



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA**

**“ANÁLISIS DE DINÁMICA DE BIOPELÍCULAS CON SPECKLE”**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERO EN FÍSICA APLICADA**

PRESENTA:

**FROYLÁN GARCÍA CRUZ**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JUAN MONTES PÉREZ**

CO-DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JULIO C. RAMÍREZ SAN JUAN (INAOE)**

Heroica Ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca, México, diciembre de 2024



# *Dedicatoria*

*A mi madre Crecencia y a mi padre Felipe:*

*A ustedes les dedico esta tesis, con todo el amor y cariño.*

*Por ofrecerme su apoyo incondicional*

*e inspirarme a no rendirme.*

# *Agradecimientos*

A mi madre Crecencia Cruz V., por ser mi motor de vida y por creer siempre en mí, tu amor, apoyo y sacrificio han hecho posible este trabajo. A mi padre Felipe García G. por motivarme a seguir adelante y por sus sabios consejos los cuales llevaré conmigo siempre. Gracias por acompañarme desde el comienzo, les estoy eternamente agradecido por formar a la persona que soy hoy en día, mi más grande admiración y respeto hacia ustedes.

A mi hermosa familia, mi pilar fundamental, quienes han sido mi mayor apoyo en cada paso de esta travesía. A mi hermana Cinthia, quien me ha dado la dicha de tener un alma tan noble en mi vida, por estar siempre a mi lado y apoyarme a lo largo de mi carrera. A mis hermanas Lety, Judi y Karla, y a mi hermano Luis, por el respaldo emocional y el apoyo constante que me han brindado; a pesar de la distancia, siempre me dieron la tranquilidad de saber que nunca estaba solo. Confío en que Dios volverá a cruzar nuestros caminos y espero con ansias el día en que nos reencontremos. A Jacque y a Mayra, por alegrar mis días y hacer especiales los momentos en casa. Gracias por comprender la dedicación y tiempo que he puesto en este trabajo. A todos ustedes les debo la inspiración para seguir adelante y alcanzar esta meta.

A mis amigos, por ser increíbles personas que la vida y la carrera me dieron la oportunidad de conocer, con ustedes compartí las mejores anécdotas, las cuales atesoraré en mi corazón. Gracias por sacar la mejor versión de mí y por hacer más amena mi estancia en la universidad.

Al Dr. Julio C. Ramírez, por darme la oportunidad de trabajar bajo su supervisión, agradezco profundamente sus enseñanzas, los conocimientos compartidos, y sobre todo, su paciencia y dedicación a lo largo de este proceso.

Al Dr. Juan Montes Pérez, por brindarme su invaluable apoyo en el desarrollo de este trabajo, aprecio profundamente sus consejos, los cuales seguiré aplicando en mi futuro profesional.

A mis sinodales, la Dra. M. Denisse Barreiro, el Dr. Hugo D. Sánchez y el Dr. Ulises Ramírez Meza, gracias por su tiempo y dedicación en revisar este trabajo, sus sugerencias y comentarios han contribuido a la mejora de mi tesis. Un especial agradecimiento a la Dra. Cruz Elizabeth Pérez, por su invaluable apoyo en la obtención de los resultados y por su compromiso y esfuerzo en la revisión de mi trabajo, lo cual aprecio profundamente. Al M.C. David I. Loaiza Toscuente, su colaboración y disposición fueron esenciales para llevar a cabo este trabajo.

Al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE), por brindarme el acceso a sus instalaciones y al laboratorio de speckle, donde obtuve las imágenes fundamentales para mi tesis.

Finalmente, a la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM) por acogerme durante estos cinco años, estoy muy agradecido por las enseñanzas recibidas a lo largo de mi carrera.



# *Resumen*

El estudio sobre la viabilidad celular (VC) es muy importante, en particular el de *Candida tropicalis*, un hongo patógeno que se caracteriza por su virulencia y su capacidad para formar biopelículas convirtiéndola en una especie difícil de erradicar y un foco de infección en dispositivos médicos. Los métodos existentes (por ejemplo el ensayo MTT) que permiten el análisis de la VC a través de la medición de la dinámica de estos microorganismos tienden a ser costosos, tóxicos y con un tiempo de respuesta prolongado. Por lo tanto, en este trabajo se propone la implementación de un sistema de LSI para obtener y analizar la dinámica de la cepa *C. tropicalis*, lo anterior por tratarse de una técnica no invasiva y de bajo costo. Se implementó una metodología dividida en dos partes. La primera se enfocó en el montaje del sistema experimental LSI, a través del cual se adquirieron imágenes de las biopelículas. Posteriormente, en la segunda parte, se construyeron y aplicaron algoritmos diseñados para procesar las imágenes de speckle de las colonias.

Se desarrollaron cuatro algoritmos para procesar los patrones de speckle de 246 biopelículas. Los resultados obtenidos demostraron que los algoritmos propuestos permiten diferenciar los niveles de actividad en los grupos tratados con diferentes concentraciones de DMSO. De esta forma se observó una tendencia clara entre la concentración de DMSO y la actividad medida, esto indica que a concentraciones más altas la población en la biopelícula se reduce, y como consecuencia, disminuye la actividad de la colonia.

**Palabras clave:** Laser Speckle Imaging (LSI), patrones de speckle, algoritmos, viabilidad celular, descriptores de Haralick.

# *Abstract*

The study of cell viability (CV) is highly important, particularly in the case of *Candida tropicalis*, a pathogenic fungus known for its virulence and its ability to form biofilms, making it a species difficult to eradicate and a source of infection in medical devices. Current methods (such as the MTT assay) for analyzing CV by measuring the dynamics of these microorganisms tend to be expensive, toxic, and have a prolonged response time. Therefore, this work proposes the implementation of a Laser Speckle Imaging (LSI) system to capture and analyze the dynamics of the *C. tropicalis* strain, as it is a non-invasive and low-cost technique. A two-part methodology was implemented. The first part focused on setting up the experimental LSI system, through which images of the biofilms were acquired. Subsequently, in the second part, algorithms designed to process the speckle images of the colonies were developed and applied.

Four algorithms were developed to process the speckle patterns of 246 biofilms. The results demonstrated that the proposed algorithms can differentiate activity levels in groups treated with varying concentrations of DMSO. A clear trend was observed between DMSO concentration and the measured activity, indicating that at higher concentrations, the biofilm population decreases, and consequently, the colony's activity diminishes.

**Keywords:** Laser Speckle Imaging (LSI), speckle patterns, algorithms, cell viability, Haralick descriptors.





# ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria . . . . .	I
Agradecimientos . . . . .	II
Resumen . . . . .	IV
Abstract . . . . .	V
Índice general . . . . .	VIII
Índice de figuras . . . . .	XIV
<b>Capítulo 1.</b> . . . . .	<b>1</b>
1.1 Introducción . . . . .	1
1.2 Planteamiento del Problema . . . . .	6
1.3 Justificación . . . . .	7
1.4 Hipótesis . . . . .	7
1.5 Objetivos . . . . .	8
1.5.1 Objetivo general . . . . .	8
1.5.2 Objetivos específicos . . . . .	8
1.6 Metas . . . . .	9
<b>Capítulo 2. Marco teórico . . . . .</b>	<b>11</b>
2.1 Speckle . . . . .	11
2.1.1 Propiedades estadísticas del patrón de speckle . . . . .	12
2.1.2 Contraste . . . . .	18
2.1.3 Tamaño del patrón de speckle . . . . .	19
2.1.4 Formación del patrón de speckle . . . . .	20
2.2 Laser Speckle Imaging . . . . .	23
2.3 Procesamiento digital de imágenes . . . . .	24
2.4 Técnicas de procesamiento de imágenes de speckle . . . . .	26

2.4.1	Time History Speckle Pattern . . . . .	26
2.4.2	Matriz de co-ocurrencia . . . . .	29
2.4.2.1	Construcción de la matriz de co-currencia . . . . .	30
2.4.3	Diferencias Generalizadas . . . . .	44
2.4.4	Fujii . . . . .	45
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Metodología . . . . .</b>	<b>47</b>
3.1	Implementación del arreglo experimental de LSI . . . . .	47
3.1.1	Cultivo de biopelículas de <i>C. tropicalis</i> . . . . .	47
3.1.2	Montaje del arreglo experimental . . . . .	51
3.1.3	Adquisición de imágenes de speckle . . . . .	53
3.2	Implementación de los algoritmos para el análisis de imágenes de speckle . . . . .	58
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Resultados y discusión . . . . .</b>	<b>61</b>
4.1	Algoritmo Time History Speckle Pattern y Matriz de co-ocurrencia . . . . .	61
4.1.1	Experimento 1 . . . . .	61
4.1.2	Resumen de los 13 experimentos . . . . .	66
4.1.3	Análisis ANOVA . . . . .	70
4.2	Algoritmo Diferencias generalizadas . . . . .	74
4.2.1	Experimento 1 . . . . .	74
4.2.2	Resumen de los 13 experimentos . . . . .	75
4.2.3	Análisis ANOVA . . . . .	76
4.3	Algoritmo Fujii . . . . .	78
4.3.1	Experimento 1 . . . . .	78
4.3.2	Resumen de los 13 experimentos . . . . .	81
4.3.3	Análisis ANOVA . . . . .	82
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones . . . . .</b>	<b>85</b>
	Referencias bibliográficas . . . . .	89
	Apéndice A . . . . .	94

# ÍNDICE DE FIGURAS

2.1	Proceso mediante el cual se forman los patrones de speckle a partir de la incidencia de la luz coherente sobre una superficie rugosa. . . . .	11
2.2	Formación de un patrón de speckle sobre un plano. . . . .	13
2.3	Función de probabilidad normalizada de un patrón de speckle. . . . .	18
2.4	Formación de una imagen de patrón de speckle mediante un sistema óptico [29]. . . . .	20
2.5	Arreglos experimentales para la adquisición de patrones de speckle. a) Patrón de motas producido por la libre propagación sin lente, y b) Patrón de motas producido cuando la muestra se refleja en el fotodetector. . . . .	21
2.6	Diagrama esquemático del método de LSI. . . . .	23
2.7	Niveles de procesamiento. . . . .	25
2.8	Construcción de una imagen THSP. (a) Se selecciona una columna en cada fotograma de speckle y, (b) se reconstruye una nueva imagen colocando las columnas extraídas $(t_1, t_2, \dots, t_N)$ de manera adyacente. . . . .	26
2.9	Imágenes de THSP seleccionando columnas específicas. . . . .	27
2.10	THSP para un material biológico con (a) alta actividad y, (b) baja actividad [16]. . . . .	28
2.11	Ejemplos de textura, a) fina, b) suave y c) gruesa. . . . .	29
2.12	Imagen de textura y su matriz de co-ocurrencia asociada. . . . .	30
2.13	Recorrido de la ventana $M \times M$ sobre la imagen a analizar. . . . .	32

2.14	Matriz de co-ocurrencia obtenida como resultado de haber recorrido toda la imagen original. . . . .	32
2.15	Diferentes relaciones espaciales para el par de pixeles. . . . .	33
2.16	a) Imagen de prueba de tamaño $4 \times 4$ y, b) el respectivo nivel de gris de sus pixeles. . . . .	33
2.17	Relación entre el pixel de referencia, la dirección de análisis del pixel vecino, y la separación; esto determina la ventana que será desplazada sobre toda la imagen. Similar al ejemplo de la figura 2.12. . . . .	34
2.18	Combinaciones de niveles de grises de la imagen de prueba. . . . .	35
2.19	Matriz de co-ocurrencia para la imagen de prueba. . . . .	36
2.20	Selección del pixel vecino a la izquierda del pixel de referencia. . . . .	36
2.21	Matriz de co-ocurrencia para la imagen de prueba. . . . .	37
2.22	Matriz simétrica para una relación (derecha+izquierda) de la imagen de prueba. . . . .	37
2.23	Total de posibles pares de pixeles para ambas direcciones, que en este ejemplo es igual a 24. . . . .	38
2.24	Matriz simétrica normalizada. . . . .	38
2.25	a) Imagen constante y, b) matriz de co-ocurrencia. . . . .	39
2.26	a) Imagen con dos niveles de gris y, b) matriz de co-ocurrencia. . . . .	40
2.27	a) Imagen con 10 niveles de gris distribuidos en cada fila y, b) matriz de co-ocurrencia asociada. . . . .	40
2.28	a) Imagen con las intensidades distribuidas aleatoriamente y, b) matriz de co-ocurrencia calculada. . . . .	41
2.29	Matrices de co-ocurrencia para dos etapas en el secado de una pintura, relacionadas con los THSP. (a) Alta actividad y, (b) baja actividad [34].	42
2.30	Matriz de co-ocurrencia de dos estados con diferente nivel de actividad.	42
2.31	Resultado de aplicar la técnica de GD. (a) Imagen de la moneda antes de ser pintada, (b) imagen de speckle de la moneda cubierta con pintura y, (c) nueva imagen construida [57]. . . . .	45

2.32	Resultado de aplicar la técnica de Fujii. (a) Imagen de la moneda antes de ser pintada, (b) imagen de speckle de la moneda cubierta con pintura y, (c) nueva imagen construida [57]. . . . .	46
3.1	Esquema de la parte 1 de la metodología. . . . .	47
3.2	(a) Fotografía de la microplaca utilizada, (b) acercamiento de uno de los micropozos sin biopelícula y, (c) biopelícula de <i>C. tropicalis</i> . . . .	48
3.3	Biopelículas cultivadas, tenemos el grupo de: (a) control (columna 1), DMSO al 25 % (columna 2), (b) 50 % (columna 3), 75 % (columna 4), (c) 100 % (columna 5), y los pozos vacíos (columna 6). . . . .	49
3.4	Conjunto de biopelículas cultivadas: (a) control (columna 1 y 2), (b) y (c) DMSO al 60 % incluyendo un pozo vacío delimitado por la circunferencia blanca. . . . .	49
3.5	Biopelículas cultivadas, divididas en grupos de: (a) pozos vacíos (columna 1), control (columna 2), (b) control (columna 3), DMSO al 60 % (columna 4), (c) y (d) DMSO al 60 %. . . . .	50
3.6	Biopelículas cultivadas, correspondientes a los grupos de: (a) pozos vacíos (columna 1), control (columna 2), (b) control (columna 3), DMSO al 50 % (columna 4), (c) y (d) DMSO al 50 %. . . . .	50
3.7	Grupo de biopelículas cultivadas: (a) control (columna 1), DMSO al 25 % (columna 2), (b) 50 % (columna 3), 60 % (columna 4), (c) 75 % (columna 5), 100 % (columna 6), y (d) pozos vacíos. . . . .	51
3.8	Montaje del sistema LSI. . . . .	52
3.9	Posición entre la cámara y la microplaca. . . . .	53
3.10	Imágenes de speckle de un paquete. . . . .	54
3.11	Patrones de speckle correspondientes a cada grupo de biopelícula. . .	54
3.12	(a) Control (columna 1), DMSO al 25 % (columna 2), (b) 50 % (columna 3), 75 % (columna 4), (c) 100 % (columna 5), y los pozos vacíos (columna 6). . . . .	55

3.13	(a) Control (columna 1 y 2), (b) y (c) DMSO al 60 % incluyendo un pozo. . . . .	56
3.14	(a) Pozos vacíos (columna 1), control (columna 2), (b) control (columna 3), DMSO al 60 % (columna 4), (c) y (d) DMSO al 60 %. . . .	57
3.15	(a) Pozos vacíos (columna 1), control (columna 2), (b) control (columna 3), DMSO al 50 % (columna 4), (c) y (d) DMSO al 50 %. . . .	57
3.16	(a) Control (columna 1), DMSO al 25 % (columna 2), (b) 50 % (columna 3), 60 % (columna 4), (c) 75 % (columna 5), 100 % (columna 6), y (d) pozos vacíos. . . . .	58
3.17	Esquema de la segunda parte de la metodología propuesta. . . . .	58
3.18	Paquete individual de una biopelícula. . . . .	59
3.19	Paquete de imágenes representativo que se usó para (a) THSP y COM y, (b) Diferencias generalizadas y Fujii. . . . .	60
4.1	Matriz de THSP para el grupo de (a) control; los tratamientos con diferentes concentraciones de DMSO (b) 25 %, (c) 50 %, (d) 75 % hasta el (e) 100 %, y, por último (f) el grupo de ruido. . . . .	62
4.2	Matriz de co-ocurrencia asociada a las imágenes de la figura 4.1 para (a) control, (b) - (e) aquellos que recibieron diferentes concentraciones de DMSO desde 25 % hasta 100 % y, (f) ruido. . . . .	64
4.3	Gráficas de los descriptores de Haralick correspondientes al experimento 1. (a) Contraste, (b) Correlación, (c) Energía y (d) Homogeneidad. . . . .	66
4.4	Gráficas del promedio de los 13 experimentos para cada descriptor de Haralick. (a) Contraste, (b) Correlación, (c) Energía, y (d) Homogeneidad. . . . .	67
4.5	Gráficas de los descriptores de Haralick normalizados por experimento. (a) Contraste, (b) Correlación, (c) Energía y (d) Homogeneidad. . . .	69
4.6	(a) Gráficas normalizadas por experimento para contraste y resultados arrojados por ANOVA, (b) gráfica de cajas y (c) gráfica de puntos. . . .	71

4.7	(a) Gráfica de datos normalizados sin outliers, (b) gráfica de cajas y (c) gráfica de puntos. . . . .	72
4.8	Gráficas de datos normalizados: (a) Correlación, (b) Correlación sin outliers, (c) Energía, (d) Energía sin outliers, (e) Homogeneidad, (f) Homogeneidad sin outliers. . . . .	73
4.9	Resultados arrojados por DG para: (a) Control, (b) DMSO al 25 %, (c) DMSO al 50 %, (d) DMSO al 75 %, (e) DMSO al 100 %, y (f) Ruido. . . . .	74
4.10	Gráfica de los promedios de las intensidades por grupo para el experimento 1. . . . .	75
4.11	Gráficas de (a) datos promediados de los 13 experimentos y (b) datos promediados normalizados. . . . .	76
4.12	(a) Gráfica de datos normalizados, (b) gráfica de cajas y (c) gráfica de puntos. . . . .	77
4.13	(a) Gráfica de datos normalizados sin outliers, (b) gráfica de cajas y (c) gráfica de puntos. . . . .	78
4.14	Resultados arrojados por Fujii para el grupo (a) Control, y las diferentes concentraciones de DMSO; (b) 25 %, (c) 50 %, (d) 75 %, (e) 100 %, y (f) el grupo de ruido. . . . .	80
4.15	Gráfica de los promedios de las intensidades para el experimento 1. . . . .	81
4.16	(a) Gráfica de datos promediados respecto a los 13 experimentos y (b) gráfica de los datos promediados normalizados. . . . .	82
4.17	(a) Gráfica de datos normalizados por experimento, (b) gráfica de cajas y (c) gráficas de puntos. . . . .	83
4.18	(a) Gráfica de datos normalizados sin outliers, (b) gráfica de cajas y (c) gráfica de puntos. . . . .	84





# CAPÍTULO 1.

## 1.1 Introducción

*Candida tropicalis* es una levadura patógena que se caracteriza por ser virulenta y resistente con capacidad para causar infecciones graves, especialmente en pacientes con sistemas inmunológicos debilitados, puede diseminarse rápidamente en el cuerpo, lo que resulta en una alta tasa de mortalidad, alcanzando entre un 40 % y 60 % en infecciones graves [1,2]. Además, su capacidad para formar biopelículas, que son capas de microorganismos que se adhieren a una superficie y envueltos en una matriz extracelular, la convierte en una especie difícil de erradicar y contribuye a la propagación de infecciones en dispositivos médicos, esto a su vez facilita su dispersión [3]. Por ello, el desarrollo de estudios sobre la viabilidad celular es importante para crear estrategias efectivas de tratamiento y prevención.

La viabilidad celular se refiere a la cantidad de células vivas y sanas que hay en una muestra, regularmente es uno de los parámetros mas usados para medir la salud de las células. Cuando estas células son expuestas a sustancias químicas, ocurre un fenómeno conocido como citotoxicidad; la cual se entiende como la alteración de las funciones celulares básicas, provocando su inhibición, este efecto se refleja en una disminución de la población o mas bien, de la viabilidad celular [4].

Dentro de los métodos tradicionales para estudiar la viabilidad celular y dinámica celular, se encuentra el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-

2,5-difeniltetrazolio (MTT), más conocido como ensayo MTT, esta técnica se basa en la medición de la actividad de las mitocondrias, que son las “fábricas de energía” de las células. El MTT es un colorante inicialmente de color amarillo que, en presencia de células vivas, es transformado por las mitocondrias en formazán, una sustancia de color violeta. Para llevar a cabo esta prueba, se prepara una solución de MTT que es añadido a las células que se encuentran bajo estudio. Hay que esperar aproximadamente 4 horas para que se formen los cristales de formazán, los cuales para ser medido necesitan solubilizarse y para esto se necesita un agente externo capaz de romper los cristales, después se calcula la cantidad de formazán utilizando un espectrofotómetro de lectura de placas, que mide cuanta luz absorbe la solución a una longitud de onda de 570 nm. Solo las células con mitocondrias viables tienen la capacidad para reducir el MTT a formazán, cuanto más violeta es la solución, mayor es la cantidad de células vivas en la muestra, esta información es interpretada como una medida de la viabilidad celular, expresada en porcentaje [4, 5].

No obstante, a pesar de que el ensayo MTT es una técnica muy útil que proporciona información cuantitativa de manera clara y precisa, presenta ciertas limitaciones; al ser una técnica invasiva, la muestra solo se puede estudiar una vez debido a que es destruida en el proceso de medición, además de no permitir el monitoreo en tiempo real de los cambios dinámicos ya que hay que esperar mucho tiempo para que reaccione el compuesto químico con las células, cabe mencionar también, que el reactivo empleado es costoso y, además es una sustancia tóxica. A raíz de estos factores, surge la necesidad de métodos alternativos capaces de superar estas limitaciones.

Uno de estos enfoques es la tecnología láser, anunciada en 1960 como un invento emblemático, un dispositivo que no fue diseñado necesariamente para aplicaciones específicas, de hecho los científicos habían descubierto una forma novedosa de generar luz coherente, con lo cual buscaron aplicaciones útiles en muchas áreas, rápidamente descubrieron que podían emplear el láser pulsado para perforar hojas de metal

delgadas. Posteriormente, se comenzó a probar para ver si podían tratar enfermedades mejor que otras fuentes de luz, en particular en el campo de la dermatología y oftalmología donde se utilizaba lámparas de xenón, de esta forma se tiene el primer registro del uso del láser en aplicaciones médicas en noviembre de 1961, donde se llevó a cabo con éxito un tratamiento de desprendimiento de retina utilizando un láser de rubí [6], este caso exitoso abrió camino a que los físicos comenzaran a estudiar la interacción entre el láser y la materia.

Eventualmente, esta exploración condujo al descubrimiento del fenómeno de speckle, el cual fue reportado en la literatura por Rigden y Gordon [7], quienes lo describieron como una apariencia granular de alto contraste que se generaba al iluminar una superficie difusa con un haz láser, esta misma naturaleza resulta no visible cuando se observa la misma área bajo la luz ordinaria. Más adelante, en 1974, el mismo fenómeno fue observado por curiosidad por el Dr. N. Abramson, quien notó que cuando una manzana se iluminaba con un haz de láser, el speckle se ‘movía’, esto sugirió en un principio que el speckle en movimiento se podía utilizar para determinar de manera anticipada si un espécimen botánico en particular era adecuado para la interferencia holográfica [8, 9], sin embargo, fue hasta finales de ese mismo año que J. D. Briers [10] presentó un trabajo donde estudió el patrón de speckle en muestras biológicas, en dicha investigación demostró que existía una relación entre las fluctuaciones del patrón y la longitud de onda de la luz utilizada. Este estudio dio paso a una amplia gama de aplicaciones, muchos autores empezaron a sugerir el patrón de speckle como una herramienta útil para prácticas como el monitoreo del flujo sanguíneo, el estudio de muestras botánicas, y diversas aplicaciones biomédicas y biológicas [11].

De esta manera, surge el sistema de Laser Speckle Imaging (LSI), el cual fue implementado por Fercher y Briers [12], se trata de una técnica óptica que usa láseres para realizar mediciones en superficies ópticamente ásperas y en constante

movimiento, al iluminar dicha superficie con luz coherente como un láser, podemos observar una apariencia granular, a esto se le denomina patrón de speckle o moteado [13]. Como consecuencia del movimiento microscópico de la muestra, se genera una imagen de speckle para cada instante de tiempo cuyos patrones de intensidad cambian a lo largo del tiempo, esto permite obtener información del objeto biológico que se está estudiando [14–16]. En la última década, esta herramienta ha demostrado ser útil en múltiples aplicaciones, en el campo de la neurociencia se ha utilizado para la medición del flujo sanguíneo en el cerebro [17]. Inclusive ha sido requerido en aplicaciones industriales para la evaluación y caracterización de materiales [18]. Las imágenes de speckle que se obtienen a través del sistema LSI no proporcionan información por si solas, se requieren de algoritmos de procesamiento computacional que permiten convertir estos patrones en datos cuantitativos para poder interpretar la actividad dinámica de la muestra.

Por lo tanto, teniendo en cuenta las particularidades mencionadas previamente, y las características propias del sistema de estudio, como su naturaleza dinámica que implica una actividad constante, y por tratarse también de un sistema estocástico, donde la actividad de speckle solo puede aproximarse, este trabajo se orienta a explorar una alternativa para medir la viabilidad celular de biopelículas de *C. tropicalis*, superando las limitaciones ya mencionadas de métodos tradicionales como el ensayo MTT. Para esto, se propone implementar la técnica de LSI para adquirir imágenes de speckle de las biopelículas. Además con el fin entender el comportamiento de estas colonias que son sometidas a tratamientos y de medir el porcentaje de la población que permanece viable al exponerse a esta sustancia, se procesaran los patrones de speckle. Los algoritmos que se plantea utilizar para el procesamiento de dichas imágenes son:

1. Time History Speckle Pattern (THSP)
2. Matriz de co-ocurrencia (COM)

3. Diferencias generalizadas y,

4. Fujii.

Se han elegido estas técnicas de procesamiento debido a que han demostrado ser efectivas para medir cambios dinámicos en diversas muestras como, la estructura de ciertas aleaciones (Cu-Al-Ni) [19], la superficie de un polímero [20], el secado de recubrimientos [21], e incluso la bioactividad de una manzana [22]. Para alcanzar este objetivo se utilizó el cultivo de bacterias del grupo *C. tropicalis* llevado a cabo en el laboratorio de microbiología del INAOE por D. Loaiza, se realizó además un estudio acerca de la implementación de un sistema LSI para la obtención de las imágenes de speckle, y posteriormente se construyeron los algoritmos correspondientes para el procesamiento de estas imágenes.

Esta tesis está organizada en 5 capítulos. El capítulo 1 muestra el contexto necesario para entender el motivo detrás de este trabajo, exponiendo las limitaciones existentes de los métodos tradicionales para el estudio de viabilidad celular, y la necesidad de utilizar nuevas técnicas que superen las desventajas de dichos métodos, este capítulo se refuerza con la justificación del estudio y se concluye con la hipótesis y objetivos alcanzados. El capítulo 2 constituye el marco teórico en el cual se explican los conceptos básicos para la comprensión del fenómeno de speckle y los parámetros que conlleva la formación de un patrón de speckle, así mismo, se ofrece una revisión detallada de la literatura existente del sistema experimental LSI y su implementación en aplicaciones dentro de diferentes áreas de la ciencia. Seguido de esto, se aborda el procesamiento digital de imágenes, esta sección proporciona una explicación minuciosa de cada uno de los algoritmos propuestos para la evaluación de la actividad de speckle, junto con ejemplos de su aplicación en diferentes contextos.

En el capítulo 3 se desglosa la metodología, la cual se divide en dos partes; en la primera se describe de manera general el proceso de cultivo de las colonias a lo largo

de 13 experimentos, estas biopelículas se clasificaron en 7 grupos diferentes, de los cuales 5 de ellos recibieron tratamiento con DMSO en distintas concentraciones, se explica además la implementación del arreglo experimental y se detalla el proceso de adquisición de las imágenes de speckle para todos los grupos de biopelículas. En la segunda parte se especifica paso a paso la ejecución de cada uno de los algoritmos partiendo desde la imagen RAW speckle hasta la obtención y análisis de datos cuantitativos de las muestras.

El capítulo 4 presenta los resultados obtenidos y la discusión de los mismos, reportando que los algoritmos han demostrado ser efectivos para determinar la actividad dinámica de las colonias de bacterias, algunos lo hicieron con mayor precisión que otros, sin embargo, los datos obtenidos revelan una tendencia clara entre los diferentes grupos de biopelículas. Finalmente, el capítulo 5 contiene las conclusiones del trabajo en función de los objetivos establecidos.

## 1.2 Planteamiento del Problema

El estudio de la viabilidad celular de hongos como *C. tropicalis* es de suma relevancia en áreas de investigación como la medicina y la microbiología, ya que esto permite conocer el comportamiento de este patógeno que es virulento y resistente, así como su reacción al ser expuesto a tratamientos, lo anterior contribuye a la creación de estrategias efectivas de medicación y prevención. Como se mencionó al inicio, los métodos comúnmente empleados presentan desventajas, siendo una de ellas el uso de agentes externos, que son costosos y tóxicos. Además de tratarse de técnicas invasivas que presentan restricciones en cuanto al tiempo de respuesta que suele ser prolongado. Esto subraya la necesidad de utilizar métodos más eficientes, como la técnica de Laser Speckle Imaging, que junto con algoritmos de procesamiento de imágenes, ofrece una alternativa viable por ser un método no invasivo, de bajo costo y relativamente sencillo de implementar, además de permitir el monitoreo en tiempo real de la bioactividad, lo cual es esencial para aplicaciones que requieren mediciones

precisas y actualizadas de manera continua. Esta combinación de LSI con algoritmos de procesamiento de imágenes permite la obtención de datos cuantitativos y con ello una medida de la viabilidad celular. De modo que, para determinar la actividad de la muestra y estudiar la viabilidad celular de las biopelículas, se buscará procesar los patrones de speckle mediante el Time History Speckle Pattern (THSP), Matriz de co-ocurrencia (COM), Diferencias generalizadas y Fujii.

### **1.3 Justificación**

El estudio de las biopelículas, en particular la viabilidad celular de colonias de *C. tropicalis*, como se mencionó anteriormente es de suma relevancia en diversas áreas de investigación, incluyendo la medicina y microbiología. Uno de los aspectos clave que motiva esta investigación es la no invasividad y la capacidad de monitoreo en tiempo real que ofrece la técnica de LSI, estas características son esenciales en aplicaciones que requieren resultados precisos, observación en tiempo real y mediciones actualizadas de manera continua, además, puesto que aún no se ha evaluado como funcionan los algoritmos antes mencionados al aplicarse a biopelículas formadas por *C. tropicalis*, en este trabajo de tesis se pretende revisar, rediseñar y aplicar algoritmos específicos para el procesamiento de imágenes de speckle, con el objetivo de cuantificar y comprender la actividad de estas colonias de hongos.

### **1.4 Hipótesis**

El sistema LSI propuesto permitirá un análisis en tiempo real, preciso y no destructivo de la viabilidad celular de las biopelículas. Además, dado que los algoritmos mencionados han sido efectivos para determinar el nivel de actividad en procesos de secado de pintura para dos estados diferentes, se infiere que, estos algoritmos podrían ser aplicables a fenómenos biológicos, específicamente, para analizar la dinámica de colonias que crecen sobre biopelículas; esto se debe a que en el secado de pintura por ser una suspensión coloidal, se tiene movimiento Browniano, análogo a este tipo

de movimiento estocástico se tiene una biopelícula que presenta actividad celular. Con base en esto, se plantea la hipótesis de que la aplicación de estos algoritmos en biopelículas permitirá evaluar los diferentes niveles de actividad en grupos de biopelículas sometidas a tratamientos con distintas concentraciones. Esto posibilitará distinguir las variaciones en la actividad dinámica de las colonias bacterianas en función de los tratamientos aplicados, proporcionando así un análisis cualitativo y cuantitativo detallado.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo general**

Implementar diferentes algoritmos de análisis de speckle de dinámica lenta para el estudio de la viabilidad de *C. Tropicalis* en biopelículas.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

1. Entender los conceptos físicos sobre el fenómeno de speckle y algoritmos de procesamiento, incluyendo el estudio de la técnica estadística Análisis de Varianza (ANOVA).
2. Establecer una metodología de implementación del sistema LSI, así como de procesamiento y análisis de las imágenes de speckle.
3. Implementar y calibrar un sistema LSI para el análisis de biopelículas de *C. tropicalis*.
4. Capturar imágenes de speckle de los diferentes grupos de biopelículas para la obtención del paquete de N imágenes.
5. Rediseñar y/o desarrollar los algoritmos de análisis de speckle dinámico.



6. Aplicar los algoritmos de speckle a las imágenes y recolectar los datos individuales de cada biopelícula.
7. Analizar los patrones de comportamiento de cada algoritmo para cada uno de los grupos de biopelículas.
8. Comparar los algoritmos de speckle para determinar cuál de ellos proporciona mayor información en la actividad de biopelículas.

## **1.6 Metas**

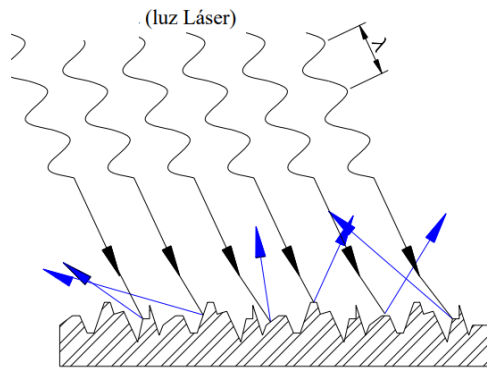
1. Implementar algoritmos de análisis de speckle que midan la viabilidad celular con un nivel de confiabilidad comparable al ensayo MTT en un tiempo mas corto.
2. Proporcionar una herramienta de medición de la viabilidad celular de forma no invasiva y en tiempo real para contribuir al avance de la investigación en biopelículas.



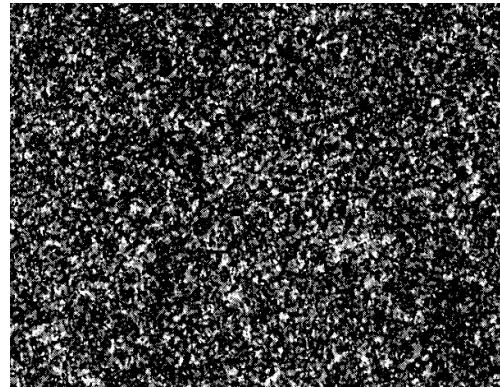
# CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

## 2.1 Speckle

El patrón de speckle (o moteado), se origina a partir de la interferencia aleatoria de la luz coherente [23]. Cuando el haz de luz incide sobre un objeto, tal como se muestra en la figura 2.1a, su superficie irregular dispersa la luz en todas las direcciones, esto genera interferencia constructiva y destructiva de las ondas dispersadas, como resultado, se observa una apariencia granular conformada por puntos brillantes de distintas intensidades que varían de manera aleatoria [24]. Estos puntos que conforman el patrón de speckle se pueden observar en la figura 2.1b.



(a) Dispersión aleatoria de la luz en el espacio.



(b) Patrón de speckle tomado en un instante de tiempo [25].

Figura 2.1: Proceso mediante el cual se forman los patrones de speckle a partir de la incidencia de la luz coherente sobre una superficie rugosa.

Si el sistema de estudio es un medio disperso y sus partículas presentan relativamente poco movimiento (sistema estático), se produce un patrón de speckle “cuasi” estático, donde los puntos brillantes y oscuros se mantienen constantes, por otro lado, si

las partículas dispersas en la muestra están en movimiento, se generan fluctuaciones en la interferencia respecto a cada observación, lo que resulta en un patrón de speckle dinámico [23], cuyas variaciones en las intensidades cambian en cada instante de tiempo.

### 2.1.1 Propiedades estadísticas del patrón de speckle

En general, las propiedades estadísticas del patrón de speckle dependen tanto de la coherencia de la luz incidente como de las propiedades de la superficie o medio que dispersa el haz. Se dice que una luz es coherente (como la producida por un láser) si existe una relación entre sus fases, es decir, dos ondas son perfectamente coherentes si mantienen una relación de fase constante a lo largo del tiempo [26]. La coherencia puede dividirse en dos tipos; la coherencia temporal que implica la estabilidad de fase a lo largo del tiempo (permite que las interferencias se mantengan constantes en diferentes momentos). Por otro lado, la coherencia espacial se refiere a la relación de fase entre distintos puntos del haz. Ambos tipos de coherencias son necesarios para que se forme un patrón de speckle.

Para describir matemáticamente el patrón de speckle, consideremos una superficie rugosa iluminada por un haz de luz coherente, el campo eléctrico de la luz reflejada en un punto  $P$  en el plano de observación, consiste en la contribución de todas las  $N$  ondas dispersas por la superficie [27], tal como se muestra en la figura 2.2.

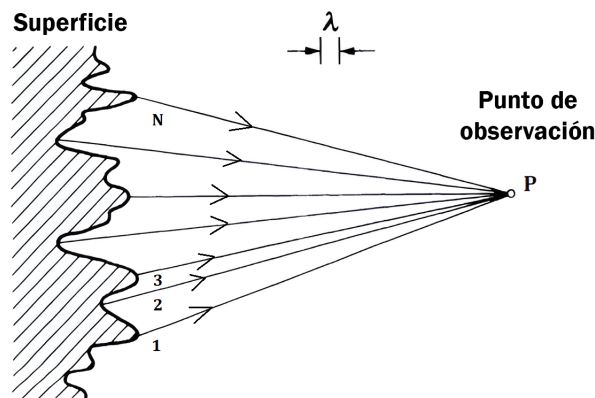


Figura 2.2: Formación de un patrón de speckle sobre un plano.

Por lo tanto, la amplitud compleja en el punto en un patrón de speckle se puede escribir mediante la siguiente ecuación [28]

$$E = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N E_k = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |E_k| e^{i\phi_k}, \quad (2.1)$$

donde  $|E_k|$  y  $\phi_k$  representan la amplitud y fase de cada onda dispersada y  $N$  es el número total de dichas contribuciones. Ahora hacemos dos suposiciones importantes sobre los dispersores [25]:

1. Tanto la amplitud  $E_k$  como la fase  $\phi_k$  son estadísticamente independientes entre sí debido a que la rugosidad de la superficie tiene un patrón no uniforme.
2. La fase  $\phi_k$  está distribuida uniformemente en el intervalo de  $(-\pi, \pi)$ .

La parte real e imaginaria del campo resultante descrita por la ecuación 2.1 son [27]

$$E_r = \text{Re}\{E\} = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |E_k| \cos \phi_k \quad (2.2)$$

$$E_{im} = \text{Im}\{E\} = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |E_k| \sin \phi_k \quad (2.3)$$

Los valores promedio de  $E_r$  y  $E_{im}$  se pueden calcular de la siguiente manera

$$\langle E_r \rangle = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N \langle |E_k| \cos \phi_k \rangle = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N \langle |E_k| \rangle \langle \cos \phi_k \rangle \quad (2.4)$$

$$\langle E_{im} \rangle = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N \langle |E_k| \sin \phi_k \rangle = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N \langle |E_k| \rangle \langle \sin \phi_k \rangle \quad (2.5)$$

Se ha usado la suposición (1) para promediar  $|E_k|$  y  $\phi_k$  por separado y además, dado que la fase varía de  $-\pi$  hasta  $\pi$ , se tiene que  $\langle \cos \phi_k \rangle = \langle \sin \phi_k \rangle = 0$ , con esto observamos que el promedio de la amplitud de  $E_r$  y  $E_{im}$  es igual a cero

$$\begin{aligned} \langle E_r \rangle &= 0 \\ \langle E_{im} \rangle &= 0 \end{aligned} \quad (2.6)$$

Ahora, para ver la relación entre la varianza de la parte real e imaginaria, y determinar también si existe alguna correlación, procedemos como se sigue

$$\langle E_r^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N \langle |E_k| |E_m| \rangle \langle \cos \phi_k \cos \phi_m \rangle \quad (2.7)$$

$$\langle E_{im}^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N \langle |E_k| |E_m| \rangle \langle \sin \phi_k \sin \phi_m \rangle \quad (2.8)$$

$$\langle E_r E_{im} \rangle = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N \langle |E_k| |E_m| \rangle \langle \cos \phi_k \sin \phi_m \rangle \quad (2.9)$$

Recordando las propiedades de ortogonalidad de las funciones trigonométricas

$$\langle \cos \phi_k \cos \phi_m \rangle = \langle \sin \phi_k \sin \phi_m \rangle = \begin{cases} \frac{1}{2} & \text{si } k = m \\ 0 & \text{si } k \neq m \end{cases} \quad (2.10)$$

$$\langle \cos \phi_k \sin \phi_m \rangle = \langle \sin \phi_k \cos \phi_m \rangle = 0$$

De esta forma, podemos reescribir las ecuaciones 2.7 - 2.9 como

$$\langle E_r^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{\langle |E_k|^2 \rangle}{2} \quad (2.11)$$

$$\langle E_{im}^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{\langle |E_k|^2 \rangle}{2} \quad (2.12)$$

$$\langle E_r E_{im} \rangle = 0 \quad (2.13)$$

De la ecuación 2.11 y 2.12 podemos observar que la varianza es idéntica tanto para la parte real como la parte imaginaria del campo complejo, y que además, dado el resultado de la ecuación 2.13, no están correlacionadas entre sí. Con base en estas propiedades obtenidas previamente y de las características mencionadas al principio, y puesto que en la práctica el número de contribuciones tiende a ser extremadamen-

te grande ( $N \rightarrow \infty$ ), se deriva del teorema del limite central que  $E_r$  y  $E_{im}$  son asintóticamente gaussianos.

La distribución normal bivariada describe la relación conjunta entre dos variables aleatorias,  $X$  y  $Y$ , mediante su función de densidad conjunta

$$f_{X,Y}(x,y) = \frac{1}{2\pi\sigma_X\sigma_Y\sqrt{1-\rho^2}} \exp\left(-\frac{1}{2(1-\rho^2)} \cdot \left[\frac{(x-\mu_X)^2}{\sigma_X^2} + \frac{(y-\mu_Y)^2}{\sigma_Y^2} - \frac{2\rho(x-\mu_X)(y-\mu_Y)}{\sigma_X\sigma_Y}\right]\right) \quad (2.14)$$

donde  $\mu_X$  y  $\mu_Y$  son las medias de  $X$  y  $Y$ , respectivamente,  $\sigma_X^2$  y  $\sigma_Y^2$  son las varianzas, y  $\rho$  es el coeficiente de correlación entre  $X$  y  $Y$ .

Acoplando las ecuaciones 2.6 y 2.11 - 2.13 no correlacionadas e independientes, encontramos que la función de densidad gaussiana circular es

$$P_{r,im}(E_r, E_{im}) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{E_r^2 + E_{im}^2}{2\sigma^2}} \quad (2.15)$$

donde

$$\sigma^2 = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{\langle |E_k|^2 \rangle}{2} \quad (2.16)$$

Ahora, para analizar el comportamiento de esta función, examinamos la naturaleza estadística de la intensidad  $I$  y fase  $\theta$ , dado que son independientes una de otra debido a la superficie iluminada [29],  $I$  y  $\theta$  del campo resultante están relacionadas con las partes reales e imaginarias de la amplitud compleja de la siguiente manera

$$\begin{aligned} I &= E_r^2 + E_{im}^2 \\ \theta &= \tan^{-1} \left( \frac{E_{im}}{E_r} \right) \end{aligned} \quad (2.17)$$

lo cual nos lleva a la siguiente expresión

$$\begin{aligned} E_r &= \sqrt{I} \cos \theta \\ E_{im} &= \sqrt{I} \sin \theta \end{aligned} \tag{2.18}$$

Sustituyendo estos términos en la ecuación 2.15 y simplificando se obtiene que

$$P_{r,im}(E_r, E_{im}) = \begin{cases} \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{I}{2\sigma^2}} & \text{si } I \geq 0 \text{ y } -\pi \leq \theta \leq \pi \\ 0 & \text{en cualquier otro caso} \end{cases} \tag{2.19}$$

Recalcando nuevamente la independencia entre la intensidad y fase, podemos reescribir la ecuación 2.19 como dos funciones independientes

$$p_{I,\theta}(I, \theta) = p_I(I)p_\theta(\theta) \tag{2.20}$$

Así, integrando la función de densidad de probabilidad de la intensidad de manera separada en sus respectivos límites, obtenemos el siguiente resultado

$$p_I(I) = \int_{-\pi}^{\pi} p_{I,\theta}(I, \theta) d\theta = \begin{cases} \frac{1}{2\sigma^2} e^{-\frac{I}{2\sigma^2}} & \text{si } I \geq 0 \\ 0 & \text{en cualquier otro caso} \end{cases} \tag{2.21}$$

De manera similar, la función de probabilidad de la fase esta dada por

$$p_\theta(\theta) = \int_0^\infty p_{I,\theta}(I, \theta) dI = \begin{cases} \frac{1}{2\pi} & \text{si } -\pi \leq \theta \leq \pi \\ 0 & \text{en cualquier otro caso} \end{cases} \tag{2.22}$$

Podemos ver que la fase se mantiene constante, mientras que la intensidad disminuye exponencialmente, esto demuestra que la función de densidad de probabilidad para la intensidad en un patrón de speckle sigue la estadística gaussiana.



Siguiendo con el análisis, se demuestra de manera directa que el  $n$ -ésimo momento  $\langle I^n \rangle$  de la intensidad es

$$\langle I^n \rangle = n!(2\sigma^2)^n \quad (2.23)$$

Para el caso en el que  $n = 1$ , vemos inmediatamente que

$$\langle I \rangle = 2\sigma^2 \quad (2.24)$$

Con esto, podemos finalmente reescribir y simplificar la función de densidad de probabilidad de la intensidad de la siguiente manera

$$P_I(I) = \frac{1}{\langle I \rangle} \text{Exp} \left[ -\frac{I}{\langle I \rangle} \right], \quad (2.25)$$

cuyo comportamiento se muestra en la siguiente figura:

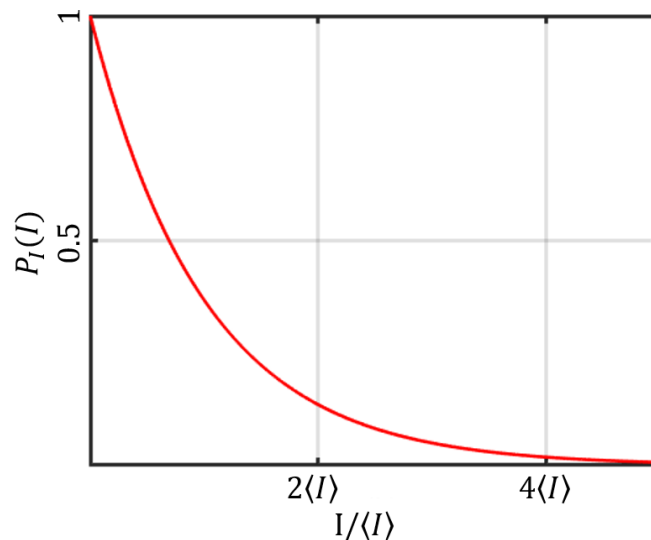


Figura 2.3: Función de probabilidad normalizada de un patrón de speckle.

Con esto podemos ver que la probabilidad de los puntos oscuros es mayor que la de los puntos brillantes [30], de tal manera que el valor de intensidad más probable en un patrón de speckle es cero, lo que indica que la mayoría de los patrones son oscuros, y aunque inicialmente se podría considerar que  $0 < I < \infty$ , en la práctica el rango efectivo de valores de intensidad siempre se encuentra entre  $[0, 2\langle I \rangle]$ , siendo poco probable que las intensidades superiores a  $5\langle I \rangle$  ocurran.

## 2.1.2 Contraste

El contraste es una propiedad que describe la diferencia de intensidad de píxeles adyacentes o entre distintas partes en una región [31]; en una imagen donde existen zonas brillantes y oscuras (patrones de interferencia), el contraste se puede determinar mediante la ecuación

$$\frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}, \quad (2.26)$$

donde  $I_{\max}$  e  $I_{\min}$  representan la intensidad más alta y más baja, respectivamente. En un patrón de speckle, el contraste se puede determinar a partir de la desviación estándar y el promedio de la intensidad [32], dado como

$$K = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle} \quad (2.27)$$

Un patrón de speckle se considera totalmente desarrollado bajo condiciones ideales (el sistema es estático, donde el haz incidente proviene de una fuente de luz completamente coherente y polarizada) en este caso, la desviación estándar  $\sigma$  es igual a la intensidad media  $\langle I \rangle$ , lo cual indica que el patrón de speckle resultante está completamente definido y su contraste es igual a 1; sin embargo, esto no ocurre en la práctica real, por lo general, los patrones de speckle no están completamente desarrollados, si no que la desviación estándar suele ser menor que la intensidad media, resultando en un contraste siempre menor a 1 [33], esta condición se describe matemáticamente como  $0 \leq K \leq 1$ .

## 2.1.3 Tamaño del patrón de speckle

En la figura 2.4 podemos observar algunos parámetros relacionados con el tamaño de speckle.

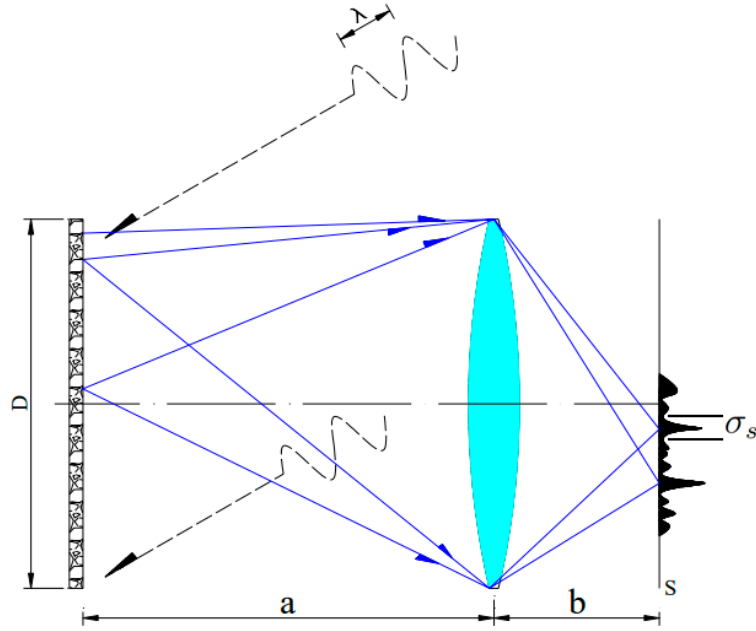


Figura 2.4: Formación de una imagen de patrón de speckle mediante un sistema óptico [29].

En la figura 2.4 se puede observar el tamaño de un patrón de speckle  $\sigma_s$  depende de la longitud de onda y algunas características específicas de los componentes ópticos utilizados [27]

$$\sigma_s = 1.2(1 + M)\lambda F, \quad (2.28)$$

donde,  $\lambda$  es la longitud de onda de láser utilizado,  $F$  es el número de apertura de la lente, dado como  $F = \frac{f_L}{D}$ , siendo  $f_L$  la distancia focal de la lente, y  $M$  es la magnificación de la lente dada como  $M = \frac{(b - f_L)}{f_L}$ .

#### 2.1.4 Formación del patrón de speckle

La figura 2.5 muestra dos arreglos diferentes para registrar los patrones de speckle dinámico de la actividad de una muestra activa, en la figura 2.5a (speckle-objetivo) se registra el patrón de moteado por la libre propagación del frente de onda del haz proveniente de la muestra, mediante un dispositivo de carga acoplada (CCD), como es el fotodetector de cámara [34].

Por otra parte, también se pueden obtener los patrones de speckle a través de un

sistema óptico (speckle-subjetivo), similar al arreglo anterior, sin embargo, este sistema incluye una lente frente a la cámara CCD, y un difusor a la salida del haz, el cual permite una distribución homogénea de la luz sobre el objeto, tal como se muestra en la figura 2.5b.

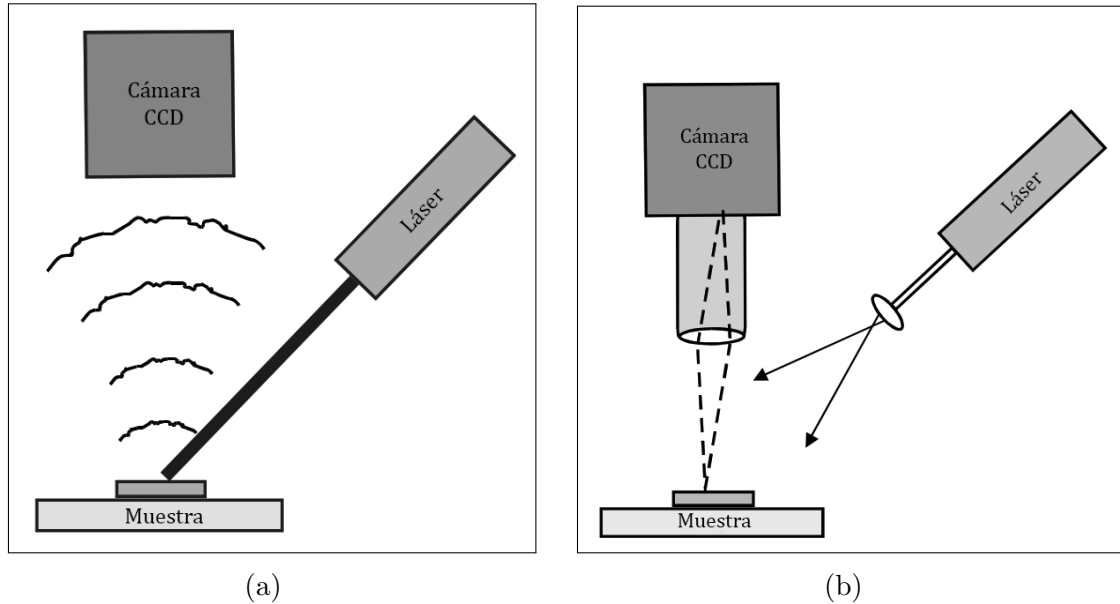


Figura 2.5: Arreglos experimentales para la adquisición de patrones de speckle. a) Patrón de motas producido por la libre propagación sin lente, y b) Patrón de motas producido cuando la muestra se refleja en el fotodetector.

La diferencia clave entre ambos tipos de speckle radica en la forma en que se genera, el speckle objetivo surge debido a la iluminación desigual de la superficie del objeto, y su estructura depende de factores como el área iluminada en la pantalla y la distancia entre la pantalla y el plano del sensor. El tamaño del speckle subjetivo, por otro lado, no está influenciado por el área iluminada o la distancia desde la pantalla, sino por la apertura angular del sistema de imagen, por lo tanto, para obtener una resolución clara de la estructura del speckle subjetivo, es importante seleccionar cuidadosamente el tamaño de la apertura así como la longitud focal de la lente de imagen [35, 36].

Al inicio los estudios se limitaban en suprimir los patrones de speckle debido a que generalmente representaban un obstáculo, pues la presencia de estos patrones en una imagen por ejemplo, reducía la capacidad para apreciar detalles finos en dicha

imagen [25]. No obstante, surgieron investigaciones sobre potenciales aplicaciones de los patrones de speckle, Ichirou Yamaguchi y colaboradores realizaron estudios sobre la medición de deformaciones en materiales, donde midieron la tensión y deformación de diferentes materiales incluyendo acero inoxidable, aluminio, latón, cobre y acero. Usando la técnica de tensión de moteado lograron obtener los coeficientes de Poisson y de expansión térmica, los resultados obtenidos mostraron una buena concordancia con otros métodos, con discrepancias menores al 10 % para la mayoría de los materiales, excepto el cobre, que presentó una discrepancia del 23 % [37, 38]. Además, resaltaron el hecho de que esta técnica permite detectar la deformación superficial sin contacto directo, lo cual sugirió que los patrones de speckle se podrían también implementar a otras aplicaciones.

Esto ha contribuido en gran medida al desarrollo de técnicas aplicables inclusive en el ámbito aeroespacial, autores como Ravindra Mallya, Amol Kiran Uchil, Satish B. Shenoy y Anand Pai han empleado la técnica de Correlación de Imágenes Digitales (DIC) con la finalidad de identificar alteraciones en un objeto; realizaron una comparación de imágenes con patrón de speckle antes y después de la deformación, obteniendo un informe detallado sobre los cambios observados. Esta herramienta fue indispensable para comprender las implicaciones del estrés y la deformación en las alas de las aeronaves, permitiendo realizar modificaciones en sus diseños y la solución de cualquier problema detectado. [39].

Múltiples aplicaciones surgieron después, en astronomía, mediante interferometría de speckle se han llevado a cabo estudios sobre estrellas binarias, rotación estelar, cromosferas estelares y otros objetos [40–42], extendiéndose también al campo biomédica con la técnica de Laser Speckle Imaging.

## 2.2 Laser Speckle Imaging

La técnica de “imágenes de moteado láser” (LSI por sus siglas en inglés) es una técnica óptica no invasiva utilizada para visualizar y monitorear la velocidad del flujo sanguíneo a través de mapas bidimensionales [43]. La configuración de LSI es relativamente sencilla, en la figura 2.6 se pueden observar los principales componentes; se emplea una fuente de luz coherente y una cámara CCD, donde en principio, el haz del láser antes de incidir en el objeto atraviesa un difusor que expande su diámetro favoreciendo así una iluminación homogénea sobre la muestra, la luz dispersada de manera aleatoria pasa a través de una lente y un conjunto de polarizadores antes de ser recogida por una cámara CCD formando finalmente las imágenes de speckle las cuales se almacenan en un ordenador.

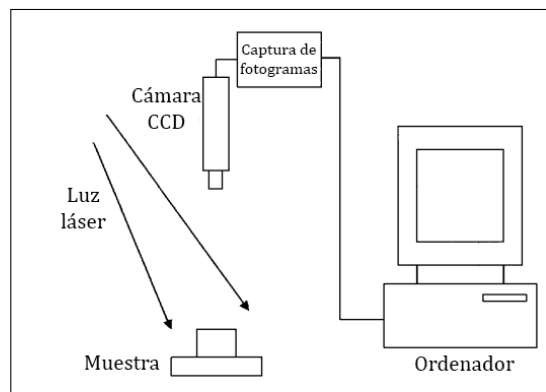


Figura 2.6: Diagrama esquemático del método de LSI.

El speckle variable en el tiempo generalmente se produce cuando se observan muestras biológicas bajo iluminación de luz láser, los ejemplos reportados en la literatura incluyen varios espécimen botánicos, en este caso el fenómeno se atribuye al flujo de fluidos dentro de la planta, o incluso al movimiento de las partículas dentro de las células de la planta [9]. Una de las aplicaciones más importantes se presenta cuando las fluctuaciones de los patrones son causadas por el flujo sanguíneo, a partir de estudios sobre las estadísticas de estas fluctuaciones es posible obtener información sobre el movimiento de los dispersores. De esta forma Fercher y Briers introdujeron el método LSI, utilizando estadísticas espaciales analizaron los cambios en la inten-

sidad de la luz proveniente de la superficie de una muestra, la técnica consistía en fotografiar la retina bajo la iluminación láser utilizando un tiempo de exposición del mismo orden que el tiempo de correlación de las fluctuaciones de la intensidad [12].

Tras su primera aplicación, la técnica LSI se volvió una herramienta versátil en aplicaciones sobre estudios dermatológicos, neuroquirúrgicos y endoscópicos. Así mismo, la implementación de este sistema junto con el desarrollo de métodos ópticos, ha facilitado investigaciones acerca de los mecanismos fisiológicos y patológicos que regulan el flujo sanguíneo en regiones por debajo de la corteza cerebral [44, 45]. Actualmente, las aplicaciones desarrolladas han posicionado a LSI como una técnica competitiva frente a los métodos existentes, debido a su capacidad para obtener una imagen precisa y en tiempo real, además, al tratarse de una técnica no invasiva cuya instrumentación es simple y de bajo costo hace que sea fácilmente accesible para muchas aplicaciones [17].

## **2.3 Procesamiento digital de imágenes**

Después de haber cubierto la parte relacionada al método de LSI, el siguiente enfoque es entender como se trabajan con las imágenes de speckle, ahora que disponemos de ellas, es necesario responder a algunas preguntas sobre cómo se pueden procesar para obtener información útil y que herramientas se pueden emplear para analizar los patrones de speckle. De este modo, continuamos con el segundo apartado de este capítulo, la parte computacional que constituye un elemento fundamental en el desarrollo de este trabajo.

Las técnicas para analizar una imagen digital se agrupan en un área llamada Procesamiento Digital de Imágenes (PDI). Este proceso se entiende como una operación cuya entrada es una imagen y cuya salida varía según las necesidades, en algunos casos, se realizan operaciones para reducir el ruido, mejorar el contraste o aplicar filtros de enfoque, en los cuales tanto las entradas como las salidas son imágenes.

Por otro lado, en aplicaciones que requieren el reconocimiento de objetos, las salidas son atributos extraídos de la imagen como contornos, bordes o la identificación de objetos específicos [46]. Estas técnicas se organizan según el nivel de procesamiento que se desea realizar para analizar la información contenida en la imagen. Estos niveles forman una cadena como la mostrada en la figura 2.7:

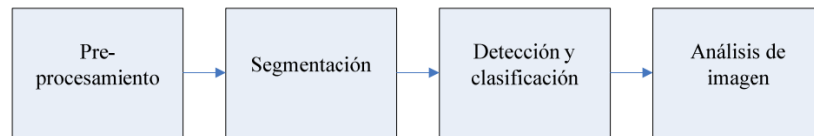


Figura 2.7: Niveles de procesamiento.

El *pre-procesamiento* implica operaciones para adaptar/recuperar información que servirán para un análisis posterior (algunos ejemplos son las operaciones de intensidad y contraste), en la *segmentación* se hace una partición de la imagen en varias regiones según la necesidad del problema a resolver y, finalmente se hace una *clasificación de objetos* contenidos en la imagen para obtener información acerca de lo que se muestra [47].

A lo largo de los años, el PDI ha adquirido gran importancia en diversas áreas de la tecnología de la información, el cómputo, y la astrofísica. Actualmente, constituye la base fundamental para una creciente variedad de aplicaciones que incluyen la diagnosis médica, la exploración espacial, la visión por computadora y aplicaciones recientes como la clasificación y el control de calidad de frutas [48, 49].

## 2.4 Técnicas de procesamiento de imágenes de speckle

Existen diferentes técnicas para procesar imágenes, las que a continuación se detallan están diseñadas para procesar paquetes de imágenes de speckle, las cuales como se mencionaron en un inicio incluyen el Time History Speckle Pattern (THSP), la Matriz de Co-ocurrencia (COM), Diferencias generalizadas y Fujii. Estos algoritmos nos permitirán profundizar en la actividad de la muestra bajo estudio,



brindando una comprensión detallada del fenómeno que se está observando.

### 2.4.1 Time History Speckle Pattern

El THSP, como su nombre lo indica, es una matriz 2D que representa la evolución temporal de una muestra o un sistema [34]. Para su formación, se requiere de un paquete de  $N$  imágenes (figura 2.8a) de la cual se extrae una columna de píxeles en cada fotograma ( $1, 2, \dots, N$ ), después se procede a colocar cada columna una al lado de la otra reconstruyendo así una nueva imagen llamada historial temporal del patrón de speckle (THSP) tal como se muestra en la figura 2.8b.

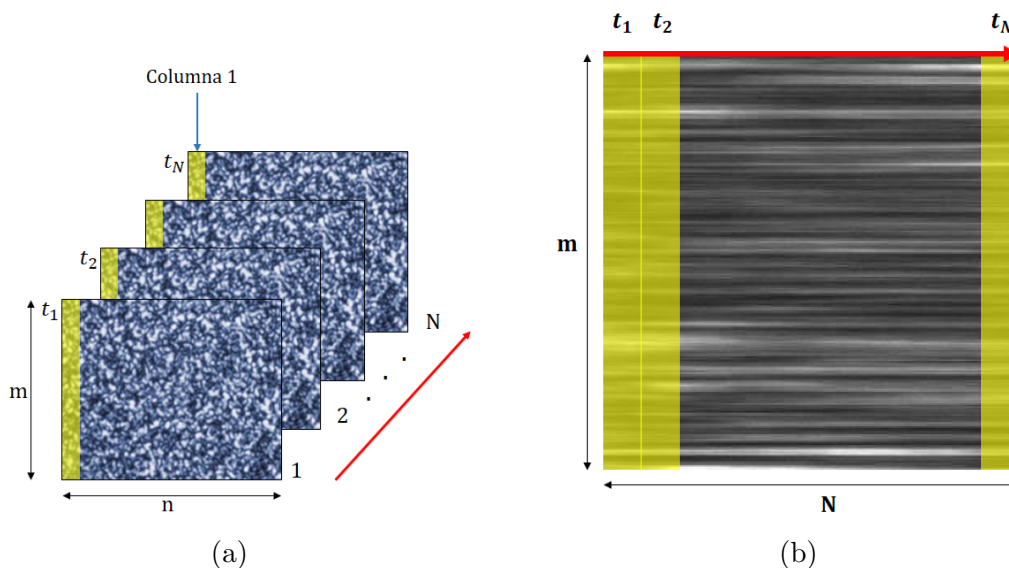


Figura 2.8: Construcción de una imagen THSP. (a) Se selecciona una columna en cada fotograma de speckle y, (b) se reconstruye una nueva imagen colocando las columnas extraídas ( $t_1, t_2, \dots, t_N$ ) de manera adyacente.

No existe un criterio específico que determine cuál de todas las columnas se deben extraer, sin embargo, es importante tomar en cuenta que si se elige la primera columna, esta selección debe aplicarse a todas las imágenes. Así para un paquete de  $N$  imágenes con dimensiones de  $m$  filas por  $n$  columnas cada una, se tendrán por lo tanto,  $n$  imágenes de THSP de tamaño  $m \times N$ , la figura 2.9 ilustra lo anteriormente mencionado.

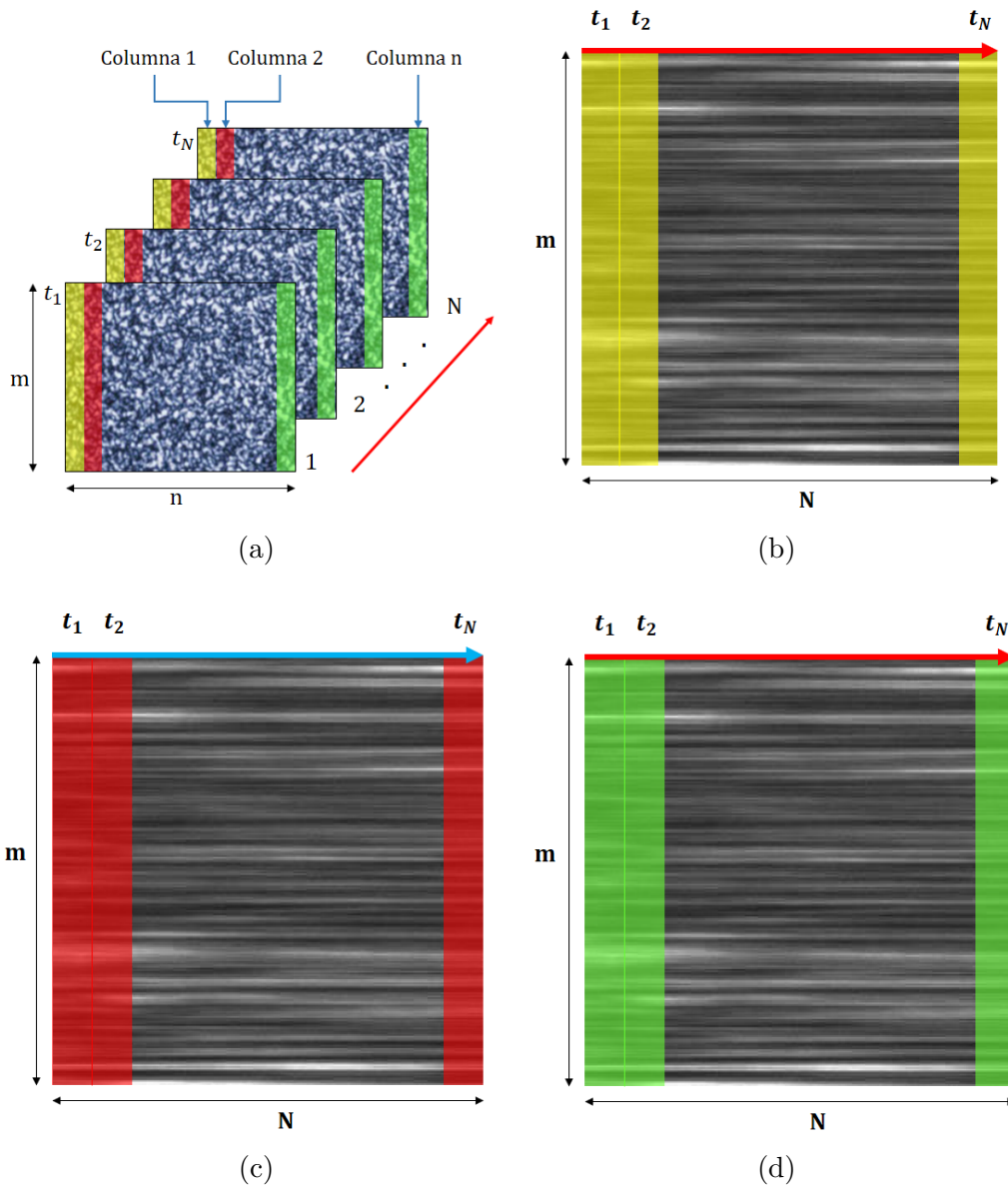


Figura 2.9: Conjunto de las posibles imágenes de THSP. A partir del (a) conjunto de imágenes de speckle, tenemos las matrices de THSP reconstruidas seleccionando (b) la columna 1, (c) la columna 2 y, (d) la  $n$ -ésima columna en cada fotograma.

El análisis de los patrones de speckle mediante el THSP se ha considerado como una herramienta versátil dentro de investigaciones sobre fenómenos físicos, químicos y biológicos [19]. Farzam Rad et al. [20] propusieron aplicar el THSP junto con la matriz de co-ocurrencia para estudiar la actividad en la superficie de los andamios de quitosano (el cual es un polímero natural diseñado para imitar la estructura y propiedades mecánicas del hueso). La técnica se utilizó para obtener información sobre cómo las dinámicas internas de los andamios cambian con el tiempo bajo di-

versas condiciones, permitiendo así evaluar su degradación y el efecto de diferentes estímulos externos.

La figura 2.10 incluye dos matrices de THSP donde es posible visualizar y distinguir el nivel de actividad para dos sistemas; si existe una variación mas alta en las líneas (asemejándose al patrón de speckle original) se habla de una muestra altamente activa (figura 2.10a), mientras que líneas mas continuas o alargadas sugieren que la muestra presenta muy poca actividad, como se puede observar en la figura 2.10b.

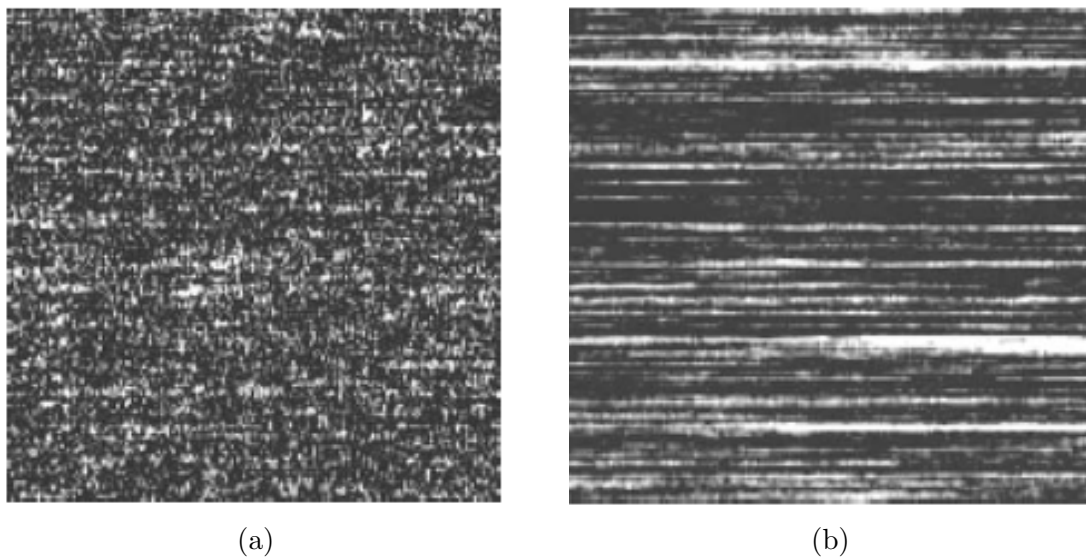


Figura 2.10: THSP para un material biológico con (a) alta actividad y, (b) baja actividad [16].

Para poder cuantificar el resultado de THSP, existen además herramientas como la matriz de co-ocurrencia (COM), la autocorrelación, el momento de inercia, etc. [20, 50], se proporcionarán más detalles a continuación.

## 2.4.2 Matriz de co-ocurrencia

Hablar de la matriz de co-ocurrencia implica hablar en principio de la textura, esta es una característica natural presente en todas las superficies, como el patrón de la madera, la trama de una tela o la disposición de los cultivos en un campo, etc. Por lo tanto cuando se desea detectar o describir alguna superficie, este se puede lograr

mediante su textura, la cual puede ser descrita como fina, suave, gruesa o tosca según corresponda [51,52]. En la figura 2.11 se muestra un ejemplo de texturas finas y gruesas.

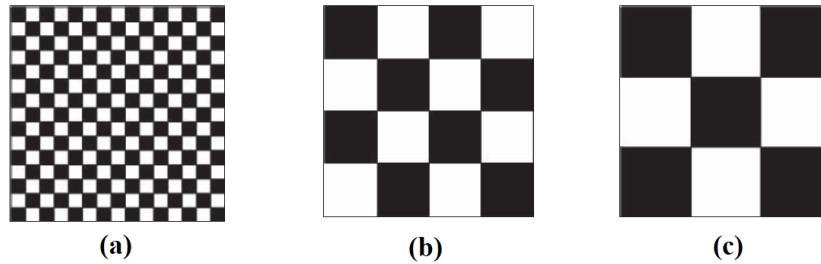


Figura 2.11: Ejemplos de textura, a) fina, b) suave y c) gruesa.

Se habla de una textura fina cuando las zonas delimitadas ya sea por los colores blanco o negro, son muy pequeñas, esto facilita percibir más detalles presentes en la superficie de una imagen, a medida que el tamaño de las áreas o blancas o negras aumentan, se forman bloques cada vez mas grandes de la misma tonalidad, por lo tanto, la textura tiende a ser más gruesa. A partir de este análisis, se puede definir entonces la textura como un arreglo de pixeles dentro de una imagen cuya relación es la distribución espacial de los tonos de grises [52]. Esta escala de grises por lo general varía entre 0 y 255, siendo 0 el color negro y 255 el color blanco. Realizar un análisis o medición de la textura nos puede proporcionar información importante sobre como se dispone o se distribuye la estructura de la superficie, uno de los métodos más comunes es la matriz de co-ocurrencia de nivel de gris (COM), que describiremos a continuación.

La matriz de co-ocurrencia es una representación tabular que contiene las frecuencias con las que un pixel con un nivel de gris (i) aparece en relación de espacio específica con otro pixel de nivel de gris (j) [53]. En la figura 2.12a, se muestra un ejemplo ilustrativo de cómo se presentan las combinaciones de pixeles en una imagen, donde podemos observar que el conjunto de nivel de gris (1,1) se presenta una vez, este valor es contabilizado en la matriz de co-ocurrencia (representada en la figura 2.12b), de manera análoga, la combinación de pixeles (1,2) aparece dos veces en la imagen,

por lo tanto el elemento 1,2 de la COM incrementa a 2; y así sucesivamente con los elementos restantes.

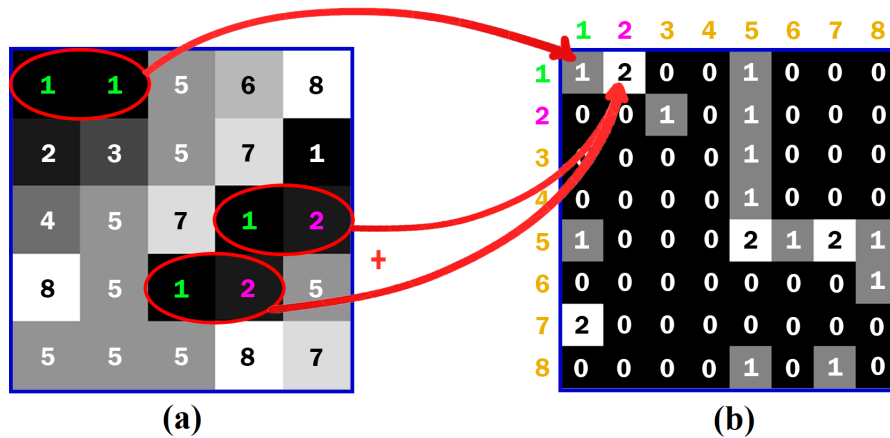


Figura 2.12: La imagen de la izquierda corresponde a una imagen de la cual se pretende estudiar su textura, cuyos elementos se representa por un valor numérico en la escala de grises para cada pixel. La imagen de la derecha es la matriz de co-ocurrencia asociada.

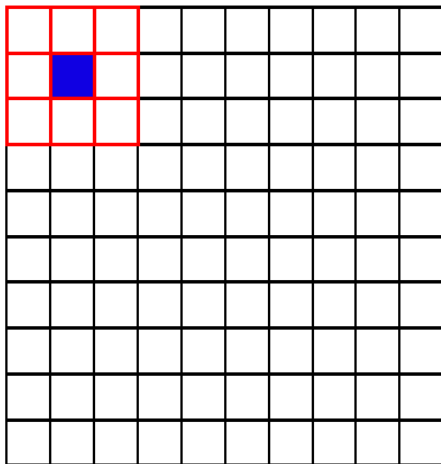
### 2.4.2.1 Construcción de la matriz de co-ocurrencia

Para construir correctamente la matriz de co-ocurrencia, es importante considerar los siguientes aspectos [54]:

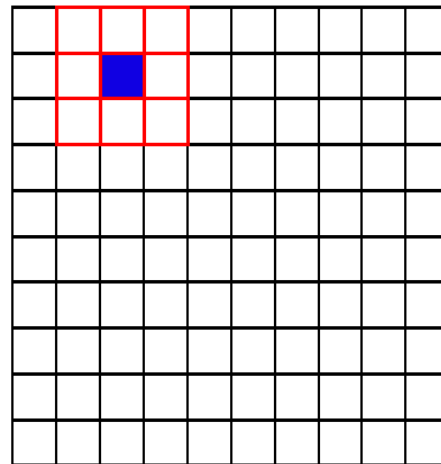
1. **Dirección y distancia:** se debe definir la dirección en la que se desea analizar los pares de pixeles vecinos, estos pueden ser horizontal, vertical o en diagonal (los cuales se pueden denotar también con ángulos de  $0^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $90^\circ$ ), también se debe especificar la distancia  $d$  que determina la separación entre los pixeles vecinos, por lo general, se selecciona una distancia  $d = 1$ .
2. **Rango de niveles de gris:** la matriz de co-ocurrencia se construye a partir de los niveles de gris presentes en la imagen, para imágenes con escala de grises de 8 bits, el rango de niveles de gris es de 0 a 255, para imágenes de 16 bits, el rango varia de 0 a 65,535.
3. **Tamaño de la matriz:** el tamaño de la matriz de co-ocurrencia depende del número de niveles de gris presentes en la imagen. Si la imagen tiene  $N$  niveles de gris, entonces la matriz será de tamaño  $N \times N$ .

4. **Simetría de la matriz:** es común que la matriz de co-ocurrencia sea simétrica, ya que la ocurrencia del par  $(i, j)$  es igual a la ocurrencia del par  $(j, i)$  en la dirección opuesta.
5. **Normalización:** la normalización es un paso opcional, se realiza dividiendo cada elemento de la matriz por el número total de pares de píxeles considerados, esto se hace para obtener valores de probabilidad en lugar de frecuencias absolutas.

Una vez definida la distancia  $d$ , se crea una ventana cuadrada de  $M \times M$  píxeles definida por la relación  $M = 2d + 1$ , esta ventana es colocada en una posición inicial 1 sobre la imagen que se va a analizar, se obtiene un valor de la textura que es recibido por el píxel central, (figura 2.13a); para cada posición de la ventana sobre la imagen se obtiene un único número. La figura 2.13b muestra como una ventana de tamaño  $3 \times 3$  se mueve a un píxel de distancia y se vuelve a repetir el cálculo obteniendo un nuevo valor.



(a) Posición inicial de la ventana sobre la imagen original.



(b) La ventana se mueve a una posición 2 y nuevamente se obtiene un valor de la textura.

Figura 2.13: Recorrido de la ventana  $M \times M$  sobre la imagen a analizar.

Una vez que la pequeña ventana espacial haya recorrido todas las dimensiones de la imagen original, se construye la matriz de co-ocurrencia con los valores de frecuencias de los pares de píxeles co-ocurridos, esto se puede observar en la figura 2.14.

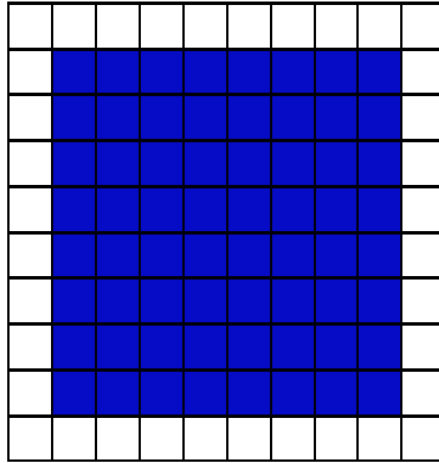


Figura 2.14: Matriz de co-ocurrencia obtenida como resultado de haber recorrido toda la imagen original.

Vale la pena mencionar que la ventana desplazada sobre la imagen de la figura 2.13 está considerando las cuatro direcciones para el pixel vecino, es decir, se están analizando los pares de pixeles vecinos en la dirección horizontal, vertical y ambas diagonales, en la figura 2.15 podemos ver estas diferentes relaciones espaciales para el pixel vecino.

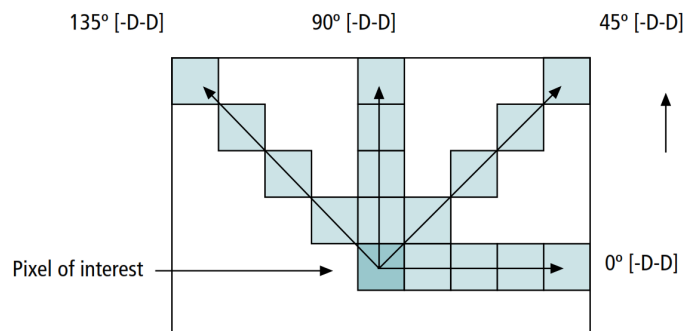


Figura 2.15: Diferentes relaciones espaciales para el par de pixeles.

Para fines prácticos, en el ejemplo que se muestra a continuación se tomará a consideración únicamente la dirección horizontal. Supongamos que tenemos la siguiente imagen mostrada en la figura 2.16, cuyas dimensiones son  $4 \times 4$ , y con 4 niveles de gris representado por los valores 0, 1, 2 y 3, respectivamente.

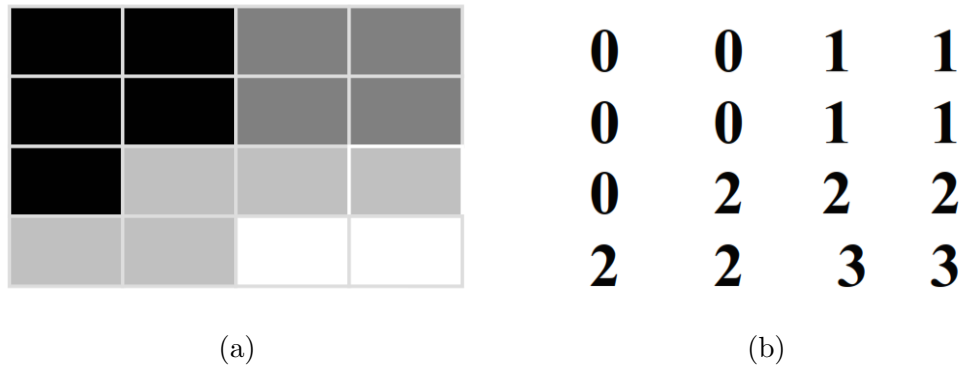


Figura 2.16: a) Imagen de prueba de tamaño  $4 \times 4$  y, b) el respectivo nivel de gris de sus pixeles.

- Paso 1. Selección de pixel vecino y dirección: definimos una dirección en la que vamos a analizar el pixel vecino, en este ejemplo, tomaremos una dirección horizontal ( $0^\circ$ ), es decir, consideraremos los pares de pixeles en la misma fila, de esta manera tenemos una ventana de  $1 \times 2$  el cual se va a desplazar sobre toda la imagen (pixel por pixel).
- Paso 2. Definición de la distancia: elegimos una distancia ( $d$ ) que determina la separación entre los pixeles vecinos, en este caso seleccionamos una distancia  $d=1$ , lo que significa que consideraremos los pixeles adyacentes, como puede observarse en la figura 2.17:

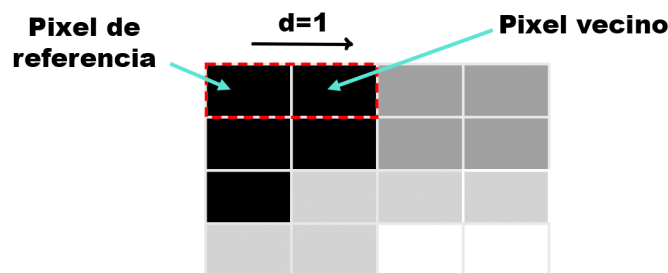


Figura 2.17: Relación entre el pixel de referencia, la dirección de análisis del pixel vecino, y la separación; esto determina la ventana que será desplazada sobre toda la imagen. Similar al ejemplo de la figura 2.12.

- Paso 3. Creación de la matriz de co-ocurrencia: en la figura 2.18 se crea la matriz de co-ocurrencia, cuyo tamaño es de  $N \times N$ ;  $N. R.$  es el nivel de gris del pixel de referencia y  $N. V.$ , el nivel de gris del pixel vecino, respectivamente,



ésta matriz contiene todas las posibles combinaciones de niveles de gris existentes en la imagen de prueba, los distintos valores numéricos asociados a la escala de grises inician con el más oscuro (0) y finalizando con el más claro (3).

<b>N. R. \ N. V.</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>0</b>	(0,0)	(0,1)	(0,2)	(0,3)
<b>1</b>	(1,0)	(1,1)	(1,2)	(1,3)
<b>2</b>	(2,0)	(2,1)	(2,2)	(2,3)
<b>3</b>	(3,0)	(3,1)	(3,2)	(3,3)

Figura 2.18: Combinaciones de niveles de grises de la imagen de prueba. Notemos que la asignación del valor numérico entero de las entradas de la matriz de co-ocurrencia no es ordenado, esto ya que según sea el valor numérico en la escala de grises del pixel de referencia y su comparación con el vecino, es como se va asignando los valores de sus elementos de la matriz.

De la matriz anterior, la primera entrada o combinación (0, 0), contendrá un número mayor o igual a cero obtenido de contar cuántas veces en el área de la ventana, un pixel con valor de gris igual a 0 (pixel vecino) está situado a la derecha de otro pixel con valor 0 (pixel de referencia), y así sucesivamente con las demás entradas de la matriz de co-ocurrencia.

- Paso 4. Recorrer la ventana sobre la imagen completa: recorreremos la ventana sobre toda la imagen considerando la dirección y distancia definidas en los pasos anteriores. Por cada par de píxeles (i,j) que cumpla con la dirección y distancia especificada, incrementamos el valor en la posición correspondiente de la matriz de co-ocurrencia. De esta manera, una vez que la ventana recorre toda la imagen, las frecuencias se acumulan en cada celda correspondiente, y así es como se construye finalmente la matriz de co-ocurrencia mostrada en la figura 2.19.

$$\begin{pmatrix} 2 & 2 & 1 & 0 \\ 0 & 2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 3 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Figura 2.19: Matriz de co-ocurrencia para la imagen de prueba.

El primer elemento de la matriz de co-ocurrencia nos dice que la combinación (0,0) ocurre dos veces en la imagen, para el segundo elemento donde el píxel de referencia es 0 y su vecino a la derecha es 1, ocurre dos veces en la imagen.

Recordando la propiedad de simetría mencionada anteriormente (la ocurrencia del par (i, j) es igual a la ocurrencia del par (j, i) en la dirección opuesta), observamos que al colocar el píxel vecino en el lado izquierdo en lugar del lado derecho como se ilustra en la figura 2.20, se obtiene la matriz de co-ocurrencia de la figura 2.21.

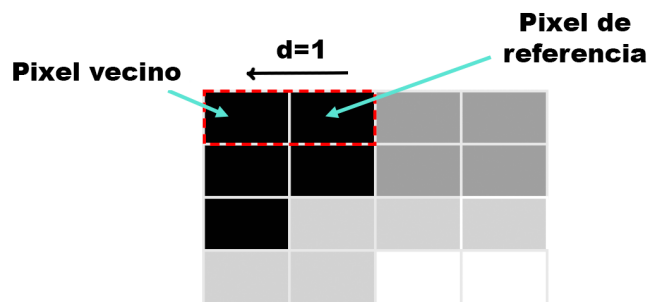


Figura 2.20: Selección del píxel vecino a la izquierda del píxel de referencia.

$$\begin{pmatrix} 2 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 2 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 3 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 \end{pmatrix}$$

Figura 2.21: Matriz de co-ocurrencia para la imagen de prueba.

Podemos notar que ésta nueva matriz es la transpuesta de la matriz de la figura 2.19 (pixel vecino a la derecha del pixel de referencia), esta propiedad de simetría nos permite una vez obtenida la matriz de co-ocurrencia del primer caso, calcular simplemente su transpuesta para obtener la matriz de co-ocurrencia del segundo caso. Esta propiedad es especialmente relevante considerando el tamaño de las imágenes que se van a analizar, ya que nos permite ahorrar tiempo de cómputo al evitar volver a calcular toda la matriz del segundo caso.

Tomando en cuenta lo anterior y considerando que es necesario trabajar con una matriz simétrica, se procede a sumar los resultados obtenidos previamente, lo que nos conduce al siguiente resultado:

$$\begin{pmatrix} 4 & 2 & 1 & 0 \\ 2 & 4 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 6 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 2 \end{pmatrix}$$

Figura 2.22: Matriz simétrica para una relación (derecha+izquierda) de la imagen de prueba.

- Paso 5. Normalización de la matriz de co-ocurrencia: dividimos cada elemento de la matriz por el número total de pares de píxeles considerados.

En nuestro ejemplo, al tener una imagen de  $4 \times 4$ , existe 12 posibles pares de píxeles, sin embargo, al considerar dos direcciones en la matriz de co-ocurrencia obtenida, el resultado se duplica a 24, tal como se ilustra a continuación:

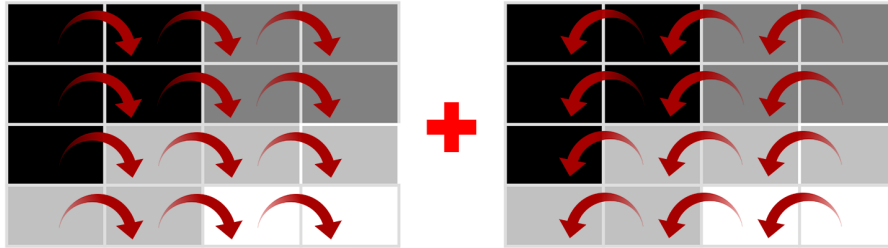


Figura 2.23: Total de posibles pares de píxeles para ambas direcciones, que en este ejemplo es igual a 24.

Así, al dividir cada elemento de la matriz de co-ocurrencia por el total de posibles eventos, obtenemos la matriz normalizada:

$$\begin{pmatrix} 0,166 & 0,083 & 0,042 & 0 \\ 0,083 & 0,166 & 0 & 0 \\ 0,042 & 0 & 0,25 & 0,042 \\ 0 & 0 & 0,042 & 0,083 \end{pmatrix}$$

Figura 2.24: Matriz simétrica normalizada.

Con respecto a la matriz de co-ocurrencia simétrica y normalizada podemos resumir lo siguiente [54]:

1. Los elementos de la diagonal representan pares de píxeles cuyo nivel de gris no presenta ninguna diferencia, con esto podemos inferir que si en la matriz estos elementos son muy grandes, la imagen no presenta mucho contraste. Esta característica es importante debido a que es una medida clave para indicar el nivel de actividad que hay sobre la muestra que se va a estudiar.

2. Las líneas paralelas a la diagonal separadas una celda, representan los pares de pixeles con una diferencia de un nivel de gris, entonces a medida que nos alejamos de la diagonal la diferencia entre pares de pixeles es cada vez mayor.
3. Por último, sumando las elementos de cada diagonal paralela obtenemos la probabilidad de que un pixel tenga 1,2,3, etc. niveles de grises de diferencia con su vecino.

A continuación se enlistan algunos ejemplos de matriz de co-ocurrencia para distintas imágenes aleatorias.

En la figura 2.25a se muestra una imagen de tamaño  $10 \times 10$  donde todos los pixeles tienen el mismo nivel de gris igual a 5, por lo tanto habrá una única combinación el cual será (5,5), esto resulta en una matriz de co-ocurrencia mostrada en la figura 2.25b con un único elemento cuya frecuencia es 180, lo cual nos indica las veces que aparece esta combinación en la imagen.

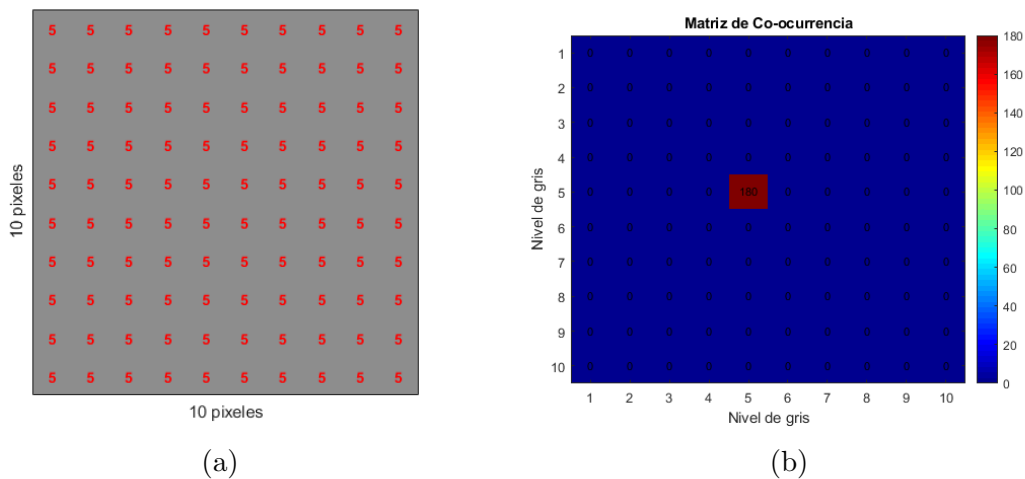


Figura 2.25: a) Imagen constante y, b) matriz de co-ocurrencia.

Para el caso donde la imagen contiene 2 niveles de gris (figura 2.26a), las posibles combinaciones de pixeles serán (5,5) y (7,7), esto resulta en una matriz de co-ocurrencia mostrada en la figura 2.26b con dos elementos con frecuencia de 90 cada uno.

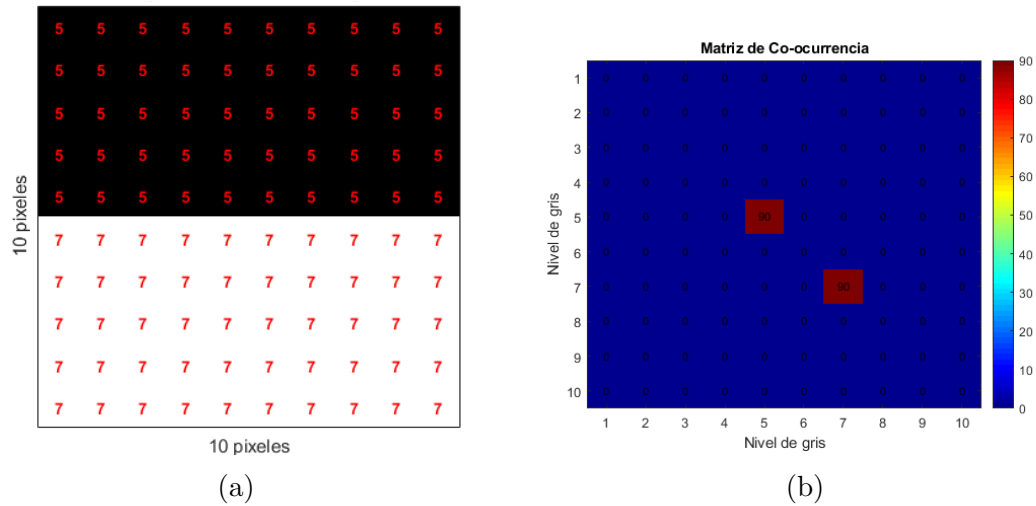


Figura 2.26: a) Imagen con dos niveles de gris y, b) matriz de co-ocurrencia.

Ahora si tomamos una imagen aleatoria con un único nivel de gris por fila como en la imagen 2.27a, tenemos 10 diferentes combinaciones, obteniendo así la matriz de co-ocurrencia mostrada en la figura 2.27b:

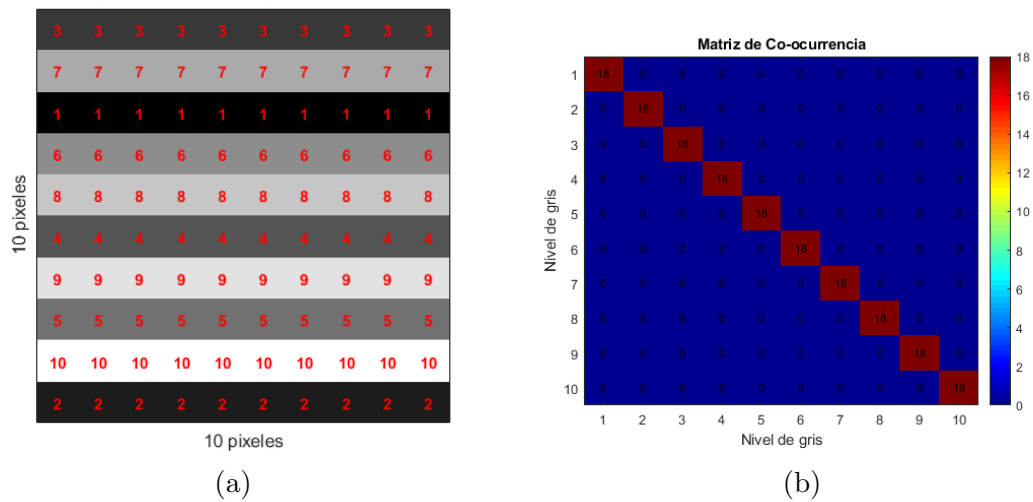


Figura 2.27: a) Imagen con 10 niveles de gris distribuidos en cada fila y, b) matriz de co-ocurrencia asociada.

Para el último ejemplo donde los pixeles de la imagen toman valores aleatorios (figura 2.28a), los elementos en la matriz de co-ocurrencia de la figura 2.28b se empiezan a dispersar alrededor de la diagonal:

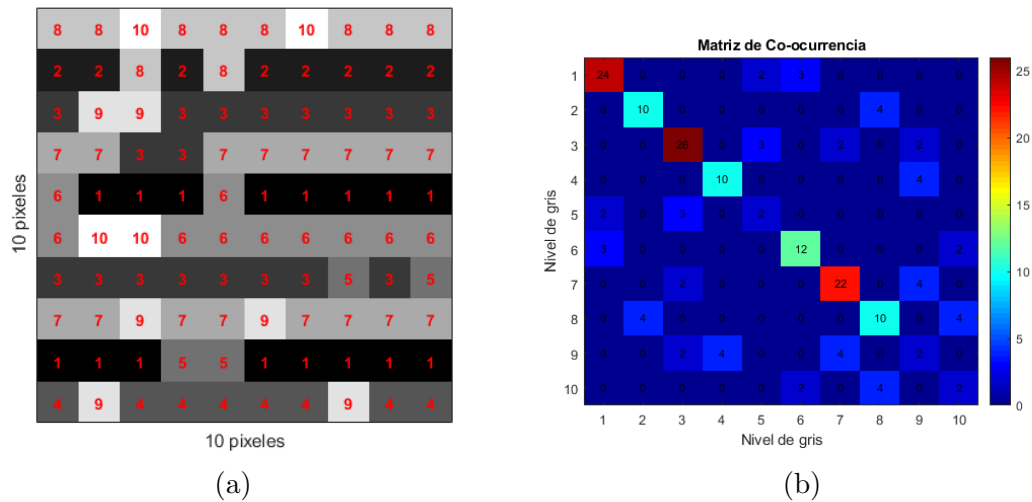


Figura 2.28: a) Imagen con las intensidades distribuidas aleatoriamente y, b) matriz de co-ocurrencia calculada.

Las propiedades de la matriz de co-ocurrencia se hacen aún más evidentes cuando se aplican a imágenes que se planean procesar, cuya dimensión es considerablemente grande, ya que podemos observar mediante el ancho de la diagonal si se trata de una imagen de alta o baja actividad. La figura 2.29 es una representación digital en escala de grises de los elementos de la matriz de co-ocurrencia, aquí podemos observar aquellos valores con mayor frecuencia (zona blanca) y aquellos con frecuencia muy baja (zona oscura), el ejemplo presentado en la figura 2.29a corresponde al estado de una pintura húmeda donde el sistema es muy activo, por consiguiente la matriz de co-ocurrencia asociada se dispersa, en contraste, tenemos la figura 2.29b que corresponde al estado de una pintura casi seca, los valores se concentran sobre la diagonal principal, esto ocurre cuando la actividad es muy baja.

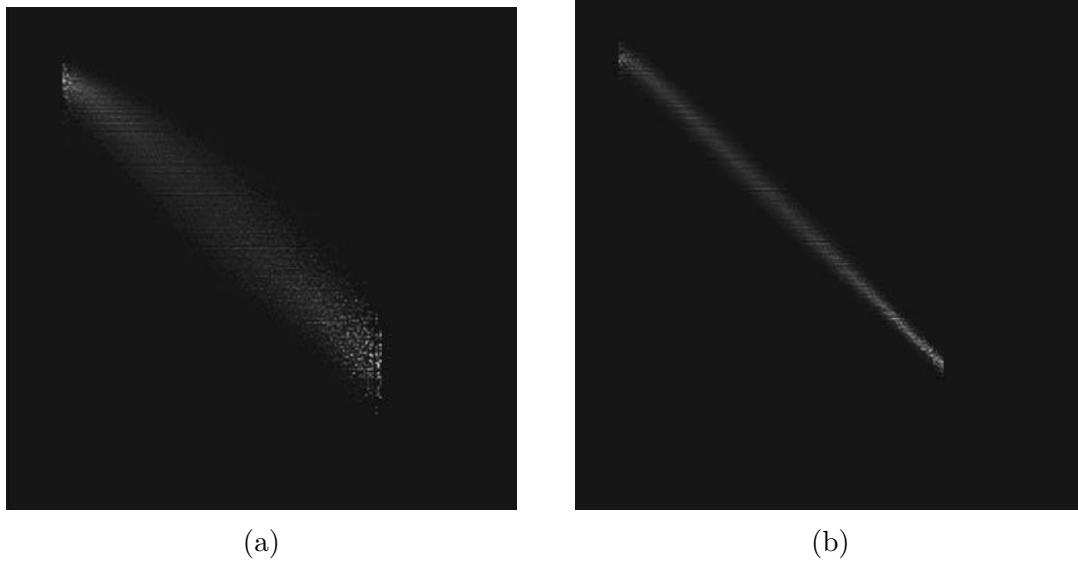


Figura 2.29: Matrices de co-ocurrencia para dos etapas en el secado de una pintura, relacionadas con los THSP. (a) Alta actividad y, (b) baja actividad [34].

La matriz de co-ocurrencia de la figura 2.29 también se suele representar en una gráfica tridimensional mostrada en la figura 2.30, esta representación nos permite ver mas a detalle como están distribuidos los elementos y sus frecuencias:

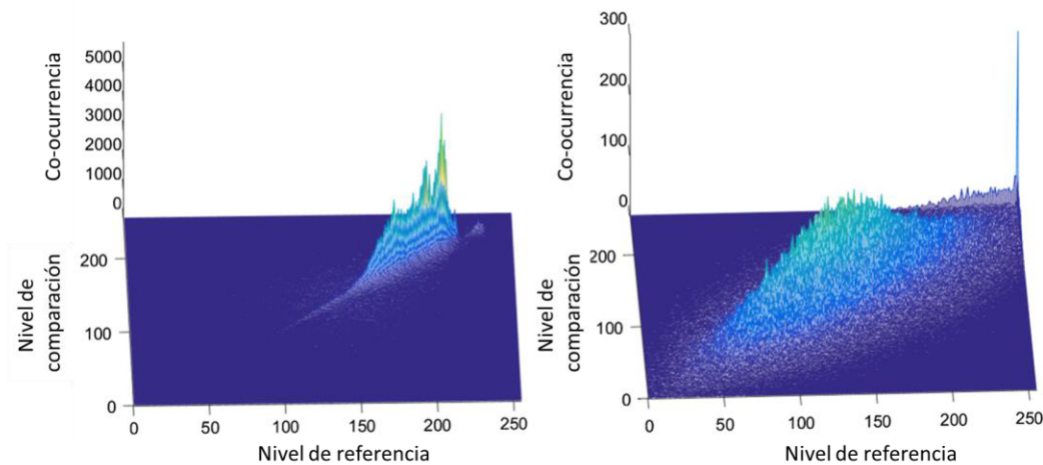


Figura 2.30: Matriz de co-ocurrencia de dos estados con diferente nivel de actividad.

Al analizar la textura mediante la matriz de co-ocurrencia, es posible obtener diferentes variables estadísticas, denominados descriptores de Haralick, algunos de ellos incluyen, el contraste, la correlación, la energía, y la homogeneidad, estas variables son utilizadas para obtener una medida cuantitativa de la matriz de co-ocurrencia [16, 55]:



1. Contraste:

$$\sum_{i,j=0}^N P_{i,j}(i-j)^2 \quad (2.29)$$

2. Correlación:

$$\sum_{i,j=0}^{N-1} P_{i,j} \left[ \frac{(i - \mu_i)(j - \mu_j)}{\sqrt{(\sigma_i^2)(\sigma_j^2)}} \right] \quad (2.30)$$

3. Energía:

$$\sum_{i,j=0}^{N-1} P_{i,j}^2 \quad (2.31)$$

4. Homogeneidad:

$$\sum_{i,j=0}^N \frac{P_{i,j}}{1 + (i-j)^2} \quad (2.32)$$

Donde:

- $P_{i,j}$  es el valor de la matriz en la posición  $(i, j)$ .
- $\mu$  es la media de los niveles de grises en la dirección  $i$  y  $j$ , respectivamente.
- $\sigma$  es la desviación estándar de los niveles de grises en la dirección  $i$  y  $j$ .

En este trabajo se pretende utilizar las propiedades proporcionadas por la matriz de co-ocurrencia, la cual permite determinar como están distribuidas las intensidades sobre toda la imagen a lo largo de todas las direcciones. Para realizar el análisis de las imágenes de THSP el cálculo se llevará a cabo considerando únicamente la dirección a 0° grados, debido a que, como recordamos en el THSP los pixeles a lo largo de una fila representan la misma zona de la muestra.

### 2.4.3 Diferencias Generalizadas

El método de diferencias generalizadas (GD) permite construir una nueva imagen a partir de una secuencia de  $N$  fotogramas. Esto se logra usando el siguiente modelo [56]

$$I_{GD}(i, j) = \sum_{k=1}^N \sum_{l=1}^N |I_k(i, j) - I_{k+l}(i, j)|, \quad (2.33)$$

donde  $I_{GD}(i, j)$  es la nueva imagen construida,  $I_k(i, j)$  es la intensidad en el punto con coordenadas  $(i, j)$  de la  $k$ -ésima imagen, y de manera análoga para  $I_{k+l}(i, j)$ . Este método suma en valor absoluto todas las posibles diferencias entre los distintos fotogramas, realizando el cálculo entre imágenes consecutivas así como los que no lo son. Esta nueva imagen revela zonas inactivas o de baja actividad mostrando puntos oscuros, en cambio cuando la actividad es alta en la muestra, tenemos puntos brillantes.

Se ha usado como muestra el secado de una pintura sobre una moneda para mostrar el rendimiento de este método, el resultado obtenido se puede observar en la figura 2.31:

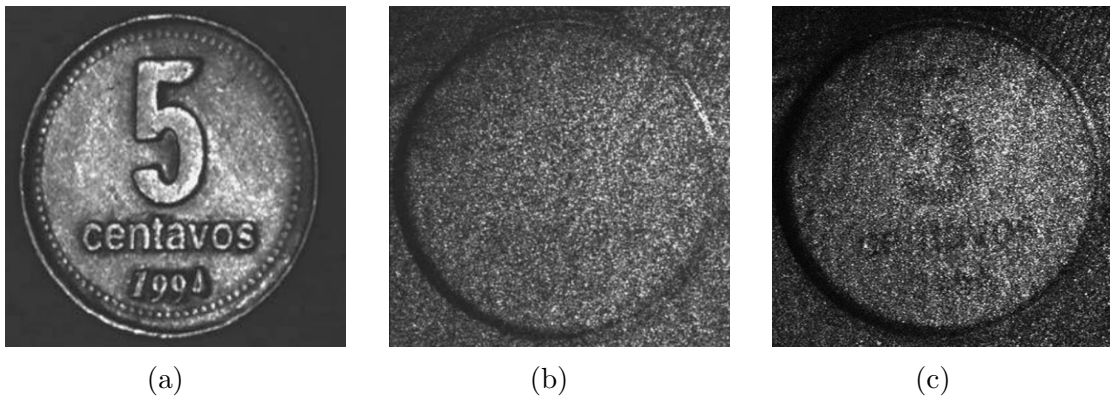


Figura 2.31: Resultado de aplicar la técnica de GD. (a) Imagen de la moneda antes de ser pintada, (b) imagen de speckle de la moneda cubierta con pintura y, (c) nueva imagen construida [57].

## 2.4.4 Fujii

El método Fujii por otra parte, suma únicamente las imágenes consecutivas, que se pondera por la suma de sus intensidades, la ecuación para implementar este método es la siguiente [58]

$$I_{Fujii}(i, j) = \sum_{k=1}^N \left| \frac{I_k(i, j) - I_{k+1}(i, j)}{I_k(i, j) + I_{k+1}(i, j)} \right|, \quad (2.34)$$

donde  $I_{Fujii}(i, j)$  es la nueva imagen construida, y  $k$  es cualquiera de las imágenes en la secuencia. En la figura 2.32 se puede ver un ejemplo del resultado al usar éste método.

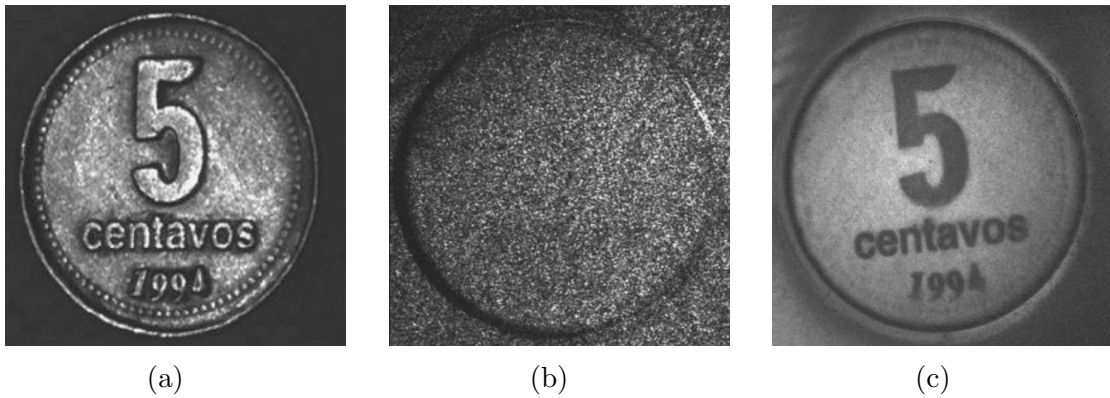


Figura 2.32: Resultado de aplicar la técnica de Fujii. (a) Imagen de la moneda antes de ser pintada, (b) imagen de speckle de la moneda cubierta con pintura y, (c) nueva imagen construida [57].



# CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

## 3.1 Implementación del arreglo experimental de LSI

La primera parte de la metodología propuesta en este trabajo de tesis se presenta en la siguiente figura:

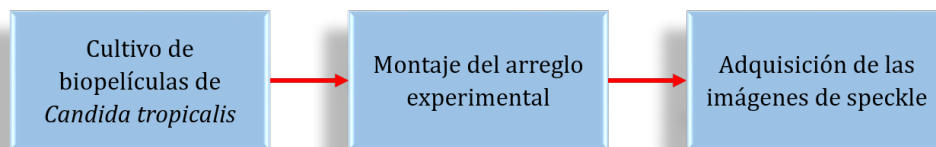


Figura 3.1: Esquema de la parte 1 de la metodología.

### 3.1.1 Cultivo de biopelículas de *C. tropicalis*

El cultivo de la colonia de hongos fue llevado a cabo en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE), por D. Loaiza. Se emplearon micropozos con diámetro de 3.3 mm y área superficial de  $A=0.36 \text{ cm}^2$ . En la figura 3.2a se puede observar el conjunto de micropozos empleado para realizar el cultivo, se muestra también un acercamiento de uno de ellos en la figura 3.2b, y en la figura 3.2c se puede observar el resultado final de la formación de la colonia sobre una biopelícula. Vale la pena consultar el Apéndice A, esta información adicional proporciona una descripción detallada de las características del sistema de cultivo y las biopelículas utilizadas.

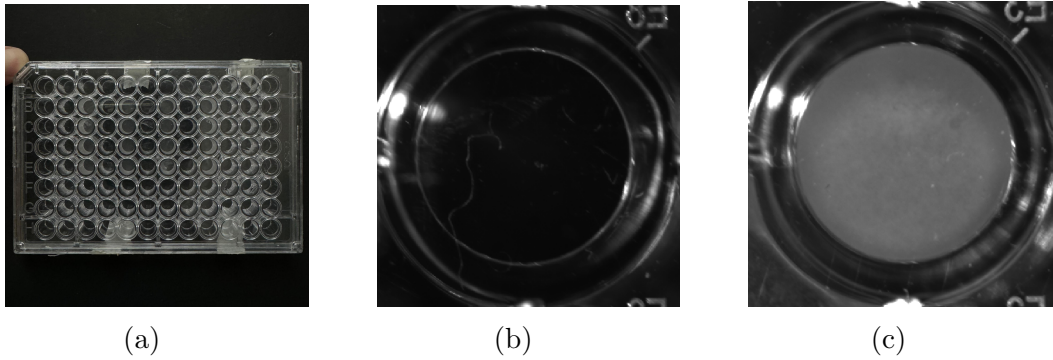


Figura 3.2: (a) Fotografía de la microplaca utilizada, (b) acercamiento de uno de los micropozos sin biopelícula y, (c) biopelícula de *C. tropicalis*.

Se cultivaron varias biopelículas de *C. tropicalis* para un total de 13 experimentos, estas biopelículas se clasificaron en grupos que recibieron diferentes concentraciones de dimetilsulfóxido (DMSO), un solvente conocido por su capacidad de penetrar las membranas celulares y su potencial toxicidad [59]. A medida que aumenta la concentración de DMSO, la población de *C. tropicalis* se reduce gradualmente, lo que a su vez disminuye la actividad de la biopelícula. A continuación, se detalla la distribución de las biopelículas a lo largo de los días del experimento.

Del experimento 1 al experimento 8, los cuales se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones, se tienen 6 grupos diferentes, cada uno con 3 biopelículas, la columna 1 de la figura 3.3a corresponde a biopelículas que no recibieron ningún tratamiento, este grupo se etiquetó como *Control*, después tenemos los grupos de *Tratamiento* que recibieron diferentes concentraciones de DMSO que van desde el 25 % para la columna 2 hasta una concentración del 100 % para la columna 5 de la figura 3.3c, por último tenemos el grupo 6, los cuales son pozos vacíos donde no hay presencia de biopelícula, este se etiquetó como *Ruido* y se utilizará como referencia al igual que el grupo de *Control*.

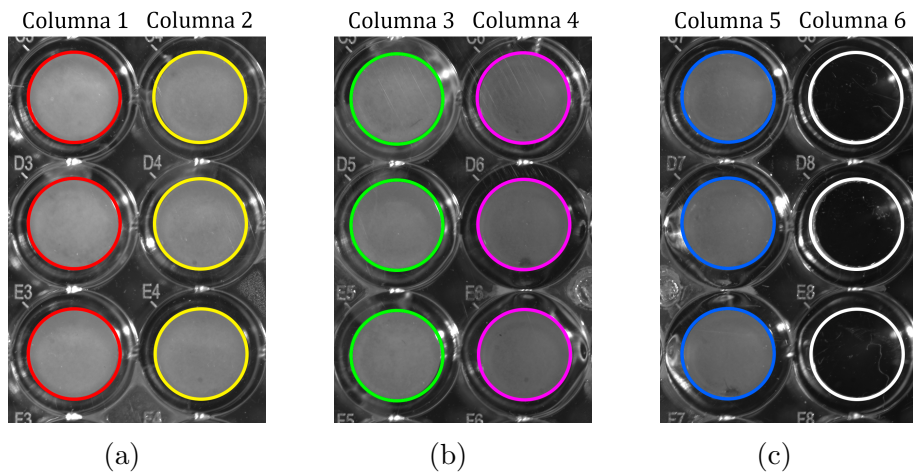


Figura 3.3: Biopelículas cultivadas, tenemos el grupo de: (a) control (columna 1), DMSO al 25 % (columna 2), (b) 50 % (columna 3), 75 % (columna 4), (c) 100 % (columna 5), y los pozos vacíos (columna 6).

Para el experimento 9, se tienen 3 grupos, control, DMSO al 60 % y un pozo vacío:

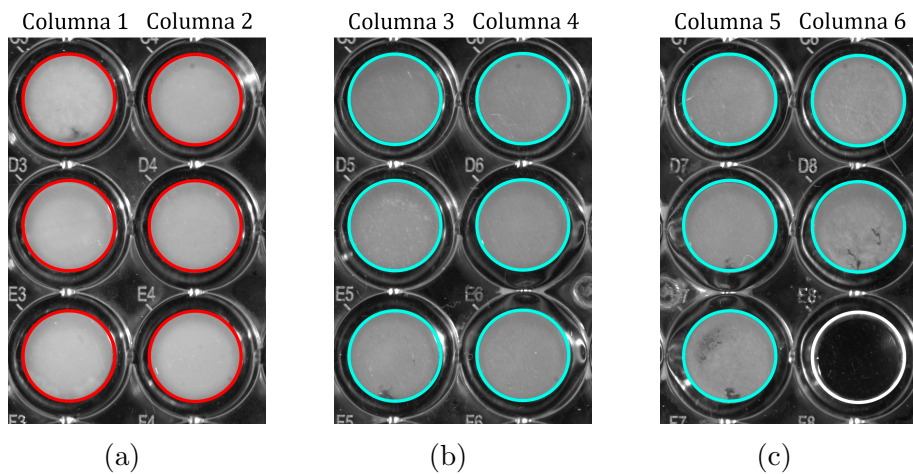


Figura 3.4: Conjunto de biopelículas cultivadas: (a) control (columna 1 y 2), (b) y (c) DMSO al 60 % incluyendo un pozo vacío delimitado por la circunferencia blanca.

Para el experimento 10, tenemos el grupo de control, DMSO al 60% y ruido, los cuales se pueden observar en la figura 3.5:

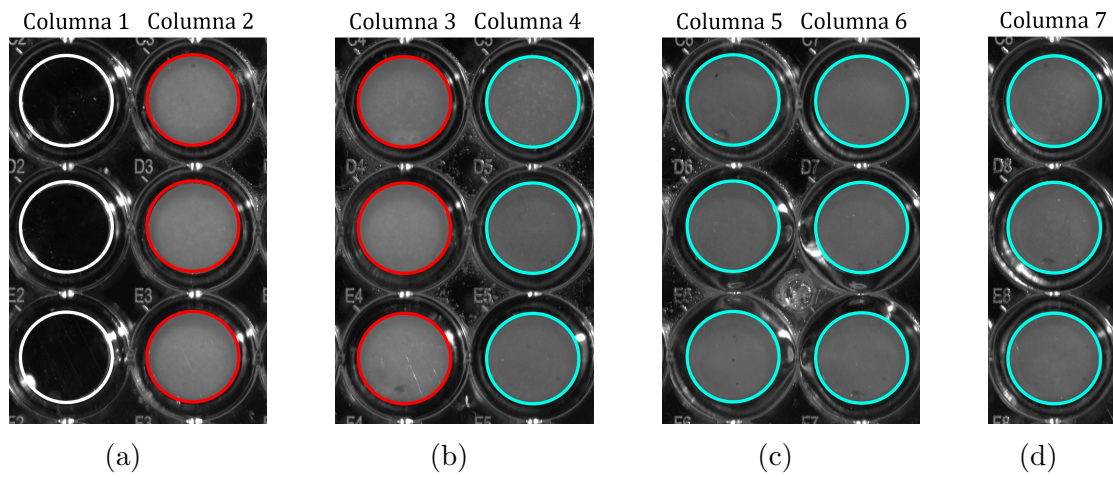


Figura 3.5: Biopelículas cultivadas, divididas en grupos de: (a) pozos vacíos (columna 1), control (columna 2), (b) control (columna 3), DMSO al 60% (columna 4), (c) y (d) DMSO al 60%.

Para el experimento 11, nuevamente tenemos 3 grupos, mostrados en la figura 3.6:

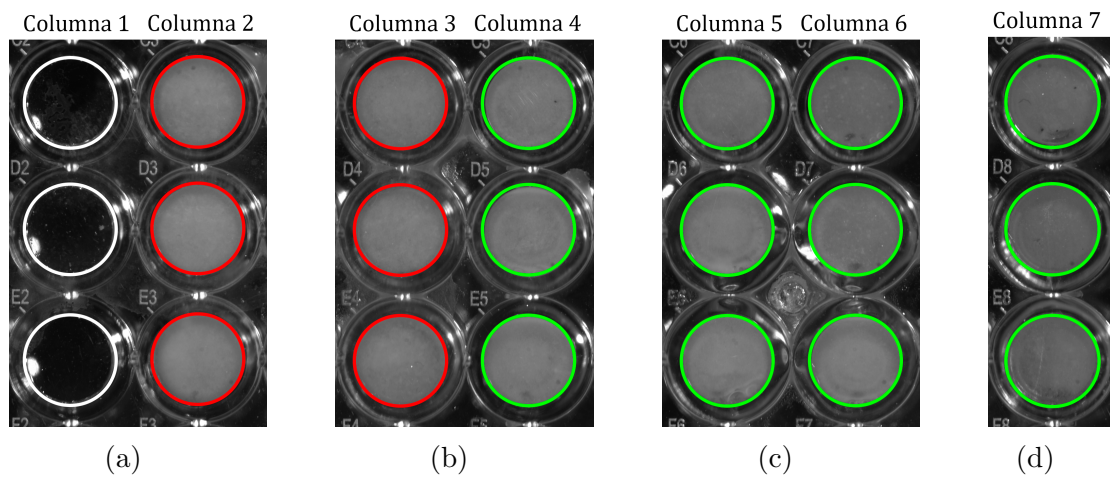


Figura 3.6: Biopelículas cultivadas, correspondientes a los grupos de: (a) pozos vacíos (columna 1), control (columna 2), (b) control (columna 3), DMSO al 50% (columna 4), (c) y (d) DMSO al 50%.



Finalmente, para los experimentos 12 y 13, existen 7 grupos diferentes de biopelículas, distribuidos de la siguiente manera:

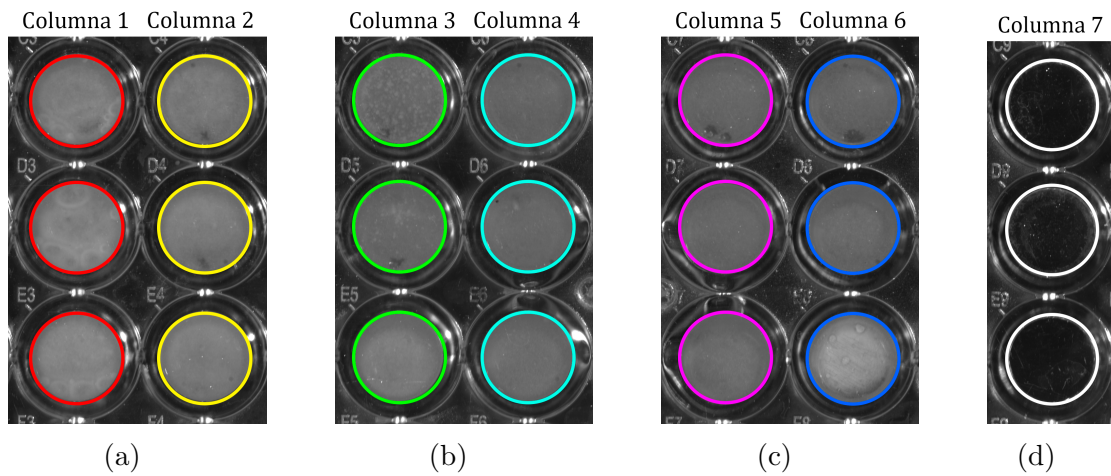


Figura 3.7: Grupo de biopelículas cultivadas: (a) control (columna 1), DMSO al 25 % (columna 2), (b) 50 % (columna 3), 60 % (columna 4), (c) 75 % (columna 5), 100 % (columna 6), y (d) pozos vacíos.

Los primeros 8 experimentos que comparten la misma distribución de biopelículas, no presentan diferencias, ya que se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones experimentales, lo mismo aplica para los experimentos 12 y 13. Estas biopelículas fueron montadas en el arreglo experimental que a continuación se detalla.

### 3.1.2 Montaje del arreglo experimental

Para el arreglo experimental del sistema de LSI, se emplearon los siguientes elementos:

- Láser He-Ne ( $\lambda = 632.816$  nm)
- Un Difusor
- Fuente de luz blanca
- Cámara CCD
- Polarizador
- Ordenador

- Soporte

El arreglo experimental óptico se muestra en la figura 3.8, este sistema incluye un láser He-Ne que incide sobre un conjunto de espejos que lo redireccionan hacia la muestra, cabe mencionar que el haz debe atravesar un difusor que expande su diámetro, esto para tener una distribución homogénea de la luz sobre las biopelículas. Posteriormente, la luz reflejada por las biopelículas es capturada mediante una cámara CCD que cuenta con un lente polarizador que permite reducir los reflejos no deseados garantizando así una imagen mas clara y definida de la muestra.

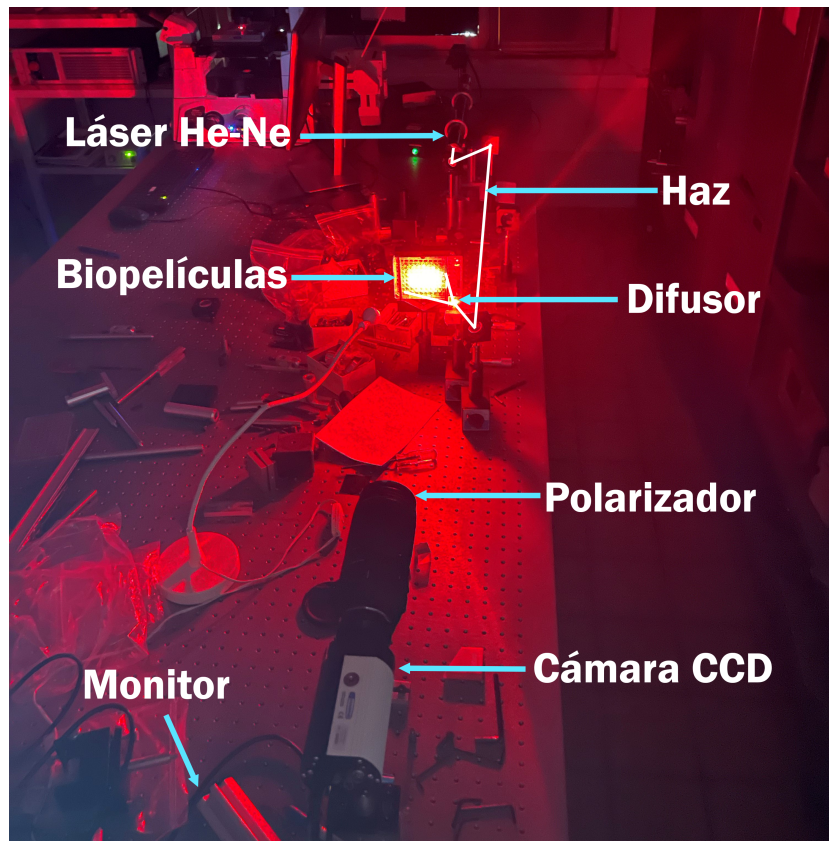


Figura 3.8: Montaje del sistema LSI.

La microplaca donde se cultivaron las biopelículas se colocó cuidadosamente sobre el soporte, con la superficie de las biopelículas orientada directamente hacia la cámara para asegurar una captura óptima de las imágenes, como se muestra en la figura 3.9.

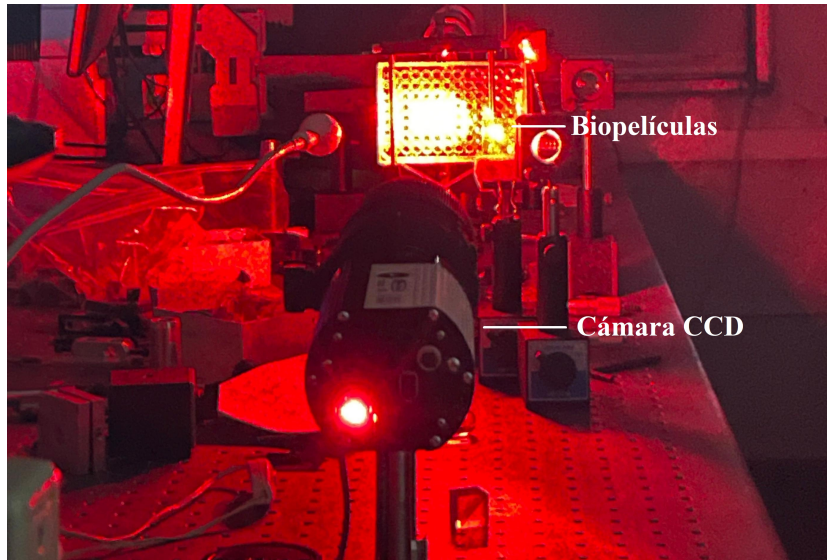


Figura 3.9: Posición entre la cámara y la microplaca.

Mediante el software *QCapture Pro - Q-Imaging*, configurado previamente en el ordenador, se procede a tomar la captura y almacenamiento de las imágenes de speckle.

### 3.1.3 Adquisición de imágenes de speckle

Se capturaron las imágenes de speckle (sin procesar), con la ayuda del software *QCapture Pro - Q-Imaging*. Una vez posicionada la microplaca sobre el soporte se dejó reposar durante aproximadamente 10 minutos, esto para estabilizarla y evitar que interfirieran posibles perturbaciones del alrededor. Se obtuvieron *paquetes* de 181 imágenes de speckle con un tiempo de exposición de  $300\text{ ms}$ , con 6 biopelículas en cada plano, cada paquete tiene una dimensión de 1185 píxeles de alto  $\times$  789 píxeles de ancho  $\times$  181 fotogramas, como se puede ver en la figura a continuación.

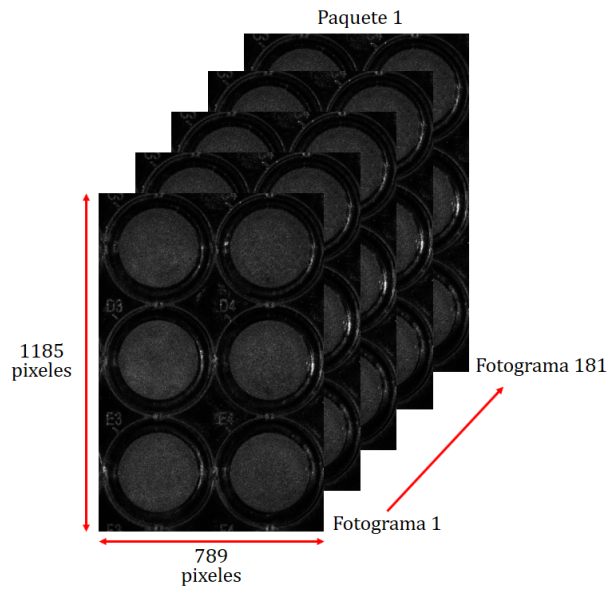


Figura 3.10: Imágenes de speckle de un paquete.

Las imágenes de speckle para cada grupo de biopelículas se ven de la siguiente forma:

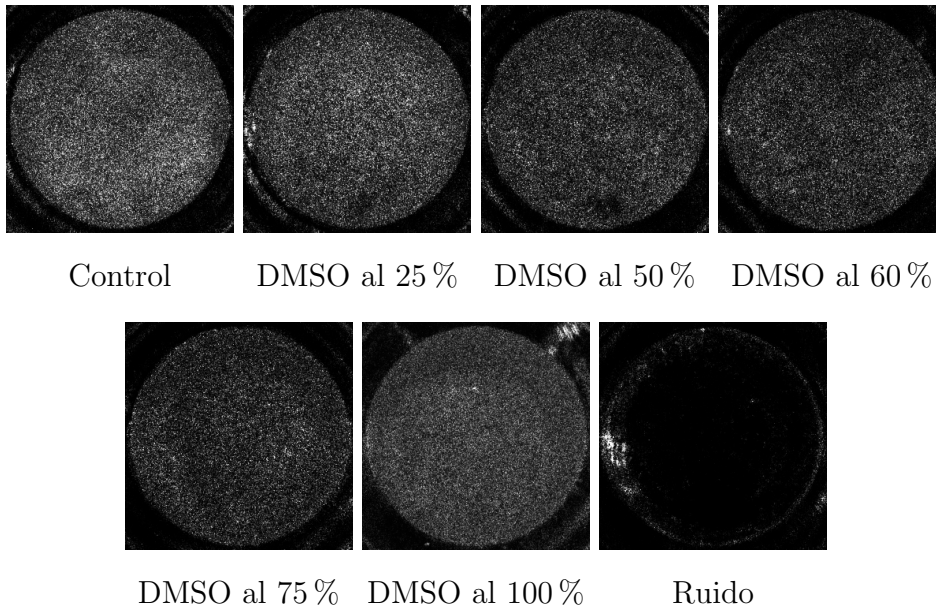


Figura 3.11: Patrones de speckle correspondientes a cada grupo de biopelícula.

La imágenes de speckle asociados a las biopelículas de las figuras 3.3 - 3.7 se muestran a continuación:

### Experimento 1 - 8

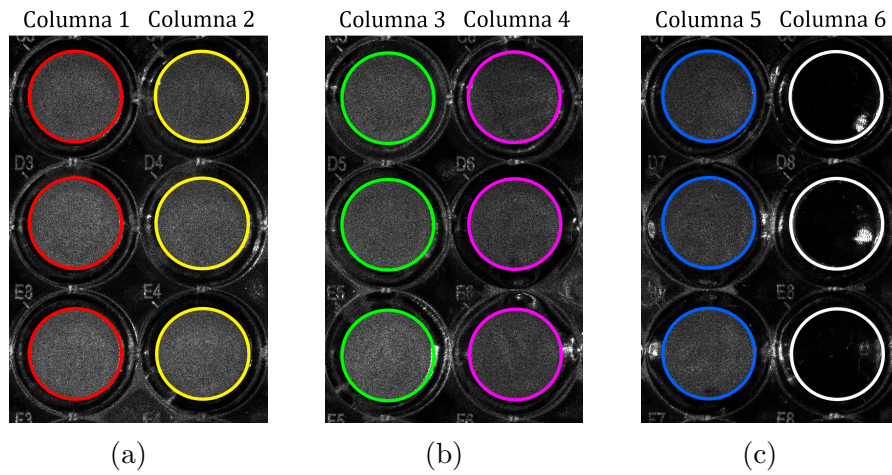


Figura 3.12: (a) Control (columna 1), DMSO al 25 % (columna 2), (b) 50 % (columna 3), 75 % (columna 4), (c) 100 % (columna 5), y los pozos vacíos (columna 6).

### Experimento 9

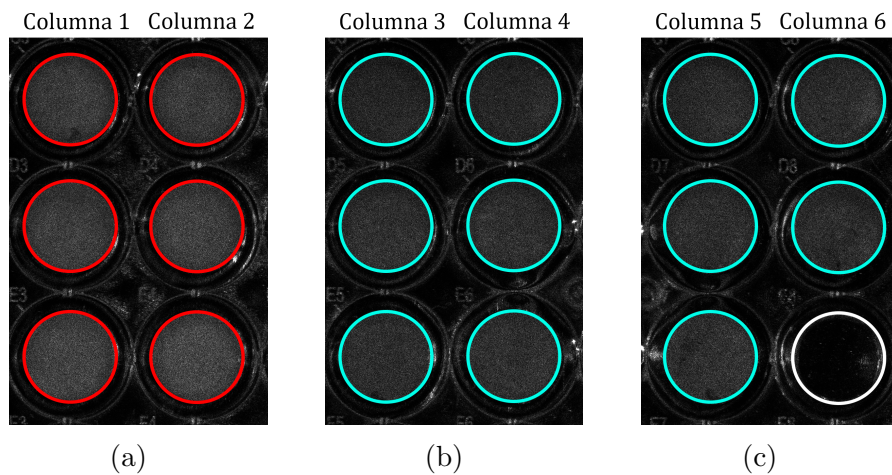


Figura 3.13: (a) Control (columna 1 y 2), (b) y (c) DMSO al 60 % incluyendo un pozo.

## Experimento 10

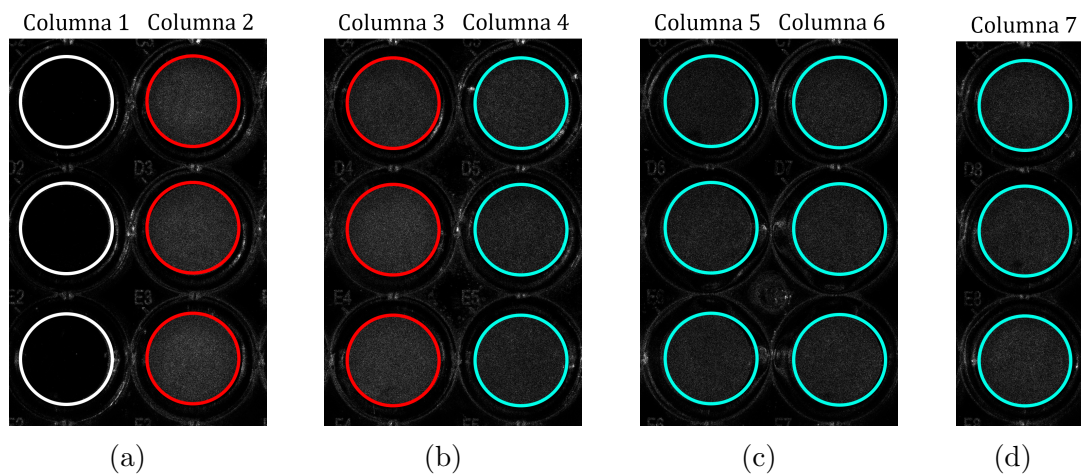


Figura 3.14: (a) Pozos vacíos (columna 1), control (columna 2), (b) control (columna 3), DMSO al 60 % (columna 4), (c) y (d) DMSO al 60 %.

## Experimento 11

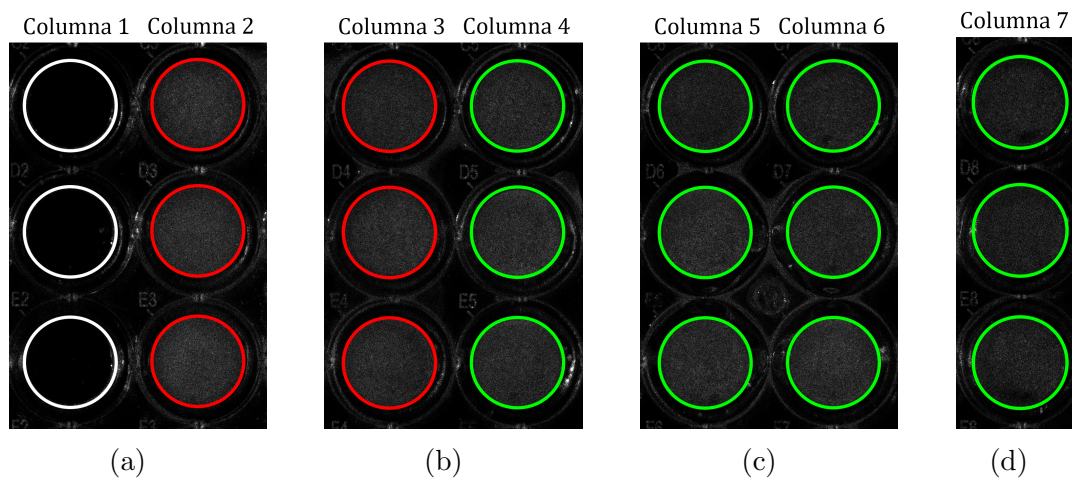


Figura 3.15: (a) Pozos vacíos (columna 1), control (columna 2), (b) control (columna 3), DMSO al 50 % (columna 4), (c) y (d) DMSO al 50 %.

## Experimento 12 y 13

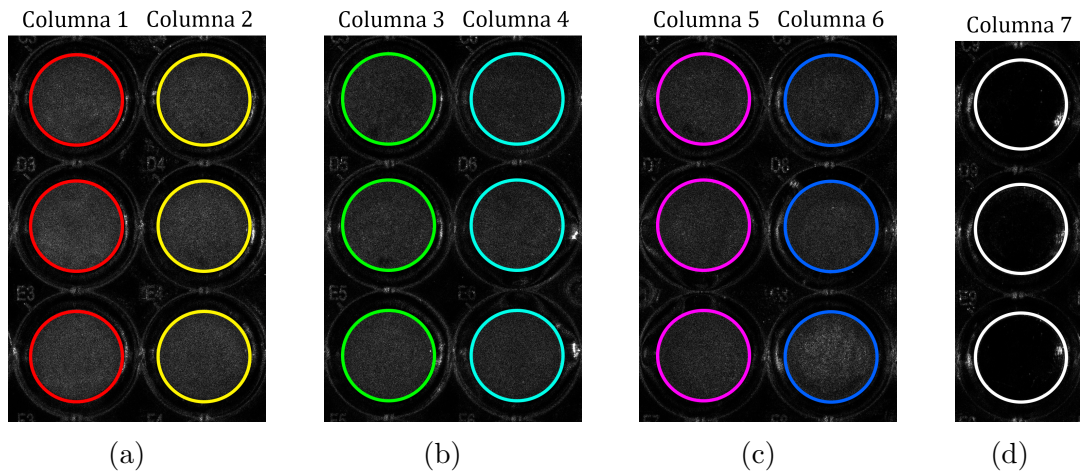


Figura 3.16: (a) Control (columna 1), DMSO al 25 % (columna 2), (b) 50 % (columna 3), 60 % (columna 4), (c) 75 % (columna 5), 100 % (columna 6), y (d) pozos vacíos.

### 3.2 Implementación de los algoritmos para el análisis de imágenes de speckle

La segunda parte de la metodología que se siguió en este trabajo de tesis fue la siguiente:

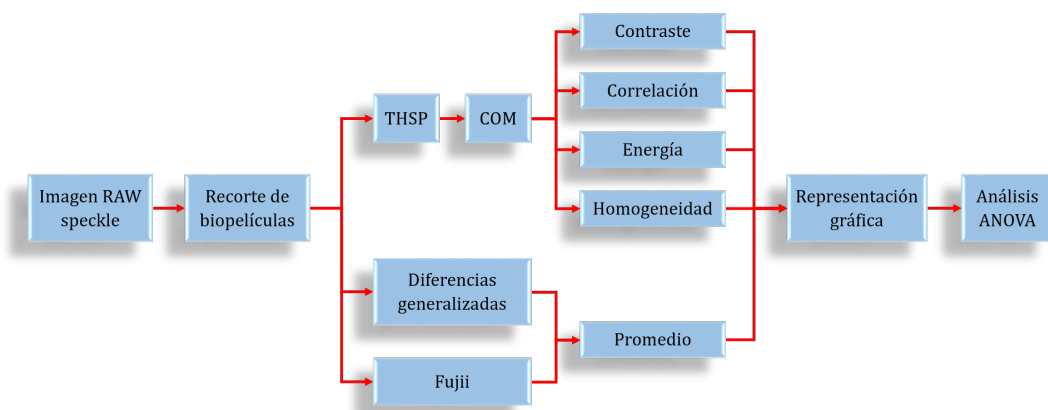


Figura 3.17: Esquema de la segunda parte de la metodología propuesta.

Previo al procesamiento de las imágenes de speckle, se hicieron recortes de tamaño  $268 \times 268$  píxeles, anulando los píxeles fuera de la biopelícula, es decir, se hicieron cero, así como se muestra en la figura 3.18, esto se aplicó de manera individual para cada una de las 181 fotogramas que conforman cada paquete.

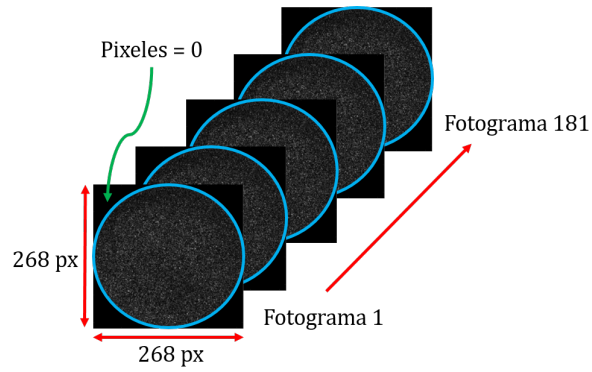


Figura 3.18: Paquete individual de una biopelícula.

Para el algoritmo de THSP se extrajo la columna central de píxeles de la biopelícula (ver figura 3.19a) y posteriormente se calculó la matriz de co-ocurrencia, se procedió a calcular los descriptores de Haralick utilizando las ecuaciones 2.29 - 2.32. Para los algoritmos de Diferencias generalizadas y Fujii, se consideró toda la región de la biopelícula (ver figura 3.19b), después se calculó el promedio mediante el siguiente modelo

$$Promedio = \sum_{i,j}^N \frac{I(i,j)}{N}, \quad (3.1)$$

donde  $I(i,j)$  es el valor de la intensidad del píxel en las coordenadas  $(i,j)$  y  $N$  es el número total de píxeles dentro de la región de la biopelícula.

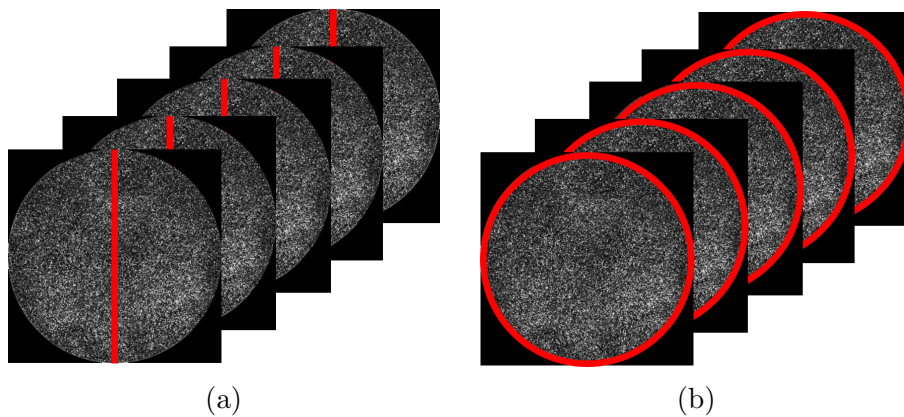


Figura 3.19: Paquete de imágenes representativo que se usó para (a) THSP y COM y, (b) Diferencias generalizadas y Fujii.

Para todos los datos se generaron gráficas comparativas y se sometieron a un análisis ANOVA. Se procesaron un total de 246 biopelículas distribuidas en trece experimentos, clasificadas en 7 grupos distintos, con 3 biopelículas cada grupo.



# CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan las imágenes y resultados obtenidos de 13 experimentos, se procesaron alrededor de 246 biopelículas, distribuidas en 3 biopelículas por grupo en cada experimento. Para cada algoritmo, se ha optado por mostrar únicamente una imagen representativa de cada grupo del experimento 1, esto debido a que todas las biopelículas fueron cultivadas bajo condiciones idénticas en cada experimento (mismo medio, concentración, tiempo de incubación), y las imágenes obtenidas son muy similares entre los experimentos 1 al 13. Los resultados completos de todos los experimentos se presentan en tablas y gráficas.

## 4.1 Algoritmo Time History Speckle Pattern y Matriz de co-ocurrencia

### 4.1.1 Experimento 1

La figura 4.1 muestra las imágenes reconstruidas de THSP para los diferentes grupos de biopelículas, el conjunto de  $M$  puntos representa la columna de píxeles extraídos en cada biopelícula. Podemos observar un seguimiento de la evolución temporal a lo largo de 181 fotogramas o imágenes, la biopelícula de control (figura 4.1a) no fue sometida a ningún tratamiento por lo que presenta una actividad máxima y corresponde al 100 % de dinámica en comparación con los grupos restantes. Esto se traduce en una imagen de THSP con líneas muy cortas y discontinuas, a medida que aumentamos la concentración de DMSO, la colonia de hongos va disminuyen-

do gradualmente y con ello la actividad sobre la biopelícula, como consecuencia las líneas del THSP correspondientes tienden a alargarse, volviéndose más pronunciadas y homogéneas, tal como se puede observar en la figura 4.1f.

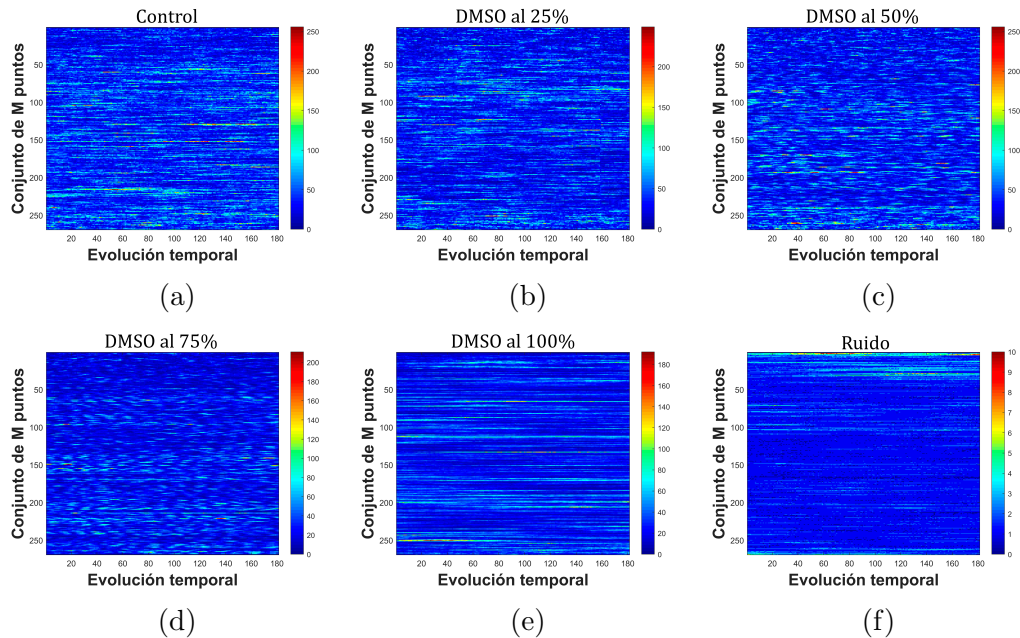


Figura 4.1: Matriz de THSP para el grupo de (a) control; los tratamientos con diferentes concentraciones de DMSO (b) 25 %, (c) 50 %, (d) 75 % hasta el (e) 100 %, y, por último (f) el grupo de ruido.

Por otro lado, en la figura 4.2 se presentan las matrices de co-ocurrencia asociadas a las THSP de la figura 4.1, podemos notar con más detalle cómo el DMSO afecta a la colonia de hongos. El tamaño de la diagonal en la matriz de co-ocurrencia es característico del nivel de la actividad de la muestra, para una biopelícula de control la matriz resultante, tal como se observa en la figura 4.2a tiende a tener una diagonal más larga debido que se distribuye a lo largo de la matriz, generando de esta manera valores de frecuencias relativamente bajos como se observa en la barra de colores que va de 0 a 200. Para los grupos con mayor tratamiento, la distribución de datos de la matriz tiende a concentrarse en la diagonal principal, lo que hace que esta se vuelva progresivamente mas corta y, al mismo tiempo, genera picos mas altos en la frecuencia. Recordemos que estos elementos corresponden a pixeles que no presentan diferencia en sus niveles de grises, cuyas probabilidades de ocurrir sobre la imagen comienza a incrementar, esto implica que la colonia se está desintegrando

progresivamente. Por último, la matriz del pozo vacío (figura 4.2f) donde no hay actividad biológica, notamos que las frecuencias se disparan a números muy altos y, así mismo la diagonal prácticamente se contrae a un punto muy reducido en la imagen.

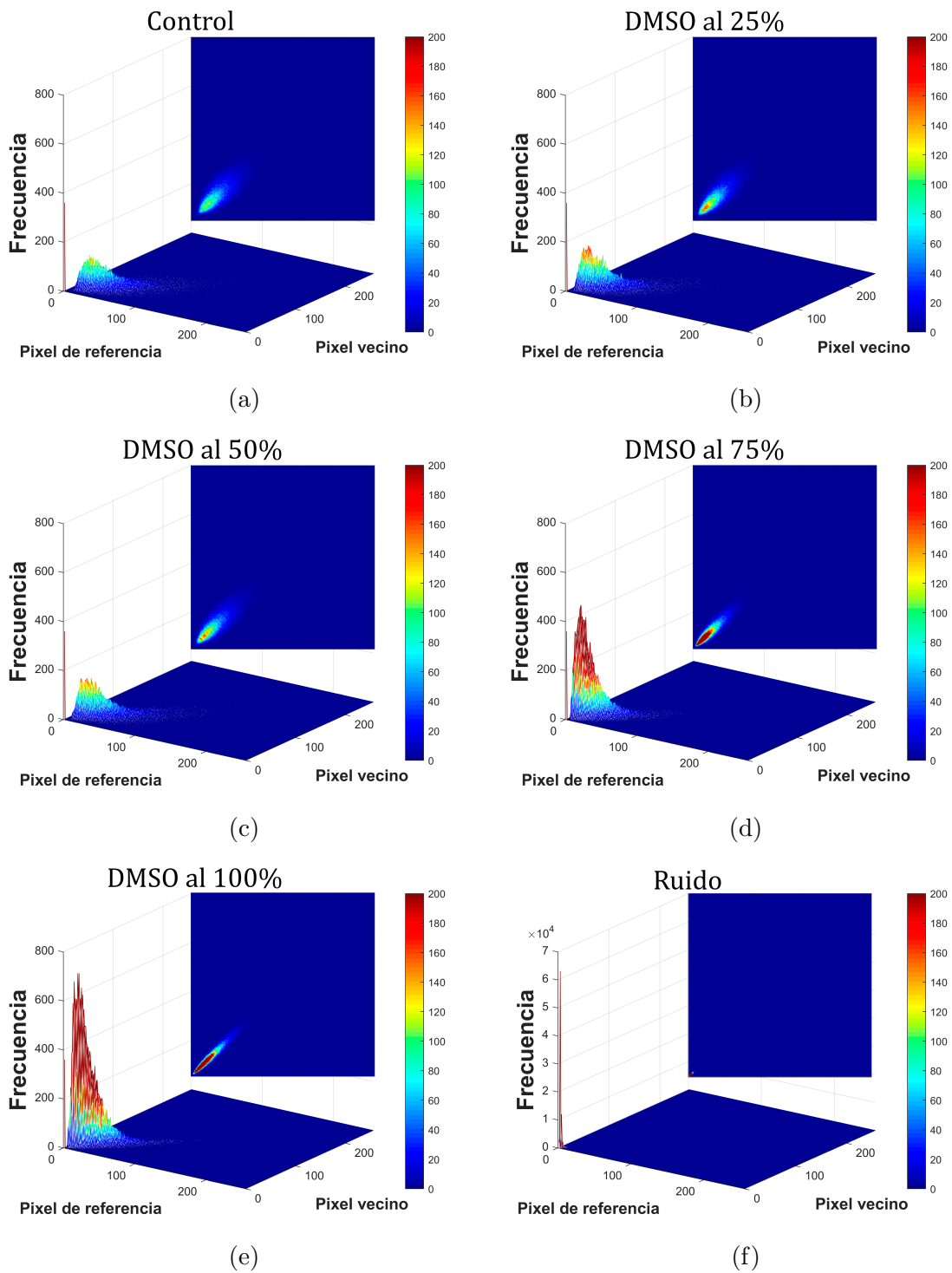
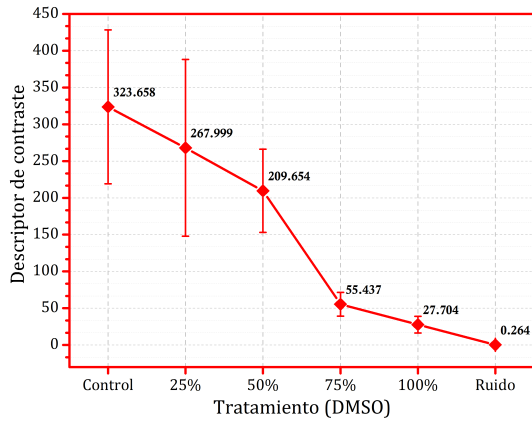


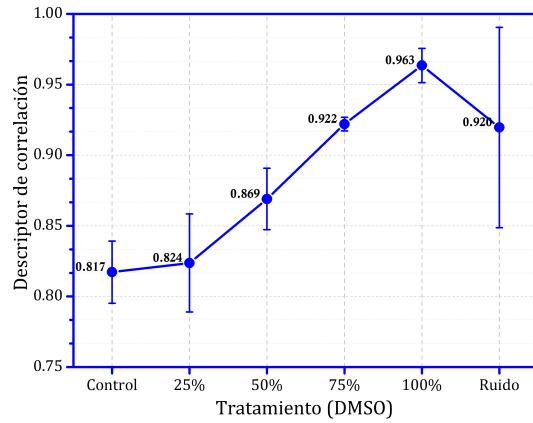
Figura 4.2: Matriz de co-ocurrencia asociada a las imágenes de la figura 4.1 para (a) control, (b) - (e) aquellos que recibieron diferentes concentraciones de DMSO desde 25 % hasta 100 % y, (f) ruido.

Se extrajeron los descriptores de Haralick para cada matriz de co-ocurrencia, obteniendo un valor único para cada biopelícula, los cuales se han promediado por grupo y cuyas gráficas correspondientes al experimento 1 se muestran en la figura 4.3. Lo primero que podemos notar es que en la gráfica de contraste (figura 4.3a) a medida que aumenta la concentración de DMSO la actividad de la colonia disminuye y los valores de contraste decrecen gradualmente, mostrando una caída drástica para el grupo de ruido. Además, es interesante observar que conforme disminuye el contraste la desviación estándar también disminuye en la misma medida.

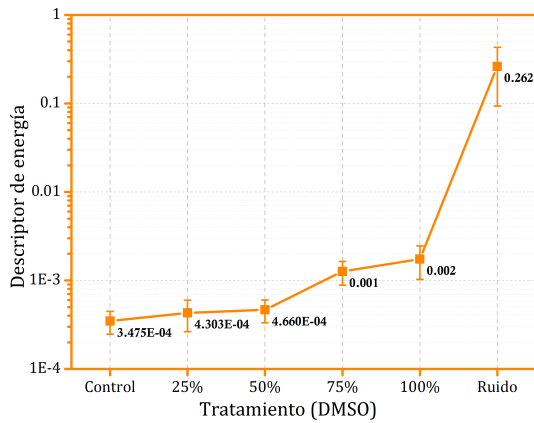
Por otro lado, con esta tendencia para el resto de las gráficas, el comportamiento de los descriptores es opuesto; es decir, los valores aumentan a medida que incrementa la concentración de DMSO. En la gráfica de correlación (figura 4.3b) se puede notar una inusual caída para el grupo de ruido, que se posiciona inclusive por debajo del grupo de DMSO al 75 %. Respecto a la gráfica de la figura 4.3c, se observa una tendencia general entre los valores de energía y los diferentes grupos de biopelículas, desde el grupo de control hasta el grupo de ruido. Sin embargo, la escala de la gráfica revela que este descriptor discrimina claramente el grupo de ruido de entre los diferentes grupos de DMSO, indicando que este es particularmente muy útil para identificar si se trata de una muestra biológica o no dinámica. Por último, en la gráfica de homogeneidad (figura 4.3d), se observa un patrón similar al de los casos anteriores: a medida que intensificamos el tratamiento, los valores de homogeneidad también tienden a aumentar.



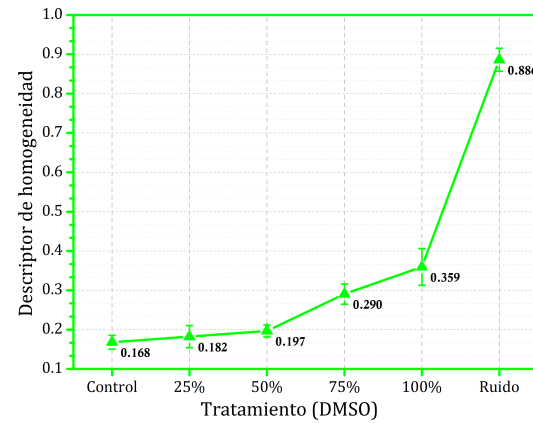
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.3: Gráficas de los descriptores de Haralick correspondientes al experimento 1. (a) Contraste, (b) Correlación, (c) Energía y (d) Homogeneidad.

#### 4.1.2 Resumen de los 13 experimentos

La tabla 4.1 resume el promedio por grupo de los diferentes descriptores para los 13 experimentos.

Tabla 4.1: Descriptores de Haralick - Promedio de los 13 experimentos.

Biopelículas	Contraste	Correlación	Energía	Homogeneidad
Control	157.406	0.743	1.020E-03	0.222
DMSO al 25 %	149.501	0.800	1.020E-03	0.234
DMSO al 50 %	89.130	0.835	2.000E-03	0.292
DMSO al 60 %	20.381	0.936	4.160E-03	0.407
DMSO al 75 %	30.590	0.936	3.020E-03	0.377
DMSO al 100 %	17.076	0.955	3.650E-03	0.417
Ruido	0.317	0.930	2.540E-01	0.869

Al extender el estudio a lo largo de los 13 experimentos, podemos observar que las gráficas mostradas en la figura 4.4 revelan un comportamiento similar al del primer experimento.

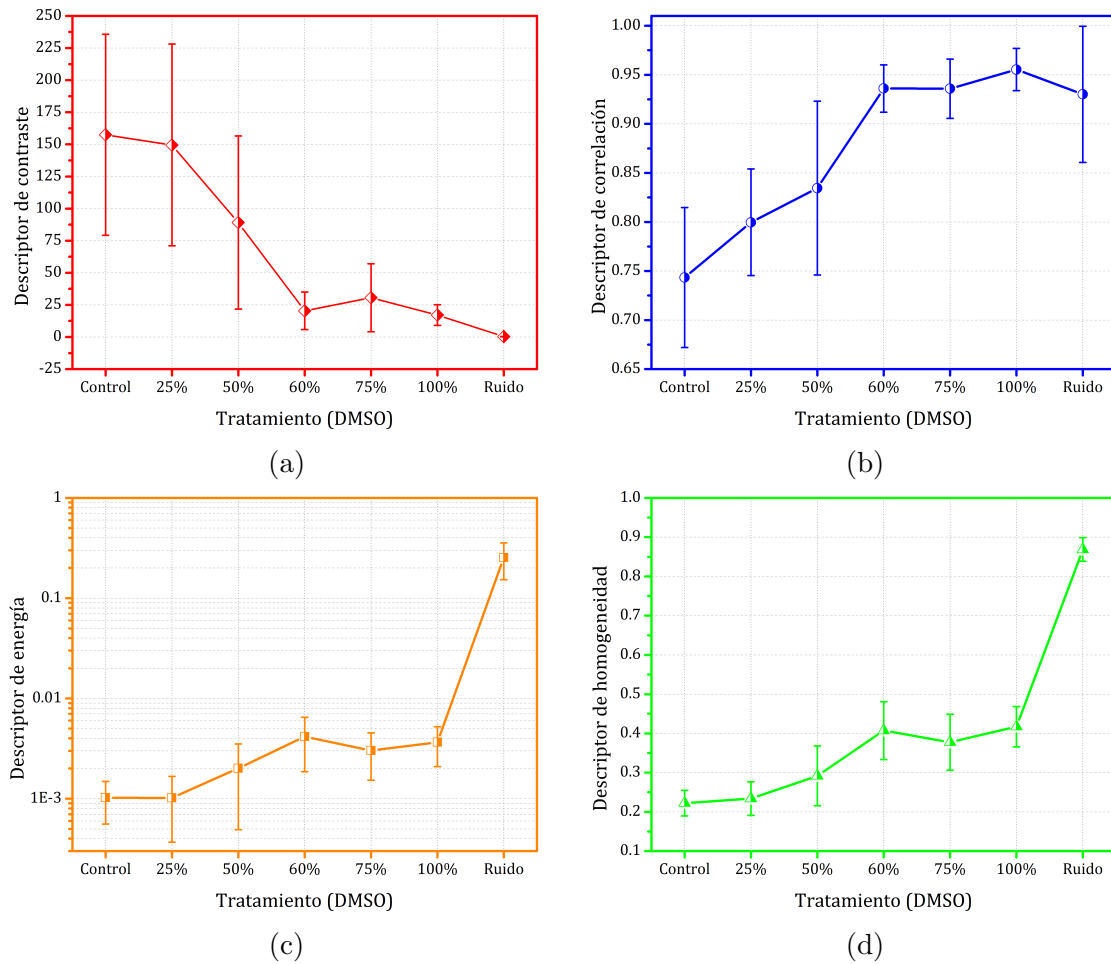


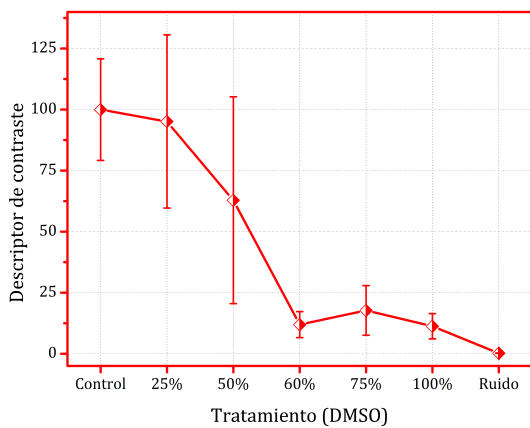
Figura 4.4: Gráficas del promedio de los 13 experimentos para cada descriptor de Haralick. (a) Contraste, (b) Correlación, (c) Energía, y (d) Homogeneidad.

Los descriptores de Haralick siguen la misma tendencia, aunque es importante mencionar el hecho de que el grupo con DMSO al 60% se desvía de esta métrica, pues en la gráfica de contraste este grupo presenta una caída mucho más rápida que el grupo con DMSO al 75% lo cual es bastante inusual considerando que los demás grupos van acorde al comportamiento esperado. Este mismo fenómeno se observa en las gráficas de correlación, energía y homogeneidad (figuras 4.4b - 4.4d) donde este grupo en particular (DMSO al 60%) presenta un aumento acelerado generando un pico anómalo que rompe la transición esperada desde el grupo de control hasta el grupo de ruido.

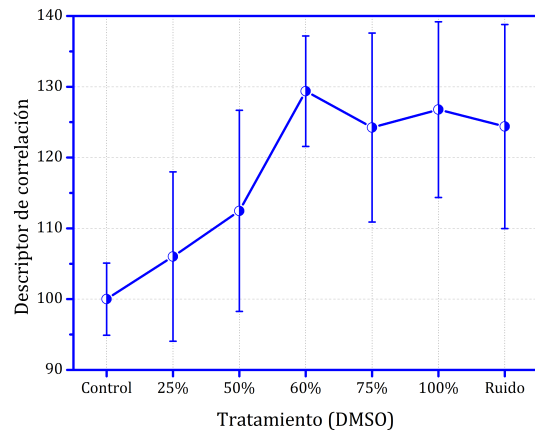
Los descriptores fueron normalizados por experimento, los datos se muestran en la tabla 4.2 cuyos valores están expresados en porcentajes, se han generado sus respectivas gráficas las cuales se pueden observar en la figura 4.5:

Tabla 4.2: Descriptores de Haralick - Promedio normalizado por experimento.

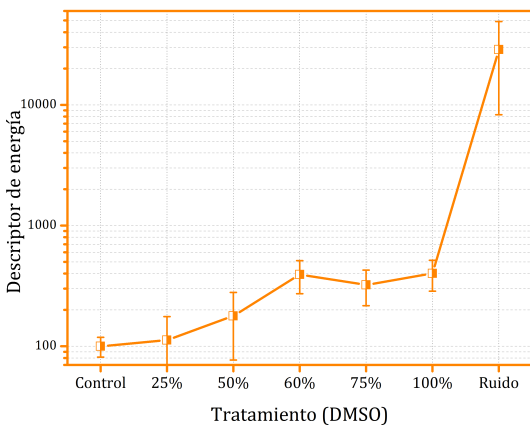
Biopelículas	Contraste	Correlación	Energía	Homogeneidad
Control	100.000	100.000	100.000	100.000
DMSO al 25 %	95.143	106.024	112.349	106.760
DMSO al 50 %	62.884	112.468	178.347	127.916
DMSO al 60 %	11.928	129.379	392.629	185.461
DMSO al 75 %	17.731	124.252	322.190	171.616
DMSO al 100 %	11.266	126.767	401.225	191.340
Ruido	0.222	124.386	28679.369	394.494



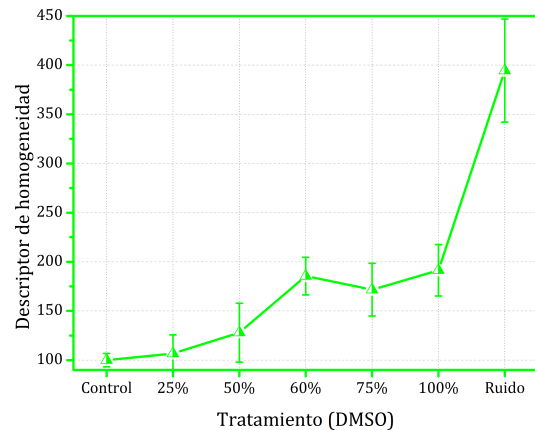
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.5: Gráficas de los descriptores de Haralick normalizados por experimento. (a) Contraste, (b) Correlación, (c) Energía y (d) Homogeneidad.

En resumen, los grupos parecen mantener la misma sensibilidad, excepto que nuevamente el grupo con DMSO al 60% se sale de la gráfica en todos los casos. Una posible explicación es que, durante los días en los que se tomaron las fotografías de las biopelículas, pudo haber existido una mayor presencia de ruido que habría influido en las imágenes tomadas. Esta presencia de ruido podría atribuirse al tiempo insuficiente de reposo de las muestras de los experimentos 9 y 10, impidiendo que estas se estabilizaran adecuadamente antes de la captura de las imágenes, afectando particularmente al grupo de DMSO al 60%, ya que es el único grupo tratado en estos experimentos (ver figura 3.4 y 3.5).

Como se ha visto para la mayoría de los casos hay una disminución del error a medida que avanzamos hacia mayores concentraciones, mientras el grupo de control muestra un error significativo, los grupos con DMSO al 100% y ruido presentan errores mínimos. Esto puede estar relacionado fuertemente con la naturaleza estocástica del sistema que se está estudiando y que la vuelve impredecible. En el grupo de control, al no recibir ningún tratamiento, las colonias tienen mayor libertad para crecer o evolucionar, lo que incrementa la variabilidad en la actividad, en cambio, al introducir concentraciones de DMSO, el sistema se condiciona y tiende a una fase transitoria en la que las colonias se estabilizan, resultando en una menor variabilidad de los descriptores y, por ende, en una disminución de la desviación estándar. De esta forma, se descarta que el ruido y la reducción del error estén relacionados con el sistema de LSI o con los algoritmos desarrollados, los cuales han sido validados con base en los resultados obtenidos.

### **4.1.3 Análisis ANOVA**

Se aplicó un análisis ANOVA a todos los descriptores una vez normalizados por experimentos. Inicialmente, se trabajó con los datos de contraste normalizados por experimento (figura 4.6a); en la figura 4.6b tenemos un diagrama de cajas o notched boxplot, la línea roja en cada caja representa la mediana de cada grupo de bio-



películas junto con sus respectivas desviaciones estándar. Como se puede observar, esta gráfica revela claramente la existencia de valores anormales en 4 grupos (DMSO al 25 %, 75 %, 100 % y el grupo de ruido), estos valores denominados outliers se encuentran muy alejados de la mediana de sus grupos respectivos. Asimismo, se tiene la segunda gráfica generada por ANOVA (figura 4.6c) llamada diagrama de puntos o comparaciones múltiples, esta gráfica como su nombre lo indica, permite comparar la media de los diferentes grupos y determinar si existe alguna diferencia significativa entre ellos.

De acuerdo con lo observado en esta gráfica, se muestra que el grupo de control y el grupo de DMSO al 25 % presentan cierta similitud, sin embargo, el análisis ANOVA revela que existe una diferencia significativa entre los grupos restantes, este análisis es consistente con los datos previamente obtenidos, ya que hemos visto que la primera concentración de DMSO (25 %) parece no tener un efecto notable o inmediato sobre la biopelícula, mientras que a partir del 50 % o 60 % de concentración de DMSO comienza a haber una disminución considerable de la dinámica.

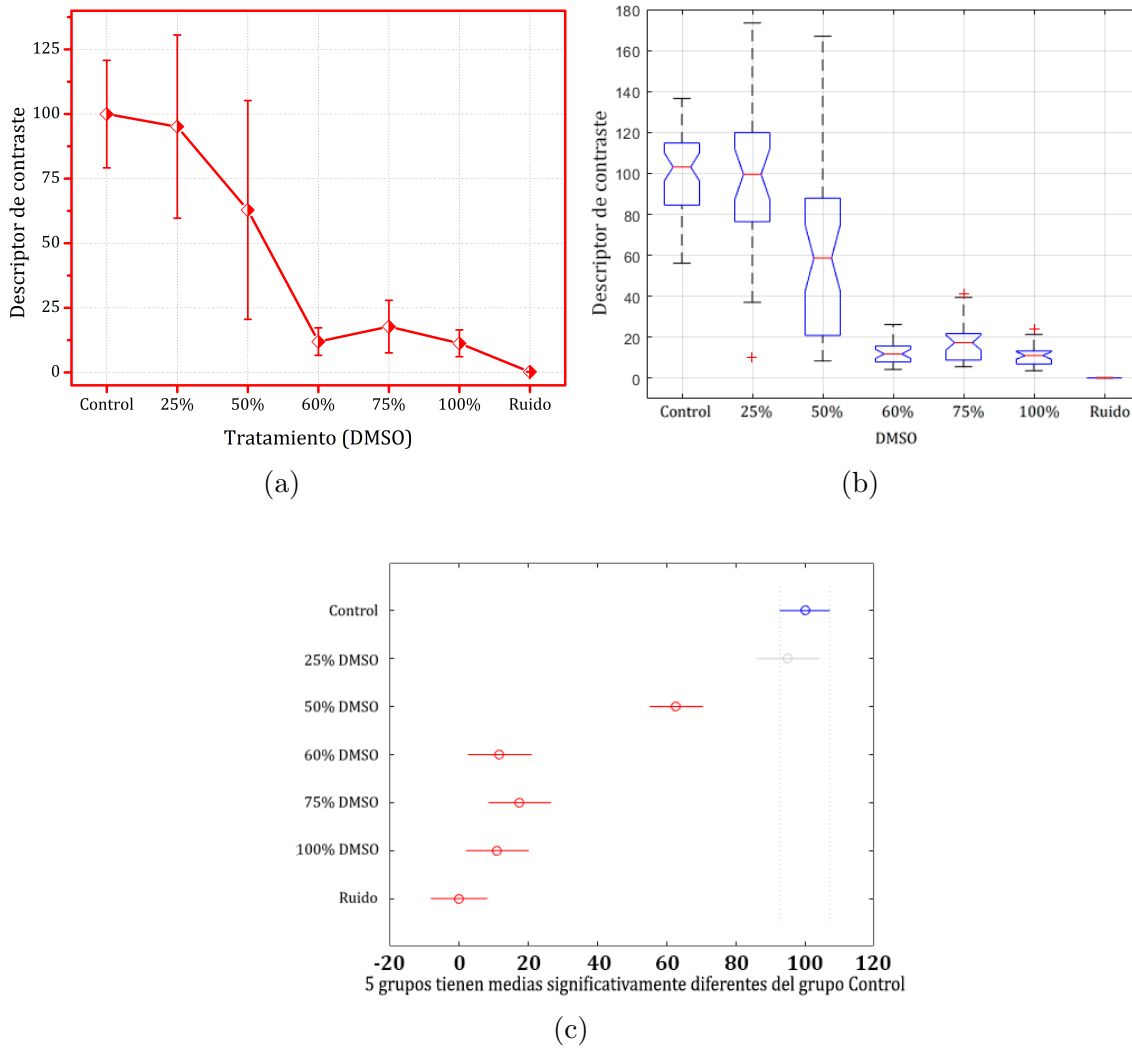


Figura 4.6: (a) Gráficas normalizadas por experimento para contraste y resultados arrojados por ANOVA, (b) gráfica de cajas y (c) gráfica de puntos.

Por último, se volvió a aplicar ANOVA para los datos después de excluir los outliers previamente identificados (figura 4.7). La cantidad reducida de outliers detectada por ANOVA confirma la consistencia de los datos en cada grupo, y aunque no existe una diferencia notoria si se excluyen estos valores (teniendo en cuenta que hay únicamente 4 outliers de 246 datos) garantiza aún más la validez de los resultados obtenidos por los algoritmos.

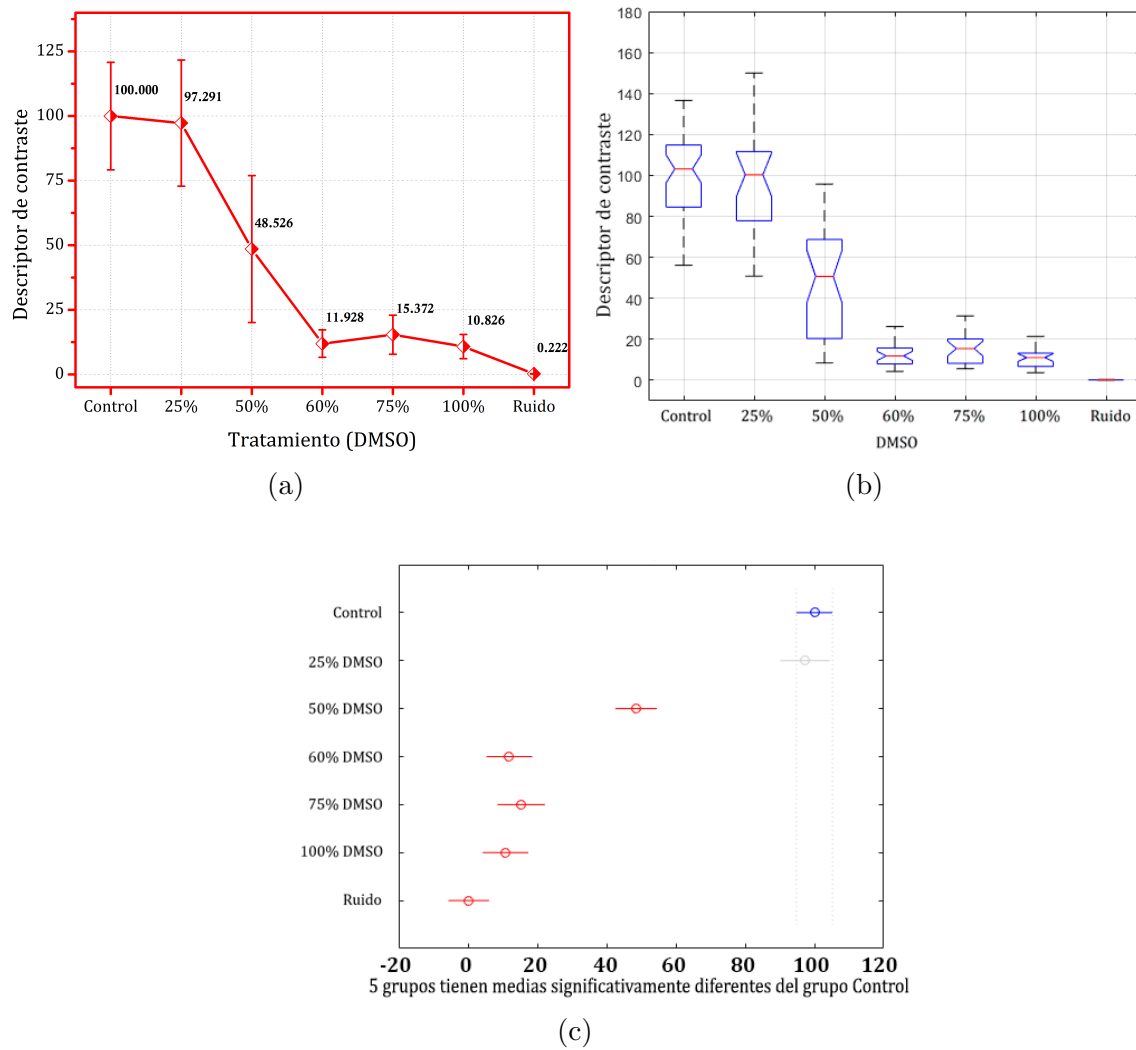
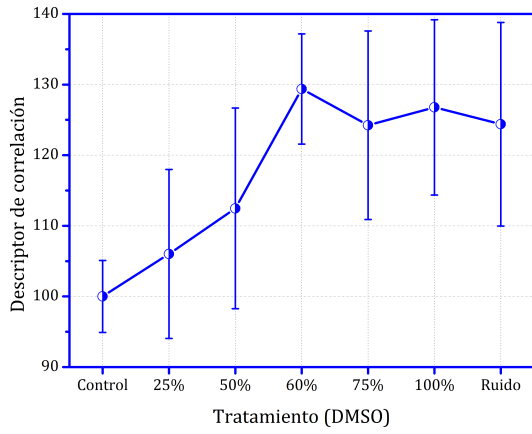
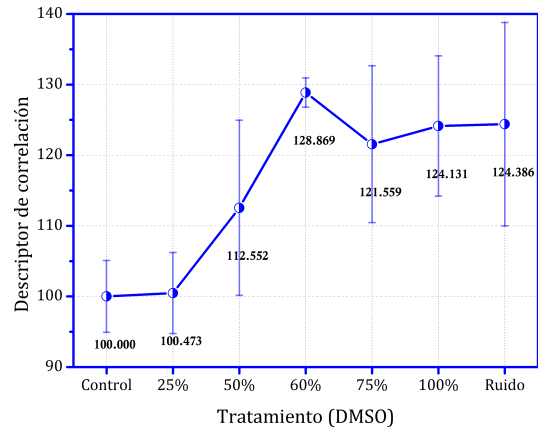


Figura 4.7: (a) Gráfica de datos normalizados sin outliers, (b) gráfica de cajas y (c) gráfica de puntos.

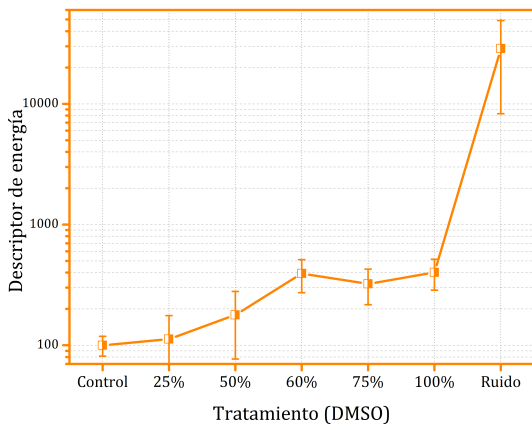
Los tres descriptores restantes (Correlación, Energía y Homogeneidad) fueron sometidos al mismo análisis, siguiendo el mismo procedimiento de identificación y exclusión de outliers. Las gráficas a continuación pertenecen a los datos normalizados con y sin outliers:



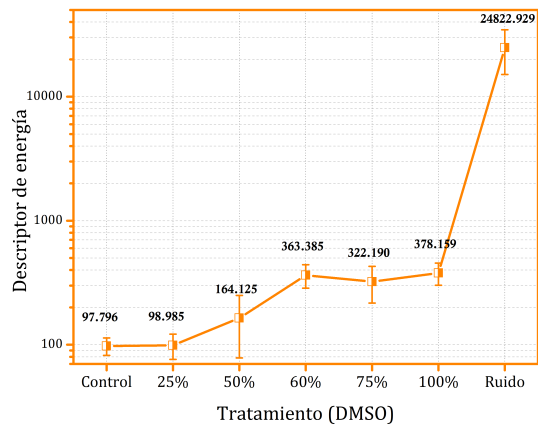
(a)



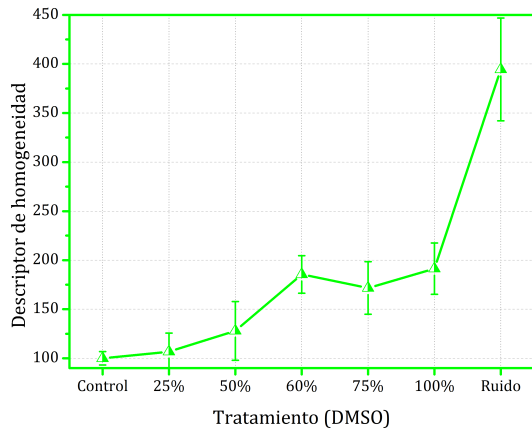
(b)



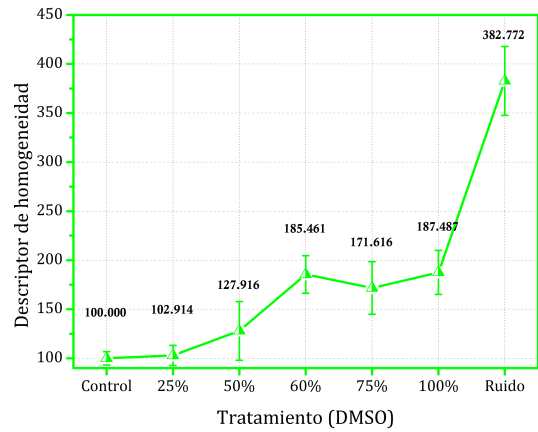
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 4.8: Gráficas de datos normalizados: (a) Correlación, (b) Correlación sin outliers, (c) Energía, (d) Energía sin outliers, (e) Homogeneidad, (f) Homogeneidad sin outliers.

## 4.2 Algoritmo Diferencias generalizadas

### 4.2.1 Experimento 1

En lo que respecta a los resultados obtenidos por el tercer algoritmo, los cuales se muestran en la figura 4.9, a medida que incrementamos la concentración de DMSO el mapa de contraste generado por el algoritmo muestra un predominio creciente del color azul en la imagen, logrando que esta se vuelva más homogénea, los promedios mostrados en cada imagen son una medida de la actividad de la biopelícula.

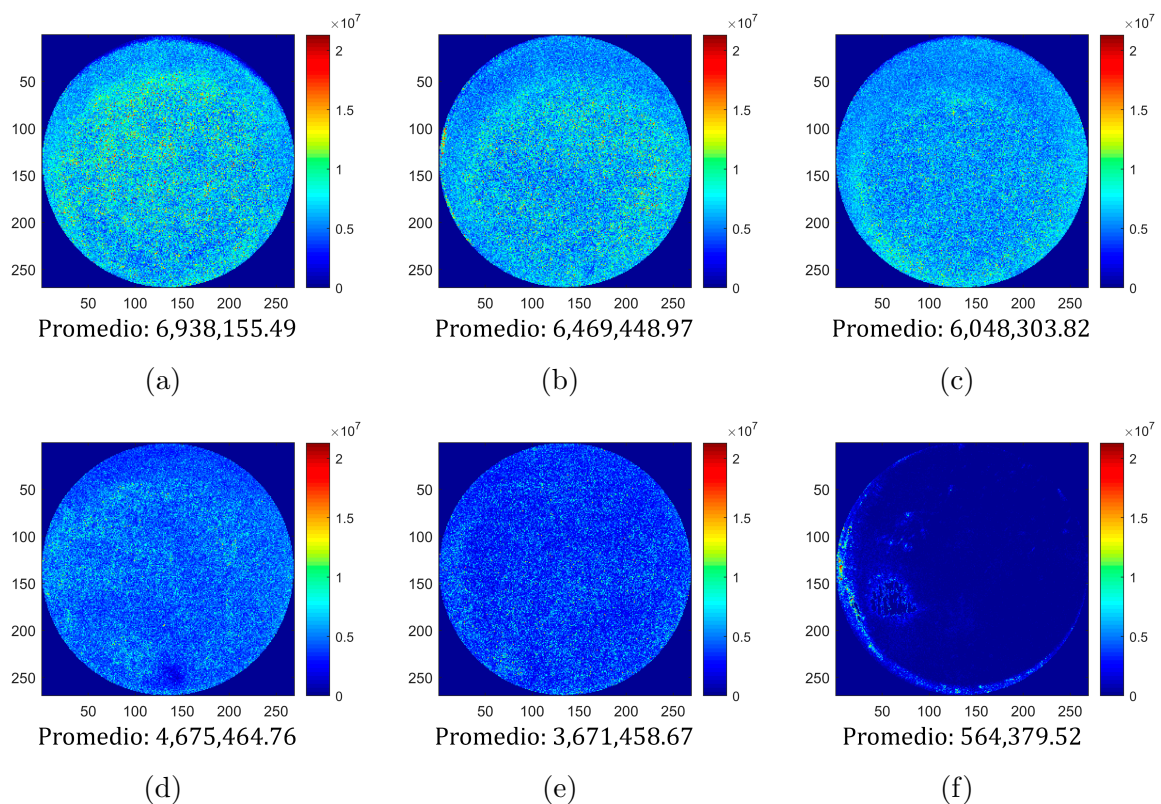


Figura 4.9: Resultados arrojados por DG para: (a) Control, (b) DMSO al 25 %, (c) DMSO al 50 %, (d) DMSO al 75 %, (e) DMSO al 100 %, y (f) Ruido.

Se promediaron las tres biopelículas que conforman cada grupo, para el experimento 1 se obtuvo la siguiente gráfica:

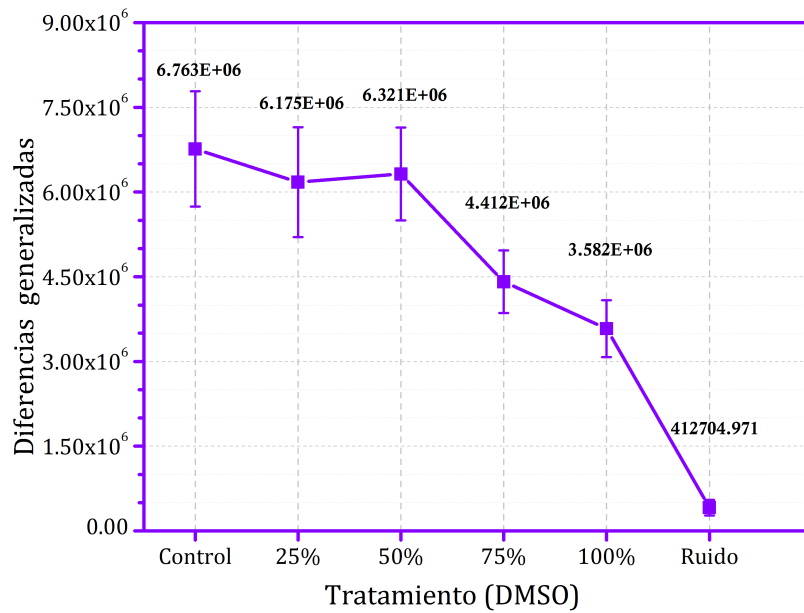


Figura 4.10: Gráfica de los promedios de las intensidades por grupo para el experimento 1.

Esto revela una tendencia en los promedios bastante similar a la de los resultados obtenidos previamente con los primeros algoritmos, demostrando así que este algoritmo también presenta una sensibilidad a los diferentes grupos de DMSO. Se observa que la caída del promedio, desde el grupo de control hasta el grupo de DMSO al 50% es relativamente lenta, lo cual sugiere que estas primeras concentraciones no tienen un gran efecto sobre las biopelículas, sin embargo, a partir del siguiente grupo, los valores decrecen rápidamente alcanzando un punto muy bajo para el grupo de ruido. Esto indica que las concentraciones más altas de DMSO generan un efecto más fuerte en la biopelícula, inhibiendo en mayor medida a las células.

## 4.2.2 Resumen de los 13 experimentos

Del mismo modo, en la tabla 4.3 se han resumido los datos a lo largo de los 13 experimentos, donde se presentan los promedios por grupo de biopelículas, y el promedio normalizado por experimento.

Tabla 4.3: Diferencias generalizadas - Promedio de las intensidades

Biopelículas	Promedio	Promedio normalizado
Control	4.037E+06	100.000
DMSO al 25 %	4.246E+06	100.169
DMSO al 50 %	3.496E+06	88.908
DMSO al 60 %	2.456E+06	64.227
DMSO al 75 %	3.142E+06	73.906
DMSO al 100 %	2.983E+06	70.765
Ruido	3.774E+05	8.960

A partir de estos datos, se generaron gráficas, tenemos en la figura 4.11a los datos promediados a lo largo de treces días y la figura 4.11b corresponde a la gráfica de los datos normalizados. Nuevamente podemos notar que los grupos parecen seguir una tendencia que concuerda con los efectos del solvente de DMSO, sin embargo, persiste la misma situación para un grupo en particular; con DMSO al 60 %, el cual cae abruptamente desviándose de la tendencia seguida por los demás grupos.

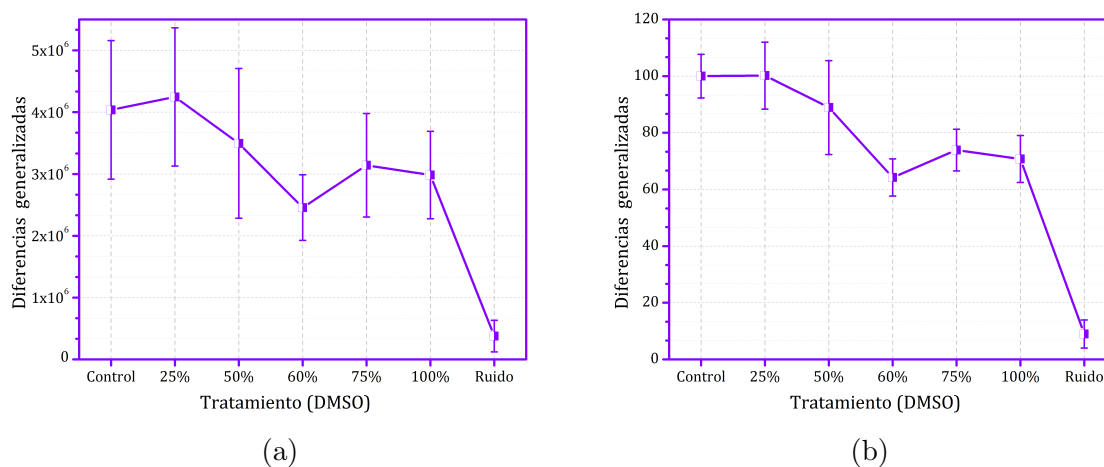
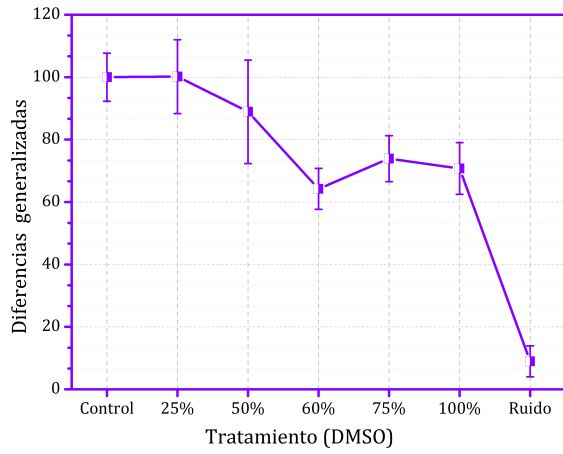


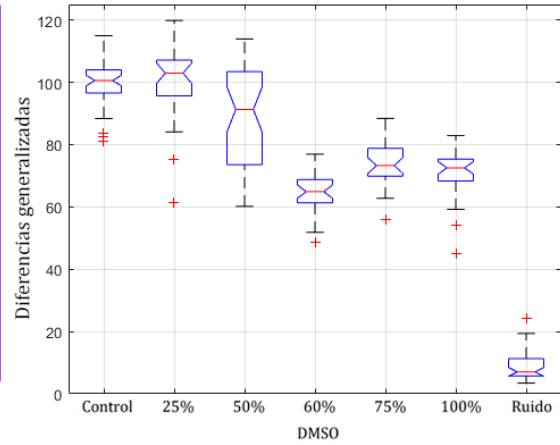
Figura 4.11: Gráficas de (a) datos promediados de los 13 experimentos y (b) datos promediados normalizados.

### 4.2.3 Análisis ANOVA

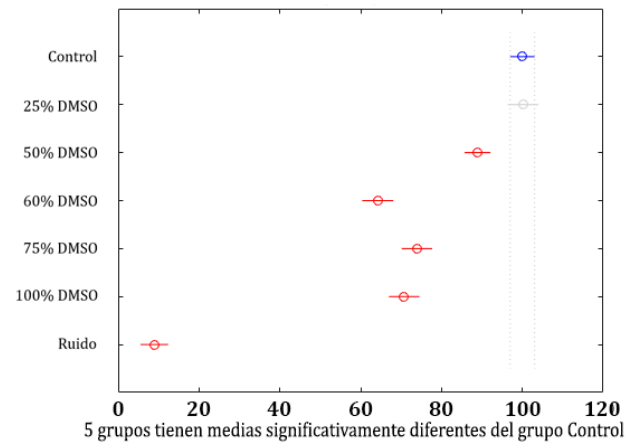
Al someter estos resultados a un análisis ANOVA, como se muestra en la figura 4.12b, se identificaron algunos outliers en todos los grupos, además, el grupo del ruido presenta una diferencia significativa con respecto a los demás grupos, tal y como se observa en la figura 4.12c.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.12: (a) Gráfica de datos normalizados, (b) gráfica de cajas y (c) gráfica de puntos.



Después de excluir estos valores atípicos, se aplicó nuevamente análisis ANOVA, cuyos resultados se presentan en la figura 4.13.

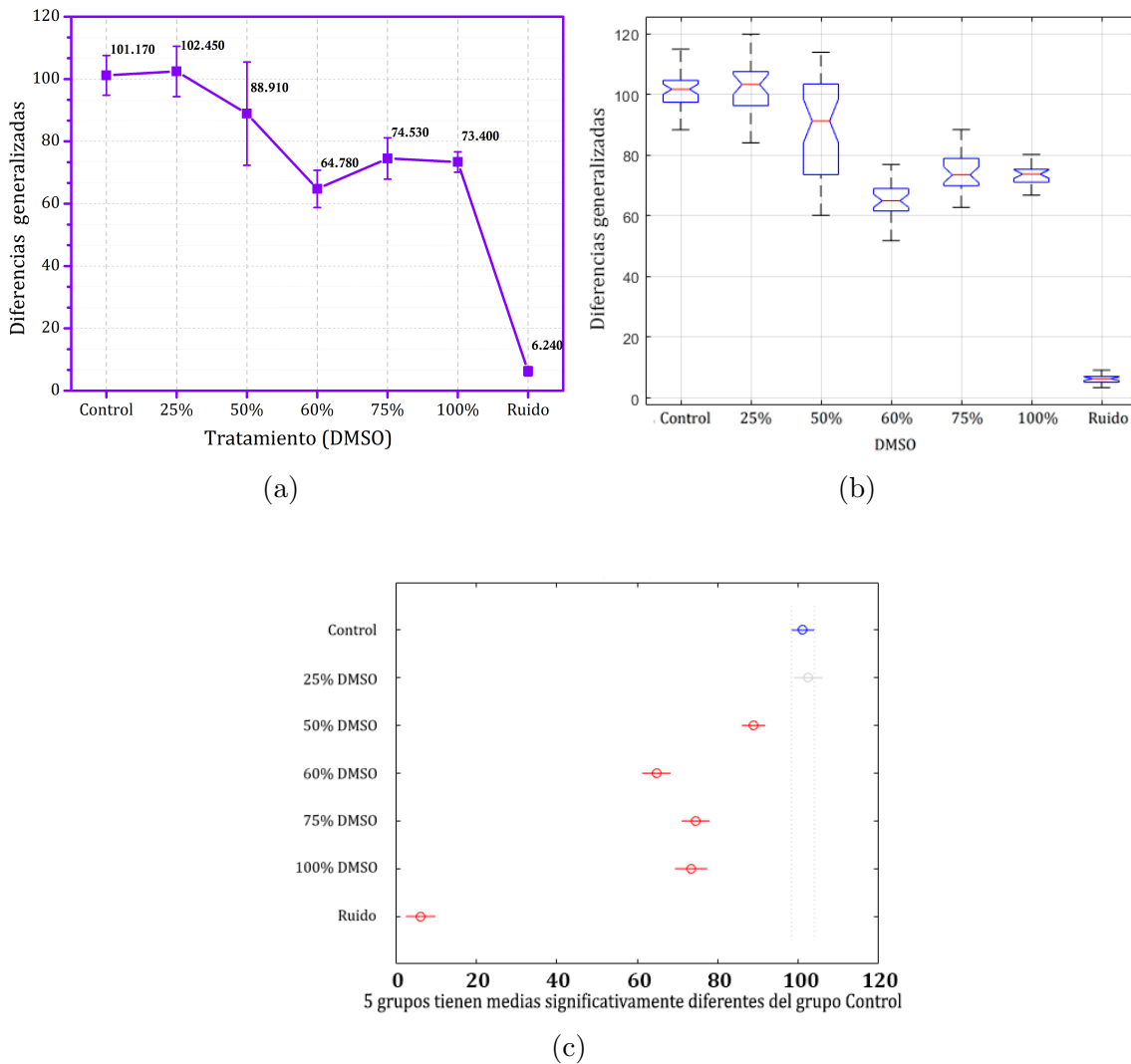


Figura 4.13: (a) Gráfica de datos normalizados sin outliers, (b) gráfica de cajas y (c) gráfica de puntos.

## 4.3 Algoritmo Fujii

### 4.3.1 Experimento 1

Por último, se han analizado los resultados obtenidos con el algoritmo de Fujii, los cuales se muestran en la figura 4.14. Este algoritmo en particular logra una distinción más precisa de la actividad en las biopelículas, en lo que respecta al grupo de control (figura 4.14a) donde la colonia está completamente viva la actividad es muy

alta, a medida que incrementamos la concentración de DMSO, el solvente va eliminando progresivamente la biopelícula, logrando un efecto mas fuerte principalmente en la región central de esta. En la figura 4.14c, se percibe con mayor claridad que el efecto del solvente es menor en los bordes, o bien, que las células presentan mayor resistencia en esta área en particular. Sin embargo, con una concentración mayor a 75 %, el solvente logra inhibir la colonia de manera más uniforme. Cada biopelícula incluye su promedio correspondiente, y podemos observar que este disminuye a medida que disminuye la actividad de las células. Para los últimos dos grupos que se pueden observar en las figuras 4.14e y 4.14f notamos que los promedios son similares, lo que significa que en ambos casos ya no hay una biopelícula activa, lo cual indica la precisión del algoritmo para la detección de diferentes niveles de actividad biológica.

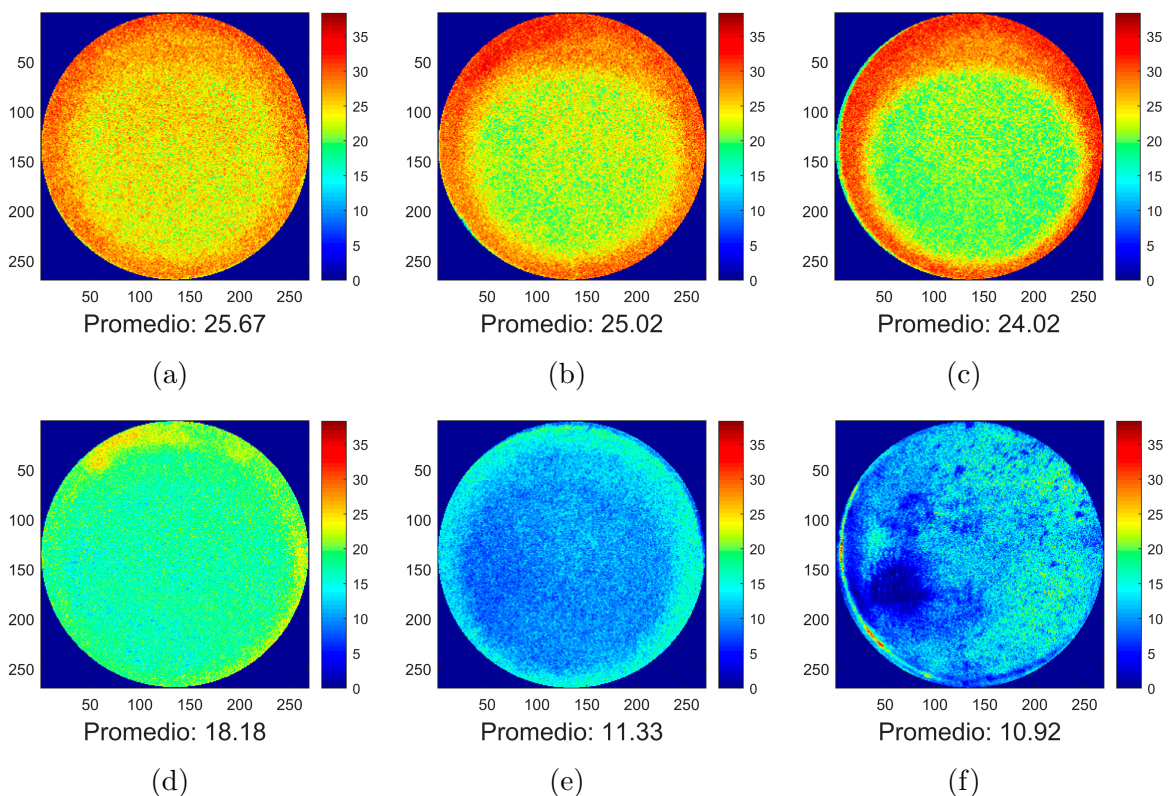


Figura 4.14: Resultados arrojados por Fujii para el grupo (a) Control, y las diferentes concentraciones de DMSO; (b) 25 %, (c) 50 %, (d) 75 %, (e) 100 %, y (f) el grupo de ruido.

La siguiente gráfica corresponde a los datos obtenidos del experimento 1:

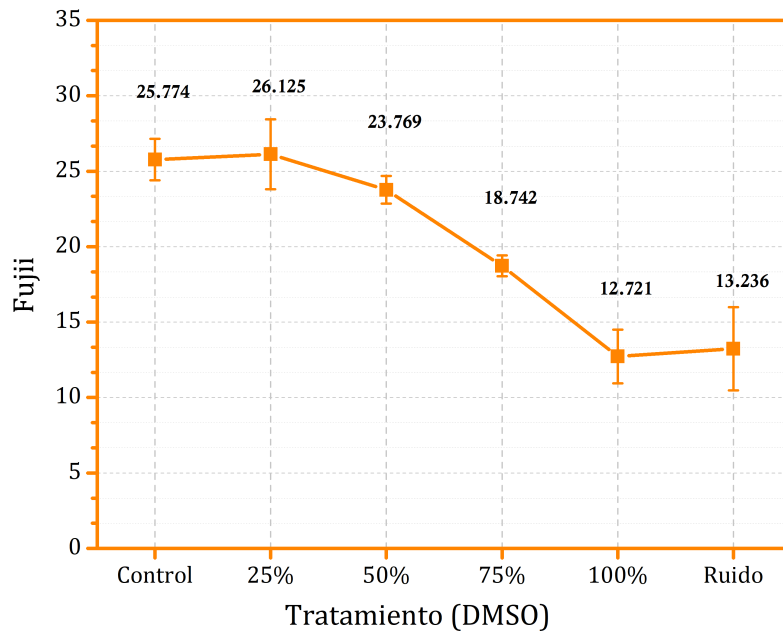


Figura 4.15: Gráfica de los promedios de las intensidades para el experimento 1.

La gráfica anterior ilustra el comportamiento de los promedios para todos los grupos estudiados, observamos que una concentración de DMSO al 25% logra inclusive estimular aún más la colonia generando un leve crecimiento con respecto al control, a partir del siguiente grupo, los valores comienzan a descender progresivamente, aunque el grupo de pozos vacíos parece ser ligeramente más ruidoso que el grupo de DMSO al 100%.

### 4.3.2 Resumen de los 13 experimentos

En la tabla 4.4 se presentan los promedios para los 13 experimentos, y de igual manera estos valores han sido normalizados por experimento:

Tabla 4.4: Fujii - Promedio de las intensidades

Biopelículas	Promedio	Promedio normalizado
Control	29.248	100.000
DMSO al 25 %	27.794	97.587
DMSO al 50 %	25.670	87.766
DMSO al 60 %	16.716	56.298
DMSO al 75 %	17.467	61.633
DMSO al 100 %	14.647	51.350
Ruido	17.587	60.893

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 4.16 se observa una clara tendencia entre los valores obtenidos, la caída progresiva de los promedios indica la disminución de la actividad en las biopelículas. Además, es importante mencionar dos aspectos evidenciados en las gráficas: primero, el grupo de DMSO al 60 % se desvía de la tendencia establecida por los demás grupos, y segundo, el grupo de ruido aumenta repentinamente por encima de los valores correspondientes al de DMSO al 100 %.

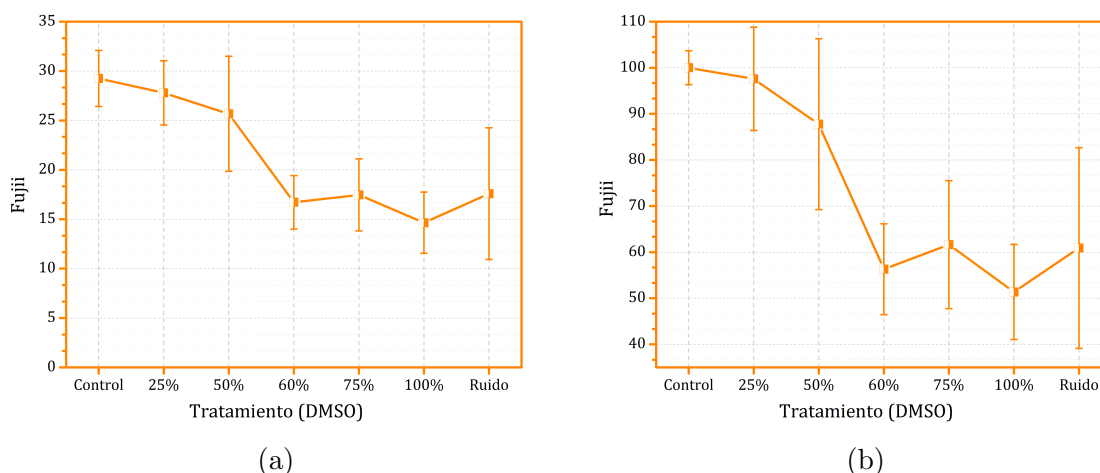


Figura 4.16: (a) Gráfica de datos promediados respecto a los 13 experimentos y (b) gráfica de los datos promediados normalizados.

### 4.3.3 Análisis ANOVA

Finalmente, en las figuras 4.17 y 4.18 se presentan las gráficas generadas por ANOVA, antes y después de excluir los outliers, respectivamente, como podemos observar se han identificado dos outliers, uno en el grupo de DMSO al 25 % y otro en el grupo de ruido, esto respalda la validez de los resultados obtenidos.

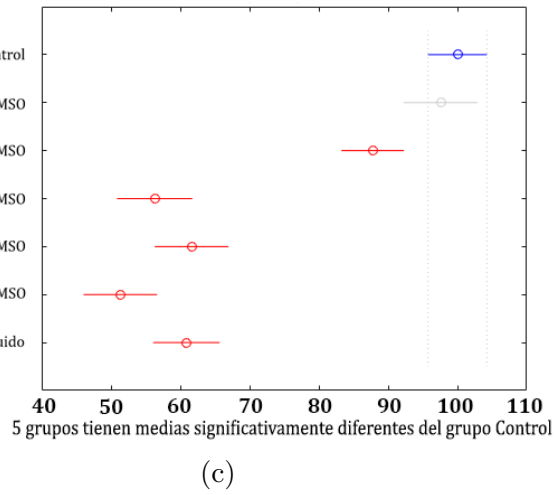
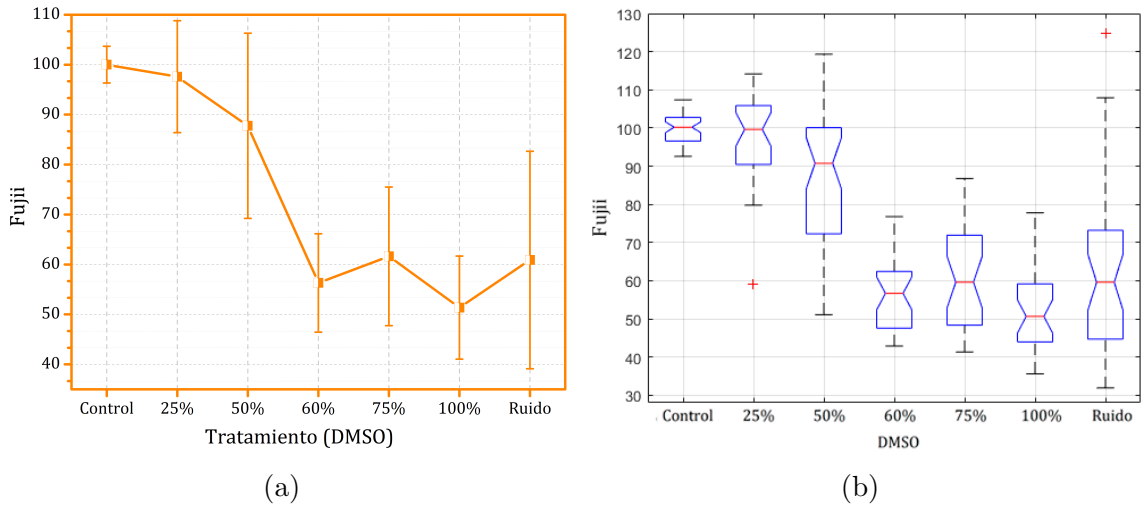
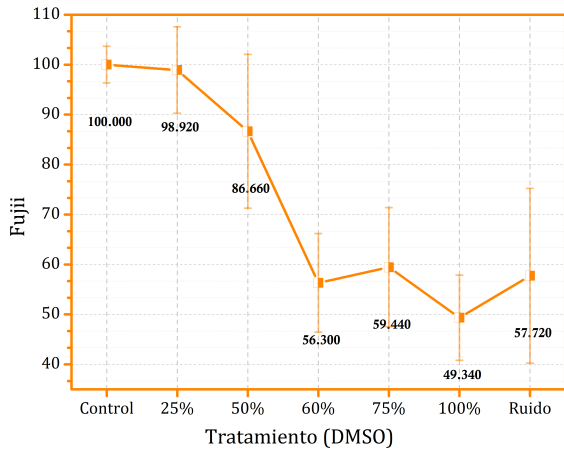
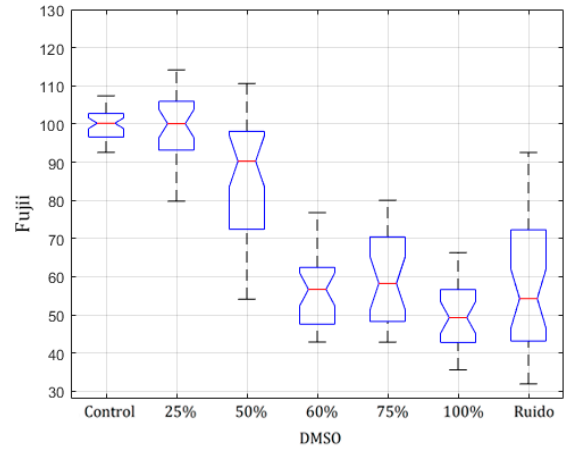


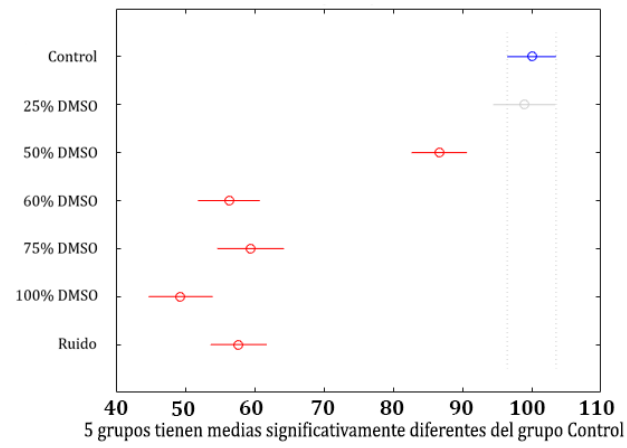
Figura 4.17: (a) Gráfica de datos normalizados por experimento, (b) gráfica de cajas y (c) gráficas de puntos.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.18: (a) Gráfica de datos normalizados sin outliers, (b) gráfica de cajas y (c) gráfica de puntos.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Ésta tesis tuvo por objetivo implementar diferentes algoritmos diseñados para procesar imágenes de speckle con el fin estudiar la viabilidad celular de colonias de *C. tropicalis*, la motivación emerge de las limitaciones y desventajas que presentan los métodos tradicionales. Para esto se siguió una metodología que está constituida por una primera etapa relacionada con el montaje experimental de un sistema LSI mediante el cual se adquirieron las imágenes de speckle sin deteriorar la muestra. La segunda etapa consiste en el procesamiento digital donde se aplicaron los algoritmos a los patrones de speckle.

El sistema de LSI que se propuso emplear permitió de manera efectiva la captura y almacenamiento de las imágenes de speckle con una alta definición. Para garantizar la calidad de las mediciones, se establecieron condiciones de iluminación, como es el uso de un haz coherente y un difusor para lograr una distribución homogénea sobre la muestra, teniendo control además de las reflexiones no deseadas que pudieran interferir con los patrones de speckle. Se utilizó un soporte para fijar la muestra y dado que el haz interacciona con las partículas suspendidas en el aire, se dejó reposar las biopelículas aproximadamente 10 minutos antes de tomar las imágenes, permitiendo que estas partículas perturbadas durante la colocación de la muestra se estabilizaran, minimizando cualquier interferencia indeseada en los patrones de speckle. Durante la adquisición de estas imágenes, se usaron parámetros de captura como un tiempo de exposición de 300 *ms* y un número estándar de 181 fotogramas por paquete. En total se recolectaron datos de 246 biopelículas, que son los que se

cultivaron a lo largo de 13 experimentos, esto nos permitió tener un número suficiente de imágenes para realizar el adecuado procesamiento.

Se empleó el software de MATLAB por su versatilidad; su gran potencial para el soporte y manejo de matrices de alta dimensionalidad ha facilitado el almacenamiento y procesamiento de los resultados generados, permitiendo trabajar de manera eficiente con un número elevado de imágenes de speckle. Además, los algoritmos construidos fueron suficientemente optimizados para tener un menor costo en los recursos computacionales, lo cual es fundamental considerando la magnitud de los datos procesados.

Con base en el desarrollo de los cuatro algoritmos propuestos, se puede decir que la hipótesis de que estos algoritmos sean aplicables para analizar la dinámica de biopelículas es viable, sobre todo debido a que han sido capaces de distinguir y evaluar los diferentes niveles de actividad en grupos que recibieron tratamiento a distintas concentraciones de DMSO, así como como en los grupos de referencia (grupo de control y ruido), se ha visto que algunos lo hicieron con mayor precisión que otros. Sin embargo, se alcanzaron los objetivos planteados en este trabajo.

El análisis de las gráficas generadas demostró que existe una tendencia entre las concentraciones de DMSO y la actividad medida. En algunos casos esta relación es directamente proporcional y en otros se presenta de manera inversa, con esto se da a entender que cuando aumentamos la concentración de DMSO el parámetro que se está usando como una medida de la actividad tiende a disminuir. Además, se pone en evidencia que el comportamiento del grupo de DMSO al 25 % es similar al grupo de control, esto indica que la primera concentración resulta poca efectiva, llegando inclusive a estimular ligeramente a la colonia, aunque a medida que aumentamos la concentración, la caída del nivel de actividad comienza a acelerar más rápido. En cuanto a los datos obtenidos de la matriz de co-ocurrencia, se demostró que algunos



descriptores son especialmente efectivos para diferenciar biopelículas con diferentes concentraciones de DMSO, mostrando una clara distinción con los pozos vacíos, tal es el caso del descriptor de la energía.

Respecto a los valores de ruido y DMSO al 60% que se salen de la tendencia marcada por los demás grupos estudiados, generando una caída o una subida más acelerada de lo esperado, aún no se tiene una explicación clara de lo que pudo haber ocurrido. Sin embargo, en primera instancia esto puede atribuirse al ruido que pudo haber influido al momento de realizar la captura de las imágenes de speckle. La similitud de los datos antes y después del análisis ANOVA, para todos los casos, confirma la consistencia y la fiabilidad de los resultados, proporcionando así un respaldo adicional a la validez de las técnicas de speckle utilizadas en este estudio.

De los resultados obtenidos, podemos validar el potencial de un sistema LSI para la captura y análisis de imágenes de speckle como una alternativa viable para evaluar la actividad biológica de colonias de *C. tropicalis*. El presente estudio contribuye a la comprensión del comportamiento de la actividad en este tipo de hongos o biopelícula mediante la implementación de algoritmos de procesamiento, sin la necesidad de requerir un agente que es costoso y tóxico. Finalmente, considerando los resultados de esta investigación se sugiere que estos algoritmos podrían ser aplicables a diversos microorganismos.



# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. Y. Ann Chai, D. W. Denning, and P. Warn, «Candida tropicalis in human disease» *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 36, n° 4, pp. 282-298, 2010.
- [2] H. Y. Yap, K. M. Kwok, C. D. Gomersall, S. C. Fung, T. C. Lam, P. N. Leung, and G. M. Joynt, «Epidemiology and outcome of Candida bloodstream infection in an intensive care unit in Hong Kong» *Hong Kong Medical Journal*, vol. 15, n° 4, p. 255, 2009.
- [3] D. L. Zuza-Alves, W. P. Silva-Rocha, and G. M. Chaves, «An update on Candida tropicalis based on basic and clinical approaches» *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, p. 1927, 2017.
- [4] D. F. A. Arrebola, L. Fernández, and D. Sánchez, «Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad» *Revista Toxicológica en Línea*, pp. 40-53, 2003.
- [5] G. F. Gallegos-Hernández, «Ensayos colorimétricos para la detección de citotoxicidad» *Vidsupra Vison Científica*, vol. 10, pp. 1-4, 2018.
- [6] J. Hecht, «Short history of laser development» *Optical Engineering*, vol. 49, n° 9, pp. 091002-1–091002-2, 2010.
- [7] J. D. Rigden and E. I. Gordon, «Granularity of scattered optical maser light» *Proceedings of the Institute of Radio Engineers*, vol. 50, n° 11, pp. 2367-2368, 1962.
- [8] A. Oulamara, G. Tribillon, and J. Duvernoy, «Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle» *Journal of Modern Optics*, vol. 36, n° 2, pp. 165-179, 1989.
- [9] J. D. Briers, «Some applications of holographic interferometry and speckle correlation techniques to the study of plant growth and physiology» Ph.D. dissertation, Univ. of London, London, UK, 1975.
- [10] J. D. Briers, «Wavelength dependence of intensity fluctuations in laser speckle patterns from biological specimens» *Optics Communications*, vol. 13, n° 3, pp. 324-326, 1975.
- [11] H. J. Rabal, R. A. Arizaga, N. L. Cap, M. Trivi, G. Romero, and E. Alanis, «Transient phenomena analysis using dynamic speckle patterns» *Optical Engineering*, vol. 35, n° 1, pp. 57-62, 1996.

- [12] J. D. Briers, «Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging» *Physiological Measurement*, vol. 22, n° 4, p. R35, 2001.
- [13] R. Jones and C. Wykes, «Holographic and Speckle Interferometry» n° 6. Cambridge University Press, 1989.
- [14] J. D. Briers, «Speckle fluctuations and biomedical optics: implications and applications» *Optical Engineering*, vol. 32, n° 2, pp. 277-283, 1993.
- [15] P. Memmolo, G. Arena, G. Fatigati, M. Grilli, M. Paturzo, L. Pezzati, and P. Ferraro, «Automatic frames extraction and visualization from noisy fringe sequences for data recovering in a portable digital speckle pattern interferometer for NDI» *Journal of Display Technology*, vol. 11, n° 5, pp. 417-422, 2015.
- [16] R. A. Braga, I. M. Dal Fabbro, F. M. Borem, G. Rabelo, R. Arizaga, H. J. Rabal, and M. Trivi, «Assessment of seed viability by laser speckle techniques» *Biosystems Engineering*, vol. 86, n° 3, pp. 287-294, 2003.
- [17] A. K. Dunn, H. Bolay, M. A. Moskowitz, and D. A. Boas, «Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle» *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 21, n° 3, pp. 195-201, 2001.
- [18] R. Rodríguez-Vera, J. A. Rayas, A. Martínez, A. Dávila, and J. L. Marroquín, «Algunas aplicaciones industriales de la interferometría electrónica de patrones de moteado» in *Simposio de Metrología, CENAM, Querétaro*, 2001.
- [19] F. M. Sánchez-Arévalo et al., «Use of time history speckle pattern and pulsed photoacoustic techniques to detect the self-accommodating transformation in a Cu–Al–Ni shape memory alloy» *Mater. Charact.*, vol. 61, n° 5, pp. 518-524, 2010.
- [20] V. F. Rad, M. Panahi, R. Jamali, A. Darudi, and A. R. Moradi, «Non-invasive in situ monitoring of bone scaffold activity by speckle pattern analysis» *Biomedical Optics Express*, vol. 11, n° 11, pp. 6324-6336, 2020.
- [21] E. Blotta, V. Ballarín, M. Brun, and H. Rabal, «Evaluation of speckle-interferometry descriptors to measuring drying-of-coatings» *Signal Processing*, vol. 91, n° 10, pp. 2395-2403, 2011.
- [22] P. D. Minz and A. K. Nirala, «Intensity based algorithms for biospeckle analysis» *Optik*, vol. 125, n° 14, pp. 3633-3636, 2014.
- [23] D. A. Boas and A. K. Dunn, «Laser speckle contrast imaging in biomedical optics» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, n° 1, pp. 011109-1–011109-2, 2010.
- [24] M. R. Trivi, H. J. Rabal, E. E. Grumel, N. L. Cap, and L. Buffarini, «Técnicas de speckle dinámico: desarrollos y perspectivas» presented at the IV Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería, La Plata, 2017.
- [25] J. W. Goodman, «Some fundamental properties of speckle» *JOSA*, vol. 66, n° 11, pp. 1145-1150, 1976.

- [26] A. T. Forrester, «On coherence properties of light waves» *American Journal of Physics*, vol. 24, n° 4, pp. 192-196, 1956.
- [27] J. C. Dainty, A. E. Ennos, M. Francon, J. W. Goodman, T. S. McKechnie, and G. Parry, «Laser speckle and related phenomena» in J. C. Dainty, Ed., *Topics in Applied Physics*, vol. 1, pp. 1-280, Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 1975.
- [28] K. J. Gåsvik, «Optical Metrology» John Wiley & Sons, 2003.
- [29] Parra Michel, «Interferometría Electrónica de moteado y desplazamiento de fase en eventos dinámicos para el análisis de la deformación uniaxial en probetas metálicas soldadas» Tesis de Maestría en Ciencias (Óptica), Centro de Investigaciones en Óptica, A.C., León, Guanajuato, 2006.
- [30] R. Restrepo Aguilar, «Modelo simple para el procesamiento digital de un patrón de speckle» Escuela de Física, Univ. de Antioquía, Medellín, Colombia, 1991.
- [31] J. D. Briers and S. Webster, «Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 1, n° 2, pp. 174-179, 1996.
- [32] J. A. Arias Cruz, «Análisis multivariante de imágenes de speckle para visualización de vasos sanguíneos» Tesis de Doctorado, Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, 2020.
- [33] P. G. Vaz, A. Humeau-Heurtier, E. Figueiras, C. Correia, and J. Cardoso, «Laser speckle imaging to monitor microvascular blood flow: a review» *IEEE Rev. Biomed. Eng.*, vol. 9, pp. 106-120, 2016.
- [34] R. Arizaga, «Methods of Dynamic Speckle Analysis » Taylor & Francis Group, 2009.
- [35] D. Gabor, «Laser speckle and its elimination» *IBM J. Res. Dev.*, vol. 14, n° 5, pp. 509-514, Sep. 1970, doi: 10.1147/rd.145.0509.
- [36] M. Kurashige, K. Ishida, and Y. Ohyagi, «Classification of Subjective Speckle for Evaluation of Laser Display» in *SID Symposium Digest of Technical Papers*, vol. 45, n° 1, pp. 419-422, Jun. 2014.
- [37] I. Yamaguchi and S. Noh, «Deformation measurement by 2D speckle correlation» in *Proc. SPIE*, vol. 1756, *Interferometry: Applications*, 15 Feb. 1993, doi: 10.1117/12.140792.
- [38] I. Yamaguchi and K. Kobayashi, «Material testing by the laser speckle strain gauge» in *Second International Conference on Photomechanics and Speckle Metrology*, vol. 1554, p. 240, SPIE, Dec. 1991.
- [39] R. Mallya, A. K. Uchil, S. B. Shenoy, and A. Pai, «Application of digital image correlation in aerospace engineering: structural health monitoring of aircraft components » *Aerospace Systems*, pp. 1-13, 2024.

- [40] I. I. Balega, Y. Y. Balega, K. H. Hofmann, A. F. Maksimov, E. A. Pluzhnik, D. Schertl, and G. Weigelt, «Speckle interferometry of nearby multiple stars» *Astron. Astrophys.*, vol. 385, n° 1, pp. 87-93, 2002.
- [41] A. Tokovinin, «Ten years of speckle interferometry at SOAR» *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, vol. 130, n° 985, p. 035002, 2018.
- [42] J. M. Beckers, «Differential Speckle Interferometry, a New Tool for Double Star Research» in *International Astronomical Union Colloquium*, vol. 62, pp. 165-175, Cambridge University Press, May 1983.
- [43] P. Kong, Y. L. Zhou, Y. Y. Xie, and M. Jiang, «A novel highly efficient algorithm for laser speckle imaging» *Optik*, vol. 127, n° 15, pp. 5852-5859, 2016.
- [44] A. K. Dunn, «Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow» *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 40, pp. 367-377, 2012.
- [45] M. Chen et al., «Laser speckle contrast imaging of blood flow in the deep brain using microendoscopy» *Opt. Lett.*, vol. 43, n° 22, pp. 5627-5630, 2018.
- [46] J. R. M. Vilet, «Procesamiento digital de imágenes» Facultad de Ingeniería UASLP, 2005. [Online]. Available: [http://read.pudn.com/downloads159/ebook/711796/Procesamiento\\_Digital\\_de\\_Imagenes.pdf](http://read.pudn.com/downloads159/ebook/711796/Procesamiento_Digital_de_Imagenes.pdf). [Accessed: Sep. 22, 2012].
- [47] R. Q. Juan and C. M. Mario, «Redes neuronales artificiales para el procesamiento de imágenes, una revisión de la última década» *RIEE & C*, vol. 9, n° 1, pp. 7-16, 2011.
- [48] E. L. Pencue-Fierro and J. León-Téllez, «Detección y clasificación de defectos en frutas mediante el procesamiento digital de imágenes» *Revista Colombiana de Física*, vol. 2003, n° 1, pp. 58-65, 2003.
- [49] A. D. Torres, «Procesamiento digital de imágenes» *Perfiles Educativos*, vol. 72, 1996.
- [50] R. A. Braga, W. S. Silva, T. Sáfadi, and C. M. B. Nobre, «Time history speckle pattern under statistical view» *Opt. Commun.*, vol. 281, n° 9, pp. 2443-2448, 2008.
- [51] R. M. Haralick, K. Shanmugam, and I. H. Dinstein, «Textural features for image classification» *IEEE Trans. Syst., Man, Cybern.*, vol. 6, pp. 610-621, 1973.
- [52] A. C. Pinto Leal, «Segmentación de imágenes por textura», 2006.
- [53] J. Ríos-Díaz, J. J. Martínez-Payá, and M. E. del Baño Aledo, «El análisis textural mediante las matrices de co-ocurrencia (GLCM) sobre imagen ecográfica del tendón rotuliano es de utilidad para la detección cambios histológicos tras un entrenamiento con plataforma de vibración» *Cultura, Ciencia y Deporte*, pp. 91-102, 2009.

- [54] M. Presutti, «La matriz de co-ocurrencia en la clasificación multiespectral: tutorial para la enseñanza de medidas texturales en cursos de grado universitario» in *4<sup>a</sup> Jornada de Educação em Sensoriamento Remoto no Âmbito do Mercosul*, pp. 1-9, 2004.
- [55] J. S. B. Valencia and A. R. Martínez, «Análisis de textura en panes usando la matriz de coocurrencia» *Rev. Politécnica*, vol. 6, n° 10, pp. 74-80, 2010.
- [56] R. A. Arizaga, N. L. Cap, H. J. Rabal, and M. Trivi, «Display of local activity using dynamical speckle patterns» *Opt. Eng.*, vol. 41, pp. 287-294, 2002.
- [57] H. J. Rabal, «Activity Images: Generalized Differences, Fujii's, LASCA, and Related Methods» in *Dynamic Laser Speckle and Applications*, pp. 115-136, CRC Press, 2018.
- [58] F. S. de Menezes, P. L. Freitas, G. F. Rabelo, and R. A. Braga, «Alternative measures for biospeckle image analysis» *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 29, n° 8, pp. 1648-1658, 2012.
- [59] J. Galvao et al., «Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO» *FASEB J.*, vol. 28, n° 3, pp. 1317-1330, 2014.

# Apéndice A

## Características del sistema de estudio.

