



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

*Desarrollo de un microscopio óptico digital
miniaturizado*

Tesis que presenta:

Samuel Bernardo Tristán Landín

para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en:

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de Tesis:

Dr. José Luis García Cordero

Apodaca, Nuevo León, México.

Noviembre 2017

No me siento obligado a creer que el mismo Dios que nos ha dotado de los sentidos, la razón y el intelecto, ha intentado que renunciemos a su uso.

— Galileo Galilei

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer inicialmente a mi asesor, el Dr. José Luis García Cordero por la confianza que depositó en mí para la realización de este proyecto, así como por la ayuda y los consejos que recibí de su parte. Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría, así como a la Agencia Espacial Mexicana (AEM) por permitirme ser parte de este proyecto y al CINVESTAV por permitirme ser parte de su comunidad.

A mis compañeros y ahora amigos del laboratorio BioARTS por sus consejos y ayuda, en especial a Alan González, Rocío Jiménez y Oriana Chávez, que me apoyaron, aconsejaron, explicaron y enseñaron diversas cosas durante todo este tiempo. Así también, agradezco a la Dra. Brenda Villalobos por su apoyo en la clarificación de los conceptos de óptica y a mi compañero Pablo Guevara por sus recomendaciones de electrónica.

A mi familia, que a pesar de la distancia siempre tuvieron palabras de aliento y que en ningún momento dejaron de creer en mí aun cuando varias veces yo llegué a hacerlo, en especial a mis padres, Ofelia y Samuel y a mis hermanos José Julio y Diego Sebastián, que simple y sencillamente siempre apuestan por mí.

A mis amigos en San Luis Potosí: Katy, Alicia, Luis, Rocío, Omar, Hugo, Oscar, Alex, Kemp y Natalia por los ánimos, las porras y las palabras de aliento.

A mi querida Pamela, mi pilar y mi apoyo durante mi último año de maestría, sin ella simplemente no podría haber logrado esto.

A Dios, por darme la fuerza para siempre salir adelante y dar lo mejor de mí.

In Memoriam

Prof. José Samuel Tristán Ruiz y Doña María del Refugio González de Tristán.

Mis queridos abuelos y mentores,
si no fuera por ellos, yo no estaría donde estoy hoy.
Siempre fieles, desde aquí en la tierra hasta el cielo, gracias.

Dedico este trabajo a mis abuelos: Don Bernardo Landín de la Mora y Doña
María de Jesús de la Mora Olivares, quienes son la inspiración que me hizo
buscar la obtención de este grado.

Per aspera ad astra

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción	1
1.1	Microscopía	1
1.1.1	Microscopio óptico	2
1.1.1.1	Formación de imágenes	2
1.1.1.2	Formación de imágenes en un microscopio	11
1.1.2	Microscopía de Fluorescencia	14
1.1.3	Formación de imágenes en un microscopio óptico digital	16
2	Estado del arte del microscopio miniaturizado	21
3	Planteamiento del problema	33
4	Hipótesis	35
5	Objetivos	35
5.1	Objetivo general	35
5.2	Objetivos específicos	35
6	Metodología y Materiales	37
6.1	Diseño y fabricación de prototipo	37
6.2	Fase de adaptación óptica	37
6.2.1	Diseño óptico	37
6.2.1.1	Cálculo de la apertura numérica (NA)	40
6.2.1.2	Cálculo de la resolución y el aumento del sistema	40
6.2.1.3	Cálculo de la formación de la imagen para diseño de objetivo	42
6.2.1.4	Selección de LEDs y filtros para fluorescencia	43
6.3	Fase de adaptación mecatrónica	45
6.3.1	Diseño de objetivo y posicionamiento del sensor	45
6.3.2	Diseño Electrónico	50
6.3.2.1	Diseño de controlador de LEDs	50
6.3.3	Programación de software	54
6.3.3.1	Selección de plataforma computacional de desarrollo	54

6.3.3.2	Interfaz gráfica de usuario (GUI) para control de cámara y LED's.	54
6.4	Fase de fabricación y ensamble	56
6.5	Fase de pruebas de funcionamiento y caracterización	58
6.5.1	Obtención de imágenes de fluorescencia: caracterización y análisis	59
6.6	Observación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)	61
7	Resultados y discusión	63
7.1	Resultados de la obtención de imágenes de campo claro	63
7.2	Resultados de análisis de resolución y aumento del sistema	65
7.3	Resultados del análisis de las imágenes de fluorescencia	69
7.4	Resultados de la obtención de la función de dispersión de punto	82
7.5	Observación de células en el microscopio miniatura	86
7.6	Resultados de experimento de formación de NETs	87
8	Conclusiones	93
9	Perspectivas	95
10	Referencias	97
A	Apéndice A: Código de Python para GUI	105
B	Apéndice B: Funcionamiento de la cámara Raspnerry Pi	145
C	Apéndice C: Neutrófilos y trampas extracelulares	151
D	Apéndice D: Código de MATLAB para mapas de calor	153
E	Apéndice E: Análisis de resolución y aumento del sistema	165
F	Apéndice F: Obtención de la función de dispersión de punto (PSF)	167

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Inicios de la microscopía	2
Figura 2	Espectro Electromagnético	3
Figura 3	Aproximación de rayo	4
Figura 4	Ley de Snell para la refracción	5
Figura 5	Formación de imágenes con lentes.	6
Figura 6	Formación de imagen en una lente delgada	9
Figura 7	Formación de la imagen en un microscopio compuesto . . .	11
Figura 8	Consideraciones para el cálculo de la apertura numérica . .	12
Figura 9	Desplazamiento de Stokes	14
Figura 10	Diagrama de Jablonsky.	15
Figura 11	Funcionamiento de un microscopio óptico de fluorescencia.	16
Figura 12	Efecto del tamaño de pixel en una imagen.	18
Figura 13	Efecto del aumento cuando se tiene un pixel de tamaño fijo.	19
Figura 14	Foldscope	21
Figura 15	Microscopio portátil	22
Figura 16	CellScope	23
Figura 17	Microscopio en teléfono celular	24
Figura 18	Microscopio en teléfono celular con lentes invertidas	25
Figura 19	Lentes fabricadas con PDMS	26
Figura 20	OpenLab Microscope	27
Figura 21	Microscopio flexible	28
Figura 22	OpenScope	29
Figura 23	Microscopio miniatura de bajo costo	30
Figura 24	Microscopio miniatura para estudios <i>in vivo</i>	31
Figura 25	Microscopio de epi-luminiscencia miniaturizado	31
Figura 26	Cámara CMOS para Raspberry Pi, V2	38
Figura 27	Ejemplo de sistema óptico de microlentes	39

Figura 28	Configuración propuesta para observación en campo claro del microscopio	43
Figura 29	Espectros de excitación y emisión de Fluoresceína, Hoechst 33342 y Rodamina	44
Figura 30	Configuración propuesta para observación en campo de fluorescencia del microscopio	45
Figura 31	Diseño de la carcasa de la cámara seleccionada para ser modificada	46
Figura 32	Diseño de la pieza objetivo.	47
Figura 33	Diseño y dimensiones del deslizador de filtros.	48
Figura 34	Diseño y medidas de la platina.	49
Figura 35	Diseño y medidas de la tapa con soporte para LEDs.	50
Figura 36	Circuito de control de LED.	51
Figura 37	Diseño de carcasa para protección de tarjeta controladora de LEDs.	53
Figura 38	Esquema de interfaz.	55
Figura 39	Interfaz gráfica de usuario final.	55
Figura 40	Piezas de microscopio en explosión.	57
Figura 41	Fotografía del microscopio ensamblado.	58
Figura 42	Diseños y medidas de piezas para caracterización de ángulo de iluminación	59
Figura 43	Imagen obtenida con el prototipo con iluminación concéntrica y sistema de microlentes invertido de la cámara	63
Figura 44	Uniformidad del fondo en campo claro.	64
Figura 45	Observación con microscopio miniatura de BioARTS de patrón USAF 1951.	66
Figura 46	Observación con microscopio Zeiss Axio de patrón USAF 1951.	67
Figura 47	Observación en campo claro de perlas de 1 μm de diámetro.	68
Figura 48	Prueba de canal de fluorescencia azul	70
Figura 49	Comparación de la intensidad de las perlas fluorescente azules para el ángulo de iluminación de excitación de 0°	71

Figura 50	Prueba de canal de fluorescencia verde	72
Figura 51	Comparación de la intensidad de las perlas fluorescente verdes	73
Figura 52	Prueba de canal de fluorescencia roja	73
Figura 53	Comparación de la intensidad de las perlas fluorescente rojas	74
Figura 54	Ejemplos del cambio de fluorescencia para fluoróforo con iluminación de excitación a 0°	75
Figura 55	Análisis de la uniformidad y contribuciones en canales digitales de la cámara para 3 fluorescencias características . .	76
Figura 56	Ejemplos del cambio de fluorescencia para fluoróforo con iluminación de excitación a 22.5°	78
Figura 57	Análisis de la uniformidad y contribuciones en canales digitales de la cámara para 3 fluorescencias características . .	79
Figura 58	Ejemplos del cambio de fluorescencia para fluoróforo con iluminación de excitación a 45°	80
Figura 59	Análisis de la uniformidad y contribuciones en canales digitales de la cámara para 3 fluorescencias características . .	81
Figura 60	Función de dispersión de punto para perlas	83
Figura 61	PSF de los perfiles promediados de las perlas	85
Figura 62	Observación de diferentes células en campo claro y fluorescencia	86
Figura 63	Experimento de monitoreo de formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)	88
Figura 64	Resultados del análisis de intensidad de fluorescencia neta de las trampas extracelulares de neutrófilos.	90
Figura B.1	Funcionamiento de obturador de rolado (<i>rolling shutter</i>). . .	146
Figura B.2	Histogramas ejemplo con control de brillo y contraste	148
Figura B.3	Balance de blancos en Cámara Raspberri Pi V2	150
Figura E.1	Patrón de resolución USAF 1951.	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Indices de refracción	5
Tabla 1.2	Convención de signos para superficies refractantes	7
Tabla 1.3	Configuración de imagen.	10
Tabla 1.4	Ejemplos de aperturas numéricas con sus respectivas resoluciones calculadas	13
Tabla 6.1	Características medidas del sistema de microlentes.	39
Tabla 6.2	Características de la cámara Raspberry Pi V2	40
Tabla 6.3	Resoluciones ópticas, de muestreo y aumento mínimos . . .	41
Tabla 6.4	Resoluciones ópticas, de muestreo y aumento mínimos . . .	44
Tabla 6.5	Parámetros de fabricación de piezas en impresora 3D.	56
Tabla 6.6	Parámetros de fresadora CNC para fabricación de tarjetas PCB.	57

ACRÓNIMOS

ADN ácido desoxirribonucleico

CCD Charged Coupled Device

CMOS Complementary Metal-Oxide Semiconductor

FITC Fluorescein Isotiocyanate

FWHM Full Width at Half Maximum

GUI Graphic User Interface

LED Light Emitting Diode

NET Neutrophil Extracellular Trap

PDMS Polydimethylsiloxane

PLA Polylactic acid

PSF Point Spread Function

ROI Region of Interest

USAF United States Air Force

UV Ultravioleta

RESUMEN

El microscopio óptico ha sido una de las herramientas principales para la investigación biológica y médica desde el siglo XVII. Como instrumento, es de un tamaño considerable y no siempre accesible para los investigadores o para aplicaciones que requieren una herramienta de análisis pequeña. Un microscopio portátil miniaturizado podría ayudar a explorar nuevas aplicaciones de microscopía. La principal aportación de este trabajo es la creación de un microscopio del tamaño de un vaso y que permite realizar experimentos de biología, como el análisis de células individuales o el diagnóstico de enfermedades. En este trabajo se presenta el diseño y la caracterización de un prototipo de microscopio óptico de fluorescencia digital en miniatura, cuyas piezas están fabricadas en una impresora 3D y se ensamblan de forma fácil. Cuatro LED controlados con una unidad electrónica personalizada se utilizan para la observación en campo claro y 3 canales de fluorescencia diferentes. Las imágenes son capturadas con un sensor CMOS con un campo de visión de aproximadamente 0.207 mm^2 . Estas características del microscopio permitieron el monitoreo de la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) en un dispositivo con micropozos. Debido a sus capacidades similares a un microscopio comercial, este prototipo tiene el potencial de ser utilizado como una herramienta general de investigación biológica y médica.

ABSTRACT

The light microscope has been one of the main tools for biological and medical research since the XVII century. As a tool, it is of considerable size and not always accessible for researchers, or for applications that require a portable and small analysis tool. A miniaturized portable microscope could aid in the exploration of new applications of microscopy. The main contribution of this work is the creation of a microscope the size of a cup that is used in biological and medical applications, such as single cell analysis or diseases diagnostics. In this work, the design and characterization of a miniaturized digital fluorescence optical microscope prototype is presented, whose pieces are manufactured with a 3D printer and can be assembled easily. Four LEDs, controlled with a custom-made electronic drive, are used for the observation in bright field and in 3 different fluorescence channels. Images are captured with a CMOS sensor with a field of view of 0.207 mm^2 . These features allowed the monitoring of neutrophil extracellular traps (NET's) formation in a device with microwells. Due to its similar capabilities as a commercial microscope, this prototype has the potential to be used as a general biological and medical research tool.

INTRODUCCIÓN

1.1 MICROSCOPIA

La microscopía es la técnica que permite observar y estudiar a detalle objetos que por la magnitud de su tamaño no son visibles al ojo humano y precisa de un instrumento para amplificar su tamaño real: el microscopio. Su significado proviene de la palabra griega: *mikros*, que significa pequeño y de la palabra latina *scopium*, que significa observación [1].

El primer microscopio reportado en el año 1590 se atribuye a los hermanos Jansen y consistía en un tubo con lentes (**Figura 1a**). Por su parte, en 1609 Galileo Galilei desarrolla una versión inicial de un microscopio compuesto (**Figura 1b**) [2]. Fue en ese mismo siglo, cuando Anton Van Leeuwenhoek y Robert Hooke, cada uno de manera individual, iniciaron el uso del microscopio como una herramienta científica. Por ejemplo, Hooke realizó observaciones de varios organismos usando un microscopio compuesto (**Figura 1c**) [3] y fue quien acuñó el término célula, que se sigue utilizando hoy en día para describir aquellos “elementos” que conforman a cualquier ser vivo. Leeuwenhoek hizo uso de lentes esféricas sencillas (**Figura 1d**), logrando obtener diferentes aumentos y pudo observar con más detalle diversos especímenes como huesos, nervios, músculos y microorganismos, convirtiéndose así en el pionero en este tipo de observaciones y haciendo del microscopio una herramienta indispensable para las ciencias biológicas.

Los avances en el estudio de la óptica han permitido fundamentar las bases de la microscopía en la actualidad. Hoy en día, la integración de la tecnología electrónica, la fotografía y el cómputo proveen a la microscopía la capacidad almacenamiento de imágenes para procesamiento, mejora y análisis posteriores a su observación [3].



Figura 1. Inicios de la microscopía. a) Primer microscopio compuesto que se atribuye a Jansen. b) El microscopio de Galileo Galilei. c) Microscopio compuesto de Hooke, con él se realizó la primera observación de células. d) Microscopio de Leeuwenhoek, con él se realizaron las primeras observaciones de microorganismos. Imágenes obtenidas de [4, 5, 6, 7]

1.1.1 *Microscopio óptico*

Los microscopios ópticos son ampliamente utilizados en el campo de la biología, ya que permiten la observación de especímenes in vivo. El microscopio óptico se puede dividir en dos categorías de acuerdo a su número de lentes: microscopio simple y microscopio compuesto, siendo el primero el conformado por una sola lente y el segundo conformado por más de una [8].

1.1.1.1 *Formación de imágenes*

Para poder estudiar los microscopios es necesario entender cómo se forman las imágenes. Los conceptos por entender son:

- Luz
- Aproximación de rayo.
- Refracción

- Lentes
- Imagen real
- Imagen virtual
- Aumento

El espectro electromagnético **Figura 2** muestra un gran rango de longitudes de onda y frecuencias, siendo el espectro visible al ojo humano aquel que se encuentra en la banda desde los 400 nm (radiación UV-luz azul) hasta los 700 nm (luz roja-infrarroja).

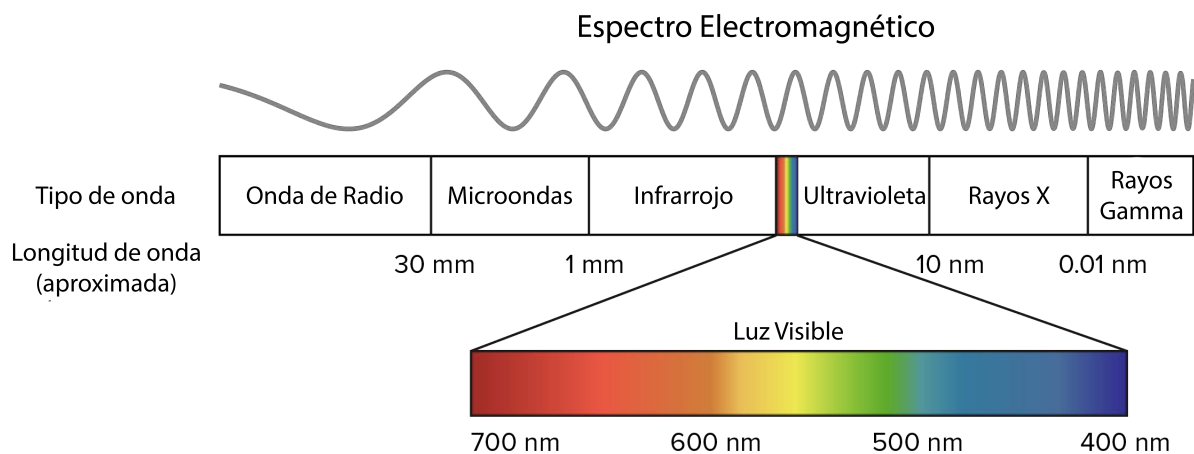


Figura 2. Espectro Electromagnético. El espectro electromagnético correspondiente a la luz visible se localiza desde aproximadamente 400 nm hasta los 700 nm de longitud de onda, luz UV y luz roja-infrarroja respectivamente. La mayoría de las aplicaciones ópticas se realizan en esta banda del espectro. Imagen obtenida, modificada y traducida de [9]

En el campo de la óptica geométrica se estudia la propagación de la luz y se asume que viaja en una sola dirección en línea recta. Esta consideración se hace cuando la luz viaja a través de un medio uniforme hasta que se encuentre con otro medio que cambie su dirección. Esto es conocido como la aproximación de rayo y se puede observar en la **Figura 3**.

La aproximación del rayo permite comprender el fenómeno de la refracción. Este fenómeno ocurre cuando la dirección de un rayo de luz viaja en un determinado medio y, al entrar en contacto con un medio diferente, cambia de dirección y velocidad [8]. En este cambio de dirección influye una propiedad del material

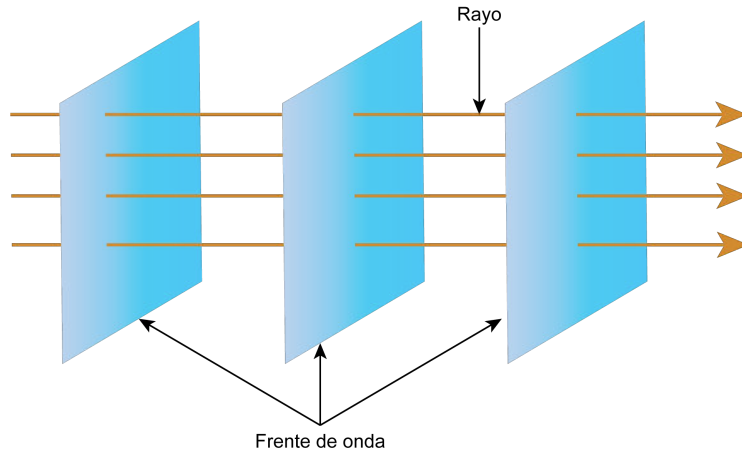


Figura 3. Aproximación de rayo. Se considera a la luz como un rayo, ya que los rayos siempre estarán viajando en la dirección en la que ésta se propague, perpendicular a su frente de onda.

conocida como índice de refracción, denotado por la letra n . Este número es importante en el diseño óptico, ya que permite seleccionar materiales para diseñar un sistema óptico. En la tabla 1.1 se dan a conocer índices de refracción de algunos materiales.

Para describir la refracción de la luz se utiliza la Ley de Snell. Esta ley permite conocer el ángulo de refracción relacionándolo con el ángulo de incidencia de la luz y los índices de refracción de los medios en los que se propaga. Se representa con la ecuación 1.1:

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2), \quad (1.1)$$

donde θ_1 es el ángulo de incidencia del rayo de luz, θ_2 el ángulo de refracción de la luz, n_1 el índice de refracción del medio en el que viaja el rayo, y n_2 el índice de refracción del medio con el que se produce el cambio de dirección, tal y como se muestra en la Figura 4.

Considerando que los rayos de luz provienen del infinito, se forma un ángulo pequeño debido a que los rayos llegan en forma casi paralela al eje óptico. Esta situación permite hacer la aproximación de ángulos pequeños, dejando a la ecuación 1.1 simplificada como en la ecuación 1.2.

$$n_1 \theta_1 = n_2 \theta_2 \quad (1.2)$$

Tabla 1.1. Índices de refracción. Obtenida de [10]

MATERIAL	ÍNDICE DE REFRACCIÓN
Vacío	1
Aire	1.000293
Helio	1.000036
Hidrógeno	1.000132
Benceno	1.501
Etanol	1.361
Agua	1.330
Diamante	2.417
Ámbar	1.55
Vidrio	1.458
BK7 (Borosilicato)	1.52

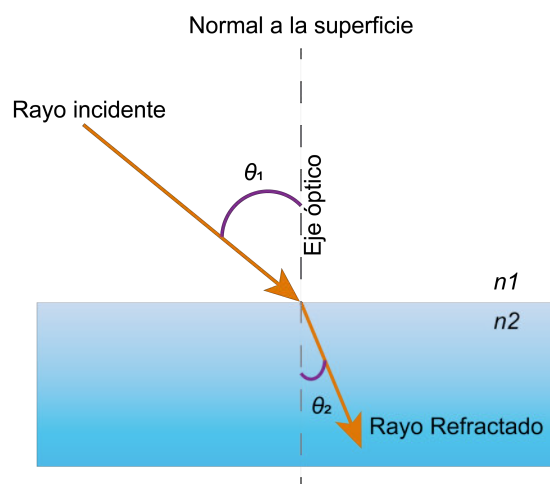


Figura 4. Ley de Snell para la refracción, con ella se describe el cambio en la dirección y velocidad de la luz cuando viaja a través de diferentes medios, siendo n_1 el índice de refracción del primer medio en el que viaja la luz, n_2 el índice de refracción del material a través del cual se propaga la luz después del cambio de dirección, θ_1 el ángulo de incidencia de la luz y θ_2 el ángulo de salida.

La refracción de la luz puede formar una imagen, que es la reproducción aparente de un objeto. Comúnmente, para producir este fenómeno se utiliza una lente, la cual es un dispositivo refractor que consta de dos superficies curvadas y re-

configura la distribución de la luz, es decir, enfoca o dispersa los rayos de luz. La ecuación 1.3 se describe como la relación de un objeto y su imagen formada por una superficie refractante:

$$\frac{n_1}{s_o} + \frac{n_2}{s_f} = \frac{n_2 - n_1}{R}, \quad (1.3)$$

donde n_1 es el índice de refracción del medio en el cual se encuentra sumergida la lente, n_2 es el índice de refracción de la lente, s_o la posición del objeto frente al lente y medido desde la superficie de éste, s_f la posición de la imagen y R el radio de la superficie refractante. La Figura 5a describe este fenómeno.

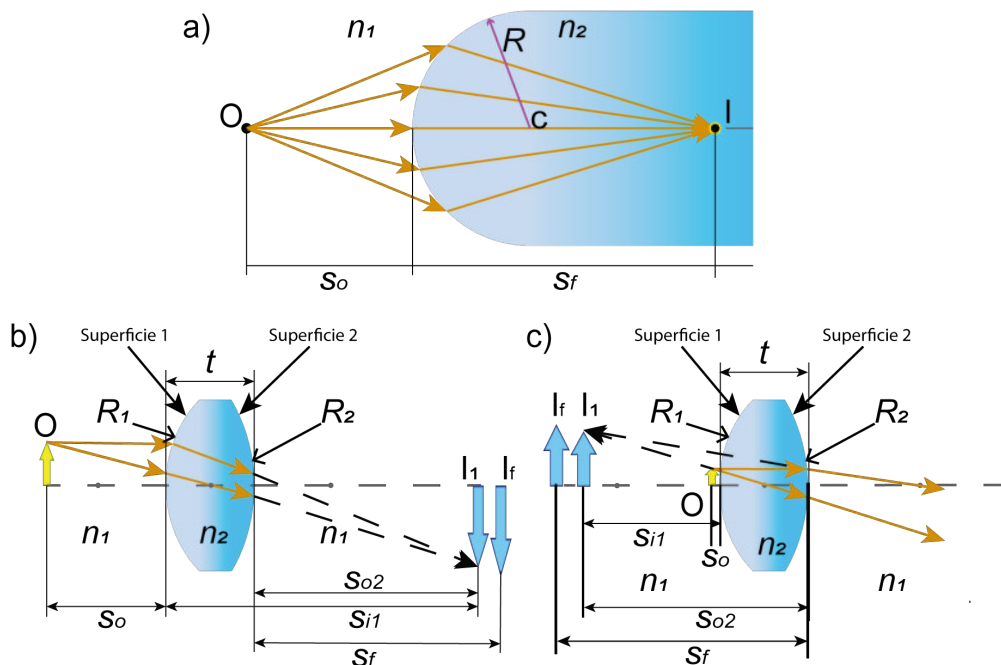


Figura 5. Formación de imágenes con lentes. Formación de imagen usando una superficie esférica refractante. El objeto O es colocado frente a la superficie esférica con radio R y centro c . Los rayos de luz provenientes del objeto O viajan a través del material para formar una imagen I . b) Convención de generación de una imagen real. Ésta siempre se localizará del lado opuesto al objeto. c) Convención de generación de una imagen virtual. Ésta siempre se localizará frente a la lente y no podrá ser proyectada en sensores, conociendo únicamente su punto de aparente convergencia. Imagen inspirada en los diagramas de [8].

Existen dos tipos de imágenes. Una es la imagen real (**Figura 5b**), que es la imagen formada en el plano de convergencia de los rayos de luz, es decir, donde se enfocan los rayos del lado contrario del objeto. Si se colocase una pantalla o sensor en este punto se podría captar la imagen. La segunda es la imagen virtual

Tabla 1.2. Convención de signos para superficies refractantes. Adaptada de [8]

CANTIDAD	POSITIVA CUANDO...	NEGATIVA CUANDO...
Posición del objeto	El objeto está frente a la lente (Objeto Real)	El objeto está detrás de la lente (Objeto virtual)
Posición de la imagen	La imagen está detrás de la lente (Imagen Real)	La imagen está frente a la lente (Imagen Virtual)
Altura del objeto	Cuando está erguida	Cuando está invertida

(Figura 5c), una imagen formada debido a la divergencia de los rayos de luz de un objeto y debido a esto, no se puede captar en una pantalla, pero se puede localizar en el punto aparente de divergencia, es decir, del mismo lado que el objeto.

La convención de signos que se sigue para conocer si la imagen es virtual o real se resume en la tabla 1.2.

Si se desea analizar la formación de una imagen por efecto de una lente, se debe tomar en cuenta que el rayo de luz se refractará al momento de entrar en contacto con la primera superficie. Se analizarán ambas superficies por separado. La formación de la imagen para la primera superficie está dictada por la ecuación 1.3, considerando que la lente está rodeado de aire, n_1 es igual a 1 (Tabla 1.1). Así mismo, si se considera únicamente el radio de la primera superficie, se obtiene la ecuación 1.4:

$$\frac{1}{s_0} + \frac{n}{s_{i1}} = \frac{n_1}{R_1}, \quad (1.4)$$

donde s_{i1} es la imagen formada con respecto a la primera superficie. Si este valor es positivo, la imagen será real, si es negativo la imagen será virtual. Considerando el primer caso, la imagen formada por la primera superficie fungirá como objeto para la segunda superficie (s_{o2}). Tomando en cuenta el grosor de la lente (t) y la

Figura 5b, s_{o2} estará determinada por la ecuación 1.5 y, al ser s_{i1} positivo, s_{o2} se considera un objeto virtual.

$$s_{o2} = t - s_{i1} \quad (1.5)$$

Para conocer dónde se forma la imagen con respecto a la segunda superficie, es decir, la imagen final (s_f), se toma nuevamente en cuenta la ecuación 1.3, sustituyendo s_o por s_{o2} , n_1 por n , debido a que se considera que los rayos que se acercan a la segunda superficie están en el material que conforma a la lente, y n_2 por 1 ya que la imagen se formaría fuera de la lente [8], dando como resultado la ecuación 1.6.

$$\frac{n}{s_{o2}} + \frac{1}{s_f} = \frac{1-n}{R_2} \quad (1.6)$$

Si se considera un grosor muy pequeño en relación con los radios de las superficies [8], se tendría el caso de una lente delgada, por lo tanto t se aproxima a 0 y provoca que s_{o2} sea igual a $-s_{i1}$, lo que simplifica la ecuación 1.6 en la ecuación 1.7.

$$\frac{-n}{s_{i1}} + \frac{1}{s_f} = \frac{1-n}{R_2} \quad (1.7)$$

Al sumar las ecuaciones 1.4 y 1.6, se obtiene la ecuación 1.8 que establece la relación entre un objeto y su imagen formada por una lente delgada.

$$\frac{1}{s_o} + \frac{1}{s_i} = (n-1)\left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2}\right) \quad (1.8)$$

Si se considera que la posición del objeto está en el infinito ($s_o \rightarrow \infty$), ocurrirá que los rayos de luz provenientes de él se refractaran y formarán la imagen en un punto cuya posición desde la lente es conocida como distancia focal (f), por tanto $s_f = f$, dando como resultado la ecuación conocida como “del fabricante de lentes” [8, 11], mostrada en la ecuación 1.9.

$$\frac{1}{f} = (n-1)\left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2}\right) \quad (1.9)$$

Al igualar las ecuaciones 1.7 y 1.8, se obtiene la ecuación 1.10, conocida como la ecuación de las "lentes delgadas". Esta ecuación puede ser usada para relacionar la distancia de la posición de un objeto con la distancia de la posición de su imagen formada por una lente delgada.

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{s_o} + \frac{1}{s_f} \quad (1.10)$$

Para poder conocer la localización de la imagen de un objeto se hace un diagrama de rayos, que es una forma gráfica de localizar la imagen. La forma de realizarlo consiste en considerar un punto del objeto, comúnmente su altura. Desde aquí se traza una línea recta paralela al eje óptico que cambia de dirección al momento de pasar a través de la lente en dirección al foco trasero de ésta. Después desde la misma altura se traza una imagen que pasará por el foco delantero de la lente y cambiará de dirección cuando pasa a través de la lente, emergiendo de manera paralela al eje óptico hasta encontrarse con la primera línea. En el punto donde se intersecan estas líneas es donde se forma la imagen. Para corroborar dicho punto basta con trazar una línea recta que salga de la altura del objeto y pase a través del centro de la lente, tal y como se muestra en la **figura 6** [8].

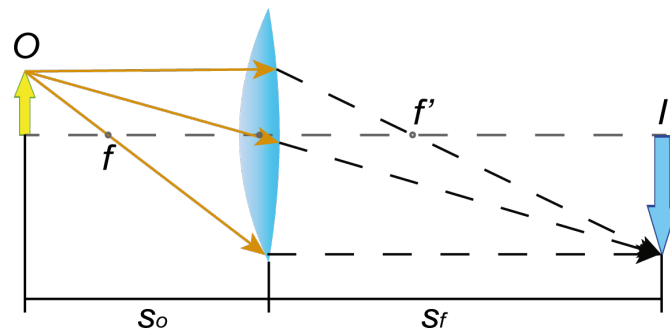


Figura 6. Formación de imagen en una lente delgada. En esta figura se puede observar el método geométrico de la localización de la imagen, siendo O la posición del objeto, s_o la distancia entre el objeto y la lente, f el punto focal frontal de la lente, f' el punto focal trasero de la lente, s_f , la distancia entre la imagen y la lente e I, el punto dónde se forma la imagen. Imagen inspirada en los diagramas de [8]

El aparente cambio de tamaño de la imagen con respecto al tamaño del objeto es un fenómeno conocido como aumento. Esta característica es de las más impor-

tantes de los microscopios, pues indica cuán grande se puede observar la muestra. El aumento se representa con la letra M y estaría dado por la ecuación 1.11 [8]:

$$M = -\frac{s_f}{s_o}, \quad (1.11)$$

donde s_f denota la posición de formación de la imagen y s_o la posición del objeto. El signo indica la orientación de la imagen. Si es negativo, la imagen es real e invertida, si es positivo, la imagen es virtual y erguida.

Una única lente delgada rodeada de aire trabaja como una lupa, es decir, una lente que sirve para observar el tamaño amplificado de los objetos. En este caso se considera la ecuación 1.9. Si se despeja s_f , se obtiene la ecuación 1.12 y, si ésta se divide entre s_o se obtiene la ecuación 1.13.

$$s_f = \frac{fs_o}{f - s_o} \quad (1.12)$$

$$M = \frac{f}{f - s_o} \quad (1.13)$$

Considerando la ecuación 1.13, la posición del objeto determinaría la posición, orientación y tamaño aparente de la imagen. Gracias a esta ecuación, se pueden considerar diversos casos de la formación de una imagen como se resume en la tabla 1.3 [12].

Tabla 1.3. Configuración de imagen [8].

LOCALIZACIÓN	TIPO	ORIENTACIÓN	TAMAÑO
$\infty > s_o > 2f$	Real	Invertida	Reducida
$s_o = 2f$	Real	Invertida	Igual
$2f > s_o > f$	Real	Invertida	Amplificada
$s_o = f$	Inexistente	—	—
$s_o < f$	Virtual	Erguida	Amplificada

1.1.1.2 Formación de imágenes en un microscopio

El microscopio óptico trabaja bajo el principio de la refracción. Si se examina el caso del microscopio simple (aquel que tiene una sola lente), se tiene el caso de una lupa. Si se considera una lente delgada, basta con aplicar las fórmulas 1.9 y 1.10 para conocer su distancia focal y donde se formaría una imagen. Las cosas cambian un poco en el microscopio compuesto, el cual es llamado de esa manera por estar conformado por dos lentes: el objetivo (que se encarga de aumentar la imagen) y el ocular (que permite la visualización de la imagen al observador). En la **Figura 7** se puede observar la formación de la imagen en un microscopio compuesto.

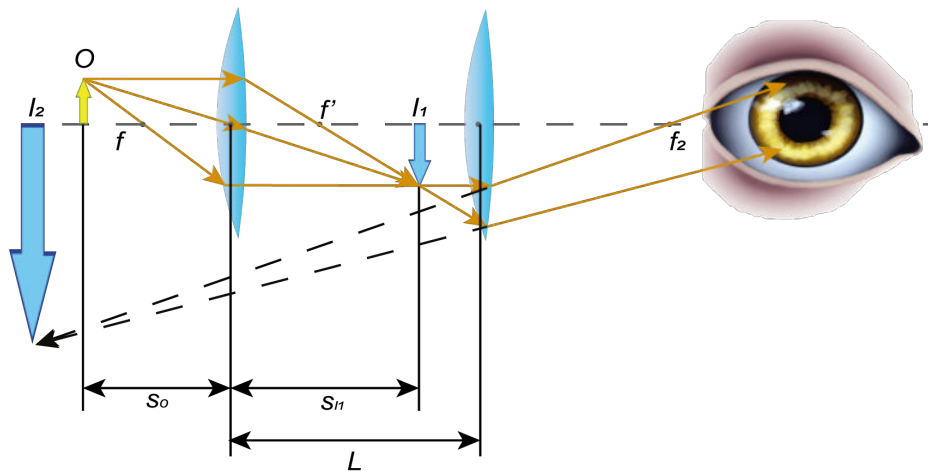


Figura 7. Formación de la imagen en un microscopio compuesto, siendo O el punto donde se encuentra el objeto, s_o , su distancia desde el objetivo, f , el punto focal frontal del objetivo, f' el punto focal trasero de la lente, s_{i1} la imagen formada por el objetivo, I_1 , el punto donde se forma la imagen, L la distancia entre objetivo y ocular, s_f la distancia entre la lente y la imagen final e I_2 el punto donde se forma la Imagen. Figura inspirada en los diagramas de [8]

En el microscopio compuesto, su primera lente ejerce la función de crear una imagen ampliada del objeto O. Dicha imagen funge como objeto real para la segunda lente, encargada de formar la imagen final, la cual será virtual y aumentada. Esta imagen es formada en el punto mínimo de observación del ojo humano, situado a 25 cm del ojo [8], pero hay que recordar la figura 5c para entender que dicho punto, en este caso, es de aparente convergencia. El hecho de que el ojo observe una imagen virtual se debe al proceso que realiza el mismo ojo, conocido como acomodación [13], en el cual los músculos ciliares se contraen o relajan para

cambiar la forma del cristalino (que es la lente del ojo) de manera que se enfoquen los rayos de luz hacia la retina. En el microscopio óptico, su calidad se determina por parámetros como la apertura numérica (NA), la resolución óptica (r) y el aumento (M). La apertura numérica es un número adimensional que caracteriza cuanta luz puede recolectar la lente acorde a cierto rango de ángulos y juega un papel importante en determinar el poder de resolución del microscopio. Cuanto más grande es este valor, mayor será la capacidad de la lente de resolver detalles [14]. En la **figura 8**, se pueden observar las consideraciones necesarias para el cálculo de la apertura numérica.

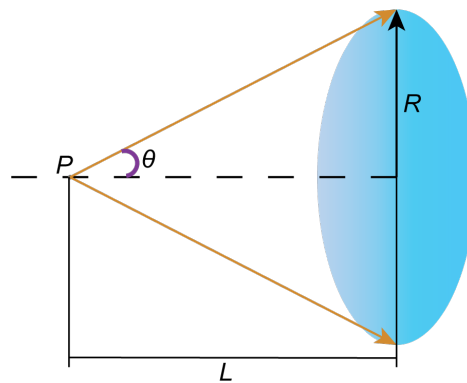


Figura 8. Consideraciones para el cálculo de la apertura numérica, siendo P un punto desde dónde sale un cono de luz, R el radio de la lente y L, la distancia entre la lente y el punto y θ el ángulo entre el foco y el radio de la lente.

Si se considera una lente delgada y se conoce la localización de su foco, se puede tomar este punto como referencia para conocer el ángulo que se forma entre el foco y el radio de la lente. Utilizando la ecuación 1.14, se puede conocer la apertura numérica denotada por NA:

$$NA = n \sin(\theta), \quad (1.14)$$

donde n el índice de refracción de la lente y θ el ángulo descrito en la figura anterior. La resolución óptica determina cuál es la menor distancia entre dos objetos que un observador o una cámara puede distinguir como objetos separados [15]. Aunque existen diferentes criterios para determinar la resolución (Abbe, Sparrow, Rayleigh, etc.) todos son aproximaciones matemáticas de las mismas propiedades

físicas [14], siendo el criterio de Abbe el común referente en microscopía, descrito por la ecuación 1.15:

$$r = \frac{\lambda}{2NA}, \quad (1.15)$$

donde r es resolución, λ es la longitud de onda a observar y NA la apertura numérica determinada por la lente utilizada. En la tabla 1.4 se proporcionan algunos ejemplos de las resoluciones que se pueden obtener con diferentes aperturas numéricas.

Tabla 1.4. Ejemplos de aperturas numéricas con sus respectivas resoluciones calculadas para 550 nm. [14]

NA	0.30	0.60	0.90	1.30	1.40
r (μm)	0.83	0.42	0.28	0.19	0.18

El aumento, descrito anteriormente por las ecuaciones 1.10 y 1.11, juega un papel importante en la microscopía, pero debe ser considerado un parámetro secundario, pues su valor óptimo dependerá de la NA y del observador. Cada objetivo tendrá una resolución mínima definida por su apertura numérica (recordando el criterio de Abbe), y el hecho de amplificar la imagen no es un sinónimo de que se obtendrá más información de ésta. Por ejemplo, si con un objetivo se observasen dos objetos separados $0,8\mu\text{m}$ como su límite resoluble, por más que se aumentase la imagen no se lograría observar que esos dos objetos se separan más allá del límite resoluble. De esta manera, el microscopio óptico permite observar objetos de tamaño muy pequeño con gran detalle, aunque con sus limitaciones ópticas definidas por: la calidad de las lentes, el mínimo resoluble de un objetivo o la longitud de onda utilizada, pues algunas no son visibles para el ser humano. Con el objetivo de obtener mejores resoluciones, la fuente de luz debe ser sustituida por una que proporcione una longitud de onda mucho menor que la longitud de onda ultravioleta para ser detectadas con sensores [16]. Estas limitaciones han llevado a buscar diferentes metodologías para mejorar las capacidades de detección de un microscopio óptico.

1.1.2 Microscopía de Fluorescencia

En la búsqueda de mejorar las observaciones biológicas se ha hecho uso de las moléculas fluorescentes. En las últimas décadas, los bioquímicos se han encargado de desarrollar estos colorantes que han permitido observar los diversos componentes de un sistema biológico (i.e. organelos celulares, tejidos, proteínas, etc.) [17]. A estos colorantes se les conoce como fluoróforos o fluorocromos y reaccionan a diferentes longitudes de onda. *A grosso modo*, la fluorescencia es el fenómeno luminiscente en el cual una sustancia es excitada con cierta longitud de onda de luz y emite luz en una longitud de onda mayor en comparación con la que excitó a la sustancia. En 1843, Gabriel Stokes acuñó el término fluorescencia al realizar observaciones del cambio en la luminiscencia de fluoruro de calcio (CaF_2) utilizando filtros hechos con diferentes sustancias para excitarla y poder observar el cambio a simple vista [18]. A esta diferencia entre la luz de excitación y la luz de emisión se le conoce como desplazamiento de Stokes, descrito en la **Figura 9**.

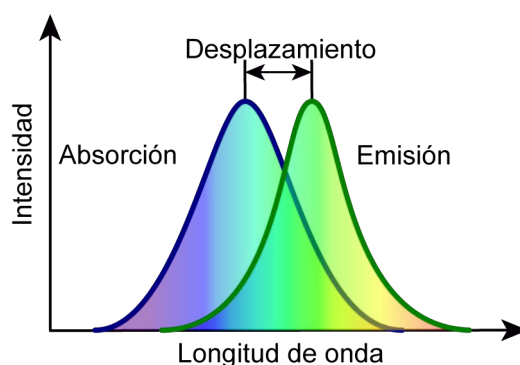


Figura 9. Desplazamiento de Stokes. Esta gráfica permite conocer la diferencia entre el máximo de la banda de longitud de onda de excitación o absorción y de emisión de la fluorescencia, la cual es una característica inherente distintiva de cualquier sustancia fluorescente.

Este cambio en la luminiscencia puede ser explicado gracias al diagrama de Jablonski, (**figura 10**) que ilustra el proceso de absorción y emisión de la luz por una molécula. Si se considera una molécula fluorescente, sus electrones elevarán su energía pasando a un estado de excitación al absorber los fotones que los excitan. Estos electrones pierden energía debido a vibraciones en la molécula. Debido a esta pérdida, en el momento en que los electrones regresan a su estado basal emiten luz de una longitud de onda mayor.

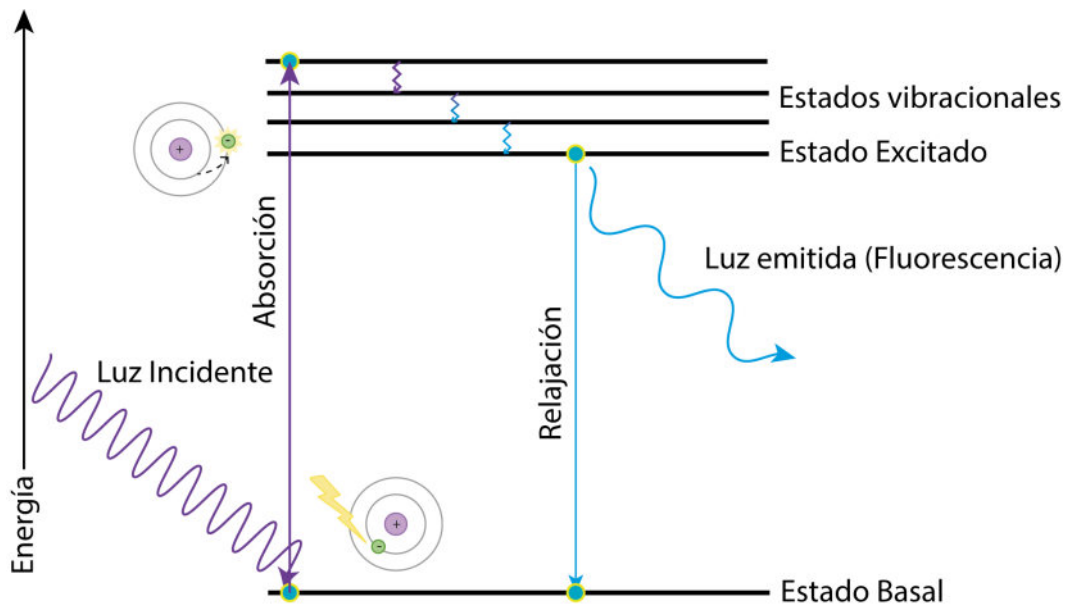


Figura 10. Diagrama de Jablonsky para la fluorescencia, simplificado. Este diagrama permite entender de manera simple las transiciones electrónicas en los orbitales de la molécula fluorescente al momento de ser excitadas con luz de una longitud de onda determinada. Imagen inspirada en [19].

El uso del microscopio de fluorescencia se popularizó con la introducción de la inmunofluorescencia, que añade la especificidad y sensibilidad de las uniones de los anticuerpos a los fluorocromos [18]. El uso de filtros de colores y espejos dicróicos que permiten observar una longitud de onda de interés han hecho del microscopio de fluorescencia una herramienta de gran utilidad para los biólogos. En la **figura 11** se puede observar la configuración básica de un microscopio invertido de epifluorescencia. Al tener una fuente de luz blanca, se le coloca un filtro, conocido como de excitación, el cual tiene la función de dejar pasar una banda de longitudes de onda cercanas al pico de absorción del fluoróforo. La luz filtrada viaja hacia un espejo dicróico colocado generalmente a 45° para ser reflejada hacia la muestra a través del objetivo del microscopio. La muestra emite luz y ésta regresa a través del objetivo al espejo dicróico que ahora funge como un filtro que refleja los colores que interfieren con la observación y deja pasar únicamente las longitudes de onda de interés. Después, la luz viaja a través del sistema óptico al ocular o hacia una cámara.

En la **figura 11** se aprecia que la observación de la fluorescencia puede realizarla el observador o bien un cámara. Las cámaras permiten adquirir imágenes y almacenarlas para un análisis posterior. En microscopía es importante conocer cómo

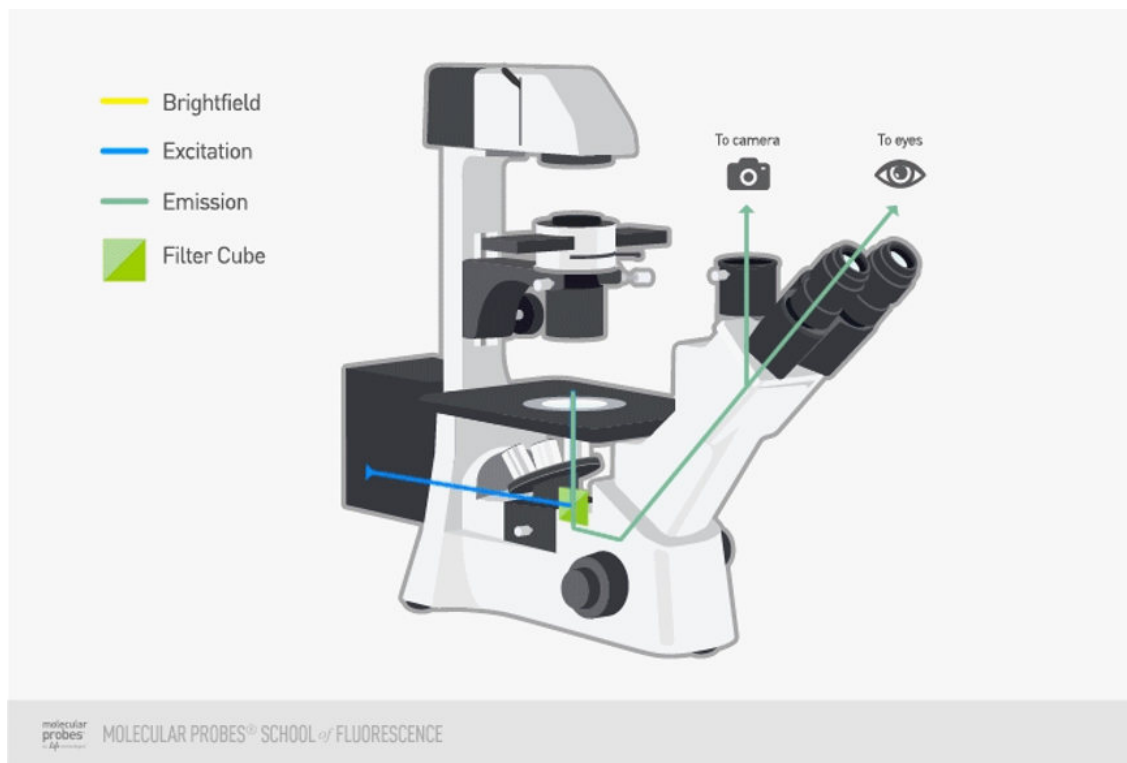


Figura 11. Funcionamiento de un microscopio óptico de fluorescencia. Desde una fuente de luz, usualmente una lámpara de mercurio, se filtra la luz con la longitud de onda de excitación requerida, ésta a su vez es redirigida hacia la muestra con un espejo dicróico. La luz emitida viaja a través del mismo camino y el espejo funciona ahora como un filtro de emisión, permitiendo el paso únicamente la fluorescencia. Imagen obtenida de [20].

ocurre el acoplamiento entre la cámara y el sistema óptico del microscopio pues esto ayuda a la calibración del mismo y a obtener una buena calidad de imagen.

1.1.3 Formación de imágenes en un microscopio óptico digital

El microscopio óptico digital trabaja bajo los mismos principios ópticos de formación de imagen. Si se considera un microscopio compuesto, su diferencia con el digital es la sustitución del ocular por una cámara digital y para entender su funcionamiento, es necesario conocer cómo se forman las imágenes digitales. La generación de imágenes digitales es un proceso que consiste en proyectar información 3D en un plano 2D. El plano 2D suele ser un sensor, que puede ser un sensor CCD (Charged Coupled Device, traducción Dispositivo de carga acoplada) o un sensor CMOS (*Complementary Metal-Oxide Semiconductor*, traducción Semiconductor Complementario de Óxido Metálico), siendo la principal diferencia entre am-

bos la manera en cómo procesan la imagen y detectan la luz. En ambos casos se tienen dos etapas: la adquisición de la señal lumínica y la digitalización. Ambos tienen celdas de fotodiodos llamadas pixeles, los cuales detectan fotones para ser transducidos en un voltaje cuyo valor es proporcional al número de fotones detectados [21]. El sensor CCD convierte las cargas de fotodiodos y condensadores que lo conforman, en voltajes, y entrega una señal analógica en la salida que es digitalizada posteriormente. En el sensor CMOS, la digitalización se hace de manera integrada, es decir, que el voltaje generado por la luz incidente en el fotodiodo es amplificado y digitalizado en el mismo chip [22].

Tanto en el caso de la cámara digital como del microscopio digital, son las lentes las encargadas de enfocar la luz y generar la imagen sobre el sensor. La resolución óptica, el aumento y el tamaño de pixel ayudaran a la generación de la imagen. Usualmente, cuando se habla de la resolución de la imagen se hace mencionando la cantidad de pixeles. Si bien es cierto que a mayor cantidad de pixeles la imagen será más detallada, esta resolución no debe ser confundida con la resolución óptica y debe considerarse más como la densidad de pixeles en el sensor. Estos elementos son los que se encargan de la digitalización, proceso con el que se reconstruye la imagen formada por las lentes a partir de la obtención de muestras de la misma.

Al momento de trabajar con imágenes microscópicas, se tiene como limitante la resolución óptica del microscopio, que es la mínima distancia entre dos objetos que permite distinguirlos como separados. Si en la imagen digital se quiere seguir observando esos dos objetos como separados, entonces, una buena aproximación es que se recolecten como mínimo 2 elementos de esa mínima distancia o resolución. Esto es conocido como la resolución de muestreo (r_s) [14]. Esta característica, en conjunto con el aumento, permiten conocer el tamaño de pixel necesario para muestrear una imagen. Esto se describe con la ecuación 1.16 [14]:

$$P = Mr_s, \tag{1.16}$$

donde P es el tamaño de pixel, r_s la resolución de muestreo y M el aumento.

En la **Figura 12** se puede observar un ejemplo de lo anteriormente descrito. Si se tiene que dos objetos están separados $0.5 \mu\text{m}$ el uno del otro y se colocan frente a una lente que genera una imagen con aumento de $20\times$, la distancia de $0.5 \mu\text{m}$ tendría un tamaño aparente en la imagen de $10 \mu\text{m}$. Si se quiere generar una imagen digital de dicha distancia, usando la ecuación 1.16, el pixel del sensor debe medir $5 \mu\text{m}$ como mínimo para poder muestrear la distancia entre ambos objetos.

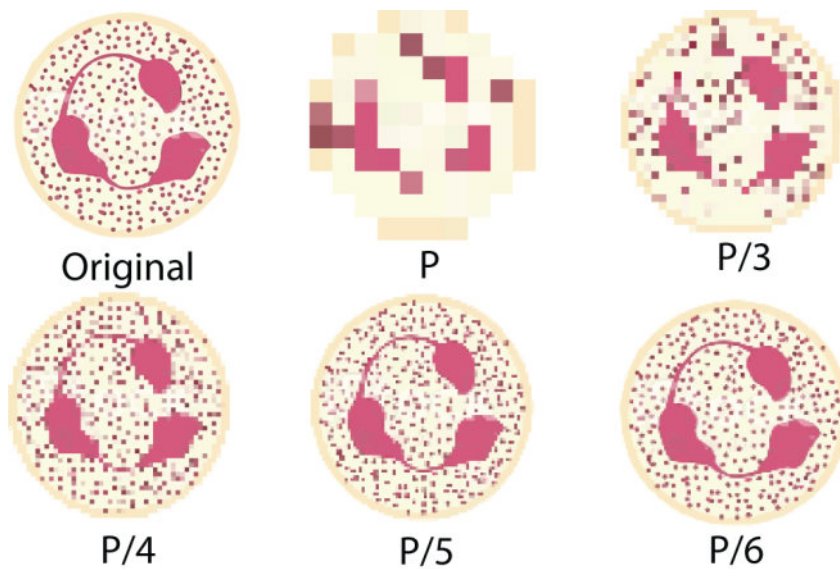


Figura 12. Efecto del tamaño de pixel en una imagen. Al momento de capturar una imagen, tanto el aumento como la cantidad de píxeles del sensor juegan un papel importante en la digitalización. Si se tiene un aumento fijo, se puede variar el tamaño del pixel. Conforme se disminuye el tamaño de pixel, se puede muestrear la imagen y se obtiene una reconstrucción más fiel.

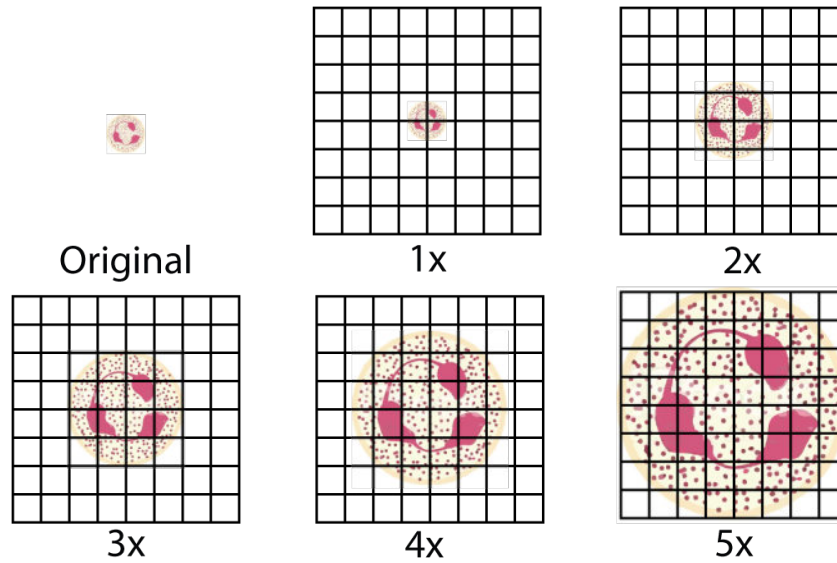


Figura 13. Efecto del aumento cuando se tiene un pixel de tamaño fijo. Si se tiene un tamaño de pixel fijo se debe encontrar un aumento adecuado para muestrear la imagen. Si los objetos en la imagen son más pequeños que el pixel, no se muestrearán adecuadamente. Al incrementar el aumento se puede muestrear más información, pero estará delimitada por la resolución del objetivo del microscopio.

El tamaño de pixel del sensor no puede modificarse fácilmente, por tanto, la estimación mencionada permite poder escoger un sensor con tamaño de pixel adecuado para obtener la imagen. También permite escoger el aumento de un objetivo para un muestreo óptimo, como se aprecia en la **figura 13**.

Otro de los aspectos que se debe considerar es el campo de visión que tendrá la imagen. El campo de visión indica cuánta área de una escena se puede observar y en el caso de las imágenes digitales está determinado por el aumento y el tamaño del sensor. Al conocer estos parámetros se puede tener una estimación del campo de visión. Basta con obtener el producto del número de elementos a lo largo y ancho del sensor por el tamaño de pixel, para posteriormente ser dividido entre el aumento del sistema óptico.

ESTADO DEL ARTE DEL MICROSCOPIO MINIATURIZADO

Actualmente, los microscopios han comenzado a dejar de ser piezas voluminosas de escritorio y han pasado a las palmas de las manos de los científicos gracias al desarrollo tecnológico digital de los últimos años. Esto ha permitido que los microscopios puedan ser utilizados como herramientas educativas o bien como herramientas de diagnóstico *Point-of-Care (POC)*.

Uno de los ejemplos de microscopios miniaturizados es el desarrollado por Parash y colaboradores que crearon el *Foldscope* en 2014: un microscopio de papel combinando principios ópticos y origami, lo suficientemente pequeño como para caber en un bolsillo y con capacidad de observación en campo claro y fluorescencia [23]. Este microscopio provee de poca funcionalidad al ser diseñado para aplicaciones educativas específicas. Es resistente a caídas y daño físico. El dispositivo e imágenes obtenidas de este microscopio se muestran en la **figura 14a** y **14b**, respectivamente.

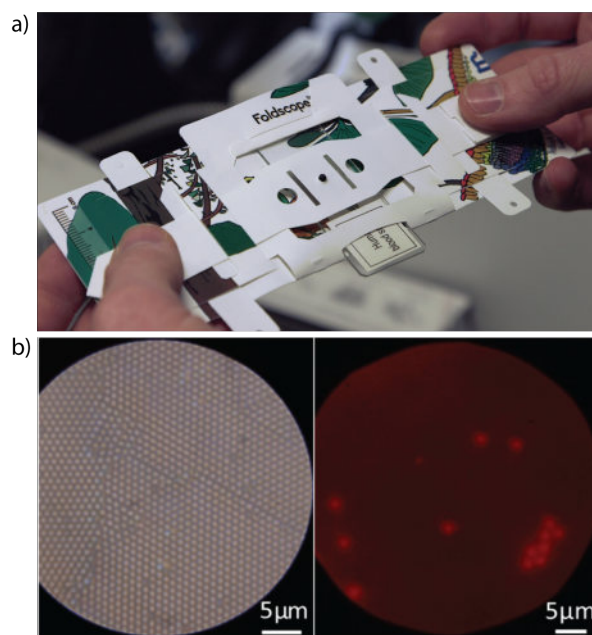


Figura 14. *Foldscope* a) Diseño de foldscope, fabricado con papel e inspirado en el origami. b) resultados de imágenes de campo claro y fluorescencia obtenidos con el dispositivo. Muestra: Perlas fluorescentes. Imágenes obtenidas de [23]

Siguiendo la tendencia del diagnóstico POC, diversos equipos como el de Miller *et al* desarrollaron un microscopio óptico digital de fluorescencia para ser utilizado en zonas de bajos recursos con el fin de apoyar en el diagnóstico *in situ* de tuberculosis. Este microscopio consistía en una plataforma mecánica de plástico con la configuración usual de un microscopio invertido de fluorescencia, como se observa en la **figura 15a** . Para la funcionalidad de campo claro utilizaban una linterna de luz blanca mientras que para el modo de fluorescencia se utilizaban filtros de excitación para la longitud de onda deseada [24]. Las imágenes obtenidas por este microscopio en campo de fluorescencia se muestran en las **figuras 15b**. Las ventajas de este microscopio es que es portátil y se alimenta con baterías, sin embargo, solo tiene capacidad de observar el campo de fluorescencia verde y precisa del uso de objetivos comerciales, los cuales pueden llegar a ser muy costosos.

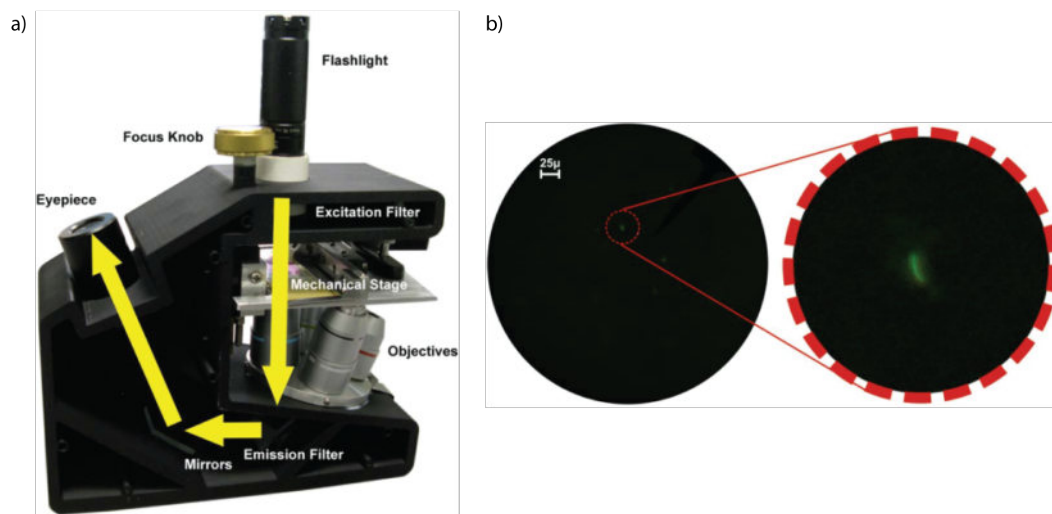


Figura 15. Microscopio Portátil. a) Diseño y configuración óptica del microscopio portátil de Miller *et al*. b) Resultado de imagen de fluorescencia capturada con el microscopio. Se puede observar que abarca un gran campo de visión, pero carece de una buena resolución y aumento. Muestra observada: *M. Tuberculosis* . Imágenes obtenidas de [24]

Con la finalidad de proporcionar ubicuidad a la microscopía, otros grupos de investigación han decidido aprovechar los teléfonos inteligentes, diseñando y fabricando aditamentos que les puedan ser colocados. En 2011, Chang y colaboradores desarrollaron un microscopio óptico digital al que llamaron *CellScope* [25], en el cual utilizan un teléfono inteligente como sensor, como se muestra en la fi-

gura 16a. En cuanto a su sistema óptico, éste es sencillo ya que utiliza la misma configuración de un microscopio compuesto con oculares y objetivos comerciales. Basta con colocar un teléfono celular frente al ocular para realizar la observación. Las imágenes obtenidas por este microscopio en campo claro y fluorescencia se muestran en las **figuras 16b** y **16c**, respectivamente. Para su análisis utilizan algoritmos de morfología (tales como la transformada de sombrero de copa y pareo de patrones (*template matching*)), que permiten establecer una región de interés (ROI) que se asemeja al tamaño típico de la bacteria, detectándola por discriminación morfológica [25].

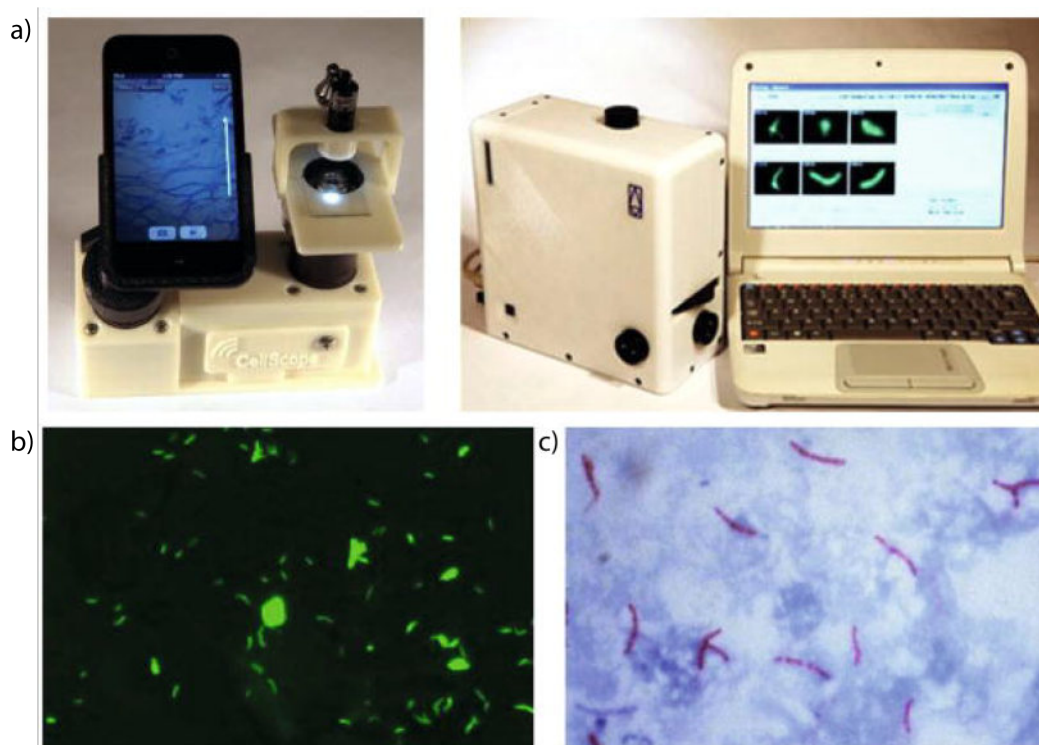


Figura 16. *CellScope*. Configuración de campo claro y fluorescencia del microscopio desarrollado por Chang et al. b) Resultado de las imágenes de *M. Tuberculosis* observadas en fluorescencia. c) Resultado de las imágenes de *M. M. Tuberculosis* observadas en campo claro y con tinción de Gram. Imágenes obtenidas de [25].

También en 2011, Smith y colaboradores [26] presentaron una plataforma para observación microscópica basada en un teléfono celular orientada a aplicaciones educativas y biomédicas. Su trabajo consistía en colocar una lente de bola de 1 mm de diámetro adherido al frente de la cámara de un teléfono celular para obtener imágenes microscópicas. Su plataforma funcionaba también como espectrómetro [26]. El sistema implementado por este equipo, así el tipo de imagen obtenida se

muestran en la **figura 17a** y **17b**, respectivamente. Su principal desventaja es que las imágenes presentan distorsiones y no tiene la capacidad de utilizar fluorescencia.

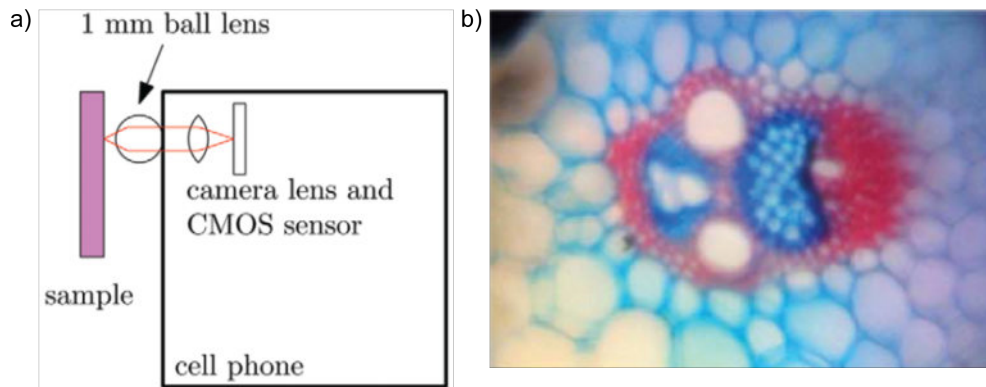


Figura 17. *Microscopio en teléfono celular.* a) Diagrama de configuración de sistema óptico de microscopio en teléfono celular. b) Imagen resultado de campo claro de microscopio en teléfono celular. Pueden observarse las distorsiones existentes en las orillas de la imagen. Muestra observada: Tallos de planta. Imágenes tomadas de [26].

Por su parte, el equipo de Switz y colaboradores, optó por el uso de los teléfonos inteligentes y los sistemas ópticos contenidos en ellos. Este tipo de sistemas ópticos, conocidos como “de foco fijo”, contienen microlentes diseñados y corregidos para funcionar como una cámara DSLR (Digital Single Lens Reflex, trad. Reflex de lente única, digital), cuya función es disminuir la imagen de un objeto observado y proyectarla en el sensor CMOS del teléfono. Al invertir el sistema óptico de microlentes, se obtiene el efecto contrario: una ampliación de la imagen. En su trabajo hacen uso de esta manipulación y colocan la lente frente a la apertura de la cámara del teléfono a una distancia de 1 mm, permitiéndoles obtener imágenes con un aumento equivalente a 56x y una resolución de $3.4 \mu\text{m}$ [27]. En la **figura 18a** se muestran el dispositivo y en la **figura 18b** una imagen obtenida con ese sistema. Las desventajas de utilizar este instrumento es que no hay una precisión correcta en la colocación de las lentes, lo que provoca distorsiones en la imagen, además de que el espacio reducido entre los dos sistemas ópticos no permite utilizar una configuración para realizar observaciones de fluorescencia.

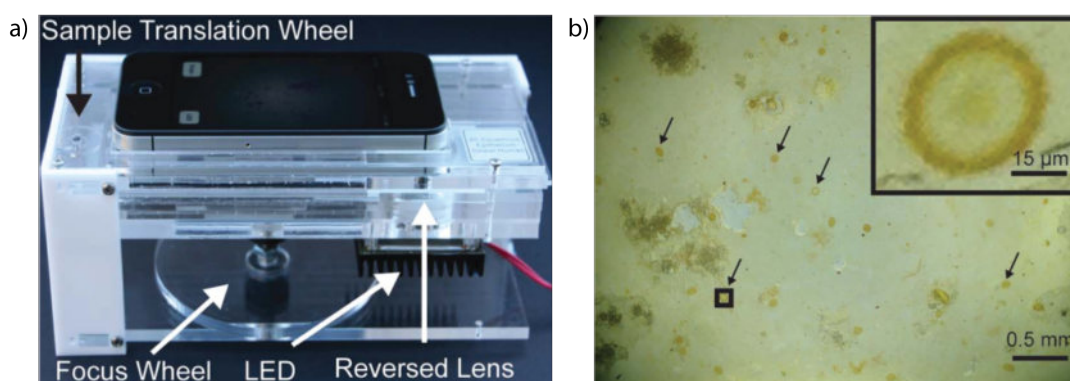


Figura 18. *Microscopio en teléfono celular con lentes invertidas.* a) Configuración de plataforma para microscopía con teléfonos celular y lentes invertidas. b) Imagen obtenida con la configuración mostrada en a), muestra observada: *A. Lumbricoides*. Imágenes obtenidas de [27].

En el caso de desarrollar aditamentos para usar las cámaras de teléfonos digitales como microscopios, otros equipos de investigación han optado por fabricar sus propios sistemas ópticos. Un ejemplo es el equipo de Sung y colaboradores, que fabricaron y caracterizaron lentes de polidimetilsiloxano (PDMS). Las lentes fueron utilizadas en microscopía óptica *in situ* con teléfonos celulares. La manera como desarrollaron las lentes fue con la inyección de gotas de PDMS sobre una superficie caliente para acelerar el curado de la sustancia, con lo cual se evita que fluya sin poder formar una superficie curvada característica de una lente. Las lentes diseñadas son adheridas por contacto a la superficie de la lente de la cámara del teléfono, como se observa en la **figura 19a**, siendo la imagen resultante la mostrada en la **figura 19b**. Ellos reportan aumentos equivalentes a 120x [28]. La desventaja de estas lentes es que presentan una apertura numérica de 0.20, lo que es un indicativo de que su resolución es poca. Debido a que son colocados directamente sobre la apertura de la cámara no es posible configurar el sistema para realizar observaciones de fluorescencia.

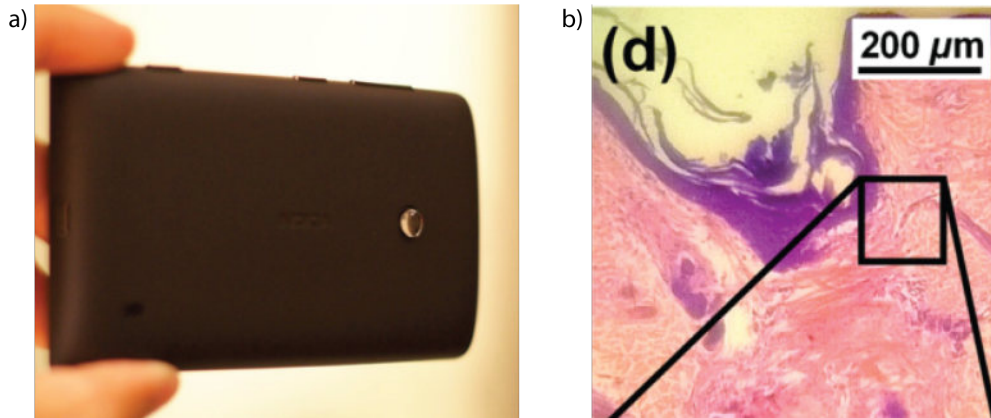


Figura 19. Lentes fabricadas con PDMS. a) Ejemplo de la adhesión de lente de PDMS a un teléfono celular. b) Imagen resultado de la configuración mostrada en a). Muestra observada: Piel humana y folículo cabelludo. Imágenes obtenidas de [28].

Los avances en la manufactura, como la impresión 3D y las plataformas de control numérico computarizado (CNC) ayudan a que los aditamentos para microscopía con teléfonos celulares puedan ser desarrollados.

Un ejemplo interesante es el del equipo de Chagas y colaboradores, que se encamina en la corriente *DIY* (*Do it yourself*, traducción "Hágalo usted mismo"). Ellos comenzaron a desarrollar su propio equipo de laboratorio (micropipetas, micro-manipuladores, termocicladores, EEG, ECG, etc.) para culminar con el desarrollo de un microscopio óptico impreso en 3D, con capacidad de fluorescencia y desarrollado con electrónica comercial [29, 30]. El microscopio, conocido como *Open-Lab Microscope*, tiene la capacidad de observación de fluorescencia y campo claro, con la desventaja de que es un microscopio similar en tamaño a un microscopio óptico simple y está conformado por varios componentes para su fabricación y ensamblaje, como se puede observar en la **figura 20a**.

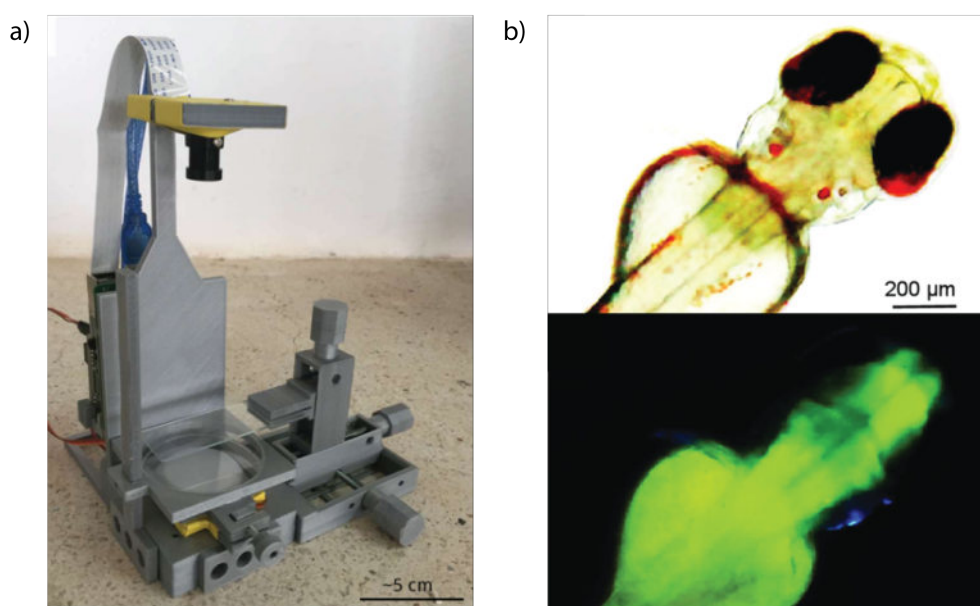


Figura 20. *OpenLab Microscope*. a) Estructura y configuración de microscopio de Chagas et al. b) Imagen ejemplo en campo claro obtenida con el microscopio. c) Imagen ejemplo en campo de fluorescencia. Muestra observada: Larva de pez cebra. Imágenes obtenidas de [30].

Su funcionamiento es a través de una interfaz gráfica de usuario (*Graphic User Interface, GUI*). Para su función como microscopio de fluorescencia, utiliza filtros de colores de bajo costo de poliéster y LEDs de la longitud de onda requerida para excitar al fluorocromo. Su sistema de enfoque es motorizado. El trabajo realizado por este equipo de investigadores es orientado a estudios de optogenética y educación [30]. Ejemplos de imágenes en campo claro y fluorescencia obtenidos con el dispositivo mencionado se muestran en la **figura 20b** y **20c**.

Otro de los equipos que ha desarrollado su microscopio óptico digital es el de Bowman y colaboradores [31]. Su trabajo consiste en el diseño mecánico de la plataforma para un microscopio, con movimiento en dos ejes. El microscopio mostrado tiene la capacidad de observación en campo claro y campo oscuro para alto contraste. Su plataforma utiliza elementos mecánicos sencillos como ligas y tornillos. La automatización que le acondicionaron al microscopio permite precisión en el movimiento de las piezas en el orden sub-micrométrico gracias a su combinación con controladores electrónicos [31]. La **figura 21a** muestra el disposi-

tivo diseñado por estos investigadores y una imagen ejemplo puede ser observada en la **figura 21b**.

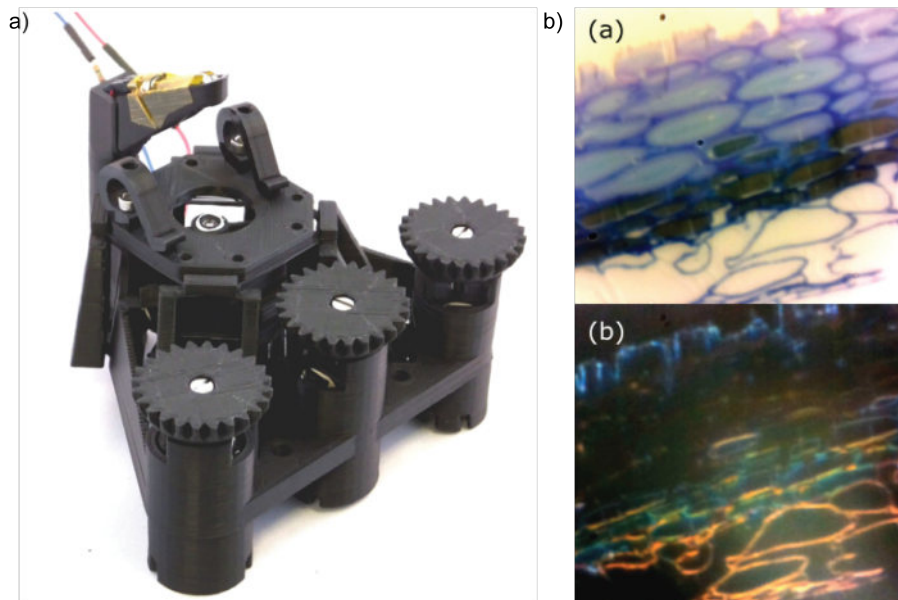


Figura 21. Microscopio flexible. a) Diseño del microscopio. b) Ejemplos de imágenes en campo claro y campo oscuro obtenidas con el microscopio. Muestra observada: *Pollia condensata*. Imágenes obtenidas de [31].

De este trabajo se derivó el OpenScope, desarrollado por un equipo de la Universidad de Cambridge [32], cuyo objetivo era desarrollar un microscopio gratuito para investigación biológica. En dicho proyecto realizan la integración de componentes electrónicos y software para entregar un microscopio de licencia gratuita. Captura imágenes de campo claro y fluorescencia. En la **figura 22a** se puede observar el dispositivo. En las **figuras 22b** y **22c** se muestran imágenes en campo claro y fluorescencia respectivamente.

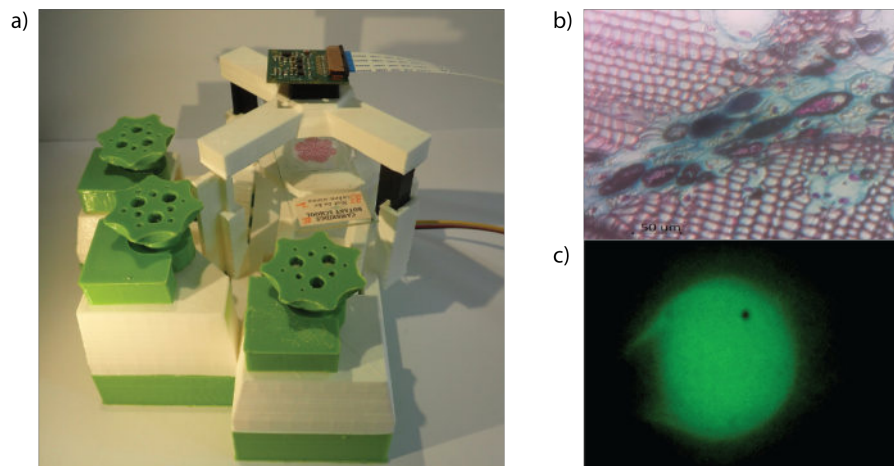


Figura 22. *OpenScopea*) Diseño estructural del microscopio. b) Imagen ejemplo de campo claro obtenida con el microscopio, muestra: Tallo de Pino. c) Imagen de campo de fluorescencia obtenida con el microscopio, muestra: Perla fluorescente con GFP. Imágenes obtenidas de [32].

La tendencia en la mayoría de estos ejemplos es que se orientan a salud global o aplicaciones generales. Si se piensa en la investigación biológica, muchas veces es necesario realizar las observaciones microscópicas en modelos *in vivo* o en dispositivos microfluídicos. En estos casos, utilizar los microscopios anteriormente mencionados pueden ser un desafío. Siguiendo la misma filosofía de creación de herramientas propias para la investigación es cómo algunos grupos desarrollaron microscopios acordes a sus necesidades. Uno de los ejemplos más notables es el de Khademhosseini y colaboradores que desarrollaron un microscopio óptico digital en miniatura para el estudio de aplicaciones microfluídicas. El tamaño de su instrumento tiene dimensiones de 4.2×5.5 cm² y está fabricado con acrílico. Utiliza una cámara web con lente invertida, como se puede observar en la **figura 23a**, lo que le proporciona la cualidad de poder ser utilizado en cualquier plataforma con terminal USB. La desventaja de este microscopio es su enfoque pues se realiza ajustando 4 tornillos. La manera en cómo obtienen diferentes aumentos es rudimentaria puesto que utilizan tubos Eppendorf modificados envueltos en cinta aislante para bloquear la luz. Su microscopio tiene la capacidad de observar fluorescencia sin filtros ya que afirman que basta con hacer una separación digital de los canales de la imagen en post-procesamiento para observar el fenómeno [33].

En sus resultados se muestra que no toda la luz de fondo es completamente bloqueada, dificultando una correcta visualización de la fluorescencia. Además, esta técnica funciona para fluoróforos que emitan luz en cualquiera de los espectros que conformen a los colores como azul, rojo y verde. Si en este caso se buscara utilizar un fluoróforo de emisión naranja o que necesitase de luz de excitación ámbar o amarillo, es posible que se presenten dificultades para su filtración digital, puesto que estos colores tendrían componentes en el color rojo y verde. Las imágenes obtenidas de campo claro y fluorescencia sin procesar son mostradas en las **figuras 23b** y **23c**.

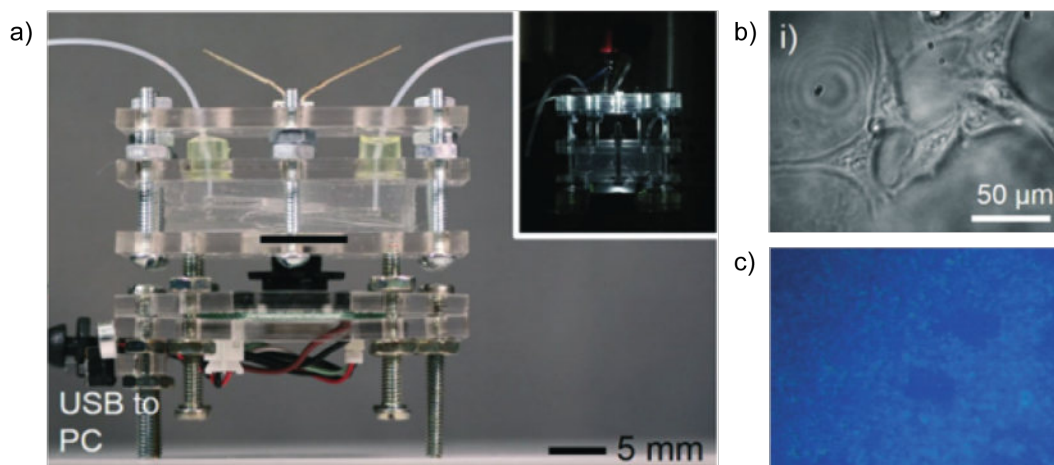


Figura 23. Microscopio miniatura de bajo costo. a) Estructura del microscopio. b) Ejemplo de imagen obtenida en campo claro observando NIH/ 3T3 fibroblastos en 40x. c) Imagen obtenida en fluorescencia observando células HepG2 teñidas con calceína. Imágenes obtenidas de [33].

Otro de los ejemplos es un microscopio fabricado para el estudio neurológico del comportamiento en ratones, llevado a cabo por el equipo de Ghosh en 2011 [34]. Este microscopio consiste en un sistema óptico configurado para fluorescencia con una lente condensadora para la iluminación, filtro de excitación y un espejo dicróico que dirige la iluminación hacia la muestra. El objetivo tiene un enfoque variable que utiliza una pieza roscada que permite su ajuste. El espejo dicróico deja pasar la luz de emisión hacia una lente acromática, que tiene la finalidad de enfocar la luz hacia el sensor CMOS, limitando las aberraciones esférica y cromática en la imagen. En la **figura 24a** se muestra el dispositivo. Una imagen ejemplo es presentada en la **figura 24b**. El sistema es colocado en la cabeza de un ratón

vivo, para poder monitorear la microcirculación en los vasos del cerebro teñidos con dextran-fluoresceína; pueden observar la dinámica de Ca^{2+} en neuronas de Purkinje, así como potenciales evocados por el comportamiento mediante el uso de un indicador para calcio permeable a las células [34].

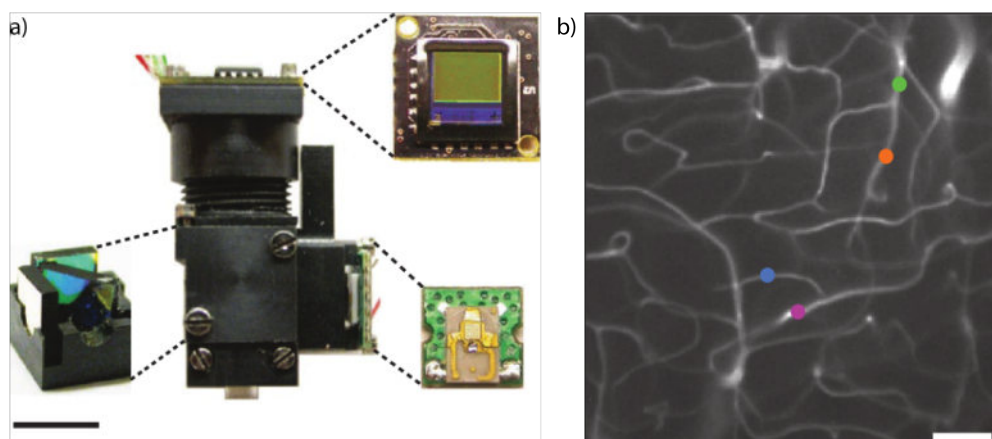


Figura 24. Microscopio miniatura para estudios *in vivo* del comportamiento de ratones. a) Estructura y componentes del microscopio. b) Imagen monocromática de fluorescencia en la cual se observa la microvasculatura del cerebelo de un ratón con solución inyectada de dextran-fluoresceína. Imágenes obtenidas en [34].

Por último, uno de los microscopios que también es utilizado en estudios *in vivo* con modelos animales es el de Murari y colaboradores, que busca utilizar un microscopio miniaturizado en estudios neuronales en ratones [35]. El dispositivo cuenta con un sistema óptico sencillo y pequeño, puesto que todo se engloba en un cilindro de 18 mm de diámetro por 18 mm de largo como se muestra en la figura 25a.

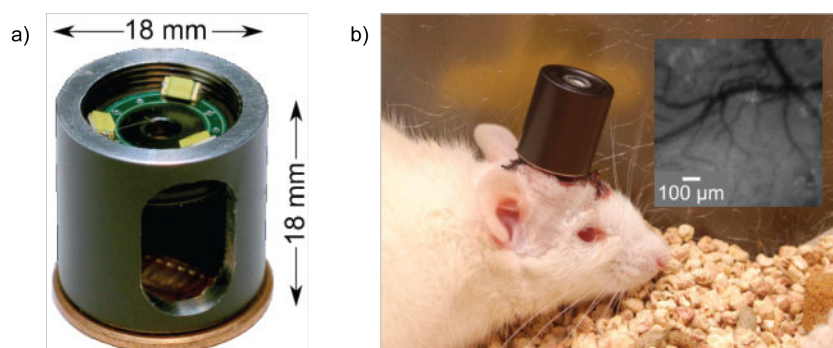


Figura 25. Microscopio miniatura para estudios *in vivo* del comportamiento de ratones. a) Estructura y componentes del microscopio. b) Imagen monocromática de fluorescencia en la cual se observa la microvasculatura del cerebelo de un ratón con solución inyectada de dextran-fluoresceína. Imágenes obtenidas en [34].

En este espacio se coloca una apertura, en cuya entrada está colocado un anillo de 3 LEDs posicionados a 120° entre ellos e inclinados apuntando hacia la muestra. Esta configuración deja pasar la luz hacia una lente que finalmente enfoca la luz hacia el sensor CMOS. La ventaja de este microscopio es que es muy sencillo y no es estorboso para el animal, como se muestra en la **figura 25b**. Su gran desventaja radica en la difícil colocación del sensor, que debe estar conectado a una unidad de procesamiento, y el colocar cables o aparatos con más peso en el cuerpo del ratón, puede provocar que se altere su comportamiento. La imagen mostrada en la **figura 25b** es tomada con el animal anestesiado y colocando una cámara sobre el sistema óptico. Los investigadores indican que se encuentran trabajando en el desarrollo de un dispositivo que permita el envío de imágenes en tiempo real desde la cabeza del ratón hasta una computadora para su análisis [35].

Aprovechar los avances tanto en óptica, electrónica y fotografía es una tendencia latente en todo el mundo y el rango de aplicaciones de cada uno de estos microscopios va desde enfrentar los problemas actuales de salud pública a nivel global, hasta aplicaciones tan específicas como estudios patológicos, buscando que estos dispositivos sean ubicuos y accesibles.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, se busca realizar estudios biológicos en condiciones adversas, es decir, en ambientes de difícil acceso como zonas rurales, de escasos recursos o con climas extremos, teniendo como interés solucionar un problema de salud, o bien, para conocer cómo se comporta la vida en condiciones extremas. Como se vio en la sección anterior, existe equipos de investigación trabajando en el desarrollo de microscopios que puedan ser orientados a estudios biológicos generales. Una de las disciplinas que ha ayudado a poder realizar estudios biológicos en un tiempo de realización menor al de otras plataformas de diagnóstico convencionales, ha sido la microfluídica, la cual estudia el comportamiento de los fluidos en escalas micrométricas. Al ser un campo multidisciplinar, engloba conceptos de biología, física, química e ingeniería para el diseño e implementación de dispositivos enfocados al estudio de fluidos en microescala. Una de sus principales aplicaciones en el análisis de muestras biológicas.

Estas plataformas microfluídicas han permitido una mayor accesibilidad a herramientas de diagnóstico para los biólogos y médicos, pero encuentra uno de sus mayores obstáculos en el volumen y costo de los equipos utilizados para su observación y análisis. El tamaño de los equipos de microscopía convencionales a veces impide su uso en ciertas aplicaciones que requieren portabilidad.

En este proyecto nos planteamos la implementación de un microscopio óptico digital que tenga la capacidad de poder ser utilizado en cualquier ámbito de investigación y diagnóstico biomédicos. Bajo esta premisa es que se busca desarrollar un microscopio que permita el estudio y análisis de muestras biológicas en dispositivos microfluídicos, a la par de que su desarrollo propicie su potencial uso en aplicaciones generales.

HIPÓTESIS

Un sistema óptico de microscopía de fluorescencia miniaturizado permitiría la realización de estudios biológicos generales o para el diagnóstico de enfermedades en diferentes condiciones y escenarios, como puede ser en microgravedad.

OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un microscopio digital invertido de fluorescencia que pueda ser utilizado para aplicaciones de análisis biológicos en dispositivos microfluídicos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar un sistema óptico para obtener imágenes con una resolución de 1 μm .
2. Diseñar piezas estructurales miniatura (menores a 10 cm) para el prototipo de microscopio.
3. Diseñar el prototipo de un sistema mecánico para el enfoque con 3 grados de libertad.
4. Habilitar el microscopio para observación en campo claro y en 3 canales de fluorescencia.
5. Caracterizar el sistema para aplicaciones biológicas en microfluídica.
6. Evaluar el prototipo con un experimento biológico de análisis de intensidad de fluorescencia.

METODOLOGÍA Y MATERIALES

6.1 DISEÑO Y FABRICACIÓN DE PROTOTIPO

Para realizar la miniaturización del microscopio se toma como referencia los límites de espacio disponible de una unidad CubeSat [36], equivalente a 1000 cm^3 . Las piezas diseñadas deben tener un tamaño que les permitan ser colocadas dentro de dicho espacio. En el proceso se hace uso de electrónica comercial, óptica y técnicas de manufactura avanzada.

En las siguientes secciones se estudia el diseño para la miniaturización del microscopio, iniciando con una fase de adaptación de la óptica que determinará sus capacidades. Posteriormente, se describe la fase de integración mecatrónica que tiene por objetivo presentar las piezas mecánicas, tarjetas electrónicas y software desarrollados. La fase siguiente del proyecto describe la maquinaria y parámetros utilizados para la fabricación de todos los componentes del microscopio. Por último, se realiza la fase de pruebas y caracterización del dispositivo, en la cual se verifica de manera experimental su funcionamiento.

6.2 FASE DE ADAPTACIÓN ÓPTICA

6.2.1 *Diseño óptico*

El diseño óptico involucra varios de los conceptos estudiados en el primer capítulo de este trabajo. El prototipo debe permitir la observación de un campo de visión necesario para estudios de células únicas donde se observen objetos con tamaño de hasta $1 \mu\text{m}$. Debe presentar las menores aberraciones posibles y debe tener la capacidad para observar fluorescencia.

Para diseñar el objetivo del microscopio se utilizan las características del sistema de microlentes del módulo de cámara del sistema Raspberry Pi, mostrado en la **figura 26**. Se desarma la pieza que contiene el sistema de microlentes y se invierte como se explicó en los trabajos [30] y [33].

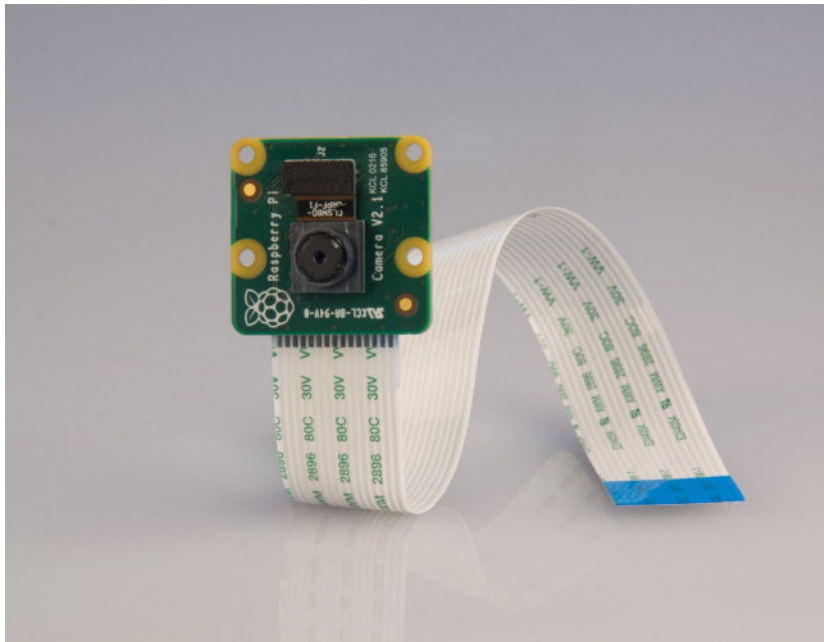


Figura 26. Cámara CMOS para Raspberry Pi, V2. Obtenida de [37]

Esta cámara se utiliza gracias a que sus opciones de control por software son fáciles de realizar. Las lentes de esta cámara son conocidos como lentes de foco fijo. Una de las características de estos sistemas es que son observados como una lente sencilla debido a que siempre se conoce su distancia focal. Dicho sistema está conformado por un arreglo de micro-lentes, los cuales están diseñados de manera que ocurran dos cosas: un efecto de proyección miniaturizada y la corrección de las aberraciones ópticas (esféricas, distorsiones, cromáticas, astigmáticas, etc). Usualmente la configuración del arreglo de micro-lentes utilizado por el fabricante no está abierta al público, pero se pueden obtener algunos datos sobre sus características en los parámetros técnicos publicados por el fabricante [38]. Para poder realizar cálculos de diseño del objetivo, se tomaron las medidas físicas de la apertura del sistema de microlentes. Los datos se muestran en la tabla 6.1

Tabla 6.1. Características medidas del sistema de microlentes de la cámara Raspberry Pi V2.

PARÁMETRO	VALOR
Diámetro de apertura medido al invertir el sistema	4.72 mm
Longitud del contenedor	3 mm
Distancia focal	3.04 mm

En internet se pudo encontrar la Patente US7,564,635B1 [39] de un sistema de microlentes con la misma distancia focal que el propuesto, pero no se sabe con certeza si se trata del mismo arreglo, lo que impide que se puedan realizar simulaciones que permitan optimizar el diseño del objetivo. Un ejemplo de la configuración óptica que sigue este tipo de sistemas se puede examinar en la **figura 27**.

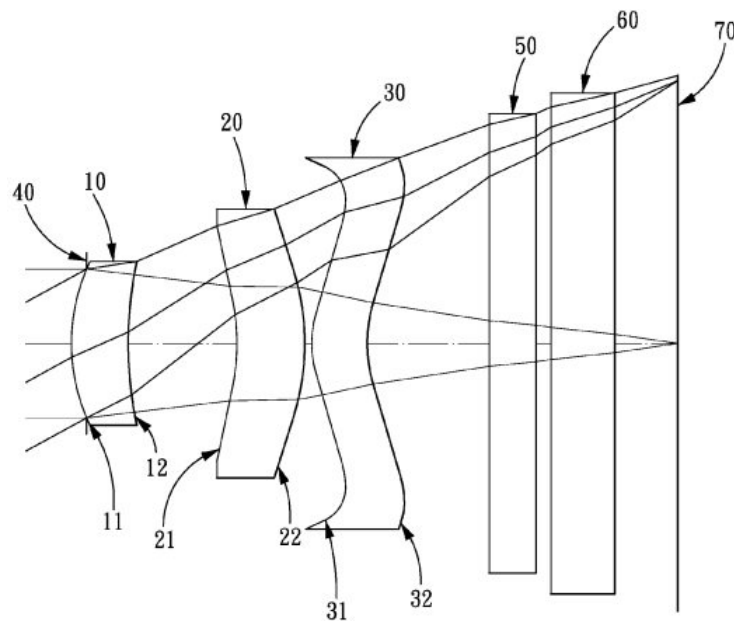


Figura 27. Ejemplo de sistema óptico de microlentes. El sistema observado tiene la misma distancia focal que el sistema de microlentes de la cámara Raspberry Pi. Los números indican el tipo de superficies de cada una de las lentes que conforman al sistema. Se puede obtener mayor información en [39].

6.2.1.1 Cálculo de la apertura numérica (NA)

El parámetro importante a considerar en las lentes para la microscopía es la apertura numérica (NA), debido a su relación con la resolución óptica.

Con el sistema de microlentes de la cámara hay que considerar que se debe invertir para poder tener un efecto magnificador y así poder ser usado en el diseño del objetivo como se describió en la sección 6.2.1. De esta manera, la apertura numérica es calculada acorde a la ecuación 1.12, la **figura 11** y los datos de la tabla 6.1. La apertura numérica calculada da como resultado $NA = 0.614$.

6.2.1.2 Cálculo de la resolución y el aumento del sistema

Para calcular la resolución en este trabajo se considera el criterio de Abbe. Haciendo uso de la ecuación 1.13 y los resultados de la apertura numérica obtenidos en la sección anterior, se calcula la resolución considerando una longitud de onda de 550 nm, por encontrarse a la mitad del espectro visible que es el más sensible para el ojo humano [15]. Se sustituyen los valores mostrados en la tabla 6.2 en la ecuación 1.13, obteniendo una resolución de $0.448 \mu\text{m}$.

Tabla 6.2. Características de la cámara Raspberry Pi V2.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
Modelo del sensor	Sony IMX219PQ
Densidad de pixeles	8 Mpx
Tamaño del sensor en pixeles	3280 x 2464
Tamaño físico del sensor	3.674 x 2.760 mm, formato de 1/4"
Tamaño del pixel	1.12 μm

Una vez que se tiene el cálculo de la resolución, se apela a lo establecido en [14], que describe la relación entre el aumento, la resolución de muestro y el tamaño del pixel en microscopía digital. Considerando que la cámara a utilizar tiene las

características mostradas en la tabla 6.2, se define que la limitante es el tamaño del pixel y la resolución de muestreo. Si se considera que se necesitan como mínimo objetos de la mitad de la resolución para muestrear la imagen, y, despejando el aumento en la ecuación 1.15, se obtienen las resoluciones de muestreo y el aumento mínimo para el sistema de microlentes, como se muestra en la tabla 6.3.

Tabla 6.3. Resoluciones ópticas, de muestreo y aumento mínimos para la formación de la imagen en el sensor.

PARÁMETRO	VALOR
Resolución óptica calculada del sistema de microlentes	0.448 μm
Resolución de muestreo de sistema de microlentes	0.224 μm
Aumentos mínimos para muestreo correcto de imagen	5x-5.54x
Aumento propuesto	7x

En la **figura 15** se mostró el efecto que tenía el aumento si el valor del pixel es fijo. Dado que el aumento es calculado considerando una resolución de muestreo mínima ($r_s = r/2$), se propone el uso de un aumento de 7x, con el fin de tener una mayor fidelidad en la captura de la imagen que la que se tendría usando el aumento mínimo calculado ya que el tamaño de pixel de la cámara es fijo. Este aumento se utiliza para calcular la posición necesaria del objeto con la ecuación 1.13 para posteriormente calcular dónde se genera la imagen y dónde debe colocarse el sensor con la ecuación 1.10.

6.2.1.3 Cálculo de la formación de la imagen para diseño de objetivo

Considerando los resultados de la tabla 6.3, se realiza el cálculo para la posición del objeto y para la posición de la imagen. Se hace uso de la ecuación 1.13, despejando la posición del objeto (s_o), dando como resultado la ecuación 6.1.

$$s_o = f - \frac{f}{M} \quad (6.1)$$

El cálculo de s_o se realiza sustituyendo los valores de la distancia focal de la lente (f) mostrada en la tabla 6.1 y del aumento (M), considerando que la imagen será real e invertida. Esta ecuación es utilizada para lentes delgadas, pero al conocer la distancia focal de una lente gruesa o un sistema de lentes que se encuentren inmersos en aire, es posible aplicarla como aproximación para encontrar la posición del objeto si se conoce la distancia focal de la lente [40].

El sistema de microlentes tiene una distancia focal de 3.04 mm, con lo que se obtiene que el objeto debe estar colocado a 3.5 mm desde el centro del sistema. La distancia dónde se coloca el objeto es adecuada considerando que, para obtener un efecto magnificador, el objeto debe estar colocado entre f y $2f$ como se indica en la tabla 1.3 de configuraciones de imagen en la sección 1.1.1.2. Haciendo esta consideración se procede al uso de la ecuación 1.10, en la cual, al despejar la posición de la imagen (s_i) se obtiene que se forma a 24.50 mm desde el centro de la lente. En resumen, se propone que el sistema óptico quede como se muestra en la **figura 28**, utilizando como fuente de iluminación un LED blanco de alto brillo (Trough Hole 3mm White LED, Lumex, SLX-LX3054UWC), al considerarse una configuración de campo claro.

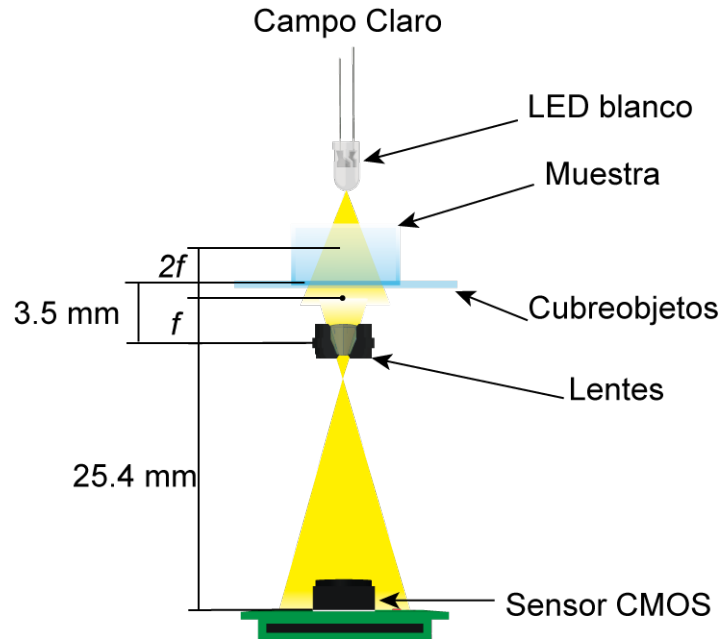


Figura 28. Configuración propuesta para observación en campo claro del microscopio.

6.2.1.4 Selección de LEDs y filtros para fluorescencia

Otro de los aspectos importantes del microscopio es su capacidad de detección de fluorescencia. En este caso se propone la detección de 3 canales de fluorescencia para tener la posibilidad de observar muestras fluorescentes en diferentes longitudes de onda.

La manera de realizar este proceso es implementar el uso de LEDs de una longitud de onda específica como fuentes de excitación para las muestras fluorescentes considerando su desplazamiento de Stokes, y posteriormente utilizar un filtro de emisión que permita el mayor bloqueo posible de la luz del LED (luz de excitación) y deje pasar la emisión de la muestra. Para lograr este propósito, la selección de LEDs y filtros se basa en 3 colorantes comúnmente utilizados para teñir células: Hoescht 33342, FITC y Dextran-Rodamina, cuya emisión corresponde a los espectros azul, verde y rojo respectivamente. En la **figura 29** se muestran los espectros de excitación y emisión de cada uno de estos fluoróforos.

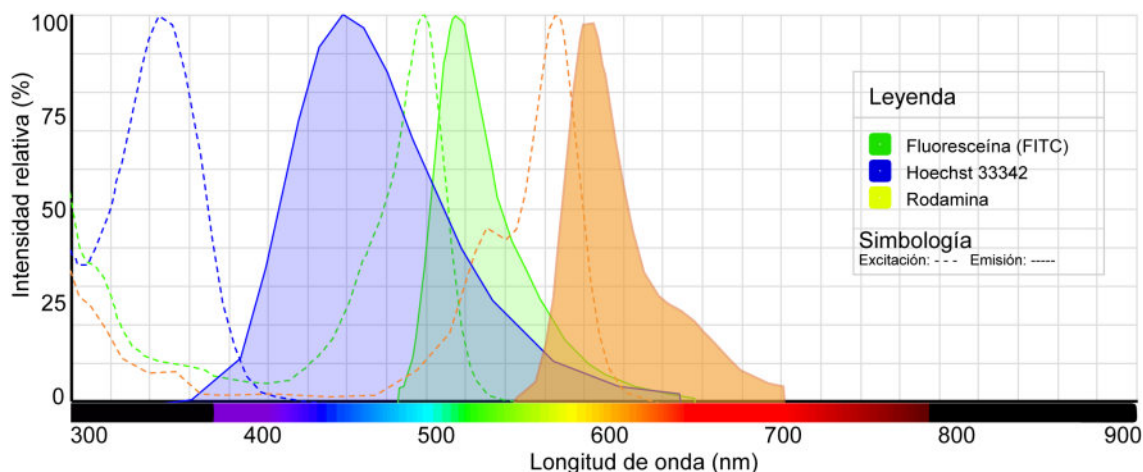


Figura 29. Espectros de excitación y emisión de Fluoresceína, Hoechst 33342 y Rodamina.

Basado en la **figura 29**, para poder observar la fluorescencia de cada una de las sustancias se selecciona un conjunto de LEDs como fuentes de excitación que cumplan con una longitud de onda igual o aproximada al máximo de excitación de la sustancia, así como un filtro óptico que bloquee la luz de la fuente de excitación y deje pasar únicamente la señal de fluorescencia. De acuerdo a esto, los LEDs y filtros seleccionados se enlistan en la tabla 6.4

Tabla 6.4. Resoluciones ópticas, de muestreo y aumento mínimos para la formación de la imagen en el sensor.

FLUORÓFORO	LED	FILTRO
Hoechst 33342	UV SMD LED, $\lambda_{\max} = 385 \text{ nm}$, VLMU3500-385-120, <i>Vishay</i>	$\lambda_{\text{cut}} \approx 410 \text{ nm}$, Filtro pasa altas, # 3114 Though UV Filter, <i>Roscolux</i> .
FITC	High Power Blue LED, $\lambda_{\max} = 475 \text{ nm}$, OSW-4303, <i>Multicomp</i>	$\lambda_{\text{cut-low}} \approx 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{cut-high}} \approx 580 \text{ nm}$, # 58, Wratten Filter, Kodak
Dextran-Rodamina	High Power Green LED, $\lambda_{\max} = 535 \text{ nm}$, OSW-4334, <i>Multicomp</i>	$\lambda_{\text{cut}} \approx 590 \text{ nm}$, Filtro pasa altas, # 19 Fire, <i>Roscolux</i> .

Los LED fueron colocados perpendicularmente al eje óptico para iluminar indirectamente a la muestra y excitarla, evitando así que la totalidad de la luz de los LED contaminen el camino óptico. Esta acción ayuda a que los filtros seleccionados puedan bloquear la luz restante y dejen un paso libre para la luz de emisión. El sistema óptico configurado para fluorescencia es mostrado en la **figura 30**.

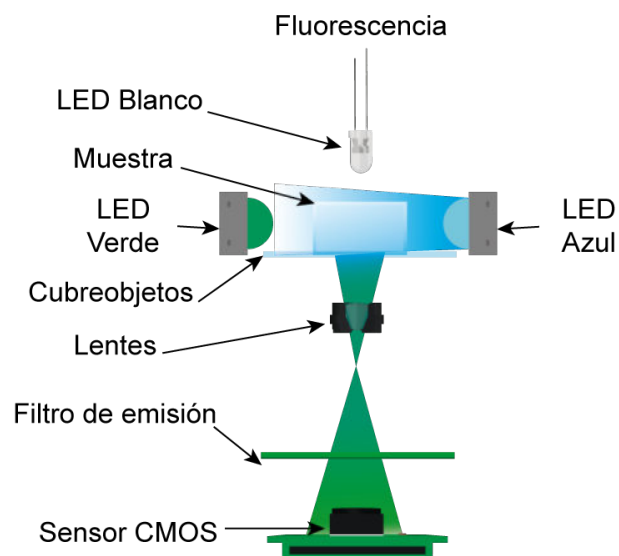


Figura 30. Configuración propuesta para observación en campo de fluorescencia del microscopio.

6.3 FASE DE ADAPTACIÓN MECATRÓNICA

Una vez que son conocidos los datos del diseño óptico se puede realizar el diseño mecánico de las piezas. En esta sección se muestran los planos técnicos de las piezas diseñada y sus modelos en 3D para entender cómo trabaja el prototipo.

6.3.1 *Diseño de objetivo y posicionamiento del sensor*

Las piezas diseñadas para el microscopio consisten en los elementos comúnmente encontrados en un microscopio óptico y todas fueron diseñadas o, en su caso, modificadas en SolidWorks (Versión 24, 2016, Dassault Systèmes SE) utilizando los cálculos ópticos para el posicionamiento de objetos y la formación de una imagen. Debido a la simplificación que se buscó realizar, el prototipo fabricado

consiste únicamente de 8 piezas: dos piezas que conforman la carcasa para la cámara, un tubo roscado del objetivo, un deslizador de filtros, una platina roscada, una cubierta con espacio para LEDs y una carcasa de protección para la tarjeta PCB constituida por dos piezas.

La pieza más importante para el microscopio es el objetivo. En el caso del microscopio miniatura, este componente es el más complejo, puesto que es parte de la base del microscopio y en ella se conjuntan las piezas mecánicas de los filtros y el mecanismo de enfoque. Para el diseño de esta pieza, se utiliza el resultado de los cálculos de la posición obtenidos para la formación de la imagen. La pieza permite que el sistema de microlentes quede colocado a 24.5 mm del sensor CMOS de la cámara. Para lograr este cometido, se modificó una carcasa de licencia gratuita diseñada para el módulo de cámara del sistema Raspberry Pi [41] como la base del sistema óptico del microscopio (**figura 31**).

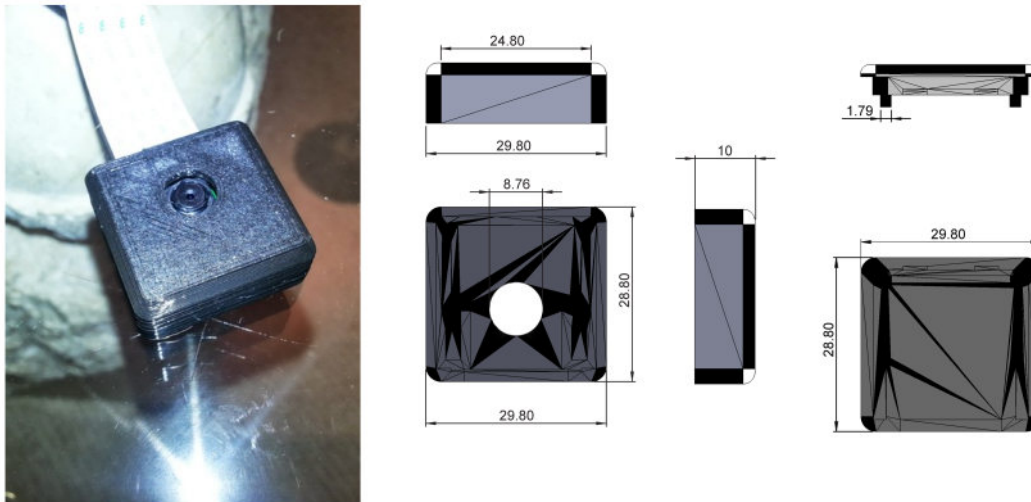


Figura 31. Diseño de la carcasa de la cámara seleccionada para ser modificada. Todas las medidas tienen unidades en mm.

La **figura 32a** muestra las medidas de la base de la carcasa, que está compuesta por dos partes. A la parte superior se le agrega un cilindro con dimensiones de 15 mm de diámetro y 20 mm de largo. En su parte superior cuenta con un orificio con dimensiones de 6.20 mm de diámetro y 2.20 mm de profundidad que funge como el espacio donde se monta el sistema de microlentes. En la **figura 32b** se

aprecian las dimensiones de la carcasa con el aditamento del objetivo diseñado, considerando al sistema de microlentes. Se puede apreciar que las dimensiones respetan la distancia calculada entre el centro del sistema y el sensor.

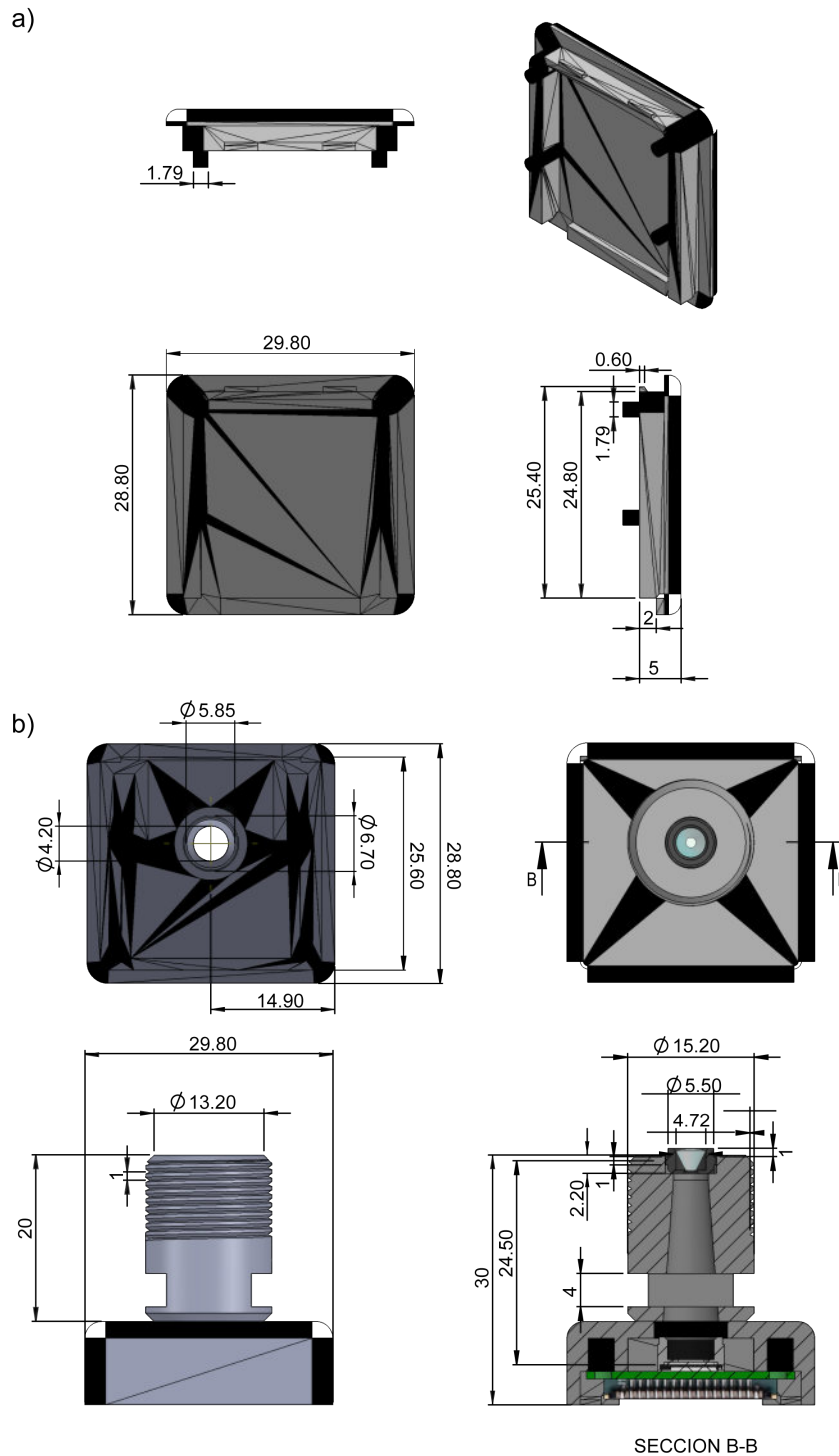


Figura 32. Diseño de la pieza objetivo. a) Diseño y dimensiones de la base de la carcasa utilizada. b) Diseño de la pieza objetivo con su tubo roscado y el sistema de microlentes agregados a la tapa de la carcasa. Todas las medidas tienen unidades en mm.

En la **figura 32** se resaltan dos características importantes:

1. La ranura existente entre el lente y el sensor
2. El roscado en el cilindro del objetivo

Los filtros deben estar entre la lente y el sensor como se propuso en la **figura 30**. Una ranura rectangular que atraviesa el cilindro del objetivo funciona como riel para un deslizador de filtros que se diseña con las dimensiones mostradas en la **figura 33**. A este deslizador se le colocan recortes de los filtros mencionados en la tabla 6.4 con dimensiones de $7.5 \times 7.5 \text{ mm}^2$.

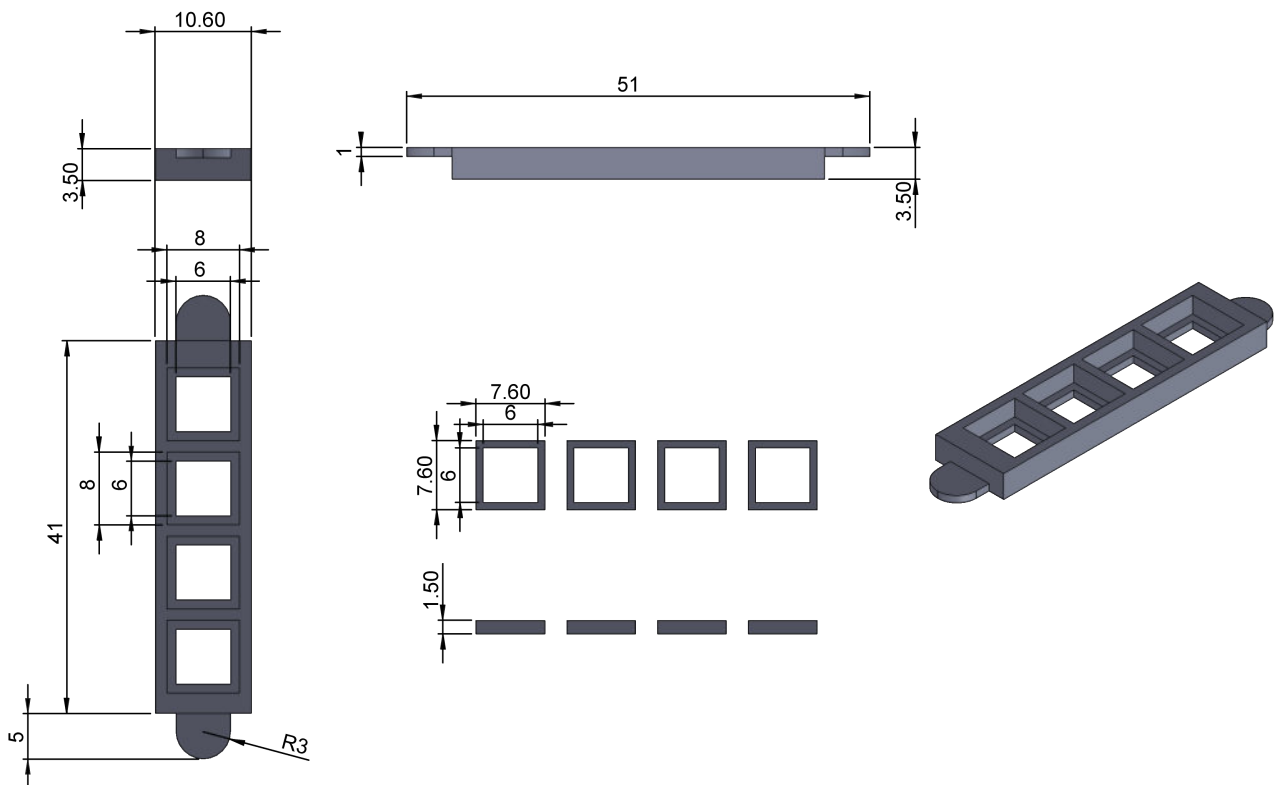


Figura 33. Diseño y dimensiones del deslizador de filtros. Todas las medidas tienen unidades en mm en vistas frontal, lateral y aérea.

La segunda característica es el roscado. Las diferencias en cada una de las posibles muestras a observar provocan diferencias en el enfoque. Para poder enfocar las muestras, se desarrolla un mecanismo sencillo a manera de tornillo que permite enroscar la platina en el objetivo para acercarla o alejarla de la lente. Este movimiento permite que el plano de la muestra pueda ser enfocada.

La platina contiene la parte complementaria al objetivo al ser un espacio de $40 \times 40 \text{ mm}^2$ con una rosca al centro. El roscado utilizado en la platina y el objetivo, tiene pasos de 1 mm y diámetro de 15 mm, lo que permite que el desplazamiento lineal al momento de girarlo sea corto (1 mm/rev) para poder ajustar el enfoque. En la **figura 34** se pueden observar las dimensiones de la platina.

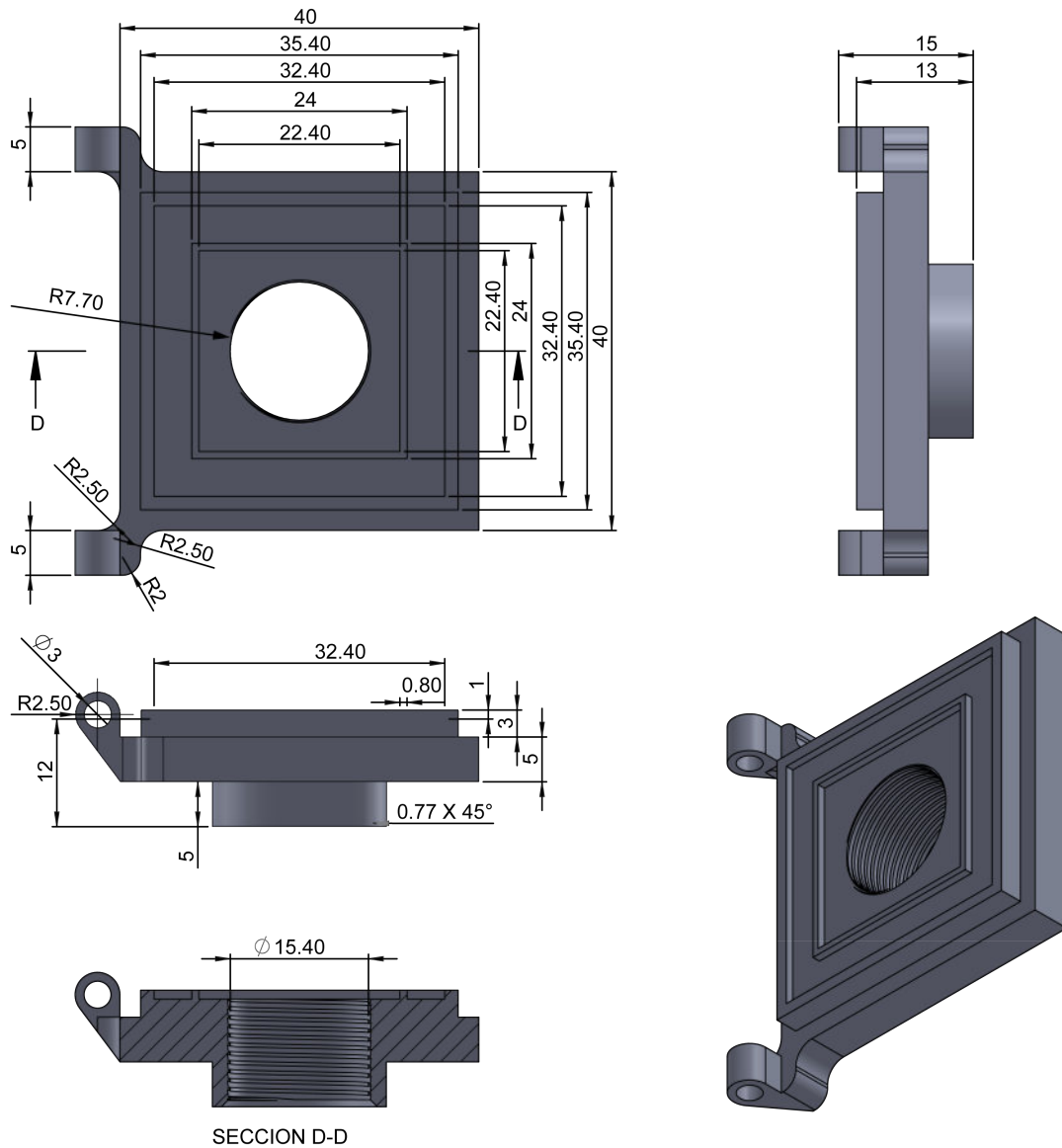


Figura 34. Diseño y medidas de la platina en sus vistas frontal, lateral, aérea más su vista isométrica y seccional para apreciar el roscado. Todas las unidades en mm.

En la **figura 34** se visualiza que la pieza de la placa tiene unos orificios que funcionan como la parte complementaria de una bisagra formada con la tapa diseñada para el microscopio y cuyas dimensiones son mostradas en la **figura 35**.

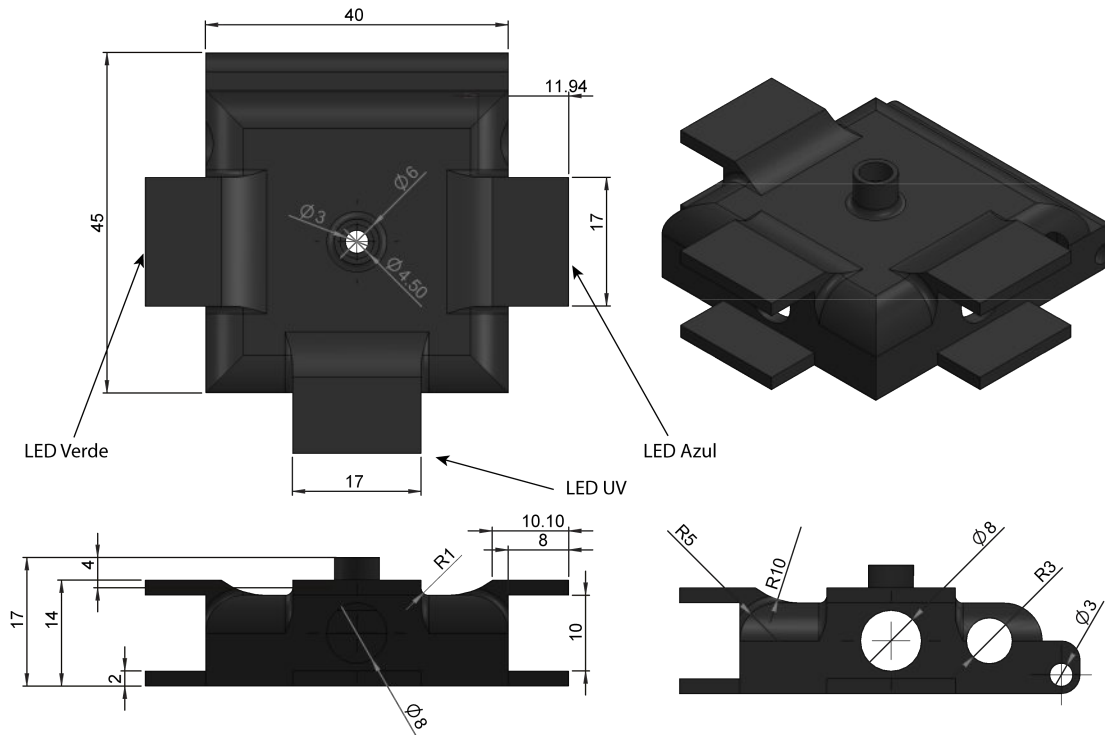


Figura 35. Diseño y medidas de la tapa con soporte para LEDs. Vistas aérea, frontal, lateral e isométrica con medidas en mm.

Se destaca que la tapa tiene el sistema de iluminación consistente en los 4 LEDs seleccionados para cada uno de los campos de observación del microscopio. El funcionamiento de la conjunción de estas piezas es simple ya que al abrirse se puede colocar la muestra, y al cerrarse se resguarda a la misma para evitar interferencias de la iluminación exterior.

Las piezas de la base, el objetivo, deslizador de filtros y platina roscada, conformarían la parte principal del microscopio

6.3.2 Diseño Electrónico

6.3.2.1 Diseño de controlador de LEDs

En el caso del diseño de hardware se utiliza KiCAD (Versión 4.0.6, 2015, KiCAD Developers Team) para el diseño de una tarjeta de circuito impresa. Para el controlador de iluminación se consideran los LED mencionados en la tabla 6.4. La

característica más importante es que son LED de potencia (i.e. demandan corriente eléctrica mayores a 75mA) y es importante protegerlos del sobrecalentamiento. El circuito diseñado permite una regulación de la corriente y que los LED puedan conmutar para encendido o apagado. Para poder realizar esta función se diseñó el circuito observado en la **figura 36a**.

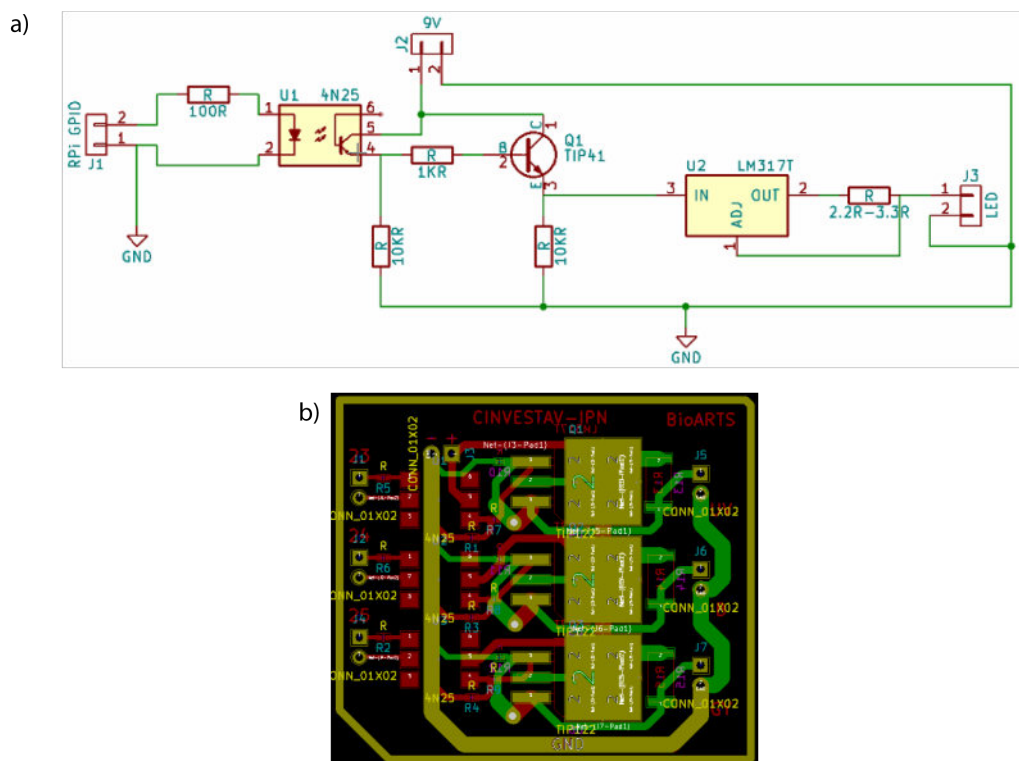


Figura 36. Circuito de control de LED. a) Circuito diseñado. b) Diseño de la tarjeta PCB.

El circuito consta con una fase de aislamiento digital, una fase de potencia y una fase de regulación. La primera fase consiste en un opto-acoplador 4N25, que tiene la función de aislar las entradas de control digital de una fuente de voltaje externa de 9 V para la alimentación de los LEDs. El fototransistor del circuito integrado se configura en pull-down para la obtención de una lógica de encendido y apagado. Con dicha configuración, el emisor del circuito integrado 4N25 está conectado a la fase de potencia a través de la base del transistor TIP41 el cual genera una amplificación de corriente y también se encuentra en configuración pull-down. El emisor del transistor se conecta a un circuito regulador LM317 configurado para regular la corriente. Realizando el cálculo indicado en la hoja de datos del regu-

lador, descrita por la ecuación 4.7 se puede escoger una resistencia que permita mantener una salida de corriente para cada LED.

$$I = \frac{1,25}{R} \quad (6.2)$$

Si se estudian las hojas de datos de los componentes, se puede observar que la relación de la intensidad de brillo es directamente proporcional a la corriente eléctrica. Con la ecuación 4.7 se dimensionan los componentes necesarios para que los LEDs operen al 80 % de su capacidad. En el caso del LED UV, éste alcanza su máximo brillo con una corriente de 500 mA, mientras los LEDs azul y verde lo hacen con 700 mA. Las resistencias calculadas para las dos corrientes mencionadas son de 2.2 Ω y 3.3 Ω , respectivamente. Para finalizar el diseño del circuito, se diseña una tarjeta de circuitos impresa (PCB) de doble capa cuyo diseño puede observarse en la **figura 36b**. En esta tarjeta se utilizan todos los componentes de montaje superficial de manera que su fabricación sea lo más pequeña posible.

Por último, para dejar la tarjeta dentro del sistema del microscopio, la pieza mostrada en la figura 32a es modificada para ser la pieza superior de una base de dos piezas, las cuales fungirán como carcasa de protección para la tarjeta, cómo se muestra en la **figura 37**.

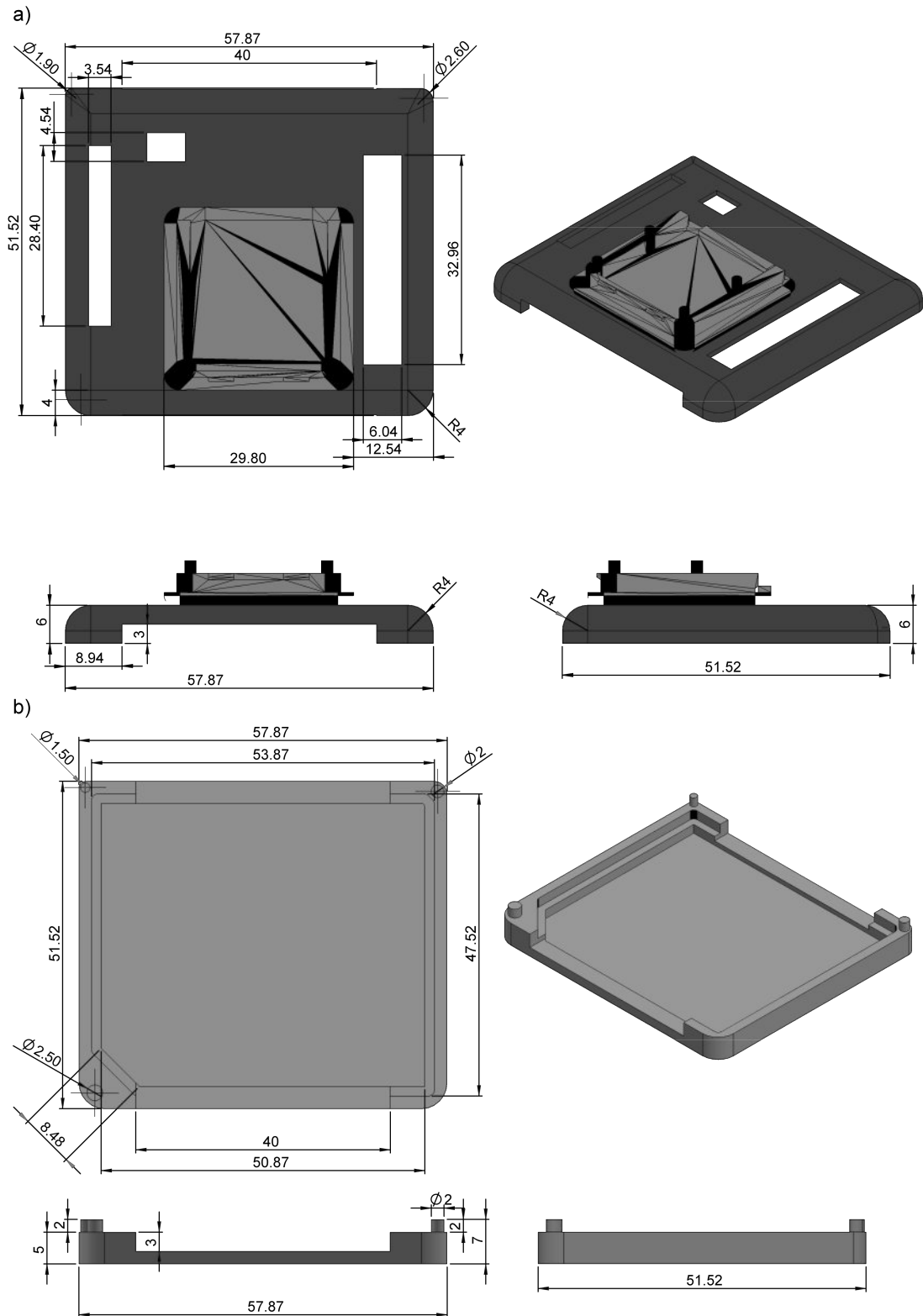


Figura 37. Diseño de carcasa para protección de tarjeta controladora de LEDs. a) Parte superior de carcasa para PCB. Se puede observar cómo está unida a la base inferior de la carcasa para la cámara. b) Parte inferior de carcasa para PCB, esta figura deja entrever cómo se une a la parte superior y la apertura para disipación del calor.

6.3.3 Programación de software

El software desarrollado permite la interacción entre el usuario y los diferentes controles del microscopio. Se requiere que dicha interacción sea intuitiva y facilite el entendimiento del funcionamiento del microscopio de manera gráfica. Este tipo de interfaces se conoce como *GUI (Graphic User Interface* , traducción: Interfaz gráfica de usuario) y en este proyecto su programación se realiza en Python (Versión 2.7, Python Software Foundation).

6.3.3.1 Selección de plataforma computacional de desarrollo.

Las opciones computacionales de desarrollo del dispositivo son variadas. Debido a la orientación de este trabajo, se busca que la plataforma de control cuente con las siguientes características:

1. Pequeña (de tal manera que pueda colocarse en un nanosatélite o cubesat).
2. Con soporte para captura y procesamiento de imágenes.
3. Con soporte para interfaz de hardware y software.

En los trabajos de Chagas [30] y Zhang [33], por ejemplo, se puede ver el aprovechamiento de las plataformas computacionales como la Raspberry Pi y una PC . En este proyecto se utilizó como plataforma computacional Raspberry Pi. Los factores predominantes son su portabilidad y que cuenta con la capacidad de poder conectar dispositivos periféricos.

6.3.3.2 Interfaz gráfica de usuario (GUI) para control de cámara y LED's.

La interfaz gráfica de usuario fue programada en Python con el uso de Tkinter y permite el control de los parámetros de la cámara descritos anteriormente, además de opciones de compresión y corrección de imagen las cuales utilizaron la biblioteca de OpenCV.

La interfaz consta de 7 secciones, las cuales se ilustran en la **figura 38**.

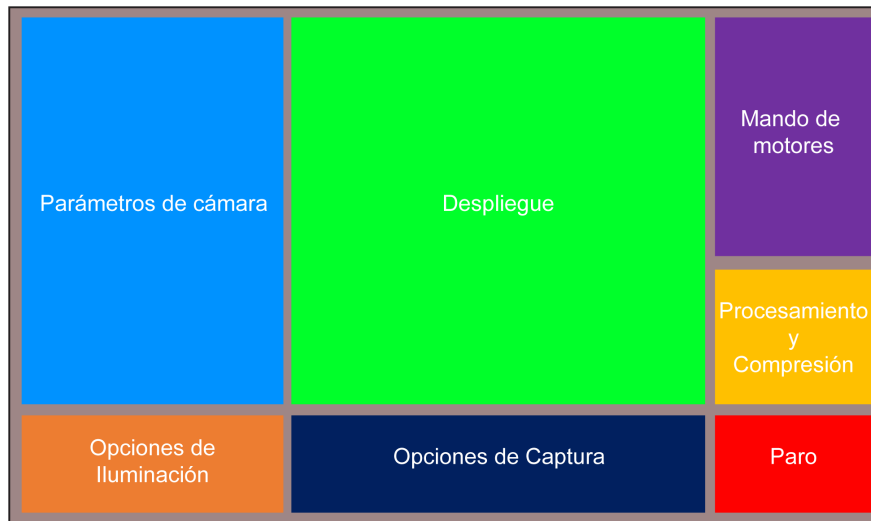


Figura 38. Esquema de interfaz. En este diagrama pueden observarse las diferentes secciones con las que cuenta la GUI.

El código final ha sido adaptado y mejorado de un código base mostrado en [42], para una mejor experiencia del usuario y se encuentra descrito en el apéndice A. El funcionamiento de las funciones de la cámara se describe en el apéndice B. En la figura 39 se puede observar la interfaz final, resultado de la mejora de dicho código. A este mismo programa se le agrega la capacidad de controlar los motores, además de una opción para utilizarlo con un joystick, basando el código en los mostrados en [43] y [44]. Éstas últimas funciones son para un prototipo de platina móvil y enfoque semi-automático aún en desarrollo.

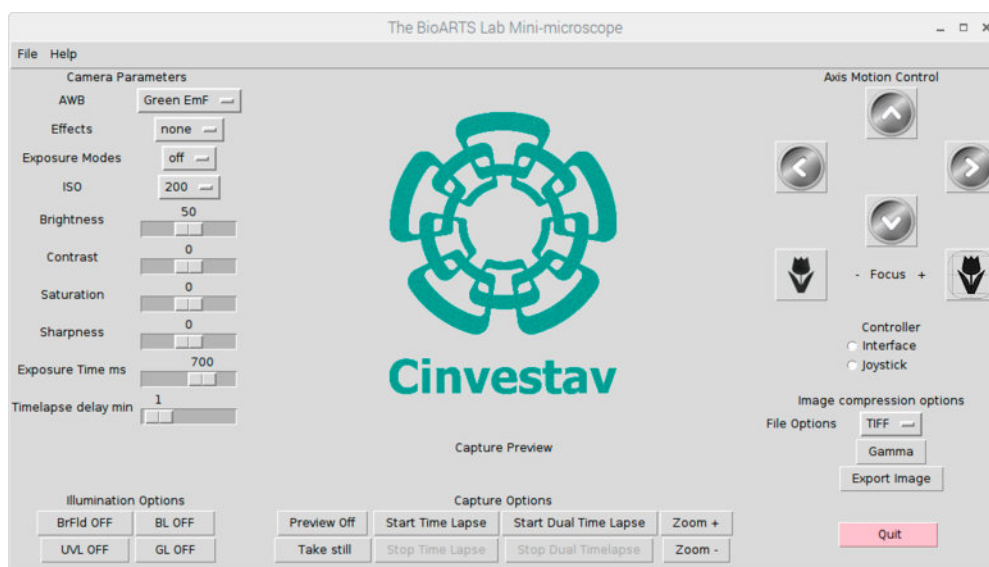


Figura 39. Interfaz gráfica de usuario final. En ella pueden observarse la distribución de las funciones en botones en cada una de las secciones mostradas anteriormente.

6.4 FASE DE FABRICACIÓN Y ENSAMBLE

Para iniciar el proceso de fabricación, las piezas del prototipo son exportadas en formato .STL para poder ser fabricadas en la impresora 3D (Replicator 2, Makerbot). Los parámetros utilizados para la fabricación con la impresora 3D se muestran en la tabla 6.5.

Tabla 6.5. Parámetros de fabricación de piezas en impresora 3D.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
Material	PLA μm
Velocidad en X	40 mm/s
Velocidad en Y	40 mm/s
Temperatura	230 °C
Relleno	10 %
Altura de capa	0.20 mm

Otra de las piezas que es fabricada para el proyecto es la tarjeta de circuitos impresa (PCB). Una vez diseñadas se exportan con formato .DXF para ser fabricadas en la fresadora CNC de sobremesa (MDX-40A, Roland DG) utilizando el software Dr. Engrave (Versión 2.70.0, Roland DG). Los parámetros utilizados para el grabado se muestran en la tabla 6.6. Para soldar cada uno de los componentes SMD se utiliza pistola de aire y para los elementos con pines se utiliza caudín.

Tabla 6.6. Parámetros de fresadora CNC para fabricación de tarjetas PCB.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
Material	FR-4 con recubrimiento de cobre μm
Velocidad en X	5 mm/s
Velocidad en Y	5 mm/s
Velocidad en Z	2 mm/s
Giro del huso	15000 rpm
Posición elevada en Z	0.50 mm
Profundidad de corte	- 0.07 mm
Paso de escarbado	0.02 mm
Herramienta	Buril de corte V 45°

Cuando todas las piezas y componentes están fabricados se procede al ensamble del microscopio. En la **figura 40** se puede observar el ensamble en explosión.

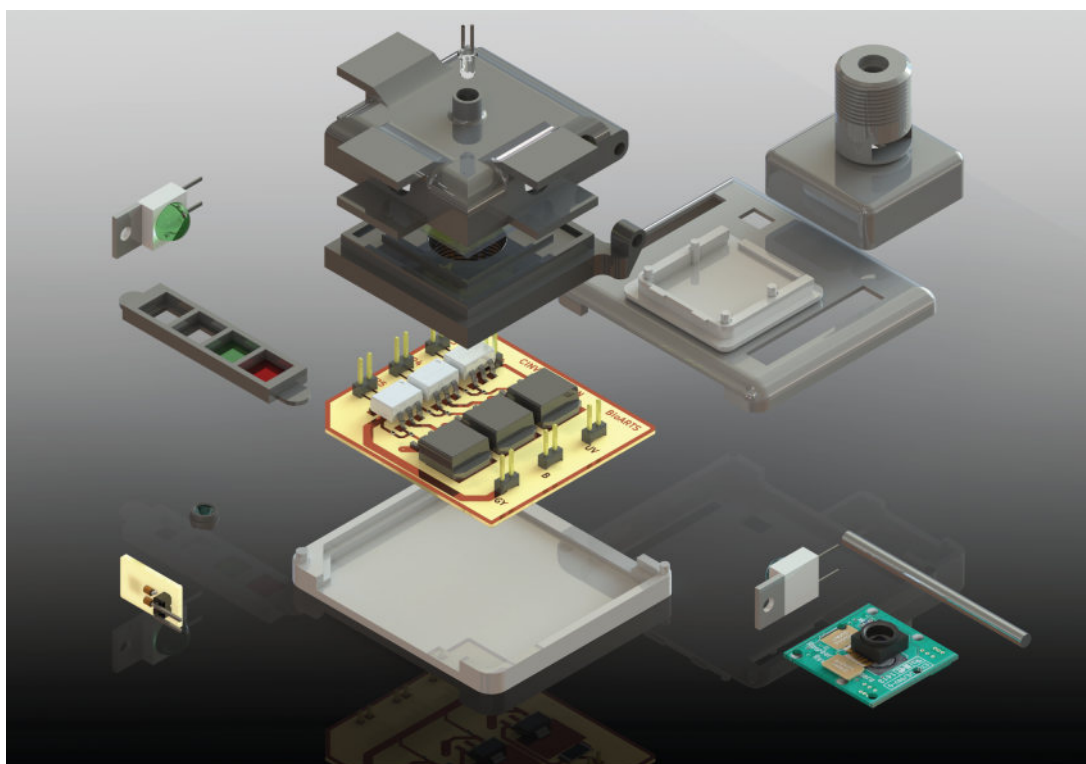


Figura 40. Piezas de microscopio en explosión.

El resultado del ensamble y fabricación se muestra en la **figura 41**.

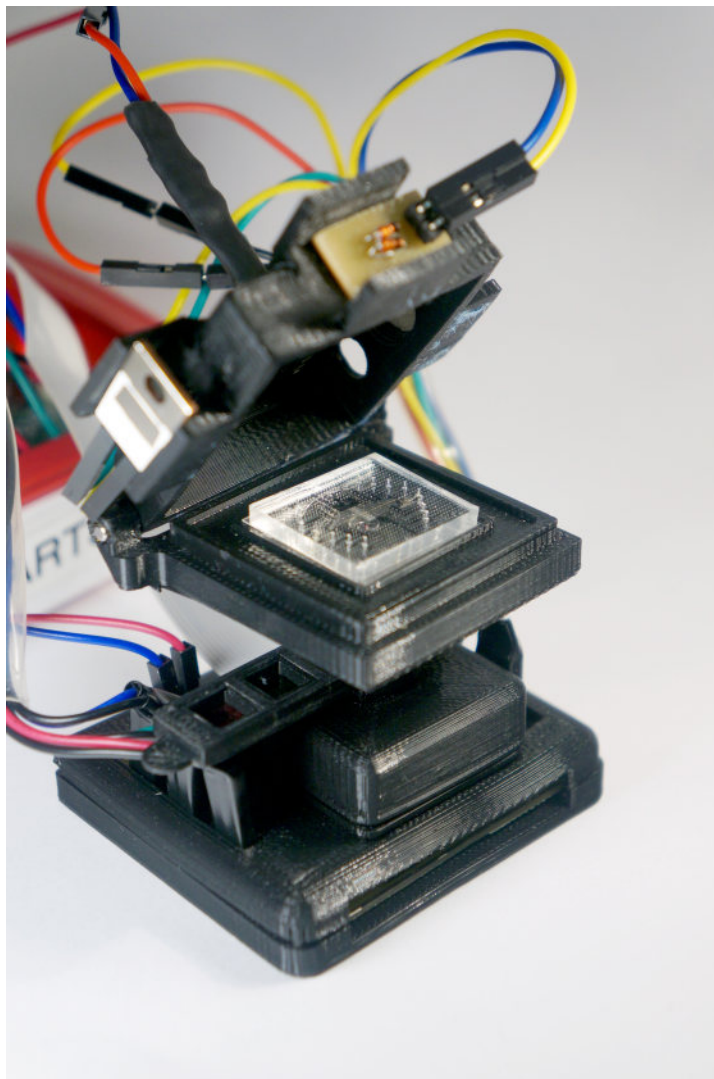


Figura 41. Fotografía del microscopio ensamblado.

6.5 FASE DE PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

La fase de caracterización consiste en hacer pruebas del funcionamiento del prototipo y su optimización para un mejor desempeño. Para lograr este cometido, se realizan simulaciones y mediciones que arrojan información del comportamiento del microscopio bajo ciertas consideraciones y son comparadas con un control predeterminado.

6.5.1 Obtención de imágenes de fluorescencia: caracterización y análisis

En la obtención de las imágenes de fluorescencia se debe tener en consideración la principal característica de este método de microscopía: el alto contraste de la fluorescencia con un fondo oscuro [45, 46]. Esta característica es la que proporciona especificidad a la observación de fluorescencia. De acuerdo con Chagas y Zhong [30, 47], colocar el LED de manera inclinada con respecto al eje óptico permite que la luz de excitación no contamine el camino óptico. En el trabajo de Chagas colocan el LED con ángulo de 45° con respecto al eje, pero, debido a sus diferencias con el presente proyecto, se debe caracterizar cuál es el mejor ángulo para iluminar la muestra en el prototipo. Se propone el uso de 3 diferentes ángulos: 0° , 22.5° y 45° como los ángulos de caracterización, diseñando 3 diferentes tapas cuyas medidas son mostradas en la **figura 42**.

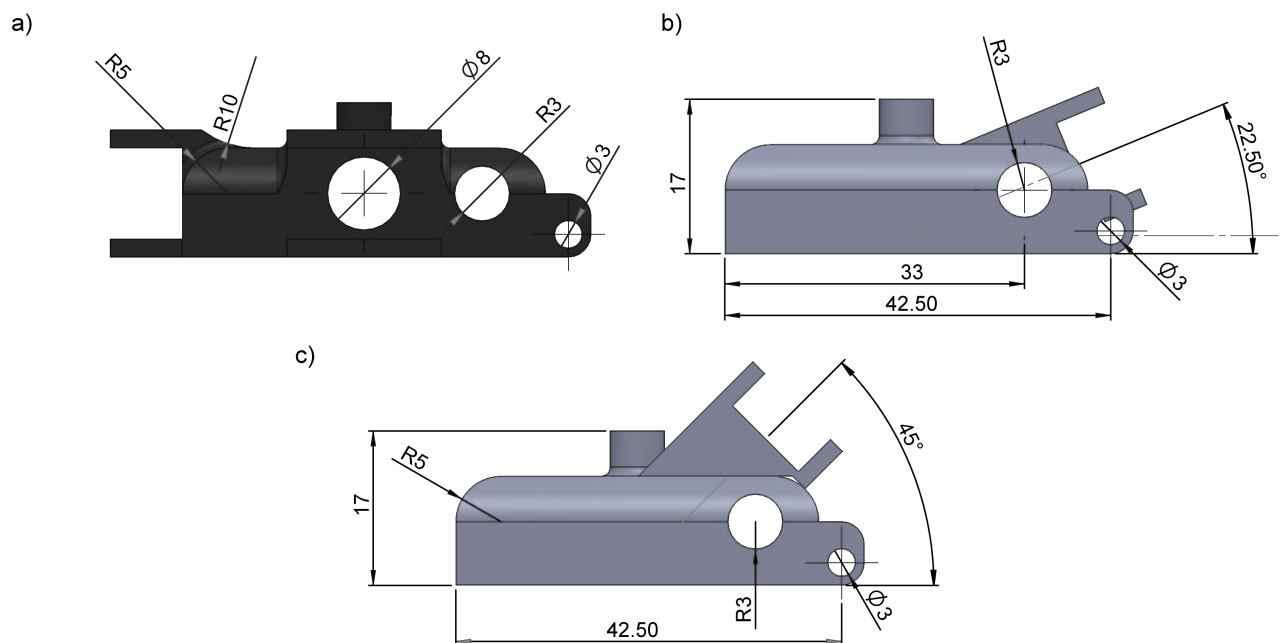


Figura 42. Diseños y medidas de piezas para caracterización de ángulo de iluminación. Tapa para iluminación con a) ángulo de 0° o perpendicular al eje óptico. b) ángulo de 22.5° c) ángulo de 45° . Todas las medidas en mm.

Para poder observar el comportamiento del sistema con los tres diferentes ángulos, se utilizan micro-perlas con 3 diferentes fluorocromos: Firefly Green, Red y Blue de $4.8 \mu\text{m}$, $3.2 \mu\text{m}$ y $1.0 \mu\text{m}$ respectivamente (Thermofisher G500, R300 & B100 fluorescent beads), para ser observadas con el juego de LEDs y filtros corres-

pondientes. Las perlas se diluyen con plurónico (Lot # SLBG6026V USA, Sigma Aldrich Co.) para tener una concentración de 1000 perlas por μL . Posteriormente, se fijan entre dos cubreobjetos con 15 μL de glicerol y se sellan con esmalte.

Otro de los factores que influyen en la correcta observación de la fluorescencia es el tiempo de exposición. Se propone que para poder observar la respuesta del sistema se observen los 3 ángulos de inclinación en 5 diferentes tiempos de exposición: 200 ms, 400 ms, 600 ms, 800 ms y 1000 ms. Si bien los tiempos utilizados son muy altos para los estándares de la microscopía, hay que tomar en cuenta que el sensor no tiene una sensibilidad tan alta como el de cualquier otro cámara digital, principalmente debido a las limitaciones por el tipo de obturador que posee (ver Apéndice B). Una vez obtenidas las imágenes se analizan de manera cualitativa, considerando una buena imagen a aquella donde se observe un buen contraste entre las perlas y el fondo. Para tener una cuantificación tanto del fondo como de la intensidad con la que brillan las perlas se analizan 40 perlas seleccionadas en 5 regiones de interés (*Region of Interest*, acrónimo, ROI) de la imagen: las 4 esquinas denotadas como NW (noroeste), NE (noroeste), SW (suroeste), SE (sureste) y el centro de la imagen (center). Estas son porciones de la imagen para realizar una operación de procesamiento. Las ROI realizadas son circulares del tamaño a la perla y se resta una ROI del mismo tamaño de una zona vecina a la perla mediante el uso de Fiji [48]. La siguiente prueba realizada consiste en la observación de las 3 soluciones fluorescentes utilizadas como referencia para la selección de los filtros y LEDs, con el fin de analizar la uniformidad de la emisión. Para esto, se utilizan pozos hechos con un sacabocados en PDMS, colocando 3 μL de solución en cada uno de ellos y observándolos por separado. Cada uno se observa con 200 ms, 400 ms, 600 ms, 800 ms y 1000 ms en los 3 ángulos de inclinación del LED. Después, se observa cualitativamente el cambio del color y se mide la uniformidad de la emisión desarrollando un script en MATLAB (apéndice C) para el cálculo de mapas de calor de la imagen donde se pueda observar la uniformidad de la luz y su contribución en cada uno de los canales digitales. Estas pruebas permiten conocer

si se ésta observando o no fluorescencia y permiten optimizar los parámetros de hardware del microscopio.

6.6 OBSERVACIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS)

Para comprobar el funcionamiento del microscopio, se debe ser probar con la realización de un experimento biológico. Se propuso la observación de la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Ver Apéndice C). Considerando los estímulos que provocan la formación de NETs, se propuso realizar un experimento que consiste en colocar neutrófilos dentro de un dispositivo con micro-pozos. Los neutrófilos están teñidos con Hoechst 33342 a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La solución en la cual estarán suspendidos los neutrófilos tiene los colorantes Sytox Green y Sytox Orange cada una con volumen 20 μL y concentración de 2.5 μM . Tanto Hoechst como Sytox son colorantes del ADN, con la diferencia de que el primero es permeable a la célula y el otro no. El chip con micropozos se coloca sobre un cubreobjetos y después se coloca en el microscopio. Posteriormente se añaden 20 μL de la solución con neutrófilos con una concentración de 1,000,000 de células por mL y se espera 5 minutos para que las células se sedimenten en los pozos. Pasado este tiempo se procede a correr el experimento con una duración de 2 horas. El experimento inicia con la colocación de una solución de 20 μL de LPS (Lipopolisacárido, Ver Apéndice C) con concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como estímulo para la formación de las trampas. Una vez colocada, se procede a la obtención de 4 imágenes: 1 de campo claro y 3 de los canales de fluorescencia disponibles en el microscopio miniatura, correspondientes al estado inicial del experimento. El monitoreo de las células se realiza tomando las 4 imágenes cada 10 min en el lapso de las dos horas. La totalidad de las imágenes son analizadas posteriormente en Fiji. El procesamiento consiste en la selección de 162 ROI correspondientes a los pozos que contenían células. A dichas ROI se les mide la intensidad de fluorescencia que presentan y se les resta una ROI en forma de dona concéntrica al exterior del pozo. Los resultados del experimento son mostrados en la sección 7.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE CAMPO CLARO

El siguiente paso es verificar el desempeño del sistema de microlentes de la cámara. Como se mencionó en la sección 6.3.1, la configuración de dicho sistema no está disponible al público, por lo que se procedió al análisis cualitativo de las imágenes formadas para comprobar su funcionalidad. Un ejemplo de una imagen adquirida con esta cámara se muestra en la **figura 43**.

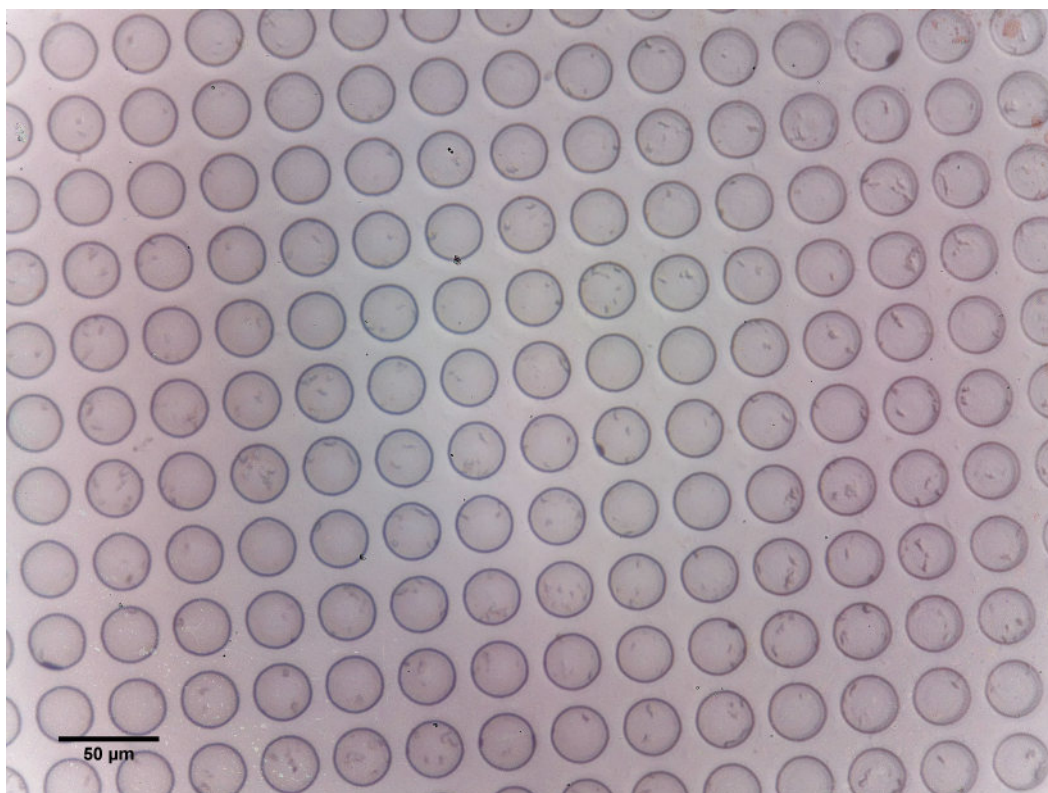


Figura 43. Diseños y medidas de piezas para caracterización de ángulo de iluminación. Imagen obtenida con el prototipo con iluminación concéntrica y sistema de microlentes invertido de la cámara.

La imagen mostrada en la **figura 43** se considera una imagen nítida debido a que los bordes de los microporos observados se ven definidos a lo largo de todo el campo de visión. Una cosa que cabe destacar de esta imagen es que algunas zonas de la imagen se observan más oscuras. Por este motivo, las características a

observar en estas imágenes es la uniformidad de la iluminación en el fondo de la imagen. Se adquirieron imágenes con el microscopio sin ningún objeto presente para posteriormente obtener un mapa de calor que indique cuáles son las zonas que presentan menor iluminación. En la **figura 44a** se puede observar una imagen del fondo y en la **figura 44b** su respectivo mapa de calor realizado en MATLAB (ver apéndice D).

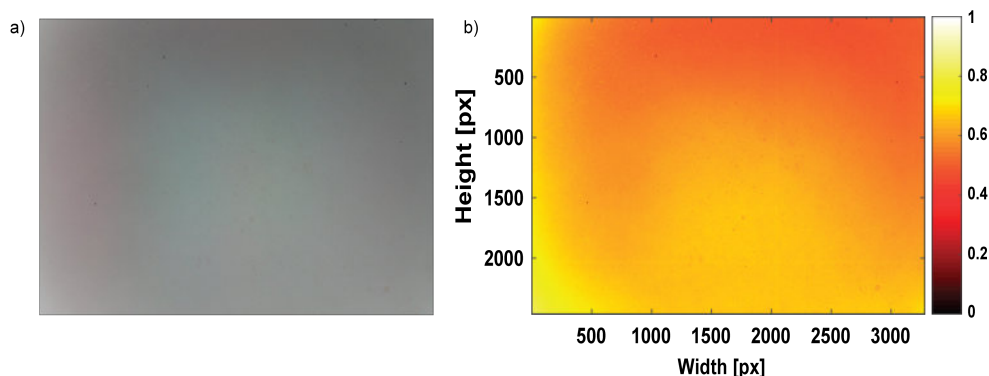


Figura 44. Uniformidad del fondo en campo claro. a) Imagen de campo claro tomada con el microscopio miniatura con sistema invertido de microlentes. b) Mapa de calor de la imagen del fondo mostrando la uniformidad de éste, siendo las zonas más amarillas las más iluminadas y las rojas o negras las menos iluminada.

En la **figura 44b**, el mapa de calor muestra que la iluminación no es uniforme y que la esquina superior derecha es la zona menos iluminada de la imagen. Este efecto puede deberse al cono de iluminación del LED, así como al mismo algoritmo de corrección de sombras inherente de la cámara. Este algoritmo consiste en corregir el viñeteo (que es un decremento en el brillo de la periferia de la imagen con respecto a su centro) en la imagen debido a un desalineamiento en las lentes o una mala iluminación [49]. Utiliza modelos matemáticos y ópticos del sombreado [50]. Se programa el algoritmo en la cámara cuando se realiza su calibración con las lentes del fabricante [49]. Al retirar las lentes, invertirlas o cambiarlas, las condiciones de iluminación cambian, y se produce el efecto de viñeteo debido a la manera en cómo se calibró el algoritmo.

En resumen, de estas pruebas se puede concluir lo siguiente:

- El uso de un LED en colocación concéntrica con el camino óptico del microscopio puede ayudar a la observación de imágenes nítidas.

- La utilización del sistema de microlentes invertido permite la obtención de imágenes claras si se analizan cualitativamente.
- El fondo de imagen de campo claro no está iluminado uniformemente, por lo que se deben explorar diferentes fuentes de iluminación que ayuden a mejorar la uniformidad.

Gracias a estas conclusiones se encuentran puntos de mejora, como el diseño de un sistema de iluminación en miniatura que permita tener iluminación más uniforme, lo cual se podría lograr usando un anillo o barra de LEDs. Con respecto al sistema de microlentes de la cámara, como este tipo de lentes es usado en cámaras de teléfonos celulares, existe una gran variedad de ellos con diferentes distancias focales que pueden ser aprovechadas para obtener diferentes aumentos, campos de visión e incluso diferentes resoluciones.

7.2 RESULTADOS DE ANÁLISIS DE RESOLUCIÓN Y AUMENTO DEL SISTEMA

Para determinar la resolución de nuestro microscopio se utilizó el patrón USAF 1951 Negativo (Thorlabs, R1DS1N, Negative Resolution Test Pattern), utilizado para aplicaciones donde la iluminación se tiene detrás del objeto a observar. La imagen obtenida con el microscopio se puede observar con la **figura 45a**. En la **figura 45b** se observa un acercamiento (obtenido al analizar la imagen posteriormente) al grupo de elementos de menor tamaño observado en el patrón USAF, en este caso el grupo 7. El elemento observable más pequeño del patrón es el ubicado en la parte inferior de la imagen ampliada (**figura 45b**), lo que nos indica una resolución de al menos $2.19 \mu\text{m}$, valor que se obtiene con la fórmula descrita en el apéndice E. Puesto que ese elemento, todavía es resoluble, se puede considerar que es posible observar objetos menores a $2 \mu\text{m}$, no obstante, eso involucraría el uso de otro patrón. En la **figura 45c** se puede observar el perfil obtenido con Fiji, de la imagen de las líneas horizontales de los elementos del grupo 7 del patrón. Esta información muestra que en la observación de los elementos ya hay una pér-

dida de contraste que se hace presente en los espacios entre líneas, denotados por los valles en la gráfica, cuyos puntos más bajos no llegan a valores cercanos a 0.

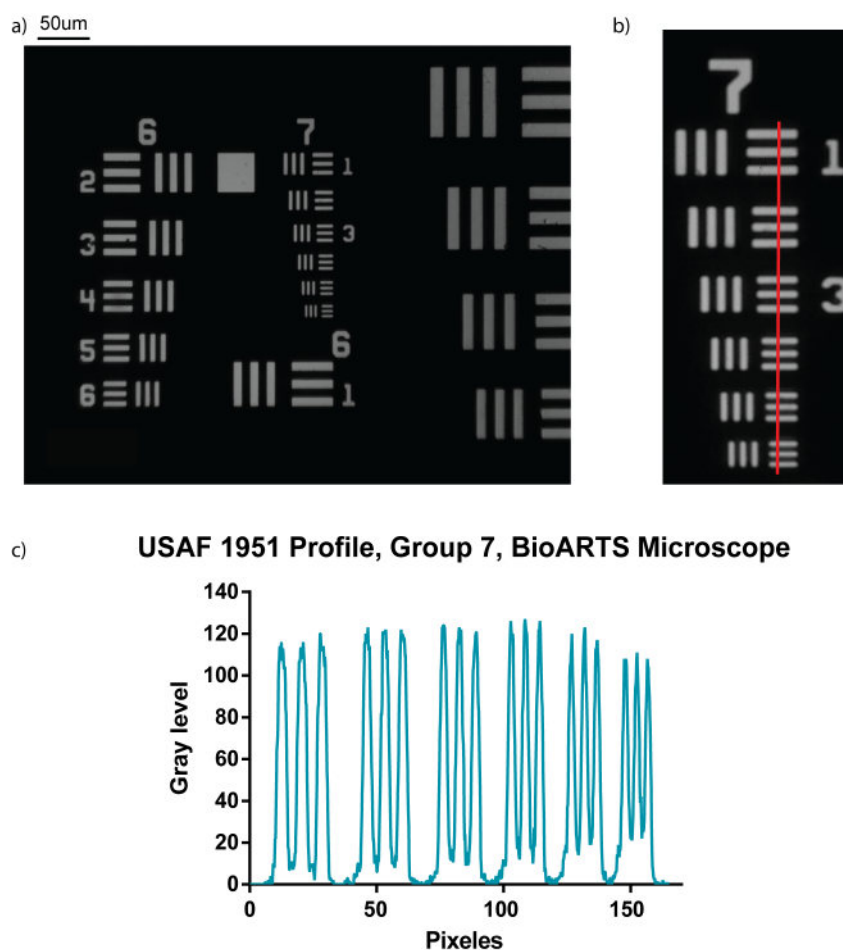


Figura 45. Observación con microscopio miniatura de BioARTS de patrón USAF 1951. a) Observación del patrón completo. Puede observarse que hacia las orillas no existe distorsión alguna notable ya que se resuelve observa un grupo claramente del lado derecho. b) Acercamiento al grupo 7 del patrón. Se puede observar que todos los elementos están resueltos. c) Perfil de los elementos horizontales del grupo 7.

El test de resolución se realizó también en un microscopio Zeiss Axio Observer. Este microscopio tiene la capacidad de observación en campo claro y fluorescencia, además de que tiene objetivos con aumentos de 10x, 20x, 40x y 100x [51]. El uso de este microscopio permite la comparación de sus capacidades de resolución y aumento con las del prototipo desarrollado en esta tesis. Los resultados de las imágenes obtenidas con este microscopio se aprecian en la **figura 46**.

La diferencia entre las observaciones radica principalmente en la intensidad con la que se observa el patrón que depende de la fuente de iluminación utilizada y la

sensibilidad de la cámara. En la observación con el microscopio Zeiss, los espacios entre líneas, denotados también por los valles en la **figura 46c**, muestran niveles más cercanos a cero, lo que es un indicativo de que existe mayor contraste en comparación con nuestro microscopio miniatura. Los niveles de gris en los valles de la **figura 45c** tienen un valor de gris más alto que en los valles de la **figura 46c**, lo que indica que la resolución en el microscopio miniatura es menor que en el microscopio Zeiss.

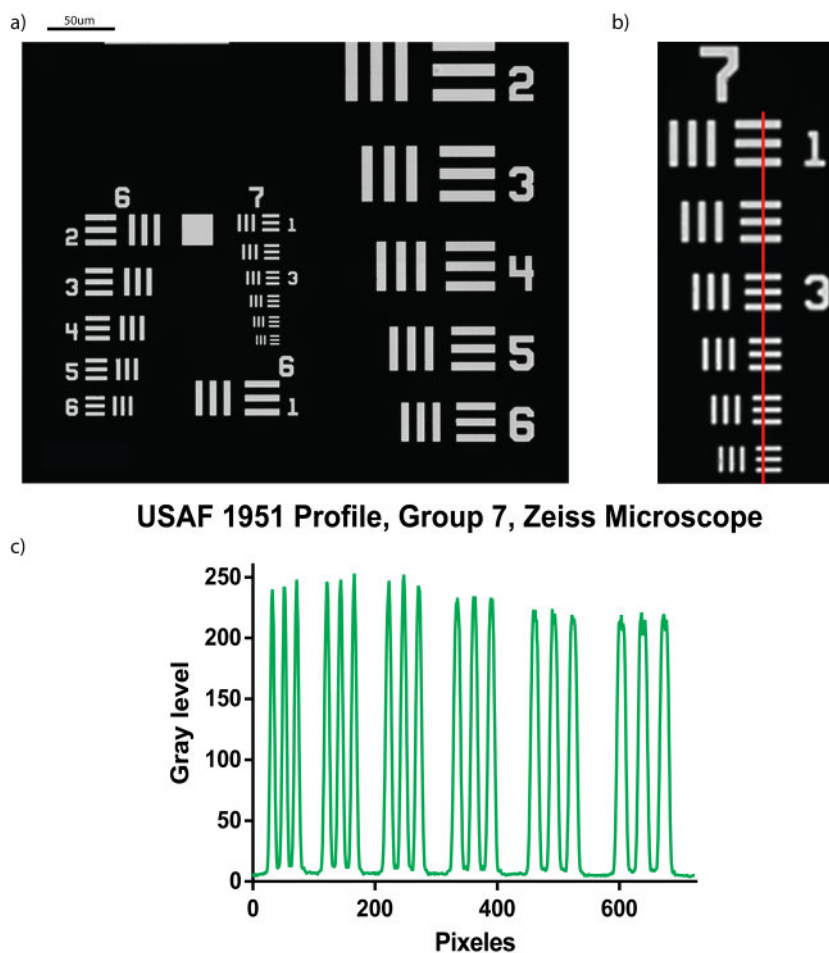


Figura 46. Observación con microscopio Zeiss Axio de patrón USAF 1951. a) Observación del patrón completo. b) Acercamiento al grupo 7 del patrón. Se puede observar que todos los elementos están resueltos. c) Perfil de los elementos horizontales del grupo 7. Imágenes capturadas con objetivo de 20x.

Una de las maneras en las que se puede corroborar la posibilidad de ver objetos menores a los 2.19 µm resultado del test de resolución es observar objetos con tamaños menores a ese valor. Con esa referencia, se usan perlas fluorescentes de 1 µm observadas en campo claro, obteniendo como resultado la imagen mostrada

en la **figura 47**. Se puede apreciar que las perlas se ven como pequeños puntos, en la imagen, por lo que se debe revisar su observación en fluorescencia. Con base en las perlas que se observan, se realiza el análisis descrito en el apéndice F sobre la función de dispersión de punto, cuyos resultados se muestran en la sección 7.4.

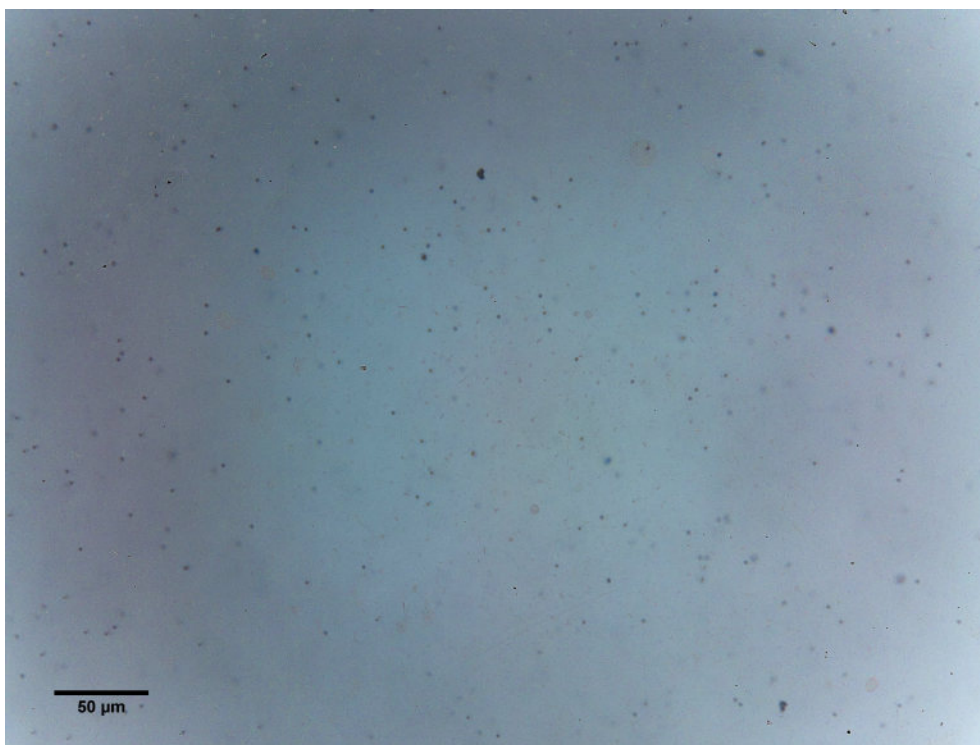


Figura 47. Observación en campo claro de perlas de $1 \mu\text{m}$ de diámetro.

Otra característica que se verificó en el microscopio es si el aumento óptico era el correcto o no. El aumento propuesto es de $7\times$, como se indica en la sección 6.2.1.2. Para verificarlo se utiliza como referencia un chip microfluídico con trampas para células desarrollado en el laboratorio. De este chip se toma como referencia una de las trampas, la cual es medida con el microscopio Zeiss calibrado. Las mediciones que se obtienen arrojan que una trampa mide $15.89 \mu\text{m}$. Una imagen del mismo chip es capturada en el microscopio miniatura y se mide con ayuda de Fiji en número de píxeles, lo que da como resultado una trampa con 100 px de largo. Se sabe que cada uno de los píxeles de la cámara mide $1.12 \mu\text{m}$, por tanto, un objeto de $15.89 \mu\text{m}$ de ancho observado con sistema de microlentes utilizado es proyectado como una imagen de $112 \mu\text{m}$ y, al aplicar la ecuación 1.10, se obtiene un aumento de $7.048\times$, muy cercana al aumento estipulado. Este aumento sería

equivalente al aumento que tiene un objetivo de 20x en el microscopio Zeiss, como se analizó de manera cualitativa en las **figuras 45 y 46**.

Otra de las características a considerar es el campo de visión (FOV), el cual estará delimitado por el tamaño del sensor. Para conocerlo, se considera el número de píxeles a lo largo y ancho del sensor (3264px de largo por 2480px de ancho) y se multiplican por el tamaño del píxel y se dividen entre el aumento óptico de la imagen, lo que da como resultado un campo de visión de 522.24 μm de largo por 396.8 μm de ancho.

Estas pruebas han permitido conocer si el diseño óptico fue correctamente desarrollado, llegando a las siguientes conclusiones:

- La resolución óptica obtenida mediante el criterio de Abbe no pudo ser verificada con el patrón USAF 1951, no obstante, muestra que el microscopio es capaz de diferenciar objetos con un tamaño de al menos 2.19 μm .
- El aumento calculado en el diseño óptico demuestra ser correcto al calibrar la imagen con medidas físicas.
- Se demuestra que el campo de visión es delimitado por el tamaño del sensor y el aumento, ajustándose a las necesidades del proyecto.

Las oportunidades de mejora a tener en cuenta son: la utilización de un sistema de microlentes con mayor apertura, que bastaría con mirar un catálogo para buscar lentes acordes a la necesidad y diseños calculados. El uso de sensores con características mejores (i.e. tamaño de píxel menor, tamaño de sensor más grande, obturador global, etc.) que el utilizado en este proyecto puede ayudar a resolver aún mejor los objetos en la imagen.

7.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES DE FLUORESCENCIA

Las imágenes obtenidas de la prueba de caracterización para fluorescencia permiten conocer la uniformidad de la iluminación y cómo es captada por el sensor.

Primeramente, se realiza lo descrito en la sección 6.5.1 con respecto a la caracterización del ángulo al cual se deben iluminar las perlas. La primera prueba se realiza con la pieza mostrada en la **figura 42** y las perlas fluorescentes azules, siendo su resultado las imágenes mostradas en la **figura 48**.

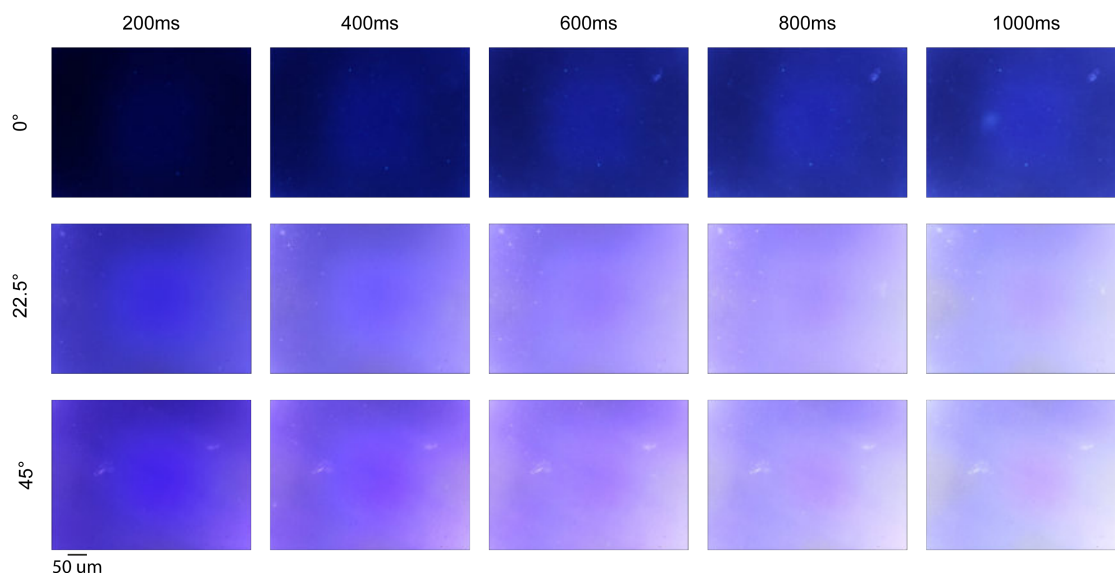


Figura 48. Prueba de canal de fluorescencia azul. Observación de perlas fluorescentes azules de $1\ \mu\text{m}$ de diámetro en 5 diferentes tiempos de exposición y 3 diferentes ángulos para la iluminación de excitación.

Cualitativamente, se puede observar en la figura 48 que conforme el ángulo de inclinación aumenta también lo hace la intensidad de fondo. En las secciones de la figura 48 correspondientes a los ángulos 22.5° y 45° se puede observar que las perlas dejan de distinguirse por completo, por lo que únicamente se puede medir la intensidad de cada una de las perlas cuando el ángulo de inclinación es 0. Los resultados de las mediciones se muestran en la figura 49.

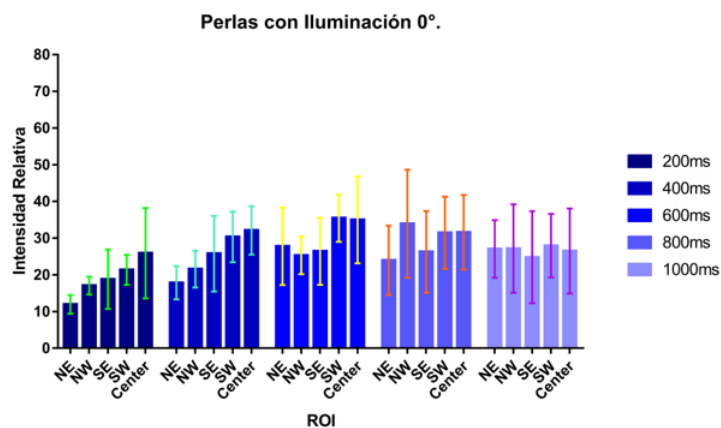


Figura 49. Comparación de la intensidad de las perlas fluorescente azules para el ángulo de iluminación de excitación de 0°, en 5 diferentes regiones de la imagen y 5 tiempos de exposición. Observación de perlas fluorescentes azules de 1 μm de diámetro en 5 diferentes tiempos de exposición y 3 diferentes ángulos para la iluminación de excitación.

En la **figura 49** se puede apreciar que conforme el tiempo de exposición aumenta, el contraste entre las perlas se mantiene. También es posible apreciar que aun cuando el tiempo de exposición es muy alto, las perlas pueden ser distinguidas. En el caso de 1 s, se puede ver uniformidad en las regiones, lo que indica que el ruido de fondo aumentó pues. Lo más destacable de estas mediciones es que no existe uniformidad en la iluminación de la imagen, puesto que la fluorescencia de las perlas que se encuentran en las esquinas es menos intensa que la de las perlas que se encuentran al centro, lo cual se debe a un efecto de viñeteo presente en la imagen.

La misma prueba se repite para los otros dos canales de fluorescencia. En la **figura 50** se muestra el resultado de las imágenes obtenidas en la observación de las perlas fluorescentes verdes. A pesar de que con el ángulo iluminación de 22.5° las perlas se observan con un alto contraste en comparación con las perlas que fueron iluminadas con LED en ángulos de iluminación de 0° y 45°, existe una mayor intensidad en el fondo. Cuando el ángulo es de 45°, la imagen comienza a presentar saturación, lo cual impide la correcta observación de las perlas.

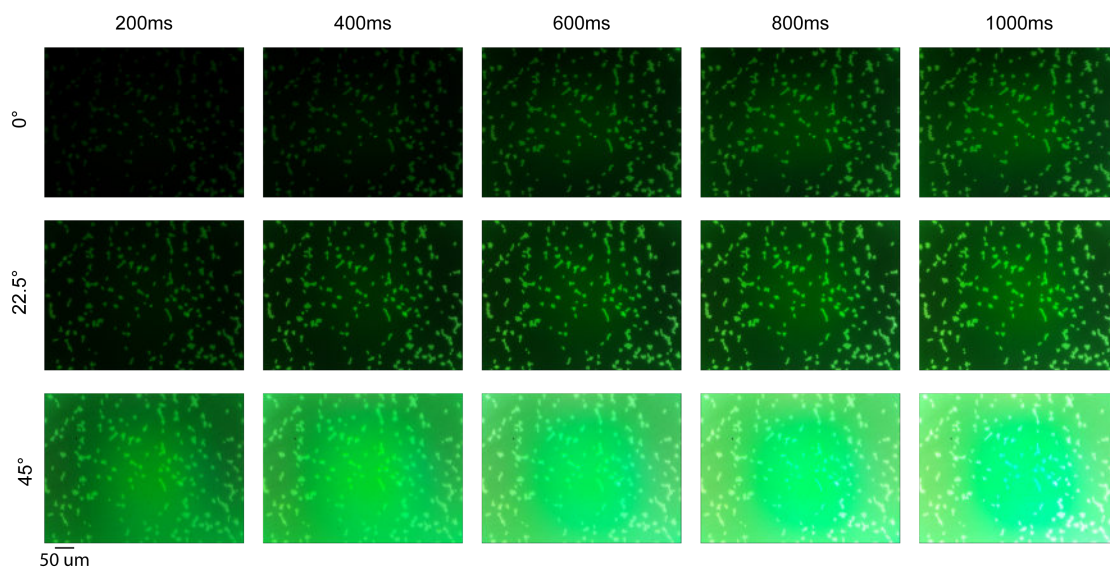


Figura 50. Prueba de canal de fluorescencia verde. Observación de perlas fluorescentes verdes de $4.8 \mu\text{m}$ de diámetro en 5 diferentes tiempos de exposición y 3 diferentes ángulos para la iluminación de excitación.

Al medir la intensidad de las perlas en las diferentes zonas de la imagen para el ángulo de inclinación de 0° , se obtiene el resultado de la **figura 51a**, donde se puede apreciar nuevamente el efecto de viñeteo en la imagen, al ser las perlas del centro de la imagen la que presentan una mayor intensidad en comparación con el resto de las zonas de la imagen. En este caso, se puede observar que con el aumento en el tiempo de exposición, disminuye el contraste en la imagen. En el caso del ángulo de 22.5° , mostrado en la **figura 51b**, se puede observar que el viñeteo disminuye, por lo cual, la iluminación en las distintas zonas de la imagen es más uniforme. Se debe notar que el efecto no desaparece, pues las perlas del centro de la imagen presentan una disminución en la intensidad de fluorescencia neta cuando se aumenta el tiempo de exposición. En el caso del ángulo de 45° , cuyos resultados se muestran en la **figura 51c**, se puede observar que las distintas zonas de la imagen presentan variación en su iluminación. Aunque hay mayor intensidad, si se compara con los otros ángulos, las variaciones son más altas.

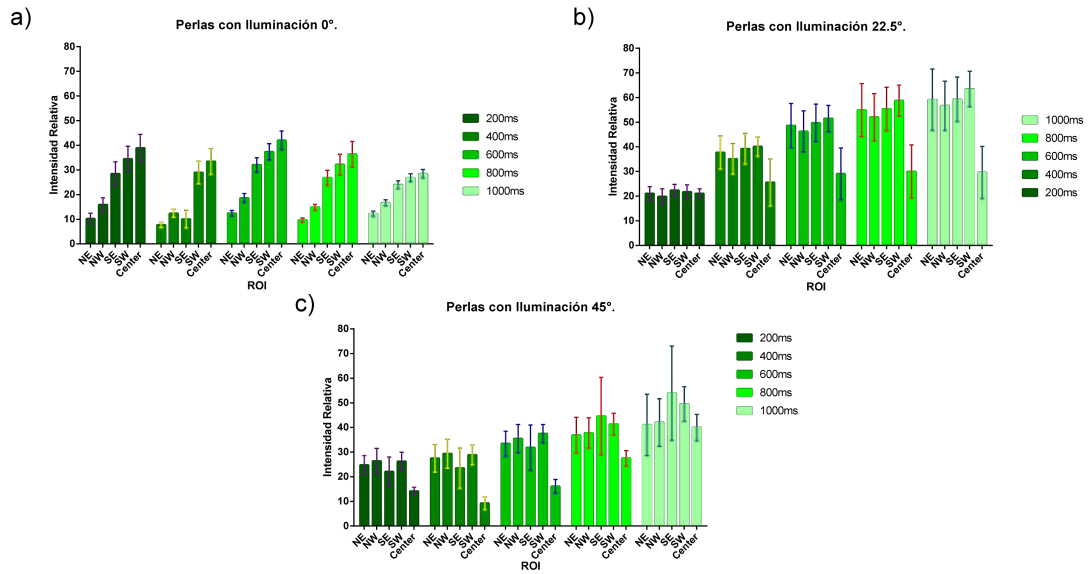


Figura 51. Comparación de la intensidad de las perlas fluorescentes verdes para los ángulos de iluminación de excitación de a) 0° , b) 22.5° y c) 45° , en 5 diferentes regiones de la imagen y 5 tiempos de exposición.

En el caso de las perlas fluorescentes rojas, cualitativamente se observa que las imágenes obtenidas presentan mayor consistencia en la iluminación, como se muestra en la figura 52. En esta figura se observa que aún con el LED con inclinación a 22.5° existe un alto contraste, no obstante, a los 45° , la contaminación lumínica existente en la imagen es evidente.

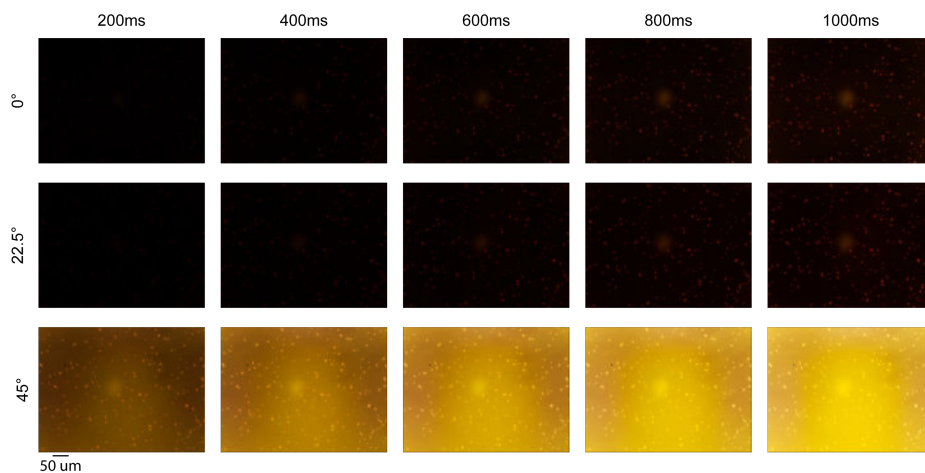


Figura 52. Prueba de canal de fluorescencia roja. Observación de perlas fluorescentes verdes de $3.2 \mu\text{m}$ de diámetro en 5 diferentes tiempos de exposición y 3 diferentes ángulos para la iluminación de excitación.

Al medir las intensidades de las perlas en las diferentes zonas de la imagen se obtienen los resultados mostrados en la figura 53. En la figura 53a, la intensidad de las perlas es baja a tiempos de exposición cortos, pero aún detectable. Ade-

más, se observa que existe más uniformidad de la iluminación de la imagen en comparación con los otros canales de tiempos de exposición. Esta uniformidad es más evidente con la iluminación en un ángulo de 22.5° , como se observa en la **figura 53b** para cada una de las imágenes analizadas. Con respecto al ángulo de 45° (**figura 53c**), el centro presenta una mayor iluminación de fondo, lo que indica que existe un menor contraste entre las perlas y el fondo.

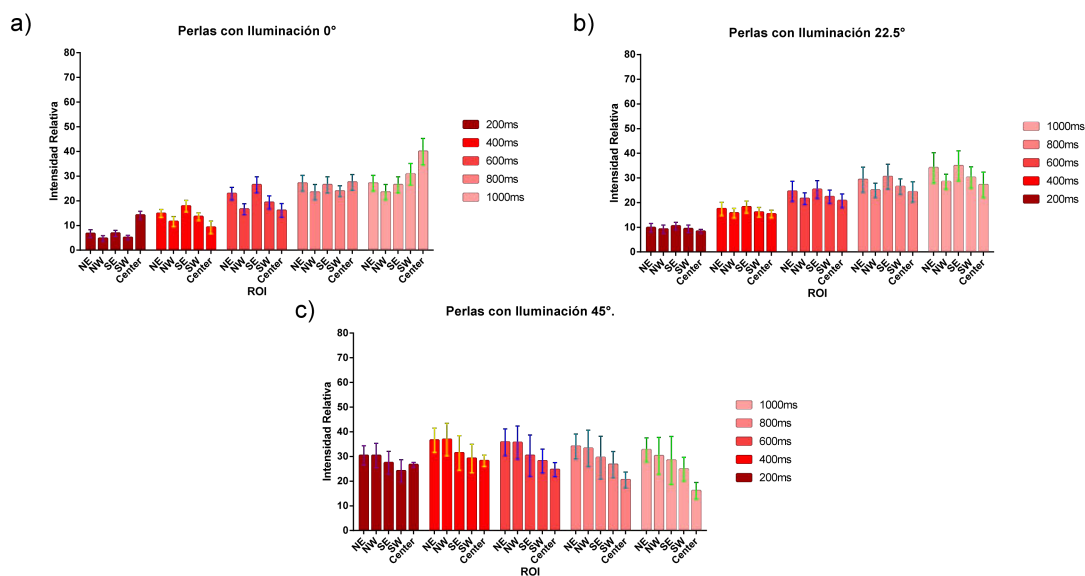


Figura 53. Comparación de la intensidad de las perlas fluorescente rojas para los ángulos de iluminación de excitación de a) 0° , b) 22.5° y c) 45° , en 5 diferentes regiones de la imagen y 5 tiempos de exposición.

Cada uno de los efectos y diferencias en las observaciones de las perlas puede deberse a que los filtros son diferentes entre sí y cada uno tendrá un comportamiento y desempeño diferentes. Otra de las razones de la diferencia de la iluminación entre cada una de las zonas de las imágenes, se debe a la ubicación del LED en el momento del enfoque, recordando que estos giran en conjunto con la platina y la dirección de la luz influye en cómo brillarán las perlas.

Para poder verificar cómo la dirección de la luz influye en la intensidad de la fluorescencia, se observa su comportamiento en todo el campo de visión, por lo que se colocan soluciones fluorescentes y se obtienen imágenes siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.5.1. De las imágenes obtenidas se selecciona aquellas que fueron capturadas con tiempos de exposición de 600 ms debido a que eran las que presentaba mejor iluminación y menos saturación. Se hacen mapas

de calor que indiquen las diferentes contribuciones de la emisión en los canales digitales de la imagen. En la **figura 54** se muestra como la fluorescencia es observada a través del sistema, notando el cambio entre el color característico de la sustancia y su emisión para los 3 fluoróforos utilizados.

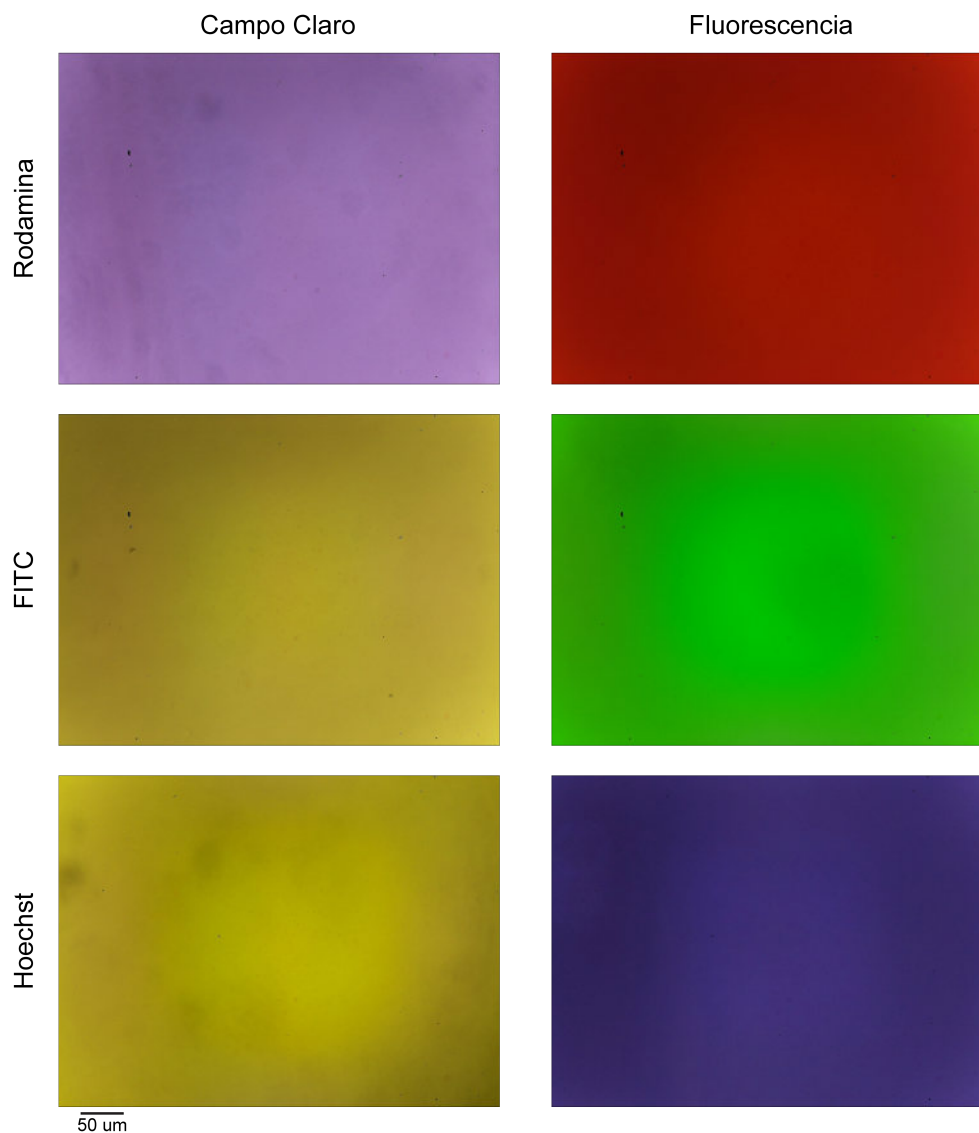


Figura 54. Ejemplos del cambio de fluorescencia para fluoróforo con iluminación de excitación a 0°

En la **figura 55** se muestran los resultados de observar soluciones de Hoechst, FITC y Dextran-Rodamina iluminadas con el LED de excitación inclinado a 0° con sus contribuciones en los canales rojo, verde y azul de la imagen.

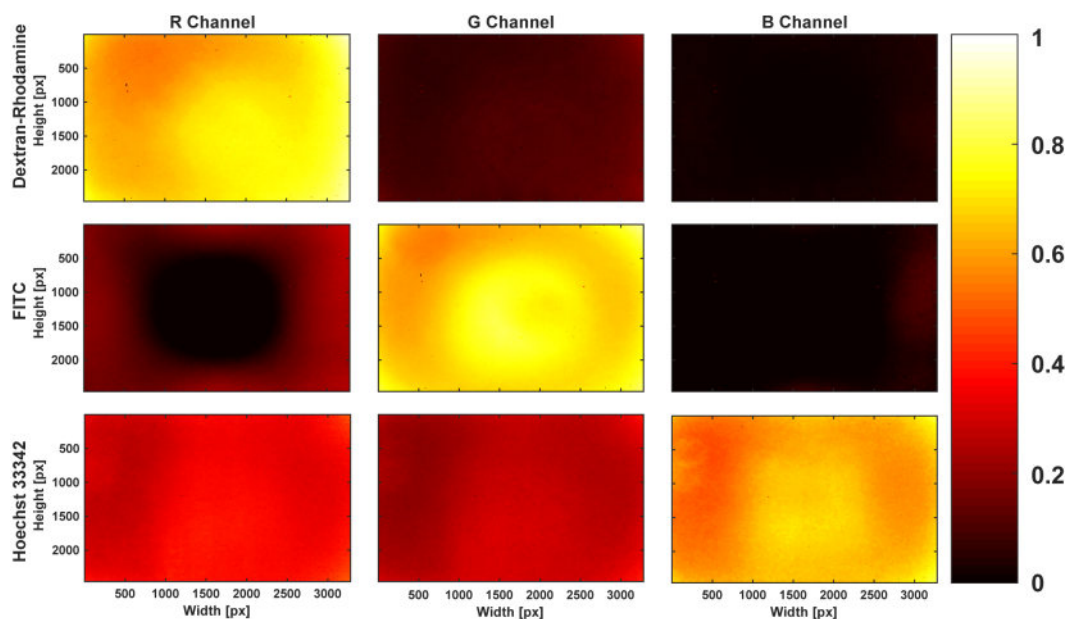


Figura 55. Análisis de la uniformidad y contribuciones en canales digitales de la cámara para 3 fluorescencias características: : naranja-rojo (Dextran-Rodamina), verde (FITC) y azul (Hoechst) para iluminación de excitación con inclinación de 0° .

Al analizar la **figura 55**, en la observación de Dextran-Rodamina se puede observar que su contribución en el canal R (rojo) es mayor en comparación con los otros canales. Esta solución fue iluminada con un LED verde desde el lado derecho de la imagen. Si se observa su contribución en el canal G (verde) hay más iluminación del lado derecho. Se observa una contribución baja de color verde, lo que indica que el filtro no está bloqueando la luz del LED en su totalidad. El canal B (azul), por su parte, muestra contribución en las orillas y nada al centro, aunque esta puede considerarse despreciable si observa la escala.

El caso más evidente de que la dirección desde dónde se ilumina a la muestra influye en la intensidad de la fluorescencia se puede observar en la emisión de FITC. Al hacer la división de canales, la contribución de color es mayor en el canal G. El canal R tiene contribución a las orillas y nada al centro, que se puede deber a las longitudes de onda de la emisión cercanas a lo que se consideraría como un color rojo, llega a ser detectadas por el sensor. En el caso del canal B, se puede observar la dirección desde donde se estaba excitando a la muestra, siendo que FITC debe ser iluminada con luz azul. La contribución que se aprecia del lado

derecho de la imagen en el canal azul puede estar asociada a la luz de excitación.

La solución de Hoechst analizada, muestra que las imágenes tienen contribuciones en los 3 canales, siendo el canal B el resultante con mayor iluminación. Los canales rojo y azul muestran contribuciones de aproximadamente 40%. Los niveles observados se atribuyen a que el filtro para estas imágenes es pasa-altas, y deja y permite el paso de luz. Si parte de la luz UV es detectada, digitalmente esta tendría contribuciones en el canal azul y rojo, lo que podría formar un color violeta. Estas pruebas dan un indicativo del desempeño de los filtros al bloquear la longitud de onda de excitación y dejar pasar la longitud de onda de emisión hacia la cámara. Se destaca que en la **figura 55**, los canales R, G y B para Dextran, FITC y Hoechst presentan un halo alrededor del centro, el cual se atribuye al efecto de viñeteo inherente de la cámara.

Las mismas pruebas fueron realizadas también para los ángulos de iluminación de 22.5° y 45°. En la **figura 56** pueden observarse los resultados de la observación en campo claro y fluorescencia de las soluciones iluminadas a 22.5° mientras que en la **figura 57** se observa el resultado del análisis de su uniformidad y contribuciones en los canales digitales de la imagen.

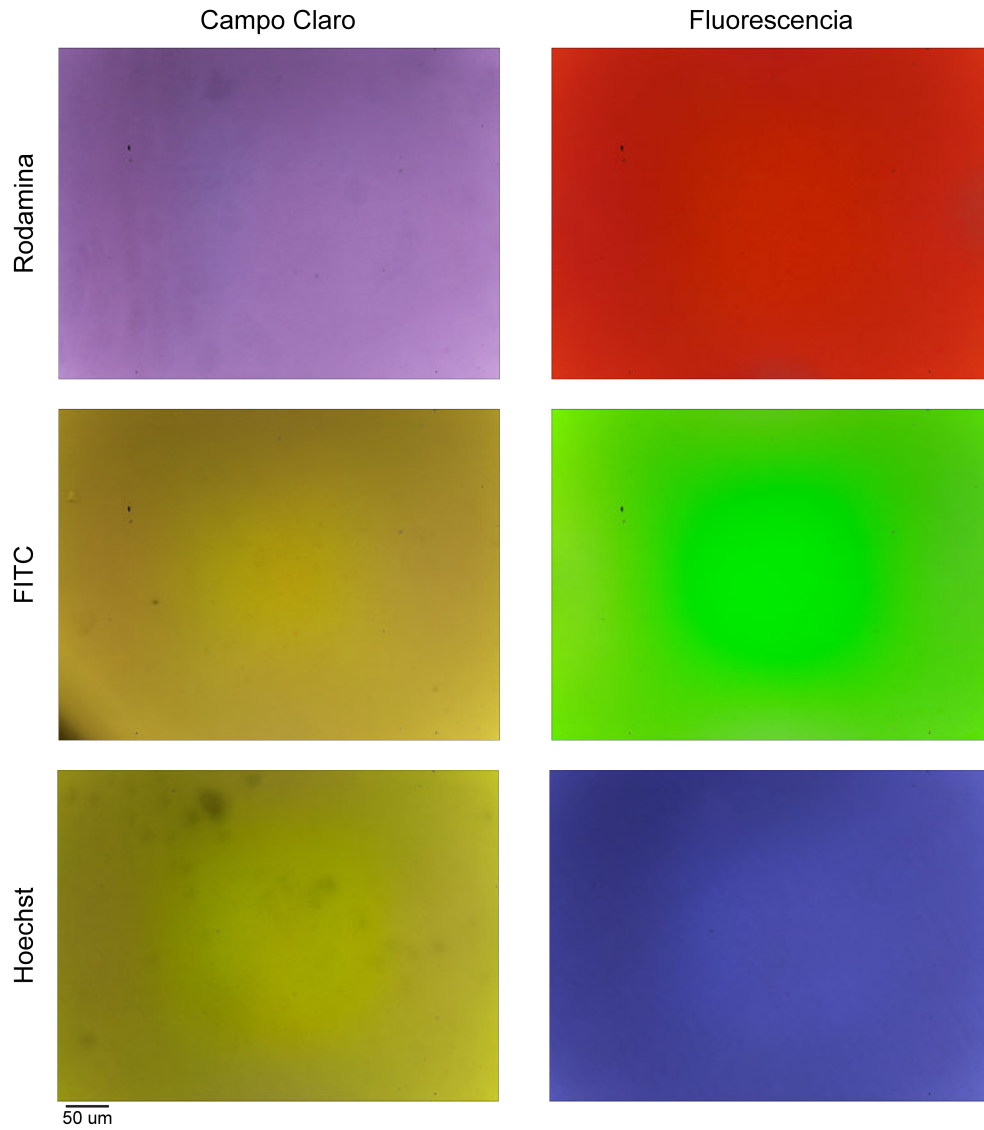


Figura 56. Ejemplos del cambio de fluorescencia para fluoróforo con iluminación de excitación a 22.5°

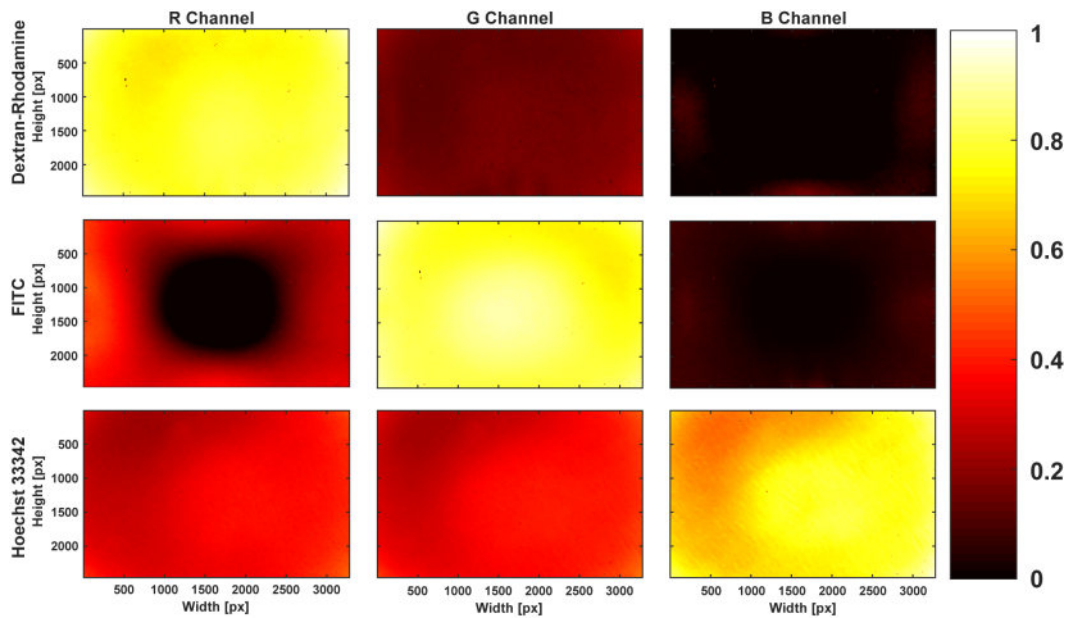


Figura 57. Análisis de la uniformidad y contribuciones en canales digitales de la cámara para 3 fluorescencias características: : naranja-rojo (Dextran-Rodamina), verde (FITC) y azul (Hoechst) para iluminación de excitación con inclinación de 22.5° .

En la **figura 57**, las imágenes muestran un comportamiento similar a sus contrapartes iluminadas a 0° , pero se debe destacar la diferencia en las contribuciones. En todas las imágenes se puede observar que hay mayor intensidad y un poco de saturación en la esquina izquierda, centro y esquina inferior derecha para Hoechst, FITC y Dextran, respectivamente. El halo descrito en la figura 55 puede también apreciarse en estas imágenes. Lo destacable es en el caso de FITC, pues sus contribuciones en el canal R y B presentan centros muy oscuros y orillas más iluminadas con respecto al centro. Esto puede seguir siendo evidencia del viñeteo de la cámara.

Por último, en la figura 58 se pueden observar las imágenes obtenidas con el LED de iluminación colocado en un ángulo de 45° . Cualitativamente, todas presentan una saturación de color. En la figura 59 puede observarse el análisis de la uniformidad de la emisión en las imágenes.

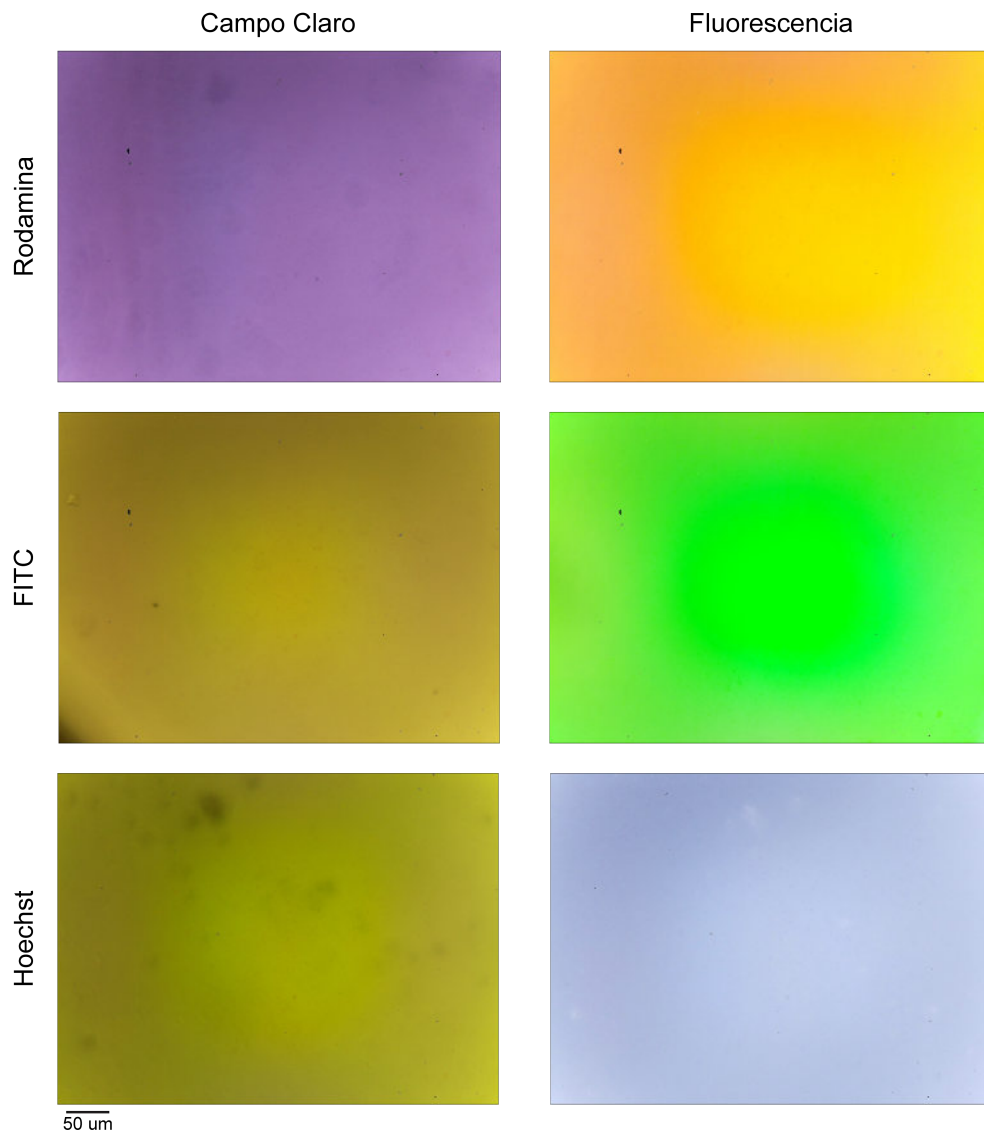


Figura 58. Ejemplos del cambio de fluorescencia para fluoróforo con iluminación de excitación a 45°

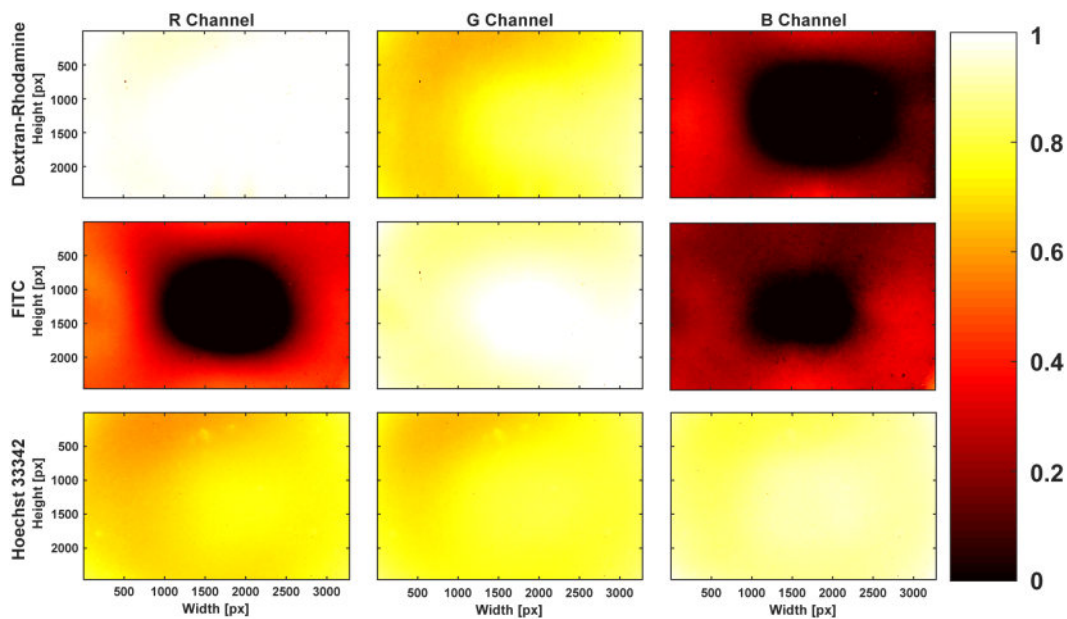


Figura 59. Análisis de la uniformidad y contribuciones en canales digitales de la cámara para 3 fluorescencias características: : naranja-rojo (Dextran-Rodamina), verde (FITC) y azul (Hoechst) para iluminación de excitación con inclinación de 45° .

En cada uno de los canales correspondientes a la emisión típica de cada fluoróforo, se puede observar una completa saturación, la cual se debe tanto a la emisión de la sustancia como a la dirección en la cual se está iluminando. Al estar el LED colocado a 45° , la iluminación es más directa a la muestra y esto provoca que se excite más. La calidad de los filtros no es suficiente para bloquear la contaminación lumínica en el camino óptico. En la figura 59 es apreciable la contaminación en los canales G y B para Dextran, R y B para FITC y R y G para Hoechst. Nuevamente, el halo observado en las figuras 55 y 57 es también percibido en los canales no correspondientes a la emisión típica del respectivo fluoróforo, mostrando un centro completamente oscuro, pero las orillas con contribuciones que oscilan entre el 20 % y 40 % de la iluminación total. Todos estos efectos se asocian a los resultados obtenidos en el análisis de la emisión de las perlas, por lo que se llega a las siguientes conclusiones:

- El uso de inclinación en la fuente de iluminación permite la observación de fluorescencia.
- El uso de ángulos entre 45° y 90° provoca que se observe saturación en la imagen y se pierda contraste en la observación.

- El ángulo de 22.5° resultó ser efectivo para la observación de fluorescencia verde y roja, pero no para la observación de fluorescencia azul.
- El ángulo de 0° o bien, la colocación de los LED de excitación de manera perpendicular al eje óptico probó ser efectivo para la observación de fluorescencia en los 3 canales.
- La dirección en la cual está orientado el LED hacia la muestra influye en su intensidad de emisión, así como en la uniformidad de la iluminación del campo de visión observado.
- La calidad del filtro y su tasa de transmisión influyen en la observación de fluorescencia.

Estas conclusiones permiten encontrar oportunidades de mejora en el diseño del mismo prototipo. La utilización de un anillo de LEDs que permita el uso de los 3 canales de fluorescencia puede ayudar a mejorar la uniformidad en el fondo. El uso de un dispositivo de este tipo permitiría prescindir de la utilización de LEDs de alta potencia. Una mejora posible es el uso de filtros de mayor calidad o bien la creación de éstos. Se recomienda que sean filtros pasa-banda y con un alto nivel de bloqueo de la excitación. Los filtros de poliéster utilizados fueron una opción sencilla para la prueba de concepto de microscopía de fluorescencia. Para aplicaciones más específicas, la obtención de filtros similares a los de un microscopio comercial de gama alta, ayudaría a mejorar el alto contraste. Por otra parte, el uso de altos tiempos de exposición puede ser reducido si se utiliza una cámara que cuente con obturador global, o bien si a la cámara utilizada se le implementa un obturador mecánico.

7.4 RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN DE LA FUNCIÓN DE DISPERSIÓN DE PUNTO

Como prueba complementaria para la verificación de la resolución, se realizó la obtención de la función dispersión de punto de acorde a lo descrito en el apéndice F. La función de dispersión de punto (PSF, Point Spread Function) describe la

respuesta de un sistema de captura de imágenes a un objeto puntual, otorgando información acerca de los límites de resolución y difuminación del sistema óptico [52, 53, 54, 55].

Las imágenes utilizadas fueron capturadas con 600 ms de exposición y con el resto de los parámetros de la cámara (ver Apéndice B) en estado predeterminado (sensibilidad automática; brillo, saturación, nitidez y contraste con valores en 50 [56, 57, 58, 59]).

El resultado obtenido se puede observar en la **figura 60**. En esta figura se pueden observar 3 perlas de 3 diferentes tamaños, seleccionadas de las imágenes obtenidas con su PSF correspondiente. Como se mencionó en la sección 6.5.1, cada una de ellas miden $1\ \mu\text{m}$ (azul), $3.0\ \mu\text{m}$ (roja) y $4.8\ \mu\text{m}$ (azules).

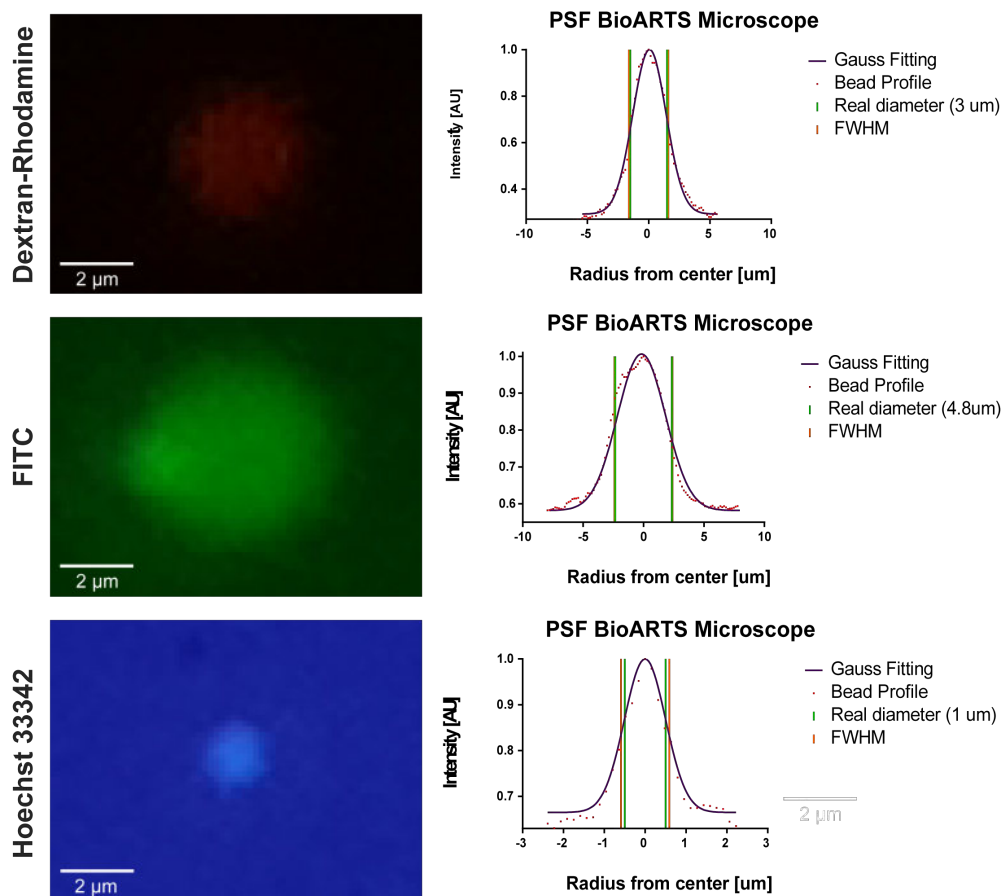


Figura 60. Función de dispersión de punto para perlas de 3 diferentes tamaños observadas en los experimentos de caracterización de la sección 6.5.1

El valor del ancho a la mitad del máximo (Full Width at Half Maximum, acrónimo FWHM), es un límite convencionalmente aceptado para la resolución de la imagen de un objeto puntual y se obtiene del ancho completo a la mitad del máximo de la PSF [54, 55]. Cada una de las funciones obtenidas en la **figura 60** indican que los FWHM conseguidos, denotados con la línea color verde, no se alejan de lo indicado como el diámetro real de la perla correspondiente, denotado con la línea color naranja. Los valores de cada FWHM son: $1.187 \mu\text{m}$ para la perla azul, $3.22 \mu\text{m}$ para la perla roja y $4.68 \mu\text{m}$ para la perla verde. Las tres perlas son resolubles en el sensor ya que se observa que su FWHM es muy cercana a los tamaños reales de éstas. La PSF de la perla azul permite demostrar que el microscopio es capaz de resolver objetos con tamaños de aproximadamente $1 \mu\text{m}$. Para poder conocer la función de dispersión del punto, hay que considerar objetos aún más puntuales. Un objeto con el tamaño de la resolución calculada o menor sería lo óptimo.

Para obtener resultados estadísticos que mostraran que el microscopio puede resolver las perlas adecuadamente, se determinaron las funciones de 40 perlas de cada color. En los 3 colores, las PSF obtenidas fueron promediadas considerando que las mediciones fueron tomadas con las perlas lo más centradas posible. Los resultados de la curva de ajuste de las perlas promedio mostradas en la **figura 61**, indican que el microscopio es capaz de resolver las perlas correctamente.

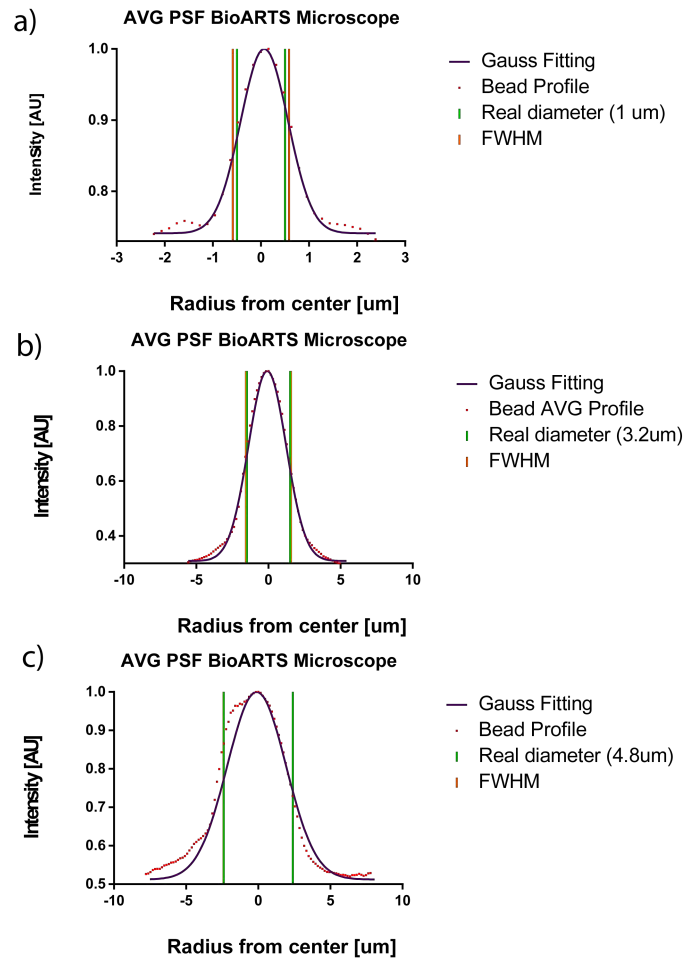


Figura 61. PSF de los perfiles promediados de las perlas a) azules ($FWHM_{avg} = 1.167 \mu\text{m}$); b) rojas ($FWHM_{avg} = 3.12 \mu\text{m}$) y c) verdes ($FWHM_{avg} = 4.8 \mu\text{m}$).

En base a los resultados obtenidos, se llega a las siguientes conclusiones:

- El sistema es capaz de resolver objetos de hasta $1 \mu\text{m}$.
- La difuminación presente en las imágenes aún permite alcanzar la resolución de objetos del tamaño indicado.

Las oportunidades de mejora observadas en este aspecto es la resolución digital del sistema, puesto que con las perlas de $1 \mu\text{m}$ se obtienen imágenes que no son muestreadas correctamente (con poca definición). Otro de los aspectos tiene que ver con el sistema óptico, puesto que con una apertura numérica mayor se podría obtener una mejor resolución óptica y la obtención de la función de dispersión de punto puede brindar más información sobre el sistema que hacer únicamente la observación de algún patrón de resolución.

7.5 OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN EL MICROSCOPIO MINIATURA

Una vez que se obtiene la PSF, se realizó una prueba de concepto, en la cual, se observaron 3 diferentes tipos de células, cada una teñida con diferente fluorocromo para observar la función en los 3 diferentes canales: neutrófilos teñidos con Hoeschst, células THP-1 de leucemia monocítica aguda teñidas con Calceína y *Saccharomyces cerevisiae* (*S. Cerevisiae*) teñidas con mCherry, el resultado de la prueba se muestra en la **figura 62**.

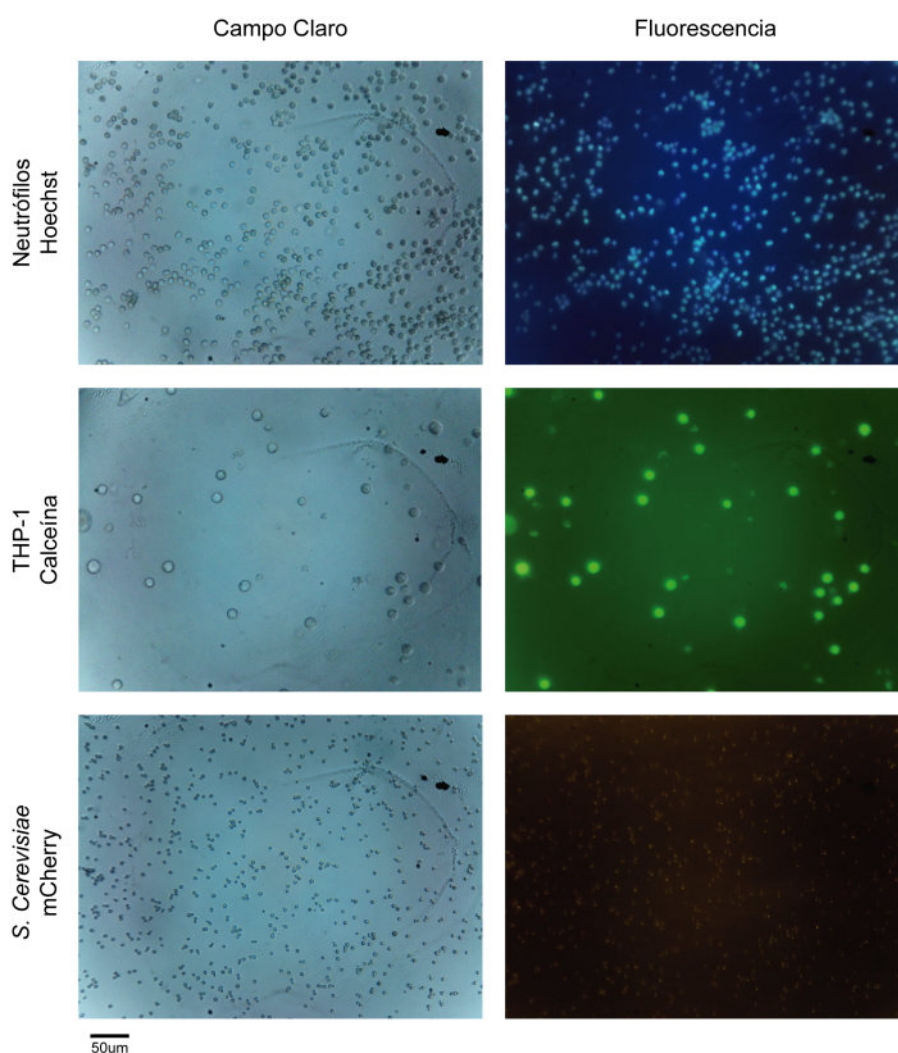


Figura 62. Observación de diferentes células en campo claro y fluorescencia con el microscopio miniatura.

De la **figura 62** se puede notar que los canales que mejor respuesta tuvieron fueron el canal de Hoechst y FITC, pues se observa que en campo claro y en fluorescencia las células examinadas co-localizan y se ven contrastadas con el fondo

de la imagen. En el caso del canal de mCherry, las células de *S. Cerevisiae* en campo de fluorescencia co-localizan con su contraparte en campo claro, no obstante, la intensidad de la fluorescencia que emiten no es suficiente para ser contrastadas por el fondo. Este problema se puede deber a que el LED que se está utilizando no es suficiente para excitar mCherry, pues el pico máximo de absorción de mCherry está en 585 nm mientras que el LED emite luz en un pico máximo de 535 nm. A estas condiciones se le añade el funcionamiento y la sensibilidad del sensor, por tanto, la observación de la fluorescencia se ve pobre en este canal.

La oportunidad de mejora que se encuentra en este experimento es el cambio del LED verde, por un LED amarillo o con longitudes cercanas a los 590 nm, lo que puede ayudar a excitar más el fluoróforo de mCherry. Cada una de las imágenes puede ser procesada con un aumento de contraste por medio de la eliminación del fondo con las modalidades de la cámara que se indican en el apéndice B.

7.6 RESULTADOS DE EXPERIMENTO DE FORMACIÓN DE NETS

Para este experimento se realiza el procedimiento descrito en la sección 6.6. Al hacer la observación de las células en micro-pozos, se busca observar la formación de NETs en un periodo de 2 horas. A neutrófilos marcados con Hoechst, Sytox Green y Sytox Orange se les agrega LPS a manera de estímulo para provocar la formación de trampas extracelulares.

En la **figura 63** pueden observarse las imágenes en 3 tiempos diferentes del experimento en los 4 canales del microscopio: campo claro, azul, verde y rojo. En ellos se observan los pozos con células, la fluorescencia de Hoechst, Sytox Green y Sytox Orange, respectivamente.

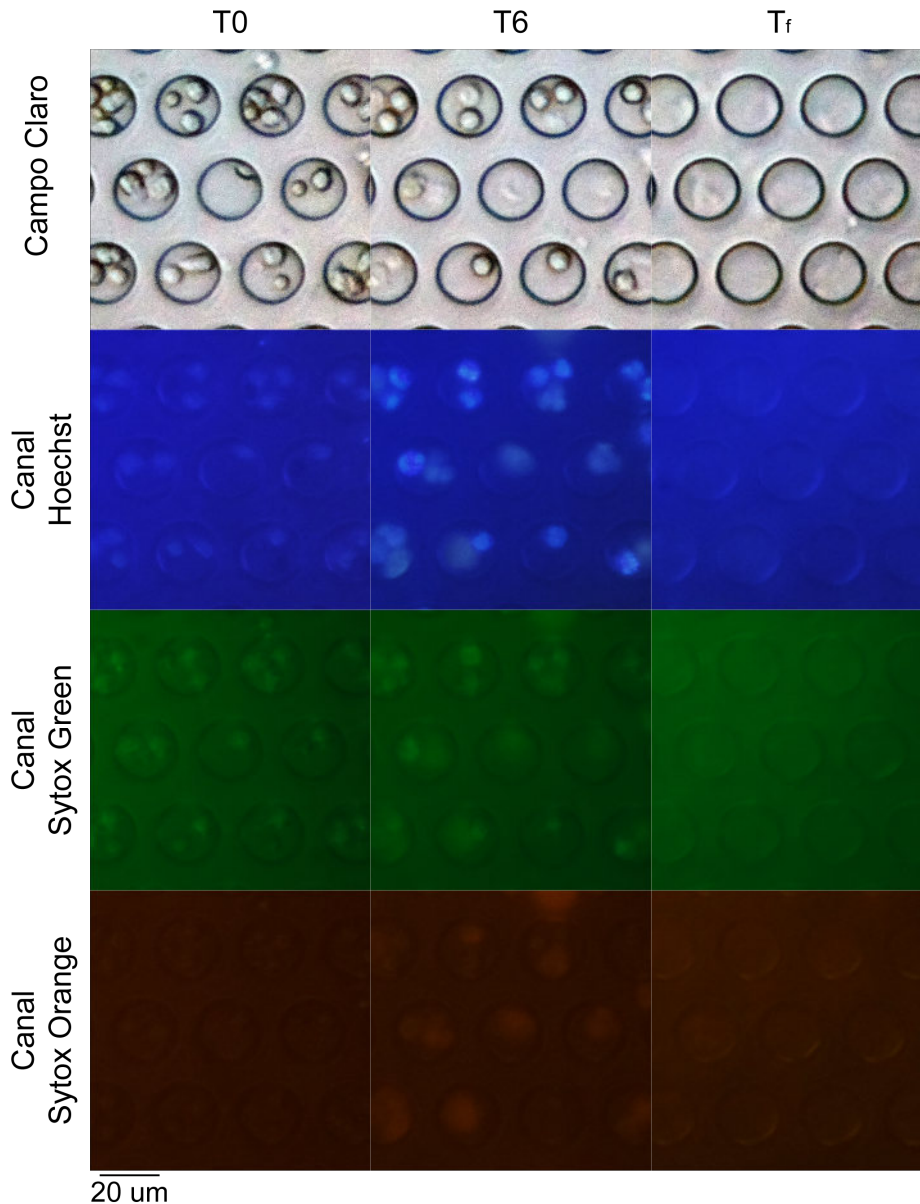


Figura 63. Experimento de monitoreo de formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). En la figura se aprecian 3 tiempos diferentes del experimento, al T_0 se ve que las células están sedimentadas en los pozos y únicamente se ve fluorescencia de Hoechst mientras que en los dos canales restantes no se observa nada. En el T_6 se observa como el ADN se ha descondensado en el canal de Hoechst, y como se han formado las trampas en los canales de Sytox Green y Sytox Orange. En T_f ya no se observan ni células y fluorescencia, indicando de que las células han muerto y los colorantes se han diluido en la solución.

En la figura 63 puede observarse el tiempo 0 (T_0), correspondiente al inicio del experimento cuando se le ha agregado el estímulo de LPS a las células. A partir de este punto, cada 10 min se tomó una fotografía en todos los canales, y se puede observar cómo, en los canales de fluorescencia, el único con señal es el de Hoechst, mostrando los núcleos de los neutrófilos, mientras que los canales Sytox Green y

Orange no presentan señal específica. Los fluoróforos utilizados para ser observados en los últimos dos canales no son permeables a la célula. Cabe destacar que en este experimento se tuvieron problemas con el canal verde, ya que este presentaba mucha iluminación de fondo en comparación con las pruebas que se habían realizado con perlas, lo que se atribuye a cambios en el índice de refracción de la luz debido a las soluciones y mismo chip microfluídico. Si bien esto representa un problema, se decidió continuar con el experimento para observar el desempeño del microscopio en este canal.

En el caso del tiempo intermedio (T_6) que corresponde a los XX min de incubación, se puede observar como la cromatina se decondensa del núcleo y comienza a salir de la célula. Esto se aprecia en la señal observada en los canales de Sytox Green y Orange. La señal es un indicativo de que la célula ha entrado en estado de NETosis. El canal azul muestra todavía la cromatina marcada debido a Hoechst, mientras que el campo claro muestra como algunas células han roto por completo su membrana. En la tercera columna de imágenes, se puede observar como ya no hay presencia de células en los pozos y por lo tanto no hay fluorescencia, lo cual es un indicativo de que ocurrió la NETosis, pues toda la cromatina de la célula se ha diluido en la solución.

Si bien la observación cualitativa de las imágenes proporciona noción sobre el proceso, se deben analizar cuantitativamente midiendo la intensidad de fluorescencia neta. Se sigue el procedimiento descrito en la sección 6.6. Al analizar los datos se obtienen las gráficas mostradas en la **figura 64**, con su respectiva comparación con el microscopio Zeiss. Cada una de las gráficas muestra la intensidad de fluorescencia de cada uno de los pozos a lo largo del tiempo que duró el experimento. El trazo rojo indica el promedio de la intensidad observada en todos los pozos a lo largo del tiempo. Se puede apreciar también el experimento control, el cual tiene los mismos parámetros, con excepción del estímulo de LPS.

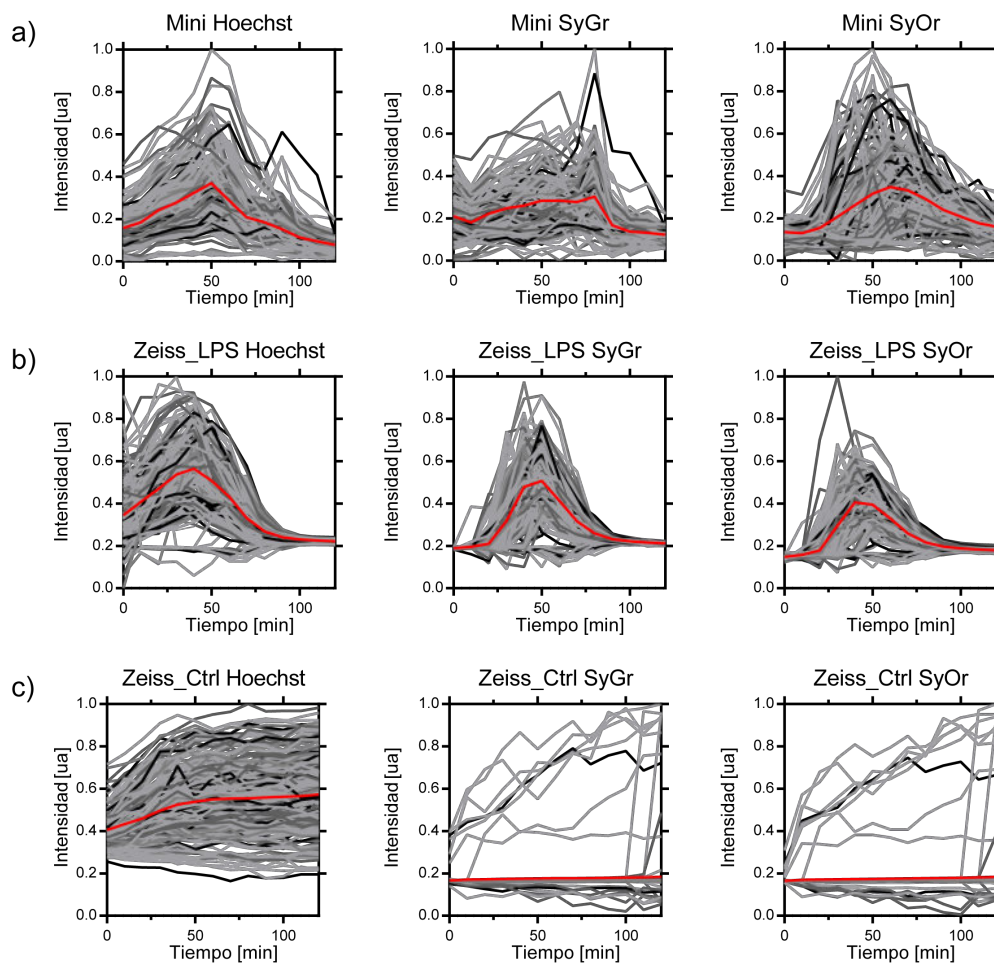


Figura 64. Resultados del análisis de intensidad de fluorescencia neta de las trampas extracelulares de neutrófilos. Las líneas grises y negras indican la fluorescencia de cada uno de los pozos a lo largo del experimento, mientras que la línea roja indica el promedio de las intensidades de los pozos a lo largo del experimento. En el primer renglón de imágenes, se aprecian los resultados obtenidos con el microscopio miniatura. El segundo renglón muestra el experimento comparativo realizado en el microscopio Zeiss. En el tercer renglón se observan los resultados del experimento de control.

En la **figura 64** se aprecia que, aunque el experimento realizado en el microscopio miniatura no tiene el mismo resultado que el realizado en el microscopio Zeiss, sigue la misma tendencia. En un inicio, en el canal de Hoechst existe una señal que aumenta continuamente hasta llegar a un pico alrededor de los 50 min. En este momento es cuando se ha descondensado el núcleo. Posteriormente, la señal en los 3 canales comienza a disminuir. Hacia el final del experimento (120 min) se aprecia que ya no hay señal en ninguno de los 3 canales, lo que indica la desaparición de las células. En el caso del canal de Sytox Green del microscopio miniatura no es tan notorio dicho comportamiento. En canal de Sytox Orange es en donde se observa que únicamente está la señal de fondo y comienza a aumen-

tar. El aumento indica la descondesación del núcleo y su salida de la célula, puesto que Sytox Orange se ha comenzado a adherir a la cromatina.

Si se aprecia el renglón del experimento de control en el microscopio Zeiss, se observa que, a lo largo de todo el experimento, la señal en el canal de Hoechst fue constante. Los canales de Sytox Green y Sytox Orange tienen algunas señales de los pozos, pero esto se debe a que las células comienzan a morir. Una de las razones que los resultados sigan la tendencia, pero no sean completamente similares a los resultados obtenidos en el microscopio Zeiss, se debe a que al momento de cambiar entre canales para tomar las fotografías existen artefacto de movimiento en el microscopio debido al cambio de filtros. Estos desplazamientos provocan que el campo de visión cambie y los pozos que se habían observado en las primeras fotografías se encuentre en otro lugar de la imagen. Aunque sea cortos, los desplazamientos en la imagen pueden provocar que las mediciones de la fluorescencia no sean precisas o provoque efectos ópticos no reflejos que alteren las mediciones, no obstante, analizando la imagen pueden detectarse los pozos.

De este experimento se concluye lo siguiente:

- El microscopio tiene la capacidad para observar un experimento de análisis de un fenómeno biológico en un chip microfluídico.
- Se tiene problemas con el canal verde, por lo que deben buscarse soluciones para que funcione a cabalidad.
- Los canales de Hoechst y Sytox Orange tuvieron un buen desempeño a lo largo del experimento, pero siguen presentando ruido de fondo.
- El sistema de cambio de filtros debe mejorarse para evitar que ocurran desplazamiento o vibraciones no deseadas al momento de está desarrollando un experimento.

CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se ha desarrollado un microscopio óptico digital miniatura. Se realizó el estudio de la óptica que permitió entender los fundamentos del funcionamiento del microscopio para desarrollar un prototipo en miniatura. El proceso consistió en el diseño y fabricación de las piezas mecánicas y electrónicas necesarias para el funcionamiento del microscopio. Cada una de estas piezas, salvo las descargadas para ser modificadas fueron desarrolladas buscando que el microscopio fuese sencillo, tanto en ensamblaje como en funcionamiento. Es importante resaltar que el prototipo no es perfecto, pero ha logrado su cometido. El diseño desarrollado puede ser mejorado, lo cual evidencia su potencial como herramienta de diagnóstico e investigación. Una prueba de que puede ser usado para análisis biológicos es el experimento realizado de las trampas extracelulares de neutrófilos.

Las mejoras que se le pueden realizar a este trabajo son: la implementación y mejora de un sistema mecánico móvil, la obtención de nuevos filtros, la fabricación de las piezas en metal y la obtención de diferentes sistemas de microlentes para mejoras ópticas. Estos cambios pueden dotar al microscopio de funciones que se asemejarían a las de un microscopio comercial de gama alta.

A pesar de que aún falta trabajo para su implementación como el sistema de análisis para un micro-laboratorio dentro de un nanosatélite, en este trabajo quedan sentadas las bases para el desarrollo de un microscopio en miniatura, de manera que los siguientes pasos deben ser encaminados a la optimización de su desempeño y su posterior uso en ambientes donde las condiciones no sean controladas.

PERSPECTIVAS

El actual prototipo de microscopio permite la captura de imágenes en campo claro y 3 diferentes campos de fluorescencia. Cuenta con funciones básicas de post-procesamiento y procesamiento en tiempo real. Actualmente se ha probado que el microscopio tiene la capacidad de poder monitorear un experimento biológico, además de que no puede pasar desapercibido su potencial como una herramienta de diagnóstico in situ. Para mejorar el desempeño del microscopio se tienen diferentes perspectivas sobre lo que se debe hacer para sus mejoras.

En el caso de la óptica, el uso de diferentes lentes o bien el aprovechamiento de los sistemas de microlentes puede permitir que se obtengan mejores resultados al hacer los cálculos pertinentes. En algunos casos, con respecto a la observación de la fluorescencia existen algunos problemas todavía, como el fondo de la iluminación y que algunos fluorocromos no se observan en ciertas concentraciones. Este problema puede solucionarse si se utiliza otra cámara más sensible, si se hace la implementación de un obturador mecánico o si se utilizan mejores filtros ópticos de colores. Otra perspectiva es darle ubicuidad al sistema y hacer uso de teléfonos celulares inteligentes con potencia suficiente en sus cámaras y sistema operativos. La adaptación de este tipo de tecnologías puede garantizar un mayor acceso a la microscopía.

Otro de los retos que restan para este proyecto es la fabricación de sus piezas en metal con cambios ligeros en su diseño. Se deben hacer cambios en la rosca del objetivo y la platina a una rosca estándar, milimétrica y con paso de 1 mm para poder tener la funcionalidad de las piezas diseñadas actualmente. Además, se deben hacer pruebas relacionadas a vibraciones mecánicas, esfuerzos, resistencia y horas de vida de cada uno de los componentes.

Por último, se espera que el microscopio pueda hacer sus pruebas finales ya como una herramienta de diagnóstico para alguna enfermedad, para lo cual se tienen planteadas diferentes ideas que van de la mano combinadas con la microfluídica. Estas pruebas finales se podrían hacer en ambientes de escasos recursos en México, dónde el acceso a tecnologías de punta para el diagnóstico de enfermedades es restringido. Una herramienta sencilla como la propuesta en este proyecto, podría provocar un gran impacto en estos ambientes. Así como estas funciones y perspectivas propuestas hay muchas, lo cual es prueba de que el microscopio prototipo desarrollado tiene un gran potencial como herramienta de investigación para biólogos y médicos.

REFERENCIAS

- [1] "Microscopio," *Diccionario de la lengua española*. Real Academia Española, 2014.
- [2] A. J. M. Wollman, R. Nudd, E. G. Hedlund, and M. C. Leake, "From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope," *Open Biol.*, vol. 5, 2015.
- [3] X. Chen, B. Zheng, and H. Liu, "Optical and digital microscopic imaging techniques and applications in pathology," *Anal. Cell. Pathol.*, vol. 34, pp. 5-18, 2011.
- [4] "Zacharias Janssen." [Online]. Available: http://www.theojanssen.ca/documents/Janssen/ZachariasJanssen/Zacharias_Janssen.htm.
- [5] "Microscopy History Line." [Online]. Available: <http://www.history-of-the-microscope.org/microscope-history-timeline-design-development-inventions.php>.
- [6] C. Richardson, "Hooke's compound microscope and its illuminating system, 1665-1675." [Online]. Available: <http://www.ssplprints.com/image/100214/richardson-claire-hookes-compound-microscope-and-its-illuminating-system-1665-1675>.
- [7] J. Werther, "Anton van Leeuwenhoek." [Online]. Available: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leeuwenhoek_Microscope.png.
- [8] R. A. Serway and J. W. Jewett, "Light and Optics," in *Physics for Scientists and Engineers with modern physics.*, 7th ed., Thomson, Ed. Belmont, CA, 2008, pp. 977-1110.
- [9] P. Ronan, "Light and photosynthetic pigments," *KhanAcademy*. [Online]. Available: <https://www.khanacademy.org/science/biology/photosynthesis-in-plants/the-light-dependent-reactions-of-photosynthesis/a/light-and-photosynthetic-pigments>.
- [10] E. Hecht, "Electromagnetic Theory, Photons and Light," in *Optics*, Addison Wesley, 2003.

- [11] E. Hecht, "Thin Lenses, in *Optics*, 4th ed., Addison Wesley, 2003.
- [12] E. Hecht, "Finite Imagery, in *Optics*, 4th ed., Addison Wesley, 2003, pp. 170-173.
- [13] A. C. . Guyton and J. E. Hall, "Optics of the Eye, in *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed., Elsevier Saunders, 2006, pp. 617-618.
- [14] D. W. Piston, "Choosing objective lenses: the importance of numerical aperture and magnification in digital optical microscopy," *Biol. Bull.*, vol. 195, no. 1, pp. 1-4, 1998.
- [15] M. W. Davidson, "Resolution," *MicroscopyU*. [Online]. Available: <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/resolution>.
- [16] S. A. Schwartz, J. S. Silfies, and M. W. Davidson, "The Diffraction Barrier in Optical Microscopy," *MicroscopyU*. [Online]. Available: <https://www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/the-diffraction-barrier-in-optical-microscopy>.
- [17] J. W. Lichtman and J.-A. Conchello, "Fluorescence microscopy," *Nat. Methods*, vol. 2, no. 12, pp. 910-919, 2005.
- [18] B. R. Masters, "The Development of Fluorescence Microscopy," *eLS*, pp. 1-9, 2010.
- [19] M. Singer, "What does it mean for a pigment to absorb light?," *KhanAcademy*.
- [20] "Epifluorescence Microscope Basics," *ThermoFisher Scientific, Molecular Probes School of Fluorescence*, 2017. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/epifluorescence-microscope-basics.html>.
- [21] R. C. Gonzalez and R. E. Woods, "Image Sensing and Acquisition, in *Digital Image Processing*, 2nd ed., Prentice Hall, 1992, pp. 45-47.
- [22] K. Kumbhar and K. P. Kshirsagar, "Comparative Study of CCD & CMOS Sensors for Image Processing," *Int. J. Innov. Res. Electr. Electron. Instrum. Control Eng.*, vol. 3, no. 12, pp. 194-196, 2015.
- [23] J. S. Cybulski, J. Clements, and M. Prakash, "Foldscope: Origami-based paper microscope," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, 2014.

- [24] A. R. Miller *et al.*, "Portable, battery-operated, low-cost, bright field and fluorescence microscope," *PLoS One*, vol. 5, no. 8, pp. 8-10, 2010.
- [25] J. Chang *et al.*, "Automated Tuberculosis Diagnosis Using Fluorescence Images from a Mobile Microscope," *Med. Image Comput. Comput. Interv.*, no. 15, pp. 345-352, 2012.
- [26] Z. J. Smith *et al.*, "Cell-phone-based platform for biomedical device development and education applications," *PLoS One*, vol. 6, no. 3, 2011.
- [27] N. A. Switz, M. V. D'Ambrosio, and D. A. Fletcher, "Low-cost mobile phone microscopy with a reversed mobile phone camera lens," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, 2014.
- [28] Y.-L. Sung, J. Jeang, C.-H. Lee, and W.-C. Shih, "Fabricating optical lenses by inkjet printing and heat-assisted curing of polydimethylsiloxane for in situ smartphone microscopy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 20, no. 1, pp. 1-4, 2015.
- [29] T. Baden, A. M. Chagas, G. Gage, T. Marzullo, L. L. Prieto-Godino, and T. Euler, "Open Labware: 3-D Printing Your Own Lab Equipment," *PLoS Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 1-12, 2015.
- [30] A. M. Chagas, T. Baden, L. L. Prieto-Godino, and A. B. Arrenberg, "The 100 Euro Lab: A 3-D Printable Open Source Platform For Fluorescence Microscopy, Optogenetics And Accurate Temperature Control During Behaviour Of Zebrafish, Drosophila And C. elegans," *bioRxiv*, no. Ccd, pp. 6-8, 2017.
- [31] J. P. Sharkey, D. C. W. Foo, A. Kabla, J. J. Baumberg, and R. W. Bowman, "A one-piece 3D printed flexure translation stage for open-source microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 87, no. 2, pp. 1-7, 2016.
- [32] J. Haseloff and R. W. Bowman, "Project OpenScope," 2015. [Online]. Available: <http://2015.igem.org/Team:Cambridge-JIC/Project>.
- [33] Y. S. Zhang *et al.*, "A cost-effective fluorescence mini-microscope for biomedical applications," *Lab Chip*, vol. 15, no. 18, pp. 3661-3669, 2015.
- [34] K. K. Ghosh *et al.*, "Miniaturized integration of a fluorescence microscope," *Nat. Methods*, vol. 8, no. 10, pp. 871-878, 2011.
- [35] K. Murari, E. Greenwald, R. Etienne-Cummings, G. Cauwenberghs, and N. Thakor, "Design and characterization of a miniaturized epi-illuminated microscop-

pe,"*Proc. 31st Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Eng. Futur. Biomed. EMBC 2009*, pp. 5369-5372, 2009.

[36] S. Lee *et al.*, "CubeSat Design Specification,"2014.

[37] E. Upton, "New 8 Megapixel Camera Board on sale at \$25,"2016. [Online]. Available: <https://www.raspberrypi.org/blog/new-8-megapixel-camera-board-sale-25/>.

[38] "Rpi Camera Module. Technical Parameters (v.2 board)."[Online]. Available: https://elinux.org/Rpi_Camera_Module.

[39] H.-C. Tang, "Optical lens system for taking image,"*US 7,564,635 B1*, 2009.

[40] E. Hecht, "Thick lens and lens systems,"in *Optics*, 4th ed., Addison Wesley, 2003, pp. 243-246.

[41] "Raspberry pi camera case/enclosure."[Online]. Available: <https://www.thingiverse.com/thing:92208>.

[42] "A Graphical User Interface, written in Python, for use with the Raspberry Pi Camera."[Online]. Available: <http://smokespark.blogspot.mx/2015/05/a-python-graphical-user-interface-for.html>.

[43] "Raspberry Pi Stepper Motor Control with L293D / ULN2003A,"*Raspberry Pi Tutorials*. [Online]. Available: <https://tutorials-raspberrypi.com/how-to-control-a-stepper-motor-with-raspberry-pi-and-l293d-uln2003a/>.

[44] "Using A Joystick On The Raspberry Pi Using An MCP3008,"2014. [Online]. Available: <https://www.raspberrypi-spy.co.uk/2014/04/using-a-joystick-on-the-raspberry-pi-using-an-mcp3008/>.

[45] "The fluorescence microscope,"*Alfred Nobel Memorial Foundation, Nobel Prize Web Site*. [Online]. Available: <https://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/>.

[46] M. W. Davidson and K. R. Spring, "Introduction to Fluorescence Microscopy,"*MicroscopyU*. [Online]. Available: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>.

[47] W. Zhong, "Using LEDs as a low-cost source to detect GFP and DsRED."[Online]. Available: <http://wormlab.rice.edu/LED/>.

[48] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, and E. Frise, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 672-682, 2012.

[49] "IMX219PQ, CMOS Image Sensor for Mobile Products (Smartphones or Tablets)."[Online]. Available: http://www.sony-semicon.co.jp/products_en/new_pro/april_2014/imx219_e.html#Table1.

[50] I. T. Young, J. J. Gerbrands, and L. J. van Vliet, "Shading Correction," *Image Processing Fundamentals*. [Online]. Available: <http://www.mif.vu.lt/atpazinimas/dip/FIP/fip-Shading-2.html>.

[51] "Zeiss Axio Observer Microscope, Product Information and documentation." [Online]. Available: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/light-microscopes/axio-observer-for-biology.html>.

[52] V. Sacek, "Point Spread Function (PSF)," *Notes on Amateur in Telescope Optics*, 2006. [Online]. Available: http://www.telescope-optics.net/diffraction_image.htm.

[53] "Point Spread Function," *Scientific Volume Imaging*. [Online]. Available: <https://svi.nl/PointSpreadFunction>.

[54] D. van Valen, "Point Spread Function," *Caltech Rprgr.*, vol. 2, pp. 6-10, 2009.

[55] "Point Spread Function and Resolution," *Center for Advanced Microscopy, Northwestern University*. [Online]. Available: <https://cam.facilities.northwestern.edu/588-2/point-spread-function-and-resolution/>.

[56] D. Jones, "Raspberry Pi Camera Documentation. API - The PiCamera Class: ISO." [Online]. Available: https://picamera.readthedocs.io/en/release-1.13/api_camera.html#picamera.PiCamera.iso.

[57] D. Jones, "Raspberry Pi Camera Documentation. API - The PiCamera Class: AWB Modes," 2016. [Online]. Available: http://picamera.readthedocs.io/en/release-1.13/api_camera.html#picamera.PiCamera.awb_mode.

[58] D. Jones, "Raspberry Pi Camera Documentation. API - The PiCamera Class: Exposure Modes." [Online]. Available: http://picamera.readthedocs.io/en/release-1.13/api_camera.html#picamera.PiCamera.exposure_mode.

[59] D. Jones, "Raspberry Pi Camera Documentation. API - The PiCamera Class: Saturation." [Online]. Available: http://picamera.readthedocs.io/en/release-1.13/api_camera.html#picamera.PiCamera.saturation.

[60] "Phototoxicity in Microscopy Literature References," *MicroscopyU*. [Online]. Available: <https://www.microscopyu.com/references/cellular-phototoxicity>.

[61] D. Jones, "Raspberry Pi Camera Documentation. Camera Hardware: Theory of Operation," 2016. [Online]. Available: <https://picamera.readthedocs.io/en/release-1.13/fov.html>.

[62] D. Jones, "Raspberry Pi Camera Documentation. Camera Hardware: Exposure Time." [Online]. Available: <https://picamera.readthedocs.io/en/release-1.13/fov.html#exposure-time>.

[63] D. Jones, "Raspberry Pi Camera Documentation. Camera Hardware - Sensor Modes." [Online]. Available: <https://picamera.readthedocs.io/en/release-1.13/fov.html#sensor-modes>.

[64] (Nikon), "DSLR Camera Basics: ISO Sensitivity." [Online]. Available: <http://imaging.nikon.com/lineup/dslr/basics/13/>.

[65] E. Atamian, "¿Cómo Usar El ISO Correctamente En Tus Fotografías?," 2014. [Online]. Available: <http://www.blogdelfotografo.com/iso/>.

[66] "ISO 12232:2006. Photography - Digital still cameras - Determination of exposure index, ISO speed ratings, standard output sensitivity, and recommended exposure index." 2006.

[67] T. Vorenkamp, "Understanding Camera Shooting/Exposure Modes."

[68] "Changing the contrast and brightness of an image." [Online]. Available: https://docs.opencv.org/3.3.0/d3/dc1/tutorial_basic_linear_transform.html.

[69] R. C. Gonzalez and R. E. Woods, "Histogram Processing," in *Digital Image Processing*, 2nd ed., Prentice Hall, 1992, pp. 88-90.

[70] M. D. Fairchild, "Saturation," in *Color Appearance Models*, 2nd ed., M. A. Kriss, Ed. John Wiley and Sons, LTD.

- [71] H.-C. Lee, "Color Balance," in *Introduction to Color Imaging Science*, Cambridge: Cambridge University Press, 2005, pp. 450-458.
- [72] D. Jones, "Raspberry Pi Camera Documentation. Camera Hardware: Background Processes," 2016. [Online]. Available: <https://picamera.readthedocs.io/en/release-1.13/fov.html#background-processes>.
- [73] A. C. . Guyton and J. E. Hall, "Leukocytes (White Blood Cells)," in *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed., Elsevier Saunders, 2006, p. 429.
- [74] M. J. Kaplan and M. Radic, "Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 6, pp. 2689-2695, 2012.
- [75] M. Herrmann, "Neutrophils & NETs orchestrate initiation and resolution in gout and other inflammatory diseases," *University of Washington, Dept. of Medicine YouTube Channel*, 2017. [Online]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=jodLmErRP64&t=806s>.
- [76] V. Brinkmann *et al.*, "Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria," *Science* (80-.), vol. 303, no. 5663, pp. 1532-1535, 2004.
- [77] J. G. Bieth, "The elastases," *J. Soc. Biol.* , vol. 195, no. 2, pp. 173-179, 2001.
- [78] C. T. N. Pham, "Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 40, no. (6-7), pp. 1317-1333, 2008.
- [79] "MPO myeloperoxidase [Homo sapiens (human)]," *National Center for Biotechnology Information*, 2017. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4353>. [Accessed: 01-Jan-2017].
- [80] "USAF 1951." [Online]. Available: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1951usaf_test_target.jpg.
- [81] D. Malacara, J. Schmit, K. Creath, and J. C. Wyant, "Contact profilometers," in *Optical Shop Testing*, 3rd ed., D. Malacara, Ed. John Wiley and Sons, LTD., 2007, p. 690.
- [82] A. Small and S. Stahlheber, "Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy," *Nat. Methods*, vol. 11, pp. 267-269, 2014.

[83] E. Katrukha, "How to quickly estimate SD of PSF in ImageJ,"2016. [Online]. Available: https://github.com/ekatrukha/DoM_Utrecht/wiki/How-to-quickly-estimate-SD-of-PSF-in-ImageJ.



APÉNDICE A: CÓDIGO DE PYTHON PARA GUI

1

```
#Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnical  
Institute of Mexico.
```

```
#This program is the base of a graphic user interface to control a optical  
digital fluorescence Microscope.
```

```
#The core code is an open example that can (and will be) be improved. This  
code could be found in the next link:
```

```
6 #http://smokespark.blogspot.mx/2015/05/a-python-graphical-user-interface-for.  
html
```

```
#The goal of this project is to use this GUI as an interface for in situ  
research and observation
```

```
#of biological samples in both fields: Fluorescence Field and Bright Field.
```

```
#In this program the user will be able of control exposure time, AWB, ISO,  
brightness, contrast and also do some
```

```
#basic image processing, such as split RGB channels.
```

11

```
#This project if founded by the Mexican Space Agency, in order to use this  
software also in a Cube Sat designed to
```

```
#study the behavior of yeast (specifically S. Cerevisiae) inside a  
microfluidc device in a microgravity enviroment.
```

```
#This program is part of the thesis project called: "Development and  
Miniaturization of a Digital Optical Microscope"
```

16

```
#People in charge of this project:
```

```
#Samuel Bernardo Tristan Landin, B. Eng. (Mechatronics) and M.Sc. Biomedical  
Physics and Engineering Student.
```

```
#Alan Gonzalez Suarez, M.Sc. Biomedical Physics and Engineering and also Ph.D  
. student.
```

```

#Jose Luis Garcia Cordero, Ph.D. and thesis advisor.

21
#-----##

from Tkinter import *
from PIL import Image
26 from PIL import ImageTk
from fractions import Fraction
import tkMessageBox as messagebox
import tkFileDialog
import pygame
31 import time
import cv2
import threading
import picamera
import picamera.array
36 import RPi.GPIO as GPIO
import numpy as np
import io
import spidev
import os
41 from datetime import datetime, timedelta

# Declare SPI bus
spi = spidev.SpiDev()
spi.open(0,0)
46
#Bright Field LED pin configuration.
GPIO.setmode(GPIO.BCM)
GPIO.setwarnings(False)
pin = 18
51 GPIO.setup(pin, GPIO.OUT)
GPIO.output(pin, GPIO.LOW)

```

```
#Blue Fluorescence excitation LED pin (UV LED) configuration.
pin3 = 23
56
GPIO.setup(pin3,GPIO.OUT)
GPIO.output(pin3, GPIO.LOW)

#Green Fluorescence excitation LED pin (Blue LED) configuration.
61 pin2 = 24
GPIO.setup(pin2,GPIO.OUT)
GPIO.output(pin2, GPIO.LOW)

#Red Fluorescence excitation LED pin (Green-Ambar LED) configuration.
66 pin4 = 25
GPIO.setup(pin4,GPIO.OUT)
GPIO.output(pin4, GPIO.LOW)

#-----Mobile prototype pins configuration
-----

71 #Declaring pins for X axis motor.
pinA1X = 12
GPIO.setup(pinA1X, GPIO.OUT)
pinA2X = 16
GPIO.setup(pinA2X,GPIO.OUT)
76 pinB1X = 20
GPIO.setup(pinB1X, GPIO.OUT)
pinB2X = 21
GPIO.setup(pinB2X,GPIO.OUT)

81 #Declaring pins for Y axis motor.
pinA1Y = 5
GPIO.setup(pinA1Y, GPIO.OUT)
pinA2Y = 6
```

```
GPIO.setup(pinA2Y,GPIO.OUT)
86 pinB1Y = 13
GPIO.setup(pinB1Y, GPIO.OUT)
pinB2Y = 19
GPIO.setup(pinB2Y,GPIO.OUT)

91 #Declaring pins for Z axis motor.
pinA1Z = 4
GPIO.setup(pinA1Z, GPIO.OUT)
pinA2Z = 17
GPIO.setup(pinA2Z,GPIO.OUT)
96 pinB1Z = 27
GPIO.setup(pinB1Z, GPIO.OUT)
pinB2Z = 22
GPIO.setup(pinB2Z,GPIO.OUT)

101 #Declaring Camera
camera = picamera.PiCamera()
zoom = 1.0
previewTime = 3
previewstatus = 0
106 threshPercent = 1.8
step = 1
numImages = 1
captureCount = 0
numSav = 0
111 timelapse = 0
stepcounterX = 0
stepcounterY = 0
stepcounterZ1 = 0
##camera.hflip = True
116 camera.vflip = True
```

```

#Declaring step motor parameters
delay = 0.002
step_counterUp = 0
121 step_counterDown = 3

#Declaring joystick and sensor channels
swt_channel = 0
vrx_channel = 1
126 vry_channel = 2

#-----Functions declaration
-----#
#Creating threading classes.
#This class help us to create threads that make the program more stable,
    preventing to freeze
131 #the program when a while, for or another looped action is taking place.
#This classes are written to controll the motors and also action like taking
    a sequence of images.
#

136
class imageSequenceThread(threading.Thread):
    def __init__(self, timelapse):
        threading.Thread.__init__(self)
        self.timelapse = timelapse
141         self._stop = threading.Event()
    def run(self):
        while not self._stop.isSet(): #This while loop will allow us
            to make our timelapse capture.
                #First we light our LED, preset the camera resolution
                    . make the capture named with the time of the
                        Raspberry Pi

```

```

        # and then wait the time set for the timelapse
        capture to make the new capture.
146     GPIO.output(pin, GPIO.HIGH)
        camera.resolution = (3280,2464)
        timestr = time.strftime("%d-%m-%H-%M-%S-img")
        camera.capture(timestr + '.png')
        GPIO.outnput(pin, GPIO.LOW)
151     time.sleep(self.timelapse)
    ##     def stop(self):
    ##         self.flag = False

class dualimageSequenceThread(threading.Thread):
156     def __init__(self, timelapse):
        threading.Thread.__init__(self)
        self.timelapse = timelapse
        self._stop = threading.Event()
        self.flag = True
161     def run(self):
        while not self._stop.isSet(): #this while loop does almost
            the same as the normal timelapse sequence:
            #Set resolution, paramterse, camera resolution. turn on
            the LED and take the capture, then, turn off the LED
            #And then turn on the other LED to make the fluorecence
            image capture, but setting also the exposure time.
            camera.resolution = (3280,2464)
166     GPIO.output(pin,GPIO.HIGH)
            camera.sharpness = 100 #Setting sharpness of image
            timestr = time.strftime("%d-%m-%H-%M-%S-BF")
            camera.shutter_speed = 1000
            time.sleep(2) #Waiting for camera to turn on.
171     camera.capture(timestr + '.png')
            GPIO.output(pin,GPIO.LOW)
            time.sleep(0.1)

```



```
GPIO.output(pin2,GPIO.HIGH)
camera.sharpness = 100 #Setting sharpness of image
176 camera.shutter_speed = xyexpT.get()*1000
timestr = time.strftime("%d-%m-%H%M%S-Fluor")
time.sleep(2) #Waiting for camera to turn on.
camera.capture(timestr + '.png')
GPIO.output(pin2,GPIO.LOW)
181 time.sleep(self.timelapse)

def stop(self):
    self.flag = False

#Declaring Stepper motor sequence
186 XYStepper=[[0,1,1,0],[0,1,0,1],[1,0,0,1],[1,0,1,0]]

class YAxisThread(threading.Thread):
    def __init__(self, stepCounter, delay):
        threading.Thread.__init__(self)
191 self.delay = delay
        self.stepCounter = stepCounter
        self._stop = threading.Event()
    def run(self):
        print self.stepCounter
196 s1,s2,s3,s4 = stepread(self.stepCounter)
        print s1,s2,s3,s4
        SetStepsY(s1,s2,s3,s4)
        time.sleep(delay)

201
class XAxisThread(threading.Thread):
    def __init__(self, stepCounter, delay):
        threading.Thread.__init__(self)
        self.delay = delay
206 self.stepCounter = stepCounter
```

```

        self._stop = threading.Event()
    def run(self):
        print self.stepCounter
        s1,s2,s3,s4 = stepread(self.stepCounter)
211     print s1,s2,s3,s4
        SetStepsX(s1,s2,s3,s4)
        time.sleep(self.delay)

class FocusAxisThread(threading.Thread):
216     def __init__(self, stepCounter, dgamma_correctionelay):
        threading.Thread.__init__(self)
        self.delay = delay
        self.stepCounter = stepCounter
        self._stop = threading.Event()
221     def run(self):
        print self.stepCounter
        s1,s2,s3,s4 = stepread(self.stepCounter)
        print s1,s2,s3,s4
        SetStepsZ(s1,s2,s3,s4) #changeForZ
226     time.sleep(self.delay)

class JoystickMovement(threading.Thread):
    def __init__(self, delay):
        threading.Thread.__init__(self)
231     self.delay = delay
        self._stop = threading.Event()
    def run(self):
        step_counterY = 0
        step_counterX = 0
236     step_counterFocus = 3
        step_counterDefocus = 0
        while not self._stop.isSet():
            # Read the joystick and switch button data

```

```
vrx_pos = ReadChannel(vrx_channel)
241 vry_pos = ReadChannel(vry_channel)
swt_val = ReadChannel(swt_channel)

#Up
if vry_pos > 540:
246     if step_counterY == 4:
        step_counterY = 0
        if step_counterY == -1:
            step_counterY = 3
        s1,s2,s3,s4 = stepread(step_counterY)
251     SetStepsZ(s1,s2,s3,s4)
        step_counterY += 1
        time.sleep(0.005)

#Down
256 if vry_pos < 515:
        if step_counterY == -1:
            step_counterY = 3
        if step_counterY == 4:
            step_counterY = 0
261     s1,s2,s3,s4 = stepread(step_counterY)
        SetStepsZ(s1,s2,s3,s4)
        step_counterY -= 1
        time.sleep(0.005)

266 ##     #Right
##     if vrx_pos < 515:
##         if step_counterX == 4:
##             step_counterX = 0
##         if step_counterX == -1:
271 ##             step_counterX = 3
##         s1,s2,s3,s4 = stepread(step_counterX)
```



```
306 #-----Defining functions
-----
#Here we define the functions for the camera control, the illumination
controls

def centre_window(w, h):
    ws = root.winfo_screenwidth()
311    hs = root.winfo_screenheight()
    x = (ws/2)
    y = (hs/2)
    root.geometry('%dx%d+%d+%d' % (w, h, x, y))

316
def brightnessScale(value):
    camera.brightness = int(value)

def contrastScale(value):
321    camera.contrast = int(value)

def saturationScale(value):
    camera.saturation = int(value)

326 def exposureTimeScale(value):
    #With this command is how we can control the exposure time in the
    RasPi Camera.
    camera.shutter_speed = int(value)*1000

def sharpnessScale(value):
331    camera.sharpness = int(value)

def awb_modes(value):
    if value == "Red EmF":
```

```

        camera.awb_mode= 'off'
336         camera.awb_gains = (1.1,1.1)
    if value == "Green EmF":
        camera.awb_mode= 'off'
        camera.awb_gains = (1.2,1.2)
    if value == "B Field":
341         camera.awb_mode= 'off'
        camera.awb_gains = (1.5,1.2)
    elif value != "Red EmF" and value != "Green EmF" and value != "B
        Field":
        camera.awb_mode = value

346 #This function is only used to tune the gains of the AWB for different
    filters.
    ##def setAWB_gains():
    ##     value1 = g1.get()
    ##     value2 = g2.get()
    ##     camera.awb_mode = "off"
351 ##     camera.awb_gains = (value1, value2)
    ##     preview()

    def exposure_modes(value):
        camera.exposure_mode= value

356    def effects(value):
        camera.image_effect = value

    def isocam(value):
361         if value == "auto":
            camera.iso = 0
        else:
            camera.iso = int(value)

```

```
366 def rotate():
    camera.rotation += 90
    print "Rotation", camera.rotation, "degrees"
    preview()

371 def hflip():
    value = hon.get()
    if value == False:
        camera.hflip = False
    else:
376         camera.hflip = True

def vflip():
    value = von.get()
    if value == False:
381         camera.vflip = False
    else:
        camera.vflip = True

##

386 def previewCamera():
    global previewstatus
    global var1
    global var5
    if previewstatus == 0:
391         previewstatus = 1
        previewbtn_text.set("Preview On") #Actual status of the preview
        camera.preview_fullscreen = False
        camera.preview_window = (500, 250, 510, 384)
        camera.video_stabilization = True
        LEDstatus = True
396         camera.brightness=sBright.get()
        camera.contrast=sContrs.get()
        camera.saturation=sSat.get()
```

```

        awb_modes(var1.get())
        isocam(var5.get())
401     camera.start_preview()
    else:
        camera.stop_preview()
        previewbtn_text.set("Preview Off")
        previewstatus = 0
406

def still():
    global img
    global imgaux
411     global captureCount
    global var1
    global var5
    camera.shutter_speed = int(sExpT.get())* 1000
    camera.brightness=sBright.get()
416     camera.contrast=sContrs.get()
    camera.saturation=sSat.get()
    isocam(var5.get())
    awb_modes(var1.get())
    camera.resolution = (3280,2464)
421     #Storing capture on a matrix in order to be used with OpenCV.
    img = picamera.array.PiRGBArray(camera, size = (3280,2464))
    camera.capture(img, 'bgr', resize = (3280,2464))
    #Storing an auxiliar image to be used as display on Canvas.
    imgaux = img.array
426     res = cv2.resize(imgaux, (510,384))
    img2 = cv2.cvtColor(res, cv2.COLOR_BGR2RGB)
    img2FromArray = Image.fromarray(img2)
    imgtk = ImageTk.PhotoImage(image =img2FromArray)
    canvas.itemconfig(img_canvas,imag = imgtk)
431     canvas.imgtk = imgtk

```



```

#Automatic Storage in TIFF format
captureCount += 1
strc = str(captureCount)
extStr = ".tiff"
436 cv2.imwrite('image' + strc + extStr, imgaux)

def gamma_value(value):
    global gamma
    gamma = float(value)
441

def gamma_correction(imgGammaAux, value):
    table = np.array([((i / 255.0) ** value) * 255
    for i in np.arange(0, 256)]).astype("uint8") #build a table
    mapping the pixel values [0, 255] to their adjusted gamma values
    return cv2.LUT(imgGammaAux, table) # apply gamma
    correction using the lookup table
446

def gammaPreview():
    global gammaImg
    gammaWindow = Toplevel()
451 ws = gammaWindow.winfo_screenwidth()
    hs = gammaWindow.winfo_screenheight()
    x = (ws/2)
    y = (hs/2)
    gammaWindow.geometry('%dx%d+%d+%d' % (600, 450, x, y))
456

    imgG = Image.open('cinvestav.gif')
    imgG = imgG.resize((480/2, 594/2), Image.ANTIALIAS)
    imgGc = ImageTk.PhotoImage(imgG)
    canvasframe2 = Frame(gammaWindow, width = 600, height = 400)
461 canvasframe2.grid(row=0, column=2, sticky=W+E+N+S)
    canvas2=Canvas(canvasframe2, width=510, height=383)

```

```

img_canvas2=canvas2.create_image(510/2,400/2,image = imgGc, anchor =
    CENTER)
canvas2.grid(row=0, column=0)

466 gframe2 = Frame(gammaWindow, width = 600, height = 50)
gframe2.grid(row=1, column=2, sticky=W+E+N+S)
gammalabel = Label(gframe2, text="Gamma Correction")
gammalabel.grid(row=1, column=0)
setGamma = Scale(gframe2, from_=0, to=3, resolution = 0.5,orient=
    HORIZONTAL, command = gamma_value)
471 setGamma.grid(row=1, column=1)

var8g = StringVar(gammaWindow)
var8g.set("TIFF") # initial value
optionExp = OptionMenu(gframe2, var8g, 'TIFF', 'JPEG', 'PNG', 'BMP',
    'DATA')
476 optionExp.grid(row =1, column = 3)
var8label = Label(gframe2, text="File Options")
var8label.grid(row=1, column=2)

exportbtn_text = StringVar(gammaWindow)
481 exportbtn = Button(gframe2, textvariable=exportbtn_text, command=
    export_image_corrected)
exportbtn_text.set("Export Image")
exportbtn.grid(row=1, column=4)

try:
486     gammaImg = gamma_correction(imgaux,2.4)
     res = cv2.resize(gammaImg, (510,384))
     gammaImg2 = cv2.cvtColor(res, cv2.COLOR_BGR2RGB)
     img2FromArrayG = Image.fromarray(gammaImg2)
     imgtk2 = ImageTk.PhotoImage(image =img2FromArrayG)
491     canvas2.itemconfig(img_canvas2,imag = imgtk2)

```

```
        canvas2.imgtk2 = imgtk2

    except:
        messagebox.showerror("Error", "Image has not been taken,
                               please take an image.")
496         gammaWindow.destroy()

        gammaWindow.mainloop()

501 def zoomIn():
    global zoom
    ws = root.winfo_screenwidth()
    hs = root.winfo_screenheight()
    if zoom >= 0.7:
506         zoom -= 0.05
        x = (ws/2) - 0.5 * 400/(1 - zoom)
        y = (hs/2) - 0.5 * 285/(1 - zoom)
        camera.zoom = (x, y, zoom, zoom)
        print "Zoom", zoom, "%"
511    else:
        print "Max zoom!"
        zoom = 0.7
        print "Zoom", zoom, "%"

516 def zoomOut():
    global zoom
    ws = root.winfo_screenwidth()
    hs = root.winfo_screenheight()
    if zoom <= 1.3:
521         zoom += 0.05
        x = (ws/2) - 0.5 * 400/(1 - zoom)
        y = (hs/2) - 0.5 * 285/(1 - zoom)
```

```

        camera.zoom = (x, y, zoom, zoom)
        print "Zoom", zoom, "%"
526     else:
        print "Min zoom!"
        zoom = 1.3
        print "Zoom", zoom, "%"

531 def led():
    if GPIO.input(pin):
        GPIO.output(pin,GPIO.LOW)
        ledbtn_text.set(" BrFld OFF ")
        print "LED off"
536     else:
        camera.framerate = 30
        GPIO.output(pin,GPIO.HIGH)
        GPIO.output(pin2,GPIO.LOW)
        GPIO.output(pin3,GPIO.LOW)
541     GPIO.output(pin4,GPIO.LOW)
        ledbtn_text.set(" BrFld ON ")
        gfluorledbtn_text.set(" BL OFF ")
        bfluorledbtn_text.set(" UVL OFF ")
        rfluorledbtn_text.set(" GL OFF ")
546     #Setting parameters to default configuration for the channel.
        sExpT.set(0)
        sSharp.set(0)
        sSat.set(0)
        sContrs.set(0)
551     sBright.set(50)
        var1.set("B Field")
        var3.set("auto")
        var5.set("400")
        isocam(var5.get())
556     awb_modes(var1.get())

```

```
        exposure_modes(var3.get())
        print "WhiteLED on"

def GREENFluorled(): #For Green Fluorescence, here we can use a RGB LED.
561     if GPIO.input(pin2):
            GPIO.output(pin2,GPIO.LOW)
            gfluorledbtn_text.set(" BL OFF ")
            print "LED off"
        else:
566     ##         var5.set("200")
            isocam(var5.get())
            time.sleep(3)
            camera.framerate = 1
            GPIO.output(pin2,GPIO.HIGH)
571     GPIO.output(pin,GPIO.LOW)
            GPIO.output(pin3,GPIO.LOW)
            GPIO.output(pin4,GPIO.LOW)
            ledbtn_text.set(" BrFld OFF ")
            gfluorledbtn_text.set(" BL ON ")
576     bfluorledbtn_text.set(" UVL OFF ")
            rfluorledbtn_text.set(" GL OFF ")
            print "LED on"
            #Setting parameters to default configuration for the channel.
            ##         sExpT.set(700)
581     ##         sSharp.set(0)
            ##         sSat.set(0)
            ##         sContrs.set(0)
            ##         sBright.set(50)
            var1.set("Green EmF")
586     ##         var3.set("off")
            ##         awb_modes(var1.get())
            ##         exposure_modes(var3.get())
```

```

def BLUEFluorled(): #For Blue Fluorescence, here we can use a RGB LED.
591     if GPIO.input(pin3):
            GPIO.output(pin3,GPIO.LOW)
            bfluorledbtn_text.set(" UVL OFF ")
            print "LED off"
            camera.awb_mode = "off"
596     camera.awb_gains = (1.2, 1.2)
        else:
            ##         var5.set("200")
            isocam(var5.get())
            time.sleep(3)
601     camera.framerate = 1
            GPIO.output(pin3,GPIO.HIGH)
            GPIO.output(pin,GPIO.LOW)
            GPIO.output(pin2,GPIO.LOW)
            GPIO.output(pin4,GPIO.LOW)
606     ledbtn_text.set(" BrFld OFF ")
            gfluorledbtn_text.set(" BL OFF ")
            bfluorledbtn_text.set(" UVL ON ")
            rfluorledbtn_text.set(" GL OFF ")
            print "LED on"
611     #Setting parameters to default configuration for the channel.
            ##         sExpT.set(500)
            ##         sSharp.set(0)
            ##         sSat.set(0)
            ##         sContrs.set(0)
616     ##         sBright.set(50)
            var1.set("Green EmF")
            ##         var3.set("off")
            ##         exposure_modes(var3.get())
            ##         awb_modes(var1.get())
621

```

```

def REDFluorled(): #For Red Fluorescence, here we can use a RGB LED.
    global var1
    if GPIO.input(pin4):
626         GPIO.output(pin4,GPIO.LOW)
            rfluorledbtn_text.set(" GL OFF ")
            print "LED off"
    else:
        ##         exposure_modes("auto")
631 ##         var5.set("200")
            isocam(var5.get())
            time.sleep(3)
            var3.set("off")
            exposure_modes(var3.get())
636         camera.framerate = 1
            GPIO.output(pin4,GPIO.HIGH)
            GPIO.output(pin,GPIO.LOW)
            GPIO.output(pin2,GPIO.LOW)
            GPIO.output(pin3,GPIO.LOW)
641         ledbtn_text.set(" BrFld OFF ")
            bfluorledbtn_text.set(" UVL OFF ")
            gfluorledbtn_text.set(" BL OFF ")
            rfluorledbtn_text.set(" GL ON ")
            print "LED on"
646         #Setting parameters to default configuration for the channel.
            ##         sExpT.set(500)
            ##         sSharp.set(0)
            ##         sSat.set(0)
            ##         sContrs.set(0)
651 ##         sBright.set(50)
            var1.set("Red EmF")
            ##         awb_modes(var1.get())

##def dual_lapse(timelapse):

```

```

656 ##         camera.resolution = (3280,2464)
        ##         while True:
        ##             if thread2.flag == False:
        ##                 break
        ##             GPIO.output(pin,GPIO.HIGH)
661 ##             camera.sharpness = 100 #Setting sharpness of image
        ##             timestr = time.strftime("%d- %m- %H: %M: %S-BF")
        ##             camera.shutter_speed = 1000
        ##             time.sleep(3) #Waiting for camera to turn on.
        ##             camera.capture(timestr + '.jpg')
666 ##             GPIO.output(pin,GPIO.LOW)
        ##             time.sleep(2)
        ##             GPIO.output(pin2,GPIO.HIGH)
        ##             camera.sharpness = 100 #Setting sharpness of image
        ##             camera.shutter_speed = xyexpT.get()*1000
671 ##             timestr = time.strftime("%d- %m- %H: %M: %S-Fluor")
        ##             time.sleep(3) #Waiting for camera to turn on.
        ##             camera.capture(timestr + '.jpg')
        ##             GPIO.output(pin2,GPIO.LOW)
        ##             time.sleep(timelapse)

676
    ##def lapse(timelapse):
    ##     GPIO.output(pin, GPIO.HIGH)
    ##     camera.resolution = (3280,2464)
    ##     timestr = time.strftime("%d- %m- %H- %M- %S-img.jpg")
681 ##     for filename in camera.capture_continuous(timestr+'img{counter:03d
        ##         }.jpg'):
    ##         print('Captured %s' % filename)
    ##         if thread1.flag == False:
    ##             break
    ##         time.sleep(timelapse)                # wait X minutes

686

```



```
def startLapse():
    try:
        timelapse = yy.get()*60
691     global thread1
        thread1 = imageSequenceThread(timelapse)
        thread1.start()
        TLButton.config(state = DISABLED)
        stopTLButton.config(state = NORMAL)
696     print "Starting image timelapse sequence\n"
        print "Image timelapse sequence: Started\n"
    except:
        print "Can't start image timelapse sequence!!"

701 def startDualLapse():
    try:
        timelapse = yy.get()*60
        global thread2
        thread2 = dualimageSequenceThread(timelapse)
706     thread2.start()
        DualTLbtn.config(state = DISABLED)
        stopDualTLbtn.config(state = NORMAL)
        print "Starting image timelapse sequence\n"
        print "Image timelapse sequence: Started\n"
711     except:
        print "Can't start image timelapse sequence!!"

def stopLapse():
716     try:
        if thread1.isAlive():
            thread1._stop.set()
            TLButton.config(state = NORMAL)
            stopTLButton.config(state = DISABLED)
```

```

721         GPIO.output(pin, GPIO.LOW)
           print "Stopping image sequence"
           print "Please wait until the last cycle finishes..."
           messagebox.showwarning("Wait", "Image Sequence Stopped")
           print "Image timelapse sequence: stopped"
726     except:
           print "Can't stop image timelapse sequence!!"
           GPIO.output(pin, GPIO.LOW)
           camera.stop_preview()

731 def stopDualLapse():
           try:
               if thread2.isAlive():
                   thread2._stop.set()
                   DualTLbtn.config(state = NORMAL)
736                   stopDualTLbtn.config(state = DISABLED)
                   print "Stopping dual image sequence"
                   print "Dual Image timelapse sequence: stopped"
                   GPIO.output(pin, GPIO.LOW)
                   GPIO.output(pin2, GPIO.LOW)
741                   messagebox.showwarning("Wait", "Image Sequence Stopped")
           except:
               print "Can't stop image timelapse sequence!!"
               GPIO.output(pin, GPIO.LOW)
               GPIO.output(pin2, GPIO.LOW)
746               camera.stop_preview()

def filenames():
    frame = 0
751    fileName = time.strftime("/home/pi/Desktop/images/%d-%m-%Y-%H%M%S",
        time.localtime())
    while frame < 1:

```

```
        yield '%s%02d.jpg' % (fileName, frame)
        frame += 1

756 ##def display_close():
    ##     if messagebox.askokcancel("Quit", "Do you want to quit?"):
    ##         GPIO.output(pin, GPIO.LOW)
    ##         GPIO.output(pin2, GPIO.LOW)
    ##         camera.close()
761 ##         root.destroy()

def on_closing():
    if messagebox.askokcancel("Quit", "Do you want to quit?"):
        GPIO.output(pin, GPIO.LOW)
766         GPIO.output(pin2, GPIO.LOW)
        GPIO.output(pin3, GPIO.LOW)
        GPIO.output(pin4, GPIO.LOW)
        camera.close()
        spi.close()
771         SetStepsY(0, 0, 0, 0)
        SetStepsX(0, 0, 0, 0)
        root.destroy()

def export_image():
776     global imgaux
    global captureCount
    captureCount += 1
    strc = str(captureCount)
    if var8.get() == "PNG":
781         extStr = ".png"
    if var8.get() == "JPEG":
        extStr = ".jpeg"
    if var8.get() == "TIFF":
        extStr = ".tiff"
```

```

786         if var8.get() == "DATA":
                extStr = ".data"
        if var8.get() == "BMP":
                extStr = ".bmp"

791         cv2.imwrite('image' + strc + extStr, imgaux)

def export_image_corrected():
        global gammaImg
        global captureCount
796         strc = str(captureCount)
        if var8.get() == "PNG":
                extStr = ".png"
        if var8.get() == "JPEG":
                extStr = ".jpeg"
801         if var8.get() == "TIFF":
                extStr = ".tiff"
        if var8.get() == "DATA":
                extStr = ".data"
        if var8.get() == "BMP":
806         extStr = ".bmp"

        cv2.imwrite('gc-image' + strc + extStr, gammaImg)

#-----Axis movement functions
-----

811 def stepread(c):
        s1 = XYStepper[c][0]
        s2 = XYStepper[c][1]
        s3 = XYStepper[c][2]
816         s4 = XYStepper[c][3]
        return s1,s2,s3,s4

```

```
def SetStepsY(s1, s2, s3, s4):
    GPIO.output(pinA1Y, s1)
821    GPIO.output(pinA2Y, s2)
        GPIO.output(pinB1Y, s3)
        GPIO.output(pinB2Y, s4)

def SetStepsX(s1, s2, s3, s4):
826    GPIO.output(pinA1X, s1)
        GPIO.output(pinA2X, s2)
        GPIO.output(pinB1X, s3)
        GPIO.output(pinB2X, s4)

831 def SetStepsZ(s1, s2, s3, s4):
        GPIO.output(pinA1Z, s1)
        GPIO.output(pinA2Z, s2)
        GPIO.output(pinB1Z, s3)
        GPIO.output(pinB2Z, s4)

836
def UpAxis(event):
    global thread3
    global delay
    global step_counterUp
841    if step_counterUp == 4:
            step_counterUp = 0
        thread3 = YAxisThread(step_counterUp, delay)
        thread3.start()
        step_counterUp += 1

846
def DownAxis(event): #Store in a thread
    global thread4
    global delay
    global step_counterDown
```

```

851         if step_counterDown == -1:
                step_counterDown = 3
                thread4 = YAxisThread(step_counterDown, delay)
                thread4.start()
                step_counterDown -= 1

856     def LeftAxis(event):
            global thread5
            global delay
            global step_counterDown
861         if step_counterDown == -1:
                step_counterDown = 3
                thread5 = XAxisThread(step_counterDown, delay)
                thread5.start()
                step_counterDown -= 1

866     def RightAxis(event): #Store in a thread
            global thread6
            global delay
            global step_counterUp
871         if step_counterUp == 4:
                step_counterUp = 0
                thread6 = XAxisThread(step_counterUp, delay)
                thread6.start()
                step_counterUp += 1

876     def FocusUpAxis(event):
            global thread7
            global delay
            global step_counterUp
881         if step_counterUp == -1:
                step_counterUp = 3
                thread7 = FocusAxisThread(step_counterUp, delay)

```

```
        thread7.start()
        step_counterUp -= 1
886
def FocusDownAxis(event):
    global thread8
    global delay
    global step_counterDown
891    if step_counterDown == 4:
        step_counterDown = 0
        thread8 = FocusAxisThread(step_counterDown,delay)
        thread8.start()
        step_counterDown += 1
896
def ReadChannel(channel):
    #Reading SPI bus for joystick control.
    adc = spi.xfer2([1,(8+channel)<<4,0])
    data = ((adc[1]&3) << 8) + adc[2]
901    return data

def guiCall():
    #chekcing if the joystick is conected to sPI Bus..
    try:
906        global spi
        if thread7.isAlive():
            thread7._stop.set()
            spi.close()
    except:
911        messagebox.showwarning("Wait", "No SPI Bus Open")

def joystickCall():
    try:
        global spi
916        global delay
```

```

        spi.open(0,0)
        global thread7
        thread7 = JoystickMovement(delay)
        thread7.start()
921     except:
        messagebox.showwarning("Wait", "No data from joystick")

#-----GUI declaration
#-----#
926 root = Tk()
    root.title("The BioARTS Lab Mini-microscope")
    #Centering window on screen and declaring size of the window.
    centre_window(1030, 525) #-225,330. 800x480 para tablet
    #Let's make some menu bars
931 camera.awb_mode

#-----Menu bar
#-----#

menubar = Menu(root)
filemenu = Menu(menubar, tearoff = 0)
filemenu.add_command(label = "Exit", command = on_closing)
936 menubar.add_cascade(label = "File", menu = filemenu)

helpmenu = Menu(menubar, tearoff = 0)
helpmenu.add_command(label = "About...")
menubar.add_cascade(label = "Help", menu = helpmenu)
941

#The following frame will allow us to organize all the functions we have for
    the camera manual controls like
#brightness, exposure time, saturation among others. We'll try to mix pack
    and grid together so we can use the canvas display inside
#The GUI but also our buttons.

```



```
946 ##display = Frame(root, bg = "orange", width = 500, height = 500)
    ##display.pack(side=RIGHT, expand = 1)

    cameraParameters = Frame(root, width = 150, height =350)
    cameraParameters.grid(row=0,column=0, sticky="n")

951
    #Just to separate display canvas from camera parameters a little bit.
    space1 = Frame(root, width = 15, height = 350)
    space1.grid(row=0, column=1, sticky="n")

956 img = Image.open('cinvestav.gif')
    img = img.resize((480/2, 594/2), Image.ANTIALIAS)
    img = ImageTk.PhotoImage(img)
    canvasframe = Frame(root, width = 510, height = 400)
    canvasframe.grid(row=0, column=2, sticky=W+E+N+S)
961 canvas=Canvas(canvasframe, width=510, height=383)
    img_canvas=canvas.create_image(510/2,383/2,image = img, anchor = CENTER)
    canvas.grid(row=0, column=0)

    previewlabel = Label(canvasframe, text="  Capture Preview  ")
966 previewlabel.grid(row=1, column=0, columnspan = 5)

    paramlabel = Label(cameraParameters, text="  Camera Parameters  ")
    paramlabel.grid(row=0, column=0, columnspan = 2)

971 var1 = StringVar(root)
    var1.set("B Field") # initial value
    optionAWBModes = OptionMenu(cameraParameters, var1, "B Field", "Red EmF", "
        Green EmF", "auto", "sunlight", "cloudy", "shade", "tungsten", "
        fluorescent", "incandescent", "flash", "horizon", "off", command =
        awb_modes)
    optionAWBModes.grid(row =1, column = 1)
    var1label = Label(cameraParameters, text="AWB')
```

```

976 var1label.grid(row=1, column=0)

var2 = StringVar(root)
var2.set("none") # initial value
optionEffects = OptionMenu(cameraParameters, var2, "none", "negative", "blur"
    , command = effects)
981 optionEffects.grid(row =2, column = 1)
var2label = Label(cameraParameters, text="Effects")
var2label.grid(row=2, column=0)

var3 = StringVar(root)
986 var3.set("auto") # initial value
optionExpMode = OptionMenu(cameraParameters, var3, 'auto', 'off', 'night', '
    nightpreview', 'backlight', 'spotlight', 'sports', 'snow', 'beach', '
    verylong', 'fixedfps', 'antishake', 'fireworks', command = exposure_modes)
optionExpMode.grid(row =3, column = 1)
var3label = Label(cameraParameters, text="Exposure Modes")
var3label.grid(row=3, column=0)

991
##var4 = StringVar(root)
##var4.set("auto") # initial value
##channelOption= OptionMenu(cameraParameters, var4, "auto", "Red", "Green", "
    Blue", command = channelsplit)
##channelOption.grid(row =4, column = 4)
996 ##var4label = Label(root, text="Channels")
##var4label.grid(row=4, column=3)

var5 = StringVar(root)
var5.set("auto") # initial value
1001 IS00option= OptionMenu(cameraParameters, var5, "auto", "100", "200", "320", "400
    ", "500", "640", "800", command = isocam)
IS00option.grid(row =4, column = 1)
var5label = Label(cameraParameters, text="ISO")

```

```
var5label.grid(row=4, column=0)

1006 sBright = Scale(cameraParameters, from_=25, to=75, resolution=1, orient=
        HORIZONTAL, command = brightnessScale)
sBright.grid(row=5, column=1)
sBright.set(camera.brightness)
##print "Brightness", camera.brightness
sBrightlabel = Label(cameraParameters, text="Brightness")
1011 sBrightlabel.grid(row=5, column=0)
root.update()

sContrs = Scale(cameraParameters, from_=-50, to=50, resolution=1, orient=
        HORIZONTAL, command = contrastScale)
sContrs.grid(row=6, column=1)
1016 sContrs.set(camera.contrast)
##print "Contrast", camera.contrast
sContrslabel = Label(cameraParameters, text="Contrast")
sContrslabel.grid(row=6, column=0)

1021 sSat = Scale(cameraParameters, from_=-100, to=100, resolution=1, orient=
        HORIZONTAL, command = saturationScale)
sSat.grid(row=7, column=1)
sSat.set(camera.saturation)
##print "Saturation", camera.saturation
root.update()
1026 sSatlabel= Label(cameraParameters, text="Saturation")
sSatlabel.grid(row=7, column=0)
root.update()

sSharp = Scale(cameraParameters, from_=-100, to=100, resolution=10, orient=
        HORIZONTAL, command = sharpnessScale)
1031 sSharp.grid(row=8, column=1)
sSharp.set(camera.sharpness)
```

```

    ##print "Sharpness", camera.shutter_speed
    root.update()
    sSharplabel= Label(cameraParameters, text="Sharpness")
1036 sSharplabel.grid(row=8, column=0)
    root.update()

    sExpT = Scale(cameraParameters, from_=0, to=1000, resolution = 50,orient=
        HORIZONTAL, command = exposureTimeScale)
    sExpT.grid(row=9, column=1)
1041 ##print "Exposure Time ms", camera.shutter_speed
    root.update()
    sexpt= Label(cameraParameters, text="Exposure Time ms")
    sexpt.grid(row=9, column=0)
    root.update()

1046
    yy = Scale(cameraParameters, from_=0, to=20, resolution=1, orient=HORIZONTAL)
    yy.grid(row=10, column=1)

    if timelapse == 0:
1051         yy.set(1)

    yz = Label(cameraParameters, text="Timelapse delay min")
    yz.grid(row=10, column=0)

1056
    #####
    ###Just testing if I can get off the yellow center on the image adjusting
        white balance manually.
    #This help us to see the real color in the image. For more info about white
        balance look at this websites:
    ##g1 = Scale(root, from_=0, to=8, resolution=0.1, orient=HORIZONTAL)
1061 ##g1.grid(row=8, column=4)
    ##

```

```

    ##g1label = Label(root, text="    Red Gain    ")
    ##g1label.grid(row=8, column=3)
    ##root.update()
1066 ##
    ##g2 = Scale(root, from_=0, to=8, resolution=0.1, orient=HORIZONTAL)
    ##g2.grid(row=9, column=4)
    ##
    ##g2label = Label(root, text="    Blue Gain    ")
1071 ##g2label.grid(row=9, column=3)
    ##root.update()
    ##
    ##gainButton = Button(root, bg="cyan", text="    Set Gains!    ",
        command=setAWB_gains)
    ##gainButton.grid(row=10, column=4)
1076 #####

    ##-----Illumination Options
    -----
    lightOpt = Frame(root, width = 150, height = 150)
    lightOpt.grid(row=1,column=0, sticky="n")
1081 lightlabel = Label(lightOpt, text="    Illumination Options    ")
    lightlabel.grid(row=0, column=0, columnspan = 3)

    spacel = Frame(root, width = 15, height = 150)
    spacel.grid(row=1, column=1, sticky="n")
1086
    ledbtn_text = StringVar()
    ledButton = Button(lightOpt, textvariable=ledbtn_text, command=led)
    ledbtn_text.set("    BrFlid OFF    ")
    ledButton.grid(row=1, column=1)
1091
    gfluorledbtn_text = StringVar()

```

```

gfluoRedButton = Button(lightOpt, textvariable=gfluoRedbtn_text, command=
    GREENFluoRed)
gfluoRedbtn_text.set(" BL OFF ")
gfluoRedButton.grid(row=1, column=2)
1096
bfluoRedbtn_text = StringVar()
bfluoRedButton = Button(lightOpt, textvariable=bfluoRedbtn_text, command=
    BLUEFluoRed)
bfluoRedbtn_text.set(" UVL OFF ")
bfluoRedButton.grid(row=2, column=1)
1101
rfluoRedbtn_text = StringVar()
rfluoRedButton = Button(lightOpt, textvariable=rfluoRedbtn_text, command=
    REDFluoRed)
rfluoRedbtn_text.set(" GL OFF ")
rfluoRedButton.grid(row=2, column=2)
1106
##-----Capture Options
-----
capOpt = Frame(root, width = 510, height = 150)
capOpt.grid(row=1,column=2, sticky="n")
caplabel = Label(capOpt, text=" Capture Options ")
1111 caplabel.grid(row=0, column=0, columnspan = 5)

previewbtn_text = StringVar()
previewButton = Button(capOpt, textvariable=previewbtn_text, command=
    previewCamera)
previewbtn_text.set("Preview Off")
1116 previewButton.grid(row=1, column=0)

takeStillButton = Button(capOpt, text=" Take still ", command=still)
takeStillButton.grid(row=2,column=0)

```

```
1121 TLbtn_text = StringVar()
    TLButton = Button(capOpt, textvariable=TLbtn_text, command=startLapse)
    TLbtn_text.set("Start Time Lapse")
    TLButton.grid(row=1, column=1)

1126 stopTLbtn_text = StringVar()
    stopTLButton = Button(capOpt, textvariable=stopTLbtn_text, command=stopLapse)
    stopTLbtn_text.set("Stop Time Lapse")
    stopTLButton.config(state = DISABLED)
    stopTLButton.grid(row=2, column=1)

1131
    DualTLbtn_text = StringVar()
    DualTLbtn = Button(capOpt, textvariable=DualTLbtn_text, command=
        startDualLapse)
    DualTLbtn_text.set("Start Dual Time Lapse")
    DualTLbtn.grid(row=1, column=3)

1136
    stopDualTLbtn_text = StringVar()
    stopDualTLbtn = Button(capOpt, textvariable=stopDualTLbtn_text, command=
        stopDualLapse)
    stopDualTLbtn_text.set("Stop Dual Timelapse")
    stopDualTLbtn.config(state = DISABLED)
1141 stopDualTLbtn.grid(row=2, column=3)

    zoomInButton = Button(capOpt, text = "Zoom +", command = zoomIn)
    zoomInButton.grid(row = 1, column = 4)

1146 zoomOutButton = Button(capOpt, text = "Zoom -", command = zoomOut)
    zoomOutButton.grid(row = 2, column = 4)
    space2 = Frame(root, width = 15, height = 350)
    space2.grid(row=0, column=3, sticky="n")

1151 #-----Quit Section---
```

```

quitframe = Frame(root, width = 500, height = 150)
quitframe.grid(row=1,column=4, sticky="n")

space3 = Frame(quitframe, width = 15, height = 30)
1156 space3.grid(row=0, column=0, sticky="n")
quitButton = Button(quitframe, bg="pink", text="      Quit      ", command=
    on_closing)
quitButton.grid(row=1, rowspan = 2, column=1)

#-----Motion Control and Image Processing
-----
1161 motionFrame = Frame(root, width = 500, height = 400)
motionFrame.grid(row=0, column=4, sticky=W+E+N+S)
50
motionlabel = Label(motionFrame, text="      Axis Motion Control      ")
motionlabel.grid(row=0, column=0, columnspan = 3)

1166
upBTN = PhotoImage(file = "upArrow.gif")
lblup = Button(motionFrame, image = upBTN)
lblup.grid(row = 1, column = 1)
lblup.bind("<Button-1>", UpAxis)

1171
rightBTN = PhotoImage(file = "rightArrow.gif")
lblright = Button(motionFrame, image = rightBTN)
lblright.grid(row = 2, column = 2)
lblright.bind("<Button-1>", RightAxis)

1176 50
leftBTN = PhotoImage(file = "leftArrow.gif")
lblleft = Button(motionFrame, image = leftBTN)
lblleft.grid(row = 2, column = 0)
lblleft.bind("<Button-1>", LeftAxis)

1181
downBTN = PhotoImage(file = "downArrow.gif")

```



```

lbldown = Button(motionFrame, image = downBTN)
lbldown.grid(row = 3, column = 1)
lbldown.bind("<Button-1>", DownAxis)
1186
lffocusBTN = PhotoImage(file = "LessFocusButton1.gif")
lblfoc = Button(motionFrame, image = lffocusBTN)
lblfoc.grid(row = 4, column = 0)
lblfoc.bind("<Button-1>", FocusUpAxis)
1191
pffocusBTN = PhotoImage(file = "PlusFocusButton1.gif")
lblfoc = Button(motionFrame, image = pffocusBTN)
lblfoc.grid(row = 4, column = 2)
lblfoc.bind("<Button-1>", FocusDownAxis)
1196
focuslabel = Label(motionFrame, text="- Focus +")
focuslabel.grid(row=4, column=1, sticky = W+E+N+S)

Controllerlabel = Label(motionFrame, text=" ")
1201 Controllerlabel.grid(row=6, column=0)
Controllerlabel = Label(motionFrame, text=" Controller ")
Controllerlabel.grid(row=7, column=1, sticky = W+E+N+S)

hon = BooleanVar()
1206 flipHRBOff = Radiobutton(motionFrame, text= "Interface", justify = LEFT,
    variable=hon, value = 1,command = guiCall)
flipHRBOff.grid(row=8, column=1, sticky = W)
flipHRBOn = Radiobutton(motionFrame, text= "Joystick", justify = LEFT,
    variable=hon, value = 2, command = joystickCall)
flipHRBOn.grid(row=9, column=1, sticky = W)

1211 compresslabel = Label(motionFrame, text=" ")
compresslabel.grid(row=10, column=0, columnspan = 3)
compresslabel = Label(motionFrame, text=" Image compression options ")

```

```

compresslabel.grid(row=11, column=0, columnspan = 3)

1216 var8 = StringVar(root)
var8.set("TIFF") # initial value
optionExp = OptionMenu(motionFrame, var8, 'TIFF', 'JPEG', 'PNG', 'BMP', 'DATA
    ')
optionExp.grid(row =12, column = 1)
var8label = Label(motionFrame, text="File Options")
1221 var8label.grid(row=12, column=0)

gammabtn_text = StringVar()
gammabtn = Button(motionFrame, textvariable=gammabtn_text, command=
    gammaPreview)
gammabtn_text.set("Gamma")
1226 gammabtn.grid(row=13, column=1)

exportbtn_text = StringVar()
exportbtn = Button(motionFrame, textvariable=exportbtn_text, command=
    export_image)
exportbtn_text.set("Export Image")
1231 exportbtn.grid(row=14, column=1)
root.config(menu = menubar)
root.tk.call('wm', 'iconphoto', root._w, img)
root.protocol("WM_DELETE_WINDOW", on_closing)
root.mainloop()

```

B

APÉNDICE B: FUNCIONAMIENTO DE LA CÁMARA RASPNERRY PI

La cámara de la Raspberry Pi tiene un sensor CMOS (8.08M-Effective Pixel Color CMOS Image Sensor, Sony IMX219, Sony Corporation), de 8 Mpx, con tamaño de pixel de $1.12 \mu\text{m}$. Este sensor tiene la capacidad de captura de video en alta velocidad (240 fps) con dimensiones de 3.69 mm por 2.75 mm. Puede ser utilizada en teléfonos inteligentes u otras aplicaciones [49].

En el microscopio se necesita tener el control sobre los siguientes parámetros de la cámara: tiempo de exposición, modos de exposición, balance de blancos, sensibilidad ISO, brillo, contraste, saturación y nitidez. Cada uno de estos parámetros permite el control de la cámara como una cámara digital normal, por lo que se deben conocer que hacen cada uno de estos parámetros y cómo es su manejo en la Raspberry Pi. El tiempo de exposición es uno de los parámetros a controlar más importante en microscopía, sobre todo cuando se observa fluorescencia. Al observar ejemplares *in vitro*, sobre todo cuando son células, se debe tener especial cuidado en este tiempo pues se puede llegar a producir foto-toxicidad en ellas debido a estar expuestas mucho tiempo a la luz [60]. También se puede llegar perder contraste entre la intensidad de fluorescencia y su fondo. El tiempo de exposición indica cuánto dura el sensor expuesto a la luz. Conforme más fotones captura, más iluminación y brillo se percibe en la imagen. En fotografía, comúnmente se habla del obturador o *shutter*, que es mecánico y se abre para capturar la luz que formará la imagen. En el caso de la fotografía digital, específicamente en las cámaras de teléfono celular como la que se usa en este proyecto [61], el obturador mecánico no se utiliza para dar paso a lo que se conoce como obturador de rolado (*rolling shutter*). Este tipo de obturador electrónico emula el funcionamiento de una persiana para capturar una imagen. Si se considera un sensor CMOS como un arreglo bidimensional, el obturador de rolado hace un escaneo de la escena renglón por renglón, para obtener una imagen ensamblada. Este proceso lleva cierto

tiempo en realizarse [61].

En la **figura B.1** se muestra el funcionamiento del obturador. Debido a este tipo de funcionamiento, la tasa de captura de escenas o *frames* se relaciona con el tiempo de exposición.

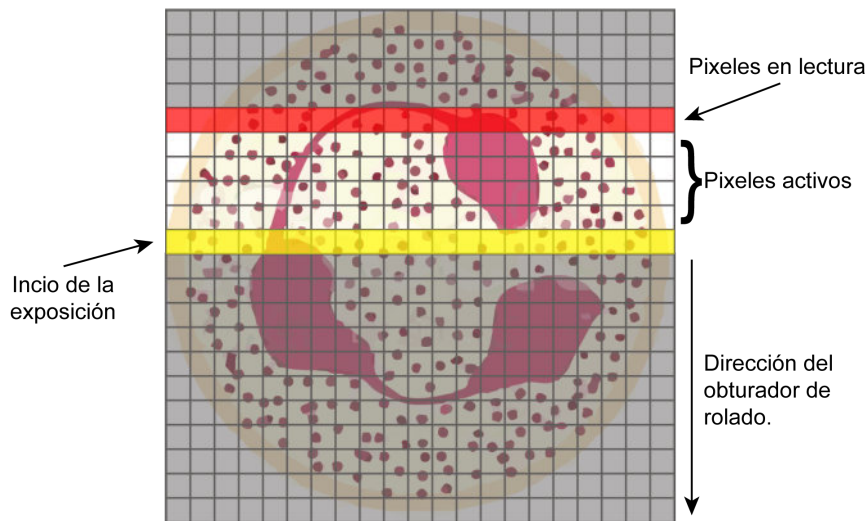


Figura B.1. Funcionamiento de obturador de rolado (rolling shutter). En la figura puede observarse como, al momento de que comienza a leerse un renglón de píxeles, ya hay píxeles que están capturando luz. Cuando termina la lectura del renglón actual, se procede a la lectura del siguiente renglón hasta completar la imagen. Este proceso ocurre en cuestión de milisegundos.

Si se define un tiempo de exposición para la cámara, habrá un número limitado de escenas capturadas debido que conlleva el proceso de la lectura de los renglones [62]. Esto es denotado por la ecuación B.1 [62], donde rt_{fr} es la tasa de frames medida en fps y t_{exp} es el tiempo de exposición.

$$rt_{fr} = \frac{1s}{t_{exp}} \quad (B.1)$$

La cámara tiene una tasa de *frames* preestablecida de 30 fps a máxima definición (8 Mpx), lo que da como resultado que sólo se puedan alcanzar cómo máximo 33.33 ms de exposición con dicha tasa de frames. En la documentación de la cámara [63], se especifica que la tasa de frames puede ser modificada. Para tomar capturas con máxima definición, la tasa puede ser configurada hasta 1 fps. Al hacer la configuración con ese valor y despear el tiempo de exposición en la

ecuación B.1, se obtiene que el tiempo de exposición puede llegar hasta 1 s.

Uno de los aspectos más importantes es la sensibilidad ISO, la cual es una medida de la habilidad de la cámara para capturar luz [64]. En las cámaras fotográficas analógicas la sensibilidad ISO se medía con número de haluros de plata (o granos) que tenía la película. Esta medida permitía al fotógrafo tener una noción de cuánta luz podía captar la película. Un grano más fino podía proporcionar más detalles a la imagen, pero era menos sensible a la luz por su tamaño (menor valor ISO) en comparación con grano más grande (mayor valor ISO) [64, 65]. En las cámaras digitales esto funciona un poco diferente ya que los fotodiodos que conforman los pixeles tendrán una sensibilidad fija, por tanto, para dar una sensación del aumento de la sensibilidad a la luz, el voltaje resultante del proceso de transducción se amplifica. En la cámara utilizada en este proyecto, se ajustan las ganancias analógicas y digitales de la cámara. Si el valor de la sensibilidad aumenta, se producen imágenes con mayor ruido y, si la sensibilidad se reduce, el ruido en la imagen es menor y la cámara reduce su rendimiento en condiciones de baja iluminación [56].

Los valores son ajustados por el fabricante acorde al estándar ISO 12232:2006, que dicta cómo debe ser representada la sensibilidad en las cámaras digitales en una escala logarítmica y una escala aritmética, excluyendo comúnmente la primera por no tener un uso común [65]. El rango de valores de sensibilidad ISO configurables en la cámara es de 0 a 1600. El valor predeterminado es 0, sin embargo, la cámara toma este valor para determinar la sensibilidad de manera automática dependiendo las condiciones de luz del ambiente. Según la documentación de la cámara, valores mayores a 800 no pueden ser configurados manualmente. El valor ISO 100 de la cámara produce una amplificación de las ganancias de aproximadamente 1.84 veces mientras que el ISO 800 produce una amplificación aproximada de 14.2 veces [56]. Otras funciones de la cámara, tales como algunos modos de exposición pueden deshabilitar la configuración [56].

Los modos de exposición modifican la velocidad del obturador (o tiempo de exposición), sensibilidad ISO o el balance de blancos, provocando que la cámara tome fotografías con parámetros específicos que usualmente los fabricantes de la cámara los determinan considerando situaciones escénicas comúnmente conocidas en la fotografía digital [67]. Cada uno de estos modos compensa la imagen para capturas rápidas o con poca luz [58].

El contraste, brillo, saturación y nitidez son funciones que afectan a la imagen. En procesamiento de imágenes, el aumento o decremento de brillo consiste en agregar o quitar una constante de color en escala de 0 a 255 a cada uno de los píxeles de la imagen [68, 69] lo que provoca que su histograma se mueva hacia la derecha (aumento de brillo) o hacia la izquierda (decremento de brillo) como se muestra en la **figura B.2b**. En el caso del contraste, se multiplica una constante por cada uno de los píxeles, controlando que tanto se dispersa el histograma de la imagen, como se observa en la **figura B.2c**. Este procesamiento se rige por la ecuación B.2 [68], en donde $g(i, j)$ es la imagen resultado, α es la ganancia (control del contraste), $f(i, j)$ es la imagen original y β la tendencia (control del brillo).

$$g(i, j) = \alpha f(i, j) + \beta \quad (\text{B.2})$$

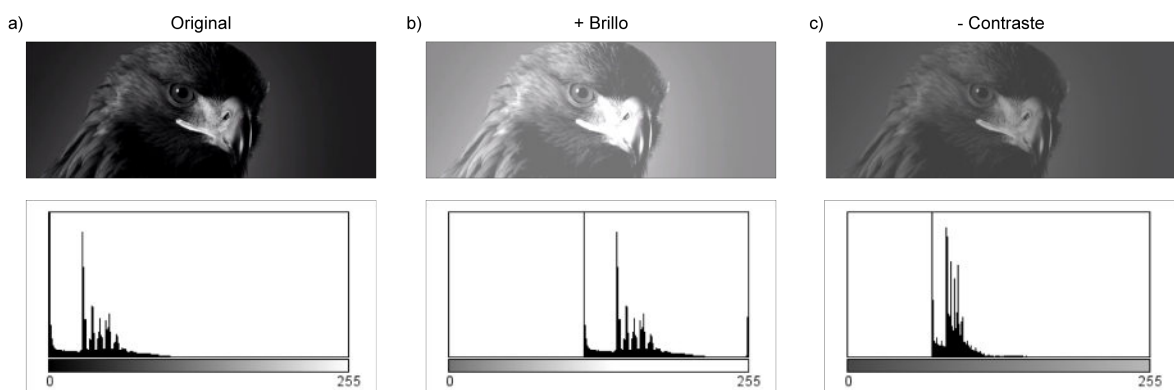


Figura B.2. Histogramas ejemplo con control de brillo y contraste. a) Imagen original con su respectivo histograma. b) Imagen con brillo aumentado y su respectivo histograma. Nótese como no ha cambiado de forma, pero ha sido desplazado hacia la derecha, lo que es indicativo de un aumento en sus niveles brillo. c) Imagen con contraste reducido. Nótese como en algunas zonas de la imagen, el plumaje del águila se ve con menor detalle y su histograma redujo su dispersión.

En la cámara utilizada en este proyecto, el parámetro de brillo tiene escala de 0 a 100 con un valor predeterminado de 50, mientras que el parámetro de contraste sigue una escala de -100 a 100 con un valor por defecto de 0.

La saturación es un indicativo de la intensidad de la luz y que tan distribuida está en un cierto espectro de longitudes de onda, es decir, la coloración de una imagen o escena relativa a su brillo [70]. Al decrementarla se obtiene una imagen acromática y al aumentarla se obtiene una imagen con colores muy intensos (i.e. saturados). Se maneja en el espacio de color HSV (*Hue, Saturation, Value/Lightness*) y es posible ajustar ese único canal. En la cámara, los valores de saturación de color están en el rango de -100 a 100, con un valor por defecto de 0, siendo -100 una imagen acromática o neutra y 100 una imagen saturada [59].

En el caso de la nitidez, ésta sigue un algoritmo que permite mejorar los bordes detectados en la imagen. En la cámara, los valores aceptados para controlar la nitidez se encuentran en un rango de -100 a 100 con valor predeterminado de 0.

Por último, uno de los parámetros importantes a ajustar debido a la modificación realizada en el hardware (inversión del sistema óptico) de la cámara es el balance de blancos. Este balance permite hacer la imagen más cálida o más fría, es decir, ajustar ganancias de los colores rojos y azules detectados respectivamente. Con este proceso se puedan obtener colores en la imagen idénticos (cualitativamente hablando) a los colores observados en la escena original [37, 57, 71]. En las cámaras digitales se pueden observar estos modos de balance que regulan el color en las imágenes dependiendo de la iluminación que se tiene en la escena, como pueden ser lámparas de tungsteno o iluminación solar. El modo predeterminado es "auto" que realiza el balance de los colores automáticamente. En la **figura B.3** se puede observar un ejemplo de diferentes capturas con diferentes balances de blancos.



Figura B.3. Balance de blancos en Cámara Raspberry Pi V2. a) Imágenes capturadas con AWB provocando un decremento en la temperatura del color, es decir, un aumento en la tonalidad de azules; b) Imágenes capturadas con AWB provocando un aumento en la temperatura del color, por tanto, existe un aumento en la tonalidad de rojos. Imágenes obtenidas de [37]

En el balance de colores, hay que considerar un proceso en segundo plano que realiza la cámara debido al firmware, que es la corrección del sombreado de los lentes (Lens Shading Correction). Según la documentación del sensor [49], la función de corrección del sombreado de lentes puede servir como un módulo de ajuste de la desviación en el proceso de ensamblado de los lentes durante la fabricación del módulo, es decir, cualquier distorsión cromática de los lentes estándar utilizados. Esto implica que al utilizar lentes diferentes al del fabricante o bien, hacer cualquier modificación al lente de fábrica, se puede observar poca uniformidad del color a lo largo de una imagen [72]. En caso de que no exista una uniformidad en el color, se puede hacer una sintonización de las ganancias del balance de blancos. Esta acción permite observar un color más real o similar al de la escena original. Cada una de las funciones descritas en esta sección pueden ser controladas por medio del lenguaje de programación Python y se puede hacer una combinación con las bibliotecas de este lenguaje para poder generar una interfaz gráfica de usuario para controlar todos los aspectos de la cámara de una forma interactiva.

APÉNDICE C: NEUTRÓFILOS Y TRAMPAS EXTRACELULARES

Los neutrófilos son un tipo de células blancas de la sangre, con múltiples núcleos y de apariencia granular, conocidos también como granulocito [73]. Los gránulos que conforman al neutrófilo contienen una gran variedad de proteínas con propiedades bactericidas o fungicidas como las α -defensinas. Por esta razón, conforman la primera línea de defensa del sistema inmune del cuerpo humano al encargarse de protegerlo ante organismos invasores mediante mecanismos como la fagocitosis, la generación de especies reactivas al oxígeno (ROS) y la liberación de las moléculas presentes en los gránulos [74].

Estas células se pueden considerar como *kamikazes*, ya que ante la presencia de diversos organismos invasores, los neutrófilos se activan como bombas de ROS o bien, activan un mecanismo que captura, detiene y debilita a las bacterias: las trampas extracelulares [75]. Este mecanismo, descrito en 2004 y denominadas como NET (Neutrophil Extracellular Trap) [76], en donde el neutrófilo extruye una malla de fibras de cromatina. Estas fibras contienen diversos péptidos derivados de los gránulos y enzimas. Algunos ejemplos son :la elastasa, encargada de disolver la elastina de los organismos invasores, así como otras proteínas encontradas en las bacterias [77, 78]; catepsina-G, que apoya en actividades antimicóticas y promueve la susceptibilidad de los macrófagos para agudizar la respuesta inmune a virus; y mieloperoxidasas, que contribuyen a la producción de ácidos hipohalosos fundamentales en la actividad microbicida de los neutrófilos [79]. Esta malla inmoviliza y debilita a las bacterias, por tanto, se considera un proceso innato de la respuesta inmune del cuerpo siendo dos los modelos que buscan describir su funcionamiento: NETosis y Extrusión de ADN/Serina Proteasas. El primer modelo es una forma de muerte celular caracterizada por la liberación de cromatina sin condensar y contenidos granulares hacia el espacio extracelular. Cuando se disuelven las membranas granulares y nucleares en el citoplasma, la membrana

celular se rompe dejando salir el contenido. El segundo, describe la extrusión de la malla de los neutrófilos intactos utilizando la liberación del ADN mitocondrial. Estos procesos pueden estar presentes en diversos estados patológicos y, debido a su rol en los procesos inflamatorios del cuerpo, así como en su papel de defensas antimicrobianas efectivas, pueden llegar a ser un arma de doble filo en individuos susceptibles, promoviendo el daño en los tejidos y la autoinmunidad [74]. Muchas bacterias pueden provocar la formación de NETs. Los estímulos que inducen la formación de estas estructuras pueden ser: la bacteria completa, componentes de la superficie de las bacterias o endotoxinas como liposacáridos (LPS). Algunos ejemplos de bacterias que incitan la formación de NETs son: *S. Aereus*, *S. Flexneri*, *H. Influenzae*, *M. tuberculosis*, *P. Gingivalis* y *E. Coli* [74].

D

APÉNDICE D: CÓDIGO DE MATLAB PARA MAPAS DE CALOR

```
clc
clear all
3 close all

BF = imread('imagebf.tiff');
FITC = imread('imageFITC45.tiff');
HOES = imread('imageHoescht45.tiff');
8 ROD = imread('imageDextran45.tiff');

BF = rgb2gray(BF);
% imshow(BF)

13 R1 = FITC(:,:,1);
G1 = FITC(:,:,2);
B1 = FITC(:,:,3);

R2 = HOES(:,:,1);
18 G2 = HOES(:,:,2);
B2 = HOES(:,:,3);

R3 = ROD(:,:,1);
G3 = ROD(:,:,2);
23 B3 = ROD(:,:,3);

%-----FITC-----

IMG = R1; %Imagen o canal a mostrar
28 m = 1; %Rango de colorbar (-m a m)

F = zeros(size(IMG));
```

```

F(:) = IMG(:);
F1 = (F - min(F(:))) ./ (max(F(:)) - min(F(:)));
33 % F1 = (F1 .* (m*2)) - m;

fig = figure()
c = colorbar;
c.LineWidth = 2.5;
38
subplot(3,3,4)
colormap('hot')
imagesc(F1)
colorbar
43
xh=xlabel('Width [px]');
yh=ylabel('Height [px]');
set([xh,yh],...
    'fontweight','bold',...
48    'fontsize',14,...
    'linewidth',3,...
    'fontname','arial');
%    'color',[1,0,0]);

53 set(gca,'linewidth',2.5,'fontname','arial','fontweight','bold',...
    'fontsize',12);
set(gcf,'Units','centimeters',...
    'Position',[10 10 12 10])
set(gcf,'PaperPositionMode','auto')
58 set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));

IMG = G1; %Imagen o canal a mostrar
m = 1; %Rango de colorbar (-m a m)

63 F = zeros(size(IMG));

```

```

F(:) = IMG(:);
F1 = (F - min(F(:))) ./ (max(F(:) - min(F(:))));
% F1 = (F1 .* (m*2)) - m;

68 subplot(3,3,5)
   colormap('hot')
   imagesc(F1)
   colorbar

73  xh=xlabel('Width [px]');
   yh=ylabel('Height [px]');
   set([xh,yh],...
       'fontweight','bold',...
       'fontsize',14,...
78   'linewidth',3,...
       'fontname','arial');
   %   'color',[1,0,0]);

   set(gca,'linewidth',2.5,'fontname','arial','fontweight','bold',...
83   'fontsize',12);
   set(gcf,'Units','centimeters',...
       'Position',[10 10 12 10])
   set(gcf,'PaperPositionMode','auto')
   set(gcf,'Position',get(0,'Screensize'));

88
   IMG = B1; %Imagen o canal a mostrar
   m = 1; %Rango de colorbar (-m a m)

   F = zeros(size(IMG));
93  F(:) = IMG(:);
   F1 = (F - min(F(:))) ./ (max(F(:) - min(F(:))));
   % F1 = (F1 .* (m*2)) - m;

```

```

subplot(3,3,6)
98 colormap('hot')
imagesc(F1)
colorbar

xh=xlabel('Width [px]');
103 yh=ylabel('Height [px]');
set([xh,yh],...
    'fontweight','bold',...
    'fontsize',14,...
    'linewidth',3,...
108    'fontname','arial');
%    'color',[1,0,0]);

set(gca,'linewidth',2.5,'fontname','arial','fontweight','bold',...
    'fontsize',12);
113 set(gcf,'Units','centimeters',...
    'Position',[10 10 12 10])
set(gcf,'PaperPositionMode','auto')
set(gcf,'Position',get(0,'Screensize'));

118 %-----Rhodamine-----
IMG = R3; %Imagen o canal a mostrar
m = 1; %Rango de colorbar (-m a m)

F = zeros(size(IMG));
123 F(:) = IMG(:);
F1 = (F - min(F(:))) ./ (max(F(:) - min(F(:))));
% F1 = (F1 .* (m*2)) - m;

subplot(3,3,1)
128 colormap('hot')
imagesc(F1)

```

```
colorbar

    xh=xlabel('Width [px]');
133  yh=ylabel('Height [px]');
    set([xh,yh],...
        'fontweight','bold',...
        'fontsize',14,...
        'linewidth',3,...
138    'fontname','arial');
    %    'color',[1,0,0]);

    set(gca,'linewidth',2.5,'fontname','arial','fontweight','bold',...
        'fontsize',12);
143  set(gcf,'Units','centimeters',...
        'Position',[10 10 12 10])
    set(gcf,'PaperPositionMode','auto')
    set(gcf,'Position',get(0,'Screensize'));

148  IMG = G3; %Imagen o canal a mostrar
    m = 1;    %Rango de colorbar (-m a m)

    F = zeros(size(IMG));
    F(:) = IMG(:);
153  F1 = (F - min(F(:))) ./ (max(F(:)) - min(F(:)));
    % F1 = (F1 .* (m*2)) - m;

    subplot(3,3,2)
    colormap('hot')
158  imagesc(F1)
    colorbar

    xh=xlabel('Width [px]');
    yh=ylabel('Height [px]');
```

```

163 set([xh,yh],...
        'fontweight','bold',...
        'fontsize',14,...
        'linewidth',3,...
        'fontname','arial');
168 % 'color',[1,0,0]);

set(gca,'linewidth',2.5,'fontname','arial','fontweight','bold',...
        'fontsize',12);
set(gcf,'Units','centimeters',...
173 'Position',[10 10 12 10])
set(gcf,'PaperPositionMode','auto')
set(gcf,'Position',get(0,'Screensize'));

IMG = B3; %Imagen o canal a mostrar
178 m = 1; %Rango de colorbar (-m a m)

F = zeros(size(IMG));
F(:) = IMG(:);
F1 = (F - min(F(:))) ./ (max(F(:) - min(F(:))));
183 % F1 = (F1 .* (m*2)) - m;

subplot(3,3,3)
colormap('hot')
imagesc(F1)
188 colorbar

xh=xlabel('Width [px]');
yh=ylabel('Height [px]');
set([xh,yh],...
193 'fontweight','bold',...
        'fontsize',14,...
        'linewidth',3,...

```



```

        'fontname','arial');
%      'color',[1,0,0]);
198
set(gca,'linewidth',2.5,'fontname','arial','fontweight','bold',...
      'fontsize',12);
set(gcf,'Units','centimeters',...
      'Position',[10 10 12 10])
203 set(gcf,'PaperPositionMode','auto')
set(gcf,'Position',get(0,'Screensize'));

%-----Hoechst-----
208 IMG = R2; %Imagen o canal a mostrar
m = 1;      %Rango de colorbar (-m a m)

F = zeros(size(IMG));
F(:) = IMG(:);
213 F1 = (F - min(F(:))) ./ (max(F(:)) - min(F(:)));
% F1 = (F1 .* (m*2)) - m;

subplot(3,3,7)
colormap('hot')
218 imagesc(F1)
colorbar

xh=xlabel('Width [px]');
yh=ylabel('Height [px]');
223 set([xh,yh],...
      'fontweight','bold',...
      'fontsize',14,...
      'linewidth',3,...
      'fontname','arial');
228 %      'color',[1,0,0]);

```

```

set(gca,'linewidth',2.5,'fontname','arial','fontweight','bold',...
    'fontsize',12);
set(gcf,'Units','centimeters',...
233 'Position',[10 10 12 10])
set(gcf,'PaperPositionMode','auto')
set(gcf,'Position',get(0,'Screensize'));

IMG = G2; %Imagen o canal a mostrar
238 m = 1; %Rango de colorbar (-m a m)

F = zeros(size(IMG));
F(:) = IMG(:);
F1 = (F - min(F(:))) ./ (max(F(:) - min(F(:))));
243 % F1 = (F1 .* (m*2)) - m;

subplot(3,3,8)
colormap('hot')
imagesc(F1)
248 colorbar

xh=xlabel('Width [px]');
yh=ylabel('Height [px]');
set([xh,yh],...
253 'fontweight','bold',...
    'fontsize',14,...
    'linewidth',3,...
    'fontname','arial');
% 'color',[1,0,0]);
258

set(gca,'linewidth',2.5,'fontname','arial','fontweight','bold',...
    'fontsize',12);
set(gcf,'Units','centimeters',...

```

```
    'Position',[10 10 12 10])
263 set(gcf,'PaperPositionMode','auto')
    set(gcf,'Position',get(0,'Screensize'));

    IMG = B2; %Imagen o canal a mostrar
    m = 1;    %Rango de colorbar (-m a m)
268
    F = zeros(size(IMG));
    F(:) = IMG(:);
    F1 = (F - min(F(:))) ./ (max(F(:)) - min(F(:)));
    % F1 = (F1 .* (m*2)) - m;
273
    subplot(3,3,9)
    colormap('hot')
    imagesc(F1)
    colorbar
278
    xh=xlabel('Width [px]');
    yh=ylabel('Height [px]');
    set([xh,yh],...
        'fontweight','bold',...
283     'fontsize',14,...
        'linewidth',3,...
        'fontname','arial');
    %     'color',[1,0,0]);

288 set(gca,'linewidth',2.5,'fontname','arial','fontweight','bold',...
        'fontsize',12);
    set(gcf,'Units','centimeters',...
        'Position',[10 10 12 10])
    set(gcf,'PaperPositionMode','auto')
293 set(gcf,'Position',get(0,'Screensize'));
    set(gcf,'PaperUnits','normalized');
```

```

set(gcf, 'PaperOrientation', 'landscape');
set(gcf, 'Position', [50 50 1200 800]);
print(fig, ['backgroundUniformity45DegCharac'], '-dpdf')
298
IMG = BF; %Imagen o canal a mostrar
m = 1; %Rango de colorbar (-m a m)

F = zeros(size(IMG));
303 F(:) = IMG(:);
F1 = (F - min(F(:))) ./ (max(F(:)) - min(F(:)));
% F1 = (F1 .* (m*2)) - m;

fig = figure()
308 colormap('hot')
imagesc(F1)
colorbar

xh=xlabel('Width [px]');
313 yh=ylabel('Height [px]');
set([xh,yh],...
    'fontweight','bold',...
    'fontsize',14,...
    'linewidth',3,...
318 'fontname','arial');
% 'color',[1,0,0]);

set(gca, 'linewidth', 2.5, 'fontname', 'arial', 'fontweight', 'bold', ...
    'fontsize', 12);
323 set(gcf, 'Units', 'centimeters', ...
    'Position', [10 10 12 10])
set(gcf, 'PaperPositionMode', 'auto')
set(gcf, 'Position', get(0, 'Screensize'));
set(gcf, 'PaperUnits', 'normalized');

```

```
328 set(gcf, 'PaperOrientation', 'landscape');  
    set(gcf, 'Position', [50 50 1200 800]);  
    print(fig, ['backgroundUniformityBF'], '-dpdf')
```


APÉNDICE E: ANÁLISIS DE RESOLUCIÓN Y AUMENTO DEL SISTEMA

Otra de las características a verificar en el microscopio es la resolución. Como se estudió en la sección 4.2.1.3, la resolución depende de la apertura numérica del lente, ligado a la apertura física del lente, así como de la longitud de onda a observar. Una de las maneras de verificar la resolución es mediante el uso del patrón de resolución USAF 1951 (United States Air Force, Design: 1951, Cancelled Military Standard MIL-STD-150A), ampliamente aceptado como un test de resolución para microscopios, escáneres y cámaras. Está conformado por 7 grupos de 6 elementos cada uno, que contienen a su vez 6 líneas (3 verticales y 3 horizontales) separadas cada una por un espacio del mismo grosor de la línea, como se muestra en la **figura E.1**.

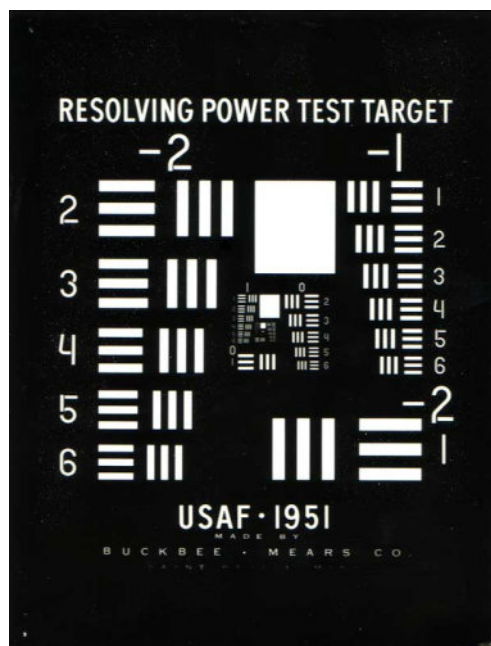


Figura E.1. Configuración del patrón de resolución USAF 1951. Imagen obtenida de [73].

Este patrón permite conocer la resolución del sistema de captura de imágenes en base al elemento más pequeño observable y la ecuación E.1.

$$r = \frac{\frac{3200}{2^{6+\text{grupo}}}}{(2^{\frac{1}{6}})^{\text{elemento}-1}} \quad (\text{E.1})$$

Recordando lo mencionado en la sección 1.1.4, la resolución digital está ligada a la resolución óptica y el aumento, es decir, que el correcto muestreo de la imagen depende del tamaño de los píxeles del sensor como del aumento proporcionado por el lente. La manera más sencilla de verificar el correcto aumento de la imagen es tener una referencia conocida, es decir, la medida física microscópica de un objeto. Se decide utilizar un chip microfluídico con trampas para células. Se mide una de esas trampas con el microscopio Zeiss (Axio Observer, Carl Zeiss MicroImaging GmbH) calibrado, y se relacionar su con la cantidad de píxeles que forman a la misma referencia en el microscopio prototipo. Como se conoce también el tamaño de los píxeles, se puede hacer la relación entre el tamaño físico de la imagen de la referencia en el sensor y el tamaño real de la referencia. Una vez conocida la relación de aumento, se puede conocer el campo de visión (*FOV*) del sistema, con el simple hecho de conocer tanto el largo como el ancho de la imagen píxeles, multiplicarlos por el tamaño de pixel y dividir ambas mediciones entre el aumento obtenido.

APÉNDICE F: OBTENCIÓN DE LA FUNCIÓN DE DISPERSIÓN DE PUNTO (PSF)

Las perlas también se utilizan en la verificación de la resolución, recordando que cambia con respecto a la longitud de onda que se está observando. La manera de hacerlo es obteniendo la función de dispersión de punto (PSF) de una muestra de perlas. En la teoría de formación de imágenes de fluorescencia, el medir el grado de dispersión o difuminación de un objeto puntual es una medida de calidad de un sistema óptico [53]. Si la función es muy dispersa, el sistema óptico puede tener fallas o aberraciones. En el caso de la microscopía, para cada punto en la muestra colocada en el plano focal del microscopio, la señal de irradiancia recolectada de un objeto puntual sería equivalente a la función de dispersión de punto [74]. Un límite convencionalmente aceptado para la resolución de la imagen de un objeto puntual es la obtención del ancho completo a la mitad del máximo (*FWHM*) de la PSF [52, 55, 74], y que está dictada por la ecuación E.1, siendo λ la longitud de onda observada y NA la apertura numérica.

$$FWHM = \frac{0,9\lambda}{NA^2} \quad (F.1)$$

La PSF puede ser modelada como una distribución Gaussiana [75], por ende, puede hacerse un ajuste de curva de la señal obtenida para tener una estimación de dicha función, lo que lleva a que el FWHM pueda ser obtenido con la ecuación E.2, dónde σ es la desviación estándar del ajuste.

$$FWHM = 2\sigma\sqrt{2\ln(2)} \quad (F.2)$$

Con las imágenes de perlas fluorescentes obtenidas se hace la observación y estimación de la PSF adquiriendo el perfil de irradiancia de 40 perlas seleccionadas de manera aleatoria. Después, se obtienen sus ajustes de curva mediante el uso de la herramienta de ajuste de curvas de Fiji y la misma herramienta arroja el parámetro de la desviación estándar del ajuste [76]. Una vez que se obtienen los

valores de las desviaciones estándar de las perlas seleccionadas, se hace uso de la ecuación E.2 para estimar el FWHM de la PSF.

Estas pruebas son complementarias al análisis de la resolución descrito en el Apéndice D.