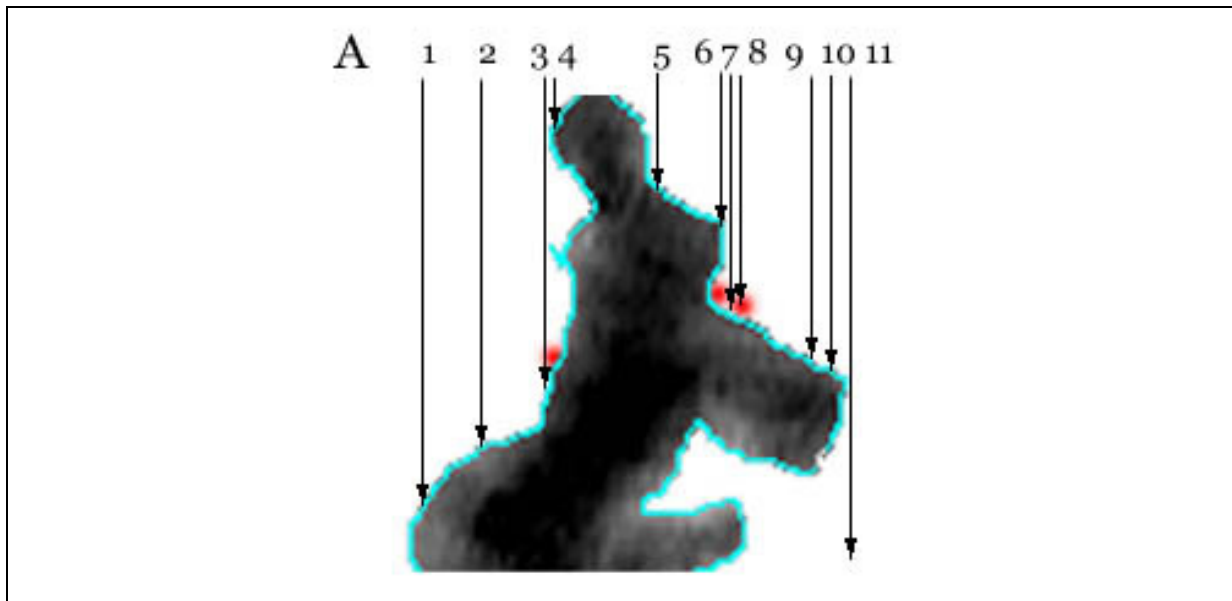


Fig. 4.6 Recorrido A para poder obtener la Matriz de Selección.

Lo mismo ocurrirá en la línea 7, ahí se marcan los puntos $(x-1, y-2)$ y $(x + 1, y-2)$. La línea 6 no procesa $(x-1, y-2)$ y por tanto hay un hueco, es decir píxeles que están marcados que si se procesaran, pero están fuera de la selección, por ello ese punto se guarda en un arreglo. El punto $(x + 1, y-2)$ también marcado con rojo, se guarda en un arreglo para los puntos derechos encontrados. Mas sin embargo la línea 8 pasa por el punto $(x + 1, y-2)$ y ya lo marca como 0, que no se procesará, entonces ese punto se quita del arreglo.

Así sucesivamente se van probando píxel por píxel o línea por línea de cada recorrido que se hace a lo ancho de la selección, de arriba hacia abajo.

El recorrido B de la Fig. 4.5 trabaja de forma similar, pero en lugar de tomar coordenadas $(x-1, y-2)$ y $(x + 1, y-2)$, se tomarán ahora las coordenadas $(x-1, y+2)$ y $(x + 1, y + 2)$ las cuales seguirán los mismos procesos antes descritos; con el recorrido de abajo hacia arriba en todo el ancho de la selección.

También se hacen recorridos a lo largo de la selección, de derecha a izquierda y de izquierda a derecha, es decir, C y D respectivamente para cubrir los últimos huecos. La coordenada que se busca donde quedan huecos para C, son $(x-2, y-1)$ y $(x-2, y+1)$ y para D son $(x+2, y-1)$ y $(x+2, y+1)$.

Con todo esto se tiene una lista de huecos o píxeles marcados como que si se procesarán pero que están fuera de la selección, puntos que fueron obtenidos en cada recorrido A, B, C y D, estos huecos ya son pequeños gracias a los 4 recorridos y que serán eliminados bajo un procedimiento sencillo que utiliza recursividad. [5]

Dicho procedimiento lo que hace es tomar un punto dentro de un hueco y que ya están dados por la lista de píxeles guardados en los arreglos anteriormente descritos y empieza marcarlos con 0 para no ser procesados; tiene como entrada el punto o píxel (x,y) dado por los arreglos y un color de relleno o patrón de marcado para no ser procesado en este caso 0, con ello se entra al procedimiento y se verifica que el punto a analizar sea diferente del límite de la selección y sea diferente a la marca de píxel que no se procesa y si cumple se marca precisamente como píxel que no se

procesará, acto seguido se vuelve a llamar al mismo procedimiento teniendo como entrada ahora el píxel $(x+1,y)$ y el mismo color de relleno. Con ello hará recursivamente y verificara todos los píxeles a la derecha. Después se vuelve a llamar así mismo el procedimiento, pero de entrada el píxel $(x-1, y)$ con ello se verifican ahora los píxeles a la izquierda; después se llaman nuevamente el mismo procedimiento con el píxel de entrada $(x, y+1)$ en otras palabras se verifican los píxeles de arriba y por el ultimo se vuelve a llamar con el píxel $(x, y-1)$ que verifica los píxeles hacia abajo. Con todo esto vemos que se esta haciendo el relleno de huecos de manera recursiva.

Cabe aquí aclarar que este procedimiento es sencillo y rellena cualquier área dentro de un contorno definido y que eso serían precisamente los huecos que faltarían por indicar que no se procesarán. Pero el lector se puede preguntar porque no usar este sencillo algoritmo para realizar una selección al fin y al cabo, el límite de selección es un área encerrada. Pues bien no se hace, porque el sistema Sagefh usa imágenes demasiado grandes; y hacer un procedimiento recursivo agotaría rápidamente la memoria del equipo, dando resultados erróneos. Por ello este procedimiento es un auxiliar del procedimiento general de selección, el cual ya nos ha dejado pequeños huecos que son rellenados fácilmente con el procedimiento recursivo.

La recursividad es una herramienta poderosa y rápida en la programación, por que todas las operaciones se realizan en memoria; sin embargo, tiene precisamente esa desventaja que cuando se acumulan muchos procesos se terminan los recursos de memoria del sistema haciendo inestable el equipo o incluso bloquearlo. En nuestro sistema se han hecho diversas pruebas valorando la calidad de resultados de la recursividad del procedimiento antes explicado, logrando siempre tener respuestas satisfactorias.

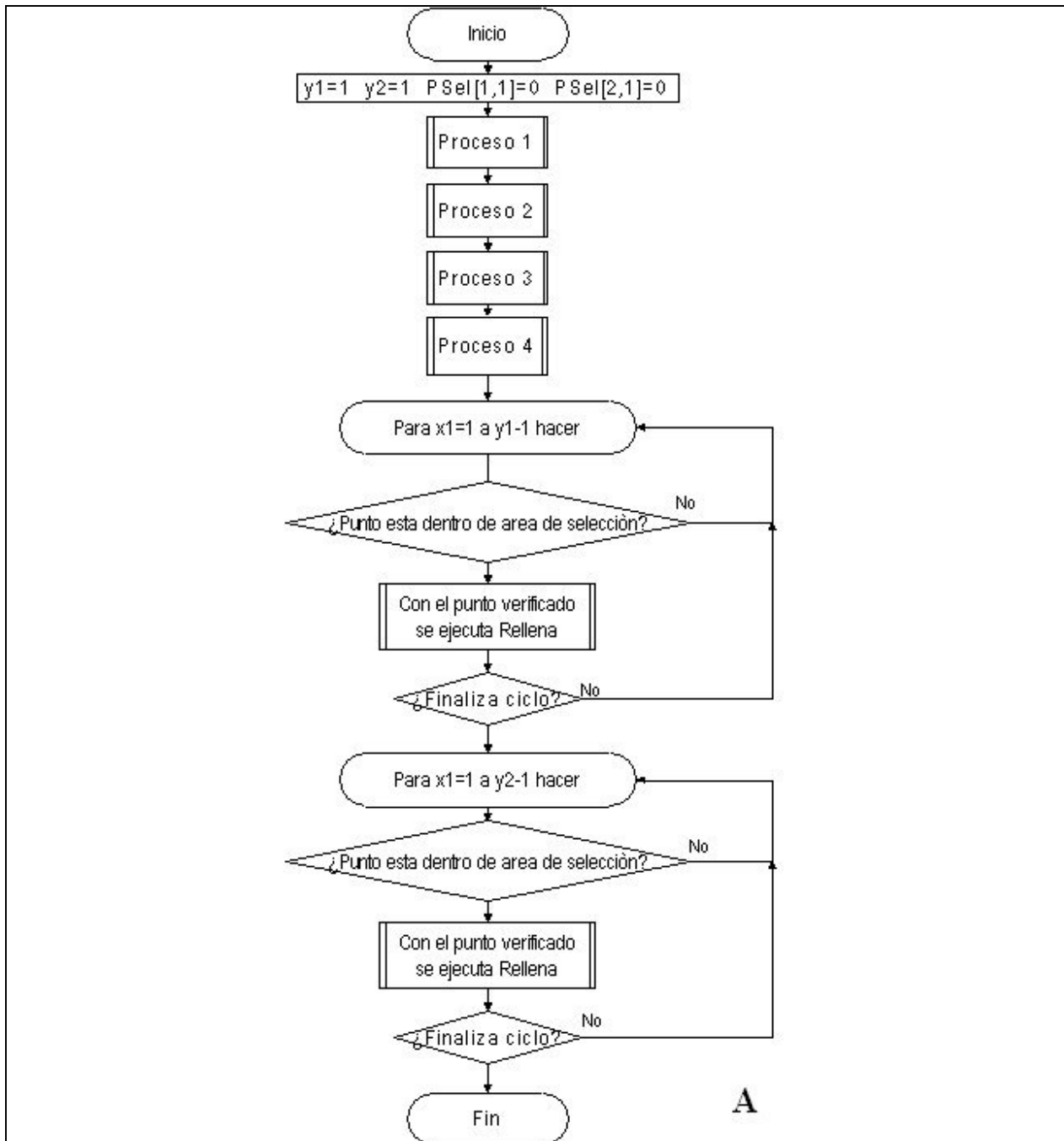
Al final con todos estos procedimientos quedara una matriz de puntos determinando que píxeles si se procesaran y cuales no, esta matriz es la misma MatSel y que será usada a lo largo de nuestro programa, ya que como se mencionó, la mayoría de las operaciones se basa en selecciones realizadas por el usuario.

MatSel es una sola matriz general y que se usará en el programa principal para todas las ventanas Form1, y que se actualizará automáticamente en cada selección o deselección que realice el usuario sobre una imagen. De hecho la primera vez que se abre, crea una imagen o se deselecciona algo, MatSel se adapta a esa Form1 y toma todo el ancho y alto de la misma imagen y marcando todos los puntos como que si se procesarán, lo que llamaríamos MatSel por default.

En la Fig. 4.7-A podemos ver el Diagrama de Flujo Principal de cómo funciona el método de selección antes explicado. Obsérvese que en el diagrama existen 4 procesos y que corresponden a los 4 recorridos, A, B, C y D que determinan los huecos que faltan por rellenar para que no se toquen durante un proceso en la imagen. El resto del diagrama representa el momento cuando son rellenados dichos huecos, tomando los puntos almacenados en los dos arreglos y que se obtuvieron durante los 4 procesos.

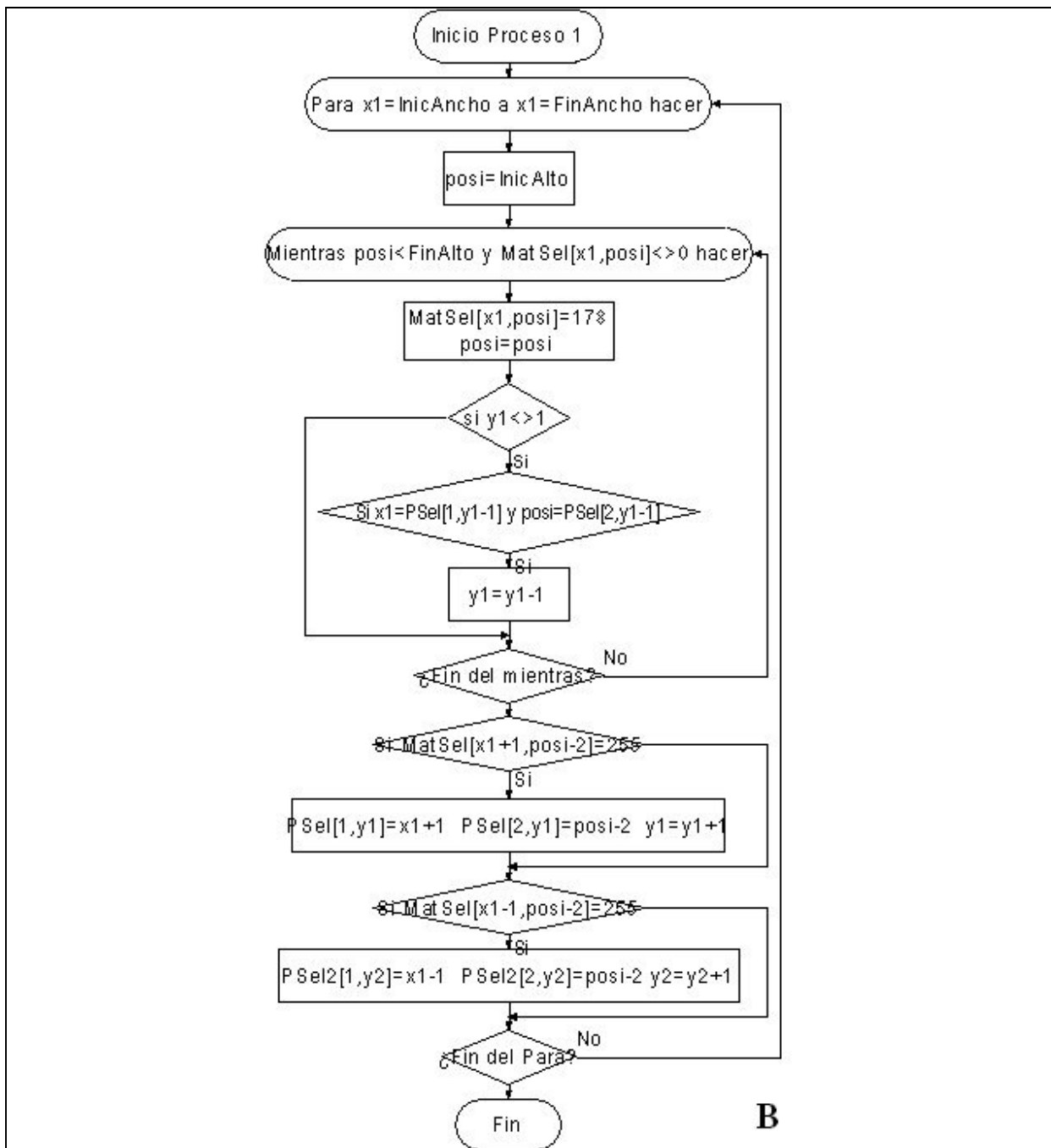
Además en la Fig. 4.7-B observamos el diagrama de flujo de alguno de los 4 procesos que van conformando MatSel, en este caso el desarrollo del Proceso 1 el cual hace el recorrido A de la Fig. 4.5, es decir, se recorre la imagen de arriba hacia abajo empezando de la izquierda hacia la derecha, marcando los píxeles que no se procesarán durante una selección que realice el usuario, para ello con base a la imagen original se marca en MatSel con un valor práctico de 128 o como se viene manejando 0 y los que si se procesarán son marcados con un valor práctico de 255 que es un valor default que tiene la matriz o como se viene manejando 1. Aún que esto último no es necesario porque la matriz siempre tiene valores de 255 cuando se abre la imagen o se deselecciona algo en ella.

En la parte final de 4.7-B donde termina el ciclo Mientras viene una condición $\text{MatSel}[x1+1, \text{posi}-2]=255$ el cual busca un hueco en la parte derecha del píxel que se esta procesando y para ello determina si esta marcado o no; si no esta marcado es decir tiene un valor 1 ó 255 este hueco se almacena en el arreglo de los huecos a la derecha y que se verificara en el siguiente recorrido de arriba hacia abajo. Después viene otra condición $\text{MatSel}[x1-1, \text{posi}-2]=255$ que verifica si hay un hueco a la izquierda del píxel que se esta trabajando, si lo hay se guarda en un arreglo, y es un hueco seguro ya que el recorrido anterior no lo detecto. Este hueco al final será procesado por el proceso Rellena tal como lo podemos observar en la parte final de la Fig. 4.7-A.



A

Fig. 4.7-A Diagrama de Flujo general del proceso que hace cualquier selección que realice el usuario sobre una imagen.



4.7-B Diagrama de Flujo del Proceso 1 que ocupa en la figura A y que a su vez sería el recorrido A de la Fig. 4.5

Ahora bien el método de Rellena lo explicaremos con pseudocódigo que es una explicación en palabras de un DFD; donde Rellena utiliza la recursividad.

Proceso Rellena [5].

1.- Inicio

2.- Se dan como valores de entrada la coordenada (x,y) y valor de relleno que aquí es el 128

3.- Se verifica en MatSel si el punto dado no ha sido marcado ya. Si no esta marcado ir al inciso 4, si ya esta marcado ir al inciso 9.

4.- Se marcara ese punto en MatSel

5.- Se vuelve a llamar a Rellena pero con el punto (x+1,y) y 128 de relleno como valores de entrada.

6.- Se llama a Rellena con el punto (x-1, y) y 128 como valores de entrada.

7.- Se llama a Rellena con el punto (x, y+1) y 128 como valores de entrada.

8.- Se llama a Rellena con el punto (x, y-1) y 128 como valores de entrada.

9.- Marcados o no marcados los puntos según corresponda, se finaliza proceso Rellena.

Con este proceso se completan los pasos para realizar una selección exitosa y todo este código se encuentra de forma esencial en cada Form1 que será necesario para mostrar cada imagen que se utilice.

4.1.2.3. Herencia de la selección

Una de las características únicas que tiene este programa es la herencia de la selección entre las imágenes después de aplicar un proceso a dicha selección, tal y como se explicó en el capítulo anterior. Veamos la siguiente figura.

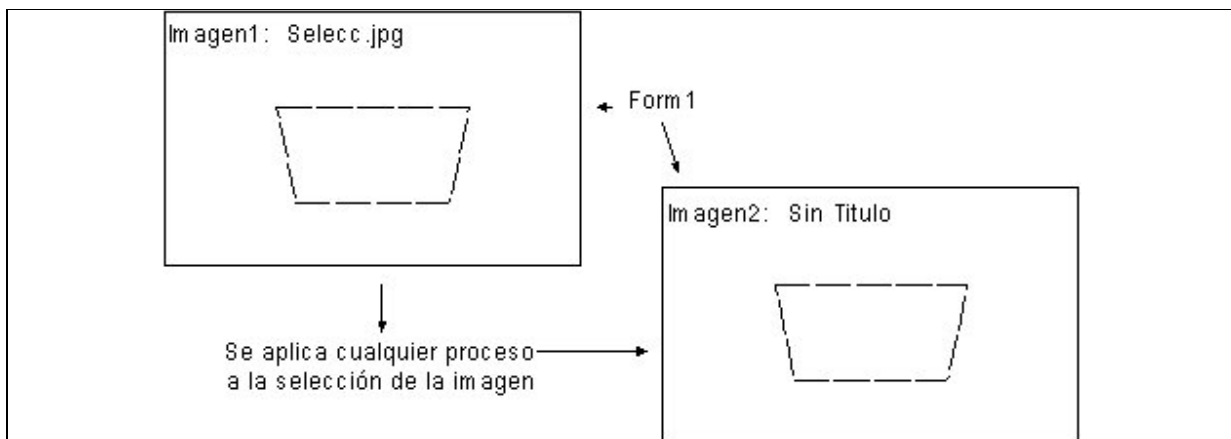


Fig. 4.8 La Herencia de la selección entre imágenes.

En la Fig. 4.8 vemos una imagen origen que se llama selecc.jpg y a la cual el usuario hizo una selección y que se ve en la figura punteada. Ahora bien el usuario aplica un proceso que cambia la forma de la imagen, es decir, le aplica un filtro gráfico para poder ver algo, el resultado se verá en otra Imagen o TForm1 (una característica más de este programa), pero la imagen resultante también mostrará la selección que tenía la imagen origen, y que vemos en la imagen Sin Título. Esto se hace con el fin de que el investigador pueda comparar sus datos o efectos del filtro aplicado en la imagen para poder realizar sus estudios con mayor facilidad, sin necesidad de perder la imagen origen. O también se hace con el fin de que el investigador realice una selección y aplique varios filtros, pudiendo comparar el avance de esos filtros en una imagen diferente, sin ir perdiendo la secuencia que lleva y sobre todo sin perder la selección hecha en la imagen origen, la cual se mantendrá hasta la última imagen resultante siempre y cuando el usuario no deseleccione en alguna de las imágenes de la secuencia.

Cabe hacer mención que hay procesos donde no se crea una TForm1 diferente para visualizar el resultado, ya que hay Formas definidas explícitamente para mostrar esos resultados tal como ocurre en la Calibración de la Curva, el Histograma o la Edición de Valores por Punto o por Región que toman valores directamente de la imagen, pero sus resultados se muestran en otros formularios.

En fin las TForm1, contenedoras de las imágenes de nuestro programa, tienen una gran importancia, aparte de lo anterior, son un medio para obtener diferentes datos de la imagen y que son pasados a otros procesos por medio de procedimientos y funciones que están dentro de la TForm1, por tan solo decir otros datos que dan, son los que se visualizarán en el programa principal en la parte inferior, donde nos mostrará la ubicación del píxel actual donde se encuentre el cursor y sus colores descompuestos, los valores RGB (Red, Green y Blue), así como su nombre.

4.1.2.4. La Calibración de la Curva

Ahora pasaremos a otra parte importante de nuestro trabajo de tesis, que es la Forma denominada Calibración de la Curva.

Como se mencionó desde el principio, este tema de tesis fue desarrollado para simplificar el proceso de investigación en el área de Histología y Fisiología, donde muchos de los cálculos se tienen que realizar paso a paso y manualmente y no de manera automática como debería aprovecharse para tener datos mucho más exactos. También se mencionó que se manejaran fotografías tomadas a cortes de tejido cerebral a una amplificación utilizando un microscopio, que muchos de esos tejidos fueron diluidos con elementos químicos o bien les fueron aplicados isótopos radioactivos para poder ver ciertas células y sus procesos biológicos para lograr con ello ciertos resultados que al investigador le interesan. Como por decir, el avance en el conocimiento de factores relacionados con enfermedades como la esquizofrenia en los humanos. Es en esta parte de la Calibración de la Curva, donde se crea una automatización en la obtención de los datos con base a la autoradiografía tomada al tejido en estudio y que por primera vez se realiza ya que no existe ningún programa que lo haga, mas aún que tenga una flexibilidad de insertar otros datos que puedan surgir más adelante en la aplicación de otros elementos radioactivos. Como se mencionó en el capítulo 1, en el Instituto de Fisiología de la BUAP se manejan los isótopos radioactivos Tritium, Fósforo 32, Fósforo 33 y Yodo 125. Estos isótopos tienen diferentes resultados en los tejidos a partir de su tiempo de aplicación y que según variará como se vaya descomponiendo el tejido, e incluso el mismo isótopo puede ocasionar una propia descomposición en el tejido, esto se podrá reducir en una buena parte disolviendo elementos químicos como etanol, metanol, tolueno, pentano, acetato etílico o agua con el isótopo y el tejido orgánico o bien ponerlos en congelación.

Aquí se analizaron varios detalles fotográficos, que se nos pidió incluir en el tema de tesis a través de una forma para incluir esos datos en el análisis de la imagen o película autoradiográfica. Dichos datos son los siguientes:

- a).- Isótopo radioactivo usado en los procesos experimentales, que pueden ser los que ya se especificaron o bien otros elementos ya que el programa se dejara abierto para insertar otros datos no contemplados como el isótopo Carbono 14. El isótopo aplicado en los tejidos deberá estar libre de impurezas del 90 al 98%.
- b).- Tiempo de decaimiento a la exposición, datos que pueden ser meses, días y horas según corresponda al isótopo aplicado. Dicho tiempo es la pérdida de masa atómica del elemento radioactivo y que varia según si el isótopo emite partículas radioactivas alfa, beta o gamma, el como fue almacenado, de su sensibilidad radioactiva con otros elementos y la temperatura. Se de-

berá tener cuidado con el tiempo especificado ya que este menciona como se encuentra el isótopo y que tan eficiente puede ser usado en los tejidos.

c).- Factor de decaimiento de la radioactividad en su estándar. Es la constante de pérdida de masa o desintegración del isótopo y es calculado en proporción al tiempo de decaimiento. Estos valores son dados por Amersham. [11 y Anexo C]

d).- Escala de actividad. Esta puede ser alta o baja y según ello tomará solo 9 valores estándares.

Actividad Especifica Alta	Actividad Especifica Baja
0	0
1.3	0.11
2.1	0.26
3.3	0.53
5.3	0.98
8.3	1.88
13.1	4.75
21.2	7.80
32.4	15.86

e).- Actividad específica de su ligando radioactivo. El cual es el número de desintegraciones o pérdida de masa del isótopo en una unidad de tiempo.

f).- Datos a graficar, serie X que será dado por tonos de grises que se obtendrán por puntos (píxeles) o regiones de la imagen que el usuario especifique y una serie Y que será la contraparte a graficar y que es obtenido por medio de una serie de operaciones con los datos dados en los incisos del a) al e) o bien el usuario los puede dar de forma directa. Cuando es por operaciones los datos Y se obtienen de la siguiente forma:

$$Y_i := (\text{Esc. Activ.}_i) (\text{Fact. Decaimiento}) \frac{1000}{\text{Activ. Espec.}}$$

donde $i:=1..9$ porque solo hay nueve 9 valores en la escala de actividad alta o baja.

Los datos de X también pueden ser obtenidos a través de una placa donde se muestran los 9 grises estándares del elemento en su escala de actividad ya sea alta o baja, según el tiempo de vida del isótopo; la placa tiene un gran costo en el mercado. Fig. 4.9. Cuando se buscan los datos X por región también se irán obteniendo a su vez el Error Estándar del Promedio o SEM por sus siglas en inglés que es Standard Error of the Mean, por cada dato X.

$$\text{SEM} := \frac{\text{SD}}{\text{Sqrt}(N)}$$

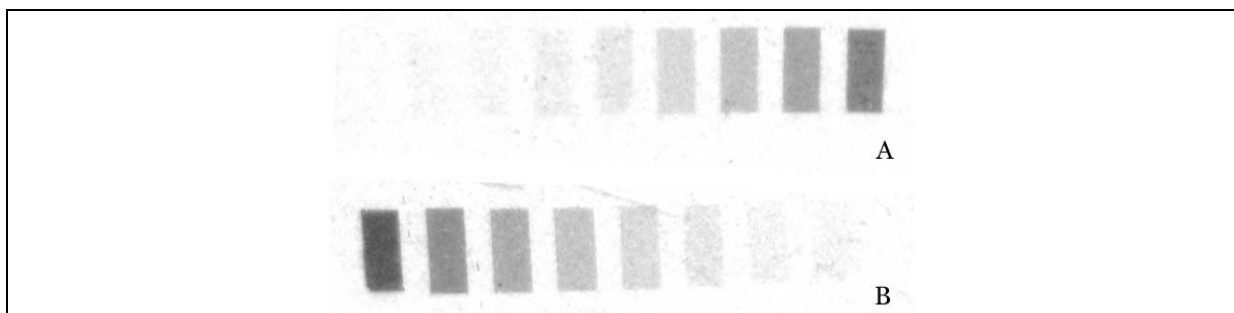


Fig. 4.9 Imagen que muestra los niveles de grises estándares y usada para graficar los valores que muestra el isótopo en la auto radiografía según la escala de actividad del mismo. Se muestran 9 niveles de grises en la escala de actividad alta (A) y 9 en la baja (B).

g).- Ahora bien los datos X y Y se graficarán para ver que tipo de curva experimental muestran. Y se graficará a su vez una curva lo más aproximada a ella que es la real y para ello se disponen de las siguientes funciones: Función lineal, exponencial, logarítmica, función de 2do, 3er y 4to grado, con ello para descubrir una función ideal la mejor aproximada a los datos X y Y, y para corroborarlo se establece un área para descubrir el error estándar de cada punto real graficado en contraparte de la función aproximada real propuesta, es decir su exactitud real con la experimental.

Todos estos datos son de vital importancia para el investigador y que involucran mucho el estado de los tejidos y de la imagen tomada a la misma.

Cabe hacer mención que según dado los incisos a) y b) se obtendrá un factor de decaimiento c) y que este valor será obtenido de forma automática ya que existen tablas dadas por Amersham y dichos resultados fueron obtenidos en laboratorio al analizar la actividad de los isótopos radioactivos en los elementos biológicos. [ANEXO C].

Con todo lo anterior se busca determinar la cantidad de alguna proteína estructural o funcional de las células o tejido a través de la emulsión radioactiva proyectada en la autoradiografía. Adicionalmente, podemos utilizar el programa para el estudio de proteínas estructurales y funcionales como podrían ser receptores de membrana, por medio de otras técnicas como podría ser western blot o bien para el estudio del DNA o RNA que se realiza por medio de la hibridización insitu.

4.1.2.5 Los Histogramas

Ahora hablaremos de otra parte esencial en el diseño del Sistema Sagefh que son los Histogramas. Un histograma es un gráfico donde se nos representa las cantidades de color que hay en una imagen, es decir, es la frecuencia con la que se presenta un nivel de color o gris de un píxel en una imagen. En nuestro proyecto utilizaremos 3 tipos de histogramas: El Absoluto, Real o Normal y el Logarítmico. Los 3 histogramas representan lo mismo simplemente cambia el factor de normalización para que los datos a graficar se ajusten a la imagen donde se visualizan.

Para comprender esto veamos el algoritmo necesario para desarrollar un histograma. Se graficarán los valores de color R, G, B y de gris (o intensidad de grises que es $(R+G+B)/3$) de una imagen cual sea en sus 255 niveles posibles en el histograma. Recordemos que en los grises por decir, se pueden representar 255 niveles o grises diferentes ya que se están manejando imágenes de 24 bits, es decir, para representar un solo píxel se utilizan 8 bits en cada canal de color.

Pasos para la obtención de un Histograma.

- 1.- Se prepara la imagen donde se realizará el histograma (imagen-histo) de la cual se obtiene su Alto y su Ancho. Se abre además la imagen origen.
- 2.- Se obtiene la población de cada color R, G, B y grises, es decir, se recorrerá toda la imagen origen sumando por separado cada color, teniendo al final la suma total de rojos, verdes, azules y grises en sus diferentes niveles.
- 3.- Se cuentan cuantos píxeles hay en cada nivel de cada color y se almacenan en un arreglo.
- 4.- Del arreglo obtenido se recorren los 255 niveles y se obtiene el valor máximo alcanzado. Así se hace en cada color y después se obtiene el máximo de los 4 valores obtenidos.
- 5.- Se obtiene el factor de normalización de la graficación de los diferentes niveles de los colores. Este se obtiene dividiendo la altitud de la imagen donde se colocará el histograma sobre el máximo de los valores obtenidos en el punto anterior. Esto se hace ya que se graficarán los valores de cada nivel de cada color. Ahora bien si por ejemplo existe en el nivel 45 de rojo un valor de

45000 píxeles con ese valor y si tenemos una imagen donde realizaremos el histograma una altura de 30000, al graficarlo este se saldrá del área de la imagen, es por ello que se busca un factor de normalización para que todos los datos graficados queden dentro del área de graficación.

6.- Ahora por cada color, se crea un ciclo y dentro de el se normaliza cada valor del arreglo del punto 3 y se grafica por lo cual se graficarán 255 valores por cada color. Se graficarán los rojos, los verdes, los azules y los grises de forma respectiva.

Es así como se obtiene un histograma para una imagen cual sea. Pero ¿cuál es la diferencia entre los 3 tipos de histograma? La respuesta es la obtención del factor de normalización de los niveles de los colores. Para el histograma normal el factor se obtiene al dividir la altura de la imagen-histo sobre el valor máximo de los diferentes niveles de los colores. En el absoluto se tienen 4 factores de normalización, uno por cada color, donde cada uno se obtiene dividiendo la altura de la imagen-histo sobre el valor máximo de los niveles de ese color. Y el logarítmico se obtiene de forma similar al absoluto solo que al momento de obtener el factor de normalización en cada color se le saca logaritmo al máximo del color, es decir, el factor se obtiene dividiendo la altura de la imagen-histo sobre el logaritmo del valor máximo del color y además también se saca logaritmo al valor de cada nivel de color al momento de graficarse esto para que no se afecte el resultado final en la visualización en el histograma. Este último se hace ya que en ocasiones el histograma absoluto muestra valores graficados muy pequeños cuando existen en la mayoría de niveles valores pequeños y en unos cuantos valores muy grandes impidiendo ver con claridad el resto de los valores, mientras que el logarítmico los resalta.

De lo anterior, el histograma es una herramienta muy poderosa en el estudio de imágenes digitales ya que nos da un muestreo de cómo se encuentran las intensidades de color de la imagen, para nuestro caso se usara mas en imágenes en grises donde nos interesa ver la distribución de los diferentes niveles de grises en las células de la auto radiografía en estudio.

En nuestro sistema el histograma mostrará valores graficados de toda la imagen o bien mostrará valores de una sola región donde el usuario previamente ha seleccionado una región en la imagen en estudio, lo que nos da una mayor exactitud en el estudio sin involucrar el resto de la imagen. Además se mostrará el promedio de los valores de grises de la región seleccionada y el error estándar de promedio o SEM que ya se explico anteriormente. También se mostrarán datos como la cantidad de píxeles que tienen ese nivel de color, cantidad de píxeles de la imagen y su desviación estándar.

En ocasiones el valor del promedio del valor de los grises, por decir, que fuera 176, se busca en el eje X de la Calibración de la Curva para ver la tendencia de ese dato en la graficación de los datos originales y de la curva aproximada, ya que cada una tiene una y diferente.

4.1.2.6 Edición de valores por punto y por región

Otra parte que se pidió de nuestro programa, fue obtener datos de forma directa con los píxeles de la imagen, tal es el caso de obtener valores de la misma, ya sea por píxeles o por una región determinada de ellos, inclusive se relacionó con la calibración de la curva que tendrá que hacerse previamente.

Pero para entender esto vayamos por partes, se le llamará edición de valores por que el usuario podrá obtener dichos valores directamente de la imagen y podrá modificarlos y adicionar algunos comentarios, inclusive tendrá la capacidad de guardarlos para futuras revisiones en formato texto o en formato de Microsoft Excel.

En la Edición por Punto como su nombre lo dice se obtendrán datos de un punto o píxel de la imagen, se obtendrá sus coordenadas (x, y) así como su valor de gris, además se adicionará el nombre de la imagen ya que el usuario tendrá la capacidad de adicionar valores de diferentes imágenes en el mismo formato texto o de Excel, para que el investigador al final pueda comparar valores de diferentes imágenes para diferentes tejidos, o bien del mismo tejido, pero con imágenes tomadas en diferentes momentos del experimento, para ver la actividad celular de los tejidos.

Ahora bien en la Edición de Región, se tomarán y editarán datos muy importantes de la imagen auto radiográfica, que como su nombre lo dice será de un grupo de píxeles que el usuario elegirá previamente bajo una selección libre total. Los datos que obtiene son el promedio de grises que están dentro de la región seleccionada, su SEM, los femtomoles sobre 1 miligramo de tejido húmedo (fmol/mg) y el nombre de la imagen sobre la que se obtiene los datos. También se dejan marcados espacios para que el usuario marque que número de muestra es, el cuadro experimental y la región del tejido que se esta analizando.

Aquí los fmol/mg son obtenidos de forma directa de la curva real calibrada del experimento en cuestión, donde los grises que corresponden en su gráfica son los grises promediados, es decir, de los grises promediados obtenidos en esta edición se buscarán en el eje x de la calibración de la curva, en los datos obtenidos en la ecuación mayor aproximada a los datos experimentales también graficados. Recordemos que en la calibración de la curva se grafican dos series de datos, los datos experimentales y los datos reales aproximados a esos experimentales. El eje y correspondiente del x buscado representará el valor de fmol/mg que es visualizado en la edición por región.

Se vuelve aclarar, que para que este último dato funcione se debe hacer una calibración de la curva con los datos correspondientes; sino de lo contrario se verán datos aleatorios y no reales.

4.1.3 Los procesos en las imágenes

4.1.3.1 Los Filtros Digitales

Ahora hablaremos de otros procesos que se le hace a las imágenes y que son la aplicación de filtros digitales, los cuales consisten en modificar sus píxeles para mostrar ciertos resultados o modificaciones en su presentación por medio de operaciones matemáticas; como ejemplo es pasar una imagen a color a gris y viceversa, obtener su negativo y aclarar o oscurecer una imagen son tan solo unos ejemplos de filtros.

En nuestro programa solo manejaremos pocos filtros, ya que el usuario nos menciona que para aplicar filtros u otras modificaciones a la imagen, se hace con otro software en este caso PhotoShop que es mas especializado para esos casos. Los que se usan en nuestro programa son comunes para el usuario y se hacen píxel por píxel los procesos y para ello nos apoyamos mucho con el método scanline para agilizar todos los procesos ya que se utilizan en ocasiones imágenes muy grandes en cuanto a dimensiones.

Grises de una Imagen

Este filtro es uno de los más necesitados en la rama del estudio de auto radiografías ya que se puede visualizar los diferentes intensidades de brillo que hay en la imagen y poder ver así las reacciones biológicas en las estructuras celulares mediante la aplicación del isótopo radioactivo en la auto radiografía. Además como ya hemos visto muchas de las opciones de nuestro sistema requerirán de imágenes en tonos de grises.

El obtener una imagen en formato de grises es muy sencillo. Como se vio en el Capítulo 2 una imagen es representada bajo tres canales de colores, el rojo, el verde y el azul que son el RGB y cada canal representa una intensidad en el píxel de la imagen. Ahora bien para representar un gris se necesita que los 3 canales tengan un mismo valor de intensidad y para lograr ello y no perder información de intensidad de los 3 canales, lo que se hace es obtener el promedio de los 3 canales y reasignando el mismo valor a los 3, es decir R o G o B tendrán por valor $= (R+G+B)/3$. Esto se aplica a toda la imagen quedando al final una imagen en tonos de grises.

Negativo de una Imagen

Este filtro también nos revela la cantidad de píxeles con mayor o menor intensidad de brillo en la imagen.

El proceso que se sigue para obtener un negativo de una imagen es que cada píxel se le asigne el negativo de sí mismo por medio de la operación lógica NOT. Entonces cada píxel de la imagen estará así $p_{x,y} := \text{not } p_{x,y}$.

Binarización de una imagen

Ahora veamos el proceso de binarización de una imagen. Para lograr ello diremos que se llama binarización al proceso de asignación de colores blanco y negro y que para ello se necesita definir un umbral o límite de donde empieza el color blanco y donde termina y por ende el negro. Los límites para uno y otro son 0 y 255 por que como ya se dijo son los valores límites que puede tomar un canal de color. Aquí utilizaremos valores de píxel para decidir quien va antes o después, esto se hace promediando el valor de los canales, para que así no perdamos características de intensidad y morfología de la imagen.

Existen 2 formas comunes para definir el umbral de binarización de la imagen:

1.- El umbral se puede definir a la mitad de los valores entre 0 y 255, quedando 127 o 128 donde comúnmente el color negro quedara entre 0 y 127 o 128 y el blanco entre 127 o 128 a 255. Entonces todo píxel que este entre los valores de binarización será cambiado según corresponda por negro o blanco. Pero existe una pequeña deficiencia en esta parte, ya que en ocasiones hay imágenes que tienen píxeles pero no en todo el rango de 0 a 255, ya sea al principio o al final dando resultado binarizaciones muy negras o muy blancas.

2.- La segunda, que es mejor, es analizar toda la imagen y tomar el máximo valor alcanzado en los píxeles en los canales R, G y B y promediarlos para que así quedaría el límite mayor definido y el límite menor se haría también promediando los valores mínimos alcanzados en la imagen. El umbral quedaría definido por el valor medio entre el límite menor y el límite máximo encontrado.

Esta es lo más recomendable y es la que se aplica en nuestro programa ya que nos basamos en valores de píxel reales y en un umbral real, en donde tomamos en cuenta los valores reales de píxel de la imagen.

La binarización permite detectar lugares con demasiada intensidad y ver la forma que queda de la célula o tejido en estudio. Se sugiere que para poder utilizar una binarización adecuada se haga sólo en imágenes en escala de grises.

Brillo de una Imagen

Otro de los filtros más usados es el manejo de brillo de una imagen, el cual permite aclarar una imagen que esta oscura o viceversa. El proceso que se sigue para el brillo es muy sencillo, es saturar el píxel cuando se quiere aclarar la imagen o quitar valor al píxel cuando se quiere oscurecer, pero siempre bajo los 3 canales para no perder su morfología. Teniendo mucha precaución de no saturar el píxel arriba de 255 o reducirlo menor a 0, ya que se podrían tener resultados inesperados.

En pocas palabras si un píxel tiene en R o en G o en B un valor de 128 y se quiere aclarar simplemente se le suman valores de 1 en 1 o bien se multiplica el píxel por una constante mayor a 1, pero en los 3 canales al mismo tiempo para así no perder la forma de la imagen, pero solo se le podrán adicionar valores a lo mas hasta que el canal alcance el valor de 255 que es el valor de aclaración máximo y que corresponde al blanco. De forma similar se sigue para oscurecer al píxel se le resta de 1 en 1 o bien se le multiplica por una constante entre 0 y 1.

Aunque con el aumento o reducción de 1 en 1 del valor del píxel se aplica a toda la imagen y el efecto se vera reflejado de forma uniforme en la misma, mientras que por multiplicación de constante, el brillo se afecta de tal forma que se modifica también un poco al contraste de la misma imagen.

Brillo por funciones

Otra metodología que se sigue para aclarar una imagen u oscurecerla, es aplicar funciones a los píxeles origen, en nuestro programa utilizaremos las funciones de seno que aclara la imagen, coseno que la oscurece y por potencia en la cual el píxel es elevada a una constante, de tal forma que $0 < \text{constante} < 1$ para aclararla y $\text{constante} > 1$ para oscurecerla. En seno y coseno el contraste se respeta un poco en la imagen, en seno se aclaran mas los píxeles claros en vez de los oscuros y en coseno se oscurecen mas los píxeles oscuros. Para la potencia mientras la constante se acerca a 0 la imagen es más clara y mientras mas se aleje de 1, será más oscura, de igual forma el contraste también se modifica poco.

Pseudocolor a una imagen

Ahora mencionaremos otra parte de nuestro sistema, que son los filtros que añaden color a una imagen en gris o monocromática. Ya hemos descrito a nivel general como funcionan estos filtros y que existen muchos de ellos, pero que al final solo se obtendrán colores falsos pero con intensidades similares a la imagen en gris. En nuestra tesis básicamente se aplicaron los métodos explicados previamente en el Capítulo 2.

Del primero el de la división por intensidades, que se aplica dividiendo 255 entre 8, de los cuales el cociente de esa división marca un umbral en cada múltiplo del cociente, así hasta cumplir los 8 niveles, es decir, $255/8$ es igual a 31.875 pero nosotros tomamos 31 como el umbral, entonces de 0 a 31 se pinta con un color, de 32 a 63 con otro, de 64 a 95 con otro más y así sucesivamente hasta llegar a los 255 niveles que alcanzarían cada canal R, G y B. En nuestro programa se tratara de dejar algunos colores tentativos para el usuario, pero se tendrá la opción de elegir los colores que a él mejor le convengan. Los umbrales aquí comentados serán dados por el color gris del píxel y le será asignado un color según su intensidad, es el por ello de las 8 capas, aunque podrían ser más.

Después de tener los colores que se aplicarán a la imagen, cada color propuesto se descompondrá en sus canales y se aplicarán en los canales respectivos del píxel correspondiente para así tener una imagen de salida con colores.

Para la parte donde aplicamos una función para obtener los valores de los colores falsos se utilizan 3 formas, que al final cada autor o programador los propone, ya que no hay una forma de volver a conseguir los colores reales de la imagen, la función pueden ser cualquiera, siempre y cuando no alteren la morfología de la propia imagen.

Equilibrio de Color

Aquí este efecto consiste en modificar los píxeles de una imagen de manera independiente en los canales R, G y B, de igual forma consiste en reducir o aumentar en 1, los valores de los píxeles origen de la imagen, produciendo efectos de coloración en la misma por lo cual también puede ser usado para colorear una imagen en gris o para ajustar los colores de una imagen con tonalidades de color. El canal rojo al sumarle de 1 en 1 se saturará de más rojo, pero al reducirle tomara la tonalidad de Cian, el Verde igual se hará más verde al sumarle pero al reducirle tomara el color Magenta y el Azul igualmente se hará más azul al sumarle pero al reducirle se hará Amarillo.

Filtros Paso Bajo y Paso Alto

Hasta el momento solo se han explicado filtros que se trabajan por píxel, es decir, a un solo píxel se le aplica una operación o varias y el resultado se regresa a ese mismo píxel. Pero en la aplicación de filtros existen otros más, que son trabajados a través de una máscara de 5, 9 o más valores y multiplicado por los píxeles correspondientes y el resultado se regresa a un píxel central; esto se hace para tomar mas características de la imagen y regresar un píxel resultado procesado con base a sus píxeles vecindad, que son los que están al lado.

Lo anterior se logra de la siguiente manera, supongamos que se va a procesar el píxel $p(x,y)$ y se procesará con un filtro Paso Bajo que más adelante se explican. Obsérvese la matriz de P_v la cual contiene todos los píxeles vecindad o alrededor del $p(x,y)$, se tiene a su alrededor 8 píxeles y se tiene la máscara FPB_3 con 9 valores, entonces para obtener un píxel resultante $R(x,y)$, se multiplican las dos matrices $P_v * FPB_3$ el cual dará el resultado un solo valor y es el que se dará a $R(x,y)$.

$$P_v = \begin{bmatrix} p_1 & p_2 & p_3 \\ p_4 & p(x,y) & p_5 \\ p_6 & p_7 & p_8 \end{bmatrix} \quad FPB_3 = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 2 & 4 & 2 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix}$$

Estas operaciones matriciales de hacen con todos los píxeles de la imagen, con lo cual se asegura tomar características un poco mas reales, con lo cual se dan filtros mucho mas complejos para dar otros efectos a la imagen.

Aquí bajo ese esquema usamos filtros Paso Bajo y Paso Alto; los primeros no dejan pasar frecuencias altas o transiciones bruscas de un píxel a otro, por lo cual la imagen resultante es una imagen mucho más suavizada, además de que eliminan el ruido, polvo o suciedad que haya adquirido la imagen al momento de tomarse. Y los Paso Alto hacen lo contrario de los Paso bajo, estos dejan pasar frecuencias altas entre los píxeles, lo que hace resaltar un poco los bordes en lo que contiene la imagen, lo que da resultado a una imagen mucho mas estilizada. Estos filtros son de utilidad por las imágenes que se utilizan en Fisiología ya que muchas veces las imágenes tomadas vienen con impurezas por el cristal usado en el microscopio, entonces un filtro Paso Bajo

ayuda a reducirlas y si una imagen sale un poco borrosa un Filtro Paso Alto ayuda estilizar y destacar mas los bordes de las células o tejidos mostrados en la imagen.

Detección de Bordes

Por último los filtros esenciales que deben estar en todos los análisis de imágenes celulares, son la detección y muestra de bordes de lo que se encuentra en la imagen. Se manejaron 2 detecciones, se muestran los bordes en dirección en X y los bordes en dirección en Y, y por medio de una operación OR con la calculadora podría obtenerse una imagen con bordes en general, es decir, en ambas direcciones X y Y. Al ejecutarse dicho filtro el resto de la imagen es ignorada o pasada a un color negro. Para lograr esto se hace a través de la operación $q = \text{Valor Absoluto de } (p_{i,j} - p_{i-1,j})$ donde q es el nuevo píxel resultado y los píxeles p son de la imagen origen pero de distinta posición. Esta operación obtendrá valores altos en donde haya cambios bruscos en los valores de los píxeles con lo cual se resaltan los bordes y en partes donde hay pocos cambios bruscos, el valor q tiende a 0, con lo cual son ignorados. La anterior operación detecta bordes en X, para Y solo se cambia un valor adelantado en j.

Filtro Espejo

Este sólo es un filtro donde la imagen es reflejada como si fuera un espejo. Se manejan dos formas: el reflejo horizontal y el reflejo vertical. Este tipo de filtro nos sirve para tener una perspectiva de visualización de la imagen.

Contraste

Este es un tipo de filtro que modifica la cantidad saturada de píxeles, principalmente cercana a donde haya cambios bruscos en intensidad de los píxeles origen. El contraste hace también que los colores sean más vivos, permitiendo ver detalles que no son visibles en imágenes con luz uniforme, con lo cual ayudará al investigador a encontrar detalles en las células de auto radiografía.

4.1.4 La ampliación de las imágenes

Ahora bien, en esta sección hablaremos de otra parte esencial de nuestro sistema, el cual también debe ser exacto para que no se tomen datos erróneos en la selección de cualquier parte de la imagen. Hablaremos de la ampliación de las imágenes pero desde dos puntos que se utilizan en nuestro programa que son el zoom y el redimensionamiento de las imágenes de forma definitiva.

Zoom

En este parte de nuestro programa lo que se hace es ampliar o reducir la imagen de manera temporal, para que el usuario pueda ver a detalle características de la imagen, o bien pueda seleccionar partes diminutas que a simple vista no son tan fácil ver o seleccionar, para que después le sea aplicado algún proceso, como por decir un filtro o el histograma parcial. En el caso de la reducción puede ser usado para que el usuario vea en gran parte toda la imagen cuando esta viene demasiado grande. El zoom es muy usado en muchos software de diseño, para realzar o definir detalles que el usuario busca o quiere modificar; este efecto de ampliación no afecta de ninguna forma el tamaño real de la imagen, ya que uno puede hacer una ampliación a un 200% de la imagen y al aplicar el proceso se hace sobre el tamaño real de la imagen en este caso siempre sería el 100%.

Existen diferentes medidas de ampliación o reducción, en nuestro sistema usaremos las básicas que son reducir la imagen en 20, 40, 60 y 80% y ampliar un 120, 150, 170, 200, 250 y un 300% y

estas medidas son muy buenas para que el usuario pueda trabajar de forma tranquila con imágenes muy pequeñas o muy grandes. Pero, que quiere decir hacer un zoom un 20% o de 200%? Simplemente en el caso del 20% es que la imagen original se mostrara en el programa reducida una quinta parte de su tamaño real y en el caso del 200% será mostrada al doble de su tamaño real.

Por lo anterior para obtener las nuevas medidas con las que se mostrará la imagen de manera temporal al usuario, estas se obtendrán así:

$$\text{NuevoAncho} := \text{AnchoOriginal} * \text{Factor de Zoom} \quad \text{y}$$

$$\text{NuevoAlto} := \text{AltoOriginal} * \text{Factor de Zoom}$$

En donde los factores de zoom en base a las reducciones y ampliaciones antes mencionados serán los siguientes:

Reducción		Ampliación	
Zoom	Factor	Zoom	Factor
20%	0.2	120%	1.2
40%	0.4	150%	1.5
60%	0.6	170%	1.7
80%	0.8	200%	2
		250%	2.5
		300%	3

Entonces si una imagen tiene medidas reales de 800x600 píxeles y se reduce un 40% sus nuevas medidas temporales será de 320x240 píxeles y si se hace una ampliación de 300% entonces sus nuevas medidas temporales serán de 2400x1800 píxeles.

Redimensionamiento de una Imagen

Ahora pasaremos a otro aspecto de nuestro programa el redimensionamiento de una imagen, esta parte la consideraremos de forma similar al zoom, nada mas que aquí las nuevas medidas de la imagen ya no serán con respecto a un zoom que como ya se dijo actúan de tipo temporal, sino que serán definitivas, además de que ya no se manejaran factores de ampliación o reducción sino las nuevas medidas el usuario las ingresara. La imagen podrá ser redimensionada de forma proporcional, es decir, la proporción que se de al ancho es igual a la proporción que se dará en el alto, esto es para mantener el aspecto real de la imagen sobre la que se esta trabajando o bien se hará la redimensión sin proporción donde el usuario dará medidas diferentes para ancho y el alto. La desventaja de esta última parte es que la imagen perderá su forma original y aparecerá distorsionada.

Para que una imagen sea redimensionada de forma proporcional se sigue lo siguiente.

1.- Dado lo que ingrese el usuario ya sea para modificar su anchura o su altura (no los dos al mismo tiempo), se obtendrá el porcentaje que haya disminuido o aumentado, del ancho o alto original de la imagen según corresponda.

2.- Como el usuario ingreso un ancho o una altura a modificar, la otra parte se dará de forma automática, si se dio el ancho, el alto se da automáticamente con base al porcentaje obtenido en el paso anterior y viceversa del alto para con el ancho.

Con ello se obtienen medidas proporcionales que mantienen el aspecto original de la imagen. Veamos un ejemplo, supongamos que tenemos una imagen original de 352x288 píxeles y que el usuario quiere que la imagen por lo menos se redimensione en su ancho a 500 píxeles. ¿Cuál será su nueva altura? Vamos a obtenerla para ello veremos cuanto por ciento aumento esos 500 píxeles sobre la medida original y lo hacemos con una simple regla de tres:

AnchoOriginal – 100%

NuevoAncho – x

Obteniéndose un aumento del 42% más de su tamaño original aproximadamente, es decir, es como si se hubiera hecho un zoom de 142%. Entonces hay que aplicar un 42% más de alto a la imagen y se hace nuevamente con una regla de tres:

Porcentaje – x

100% - AltoOriginal

Quedando que la nueva altura nos dará un aproximado de 409 píxeles. Por tanto la imagen quedará con las nuevas medidas proporcionales de 500x409 píxeles. Para el caso de que se cambie el alto, el ancho se obtendría de manera similar.

4.1.5 La Calculadora de Imágenes

Otro de los elementos a implementar es el uso de la Calculadora de Imágenes, la cual nos permite procesar 2 imágenes a través de una función y obtener un resultado en otra imagen, dicho resultado nos permite detallar ciertas características de las imágenes por decir, podemos ver los cambios que sufren las células entre una imagen tomada en un momento dado y otra imagen tomada un segundo después, según sea lo que el investigador requiera.

La aplicación de las funciones se realizan por cada canal R, G y B de cada píxel, por decir así se haría el resultado de un cálculo de suma entre dos imágenes:

Supóngase dos imágenes Imagen1 e Imagen2 con sus píxeles correspondientes P1(x,y) y P2(x,y) los cuales habrá que descomponerlos en sus canales; para P1(x,y) sus canales R, G y B serían P1R(x,y), P1G(x,y) y P1B(x,y) y para P2(x,y) serían P2R(x,y), P2G(x,y) y P2B(x,y). Ahora bien supóngase una imagen resultado ResImagen también con sus píxeles R(x,y) y sus respectivas descomposiciones de los canales R, G y B, entonces la operación de suma entre las imágenes será:

$$R_R(x,y) = P1_R(x,y) + P2_R(x,y)$$

$$R_G(x,y) = P1_G(x,y) + P2_G(x,y)$$

$$R_B(x,y) = P1_B(x,y) + P2_B(x,y)$$

La operación se hace en los 3 canales. Cabe hacer mención que los valores de RGB esta entre 0 y 255, por lo cual en las operaciones se debe tener cuidado que el resultado no tenga un valor superior a 255 y menor a 0, por lo cual si algún valor resultante rebasa esos niveles, se normaliza, para valores mayores a 255, el resultado se iguala a 255 y si es menor de 0 el valor se iguala a 0.

En la calculadora se implementaron varias funciones del tipo lógicos y aritméticas, las cuales cada una obtiene una característica en común, pero al final el investigador podrá y deberá probar las diferentes funciones para que vea los resultados, y obtenga lo que busca en las imágenes.

Función	Descripción
Lógica AND	Imagen1 AND Imagen 2
Lógica OR	Imagen1 OR Imagen 2
Lógica XOR	Imagen1 XOR Imagen 2
Negación de Lógica AND	Not (Imagen1 AND Imagen2)
Negación de Lógica OR	Not (Imagen1 OR Imagen2)
Negación de Lógica XOR	Not (Imagen1 XOR Imagen2)
Aritmética SUMA	Imagen1 + Imagen 2
Aritmética RESTA	Imagen1 - Imagen 2
Aritmética MULTIPLICACION	Imagen1 * Imagen 2
Aritmética DIVISION	Imagen1 / Imagen 2
Aritmética DESIGUALDAD <=	Sí Imagen1 <= Imagen 2 -> Res=0

Mínima
Máxima

No Res=255
Min(Imagen1, Imagen 2)
Max(Imagen1, Imagen 2)

De la Suma, Resta y Multiplicación se verifica que los datos estén entre 0 y 255 y de la División que no exista una división entre 0 para no ocasionar errores. El resultado óptimo para lo que busque el usuario será a través de una serie de pruebas que haga con las diferentes operaciones para así obtener lo que desea.

En resumen, el diseño de todo programa requiere de mucho trabajo interdisciplinario entre el programador y el usuario para que éste cumpla con las necesidades del usuario y satisfaga las metas de calidad de una ingeniería de software, donde todo ello se corrobora con las diferentes pruebas y trabajo que el usuario realice sobre el programa.

Capítulo 5

EL DESARROLLO DEL SISTEMA SAGEFH VERSIÓN 1.0

Ahora iniciamos el Capítulo 5, la recta final de este proyecto de tesis. En éste veremos como todo lo analizado en los capítulos anteriores cobra vida al realizarse el programa o sistema Sagefh, nombre que definimos en el capítulo 3. Veremos un poco más de diseño del programa al realizarse, pero esto ya será para determinar las bases de cómo se construyó nuestro sistema para que con ello, todo lo que vimos anteriormente en la parte de análisis y diseño serán tangibles ahora al realizarse todas las ventanas del sistema, que interactuarán con el usuario final que lo utilizará en el Instituto de Fisiología, es decir, la realización de la interfaz final; además de que veremos la parte técnica del mismo en la implementación donde se analizarán las principales características de nuestro sistema. Veremos también algunos ejemplos donde se de la aplicabilidad de nuestro software, sus pruebas así como sus resultados al ser comparados con otro software ya existente en el mercado.

5.1 Diseño Arquitectónico

En esta parte del diseño explicaremos como se desarrolló la estructura del programa y la relación de control de los diversos módulos que lo conforman o al menos los principales, donde se ve afectada la imagen (procesos y filtros). Al tratarse esto veremos como la imagen es procesada, desde que es abierta hasta que es mostrada al usuario o donde se muestran resultados específicos según el módulo, que el usuario a través de la interfaz final haya seleccionado. En pocas palabras en el diseño arquitectónico vemos la estructura general interna de cómo se conformará nuestro Sistema Sagefh y como fluirá la información a través de esa estructura.

Observemos la Fig. 5.1, en la cual se esquematiza el diseño arquitectónico de lo que constituye nuestro sistema. Aquí nuestros principales datos conforman la propia imagen que se maneja con el programa y las partes que se obtienen de la misma con procesos tales como son con aplicación de filtros, estadísticas de la imagen, asignación de colores falsos, histogramas y propiedades de la imagen, entre otras mas. Una parte que se podría tomar como independiente de la imagen, pero que en realidad es dependiente, es lo que se efectúa en la Calibración de la Curva donde por medio de una imagen se obtienen datos de interés para el investigador y de ahí se obtiene otros resultados como gráficas. En la 5.1 vemos por donde la imagen puede seguir, sus posibles procedimientos y resultados donde se llega, lo que para nosotros es de mucha importancia ya que de ahí podremos ir conformando la estructura general de nuestro sistema e incluso su propia interfaz.

Dentro del Diseño arquitectónico se contemplan dos tipos de flujos de datos, el de transformación y el de transacción [3]. El primero hace mención cuando los datos que conforman las imágenes de nuestro caso, a través de una interfaz final son seleccionadas por el usuario para ser modificadas por cualquier proceso (flujo de entrada) y muestran los resultados en la misma interfaz final (flujo de salida) que el usuario maneja con nuestro programa, valiéndose la aclaración

que pasan por un módulo de transformación o modificación. El de transacción es cuando la información según un criterio se divide en varios caminos posibles dentro de la estructura o diseño arquitectónico para ser modificada. Todo esto se hace con el fin de saber como la información fluye dentro del programa y no tener pérdidas de datos o repetición de procesos, para que con ello el software desarrollado trabaje de manera eficiente, con cohesión, acoplamiento y que su programación y mantenimiento sean más fáciles.

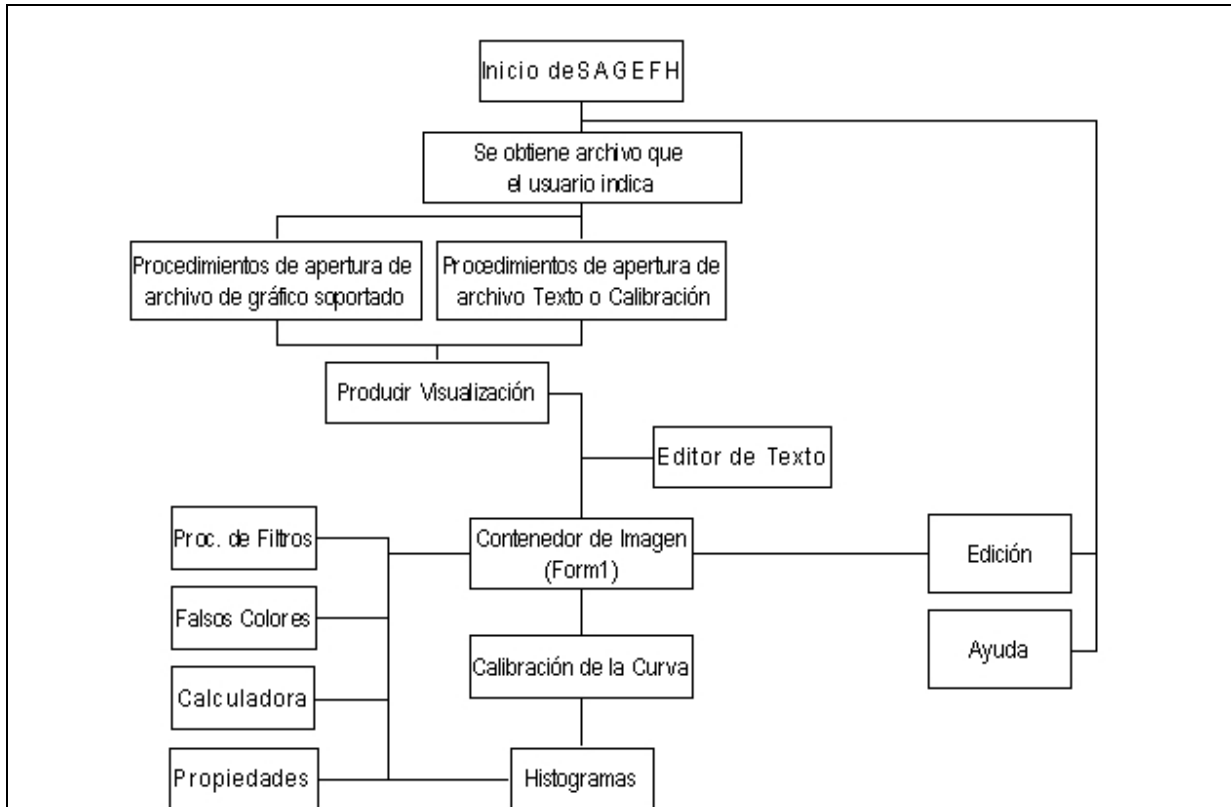


Fig. 5.1. Estructura General Interna del Programa Sagefh representado por los principales módulos que lo conforman y sus relaciones. Diseño Arquitectónico.

En la Fig. 5.1 existe un Flujo de transacción al seleccionar un archivo y abrirlo, ya que se tiene dos caminos al visualizarlo, uno gráfico y otro de texto, el resto son flujos de transformación de los procesos y solo afectan a la imagen donde produce su resultado, esto con base a lo que seleccione el usuario, por solo decir la imagen ubicada en el contenedor de imagen (Form1) es afectada de forma individual por procesos de filtros, falsos colores, calculadora y propiedades. Cabe hacer mención que existen otros elementos dentro de la Fig. 5.1. que tal vez no modifiquen la imagen pero si proporcionan ayuda o información de cómo manejar el programa y con ello el usuario pueda llegar a la información según sus requerimientos como en la barra de tareas donde se muestra la posición del cursor y sus valores R, G y B de forma independiente.

5.2 Diseño e Implementación de la Interfaz Usuario-Máquina

Ahora bien pasamos a una de las etapas de consolidación del Sistema Sagefh versión 1.0, que es el diseño e implementación de su interfaz final, en la cual el usuario o investigador trabajará con el programa y obtendrá los resultados que hemos explicado en capítulos anteriores de esta tesis. Al momento de desarrollar una interfaz, debemos tener en cuenta varios objetivos por parte del usuario como el nivel de manejo de una PC, forma de visualización, modificación y colocación de

datos o resultados entre otras cosas a lo que se llama Modelo de Usuario, o Percepción del Sistema y Modelo del Usuario.

5.2.1 Modelo del Usuario y Percepción del Sistema

Como se mencionó anteriormente estas partes consolidarán el desarrollo de la interfaz final para quienes es desarrollado el sistema, además de lo requerimientos especificados por el usuario en el capítulo anterior ahora se verán reflejados. Para empezar se menciona que el Sistema Sagefh será usado por alumnos, maestros y doctores del Instituto de Fisiología de la BUAP con lo cual los usuarios ya tienen nociones básicas de manejo de un equipo de cómputo, por lo cual el programa se desarrolla en un ambiente un poco de usuarios avanzados, aunque sin perder la sencillez de usarlo. Ahora bien la forma de trabajo y visualización del programa se coordinó con el Dr. Gonzalo Flores investigador del Instituto en el Área de Neurociencias, el cual pidió un programa que abriera imágenes en formato básico principalmente TIFF, a las cuales se les podían aplicar algunos filtros para resaltar algunas características mostradas en la imagen; pero que cada resultado se visualizara en una ventana diferente, donde si en la imagen por decir 1, si se seleccionaba una parte, en la imagen 2 el resultado se mostrará con la misma selección hecha en 1, pero en otra ventana. También el usuario solicitó una forma de calibración de la curva donde se ingresarán valores y otros mas se obtuvieran de forma automática en base a tablas, y que la gráfica visualizada fuera movable para ver a detalle los datos graficados y otras cosas necesarias que se especificaron en la sección 3.5. Cabe hacer mención que al final de estos análisis y características el programa se desarrolló y se hicieron varias pruebas de visualización final de Sagefh, los cuales se le mostraron al usuario, también conforme el lo solicitaba se agregaban o eliminaban o modificaban módulos de la interfaz para que al final quedara tal como había sido requerido; en otras palabras se siguió la metodología de la Fig. 5.2. que se parece en parte a la de la Fig. 3.1.

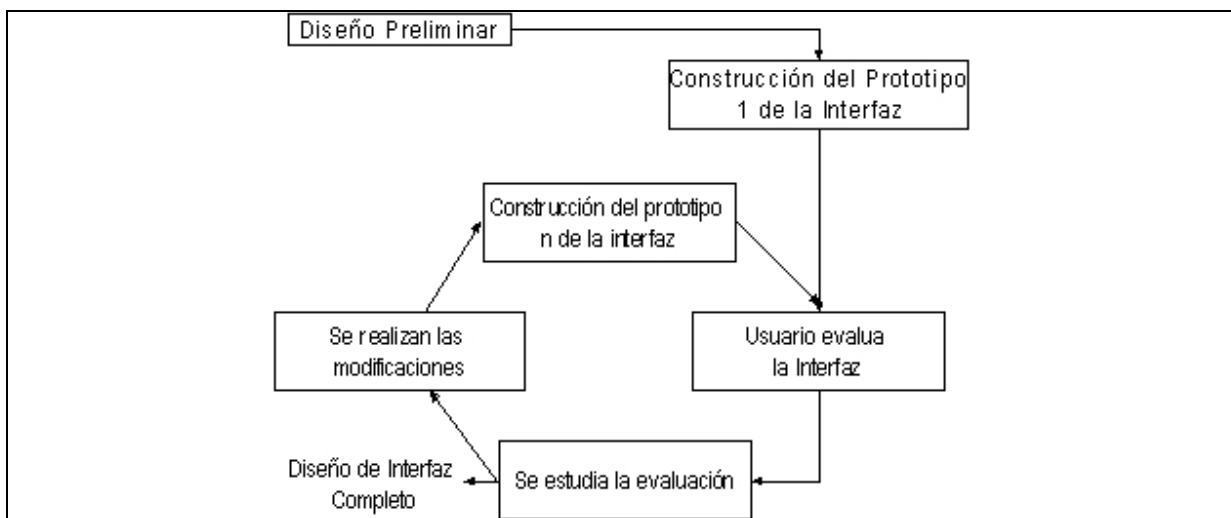


Fig. 5.2. Ciclo de Evaluación del diseño de la Interfaz usado en Sagefh. [3]

5.2.2 Herramientas de Implementación para el sistema Sagefh

Cabe hacer un paréntesis para mencionar lo que se conoce como Kits de herramientas de interfaz de usuario o sistemas de desarrollo de interfaz de usuario (SDIU), siendo éste todos los elementos que hacen posible la creación y modificación de la interfaz del software. Por lo tanto las principales herramientas para poder desarrollar toda la implementación de nuestro programa son:

1. Borland Delphi 5, que como se dijo por su facilidad de uso al desarrollar la aplicación y por la sencillez de su propia interfaz y lenguaje (Pascal orientado a objetos) fue seleccionado para programar, codificar y crear la interfaz del sistema Sagefh.
2. El software de programación Delphi, es trabajado en una PC con sistema operativo Microsoft Windows XP Profesional.
3. La PC es una Pentium 4, con 256 MB de memoria RAM y HD de 40Gb.
4. Maple V para poder corroborar los datos matemáticos principalmente en las operaciones de matrices.

5.2.3 Implementación de la Interfaz Final

Con lo antes descrito, podemos ya empezar a indicar como quedaría nuestra interfaz final, que el usuario tendría enfrente para poder trabajar la información con el programa Sagefh. Pero antes de todo esto se realiza la codificación de los algoritmos vistos en el Capítulo 4 para que cuando ya funcionen de forma adecuada, se pueda realizar la interfaz de una manera simple y darle al usuario los resultados que deseaba.

Antes de entrar a la implementación del Sagefh, tomamos cuatro puntos esenciales para que el resultado sea óptimo según la ingeniería de software: 1).- Tiempo de respuesta del sistema, 2).- Las facilidades de ayuda al usuario, 3).- La manipulación de la información de los errores y 4).- el etiquetado de ordenes.

De la parte 1 se referirá a toda respuesta en tiempo de lo que se haga en nuestro programa, todos los procesos a excepción de los filtros son rápidos, decimos que los filtros no tanto porque se manejan matrices de bits y cada vez que se ejecuta un filtro, se crea la matriz, se hace el filtro y se ejecuta una nueva matriz para visualizar el resultado, esta parte es relativamente un poco tardada dependiendo del tamaño de la imagen.

Ahora bien la ayuda de nuestro programa se manejará de forma agregada, es decir, a través de una opción se mostrará la ayuda; se trató de mostrar toda la ayuda, para todas las opciones posibles de nuestro sistema. En algunas opciones a través de la barra de estado o en texto que aparece al colocar el cursor encima de algún elemento se muestra una ayuda integrada, es decir, en el momento de que se desarrollo el software se pensó que en el momento de ejecución del mismo se visualiza una ayuda.

También en la parte 3 se tiene un especial cuidado al manejar posibles errores del programa, cada uno de los posibles se presenta a través de un cuadro de diálogo, que se le muestra al usuario, para que tenga una idea o sepa que hacer cuando se presente un error. Aunque como todo software, no se pueden contemplar y especificar todos los errores como los externos que afecten el programa; por mencionar alguno, una falla en el disco duro de la PC del usuario y si el programa se carga en ese sector de falla ocasionará un error, el sistema Sagefh no tiene esa capacidad de reconocer esos errores externos; pero al menos todos los posibles que ocurran desde adentro cuando se manejen los datos e imágenes, se contemplan y se documentan.

Por último en la parte 4 se menciona el etiquetado de ordenes, que no es mas que las posibles secuencias de teclas para invocar un comando en el software, tal como CTRL+A para poder abrir una imagen sin necesidad de hacerlo con el Mouse. Sagefh solo contemplará las principales funciones del programa y se harán compatibles con otras secuencias de comandos que existen en otros programas, esto para evitar confusiones al usuario que emplee varios programas y entre ellos Sagefh. En la Fig. 5.3. se observa la interfaz principal de Sagefh y sus principales partes: Barra de Menú, de Herramientas y de Estado; además se visualiza ya con una imagen abierta colocada en Form1 que será para todas las imágenes.

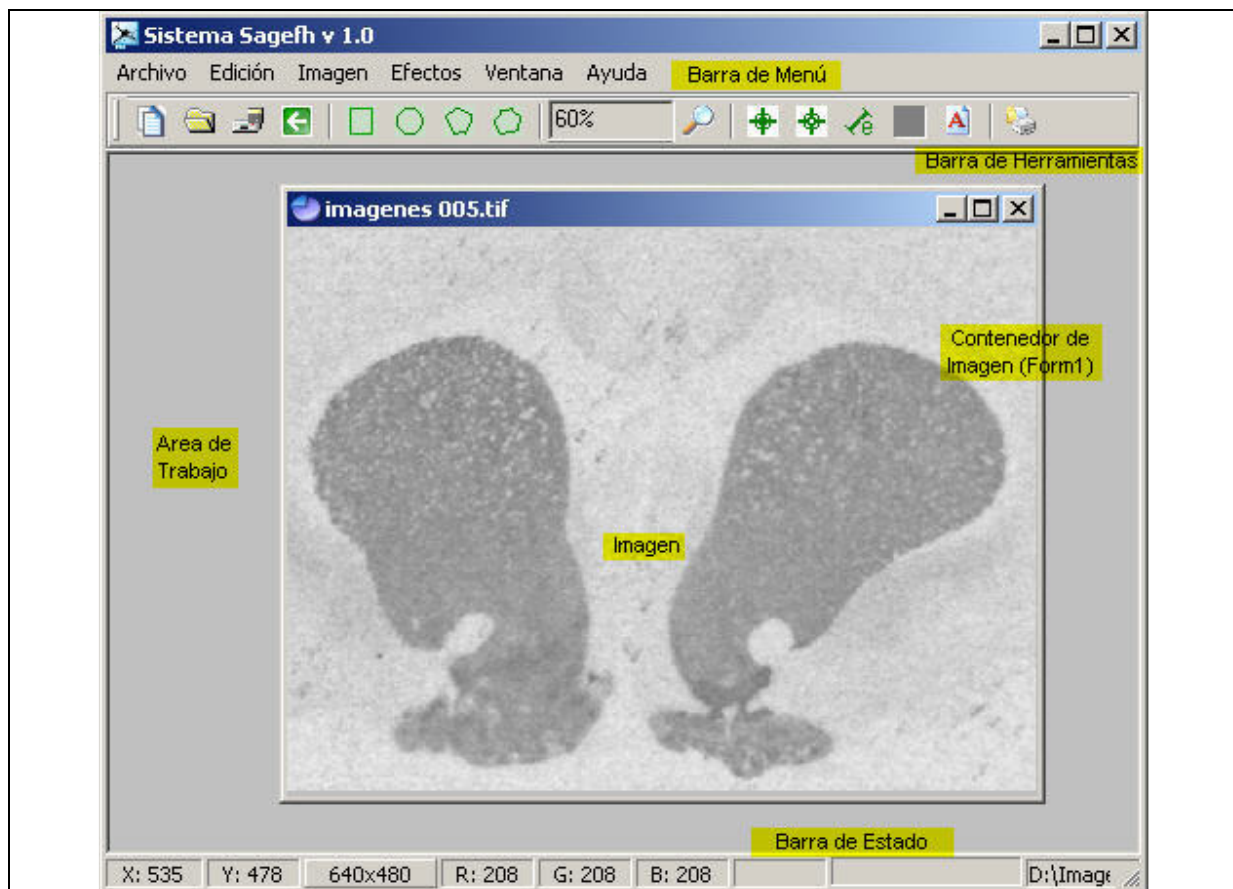


Fig. 5.3 Interfaz Final del Sistema Sagefh versión 1.0 y las principales partes que lo conforman.

En la Fig. 5.4 observamos la forma de la Calibración de la Curva, una de las partes esenciales de nuestro programa en la que el usuario puso mucho énfasis para su realización, ya que esta parte era necesaria para reducir tiempo y costos en sus investigaciones. En la figura podemos observar como se encuentra ya trabajando y en la sección derecha, sobre la parte azul vemos la graficación de los datos y sus posibles ecuaciones de acercamiento o acoplamiento, para redefinir la muestra de resultados que el usuario insertó a través de una imagen; en este caso la que se muestra en la Fig. 5.3. Esta interfaz además tiene otros datos adicionales para el usuario, para asegurar la calidad de acoplamiento de las ecuaciones propuestas, ya explicadas en el capítulo 4. De manera que el usuario en esta forma solo ingresa datos como el tipo de radioisótopo y el tiempo de decaimiento, para que a través de tablas internas [ANEXO C y 11] se obtenga el factor de decaimiento correspondiente, también se insertarán la escala de actividad y su AS, para que así automáticamente se obtenga la serie Y Fmol/mg a graficar, el resto de los datos el usuario los insertará. Cabe hacer mención que esta forma tiene la libertad de dar los datos que sean en X y Y para graficar y obtener su ecuación de ajuste, sin necesidad de insertar nada en la parte de Datos Esenciales, con lo cual se cumple la libertad de controlar el flujo interactivo al usuario en las Entradas de Datos; incluso hasta se permite guardar los datos para poder visualizar la grafica mas adelante o bien se puede guardar la misma grafica como imagen BMP.

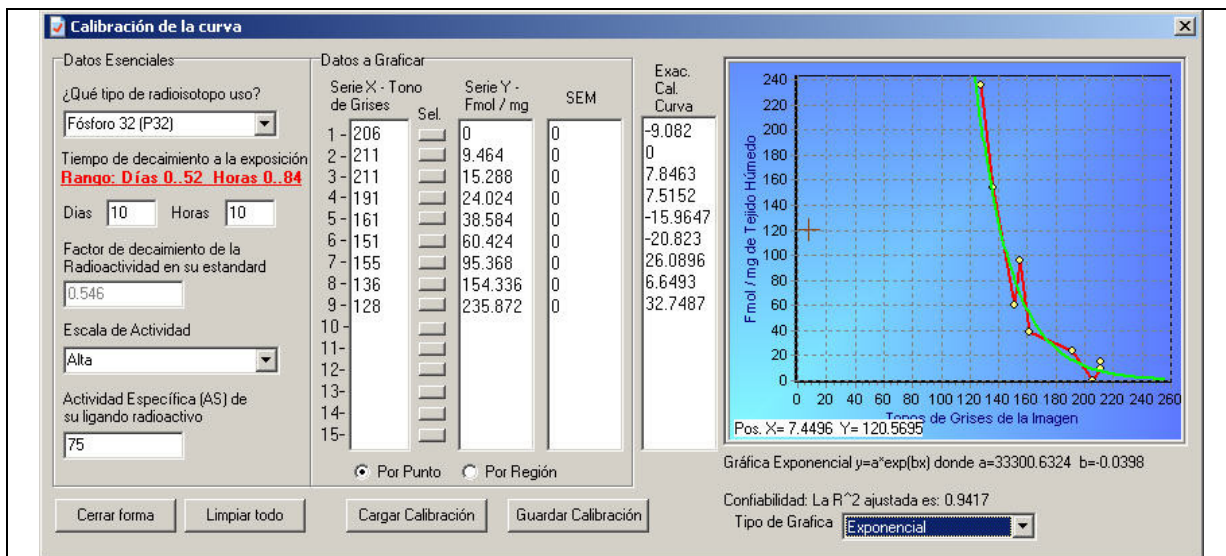


Fig. 5.4. La forma de la Calibración donde ya se han cargado algunos datos y su graficación.

La inserción de los datos de tipo numérico se valida para no crear inestabilidad en el programa, por lo cual si se inserta un dato erróneo se muestra un mensaje como el de la Fig. 5.5 cumpliendo en producir mensajes de errores significativos cuando sean necesarios para que la Interfaz Hombre-Máquina sea lo más amigable y al final el usuario obtenga los resultados que solicitó.

En el resto del programa donde se requiera insertar datos la validación y los mensajes de errores para avisar al usuario están presentes.

Otra de las interfases interesantes que no podía faltar en nuestro sistema, es el manejo de la Calculadora entre Imágenes, la cual permite detallar características únicas entre las imágenes, además de que en un momento dado también nos pueda ayudar a dar colores falsos entre imágenes creando resultados sorprendentes, ya que al final es tan solo un manejo de operaciones entre píxeles de las imágenes, aunque eso si, mientras mas grandes las imágenes, el resultado de la operación final será un poco tardado ya que se crean dos matrices de bits para cada imagen, para así por medio de scanline realizar la operación; el resultado de la cual se coloca en otra matriz. La previsualización en la forma de la calculadora es rápida, de manera que al aceptar un resultado en la previsualización, éste se ejecuta con seguridad de lo que se quiere obtener.

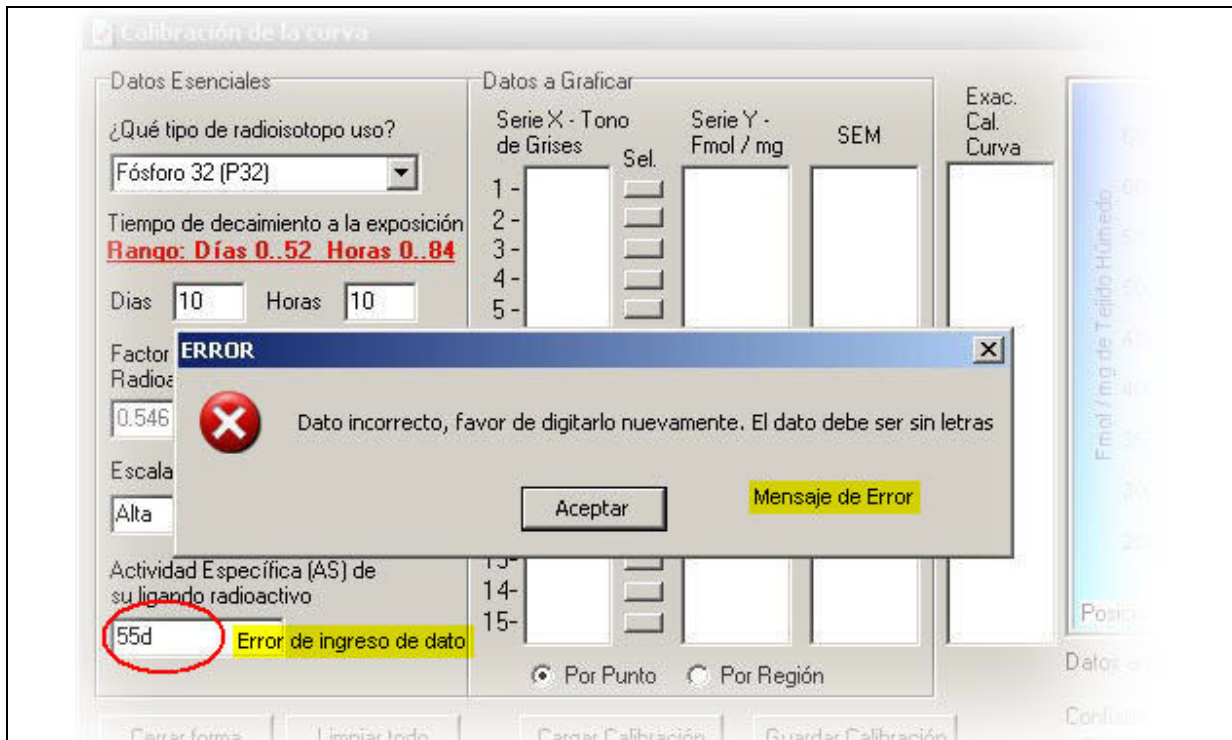
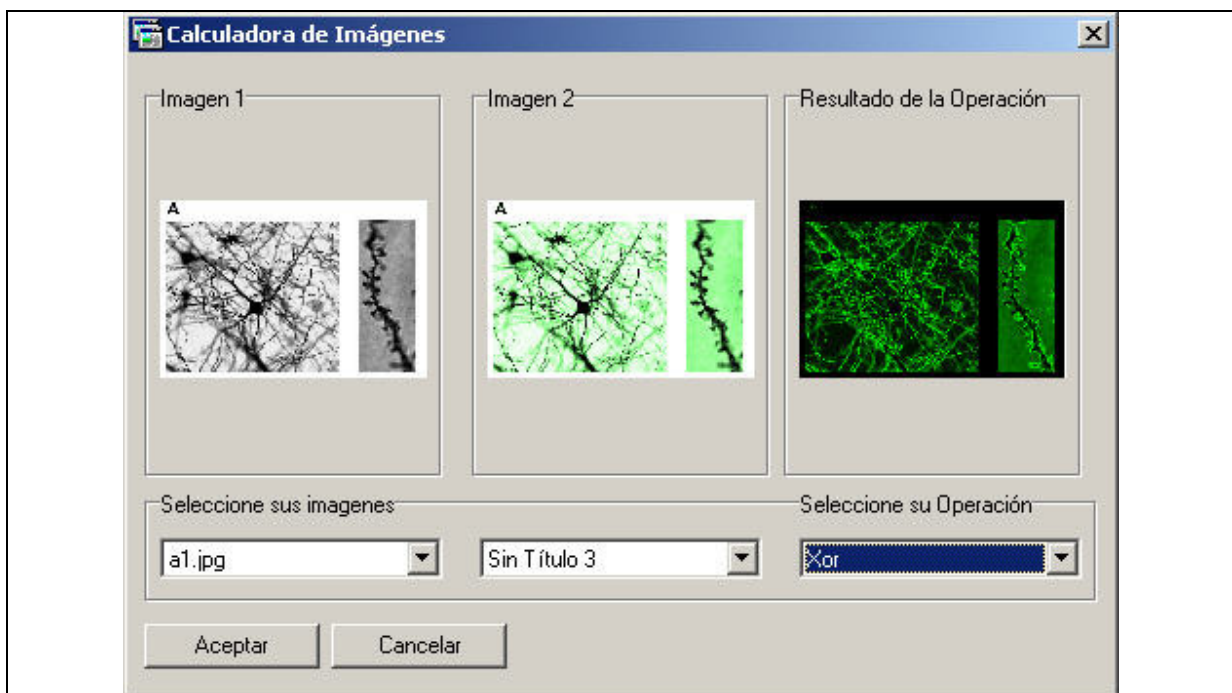


Fig. 5.5. Mensaje de error en la Calibración de la Curva, ya que se inserto una letra en el campo de AS donde solo se aceptan números enteros.



En la Fig. 5.6 se observa la calculadora de imágenes y la visualización del resultado con imágenes de 2146x1424 píxeles. La Imagen 1 es la original y la 2 es resultado de otra operación.

El final del diseño de la interfaz como se mencionó se estableció de manera directa con el usuario ya que es la persona que al final utilizará el sistema Sagefh. Se hace mención que el software se

terminó casi en su totalidad y se dejó al usuario para que lo utilizara, viera los detalles y posibles errores de trabajo, para que así al final de ese periodo de pruebas prácticas se hicieran las correcciones pertinentes y quedará un software apto para sus necesidades. Existen otras interfaces en Sagefh, pero por espacio se expusieron aquí las más importantes; cabiendo la aclaración que siempre fue cumpliendo con las especificaciones del usuario y de la ingeniería del software.

5.3 Implementación estructurada y técnica de SAGEFH

En esta sección se presentan a detalle algunos de los principales módulos que conforman nuestro Sistema Analizador Gráfico para Estudios Fisiológicos e Histológicos; se trató con la forma de la programación estructurada, misma que se encuentra a través del Diseño Procedimental y del Lenguaje de Diseño de Programas (LDP), también llamado lenguaje estructurado o pseudocódigo en el cual se mezcla lenguaje común con lenguaje estructurado de programación; que para nosotros fue Pascal.

Cabe hacer mención que aquí no insertaremos código de forma directa ni se harán explicaciones de todos los módulos, ya que abarcaríamos un buen espacio en hacerlo. Lo que sí se hace es explicar al menos las características principales de Sagefh, así también mostramos algunas instrucciones importantes que se usaron para dar forma al sistema.

Como se mencionó en el Capítulo 3, se seleccionó el lenguaje de programación Borland Delphi en su versión 5 para realizar el programa SAGEFH debido a varias situaciones. Para empezar Delphi tiene una característica de crear ventanas o formas, las cuales pueden ser madres bajo la propiedad de la ventana `FormStyle=fsMDIForm`; las madres contienen ventanas hijas que se incluyen poniéndole a la propiedad `FormStyle=fsMDIChild`. La ventaja de todo esto, es tener varias ventanas almacenadas en una sola sin necesidad de involucrar en un problema al usuario al abrir muchas imágenes y no tenerlas organizadas de forma adecuada, además de que cada ventana con su imagen puede ser seleccionada desde el Menú Ventana de Sagefh. Otra ventaja es la de crear una sola clase de ventana para una imagen, y si queremos otra imagen solo se implementara esa clase-ventana creando un nuevo objeto, para colocar la nueva imagen y así sucesivamente. Existen otras ventanas o formas que tienen la capacidad de recibir datos para después procesarlos en las imágenes, esas ventanas no son hijas y tienen la propiedad de poder salir de la ventana madre. En Sagefh solo existe una ventana madre que es la principal de todo el programa y sólo serán hijas las que contengan las imágenes, las demás ventanas son ventanas normales que no manejan esas propiedades de madre e hija y solo tienen asignado el valor `fsNormal` o `fsStayonTop`; esta última para mantener la ventana encima de todas hasta que obtenga el dato que pide, pero pudiendo mover otras ventanas. Otra forma de manejar las ventanas que piden datos es al mostrarlas por decir la forma de Imagen Nueva que fue mostrada así: `NuevaImag.ShowModal` la ventana se llama `NuevaImag` y `ShowModal` es una propiedad que muestra la ventana y no permite ejecutar otra opción mas que lo que pide la propia ventana, se podrá realizar otra acción hasta que se ingresen los datos necesarios y aceptándolos o bien cerrar esta ventana. Estas últimas propiedades, se manejan dentro de Sagefh para tener un control de todas las ventanas que se manejan en el programa y no crear con ello riesgos de inestabilidad o confusión por parte del usuario, además de que permite tener el control de todas las acciones del programa y tener una respuesta adecuada a cada una de ellas y no tener resultados inesperados.

Por otra parte como se mencionó en el Capítulo 4 existen las ventanas hijas llamadas `Form1` las cuales contienen las imágenes y se realizan ahí las principales funciones del sistema, tal y como vemos en la Fig. 5.7. Al momento de cargar las imágenes estas se cargan en su formato original primero, después se pasan a una variable heredada `Bitmap` de la clase `TBitmap`, la cual esta última es un mapa de bits de la imagen y es como se manejará en todos los procesos del programa; ya por último para hacerla compatible con los procesos que se realicen con el programa se con-

vierte a formato de 24 bits mediante `Bitmap.PixelFormat:=pf24bit` permitiendo manejar de manera más fácil los 3 canales básicos con colores Rojo, Verde y Azul: RGB; ya que cada canal tendrá asignado 8 bits para representar una tonalidad de color o de gris en su caso. Delphi con tan solo algunas instrucciones puede hacer todo esto, permitiendo usar muy poco código en la aplicación, tan solo por decir con la instrucción: `Bitmap.Canvas.Pixels[x, y]` permite acceder a cualquier píxel de la imagen y poder procesarla. Al final para guardar la imagen el Bitmap se pasa al formato que se quiere guardar la imagen quedando así grabada en cualquier medio de almacenamiento, todo esto con la opción Guardar o Guardar como de Sagefh.

El siguiente procedimiento es para poder abrir una imagen, dándose el nombre y su ubicación en la variable de entrada `NombreIm`, con el se comentan algunas cosas de lo que se explicó anteriormente:

```
PROCEDURE AbrirImagen(NombreIm: String);
VAR
  Declaración de variables para los tipos de imágenes
BEGIN
  Inicialización de variables
  Se comprueba si la imagen escogida ya fue abierta
  Según el tipo de imagen se le asigna un número
  CASE TipoImagen OF
    1: BEGIN
      TRY
        Se ejecutan procesos para cargar una imagen JPG
      EXCEPT
        Se manda mensaje de error al no poder abrir la imagen
      END;
    END;
  ... Demás opciones del CASE para abrir el formato de imagen correcto
  ELSE
    BEGIN
      Se manda mensaje de error de que el archivo gráfico seleccionado no es soportado por el programa.
    END;
  IF NoAbre=FALSE THEN // Si se pudo abrir la imagen
    BEGIN
      Form1:=TForm1.Create(Application); // crea una ventana MDI hijo
      ...
      Bitmap.PixelFormat:=pf24bit; // Se maneja este formato para cualquier imagen
      ...
      // Asigno Bitmap a la ImageForm1 de la Form1 hija actual
      Form1.ImageForm1.Picture.Bitmap.Assign(Bitmap);
      ...
      ObtieneMatSel(Form1.ImageEspejo.Picture.Bitmap); // Matriz de bits
    END;
  ...
  Se manda un mensaje de error si la imagen seleccionada ya fue abierta anteriormente
  END;
```

5.3.1 Del manejo de Imágenes

Ahora bien profundizando a detalle, en la forma de manejo de nuestras imágenes en Sagefh se explica lo siguiente, que al abrir una imagen se crea lo siguiente para poder usarlas:

1. La imagen se carga en una instancia BitMap de la clase TBitMap.
2. La matriz bidimensional MatSel se pone todo a 178 lo que indica que no hay nada seleccionado. Tiene un tamaño igual a la imagen.

Y cuando se ejecuta cualquier proceso, ya sea un filtro o un histograma por decir, entonces se crea una matriz tridimensional Matriz1 donde se cargan los valores R, G, B de la imagen, esto se hace para usarla con Scanline y el proceso sea rápido.

Se hace mención de que en los procesos la situación es la siguiente:

1. Se obtiene Matriz1 para realizar el proceso a través de PasaMatriz(BitMap,0,Matriz1);
// Para el Scanline
2. MatSel ya esta cargada
3. Se ejecuta el proceso seleccionado dentro de una condición MatSel[x,y]<>178
4. Después se crea una nueva instancia Form1
5. Se regresa el resultado a la nueva Form1 a través de Mostrar(Matriz1,BitMap);
6. Se libera Matriz1 a través de PasaMatriz(BitMap,1,Matriz1);
// Para el Scanline esto se hace para no ocupar memoria innecesariamente.

Cabe hacer mención que MatSel[x,y] se modifica según lo que ocurra en ImageEspejo, o para pintar la selección, 178 para especificar lo que no se procesará en la imagen cuando haya alguna selección, con 255 lo que si se procesará y que como se dijo tiene un ancho y alto de igual tamaño que la imagen. Matriz1, tiene también un Ancho y Alto igual a la imagen, con fondo de 3, esto para R, G, B de cada píxel de la imagen, es decir, en Matriz1[x,y,z], x y y toman valores máximos de ancho y alto respectivamente y z toma valores 0, 1, 2 en R, G, B respectivamente.

Ahora bien en el programa solo se maneja una sola MatSel y una sola Matriz1 cuando se realiza un proceso, puede existir una Matriz2 si la operación requiere dos imágenes, ya que cada imagen requiere un Matriz de Bits para cada Scanline y hacer más rápidos los procesos. Para MatSel, ésta se actualiza cuando se cambia entre las Form1 a través de:

```
procedure TForm1.FormActivate(Sender: TObject);
procedure TForm1.FormDeactivate(Sender: TObject);
```

Esta actualización se hace sin importar si hay un zoom entre las imágenes contenidas en las Form1, MatSel se actualiza al tamaño original de la imagen y si hay ampliación o reducción (zoom) solo en ImageEspejo se redibuja la selección al tamaño de la imagen en ese momento, las variables internamente se dejan al tamaño original o real.

Por otra parte, en las imágenes uno puede colocarse en tiempo real sobre ellas y obtener en la barra de estado la posición actual del cursor y su descomposición en R, G y B del píxel donde se encuentra uno, esto al investigador le es de ayuda, ya que puede ver los cambios de coloración entre diferentes contornos de objetos o células que hay en la imagen.

```
p:=ImageForm1.Picture.Bitmap.Canvas.Pixels[X,Y]; // x,y reales en ImageForm1
// Se descompone R,G,B
R:=(p and $FF);
G:=(p and $FF00) shr 8;
B:=(p and $FF0000) shr 16;
```

Cabe aquí hacer mención que los resultados mostrados en la Barra de Estado son obtenidos directamente de la ImageForm1 contenida precisamente en Form1, haya o no un zoom, esto para obtener datos exactos según donde se encuentre el cursor; ya para los procesos internos se realiza por medio de imágenes en tamaño real, esto se logra ya que cada Form1 tiene una instancia TBitmap llamada BitmapLocal y esta tiene tamaño real sin importar lo que se este haciendo en ImageForm1, por lo cual lo mostrado en procesos son reales y no son alterados por los zoom usados por el usuario y el StretchDraw que maneja Delphi para cambiar de tamaño las imágenes en los TBitmap.

5.3.2 Implementación de Form1

Hasta ahora se hablado del manejo de las imágenes y algunas partes donde se manejó el Contenedor de Imagen o Form1 como se maneja internamente en Sagefh. Form1 como se ha explicado es una parte esencial se nuestro programa ya que ahí se manejan partes importantes además de ahí esta la fuente de información para todas las ventanas del programa y de ser el visualizador final de la imagen en la IHM. Fig. 5.7. Como se ha dicho Form1 contiene 3 contenedores de la clase TImage: ImageForm1, ImageEspejo e ImagePaste. En ImageForm1 será colocada la imagen abierta del cuadro de diálogo Abrir Imagen donde el usuario seleccionó una imagen de su medio de almacenamiento, sea disco duro, disquette, CD o memoria USB. La segunda ImageEspejo será de color transparente y en ella se realizarán la selección cuadrada, circular o con líneas; además de que dando clic con el botón derecho del mouse desplegará un menú de opciones de zoom para la imagen cargada en ImageForm1. La ImagePaste en donde se colocarán porciones de imágenes previamente cortadas de otra imagen o de la misma.

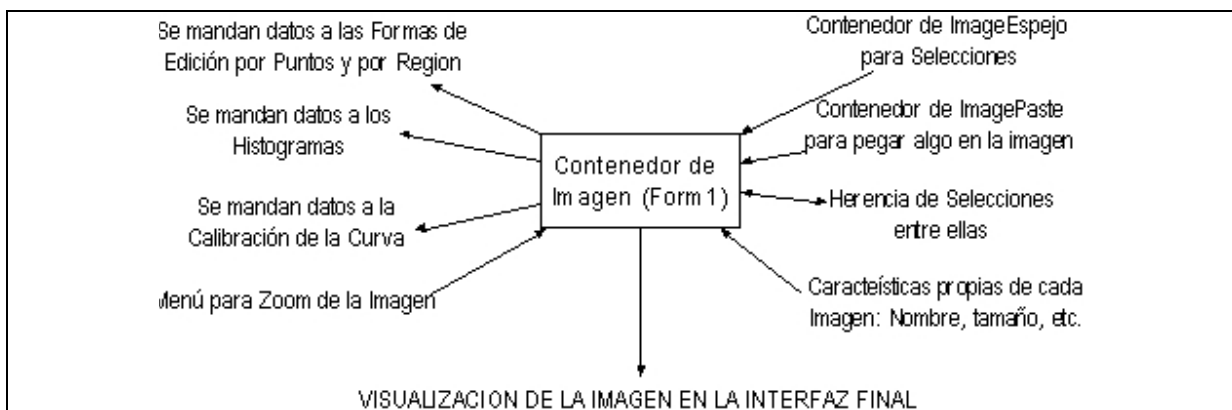


Fig. 5.7 Características esenciales de Form1 para interactuar con todo el sistema Sagefh

Una de las características importantes de Form1 es que en ImageForm1 se hace el zoom de las imágenes, procediéndose se la siguiente manera:

- 1.- El usuario da clic con el botón derecho sobre la imagen y selecciona su zoom.
- 2.- En el programa:
 - a. Se obtiene el factor de zoom seleccionado (Ver. Sección 4.1.4)
 - b. Se ejecuta el procedimiento Zoom(FactorZoom) en donde se amplía la imagen en ImageForm1 y se actualizan todas las variables.
 - c. Si existe alguna selección hecha, también se amplía o disminuye dicha selección.

Los procedimientos se encuentran dentro de la Ventana Principal madre, para que estén disponibles para cualquier imagen, sin necesidad de repetir código en cada Form1. El procedimiento para Zoom es el siguiente:

```

PROCEDURE Zoom(Factor: Single);
VAR
  Tt: Byte;
  Medida: TRect;
BEGIN
  FOR Tt=0 hasta Principal1.MDICHildCount-1 DO // Se busca la ventana que se le hará el zoom
  BEGIN
    IF nombre de la imagen es igual al de la ventana THEN
    BEGIN
      WITH ActiveMDICHild AS TForm1 DO // Ventana actual
      BEGIN
        Se le asigna a la ImageForm1 y a su Bitmap las nuevas medidas con base al  Factor
        ...
        ImageForm1.Picture.Bitmap.Canvas.StretchDraw(Medida,BitMap); // Se redimensiona la
imagen
        ...
        Se actualiza la selección si es que la hay.
        ...
      END;
    END;
  END;
END;

```

Medida es una instancia de TRect la cual permite guardar 4 medidas de un rectángulo, en nuestro caso son las nuevas medidas del tamaño que tendrá nuestra nueva imagen. Obsérvese que dado que se pueden manejar varias ventanas hijas, se busca la ventana que tiene el Nombre de la imagen que el usuario escogió para dar zoom.

5.3.3 De la Calibración de la Curva

Otra parte técnica importante como se ha dicho desde inicio de este proyecto, es la creación de la forma de la Calibración de la Curva, la cual incorpora varias funciones:

- La incorporación de datos tipo numéricos decimales a través de campos derivados de la clase TEdit de Delphi, que es una caja de texto de una sola línea. Todos los datos que se ingresen en estos campos están validados por si el usuario ingresa datos incorrectos o que no correspondan al experimento según el isótopo seleccionado. Cuando hay un error, el programa marca que tipo de error es y regresa el cursor a donde fue ocasionado dicho error.
- La selección del tipo de uso de isótopos radioactivos, su actividad específica y su escala de actividad y el tipo de gráfica a realizar se seleccionan de datos ya definidos por cuadros de desplegado de opciones, derivados de la clase TComboBox.
- Otros cuadros son los derivados de la clase TMemo, que son plantillas que reciben datos del tamaño que sean a lo largo y en varios renglones. Se usan en las series a graficar X y Y, en el error estándar de la media de cada dato dado y en la exactitud de la curva en cada dato.
- Por último, está la parte donde se grafican los datos X y Y, un componente derivado de la clase TChart el cual permite a través de un eje X y Y realizar graficaciones de datos en diferentes formas y estilos en 3D, en círculo en barras o en líneas o puntos, para nuestro programa será en los dos últimos.

Todos los datos X pueden ser manejados de forma directa por el usuario o bien pueden ser obtenidos a través de la Form1 cuando el usuario quiere obtenerlos directamente de la Imagen, esto se logra gracias a ImageForm1 a través de sus eventos de clase OnMouseMove, OnMouseDown y OnMouseUp que son propiedades que permiten la obtención y envío de información a través de las demás ventanas de Sagefh. Además se da la posibilidad al usuario de poder guardar los datos numéricos y mas adelante volver a cargarlos para no repetir el experimento, así como también si lo desea puede guardar la grafica de los datos y su ecuación aproximada.

5.3.4 De las demás ventanas de Sagefh

En el programa existen otras ventanas que tiene una relación directa también con la Form1. Para empezar diremos que existen algunas ventanas como Propiedades de Imagen, Calculadora de Imágenes, Brillo y Tamaño de la Imagen que tienen en su interior una previsualización total de la imagen, esto se logra al reducir la imagen original de Form1 en cuestión, a través de la clase TImage en su propiedad StretchDraw con el procedimiento:

```
Procedure RedimensionaParaProg(var BmpOrig: TBitmap; MaxAncho,MaxAlto:Integer);
```

Este procedimiento toma la imagen original a través de BmpOrig y el resultado ya reducido lo regresa en esa misma variable; MaxAncho y MaxAlto son los valores máximos a tener la imagen en su ancho y alto. En esas últimas variables, el procedimiento primero verifica que si reduciendo al MaxAncho, el alto no rebasa al MaxAlto, si se rebasa entonces se reduce primero el MaxAlto y después su ancho de la imagen, esto con el fin de tomar solo una medida y sacar la proporción de cuanto se debe reducir en su ancho y en su alto; y este sea proporcional en ambos lados. No se puede sacar la proporción independientemente en el ancho y el alto de la imagen porque sino esta no guardará su proporción original y se distorsionaría. Para lograr esto se sigue lo explicado en el Redimensionamiento de una Imagen de la sección 4.1.4. del Capítulo 4 de esta tesis. En Previsualización antes de Imprimir también se sigue la misma metodología de reducción de la imagen para colocarlo sobre otra imagen en blanco con medidas proporcionales a una hoja tamaño carta de 27.9cm x 21.5cm, esto con el fin de mostrar al usuario como se verá la hoja antes de imprimir en una hoja de ese tamaño.

Del Histograma se maneja también una imagen donde precisamente se pondrán la frecuencia de los valores de RGB en sus diferentes niveles. El usuario podrá ver solo un color, 2 o los 3 al mismo tiempo, además se colocó un apartado de Información Adicional donde podrá ver la cantidad de R, G o B en cada nivel de 0 al 255, con tan solo mover el cursor sobre la imagen del histograma, previamente seleccionado el canal en cuestión a través de un ComboBox. Se tiene también la opción a través de botones de escoger el tipo de Histograma a realizar. Al final se tiene la información del promedio de píxeles de la imagen con base a su tonalidad de grises en la región total de la imagen o en la seleccionada si es que la hay, que se obtiene a través de MatSel que es la matriz que nos indica que píxeles de la imagen se procesan y también se muestra el Error Estándar del Promedio SEM.

Otra ventana sencilla en el Editor de Texto que es una herramienta necesaria para la edición de archivos de texto sencillo y de los archivos de calibración de Sagefh. Esta ventana maneja un objeto de la clase TMemo, donde se cargará el texto y que por medio de un TStringList que es una clase que maneja texto a través de un arreglo de líneas de texto. Ya sea para cargar o guardar se usa TStringList y TMemo sirve para visualizarlo en la forma del Editor. Este Editor solo cuenta para crear un nuevo archivo, para abrir y para salvar.

5.3.5 Los Filtros de las imágenes

Llamaremos Filtros aquellos procesos que trabajan de manera directa con los píxeles de las imágenes y se realiza cualquier actividad con ellos, para mostrar algún cambio o característica esencial de la propia imagen. En Sagefh, los filtros son aquellos como el Negativo, Binarización, la asignación de colores falsos, grises, etc. Ahora bien los filtros aún van mas allá de los píxeles, ya que se manejan, su descomposición en el sistema de colores RGB esto para obtener características reales y que para ello se usará el scanline para lograr hacer los procesos mas rápidos, ya que como se dijo las operaciones se hacen directamente en memoria y no en la imagen que esta en disco.

Veamos el siguiente pseudocódigo empleado para pasar una imagen de colores a una imagen en tonalidades de grises; es un ejemplo a nivel general de como se realiza cualquier filtro de las imágenes:

```

PROCEDURE Grises1Click(Sender: TObject);
VAR
  x,y,gris:integer;
BEGIN
  IF Existe una imagen abierta THEN
  BEGIN
    Se obtiene Ancho y Alto de la Imagen
    Se obtiene la selección si es que la hay
    Se pasa al scanline, obtención de Matriz1
    ...
    FOR X=Inicio Selección Ancho hasta Fin de Selección Ancho -1 DO
    BEGIN
      FOR Y=Inicio Selección Alto hasta Fin de Selección Alto -1 DO
      BEGIN
        IF Píxel[x,y] se procesa según MatSel THEN
        BEGIN
          Se realizan procesos del filtro
        END;
      END;
    END;
  END;
  ...
  Form1:=TForm1.Create(Application); // crea una ventana MDI hijo
  ... Se ejecutan procesos para poner la imagen en la nueva ventana
  ...
  Se continúa la selección en la nueva ventana, si es que la hay
  END
  ELSE
    Mensaje de error al no haber una imagen abierta
  END;

```

En la parte donde se realizan los procesos de los filtros pueden hacerse cambios de colores, el negativo, la binarización o según lo que se requiera y esté implementado en nuestro sistema. En general existen muchísimos filtros que se pueden aplicar, pero aquí se implementaron los que el usuario solicitó y los que se pensó que en un momento dado podrían ser útiles en el manejo de las imágenes, según los estudios fisiológicos e histológicos que él realiza.

Para los procesos de asignación de colores falsos estos se hacen dividiendo el plano de las 256 tonalidades de grises en 5 y 8 capas para que a cada capa se le asigne un determinado color. También se hace saturando los grises en un solo canal de color, ya sea rojo, verde o azul, es decir, RGB y estos se pueden aclarar u oscurecer. Otra forma es tomar los píxeles de alrededor para ajustar el píxel central que es el que se procesara bajo un Filtro Paso Alto.

Aquí cabe hacer mención que debido a que los filtros se dividen en puntuales y matriciales, prácticamente se manejan 2 procedimientos, en donde cada procedimiento a través de un case se pueden escoger cualquier filtro a través de una variable de entrada que nos dice que tipo de filtro el usuario seleccionó. El case se coloca en donde se realizan los procesos de filtro, con lo cual reduce el tiempo significativamente, ya que no se duplica, triplica o mas veces el código restante dentro de la programación. En el caso del filtro espejo, si se manejan otros 2 procedimientos en X y Y, ya que el resultado se va obteniendo y pasando en otra matriz, para después dejarla en la imagen de la nueva Form1.

5.3.6 Aplicación de las selecciones entre las Form1

Para concluir con nuestro Capítulo, hablaremos un poco de la implementación de la aplicación de las selecciones entre las imágenes. Como se ha mencionado existen 4 tipos de selecciones diferentes disponibles para el usuario, la Selección Cuadrada, Circular, Libre con líneas y Libre Total, cada una de ellas programada en las Form1 de forma independiente.

Para ello nos auxiliamos de los eventos OnMouseMove, OnMouseUp y OnMouseDown de ImageEspejo contenida en Form1, que son 3 eventos en tiempo real que observan el comportamiento del puntero del mouse sobre la imagen en la que se este trabajando.

OnMouseMove: Ve el comportamiento del puntero sobre la imagen, regresando valores como su posición y si existe un botón del mouse presionándose.

OnMouseDown: Regresa el estado del mouse cuando se ha presionado un botón y la posición donde se hizo.

OnMouseUp: Regresa el estado del mouse cuando se ha soltado el botón presionado y en que posición se realizó.

Los 2 últimos eventos actúan bajo los mismos principios pero difieren, el primero ve cuando se presiona algún botón del mouse y el segundo cuando se suelta, ambos pueden ser en la misma posición o en posición diferentes.

La selección empieza primero cuando el usuario escoge alguna opción de selección, acto seguido se da un clic sobre la imagen y se activa OnMouseDown y el usuario empieza su selección moviendo el puntero del mouse y controlándose con OnMouseMove, para finalizar o continuar con otro trazo de la misma selección con otro clic tomando ahora el evento de OnMouseDown para ver lo que el usuario realizó. Si la selección termina se toma un rectángulo imaginario para encerrar la selección sea cual sea y así poder crear MatSel. A medida que el usuario selecciona algo OnMouseMove se van censando para determinar coordenadas inicial y final de selección, sólo se tomarán coordenadas (x, y) de la esquina superior izquierda y de la esquina inferior derecha, lo que las coordenadas serían:

Esquina Superior Izquierda : (InicAncho, InicAlto) = (x_1, y_1)

Esquina Inferior Derecha: (FinAncho, FinAlto) = (x_2, y_2)

Con lo cual MatSel sería una matriz bidimensional con tamaño de Ancho=FinAncho-InicAncho y de Alto=FinAlto-InicAlto, con lo cual en todos los procesos de las imágenes se manejan estas coordenadas para procesar los píxeles que el usuario haya seleccionado. Si no existe alguna se-

lección las dimensiones de MatSel son las dimensiones de la propia imagen. La forma de decir que píxeles se procesan en MatSel fue explicado ya en el Capítulo 4.

Ahora bien para las selecciones Cuadrada y Circular nos auxiliaremos de una variable del tipo TRect esto para aplicarla a los procesos:

```
ImageEspejo.Canvas.Rectangle(ARect); // Para pintar un rectángulo
```

```
ImageEspejo.Canvas.Ellipse(ARect); // Para pintar un círculo o elipse
```

ARect es del tipo TRect y que como se dijo guarda 4 valores de coordenadas como si fuera el rectángulo imaginario que se explicó previamente. Esos 2 procesos pintan sobre la ImageEspejo un cuadrado o un círculo o una elipse según lo que el usuario haya seleccionado y hecho; y se ejecutan en OnMouseDown.

Para las selecciones Libre con Líneas y Libre Total, en la primera el usuario empieza con un clic y con cada clic se pinta una línea, al final el usuario tiene que unir el punto inicial de la primera línea con el último punto de la línea final, para que con ello se cierre la selección. Primero el usuario hará todas las líneas necesarias para su selección mientras se van guardando las coordenadas iniciales y finales de cada línea para que al final cuando termine a través de un FOR se pinten todas las líneas de su selección con:

```
ImageEspejo.Canvas.MoveTo(Puntos[kk].x,Puntos[kk].y);
```

```
ImageEspejo.Canvas.LineTo(Puntos[kk+1].x,Puntos[kk+1].y);
```

Donde Puntos es arreglo del tipo TPoint donde se guardan valores (x,y) para cada punto inicial y final de cada línea pintada.

Para selección libre total solo se hará con dos clics el inicial y el final, ambos terminaran aproximadamente en la misma posición para cerrar la selección. Aquí se hará con múltiples líneas mientras el usuario mueva el cursor sobre la imagen, cada coordenada de cada línea se ira guardando para al final tener todo un arreglo de coordenadas de toda la selección, que se irán guardando en Puntos.

Tanto para la selección libre con líneas y total, para poder cerrar la selección se tiene que dar clic exactamente en la misma posición por donde se empezó. Esto a veces por el tamaño de la imagen o por la resolución del monitor resulta imposible, por lo cual se tiene un rectángulo de confianza con un área de 100 píxeles, que en realidad es un cuadrado de 10x10 píxeles, esto para que el usuario tenga oportunidad sin problemas de cerrar su selección de manera manual, aunque de manera automática a través de un menú se puede hacer. Todo esto lo podemos ver en la Fig. 5.8 donde se observa que la línea inicial con la final no se encuentra unida, pero si el usuario terminó su selección dentro del rectángulo de confianza, el sistema automáticamente cerrará la selección y unirá el punto inicial con el punto final, quedando lista la selección para cualquier proceso.

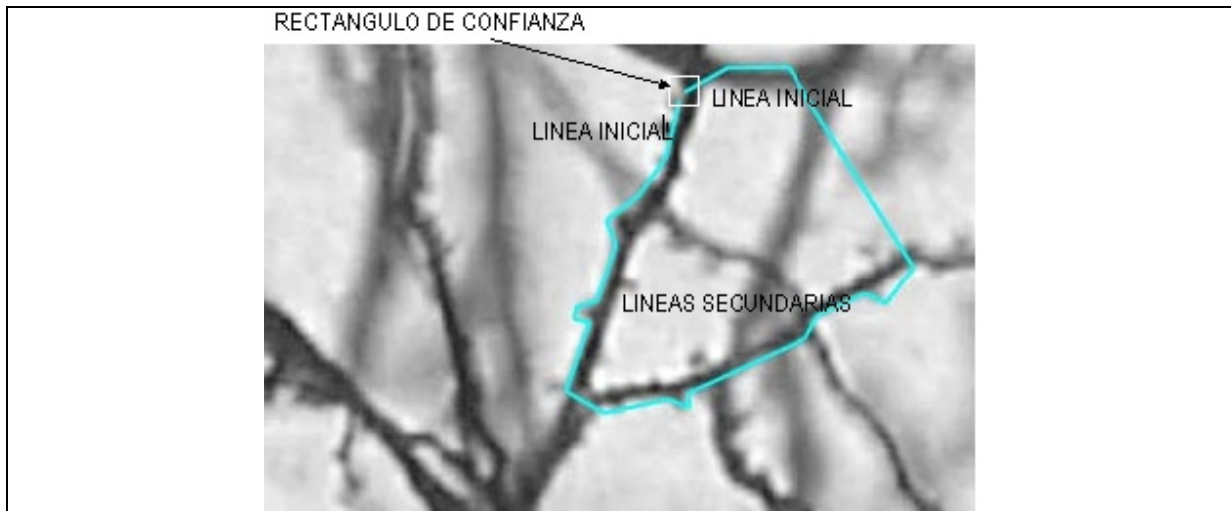


Fig. 5.8 Forma de trabajo de las selecciones Libre con Líneas y Total con las características que lo conforman.

Dentro del rectángulo de confianza el sistema, a través de un procedimiento buscará que el punto final se encuentre entre los 100 píxeles posibles, si lo está se termina, sino se deja a que el usuario siga seleccionando.

Ahora bien después de haber seleccionado las coordenadas que se guardan en Arect o en Puntos se ajustan al tamaño real de la imagen, esto para que cuando se ejecute un proceso se realicen sobre datos reales, además de esos datos permitirán redibujar la selección si el zoom en la imagen cambia. Cada Form1 contiene sus propias coordenadas Arect o Puntos con lo cual se puede hacer diferentes selecciones en las ventanas de las imágenes, teniendo así un control mas exacto de toda imagen abierta en Sagefh. Esto último se logra con las instrucciones:

```
Puntos[kk].x:=Round(Puntos[kk].x*(Ancho/ImageForm1.Picture.Bitmap.Width));
Puntos[kk].y:=Round(Puntos[kk].y*(Alto/ImageForm1.Picture.Bitmap.Height));
```

Que finalmente es una regla de tres para ajustar el zoom de la imagen con el ancho o alto real y así obtener un factor de amplificación (si es que lo hay), para después obtener los datos reales de una imagen original sin zoom. Además también por ser Form1 una ventana, si se tiene algún movimiento en alguna barra de desplazamiento, también esos valores son tomados en cuenta para saber los píxeles reales donde se esta seleccionando.

Al final, para realizar una selección se tomaron varias características, como posiciones, movimientos de ventana, zoom en las imágenes, control de la selección para no salirse de la imagen y el respaldo de los datos para cada Form1, que como se dijo permite tener una selección de forma independiente entre las diferentes imágenes que pueden estar abiertas en el sistema, dejando un control al usuario para hacer cualquier proceso, además de que si se selecciona, al ejecutar un proceso, la nueva ventana heredera la selección previa para que así el usuario pueda seguir ejecutando mas procesos sobre la misma selección en diferentes Form1. Esto último se logra con el procedimiento:

```
PROCEDURE ZoomSeleccion(var ImageZ:TImage; FactZ: single);
VAR
  GRect: TRect;
  kk,cont2:Integer;
  PP: PuntosSel;
```

```

BEGIN
  Se obtiene los datos de TRect en GRect
  IF BandRect=1 THEN
    Se ejecuta proceso para pintar un cuadrado
  IF BandCirc=1 THEN
    Se ejecuta proceso para pintar un círculo o elipse
  IF BandLibre=1 o BandLibreTotal=1 THEN
    BEGIN
      Se obtiene Puntos en PP
      Se ajustan al factor de zoom actual de FactZ
      ...
      FOR Kk=0 hasta cont2-2 DO // Pinto la selección en ImageZ
        BEGIN
          ImageZ.Canvas.MoveTo(PP[kk].x,PP[kk].y);
          ImageZ.Canvas.LineTo(PP[kk+1].x,PP[kk+1].y);
        END;
      Se une el punto inicial con el final
    END;
  END;
END;

```

Donde ImageZ es la parte en que se pintará la selección y FactZ es el factor de ampliación existente. Este procedimiento lo que hace es obtener de la Form1 la variable del tipo TRect o Puntos, para después dependiendo de la selección pintar sobre la ImageZ la selección con el zoom especificado en FactZ, o en tamaño real si FactZ=1; en sí el procedimiento es sencillo. Para la obtención de los valores de Trect y Puntos, se crearon procedimientos en Form1 los cuales permiten ese paso de valores, los procedimientos son Dase1 y Dase2.

Existen otras características particulares de Sagefh que permiten cumplir todos los requisitos solicitados por el usuario, pero explicarlos en general llevaría más tiempo, considerando que aquí se destacan los mas importantes, los cuales permiten que el programa trabaje de la mejor manera. En el siguiente Capítulo veremos las pruebas y resultados de la implementación técnica aquí explicada.

Capítulo 6

PRUEBAS, RESULTADOS Y COMPARATIVAS DEL SISTEMA SAGEFH

Llegamos a la parte final de nuestro proyecto de tesis, aquí mostraremos los resultados con nuestro sistema ya trabajando; las pruebas realizadas y lo obtenido de ellas, así como algunas comparaciones entre los resultados del programa con los de otro software.

Nuestro programa fue desarrollado para simplificar y mejorar procedimientos que ya se realizaban en el Instituto de Fisiología, con lo cual el software se sometió a pruebas con los diferentes usuarios que lo utilizarían, y ellos mismos además hicieron pruebas y comparaciones con resultados obtenidos usando otro sistema y los de Sagefh.

Debido a que las pruebas del software son un elemento crítico para la garantía de su calidad, representa una revisión final de las especificaciones del diseño y de la codificación [3]; y en esos 3 ámbitos se debe tener seguridad que no falla nuestro programa, además de cumplirse los requisitos que el usuario haya solicitado.

Algunos defectos encontrados fueron corregidos y el resultado es un software que trabaja ahora de la mejor manera posible con ellos. Aun así Sagefh tiene mucho por delante, pero el tiempo permitirá que otros programadores hagan nuevas ampliaciones.

Sea pues y adelante entremos en este capítulo para conocer los resultados de trabajar con Sagefh.

6.1 Funcionamiento interno y externo de Sagefh

Las pruebas son algo fundamental para comprobar que efectivamente el software este trabajando de la mejor manera, tanto en su codificación como en su interfaz que el usuario manejará sin caer en ambigüedades lógicas de programación y sin dejar al usuario con las preguntas ¿Qué paso? ¿Qué hice mal? al operarlo.

Para empezar en nuestro programa nos basaremos en las facilidades de prueba del software para ir asegurando que es un software que cumple principios básicos de calidad, esas facilidades son:

Operatividad: Eso nos dirá que los errores no dejan sin servicio a nuestro software, y que para ello nosotros en Sagefh validamos todos los errores posibles como el de la Fig. 5.5 o al menos todos aquellos que surgieron y los que el usuario nos comentó en sus pruebas. Por solo mencionar un error que el usuario dijo, fue que los datos de Edición por Punto y Región no se guardaban de forma correcta en formato para Excel, pero se tenía la opción de guardar en Texto. Este error no dejó fuera de servicio al programa, pero se corrigió a tiempo.

Observabilidad: Esto nos dice que todo los datos que ingresamos podamos verlos durante la ejecución del programa hasta su resultado y si hay error en ellos poder corregirlos, y eso también se cumple ya que Delphi permite a través de su menú Run varias opciones para revisar en tiempo de ejecución el estado de las variables y de los datos, y si hay un error detenernos para hacer las correcciones debidas.

Controlabilidad: Similar a la Observabilidad, donde podamos tener control de todo lo que pasa internamente en nuestro software, con lo cual Delphi permite detenernos en cualquier momento de la ejecución de nuestro código.

Capacidad de descomposición: Esto nos permite tener control de todo nuestro código para hacer pruebas por separado y con lo cual Sagefh lo cumple ya que es un programa que fue hecho en un lenguaje orientado a objetos, además de que todos los procesos son hechos en procedimientos y funciones permitiendo tener mas capacidad para ver cada modulo de la interfaz.

Simplicidad: Este nos pide tener la facilidad de corregir errores en nuestro programa, con lo cual teniendo el punto anterior donde todo se programó con procedimientos, funciones y clases se consigue en Sagefh, además de que la estructura de programación es igual en todo el código. Aquí se aplicaría una pequeña restricción en el módulo que permite abrir las imágenes en Formato Tiff ya que varía poco en la estructura de codificación. La simplicidad también se aplica en la facilidad de tener un software que el usuario trabaje de la manera más sencilla y entendible para él, lo cual Sagefh tiene una interfaz poco complicada.

Estabilidad: Nos dice que el software trabajará de forma igual después de las pruebas, claro corrigiendo los errores encontrados. Sagefh siendo procedimental y con módulos de clases, permite cumplir este objetivo, ya que si hay un fallo por decir en un dato erróneo, solo a través del procedimiento correspondiente corregir ese error sin tocar el resto del código, dando resultados óptimos. Se aplica restricción si los datos modificados no son parte esencial de toda la estructura interna y externa de Sagefh, como el cambio de trabajo de las imágenes de RGB a CMYK ya que ahí si habría cambios generales en todo el software.

Facilidad de comprensión: Esta parte se refiere a que todo lo de Sagefh tanto para el programador como para el usuario sea entendible. A través de los capítulos se ha explicado la metodología de trabajo, algoritmos y codificación, además de que en el Anexo D del Manual de Programa se explica el funcionamiento del programa con lenguaje común para que el usuario se dedique más a sus pruebas y resultados de sus estudios, que en entender la conformación del programa.

El fin de programar Sagefh en Delphi nos permitió tener un control sobre el código del programa, ya que los errores que iban apareciendo durante la codificación se fueron corrigiendo línea por línea y variable por variable y los módulos ya realizados se entregaban al usuario para su evaluación y si era necesario hacer cambios para un nuevo rediseño de la interfaz que el utilizaría, además de la corrección de errores que el encontraba. Delphi por ser procedimental, permitió tener unidades y pequeñas secciones de código, donde cada una de ellas tiene una función específica; si alguna de ellas falla puede ser corregida sin alterar el resto, viene al caso mencionar la Calibración de la Curva que tuvo varias correcciones hasta llegar al resultado que se entregó.

6.2 Requisitos Finales de Funcionamiento de Sagefh

Como se ha comentado previamente Sagefh fue desarrollado en Delphi 5 en Microsoft Windows XP, y las características para su adecuado funcionamiento ha sido probado en varios equipos de cómputo con plataformas Windows. Aquí mencionaremos los requisitos básicos con que fue probado Sagefh; que sin embargo pueden ser un poco menos, siempre y cuando el equipo tenga un

rendimiento óptimo en el sistema operativo instalado de Microsoft Windows en sus diferentes versiones. Sagefh funciona con las siguientes características mínimas:

- 1.- Computadora con procesador Intel Celeron a 600 Mhz
- 2.- Memoria mínima de 92 Mb RAM
- 3.- Disco duro de 4 Gb
- 4.- Sistema Operativo Microsoft Windows 98

Es lógico pensar que mientras más grandes sean las imágenes a utilizar mayor será necesaria la capacidad de la computadora, aunque con las antes mencionadas es suficiente para manejar imágenes de 800x600 píxeles o mas aunque el procesamiento será mas lento.

Sobre el punto 4 se comenta que se hicieron pruebas con los sistemas operativos Windows 98, 2000 y XP que son los más comunes. Para otros sistemas operativos como Linux, MAC OS o Solaris, Sagefh no tiene compatibilidad, se tendría que pasar el código para que se pudiera soportar en esos sistemas operativos. Pero al menos en el Instituto de Fisiología se tiene sistemas Windows con lo cual asegura su funcionamiento correcto para los usuarios.

Del punto 3, Sagefh solo ocupa en su instalación 1.6 Mb en su ejecutable y 2.15 Mb en librerías adicionales de Delphi necesarias para el software. Por lo tanto se requieren solo para Sagefh 3.75 Mb, el resto de espacio necesario es para crear imágenes que el usuario requiera o bien en un momento dado para procesarlas.

6.3 Prueba de la Caja Negra

Existe en la Ingeniería del Software muchas formas de hacer pruebas con los programas que se realizan, tal como la Prueba de la Caja Blanca y la Prueba de la Caja Negra. El primero se basa en analizar que todo el código al menos alguna vez se ejecuta, es la parte lógica de la programación y la segunda se encarga de analizar o buscar errores en las funciones, interfaz, estructuras de datos, rendimiento del programa y en la inicialización y terminación del mismo. Además la prueba de la caja negra se encarga de ver que todos los requisitos buscados en el sistema se cumplan sin ningún problema para el usuario final.

Para empezar se hicieron pruebas a las interfaces gráficas de usuario (IGU) ya que son la parte visual que el usuario tendrá enfrente al manejar el sistema Sagefh. Diremos que con un icono y un doble clic por parte del usuario, Sagefh se inicializará y cargará un mensaje splash de bienvenida y después se cargará toda la interfaz (ventana principal) tal como se muestra en la Fig. 6.1. todo en idioma español, lo que permite cumplir un objetivo de esta tesis de dar una herramienta en español y sin costo de licencia alguna para el Instituto de Fisiología. Dicha interfaz podrá ser manejada con el puntero del mouse o bien con el teclado o con metacomandos como CTRL+A para abrir una imagen que se realizan también desde el teclado, permitiendo al usuario tener un control total de Sagefh. Dentro de la ventana principal se cargan todas las imágenes que el usuario seleccione, pudiendo tener varias de ellas y teniendo control de ellas con el Menú Ventana donde se cargan todos los nombres de las imágenes abiertas, permitiendo al usuario cambiar de una a otra de ellas, con tan solo un clic del ratón. Obsérvese la Fig. 6.2 donde se tiene a Sagefh con varias imágenes abiertas de diferentes tamaños y diferentes formatos gráficos.

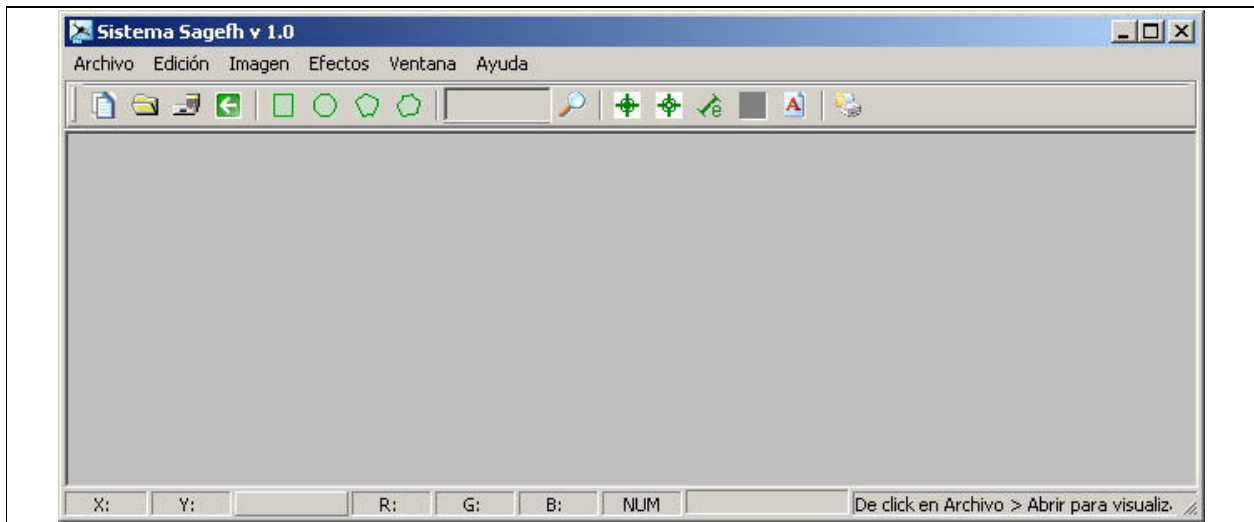


Fig. 6.1. Interfaz inicial y completa del Sistema Analizador Gráfico para Estudios Fisiológicos e Histológicos, donde se observa el aspecto de Simplicidad en su interfaz.

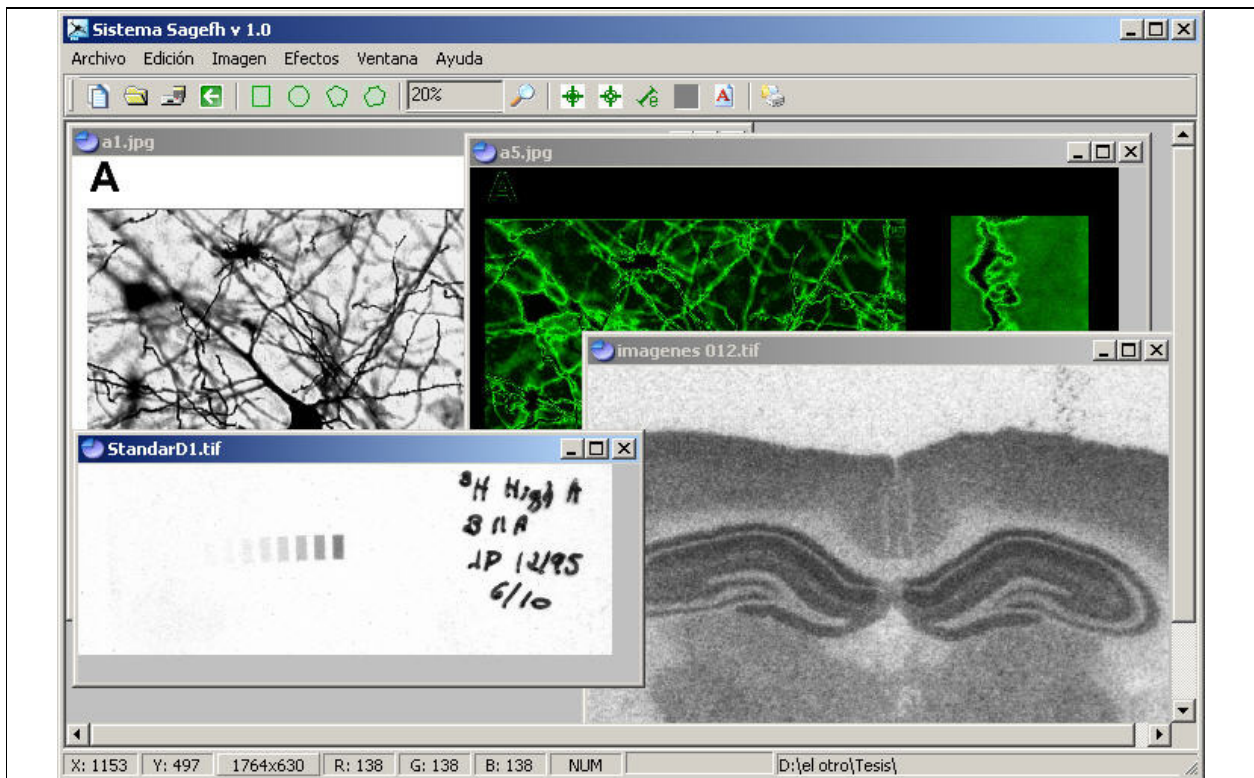


Fig. 6.2 Sistema Sagefh con la ventana principal albergando varias ventanas hijas que contienen igual número de imágenes abiertas.

En la Fig. 6.2 se tienen abiertas 4 imágenes, 2 tif y 2 jpg, además de que unas tienen aplicado un cierto zoom para poder visualizadas en el programa. Con ello se cumple el requisito de poder abrir varias imágenes de diferentes formatos (ya que se pueden abrir otros formatos), y de ser visualizadas al mismo tiempo. Cada imagen trabaja de manera independiente del resto de las demás.

Ahora bien dentro de la ventana principal se cargan todas las ventanas de trabajo del sistema Sagefh: Imágenes, Calculadora, Edición de puntos y región, Calibración de la Curva, Histogramas, Pseudocolor, Texto a la imagen entre otras. La diferencia en el manejo entre ellas es que las imágenes siempre están dentro de la ventana principal, y las demás pueden salirse o bien estarán hasta que el usuario acepte o cancele alguna acción, según corresponda a la ventana.

Una de las características incorporadas en Sagefh y que resulta de utilidad al investigador es la herencia de la selección entre imágenes según aplique diferentes filtros a las mismas.

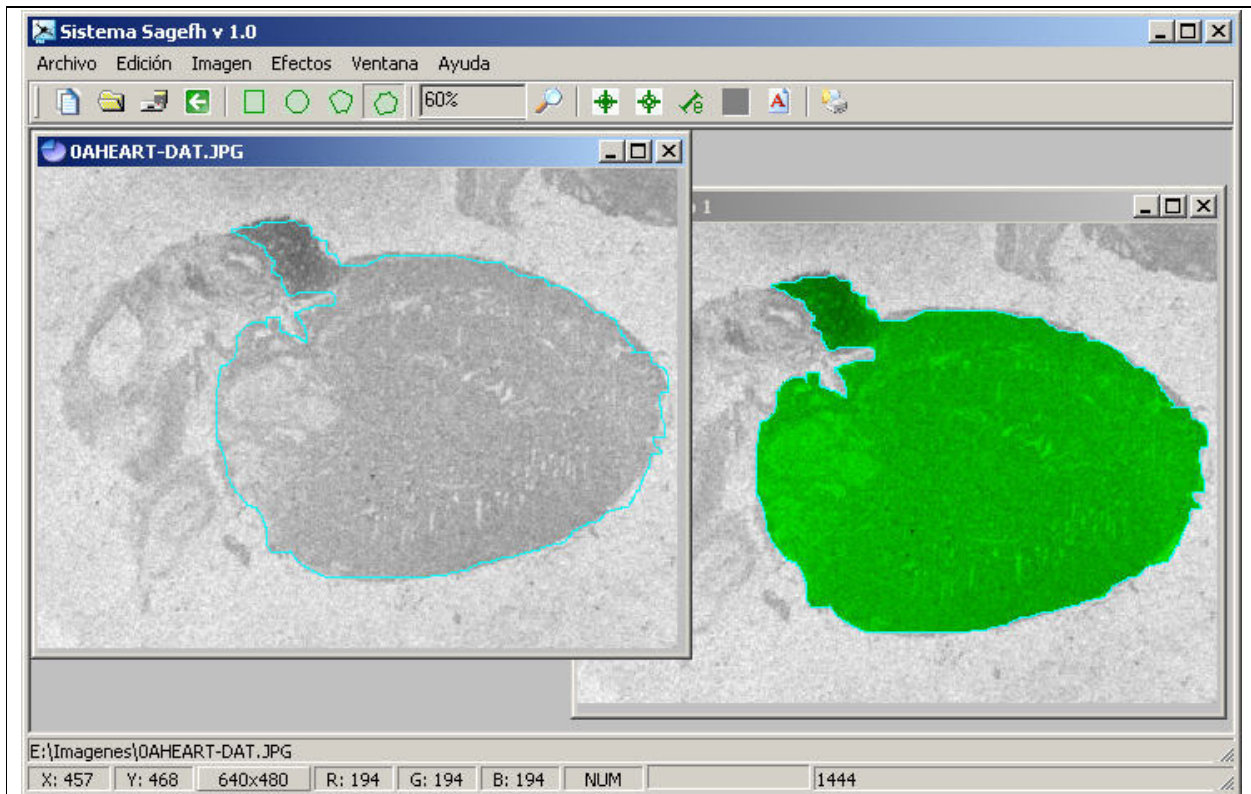


Fig. 6.3 La herencia de la selección después de aplicar un proceso de RGB a la imagen OAHEART-DAT.JPG que es la sección de un corazón.

Obsérvese la imagen de la Fig. 6.3 donde en la imagen OAHEART-DAT.JPG se seleccionó una célula y se le aplicó a esa porción una asignación de color, en este caso se aplicó una asignación total de verde a través de la opción Pseudocolor Monocromático R-G-B y el resultado es mostrado automáticamente en otra ventana, la cual lleva aplicada también la misma selección que la imagen origen, permitiendo al usuario aplicar más filtros a la misma porción de la imagen, teniendo con ello una exactitud de lo que se va aplicando; evitando con ello volver a seleccionar esa porción para evitar dar valores inexactos al resultado final, ya que después de esas operaciones se puede aplicar una Calibración de la Curva de donde se obtienen tonalidades de grises o en su caso un Histograma para ver la distribución y frecuencia de las mismas tonalidades.

La selección tiene una gran importancia en nuestro proyecto ya que de las selecciones, se utilizarán varias en diferentes procesos con la imagen. Para empezar se dio al usuario 4 tipos de selecciones posibles, tal como se ha mencionado en los capítulos anteriores, la Cuadrada, la Circular, la Libre con Líneas y la Libre Total cumpliendo un objetivo particular de este proyecto. Aparte de ser heredables las selecciones, también están disponibles si se hace un zoom a la imagen, es de-

cir, si previamente a un zoom se hace una selección, después de aplicado el zoom lo seleccionado seguirá abarcando la porción elegida por el usuario, sin importar si hace un efecto o no. La selección solo desaparece si se da un clic sobre la imagen después de haber seleccionado; lo que permite tener al usuario un mayor control con todo lo que seleccione.

Ahora veamos la parte de la Calibración de la Curva, con la cual nuestro proyecto de tesis redujo el tiempo de manipulación y obtención de datos al investigador, además de que ofrece otros datos para ver que la calibración de la curva con base a ellos, que se pueden obtener directamente de la imagen (como valores de intensidad o grises en píxeles o regiones) y de datos de las tablas de radioactividad de los isótopos utilizados en el experimento para poder ver estructuras de proteínas o algún elemento de una célula. Del lado derecho veremos el pintado de los datos así como la ecuación que se aproxime más a su comportamiento, teniendo varias ecuaciones para ello.

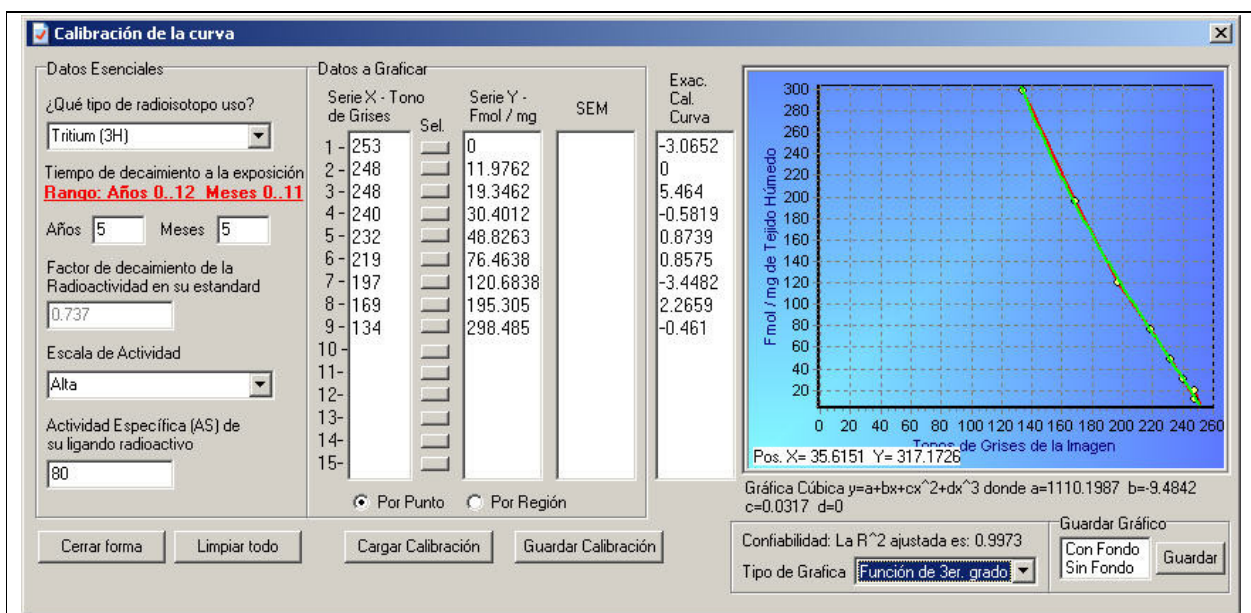


Fig. 6.4 Ventana en ejecución de la Calibración de la Curva, con datos ya insertados y la gráfica ajustada con la ecuación Logarítmica.

Aquí en esta parte de la Calibración se realizaron varias pruebas de diferentes tipos. En primera instancia los valores insertados en Datos Esenciales son y deberán ser enteros, si el usuario inserta un dato con letra habrá un error. Lo mismo pasará con los Datos X y Datos Y, los cuales al momento de realizarse alguna ecuación, se marcará un error, si es que hay un dato digitado o importado de forma errónea, impidiendo continuar con la operación de graficación hasta que se corrija dicho error. Todo dato en esta forma puede ser obtenido de forma automática según el isótopo seleccionado y la imagen proporcionada para los grises o bien pueden ser insertados los datos de forma directa, lo cual dará mucho control al usuario sobre esta forma o también cargados de un experimento y previamente guardados. Aquí el Factor de Decaimiento se obtiene de manera automática ya que se insertaron tablas de radioactividad de los isótopos de Amersham Life Science (Ver Anexo C) cumpliendo con un objetivo particular más de esta tesis.

Una forma de ver que Sagefh trabaja adecuadamente, son las pruebas que hace el investigador al programa y compara sus resultados con los que obtenía con otros procedimientos manuales, o con otro software. El resultado final entre los resultados de Sagefh y los obtenidos manualmente son muy similares entre sí y por lo tanto son aceptables para el usuario. La comparativa hecha entre el software empleado para el caso por ImageJ versión 1.29x de Wayne Rasband del Natio-

nal Institutes of Health de los Estados Unidos, son de igualmente similares, aunque se usa otro el MCDI Imaging Research St. Catherines, Ontario, Canada, que de este solo se tiene una licencia y con un costo por mas de 25,000 pesos en cada equipo, a lo que Sagefh puede ser usado en varios equipos de cómputo y realizar al menos hacer los procesos más básicos que los que hace MCDI. Y por otra parte ImageJ es un software realizado en Java, es Freeware, y en ingles.

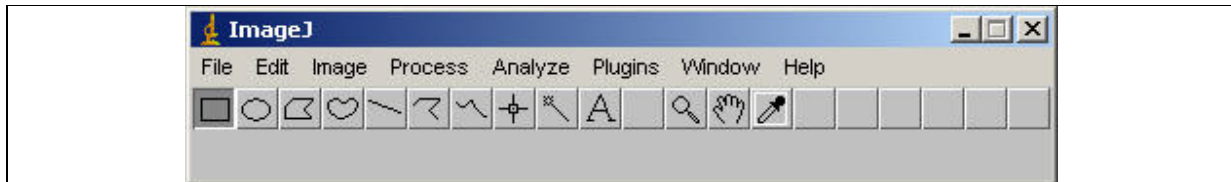


Fig. 6.5 Interfaz del software ImageJ versión 1.29x de Wayne Rasband.

Para poder realizar la calibración se tenían que primero hacer los cálculos de la Serie Y con base al isótopo utilizado, la actividad radioactiva y los factores de Factor de Decaimiento, todos esos datos tenían que ser obtenidos de forma manual para después ser insertados en una caja de edición de texto, de igual forma los valores de la Serie X, tenían que ser obtenidos previamente de forma manual o una operación por cada tonalidad (Ver Fig. 4.9 donde esta la imagen de calibración de alta y baja) de gris. De esta forma después de ser insertados los datos se seleccionaba la operación y el resultado era visualizado en una ventana en blanco y negro.

En la Fig. 6.6 observamos los mismos resultados de Sagefh pero con ImageJ. En ImageJ previamente se insertaron los datos en un cuadro de texto para cada serie, donde la serie X, se obtuvo de la Fig. 4.9 y la Serie Y por medio de varias operaciones por el isótopo ^3H utilizado, después de esto solo se seleccionó la ecuación para aproximar a los datos experimentales y el resultado es el que vemos en 6.6, donde obtenemos en a, b, c y d los coeficientes de la ecuación de 3er. grado, que son casi idénticos entre Sagefh e Imagen, lo cual nos muestra una exactitud encontrada en las funciones que realiza nuestro software, además en Sagefh, con un clic del botón derecho del mouse sobre la graficación el usuario puede mover los alcances de la graficación y hacia donde tienden los extremos de la ecuación ajustada. Vemos en Sagefh datos que nos ayuden a decir cual es la ecuación mas ajustada, como la parte de Exac. Cal. Curva que es la Exactitud de la Calibración de la Curva y son datos obtenidos de la Y experimental – la Y ajustada y la x correspondiente es la misma, ya que ambas se graficaron sobre el plano único de 0 a 255 tonalidades de grises posibles. También nos ayuda el factor R^2 ajustada, que también nos ayuda a decir la exactitud de la ecuación ajustada.

Sagefh también ofrece, la oportunidad de tener al mismo tiempo el comportamiento las ecuaciones tanto de los datos experimentales, como la ecuación de los datos ya ajustados por el método de mínimos cuadrados, permitiendo al investigador tener una idea mas exacta de cómo estarán los valores. Los datos experimentales están graficados en color rojo y los datos ajustados están en color verde.

También se tiene la oportunidad de guardar los datos, por si se requiere verificar el experimento más tarde, ya sin necesidad nuevamente de obtener los valores de grises directamente de la imagen. Si en un momento dado el investigador requiere modificar el archivo guardado lo buscará con extensión .cal y el nombre que le haya puesto, siempre y cuando respetando el acomodo de los datos, ya que si modifica el orden de los datos guardados, Sagefh marcará un error al cargarlos. El usuario podrá editar el archivo con TSagefh que es el Editor de Texto propio del sistema o bien lo podrá hacer con el Bloc de Notas de Windows u otro de su preferencia, siempre y cuando no modifique o agregue efectos al texto.

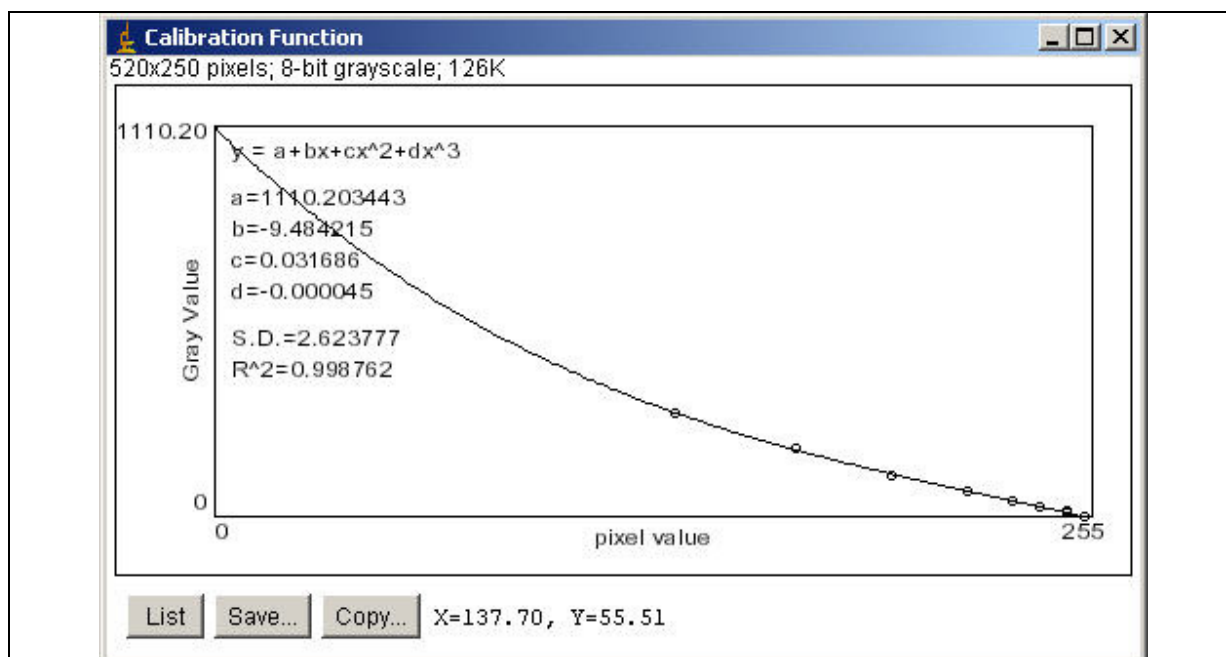


Fig. 6.6 Mismos datos de la Fig. 6.4 pero ahora realizados con ImageJ.

En la calibración también se ofrece al usuario el escoger las tonalidades de grises de la imagen de dos modos, sea por punto (un píxel) o por región (conjunto de píxeles), donde los grises pueden representar un compuesto químico, isótopo radioactivo o alguna otra característica que el investigador estudia en la fotografía o imagen. El poder escoger las tonalidades de esas 2 formas dan al usuario una mayor exactitud en sus cálculos. Al final el usuario con toda libertad puede guardar en un mapa de bits, el gráfico de los datos así como el de la curva aproximada, para futuras referencias.

La Calibración de la Curva es una herramienta de importancia que requirió la mayor exactitud posible en sus procedimientos matemáticos para el cálculo de la calibración, se empleó el Método de Mínimos Cuadrados y para lo cual las operaciones matriciales una a una se fueron probando con Maple V, tan solo por decir, la obtención de una matriz inversa, se probó en sus diferentes operaciones, con lo cual se fue asegurando que todos los resultados finales mostrados en Sagefh fueran los más exactos posibles.

La Calibración de la Curva viene a ser la herramienta importante al analizar algunas proteínas y células dopaminérgicas con sus receptores a través de la autoradiografía de los cortes histológicos realizados a los cerebros de las ratas para analizar sus conductas y reacciones ante diferentes estímulos, para ver curas de enfermedades como la esquizofrenia u otras del tipo neuronal o nervioso en los seres humanos.

Otra herramienta de interés y que sirve también para la Calibración de la Curva, aunque puede ser usado con otro fin son las Formas de Edición por Punto y la de Edición por Región, que como sus nombres lo dicen obtiene valores de los píxeles de la imagen en cuestión ya sea por un punto o píxel, por región o conjunto de píxeles.

En ambas formas, lo que se hace es obtener valores del o los píxeles seleccionados por el usuario. En Edición por punto, PSagefh, el usuario dará un clic en diferentes partes de la imagen según donde requiera obtener los valores automáticamente; por cada clic se despliega la posición actual

(x, y) del píxel y su valor en gris o si la imagen esta en color se hace la operación $(R+G+B)/3$, así como el nombre de la imagen ya que el usuario puede tomar píxeles de diferentes imágenes, los valores se despliegan en una forma tipo Microsoft Excel. Después de obtener varios valores, se puede desplegar otros valores en el Menú Edición y seleccionado Datos Adicionales lo cual hará que despliegue el Promedio, Desviación Estándar, Valor Mínimo y Valor Máximo de los valores previamente obtenidos; se pueden seleccionar tantos valores como se deseen así como los datos adicionales, los cuales sirven al usuario para ver los cambios entre los niveles de intensidad que existen en la imagen, para los elementos usados en la fijación del tejido.

	A	B	C	D	E	F	G
1	Muestra	Cuadro Experim	Región	Promedio	SEM	Fmol/mg	Nomb. de la Imágen
2				202.1739	0.4547	202.1739	imagenes 006.tif
3				147.0147	0.277	147.0147	imagenes 006.tif
4				93.4755	0.1672	93.4755	StandarD2.tif
5				117.1166	1.4924	117.1166	a2.jpg
6							
7							
8							

Fig. 6.7 Imagen de la Forma de la Edición por Región de Sagefh conteniendo ya algunas valores de tres imágenes distintas.

La otra forma de edición que es la Edición por Región RSagefh, el usuario por medio de una selección libre puede seleccionar cualquier parte de una imagen y al cerrar la selección se desplegará en RSagefh el valor promedio de los valores de grises de los píxeles de dicha región así como el SEM de esos datos. En la última columna se desplegará el nombre de la imagen de donde se obtuvieron los valores. Las columnas Muestra, Cuadro Experimental y Región son llenadas por el usuario dependiendo de lo que estudia en la imagen, tal como se ve en la Fig. 6.7. Aquí en esta forma no existen Datos Adicionales.

Al final el usuario en ambas formas PSagefh y RSagefh puede guardar los datos en modo texto o bien guardarlas en formato de Microsoft Excel versión 4, es decir, la versión de 1997, lo cual permite que dicho archivo sea abierto en todas las versiones de Excel posteriores a la 4 de 1997. En cuanto a modo texto no existe mayor problema ya que puede ser abierto por cualquier utilidad que maneje o edite texto, incluso por la propia utilidad de TSagefh que es el Editor de Texto contenido en el programa principal, teniendo una mayor movilidad en el manejo de los datos.



Fig. 6.8 Editor de Texto, TSagefh, conteniendo los datos de la Fig. 6.7 guardados previamente en modo texto.

Tal y como vemos en la figura anterior el TSagefh tiene los valores de RSagefh. Este editor realiza solo las operaciones básicas: Nuevo, Guardar y Guardar como, ya que no se requieren otras. Aunque dando clic con el botón derecho sobre la edición se tiene las operaciones de Copiar, Pegar y Eliminar, además de que se puede seleccionar de la manera tradicional con el mouse o el teclado. Este editor sirve para manejar los archivos de texto sin formato y los archivos de Calibración de la Curva.

Otra parte de nuestro proyecto fue el desarrollo de los Histogramas, que como se mencionó existen tres tipos; Normal, Absoluto y Logarítmico, los tres representan las frecuencias de repetición de los diferentes niveles de grises que existen dentro de la imagen. En la forma de histograma según vemos en la Fig. 6.9 se tienen diferentes valores que son necesarios para el comportamiento de los grises en la imagen, podemos ver los datos de Cantidad de Píxeles en el canal seleccionado, Cantidad de píxeles totales en la imagen, el promedio y la desviación estándar de ese mismo canal, eso nos permite ver los valores en los diferentes niveles posibles de los colores R, G y B o intensidad en el caso de las imágenes de grises. Pero no solo eso se incorpora en nuestro histograma además podemos obtener el histograma y sus datos de regiones seleccionadas no solo de la imagen completa sino de partes de ella, lo cual permite tener una idea más clara de los niveles de grises en las autoradiografías usadas en los experimentos. Veremos que también tendremos el valor del promedio de la región seleccionada y su SEM Error estándar, dicho valor el usuario lo podrá buscar en la Calibración de la Curva en el eje x, para ver su comportamiento en el eje y, en los fmol/mg de tejido húmedo, en los valores graficados originales y en el curva de calibración.

El usuario podrá ver los datos graficados de manera independiente o de manera conjunta solo seleccionando en las casillas de los colores que están en el lado izquierdo, además de seleccionar el canal a saber para conocer sus valores en los diferentes niveles de 0 a 255, moviendo tan solo el cursor sobre el histograma.

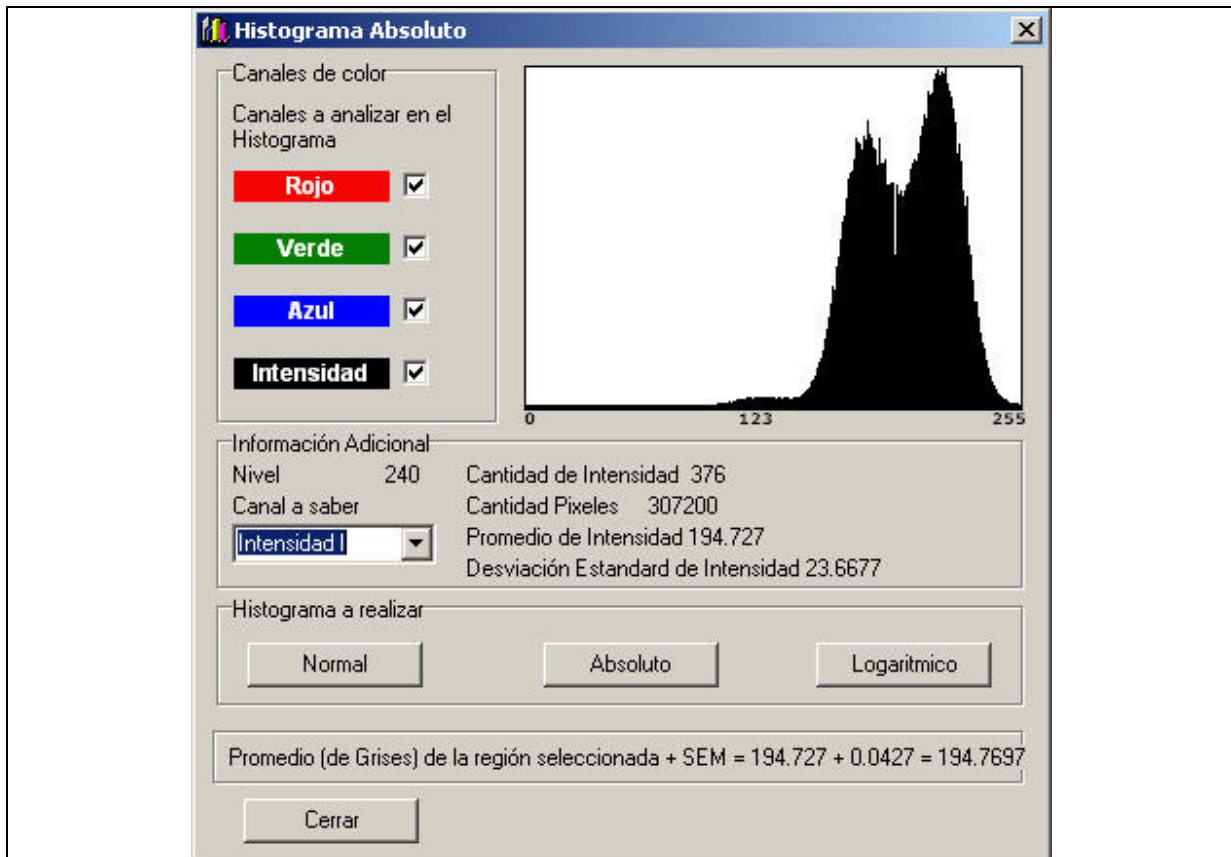


Fig. 6.9 Histograma absoluto de la imagen OAHEART-DAT.JPG que se visualiza en la Fig. 6.3 aunque esta se hizo sin selección.

Otro resultado y parte de este proyecto es la Calculadora de Imágenes, que ya se explicó en el capítulo anterior, con la cual se permiten obtener mejoras de la imagen, aclarar unas zonas u oscurecerlas para mejorar la de origen y poder estudiarla mejor, el resultado de la calculadora es visualizado en otra forma y tendrá el tamaño menor de las 2 imágenes fuentes. La interfaz de la calculadora es sencilla, además de que se puede aplicar procesos con imágenes que se encuentren en el clipboard o portapapeles del sistema, y la selección de las imágenes fuentes se realiza solo al escogerla de una lista; la previsualización permite que al Aceptar la operación, el resultado sea seguro y la que el investigador requiere.

Una herramienta más en Sagefh es la aplicación de falsos colores a una imagen de tonalidades en grises. Se tienen 5 opciones posibles para la asignación de colores; aunque cabe aclarar que es imposible obtener los colores reales de una imagen por lo cual solo se pueden obtener colores en base a los comportamientos de los mismos grises de la imagen origen. Obsérvese la Fig. 6.10 donde se tienen varias ventanas con imágenes ya con colores falsos en base a la imagen “Sin Título 1” la cual se encuentra en grises. Para empezar todas las imágenes aquí mostradas son tamaño mediano de 1404x1217 píxeles con los que el programa trabajó sin ningún problema. “Sin título 3” se le aplicó Pseudocolor 1, el cual a través de un número obtenido en sumas de 479 hasta llegar al nivel de gris del píxel actual, se regresa a un píxel de la nueva imagen por corrimiento y así con el resto de los píxeles de la imagen origen. “Sin Título 4” se obtiene con Pseudocolor 2, en el cual, el plano de grises se divide 5, donde de 0 a 51 se aplica un valor de 204 mas al canal rojo resultante; de 52 a 102 se aplica un valor mas de 153 a los canales rojo y verde obteniendo un amarillo; de 103 a 153 se aplica mas 102 al verde y 153-azul , lo cual da un verde; de 154 a 203

se aplica 203-verde y más 52 al azul, lo que da un azul y por último de 204 a 255 se aplica verde-204, lo que da un morado, los canales no mencionados en cada aplicación se dejan intactos. El comportamiento variaría mucho dependiendo de los grises de la imagen. Sin Título 8 se le aplica Pseudocolor 3 el cual aplica un Filtro del tipo Paso Alto.

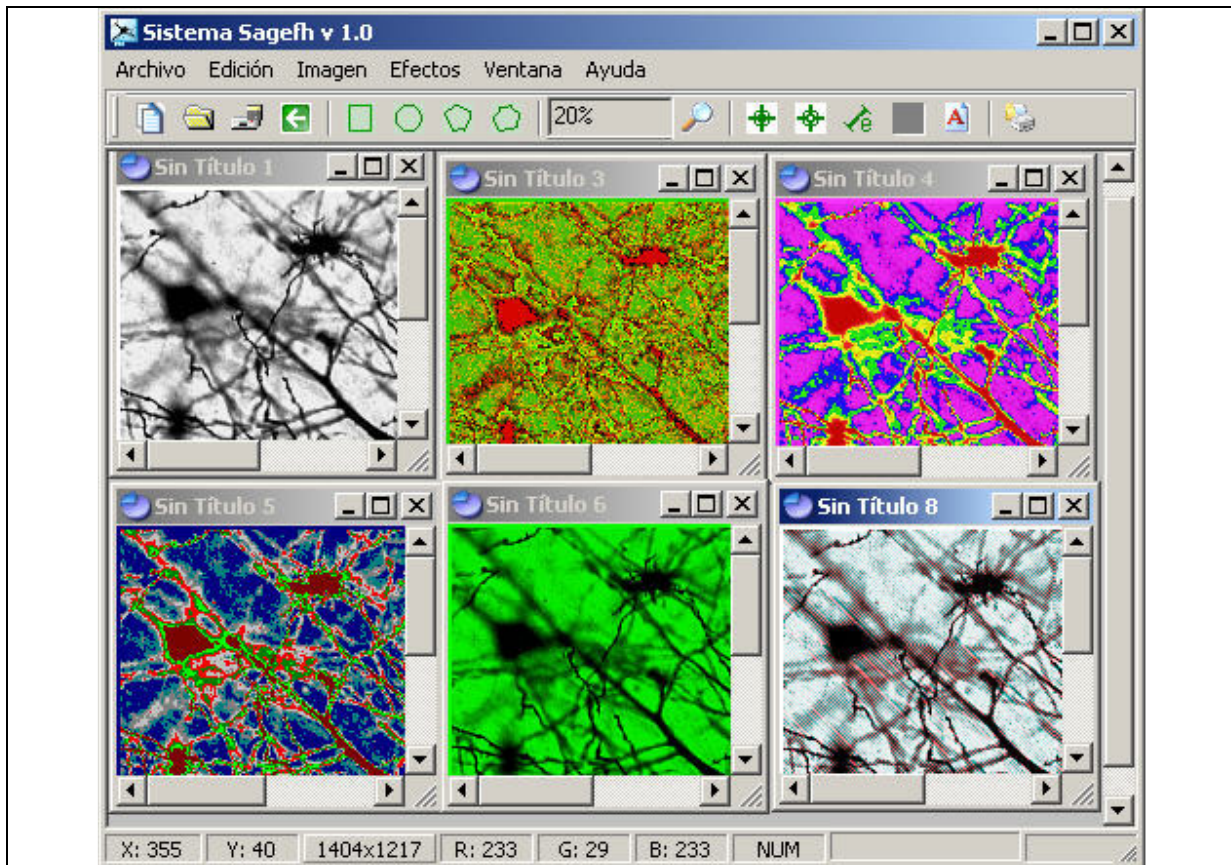


Fig. 6.10 Aplicación de las diferentes opciones de Pseudocolor a la imagen Sin Título 1 la cual se encuentra en tonalidades de grises.

Sin Título 5 solo se divide el nivel de grises en 8 y a cada nivel se le aplica un color que el usuario puede seleccionar a través de una forma. Por último Sin Título 6 es una saturación del canal rojo, verde o azul o de 2 o 3 canales según el usuario seleccione y se aplica a la imagen a través de una operación lógica AND con lo cual los píxeles origen no cambian y solo se colorean. Además en esta última el usuario tiene el control de cambiar el brillo de la imagen para hacer una conjugación de color y brillo y los resultados sean mejores. Todos estos procesos de asignación de colores falsos a las imágenes monocromáticas vienen a ser parte del conjunto de Filtros que Sagefh tiene y que a continuación veremos.

Para empezar con ellos, se menciona que se manejan 2 tipos de filtros, de píxel a píxel y por conjunto de píxeles 8-vecindad, pero cualquier filtro al final sirve para mejorar los objetos que tiene la imagen de la autoradiografía o resaltar algunas partes de ella. Aquí en esta tesis, solo se colocaron filtros que se consideraron muy esenciales y que fueron comúnmente usados, ya que para otros efectos de imagen o más complejos el investigador utiliza otro software comercial como Adobe PhotoShop.

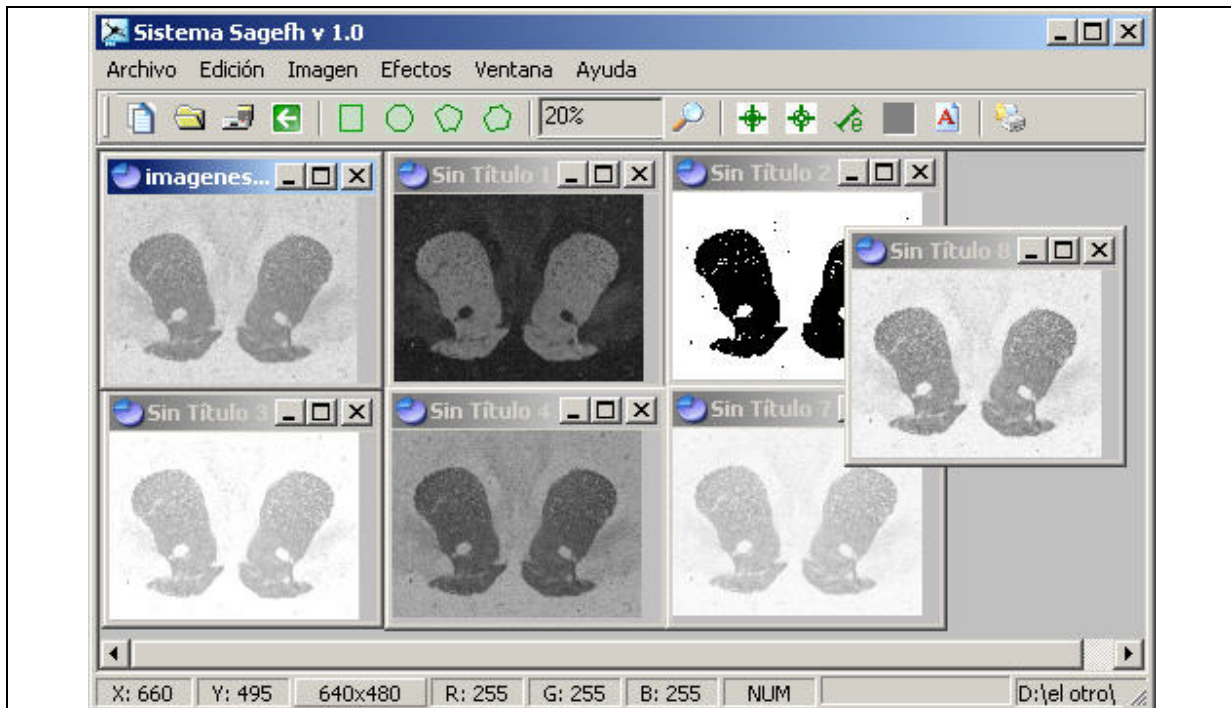


Fig. 6.11 Filtros usados por Sagefh donde se trabaja en las imágenes píxel por píxel, la imagen origen es imágenes 006.tif

En la Fig. 6.11 podemos ver varias imágenes con varios efectos, donde la imagen origen es imágenes006.tif, a la imagen Sin Título 1 se le aplicó un negativo, a la 2 una binarización; donde aquí se divide el plano en 2, entre los intervalos de menor y mayor gris que se encuentre la imagen, asegurando una buena binarización y no abarcando todo el plano de grises, en la 3 y la 4 se modificó el brillo de la imagen, donde los valores de la imagen origen se saturaron o se redujeron sus valores para así aclararla u oscurecerla. A la 7 se le aplicó la función seno donde la imagen se aclaró pero en sus partes oscuras; las partes claras solo se aclaran levemente. A la 8 fue la función coseno que oscurece la imagen, pero solo en las partes más oscuras y las claras levemente las modifica, estas 2 últimas mejoran significativamente el manejo de las células en la imagen ya que las funciones ignoran el fondo y solo se enfocan sobre las partes que más sobresalen de la imagen.

Estos filtros funcionan también en imágenes en color y sus resultados son más notorios, ya que se manejan los 3 canales de forma independiente para obtener los mejores resultados, además de que si existe alguna selección en la imagen origen y se aplica un filtro, el resultado del filtro solo se aplicará en la región seleccionada y el resultado se visualizará en otra ventana, lo que permite tener el control de los efectos sobre las imágenes y sus regiones cuales fueran.

Existen otros filtros que son los Paso Bajo y Paso Alto, los cuales permiten delinear o hacer difusos bordes de los objetos visualizados en la imagen, estos se trabajan a través de una máscara de 8 píxeles alrededor del píxel actual o que se este procesando, permitiendo tener una visión más exacta del entorno del píxel actual; a los píxeles se les multiplica por una matriz de 3x3 con diferentes valores y la suma de esa multiplicación dará el píxel resultante, el resultado final se visualiza en otra ventana.

Otro filtro es el repujado que como su nombre lo dice resalta los bordes y formas de la imagen, esto se logra gracias a donde haya variantes fuertes de los valores de los píxeles, para así lograr

un relieve. Esta opción sirve para destacar la forma de algunas células cuando la imagen tiene muchos contrastes de valores de píxel. Aquí se manejan dos tipos: recorriendo la imagen de forma horizontal de izquierda a derecha para obtener su relieve o bien vertical de arriba hacia abajo. De aquí deriva también el filtro de detección de bordes, que se manejan de igual forma que en repujado, nada más que la operación es diferente y el resultado es la visualización de solo bordes de los objetos que tengan cambios medianos o fuertes en sus píxeles, el resto de la imagen se vuelve oscura.

Por otra parte se manejan también el filtro de potencias donde dando un número a , que se eleva a la potencia dada por x , que es el valor del píxel actual, el número dado tendrá valores en el intervalo $0 < a < 1$; dándose aclaración en la imagen respetando su contraste; si $a > 1$, oscurece la imagen también respetando su contraste. Se realizó una forma donde ya se tienen valores propuestos que aclaran ($1/2$, $1/3$ y $1/4$) y otros que oscurecen ($2,3$ y 4); aunque también se deja la oportunidad, de que el usuario pueda dar un valor que él elija para que vea el comportamiento de ese valor a través de la previsualización.

Otras herramientas básicas de Sagefh son la posibilidad de transformar la imagen si tuviera un espejo enfrente, se realiza de manera horizontal y vertical, lo cual da una perspectiva diferente de cómo se encuentra la imagen. También tenemos para ver las propiedades de la imagen, sus medidas, formato, fecha de creación y tamaño en disco. Otra más es la de poder modificar el tamaño de la imagen, se da al usuario de poder dar sus propias medidas para ampliar o reducir la imagen y que estas además sean proporcionales o no, además de que sean definitivas.

También en las imágenes se puede aplicar un zoom el cual es un cambio de tamaño de la imagen de manera temporal y sin afectar la de origen, solo es para visualizarla en el programa, se tiene zoom hasta para reducir a un 20% la imagen o para aumentarla hasta un 300%. No se da un rango de más zoom porque se considera que los objetos a estudiar o no se distinguirían bien a un zoom menor o se distorsionarían a un zoom mayor, por ello con ese rango que el programa proporciona es suficiente para ver detalles de la imagen.

Sagefh también tiene la posibilidad de crear imágenes nuevas, se tiene una forma para ello, donde el usuario define su nombre y las medidas de la nueva imagen, en ella se podrán pegar objetos recortados de otra imágenes o imagen que esté en el clipboard del sistema, y al final el usuario podrá guardarla en el formato que el sistema soporta o en un momento dado imprimirla, dando una imagen de previsualización también, para que el usuario perciba como quedará la imagen en la hoja impresa.

El fin del sistema Sagefh es el de presentar un entorno con facilidades de uso ya que el investigador requiere resultados en sus estudios y no tratar de manejar o depender del estudio de un software muy complejo, por ello cada ventana del programa tiene las opciones mínimas; pero sin embargo las más esenciales, siéndole una herramienta útil de ayuda al investigador o estudiantes del Instituto de Fisiología de esta Universidad.

Aun así al realizar todas las pruebas de trabajo de nuestro sistema, por parte de los usuarios, el investigador y el programador y habiendo corregido los problemas detectados por cada uno de ellos, Sagefh como cualquier otro software puede tener fallas, ya que cada usuario trabaja con diferentes imágenes, procesos y estudios, aunque relacionados, sin que se pueden evaluar todas esas combinaciones múltiples que se pudieran dar, pero se tiene la certeza de que al menos las principales se evaluaron y trabajan bien. Como todo trabajo de desarrollo, Sagefh aún tiene muchas pruebas que realizar y resultados que aportar por delante.

Conclusiones

Hemos llegado a la parte final de este proyecto de tesis y hoy podemos ya ver hecho realidad el Sistema Sagefh en su versión 1.0, el cual después de varias investigaciones, pruebas y correcciones ya trabaja en forma en el Instituto de Fisiología con el Dr. Gonzalo Flores Álvarez y estudiantes del mismo instituto, el cual es utilizado en las investigaciones en el comportamiento y en modelos animales en enfermedades mentales en el Laboratorio de Neuropsiquiatría, y el cual a través de experimentos hechos con ratas ha demostrado su valiosa utilidad. En los experimentos intervienen varias personas desde los que crían los animales hasta los que crean el modelo animal, para posteriormente preparar y cortar los tejidos a estudiar, y así obtener muestras de tejido procesado, para por medio del uso del análisis de imágenes realizar el estudio cuantitativo ya sea de receptores a algún neurotransmisor o de alguna proteína transportadora, ya que este software permite analizar las imágenes contenidas en un microfilm sensible a algún isótopo radioactivo o bien estudiar alguna imagen a través del uso del microscopio, después de digitalizarla, la cual será después procesada por algún software como MCID-3 o MCID-4, Leica Qwin, Adobe PhotoShop y hoy también por Sagefh.

Los estudios arrojarán datos de los cambios morfológicos en estos modelos animales relacionados con trastornos psiquiátricos y en consecuencia tendrían implicaciones estos resultados sobre las correspondientes enfermedades psiquiátricas en los humanos.

C.1 Conclusiones del Proyecto

Para empezar diremos que las primeras conclusiones encontradas fueron, el conocimiento de cómo se obtienen las imágenes digitales a nivel celular en el estudio de estos modelos animales, para llegar a debatir y concluir las semejanzas que hay con las enfermedades y alteraciones de los comportamientos en el ser humano en condiciones normales o ante ciertos estimulantes.

Sagefh es una herramienta la cual cumple los objetivos expuestos en el Capítulo 3, reducir costos de uso de software comercial, por uno propio para el estudio de las características de las imágenes obtenidas por autoradiografía, ya que solo se cuenta con software comercial en 1 o 2 equipos de cómputo y cada licencia tiene un costo arriba de 50000 pesos. Sagefh implementa una herramienta sin costo, en idioma español, con la posibilidad de instalarlo en varios equipos y sin costo alguno para el Instituto de Fisiología.

Por consiguiente, en los equipos donde no se tiene algún software comercial, los datos experimentales eran tratados de forma manual y con posibilidades de obtener resultados inexactos. Mientras que en los equipos donde hay software comercial, no era posible procesar todo el trabajo, ya que frecuentemente se saturaba su uso impidiendo procesar la información de manera rápida para el investigador. Otro detalle es que el software comercial hace varias funciones ciertamente necesarias, pero no de manera conjunta, por ejemplo para la Calibración de la Curva o el Histograma por Región, había que hacer varios procedimientos antes, lo que se traducía en un proceso un poco tedioso. Sagefh reduce todos estos pequeños inconvenientes aunque no se pue-

de comparar con todo lo que hace un software comercial; nuestra tesis si implica la reducción de costos y la simplificación de procesos en los estudios a través de una sola herramienta.

A un nivel más práctico, el desarrollo de la tesis, implicó un aprendizaje mas profundo en el manejo de las imágenes digitales, como la carga de las imágenes TIFF que se manejan en diferentes formatos, el uso de diferentes filtros a nivel puntual y vecindad, la optimización del software para que este no fuera tan “pesado” para poder instalarlo en computadoras con requisitos mínimos, la utilización de una Ingeniería del Software para crear un programa estándar y que cumpla ciertas normas de estabilidad y trabajo, además de las diferentes pruebas para lograrlo.

También de la utilización de otras utilerías necesarias para hacer completo el proyecto, como el uso de un software para crear un archivo de ayuda que interactuara con toda la aplicación para poder dar soporte al usuario si es que tuviera una duda al momento de usarlo, además de la creación de un Manual de Usuario para explicar detalle a detalle cada opción que tiene Sagefh.

Con todo ello se concluye que Sagefh cumple para empezar todos los objetivos planteados desde un inicio, además de reducción de costos y tiempos de procesos, aplicación de diferentes metodologías computacionales y con ello un re-aprendizaje en las partes de la Ingeniería de Software, aprendizaje a un nivel de lenguaje visual en este caso Borland Delphi para dar una solución a un problema presentado en el Instituto de Fisiología de la BUAP, además de utilizar componentes adicionales externos como los convertidores de los formatos de imagen aplicados para poder procesarlos dentro de Sagefh.

C.2 Limitantes

Lamentablemente como todo software, Sagefh posee algunas deficiencias, aunque claro no afectan gravemente el cumplimiento de los objetivos planteados en esta tesis, si ameritan mencionarse para que un futuro estos errores puedan corregirse y así mejorar la aplicación.

1. Nuestro proyecto no puede abrir todos los formatos de imágenes TIFF que existen debido a que el algoritmo usado para visualizar estas imágenes ha cambiado en varias versiones. Existen más de 6 versiones de formatos TIFF en los cuales se ha mejorado su compresión y el uso de paletas de colores, además de que en ellas se pueden codificar otras imágenes. Afortunadamente los decodificadores que usa Sagefh abren la mayoría de las imágenes TIFF que se manejan en Fisiología, aunque algunas cuantas nos las abre, por lo cual se tiene que modificar con PhotoShop para así después visualizarlas en Sagefh.
2. También no se pueden abrir o guardar adecuadamente otros formatos de imágenes como la GIF, PNG, algunos formatos de PCX y otras más.
3. La parte de Previsualización de los efectos, no se muestra la parte seleccionada, cuando hay una selección sobre la imagen, sino se ve la previsualización en toda la imagen. Aunque claro está, que cuando se acepta el efecto, solo se afectara a la parte seleccionada.
4. En la parte de Edición por Punto y Por Región aunque se tiene una forma con una hoja similar a Excel, esta forma no tiene todas las funciones que deberían tenerse para manejar datos estadísticos, hacer gráficos con ellos, o cualquier otra función de Excel necesaria para manejar esta información. Esto no afecta el trabajo de Sagefh ya que se obtienen al menos los datos que el investigador solicitó y estos pueden guardarse en un archivo tipo texto o Excel, para así ya ser procesados de forma independiente por la aplicación de Microsoft Excel.
5. El programa tiene un rango para aplicar un zoom entre 20% a 300% del tamaño de una imagen, para así poder estudiarla mejor, pero aplicar un zoom fuera de ese rango es imposible, a menos que se reduzca o aumente el tamaño de la imagen según corresponda, y después se aplique el zoom que se requiera.

6. Por último cuando se pega algo sobre una imagen, la sección pegada no aplica al zoom que tiene la imagen destino donde se pega la sección. Se requiere hacer todo en zoom al 100%.
7. El sistema se hace lento en imágenes demasiado grandes, ya que estas se mapean en memoria, por lo cual aplica que a mayor tamaño de la imagen mayor memoria será necesaria en el equipo de cómputo.

Estas son las limitaciones que presenta nuestro programa pero que sin embargo no afecta el desempeño y los resultados de Sagefh así como la estabilidad y su funcionamiento.

C.3 Perspectivas

Por último pasemos a las perspectivas o mejoras que a futuro a nuestro proyecto se le puede agregar para hacerlo mucho más eficiente y más exacto en cada una de sus operaciones.

Para empezar diremos que las soluciones de las limitaciones podrían ser un buen comienzo para que más adelante Sagefh mejore y se convierta en un software importante en el análisis de imágenes a un nivel celular.

Otras mejoras que se podrían agregar sería el realizar más efectos de análisis morfológico, a nivel región o área total de la imagen, como el conteo de células, separación de planos, reconocimiento de algunas formas comunes de algunas células de proteínas entre otras características.

Otra mejora, es reducir aún más el tiempo de ejecución de los procesos en imágenes demasiado grandes, para evitar problemas de inestabilidad en el software. Así mismo con esto se mejora y reduce el tiempo de carga de imágenes grandes, aplicando algunas técnicas como la división de una imagen y cargarla en partes para que sea más rápido y eficiente en vez de cargar toda una imagen completa, tal como lo hace Adobe PhotoShop.

Y por último, algo más que podría agregarse a Sagefh es la personalización de la aplicación, como insertar botones en la barra de herramientas de los procesos más usados, colores de la interfaz, tipo o tamaño de letra, para que el usuario se sienta más cómodo y libre al usar el software. Además de personalizar las unidades de medición y que se utilicen en todos los procesos necesarios, por decir alguna característica.

En fin al Sistema Analizador Gráfico para Estudios Fisiológicos e Histológicos le falta por crecer y convertirse en una aplicación más robusta, más eficiente que uno u otras personas se encargaran de hacerlo. El primer paso ya está dado, las mejoras ya empezaron y la reducción de costos se verán poco a poco, ahora el tiempo dará el siguiente paso.

También como conclusión final de esta tesis, hago mención a todo lo visto a lo largo de los estudios profesionales en la carrera de Ciencias de la Computación y que hoy se ve complementado con este trabajo, donde todo lo visto se aplica a este proyecto como la aplicación de la Ingeniería del Software, la programación, y el uso de las matemáticas en todo ello. Además de desarrollar un producto o software a un usuario final para estudios que requieren exactitud como la Calibración de la Curva, aunque previamente se tuvo una experiencia similar en el Servicio Social al desarrollar una aplicación de Base de Datos. Pero al final todas esas experiencias dejan una enseñanza y hoy aquí un software, Sagefh, que se aplica a un nivel profesional y más avanzado.

Con base en lo anterior, Sagefh cimentó un software más en la solución a un problema de la vida real y que de manera personal y profesional me dejan una gran enseñanza, y que a futuro me servirá para seguir adelante en este mundo fascinante de la programación y la computación.

Anexo A

OPERACIONES MATRICIALES

Para comprender varias partes de nuestro programa de tesis, veremos algunos conceptos matriciales brevemente, tomando en cuenta que el lector tiene algunas nociones matemáticas y álgebra.

En este pequeño apartado veremos solo algunas operaciones matemáticas realizadas con matrices, que son las que se usan en este proyecto de tesis, desde las sencillas hasta unas más complejas.

Definición A.1. Una matriz es un arreglo bidimensional de elementos.

De aquí en adelante para denotar una matriz, se hará con mayúsculas y sus elementos con minúscula, con sus respectivos subíndices de ubicación en el arreglo, como en la siguiente matriz **A**.

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{21} & a_{31} \\ a_{12} & a_{22} & a_{32} \\ a_{13} & a_{23} & a_{33} \end{bmatrix}$$

Fig. A.1 La Matriz A de 3x3 y sus elementos

Nosotros manejaremos matrices de orden: 1 columna por n renglones (1xn) y matrices cuadradas es decir de nxn. Nuestro programa de tesis maneja los subíndices de la siguiente forma: columna por renglón (cxr)

Definición A.2. Sean **A** y **B** matrices de nxm. La suma de dichas matrices que darán por resultado a la matriz **C**, se obtiene sumando cada elemento de la matriz **A** con el correspondiente elemento de la matriz **B** ubicados en las estructuras de sus respectivas matrices, esto es $a_{ij} + b_{lm}$ donde $i = l$ y $j = m$, dentro del arreglo y así cada elemento de la matriz **C** quedará definido como $c_{ij} = a_{ij} + b_{lm}$.

Definición A.3. Sean **A** y **B** matrices de nxm. La resta de matrices cuadradas **C** se obtiene restando cada elemento a_{ij} menos el elemento b_{lm} donde $i = l$ y $j = m$, es decir, $c_{ij} := a_{ij} - b_{lm}$.

Definición A.4. Sean **A** y **B** matrices de nxn, la multiplicación de estas matrices cuadradas para dar la matriz **C**, se obtiene al sumar los productos de cada uno de los k elementos de la fila i-ésima de la matriz **A**, por los correspondientes k elementos de la columna j-ésima de la matriz **B**, es decir: $c_{ij} = \sum(a_{ik} * b_{kj}) = a_{i1} * b_{1j} + a_{i2} * b_{2j} + \dots + a_{in} * b_{nj}$.

Definición A.5. Sea **A** una matriz cuadrada nxn. Definimos al escalar determinante, de la matriz **A** como $|\mathbf{A}|$, donde la forma de obtenerlo, variará dependiendo del orden n de la matriz. En esta

definición obtendremos los determinantes de orden 1, 2 y 3, más adelante definiremos para órdenes superiores.

De orden 1, Matriz de 1x1: $|\mathbf{A}| := a_{11}$

De orden 2, Matriz de 2x2: $|\mathbf{A}| := a_{11} * a_{22} - a_{12} * a_{21}$

De orden 3, Matriz de 3x3:

$$|\mathbf{A}| = a_{11} * a_{22} * a_{33} + a_{12} * a_{23} * a_{31} + a_{13} * a_{21} * a_{32} - a_{13} * a_{22} * a_{31} - a_{12} * a_{21} * a_{33} - a_{11} * a_{23} * a_{32}$$

Menores y Cofactores

Considere una matriz cuadrada \mathbf{A} de orden $n \times n$. Denotaremos por \mathbf{M}_{ij} la submatriz cuadrada de orden $(n-1) \times (n-1)$ de \mathbf{A} , que se obtiene suprimiendo su i -ésima fila y su j -ésima columna de esta última. El determinante $|\mathbf{M}_{ij}|$ recibe el nombre de menor del elemento a_{ij} de \mathbf{A} , y definimos el Cofactor de a_{ij} , denotado por \mathbf{A}'_{ij} , como el menor “con signo”:

$$\mathbf{A}'_{ij} := (-1)^{i+j} |\mathbf{M}_{ij}|$$

De hecho obsérvese que los “signos” $(-1)^{i+j}$ que acompañan a los menores se disponen en forma de tablero de ajedrez, es decir, de forma alternada, empezando con + en el primer elemento y con signos + en la diagonal principal.

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} + & - & + & - & \dots \\ - & + & - & + & \dots \\ + & - & + & - & \dots \\ - & + & - & + & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \end{bmatrix}$$

Fig. A.2 Matriz \mathbf{A} con sus signos en forma de tablero de ajedrez

Aquí aclaramos que \mathbf{M}_{ij} denota una matriz y \mathbf{A}'_{ij} denota a un escalar.

Definición A.6. Sea \mathbf{A} una matriz. Definimos la matriz transpuesta de \mathbf{A} , como \mathbf{A}^T la cual resulta de intercambiar las filas por columnas o las columnas por las filas.

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{21} & a_{31} \\ a_{12} & a_{22} & a_{32} \\ a_{13} & a_{23} & a_{33} \end{bmatrix} \quad \mathbf{A}^T = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{bmatrix}$$

Fig. A.3. La Matriz \mathbf{A} y su transpuesta \mathbf{A}^T .

Definición A.7. Sea \mathbf{A} una matriz cuadrada de orden $n \times n$. Definimos al adjunto clásico o adjunto, como $\text{adj} \mathbf{A}$, la cual es la transpuesta de la matriz de Cofactores de \mathbf{A} .

$$\text{adj} \mathbf{A} = \begin{bmatrix} \mathbf{A}'_{11} & \mathbf{A}'_{12} & \mathbf{A}'_{13} \\ \mathbf{A}'_{21} & \mathbf{A}'_{22} & \mathbf{A}'_{23} \\ \mathbf{A}'_{31} & \mathbf{A}'_{32} & \mathbf{A}'_{33} \end{bmatrix}$$

Fig. A.4. La Matriz Adjunta de \mathbf{A}

Muy bien, hasta ahora hemos visto operaciones sencillas con las matrices, a continuación seguiremos con la forma de calcular el determinante de matrices de orden mayor a 3, aunque el Teorema que a continuación se menciona también es válida para ordenes menores.

Teorema A.1. El determinante de una matriz \mathbf{A} es igual a la suma de los productos obtenidos multiplicando los elementos de cualquier fila ó columna por sus correspondientes cofactores:

$$|\mathbf{A}| = a_{1j}\mathbf{A}'_{1j} + a_{2j}\mathbf{A}'_{2j} + \dots + a_{nj}\mathbf{A}'_{nj} = \sum a_{ij}\mathbf{A}'_{ij} \quad \text{donde } i=1, 2, \dots, n \text{ y } j = 1 \text{ ó } 2 \text{ ó } 3 \text{ ó } \dots \text{ ó } n \text{ (por columnas)}$$

$$|\mathbf{A}| = a_{i1}\mathbf{A}'_{i1} + a_{i2}\mathbf{A}'_{i2} + \dots + a_{in}\mathbf{A}'_{in} = \sum a_{ij}\mathbf{A}'_{ij} \quad \text{donde } j = 1, 2, \dots, n \text{ e } i = 1 \text{ ó } 2 \text{ ó } 3 \text{ ó } \dots \text{ ó } n \text{ (por filas)}$$

Estas fórmulas para $|\mathbf{A}|$ se conocen como desarrollos de Laplace del determinante de \mathbf{A} por la i -ésima columna y la j -ésima fila, respectivamente.

Nosotros en nuestro programa de tesis solo manejaremos la fórmula por columnas.

Veamos el siguiente ejemplo donde desarrollaremos el determinante de una matriz de 4×4 . Sea la matriz cuadrada, la cual le calcularemos su determinante, con base al Teorema A.1.:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 3 & -2 \\ 2 & -4 & 7 & 2 \\ 3 & -2 & 9 & -1 \\ 1 & 3 & -1 & -1 \end{bmatrix}$$

Fig. A.5 Matriz A de ejemplo

El cálculo del determinante lo haremos, como se dijo, con la fórmula de columnas:

$$|\mathbf{A}| = 1 \cdot \begin{vmatrix} -4 & 7 & 2 \\ -2 & 9 & -1 \\ 3 & -1 & -1 \end{vmatrix} + (-1) \cdot \begin{vmatrix} 2 & 7 & 2 \\ 3 & 9 & -1 \\ 1 & -1 & -1 \end{vmatrix} + 3 \cdot \begin{vmatrix} 2 & -4 & 2 \\ 3 & -2 & -1 \\ 1 & 3 & -1 \end{vmatrix} + (-2) \cdot \begin{vmatrix} 2 & -4 & 7 \\ 3 & -2 & 9 \\ 1 & 3 & -1 \end{vmatrix} = \dots = 15$$

Fig. A.6. Obtención del determinante de la matriz \mathbf{A} .

Obsérvese que se tomaron los datos de las cuatro columnas de la primera fila de la Matriz \mathbf{A} ; los datos son 1, 1, 3 y -2 y son los elementos que están fuera de los determinantes (es decir, fuera de los correspondientes cofactores) de la Fig. A.6., pero que ya tienen aplicado el signo, + - + -, quedando ahora 1, -1, 3 y -(-2), este último se vuelve positivo. La Fig. A.6 se reduce a:

$$\begin{aligned} |\mathbf{A}| &= 1 \cdot (-45) + (-1) \cdot (-30) + 3 \cdot (24) + 2 \cdot (-21) \\ |\mathbf{A}| &= -45 + 30 + 72 - 42 = 15 \end{aligned}$$

Teorema A.2. Para toda matriz cuadrada \mathbf{A} :

$$\mathbf{A} \cdot (\text{adj } \mathbf{A}) = (\text{Adj } \mathbf{A}) \cdot \mathbf{A} = |\mathbf{A}| \mathbf{I}$$

Donde \mathbf{I} es a matriz identidad. De este modo, si $|\mathbf{A}| \neq 0$, entonces:

$$\mathbf{A}^{-1} = (1/|\mathbf{A}|) \cdot (\text{Adj } \mathbf{A})$$

Donde \mathbf{A}^{-1} le llamaremos la Matriz Inversa de \mathbf{A} .

Hasta aquí hemos visto las principales operaciones matriciales que se usan en nuestro programa de tesis: suma, resta y multiplicación de matrices, el cálculo de su determinante para matrices cuadradas de orden 1×1 hasta $n \times n$, así también, como calcular las matrices de menores, cofactores e inversa. Con ello finalizamos nuestro anexo \mathbf{A} .

Anexo B

EL METODO DE LOS MINIMOS CUADRADOS [2]

En muchas ocasiones de nuestra vida, nosotros hemos medido y tomado una infinidad de datos, y que nos sirven después para compararlos con otros, ya sea dato por dato, o graficándolos, esto se ve principalmente en Estadística, tal por ejemplo, como medir la estatura de personas en base a su edad, la frecuencia con que una persona compra cierto artículo, la cantidad de personas que votan por un partido en ciertas regiones, cantidad de grises en una imagen, etc. Todos estos datos tomados se llaman muestra de la población, ya que son una parte de un todo, y existirán entre ellos una variable independiente y una variable dependiente, por lo regular, X y Y , respectivamente.

Pero es en el momento cuando los graficamos, donde observamos que los puntos de cada dato, tienden a mostrar una forma o definen tendencias de una línea recta o curva.

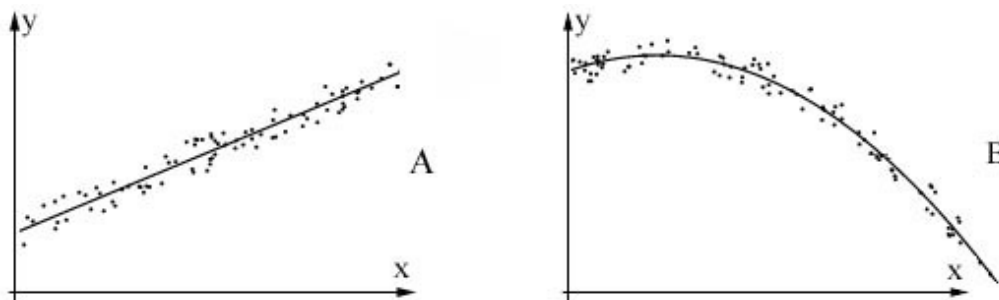


Fig. B.1.A Aquí se muestran una serie de puntos, que son datos x , graficados contra y , así como sus correspondientes tendencias en línea recta. La Fig. B.1.B muestra una diferencia en la tendencia que se puede visualizar como una curva.

Es ahí y dependiendo del trabajo que se este haciendo, donde se decide encontrar una ecuación que se aproxime lo más posible a esa tendencia de los datos graficados, lo cual se logra con el Método de los Mínimos Cuadrados; es decir buscamos una función que represente el comportamiento de todo el conjunto que es la población, con base a una muestra previa.

Para ilustrar dicho método, vamos a ajustar una línea recta a través de un conjunto de n puntos que mediante sus coordenadas (x, y) representan a los datos. Vemos que esto es similar al método que podríamos utilizar para ajustar una recta a simple vista; es decir, se pretende que las desviaciones o segmentos de rectas que van del punto a la recta propuesta sean “pequeñas” en cierto sentido. Una manera conveniente para lograr esto y que nos aporta coeficientes que describen a dicha recta, sean estimadores con propiedades adecuadas, consiste en minimizar la suma de los cuadrados de las desviaciones verticales de la recta ajustada como se ve en la Fig. B.2.

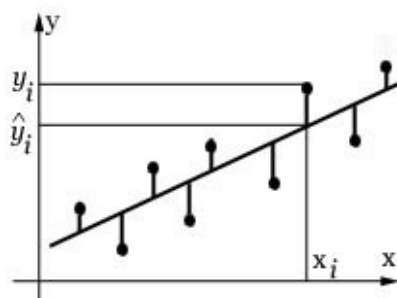


Fig. B.2. Conjunto de puntos ajustados a través de una línea recta. La desviación vertical de cada punto esta dada por la diferencia $y_i - \hat{y}_i$.

Por lo tanto si $\hat{y}_i = a + bx_i$ es el valor que se predice del i -ésimo valor de y (cuando $x = x_i$), entonces la desviación del valor observado de y a partir de la recta \hat{y} (considerado como el error de ajuste) es $y_i - \hat{y}_i$ y la suma de los cuadrados de las desviaciones que deben minimizarse es:

$$\text{SCE} := \sum_{i=1}^n [y_i - (a + bx_i)]^2$$

La cantidad SCE se llama también suma de los cuadrados de los errores por motivos que serán obvios en seguida.

Si SCE tiene un mínimo por el cálculo diferencial, éste ocurrirá para los valores de a y b , que satisfacen las ecuaciones, $\partial \text{SCE} / \partial a = 0$ y $\partial \text{SCE} / \partial b = 0$. Al obtener las derivadas parciales de SCE con respecto de a y b , respectivamente, y al igualarlas a 0 obtenemos:

$$\frac{\partial \text{SCE}}{\partial a} = -2 \sum_{i=1}^n [y_i - (a + bx_i)] = 0 \quad \frac{\partial \text{SCE}}{\partial b} = -2 \sum_{i=1}^n [y_i - (a + bx_i)] x_i = 0$$

Las ecuaciones $\partial \text{SCE} / \partial a = 0$ y $\partial \text{SCE} / \partial b = 0$ se denominan ecuaciones de los mínimos cuadrados para estimar los parámetros de una recta. Nótese que las ecuaciones de los mínimos cuadrados son lineales en a y b y por lo tanto se pueden resolver simultáneamente. Haciendo las operaciones algebraicas correspondientes de las ecuaciones anteriores, puede verificarse que las soluciones son las siguientes:

$$b = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2} \quad a = \hat{y} - b\hat{x}$$

Además se puede demostrar que la resolución simultánea de las dos ecuaciones de los mínimos cuadrados produce valores para a y b que minimizan SCE.

Ahora bien, una manera conveniente de manejar las ecuaciones lineales anteriores, es por medio de matrices. Supóngase que tenemos el modelo lineal

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

y hacemos n observaciones independientes y_1, y_2, \dots, y_n de Y . Podemos escribir y_i como

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \dots + \beta_k X_{ik} + \varepsilon_i$$

en donde x_{ij} es el valor de la j -ésima variable independiente para la i -ésima observación, $i = 1, 2, \dots, n$. Ahora definamos las matrices siguientes, con $x_0 = 1$:

$$Y := \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix} \quad X := \begin{bmatrix} x_0 & x_{11} & x_{21} & \dots & x_{k1} \\ x_0 & x_{12} & x_{22} & \dots & x_{k2} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ x_0 & x_{1n} & x_{2n} & \dots & x_{kn} \end{bmatrix} \quad \beta := \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix} \quad e := \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \vdots \\ e_n \end{bmatrix}$$

Por lo tanto las n ecuaciones que representan las y_i como función de las x , las β y las ε se pueden escribir simultáneamente como $Y = X\beta + \varepsilon$.

Para n observaciones de un modelo lineal simple de la forma $Y = \beta_0 + B_1x + \varepsilon$ tenemos que:

$$Y := \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix} \quad X := \begin{bmatrix} 1 & x_1 \\ 1 & x_2 \\ \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots \\ 1 & x_n \end{bmatrix} \quad \beta := \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \end{bmatrix} \quad e := \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \vdots \\ e_n \end{bmatrix}$$

(Suprimimos el primer subíndice de x ya que hay solamente una variable x involucrada; y $e = \varepsilon$). Se dieron las ecuaciones de los mínimos cuadrados para a y b , anteriormente, que son las soluciones de $\partial SCE / \partial a = 0$ y $\partial SCE / \partial b = 0$, que reescritas antes de despejar a y b , tendríamos:

$$na + b \sum_{i=1}^n x_i = \sum_{i=1}^n y_i \quad a \sum_{i=1}^n x_i + b \sum_{i=1}^n x_i^2 = \sum_{i=1}^n x_i y_i$$

Ahora bien dado que:

$$X^T X := \begin{bmatrix} 1 & 1 & \dots & 1 \\ x_1 & x_2 & \dots & x_n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & x_1 \\ 1 & x_2 \\ \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots \\ 1 & x_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} n & \sum_{i=1}^n x_i \\ \sum_{i=1}^n x_i & \sum_{i=1}^n x_i^2 \end{bmatrix}$$

y

$$X^T Y := \begin{bmatrix} \sum_{i=1}^n y_i \\ \sum_{i=1}^n x_i y_i \end{bmatrix}$$

vemos que las ecuaciones de los mínimos cuadrados están dadas por $(X^T X)\beta' = X^T Y$ en donde

$$\beta' := \begin{bmatrix} \beta'_0 \\ \beta'_1 \end{bmatrix}$$

De aquí que $\beta' = (X^T X)^{-1} X^T Y$ (Donde β' contiene las coeficientes de solución, que son a y b, como hemos venido manejando)

Aunque se ha demostrado solamente que este resultado es verdadero para un caso simple, se puede demostrar que las ecuaciones de los mínimos cuadrados y sus soluciones se presentan con la notación matricial siguiente:

Ecuaciones de los Mínimos Cuadrados y soluciones para un modelo lineal general (aunque haciendo cambios de variables se pueden aplicar a otros modelos, como la cuadrática, cúbica entre otras):

Ecuaciones: $(X^T X)\beta' = X^T Y$

Soluciones: $\beta' := (X^T X)^{-1} X^T Y$

Este modelo de solución de un ajuste de datos por medio del Método de Mínimos Cuadrados es válido también para ecuaciones siguientes y que aplicamos en nuestro tema de tesis:

Función	Tipo de función
$\hat{y} = a + bx$	Lineal
$\hat{y} = a + bx + cx^2$	Curva Cuadrática
$\hat{y} = a + bx + cx^2 + dx^3$	Curva Cúbica
$\hat{y} = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4$	Curva Cuarta
$\hat{y} = a + \exp(x)$	Exponencial
$\hat{y} = a + \ln(x)$	Logarítmica

Para las operaciones matriciales visto en este Anexo B, ver el Anexo A.

Confiabilidad de Ajuste del Método de Mínimos Cuadrados

Ahora bien, veremos como comprobar que efectivamente la función obtenida de ajuste por medio del Método de Mínimos Cuadrados para los valores experimentales representa efectivamente la tendencia de los valores experimentales, es decir, que realmente la función encontrada sea la que ajustada más real a la tendencia de los valores experimentales y a la población.

Una de las formas de comprobación es por medio de la diferencia entre el valor experimental y el valor ajustado; mientras más se acerque a 0 la diferencia, más exacto es el ajuste de los valores. Esto se aplica para todos los elementos experimentales contra los datos ajustados correspondientes. En otras palabras es verificar que sea mínima las desviaciones verticales por cada punto experimental y real: Desviación Vertical = Y experimental – Y Ajustado o real.

La forma anterior es tan solo una verificación punto a punto de los datos experimentales con los ajustados, pero ahora veremos una verificación global, es decir por medio de todos los datos experimentales, corroborar que la función global seleccionada sea la que represente esa tendencia de los datos experimentales.

- R² Ajustada

Esta parte es usada mucho en la calibración de la curva del sistema Sagefh, la cual denota el coeficiente de determinación múltiple y que es una medida que nos dice que tan bien, se ajusta la ecuación de regresión múltiple o elegida por el método de los mínimos cuadrados a los datos de muestra o experimentales. Habría un ajuste perfecto si $R^2 = 1$, de hecho el ajuste sería muy bueno si se acerca 1 y muy malo si se acerca a 0. Una debilidad de este factor es que crece a medida que se incluyen más variables, pudiendo engañarnos en su valor en las ecuaciones por decir de 3 y 4 grado. Por ello utilizaremos el factor R² ajustado, que es el coeficiente de determinación ajustado, el cual se ajusta mejor al número de variables y al tamaño de la muestra usada. Su fórmula es:

$$R^2 \text{ ajustada} := 1 - \frac{(n - 1)}{[n - (k + 1)]} (1 - R^2)$$

Donde n es el tamaño de la muestra, k el número de variables en la ecuación y R² es el coeficiente de determinación, que es una cantidad de la variación de y, que se explica con la función ajustada y se calcula con la fórmula siguiente:

$$R^2 := \frac{\text{Variación explicada}}{\text{Variación total}}$$

Ahora bien en esta fórmula entrarán elementos importantes que nos dicen con exactitud como están ajustados los datos de la muestra, con su correspondiente ajustado obtenido con el método de mínimos cuadrados. La variación explicada, es la suma de todas las desviaciones explicadas al cuadrado de cada elemento experimental. Y la variación total es la suma de todas las desviaciones totales al cuadrado de cada dato experimental. Esto es:

$$\begin{array}{rclcl} \text{Variación Total} & = & \text{Variación explicada} & + & \text{Variación no explicada} \\ \Sigma(y - y_p)^2 & = & \Sigma(\hat{y} - y_p)^2 & + & \Sigma(y - \hat{y})^2 \end{array}$$

Donde y es un valor de muestra, y_p el valor promedio de la muestra y \hat{y} su valor ajustado correspondiente al de la muestra. Pero estas variaciones vienen de las siguientes desviaciones:

$$\begin{array}{rclcl} \text{Desviación Total} & = & \text{Desviación explicada} & + & \text{Desviación no explicada} \\ y - y_p & = & \hat{y} - y_p & + & y - \hat{y} \end{array}$$

Donde especificando, la desviación total es la diferencia del valor de muestra y el valor promedio de los datos de muestra; la desviación explicada es la diferencia del valor ajustado y el valor promedio y la desviación no explicada, es aquella que no podemos deducir el por que ocurre entre el valor de muestra y su valor ajustado.

Con todo ello vemos que R² muestra datos de forma directa de los puntos experimentales, de los ajustados y las separaciones entre ellos, además de que se toma en cuenta a todos los datos involucrados, con ello nos lleva a que R² nos puede decir de forma global, si la ecuación propuesta en el método de mínimos cuadrados representa la tendencia global de los datos experimentales.

Anexo C

DATOS DE AMERSHAM LIFE SCIENCE SOBRE LOS ISOTOPOS

En este apartado se describen algunas características de los isótopos radioactivos usados en Fisiología y aplicados en nuestro programa, se muestran además las tablas de los factores de decaimiento o de descomposición en el ambiente de los isótopos radioactivos con base a su actividad estándar y su tiempo de vida. Dichos datos son obtenidos directamente de Amersham Life Science que a lo largo de casi 50 años los ha estudiado. [11] Cabe hacer mención que los elementos radioactivos aquí utilizados no representan peligro a la vida humana de forma directa, aún así se siguen varias normas de seguridad internacionales para su almacenamiento y su utilización en los experimentos con ratas en los laboratorios de Fisiología.

TRITIUM ^3H

Descripción	Valor
Tiempo de vida radioactivo promedio	12.4 años
Principal emisión radioactiva	18.6 keV Beta (máximo)
Comprobación de contaminación	Trapo ensuciado con liquido destellante
Comprobación biológica	Muestras de orina
Protección requerida	Ninguna

El elemento tritium tiene una emisión baja de rayos beta por lo cual no puede ser monitoreado de forma directa con aparatos, con ello se debe tener cuidado y mantener el área de trabajo siempre limpia y ordenada.

A continuación se muestra la tabla que contiene los factores decaimiento o descomposición del isótopo cuando ya esta en el ambiente, el control se lleva en meses x años, por decir el factor 0.869 es obtenido a saber el factor de decaimiento a los 2 años con 7 meses.

Meses> Años v	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	1.000	0.995	0.991	0.986	0.981	0.977	0.972	0.968	0.963	0.959	0.954	0.950
1	0.945	0.941	0.936	0.932	0.928	0.923	0.919	0.915	0.910	0.906	0.902	0.898
2	0.893	0.889	0.885	0.881	0.877	0.873	0.869	0.865	0.860	0.856	0.852	0.848
3	0.844	0.841	0.837	0.833	0.829	0.825	0.821	0.817	0.813	0.810	0.806	0.802
4	0.798	0.794	0.791	0.787	0.783	0.780	0.776	0.772	0.769	0.765	0.762	0.758
5	0.754	0.751	0.747	0.744	0.740	0.737	0.733	0.730	0.727	0.723	0.720	0.716
6	0.713	0.710	0.706	0.703	0.700	0.697	0.693	0.690	0.687	0.684	0.680	0.677
7	0.674	0.671	0.668	0.665	0.661	0.658	0.655	0.652	0.649	0.646	0.643	0.640
8	0.637	0.634	0.631	0.628	0.625	0.622	0.619	0.616	0.614	0.611	0.608	0.605
9	0.602	0.599	0.597	0.594	0.591	0.588	0.585	0.583	0.580	0.577	0.575	0.572
10	0.569	0.567	0.564	0.561	0.559	0.556	0.553	0.551	0.548	0.546	0.543	0.541
11	0.538	0.535	0.533	0.530	0.528	0.526	0.523	0.521	0.518	0.516	0.513	0.511
12	0.509	0.508	0.504	0.501	0.499	0.497	0.494	0.492	0.490	0.487	0.485	0.483

FOSFORO 32 ³²P

Descripción	Valor
Tiempo de vida radioactivo promedio	14.3 días
Principal emisión radioactiva	1.709 MeV Beta (máximo)
Comprobación de contaminación	Detector Geiger-Müller
Comprobación biológica	Muestras de orina
Protección requerida	1 cm de Perspex (Plexiglas) corta los rayos beta y minimiza la producción de Bremsstrahlung

El elemento Fósforo 32 tiene una alta energía en sus átomos y comúnmente es encontrada en laboratorios de investigación por lo cual se debe tener mucho cuidado. A continuación se muestran sus factores de decaimiento, el control se lleva Horas x Días.

Horas > Días v	0	12	24	36	48	60	72	84
0	1.000	0.976	0.953	0.930	0.908	0.886	0.865	0.844
4	0.824	0.804	0.785	0.766	0.748	0.730	0.712	0.695
8	0.679	0.662	0.646	0.631	0.616	0.601	0.587	0.573
12	0.559	0.546	0.533	0.520	0.507	0.495	0.483	0.472
16	0.460	0.449	0.439	0.428	0.418	0.408	0.398	0.389
20	0.379	0.370	0.361	0.353	0.344	0.336	0.328	0.320
24	0.312	0.305	0.298	0.291	0.284	0.277	0.270	0.264
28	0.257	0.251	0.245	0.239	0.234	0.228	0.223	0.217
32	0.212	0.207	0.202	0.197	0.192	0.188	0.183	0.179
36	0.175	0.170	0.166	0.162	0.159	0.155	0.151	0.147
40	0.144	0.140	0.137	0.134	0.131	0.127	0.124	0.121
44	0.119	0.116	0.113	0.110	0.108	0.105	0.102	0.100
48	0.098	0.095	0.093	0.091	0.089	0.086	0.084	0.082
52	0.080	0.078	0.077	0.075	0.073	0.070	0.068	

FOSFORO 33 ³³P

Descripción	Valor
Tiempo de vida radioactivo promedio	25.4 días
Principal emisión radioactiva	0.249 MeV Beta (máximo)
Comprobación de contaminación	Detector Geiger-Müller
Comprobación biológica	Muestras de orina
Protección requerida	1 cm de Perspex (Plexiglas) corta los rayos beta.

El elemento Fósforo 33 no requiere de cuidados especiales, solo lo necesario como cualquier emisor beta. A continuación se muestra su tabla de factores de decaimiento, donde se maneja Días x Días.

Días > Días v	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1.000	0.973	0.947	0.921	0.897	0.872	0.849	0.826	0.804	0.782
10	0.761	0.741	0.721	0.701	0.683	0.664	0.646	0.629	0.612	0.595

20	0.579	0.564	0.549	0.534	0.520	0.506	0.492	0.479	0.466	0.453
30	0.441	0.429	0.418	0.406	0.395	0.385	0.374	0.364	0.355	0.345
40	0.336	0.327	0.318	0.309	0.301	0.293	0.285	0.277	0.270	0.263
50	0.256	0.249	0.242	0.236	0.229	0.223	0.217	0.211	0.205	0.200
60	0.195	0.189	0.184	0.179	0.174	0.170	0.165	0.161	0.156	0.152
70	0.148	0.144	0.140	0.136	0.133	0.129	0.126	0.122	0.119	0.116
80	0.113	0.110	0.107	0.104	0.101	0.098	0.096	0.093	0.091	0.088
90	0.086	0.084	0.081	0.079	0.077	0.075	0.073	0.071	0.069	0.067
100	0.065	0.064	0.062	0.060	0.059	0.057	0.055	0.054	0.053	0.051

YODO 125 ¹²⁵I

Descripción	Valor
Tiempo de vida radioactivo promedio	59.6 días
Principal emisión radioactiva	35 keV Gamma (7% emitido y 98% convertido internamente) 27-32 keV Rayos X (1.40% TeK Rayos X)
Comprobación de contaminación	Detector centelleante
Comprobación biológica	Análisis de la Tiroides y el Detector centelleante
Protección requerida	

El elemento Yodo 125 tiene una volatilidad o evaporación muy rápida y por ello se debe tener un cuidado muy especial en su utilización. Además algunos componentes de yodo pueden penetrar los guantes de hule y goma por ello se sugiere usar doble par de guantes o bien guantes de polietileno. A continuación se muestra su tabla de factores de decaimiento, dada Días x Días.

Días > Días v	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
10	1.000	0.977	0.955	0.933	0.911	0.890	0.870	0.850	0.830	0.811
20	0.793	0.774	0.756	0.739	0.722	0.706	0.689	0.673	0.658	0.643
40	0.628	0.614	0.600	0.586	0.572	0.559	0.546	0.534	0.521	0.509
60	0.498	0.486	0.475	0.464	0.454	0.443	0.433	0.423	0.413	0.404
80	0.394	0.385	0.377	0.368	0.359	0.351	0.343	0.335	0.328	0.320
100	0.313	0.305	0.298	0.292	0.285	0.278	0.272	0.266	0.260	0.254
120	0.248	0.242	0.236	0.231	0.226	0.221	0.215	0.211	0.206	0.201
140	0.196	0.192	0.187	0.183	0.179	0.175	0.171	0.167	0.163	0.159
160	0.156	0.152	0.149	0.145	0.142	0.139	0.135	0.132	0.129	0.126
180	0.123	0.120	0.118	0.115	0.112	0.110	0.107	0.105	0.102	0.100
200	0.098	0.095	0.093	0.091	0.089	0.087	0.085	0.083	0.081	0.079
220	0.077	0.076	0.074	0.072	0.071	0.069	0.067	0.066	0.064	0.063
240	0.061	0.060	0.059	0.057	0.056	0.055	0.053	0.052	0.051	0.050

Al final todos los elementos radioactivos aquí utilizados no son peligrosos de forma directa a la vida humana, aunque si deberán tener cuidado en su uso y cumplir con las normas internacionales en su utilización, así como en la descontaminación de los instrumentos y poner en contenedores los residuos de los mismos.

* A continuación el Manual del Usuario. La numeración de página del manual empieza desde 1, para que pueda imprimirse aparte para poder utilizarlo y aprender a usar el Sistema Sagefh y sea de fácil uso. En esta Tesis sería la página 105.

Anexo D

SISTEMA ANALIZADOR GRÁFICO PARA ESTUDIOS FISIOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS

Manual del Usuario del Programa

Bienvenido al manual de Usuario del Sistema Analizador Gráfico para Estudios Fisiológicos e Histológicos, en este programa usted encontrará una herramienta sencilla capaz de analizar ciertas características de una imagen fotográfica, en la cual se muestran células de cortes histológicos de tejidos de animales. En este manual usted encontrará las principales funciones del programa, formas de trabajo de los procesos y como ingresar información en los mismos; además de los posibles errores que surgen en su uso al no ingresar de manera correcta datos o imágenes.

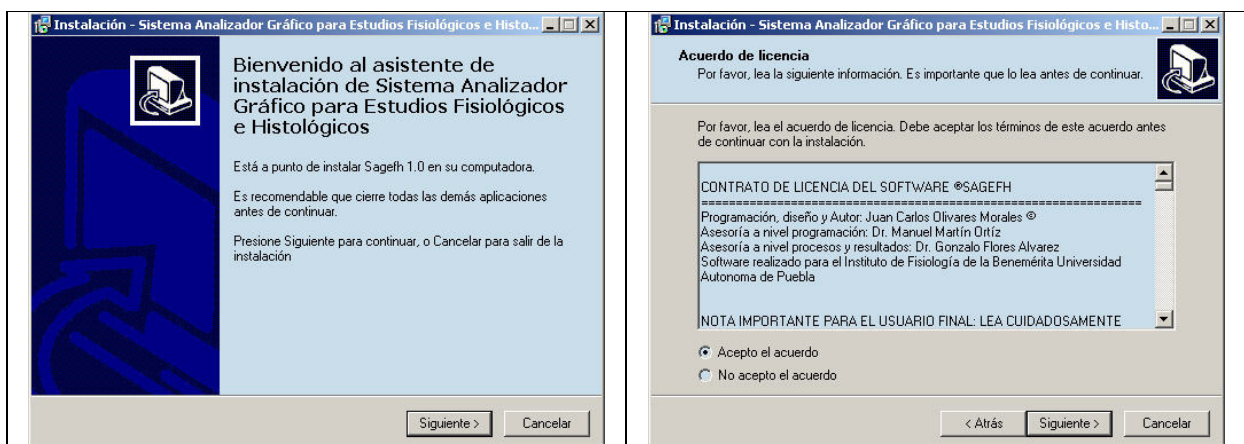
Requisitos de Sistema

Para instalar el sistema SAGEFH versión 1.0 necesita usted tener una computadora con las siguientes características mínimas: PC con procesador Pentium III a 1.2 Ghz, con 128 Mb de memoria RAM. Disco Duro con 10Mb de espacio libre para la instalación del programa y procesamiento de las imágenes y sistema operativo Microsoft Windows 98 o 2000/XP con una resolución en pantalla de 800x600 píxeles.

Cabe hacer mención que son tan solo los requisitos mínimos para que funcione de manera correcta el sistema, sin embargo puede funcionar con requisitos menores o trabajará mucho mejor si cuenta con mayores de los recursos mencionados.

Instalación

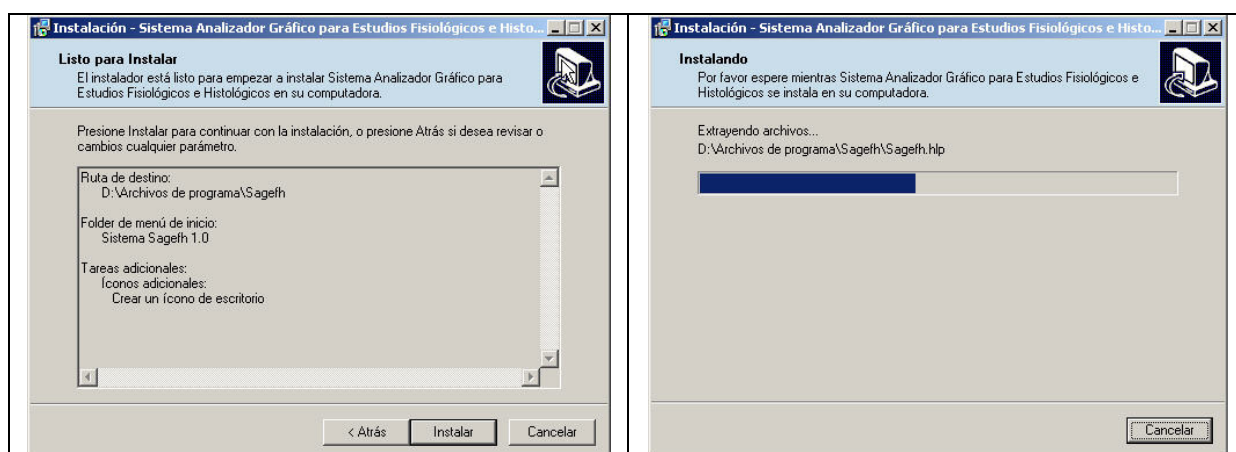
Para instalar el sistema Sagefh en su equipo deberá contar con el disco de instalación. Al insertar el disco este se auto ejecutará y aparecerá el mensaje de bienvenida. Si no se auto ejecuta, ir al disco de instalación y ejecutar el archivo setup.exe.



Pantallas de inicio al empezar la instalación de Sagefh. Izquierda. Cuadro de diálogo que se muestra al ejecutar el archivo setup.exe. Derecha. Cuadro de aceptación de la licencia de Sagefh.

Después de aceptar la licencia de protección de Sagefh, se pide el password para poder instalar el software, el cual se proporciona directamente al Dr. Gonzalo Flores Álvarez, del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Después de haber ingresado el password, el siguiente diálogo le indicará donde se instala el software, se sugiere un directorio pero usted puede cambiarlo. Después de esto se muestra el diálogo donde se pondrá el nombre al grupo del programa que quedará en la sección de Programas del menú Inicio de Windows. El siguiente cuadro de diálogo nos permite crear un acceso directo en el escritorio para poder iniciar el sistema cuando ya este instalado en nuestro equipo de cómputo, para hacerlo solo hay que seleccionar la opción Crear un icono de escritorio.



Cuadros de diálogo finales de la instalación. Izquierda. Este cuadro muestra las opciones seleccionadas a instalar. Derecha. Progreso de la instalación.

Al final de estos cuadros aparecerá, el cuadro de diálogo de confirmación de que se ha completado la instalación del Sistema Analizador Gráfico de Estudios Fisiológicos e Histológicos. Se podrá seleccionar si se desea ejecutar la aplicación automáticamente al terminar la instalación.

Pantalla Inicial

Al iniciar el Sistema Sagefh versión 1.0 este cargará todas las librerías gráficas y todos los formularios que en el sistema se necesitan, aunque no se visualizarán hasta que se carguen y trabajen las imágenes. Después de la instalación se creará el icono correspondiente para poder iniciar el programa. Al dar clic en dicho icono, que será el acceso directo a nuestro programa, se empezará con la pantalla inicial y la interfaz gráfica de Sagefh similar a la de la Fig. 1.1

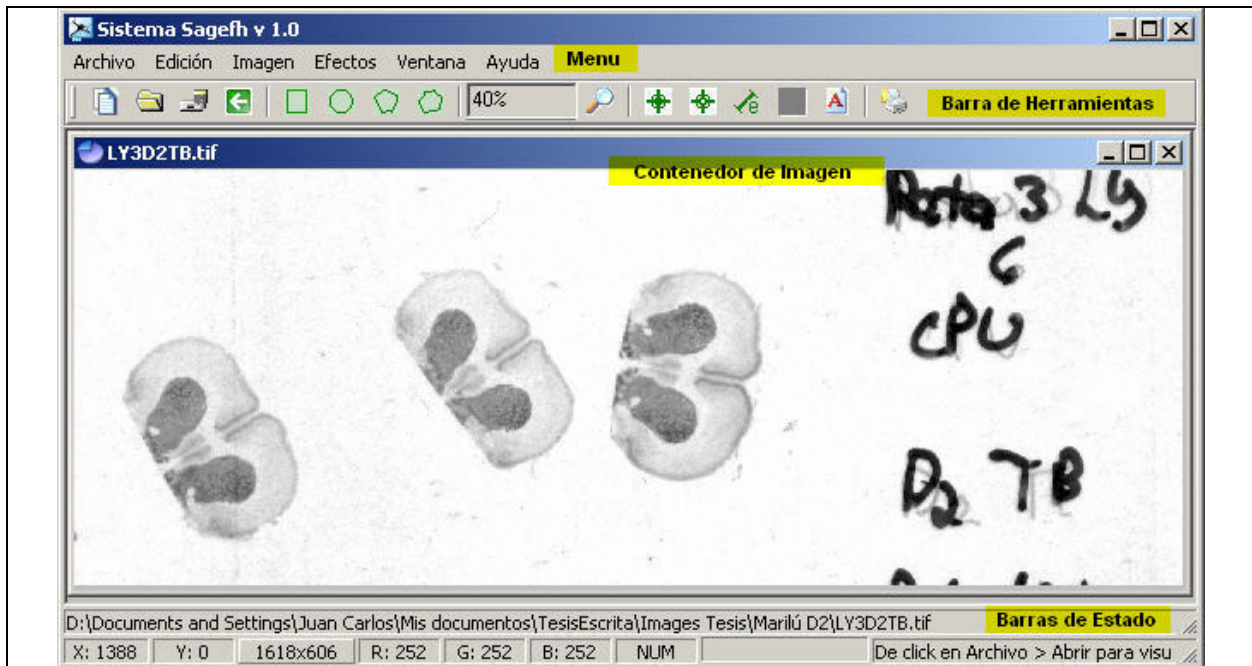
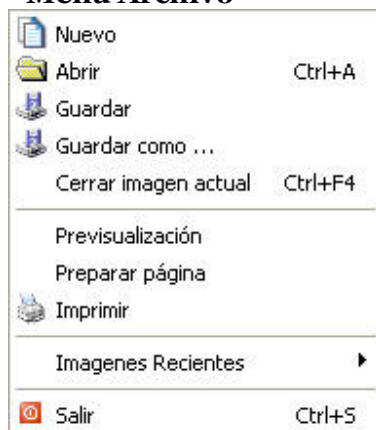


Fig. 1.1 Interfaz del Sistema Analizador Gráfico para Estudios Fisiológicos e Histológicos versión 1.0 con una imagen Tif abierta reducida a un 40% de su tamaño.

Los Menús del sistema

Ahora pasaremos a la parte principal de nuestro programa, la acción de lo que se realiza y para ello se describe lo que hace cada opción que vemos en la barra del menú principal.

- Menú Archivo



El menú archivo contiene 9 opciones que son:

Nuevo. Esta parte nos sirve como su nombre lo indica para crear una nueva imagen. Al dar clic sobre Nuevo nos aparecerá una opción donde daremos las medidas que tendrá la nueva imagen, ancho y altura. También veremos la opción de que la medida sea del tamaño de lo que está en el clipboard o portapapeles, ya que se toma en cuenta si cierta región de una imagen es copiada o cortada y se quiera pasar a una nueva imagen, entonces se deja esa opción para que las medidas se obtengan de manera automática Y por último tendremos la opción de dar un nombre a la ima-

gen. Al aceptar se crea la imagen con todas las opciones que escogimos o bien damos clic en Cancelar para cerrar esa opción sin realizar ninguna acción.

Abrir. Nos permite visualizar una imagen en nuestro programa, misma que tengamos en el equipo de cómputo. Incluso podremos preverla antes de abrirla (sólo en imágenes compatibles). Al oprimir la tecla del ratón (hacer clic o dar clic) un el botón Abrir, se entrará un cuadro de diálogo tipo explorador de Windows, donde en la parte superior seleccionaremos la ubicación de nuestra imagen, sea en el disco duro de la PC u otro dispositivo extraíble como disquete, CDROM o memoria flash. En la parte central aparecerán los directorios para especificar donde se encuentra la imagen, en la parte derecha aparecerá la previsualización que se hará cuando se de un clic sobre el archivo de la imagen que se abrirá. En la parte inferior se puede escribir un nombre completo de la imagen y abajo se elige el formato de imagen. Por default el Sistema Sagefh mostrará todas las imágenes soportadas que son JPEG, TIF, BMP, PCX, PSD, ICO, TXT o CAL, pero se puede especificar solo un formato de los antes mencionados para hacer fácil la búsqueda de un imagen específica. Al dar doble clic sobre el archivo o dar clic en el botón Abrir, esta se mostrará como una nueva ventana en el programa Sagefh. O bien dando clic en Cancelar o presionando la tecla ESC se cierra el cuadro de diálogo sin realizar ninguna acción. Otras opciones aparecen también en la parte superior de ese cuadro de diálogo que son para visualizar características de los archivos como fecha de creación, tamaño y movimiento y creación en los directorios.

Las imágenes se visualizarán en un Contenedor de Imagen y los archivos de Texto o Calibración en la ventana TSagefh que es el Editor de Texto.

Guardar. Esta opción permite como lo dice guardar las imágenes que tengamos en nuestro sistema Sagefh, pero que ya le haya sido previamente asignada un nombre y haya sido guardada previamente con Guardar como. Esta opción permite guardar la imagen después de haber hecho modificaciones. Si se da clic sobre esta opción y la imagen no ha sido guardada previamente, entonces el programa se pone en modo de Guardar como.

Guardar como. Esta opción permite guardar imágenes por primera vez. Al dar clic sobre esta opción aparecerá un cuadro de diálogo similar al de Abrir con la diferencia que ahora si se debe ingresar un nombre con el cual se guardará la imagen en la computadora, así como definir una extensión o tipo de formato gráfico con el que se guardará, pudiendo ser JPEG, TIF, BMP o ICO. El nombre y extensión se definen en la parte de abajo del cuadro de diálogo. En un momento dado también nos sirve para poder guardar la imagen actual de trabajo con otro nombre, esto con el fin de tener dos imágenes iguales pero con diferente nombre.

Cerrar imagen actual. Cierra la imagen que se tiene encima de todas las ventanas de las otras imágenes (si es que las hay), es decir cierra la imagen actual.

Previsualización. Esta opción permite observar como quedaría impreso el gráfico actual sobre una hoja tamaño carta, ya sea de forma horizontal o vertical, según se defina en la orientación de página en Preparar página. En la parte inferior aparecerá el botón de mandarla a imprimir o bien cerrar la ventana.

Preparar página. Esta opción permite configurar nuestro gráfico para que sea impreso de forma adecuada y correcta. Al dar clic sobre esa opción nos aparecerá un cuadro de diálogo con tres partes: Impresora, Papel y Orientación. En la parte de Impresora definiremos el dispositivo sobre la cual se imprimirá el gráfico, así como también podremos ver propiedades de la misma. Papel nos permite definir el tamaño sobre el cual se imprimirá y la forma como la impresora





toma las hojas, por default es Automático. Y por último la orientación nos permite imprimir el gráfico sobre una hoja rectangular ya sea en forma horizontal o vertical.

Imprimir. Nos permite mandar a impresión la imagen actual. Al dar clic sobre esa opción nos muestra un cuadro de diálogo, donde ya aparece la impresora que seleccionamos en preparar página o bien si lo deseamos podemos volver a cambiarla. También nos muestra que se imprime todo el gráfico y el número de veces que se harán dichas impresiones. Y abajo se muestra el botón Aceptar que al dar clic se mandará automáticamente el gráfico a impresión o Cancelar si deseamos no realizarlo por el momento.

Imágenes recientes. Esta parte del menú Archivo abre un submenú en el cual se mostrarán los últimos cinco documentos o imágenes abiertas en el programa. Cada vez que se abre una imagen se adiciona su nombre en esta lista. Esto es para facilitar la carga de las imágenes que se trabajaron por última vez.

Salir. Por último esta opción permite abandonar el Sistema Sagefh. Al dar clic sobre esa opción aparecerá un mensaje de confirmación de salida de nuestro programa y que al darle Sí, se cerrarán todas las imágenes y opciones abiertas de la aplicación. Si damos No seguimos trabajando normalmente.

- Menú Edición

 Deshacer	Ctrl+U		
 Cortar	Ctrl+X		
 Copiar	Ctrl+C		
 Pegar	Ctrl+V		
Selección cuadrada libre			
Selección circular libre			
Selección libre con líneas			
Selección libre			
Seleccionar todo	Ctrl+E		
Valores			

Ahora vamos a ver las funciones que tiene el Menú Edición.

Deshacer. Esta opción realmente no permite deshacer muchos de los cambios que se hacen sobre las imágenes en las que se está trabajando, ya que el sistema Sagefh cada vez que se realiza alguna acción, el resultado es visualizado en otra ventana, dejando la imagen original intacta. En la práctica deshacer solo quita cualquier selección hecha sobre la imagen.

Cortar. Cuando se realiza alguna selección dentro de una imagen, siempre es posible cortar todo lo que está dentro de la selección y luego poder ponerlo en otra imagen o en esa misma. La parte de la imagen que se corta se vuelve blanca y así quedará el efecto de recorte sobre la imagen origen.

Copiar. Esta opción trabaja de manera similar a Cortar, con la diferencia de que es espacio que se está tomando en cuenta no quedará en blanco sino simplemente se hará una copia exacta de lo que hay dentro de la selección. Lo copiado quedará en el Portapapeles de Windows.

Pegar. Esta es una de las funciones que hacen que Cortar y Copiar tengan sentido en nuestro programa e incluso en otros programas. Pegar sólo funciona cuando se ha ejecutado antes Cortar y Copiar. Para poder pegar una región nos colocamos sobre la imagen destino, es decir, sobre la que se hará el pegado; cuando damos la función pegar, la región antes copiada o cortada se mostrara en la imagen destino. Después de ello solo bastará mover la región pegada a la parte donde queramos que quede y para lo cual bastará dar un clic sobre la región y mantener presionado el botón izquierdo del Ratón y así se podrá mover la región. Cuando uno mueve el ratón sobre la imagen, el indicador flecha del cursor cambia, eso indica que estamos sobre lo que pegamos y que podemos moverla si lo deseamos.

Después para que la región pegada se fusione de manera definitiva con la imagen destino deberá dar Enter y acto seguido aparece un mensaje donde se nos pide confirmar la fusión haciendo clic en el botón de Sí. Fig. 1.2 El No es para quitar lo que se pego y Cancelar es para cuando se desea aun mover la región pegada en otra parte de la imagen destino.

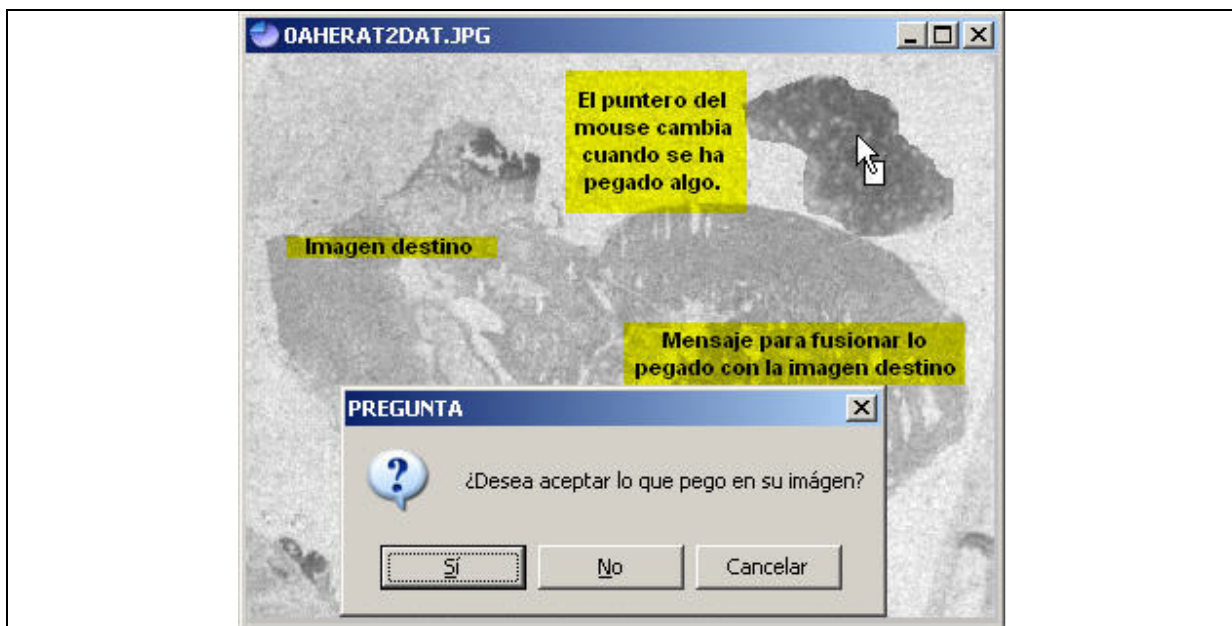


Fig. 1.2 Momentos en los cuales se pega una región sobre una imagen

Selección cuadrada libre. Opción que nos permite seleccionar una parte de la imagen con un rectángulo. La forma de trabajo de esta función es la siguiente:

- a).- Se da clic en esta función para activarla.
- b).- Ahora se dará un clic sobre la imagen y se mantendrá presionado el botón izquierdo del Ratón y al instante podremos ver en color negativo como aparece un rectángulo y que crecerá o disminuirá de tamaño según movamos el apuntador sobre la imagen.
- c).- Para finalizar la parte de selección simplemente se soltará el botón izquierdo del Ratón y automáticamente aparecerá el rectángulo con color azul y del tamaño del último rectángulo mostrado con color negativo.

De esta forma ya se tiene una selección libre en forma de rectángulo y el usuario ya podrá usar cualquiera de los procesos que crea conveniente.

Selección circular libre. Opción que nos permite seleccionar una parte de la imagen con un círculo. La forma de hacerlo es igual que en la Selección cuadrada libre.

Selección libre con Líneas. Esta opción permite seleccionar una parte de la imagen a través de un polígono irregular que iremos formando poco a poco. La forma de trabajo de esta opción es la siguiente:

- a).- Se da clic en esta función para activarla.
- b).- Se dará un clic sobre la imagen y automáticamente aparecerá una línea en color negativo que crecerá o disminuirá de tamaño según movamos el apuntador. Línea nos permite definir un lado del polígono.
- c).- Se da otro clic para definir ya totalmente un lado y a su vez aparecerá otra línea que será el siguiente lado del polígono a definir. Y así sucesivamente hasta formar el penúltimo lado de nuestro polígono.
- d).- Para finalizar solo bastará unir la última línea con el punto de inicio o bien solo dando clic con el botón derecho del ratón sobre la imagen y seleccionamos la parte Cerrar selección actual y con ello se pintará automáticamente nuestro polígono con color azul y así poder aplicar cualquier función que se crea conveniente.

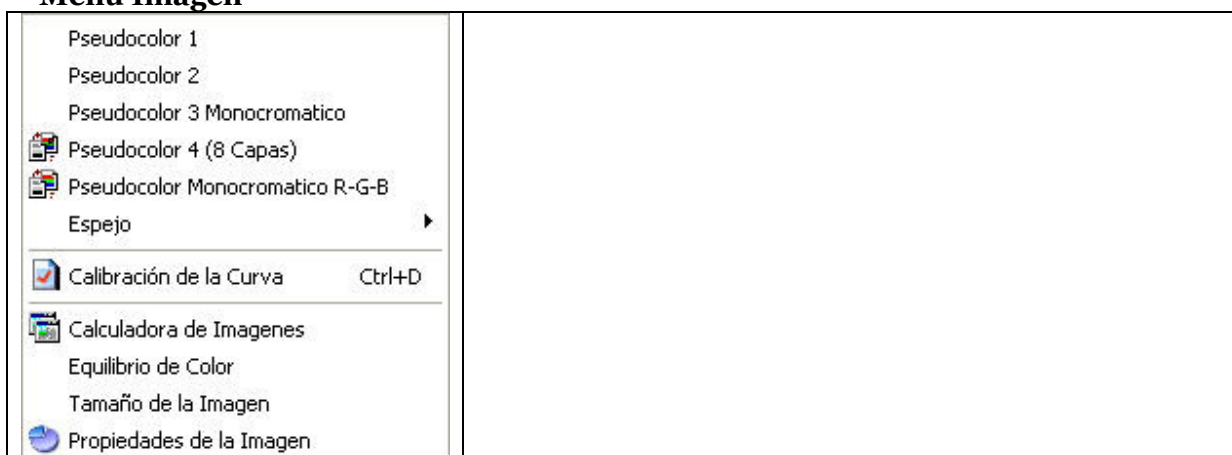
Selección libre. Esta opción permite seleccionar cualquier región de la imagen con tan solo mover el apuntador del ratón. La forma de uso de esta función es:

- a).- Se da clic en esta función para activarla.
- b).- Se da un clic sobre la imagen y automáticamente empezara la selección con color azul según se vaya moviendo el apuntador.
- c).- Para finalizar esta selección basta unir el punto final con el punto inicial o bien dar clic con el botón derecho del ratón y escoger Cerrar selección actual.

Seleccionar todo. Esta opción permite seleccionar toda la imagen sin necesidad de seleccionar algo o parte sobre ella.

Valores. Es una opción para obtener datos estratégicos donde empieza la selección y donde termina dentro de un área rectangular. Al dar clic en esta opción se nos dice el punto x,y superior izquierdo de donde empieza la selección y el punto inferior derecho de donde termina, además de mostrar el ancho y alto de la imagen.

- Menú Imagen



Ahora vamos a la explicación del Menú Imagen.

Pseudocolor 1, 2,3 y 4 (8 Capas). Estas cuatro opciones nos permiten poner colores falsos a las imágenes monocromáticas o grises. Con las opciones 1, 2 y 3, solo bastará dar clic sobre ellas para ver su efecto de color. Para la opción 4 (8 Capas), al dar clic sobre ella nos mostrará un cua-

dro de diálogo Fig. 1.3 donde se tiene la opción de elegir hasta ocho colores para ponerle a los niveles de grises de la imagen.

En el cuadro de diálogo se nos muestra una tira de 8 colores distintos y que al dar clic sobre alguno de esos colores nos mostrará otro cuadro de diálogo donde podremos definir el color que deseemos poner y que se presentará en el intervalo de grises que se muestra debajo de la tira de colores (0 a 255). En la parte izquierda se muestra su valor RGB de cada uno de los 8 colores, incluso se tiene la opción de ingresar los números correspondientes y dando clic en el botón Aplicar Color para visualizarlo en la capa correspondiente, si es que se sabe los valores R, G, B que corresponden al valor que deseamos. Los valores deben estar entre 0 a 255.

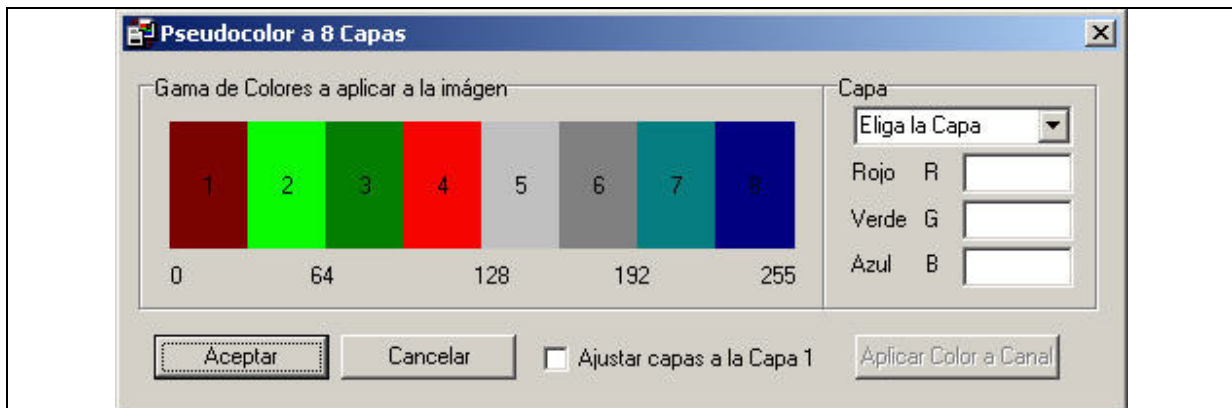


Fig. 1.3. Cuadro de diálogo cuando se escoge la opción Pseudocolor 4 (8capas)

Después de haber elegido nuestros ocho colores, se da clic en Aceptar para que nuestra imagen de grises pase a ser de color. O bien si se da Cancelar no hay ningún efecto sobre la imagen. Existe la opción también de Ajustar capas a la Capa 1, esto es, para que los 8 colores tengan una tonalidad parecida a la Capa 1, esto se hace por si queremos que los colores no sean tan contrastantes y diferentes, se da esa opción para ajustar las ocho a un intervalo de color.

Pseudocolor Monocromático R-G-B. Esta opción nos permite asignar un plano de color a una imagen a través de una operación AND. En la Fig. 1.4. se tiene la opción de aplicar un color puro rojo, verde o azul o bien dando clic sobre la parte que dice Clic para Color, para que usted pueda seleccionar su propio color.

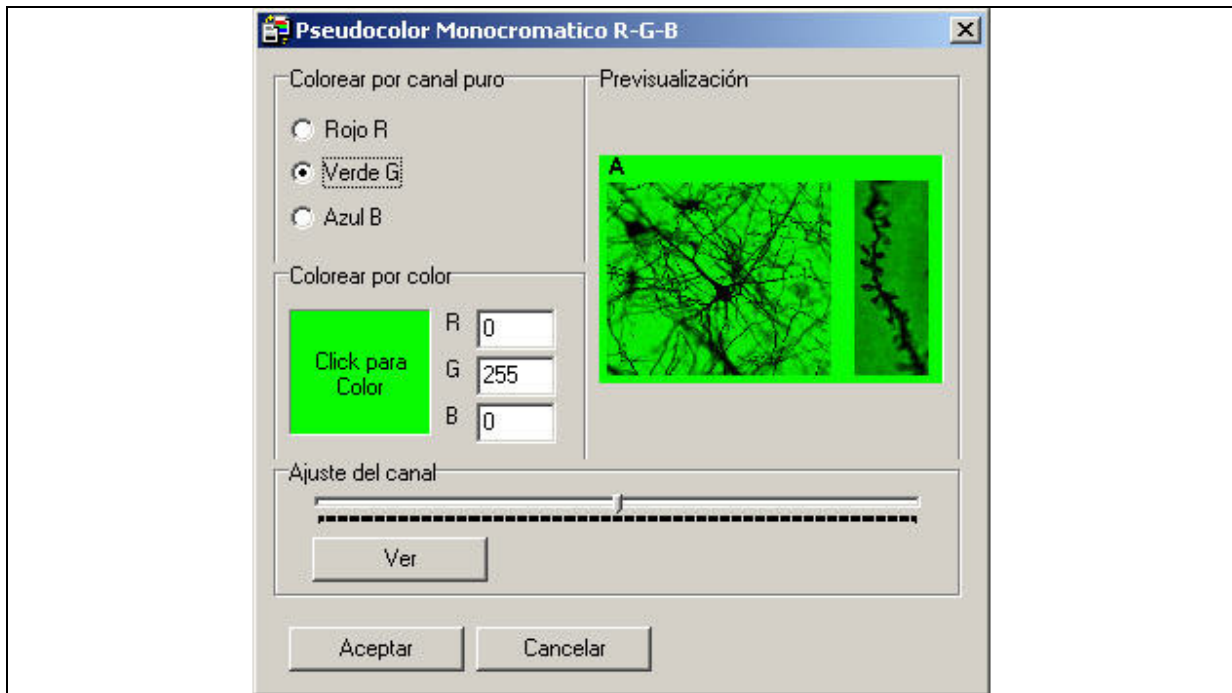


Fig. 1.4. Ventana de Pseudocolor Monocromático RGB donde se asigna el color verde a una imagen.

Se tiene ahí mismo además la opción del ajuste del canal, el cual al mover el indicador podemos aplicar brillo (hacia la derecha) u oscurecimiento (hacia la izquierda) esto por si el color es demasiado oscuro para la imagen, pudiéndose crear con ello imágenes con falso color muy vistosas.

Espejo. Esta opción nos permite hacer un reflejo de la imagen como si fuese un espejo de la misma. Se tienen dos opciones en espejo en vertical o X y espejo en horizontal o en Y.

Calibración de la Curva. Opción y parte esencial del sistema Sagefh. Al dar clic en esta opción aparecerá la forma de la Fig. 1.4, la cual se divide en 3 partes importantes que son: Los Datos Esenciales, Los Datos a Graficar y La Graficación.

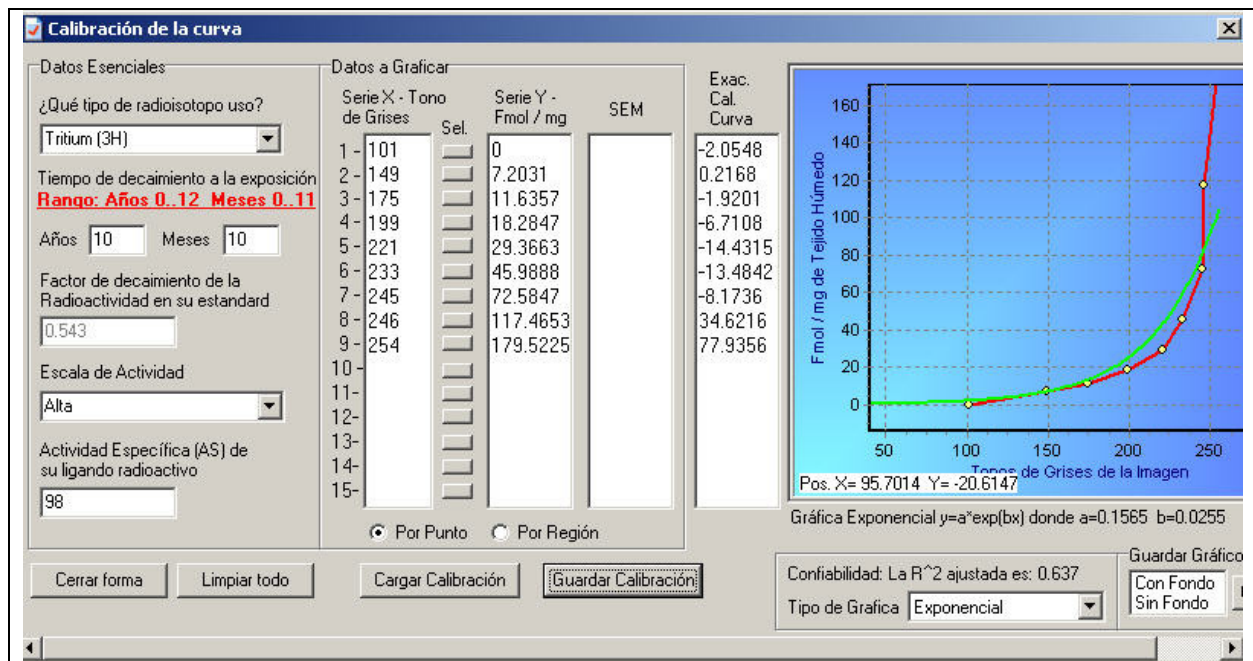


Fig. 1.5 Forma de la Calibración de la Curva ya con datos experimentales y la función ajustada calibrada para esos datos.

Dentro de esas partes una es necesaria para poder ver la graficación de la curva calibrada o función exacta de los datos experimentales. Esta forma es usada para graficar los datos experimentales y para obtener la gráfica más aproximada a esos datos experimentales con base a funciones ya predeterminadas para ver si el experimento cumple lo que se está buscando. Pero para ver como trabaja esta forma, vayamos por partes y veamos su funcionamiento.

a).- Datos Esenciales: Esta se ve en la parte izquierda de la forma y se deberá llenar de arriba hacia abajo y de forma consecutiva, ya que de otra manera puede marcarse errores donde hay campos vacíos. Primero se elige el isótopo radioactivo aplicado el tejido, ya sea Tritium, Fósforo 32 y 33 o Yodo 125 o bien se deja la alternativa de ingresar otro elemento radioactivo no considerado en este programa como el Carbono 14. Escogiendo algunas de las primeras 4 opciones de elementos, nos mostrará en el siguiente campo, el ingreso del tiempo de decaimiento a la exposición del tejido al isótopo radioactivo; éste se deberá llenar según el intervalo marcado en rojo, en días, meses o años según corresponda. Cuando se elige un isótopo diferente, estas opciones se bloquean y se va directamente al siguiente campo. Al dar el tiempo de decaimiento se obtiene automáticamente el Factor de decaimiento de la radioactividad en su estándar con base a tablas de seguridad de Amersham. En el caso de isótopo libre el usuario tendrá que ingresarlo, ya que son isótopos no tomados en cuenta en este programa. Después se escoge su Escala de Actividad: Alta o Baja para terminar ingresando la Actividad Específica. Todos los datos en esta forma son enteros o reales según corresponda. Al estar en Actividad Específica se da enter y automáticamente se mostrarán datos en la serie Y, que son obtenidos con la ecuación: falta ecuación???

b).- Datos a Graficar: Esta parte es importante para que La Graficación funcione y tenga éxito en su calibración.

Tenemos de un lado la Serie X, que se llenará con base a los tonos de grises que se obtienen de manera directa de una imagen y que por consiguiente solo deberán ser valores entre 0 y 255 ya que es el intervalo total de grises que puede haber en una imagen. Estos datos se pueden obtener

de 2 formas, ya sea por punto o por una región determinada de la imagen y que podremos seleccionar dando clic en alguna de esas opciones que están debajo de la Serie X. Después de haber seleccionado alguna de esas dos formas y que por omisión es por Punto, se dará clic en alguno de los 15 botones que están del lado derecho de la Serie X, cuando se da clic en alguno de esos botones se quita la Forma y aparece la última imagen vista en el programa y que este aun abierta o bien se puede escoger otra que el usuario crea conveniente. Cuando es por punto solo bastará dar un clic en cualquier parte de la imagen para que automáticamente aparezca la forma de Calibración nuevamente y aparecerá el valor obtenido a un lado del botón que se presionó. Se tienen 15 botones para 15 valores, no más. En el caso de que sea Por Región, su forma de trabajo es similar a la de Por Punto, nada más que en vez de un clic se seleccionará una región libre como si se hubiera seleccionado la opción Selección libre y que al cerrar la región aparecerá nuevamente la forma de Calibración y mostrará el valor promedio de grises de esa región, además que para seleccionar nuevamente otra región cuando aparezca la imagen nuevamente se dará un clic antes para quitar la selección anterior. También podrá ingresar el valor directamente uno por uno de arriba hacia abajo dando un enter por cada valor que acabe de ingresar. Estos valores de Serie X también puede ser guardados con el botón Guardar Calibración y abrirlos con el botón de al lado. Los valores comúnmente son obtenidos a través de una imagen filmina que contiene ya grises calibrados con base a la aplicación de los isótopos radioactivos y a su Escala de Actividad, por ello son datos calibrados y que el usuario deberá tener cuidado al ingresarlos para tener un ajuste de datos exacto.

En el caso de que seleccione los valores de grises por región se incorpora la parte de Error Estándar en la Media o SEM, el que nos dice que tan exacto fue el promediado de los valores de la región y que tan exacto fue que todos los puntos dentro de la región fueran tan similares entre si; mientras más se acerque a cero, son más exactos.

Al final estos campos, Serie X y Serie Y pueden llenarse bajo el procedimiento anterior o bien de forma libre, datos que el usuario crea conveniente, siempre que no pasen de 15.

c).- La Graficación: Después de ingresar los datos viene su graficación y su correspondiente calibración. Para ello en la parte inferior de la gráfica se tienen las siguientes opciones:

Función	Qué hace
Normal	Gráfica de forma común los datos que están en las Series X y Y, es decir, graficará los datos experimentales.
Exponencial	Busca bajo la ecuación $y=a*\exp(bx)$ hacer un ajuste de los datos de Serie X y Y.
Línea	Similar que en Exponencial pero con la ecuación $y=a+bx$
Logarítmica	Similar que en Exponencial pero con la ecuación $y=a+b*\ln(x)$
Función parabólica segundo grado	Similar que en Exponencial pero con la ecuación $y=a+bx+cx^2$
Función parábola cúbica	Similar que en Exponencial pero con la ecuación $y=a+bx+cx^2+dx^3$
Función polinomial de cuarto Grado.	Similar que en Exponencial pero con la ecuación $y=a+bx+cx^2+dx^3+ex^4$

Las funciones que buscan un ajuste se realiza con el Método de Mínimos Cuadrados.

Al dar clic en Normal se mostrará su graficación en color rojo en el área de graficado y ahí permanecerá y al seleccionar cualquier otra opción se graficará esa función en color verde. Al pasar a otra opción la anterior se borrará y se graficará la nueva seleccionada, esto con el fin de tener referencia de cual de las funciones está mejor aproximada a los datos experimentales que es la

Normal. También abajo del área de graficado se muestran los factores encontrados a, b, c y/o d según la función seleccionada y el Factor de Confiabilidad R^2 que nos dice que tan exacta es la función calibrada globalmente con la función que experimentan los 15 datos experimentales.

En el área de graficado al pasar el cursor encima de ella se muestra en su esquina inferior izquierda el valor que representa en el cuadrante según donde este el cursor. También si queremos ver con más enfoque que tan exacto esta la función de calibración pasando por los datos experimentales, solo bastará con dar clic con el botón derecho del ratón y mover el cursor según hacia donde queramos ver.

En la parte izquierda del área de graficación se muestra uno por uno que tan exacto fue la calibración de la curva o de la función con los 15 posibles datos experimentales dados en la parte de Datos a Graficar, por medio de la ecuación:

$$\text{Exactitud} := \text{Dato Experimental} - \text{Dato Calibrado}$$

De esta forma se ven los datos experimentales graficados y la graficación de la función más aproximada de esos datos, que sería el comportamiento real y efectivo del experimento.

Calculadora de Imágenes: La calculadora de imágenes es una poderosa herramienta para ver si una imagen ha cambiado o no, establece diferencias entre imágenes de un mismo objeto tomadas en momentos diferentes (tomar la primera y la otra un segundo después); por ejem. para comparar entre una imagen de color y una gris, entre otros efectos vistosos donde el usuario podrá hacer uso de las diferentes operaciones para realizar su trabajo con las imágenes. Al seleccionar esa opción nos mostrará una forma donde primero escogeremos nuestras imágenes a procesar y del lado derecho las operaciones que pueden ser: And, Or, Xor, Suma, Resta, Multiplicación, División, Desigualdad $Im1 < Im2$, Mínimo y Máximo. Al escoger cada imagen ésta visualizará en la parte superior y el resultado de la operación también se visualiza después de haber escogido la operación. Acto seguido solo bastará dar Aceptar o Cancelar para la operación. El resultado se muestra en una ventana aparte de las imágenes origen.

Equilibrio de Color. Al dar clic sobre esta opción se nos mostrará un cuadro de diálogo en el cual tendremos tres indicadores los cuales con el ratón podremos deslizar hacia la derecha o izquierda. Esto nos permitirá ajustar o modificar las tonalidades de color de una imagen ya sea para agregar más color, reducirlo o ajustarlo, según el indicador que se deslice. Esta opción también funciona para añadir colores a una imagen en tonalidades de grises, ya que trabaja de manera independiente cada indicador en un canal.

Tamaño de la Imagen: Esta opción nos permite cambiar el tamaño real de la imagen, ya sea de manera proporcional o solo para lo ancho o alto de la misma. Al seleccionar esta opción nos aparecerá una forma donde al lado derecho se nos muestra la imagen a modificar y del lado izquierdo aparece el nombre de la imagen y sus medidas actuales, las cuales se pueden modificar ingresando los nuevos valores de forma directa. Si damos clic en la parte que dice Dimensiones proporcionales, al ingresar un nuevo valor de ancho, el alto se modificará de forma automática y proporcional al ancho ya sea para incrementar o reducir el tamaño de la imagen. De manera similar ocurre si ingresamos un nuevo valor para lo alto.

Al tener ya los nuevos valores solo bastará Aceptar para que la imagen actual cambie de tamaño, el resultado se ve en la misma ventana de la imagen escogida. Si damos Cancelar no se hará nada. La selección de medidas proporcionales hace que la imagen crezca o se reduzca sin distorsión de proporción de lo que contenga la misma, asegurando que los píxeles que se seleccionen sean fidedignos y correspondan en cantidad para futuras interpretaciones.

Propiedades de la Imagen: Al seleccionar esta opción nos aparecerá una forma, donde del lado derecho se muestra la imagen actual y del lado izquierdo su ficha técnica donde se muestra su: Nombre completo y el directorio donde se encuentra, su nombre y directorio en formato MSDOS, Tipo de imagen (JPG, TIF, BMP o ICO), Medidas de ancho y alto, tamaño en disco en

bytes y kilobytes, Fecha y Hora de su última modificación o creación finalmente la cantidad de píxeles que contienen a la imagen.

- Menú Efectos

Grises		
Negativo		
Binarización		
Filtro Paso Bajo-Alto	▶	
Repujado	▶	
Detección de Bordes	▶	
Brillo		
Aclara por Seno		
Oscurece por Coseno		
Potencia		
Oscurece por Cuadratica		
Contraste Global		
Contraste		
Limpia Basura		

Ahora pasaremos a la sección Efectos, donde como dice su nombre, se aplicarán filtros de efectos a las imágenes que tengamos abiertas en nuestro programa Sagefh. Todas las opciones de este menú mostrarán su resultado en una nueva ventana.

Grises: Al elegir esta opción, convertirá la imagen actual a color en una imagen en tonalidades de grises. Esta es una excelente opción ya que nuestro programa se basa principalmente en imágenes en grises. Esta opción lo que hace es tomar los canales RGB por separado los suma y los divide entre 3; el valor resultante se coloca en los 3 canales, es decir, R, G y B tendrán el mismo valor, con lo que se logra una imagen en grises sin que esta pierda su morfología.

Negativo: Al elegir esta opción hará que la imagen actual sea mostrada con sus píxeles negados, tal como si fuera el negativo de una fotografía, por medio de una operación lógica pixelnuevo := Not (pixelActual). Esta opción nos hace notar ciertas características de la imagen que no se puedan ver a simple vista en el gráfico normal actual.

Binarización: Esta opción al elegirla nos permite obtener una imagen solamente en dos tonos: blanco y negro; para lograrlo se recorren todos los píxeles de la imagen y se toman los valores R, G, B mas altos que hay, se suman y se dividen entre 3 (es decir su promedio) y que con ello tenemos definido un umbral donde los píxeles de la imagen que sobrepasen ese umbral serán cambiados a color blanco 255 y los píxeles inferior a ese umbral serán negros o (cero). Esto se hace para ver con detalle características muy oscuras de la imagen y separarlas del resto que son tonos muy claros y que por lo regular es el fondo de la misma, además de que así se descartan valores que no haya en la imagen.

Filtro Paso Bajo-Alto: Este opción del Menú Efectos tiene un submenú donde se nos muestran seis opciones para este tipo de filtros. Se tienen tres filtros Paso Bajo, los cuales atenúan los cambios bruscos en las tonalidades de la imagen, es decir, se suavizan los bordes o cambios

grandes de las tonalidades la imagen, mientras que los tres filtros Paso Alto destacan los bordes o cambios bruscos de las tonalidades de la imagen.

Repujado. Esta opción lo que hace es convertir la imagen en un relieve de la misma, es decir, resalta los altos contrastes de la imagen y el resto la ignora, convirtiéndose en una tonalidad de gris. Esto se hace para observar algunos detalles de los cambios bruscos de los bordes de la imagen. Se tienen en un submenú dos alternativas en X y en Y, donde la primera resalta los bordes en dirección vertical de x y la segunda resalta los bordes o cambios en dirección horizontal de y. En fin esta opción es como si se estampara la imagen sobre un lienzo.

Detección de Bordes. Esta opción es similar a la anterior, la diferencia es que aquí solo se resalta los bordes de lo que hay en la imagen, el resto de ella se pasa a un color oscuro. Se tienen dos direcciones de detección en X que detecta los bordes verticales y en Y que detecta los bordes horizontales. Una operación AND en la Calculadora de Imágenes obtendría los bordes en todas las direcciones de la imagen al pasar los bordes X e Y por esa operación lógica. El resultado de esta opción puede ser muy oscura por lo cual con la modificación de su brillo se resaltarán aun más los bordes detectados.

Brillo: Esta opción nos permite modificar el brillo existente en la imagen, es decir, si nosotros tenemos una imagen muy oscura esta opción nos permitirá aclararla o bien oscurecerla si es que está muy clara. La forma de lograrlo es saturar los píxeles aumentando de uno en uno sus valores para aclararla o bien reducirles su valor de uno en uno para oscurecerla. Al elegir esta opción nos aparecerá una forma donde la parte superior se muestra una sección sobre la que se aplicará esta opción y abajo un indicador deslizante que dando clic sobre y manteniendo presionado el botón izquierdo del ratón podremos verla de derecha para aclarar e izquierda para oscurecer y a un lado se muestra el valor que se va tomando, donde para aclarar son 255 valor máximo y 0 valor mínimo para oscurecer en el intervalo de tonalidades que puede tomar un píxel en sus canales. Al final solo bastará con Aceptar para que el resultado se visualice en otra ventana o bien Cancelar esta opción sin hacer nada. También el brillo se puede modificar multiplicando una constante a los píxeles de la imagen. En la forma se puede también seleccionar esta forma y al hacerlo se activará una casilla donde podrá ingresar valores de números reales entre cero y uno para oscurecerla y mayores de uno para aclararla. La diferencia entre estas dos es que por suma de uno en uno a los píxeles la imagen se satura rápidamente y pierde sus colores y contrastes, mientras que por multiplicación de constante esas características se respetan un poco más.

Aclara por Seno: Esta opción a través de una función trigonométrica que es Seno, la imagen se aclarará. Una característica de esta función es que aclara más las partes donde haya píxeles algo claros y los píxeles oscuros se respetarán. En otras palabras esta opción aclara más las zonas con menos cambios bruscos de tonalidades y las zonas oscuras las modificará poco.

Oscurece por Coseno: Esta opción trabaja bajo la función Coseno, al aplicarla sobre la imagen oscurecerá más las zonas oscuras y las zonas claras las aclarará más con lo cual se logra un aumento también de contraste de los objetos o células que existan sobre la imagen.

Potencia: Al dar clic en esta opción se nos abrirá una forma de diálogo la cual nos muestra las opciones para aplicar una potencia a los píxeles de la imagen y arrojando con ello oscurecerla o aclararla. Se aclarará más cuando se seleccionen valores reales entre cero y uno y se oscurecerá más cuando los valores sean mayores que uno. Se tiene la opción de Personalizado donde podrá ingresar sus propios valores para escoger el que mejor se adecue a las necesidades del cambio de la imagen. El programa solo acepta valores expresados en números reales.

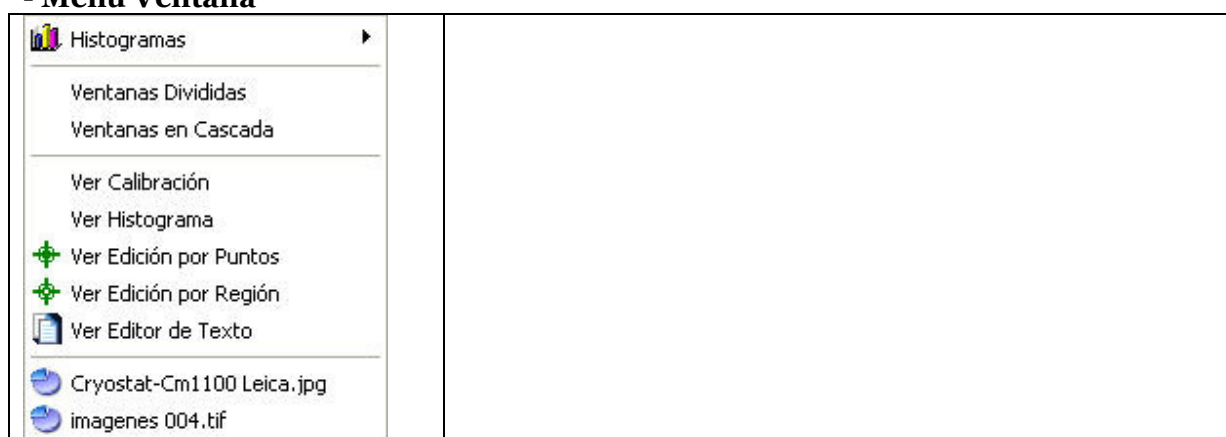
Oscurece por Cuadrática: Prácticamente es una opción similar a la anterior pero aquí ya se define que sea la potencia dos o cuadrática. Los píxeles más oscuros son los que se afectarán más por esta opción.

Contraste Global: Al seleccionar esta opción nos mostrará un cuadro de diálogo en el cual a través de un indicador deslizante podremos modificar el contraste de la imagen, así como un botón para Reiniciar el indicador por si queremos volver a empezar a modificar el contraste de la imagen actual. El contraste resaltará los tonos claros y los tonos oscuros y los diferenciará entre sí.

Contraste: Esta opción a través de los filtros vecindad resaltará los bordes de la imagen sin alterar el resto de píxeles que exista en la imagen.

Limpiar Basura: Esta opción a través de un umbral que se definirá y por medio de un indicador deslizante que convertirá los píxeles en blanco los que estén arriba de ese umbral y los que estén abajo no se modificarán, esta opción ayudará a eliminar algunas imperfecciones de la imagen, que junto con el Contaste Global dejarán limpia las células que tienen píxeles mucho más oscuros por la basura que el objetivo pueda tener al momento de obtener la autoradiografía en el microscopio.

- Menú Ventana



Ahora pasemos al penúltimo menú de nuestro programa, el cual tiene procesos importantes en los procesos histológicos.

Histogramas: Al elegir esta opción se mostrará un submenú con tres opciones de histograma: el Normal, el Absoluto y el Logarítmico. Para empezar diremos que un histograma nos muestra por medio de un gráfico de barras la cantidad de píxeles que están en los diferentes niveles de los tres canales, aparte los grises. Ya que para representar los diferentes rojos posibles en nuestras imágenes de 24 bits se tiene 255 tonalidades diferentes y que así en los 3 canales más los grises, aunque claro la representación de su gráfico se hacen por separado.

a).- Histograma Normal: Es aquel histograma donde los valores de frecuencia de los 3 canales se ajustan en el gráfico, donde se visualizarán por medio del valor más grande alcanzado en el tono de los 3 canales RGB. Ahora bien ¿por qué el ajuste? Esto es debido porque los valores son pintados en un gráfico con una altura determinada y si graficamos los valores sin ajustarlos po-

demos salirnos del gráfico y perderíamos la esencia del histograma, es por ello la necesidad de un valor de ajuste y lo que hace la diferencia entre los 3 tipos de histogramas.

b).- Histograma Absoluto: Aquí el histograma, los valores de frecuencia son ajustados por cada canal y por su máximo valor alcanzado en ese mismo canal.

c).- Histograma Logarítmico: Este trabaja de manera similar al Absoluto con la diferencia que los valores de frecuencia se amplían o hacen crecer, ya que en ocasiones la gráfica resultante del Absoluto es muy pequeña y no se nota con claridad los valores, o bien puede haber un valor muy alto en un tono y los demás pequeños y que al graficarse solo se observaría el de mayor tono y los demás se verían muy poco. Obsérvese tan solo la Fig. 1.6 donde los valores son muy visibles en este tipo de histogramas.

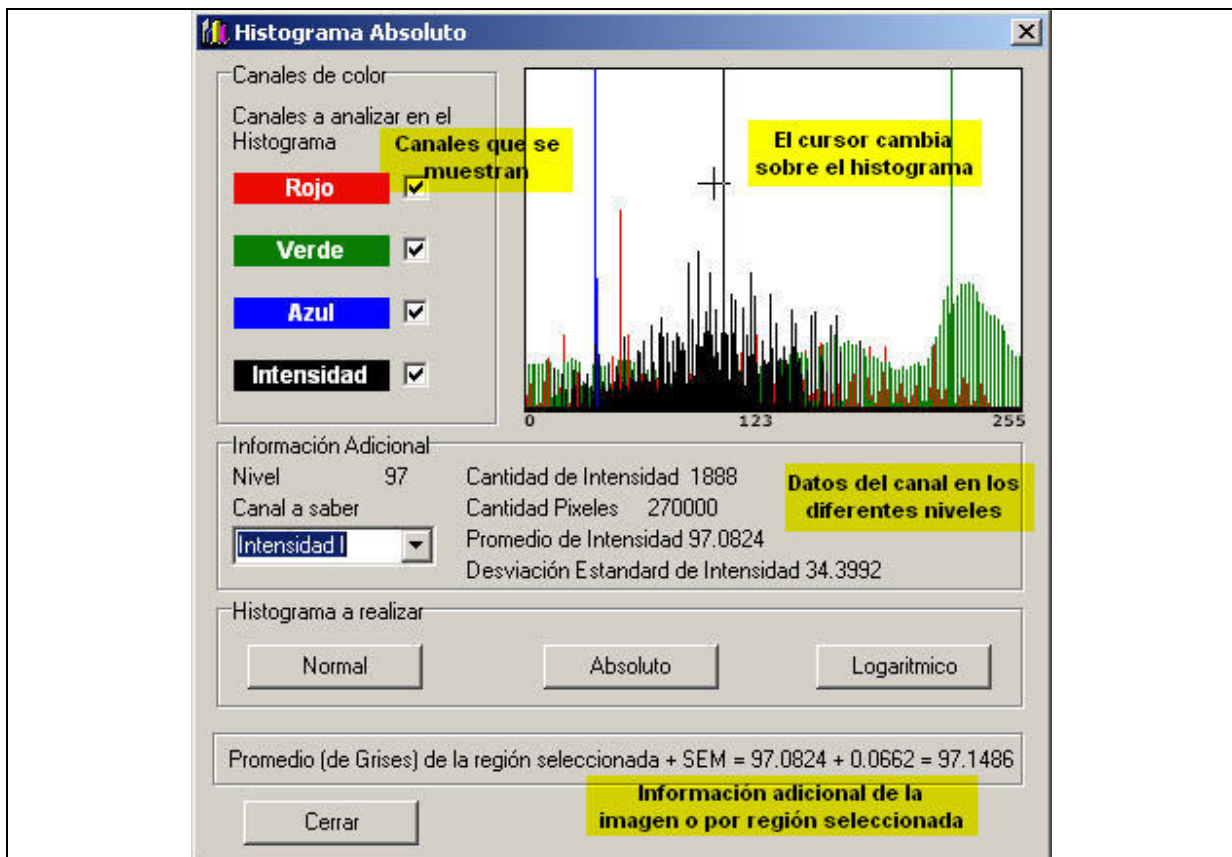


Fig. 1.6 La Forma del Histograma en modo logarítmico

Ventanas Divididas: Lo que hace esta opción es colocar todas las formas o ventanas de las imágenes en forma dividida dentro del programa, es decir, las acomoda de tal forma que todas las imágenes abiertas sean visibles.

Ventanas en Cascada: Esta opción permite colocar las imágenes unas tras otra, de tal manera que solo sea visible su nombre o título y una pequeña porción izquierda y superior de la imagen para poder reconocerlas todas.

Ver Calibración: Permite visualizar la forma de la Calibración de la Curva si es que de momento desaparece por manipular alguna imagen.

Ver Histogramas: Visualiza en pantalla la forma de Histogramas como la de la Fig. 1.5.

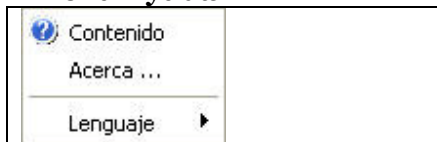
Ver Edición por Puntos: Visualiza en la pantalla la forma de Edición por puntos, llamado PSagefh, que veremos más adelante.

Ver Edición Por Región: Visualiza la forma de Edición por Región, llamado RSagefh, que más adelante veremos.

Ver Editor de Texto: Visualiza la forma del Bloc de Notas o Editor de Texto interno del sistema Sagefh, llamado TSagefh.

Imágenes Abiertas: Después del menú Ver Edición por Región viene una línea que separará el menú de las imágenes abiertas. Con tan solo dar clic en alguna de esas opciones se visualizará la imagen que tenga dicho nombre en el menú de imágenes abiertas.

-Menú Ayuda



Por último veremos el Menú de Ayuda y que tiene solo dos alternativas.

Contenido: Esta opción nos desplegará la ventana de ayuda del Sistema Sagefh donde se muestra las principales funciones del programa.

Acerca: Al elegir esta opción nos mostrará la información de copyright, nombre y programador de nuestro programa Sagefh.

Lenguaje: Esta opción nos mostrará un submenú donde podremos cambiar el idioma que usa la interfaz de Sagefh. Se muestran 2 idiomas comunes el Español y el Inglés, se tiene la opción de poder cargar otro lenguaje que el usuario haya creado al modificar algunos de los archivos ya establecidos. El proceso de usar otro lenguaje diferente al español e inglés es modificar alguno de los archivos que ya existen y después cargarlo con la opción Otro del submenú Lenguaje.

La Barra de Herramientas

Ahora pasaremos a explicar el funcionamiento de cada una de las opciones de la barra de herramientas y de los cuales muchas de esas opciones ya se explicaron en los menús correspondientes.

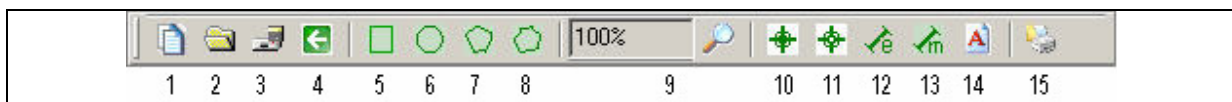


Fig. 1.7 La Barra de Herramientas de Sagefh

- 1.- Es el mismo que Nuevo del Menú Archivo.
- 2.- Es lo mismo que Abrir del Menú Archivo.
- 3.- Es lo mismo que Guardar del Menú Archivo.
- 4.- Es lo mismo que Deshacer del Menú Edición.
- 5.- Es lo mismo que Selección Cuadrada libre del Menú Edición.

6.- Es lo mismo que Selección Circular libre del Menú Edición.

7.- Es lo mismo que Selección Libre con líneas del Menú Edición.

8.- Es lo mismo que Selección Libre del Menú Edición.

9.- Esta parte nos indica el porcentaje de zoom que tiene nuestra imagen actual que va de 20% a 300%. Para cambiar el **zoom** de nuestra imagen, bastará con dar un clic con el botón derecho del ratón y seleccionar el nuevo porcentaje, ya sea para incrementar o reducir el tamaño de la imagen de manera temporal. Para más detalles revisar la sección Contenedor de Imagen.

10.- **Edición por Punto.** PSagefh (Valores por punto) Ahora explicaremos como funciona esta opción de nuestro programa. Para empezar diremos que esta forma nos permite recabar información exacta de la imagen que se está analizando, para llevar un control de ella para futuros análisis y referencias. La Edición por punto es recabar la información de un píxel determinado de la imagen, guardándose sus coordenadas x e y, su valor de gris y el nombre de la imagen de la que se obtiene, ya que la forma puede almacenar varios valores de distintas imágenes. Los anteriores valores se guardan en las columnas nombradas ya previamente en el programa Para poder trabajar con ella cuando se elige la opción Edición por Puntos aparece una forma como la de la Fig. 1.8, y acto seguido la podemos mover haciendo un clic con el botón izquierdo del ratón sobre la barra de titulo y mantenerlo presionado para así moverla de tal forma que podamos ver la imagen de la cual queremos tomar los valores. Después daremos un clic en cualquier parte de la imagen de donde queramos tomar el valor y automáticamente se almacenarán los valores en la forma de Edición, así se hará sucesivamente hasta tenerlos todos y después guardarlos.



Fig. 1.8 Interfaz de la Forma Edición por Puntos PSagefh.

Esta forma también cuenta con unas sencillas opciones en la barra de Menús.

<p>Guardar</p> <p>Cerrar Ctrl+F4</p>	<p>Menú Archivo: Cuenta con 2 opciones, Guardar que permite guardar los archivos de nuestra forma de Edición por Puntos en formato Texto o bien en Formato de Microsoft Excel y Cerrar que cierra la forma de Edición.</p>
<p>Copiar</p> <p>Pegar</p> <p>Limpiar Celdas</p> <p>Eliminar última entrada</p> <p>Datos Adicionales</p>	

Menú Edición: Cuenta con 5 opciones importantes en el trabajo de esta forma.

Copiar, permite poner en el portapapeles la información que esta en la celda actual o lo que este seleccionado. Para seleccionar bastará hacerlo manteniendo presionado el botón izquierdo del ratón y mover el cursor.

Pegar, permite pegar en las celdas actuales lo que se encuentra en el portapapeles.

Limpiar Celdas, esta opción permite reiniciar la Forma Edición por Puntos ya que elimina la mayor información que se encuentre en ella, con excepción de lo de la fila uno.

Eliminar última entrada. Esta opción elimina los últimos valores que el usuario obtuvo con el último clic que hizo sobre la imagen, es decir, se borra la última fila ingresada.

Datos Adicionales, esta es una de las opciones importantes dentro de esta forma ya que se obtienen valores finales de los datos que se ingresan, dentro del área de trabajo y separado de una fila en blanco de la última fila de datos, datos adicionales muestra el Promedio de los valores de grises de los puntos dados, su desviación estándar SD, y los valores máximo y mínimo alcanzados en esos valores. Esta información será útil para más estudios de la imagen auto radiográfica. Todos estos valores son mostrados en el área de trabajo.

En cuanto a su **Barra de Estado** nos muestra en Columna y renglón donde nos encontramos, así como indicadores MAYUS que se activa cuando la tecla mayúsculas esta activada, NUM cuando el teclado numérico esta activado y el mensaje de que se puede dar clic sobre cualquier parte de cualquier imagen para obtener los valores, X e Y del píxel, su valor de gris y el nombre de la imagen.

11.- Edición por Región. RSagefh (Valores por Región) Esta opción trabaja de forma similar a la opción anterior, pero con la diferencia que no se toman los valores de un solo píxel, sino de toda una región que seleccione el usuario. Al elegir esta opción aparecerá una forma como la de la Fig. 1.8, pero dentro del Área de trabajo, aparecerán las columnas nombrada como: Muestra, Cuadro Experimental, Región, Promedio, SEM, Fmol/mg y el nombre de la imagen; las primeras 3 opciones son llenadas por el usuario, las demás el programa las obtiene. Al aparecer esta forma, se hace a un lado y se empieza a seleccionar en forma libre la región de estudio y automáticamente cuando se cierra la selección los datos aparecerán inmediatamente, el promedio de grises de la región seleccionada, su Error Estándar, su valor de fentomoles sobre miligramo de tejido y el nombre de la imagen. El valor de fmol/mg se obtiene directamente de la curva calibrada por lo cual se debe hacer previamente, de otra manera se obtendrá un dato erróneo; el valor que se obtiene de ahí donde el promedio de grises se busca en el eje x y el valor correspondiente en y es el valor fmol/mg. Los Menús que aparecen en esta forma son idénticos a los de Edición por Punto a excepción el de Datos Adicionales el cual aquí no se usa y por consiguiente aparecerá deshabilitado.

Usted podrá usar las dos formas de la manera que guste, pero no al mismo tiempo aunque puede alternar entre ellas sin que pierda los valores que haya insertado previamente, además para seleccionar una nueva región igual, deberá dar un clic previamente para quitar la selección hecha en la región anterior. También se tiene una barra de estado similar a la de PSagefh solo cambia el mensaje para poder seleccionar cualquier región de la imagen para obtener los valores.

12.- Tomar Escala. Ahora bien en muchas de las imágenes que utilizamos queremos a veces medir algún objeto y en la imagen aparecerá una escala que se puso previamente y que nos dice cuanto vale una cierta medida en el gráfico.

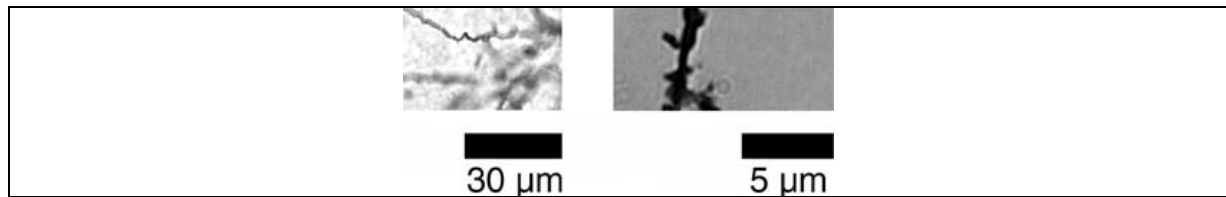


Fig. 1.9 Imagen con su escala tomada en el microscopio.

Obsérvese en la Fig 1.9 las dos escalas presentes de 30 y 5 micras y que son de diferentes imágenes. Aquí la opción tomar escala nos permite medir el largo de la línea oscura y con ello asentar una escala para así pasar a la medición de algún objeto con dicha escala.

Al elegir esta opción daremos un clic en el inicio de la línea oscura o la que represente la escala en la imagen y moveremos el cursor al final y daremos otro clic y con ello aparecerá una forma Fig. 1.10 la cual nos mostrará ya la información tomada en la parte que dice Medidas de la Escala, ahí la distancia entre píxeles de inicio y fin de selección, Distancia que representa con base a la escala por decir 30 μm o 5 μm y por último la Unidad de medida usada que puede ser cm, mm, μm o nm entre otras, estas dos últimas pueden ser modificadas por usted para sacar ajustes a las medidas que se tomen después. Como en la Fig. 1.10 donde tomamos la escala de las 5 micras.

13.- Tomar medida en base a la escala. Ahora bien, después de haber hecho nuestra medición de escala pasaremos a la medición del objeto que queramos en nuestra imagen. Para elegir esta opción se presiona el botón 13 de la barra de herramientas o bien clic en el botón Medir de la forma de Calibración de la Escala.

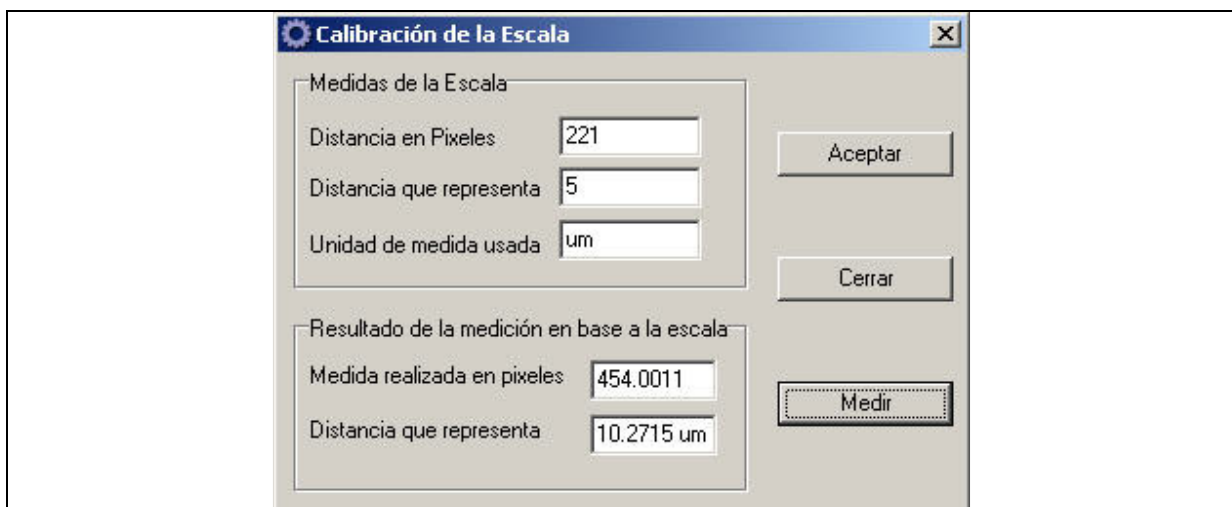


Fig. 1.10 Forma de la Calibración de la Escala, con datos de la Fig. 1.9 en donde aparece la escala 5 μm y en el resultado se midió el ancho que representa la imagen que esta arriba de la escala de 5 μm , hecha a tamaño real de la imagen.

Al momento de escoger alguna de esas opciones anteriores, se quitará la forma y mediremos de forma similar que cuando tomamos la escala, un clic al inicio y otro al final y que con este aparece nuevamente la forma y mostrará su medición en la parte Resultado de la medición en base a la escala.

14.- Adicionar Texto a la Imagen. Esta opción como su nombre lo dice coloca texto en la imagen. Al seleccionar esta opción aparecerá una forma donde escribiremos nuestro texto a co-

locar e incluso hasta darle formato de color de fuente, tamaño y tipo, así como con fondo de color o transparente. Al tener nuestro Texto ya listo solo daremos en Aceptar y automáticamente se mostrará el texto en la imagen y después lo podremos mover hasta dejarlo donde queramos; al final solo se dará enter para aceptarlo definitivamente en la imagen, de hecho al Aceptar el texto es como si se hubiera pegado una nueva imagen, en este caso sería el texto, por consiguiente se trabaja de forma similar como si se hubiera pegado una imagen. El comportamiento y pegado del Texto es similar al método de Pegar de una imagen.

15.- Es lo mismo que Imprimir del Menú Archivo.

La Barra de Estado

Ahora pasaremos a la parte de nuestro programa que nos dice la situación actual del Sistema Sagefh, que es la barra de estado, la cual se divide en 2 partes. La primera de ellas es sencilla ya que solo nos muestra la ubicación del directorio y nombre de la imagen actual de trabajo.

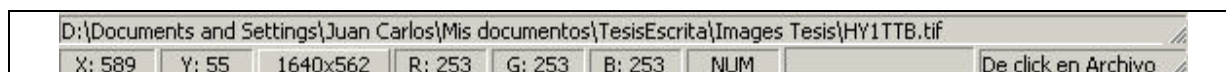


Fig. 1.11 La Barra de Estado de Sagefh.

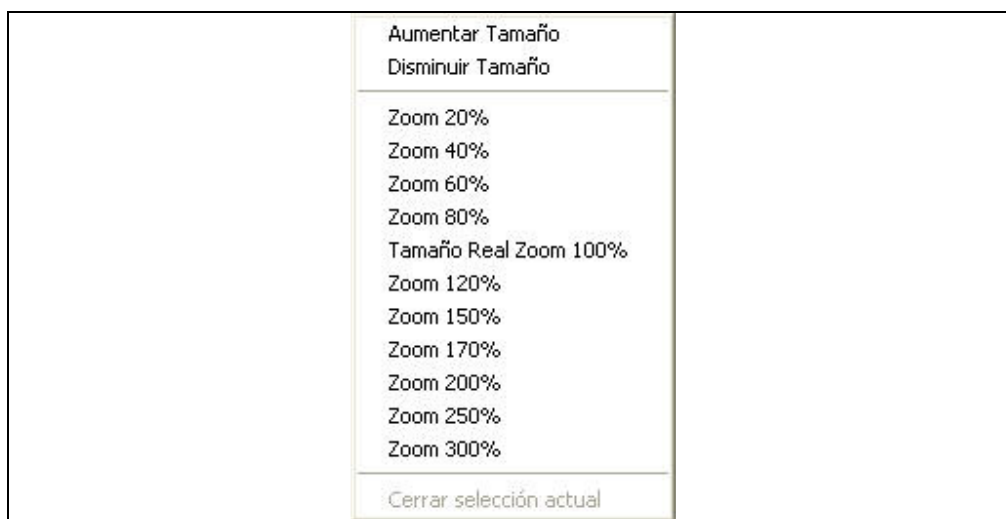
La segunda barra de estado esta dividida en 9 casillas, tal como vemos en la Fig. 1.11 la casilla 1 y 2, nos muestran las coordenadas (x, y) actuales donde se encuentra el cursor sobre la imagen que se está visualizando, la casilla 3 nos menciona las dimensiones de Ancho x Alto respectivas de la imagen sobre la cual trabajamos. Esta medida cambia según la ventana de la imagen. Las casillas 4, 5 y 6 nos muestran una descomposición de los canales Rojo, Verde y Azul, (del inglés RGB) del píxel donde se encuentre el cursor en la imagen. Cuando se tienen imágenes en gris los 3 valores son iguales. La casilla 7, muestra si esta activado el teclado numérico el cual nos facilitará las cosas al insertar datos en la Calibración de la Curva. La casilla 8 nos indica el avance progresivo cuando se realiza alguna operación de filtro en la imagen, incluso hasta el cursor cambiara su forma de un reloj de arena y cuando se finaliza el proceso se reestablece el cursor limpiando el indicador. El progreso se ve con una franja azul.

Por último la casilla 9 solo nos indica el mensaje de Dar clic en Archivo para abrir otra imagen u otro mensaje necesario para el Sistema Sagefh.

Todas estas opciones nos ayudan a ser más eficientes en nuestro programa, ya que los valores RGB y la posición de píxel nos ayudará a determinar posibles cambios entre imágenes similares.

El contenedor de Imagen

El contenedor de imagen es precisamente la forma donde se carga la imagen que seleccionamos con el Menú Abrir o toda aquella que se obtiene de una original al ejecutar un proceso. El en el contenedor de imagen también realizamos las selecciones de todo lo que hay en el gráfico para poder estudiarlo a detalle.



También en el contenedor de imagen tenemos un menú, que aparece cuando damos clic con el botón derecho del ratón.

Aumentar Tamaño: Hace un zoom a la imagen actual pasando del porcentaje actual al que sigue, es decir, si tenemos 100% y hacemos Aumentar Tamaño pasaremos al porcentaje 120%.

Disminuir Tamaño: Es similar a Aumentar nada mas que aquí se disminuye el zoom y porcentaje.

Zoom 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 170, 200, 250 y 300%: Estas opciones de forma independiente cada una realizan la función de aumentar o disminuir el tamaño de visualización de la imagen actual (efecto de zoom). Para lograr esto, se multiplica el ancho y alto por factores iguales definidos según corresponda al zoom.

Del 20 es 0.2, del 40 es 0.4, del 60 es 0.6, del 80 es 0.8, del 100 es 1, del 120 es 1.2, del 150 es 1.7, del 170 es 1.7, del 200 es 2, del 250 es 2.5 y de 300 es 3, esos factores se multiplican en el ancho y alto de la imagen y así se visualiza la imagen aumentada o reducida según el zoom escogido.

Cerrar selección Actual: Esta opción solo estará disponible cuando se este realizando una Selección libre con Líneas, o Selección Libre y sirve precisamente para cerrar el polígono de selección y así ya no será necesario unir el punto inicial con el final de forma manual, ya que con esta opción se hace de manera automática. Esta opción es muy indispensable cuando se realizan selecciones muy detalladas.

Con todas estas opciones y descripciones se espera que usted como usuario pueda desempeñar de una manera mas exacta con el Sistema Sagefh, sus cálculos en el análisis morfológico, histológico y métrico de los autoradiografías tomadas a cortes milimétricos de tejido animal, para así descubrir nuevas soluciones a enfermedades que a los humanos atañen, como la esquizofrenia, que es uno de los tantos estudios que se realizan en Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma del Puebla.

Bibliografía

- [1] Tratamiento Digital de Imágenes. Rafael C. González y Richard E. Woods. Editorial Adisson Wesley y Díaz de Santos. EUA 1996.
- [2] Estadística Matemática con Aplicaciones. William Mendenhall, Dennis D. Wackerly y Richard L. Scheatter. Grupo Editorial Iberoamerica. México 1994.
- [3] Ingeniería del Software – Un enfoque práctico. Roger S. Presuman. Editorial Mc Graw Hill. 4 edición 1998
- [4] Aprendiendo Borland Delphi 4 en 21 días. Kent Reisdorph. Editorial Prentice Hall. México 1999
- [5] Graficas por Computadora. Donald Hearn y M. Pauline Baker. Editorial Prentice Hall. México 1988
- [6] Histological & Histochemical Methods. Theory & Practice. Jhon Alan Ciernan Butterworth Heinemann. 3 edición
- [7] * Sitio Web: Histología Humana. Salamanca España
<http://www3.usal.es/~histologia/histologia.htm>
- [8] Research report: Neonatal prefrontal cortex lesion using CO₂ laser technique. Laura Sánchez Huerta, Griselda Ayala, Javier Marroquín, Rafael Calderón, Adriana B. Silva Gómez, Konstantin S. Khotiaintsev, Larisa Degtiareva, Sergey N. Khotiaintsev, Gonzalo Flores. Brain Research Protocols 1, Agosto 2002
* <http://www.elsevier.com/locate/bres>
- [9] Diccionario Pequeño Larousse ilustrado. Ramón García-Pelayo y Gross. Ediciones Larousse. 11 edición México 1986
- [10] Artículo: A New Quantitative Film Autoradiographic Method of Quantifying mRNA Transcripts for In Situ Hybridization. Arpad Palfi, Laszlo Hatvani, and Karoly Gulya. Department of Zoology and Cell Biology (AP,KG) and Bolyai Institute (LH), University of Szeged, Szeged, Hungary
- [11] Guide to the self-decomposition of radiochemicals. Amersham Life Science. Amersham International 1992
- [12] Imágenes digitales. Procesamiento Práctico con Java. Gonzalo Pajares, Jesús M de la Cruz, José M. Molina, Juan Cuadrado, Alejandro López. Editorial Alfa-Omega Ra-Ma. México.

- [13] * Sitio Web: Génesis del Uso de las Radiaciones. Ing Roberto Cuenca.
Universidad del Valle, Cali en Colombia.
<http://colombiamedica.univalle.edu.co/VOL28NO1/Radiaciones.html>
- [14] * Sitio Web: Foto 3. Sitio dedicado a lo relacionado con la fotografía.
<http://www.foto3.es/index2.htm>

* El sitio web mencionado con el tiempo puede ser modificado, cambiado o eliminado.

