



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
ELÉCTRICA – INSTRUMENTACIÓN

MICROSCOPIO ÓPTICO DE BAJO COSTO PARA
APLICACIONES DE MICROSCOPIA VIRTUAL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
ING. EFRÉN ULLOA PEÑA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARTHA ROSETE AGUILAR

CIUDAD DE MEXICO, AGOSTO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Garduño Mejía Jesús

Secretario: Dr. Rodríguez Herrera Oscar G.

Vocal: Dra. Rosete Aguilar Martha

1er. Suplente: Dr. Qureshi Naser

2º. Suplente: Dr. Márquez Islas Roberto

Lugar donde se realizó la tesis:

Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Tutor de Tesis:

Dra. Martha Rosete Aguilar

Agradecimientos

- A mis padres, Efrén Ulloa Rios y Georgina Peña Carrillo, que sin su apoyo incondicional no podría estar donde estoy actualmente porque, aunque estemos lejos siento que los tengo aquí a mi lado.
- A mi prometida, Mayte Lizeth Padilla Cristerna, quien me acompañó tanto en los momentos buenos como en los malos de esta travesía, sin ella hace mucho que habría perdido la poca cordura que me queda.
- A la Dra. Martha Rosete Aguilar, por la gran oportunidad que me brindó al confiar en mi para llevar a cabo este proyecto.
- A la Universidad Autónoma de Nayarit, que proporcionó la beca de manutención gestionada por el Sindicato de Empleados y Trabajadores de la Universidad Autónoma de Nayarit, SETUAN, ante el Patronato de la institución.
- Al Dr. Roberto Márquez por contactarnos e incluirnos en lo que fue la primera etapa de este proyecto.
- Al ICAT, por brindar el espacio donde pude adquirir los conocimientos necesarios para concluir mis metas.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA, de la UNAM por el apoyo a través de los proyectos PAPIIT IN107018 y PAPIIT IN111818.
- Al proyecto CONACyT AEM-2015-01-262872 por proporcionar las muestras de células HEK293 usadas en la presente.

Índice

| | |
|---|----|
| Agradecimientos | i |
| Índice..... | ii |
| Índice de figuras | iv |
| Índice de tablas | vi |
| 1 Introducción | 1 |
| 2 Objetivo general | 3 |
| 3 Objetivos específicos..... | 3 |
| 4 Microscopios ópticos..... | 4 |
| 4.1 Microscopio óptico compuesto | 4 |
| 4.2 Amplificación..... | 5 |
| 4.3 Dos tipos de objetivos | 6 |
| 4.3.1 Objetivos estándar: Conjugados finitos | 6 |
| 4.3.2 Objetivos con un conjugado infinito. | 7 |
| 4.4 Microscopio óptico sin ocular..... | 8 |
| 4.5 Resolución del objetivo | 8 |
| 4.6 Campo de visión | 10 |
| 5 Sistema de iluminación | 12 |
| 5.1 Iluminación con una lámpara led | 12 |
| 5.2 Módulo de iluminación de fondo, Adafruit | 13 |
| 5.3 Iluminación con fuente personalizada..... | 16 |
| 5.4 Iluminación por transmisión..... | 19 |
| 5.5 Iluminación con fuente condensadora por transmisión | 22 |
| 6 Sistema mecánico..... | 27 |
| 6.1 Platinas | 27 |
| 6.1.1 Montaje de las platinas | 28 |
| 6.2 Montaje para muestras histológicas..... | 30 |
| 6.3 Motores..... | 31 |
| 6.3.1 Drivers | 31 |
| 7 Detección y procesamiento de imágenes..... | 34 |
| 7.1 Sensor..... | 34 |
| 7.1.1 Cámara del módulo de Raspberry | 34 |
| 7.1.2 Sensor 72BUC02-ML | 35 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.1.3 | Resolución espacial del sensor | 36 |
| 7.2 | Procesamiento..... | 37 |
| 7.2.1 | Raspberry Pi..... | 37 |
| 7.2.2 | PC | 37 |
| 7.3 | Unión de las imágenes..... | 38 |
| 8 | Resultados y discusión..... | 40 |
| 8.1 | Huevos de helminto | 40 |
| 8.2 | Células HEK293..... | 42 |
| 8.3 | Muestras histopatológicas..... | 45 |
| 8.3.1 | Imágenes unidas | 46 |
| 9 | Conclusiones y perspectivas..... | 49 |
| 10 | Bibliografía | 51 |
| 11 | Apéndices..... | 53 |
| 11.1 | Análisis de la línea media de las imágenes | 53 |
| 11.2 | Corrección de las imágenes tomadas | 54 |
| 11.3 | Evaluación de la uniformidad de las imágenes obtenidas con el sistema..... | 55 |
| 11.4 | Programa para la toma de imágenes mientras se hace barrido en XY de la muestra..... | 56 |
| 11.5 | Programa para la obtención de la MTF de un borde | 58 |
| 11.6 | Costos de los componentes y materiales | 60 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 4.1 EL CRISTALINO RELAJADO ENFOCA LOS RAYOS PROVENIENTES DE UN OBJETO EN INFINITO SOBRE LA RETINA DEL OJO. | 4 |
| FIGURA 4.2 TRAZO DE RAYOS DE UN MICROSCOPIO COMPUESTO SIMPLE, CON SALIDA AL INFINITO (A) Y SALIDA LIGERAMENTE DIVERGENTE QUE AYUDA A EJEMPLIFICAR EL AUMENTO EN EL TAMAÑO DE LA IMAGEN (B). | 5 |
| FIGURA 4.3 DIAGRAMA DE RAYOS DE UN OBJETIVO DE MICROSCOPIO DE CONJUGADOS FINITOS. | 6 |
| FIGURA 4.4 TRAZO DE RAYOS QUE REPRESENTA UN OBJETIVO DE MICROSCOPIO DE CONJUGADOS FINITOS SEGUIDO DE UN LENTE OCULAR QUE COLIMA LOS RAYOS AL INFINITO PARA QUE ESTOS SEAN VISTOS CON UN OJO RELAJADO. | 7 |
| FIGURA 4.5 DIAGRAMA DE RAYOS QUE REPRESENTA UN OBJETIVO DE MICROSCOPIO DE CONJUGADOS INFINITOS, A LA IZQUIERDA LA MUESTRA A UNA DISTANCIA FINITA Y A LA DERECHA LOS RAYOS QUE SALEN HACIA EL INFINITO. | 7 |
| FIGURA 4.6 CON LOS RAYOS COLIMADOS PROVIENIENDO DESDE EL OBJETIVO DE CONJUGADOS EN INFINITO DESDE LA IZQUIERDA, LA LENTE DE TUBO LOS ENFOCA A UN PUNTO FINITO DONDE PUEDEN SER PROYECTADOS EN UN DETECTOR O USADOS COMO OBJETO PARA UNA LENTE OCULAR. | 8 |
| FIGURA 4.7 MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE HUEVOS COMUNES DE HELMINTO (PRATS, 2005) | 9 |
| FIGURA 5.1 CARTA DE RESOLUCIÓN ÓPTICA DE LA USAF Y LA LAMPARA LED USB CON LA QUE FUE ILUMINADA (ACCO BRANDS, 2019). | 13 |
| FIGURA 5.2 MÓDULO DE ILUMINACIÓN DE FONDO..... | 13 |
| FIGURA 5.3 CIRCUITO PARA EL FUNCIONAMIENTO DEL MÓDULO DE LUZ TRASERA. | 14 |
| FIGURA 5.4 IMÁGENES OBTENIDAS AL ILUMINAR CON EL MÓDULO DE LUZ DE FONDO Y SUS RESPECTIVOS CORTES TRANSVERSALES. A) ZONA EXTREMA JUNTO AL LED, B) ZONA CENTRAL DEL MÓDULO Y C) ZONA EXTREMA CONTRARIA AL LED | 15 |
| FIGURA 5.5 ANILLO DE LEDES MONTADO EN UN OBJETIVO 10x | 16 |
| FIGURA 5.6 CIRCUITOS QUE CONTIENEN CADA UNO UN LED (FLECHA AZUL) Y SU CORRESPONDIENTE RESISTENCIA LIMITADORA (FLECHA NARANJA) AMBOS DE MONTAJE SUPERFICIAL..... | 17 |
| FIGURA 5.7 CIRCUITO QUE REPRESENTA LOS CINCO LEDES CONECTADOS EN PARALELO A LA FUENTE DE PODER | 17 |
| FIGURA 5.8 CORTE TRANSVERSAL DE UNA IMAGEN DE FONDO BLANCO ILUMINADA CON EL ANILLO LED..... | 18 |
| FIGURA 5.9 HUEVOS DE HELMINTO TOMADAS CON EL SISTEMA DE ILUMINACIÓN DE ANILLO | 18 |
| FIGURA 5.10 HUEVO DE HELMINTO TOMADA CON LA SEGUNDA VERSIÓN DEL PRIMER PROTOTIPO, LA CUAL SOLAMENTE TOMABA EN CUENTA LAS LONGITUDES DE ONDA PERTENECIENTES AL VERDE (~550NM)..... | 19 |
| FIGURA 5.11 CORTE TRANSVERSAL DE LA IMAGEN TOMADA CON EL FILTRO VERDE..... | 19 |
| FIGURA 5.12 (A) DIAGRAMA QUE REPRESENTA (NO A ESCALA REAL) LA ILUMINACIÓN POR TRANSMISIÓN CON UN LED SIMPLE Y (B) SU VERSIÓN FÍSICA..... | 20 |
| FIGURA 5.13 CIRCUITO QUE REPRESENTA EL LED CON SU RESISTENCIA LIMITADORA CONECTADOS A LA FUENTE | 21 |
| FIGURA 5.14 HUEVOS DE HELMINTO TOMADOS CON EL SEGUNDO PROTOTIPO, EL CUAL SE ILUMINA POR TRANSMISIÓN..... | 21 |
| FIGURA 5.15 HUEVOS DE HELMINTO TOMADOS CON EL SEGUNDO PROTOTIPO, USANDO AHORA UN FILTRO VERDE..... | 21 |
| FIGURA 5.16 DIAGRAMA QUE REPRESENTA COMO LA LUZ DEL LED ES COLIMADA POR LA LENTE SOBRE LA MUESTRA (NO A ESCALA REAL) Y SU VERSIÓN FÍSICA, LA LENTE ESTÁ CONTENIDA DENTRO DEL TUBO MARCADO CON UNA FLECHA..... | 23 |
| FIGURA 5.17 LAMINILLA QUE CONTIENE HUEVOS DE SCHISTOSOMA | 23 |
| FIGURA 5.18 HUEVOS DE SCHISTOSOMA ILUMINADOS CON LUZ COLIMADA, USANDO UN OBJETIVO 10x..... | 24 |
| FIGURA 5.19 IMAGEN DE FONDO ANALIZADA EN CADA UNO DE LOS COLORES QUE LA COMPONEN, PARA EL SENSOR DEL MÓDULO RASPBERRY | 24 |
| FIGURA 5.20 CORRECCIÓN DE COLOR DE LA FIGURA 5.18 | 25 |
| FIGURA 5.21 FOTOGRAFÍA DE HUEVOS DE SCHISTOSOMA TOMADOS CON EL SENSOR DE LA CÁMARA TIS, 20x | 25 |
| FIGURA 5.22 (A)IMAGEN DE FONDO TOMADA CON LA CÁMARA DE TIS, (B) CORTE TRANSVERSAL DE LA IMAGEN Y (C) EVALUACIÓN DE LOS CANALES RGB DE (A) | 26 |
| FIGURA 6.1 PLATINA MPT125X-50L, USADA PARA MOVER EL SISTEMA EN EL EJE X..... | 27 |
| FIGURA 6.2 PLATINA T60Z-10A USADA PARA EL MOVIMIENTO EN EL EJE Z. | 28 |
| FIGURA 6.3 PRIMER (A) Y SEGUNDO (B) MONTAJES DEL SISTEMA..... | 29 |
| FIGURA 6.4 MICROSCOPIO INVERTIDO. | 29 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 6.5 (A) MONTAJE FINAL DEL MICROSCOPIO INVERTIDO, (B) DETALLE DEL BRAZO QUE SUJETA EL SISTEMA DE ILUMINACIÓN, (C) MONTURA QUE SUJETA EL TUBO ÓPTICO A LAS PLATINAS DE MOVIMIENTO EN EL ESPACIO XYZ Y (D) FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE ILUMINACIÓN SOBRE LA MUESTRA, SI SE REQUIERE CAMBIAR DE OBJETIVO NO ES NECESARIO MOVER EL BRAZO SUJETADOR. | 30 |
| FIGURA 6.6 UNO DE LOS MOTORES NEMA 11 USADO EN EL SISTEMA. | 31 |
| FIGURA 6.7 CIRCUITO BÁSICO DE UN DRIVER CON TRANSISTOR BJT Y SU ANALOGÍA CON UN INTERRUPTOR. | 32 |
| FIGURA 6.8 DRIVERS MP6500 UTILIZADOS EN EL SISTEMA. | 32 |
| FIGURA 7.1 MÓDULO DE CÁMARA DE RASPBERRY. SE SEÑALA CON UNA FLECHA ROJA LALENTE QUE ESTÁ MONTADA DE FÁBRICA. | 35 |
| FIGURA 7.2 PLACA DE CÁMARA A COLOR USB 2.0 (THE IMAGING SOURCE, 2018) | 36 |
| FIGURA 7.3 IMAGEN DE UN BORDE OBTENIDO DE UNA CARTA DE RESOLUCIÓN (USAF) CON UN OBJETIVO 20X, CORTE PROMEDIADO DE UNA SECCIÓN DEL BORDE, LINE SPREAD FUNCTION DEL BORDE, MTF OBTENIDA DE LA IMAGEN (IMÁGENES SUPERIOR, INFERIOR IZQUIERDA, INFERIOR CENTRAL E INFERIOR DERECHA, RESPECTIVAMENTE) | 36 |
| FIGURA 7.4 ORDEN EN EL QUE EL SOFTWARE FIJI UNE LAS IMÁGENES, ESTE PUEDE SER CAMBIADO DEPENDIENDO DE CÓMO SE HAYAN TOMADO LAS FOTOGRAFÍAS ORIGINALES. | 38 |
| FIGURA 8.1 HUEVOS DE HELMINTO, (A) ILUMINACIÓN POR REFLEXIÓN AUMENTO DE 5X, (B) DETALLE AMPLIADO, (C) ILUMINACIÓN POR TRANSMISIÓN AUMENTO DE 5X, (D) DETALLE AMPLIADO. | 41 |
| FIGURA 8.2 HUEVOS DE HELMINTO TOMADOS CON (A) UN MICROSCOPIO ÓPTICO LEICA, AUMENTO DE 4X, (B) UN MICROSCOPIO ÓPTICO LEICA, AUMENTO DE 10X, (C) IMAGEN OBTENIDA CON NUESTRO MICROSCOPIO (SEGUNDO PROTOTIPO) CON ILUMINACIÓN POR TRANSMISIÓN COLIMADA, SENSOR RASPBERRY Y AUMENTO DE 10X, (D) IMAGEN OBTENIDA CON NUESTRO MICROSCOPIO (TERCER PROTOTIPO) CON ILUMINACIÓN POR TRANSMISIÓN COLIMADA, EL SENSOR DE TIS Y AUMENTO DE 20X. | 42 |
| FIGURA 8.3 CÉLULAS HEK293 OBSERVADAS CON EL SENSOR DE LA RASPBERRY, UTILIZANDO UN OBJETIVO 10X (A), UN SEGUNDO CULTIVO VISTO CON EL SENSOR DE TIS QUE DA UN CAMPO DE VISION SIMILAR, UTILIZANDO UN OBJETIVO 20X (B)..... | 43 |
| FIGURA 8.4 A-D) IMÁGENES QUE MUESTRAN LA MUERTE CELULAR DE UN CULTIVO DE HEK293 A LO LARGO DE UN LAPSO DE 4.5 HORAS, CON UN INTERVALO APROXIMADO DE 30 MINUTOS ENTRE CADA UNA. | 44 |
| FIGURA 8.5 MUESTRA DE HIPERPLASIA DE PRÓSTATA, A) PRIMER PROTOTIPO (CÁMARA RASPBERRY E ILUMINACIÓN DE ANILLO) Y AUMENTO 5X, B) IMAGEN DE LA MUESTRA CON UN MICROSCOPIO ÓPTICO LEICA, AUMENTO DE 4X, C) TERCER PROTOTIPO (SENSOR TIS E ILUMINACIÓN POR TRANSMISIÓN CONLENTE CONDENSADORA), AUMENTO 10X, D) MICROSCOPIO CARL ZEISS, AUMENTO 10X. | 46 |
| FIGURA 8.6 A-D) FOTOGRAFÍAS DE UNA MUESTRA DE HIPERPLASIA DE PRÓSTATA CON UN AUMENTO DE 10X USANDO EL SENSOR TIS, LAS IMÁGENES SE TOMARON SIGUIENDO EL ORDEN: A,B,D,C..... | 47 |
| FIGURA 8.7 IMAGEN DE LA VERSIÓN DIGITAL DE UNA SECCIÓN DE MUESTRA DE HIPERPLASIA DE PRÓSTATA, CON UN AUMENTO DE 10X USANDO EL SENSOR TIS..... | 48 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| TABLA 4.1 COMPARACIÓN DE LOS CAMPOS DE VISIÓN DE DOS DISTINTOS SENSORES AL USAR UN OBJETIVO 20X | 10 |
|---|----|

1 Introducción

La salud es uno de los principales factores de bienestar de la población y cada año los costos de atención médica en México van en aumento (OECD, 2017), una de las causas es que algunos diagnósticos de enfermedades requieren material de biopsia y son comúnmente realizados por especialistas, quienes tienen que estar presentes para visualmente inspeccionar el tejido, además de que en ocasiones se requieren diferentes opiniones para descartar posibles falsos positivos o negativos; en estos casos los cortes histológicos deben transportarse comprometiendo su integridad, por lo que se opta por transportar al paciente y tomar una nueva muestra.

Este problema podría solucionarse si se observara la muestra mediante una computadora sin necesidad de tenerla físicamente. Los términos “microscopía virtual” y “telepatología” suelen confundirse comúnmente. La telepatología dinámica se refiere a la operación robótica remota de un microscopio y la transmisión del video en tiempo real. En contraste, la microscopía virtual consiste en usar tecnología de obtención de imágenes para digitalizar, guardar y observar cortes. El espectro de aplicación de la telepatología es limitado por su calidad de “en vivo” y ser controlada por un solo usuario (Lundin, Lundin, & Isola, 2004), mientras que un corte histológico virtual puede ser examinado por múltiples médicos en un menor tiempo.

En la actualidad los sistemas capaces de hacer microscopía virtual o telepatología son usados solamente por países de primer mundo, o solamente en casos muy específicos por su elevado costo, por ejemplo, un sistema de movimiento automatizado para microscopios de la empresa Thorlabs (MLS203-1 y BBD202) tiene un precio de aproximadamente \$10,000

USD (Thorlabs, 2018), aunado a los costos del sistema de toma de imágenes, las licencias de los softwares de procesamiento y el microscopio en sí mismo.

Muchos de los sistemas actuales de bajo costo presentan pequeños inconvenientes, por ejemplo, los que usan ópticas convencionales requieren un nivel de habilidad significativa para ser operados; aunque los que utilizan opciones más económicas no están exentos de fallas, el movimiento manual de las muestras ha sido citado por Bogoch *et al.*, por ejemplo, como uno de los factores limitantes en el desempeño de diagnóstico con microscopios basados en celulares. (Ephraim RK, 2015).

En este proyecto se continúa con los esfuerzos que han realizado todas estas personas con anterioridad, desarrollando un microscopio de bajo costo que tenga los requerimientos necesarios para llevar a cabo microscopía virtual, totalmente automático, fácil de usar y con un costo que no supere los \$1000 USD.

La principal ventaja del sistema propuesto es que en lugares de bajos recursos, las muestras pueden ser tomadas localmente para luego ser enviadas a un médico especializado sin necesidad de viajar largas distancias para tener un diagnóstico. Sin embargo, la utilidad depende mucho de su costo-beneficio y simplicidad. En un entorno de bajos recursos, el sistema debería de ser lo suficientemente barato para usarse ampliamente en campo, además de sencillo de manejar para que cualquier persona pueda operarlo.

2 Objetivo general

Crear un microscopio óptico de bajo costo capaz de generar imágenes de la calidad necesaria para hacer diagnóstico clínico.

3 Objetivos específicos

Obtener imágenes con una resolución espacial de $1.5 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$.

Desarrollar software para control de movimiento en 2-D, con resolución de paso de 0.5 mm.

Diseñar una fuente de luz que proporcione iluminación uniforme sobre la muestra.

Hacer la reconstrucción de la imagen global de la muestra.

Evaluar las imágenes obtenidas.

4 Microscopios ópticos

4.1 Microscopio óptico compuesto

La principal función de un microscopio es observar objetos cercanos aumentando su tamaño aparente, esto se logra al colocar el objeto (O_1) entre la distancia focal (f) del objetivo y dos veces esta distancia ($2f$), de esta manera se forma una imagen real, invertida y aumentada del objeto. Esta imagen (I_1) funciona como el “nuevo” objeto (O_2) para el ocular que formará una imagen (I_2) de este “nuevo” objeto. El ojo al mirar a través del ocular formará a su vez, a través del cristalino (la lente dentro del ojo), una nueva imagen (I_3) sobre la retina. Ahora bien, es conveniente que el ojo funcione como “ojo relajado” para lo cual es necesario que la imagen I_2 formada por el microscopio esté localizada en infinito (Figura 4.1), ya que normalmente los músculos ciliares que son responsables de modificar la forma del cristalino se encuentran relajados al observar objetos lejanos que se consideran en el infinito, y así se evitan esfuerzos en los ojos.

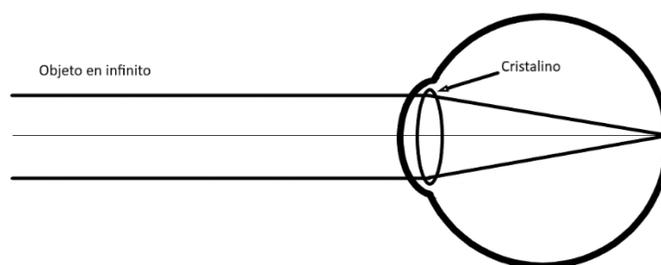


Figura 4.1 El cristalino relajado enfoca los rayos provenientes de un objeto en infinito sobre la retina del ojo.

De tal manera que para que funcione como ojo relajado es necesario que el plano focal del ocular coincida con la posición del objeto O_2 (Figura 4.2.a). Con este arreglo el observador verá una imagen ampliada del objeto (Hecht, 2015).

En la Figura 4.2.b se muestra el trazo de rayos de un microscopio óptico compuesto simplificado en el que la muestra se encuentra entre f y $2f$ de la primera lente (objetivo), pero con fines demostrativos y para poder ser entendido de mejor forma, la imagen real producida se coloca a menor distancia que la distancia focal del ocular; al hacer el trazado de rayos se puede ver claramente que el observador ve una imagen virtual invertida y aumentada de la muestra.

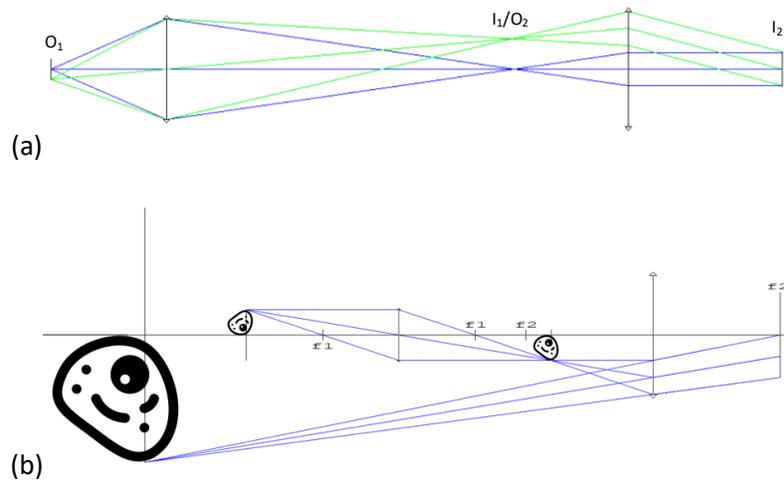


Figura 4.2 Trazo de rayos de un microscopio compuesto simple, con salida al infinito (a) y salida ligeramente divergente que ayuda a ejemplificar el aumento en el tamaño de la imagen (b).

4.2 Amplificación

Para el microscopio óptico compuesto mostrado en la Figura 4.2.a, se tiene que el objeto está localizado a una distancia S_o y la imagen a una distancia S_i . La amplificación transversal de la primera imagen I_1 está dada por:

$$MT = -\frac{S_i}{S_o} \quad (4.1)$$

La imagen formada por el lente objetivo ahora funciona como objeto para la segunda lente, el ocular, que forma su imagen localizada en infinito. El ojo al observar a través del ocular enfoca la imagen localizada en infinito sobre la retina. La amplificación angular de la lente ocular, de acuerdo con Hecht (2015), está dada por:

$$MA = \frac{25cm}{f_{ocular}} \quad (4.2)$$

La amplificación total del microscopio es:

$$M = MT \times MA \quad (4.3)$$

4.3 Dos tipos de objetivos

Los objetivos de microscopio están divididos en dos grupos, conjugado infinito y conjugado finito, cada uno con sus ventajas y desventajas, los cuales deben usarse de acuerdo con el tipo de microscopio a construir.

4.3.1 Objetivos estándar: Conjugados finitos

Para el caso de los microscopios ópticos compuestos, la mayoría de los objetivos estándar obedecen al *Deutsch Industrie Norma* (DIN, por sus siglas en inglés). El estándar DIN tiene una distancia de 160mm de la brida del objetivo a la brida del ocular (esta distancia se conoce como longitud del tubo óptico). El otro estándar es el *Japanese Industrial Standard*, o JIS por sus siglas en inglés. El estándar JIS tiene una distancia de 170mm de la brida del objetivo a la brida del ocular (Malacara-Doblado & Téllez-Quiñones, 2017).

Estos objetivos tienen la función de formar la imagen del objeto a una distancia, como lo dice su nombre, finita. Cuando un punto es la imagen de otro punto se les llama puntos conjugados, por lo tanto, podemos decir que estos objetivos están diseñados para conjugados finitos (Figura 4.3). La distancia particular a través del sistema es caracterizada por el estándar DIN o JIS; todos los microscopios de conjugados finitos entran en cualquiera de estos dos estándares (Edmund Optics, 2011).



Figura 4.3 Diagrama de rayos de un objetivo de microscopio de conjugados finitos.

La ventaja que presentan estos objetivos es que se pueden crear sistemas ópticos fácilmente con tan solo montar el objetivo y asegurarse de colocar el ocular o el detector a la distancia que dicta la norma por la que se rige (Figura 4.4). Esto hace que la fabricación de un microscopio con estos objetivos sea muy económica, ya que tan solo hace faltan los dos componentes críticos, el objetivo y el detector, además del tubo físico donde se alojan los componentes.



Figura 4.4 Trazo de rayos que representa un objetivo de microscopio de conjugados finitos seguido de un lente ocular que colima los rayos al infinito para que estos sean vistos con un ojo relajado.

La desventaja de estos objetivos es que están diseñados para montarse en microscopios con un tubo óptico de longitud específica, por lo que si se deseara agregar otros implementos ópticos al sistema (polarizadores, retardadores, filtros, etc.) se tendría que rediseñar todo el montaje para que las distancias y planos focales volvieran a ajustarse al ensamblaje original, o modificarlo para adaptarse a las nuevas dimensiones ópticas.

4.3.2 Objetivos con un conjugado infinito.

Cuando se hace un sistema óptico con un conjugado en infinito, se tiene una fuente puntual a una distancia finita que es colimada por el sistema hacia el infinito. En un objetivo conjugado infinito, el punto es el objeto bajo inspección y el infinito apunta hacia el ocular, o al sensor si se usa una cámara (Figura 4.5). Este tipo de diseño moderno utiliza una lente de tubo adicional entre el objetivo y el ocular para producir una imagen como se observa en la Figura 4.6 (Edmund Optics, 2011).

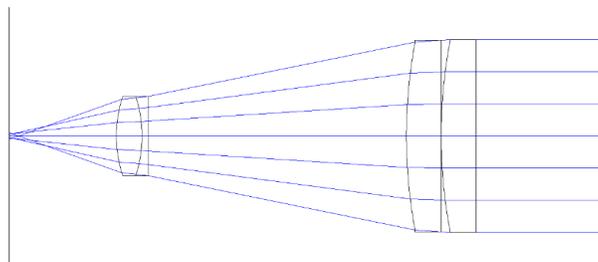


Figura 4.5 Diagrama de rayos que representa un objetivo de microscopio de conjugados infinitos, a la izquierda muestra a una distancia finita y a la derecha los rayos que salen hacia el infinito.

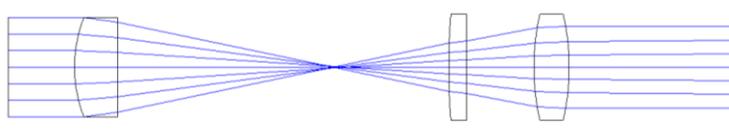


Figura 4.6 Con los rayos colimados proviniendo desde el objetivo de conjugados en infinito desde la izquierda, la lente de tubo los enfoca a un punto finito donde pueden ser proyectados en un detector o usados como objeto para una lente ocular.

El uso de este tipo de objetivos permite la utilización de componentes ópticos adicionales, como polarizadores, filtros y otros componentes que sirvan para ayudar a analizar la imagen.

Los sistemas ópticos diseñados con este principio pueden variar la magnificación de manera rápida, ya que ésta depende de la relación que hay entre la distancia focal del lente de tubo y la distancia focal del objetivo; incrementando o disminuyendo la distancia focal del lente de tubo cambia la magnificación del sistema (Edmund Optics, 2011).

La gran desventaja es que cada que se requiere cambiar la amplificación se tiene que cambiar la lente de tubo que es, por mucho, el componente de más alto costo del sistema.

4.4 Microscopio óptico sin ocular

Para el prototipo de la presente tesis se usó un objetivo de microscopio diseñado para un microscopio óptico compuesto, pero en lugar del ocular se colocó directamente el sensor CMOS (semiconductor complementario de óxido metálico, por sus siglas en inglés) de una cámara en el plano focal del objetivo, formándose aquí la imagen aumentada de la muestra.

4.5 Resolución del objetivo

La resolución del objetivo está dada por el límite de difracción:

$$r = \frac{0.61\lambda}{A.N.}, \quad (4.4)$$

siendo r la distancia mínima entre dos puntos distinguibles, $A.N.$ la apertura numérica del objetivo y λ la longitud de onda utilizada para iluminar la muestra (en este caso $550nm$ ya

que, bajo condiciones normales de iluminación, el ojo humano es más sensible a la luz verde-amarilla correspondiente a esta longitud) (Warren J., 2000). La selección de la apertura numérica del objetivo de microscopio determinará la resolución de los objetos más pequeños que podemos observar.

La aplicación del microscopio desarrollado en la presente inicialmente fue para la observación de huevos de helminto, que tienen un tamaño entre 30 y 150 micras como se muestra en la Figura 4.7 (Prats, 2005), siendo necesario observar la estructura interna. Por otro lado, se requería poder observar el mayor campo posible. Un objetivo de microscopio 10X con una apertura numérica de 0.25 alcanza una resolución de 1.4 micras si se toma la longitud de onda de la luz de $550nm$. Por otro lado, un objetivo de microscopio 20X con una apertura numérica de 0.4 alcanza una resolución de 0.9 micras para la misma longitud de onda. Por lo que se decidió trabajar con estos dos objetivos de microscopio.

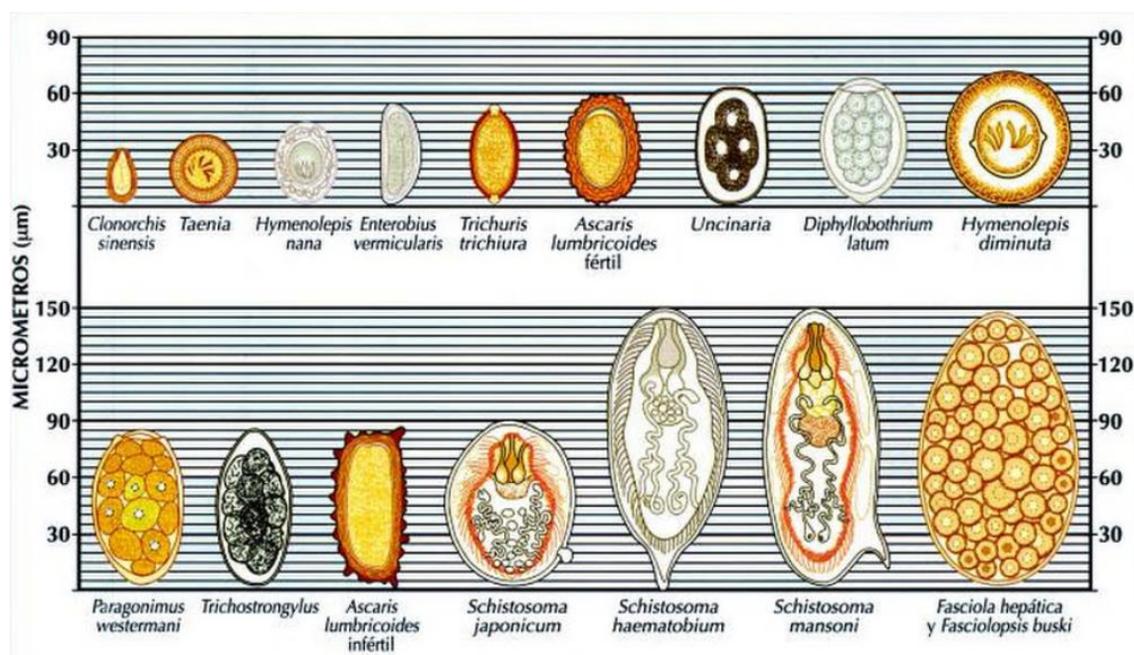


Figura 4.7 Morfología y tamaño de huevos comunes de helminto (Prats, 2005)

Sin embargo, la resolución del sistema no solo está restringida por el objetivo de microscopio, y con el fin de asegurar que el sistema completo tuviese el poder de resolución que se necesita, se debió calcular también la resolución que el sistema de obtención de imágenes podía proporcionar. Esto se analizará más adelante en la sección 7.

4.6 Campo de visión

Normalmente un microscopio convencional tiene un campo de visión (*FOV*, por sus siglas en inglés) definido por el cociente de la magnificación del objetivo y el diafragma del ocular:

$$FOV_{\text{objetivo-ocular}} = \frac{\text{Diafragma}_{\text{ocular}}}{\text{Magnificación}_{\text{objetivo}}} \quad (4.5)$$

Pero dado que el sistema proyecta directamente la imagen sobre una cámara, se usa la ecuación 4.6, la cual describe las longitudes tanto horizontal, vertical como diagonal del sensor usado.

$$FOV_{\text{objetivo-cámara}} = \frac{\text{Tamaño del sensor}_{x,y,d}}{\text{Magnificación}_{\text{objetivo}}} \quad (4.6)$$

Como se explicará en el capítulo 7, en la presente se probaron dos diferentes sensores, el del módulo de cámara de *Raspberry* y un sensor dedicado de *The Imaging Source* (TIS, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, en la Tabla 4.1 se muestra la comparativa de los campos de visión de ambos aparatos con un objetivo 20x:

Tabla 4.1 Comparación de los campos de visión de dos distintos sensores al usar un objetivo 20x

| FOV | Módulo Raspberry | Sensor DFM 72BUC02-ML |
|------------|--|--|
| Horizontal | $FOV_{\text{objetivo-cámara}} = \frac{3691.5\mu\text{m}}{20x}$ $= 184.5\mu\text{m}$ | $FOV_{\text{objetivo-cámara}} = \frac{5702.4\mu\text{m}}{20x}$ $= 285.12\mu\text{m}$ |
| Vertical | $FOV_{\text{objetivo-cámara}} = \frac{2777.6\mu\text{m}}{20x}$ $= 138.88\mu\text{m}$ | $FOV_{\text{objetivo-cámara}} = \frac{4276.8\mu\text{m}}{20x}$ $= 213.84\mu\text{m}$ |
| Diagonal | $FOV_{\text{objetivo-cámara}} = \frac{4619.7\mu\text{m}}{20x}$ $= 230.9\mu\text{m}$ | $FOV_{\text{objetivo-cámara}} = \frac{7128\mu\text{m}}{20x}$ $= 356.4\mu\text{m}$ |

Como se puede observar en la Tabla 4.1, el campo de visión aumenta proporcionalmente con el tamaño del sensor que se use y disminuye a medida que se aumenta el poder de magnificación del objetivo, como se mencionará más adelante, estas fueron características tomadas en cuenta para la elección de la cámara.

5 Sistema de iluminación

La iluminación adecuada de la muestra es crucial para lograr imágenes de alta calidad en la microscopía (Davidson & Abramowitz, 2002), y aún más en la microscopía virtual, por esto la búsqueda de un sistema de iluminación fue una de las tareas primordiales en este proyecto.

5.1 Iluminación con una lámpara led¹

Teniendo en cuenta que el sistema de iluminación podría ser el que más potencia eléctrica consumiera, se buscó limitar el gasto de potencia a menos de 5 Watts (W), que es la mitad del total que puede proporcionar el *Power Bank* (banco de poder) USB que se usó para alimentar el sistema ($5V \times 2A = 10W$). Como primera aproximación al problema se decidió usar una lámpara led USB cuyo consumo de corriente era de $1A$, por lo que se ajusta a las necesidades del proyecto. Se iluminó una muestra, que en este caso era una carta de resolución óptica desarrollada por la USAF (*United States Air Force*, por sus siglas en inglés).

Puede observarse en la Figura 5.1 que la imagen presenta un gradiente circular de blanco a rosa, desde el centro hasta las orillas. Al notar esta falta de homogeneidad se buscaron diferentes alternativas.

¹ Hasta 2001, el término se escribía en español como una sigla: con mayúsculas y sin plural (un LED, dos LED). Fue aceptado como sustantivo común por la Asociación de Academias de la Lengua Española en el *Diccionario de la lengua española*. Su plural es «ledes» (así como el plural de «red» es «redes»). No se escribe más como acrónimo (LED), de manera análoga a las palabras lexicalizadas láser (plural *láseres*) no se escribe más como el acrónimo inglés *LASER* (*light amplification by stimulated emission of radiation*: 'amplificación de luz por emisión estimulada de radiación') o radar (plural *radares*) ya no se escribe más como el acrónimo inglés *RADAR* (*radio detection and ranging*: *detección y medición de distancias por radio*).

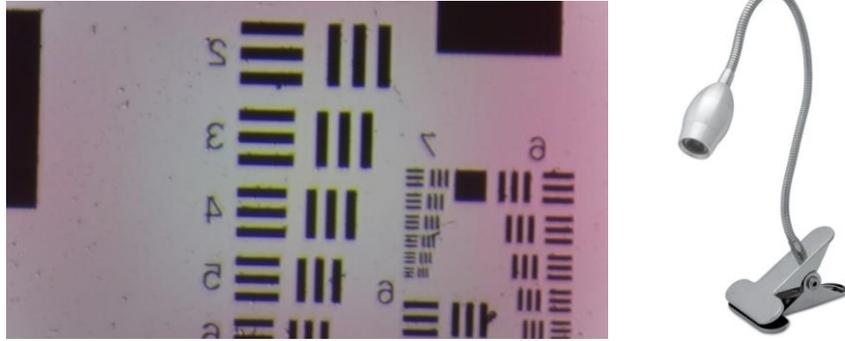


Figura 5.1 Carta de resolución óptica de la USAF y la lampara led USB con la que fue iluminada (ACCO Brands, 2019).

5.2 Módulo de iluminación de fondo, Adafruit

Este módulo *KWB-R7323W-1W* (Lucky Light Electronics, 2008) proponía una iluminación homogénea en un área relativamente grande de $23mm \times 75mm$ (Figura 5.2).

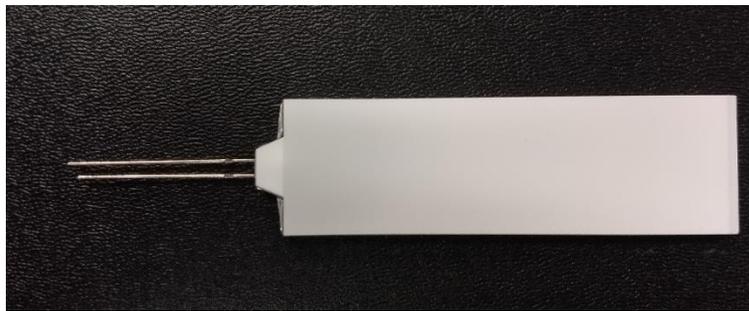


Figura 5.2 Módulo de iluminación de fondo

El diagrama eléctrico para conectarlo es muy simple, solo basta conectar las terminales positiva y negativa (ánodo y cátodo respectivamente) a una fuente de voltaje y colocar una resistencia limitadora de corriente que satisfaga al módulo. El valor de la resistencia necesaria puede obtenerse a partir de la forma general de la ley de Ohm:

$$V = I \cdot R \quad (5.1)$$

La cual establece que el voltaje entre dos terminales es igual al producto de la corriente y la resistencia entre los terminales (Cheng, 1997). Despejando R de la ecuación 5.1, tenemos:

$$R = \frac{V}{I} \quad (5.2)$$

La unidad del voltaje (V) es el *volt*, el de la corriente (I) es el *amper* y el de la resistencia (R) es el *ohm*. La hoja de datos del módulo de luz menciona una corriente y un voltaje directos recomendados de $15mA$ y $3.2V$ respectivamente, esto quiere decir que habría que colocar una resistencia R tal que por el circuito circulara una corriente $I = 15mA$; el voltaje con el que se debe calcular es el que suministra la fuente menos el que cae en el led, por lo que al sustituir en la ecuación 5.2 se obtiene que:

$$R = \frac{V}{I} = \frac{V_{fuente} - V_{led}}{I} = \frac{5V - 3.2V}{15mA} = 120\Omega$$

La resistencia de 120Ω existe como valor comercial, entonces el circuito a montar sería el mostrado en la Figura 5.3.

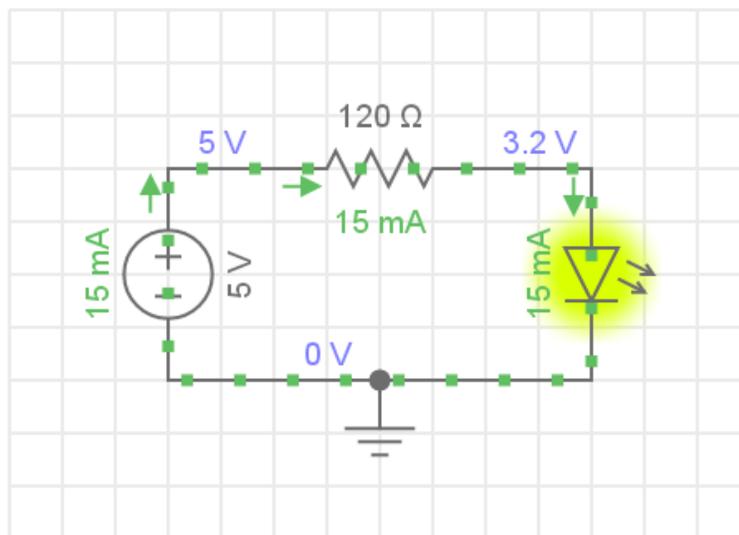


Figura 5.3 Circuito para el funcionamiento del módulo de luz trasera.

Sin embargo, como se descubrió al usarlo, el módulo es simplemente un led que ilumina la pieza entera. Entonces las imágenes producidas tenían dos zonas muy iluminadas, una cercana al led (Figura 5.4.a) y la otra en el extremo opuesto (Figura 5.4.c); la zona central

presentaba una iluminación menor dado que la difusión de la luz no es óptima (Figura 5.4.b). Se hizo un análisis de nivel de luminosidad con el software Matlab (Apéndice 11.1) a cada una de las imágenes tomadas y se pudo observar que ninguna presentaba homogeneidad, ya que al procesar las fotos se esperaba tener una gráfica que mostrara una línea horizontal recta, que correspondería a una iluminación uniforme sobre el corte analizado.

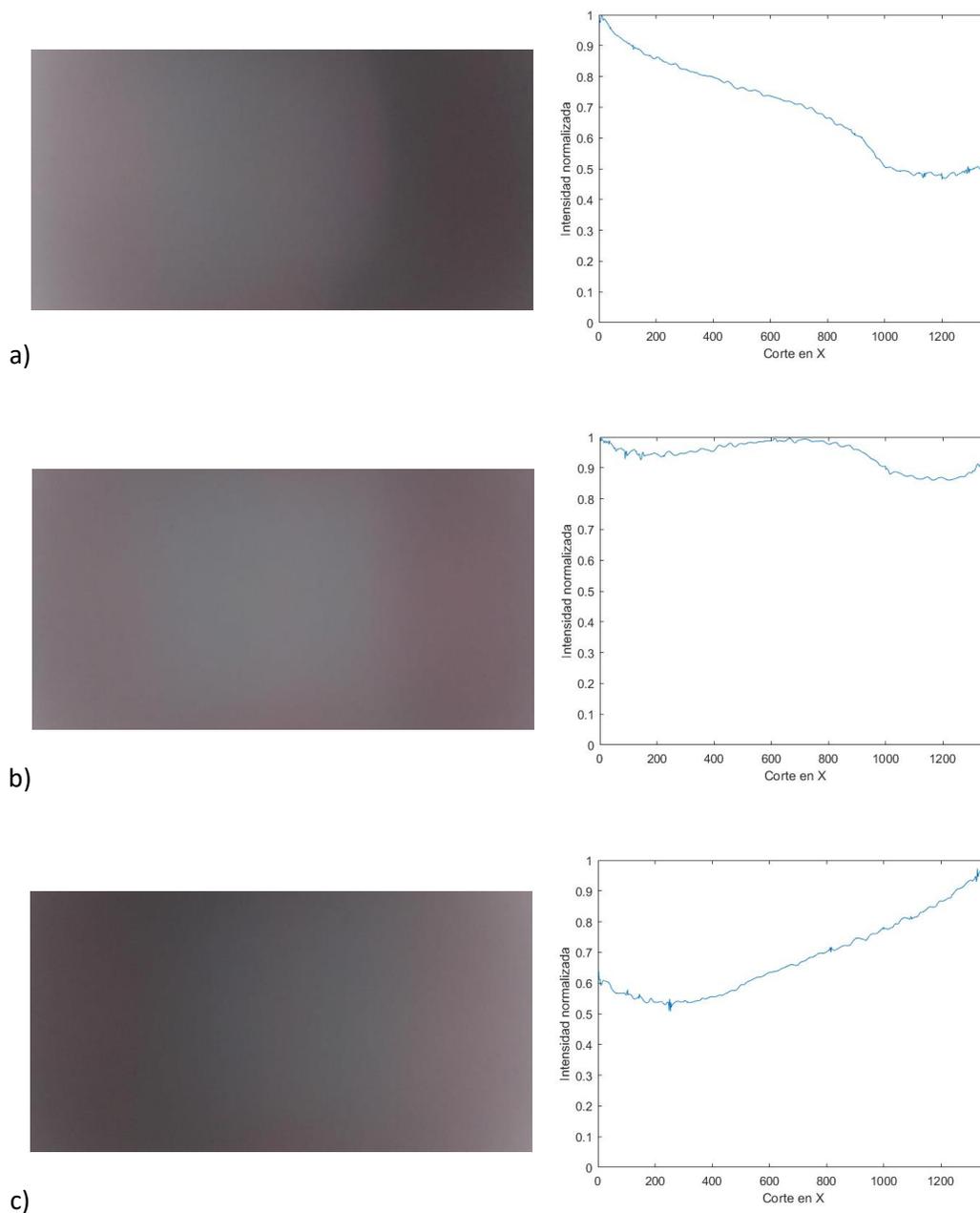


Figura 5.4 Imágenes obtenidas al iluminar con el módulo de luz de fondo y sus respectivos cortes transversales. a) Zona extrema junto al led, b) zona central del módulo y c) zona extrema contraria al led

5.3 Iluminación con fuente personalizada

Una vez descartada la opción del módulo KWB de Adafruit se pensó en el diseño de una fuente personalizada que se pudiera modificar conforme se fuera requiriendo. El diseño final se componía de un anillo montado en el objetivo del microscopio que contenía cinco ledes de montaje superficial (Lucky Light Electronics, 2005) de manera que los conos de emitancia convergieran en el punto focal del objetivo del microscopio, asegurando una zona de iluminación homogénea de un tamaño suficiente para cubrir gran parte de la muestra (Figura 5.5).

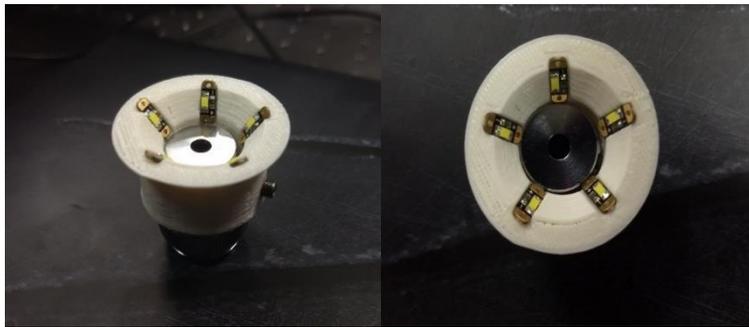


Figura 5.5 Anillo de ledes montado en un objetivo 10x

Los ledes están pre montados en pequeños circuitos que contienen el diodo y una resistencia limitadora de 100Ω (Figura 5.6), según la hoja de datos cada led tiene un voltaje y corriente directos de $3.4V$ y $20mA$ respectivamente. Si se despeja I de la ecuación 5.2 se tiene que:

$$I = \frac{V}{R} \quad (5.3)$$

Por lo tanto, al calcularse la corriente de cada led al conectarse a una fuente de $5V$, cada placa individual consumiría $16mA$.

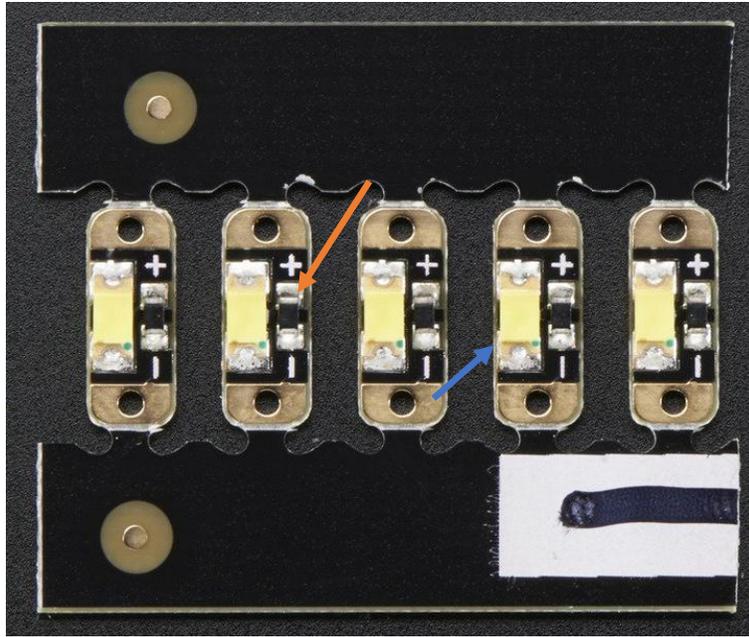


Figura 5.6 Circuitos que contienen cada uno un led (flecha azul) y su correspondiente resistencia limitadora (flecha naranja) ambos de montaje superficial

Como ya se mencionó, la fuente con la que se alimentaba el sistema es un *Power Bank* USB que suministra 5V y 2A a la salida, por lo que, si se calcula la corriente total que demanda el circuito de la Figura 5.7 con la ecuación 5.4, la corriente máxima del sistema sería de:

$$I_{T_{paralelo}} = I_1 + I_2 + \dots + I_n \quad (5.4)$$

$$I_{T_{paralelo}} = 5 \times 16mA = 80mA$$

Esto es equivalente al 4% de la corriente que puede suministrar el *Power Bank*.

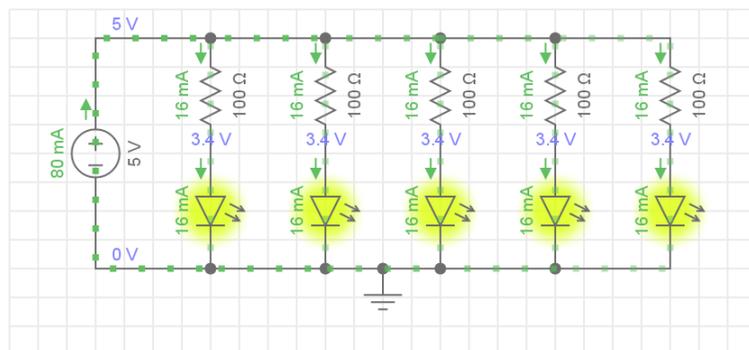


Figura 5.7 Circuito que representa los cinco ledes conectados en paralelo a la fuente de poder

Las ventajas que presentó esta propuesta fue que la mancha de luz era constante sin importar la posición del objetivo respecto a la muestra y podía ajustarse para diferentes objetivos de similar tamaño. Una vez más se procedió a analizar la homogeneidad de la iluminación (Figura 5.8).

Esta aproximación fue buena, sin embargo, el color no fue homogéneo (Figura 5.9), por lo que se buscó limitar las disparidades aplicando un filtro verde a la fuente de luz (Figura 5.10), ya que el sensor usado tiene su matriz física de pixeles con este color como principal, pudiéndose apagar las componentes roja y azul.

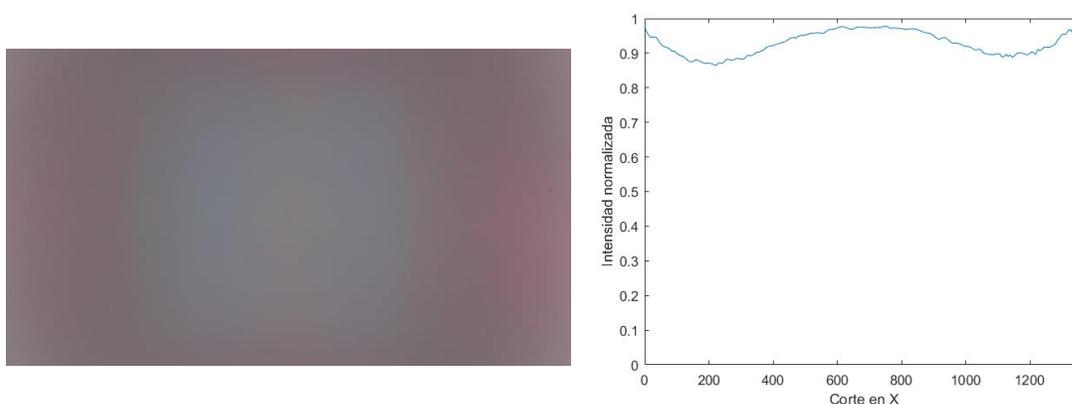


Figura 5.8 Corte transversal de una imagen de fondo blanco iluminada con el anillo led



Figura 5.9 Huevos de Helminto tomadas con el sistema de iluminación de anillo

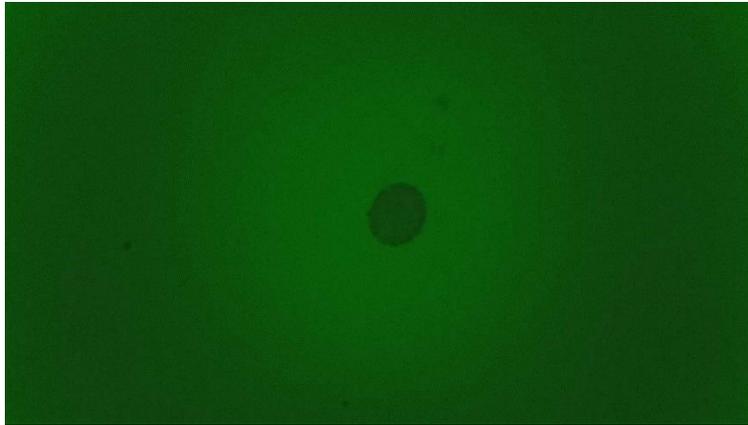


Figura 5.10 Huevo de Helmintho tomada con la segunda versión del primer prototipo, la cual solamente tomaba en cuenta las longitudes de onda pertenecientes al verde (~550nm)

Al evaluar las imágenes tomadas con esta versión del sistema, se determinó que no tenían el suficiente contraste como para usarse en el software de reconocimiento de imágenes propiedad de la fundación Bill Gates², además que presentaban el mismo patrón de iluminación que tenían las anteriores imágenes como se muestra en la Figura 5.11.

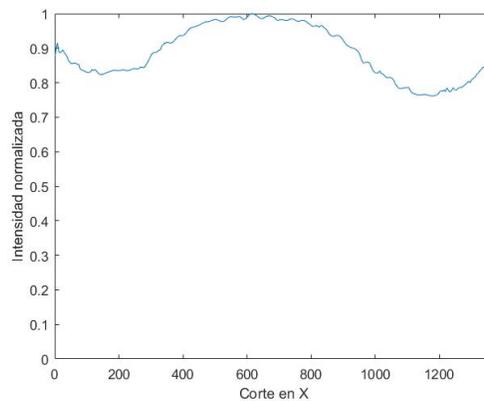


Figura 5.11 Corte transversal de la imagen tomada con el filtro verde.

5.4 Iluminación por transmisión

Tras comprobar que hacía falta mayor intensidad de iluminación y contraste en las imágenes, se montó un segundo prototipo el cual ahora iluminaba la muestra por

² El Instituto de Ingenierías de la UNAM y la fundación Bill Gates fueron los primeros usuarios que probaron el sistema planteado.

transmisión en lugar de reflexión, el cual consistía simplemente de un led (Lucky Light Electronics, 2017) montado por debajo de la muestra cómo se observa en la Figura 5.12.

Una vez más el circuito resultó muy simple, el led con una resistencia limitadora en serie conectados a la fuente USB (Figura 5.13). Sin embargo, al colocar los datos del led en la ecuación 5.2 ($3.4V$ y $350mA$) se obtiene una resistencia para el circuito de 4.57Ω , un valor que no se encuentra disponible comercialmente (Solver, 2019). El valor más cercano que se pudo obtener fue de 20Ω , por lo que la corriente que pasa por el sistema, de acuerdo con la ecuación 5.3 es de $80mA$.

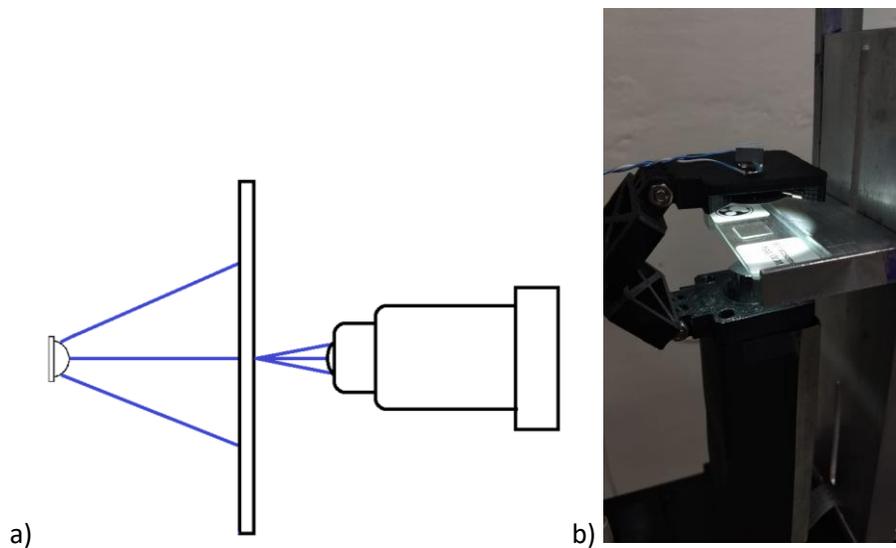


Figura 5.12 (a) Diagrama que representa (no a escala real) la iluminación por transmisión con un led simple y (b) su versión física.

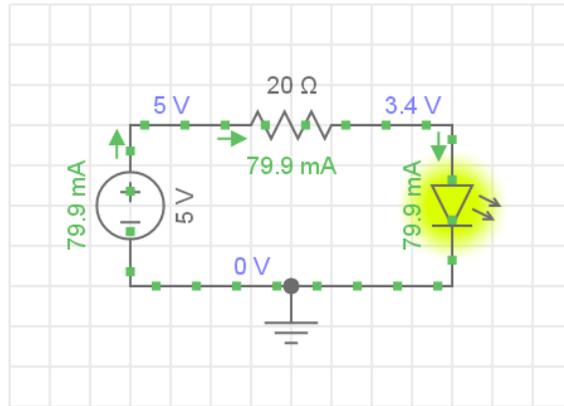


Figura 5.13 Circuito que representa el led con su resistencia limitadora conectados a la fuente

El uso de este nuevo sistema de iluminación causó un aumento en la calidad de las imágenes, las cuales se muestran en la Figura 5.14 y la Figura 5.15.

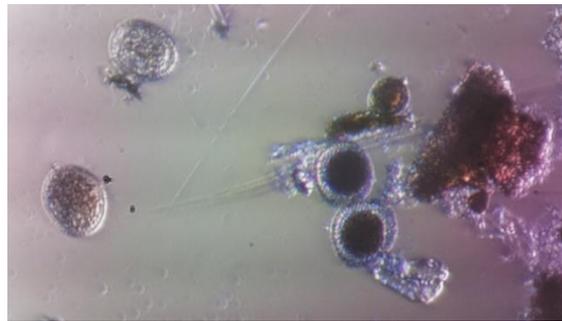


Figura 5.14 Huevos de helminto tomados con el segundo prototipo, el cual se ilumina por transmisión

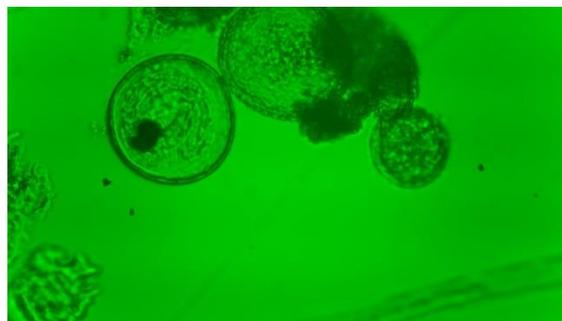


Figura 5.15 Huevos de helminto tomados con el segundo prototipo, usando ahora un filtro verde

Sin embargo, una vez más el color no fue homogéneo hasta que se utilizó el mismo filtro verde en la fuente de iluminación; después de pruebas e investigación, se descubrió que el

sensor usado en el prototipo tiene una matriz de corrección correspondiente al lente de fábrica:

El firmware de la cámara incluye una tabla precargada para corregir la distorsión cromática de la lente del módulo estándar. Esta es una razón por la cual los módulos de terceros que incorporan diferentes lentes pueden mostrar un color no uniforme a través de los fotogramas (Jones, 2017).

Inicialmente el proyecto estaba dirigido por la fundación Bill Gates y el Instituto de Ingeniería, los cuales establecieron las bases que dictaban si la calidad del sistema era suficiente, sin embargo, estos requerimientos no fueron de nuestro conocimiento por lo que al entregar las imágenes del primer prototipo (Figura 5.9 y Figura 5.10) se evaluaron como deficientes, principalmente porque la iluminación del campo, sin objeto, no era lo suficientemente homogénea. El segundo set de imágenes (Figura 5.14 y Figura 5.15) ya no fue evaluado y se desconoce si cumplen con los mínimos para pasar las pruebas del software de reconocimiento.

5.5 Iluminación con fuente condensadora por transmisión

Para corregir el problema del contraste y falta de homogeneidad se probó con un sistema que iluminaba la muestra por transmisión, pero ahora la luz proveniente del led sería colimada por una lente condensadora entre el led y la muestra (Figura 5.16), esto proveería de una zona grande de luz homogénea.

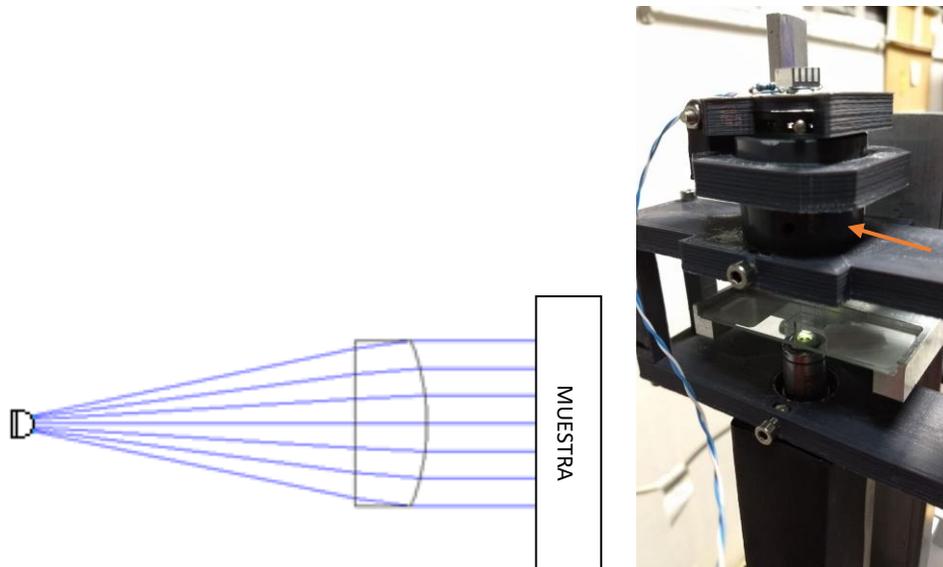


Figura 5.16 Diagrama que representa como la luz del led es colimada por la lente sobre la muestra (no a escala real) y su versión física, la lente está contenida dentro del tubo marcado con una flecha.

Para poder asegurar una buena repetitividad en las pruebas, se consiguió un juego de muestras orgánicas en la que una correspondía a huevos de helminto del género *Schistosoma* (Figura 5.17) y se procedió a tomar las imágenes con el nuevo sistema de iluminación con luz colimada (Figura 5.18).



Figura 5.17 Laminilla que contiene huevos de *Schistosoma*



Figura 5.18 Huevos de *Schistosoma* iluminados con luz colimada, usando un objetivo 10x

El contraste de la imagen mejoró considerablemente, sin embargo, el problema del color se mantenía. Lo siguiente que se intentó fue corregir de manera digital aplicando una máscara que nivelara los canales RGB de la imagen en Matlab (Apéndice 11.2), esto porqué, como se observa en la Figura 5.19 obtenida con el programa generado en el mismo software (Apéndice 11.3), cada canal presenta un gradiente diferente de intensidad, lo que afecta el color final de la fotografía.

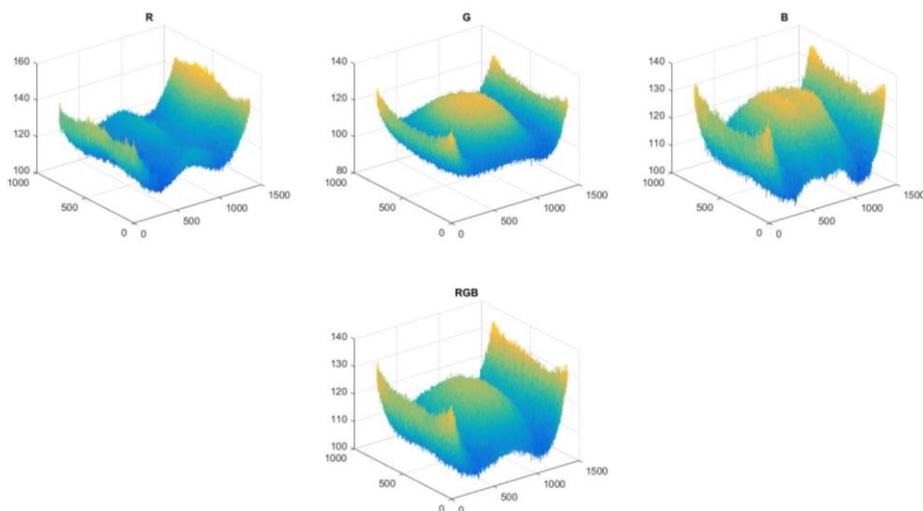


Figura 5.19 Imagen de fondo analizada en cada uno de los colores que la componen, para el sensor del módulo Raspberry

El resultado del procesado fue bueno, sin embargo, aún se podían distinguir los gradientes de color ya que el filtro usado es genérico para una imagen de fondo tomada antes de la

imagen a corregir, además que al hacer este proceso se pierde gran cantidad del contraste ganado con la nueva iluminación (Figura 5.20).

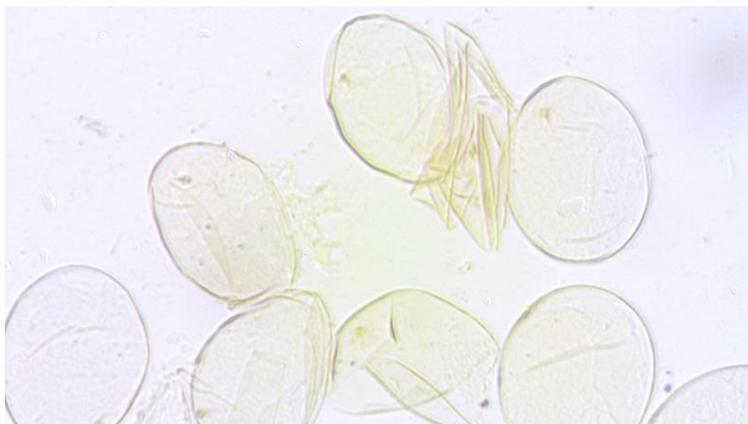


Figura 5.20 Corrección de color de la Figura 5.18

Para corregir el problema se cambió al sensor 72BUC02-ML de TIS y se procedió a tomar nuevamente las fotografías para evaluarlas. Como puede verse en la Figura 5.21, hubo una gran mejora en la calidad de las imágenes, tanto en la homogeneidad del color como en el contraste.



Figura 5.21 Fotografía de huevos de Schistosoma tomados con el sensor de la cámara TIS, 20x

Se llevó a cabo un análisis de la homogeneidad de la iluminación de una imagen de fondo blanco (Figura 5.22.a y Figura 5.22.b) al igual que con el sensor de Raspberry, los resultados

parecían mejores que las pruebas anteriores, y al analizar cada uno de los tres canales de la imagen, se puede concluir que el problema era causado totalmente por el sensor y no por los elementos ópticos ni fotoeléctricos del sistema (Figura 5.22.c).

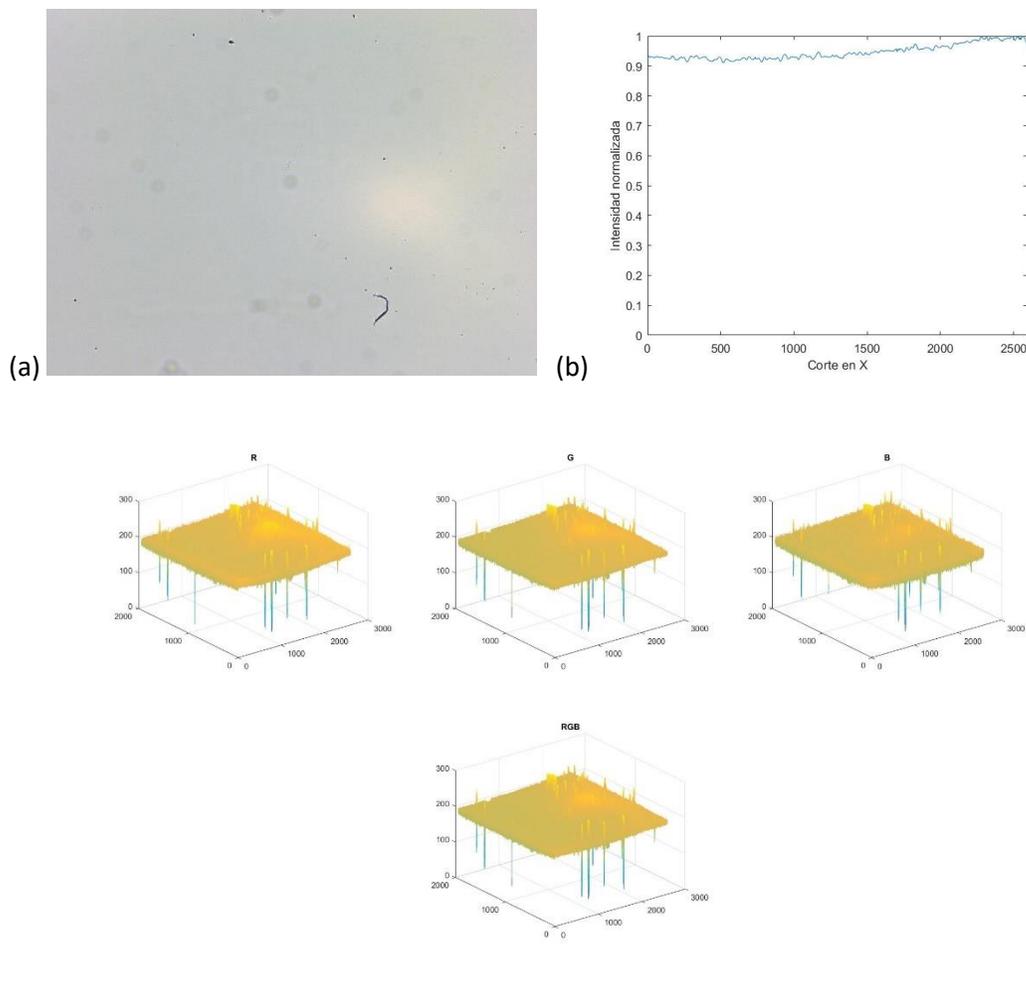


Figura 5.22 (a) Imagen de fondo tomada con la cámara de TIS, (b) Corte transversal de la imagen y (c) evaluación de los canales RGB de (a)

Al contar con un sistema de iluminación que ofrece imágenes homogéneas, se pudieron tomar imágenes de muestras histológicas para su evaluación por parte de expertos en el área.

6 Sistema mecánico

Una parte esencial del proyecto es el movimiento controlado de la laminilla con la muestra respecto al microscopio. El sistema mecánico es el encargado de tal efecto.

6.1 Platinas

Dado que uno de los objetivos del proyecto era mantener un bajo costo, se buscó que las platinas tuvieran la capacidad de trasladar el microscopio a lo largo de toda la muestra, asimismo debería tener una resolución de paso de al menos $0.5mm$ mientras que mantuvieran un costo razonable.

Como se mencionó con anterioridad, al inicio el sistema estaba siendo utilizado para buscar huevos de helminto y la muestra a analizar era un recipiente de $5cm \times 2cm$, por lo que la platina debía poder trasladar el microscopio por esta superficie.

Se probó un montaje con dos platinas de la empresa *MPositioning* modelo *MPT125X-50L* (Figura 6.1), las cuales tienen un área de trabajo cuadrada de $125mm$ de lado, más que suficiente para albergar los recipientes, su longitud de carrera es de $50mm$ en un solo eje, justo el máximo que se necesitaría mover en cualquier dirección. Además, la resolución de paso es de $10\mu m$, que supera por mucho lo requerido por el sistema.

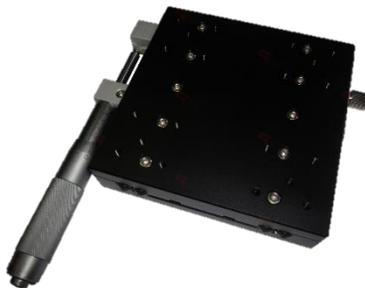


Figura 6.1 Platina MPT125X-50L, usada para mover el sistema en el eje X.

Con el apilamiento de dos platinas se obtiene el movimiento en el plano XY , sin embargo, es necesario el movimiento en el eje Z para poder enfocar el sistema. Para ello se usó una platina con menos recorrido, ya que la muestra no superaba los $5mm$ de profundidad, la elegida fue la platina de la misma empresa modelo $T60Z-10A$ (Figura 6.2), la cual tiene $60mm$ por lado, carrera de $10mm$ y una resolución de paso de $10\mu m$.



Figura 6.2 Platina T60Z-10A usada para el movimiento en el eje Z.

6.1.1 Montaje de las platinas

Al llevar a cabo el montaje primero se probó la capacidad de enfoque de la platina pequeña, se montó como se muestra en la Figura 6.3.a, con tan solo el microscopio montado en una base fija y la platina debajo para llevar a cabo pruebas. Una vez realizadas, se observó que la platina cumplía con el nivel de precisión y se procedió a montar las otras dos para el movimiento en el plano XY (Figura 6.3.b). En este segundo ensamblaje se cambió el montaje del eje Z , colocando la base del microscopio en la platina, y esta última en una base separada a las otras dos para poder tener un movimiento de la muestra en el plano XY respecto al microscopio fijo.

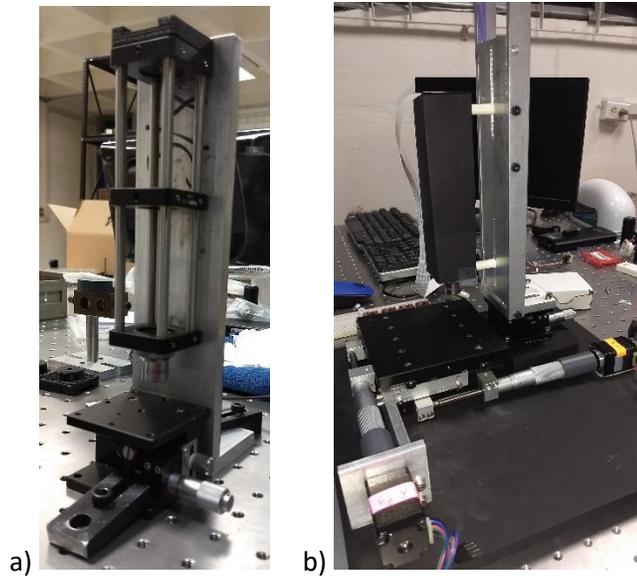


Figura 6.3 Primer (a) y segundo (b) montajes del sistema.

6.1.1.1 Inversión del microscopio

Debido a que las primeras pruebas se llevaron a cabo con el sistema de iluminación de anillo mostrado en la sección 5.3 el primer montaje resultó adecuado, sin embargo, al requerir hacer pruebas con la iluminación por transmisión se necesitaba una longitud del sistema que excedía la que podía lograrse con el microscopio montado como se muestra en la Figura 6.3.b, por lo que se decidió invertir el microscopio para poder montar los componentes necesarios sin problemas de espacio (Figura 6.4).

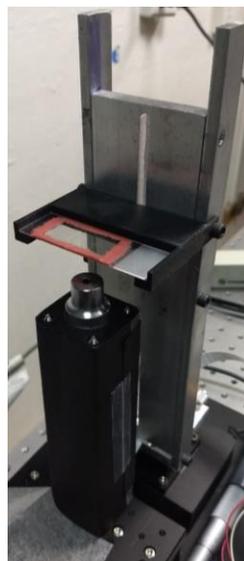


Figura 6.4 Microscopio invertido.

6.2 Montaje para muestras histológicas

Cuando se cambió el enfoque del proyecto y se comenzaron a tomar imágenes de muestras histológicas, el rango de movimiento en el plano XY se redujo drásticamente, ya que cada muestra tiene un tamaño aproximado de 1cm^2 . Pese a esto se siguió trabajando con las mismas platinas ya que aún cumplían los requisitos que el sistema necesitaba.

La montura cambió ligeramente para permitir que todas las platinas estuviesen montadas juntas y ahora el movimiento era del tubo óptico respecto a la muestra que se mantenía estática. La iluminación también se modificó para que, en lugar de anclarse al propio objetivo, se anclara a las varillas que componen el tubo, así si se requería cambiar de objetivo solo se necesitaría desatornillarlo y elegir el adecuado, sin necesidad de mover el sistema de iluminación (Figura 6.5).

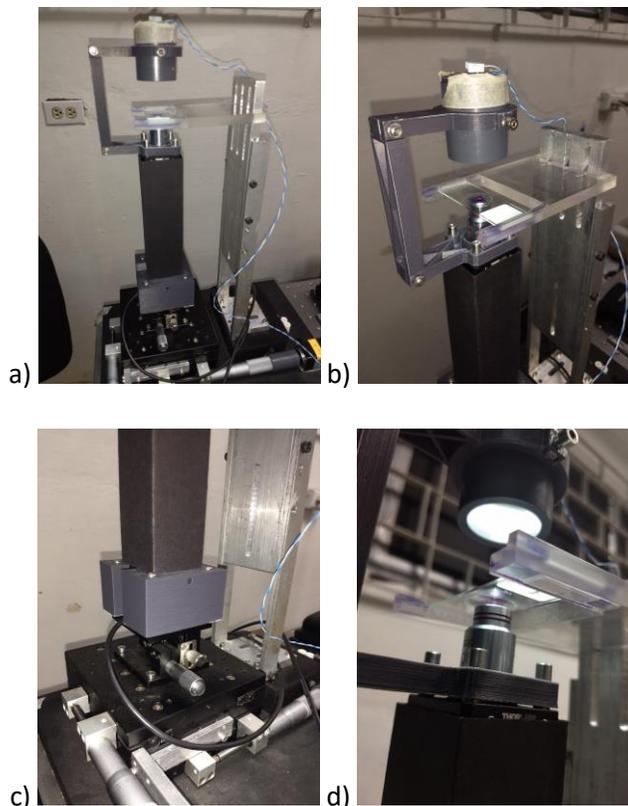


Figura 6.5 (a) Montaje final del microscopio invertido, (b) detalle del brazo que sujeta el sistema de iluminación, (c) montura que sujeta el tubo óptico a las platinas de movimiento en el espacio XYZ y (d) funcionamiento del sistema de iluminación sobre la muestra, si se requiere cambiar de objetivo no es necesario mover el brazo sujetador.

6.3 Motores

Considerando que las platinas debían de moverse automáticamente, se consiguieron dos motores Nema 11 (Pololu, 2019) para tal función (Figura 6.6). Estos motores operaban con $4.5V$ y $670mA$ por cada una de las dos bobinas que los componen, por lo que cada uno demandaría $1340mA$ de corriente, debajo del límite que ofrece el Power Bank que alimentaba el sistema.



Figura 6.6 Uno de los motores Nema 11 usado en el sistema.

Otra característica buscada en los motores era la resolución de paso, los usados en el sistema están diseñados de tal forma que cada revolución está compuesta de 200 pasos. Ahora bien, las platinas tienen en su perilla de movimiento 50 pasos de $10 \mu m$ cada uno. Al hacer el cálculo, cada marca de la perilla corresponde a cuatro pasos del motor. Esto es más que suficiente para que los motores muevan las platinas en pasos completos sin necesidad de hardware extra.

Al hacer las pruebas correspondientes al correcto movimiento de las platinas con los motores se notó que, aunque la cantidad de pasos fue la que se esperaba, el tener pasos completos causaba un recorrido brusco a través de la muestra. Este problema fue resuelto con el uso de *drivers* (controladores) con la capacidad de recorrer fracciones de pasos.

6.3.1 Drivers

Los *drivers* son indispensables en el control de motores, ya que la mayoría de las tarjetas de control no pueden proporcionar la corriente necesaria para moverlos. Un *driver* funciona

básicamente como un interruptor que se enciende y apaga con una señal lógica de baja corriente, pero es capaz de tolerar el flujo de corrientes mayores a través de él (Figura 6.7).

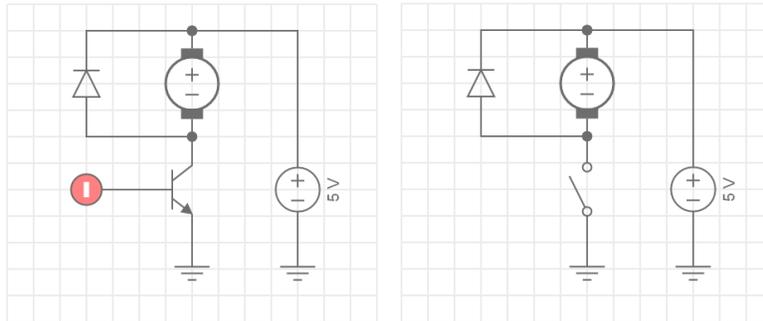


Figura 6.7 Circuito básico de un driver con transistor BJT y su analogía con un interruptor.

Sin embargo, los motores a pasos como los que se usaron en este proyecto se componen de dos bobinas, por lo que se necesita más de un circuito como el mostrado en la Figura 6.7. Para esto se usaron los drivers *MP6500* (Pololu, 2019) que se muestran en la Figura 6.8, capaces de controlar sin problemas los motores a pasos bipolares; además tienen la función de controlar por micro pasos, pudiendo aumentar el número de pasos efectivos que tienen los motores por revolución, haciendo que la transición entre paso y paso sea más suave (Boyes, 2002) y por tanto evitan que el recorrido de las platinas sea accidentado.

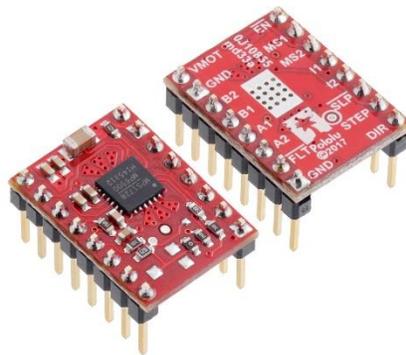


Figura 6.8 Drivers MP6500 utilizados en el sistema.

Usando la función de micro pasos, se pudo aumentar a 400 pasos por revolución para cada motor y como se muestra en el programa de toma de imágenes (Apéndice 11.4) se movían las platinas en recorridos de $250 \mu m$, teniendo en cuenta que el campo de visión de cada

imagen es de $285.12\mu m$ habría aproximadamente $35\mu m$ de traslape entre cada foto para unir las en el post procesado.

Al usar estos *drivers* es necesario aumentar el voltaje que se suministra a los motores para poder mantener los micro pasos, lo que en principio aumentaría también la corriente que circula por las bobinas de estos, dañándolas; sin embargo, los *drivers* utilizados tienen un sistema interno de limitación de corriente que elimina este inconveniente.

No obstante, la fuente que se usaba al momento no podía suministrar más de $5V$, por lo que se decidió usar un eliminador que podía proporcionar desde 12 hasta 24 volts de tensión y hasta 3 amperes de corriente de salida, por lo que la alimentación eléctrica no sería una preocupación de ahora en adelante.

7 Detección y procesamiento de imágenes

7.1 Sensor

Teniendo en cuenta que el sistema trabajaría con dos objetivos de microscopio, siendo el de máximo aumento el de 20x, apertura numérica de 0.4 y analizando con una longitud de onda de $550nm$, se buscó un sensor que no limitara la resolución propia del sistema. De acuerdo con la ecuación 4.4:

$$r = \frac{0.61(550nm)}{0.4} = 839nm$$

la máxima resolución de nuestro objetivo es de aproximadamente 839 nm. El diámetro del spot es de dos veces el radio dado por la ecuación 4.4, por lo que se buscó una cámara con un tamaño de píxel de aproximadamente ese tamaño.

7.1.1 Cámara del módulo de Raspberry

En un principio se utilizó un módulo de cámara para Raspberry Pi versión 2.1 (Figura 7.1), el cual cuenta con un sensor *Sony IMX219* montado en su placa. Este sensor tiene un píxel de $1.12\mu m \times 1.12\mu m$ (Raspberry Pi Foundation, 2016), lo cual brindaba una resolución de imagen más que suficiente para el proyecto a un costo de \$25 USD (Newark Element 14, 2018).

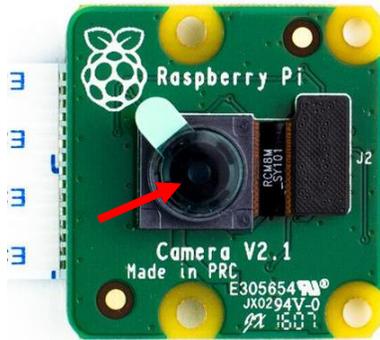


Figura 7.1 Módulo de cámara de Raspberry. Se señala con una flecha roja la lente que está montada de fábrica.

Sin embargo, como se descubrió en la sección cinco, las imágenes obtenidas de este sensor resultaron deficientes ya que no está diseñado para usarse con un sistema óptico diferente al que tiene montado de fábrica. Por tal motivo se buscó un sensor que por defecto no tuviese óptica integrada.

7.1.2 Sensor 72BUC02-ML

La cámara de la compañía TIS funciona con un sensor *MT9P006* de *ON Semiconductor* (Figura 7.2), y su tamaño de píxel es de $2.2\mu m \times 2.2\mu m$ (The Imaging Source, 2018), por lo que la resolución es del orden de la resolución requerida por el sistema.

El único inconveniente de usar este sensor es el precio de \$289 USD, pero con las ventajas de que, al ser una tarjeta dedicada a la toma de imágenes en microscopía, se pueden modificar sus ajustes más fácilmente y tiene un área efectiva más grande (como se explicó en la sección 4.6). Además, su paquete de desarrollo gratuito está disponible en Microsoft Windows, por lo que la dificultad y complejidad de su control se ve reducida notablemente, tanto para su programación inicial como para el usuario final.



Figura 7.2 Placa de cámara a color USB 2.0 (The Imaging Source, 2018)

7.1.3 Resolución espacial del sensor

Como se mencionó en la sección 4.5, otro componente que afecta la resolución del sistema es el sensor usado, para estimar la máxima resolución espacial se llevó a cabo una prueba de Función de Modulación de Transmisión (*MTF*, por sus siglas en inglés), que explica cómo se comporta el sistema completo ante una entrada conocida, el resultado se muestra en la Figura 7.3 y el código con el que fue obtenido se describe en el Apéndice 11.5.

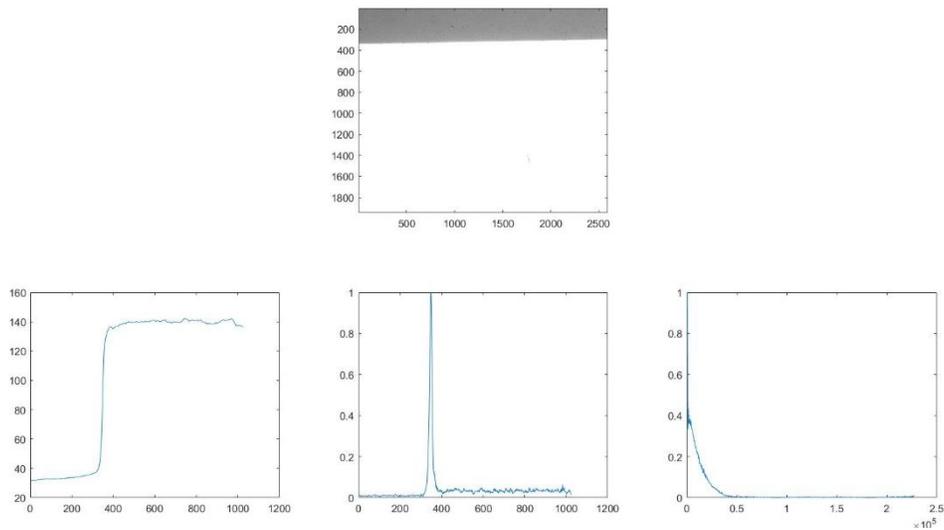


Figura 7.3 Imagen de un borde obtenido de una carta de resolución (USAF) con un objetivo 20x, corte promediado de una sección del borde, Line Spread Function del borde, MTF obtenida de la imagen (Imágenes superior, inferior izquierda, inferior central e inferior derecha, respectivamente)

Con estos resultados, haciendo un corte al 10% en la *MTF* se puede observar que el sistema con un objetivo 20x tiene una resolución de $2.5\mu m$.

7.2 Procesamiento

Dado que el proceso debe de ser lo más simple y rápido posible, se buscó una plataforma fácil de usar que contara con recursos de hardware y software para llevar a cabo todos los procesos necesarios, teniendo idealmente conexiones periféricas nativas para conectar un sensor de captura de imágenes, espacio en memoria suficiente para guardarlas y un procesador lo suficientemente potente para procesarlas en poco tiempo.

7.2.1 Raspberry Pi

Para el sistema en un principio se usó una placa de desarrollo Raspberry Pi 3 modelo B versión 1.2, la cual cuenta con un procesador de cuatro núcleos a 1.4GHz Broadcom BCM2837 de 64 bits, un puerto microSD para cargar el sistema operativo y guardar archivos, y un puerto para ISC preparado para conectar el módulo *Raspberry Pi Camera* (Raspberry Pi Foundation, 2016).

La ventaja de este sistema es que todos los periféricos del sistema se pueden conectar directamente, la etapa de potencia se conecta fácilmente con cables simples, la alimentación puede ser suministrada vía un cable micro USB y un cargador genérico de 5V que pueda proporcionar al menos 2A, justo lo que la fuente de poder que se usaba ofrecía. Los periféricos de interfaz de usuario (teclado, ratón, pantalla) al ser *Plug-and-Play* (PnP por sus siglas en inglés, o ‘enchufar, conectar y usar’) se conectan a los puertos USB de la tarjeta de desarrollo y funcionan sin ningún problema.

La desventaja que presenta el sistema es que, si no se tiene una fuente estable, las variaciones de voltaje o corriente pueden causar corrupción de archivos en la tarjeta de memoria, haciéndola ilegible para la Raspberry Pi. Además, el *Kit de Desarrollo de Software* (SDK, por sus siglas en inglés) del sensor de TIS para Raspbian (el sistema operativo nativo de la tarjeta Raspberry Pi) no está diseñado para crear software de forma intuitiva y fácil para el usuario, lo que lo hace complejo de programar y operar.

7.2.2 PC

Cuando se cambió el sensor por el de la cámara TIS, se comenzó el desarrollo de la aplicación para el control del sistema desde una computadora con sistema operativo Windows. El SDK

está disponible como un ejecutable autoinstalable en .NET para Windows Visual Studio (The Imaging Source, 2019), un lenguaje visual muy amigable para el usuario.

Además, esto simplificó mucho la tarea de toma de imágenes, ya que el software incluido con la cámara puede controlarse directamente desde cualquier PC que cumpla los requerimientos mínimos.

El único inconveniente sería que al no tener una conexión de entrada y salida de propósitos generales (GPIO, por sus siglas en inglés) se debió de buscar una forma de conectar la computadora a los motores para llevar a cabo el movimiento de barrido de la muestra. Para esto se usó una placa Arduino para realizar la comunicación entre la computadora y los *drivers* de los motores.

7.3 Unión de las imágenes

Una parte importante en el desarrollo del proyecto fue el poder evaluar una única imagen compuesta de todas las que se tomaran de la muestra, para así dar una versión digitalizada que podría examinarse sin necesidad de estar *in situ*.

Para lograr esto se utilizó el software Fiji (Schindelin, y otros, 2012) con la herramienta *Stitching* que tiene incluida en él. Como puede verse en la Figura 7.4, el programa toma imágenes tomadas en un orden específico y las une para formar una imagen con todas ellas.

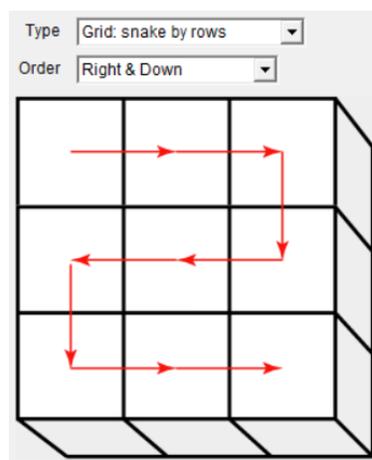


Figura 7.4 Orden en el que el software Fiji une las imágenes, este puede ser cambiado dependiendo de cómo se hayan tomado las fotografías originales.

Con esta herramienta puede fácilmente tomarse una serie de fotografías a la muestra deseada para luego unir las en el resultado final que sería enviado a los expertos en el área para su evaluación.

8 Resultados y discusión

Dado que el sistema se montó de diferentes maneras y con distintos métodos de iluminación, hubo que compararlos cada vez con algún sistema análogo para poder verificar que se estuvieran obteniendo resultados óptimos.

Las imágenes mostradas en esta sección se obtuvieron con tres prototipos de microscopio construidos, los cuales se identificarán de la siguiente manera:

Prototipo 1: Iluminación por reflexión con el sistema mostrado en la Figura 6.3 y detector de la Raspberry.

Prototipo 2: Iluminación por transmisión con el sistema mostrado en la Figura 5.12 y detector de la Raspberry.

Prototipo 3: Iluminación por transmisión con el sistema mostrado en la Figura 6.5 y el detector de TIS.

8.1 Huevos de helminto

Como se mencionó con anterioridad, el proyecto comenzó con pruebas para identificar huevos de parásitos intestinales. Las imágenes tomadas con el primer prototipo se muestran en las Figuras 8.1.a y 8.1.b, y con el segundo prototipo se muestran en las Figuras 8.1.c y 8.1.d.

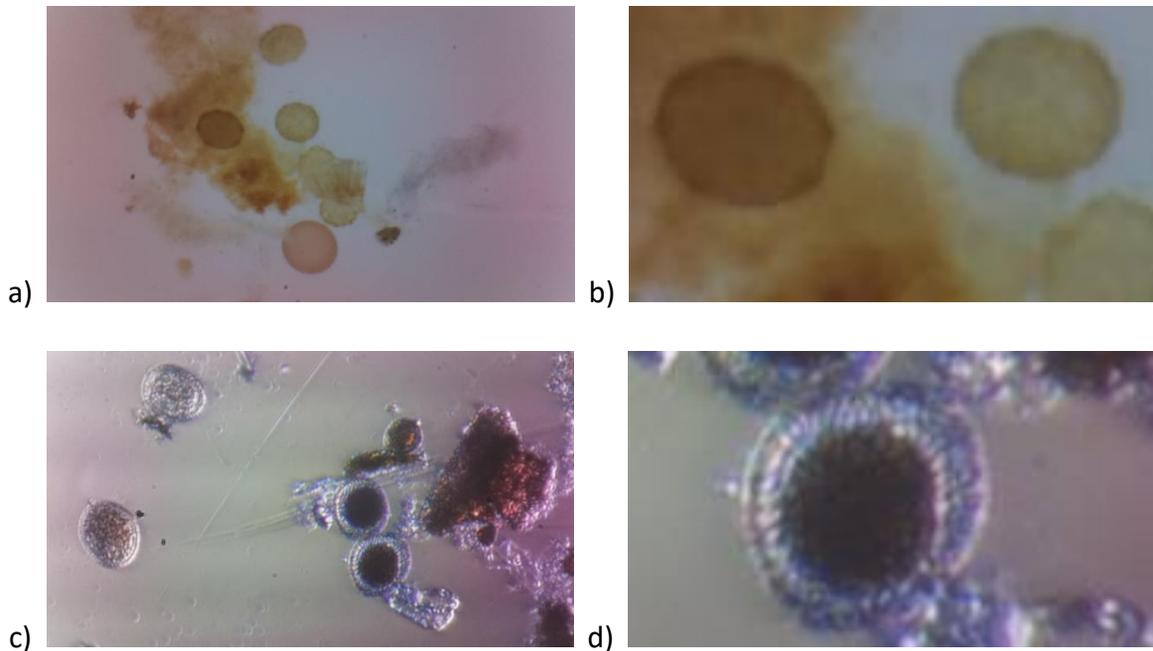


Figura 8.1 Huevos de helminto, (a) iluminación por reflexión aumento de 5x, (b) detalle ampliado, (c) iluminación por transmisión aumento de 5x, (d) detalle ampliado.

Se evaluaron las imágenes mostradas en la Figura 8.1.a, y como se mencionó con anterioridad, los investigadores del Instituto de Ingeniería de la UNAM determinaron que los bordes no eran suficientemente definidos y faltaba contraste entre los especímenes y el fondo. Como referencia se tomaron fotografías con un microscopio óptico Leica, las cuales se compararon también con el segundo juego de imágenes del segundo prototipo. Estos resultados ya no fueron evaluados, pero se siguió con el trabajo para obtener fotografías de mejor calidad. Como se mencionó en el apartado 5.4, el sensor Raspberry tenía una matriz de corrección para la lente de fábrica, por lo que se volvieron a tomar las imágenes con el nuevo sensor de TIS, en la Figura 8.2 se muestra la comparativa de estos sistemas.

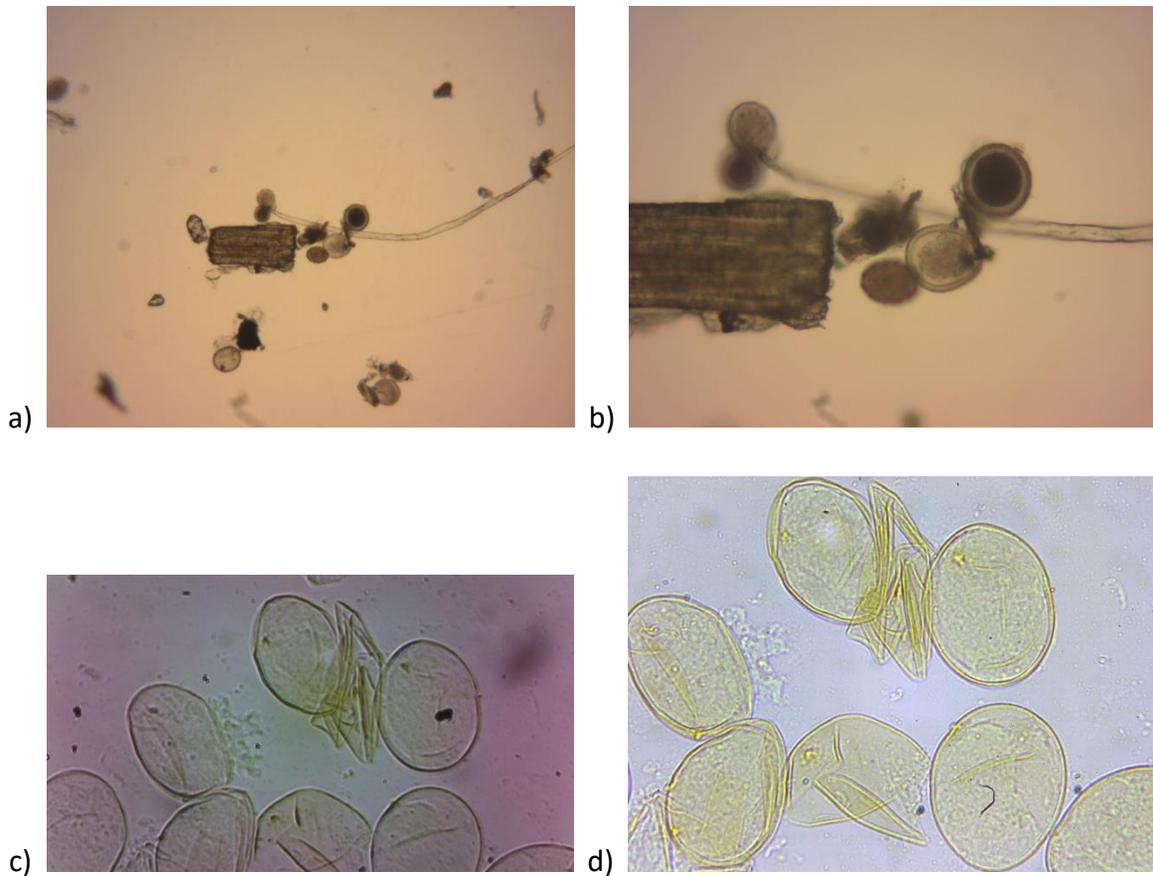


Figura 8.2 Huevos de helminto tomados con (a) un microscopio óptico Leica, aumento de 4x, (b) un microscopio óptico Leica, aumento de 10x, (c) imagen obtenida con nuestro microscopio (segundo prototipo) con iluminación por transmisión colimada, sensor Raspberry y aumento de 10x, (d) imagen obtenida con nuestro microscopio (tercer prototipo) con iluminación por transmisión colimada, el sensor de TIS y aumento de 20x.

8.2 Células HEK293

Durante el proceso de diseño del tercer prototipo, se propuso el uso del sistema para hacer observaciones de células embrionarias de riñón humano, conocidas como *HEK293*, para su estudio en ambientes de microgravedad. Para esto se proporcionó una muestra de cultivo y se procedió a la toma de imágenes, primero con el sensor de la tarjeta Raspberry y, una vez montado el tercer prototipo, con el sensor de TIS.

Al mostrar ambos resultados, los encargados del proyecto confirmaron que, aunque las fotografías tomadas con el sensor de la Raspberry cumplían con las necesidades básicas de resolución y campo de visión que se tenían, el color no correspondía con el que debería de tener la muestra, siendo un punto importante en el desarrollo de su sistema (Figura 8.3.a).

Mientras que las imágenes tomadas con el sensor de TIS cubrían por completo los requerimientos, además que brindaban un mayor campo de visión (Figura 8.3.b), lo que hacía más fácil el estudio que estaban realizando.

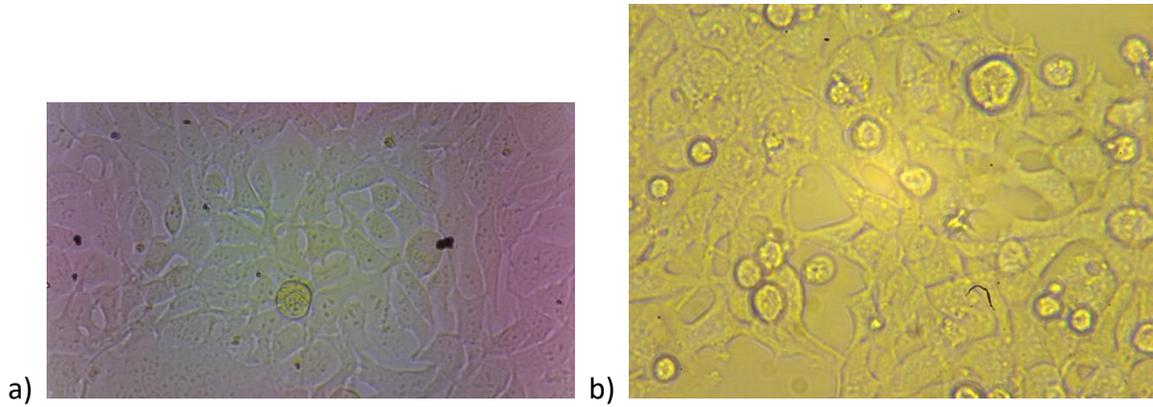


Figura 8.3 Células HEK293 observadas con el sensor de la Raspberry, utilizando un objetivo 10x (a), un segundo cultivo visto con el sensor de TIS que da un campo de vision similar, utilizando un objetivo 20x (b).

Algo a destacar es que con el software incluido con el sensor TIS, se puede llegar a hacer una secuencia de imágenes en un lapso específico, como puede mostrarse en la Figura 8.4, esto puede ser de ayuda en algunas aplicaciones con cultivos celulares ya que se puede observar el cambio de la muestra a lo largo del tiempo en el que se toman las imágenes.

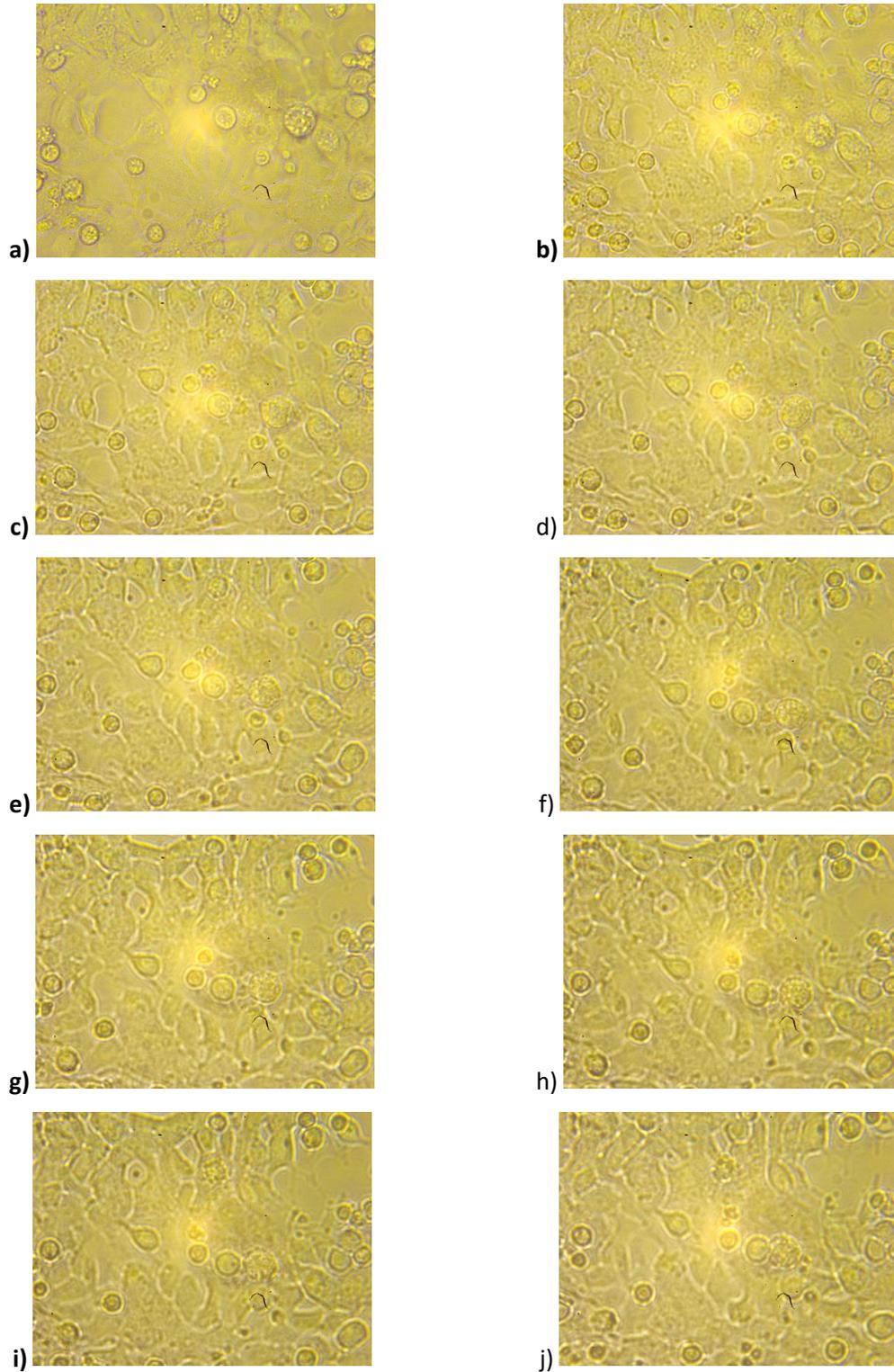


Figura 8.4 a)-d) Imágenes que muestran la muerte celular de un cultivo de HEK293 a lo largo de un lapso de 4.5 horas, con un intervalo aproximado de 30 minutos entre cada una.

8.3 Muestras histopatológicas

Al avanzar en el desarrollo del proyecto, se descubrió que las imágenes tomadas con el primer sensor resultaban deficientes para muchas de las aplicaciones, por lo tanto, se tomó la decisión de consultar con expertos en histología para que evaluaran las fotografías obtenidas con dos de los prototipos, además de una referencia tomada con un microscopio óptico Carl Zeiss.

Como se esperaba, la imagen tomada con el primer prototipo pudo ser reconocida visualmente, pero se concluyó que no contaba con el nivel de iluminación, definición ni contraste para poder ser utilizada en algún diagnóstico (Figura 8.5.a), como referencia se tomó una captura con un microscopio óptico Leica (Figura 8.5.b) para comparar la calidad. La fotografía tomada con el tercer prototipo fue evaluada con los mismos criterios y se dedujo que esta contaba con mejores características, siendo capaz de observarse a detalle partes de las muestras que antes no podían diferenciarse (Figura 8.5.c), haciendo a estas imágenes más que adecuadas para el proceso de digitalización de muestras histológicas. Por último, las fotografías obtenidas con el microscopio de gama alta (Carl Zeiss) fueron revisadas y se obtuvo una mejor evaluación con mejor resultado en campo de visión (Figura 8.5.d). Sin embargo, para poder utilizar este sistema comercial es necesario adaptar etapas electromecánicas que permitan el movimiento para poder hacer el barrido de la muestra, lo cual incrementa el ya de por sí elevado costo de este tipo de microscopios, cuyo precio puede llegar a decenas de miles de dólares (Carl Zeiss, 2019).

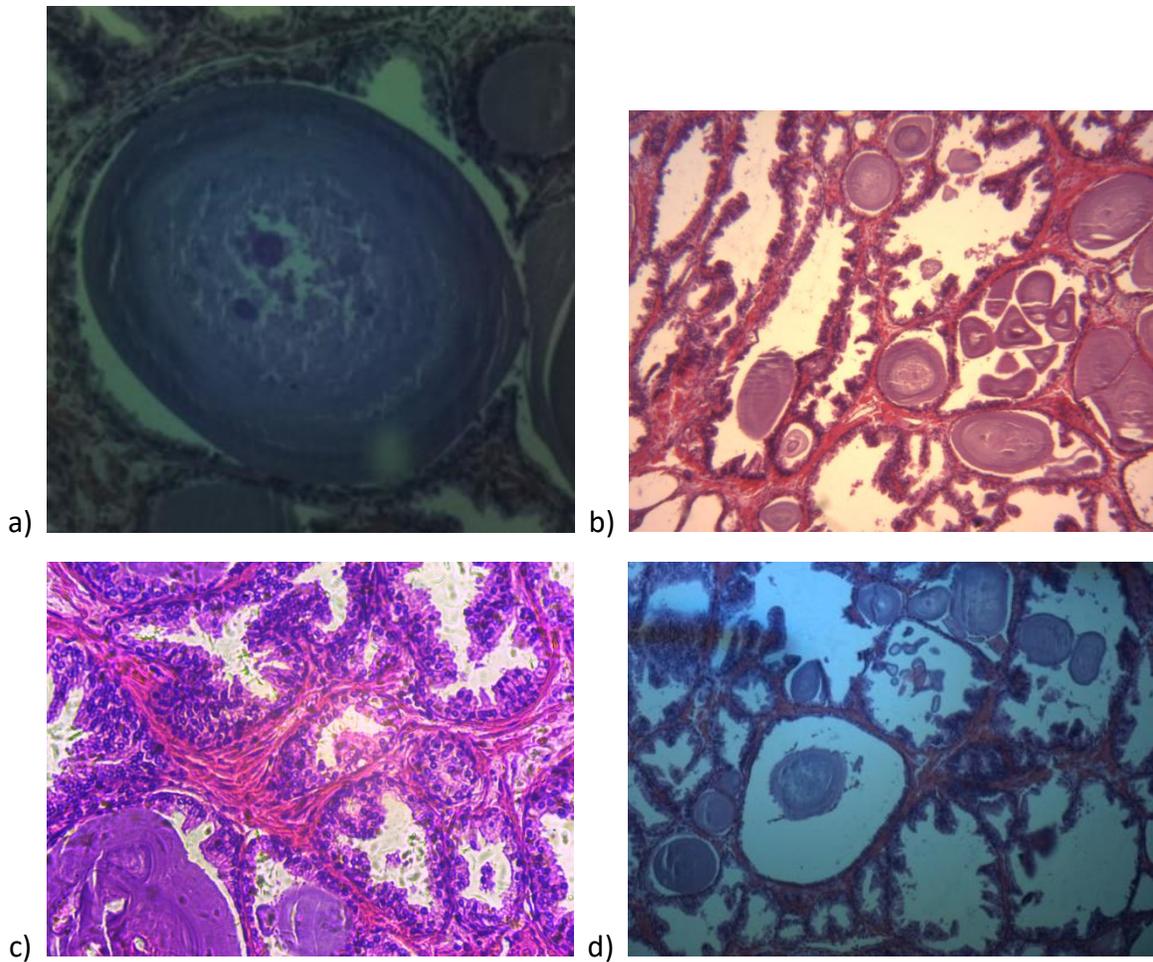


Figura 8.5 Muestra de Hiperplasia de próstata, a) primer prototipo (cámara Raspberry e iluminación de anillo) y aumento 5x, b) imagen de la muestra con un microscopio óptico Leica, aumento de 4x, c) tercer prototipo (sensor TIS e iluminación por transmisión con lente condensadora), aumento 10x, d) microscopio Carl Zeiss, aumento 10x.

8.3.1 Imágenes unidas

Como se mencionó con anterioridad, el propósito de este proyecto era poder enviar una versión digital de la muestra a las personas encargadas de hacer el diagnóstico, por lo que una vez que se tenían imágenes de óptima calidad se procedió a unirlas.

En las Figura 8.6.a-d se tienen las imágenes tomadas a una muestra de hiperplasia de próstata con un objetivo 10x usando el sensor TIS.

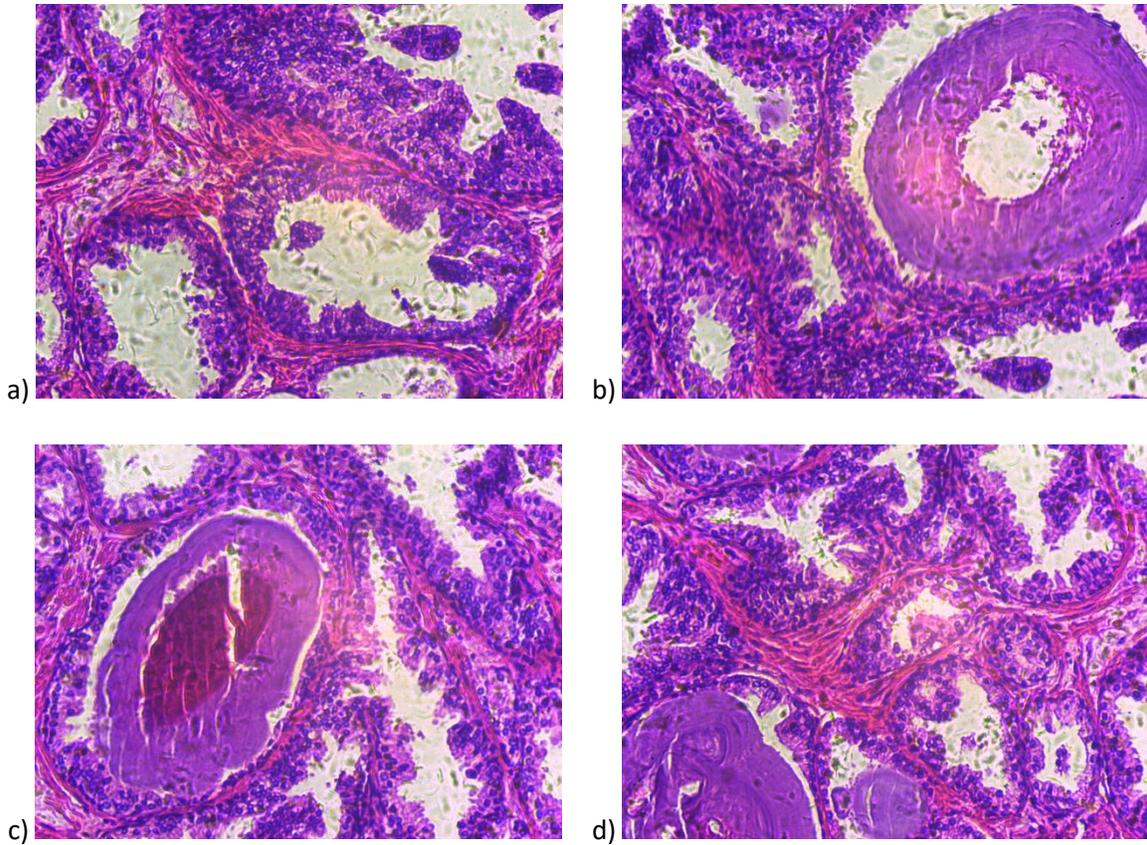


Figura 8.6 a)-d) Fotografías de una muestra de hiperplasia de próstata con un aumento de 10x usando el sensor TIS, las imágenes se tomaron siguiendo el orden: a,b,d,c.

Tomando en cuenta el orden en el que fueron tomadas las imágenes, se ingresaron al software Fiji mencionado en la sección 7.3, se seleccionó la opción “*Grid: snake by rows, Right & Down*” y se procedió a hacer el procesado. El resultado se muestra en la Figura 8.7 y como puede notarse el traslape de las imágenes es casi imperceptible y no existen errores causados por alguna brecha debido a submuestreo.

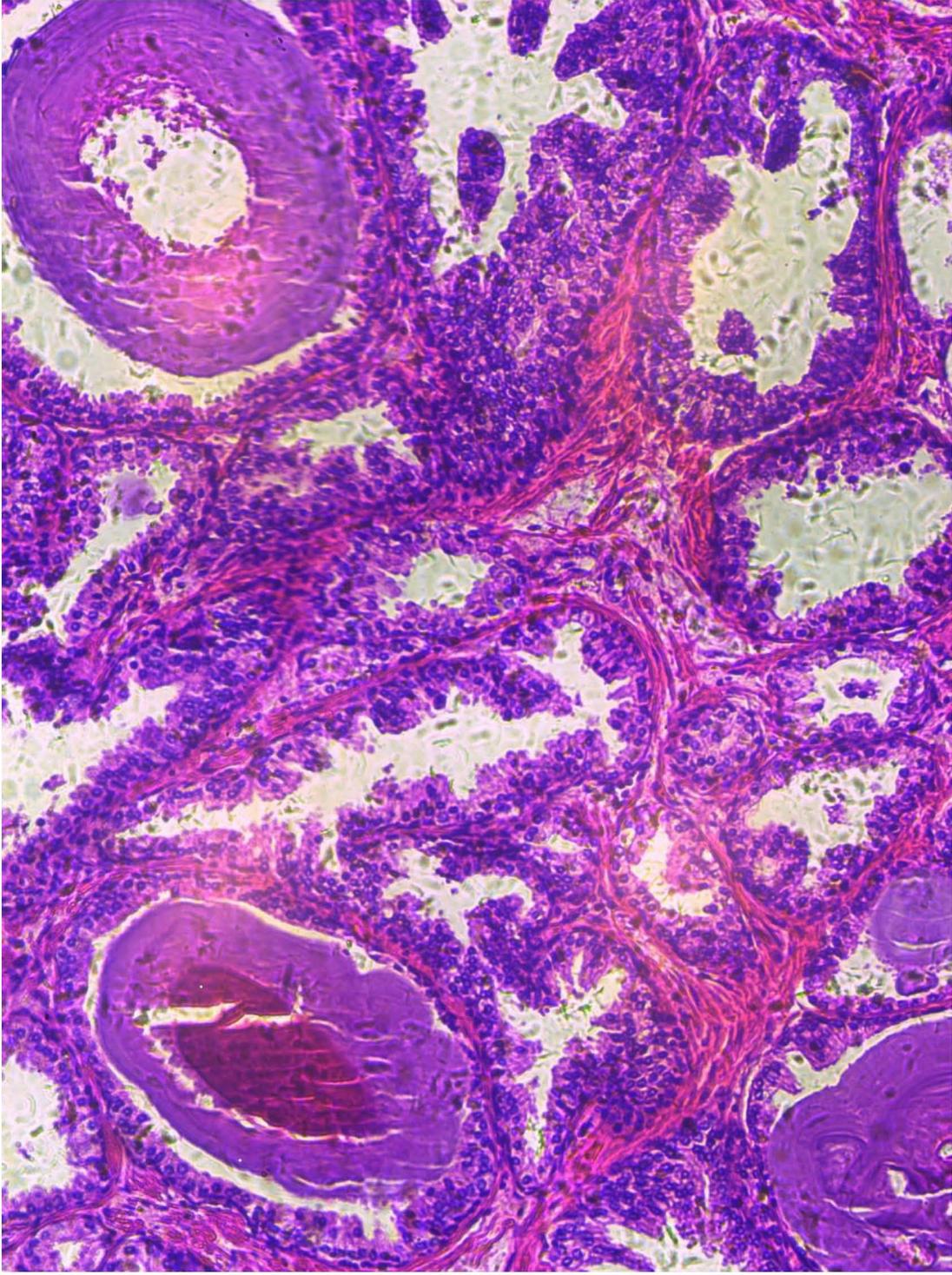


Figura 8.7 Imagen de la versión digital de una sección de muestra de hiperplasia de próstata, con un aumento de 10x usando el sensor TIS.

9 Conclusiones y perspectivas

Se presentan las conclusiones de la presente, a partir de los resultados obtenidos y conforme a los objetivos planteados al inicio de ésta.

- La resolución teórica de los objetivos usados en este proyecto, como la resolución espacial real del sensor de TIS, son suficientes para poder producir imágenes que pueden ser usadas en el diagnóstico clínico-histopatológico.
- El software para controlar el movimiento de las platinas creado en Python fue capaz de crear el patrón de traslación para poder tomar las fotografías necesarias para digitalizar las muestras, con una resolución de paso suficiente para evitar huecos por submuestreo entre las imágenes.
- La fuente de luz usada produce una zona homogénea de iluminación sobre la muestra, que se traslada junto al microscopio, por lo que se aseguran fotos con el mismo nivel lumínico cada vez que se toman.
- Con las imágenes obtenidas al hacer el barrido en XY, y gracias al software de reconstrucción de Fiji, se pudieron crear imágenes que pueden ser analizadas en diagnóstico.
- Las muestras digitalizadas fueron evaluadas por un especialista en histología, quien determinó que cumplían los requisitos de calidad para poder distinguir los aspectos básicos que se estudian en una muestra histopatológica.
- Los componentes y materiales usados en la construcción del microscopio no superaron los \$1000 USD (Apéndice 11.6), manteniendo la calidad de imagen de un microscopio comercial y agregando funciones con las que algunos no cuentan.

Debido a que el diseño final aún está en etapa de prototipo, se propone lo siguiente con el fin de comercializarlo:

- Buscar materiales de construcción que brinden mayor firmeza al sistema para evitar que las vibraciones externas influyan en la toma de imágenes de la muestra.
- Implementar un sistema de enfoque automático con un control similar al usado en el movimiento en el plano XY.
- Crear una interfaz de usuario para un manejo más sencillo, sin necesidad de capacitar a los usuarios que utilicen el microscopio
- Condensar y aislar la etapa electrónica de potencia, para impedir malos manejos por parte de los usuarios, evitando así posibles accidentes.

10 Bibliografía

- ACCO Brands. (2019). *Lampara de escritorio led EL33*. Recuperado el 4 de mayo de 2019, de <https://www.accomexico.com/producto/lampara-de-escritorio-led-el33>
- Boyes, W. (2002). *Instrumentation Reference Book*. Elsevier.
- Carl Zeiss. (6 de junio de 2019). *Upright microscopes*. Obtenido de <https://www.microshop.zeiss.com/index.php?s=140674770ca671b&l=en&p=us&f=e&i=1004>
- Cheng, D. K. (1997). *Fundamentos de electromagnetismo para ingeniería*. Pearson Education.
- Davidson, M. W., & Abramowitz, M. (2002). Optical Microscopy. En J. P. Hornak, *Encyclopedia of Imaging Science and Technology, 2 Volume Set*. John Wiley & Sons.
doi:10.1002/0471443395.img074
- Edmund Optics. (15 de Marzo de 2011). *Imaging Resource Guide*. Recuperado el 20 de enero de 2019, de Understanding Microscopes and Objectives: <https://www.edmundoptics.com/resources/application-notes/microscopy/understanding-microscopes-and-objectives/>
- Ephraim RK, D. E. (2015). Diagnosis of Schistosoma haematobium infection with a mobile phone-mounted Foldscope and a reversed-lens CellScope in Ghana. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 92, 1253-1256.
- Hecht, E. (2015). *Óptica* (Quinta ed.). España: Pearson Educación. Recuperado el 7 de Diciembre de 2018
- Jones, D. (2017). *Documentation for picamera*. Recuperado el 10 de agosto de 2018, de Camera Hardware: <https://picamera.readthedocs.io/en/latest/fov.html>
- Lucky Light Electronics. (15 de diciembre de 2005). *Withe Chip LED Technical Data Sheet*. Obtenido de <https://cdn-shop.adafruit.com/datasheets/LL-S150W-W2-1C.pdf>
- Lucky Light Electronics. (23 de Septiembre de 2008). *White Backlight Displays Technical Data Sheet*. Obtenido de <https://cdn-shop.adafruit.com/datasheets/KWB-R7323W-1W.pdf>
- Lucky Light Electronics. (12 de septiembre de 2017). *HP60MWG 1W Power LED Light Source Technical Data Sheet*. Obtenido de <https://www.luckylight.cn/media/component/data-sheet/HP60MWG.pdf>
- Lundin, M., Lundin, J., & Isola, J. (2004). Virtual Microscopy. *Clinical Pathology*, 1250-1251.
doi:10.1136/jcp.2004.019919
- Malacara-Doblado, D., & Téllez-Quiñones, A. (2017). Microscopes. En D. Malacara-Hernández, & B. J. Thompson, *Fundamentals and Basic Optical Instruments* (Vol. I, pág. 456). CRC Press.

- Recuperado el 05 de 04 de 2019, de <https://www.crcpress.com/Fundamentals-and-Basic-Optical-Instruments/Hernandez/p/book/9781498720748>
- Newark Element 14. (2018). *RPI 8MP CAMERA BOARD*. Obtenido de Raspberry Pi Camera Board, Version 2: <https://www.newark.com/raspberry-pi/rpi-8mp-camera-board/camera-board-8-mps-raspberry-pi/dp/77Y6521?src=raspberrypi>
- OECD. (2017). *Health resources*. Obtenido de Health spending: <https://data.oecd.org/healthres/health-spending.htm>
- Pololu. (31 de mayo de 2019). *MP6500 Stepper Motor Driver Carrier, Digital Current Control*. Obtenido de <https://www.pololu.com/product/2968>
- Pololu. (31 de mayo de 2019). *Stepper Motor: Bipolar, 200 Steps/Rev, 28x45mm, 4.5V, 0.67 A/Phase*. Obtenido de <https://www.pololu.com/product/1206>
- Prats, G. (2005). *Microbiología clínica*. Buenos Aires, Madrid, España: Panamericana. Recuperado el 11 de Abril de 2019
- Raspberry Pi Foundation. (2016). Camera Module. Reino Unido. Obtenido de <https://www.raspberrypi.org/documentation/hardware/camera/>
- Raspberry Pi Foundation. (febrero de 2016). *Raspberry Pi 3 Model B*. Obtenido de <https://www.raspberrypi.org/products/raspberry-pi-3-model-b/>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*(9), 676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Solver, A. J. (2019). *Tabla de valores comerciales de resistencias*. Obtenido de <http://www.aloha2.com.ar/Tincho/Descargas/Electronica/Resistencias.pdf>
- The Imaging Source. (12 de Diciembre de 2018). *DFM 72BUC02-ML*. Obtenido de USB 2.0 color board camera: <https://www.theimagingsource.com/products/board-cameras/usb-2.0-color/dfm72buc02ml/>
- The Imaging Source. (25 de Enero de 2019). *DFM 72BUC02-ML*. Obtenido de Software & Drivers: https://www.theimagingsource.com/products/board-cameras/usb-2.0-color/dfm72buc02ml/#tab_software
- Thorlabs. (2018). *High-Speed Motorized XY Scanning Stages*. Obtenido de https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=5360
- Warren J., S. (2000). *Modern Optical Engineering* (Tercera ed.). Estados Unidos: McGraw-Hill. Recuperado el 4 de octubre de 2018

11 Apéndices

11.1 Análisis de la línea media de las imágenes

```
clear

%Lectura de la imagen
Foto=imread('Imagen.jpg');

%Conversión de la imagen RGB a escala de grises
imagen=rgb2gray(Foto);

%Obtención de las dimensiones de la matriz de la imagen
[x,y]=size(imagen);

%Toma de la línea media de la matriz para su evaluación
linea=double(imagen(floor(x/2),:));

%Reducción del ruido de la línea tomada
linea = wden(linea, 'modwtsqtwolog', 's', 'mln', 4, 'sym4');

%Normalización de los datos
M=max(linea);
lineaN=linea/M;

%Impresión en pantalla de los datos graficados
plot(lineaN)
xlabel('Corte en X')
ylabel('Intensidad normalizada')
ylim([0 1])
xlim([0 y])
```

11.2 Corrección de las imágenes tomadas

```
clearvars
```

```
%Lectura de la imagen a corregir y la referencia  
Referencia=imread('Referencia.jpg');  
Imagen=imread('Imagen.jpg');
```

```
%Se obtiene el tamaño de la matriz de la imagen  
%y se crea una matriz base para la máscara
```

```
[x y z]=size(Imagen);  
Blanco=uint8(ones(x,y,z));  
Valor=max(max(max(Referencia)));  
for i=1:x  
    for j=1:y  
        for k=1:z  
            Blanco(i,j,k)=Valor;  
        end  
    end  
end  
Mascara=Blanco-Referencia;
```

```
%Una vez creada la máscara, se corrige la imagen  
Resultado=Imagen+Mascara;  
image(Resultado)
```

11.3 Evaluación de la uniformidad de las imágenes obtenidas con el sistema

```
clear

%Lectura de la imagen
Imagen=imread('Imagen.jpg');

%Se encuentra el valor máximo de la matriz de la imagen
M=max(max(Imagen));

%Normalización de la matriz
ImagenN=Imagen./M;

%Separación de la matriz en los canales RGB
R=ImagenN(:,:,1);
G=ImagenN(:,:,2);
B=ImagenN(:,:,3);

%Conversión de la imagen a escala de grises
RGB=rgb2gray(ImagenN);

%Impresión en pantalla de las matrices
subplot(2,3,1)
mesh(R),title('R')
subplot(2,3,2)
mesh(G),title('G')
subplot(2,3,3)
mesh(B),title('B')
subplot(2,3,5)
mesh(RGB),title('RGB')
```

11.4 Programa para la toma de imágenes mientras se hace barrido en XY de la muestra

```
from time import sleep
import RPi.GPIO as GPIO
from picamera import PiCamera
from gpiozero import Button

EN=19
DIR=20    #Direction PIN
STEP=21   #Step PIN
DIR_1=14
STEP_1=15
CW=1     #Clockwise rotation
CCW=0    #Counterclockwise rotation
SPR=1600 #Steps per half rotation
pasos=5
flag=1

GPIO.setmode(GPIO.BCM)
GPIO.setup(DIR, GPIO.OUT)
GPIO.setup(STEP, GPIO.OUT)
GPIO.setup(DIR_1, GPIO.OUT)
GPIO.setup(STEP_1, GPIO.OUT)
GPIO.setup(EN, GPIO.OUT)
GPIO.output(DIR, CCW)
GPIO.output(DIR_1, CCW)
camera=PiCamera()
camera.resolution=(400,400)

camera.iso=200
sleep(2)
camera.shutter_speed=camera.exposure_speed
camera.start_preview()

step_count=SPR
delay=0.000250

for i in range(pasos):
    GPIO.output(DIR, CCW)
    for j in range(pasos):
```

```

camera.capture('/home/pi/Pictures/Fotos/Imagenes'+str(i)+'_'+
str(j)+'.jpg')
    for x in range(step_count):
        GPIO.output(STEP, GPIO.HIGH)
        sleep(delay)
        GPIO.output(STEP, GPIO.LOW)
        sleep(delay)
    for y in range(step_count):
        GPIO.output(STEP_1, GPIO.HIGH)
        sleep(delay)
        GPIO.output(STEP_1, GPIO.LOW)
        sleep(delay)
    i=i+1
    GPIO.output(DIR, CW)
    for j in range(pasos):

camera.capture('/home/pi/Pictures/Fotos/Imagenes'+str(i)+'_'+
str(j)+'.jpg')
    for x in range(step_count):
        GPIO.output(STEP, GPIO.HIGH)
        sleep(delay)
        GPIO.output(STEP, GPIO.LOW)
        sleep(delay)
    for y in range(step_count):
        GPIO.output(STEP_1, GPIO.HIGH)
        sleep(delay)
        GPIO.output(STEP_1, GPIO.LOW)
        sleep(delay)
for i in range(2*pasos):
    GPIO.output(DIR_1,CW)
    for y in range(step_count):
        GPIO.output(STEP_1, GPIO.HIGH)
        sleep(delay)
        GPIO.output(STEP_1, GPIO.LOW)
        sleep(delay)

camera.stop_preview()
GPIO.cleanup()

```

11.5 Programa para la obtención de la MTF de un borde

```
clear all
%Lectura de la imagen a evaluar
Imagen=(imread('Reglilla.jpg'));
GScale=rgb2gray(Imagen);

%Impresión en pantalla de la imagen
subplot(2,3,2)
image(GScale)
colormap(gray)
GScale=double(GScale);

%Promedio de 50px del borde
promedio=zeros(512,1);
for i=1:50
    promedio=promedio+GScale(1:512,50+i);
end
promedio=promedio./i;
linea=promedio;
lineaR=double(linea);

%Suavizado del promedio
linea=sgolayfilt(lineaR,1,21);

%Impresión en pantalla de la gráfica del promedio
subplot(2,3,4)
plot(linea)

%Obtención de la LSF del borde
lsf=abs(diff(linea));
lsf(512,1)=0;
lsf=sgolayfilt(lsf,1,3);
lsf=lsf./max(lsf);

%Impresión en pantalla de la LSF
subplot(2,3,5)
plot(lsf)
```

```
%Obtención de la MTF
MTF_ =abs(fft(lsf));
MTFN=MTF_./max(MTF_);
MTFN=MTFN(1:256,1);
x=443.89*(0:255);

%Impresión en pantalla de la MTF
subplot(2,3,6)
plot(x,MTFN)
```

11.6 Costos de los componentes y materiales

| Cantidad | Componente | Número stock | Proveedor | Precio unitario (USD) | Precio Total (USD) |
|-----------------|---|---------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1 | Objetivo 20x DIN | 33-438 | Edmund Optics | 110 | 110 |
| 1 | Anillo adaptador RMS-SM1 | SM1A3 | Thorlabs | 17.1 | 17.1 |
| 1 | Varilla de ensamblaje para jaula 6" (pack de 4) | ER6-P4 | Thorlabs | 32.21 | 32.21 |
| 1 | Jaula con cuerda SM1, 30mm | CP02 | Thorlabs | 16.4 | 16.4 |
| 2 | Jaula sin cuerda, 30mm | CP06 | Thorlabs | 17.1 | 34.2 |
| 1 | Tarjeta de cámara USB 2.0 | DFM 72BUC02-ML | The Imaging Source | 289 | 289 |
| 1 | Lente esférica 12mm Dia. X 9mm FL | 65-986 | Edmund Optics | 50 | 50 |
| 1 | LED ultrabrillante blanco | LED-W5MD5-UB-H120 | AG Electrónica | 0.53 | 0.53 |
| 2 | Platina de traslación lineal | MPT125X-50L | MPositioning | 112.1 | 224.22 |
| 2 | Motor a pasos bipolar, 200 pasos/rev, 28x45mm | 1206 | Pololu Robotics & Electronics | 19.95 | 39.90 |
| Total | | | | | 813.56³ |

³ Precios actualizados al 31 de julio de 2019, sin incluir gastos de envío ni impuestos de importación.