

TÉCNICAS DE TINCIÓN Y CORRECCIÓN DIGITAL PARA PREPARACIONES MICROSCÓPICAS EN BIOLOGÍA Y ENTOMOLOGÍA

Rafael Magro

C/ Cuatro Calles nº 13. Castrillo-Tejeriego. 47329 Valladolid, España – ephesia@inicia.es

Resumen: Se exponen diferentes técnicas de tinción digital para preparaciones microscópicas en biología, con especial atención a la disciplina entomológica. Se enumeran los campos de aplicación y la emulación digital de las diferentes técnicas químicas, detallando el uso de efectos de enfoque, desenfocado, relieve, color, etc. Se plantea el uso de filtros universales de tratamiento de imágenes por medio de matrices bidimensionales, mapas de degradado, curvas y discriminación de canales de color en el espacio RGB. Estos sistemas proporcionan un número infinito de efectos digitales y se describen aquí 150 fórmulas. Esto presupone el uso de algoritmos y la aplicación de procedimientos matemáticos basados en las reglas de convolución. Se incluyen una serie de normas y protocolos en lo referente a nomenclatura de los efectos utilizados. Se reúnen instrucciones someras para el trabajo con programas comerciales, así como para la programación de un aplicativo por medio de pseudocódigo. Se propone un reglamento deontológico para la aplicación correcta de las pautas de actuación en las manipulaciones digitales.

Palabras clave: Técnicas digitales, tinción, entomología, biología.

Staining techniques and digital correction for microscopic preparations in biology and entomology

Abstract: Different digital staining techniques for microscopic preparations are set out, with special emphasis on entomology. Fields of application and digital emulation of the various chemical techniques are listed, with details of the effects of focus, un-focus, relief, colour, etc. The use of universal filters is explained for the treatment of images through bidimensional matrices, degradation maps, curves and colour channels in RGB space. These systems provide an infinite number of digital effects, and here 150 formulae are described, requiring the use of algorithms and the application of mathematical procedures based on convolution rules. They include a series of norms and protocols regarding the nomenclature of the effects used. Summarised instructions are assembled for work with commercial programs as well as software programming via a pseudo-code. Ethical rules are proposed for the correct application of performance guidelines in digital manipulation.

Key words: Digital techniques, staining, entomology, biology.

INTRODUCCIÓN

En el año 2002 publicamos un trabajo sobre técnicas de preparación microscópica (véase Magro, 2002: 205-216). En el mismo, se expusieron diferentes maneras de realizar tinciones, utilizando productos químicos con poder cromógeno en consonancia con el tipo de estructura a tratar. Como quiera que, en el decurso de los años, la tecnología aplicada a los computadores personales ha evolucionado hasta límites insospechados, hoy en día es factible realizar complicados cálculos de matemática binaria con ordenadores de bajo coste. Así mismo y correlativamente al avance del hardware, también se ha producido una gran evolución del software. Recordemos que, precisamente, es éste el que proporciona la efectividad, la 'inteligencia', el medio de comunicación interpretado y aplicado a los diferentes dispositivos de interfaz humana. Dicho de otro modo, hace inteligible la gran maraña binaria de fluctuación de datos gestionada por memorias, microprocesadores y raudales de silicio. Es el aplicativo, la herramienta que por medio de los periféricos nos proporciona la posibilidad de interactuar con los circuitos de la máquina, una de las partes más importantes del sistema. Hoy en día estamos en disposición de utilizar en nuestros domicilios, máquinas y grandes sistemas para realizar cálculos que, tan sólo hace cinco años, ocupaban grades salas. Paralelamente, también podemos usar de manera cotidiana, las aplicaciones diseñadas específicamente para esta tecnología en multitud de menesteres. En el mencionado trabajo de técnicas de tinción (véase Magro, 2002), se empleaban productos químicos para teñir las

estructuras de diferentes partes anatómicas. Ahora, gracias a la impresionante evolución del binomio hardware-software, es posible emular de manera digital dichos efectos cromógenos.

I. Campos de aplicación

En este trabajo exponemos diferentes métodos de tinción y corrección digital. Durante la consecución del mismo, nos circunscribimos específicamente a tres ámbitos independientemente si el material es analógico o digital. En el primero, disponemos de material fotográfico de preparaciones microscópicas, en cualquier soporte pero con defectos. En el segundo, partimos de fotografías de preparaciones microscópicas en las que se aplicó tinción química y se desea mejorar, resaltar, o colorear ciertas partes. En el tercero, imágenes microscópicas sin ningún tratamiento químico de tinción, pero con suficiente contraste. Para todos ellos se describen los rudimentos y las manipulaciones necesarias para aplicar correctamente estas técnicas y efectuar sin dificultad las operaciones. Para la perfecta comprensión de texto, se da por entendido que el lector está familiarizado con las técnicas necesarias para la obtención de instantáneas, nociones básicas de digitalización, imagen de mapa y vector, etc.; caso contrario se sugiere la lectura de artículos o libros que a tal efecto están publicados, al no ser este tema objeto del presente manuscrito. Se requieren, igualmente unos mínimos conocimientos de matemáticas aplicadas a la programación básica.

II. Emulación digital de tinciones con químicos

Considerando que partimos de una imagen digital o una analógica vectorizada, es posible manipular la información del contenido del archivo para conseguir efectos similares a la tinción por medios químicos. Ahora bien, es innegable que, para procesar coherentemente la imagen de una determinada preparación microscópica, es necesario conocer con anterioridad qué efectos producirían determinadas sustancias químicas en las estructuras tratadas. ¿Cómo sabemos, por ejemplo, qué parte del núcleo de una célula se va a teñir en contacto con una sustancia con poder cromógeno en una determinada estructura?, ¿Qué parte de un esclerito absorberá más fucsina o vigencial? ¿La más quitinosa? ¿La menos esclerosada? (véase, Martínez, 2002:187-195 y/ o Magro, 2002, y bibliografía citada en los mismos). Para ilustrar este problema, de manera más contundente y comprensible, imaginemos que efectuamos una fotografía con una cámara de análisis térmico al cuerpo de un invertebrado situado en la arena del desierto. Se necesitan diferentes recursos técnicos y codificaciones, a saber: la propia cámara (cuerpo, electrónica), el medio-soporte (CCD, memoria), el lenguaje (binario), la codificación, análisis de los datos y la parametrización. Estipulemos que las partes se colorearan de mayor a menor temperatura en intervalos con una resolución de 0,2°. La temperatura más alta color rojo y sucesivamente, naranja, amarillo, verde, azul y negro hasta llegar a la más fría. De esta manera, obtendríamos una imagen con un explícito mapa de temperaturas del susodicho invertebrado. Si realizamos una fotografía del mismo, con una cámara digital convencional, no obtendremos ninguna información de la temperatura. Por lo tanto, si tratamos digitalmente el color de esta imagen, el valor muestreado no se establecería correctamente, es decir, no sería fehaciente a una realidad física del valor en grados. Ahora bien, por medio del aplicativo, es posible realizar un algoritmo que, basándose en diferentes cálculos emule el resultado. Por ejemplo, la profundidad de campo: cuanto más cerca estén las partes del invertebrado a la arena, más cálidas serán. La propiedad de absorción o reflejo de los rayos infrarrojos por los colores: las partes blancas del espécimen estarán más frías que las partes negras. Las partes mates, más calientes y las brillantes, más frías. Lo mismo sucede con las zonas planas y las esféricas, su función orgánica, el índice de absorción de calor de los colores, etc. Cuanto más específica y más preciosa sea la rutina del citado algoritmo la emulación es más perfecta y el resultado más coherente. Afortunadamente, algoritmos de este tipo ya han sido implementados y se denominan 'Mapas de calor'. En la práctica, interactuaremos con el aplicativo y tras la parametrización y la asignación colorística, éste efectuará los cálculos necesarios. La tinción digital, es especialmente útil cuando lo que se persigue es resaltar o ver ciertas estructuras de manera más clara a efectos de morfometría, taxonomía, etc. Por otra parte, la gran mayoría de las tinciones químicas que se aplican a estructuras microscópicas en entomología, están encaminadas a conseguir resultados en este sentido.

III. Tinción digital versus tinción química

En numerosas ramas de la ciencia y en multitud de disciplinas de la investigación científica, hace décadas que se están utilizando los efectos digitales para la mejor comprensión y el uso razonado de imágenes. Entre éstas destaca la medicina, con monumentales avances en técnicas digitales aplicadas en diagnóstico y radiodiagnóstico por imagen, la astronomía, la física, la química, meteorología, etc. En cualquier caso, centrándonos en la entomología, podríamos inquirir la si-

guiente cuestión, ¿cuándo se debe o puede utilizar tinción digital y cuándo química?

Tinción digital

1. Cuando se necesita un contraste mayor al proporcionado por técnicas químicas entre diferentes partes anatómicas.
2. Cuando no existen medios químicos para conseguir cierto efecto.
3. Cuando no se pueden manipular químicamente las preparaciones microscópicas.
4. Cuando no se deben, o no se pueden, desmontar preparaciones microscópicas realizadas con anterioridad.
5. Cuando por razones de valor histórico y/ o científico se deben conservar las preparaciones tal y como se concibieron.
6. Cuando pedagógicamente, o por taxonomía, es necesario poner de relieve ciertas estructuras para su mejor comprensión.
7. Cuando no existe tal preparación, pero si una fotografía, daguerrotipo, dibujo, frame, etc.
8. Cuando el soporte fotográfico presenta defectos irresolubles química o analógicamente.
9. Cuando la fotografía está borrosa o deteriorada.
10. Cuando la imagen procede de una fuente 3D.
11. Cuando es imposible acceder a medios de procesado y análisis que sólo poseen ciertos departamentos.
12. Cuando el proceso químico es demasiado costoso y el fin no justifica los medios.
13. Cuando el efecto es propio del mundo digital y no es posible reproducirlo de otro modo.
14. Cuando la tinción química es totalmente irreversible y se puede realizar por medio de efectos digitales.
15. Cuando el protocolo químico es extremadamente complejo e implica un porcentaje muy alto de destrucción del material original.
16. Cuando las sustancias químicas son muy contaminantes y/ o no son biodegradables.

Tinción química

1. Cuando la sustancia química provoca un efecto peculiar en relación a diferentes estructuras y no existe algoritmo o éste no posee una emulación perfecta.
2. Cuando la sustancia química colorea ciertas partes por absorción funcional del órgano o de la estructura.
3. Cuando la tinción se efectúa directamente sobre organismos vivos.
4. Cuando en coloraciones vitales se desean obtener instantáneas efímeras del efecto químico.
5. Cuando la técnica utilizada sólo subsiste un tiempo determinado y se necesita inmediatez.
6. Cuando se necesita exclusivamente un valor parametral y/ o numérico.
7. Cuando el efecto es propio de la razón química y no es posible reproducirlo de otro modo.
8. Cuando la preparación es totalmente transparente y/ o sólo se puede observar con contraste de fase u otros medios ópticos.
9. Cuando el método empleado supone cierto grado de reversibilidad.
10. Cuando se utilizan medios químicos que ponen de relieve ciertas enfermedades.
11. Cuando las sustancias químicas empleadas no son contaminantes y son biodegradables.

IV. Introducción hacia un primer intento de normalización de las técnicas de tinción digital

En el ámbito de la informática existen numerosas aplicaciones de diseño y retoque fotográfico. Con todas ellas es factible realizar cambios cromáticos y correcciones de imagen. No sólo en cuestión de aplicativos, también existe un inmenso surtido de pequeñas implementaciones (complementos, plugin) para grandes y conocidos programas. De esta manera, podemos utilizar un determinado aplicativo y enriquecerlo o completarlo con una infinidad de filtros. Igualmente, se da el caso de que, estas aplicaciones y sus complementos, son muy susceptibles de comercialización por cuestiones referentes a la encarnizada competencia, los rigores de las leyes del mercado y la venta del producto. Esta situación se complica ostensiblemente por otro factor: las modas. Así pues, un habitante de la antípoda puede realizar una tinción digital con un determinado programa y un complemento concreto y conseguir un resultado excelente. Mientras tanto uno de occidente, es muy posible que, en el mejor de los casos, no tenga disponible ni la versión ni el mismo complemento y aunque sea factible conseguir los mismos resultados con otro programa, la experiencia del primero no es aplicable a la del segundo. Dicho de otro modo y en forma de metáfora, si exponemos y aplicamos una determinada fórmula química en la antípoda, ésta no vale para occidente. En este trabajo no exponemos el método más rápido ni el más novedoso desde el punto de vista del software, desarrollamos técnicas de tinción digital encaminadas a la mayor efectividad y normalización. Con muy pocos conocimientos de informática y siguiendo ciertas directrices, nuestros efectos y tinciones digitales pueden ser totalmente compatibles e idénticos en diferentes plataformas, es decir, poseer cierto grado de homologación. En cualquier caso, aplicamos la premisa; 'debe ser posible y realizable en distintas máquinas e independiente del software'. Esto es factible gracias al uso de cuatro técnicas:

- Las matrices digitales.
- Los mapas de degradado.
- Las curvas.
- La rotación de mapas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En lo referente a requerimientos del sistema informático, pretendemos que sea suficiente un procesador Pentium I/II o similar, con un mínimo de 248 RAM y tarjeta gráfica integrada o básica. No todo el mundo tiene máquinas de última generación. No obstante con un sistema más actualizado los filtros se aplicarán a mayor velocidad. El sistema operativo puede ser cualquiera a partir W.98, en un entorno Mac o Linux. Se requiere cámara de fotos analógica con un escáner o una cámara digital con CCD de al menos 8 mega píxeles. Microscopio, estereoscopio y los adaptadores o lentes de Barlow para las cámaras, tarjetas de memoria, carretes, etc. Si el CCD de la cámara digital posee al menos 12 mega píxeles y el cuerpo porta un objetivo ultra-macro óptico (no por interpolación), no siendo la preparación microscópica menor de 1 mm y además se posee cierta pericia, se pueden fotografiar las preparaciones sin necesidad de microscopio y luego aumentarlas sin demasiada pérdida de calidad. En nuestro caso, también obtenemos las imágenes a partir de un CCD adaptado a la lupa y éste al sistema informático. Para la gestión de fotografías y capturas de vídeo utilizamos el aplicativo AmCap.

Para aplicar filtros, el primer paso consiste en realizar la preparación, utilizando técnicas de tinción clásicas o no. El

medio de inclusión debe de ser lo más transparente posible, por ejemplo DMHF (Dimetil-hidantoína-formaldeído). De lo contrario, es preferible fotografiar las preparaciones en inmersión, con agua destilada o deshidratadas, en Silicex.

Una vez obtenida la instantánea, si esta procede de una fuente analógica, revelar y escanear, como poco a 700 pp. Si por el contrario, procede de una cámara digital, se requiere volcar el contenido de la tarjeta de memoria en el PC. En cualquiera de los dos casos, es recomendable optimizar la imagen para el tamaño que se necesita, por ejemplo, si es para una publicación y la mancha de color no va a superar 100x100 mm, es inútil trabajar con una imagen mucho más grande. Si así lo hacemos, en contra de lo que pudiera parecer, perderemos resolución; resumiendo: el tamaño del lienzo de la imagen original tiene que ser más o menos el mismo que el de la imagen impresa.

Es muy importante la calibración del monitor, es decir, que lo que observamos en la pantalla posee la misma tonalidad, contraste, brillo y saturación que la imagen de la preparación que observamos bajo el microscopio. Es recomendable asignar al sistema gráfico dos perfiles de color, uno por si se desea imprimir y otro para la visualización en el monitor. Desgraciadamente los monitores CRT, están desapareciendo, éstos son mucho más efectivos y más fáciles de graduar que los tan afamados LCD. Para la calibración de los mismos se puede utilizar el software proporcionado por el periférico, también resulta útil tener una guía fórmula-color de Pantone.

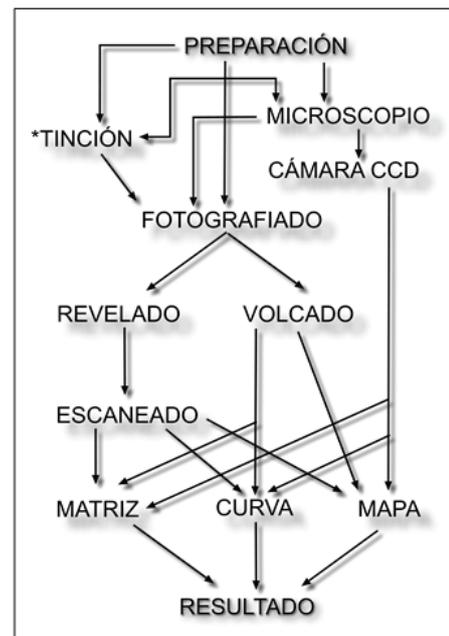


Fig. 1. Diagrama de procesos de operaciones preliminares (* optativo).

I. Programación, entomología y convenciones

Casi todos los entomólogos utilizamos una gran cantidad de información. La mayoría nos vemos abocados a utilizar un sistema relacional de bases y tablas de datos. Las plataformas avanzadas para el desarrollo y gestión de éstos poseen un lenguaje de programación. Los entornos suelen tener un interfaz de usuario que nos permite, por ejemplo, la creación de formularios de entrada, trabajar con un editor que admite varios lenguajes, con objetos, controles, constantes, variables, clases, herencia, polimorfismo, encapsulación, etc. Por este motivo y con el tiempo, se hace necesario que nuestras consultas, rutinas y formularios, sean independien-

tes del programa con el que fueron concebidas, es decir: compiladas. Esto da origen al aplicativo. Por lo tanto, muchos poseemos, de facto, una plataforma a la que podemos añadir nuevos módulos, clases virtuales, nuevas propiedades a las clases establecidas, etc. En consecuencia, tras la lectura de este artículo se puede optar por realizarse uno mismo el software (y enriquecer nuestra plataforma) o utilizar cualquier programa para retoque fotográfico que posea gestión de matrices, curvas y mapas de degradado, por ejemplo Photo Shop, Paint Shop Pro, Corel Photo Paint, Gimp, etc. (véase Mateos, 2008:10). Nosotros hemos programado, para este trabajo, el MEIM (Módulo de edición de imágenes microscópicas) para Ephesia Earth V.2 en plataforma VB y C#.Net. Se han comprobado matrices, mapas de degradado y curvas entre los siguientes programas: PhotoShop V.CS3, Paint Shop pro V.9, Corel Photo Paint V.11 y Gimp V2.2. Existen multitud de lenguajes de programación, algunos muy parecidos y otros radicalmente diferentes. Creemos que en un artículo de estas características no debemos decantarnos por uno u otro, porque pretendemos, desde el punto de vista de la lógica de la programación, exponer los conceptos de la manera más ecléctica. Es por ello, que incluimos varios anexos con pseudo código. El lector no necesita profundos conocimientos sobre algoritmos, pero sí unos muy básicos conceptos de estructura y matemática aplicada a la programación. Por ejemplo: saber que es una variable, una función, una matriz, un bucle lógico. A lo largo de la exposición y en los anexos, empleamos ciertas normas y convenciones más o menos universales para pseudo código, que enumeramos a continuación:

- Las rutinas anidadas se escriben con sangría francesa, por ejemplo:

```

MiVariableA = "Me gustan los lepidópteros"
MiVariableB = [EntradaUsuario].[propiedad]
  If MiVariableB <> ""
    If MiVariableB = "No"
      [SalidaTexto] = "Me gustan los dípteros"
    Else
      [SalidaTexto] = MiVariableA
    endif
  endif
endif

```

- Excepto el texto de entrada o salida de usuario, el resto no se acentúa.
- Los nombres compuestos se escriben enlazados y con la primera letra en mayúsculas (llamada coloquialmente escritura de camello).
- Las sentencias de apertura y cierre ({}) se omiten en el pseudo código al no ser comunes a todos los lenguajes.
- Las secuencias de control de flujo universales, como If/ End If, Do/ End do, For/ Next, etc., se escriben tal cual.
- Los nombres personalizados de las variables se anotan el letra cursiva.
- Las funciones, en negrita.
- Los objetos, las clases, las propiedades (separadas por un punto) y los controles, en negrita y con corchetes, por ejemplo:

```

Principio rutina()
  MiVariableA = "Soy lepidóptero."
  MiVariableB = ramaDeEstudio()
  MiVariableC = MiVariableA & " " & MiVariableB
  [Control].[propiedad] = MiVariableC
Fin rutina

Funcion ramaDeEstudio()
  [retorno] = "Estudio pirálidos."
Fin funcion

```

- Al no ser universales, se omiten las declaraciones de tipos. Cada cual establecerá éstas dependiendo de su entorno.
- Se utilizan los operadores matemáticos más comunes: + (suma), - (resta), * (multiplicación), / (división), % (porcentaje), = (igual), Mod (módulo), etc.
- El operador diferente es (<>). Retorno de carro (_ , guión bajo), comentario (//) y salto continuo (:).
- Para las sentencias de concatenación se utiliza el símbolo &.
- En las iteraciones de los bucles, se utiliza la carga de la variable más el valor. Aunque es más limpio y elegante el sistema de notación, *NVariable++*, no es compatible con todos los lenguajes:

```

  NombVariable = 0
  Do (NombVariable <= 69)
    NombVariable = NombVariable + 1
  End do

  Do (NombVariable <= 69)
    NombVariable = NombVariable + 1
  End do

```

- Los valores numéricos se anotan sin comillas, al contrario que los de texto, que se escriben con comillas dobles.

II. Formatos del archivo de imagen

Básicamente existen dos tipos de categorías gráficas principales: la imagen vectorial y la imagen de mapa. La imagen vectorial se genera por medio de comandos y algoritmos matemáticos, estos datos se almacenan como fórmulas. Esto significa que, si vectorizamos una imagen de mapa, teóricamente, ésta podría ampliarse hasta el infinito. En la práctica, esto sólo sucede con los dibujos de línea. La categoría gráfica de imágenes de mapa de bits no se pueden ampliar. Esto ocurre porque la información (los puntos de color) se almacena en una matriz de tamaño indeterminado que se establece a partir de la dimensión del propio archivo gráfico. En consecuencia, si se aumenta la imagen pierde resolución. Un archivo gráfico de mapa puede tener diferentes formatos, entre otros, AI, BMP, DIB, EPS, GIF, JPEG, PNG, PSD, TIFF, etc. Un aspecto importante de todos los archivos gráficos es el ratio de compresión. La cantidad de información redundante hace que las imágenes se puedan comprimir con cierta facilidad. Uno de los tipos de compresión más utilizado es el RLE (Run Length Encoding). El tipo bmp es un formato de mapa de bits estándar muy utilizado en sistemas Windows y en OS/2. Éste contempla profundidades de color de 1, 4, 8, 16, 24 y 32 bits. Las imágenes de 1 a 4 bits son en blanco y negro, las que superan los 8 bits pueden tener 256 colores o más. Las de 24 bits utilizan color real. El formato dib (Device independent Bitmap) es muy similar, pero es independiente del dispositivo, es decir, que el archivo de imagen no está vinculado a un periférico, por ejemplo el monitor. Con respecto al formato jpeg (Join Photographic Experts Group), soporta color real y es uno de los formatos más usados. Aunque se pueda conseguir un alto ratio de compresión, las variables provocan una pequeña pérdida de información. El formato gif (Graphics Interchange Format) es uno de los estándares de archivos gráficos más estables, pero sólo permite imágenes de 256 colores. En este trabajo se han utilizado imágenes en bmp, gif, jpeg y png. Estos formatos se almacenan en matrices de puntos de color. Por lo tanto, si somos capaces de realizar operaciones matemáticas sencillas con los valores de los píxeles de la imagen, podremos modificar su apariencia.

III. Matrices bidimensionales y color

Los píxeles de una imagen están representados en una matriz bidimensional de enteros por uno o más bits. En una imagen B/N se representa un píxel por bit. En las que poseen 256 colores cada píxel por un octeto. En los gráficos con mayor número de colores se usan tres octetos por píxel, o lo que es lo mismo, uno por cada color básico en sistema RGB (rojo, verde y azul, 16.777.256 colores). Las imágenes conformadas por 256 colores también se denominan 'de paleta'. Cada píxel es un apuntador al color en la paleta del octeto. Aunque, teóricamente, sería posible mostrar imágenes de suficiente calidad en 256 colores, el algoritmo de procesamiento del archivo establece colores adicionales dependiendo del hardware. Por lo tanto, las imágenes de tres octetos TCI, son más fidedignas. De hecho, se denominan de 'color verdadero' (True Color Images). Una sencilla técnica de inversión de colores se podría programar calculando el color complementario. Para realizar esta operación restamos a 255 cada uno de los tres colores, $G = (0, 255, 0)$, [verde puro]; la operación es igual a $(255-0) (255-255) (255-0) = (255, 0, 255)$ que corresponde con el color magenta puro, que es el complementario del verde. Si realizamos la misma operación con los colores restantes (G, y B) e implementamos dos bucles que recorran la matriz bidimensional del archivo de imagen, sustituyendo los valores por sus complementarios, obtendremos el antagónico en color de la misma. De igual manera, partiendo de un negativo podremos obtener la imagen en positivo. En el anexo I se incluye el seudo código con doble bucle para insertar el contenido de un archivo de imagen en una matriz bidimensional. Utilizando el mismo tipo de algoritmo modificado se puede obtener la imagen en colores complementarios. Con ligeras variaciones de la rutina se puede lograr, partiendo de una preparación fotografiada en el microscopio con luz transmitida, una fotografía de emulación digital del microscopio de campo oscuro.

IV. Matrices, efectos de enfoque, desenfoco y convolución

Una imagen desenfocada presenta menor densidad en lo referente a cambios bruscos en sus píxeles y una enfocada lo contrario (fig. 2 y 3).

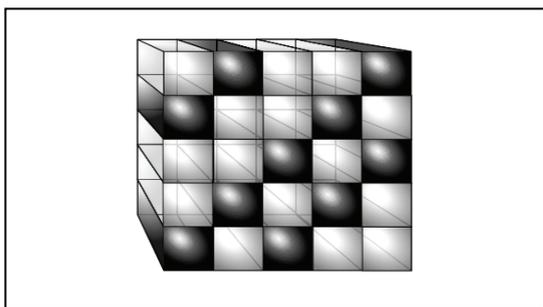


Fig. 2. Matriz de una imagen de 4 bits enfocada.

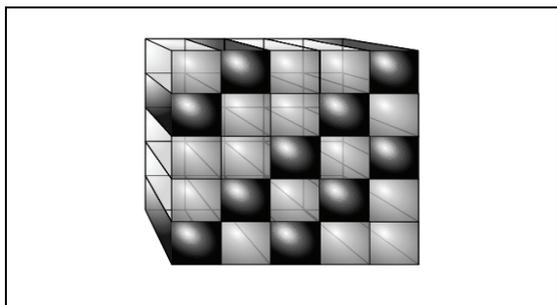


Fig. 3. Matriz de la imagen de 4 bits desenfocada.

Si reducimos las diferencias grandes entre los píxeles adyacentes la imagen se desenfocará. Si aumentamos los bordes entre píxeles contiguos la imagen se enfocará (fig. 4 y 5).

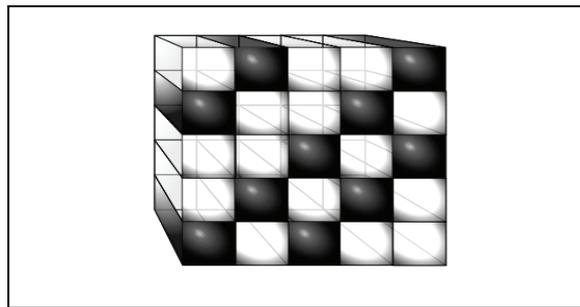


Fig. 4. Matriz de la imagen de la figura 2, más enfocada.

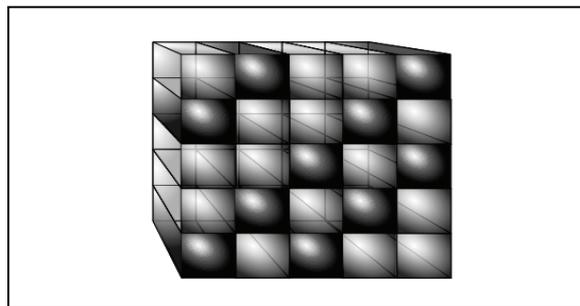


Fig. 5. Matriz de la imagen de la figura 3 más desenfocada.

Las operaciones matemáticas con las cuales a cada píxel se le reasigna un número según los valores de los píxeles circundantes, se llaman operaciones de convolución.

La matriz completa del archivo gráfico se debe descomponer en pequeñas matrices, normalmente esta operación se realiza en módulos de 3x3 (fig. 6) o 5x5 (fig. 7).

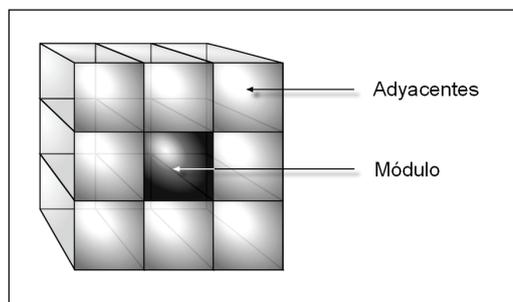


Fig. 6. Matriz de 3 x 3 con píxel objeto y adyacentes.

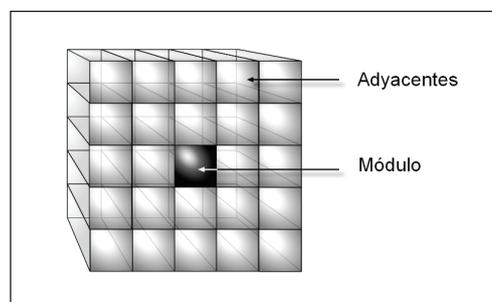


Fig. 7. Matriz de 5 x 5 con píxel objeto y adyacentes.

Las operaciones matemáticas se realizan explorando, por medio de bucles y recursividad, estos pequeños fragmentos. La programación recurrente consiste en una implementación de rutinas que se llaman así mismas, por ejemplo:

FuncionCuentaLepidopteros()

```
MivariableA= MivariableA-1
If MivariableA= 0
  [Salir]. FuncionCuentaLepidopteros()
endif
MivariableB= FuncionCuentaLepidopteros()
```

Fin funcion

La recursividad es muy útil pero es fácil, como en el ejemplo expuesto, que entremos en un bucle infinito. Se debe especificar a la función recurrente cuando debe terminar de llamarse así misma. La condición que hace que finalice, en este caso, es que (*MivariableA*) posea un valor de cero (para más información véase Palma *et al.*, 2003: 55). Los principios de la recursividad se pueden exponer con el siguiente sencillo ejemplo de cálculo factorial:

```
If MIFac = 0
  Factorial= 1
Else
  Factorial= Factorial (MIFac-1) * MIFac
End if
```

Para comprender mejor el algoritmo de desenfoque, imaginemos una matriz de 3x3. Partiendo de que el píxel central tiene, por ejemplo, un valor de 10 y los valores de los adyacentes, que son 8; 8, 9, 10, 12, 10, 11 y 9, la media del valor $(8 + 9 + 10 + 11 + 12 + 10 + 11 + 9 + 10) / 9 = 10$. Comprobamos que el píxel objeto es igual a la media de sus vecinos. Si el central tiene un valor de 20 la media será 11. Por lo tanto, obteniendo el resultado de la media del grupo adyacente y forzando el valor de los que sean muy diferentes, se obtendrá desenfoque. De esta manera, habremos aplicado la técnica matemática de convolución. En el anexo II se incluye el pseudo código para un algoritmo de desenfoque.

En cuanto al de enfoque, es más útil y su efecto también más sutil. Si dos píxeles vecinos están situados en una área plana de la imagen, la diferencia entre ellos no existe, o en cualquier caso será mínima, por lo tanto, se ignoran. Si la diferencia entre adyacentes es grande y significativa, sus valores se aumentan. El efecto que se produce, consiste en el aislamiento de las partes más monótonas, respecto de las más perfiladas. Si añadimos la diferencia del píxel objeto y adyacentes al píxel original y lo multiplicamos por un factor de enfoque, el píxel resultante tendrá mayor contraste en referencia a los adyacentes. El factor que se suele añadir no supera, casi nunca, el 50% de la fracción de la diferencia. De esta manera, se obtendrá una imagen más definida. Ahora bien, se podría pensar que, si aumentamos el factor, obtendríamos en cada barrido de la matriz, por medio del algoritmo, una imagen más nítida; craso error, el efecto que se produce es el blanqueamiento del píxel adyacente, de manera que, la imagen se distorsiona con molestos bordes blancos. De la misma manera, se podría pensar que si aumentamos el tamaño de la matriz, por ejemplo a 5 x 5 y modificamos sus 24 píxeles adyacentes, también se ganaría más enfoque. El efecto es igualmente desastroso (fig. 8). En el anexo III se incluye el pseudo código para un algoritmo de enfoque.

IV. Matrices y efectos de relieve

Continuando con el ejemplo expuesto en el anterior apartado y utilizando una matriz de 3 x 3, si sólo usásemos la diferencia entre los píxeles adyacentes, se agudizarían los bordes, pero solamente éstos. En esto se basa el algoritmo de relieve. Resta añadir una constante de diferencia para que las partes oscuras muestren áreas de más brillo. El valor de esta constante suele ser 128. En el anexo IV se incluye el

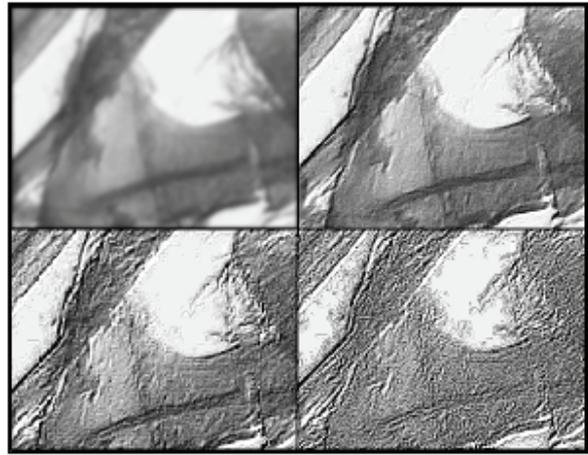


Fig. 8. Detalle de la preparación de la fultura de un lepidóptero. La imagen superior izquierda es la original desenfocada. La superior derecha, una vez aplicado el algoritmo de enfoque con un factor del 50%. En la inferior izquierda se asignó un factor superior al 60%, y en la inferior derecha se utilizó una matriz de 5 x 5. Nótese que en las imágenes inferiores se produce un paulatino efecto de relieve. Esto sucede al mostrarse los píxeles que se han modificado entre las partes monótonas y las perfiladas.

seudo código para un algoritmo de relieve. Con ligeras variaciones, se pueden emular las imágenes de preparaciones de microscopio electrónico de barrido.

V. Matrices y filtro universal

Si utilizamos dos matrices, la primera de 3 x 3 y la segunda de 5 x 5, obtendremos un filtro personalizado que nos proporciona miles de efectos diferentes, desde luego, suficientes para el entomólogo más exigente. Los coeficientes de los píxeles adyacentes en la matriz de 5 x 5 se multiplican por el valor del píxel que hay debajo de ella y se suman sus productos (llamado valor SP). Ahora bien, para que esto funcione, es necesario añadir dos nuevas constantes: el factor 'dividir' y la 'desviación'. Por ejemplo, si escribimos una matriz de 3 x 3 cuyo valor es 0, 0, 0, 1, -1, 0, 0, 0, 0, dividir = 1 y Desviación = 128, obtendremos un ejemplo de bajorrelieve. Aquí se reemplaza cada píxel con la diferencia de su valor y uno de la anterior columna. El factor desviación corrige los píxeles oscuros aclarándolos. En el anexo V se puede estudiar el pseudo código de un filtro universal.

VI. Manipulación de canales de color

Para trabajar con archivos de imágenes el software y el hardware usan paletas y espacios de color. Aquí utilizamos el sistema de color RGB. ¿Qué sucedería si no aplicamos las fórmulas matemáticas de convolución a todos los canales? Si asignamos un filtro conjuntamente al canal R y G, no realizando ninguna operación sobre el canal B, existirían tantas posibilidades de variaciones de color como probabilidades de combinación de todos los números en la matriz y ausencia o presencia de cada uno de los canales, de manera individual o por pares. Teniendo en cuenta, que en cada casilla de la matriz podemos asignar un intervalo numérico de -999 a 999 x 25 celdas y 3 canales, las posibilidades de coloración son casi infinitas. La mayoría de las aplicaciones comerciales que nos brindan la posibilidad de trabajar con filtros de matriz, incluyen controles para seleccionar estos canales (casillas de verificación, radio-botones, etc.)

VII. Canales de color, ámbito y vida de las variables

Existen dos métodos para realizar mezclas de color, el método sustractivo y el aditivo. Mezclando luces de colores

procedentes de dos o más focos (cañones) sobre una pantalla blanca, obtenemos una mezcla aditiva de tres colores que reciben el nombre de colores primarios aditivos. Estos colores puros primarios son, en realidad, un amplio conjunto de frecuencias próximas. Mezclando estos tres colores en diferentes proporciones podemos obtener toda la gama de colores existentes. Los programas de dibujo permiten personalizar el color y dejan definir la mezcla de forma visual ajustando las proporciones de tres haces RGB (Red, Green, Blue) = RVA (rojo, verde, azul). Se puede variar la intensidad de los cañones RGB introduciendo valores entre 0 y 255. Si se marca rojo con 255 y se dejan verde y azul a cero, se obtendrá un rojo intenso. En televisión se utilizan los colores rojo, verde y azul. Éstos son emitidos por cañones independientes para producir toda la gama de colores que vemos en la pantalla (para más información léase Padova *et al.*, 2006: 45).

Mezclando pigmentos o sustancias cromógenas que absorben una parte de la luz, dejando rebotar el resto, se obtiene una luz emergente formada como consecuencia de una mezcla sustractiva CMY (Cyan, Magenta, Yellow)= AMC (amarillo, magenta y cian), que son los colores básicos primarios en este sistema. Nosotros vemos la parte de la luz blanca, el color que emerge del papel. El resto de los colores que poseía la luz blanca fue sustraído por los pigmentos, por lo cual, se ve del color que compone la radiación que rebota en él. Combinando, a partes iguales, dos de estos primarios sustractivos, se produce un primario aditivo. Mezclando amarillo y cian en cantidades iguales, se obtiene color verde. Parece raro que estos dos colores, que no se asemejan al verde, lo produzcan. Los átomos de un determinado elemento absorben las mismas frecuencias que emiten, por lo tanto, primero absorben e inmediatamente redifunden la misma radiación. El conjunto de las radiaciones que propagan origina el color de ese elemento. El resto de las radiaciones desaparecen dentro de la sustancia y no se reemiten. Observando el espectro del amarillo, se ve que no refleja el azul y el violeta, lanzando los demás. El cian hace desaparecer el rojo y el naranja. Si están mezclados amarillo y cian, sólo sobrevive la parte verde y amarilla (que es común a los dos espectros), por lo tanto, la mezcla a partes iguales de pigmentos cian y amarillo da un hermoso color verde. Todos los procedimientos para imprimir colores sobre una superficie se basan en la mezcla sustractiva. Combinando en distintas proporciones los primarios sustractivos se logran los diferentes colores. Es conveniente saber que, un color complementario es aquel cuya composición, en método sustractivo, no presenta nada del primario. El verde, es el complementario del magenta, porque el amarillo y el cian son los colores primarios que no posee el propio magenta. Continuando la secuencia, el rojo es el complementario del cian y el violeta el del amarillo. El sistema AMC, lo utilizaremos más adelante en los mapas de degradado y en el establecimiento de gradientes para tinción digital.

El trabajo por separado en canales de color RGB (rojo, verde y azul) no es complejo. En todos los lenguajes de programación las variables tienen un ámbito, valor y vida en determinados contextos, hasta que su contenido se vacía liberando memoria. Se pueden declarar entonces variables globales, que son aquellas cuyo contenido afecta a la totalidad de la algoritmia del aplicativo. Públicas las que afectan a una parte de la rutina global; privadas, las de uso concreto en un procedimiento o incluso en un bucle. De esta manera, si asignamos antes de ejecutar las fórmulas de convolución, una condición global RGB, pasando por referencia el valor R, G o, B (por medio de un control) y a continuación,

activamos el procedimiento, todos los parámetros establecidos en la matriz afectarían a los canales apuntados. En el anexo VI se incluye pseudo código de discriminación de canales por medio de variables globales.

VIII. Nomenclatura y usos de Matrices para tinción digital

Como hemos observado en el anterior apartado, transmitir la información del contenido de una matriz sin dibujar una retícula, supone escribir y leer largas líneas de datos. El sistema, aunque efectivo, es engorroso. Si examinamos detenidamente los números de la matriz percibimos que hay bastantes series redundantes. ¿Para qué transcribir pues, toda esta información? Comenzaremos por simplificar la dimensión de la matriz. Denominaremos a las de 5 x 5, α (alfa-matriz) y a las de 3 x 3, β (beta-matriz) (fig. 9 y 10).

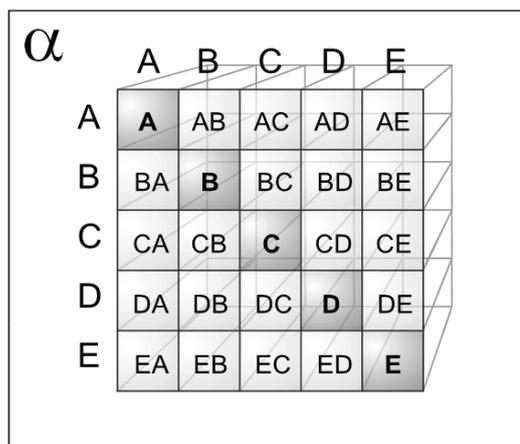


Fig. 9. α matriz y nomenclatura de las celdas.

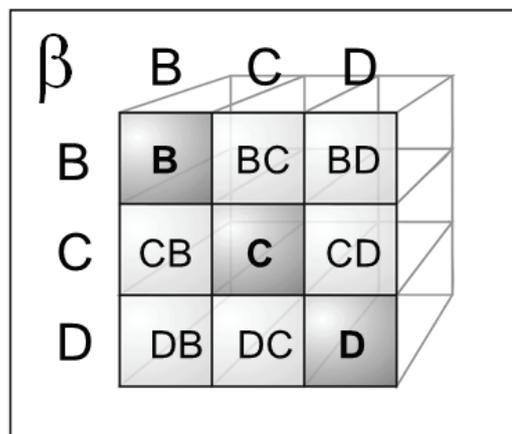


Fig. 10. β matriz y nomenclatura de las celdas.

Por defecto, el contenido de la matriz es cero o nulo (Null). Si en nuestra aplicación accedemos a las matrices y éstas están vinculadas a una tabla, tendremos que controlar este evento a nivel de motor de datos o a través de una condición en las rutinas que se escriban. Si por el contrario, utilizamos programas comerciales, esta posibilidad ya está controlada. Por lo tanto, consideraremos que, cuando por defecto, se omite el valor de la posición de la casilla en la retícula bidimensional, el valor corresponde a cero. Por ejemplo, si en α CB queremos colocar el número 1, C posee -3, CD 1 y el resto de las casillas tienen un valor de 0, el resultado transcrito de la matriz sería, α CB1|C-3|CD1 Pero, quizá se pueda simplificar más, ¿y si omitimos el valor 1? El resultado es el siguiente: α CB|C-3|CD. También podemos

obviar el operador, considerando que si el nombre de la casilla está escrito en minúsculas es negativo y al contrario positivo (α CB|c3|CD). Falta asignar el valor dividir y desviación. Para la primera utilizaremos su operador(/) y para la segunda Δ , δ (delta). De la misma forma que hacemos para las casillas, si los valores corresponden a 0, se ignora el operador y si estos presentan el número 1, se escribe exclusivamente el mismo. Con respecto a los canales de color RGB sobre los que se aplican los algoritmos, se añaden al final de la cadena, excepto si incluimos todos. Concluyendo, la matriz se escribiría de la siguiente manera: α CB|c3|CD/ δ 20 (fig. 11). Si sólo modificamos los canales R y G, el resultado es α CB|c3|CD/ δ 20RG y así sucesivamente.

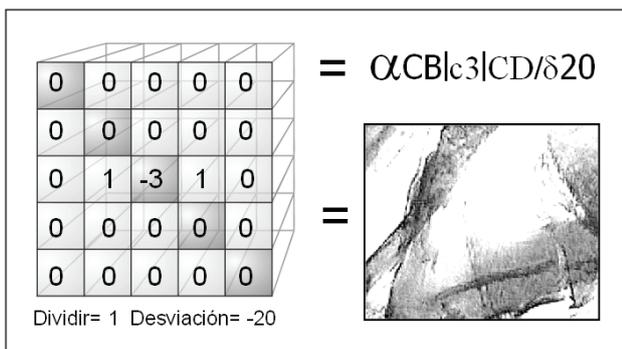


Fig. 11. α matriz y transcripción, según nomenclatura, con los parámetros dividir y desviación (nótese que se modifican todos los canales RGB).

La nomenclatura utilizada se puede resumir en los siguientes puntos:

1. Las celdas de la matriz se leen comenzando por la columna horizontal para continuar con la vertical.
2. Las celdas de la matriz que corresponden a una letra duplicada, porque están situadas en el vértice de su cuadrante, se representan con una sola letra.

3. La matriz de 5 x 5 se denomina α matriz.
4. La matriz de 3 x 3 se denomina β matriz.
5. El operador de separación es la barra vertical (|).
6. El operador del parámetro dividir es la barra oblicua derecha (/).
7. El operador del parámetro desviación es la letra griega Δ δ (delta).
8. El valor 0, se ignora, y el 1, se representa con el nombre de la casilla o el símbolo del operador.
9. Las letras en minúsculas significan un valor negativo, excepto α y β .
10. Los nombres de las celdas se escriben en orden de lectura occidental, comenzando por la parte de arriba hacia la derecha, retorno de carro y lectura hacia la derecha, hasta finalizar en la última casilla de la matriz.
11. Los dos penúltimos fragmentos corresponden con los parámetros dividir y desviación.
12. A continuación de los parámetros dividir y/ o desviación, no se utiliza la barra vertical.
13. Se especificarán los canales sobre los que se aplican los algoritmos, excepto si se usan los tres (RGB).

IX. Tinciones digitales con matriz en la práctica

Tras estos prolegómenos, estamos en disposición de comenzar a trabajar con matrices de imágenes y efectuar las primeras tinciones digitales. Para empezar, necesitamos abrir, por ejemplo, PhotoShop, Paint Shop pro, Corel Photo Paint o Gimp, la aplicación propia, o cualquier programa de edición de archivos gráficos que posea un filtro de matriz (consúltese MATEOS, 2008). En Internet existen gran cantidad de controles ActiveX, complementos y pequeños programas de este tipo. Es conveniente familiarizarse con la interfaz genérica de éstos, puesto que, en casi todos los casos, es muy similar. Como ya se comentó anteriormente, para la consecución de este artículo hemos realizado el programa MEIM, (Módulo de edición de imágenes microscópicas) para el aplicativo Ephesia Earth V.2 (fig. 12, y 13)

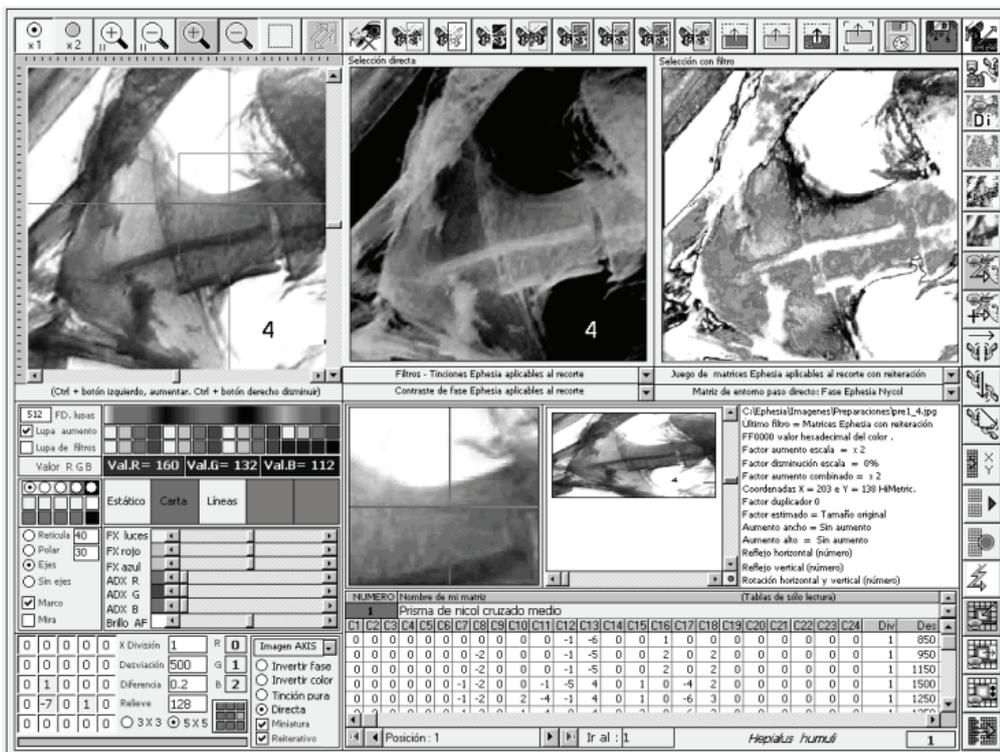
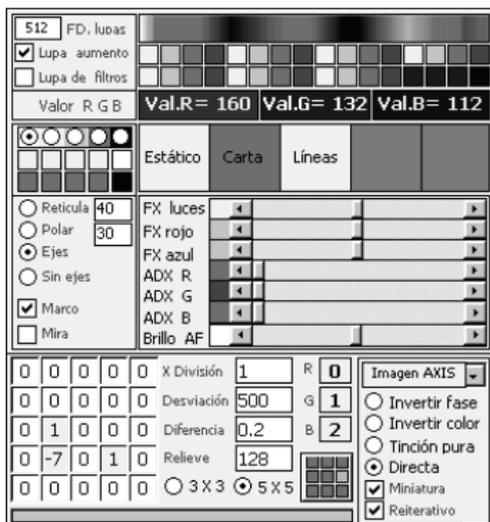


Fig. 12. Interfaz gráfica y controles del MEIM para Ephesia Earth V.2, que se ha realizado para esta publicación. Para la construcción de este programa se han usado, entre otras, las técnicas matemáticas de convolución, aritmética de la imagen, recursividad y los algoritmos descritos en este trabajo.



◀ **Fig. 13.** Detalle del cuadrante inferior izquierdo del MEIM para Ephesia Earth V.2. Obsérvese detenidamente la barra de mapa de degradado y una α matriz, con posibilidad de selección de canales y configuración de los parámetros dividir. Como puede verse, se puede completar la algoritmia con dos parámetros más: diferencia y relieve, lo cual proporciona, si cabe, efectos aún más sofisticados. Admite discriminación de canales RGB.

En PhotoShop , Paint Shop pro, Corel Photo Paint y Gimp, existen algunas diferencias respecto a la nomenclatura. Mientras el parámetro dividir, en el primero se llama escala, en el segundo tercero y cuarto, divisor. Lo mismo sucede con el concepto desviación que es llamado respectivamente, desplazamiento, tendencia y descentrado (fig. 14, 15, 16 y 17).

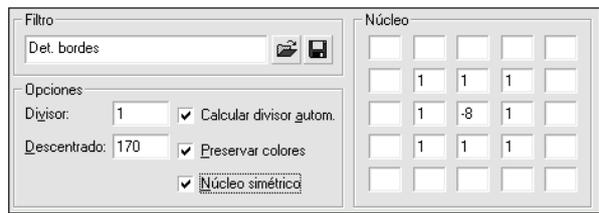


Fig. 16. Detalle de la α matriz de Corel Photo Paint. Obsérvese que este aplicativo tiene un nuevo parámetro llamado 'núcleo asimétrico' que modifica la ubicación del píxel módulo, pero no admite canales.



Fig. 14. Detalle de la matriz de PhotoShop. No permite modificación de canales RGB.

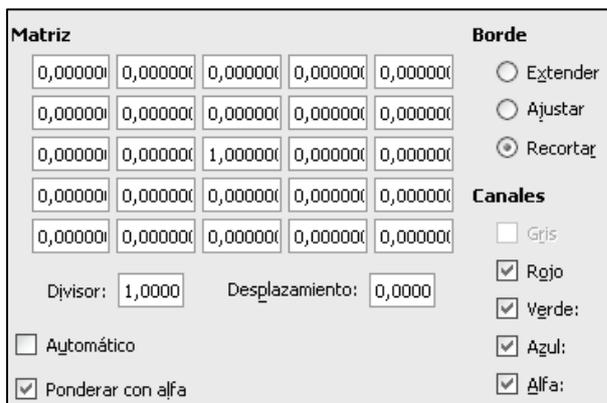


Fig. 17. Detalle de la α matriz de Gimp. Obsérvese que este aplicativo tiene varios parámetros: extender, ajustar y recortar, que modifican la manera en que se comporta el algoritmo de convolución. Utiliza un canal más denominado alfa, que pondera la transparencia de la imagen. Posee control de canales RGB y conversión a blanco y negro.

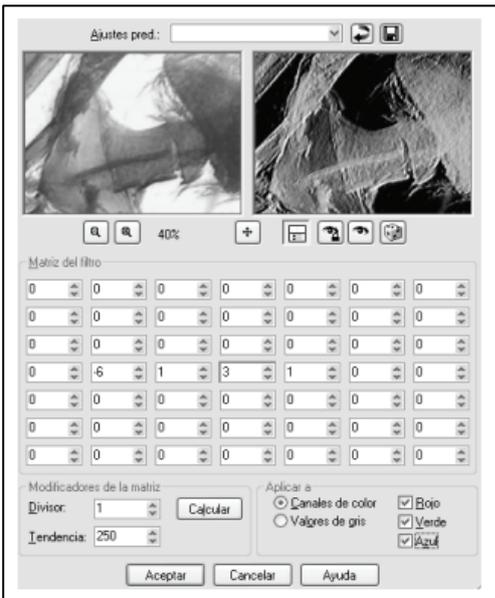


Fig. 15. Detalle de la matriz en Paint Shop pro. Nótese que ésta es de 7 x 7. Posee un control de canales RGB y conversión a blanco y negro.

Con respecto a la funcionalidad notemos que los complementos que traen de serie PhotoShop y Corel Photo Paint no tienen en la matriz la capacidad de discriminar canales, aunque si se pueden disgregar con otras opciones del programa. Por lo tanto, si se desea diferenciar canales, lo más práctico es instalar un nuevo complemento con esta característica. Los complementos no son siempre compatibles entre diferentes programas, por ejemplo, no es posible intercambiar los de serie entre Gimp, Photoshop y Corel Photo Paint.

Paint Shop pro, trabaja con una sofisticada matriz de 7x7 que eleva aún más el rango de posibilidades, pero para el tema que nos ocupa no es relevante, por lo que a la hora de rellenar las casillas, el resto las ignoramos, dejando el valor cero que tiene por defecto. En lo referente al radiobotón, valores de gris, discrimina los canales de la imagen para trabajar únicamente en blanco y negro.

Gimp tiene una matriz de 5 x5 (α matriz) y permite modificar varios parámetros: extender, ajustar y recortar. Con ellos se modifican la manera en que se comporta el algoritmo de convolución. Utiliza un canal más denominado alfa, que establece la transparencia de la imagen. Con respecto a la casilla de verificación, "ponderar con alfa", sólo está disponible para imágenes en color y valora las medias de las transparencias en relación al conjunto de canales,

cuando está activado el radio-botón "recortar". En este trabajo no utilizamos antedichas opciones.

Para familiarizarse con estos filtros se recomienda introducir series de números, de uno en uno, comenzando desde el del centro y continuar con los adyacentes de manera perimetral, escribiendo el valor en positivo y negativo. Una vez comprendido el funcionamiento de la matriz y la convolución, activar y desactivar las diferentes opciones en los canales RGB. Se recomienda grabar o guardar estos datos, de este modo, si conseguimos una emulación perfecta, por ejemplo, de la técnica de tinción química del negro de clorazol, lo podremos utilizar en otras ocasiones. Adquirido el dominio necesario, introducimos cualquiera de las series propuestas en el anexo VIII. En cualquier caso, al igual que en las tinciones químicas una determinada fórmula cromógena, no actúa de igual manera en diferentes estructuras (aunque éstas se realicen a la perfección y en idénticas condiciones de laboratorio), en las tinciones digitales, ocurre lo mismo. No todas la fotografías son candidatas perfectas para cualquier modificación de color, de igual manera que, no todas las estructuras son susceptibles del empleo de la misma técnica de tinción química. Es importante elegir cuidadosamente, qué efecto se pretende, qué parte se desea resaltar o no, cuál es el valor pedagógico de mostrar un determinado tipo de efecto en la imagen. Es recomendable no dejarse arrastrar por la preciosidad estética de las imágenes resultantes, (lo cual es sencillo) a efectos de conseguir una adecuada funcionalidad práctica, científica, técnica y una coherente plasticidad. En la el anexo VII se incluyen las posibles sugerencias en este sentido.

En PhotoShop, la opción de filtro de matriz está en el menú Filtro/ Otros/ Personalizar. En Paint Shop pro, Efectos/ Filtro definido por el usuario. En Corel Photo Paint se encuentra en Efectos/ Personalizado/ Definido por el usuario. En Gimp en Filtros/ Genérico/ Matriz de convolución.

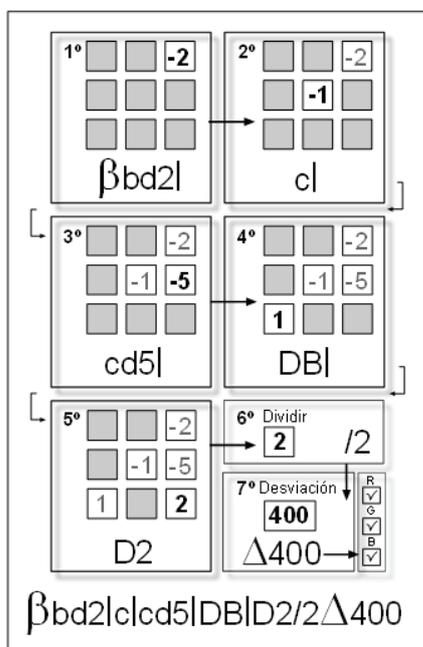


Fig. 18. Diagrama de procesos concreto para una β matriz con filtro de contraste suave.

X. Mapas de degradado y tinción digital

Hasta el momento, todos los efectos digitales que hemos aplicado se basan en la comparación y manipulación de los

píxeles adyacentes en referencia a un píxel módulo. El hecho de modificar en cada operación la matriz completa, impide que sea posible realizar una coloración puntual en una determinada parte de la imagen. Se podría realizar si cortamos la imagen en fragmentos, modificamos su color y la recomponemos; esto se conoce como trabajar con añadidos (sprites). Aseverando que un mapa de degradado o gradiente, se comporta de una manera radicalmente diferente a un añadido, podríamos realizar efectos muy similares. ¿Qué sucedería si en lugar de comparar los píxeles adyacentes con el píxel módulo, duplicáramos la imagen y cotejáramos cualquier píxel de la segunda con los de la primera? Aparentemente, el caos. Pero, si aplicamos diferentes fórmulas matemáticas tendentes a la selección de un determinado píxel y la comparación con uno concreto de la copia, las cosas cambian. De esta manera, se pueden conseguir efectos de tinción digital infinitos. Más de un millón y medio de colores modificándose respecto a si mismos, a los valores de comparación entre las dos imágenes y a la cantidad de píxeles totales en la matriz del archivo. Nos explicaremos de manera más concisa, si retomamos el ejemplo del negativo de una imagen expuesto más arriba (véase apartado III en este capítulo); ahora comparamos un determinado píxel de la imagen original con la superpuesta y estipulamos que cada píxel invierta su valor cuando está solapado por un píxel de idéntico valor. De esta forma, cada vez que movemos la imagen superpuesta, el píxel inferior mostrará su valor en negativo. Si no realizamos ninguna operación, el valor se suma, resultando una imagen con el doble de saturación. Si restamos su valor, obtendríamos una imagen con la mitad de saturación, y con otros operadores, su efecto matemático. Se comprenderán estos efectos con más facilidad si imaginamos las imágenes como películas transparentes emulsionadas (como un cuadro de celuloide de una película de cine), una encima de otra, teniendo en cuenta que, una de ellas, tiene la propiedad de un operador.

X. Operadores lógicos AND, OR, NOT y XOR

Existen 256 formas de fusionar los píxeles de origen con los de destino. Para esto se pueden utilizar los operadores lógicos AND, OR, NOT, XOR y las agregaciones entre ellos. En algoritmia, estas combinaciones se escriben en valores hexadecimales. De estas combinaciones las más interesantes se realizan con el operador XOR. Éste funciona de la siguiente manera: supongamos que las especialidades de un entomólogo podrían ser los lepidópteros y los coleópteros y queremos que una serie de instrucciones se realicen si existe un entomólogo que tiene una de estas especialidades, pero, no si tiene ambas y viceversa. El operador XOR, se utiliza para evaluar condiciones cuando una es verdadera y otra falsa. Con imágenes, este operador funciona como un conmutador, la primera vez que se ejecuta, modifica la imagen y la segunda la devuelve a su estado original. Las combinaciones más comunes entre operadores son las siguientes: combina el mapa de bits de origen invertido con el mapa de bits de destino mediante OR; invierte el resultado de combinar los mapas de bits de origen y de destino mediante OR; combina los píxeles de los mapas de bits de origen y de destino mediante AND; invierte el mapa de bits de origen mediante AND; combina los píxeles de los mapas de bits de destino y origen mediante XOR y combina los píxeles de los mapas de bits de destino y origen mediante OR (fig.19).

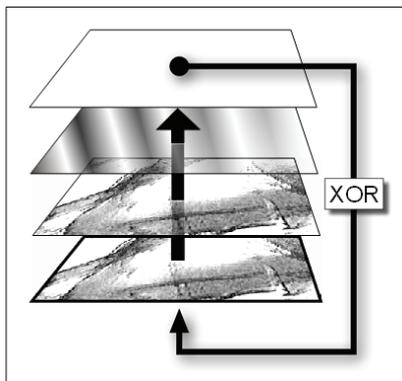


Fig. 19. Funcionamiento disgregado de un sistema de mapa de gradaciones por medio de un operador lógico XOR.

XI. Nomenclatura y usos de gradientes para tinción digital

Hace ya muchos años que cualquier programa de dibujo vectorial o de retoque fotográfico posee una barra de degradados (fig. 20). La ventaja de estas combinaciones de color consiste en que la mayoría de las aplicaciones permiten importarlas y exportarlas. Por lo tanto, existe la posibilidad de crear una barra con colores personalizados y reutilizarla con posterioridad.

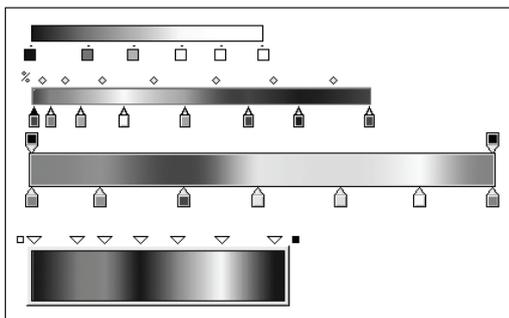


Fig. 20. Barras de degradado en diferentes aplicaciones.

Todos los programas ofrecen la funcionalidad de colocar manualmente marcadores de color (balines), establecer su tonalidad e introducir su ubicación dentro de la barra de color. Los datos se introducen en porcentajes a lo largo de la barra. En la mayoría de los aplicativos se pueden colocar hasta 99 balines y establecer 16.777.256 colores. Como quiera que, para el tema que nos ocupa, estos parámetros son a todas luces excesivos, trabajando con tres series de 5, 6 y 11, obtenemos suficientes combinaciones. Estas barras, las denominamos, respectivamente, α , β y γ . En lo referente a colores para los marcadores, utilizaremos los básicos pertenecientes al sistema sustractivo y aditivo, es decir, YMC RGB (véase apartado VII en este capítulo), las mitades de su valor, el negro y su dos tercios, el blanco y el tercio de su valor (fig.21).

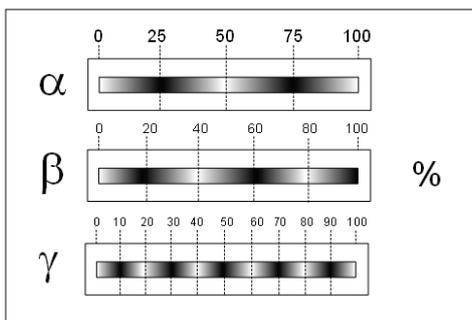


Fig. 21. Denominación y porcentajes en la barra de gradaciones.

Los valores de los colores se pueden establecer, en RGB y en hexadecimal (GARCÍA et al., 2007). Esto sería una secuencia RGB, para especificar una barra de gradientes : γ 0, 0, 255, 255, 0, 255, 255, 255, 0, 0, 255, 255, 0, 0, 0, 255, 255, 0, 0, 0, 255, 0, 255, 255, 0, 0, 0, 0, 0, 255, 255, 0, 255. Como es evidente, se necesita simplificar (tabla I).

Tabla I. Nomenclatura de colores, valores en RGB, sistema hexadecimal y abreviaturas utilizadas en las mezclas aditivas y sustractivas.

Amarillo	255, 255, 0	FFFF00	Y
Magenta	255, 0, 255	FF00FF	M
Cian	0, 255, 255	00FFFF	C
Rojo	255, 0, 0	FF0000	R
Verde	0, 255, 0	00FF00	G
Azul	0, 0, 255	0000FF	B
Blanco	255, 255, 255	FFFFFF	W
Negro	0, 0, 0	000000	K
Amarillo 1/2	128, 128, 0	808000	y
Magenta 1/2	128, 0, 0	800080	m
Cian 1/2	0, 128, 128	008080	c
Rojo 1/2	128, 0, 0	800000	r
Verde 1/2	0, 128, 0	008000	g
Azul 1/2	0, 0, 128	000080	b
Blanco 2/3	170, 170, 170	AAAAAA	w
Negro 1/3	85, 85, 85	555555	k

Utilizando la primera letra, excepto la del negro que es la última, la secuencias de tres filtros de mapa de gradientes, se podrían transcribir de la siguiente forma: α BYMCK, β KMICYBK, γ BMYCKYBCKBM. Pero, ¿qué sucede si queremos ignorar algunos marcadores?, simplemente utilizamos ceros en su lugar, por ejemplo: γ B000KYBCK0M (los balines del 20, 30, 40 y 90 %, se han borrado, por lo que la gradación es de blanco a negro desde la posición cero hasta la cuarta, y del negro al magenta del 80 al 100%).

La nomenclatura y normas utilizadas para mapas de degradado se pueden extraer en los siguientes puntos:

1. Los porcentajes de las barras se leen de izquierda a derecha, siendo cero el principio y 100 el final.
2. En las barras se utilizaran series de 5, 6 y 11.
3. La de 5 divisiones se denomina α gradiente.
4. La de 6 fracciones se designa β gradiente.
5. La de 11 se llama γ gradiente.
6. El sistema de color corresponde con los colores básicos en modo sustractivo y aditivo.
7. Para completar el espacio RGB con colores más sofisticados se utilizan las mitades de su valores más el negro, sus dos tercios y el blanco con el tercio de su valor.
8. Los valores de los colores no puros se escriben con su inicial en minúsculas.
9. Las letras de las series se componen por la denominación del tipo de barra, estipulada por la letra griega en primer lugar, seguidas de la inicial del nombre del color, excepto el negro que corresponde con la última letra.
10. El operador de ausencia de marcadores es el número cero.

XII. Mapas de degradado en la práctica

La mayoría de las programas comerciales no permiten acceder, en un solo paso, a la aplicación de un mapa de degradado. Por supuesto, es posible realizar estas operaciones con diferentes técnicas, en algunos casos superponiendo capas, lentes, objetos, etc. Consúltese la documentación del aplicativo elegido, pues sería prolijo en exceso enumerar estos detalles, a la par que fuera del ámbito de este trabajo.

En cualquier caso, siempre existe la posibilidad de instalar un complemento. De los programas citados en este artículo sólo PhotoShop, Ephesia Earth V.2 y Gimp, permiten la aplicación directa, con un par de pulsaciones, de maniobras de control de gradación. Sin embargo, en Gimp, resulta bastante engorroso la ubicación de los balines y la asignación de colores. En cualquier caso, este innovador y original programa, se distancia de manera considerable de la forma 'tradicional' de manipular imágenes, es complejo, pero también excelente, rápido y muy efectivo, pero ciertamente, no demasiado apto para principiantes. En PhotoShop, esta opción está en el menú Imagen/ Ajustes/ Mapa de degradado. Para trabajar, se realiza doble clic sobre el patrón degradado que se muestra por defecto y aparece la pantalla de edición. Las operaciones son muy sencillas, el primer paso consiste en añadir los marcadores necesarios, y esto se realiza arrastrando y soltando cualquiera de los que vienen por defecto en el primer gradiente mostrado. También se puede escoger entre los gradientes disponibles en la librería, o disponer las operaciones sobre uno con el que se halla trabajado con anterioridad. En este sentido, se recomienda que se realicen, la primera vez, tres patrones de barras α , β , γ y se guarden con el nombre apropiado para tenerlos siempre disponibles. Esta manera de proceder simplifica bastante el trabajo. A continuación, se escriben los parámetros de ubicación dependiendo de si la barra es del tipo α , β o γ (anexo IX). Una vez colocados los balines, se establecen los colores, bien por medio de la paleta de color, por su nombre, su valor RGB o hexadecimal. Para trabajar con la paleta, hacemos doble clic sobre el marcador que se va a modificar. Si en la pantalla que se muestra a continuación activamos la casilla de verificación 'Sólo colores web', los que aparecen en el vértice superior derecho corresponden con los básicos. Para buscar los colores, se comienza por hacer clic en la barra de color vertical. Conviene, en cualquier caso, verificar que el color seleccionado corresponde con el valor en RGB o hexadecimal. Para terminar, se guarda la barra de degradado y se acepta grabando el archivo (fig. 22).

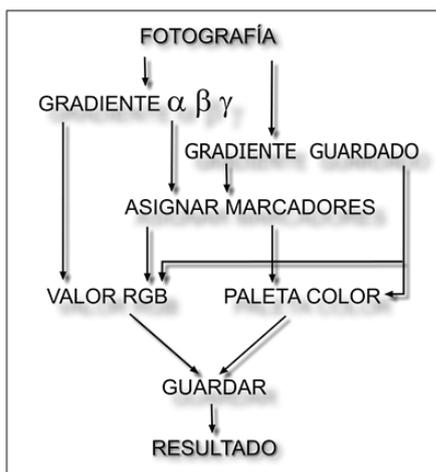


Fig. 22. Diagrama de procesos del trabajo y la aplicación de mapas de degradado.

XIII. Tinción digital por curvas

Las técnicas de modificación del color por medio de curvas, consisten en la manipulación de los canales de RGB por medio de una línea representada en un espacio X- Y. En aritmética de la imagen, son muy similares a las matrices, aplicándose igualmente fórmulas y algoritmos de convolución pero de manera algo más sofisticada. Las curvas, no son

más que la representación gráfica y manipulable de estos cálculos matemáticos (fig. 23, 24 y 25).

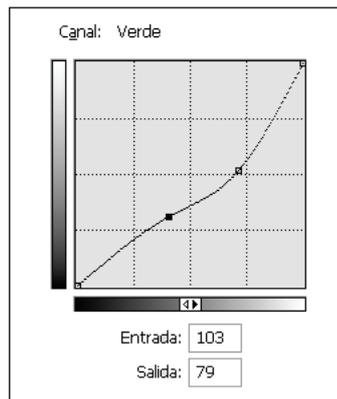


Fig. 23. Ejemplo del panel de curvas de PhotoShop. Los parámetros de los puntos notables en las curvas se definen por medio de dos cuadros de texto: entrada y salida. Esto permite una ubicación exacta del punto en la curva resultante. Los puntos se pueden desplazar fuera de su vértices y al moverlos generan automáticamente el final de la línea en el lado correspondiente del cuadrado.



Fig. 24. Ejemplo del panel de curvas de Corel Photo Paint. Los parámetros de los puntos notables en las curvas se definen por medio de coordenadas X-Y, correspondiendo la primera a la entrada y la segunda a la salida. La ubicación exacta del punto en la curva requiere cierta habilidad con el ratón. Los puntos no se pueden desplazar fuera del perímetro del cuadrado y al moverlos oscilan automáticamente en el lado correspondiente. Si se da el caso de que, el punto de inicio o el de término, se tenga ubicar fuera de uno de estos lados, es necesario ignorar este comportamiento y añadir dos nuevos puntos, considerando éstos inicio y final. Para dichos casos resulta muy útil trabajar, en principio, con la opción de "curva quebrada".

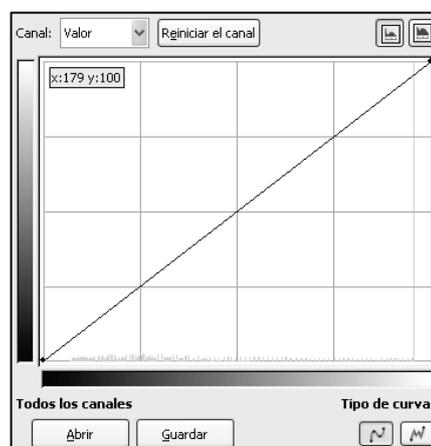


Fig. 25. Ejemplo del panel de curvas de Gimp. Los parámetros de los puntos notables en las curvas se definen por coordenadas X-Y. La ubicación exacta del punto en la curva requiere cierta habilidad con el ratón.

Observando la cuadrícula donde se desarrolla la curva, el negro está situado en la esquina inferior izquierda y el blanco en la superior derecha, y comprende, entre 0 y 255, toda la gama de colores RGB. Al cambiar la forma de la curva se modificará la tonalidad y el color de la imagen. Se oscurece, al curvar la línea hacia abajo y si lo hacemos hacia arriba, se aclara. Las partes de la imagen con más contraste están representadas por las secciones más pronunciadas de la curva. Las secciones más planas de la curva representan las partes de la imagen con menor contraste. Para ajustar las zonas iluminadas colocamos y movemos un punto en la parte superior de la curva. Para las sombras, un punto de la parte inferior de la curva. Si lo ubicamos en la parte central, los medios tonos. Para asignar un valor de entrada a un valor de salida más bajo, oscureciendo la imagen, se mueve un punto hacia abajo o hacia la derecha. Para fijar un valor de entrada más bajo a un valor de salida más alto, se mueve el punto hacia arriba o hacia al izquierda y por lo tanto, la imagen aclarará. Para visualizar una imagen en negativo, basta con trasladar los puntos de los vértices al lado opuesto en sentido vertical. Los pasos intermedios, proporcionan diferentes efectos de solarización. Si realizamos estas operaciones en el canal compuesto RGB y luego en cada canal de manera independiente, la imagen se habrá modificado completamente, aunque en la mayoría de las ocasiones con modificar un canal es suficiente.

El sistema descrito, es uno de más utilizados y más antiguos para modificar la tonalidad de una imagen. En la práctica, casi todos los aplicativos de retoque fotográfico poseen edición por curvas. Las manipulaciones en éstas se pueden guardar en archivos, pero las extensiones no son compatibles entre diversos programas. Se recomienda, inicialmente, utilizar PhotoShop, cuyos archivos de curvas tienen extensión acv.

XIV. Nomenclatura para la tinción digital por curvas

Se necesitan dos parámetros por cada punto, entrada y salida. Estos valores se establecen por el conjunto y correlativamente por cada canal, es decir: RGB y R, G, B. Se trata pues, de establecer las estimaciones correspondientes a cada punto de la curva y en cada canal, de manera consecutiva. Para realizar los efectos, normalmente, no es necesario fijar más de un punto adicional por cada curva. De la misma manera, es infrecuente la edición en el conjunto y en todos los canales a la vez (véase anexo X). La nomenclatura y normas utilizadas para curvas, se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Los filtros por curvas los destacamos con la letra ϵ
2. Para establecer las cuantificaciones en el canal RGB, comenzamos a leer los puntos de izquierda a derecha, continuando con los canales por separado R, G y B. Se ignoran los canales no modificados.
3. Primero se leerá la entrada y luego la salida.
4. Si los números de entrada y salida son iguales sólo se escribe uno.
5. Para separar las series utilizamos la barra vertical, excepto cuando comienzan o terminan con una letra y no definen el final, o el principio, de un nuevo punto.
6. Los valores se establecen en el orden instituido por defecto en los canales, es decir, RGB, R, G y B. Los números de los tres últimos, se preceden por su inicial en mayúsculas.
7. El vértice superior izquierdo se denomina, **a**. El vértice superior derecho, **b**. El vértice inferior izquierdo, **c**. El vértice inferior derecho, **d** (fig. 26).
8. El punto de salida por defecto es **c** y el opuesto de llegada es **b**.

9. Sólo se utilizan **a** y **d** cuando la línea comienza o termina exactamente en el vértice que responde a esta denominación. Si, por cualquier razón, una curva que parte del vértice **c** finaliza muy cerca del vértice **d**, pero no en el mismo, se considerará **b**.

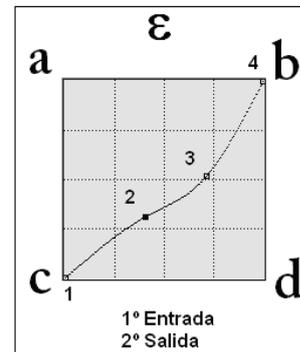


Fig. 26. Esquema de la nomenclatura utilizada en la tinción digital por curvas.

XV. Tinción digital por curvas en la práctica

Las operaciones se reducen a abrir en el aplicativo la imagen y un diagrama de curvas, e introducir las series en orden RGB, R, G, y B (fig. 27).

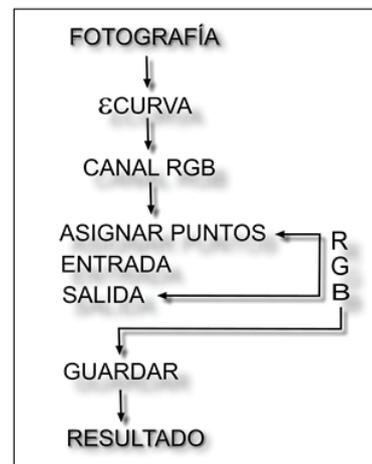


Fig. 27. Diagrama de procesos genérico de tinción digital por curvas.

Analicemos el siguiente ejemplo para la emulación de prisma de nicol: $\epsilon c|24-135|113-19b203-243$, todos los cambios se han realizado en el canal común. El primer punto (**c**) está situado en el vértice inferior izquierdo y su valor corresponde a 0. El segundo punto, tiene una entrada de 24 y una salida de 135. El tercero 113 y 19, finalizando la curva en el cuarto punto (**b**), que está situado casi en el vértice superior derecho, cuyos valores corresponden a 203-243. El resto de los canales no se han modificado (fig. 28).

En PhotoShop estas opciones están en: Imagen/ Ajustes/ Curvas. En Paint Shop Pro: Ajustar/ Brillo contraste/ Curvas. En Corel Photo Paint: Imágenes/ Ajustar/ Curva tonal y en Gimp: Capa/ Colores/ Curvas.

XVI. Tinciones digitales para discriminación de tejidos y acotación de zonas puntuales.

La técnica química de coloración puntual de estructuras y zonas está poco extendida y su uso tiene relativa utilidad. La emulación de estas técnicas de manera digital es bastante sencilla pero, sin embargo, el usuario está abocado a realizarlas de manera más o menos manual. No existe un método

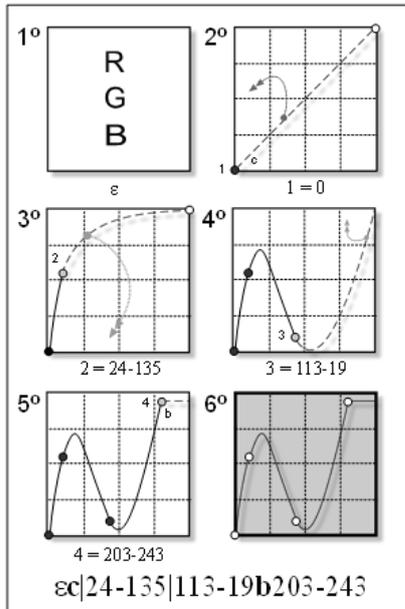


Fig. 28. Diagrama de procesos concretos de tinción digital por curva, emulación de prisma de Nicol. Las bases de los arcos, con doble flecha y línea segmentada en perpendicularidad, indican desde donde se debe arrastrar la curva que existe por defecto, para modificarla. Igualmente, la doble cabeza de éstas, sugiere la dirección y donde se debe soltar la línea segmentada en paralelo, para establecer el punto y el valor de su curva.

do claramente universal, fuera de este contexto, para desarrollar estos procesos. Todos los programas de retoque fotográfico tienen herramientas de selección de partes de una imagen: varitas mágicas, selectores magnéticos, delimitadores poligonales, extracción por máscaras, etc. Pero, éstas, aún si se posee cierta destreza en la calibración de su sensibilidad, en la mayoría de los casos no son útiles. Desafortunadamente, en muchas ocasiones, las imágenes de preparaciones microscópicas, no tienen un contraste tan acusado como para que la herramienta delimite las zonas que se desean establecer con la precisión requerida. Por lo tanto, las posibilidades son harto limitadas. En bastantes situaciones, se limitarán a la selección manual de las regiones que se quieren discriminar y la posterior coloración por cualquiera de los sistemas expuestos en este trabajo. Es necesario detallar que, las modificaciones en el color que se pueden practicar por medio de matrices, mapas, curvas, etc., y la aplicación de técnicas de convolución, no tienen porque efectuarse sobre zonas cuadradas o rectangulares. En este artículo se presenta de esta manera, exclusivamente por razones de claridad en la exposición. Es decir, es factible realizar una selección irregular y aplicar en ésta los efectos y filtros descritos (fig.29).

El problema se plantea, cuando en realidad lo que pretendemos es conseguir la realización automática de estas operaciones, desarrollando sin demasiadas manipulaciones las derivaciones de color a efectos de beneficiarnos de la capacidad de cálculo del ordenador. Sin demasiadas aspiraciones de universalidad, y teniendo en consideración las escasas ocasiones en que se aplican estos efectos, aflora la siguiente cuestión: ¿Existiría la posibilidad de discriminar zonas aislando diferentes gradaciones o grupos concretos de tonalidades y sus tejidos? ¿una vez delimitadas éstas, sería posible conmutar estos píxeles para realizar aritmética de convolución? La respuesta es afirmativa, pero, lo que sucede, es que hay muy pocas herramientas en el mercado capaces de gestionar estos cambios de manera efectiva.



Fig. 29. En la fultura de la imagen superior se indica una selección manual. En la inferior, se ha aplicado a la zona delimitada un filtro de matriz $\beta C|\Delta 20$ (para más información véase también la fig. 67).

Afortunadamente para nosotros, existe un complemento, es gratuito y se distribuye con Gimp, se trata de un filtro de rotación de mapa (fig. 30).

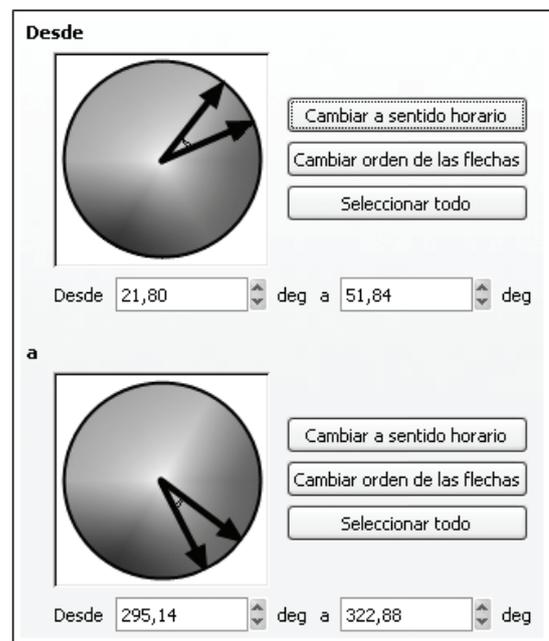


Fig. 30. Complemento de rotación de mapa.

En el aplicativo se muestran sendos círculos cromáticos en el espacio RGB con unas flechas que constituyen ángulos en grados, en pi-radianes o en radianes. El de la parte superior establece la gama de tonalidad de la que se parte, es decir, la zona seleccionada en la imagen de la preparación. El inferior, la gradación de color por la que se desea sustituir la acotación establecida. Por lo tanto, si decimos, $\pi 21,80|51,84|295,14|322,88$ sustituimos una gama reducida de naranjas por violeta (la lectura se realiza de

arriba abajo y de izquierda a derecha). En realidad la gama de partida es desconocida, por lo que se podría afirmar que $\pi 295,14|322,88$ modifica cualquier matiz hacia una gama reducida de violetas. Cuanto menos grados tiene el interior del arco formado por la flechas, más pequeño es el intervalo de tonalidad. Este complemento se encuentra ubicado en Gimp en el menú: Filtros/ Colores/ Mapas/ Rotación de mapa.

XVII. Tinción digital y reiteración

La reiteración consiste en aplicar a la fotografía de una misma preparación secuencias de varias tinciones digitales, por ejemplo: $\alpha \text{BYMCK} + \alpha \text{CB|c3|CD}/\Delta 20$; aquí aplicamos primero un mapa de degradado y sobre éste un filtro de matriz. De esta manera, podemos aplicar efectos en secuencia y número de modo indefinido, sean todos de matriz, mapas de gradaciones, curvas o combinaciones entre ambos (anexo XI). En la práctica, en pocas ocasiones es necesario realizar estas operaciones.

XVIII. Tinción digital y reversibilidad

Taxativamente, es absolutamente recomendable, si no imprescindible, no trabajar sobre la fotografía original. La forma más coherente de proceder es guardar el original que, además, debido a la, cada vez mayor cantidad de mega píxeles con que suelen trabajar los CCDs de las cámaras digitales, tienen un tamaño de archivo y resolución considerable, normalmente muy superior al necesitado. Como ya se comentó con anterioridad (véase apartado II de este capítulo) la copia de la imagen con la que vamos a trabajar tiene que tener un tamaño similar o ligeramente superior al de impresión. Los motivos son los siguientes: si aplicamos tinciones sobre imágenes demasiado grandes, por ejemplo, supongamos que necesitamos una imagen a sangre en formato Din-A4 y para esto procesamos un gráfico de tamaño Din-A3, lo único que conseguimos es ralentizar las operaciones de los filtros, al tener que cargar en memoria una matriz del archivo de imagen demasiado grande. Es necesario tener en cuenta para una impresión, que no porque el archivo sea más grande y presente una resolución muy superior a la necesaria, ésta esgrimirá una mayor calidad, todo lo contrario, en muchos casos, el resultado es peor. Esto se debe a que el software-spooler de impresión tiene que traducir y simplificar la información innecesaria y redundante. Lo mismo sucede con el aplicativo de retoque fotográfico. Por lo tanto, insistimos, se trabajará sobre una copia de la imagen que tiene que tener un formato similar al de impresión, por supuesto, con la más alta resolución.

Todas las tinciones digitales que se aplican a una imagen se pueden realizar de manera inversa, es decir, si aplicamos un filtro α matriz de enfoque con determinados parámetros y seguidamente uno de desenfoque con el efecto inverso obtendremos la imagen original. Ocurre que, para realizar estas operaciones, obviamente, necesitamos saber el efecto inverso y en ocasiones lo desconocemos. Realizando una tinción digital en un solo paso no existe tal problema, pero ¿y si trabajamos por reiteración? En este caso, no queda más remedio que apuntar las series de gradaciones y las matrices que hemos aplicado para, de manera correlativa, realizar las inversas trocando el operador. De todas formas, siempre se puede aplicar un filtro de matriz deshacer, es tan sencillo como, $\text{matriz} = \beta \text{C}$; esta fórmula devuelve cualquier imagen a su estado original.

Para deshacer los efectos realizados con curvas, basta borrar todos los puntos y dejar las líneas rectas.

Con respecto a mapas de degradado, si la fotografía es en blanco y negro, αB000K retorna al estado original. Es

provechoso guardar el filtro y el mapa, de esta manera, siempre podremos disponer de una función deshacer. En lo referente a gradaciones en color, la única manera de retornar al estado original de la imagen consiste en utilizar las funciones deshacer del aplicativo utilizado, o más útil, trabajar con historiales.

Para volver a la imagen original, en rotación de mapas, basta con no establecer grados de origen y destino.

XIX. Tinciones digitales por matriz, mapas de degradado, curvas y rotación RGB: argumentos y campos de aplicación.

Probablemente, tras la lectura de los anteriores capítulos, el lector se realizará la siguientes preguntas: ¿Cuándo es conveniente utilizar tinción digital por matriz? ¿Cuándo utilizar el mapa de gradaciones o las curvas? ¿Qué aplicativo usar para cada sistema? La respuesta a estas interrogantes se encuentran en la propia imagen y el efecto que se desea conseguir. Para la mayoría de los casos, es suficiente usar filtros de matriz. Pero, es necesario puntualizar que, con éstos, es más fácil establecer efectos en las gamas rojas y violetas, que en las verdes y amarillas. En lo concerniente a efectos de relieve, las matrices son ideales y es más sencillo asignar valores, que con los otros métodos. A tenor de nuestra experiencia, el programa ideal, dada su rica matriz y la posibilidad de discriminación de canales RGB es, Paint Shop Pro (aparte de realizar uno mismo el aplicativo...).

En algunos casos, es necesario trabajar con tonalidades específicas donde la gradación del color es crítica, a la par que éstas y sus combinaciones, son difíciles de conseguir. Igualmente, puede suceder, que resulte complejo traducir el efecto que realmente se desea lograr, a la necesaria aritmética matemática de la imagen para aplicar matrices y resulte dificultoso, razonar en términos de algoritmia de convolución. Los efectos de emulación de visión del microscopio con prisma de nicol, los de contraste de fase, la visión en campo oscuro, fluorescencia, la emulación del microscopio electrónico de barrido, etc., son complejos de efectuar con matrices, imposibles con mapas de gradientes y relativamente sencillos con curvas. Cuando se necesitan transiciones tonales muy delicadas y variaciones mínimas, el trabajo con curvas, es convincente en todo tipo de gamas. El complemento más completo y sencillo es el que ofrece PhotoShop.

Con respecto a los mapas de degradado, su aplicación se circunscribe a conseguir espectaculares efectos de tinción digital, fuera del ámbito de la emulación de las tinciones químicas. Cuando se necesita trabajar con gamas de colores puros y sus complementarios, si se necesita un exacerbado contraste entre tonalidades, o se desea un efecto digital artificial, propio de la imagen informática, sin ningún género de dudas, por su fácil manejo y comodidad, conviene utilizar mapas de gradaciones. El aplicativo recomendable y más cómodo para realizar estas operaciones es PhotoShop.

Para realizar tinciones digitales, discriminación de tejidos y acotación de zonas puntuales de manera manual, sirve cualquier programa de los citados que posea matriz de convolución o curvas y discriminación de canales RGB. Si perseguimos automatización, lo más conveniente es utilizar el complemento de rotación de mapas de Gimp (véase anexo XIII).

XX. Código deontológico de manipulación digital

Dado que las manipulaciones digitales son amplias y variadas y pueden modificar ostensiblemente la información respecto a la imagen original, proponemos el siguiente código deontológico de pautas de actuación:

Art. 1. Cualquier imagen, o representación de un todo, o una estructura procedente de material biológico procesada por medios de manipulación digital, debe ser fidedigna con respecto al material original.

Art. 2. Cualquier imagen, o representación de un todo o una estructura procedente de material biológico procesada por medios de manipulación digital que presente cambios relevantes con respecto al material original en su color, forma o composición plástica, debe de citarse como alterada digitalmente.

Art. 3. No se realizarán procesos de manipulación digital en forma o color cuando éstos alteren, camuflen o desvíen el valor morfológico o taxonómico del todo, parte, o fragmento de la estructura original.

Art. 4. No se realizarán procesos de manipulación digital en forma o color, sobre de material fotográfico con valor histórico, cuando se alteren las características gráficas del original.

Art. 5. De realizarse procesos de manipulación digital en forma o color, sobre material fotográfico con valor histórico, estas actuaciones estarán encaminadas a la restauración y mejora de las características gráficas del original.

Art. 6. No se realizarán procesos de manipulación digital en forma o color, sobre material fotográfico con valor histórico, ni siquiera si estas actuaciones estén encaminadas a la restauración y mejora de las características gráficas del original, cuando no exista material documental sobre los que basar las pautas y fijar los criterios de actuación.

Art. 7. Ante la necesidad de efectuar procesos de manipulación digital en forma o color, sobre material fotográfico con valor histórico y cuando se cumplan, las condiciones expuestas en los artículos, 4, 5 y 6, el material resultante se citará como restaurado o alterado digitalmente.

Art. 8. Ante la necesidad de efectuar procesos de manipulación digital en forma o color, sobre material fotográfico con valor histórico, se utilizarán convenios plásticos coherentes, con el fin de salvaguardar el valor estilístico de la imagen original.

Art. 9. Los procesos de tinción y manipulación digital se utilizarán a efectos de clarificar determinados aspectos de un todo o una estructura, con fines exclusivamente descriptivos o pedagógicos.

Art. 10. No se realizarán fotocomposiciones de preparaciones a partir de estructuras pertenecientes a especímenes de distinto sexo.

Art. 11. No se realizarán fotocomposiciones de preparaciones a partir de estructuras pertenecientes a diferentes especímenes, incluso del mismo sexo, excepto cuando el valor descriptivo o pedagógico lo requiera, siempre y cuando se cite taxativamente.

Art. 12. En el caso de realizar fotocomposiciones a partir de las preparaciones de un mismo espécimen y sexo, se especificarán de manera clara y concisa el/ los motivos de esta forma proceder.

Art. 13. No se rellenarán lagunas o se completarán estructuras digitalmente, cuando en la preparación original no existan.

Art. 14. Ante la necesidad de efectuar procesos de manipulación digital, en el sentido de completar estructuras inexistentes en las preparaciones originales, únicamente con fin descriptivo y / o pedagógico, se diferenciará de manera clara y concisa el tipo de trazo, dibujo y color de las partes afectadas en comparación con las partes originales que se conservan.

Art. 15. Si se realizan procesos de manipulación digital, en el sentido de completar estructuras inexistentes en las preparaciones originales y cuando se cumplan, las condiciones

expuestas en los artículos, 8, 9 y 14 se valorarán, concretarán y citarán de manera concluyente, las manipulaciones efectuadas.

Art. 16. Se recomienda no utilizar herramientas o sistemas de clonación o, en su defecto, aplicarlas sólo cuando es estrictamente necesario para señalar o remarcar zonas, con fines exclusivamente informativos.

Art. 17. Si se realizan procesos de manipulación digital, en el sentido de clonar estructuras para dibujar partes inexistentes en las preparaciones originales y cuando se cumplan, las condiciones expuestas en los artículos, 8, 9, 14 y 16, se concretarán y citarán de manera concluyente las manipulaciones efectuadas. Se delimitarán de forma clara y evidente, por medio de líneas o de cualquier otra manera, especificando qué parte del todo corresponde a zonas clonadas (fig. 31).



Fig. 31. Imagen original y clonada. En la de la derecha se debería especificar: "Imagen aclarada digitalmente con zonas de clonación delimitadas".

CONCLUSIONES

Utilizando los sistemas de tinción digital de matriz, curvas y gradación, se pueden realizar combinaciones infinitas de cambio de color (fig. 32-67, anexos VII-IX). Es posible emular digitalmente los efectos de la mayoría de las tinciones químicas. En lo referente a corrección de defectos como el de la falta de foco, es muy sencillo recuperar estas imágenes. No obstante, del mismo modo que para la químicas es necesario poseer conocimientos del comportamiento de los cromógenos, decolorantes y las estructuras a las que se van aplicar los tratamientos, para trabajar con tinciones digitales es necesario conocer someramente diversas materias. Es importante poseer unas básicas nociones de informática y aplicaciones de retoque fotográfico. Si se desean realizar operaciones con algoritmia, aritmética de la imagen y programación, estos conocimientos se deberán extender al conocimiento de un lenguaje para aplicativos y ligeras nociones de matemáticas básicas aplicadas a la programación.

Las tinciones digitales se pueden aplicar a todo tipo de preparaciones microscópicas y por extensión a todo tipo de fotografías biológicas. No existen limitaciones con respecto al método de inclusión. Recordemos que, el montaje en medio hidrosoluble impone ciertas restricciones de coloración química (Magro, 2002: 215, anexo VI). La persona que realice las operaciones de matriz, degradado o curvas, utilizando los datos de los anexos VIII, IX, X y XI, que se incluyen en la parte final de este trabajo, debe de estar en disposición de conseguir resultados excelentes con un período de aprendizaje y asimilación de nomenclatura, irrisorio. Los requerimientos informáticos y logísticos son mínimos, pudiéndose aplicar estos efectos bajo diferentes plataformas, sistemas operativos y software de libre distribución (véase Mateos, 2008). El motivo por el cual nos hemos decantado por los filtros de matrices es, precisamente, que es un sistema prácticamente universal y uno de los más antiguos

para la aplicación de efectos digitales, habiendo demostrado, sin ningún género de dudas, su robusta arquitectura, fiabilidad y supervivencia en diversos entornos. Tengan una denominación u otra, casi todas las fórmulas para efectos digitales, se basan en técnicas más o menos sofisticadas y evolucionadas a partir de la algoritmia de convolución.

Otro factor a tener en consideración es el tiempo que se tarda en realizar la tinción digital comparándolo con el procesado químico. Nosotros hemos realizado esta evaluación llegando a componer 100 variaciones de tinciones digitales diferentes en 60 minutos. Como es obvio, esto supone una gran ventaja de las tinciones digitales frente a las químicas.

No deseamos concluir sin apostillar que, muchas de las sustancias que se emplean en la tinción química son tóxicas y plantean problemas de biodegradación, es en este sentido, en el cual deberíamos realizar un mayor esfuerzo en el desarrollo de técnicas y algoritmia para la tinción digital. En cualquier caso, no ignoramos que, con nuestros equipos informáticos nos enfrentamos a problemas de gasto energético pero, al fin y al cabo, se deberá tender a ocasionar, dentro de los males, el de menor impacto.

Posibles líneas de investigación futura

Se da la circunstancia de que existen muy diversas maneras y diferentes combinaciones numéricas así como de algoritmia, para la aplicación de efectos digitales. Somos plenamente conscientes de que, la lista de códigos para filtros que se propone en este trabajo, dista mucho de ser exhaustiva. Para la consecución del mismo, primero hemos estudiado los efectos de los químicos cromógenos en diversos y variados tejidos, para de esta manera y con conocimiento de causa, evolucionar un código digital cuyo comportamiento en el sentido del color sea similar al químico. Nuestras nociones en lo concerniente a tinciones químicas son, ciertamente

limitadas y de éstas se derivan las condiciones imprescindibles para el desarrollo de la algoritmia de emulación. En este sentido, sería muy interesante desarrollar nuevos filtros digitales. En cualquier caso, la conclusión final de una determinada fórmula siempre es empírica, es decir, para desarrollar algunas emulaciones, el código es ciertamente variado. Cabe citar, por ejemplo, que, en la realización de la emulación de la tinción química con azul de metileno, hemos compendiado la que consideramos más sintética de entre más de veinte variaciones y fórmulas diferentes. En investigaciones futuras, es necesariamente deseable que el código ideado sea poseedor de una muy apreciada característica: la máxima simplificación.

Agradecimiento

A M. Díaz y a J. Davies por su particular paciencia en la lectura y crítica razonada del manuscrito original.

Bibliografía

- GARCÍA ZUBÍA, J. & I. ANGULO MARTÍNEZ & J. M^a. ANGULO USATEGUI 2007. *Sistemas Digitales y tecnologías de computadoras*. Thomson. Madrid. 437 pp.
- Magro, R. 2002. Técnicas de preparación microscópica, tinción e inclusión para dermatopsias en los lepidópteros. (Insecta: Lepidoptera). *Boln. S.E.A.*, **31**: 205-216.
- MATEOS BARRADO, J F. 2008. *Edición de medios digitales con software libre*. Anaya. Madrid. 400 pp.
- MARTÍNEZ, I. 2002. Técnicas básicas de anatomía microscópica y de morfometría para estudiar insectos. *Boln. S.E.A.*, **30**: 187-195.
- PADOVA, T. & D. MASON 2006. *Corrección del color*. Anaya. Madrid. 476 pp.
- PALMA MENDEZ, J. T. & M^a. DEL C. GARRIDO CARRERA & F. SÁNCHEZ FIGUEROA & A. QUESADA AREMIBIA 2003. *Programación concurrente*. Thomson. Madrid. 300 pp.

ANEXOS

Anexo I. Seudo código para insertar un archivo de imagen en una matriz.

```

Global PG (0 to Valor1, 0 to Valor2, 0 to Valor3) [Tipo]
Principio ProcedimientoInsertar()
//Declaraciones
x = [Formulario].[Control].[PropiedadEscalaAncho]
y = [Formulario].[Control].[PropiedadEscalaAlto]
If x > Valor3 Or y > Valor3 //Controlar desbordamiento
    x = 0 : y = 0
    [Salir Rutina]
else
    For (i = 0) To (y-1)
        For (j = 0) To (x-1)
            Pixel = [Formulario].[Control].[PropiedadPunto(j, i)]
            R = Pixel Mod 256 : G = ((Pixel AND &HFF00) / 256) Mod 256
            B = (Pixel AND &HFF0000) / 65536 : PG(0, i, j) = R
            PG(1, i, j) = G : PG(2, i, j) = B
        Next //Control de carga
    Next
Endif //Control de errores
Final Procedimiento

```

Anexo II. Seudo código para un algoritmo de desenfoque por convolución.

Principio ProcedimientoDesenfoque()

```
//Declaraciones
For i = 1 To YFil - 2
  For J = 1 To XFil - 2
    R = PG(0, i - 1, J - 1) + PG(0, i - 1, J) + PG(0, i - 1, J + 1) + PG(0, i, J - 1) + PG(0, i, J) + _
      PG(0, i, J + 1) + PG(0, i + 1, J - 1) + PG(0, i + 1, J) + PG(0, i + 1, J + 1)
    G = PG(1, i - 1, J - 1) + PG(1, i - 1, J) + PG(1, i - 1, J + 1) + PG(1, i, J - 1) + PG(1, i, J) + PG(1, i, J + 1) + _
      PG(1, i + 1, J - 1) + PG(1, i + 1, J) + PG(1, i + 1, J + 1)
    B = PG(2, i - 1, J - 1) + PG(2, i - 1, J) + PG(2, i - 1, J + 1) + PG(2, i, J - 1) + PG(2, i, J) + PG(2, i, J + 1) + _
      PG(2, i + 1, J - 1) + PG(2, i + 1, J) + PG(2, i + 1, J + 1)
    [Formulario].[Control].[PropiedadPunto](J, i), [Parametro.RGB](R / 9, G / 9, B / 9)
  Next
Next //Control de errores
Final Procedimiento
```

Anexo III. Seudo código para un algoritmo de enfoque por convolución.

Principio ProcedimientoEnfoque()

```
//Declaraciones
DF = FuncionTipoNumerico([Formulario].[Control].[PropiedadTexto])
For i = 1 To YFil - 2
  For J = 1 To XFil - 2
    R = IP(0, i, J) + DF * (IP(0, i, J) - IP(0, i - Dx, J - Dy))
    G = IP(1, i, J) + DF * (IP(1, i, J) - IP(1, i - Dx, J - Dy))
    B = IP(2, i, J) + DF * (IP(2, i, J) - IP(2, i - Dx, J - Dy))
    If R > 255 : R = 255 : endif : If R < 0 : R = 0 : endif
    If G > 255 : G = 255 : endif : If G < 0 : G = 0 : endif
    If B > 255 : B = 255 : endif : If B < 0 : B = 0 : endif
    [Formulario].[Control].[PropiedadPunto](J, i), [Parametro.RGB](R, G, B)
  Next
Next //Control de errores
Final Procedimiento
```

Anexo IV. Seudo código para un algoritmo de relieve por convolución.

Principio ProcedimientoRelieve()

```
//Declaraciones
RL = FuncionTipoNumerico([Formulario].[Control].[PropiedadTexto])
For i = 1 To YFil - 2
  For J = 1 To XFil - 2
    R = [Abs](IP(0, i, J) - IP(0, i + Dx, J + Dy)) + RL
    G = [Abs](IP(1, i, J) - IP(1, i + Dx, J + Dy)) + RL
    B = [Abs](IP(2, i, J) - IP(2, i + Dx, J + Dy)) + RL
    [Formulario].[Control].[PropiedadPunto](J, i), [Parametro.RGB](R, G, B)
  Next
Next //Control de errores
Final Procedimiento
```

Anexo V. Seudo código para la realización de un filtro universal de α matriz.

Principio ProcedimientoFiltroUniversal(Roj, Verd, Azu)

```
//Declaraciones
For i = 0 To 4
  For J = 0 To 4
    FiltroUsuario(i, J) = FuncionTipoNumerico([Formulario].[Control].[PropiedadTexto](Indice))
  Next
Next
FiltroNombre = FuncionTipoNumerico([Control])_ FiltroBias = FuncionTipoNumerico([Control].[PropiedadTexto])
relieve = FuncionTipoNumerico([Formulario].[Control].[PropiedadTexto])
For i = Offset To (YFil + 4) - Offset - 1
  For J = Offset To (XFil + 4) - Offset - 1
    SumaR = 0: SumaG = 0: SumaB = 0
    For fi = -Offset To Offset
      For fj = -Offset To Offset
        SumaR = SumaR + IP(Roj, i + fi, J + fj) * FiltroUsuario(fi + 2, fj + 2)
        SumaG = SumaG + IP(Verd, i + fi, J + fj) * FiltroUsuario(fi + 2, fj + 2)
        SumaB = SumaB + IP(Azu, i + fi, J + fj) * FiltroUsuario(fi + 2, fj + 2)
      Next
    Next
    R = Abs(SumaR / FiltroNombre + FiltroBias)
    G = Abs(SumaG / FiltroNombre + FiltroBias)
    B = Abs(SumaB / FiltroNombre + FiltroBias)
    [Formulario].[Control].[PropiedadPunto](J, i), [Parametro.RGB](R, G, B)
  Next
Next //Control de errores
Final Procedimiento
```

Anexo VI. Seudo código de discriminación de canales por medio de variables globales.

```

Global CanalR , CanalG, CanalB
Principio ProcedimientoDiscriminaciónRGB()
//Declaraciones
CanalR = ([Formulario].[Control].[PropiedadValor])(Indice)
CanalG = ([Formulario].[Control].[PropiedadValor])(Indice)
CanalB = ([Formulario].[Control].[PropiedadValor])(Indice)
[Llamada]ProcedimientoFiltroUniversal(CanalR, CanalG, CanalB)
//Control de errores
Final Procedimiento
    
```

Anexo VII. Tipos de imagen y efectos aplicables.

Tipos de imagen	Características originales	Tinción y técnica digital aplicable
Cápsulas cefálicas	Correcta	Mapa de degradado- Relieve.
Cualquiera	Con efecto muaré	Desenfoque- Curvas
Cualquiera	Demasiada profundidad de campo	Enfoque- Relieve- Filtro matriz- Reiteración
Cualquiera	Demasiado clara	Oscurecer con filtro matriz y enfoque- Curvas
Cualquiera	Demasiado contraste	Aclarar y desaturar con filtro matriz- Enfoque- Discriminación de canales- Reiteración- Curvas
Cualquiera	Demasiado difuminada	Enfoque- Relieve- Filtro matriz- Reiteración- Curvas
Cualquiera	Demasiado gris y clara	Discriminación de canales- Reiteración- Enfoque- Curvas
Cualquiera	Demasiado oscura	Aclarar con filtro matriz y enfoque
Cualquiera	Demasiado perfilada	Desenfoque- Curvas
Cualquiera	Demasiado pixelada	Releer mejorando y aplicar filtro matriz- Desenfoque
Cualquiera	Demasiado saturada	Aclarar y desaturar con filtro matriz- Enfoque- Discriminación de canales- Reiteración- Curvas
Cualquiera	Desenfocada	Enfoque
Cualquiera	Plana	Relieve- Filtro matriz- Reiteración
Cualquiera	Sin contraste	No aplicable- Curvas
Cualquiera	Sin profundidad de campo	Relieve- Filtro matriz- Reiteración
Cualquiera	Tramada	Desenfoque
Escleritos al natural	Correcta	Mapa de degradado- Filtros de matriz- Enfoque- Relieve- Reiteración- Discriminación de canales- Curvas
Escleritos con tinción química	Correcta	Mapa de degradado
Genitalias	Correcta	Mapa de degradado- Filtros de matriz- Enfoque- Relieve- Reiteración- Discriminación de canales
Otros órganos muy quitizados	Correcta	Mapa de degradado
Otros órganos poco quitinizados	Correcta	Mapa de degradado- Filtros de matriz- Enfoque- relieve- Reiteración- Discriminación de canales- Curvas
Piel larval muy quitinizada	Correcta	Mapa de degradado
Piel larval poco quitinizada	Correcta	Mapa de degradado- Filtros matriz- Enfoque- Discriminación de canales- Curvas

Anexo VIII. Tinciones digitales, α y β matriz.

*Las celdas sombreadas en gris claro tienen representación gráfica en este artículo.

Nº	Tipo	Denominación del efecto	Código de la matriz
1	Híbrido	Decolorado + fucsina + metileno alto contraste (fig. 34)	β c CD48150RB
2	Híbrido	Microscopio con filtro rojo + tinción índigo (fig. 35)	β b2 Δ 240GB
3	Híbrido	Microscopio con filtro rojo + tinción índigo + relieve	β b2 db4 D4 Δ 204GB
4	Emulación	Alto contraste (fig. 33)	β C D8190
5	Emulación	Azul de metileno	β C D38240B
6	Emulación	Azul de metileno + fucsina (fig. 36)	β c D38240G
7	Emulación	Azul de metileno + negro de clorazol (fig. 37)	β c D38240RG
8	Emulación	Azul de metileno en campo oscuro	β c db2 D2 Δ 200
9	Emulación	Azul de toluidina	β CA200B
10	Emulación	Azul de toluidina suave	β CA140B
11	Emulación	Decolorado + tinción con fucsina + negro de clorazol	β cb CD38220G
12	Emulación	Decolorado + tinción con hematoxilina	β cb CD48350RB
13	Emulación	Decolorado + tinción con mercurcescina	β cb CD38150RB
14	Emulación	Decolorado + tinción con negro de clorazol	β cb CD48350RG
15	Emulación	Decolorado con alto contraste	β cb CD38150RG
16	Emulación	Fucsina + mercurcescina	β C D28240RB
17	Emulación	Hematoxilina	β C DB4 D58150R
18	Emulación	Mercurcescina + negro de clorazol (fig. 38)	β C6/4R
19	Emulación	Mercurcescina sódica	β C db4 D68170R

Nº	Tipo	Denominación del efecto	Código de la matriz
20	Emulación	Microscopio con filtro amarillo	$\beta\Delta 90B$
21	Emulación	Microscopio con filtro amarillo + tinción azul de metileno	$\beta c2\Delta 470B$
22	Emulación	Microscopio con filtro beige	$\beta C13/21\Delta 17B$
23	Emulación	Microscopio con filtro cian	βR
24	Emulación	Microscopio con filtro cian + tinción mercurceséina	$\beta c2\Delta 590R$
25	Emulación	Microscopio con filtro magenta	βG
26	Emulación	Microscopio con filtro rosa	$\beta C14/19\Delta 15GB$
27	Emulación	Microscopio con filtro violeta	$\beta C14/21\Delta 17RG$
28	Emulación	Microscopio de fluorescencia con filtro amarillo	$\beta c2 dc3\Delta 590B$
29	Emulación	Microscopio fluorescencia verde con filtro magenta	$\beta db5 D5G$
30	Emulación	Negro de clorazol	$\beta c db D3830$
31	Emulación	Negro de clorazol suave + decolorado	$\beta c db D3\Delta 30B$
32	Emulación	Orceína + fucsina	$\beta C14/8RB$
33	Emulación	Orceína acética suave	$\beta C12/10R$
34	Emulación	Orceína muy suave	$\beta C11/10RB$
35	Emulación	Verde He (fig. 39)	$\beta C2 db4 DC58430R$
36	Emulación	Verde He + Cúrcuma	$\beta C2 db4 DC58430RB$
37	Emulación	Vigencial (fig. 40)	$\beta D48190B$
38	Emulación	Vigencial + azul de metileno	$\beta C db3 D5B$
39	Emulación	Violeta genciana + azul metileno suave	$\beta CA90B$
40	Digital	Aclarar	$\beta C \Delta 20$
41	Digital	Aclarar perfilando	$\beta bc cb C CD DCA20$
42	Digital	Aclarar saturando	$\beta C2 \delta 100$
43	Digital	Contraste suave	$\beta cb2 C CD4/2880$
44	Digital	Decolorado con alto contraste	$\beta cb2 CD48150$
45	Digital	Fase XOR (fig. 41)	$\beta b7 CB3 C2 D\Delta 300$
46	Digital	Fase XOR fuerte y oscura	$\beta b9 CB3 C2 D2\Delta 300$
47	Digital	Fase XOR oscura	$\beta b7 CB3 C2 D\Delta 230$
48	Digital	Fase XOR perfilada	$\alpha b7 ca2 CB3 C2 CD D\Delta 380$
49	Digital	Fase XOR perfilada contraste fuerte	$\alpha bc bd2 CA cb4 CD4 dc6 D2\Delta 1010$
50	Digital	Hallar regiones	$\beta CD48690$
51	Digital	Máscara de fondos media (fig. 42)	$\beta bc bd2 c5 CD6 dc3/3\Delta 450$
52	Digital	Microscopio con filtro magenta + tinción verde HE	$\beta b\Delta 230G$
53	Digital	Microscopio con filtro magenta + tinción verde HE + relieve	$\beta b db4 D4\Delta 200G$
54	Digital	Negativo con filtro azul (fig. 43)	$\beta cb c CDA\Delta 270RG$
55	Digital	Negativo con filtro magenta	$\beta cb c CDA\Delta 270G$
56	Digital	Negativo con filtro rojo	$\beta cb c CDA\Delta 270GB$
57	Digital	Oscurecer	$\beta C \delta 40$
58	Digital	Oscurecer perfilando	$\beta bc CB C cd DC\delta 40$
59	Digital	Perfilar y contrastar	$\beta c db D3830$
60	Digital	Prisma fuerte	$\beta bc C cd5 DBA900$
61	Digital	Prisma perfilado suave	$\beta bd2 c cd5 DB D2/2\Delta 400$
62	Digital	Quitar contraste	$\beta cb CD2/2\Delta 70$
63	Digital	Relieve fondo rosa (fig. 44)	$\beta cb6 C CD5\Delta 110G$
64	Digital	Relieve fondo violeta (fig. 45)	$\beta cb6 C CD5/\Delta 90RG$
65	Digital	Relieve gris (fig. 46)	$\beta cb6 C CD5\Delta 150$
66	Digital	Relieve perfilado negativo oscuro	$\alpha ca6 CB C3 CD/2\Delta 120$
67	Digital	Relieve perfilado negativo fuerte	$\alpha ca6 CB C3 CDA\Delta 190$

*Las celdas sombreadas en gris claro tienen representación gráfica en este artículo.

Anexo IX. Tinciones digitales por mapa de degradado, α , β , γ .

Nº	Tipo	Denominación del efecto	Código del gradiente
68	Digital	Arco iris directo	$\beta CKMRYB$
69	Digital	Arco iris inverso (fig. 47)	$\beta BYRMKC$
70	Digital	Blanco y negro	βWK
71	Digital	Blanco y negro negativo	βKW
72	Digital	Complementario sustractivo azul	$\alpha Y0cyb$
73	Digital	Complementario sustractivo azul naranja	$\beta y00bW$
74	Digital	Complementario sustractivo rojo	$\gamma ROM0b00CGYR$
75	Digital	Complementario sustractivo verde	$\beta CbMRYg$
76	Digital	Fase argénteo	$\beta kW0kWK$
77	Digital	Fase áurea	$\beta kW0yRk$
78	Digital	Fase cúprica (fig. 48)	$\beta kW0ygb$

*Las celdas sombreadas en gris claro tienen representación gráfica en este artículo.

Anexo X. Tinciones digitales por curva.

Nº	Tipo	Denominación del efecto	Código de la curva
79	Híbrido	Azul metileno + fucsina alto contraste	scb 171-255 Rc 100-0 b 192-255 Gc 141-0 b (fig. 49)
80	Híbrido	Carmín alumbre + verde yodo nicol	ec 96-185 199-38 b 230-0 Bc 92-146 b
81	Híbrido	Decolorado + contraste	ec 59-0 b 189-255
82	Híbrido	Decolorado + fucsina	sc Gc128-0 b
83	Híbrido	Mic. filtro amarillo azul de toluidina	scBc 255 d
84	Híbrido	Mic. fluorescencia cian + mercurseína	scRc 82-255 d
85	Híbrido	Mic. fluorescencia magenta + verde HE	scGc 88-168 b 170-0
86	Híbrido	Microfluorescencia azul campo oscuro	sc 25-110 74-51 197 dBc 14-88 71-218 b (fig. 50)
87	Híbrido	Microfluorescencia verde campo oscuro	ec 28-116 77 200 dGc 77-219 b 188-255
88	Híbrido	RAL azul de metileno + fucsina	ec 33-166 52-74 139-172 192-216 d (fig. 51)
89	Híbrido	Tinc. nigrosina camp. oscuro + cúrcuma	scadBc 92-184 173-121 b
90	Híbrido	Violeta de genciana complejo (fig. 52)	sc 111-65 bRc 84-128 bGc 77-0 125-86 bBc 68-146 b
91	Emulación	Azul de metileno (fig.53)	scRc 133-0 bGc 81-0 b
92	Emulación	Azul de metileno + mercurseína	scRc 152-16 b 201-237 Gc 77-0 b (fig. 54)
93	Emulación	Azul de toluidina	scBab
94	Emulación	Decolorado + Eosina (fig. 55)	sc 81-9 bRc 55-253 b 87-216 Bc 0-31 b
95	Emulación	Hemalum de Mayer (fig. 56)	scRc b 178-255 Ba 119-129 b
96	Emulación	Hematoxilina + Verde HE	scRc 73-207 165-150 b
97	Emulación	Hematoxilina de Heidenhain	scRc 72-204 141-177 b 204-238
98	Emulación	Mercurseína + negro de clorazol	ec 115-20 bRc 24-102 b 189-255 (fig. 57)
99	Emulación	Mercurseína + verde HE fuerte	scRc 49-173 212-132 b (fig. 58)
100	Emulación	Mercurseína sódica	scRcb 168-255
101	Emulación	Negro de eriocromo	scGc 61-0 b
102	Emulación	Orceína + Verde HE suave	scRc 164-176 212-132 b
103	Emulación	Picrocarmín	scGc 106-13 bB 143 b
104	Emulación	Reactivo de Herzberg (fig. 59)	scRa 55-131 93-249 128-114 156-193 d
105	Emulación	Safranina + azul de metileno (fig. 60)	scRc 139-130 b 181-255
106	Emulación	Tinción al ácido Pírico	scBc 143-0 b
107	Emulación	Tinción de Breed-Newman	scBa 12-159 71-243 151-142 205-222 b
108	Emulación	Tinción de Fontana-Tribondeau	sc 121-0 bRc 107-121 bBcb 255-211
109	Emulación	Tinción de Giemsa	scRc 93-206 b 107-255 Gc 90-0 b 205-200 Bcb 206-192
110	Emulación	Tinción de Gram (fig. 61)	scRc 127-0 b 160-255 Bcb 130-234
111	Emulación	Tinción de Lemberg (fig. 62)	scBc 40-102 65-226 108-3 148-249 215-135 b
112	Emulación	Tinción de Tribondeau	sc 37-2 bRc 102-107 bBc 0-183 94-112 b 255-174
113	Emulación	Tinción Lugol – Gram (fig. 63)	sc 117-0 bRc 140-165 b 172-255 Bc 0-230 132-175 b 181-252
114	Emulación	Tinción RAL contraste de fase	sc 22-20 54-113 d
115	Emulación	Tionina	scBc 235-220 b
116	Emulación	Verde HE	scRc 153-0 b 220-255
117	Emulación	Verde HE + orceína	scRc 120-173 189-99 b
118	Emulación	Verde Janus + Amarillo cúrcuma	scGc 90-51 b 144-230
119	Emulación	Vigencial	scBc 45 114-255 b
120	Emulación	Violeta de genciana + cúrcuma	scBc 133-0 b 171-255
121	Digital	Aclarar	scb 187-255
122	Digital	Contraste	sc 59-0 b
123	Digital	Negativo	scad
124	Digital	Negativo alto contraste	sc 97-255 d
125	Digital	Negativo bajo contraste	scab 255-102
126	Digital	Nicol cruzado con contraste de fase	sc 23-118 87-34 194-203 d (fig. 64)
127	Digital	Prisma de nicol cruzado	sc 30-189 116-29 135-189 232-113 b
128	Digital	Prisma de nicol fuerte (fig. 65)	sc 24-135 113-19 b 203-243
129	Digital	Prisma de nicol paralelo	sc 22-116 112-12 132-187 233-27 b
130	Digital	Prisma de nicol perfilado	sc 25-133 110-51 b
131	Digital	Prisma de nicol perfilado bordes	sc 40-236 127-6 b 207-255
132	Digital	Prisma de nicol perfilado XOR azul	sc 40-236 127-6 b 207-255 Bc 131-94 b
133	Digital	Prisma de nicol perfilado XOR rojo	sc 40-236 127-6 b 207-255 Rc 133-46 b
134	Digital	Prisma de nicol XOR azul	sc 24-135 113-19 b 203-243 Ba d
135	Digital	Prisma de nicol XOR azul XOR rojo	sc 24-135 113-19 b 203-244 Ga Ba d
136	Digital	Prisma de nicol XOR magenta (fig. 66)	sc 24-135 113-19 b 203-244 Rc 93-150 b
137	Digital	Prisma de nicol XOR verde	sc 24-135 113-19 b 203-244 Ga d 255-31
138	Digital	RAL negativo magenta	sc 22-20 54-113 dGc 111-173 b

*Las celdas sombreadas en gris claro tienen representación gráfica en este artículo.

Anexo XI. Efectos con reiteración.

N °	Tipo	Denominación del efecto	Código
139	Híbrido	Decolorado + fucsina + azul metileno alto contraste	$\beta_{cb} CD3\delta150RG + \beta_c CD4\delta150RB$
140	Híbrido	Vigencial + azul de metileno alto contraste	$\beta D4\delta190B + \beta D2\delta190$
141	Emulación	Análisis de fluorescencia	$\beta c2 dc3\Delta590B + \beta c2 dc6\Delta750GB$
142	Digital	Campo oscuro azul metileno + mercurceséina	$\beta c db2 D2\Delta200 + \beta C10/4R$
143	Digital	Contrastar vigencial y aplicar RAL contraste de fase	$\epsilon c59-0b + \beta D4\delta190B + \epsilon c22-20 54-113d$
144	Digital	Fase XOR positivo	$\beta b7 CB3 C2 D\Delta300 + \beta b7 CB4 C2 D\Delta300$
145	Digital	Perfilar y contrastar con prisma de nicol	$\beta c db D3\delta30 + \epsilon c 25-133 110-51b$
146	Digital	Relieve cian	$\beta cb6 C CD5\Delta150 + \beta cb6 C CD5\Delta150R$
147	Digital	Relieve luz amarilla	$\beta cb6 C CD5\Delta150 + \beta cb6 C CD5\Delta150B$
148	Digital	Relieve luz verde	$\beta cb6 C CD5\Delta150 + \beta cb6 C CD5\Delta150RB$
149	Digital	Relieve perfilado negativo canal rojo	$\alpha ca6 CB C3 CD/2\Delta190 + \beta \Delta200R$
150	Digital	Relieve perfilado negativo magenta	$\alpha ca6 CB C3 CD/2\Delta190 + \beta \Delta210RB$

Anexo XII. Invertir proceso.

Operación	Código
De negativo a positivo curvas	ϵcb
De negativo filtro rojo a negativo	$\beta cb c cd\Delta270R$
De oscurecer a aclarar	$\beta C\delta50$
De positivo a negativo curvas	ϵad
Deshacer canal azul	ϵBcb
Deshacer canal rojo	ϵRcb
Deshacer canal verde	ϵGcb
Deshacer conjunto RGB	ϵcb
Volver al original con curvas	$\epsilon cbRcbGcbBcb$
Volver al original en matriz	βC
De fluorescencia a vigencial	$\beta c2 dc3\Delta590B$

Anexo XIII. Métodos y sugerencia de aplicativo.

Métodos	Aplicativo
Matriz	Paint Shop pro
Curvas	Photoshop
Mapas de degradado	Photoshop
Rotación de mapas	Gimp

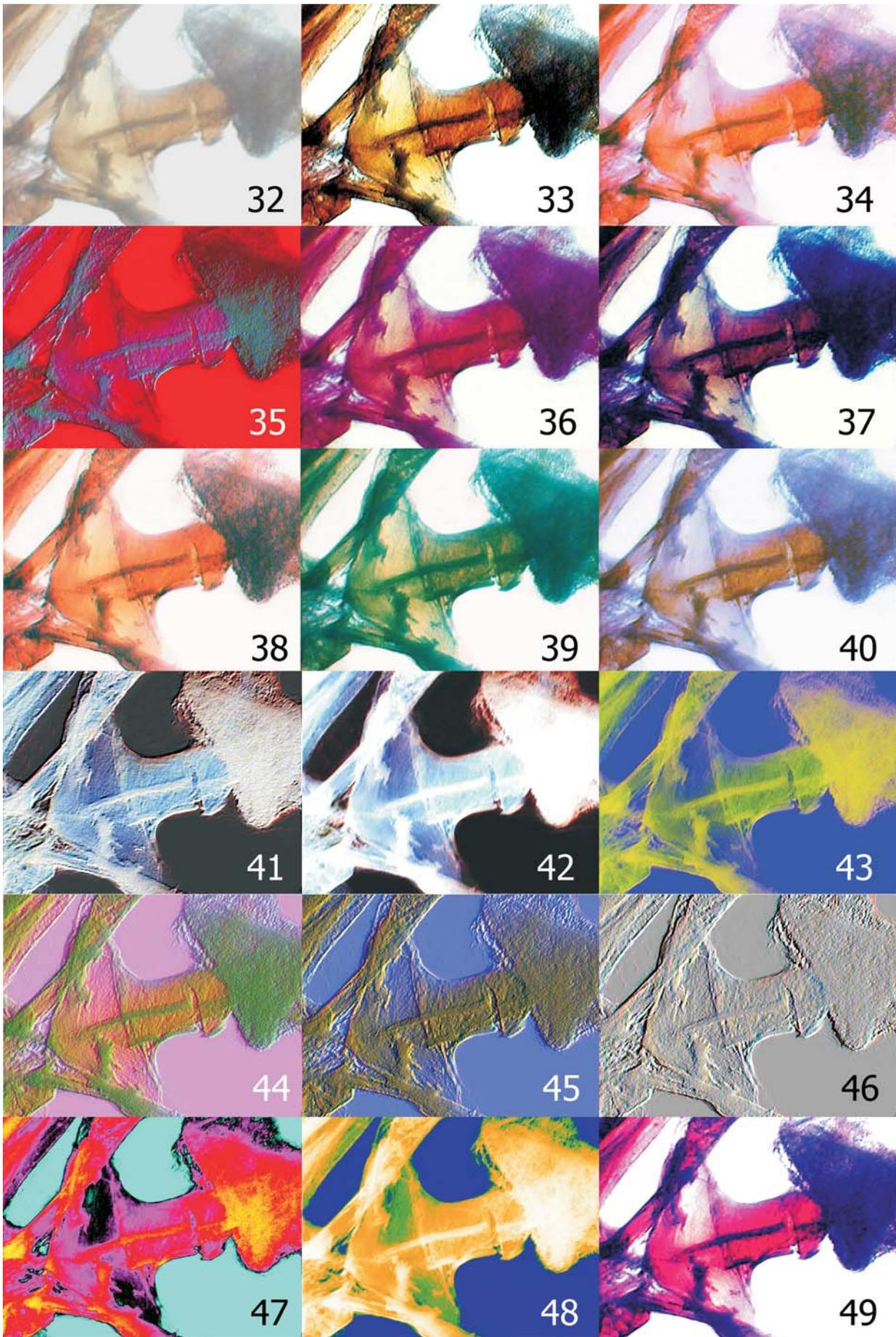


Fig. 32-49. Tinciones digitales. **33-46.** Matrices de convolución. **47-48.** Mapas de degradado. **49.** *escurvas*. **32.** Preparación original. Véanse referencias en los anexos: **33.** Nº 4. **34.** Nº 1. **35.** Nº 2. **36.** Nº 6. **37.** Nº 7. **38.** Nº 19. **39.** Nº 35. **40.** Nº 37. **41.** Nº 45. **42.** Nº 51. **43.** Nº 54. **44.** Nº 63. **45.** Nº 64. **46.** Nº 65. **47.** Nº 69. **48.** Nº 78. **49.** Nº 79.

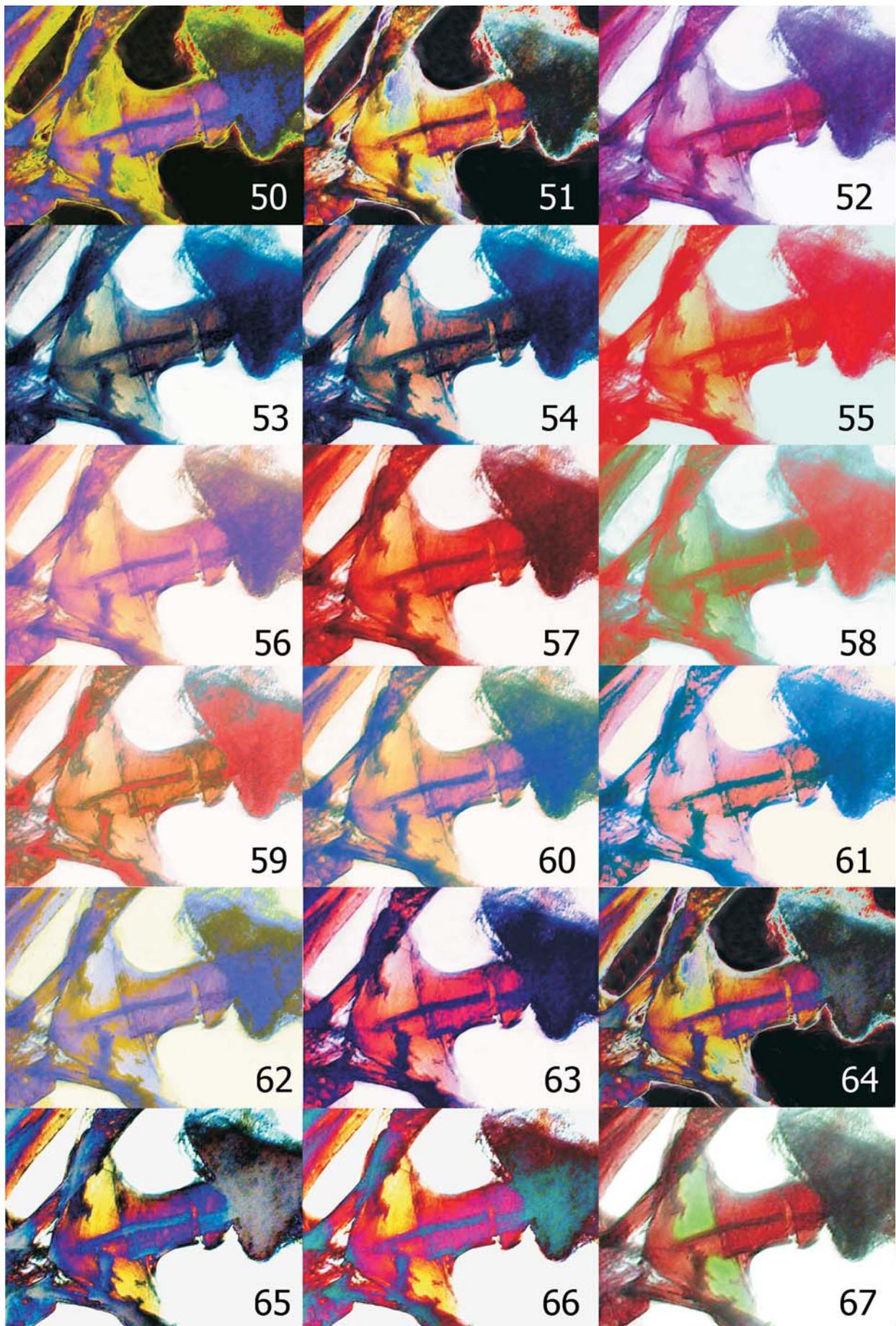


Fig. 50-67. Tinciones digitales. **50-66.** *ácurvas*. **67.** Rotación de mapa con reiteración por granates y por verdes. Véanse referencias en los anexos: **50.** Nº 86. **51.** Nº 88. **52.** Nº 90. **53.** Nº 91. **54.** Nº 92. **55.** Nº 94. **56.** Nº 95. **57.** Nº 98. **58.** Nº 99. **59.** Nº 104. **60.** Nº 105. **61.** Nº 110. **62.** Nº 111. **63.** Nº 113. **64.** Nº 126. **65.** Nº 128. **66.** Nº 136.