

True Confocal Scanner  
TCS SP2 de Leica

Manual del usuario

**Leica**  
MICROSYSTEMS

# Índice de contenidos

Índice de contenidos .....	2
Generalidades.....	5
Utilización de este manual.....	5
Novedades de esta versión del manual .....	7
Formación de imágenes confocales .....	8
Ayuda a través de Internet.....	10
Advertencias legales .....	11
Indicaciones de seguridad .....	13
Arranque del sistema operativo .....	29
Configuración de usuario.....	34
Puesta en servicio del sistema confocal .....	35
Ajuste de la iluminación Köhler .....	43
Cuidados y limpieza .....	45
El Leica Confocal Software: Visión general.....	47
Abertura y almacenamiento de bloques de datos .....	49
Teclas de aceleración.....	50
Funciones de menú .....	51
Formatos de archivo LCS .....	54
Especificaciones del formato de archivo "Lei" (versión beta 2.000) .....	56
Procedimiento y ejercicios sobre procesos seleccionados .....	65
Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen .....	65
Creación de lotes parámetros de captura (IPS) definidos por el usuario.....	73
Ajuste de los parámetros de captura con la consola de mando .....	79
Captura de series de imágenes espaciales .....	83
Captura de series de imágenes temporales.....	92
Captura de series Lambda (series de imágenes espectrales).....	101
Captura de series de imágenes secuenciales.....	109
Capturas de imágenes de zonas de interés (ROI Scan) .....	119
Enlace de imágenes individuales o series de imágenes .....	124
Separación de imágenes individuales o series de imágenes .....	131
Generalidades.....	135
Introducción a la ayuda del Leica Confocal Software.....	135
Apertura de la ayuda sensible al contexto .....	136
Funciones de captura de datos .....	137
Ajuste de la trayectoria de rayos.....	137
Ajuste del distribuidor de haz acústico-óptico (AOBS) (opcional).....	139
Selección del objetivo .....	141
Manejo del módulo del trípode del microscopio mediante el software.....	142
Ajuste de los detectores .....	145
Zoom electrónico .....	146
Exposición ampliada de un detalle de la imagen .....	148
Ajuste del diafragma de detección .....	148
Selección del formato de barrido .....	149
Selección del modo de barrido .....	150
Selección de la velocidad de barrido .....	151
Inicio del barrido único.....	152
Inicio del barrido continuo.....	152
Cuadro de diálogo Series Scan Overview.....	153
Definición del punto inicial de una serie espacial .....	154
Definición del punto inicial de una serie Lambda .....	154
Definición del punto final de una serie espacial .....	155
Definición del punto final de una serie Lambda.....	156
Determinación del número de cortes espaciales.....	156
Determinación del número de incrementos de longitud de onda.....	157
Importación de espectros de tinturas .....	158
Inicio del barrido de series.....	161
Configuración de secuencias de captura .....	163

Definición de un experimento de blanqueado .....	166
Selección del barrido unidireccional o bidireccional .....	168
Ajuste de la fase .....	169
Giro del campo de barrido .....	169
Adopción de parámetros de captura de un experimento .....	171
Captura de imágenes de una línea en una determinación de la media .....	171
Captura de imágenes en una transmisión a ráfagas .....	172
Captura de imágenes en una determinación de la media .....	172
Captura de imágenes en el procedimiento de acumulación .....	173
Captura de imágenes con una resolución digital de 8 ó 12 bits .....	173
Ajuste de la rueda de lente ultravioleta (opcional) .....	174
Selección de la línea de láser para el fondo de la imagen (ROI Scan) .....	174
Selección de líneas de láser para cada zona de interés (ROI Scan) .....	175
Control de la platina XY .....	175
Selección del accionador Z .....	178
Ajuste de la serie temporal .....	178
Funciones de la visualización de datos .....	180
Visor Viewer .....	180
Visualización de capturas como miniaturas en el navegador del experimento .....	182
Cuadro de diálogo Viewer Options .....	183
Visualización de los canales de detección .....	192
Zoom de las imágenes del visor Viewer .....	194
Selección de tablas de asignación de colores (LUT) .....	194
Representación de imágenes individuales .....	196
Representación de imágenes múltiples .....	196
Representación de imágenes en serie .....	197
Representación de imagen superpuesta .....	197
Representación de imagen superpuesta en RGB .....	198
Visualización de series de imágenes .....	199
Proyecciones .....	202
Creación de vistas tridimensionales .....	209
Visualización de la correlación de los canales de detección .....	212
Proceso de datos .....	213
Proyecciones tridimensionales y animaciones de series de imágenes .....	213
Operaciones aritméticas y booleanas .....	213
Conversión de la resolución en bits de las imágenes .....	218
Unión y separación de cortes de imágenes, imágenes y series de imágenes .....	219
Ajuste de la luminosidad, el contraste y la corrección Gamma .....	223
Ampliación del enfoque mediante proyecciones de lotes de imágenes en una imagen individual .....	226
Filtro lineal y filtro morfológico .....	228
Nivelado y filtrado de capturas superficiales .....	228
Identificación y separación de señales fluorescentes superpuestas .....	228
Segmentación de estructuras de imagen .....	236
Funciones de medida y análisis .....	236
Cálculo de un histograma .....	236
Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) .....	237
Medición de un perfil a lo largo de una distancia .....	239
Medición de superficies y volúmenes .....	240
Copia de gráficos de cuantificación a la página de presentación .....	241
Impresión de gráficos de cuantificación .....	241
Exportación de datos de cuantificación .....	242
Definición de una zona de interés (ROI) con forma de elipse .....	242
Definición de una zona de interés (ROI) con forma de polígono .....	243
Definición de una zona de interés (ROI) con forma de rectángulo .....	244
Definición automática de una zona de interés (ROI) .....	244
Marcado y desplazamiento de una zona de interés (ROI) .....	245
Desplazamiento y giro de una zona de interés (ROI) .....	246
Borrado de una zona de interés (ROI) .....	246
Documentación de datos .....	248
Creación de página de presentación .....	248

Copia de imágenes a la página de presentación .....	248
Trazado de líneas en la página de presentación.....	249
Trazado de un rectángulo en la página de presentación.....	249
Inserción de un campo de texto en la página de presentación.....	250
Impresión.....	250
Tratamiento de datos .....	252
Apertura de archivos .....	252
Almacenamiento de archivos.....	252
Almacenamiento de archivos como .....	252
Guardar todos los archivos.....	253
Creación de experimentos.....	253
Adaptaciones específicas del usuario .....	254
Control de funciones a través de la consola de mando.....	254
Almacenamiento del visor Viewer como plantilla .....	255
Paquete de programas opcionales .....	256
Materials (opcional) .....	256
Multicolor (opcional) .....	270
3D (opcional) .....	281
Apéndice.....	300
Función de adaptación para la corrección de tendencias .....	300
Funcionamiento de los enlaces booleanos .....	302
Panel de control opcional de activación .....	303
Glosario .....	305
Especificaciones .....	309
Peso y dimensiones del TCS SP2 de Leica .....	309
Declaración de conformidad.....	310
Índice .....	311



# Generalidades

## Utilización de este manual

### Acerca de este manual

El presente manual está concebido al mismo tiempo como método introductorio y como manual de referencia del TCS SP2 de Leica y está dirigido tanto a principiantes como a usuarios con experiencia. Si el usuario no ha utilizado nunca este aparato, debe comenzar por el capítulo "El software LCS", utilizar el software durante algún tiempo y, a continuación, leer el resto de capítulos del manual. Los usuarios con experiencia pueden consultar los capítulos, el índice de contenido y el índice, cuando deseen explicaciones sobre un tema determinado.

Este manual también aclara cómo interaccionan el Leica Confocal Software y el microscopio de Leica.

#### Cómo utilizar el presente manual

Se recomienda no sólo leer este manual, sino utilizarlo como libro de trabajo. Al mismo tiempo, también puede utilizarlo como método introductorio, con el fin de aprender a utilizar el Leica Confocal Software. Incluye toda una serie de tareas y su ejecución. Siga las instrucciones paso a paso para conseguir un aprendizaje lo más completo posible. Las instrucciones para la ejecución de determinadas tareas se indican en este manual mediante un título diferente.

#### Ejecución de tareas

Tras el título introductorio se incluye, bien el procedimiento para la ejecución de las tareas deseadas (es decir, instrucciones paso a paso), o bien se ofrecen diferentes opciones entre las que el usuario puede elegir:

1. Párrafos numerados como éste que contienen instrucciones paso a paso. Siga estas instrucciones para aprender el funcionamiento de la herramienta.
2. Cuando debe seleccionar varias opciones de menú seguidas, aparece entre cada opción una flecha: **File → Save**, por ejemplo, quiere decir que debe hacer clic en File (Archivo) y, seleccionar la opción Save (Guardar) en el menú emergente.

En general se indica una secuencia de pasos. Ejecute el paso o la secuencia indicados, a fin de poner en práctica la acción o las acciones deseadas.

Se recomienda leer este manual de nuevo tras haber utilizado el TCS SP2 de Leica durante algún tiempo. En una segunda lectura, encontrará prácticas funciones que había pasado por alto la primera vez.

#### Ayuda en línea

El TCS SP2 de Leica está dotado de un sistema de ayuda sensible al contexto que aclara las diferentes funciones del sistema.

El usuario puede buscar temas de ayuda determinados en el índice de contenidos de la ayuda en línea:

Haga clic en **Help → Contents**. Se carga la ayuda en línea y aparece el cuadro de diálogo CONTENTS (Contenido). Este cuadro de diálogo contiene el índice de contenido en forma de esquema de árbol que puede expandirse o reducirse. Haga doble clic en una entrada del índice para ver la información correspondiente.

Para buscar temas de ayuda determinados mediante una palabra clave:

Haga clic en **Help (Ayuda) → Index**. Se carga la ayuda en línea y aparece el cuadro de diálogo INDEX (Índice). Introduzca el término que desea buscar. La ayuda en línea muestra la palabra clave más similar al término indicado.

Para buscar temas de ayuda determinados mediante la búsqueda de texto completo:

Haga clic en **Help (Ayuda) → Search (Buscar)**. Se carga la ayuda en línea y aparece el cuadro de diálogo SEARCH (Buscar). Introduzca el término o la expresión que desea buscar y haga clic en la tecla de pantalla LIST TOPICS (Mostrar temas). Se muestra una lista de los temas organizada de forma jerárquica. A la derecha del campo en el que ha introducido el término o la expresión, se encuentra un menú en el que puede buscar los textos completos mediante operadores booleanos.

## Términos y modos de escritura

### Tecla

Se denominan teclas a las teclas de pantalla de la interfaz de usuario del Leica Confocal Software. Tienen un símbolo o una denominación en inglés (con frecuencia, abreviado). En algunos casos provocan directamente una acción y en otros, abren un cuadro de diálogo.

### Menú

Entre los menús, se encuentran las categorías File, View, Macro, Tools, Window y Help, que aparecen en la denominada barra de menús en el borde superior de la interfaz de usuario.

### Opción

Se denomina opciones a las posibilidades de selección que aparecen ordenadas jerárquicamente bajo los menús. En algunos casos provocan directamente una acción y en otros, abren un cuadro de diálogo.

### Cuadro de diálogo

Tanto las teclas como las opciones abren cuadros de diálogo. En ellos pueden ajustarse diversos parámetros o seleccionarse funciones.

### Registro

Los registros se encuentran en los cuadros de diálogo y ordenan por temas los parámetros y las funciones que pueden ajustarse en ellos. Algunos registros se subdividen en campos.

### Visor

El Leica Confocal Software dispone de dos tipos de visores: el visor Viewer se activa con la tecla New y muestra las imágenes tomadas. El visor Experiment Overview presenta las imágenes tomadas en un diagrama de árbol. Éste se activa en el menú View y se inserta como ventana independiente en el borde izquierdo de la interfaz de usuario.

### Leyendas

El Leica Confocal Software cuenta con dos tipos de leyendas con las que se muestran los parámetros y la configuración de la captura de una imagen. La leyenda Experiment puede insertarse en el borde derecho del visor Viewer. La leyenda Hardware se activa en el menú View y se inserta como ventana independiente en el borde derecho de la interfaz de usuario.

### Menú contextual

Los menús contextuales aparecen cuando se acciona el botón derecho del ratón en ciertos campos de la interfaz de usuario. Permiten el acceso a diversas órdenes contextuales.

## Novedades de esta versión del manual

- Ajuste de la luminosidad, el contraste y la corrección Gamma (capítulo Procesamiento de datos, página 223)
- Nivelado y filtrado de capturas superficiales (opcional) (capítulo Procesamiento de datos, página 228)
- Identificación y separación de señales fluorescentes superpuestas (capítulo Procesamiento de datos, página 228)
- Segmentación de estructuras de imagen (opcional) (capítulo Procesamiento de datos, página 295)
- Manejo del módulo del trípode del microscopio mediante el software (capítulo Funciones de la toma de datos, página 142)
- Importación y exportación de espectros de tintura (capítulo Funciones de la toma de datos, página 158)
- Selección del accionador Z (capítulo Funciones de la toma de datos, página 178)
- Representación gráfica de valores de medición de una medida en línea (capítulo Funciones de la representación de datos, página 187)
- Descripciones actualizadas de procesos de trabajo y ejercicios (capítulo Procedimientos y ejercicios sobre procesos seleccionados, página 65)

## Formación de imágenes confocales

### ¿En qué consiste la microscopía confocal?

Si bien se encuentra en estudio desde 1953, no ha sido hasta los últimos 10 años cuando la microscopía de barrido láser confocal se ha convertido en una técnica utilizada con frecuencia en la práctica. En la actualidad, es la técnica más utilizada en la investigación biológica, en la analítica química y en la examinación de material. Un dispositivo de este tipo aúna los resultados de una larga investigación con el desarrollo en diferentes ámbitos: microscopía, tecnología láser y óptica para luz coherente, tecnología de vídeo, electrónica y tecnología para ordenadores.

En la microscopía confocal se reconocen estructuras en las que la luz emitida o reflejada por una muestra se concentra en un solo plano focal y se superpone a toda la luz que no procede de dicho plano.

En un barrido puntual confocal, las lentes del microscopio enfocan la luz láser sobre un solo punto de la muestra (el **punto focal**). A continuación, el láser explora la muestra punto por punto y genera la imagen barrida. La fluorescencia y la luz reflejada por la muestra vuelven atravesando el objetivo.

El microscopio y el sistema óptico del módulo de barrido enfocan la luz emitida por el punto focal sobre un segundo punto, el **punto confocal**. A través de la pequeña abertura de este punto (denominada pinhole), la luz del punto focal llega hasta el detector. La luz que no procede de este foco no atraviesa la abertura.

El principio confocal se representa de forma esquemática para la microscopía de epifluorescencia.

Como en otros microscopios de epifluorescencia, la lente se utiliza al mismo tiempo como condensador y como objetivo. La gran ventaja es que desaparece la necesidad de equilibrar dos lentes con exactitud y ajustarlas entre sí. Un difusor de rayos (un espejo dicróico) refleja el rayo láser colimado y polarizado que se introduce a través de una ranura sobre la parte trasera de la lente del objetivo y lo enfoca sobre la muestra. La luz que refleja la muestra vuelve a atravesar la misma lente.

El rayo de luz se enfoca a través del pinhole (es decir, la ranura confocal) para excluir, de esta forma, la luz extrafocal, es decir, la emitida por zonas de la muestra que están por encima o por debajo del plano focal. El volumen del corte óptico depende de diferentes parámetros como el diámetro (variable) de la abertura y la longitud de onda. Un detector sensible a la luz (por ejemplo un fotodiodo) colocado tras la abertura confocal registra los datos intrafocales de cada punto de la muestra. La señal de salida analógica se digitaliza y transmite a un ordenador.

El detector consiste en un detector puntual que sólo recibe la luz de un punto de la muestra. De esta forma, el microscopio confocal permite observar sólo un punto de la muestra en cada momento, a diferencia del microscopio convencional con el que puede verse una zona mayor de la muestra. Así, la imagen completa de la muestra sólo se consigue mediante la exploración punto por punto de ésta, para lo cual debe desplazarse el punto luminoso o la muestra. Ambas posibilidades han conducido al desarrollo de dos tipos diferentes de microscopios confocales:

Microscopios con platina móvil (barrido en etapas): la platina con la muestra se desplaza un poco tras cada exposición mientras que el sistema óptico permanece quieto.

Microscopios con técnica de rayo o de espejo: el punto luminoso se desplaza sobre la muestra que se encuentra fija y la recorre punto por punto con ayuda de pequeños y rápidos espejos accionados mediante un galvanómetro, como los que utiliza LEICA.

El sistema TCS SP2 de LEICA permite crear un solo plano focal, así como toda una serie de planos (horizontales o verticales). Un corte único vertical o un barrido xz, ofrece una vista lateral de la muestra.

La recogida de una secuencia de cortes ópticos de la muestra como lote de imágenes y su posterior procesamiento digital presenta la ventaja de que este bloque de datos de varias dimensiones permite generar una imagen bidimensional calculada (proyección) o una representación reducida en 3 dimensiones de la muestra en un ordenador apropiado.

### Poder resolutivo óptico

El término resolución hace referencia a la capacidad de distinguir entre los detalles más precisos de una estructura. En un microscopio ideal, el sistema óptico estaría libre de todo tipo de aberraciones. En este instrumento hipotético, el poder resolutivo estaría limitado exclusivamente por la difracción. Ésta puede definirse como la distancia más pequeña entre dos puntos de una muestra a la que éstos puntos pueden verse siempre como puntos separados (criterio Rayleigh). A partir de éste límite, ambos puntos se fusionan entre sí (es decir, los aros de difracción se superponen de forma parcial o total) y no pueden reconocerse como dos puntos independientes. Esta distancia se calcula a partir

del tamaño de una imagen de difracción de un punto minúsculo de la muestra. Corresponde al radio del primer mínimo de esta imagen de difracción. Esto, a su vez, depende de la apertura numérica del objetivo y del condensador. La apertura numérica se define mediante el coeficiente de refracción de la lente y el tamaño del compás de vara que puede penetrar.

De forma análoga a la argumentación anterior, la resolución axial puede definirse como el radio del primer mínimo a lo largo del eje del microscopio de la imagen de difracción de un objeto puntual. De acuerdo con la teoría de imágenes de difracción en 3 dimensiones de este tipo, el poder resolutivo a lo largo del eje z es dos veces menor que el poder resolutivo óptico lateral. De esta forma, la resolución óptica a lo largo del eje z alcanza aproximadamente la mitad de la resolución del plano focal.

El microscopio TCS SP2 de LEICA consiste en un sistema de barrido de puntos con gran sensibilidad y resolución teórica en los ejes x, y, z, que no acepta condiciones.

La resolución de barrido se refiere a la nitidez de enfoque que está determinada por el número y el tamaño del pixel. Cuanto mayor es el número de píxeles y mayor el formato de barrido seleccionado, más sencillo resulta distinguir entre dos objetos próximos entre sí. La resolución de barrido está limitada por el poder resolutivo óptico máximo.

### **Detección**

La formación de imágenes confocales, es decir, la medición de las características ópticas de cantidades muy pequeñas de una muestra no está limitada únicamente por la calidad óptica del microscopio. Otras limitaciones son:

- El hecho de que las muestras continuas se miden (debido a la toma de muestras y al procesamiento digital) sólo en pequeñas cantidades individuales de muestra.
- La exactitud con la que se definen estas pequeñas cantidades, que se determina mediante el mecanismo de barrido.
- La potencia de la fuente de luz en relación con el potencial de reflexión de la muestra.
- La sensibilidad y el ruido del detector.

También el detector es un componente central del microscopio confocal. Debido a su elevada relación entre señal y nivel de ruido, LEICA Microsystems Heidelberg utiliza fotomultiplicadores como detectores.

### **Edición de imagen**

En los primeros microscopios confocales, el detector estaba conectado a un osciloscopio con fosforescencia y la imagen se mostraba de la forma en que se producía el barrido. En la actualidad, en primer lugar se procesa la señal digitalmente y después se muestra en un ordenador. De esta forma existe la posibilidad de modificar la imagen mostrada de diferentes formas. Las posibilidades son las siguientes:

- Incremento del contraste mediante valores umbral, extensión de contraste lineal y la corrección Gamma (curva del valor de intensidad de la imagen frente a la representación gráfica de la intensidad de la fuente).
- Doble exposición de imágenes en experimentos.
- Filtro digital para la ampliación de los bordes, el alisado, la eliminación de interferencias, etc.
- Reconstrucción de vistas tridimensionales con ayuda de cortes ópticos recogidos en lotes de imágenes. Esto permite, por ejemplo, la reconstrucción de una imagen en un plano xz mediante lotes de imágenes de planos xy. Al mismo tiempo, pueden generarse modelos tridimensionales completos de la muestra y examinarse desde cualquier dirección.
- Composición de películas digitales mediante las series temporales tomadas con el microscopio.
- Cuantificación y mediciones

Este tipo de edición de imágenes no incrementa la calidad de los datos recogidos; sin embargo, permite mejorar la vista y facilitar la interpretación cualitativa de los datos.

### **Fuente luminosa**

El láser se adapta como fuente luminosa de forma excepcional a la microscopía confocal, ya que proporciona una luz muy clara y el rayo presenta una desviación muy pequeña. Al mismo tiempo, su enfoque es sencillo y su intensidad muy estable. Precisamente esta estabilidad cobra especial importancia en las mediciones cuantitativas.

### Integración

El TCS SP2 de Leica está concebido como sistema integral. Todos los elementos ópticos y mecánicos trabajan de forma continua con el hardware y el software del ordenador. El Leica Confocal Software incluido con el microscopio permite todo el proceso de generación de imágenes, desde los cortes ópticos, pasando por la edición y el análisis de las imágenes (la principal aplicación del software) hasta la impresión de las imágenes creadas mediante una impresora.

### Ayuda a través de Internet

En caso de que surja algún problema, en primer lugar póngase en contacto con la representación de Leica más cercana o con su distribuidor.

Si desea información acerca de Leica Microsystems Heidelberg GmbH y sobre la microscopía confocal, visite nuestro sitio Web:

<http://www.confocal-microscopy.com>

O bien, envíenos un mensaje electrónico a la dirección [lt.support@leica-microsystems.com](mailto:lt.support@leica-microsystems.com).

## Advertencias legales

Versión 2.3, 31.10.02, Fabricado en Alemania.

© Copyright 2002/2003, Leica Microsystems Heidelberg GmbH. Reservados todos los derechos.

Esta publicación no puede publicarse ni reproducirse total ni parcialmente, de forma electrónica ni mecánica, sin el consentimiento expreso de Leica Microsystems Heidelberg GmbH. Esto incluye también el fotocopiado, el registro o el almacenamiento en un sistema recuperable, así como la traducción a otros idiomas.

### DERECHOS DE PROPIEDAD

Los datos que contiene el presente documentos son propiedad de Leica Microsystems Heidelberg GmbH y están disponibles exclusivamente para los clientes de dicha empresa, para su seguridad y para el manejo eficiente y el mantenimiento correcto del producto aquí descrito. Está prohibida la utilización o transmisión de datos propiedad de Leica Microsystems Heidelberg GmbH con el objetivo de utilizarlos en la fabricación o reproducción del producto aquí descrito o de uno similar, y la entrega de este documento no representa ninguna licencia ni consentimiento implícito para ello.

### REVISIONES Y MODIFICACIONES

Leica Microsystems Heidelberg GmbH se reserva el derecho de revisar el presente documento o el producto en él descrito en todo momento y desarrollarlo y mejorarlo sin previo aviso ni otras obligaciones. La información y las especificaciones técnicas del presente manual pueden modificarse en todo momento sin previo aviso.

### GARANTÍA

Leica Microsystems Heidelberg GmbH ofrece la presente publicación sin garantía de defecto ni ningún otro tipo de garantía, ni explícita ni implícita, incluida pero no limitada a la garantía implícita de negociabilidad o de aptitud para un fin determinado. En la confección de este documento se han observado todas las medidas de seguridad apropiadas, incluida la realización de una comprobación de los aspectos técnicos y no técnicos. Leica Microsystems Heidelberg GmbH no asume ninguna garantía en caso de posibles errores o exclusiones. Tampoco es responsable Leica Microsystems Heidelberg GmbH de daños directos, accidentales ni derivados que se produzcan como consecuencia del empleo del material incluido en este documento.

### MARCAS COMERCIALES Y MARCAS REGISTRADAS

En el presente manual se nombran marcas registradas. En lugar de utilizar un símbolo de marca registrada (™) cada vez que se nombra una, declaramos por la presente utilizar dichos nombres con el fin exclusivo de redactar el documento y (en interés del propietario de la marca) sin ninguna intención de vulnerar la marca registrada.

### SEGURIDAD



*Los términos utilizados referentes a la clase de seguridad para láser se refieren a la normativa EN 60825-1. En el ámbito de aplicación de la norma CDRH, en el texto se sustituye la clase láser 4 por IV, la clase láser 3B por IIIb, la clase láser 3A por III A, la clase láser 2 por II y la clase láser 1 por I.*

Este aparato está concebido y fabricado para satisfacer las normas de potencia de productos láser de la clase 3B, tal como se definen en las normas y prescripciones USHHS CDRH/FDA, OSHA y EN, vigentes en el momento de la fabricación.

Dado que es imposible prever todas las situaciones de peligro posibles, le corresponde al usuario, durante la instalación, el servicio y el mantenimiento del producto, actuar con cuidado y sensatez y observar todas las medidas de seguridad apropiadas en vigencia para los láser de clase 3B y para

aparatos de alta tensión.

Se recomienda seguir los procesos de servicio y mantenimiento publicados. Toda desviación de los procesos de servicio y mantenimiento indicados se realiza bajo responsabilidad exclusiva del usuario.

#### **LICENCIA DE SOFTWARE**

El software descrito en el presente documento está sometido a un acuerdo de licencia incluida junto con el producto. Dicho acuerdo detalla las condiciones bajo las cuales está permitido o prohibido el empleo del producto.



## Indicaciones de seguridad

El apartado siguiente recoge las medidas de seguridad, los avisos y las indicaciones de seguridad estándar.

### Instrucciones generales de seguridad

La seguridad del usuario es lo primero de todo. Por ello, lea y observe los avisos y las indicaciones de seguridad incluidos en este manual y colocados sobre el aparato antes de poner en funcionamiento los productos de Leica. Si no se observan los avisos y las indicaciones de seguridad, pueden producirse graves daños físicos a las personas e importantes daños materiales en el aparato y en los datos.

### Responsabilidad del riesgo de la utilización del aparato

El usuario o el propietario asume el riesgo de la utilización del aparato.

El propietario o usuario es responsable de todas las consecuencias que pueden derivarse si alguna persona que no pertenece al servicio de atención al cliente de Leica abre el aparato, si no se realiza el mantenimiento o las reparaciones de forma correcta o si se utiliza para otros fines que los indicados en la documentación adjunta o en la ayuda en línea. Leica Microsystems Heidelberg GmbH no asume ninguna responsabilidad por los daños que puedan producirse como resultado de la no observación de la información anterior. La información anterior no modifica en ningún modo, ni implícito ni explícito, las cláusulas de garantía y responsabilidad incluidas en las condiciones generales de contrato de Leica Microsystems Heidelberg GmbH.

### Advertencias, indicaciones de seguridad y notas

Las advertencias, indicaciones de seguridad y notas generales contenidas en este manual se distinguen de la siguiente manera.



Un **aviso** de este tipo indica un proceso, un procedimiento, una condición o unas instrucciones que deben observarse y cumplirse estrictamente ya que, de lo contrario, existe un riesgo para la vida de las personas que trabajan con el aparato.



Una **advertencia de seguridad** de este tipo indica un proceso, un procedimiento, una condición o unas instrucciones que deben observarse y cumplirse estrictamente ya que, de lo contrario, existe un riesgo de importantes daños materiales para el aparato o los datos o puede provocar la pérdida de datos.



Las **notas** contienen información adicional sobre un tema determinado o instrucciones especiales para el manejo del producto bajo una condición particular o una serie de circunstancias.

**Condiciones especiales del lugar de ubicación**

Si bien se ha probado que este aparato cumple con los valores límite referentes a emisiones de radiación electromagnética (CEM), no puede excluirse un pequeño riesgo de influencia sobre otros dispositivos.



*Este aparato no puede ubicarse en una habitación con aparatos médicos cuya finalidad sea la de conservar la vida.*



*Antes de cambiar la ubicación del sistema confocal debe limpiarse éste a fondo. Lo mismo debe realizarse al extraer piezas. Esto se refiere en especial a sistemas que se encuentran en laboratorios de investigación biológica y médica.*

*Esto es necesario para evitar la contaminación presente y, de esta forma, evitar propagar sustancias peligrosas y agentes patógenos y el peligro que esto pueda conllevar para las personas. Al hacerlo, no limpie sólo las superficies, sino preste atención especial a los ventiladores y dispositivos de refrigeración ya que en ellos se almacena polvo con mayor frecuencia.*



*La utilización del aparato para fines distintos de los indicados, así como la apertura del aparato por parte de personal no autorizado conlleva un peligro por la tensión eléctrica y por la radiación láser.*



*Los términos utilizados referentes a la clase de seguridad para láser se refieren a la normativa EN 60825-1. En el ámbito de aplicación de la norma CDRH, en el texto se sustituye la clase láser 4 por IV, la clase láser 3B por IIIb, la clase láser 3A por III A, la clase láser 2 por II y la clase láser 1 por I.*

**Clase del láser**

Este aparato está concebido y fabricado para satisfacer las normas de potencia de dispositivos de láser de la clase 3B, tal como se definen en las normas y prescripciones USHHS CDRH/FDA, OSHA, EN y 60825-1 y la normativa para la prevención de accidentes VBG 93, vigentes en el momento de la fabricación.

Dado que es imposible que el fabricante prevea todas las situaciones de peligro posibles, le corresponde al usuario, durante la instalación, el servicio y el mantenimiento del producto, actuar con

cuidado y sensatez y observar todas las medidas de seguridad apropiadas en vigencia para los láser de clase 3B y para aparatos de alta tensión. Toda desviación de los procesos de servicio y mantenimiento indicados se realiza bajo responsabilidad exclusiva del usuario.

El TCS SP2 de Leica es inofensivo siempre que se utilice conforme a las instrucciones provistas.



*El propietario es responsable de que se observen las normas de seguridad vigentes.  
Por cuestiones de seguridad, a la zona del láser sólo puede acceder el personal del servicio posventa de Leica.*

### Medidas técnicas de seguridad

De acuerdo con las disposiciones de seguridad para láser, EN 60825 (normativa europea) y CDRH (normativa de EE.UU.), Leica Microsystems Heidelberg GmbH toma diferentes medidas de seguridad. Se han colocado etiquetas de advertencia en todas las aberturas o piezas extraíbles por las que podría producirse la salida de luz láser.

También se ha montado un mayor número de **conmutadores de seguridad láser**.

Observe las indicaciones de la norma EN 60825-1: "Seguridad de instalaciones láser, 1ª parte. Clasificación de los aparatos, requisitos y manual de usuario", según la cual, para instalaciones en las que se utilizan aparatos de la clase 3B debe nombrarse un oficial de seguridad para láser (Laser Safety Officer) o un consejero para la protección de láser (Laser Protection Advisor). Es responsabilidad del propietario determinar los controles apropiados para el uso del aparato y su revisión.



*Nunca mire directamente un rayo láser ni su reflexión. Si una persona se expone a un rayo láser, su visión puede resultar dañada de forma irreparable. El reflejo de un rayo láser es tan intenso como el rayo directo.*

*El usuario es responsable en todo momento del manejo y el mantenimiento seguros de este aparato. La clasificación como dispositivo láser de la clase 3B y el cumplimiento de los requisitos sobre seguridad eléctrica sólo queda garantizado, cuando todos los dispositivos, bloqueos y sistemas de seguridad para cerrar el láser se encuentran en perfecto estado y funcionan. Debido a dispositivos de seguridad desactivados o dañados, el personal puede quedar expuesto a una radiación láser de la clase 3B que es lo bastante fuerte como para provocar graves lesiones en los ojos, quemaduras o daños materiales.*

*Toda manipulación o desactivación de los sistemas de seguridad o los cerrojos de seguridad tiene como consecuencia la pérdida del derecho de garantía.*

### Cable de conexión

El juego de cables de conexión incluido en el suministro satisface los requisitos del país en el que se ha adquirido el aparato. En el caso de que vaya a utilizar el aparato en otro país, debe utilizar cables

de conexión que satisfagan los requisitos del país en cuestión.

**El fabricante ha prescrito la disposición siguiente:**

El cable de conexión del microscopio debe introducirse en el zócalo incluido. En el caso que se utilice una lámpara de mercurio de alta presión, ésta debe conectarse a una conexión a la red diferente. De esta forma se evita que tenga que conectarse y desconectarse constantemente junto con el ordenador de control y el sistema electrónico de barrido lo que prolonga la vida de la fuente de iluminación.



*Este aparato está concebido para la conexión a un enchufe con toma de tierra. El enchufe con toma de tierra es una importante función de seguridad. A fin de reducir los riesgos de descargas eléctricas o daños materiales, esta función no debe desactivarse en ningún momento.*



*A fin de reducir riesgos de incendio y descargas eléctricas, el aparato no debe exponerse nunca a la lluvia ni a la humedad. Nunca abra la carcasa. El mantenimiento completo debe realizarlo un miembro del personal autorizado de Leica.*

*Nunca debe penetrar humedad en el interior de la carcasa del aparato y los componentes eléctricos no deben entrar en contacto con la humedad. El aparato debe estar completamente seco antes de conectarlo a la red eléctrica o de encenderlo.*

**Indicaciones generales de seguridad**

De conformidad con las disposiciones generales de seguridad así como las disposiciones de seguridad relativas a aparatos láser, deben seguirse las instrucciones siguientes:

Observe las instrucciones para el manejo del aparato.

Utilice este producto exclusivamente de acuerdo con la información contenida en el presente manual y en la ayuda en línea del Leica Confocal Software. En primer lugar, lea atentamente las instrucciones para la utilización del aparato antes de poner el sistema en servicio. Como preparación para la ejecución de cada paso de trabajo a realizar, lea en primer lugar la descripción de la función en la ayuda en línea y, sobre todo, observe las prescripciones de seguridad que afectan al manejo del sistema. Si desea una visión general de todas las funciones, consulte el índice de contenido de la ayuda en línea.

Utilice este producto exclusivamente para los fines descritos en el presente manual y en la ayuda en línea del Leica Confocal Software.

El sistema está concebido para generar imágenes de barrido láser confocal y la medición cuantitativa en el campo de los materiales. Toda utilización del TCS SP2 de Leica para otros fines o en otras aplicaciones se considera utilización inapropiada y no autorizada. El usuario asume el riesgo de todos los experimentos que se realicen con este sistema, así como las consecuencias que se deriven de dichos experimentos. Esto es especialmente válido cuando se abre y modifica el aparato.

Atienda a las instrucciones de mantenimiento.

Para ello, lea el capítulo 'Cuidados y limpieza' de este manual.

No realice ninguna intervención en el aparato que no esté descrita en este manual o en anexos

publicados con posterioridad.

Sólo el personal técnico de atención al cliente de Leica Microsystems Heidelberg GmbH está autorizado para realizar tareas de reparación y mantenimiento.

Conecte al producto sólo aquellos aparatos eléctricos que se citan en la presente documentación.

Nunca conecte aparatos que no se citan en esta documentación.

Antes de conectar uno de estos aparatos al producto, consulte con el servicio de atención al cliente de Leica más cercano o directamente con Leica Microsystems Heidelberg GmbH.

Nunca utilice un condensador de microscopio S70.

Debido a su gran distancia de trabajo y la baja apertura numérica del condensador S70, en el caso de desatender las indicaciones de seguridad (vea "Indicaciones de seguridad especiales para el usuario") puede tener lugar una solicitación excesiva del haz láser. Por este motivo, utilice sólo los condensadores S1 y S23 de Leica.

Indicaciones de seguridad especiales para el usuario

Con las medidas especiales derivadas de diferentes disposiciones de seguridad, Leica Microsystems Heidelberg GmbH ha realizado todo lo posible para maximizar la seguridad del usuario y minimizar los riesgos para la salud.

El usuario debe utilizar el TCS SP2 de acuerdo con las instrucciones para garantizar su propia seguridad. A continuación se describen varios puntos importantes:

Nunca cambie el objetivo durante un proceso de barrido.

Para cambiar un objetivo de forma correcta, proceda del modo siguiente:

Asegúrese de que está desconectado el modo de barrido. Compruebe que no hay ninguna luz láser en el plano focal.

Gire el revólver portaobjetivos de forma que el objetivo quede fuera del eje óptico y esté orientado hacia el exterior. Actúe con precaución y no ejerza fuerza sobre el revólver ya que esto puede provocar una reducción permanente de la resolución en los scanner de objetivo.

Enrosque el nuevo objetivo y gire el revólver de forma que vuelva a colocarse en el eje óptico.

Todas las posiciones del revólver portaobjetivos que no se utilizan deben cubrirse.

Nunca coloque ningún objeto en la trayectoria de los rayos del láser durante el proceso de barrido.

Introduzca la muestra de forma correcta en el portapreparados.

Nunca cambie la muestra durante un proceso de barrido.

Para cambiar la muestra de forma correcta, proceda de la forma siguiente:

Asegúrese de que está desconectado el modo de barrido. Compruebe que no hay ninguna luz láser en el plano focal. Cierre la tapa de seguridad del tubo.

A continuación, cambie la muestra.

## **Seguridad con el láser**

El término 'LASER' es una sigla que quiere decir **L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation (amplificación de luz por emisión inducida de radiación). El primer láser se presentó en 1960 y trabajaba con un rubí como medio del láser. En la actualidad, el láser se utiliza en muy diferentes ámbitos, desde la cirugía hasta la lectura de códigos de barras en la caja del supermercado, los punteros láser, las impresoras láser o los lectores de CD.

El láser puede generar un haz muy intenso y preciso (colimado) de radiación electromagnética en una longitud de onda desde 150 nm hasta 1 mm. Esta radiación se muestra en general en forma de una luz de gran intensidad. La luz láser no consiste en un tipo de radiación ionizada, por lo que la interacción con la materia se produce en la superficie. Los ojos y la piel son órganos que reaccionan de forma muy sensible cuando se exponen a la radiación láser. Los efectos de los rayos láser sobre ambos órganos varían y dependen del tipo de láser (longitud de onda de la radiación) y potencia del haz. Una energía láser con la longitud de onda y la potencia apropiadas puede enfocarse desde el cristalino sobre la retina y producir en ésta graves e irreparables daños. Cuando la potencia de la radiación láser es suficiente, puede producir quemaduras en la piel si algún miembro o parte del cuerpo se exponen al rayo. La tabla siguiente recoge los diferentes campos del espectro

electromagnético producido por el láser y muestra sobre qué órganos pueden producir daños por contacto con el rayo láser.

Campo espectral	Longitud de onda	Órgano afectado
Ultravioleta	UV-C 100 nm hasta 280 nm	Absorbido por completo por la córnea y la conjuntiva
	UV-B 280 nm hasta 320 nm	Absorbido casi por completo por la córnea y la conjuntiva
	UV-A 320 nm hasta 380 nm	Cristalino (turbidez del cristalino)
Visible	380 nm hasta 760 nm	Retina
	IR-A 760 nm hasta 1.400 nm	Retina, cristalino, piel
Infrarrojo	IR-B 1.400 nm hasta 3.000 nm	Córnea y piel
	IR-C 3.000 nm hasta 10 <sup>6</sup> nm	Córnea y piel

Los láser suelen clasificarse según el tipo de medio. La subdivisión de los láser en clases de riesgo se realiza según la longitud de onda, la duración máxima de la irradiación y la potencia media del láser.

#### Clases de riesgo de los láser



*Debe evitarse siempre mirar el rayo láser, independientemente del tipo de láser o de que su nivel de potencia.*

#### Clase 1

Láser no peligroso (en general encapsulado).

#### Clase 2

Láser visible con baja potencia que, gracias al reflejo de protección del párpado, generalmente no es peligroso, si no se mira directamente al rayo.

#### Clase 3A

Láser que, si se mira accidentalmente al rayo durante un breve momento, generalmente no es peligroso; no obstante, puede suponer un peligro cuando se utiliza una óptica colectora.

#### Clase 3B

Láser que, al mirar directamente al rayo o al reflejo del rayo sobre un espejo, puede provocar daños a los ojos.

#### Clase 4

Láser que, al mirar directamente al rayo, al reflejo del rayo sobre un espejo o la reflexión difusa (dispersión), puede provocar daños a los ojos o quemaduras en la piel. Existe riesgo de incendio

#### Sistemas encapsulados

Las instalaciones o los sistemas láser de las clases 2, 3A, 3B o 4 que se encuentran en el interior de una carcasa protectora y se utilizan según un modo de clasificación bajo, pueden incluirse en una clase más baja. Puede ser necesario utilizar medidas de control especiales a fin de mantener dicha clasificación.

#### Riesgos que se derivan de los láser

Los riesgos derivados de las instalaciones láser, pueden clasificarse en los siguientes grupos principales:

1. Daños en los ojos, p. ej. quemaduras de la retina o la córnea.



**LOS DAÑOS DE LA RETINA SON IRREPARABLES.**

2. Daños en la piel, p. ej. quemaduras.
3. Riesgos eléctricos derivados de los aparatos de alta tensión.
4. Riesgo de incendio y explosión.

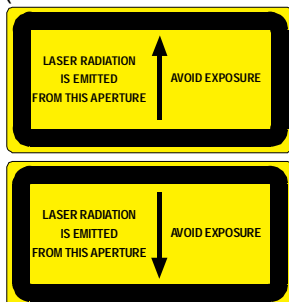
### Especificaciones de la radiación láser utilizada

Tipo de láser	Longitud de onda [nm]	Máxima potencia luminosa en la salida del láser [mW]	Máxima potencia luminosa en el plano focal [mW]	Duración de pulso
Ar-UV	351, 364	< 50	< 2,5	continuous wave (no a ráfagas, onda continua)
Diodo	405	< 25	< 4	continuous wave (no a ráfagas, onda continua)
Diodo	430	< 10	< 4	continuous wave (no a ráfagas, onda continua)
HeCd	442	< 30	< 3	continuous wave (no a ráfagas, onda continua)
ArKr	488, 568, 647	< 125	< 10	continuous wave (no a ráfagas, onda continua)
Ar	458, 476, 488, 514	< 200	< 50	continuous wave (no a ráfagas, onda continua)
HeNe	543	< 1,5	< 0,5	continuous wave (no a ráfagas, onda continua)
Kr	568	< 25	< 5	continuous wave (no a ráfagas, onda continua)
HeNe	594	< 3	< 1	continuous wave (no a ráfagas, onda continua)
HeNe	633	< 15	< 4	continuous wave (no a ráfagas, onda continua)

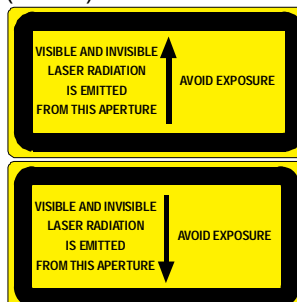
Se utilizan los siguientes símbolos de seguridad para el láser.

#### 1. En todas las aberturas de las que puede salir luz

Para sistemas láser que emiten en un ámbito espectral visible  
(Ar/ ArKr/ Kr/ HeNe/ HeCd/ Diodo)

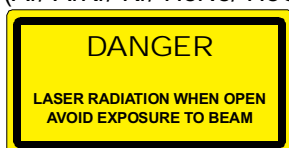


Para sistemas láser que emiten en un ámbito espectral ultravioleta  
(Ar-UV)

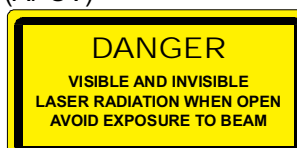


#### 2. En todas las piezas de la carcasa que pueden abrirse con herramientas y de las que puede salir radiación láser

Para sistemas láser que emiten en un ámbito espectral visible  
(Ar/ ArKr/ Kr/ HeNe/ HeCd/ Diodo)



Para sistemas láser que emiten en un ámbito espectral ultravioleta  
(Ar-UV)

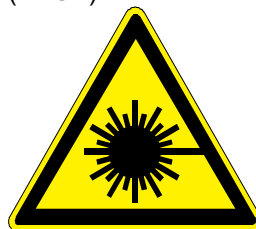


### 3. Sobre la tapa de la fuente de alimentación

Para sistemas láser que emiten en un ámbito espectral visible  
(Ar/ ArKr/ Kr/ HeNe/ HeCd/ Diodo)




Para sistemas láser que emiten en un ámbito espectral ultravioleta  
(Ar-UV)



En un diodo láser externo de 405 nm (opcional / sustitución de UV):




  
**CE**

LASER RADIATION

AVOID EXPOSURE TO BEAM  
CLASS IIIb CDRH LASER PRODUCT  
CLASS 3B PER EN60825-1 1994+A11

---

 **COHERENT**

2303 LINDBERGH ST.  
AUBURN, CA 95602-9295  
USA (530) 888 - 5062

PART NUMBER / REVISION


WAVELENGTH / POWER  

405 nm25 mW

SERIAL NUMBER

THIS PRODUCT DOES NOT CONFORM TO  
THE APPLICABLE STANDARDS OF  
21CFR1040

PLEASE READ INSTRUCTIONS  
BEFORE USING

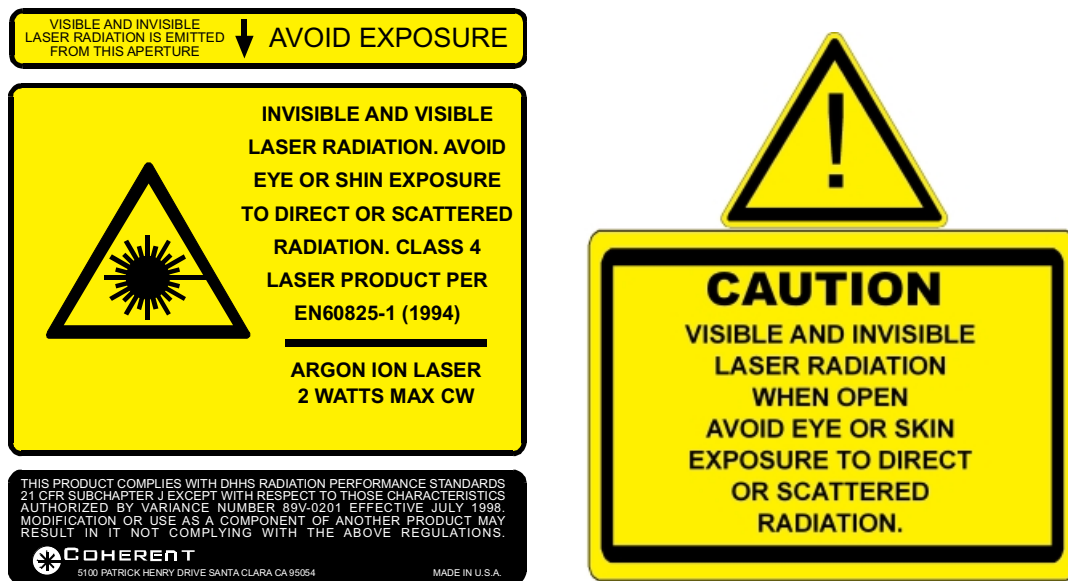


#### Colocación en el propio láser:



*Si bien la radiación del láser de 405 nm puede clasificarse dentro del campo espectral visible, se considera como si fuera un láser UV. Los sistemas confocales que se accionan mediante un láser UV o un láser de 405 nm disponen de una óptica especial para el microscopio. Por este motivo, no es posible reequipar un sistema confocal concebido para el ámbito espectral visible con un láser UV ni con uno de 405 nm.*

#### En un láser UV (opcional):



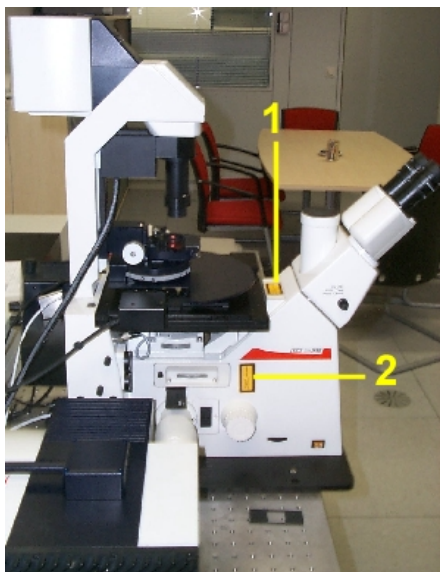
Colocación en el propio láser:



*Los sistemas confocales que se accionan mediante un láser UV disponen de una óptica especial para el microscopio. Por este motivo, no es posible reequipar un sistema confocal concebido para el ámbito espectral visible con un láser UV.*

## Posición de las marcas de seguridad de láser

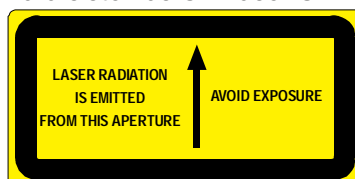
## 1. Microscopio inverso



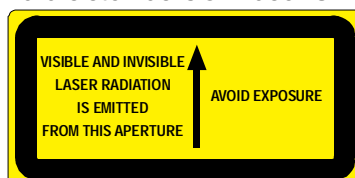
La posición 1 y la posición 2 marcan los lugares de colocación de las marcas de seguridad en el trípode del microscopio inverso.

## Posición 1

Para sistemas SIN láser UV

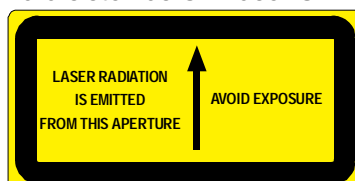


Para sistemas CON láser UV

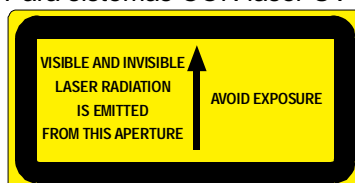


## Posición 2

Para sistemas SIN láser UV



Para sistemas CON láser UV



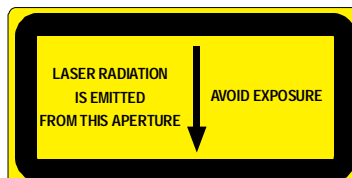
## 2. Microscopio vertical



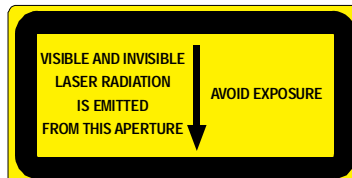
La posición 1 y la posición 2 marcan los lugares de colocación de las marcas de seguridad en el trípode del microscopio vertical.

### Posición 1

Para sistemas SIN láser UV

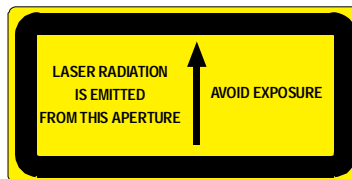


Para sistemas CON láser UV

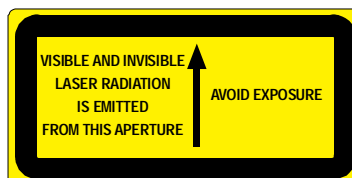


### Posición 2

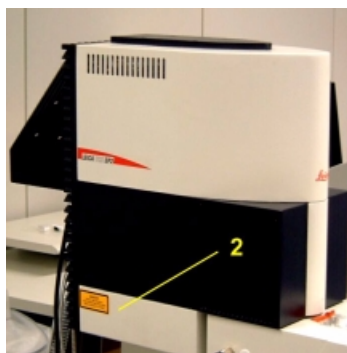
Para sistemas SIN láser UV



Para sistemas CON láser UV



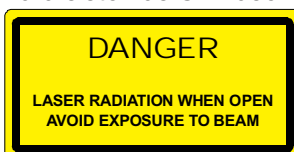
### 3. Cabezal de barrido



La posición 1 y la posición 2 marcan los lugares de colocación de las marcas de seguridad en el cabezal de barrido.

#### Posiciones 1 y 2

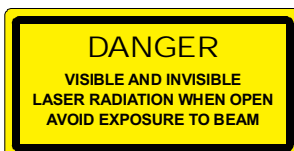
Para sistemas SIN láser UV



=

#### Posiciones 1 y 2

Para sistemas CON láser UV

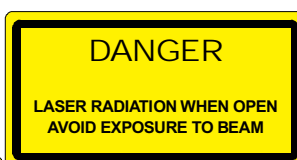


### 4. Fuente de alimentación (tapa)



#### Posición 1

Para sistemas con láser HeNe



Para sistemas con láser ArKr



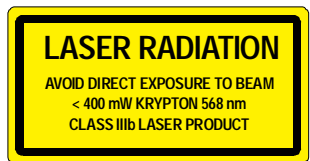
Para sistemas con láser Ar



Para sistemas con láser Kr



Para sistemas con láser HeNe, Ar y Kr

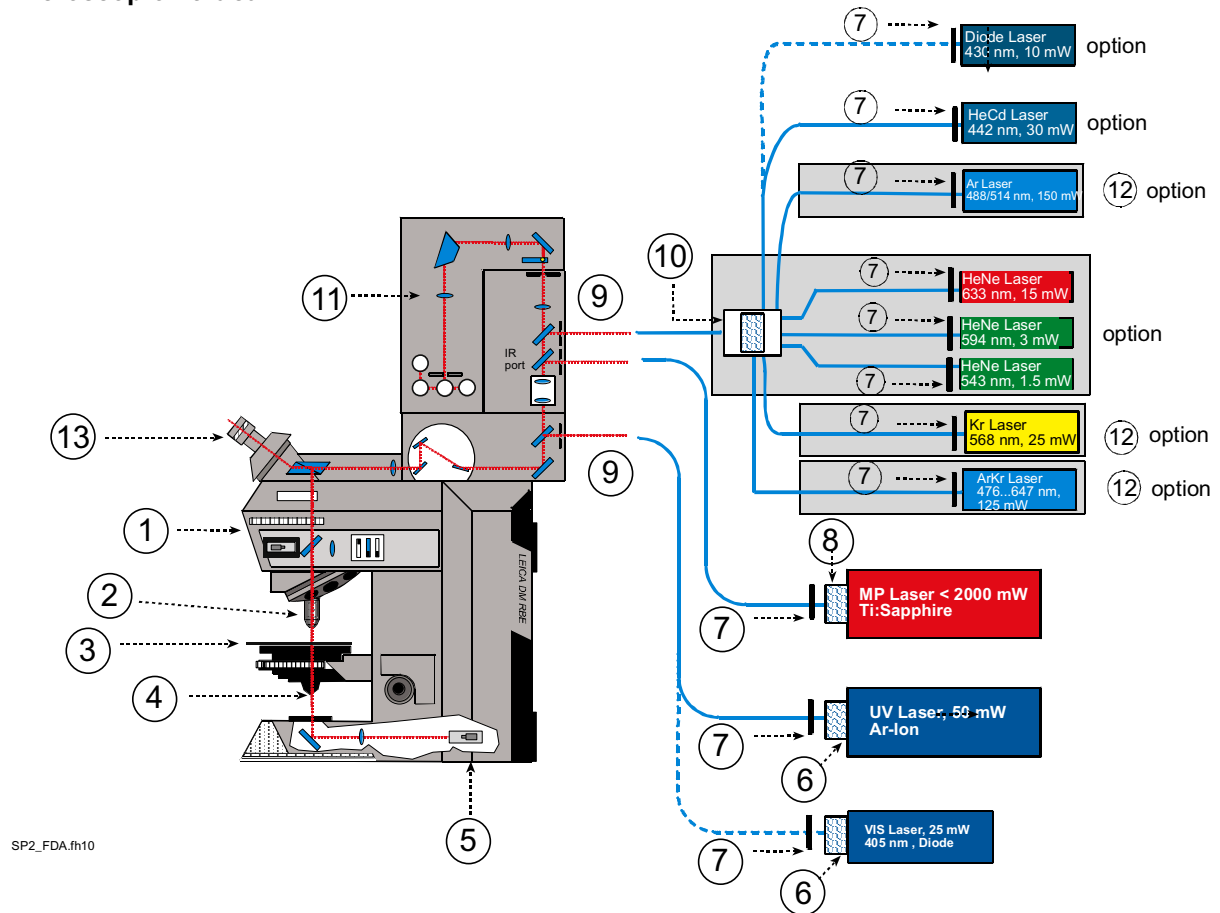


Para sistemas con láser HeNe, HeCd, Ar y Kr

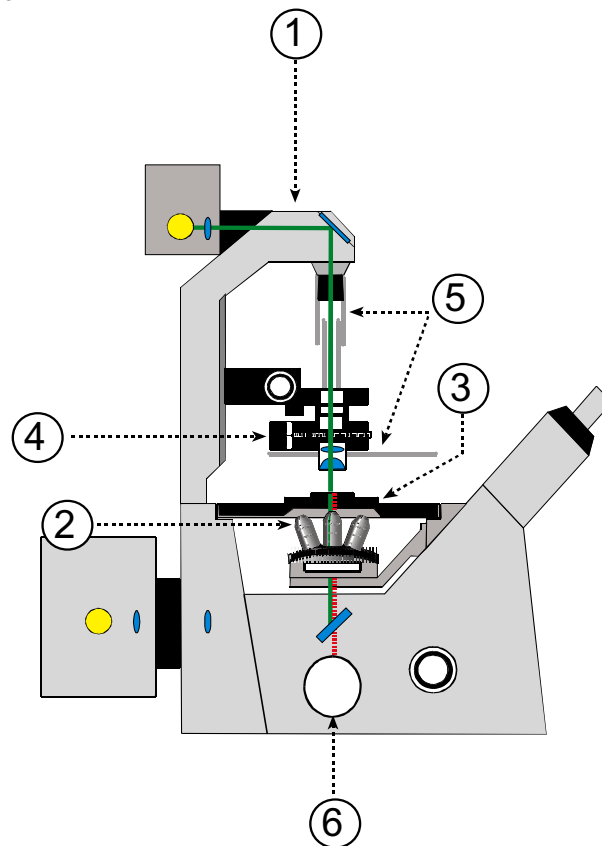


## Visión general del sistema

## Microscopio vertical



1: trípode de microscopio, 2: objetivo, 3: platina para muestras del microscopio, 4: condensador, 5: detector de subiluminación (non-descanned), 6: modulador UV (sólo para sistemas UV), 7: obturador de seguridad para láser, 9: fibra óptica encapsulada (toda la fibra óptica que llega hasta el cabezal de barrido), 10: confluencia de haces, modulador VIS, 11: cabezal de barrido, 12: fuente de alimentación (Supply Unit), 13: oculares

**Microscopio inverso**

FDAnverted.FHS

1: trípode de microscopio inverso, 2: objetivos, 3: platina para muestras del microscopio, 4: condensador, 5: arandela de aluminio como colector de haces, chapa de protección entre el condensador y el detector de subiluminación, 6: conexión para el cabezal de barrido (el mismo cabezal que en el microscopio vertical)



## Arranque del sistema operativo

El sistema operativo se arranca de forma automática tan pronto como se conecta el PC. En primer lugar aparece una pantalla de bienvenida.

Inicie una sesión. Tal como se indica en las instrucciones del cuadro de diálogo que aparece, inicie la sesión pulsando al mismo tiempo las teclas **Ctrl**, **Alt** y **Delete**.

Tan pronto haya pulsado estas teclas, se abre el cuadro de diálogo **Login Information**.

Introduzca aquí su contraseña, con la que se identifica como usuario de este PC.

El nombre de usuario estándar para el sistema TCS SP2 de Leica es "TCS\_User".

No existe una contraseña estándar. Se recomienda disponer una identificación propia para cada usuario (administrador del sistema). En este caso, se crean directorios personales a los que sólo puede acceder el usuario en cuestión. El software LCS se basa en la administración del usuario del sistema operativo por lo que también se crean archivos propios del software LCS para la administración de perfiles específicos de usuario. Para la configuración de usuarios consulte el capítulo "Configuración de usuarios" en este manual.

Tan pronto haya iniciado una sesión con su identificación de usuario, puede cambiar su contraseña.

Para ello pulse las teclas **Ctrl**, **Alt** y **Delete** al mismo tiempo.

A continuación, haga clic en **Change password**. Se abre el cuadro de diálogo **Change password**.

Introduzca su contraseña actual en el campo **Old Password** (el campo para la introducción de la contraseña es sensible a mayúsculas y minúsculas, por lo que debe prestar atención a la utilización de éstas). A continuación, pulse la tecla tabulador. Al hacerlo, el cursor pasa al campo siguiente.

Introduzca aquí su nueva contraseña y, a continuación, pulse la tecla tabulador de nuevo. Introduzca la nueva contraseña una segunda vez para confirmarla. De esta forma se excluyen errores de escritura. Esto es especialmente importante porque los caracteres que se escriben en el teclado aparecen en la pantalla como asteriscos.



*En el caso de que en la confirmación escriba la contraseña de forma incorrecta, aparece un aviso. Inténtelo de nuevo.*

A continuación, haga clic en OK. La siguiente vez que inicie una sesión será válida la contraseña nueva.



*Atención: una vez introducida una contraseña, no debe olvidarla bajo ninguna circunstancia. Sin la contraseña correcta no tendrá acceso al PC.*

A continuación se muestra el cuadro de diálogo Welcome. Tómese un momento para leer el consejo "Did you know..." y haga clic a continuación en la tecla de pantalla **Close** para comenzar el trabajo con el sistema operativo.

### Trabajo con el ratón

Para poder utilizar el sistema operativo de forma realmente eficiente, precisa un ratón. Debe conocer las siguientes acciones del ratón:

**Apunte** quiere decir que coloque el cursor (que al desplazar el ratón adopta forma de flecha) sobre el objeto indicado desplazando el ratón. La punta de la flecha debe tocar el objeto.

**Haga clic en** quiere decir que coloque el cursor sobre el objeto indicado de la forma descrita, pulse una vez brevemente el botón del ratón y suéltelo. Si no se indica otra cosa, utilice siempre el botón izquierdo del ratón (en caso contrario, se indica, por ejemplo, hacer clic con el botón derecho del ratón). Al hacer clic en un objeto, en general, éste se selecciona.

**Haga doble clic en** quiere decir que coloque el cursor sobre el objeto indicado de la forma descrita, pulse dos veces brevemente el botón del ratón y suéltelo. En general, mediante un doble clic se

acciona el objeto.

**Arrastre** quiere decir que coloque el cursor sobre un objeto, pulse el botón del ratón y desplace este objeto, con el botón apretado, hasta otro lugar. Si no se indica otra cosa, utilice siempre el botón izquierdo del ratón (en caso contrario, se indica, por ejemplo, arrastrar con el botón derecho del ratón).

### La interfaz de usuario del sistema operativo

La interfaz de usuario básica del sistema operativo se designa "**escritorio**". Éste constituye el fondo de los objetos que contiene.

Los objetos del escritorio permiten al usuario interactuar con el sistema de forma lógica y mostrar los objetos del sistema.

El fondo sobre el que aparecen todas las imágenes y cuadros de diálogo se designa escritorio. En la barra de tareas se muestran todos los programas y ventanas activas. Es posible cambiar entre los diferentes programas y ventanas haciendo clic en el nombre correspondiente en la barra de tareas.

La tecla de pantalla Start abre un menú que permite abrir los programas deseados. Haga clic en la tecla de pantalla Start. El menú que se abre contiene diferentes opciones con sus propios submenús. Haga clic en la opción deseada.

También dispone de algunos símbolos sobre el escritorio. Haga doble clic en uno de ellos para activarlo.

A continuación se describe brevemente cada objeto que aparece sobre el escritorio.

Entre los objetos estándar del escritorio se encuentra el símbolo **My Computer**. Si hace **doble clic** en él, se abre la ventana My Computer.

Esta ventana permite un fácil acceso a los componentes principales del sistema o de la estación de trabajo, como por ejemplo los discos duros o la unidad de disquetes. Si hace doble clic, por ejemplo, en el símbolo **Hard disk [C:]**, se muestra el contenido del disco duro de su PC. De esta forma, el usuario tiene la posibilidad de ver los recursos locales como objetos. Desde la ventana 'My Computer' también puede acceder al control del sistema (símbolo Control Panel) y a la impresora del PC de control en el caso de que se haya instalado una. En el caso de que, durante la instalación, haya instalado una de las aplicaciones locales adicionales como 'Dial-Up Networking', ésta también aparece en la ventana 'My Computer'.

A través del símbolo **Control Panel** de la ventana My Computer también puede ver y modificar cualquier componente del sistema. La ventana Control Panel por su parte, también contiene numerosos símbolos que permiten al usuario controlar el sistema. Es posible que en su PC vea también otros símbolos que no se mencionan aquí. El motivo puede ser, por ejemplo, que ha instalado otro hardware o que quizá está conectado a un modem o a una red. Otro motivo puede ser que ha instalado otras opciones del sistema operativo.

Si hace doble clic en el símbolo **Network Neighborhood** se abre el cuadro de diálogo Network Neighborhood y muestra los aparatos que están conectados con la estación de trabajo. Este cuadro de diálogo representa un sencillo mecanismo para hojear los sistemas de red y los recursos con los que puede instalar una conexión independientemente del fabricante de la red. Hasta la fecha, si se deseaba conectar un sistema de forma simultánea con diferentes tipos de red, era necesario seguir siempre las directrices de cada fabricante al conectar el sistema y mostrar la red. Por el contrario, el sistema operativo actual está en condiciones de proporcionar una vista general de todas las redes incluso la red contiene recursos de Windows NT, Novell NetWare, Banyan Vines u otros.

El símbolo **Inbox** se utiliza si en su sistema se ha activado Microsoft Exchange. El sistema operativo dispone de un servicio integrado de correo electrónico basado en Microsoft Mail (MS Mail) y Microsoft Exchange. En el caso de que en la red a la que está conectado su sistema ya disponga de un buzón de correo de MS Mail, el correo cliente del sistema operativo puede crear una conexión directa. A través del símbolo Inbox puede acceder a sus mensajes de correo.

El símbolo **Recycle Bin** (la papelera de reciclaje) representa el depósito para objetos borrados.

Mientras un archivo se encuentre en esta papelera de reciclaje es posible, en caso de que la haya borrado por error, recuperarla de forma rápida y sencilla. El sistema operativo mantiene los archivos en este depósito hasta que el sistema no disponga de espacio libre en los discos. En este caso, el sistema operativo comienza a borrar el contenido de la papelera de reciclaje (Recycle Bin), y los más antiguos, de acuerdo con el principio FIFO (First-in First-out) son los primeros que se borran.



*Los archivos que se sobrescriben debido a que dos aplicaciones diferentes utilizan un archivo con el mismo nombre, no se almacenan en la papelera de reciclaje.*

Mediante un doble clic en el símbolo Recycle Bin puede ver el contenido de la papelera de reciclaje. Si aparece una ventana vacía, esto confirma que no se encuentra ningún objeto en la papelera.

El menú de inicio

Con un sólo clic con el botón izquierdo del ratón en la tecla de pantalla Start se abre el menú de inicio. Aquí se muestran siete categorías principales de opciones a través de las cuales puede llevar a cabo el trabajo con el sistema.

Mediante un clic en el botón derecho del ratón se abre un pequeño menú de control que contiene las opciones Open, Explore y Find.

El funcionamiento se describe a continuación.

Inicio de programas

El menú de inicio contiene diferentes categorías en las cuales puede almacenar las aplicaciones y el trabajo. Para ver cada submenú apunte con el ratón a la opción deseada. De esta forma, aparece de forma automática el submenú correspondiente. Observe que no precisa hacer clic con el ratón.

La opción **Programs** abre el submenú de programas. En este menú aparecen todas las aplicaciones instaladas. Algunas opciones están marcadas con una flecha. Ésta indica que existe otro submenú disponible. Apunte, p. ej., con el ratón a la opción **Accessories**, para poder ver el submenú correspondiente. En el submenú de Accessories aparece una lista de los programas integrados en el sistema operativo.

**CONSEJO:** Si arrastra (drag) un objeto desde el escritorio o desde Windows Explorer con el ratón hasta la tecla de pantalla Start y lo suelta allí (drop), se crea un enlace de forma automática. A partir de ese momento, este objeto aparece en el menú inicio y puede activarse desde éste.

Existen varias posibilidades para abrir un programa. El método descrito a continuación es el más sencillo:

1. Haga clic en la tecla de pantalla Start.
2. Haga clic en Programas.
3. Haga clic en el grupo que contiene el programa que desee iniciar (p. ej. LCS).
4. Haga clic en el programa que desee iniciar (p. ej. Leica LCS).

También puede iniciar un programa abriendo un documento creado con el programa deseado. El programa se inicia de forma automática al abrir el documento. Haga doble clic en un archivo de la ventana My Computer o de Windows Explorer, para abrirlo. En lugar de esto, puede hacer clic en la tecla de pantalla Start y, en el menú Documents, seleccionar un documento utilizado recientemente.

También tiene la posibilidad de iniciar un programa haciendo doble clic en el símbolo del programa (denominado acceso directo) del escritorio. Los accesos directos son enlaces a otros archivos. Al hacer clic en un acceso directo, Windows sigue el enlace hacia atrás hasta el archivo original.

Si utiliza un documento o un programa con frecuencia, es posible que desee crear un acceso directo que esté disponible en el escritorio. Para ello, apunte el objeto deseado con el ratón, mantenga pulsado el botón derecho del ratón y desplace el objeto desde la ventana de Windows Explorer o My Computer. Al soltar el botón del ratón aparece un menú. En este menú, seleccione la opción Create Shortcut(s) Here. Algunos programas crean de forma automática durante el proceso de instalación un acceso directo.



*El sistema operativo sigue el enlace desde un acceso directo y su original no activo. Esto significa que si, por ejemplo, crea un acceso directo para un programa y a continuación mueve el original a otra carpeta (y no lo copia), puede ocurrir que el*

| acceso directo deje de funcionar.

La carpeta Startup tiene un función especial: Todos los programas que se encuentran en ella se abren de forma automática cuando se arranca el sistema operativo.

En el menú Documents se encuentran los nombres de los 15 últimos archivos creados. Para abrir cada archivo y, al mismo tiempo, la aplicación correspondiente, haga clic en el nombre del archivo en este menú.



| *Todos los archivos de documentos que pueden abrirse desde una aplicación (en general, debe seleccionarse para ello las opciones de menú File/Open en la aplicación correspondiente), no se incluyen aquí. Esta lista sólo incluye los documentos abiertos directamente desde el escritorio.*

El menú Settings contiene tres opciones que permiten realizar modificaciones en la configuración del sistema. Este menú permite acceso directo al control del sistema y a la impresora. También permite abrir la ventana Task Properties.

La posibilidad de activar de esta forma los programas de utilidad más importantes de la configuración del sistema es especialmente útil cuando una aplicación está ya abierta y activa en primer plano y desea realizar una rápida modificación.

La opción Find ofrece una posibilidad sencilla de buscar recursos del sistema. En el submenú de esta opción puede seleccionar tres tipos de búsqueda.

#### **La barra de tareas**

La barra de tareas, que se encuentra en el borde inferior de la pantalla, muestra constantemente las aplicaciones utilizadas en el sistema en cada momento. También ofrece la posibilidad de cambiar de forma sencilla de una aplicación a otra. Tan pronto como abra otra aplicación, las vistas minimizadas de los programas abiertos se adaptan dentro de la barra de tareas de forma que la vista minimizada de la nueva aplicación también encuentra lugar en ella. De esta forma se garantiza que todas las aplicaciones abiertas están visibles en la barra. Para pasar de un programa abierto a otro sólo es necesario hacer clic en la vista minimizada del programa deseado que se encuentra en la barra de tareas.

Al mismo tiempo, la barra de tareas ofrece información y funciones adicionales de forma constante como, por ejemplo, la hora del sistema y la regulación del volumen de los altavoces en el caso de que haya instalado una tarjeta de sonido. El usuario puede modificar y adaptar todas estas funciones a su gusto.

#### **Ajuste de la fecha y la hora**

A través del símbolo Date/Time de la ventana Control Panel puede ajustarse la fecha actual, la hora y el huso horario. Esta configuración es muy importante ya que el sistema operativo dota a todos los archivos de una fecha y una hora tan pronto como se crean o se realizan modificaciones en ellos.

Puede seleccionar ambas opciones haciendo clic en la tarjeta de registro correspondiente.

#### **Para cambiar la fecha y la hora**

Haga clic en la fecha deseada o utilice las teclas de pantalla de control para cambiar el mes y el año indicados. La hora también puede cambiarse, seleccionando en primer lugar la visualización digital, y ajustando la hora con ayuda de las flechas hacia arriba y hacia abajo.

#### **Para cambiar el huso horario**

En la lista emergente del borde superior del cuadro de diálogo seleccione el huso horario correspondiente. Observe si está seleccionada la opción de cambio de hora automático a horario de invierno y horario de verano. En algunos sistemas también puede arrastrar la zona de selección del planisferio y colocarla en el lugar deseado.

Si realiza modificaciones de la configuración de la fecha y la hora del sistema operativo, se actualiza también el reloj CMOS que funciona con batería.



*Según la configuración puede ocurrir que los sistemas conectados a una red realicen una actualización de la fecha y la hora desde el servidor de la red cada vez que inicie una sesión. Si la hora del servidor no es correcta, tampoco lo es la hora de las estaciones de trabajo. En este caso, informe al administrador de la red.*

### Activación de la ayuda

El sistema operativo contiene un amplio sistema de ayuda muy potente. Junto con los menús de ayuda, que están a disposición del usuario en todas las ventanas, el menú de inicio dispone de una ayuda propia e independiente. Para activarla, haga clic en la tecla de pantalla Start y, a continuación, en Help.

En este cuadro de diálogo se ofrecen tres tarjetas de registro: Contents, Index y Find. La tarjeta de registro Contents (Contenido) está por encima de las otras. Puede activar las otras tarjetas con un simple clic en ellas.

#### Contents

La tarjeta de registro Contents muestra los temas de ayuda. Dichos temas se subdividen en categorías y se representan mediante el símbolo de un libro. Haga doble clic en uno de estos libros para abrirlo. Se muestran los libros y documentos que contiene. Haga doble clic en uno de estos libros o documentos para abrirlo.

#### Index

La tarjeta de registro Index contiene un índice con todos los temas disponibles. Introduzca el término que desea consultar. Mientras introduce las primeras letras, el sistema consulta la lista y muestra la parte correspondiente del índice alfabético. Cuando encuentre el tema de ayuda deseado en la lista, haga doble clic para verlo.

#### Find

La tarjeta de registro Find ofrece la posibilidad de búsqueda del texto completo en lugar de búsqueda por categorías. Introduzca en el campo de texto el término o la expresión sobre el cual desea buscar un tema en la ayuda. El campo de texto está enlazado con una lista de palabras de los archivos de ayuda. El sistema muestra todos los términos o expresiones que se corresponden con los introducidos. Si desea introducir más de un término, sepárelos con un espacio en blanco entre ellos. En el caso de que desee cambiar la opción de búsqueda, active la opción de menú Options. La primera vez que hace clic en la tarjeta de registro, Windows indica que, en primer lugar, debe crearse una lista. Haga clic en Next y, para finalizar, en Finish para crear la lista. A continuación puede ver la tarjeta de registro principal Find. Introduzca el término que desea buscar en el campo de texto superior. A continuación, haga clic en una palabra del campo central para delimitar la búsqueda. Para finalizar, consulte la lista de temas de ayuda que aparece en el borde inferior y haga doble clic en el tema que desee leer.

Una vez leído el tema, puede hacer clic en Help Topics para volver a la pantalla principal de la ayuda o en Back para volver al tema de ayuda previo. Haga clic en la tecla de pantalla Close, para abandonar la ayuda.

### Salida del sistema operativo (Shutdown)

Haga clic siempre en la opción **Shut Down** antes de desconectar el PC. A través de esta opción, el sistema operativo se cierra de forma correcta. Al mismo tiempo, se garantiza que los otros procesos en curso se detienen de forma correcta y que los datos que, según los casos se encuentran en la memoria caché, se transmiten de ésta al disco duro. Existen diferentes opciones disponibles para cerrar el sistema.



*Si desconecta el PC sin haber cerrado previamente el sistema operativo puede producirse una pérdida importante de datos.*

## Configuración de usuario

### 1. Identificación como administrador

Inicie una sesión como administrador. Para ello, utilice la identificación: "Administrator" y la contraseña: "Admin"

### 2. Abra el User-Manager

Seleccione **Start→Programs→Administrative Tools→User Manager**

### 3. Defina un nuevo usuario.

Para ello, introduzca en el cuadro de diálogo al menos los datos siguientes:

#### 1. Nombre de usuario

#### 2. Contraseña (debe introducirse de nuevo en la línea siguiente para confirmarla)

Seleccione las dos siguientes opciones en las casillas de selección:

a.) "User must change password at next logon" (Para que el nuevo usuario pueda definir su propia contraseña al identificarse.)

b.) "Password never expires" (de esta forma, una vez definida la contraseña será válida hasta que se modifique en el User Manager o se elimine el usuario).

En la barra inferior del cuadro de diálogo seleccione la opción "Profiles". En el campo "Local path" introduzca la siguiente ruta de acceso para almacenar los archivos específicos del usuario:

d:\users\username ("username" es un comodín; en su lugar debe introducirse el nombre de usuario definido).



*Los discos duros montados de fábrica tienen 2 particiones (C:\ y D:\). El directorio del usuario debe crearse en la partición D:\.*



## Puesta en servicio del sistema confocal

### 1. Compruebe que el conector para protección de copia del software está colocado en el puerto paralelo para la impresora del ordenador.

Sin este conector NO es posible iniciar el software LCS.

### 2. Conecte el microscopio (o los microscopios) y la fuente luminosa.

Todos los trípodes de microscopios manuales de Leica (DM-LM, DM-IRB, DM-R, DM-LFSE) pueden conectarse y desconectarse mediante el interruptor colocado en el lateral del trípode.

Todos los trípodes de microscopios automáticos de Leica (DM-LFSA, DM-RXA, DM-RXA2, DM-RE, DM-IRBE) pueden conectarse y desconectarse mediante el interruptor colocado en el lateral del trípode.

Los trípodes de los microscopios DM-LFSA, DM-IRE2 y DM-RXA2 de Leica pueden conectarse y desconectarse mediante la unidad electrónica independiente (LEICA CTR MIC Electronics box).



*Todas las lámparas fluorescentes están dotadas de una fuente de alimentación eléctrica independiente. Por ello, sólo pueden encenderse y apagarse a través de dicha fuente de alimentación.*

### 3. A continuación, conecte los interruptores del ordenador (PC), el scanner confocal (Scanner) y el láser (Lasers) situados en el panel de control.



### 4. Inicie una sesión en el PC.

Si ya ha creado una identificación de usuario, utilícela. De esta forma se garantiza que la configuración específica de un usuario se almacena y mantiene sólo para dicho usuario. En el caso de que el administrador del sistema aún no haya creado una identificación de usuario, inicie la sesión como "TCS\_User". No es preciso introducir una contraseña.

### 5. Inicie el programa LCS.

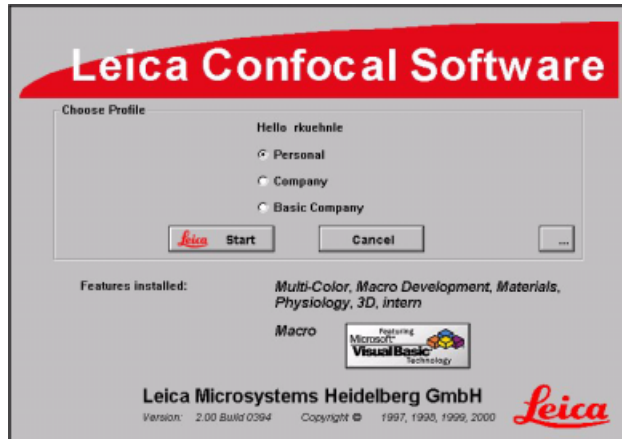
Para ello haga clic en el símbolo del programa situado en el escritorio del PC.



*Leica*

### 6. A continuación, seleccione un perfil de software.

Para el usuario puede crearse un perfil propio que incluye la estructura de la interfaz gráfica de usuario y la definición de la configuración específica del usuario para el sistema confocal.



*Antes de pasar al paso siguiente, espere hasta que haya finalizado la inicialización de los componentes del hardware.*

## 7. Coloque una muestra y dispóngala en el modo de microscopio convencional.

En primer lugar, enfoque sobre un lugar de la muestra que desea observar. A continuación, ajuste la iluminación Köhler (vea el capítulo "Ajuste de la Iluminación Köhler" en la página 43.)

a.) Ajuste para observación convencional con los microscopios verticales de la serie DM-Rxxx, DM-LFxx



*Serie de microscopios DM\_Rxx:*

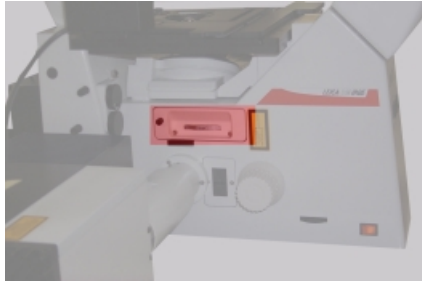
*Serie de microscopios DM-LFSx:*

*Coloque la palanca de control en la posición "VIS" y gire la rueda del filtro de fluorescencia hasta la posición del filtro apropiada.*

*Pos 1: DAPI (opcional), Pos 2: TRITC, Pos 3: FITC, Pos 4: Vacío (Scan)*

b.) Ajuste para observación convencional con los microscopios inversos de la serie DM-IRxx





*Serie de microscopios DM\_IRxx:*

*Extraiga por completo la palanca de control colocada en el lado izquierdo (retirada) y gire la rueda del filtro de fluorescencia hasta la posición del filtro apropiada.*

*Pos 1: DAPI (opcional), Pos 2: TRITC, Pos 3: FITC, Pos 4: Vacío (Scan) Introduzca por completo la palanca de control del lado derecho*

*En el caso de un sistema UV: gire la lente de tubo hasta la posición "Scan".*



*Serie de microscopios DM\_IRxx:*

*Coloque la rueda de la lente de tubo del lado derecho en la posición "Scan".*

## 8. A continuación, pase a funcionamiento confocal.

a.) Cambio a observación confocal en los microscopios verticales de la serie DM-Rxxx, DM-LFxx



*Serie de microscopios DM\_Rxx:*

*Coloque la palanca de control y la rueda del filtro de fluorescencia en la posición "Scan".*



*Serie de microscopios DM-LFSx:*

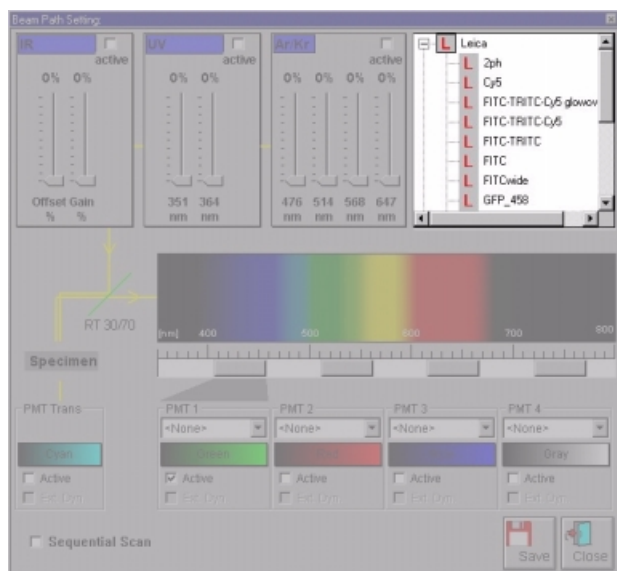
*Coloque la palanca de control y la rueda del filtro de fluorescencia en la posición "Scan".*

## 9. Seleccione un juego específico de parámetros de captura (Aplicación)

Pulse la tecla "Beam" en el paso de trabajo "Acquisition".



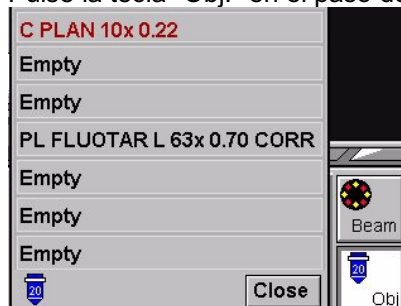
En el cuadro de diálogo "Beam Path Setting" seleccione un método (ventana superior derecha).



Como método se entiende un lote de configuración del hardware (IPS: Instrument Parameter Setting) específico para una técnica de captura determinada y un tipo especial de preparación de la muestra. El término FITC/TRITC designa, por ejemplo, la configuración para la captura por dos canales (simultánea) para ambas tinturas fluorescentes FITC y TRITC). Junto con los métodos indicados por la empresa, también pueden definirse y almacenarse métodos propios. Para ello, vea el capítulo "Software para adaptaciones del usuario".

## 10. Seleccione el objetivo del microscopio.

Pulse la tecla "Obj." en el paso de trabajo "Acquisition".



En el cuadro de diálogo que se abre seleccione el objetivo que desea utilizar.



*En los trípodes para microscopio automatizados el objetivo seleccionado se coloca de forma automática en la trayectoria de los rayos.*

*Con otros trípodes debe realizarse de forma manual.*

## 11. Seleccione el procedimiento de barrido.

Pulse la tecla "Mode" para seleccionar el procedimiento de barrido.

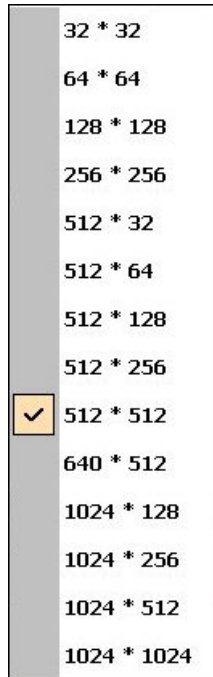


*Mediante el procedimiento de barrido se ajusta el tipo de bloque de datos que debe capturarse. Puede elegir entre:*

- a.) procedimiento de barrido espacial (xyz, xzy)*
- b.) procedimiento de barrido temporal (xt, xyt, xzt, xyzt)*
- c.) procedimiento de barrido espectral (xyλ, xzλ)*

## 12. Seleccione el formato de barrido.

Pulse la tecla "Format" para seleccionar el formato de barrido.



A través del formato de barrido se define el número de puntos de la trama que examina el scanner en el campo de barrido.

## 13. Optimice los parámetros de captura para un barrido continuo.

Pulse la tecla "Continuous." para iniciar un barrido continuo.



Tan pronto como comienza éste, puede optimizar los parámetros de captura mediante la consola de mando y los parámetros de captura definidos en ella.

Entre los parámetros de optimización se encuentran los siguientes:

- a.) la posición Z exacta dentro de la muestra
- b.) el factor de refuerzo del detector seleccionado
- c.) el diámetro del diafragma de detección
- d.) el factor de ampliación

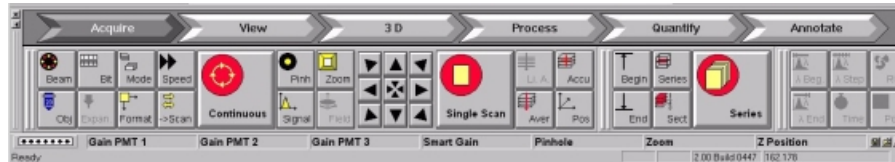
## 14. Captura de un bloque de datos espacial tridimensional (serie tridimensional)

14.1. Busque el límite superior del bloque de datos que desea capturar.

Para ello utilice el botón correspondiente para la colocación de la posición Z en la consola de mando.



*De forma estándar, la posición Z está configurada en la posición 7 de la consola de mando.*



Asignación estándar de la consola de mando (borde inferior de la imagen)

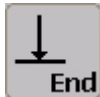
14.2. Pulse la tecla "Begin" para definir el punto de inicio de la serie tridimensional.



14.3. Busque el límite inferior del bloque de datos que desea capturar.

Para ello utilice el botón correspondiente para la colocación de la posición Z en la consola de mando.

14.4. Pulse la tecla "End" para definir el punto final de la serie tridimensional.



14.5. Detenga el barrido continuo pulsando de nuevo la tecla "Cont.".

14.6. Pulse la tecla "Sect." para definir el número de cortes ópticos.



*Si desea más detalles sobre esta función, consulte la ayuda en línea.*

14.7. Pulse la tecla "Aver." para definir el promedio de procedimientos (Frame-Average).



*En este promedio se incluyen siempre las exposiciones de un solo corte óptico.*

14.8. Pulse la tecla "Series" para la exposición de la serie tridimensional.



### 15. Almacene los datos de la imagen.

Seleccione la opción de menú **File->Save as** para almacenar el bloque de datos.



*Si desea más detalles sobre el almacenamiento de bloques de datos y formatos de almacenamiento, vea el capítulo "Abertura y almacenamiento de bloques de datos", en la página 49.*

## Ajuste de la iluminación Köhler

### ¿En qué consiste la iluminación Köhler?

En una imagen microscópica, sólo puede reproducirse una zona determinada de una muestra (campo de imagen). La iluminación Köhler permite iluminar con precisión dicha zona. El fondo para la precisa iluminación del campo de imagen es el siguiente:

Cuando la zona iluminada es menor que el campo de imagen, el compás de vara que percibe el objetivo y la apertura numérica también son menores. Dado que el poder resolutivo óptico depende directamente de la apertura numérica, al reducirse la iluminación también se reduce el poder resolutivo, lo cual no es deseable en la mayoría de los casos.

Cuando la zona iluminada es mayor que el campo de imagen esto amplía la luz parásita. Esto, a su vez, conlleva una disminución del contraste de la imagen, lo que puede provocar que no se observen las estructuras de la imagen microscópica analizada ópticamente.

La iluminación Köhler alcanza un punto intermedio entre el contraste máximo y el poder resolutivo máximo. Los objetivos de microscopios más potentes alcanzan con frecuencia su mejor comportamiento óptico sólo cuando la iluminación Köhler se ajusta con precisión.

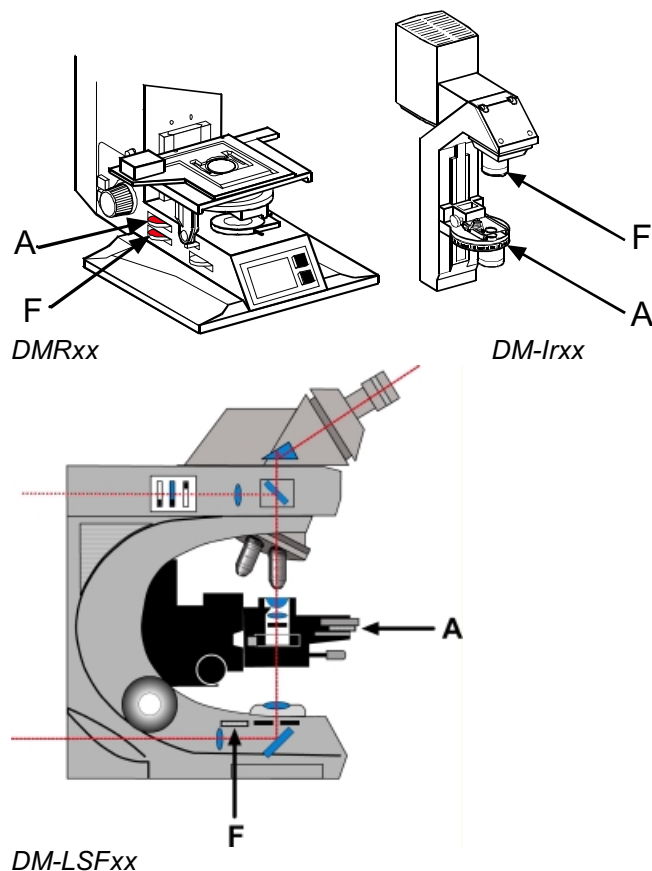
### Ajuste de la iluminación Köhler

#### 1. Enfoque

Enfoque con nitidez una zona del preparado que le parezca interesante. Aún no es necesario tener en cuenta la calidad de la imagen.

#### 2. Apertura del diafragma de abertura

Abra por completo el diafragma de abertura. Más adelante éste se cierra hasta alcanzar el contraste deseado.



A: Diafragma de abertura, F: Diafragma de campo

**3. Cierre del diafragma de campo**

De esta forma se oscurecen la mayor parte de las zonas del campo de imagen. El usuario ve un foco luminoso impreciso y desenfocado. Si este foco luminoso desaparece del campo de visión al cerrar el diafragma de campo, debe centrarse éste último. En este caso, abra el diafragma hasta que pueda ver el foco luminoso del borde del campo visual.



*En el caso de que no pueda ver el foco luminoso, es probable que el condensador esté colocado a una altura incorrecta. En ese caso, ajuste la altura del condensador hasta que pueda ver el diafragma de campo.*

**4. Enfoque**

Ajuste el borde del foco luminoso modificando la altura del condensador.

**5. Centrado**

Gire el tornillo centrador del condensador hasta que el foco luminoso esté centrado en el campo visual. El centrado es más sencillo si abre un poco el diafragma de campo para aumentar el foco luminoso.

**6. Apertura del diafragma de campo**

Abra el diafragma de campo hasta que el foco luminoso desaparezca exactamente en el borde del campo de imagen.

**7. Cierre del diafragma de abertura**

Cierre el diafragma de apertura hasta que alcance el contraste deseado (abra hasta aproximadamente el 70% del diámetro máximo).

**8. Al cambiar el objetivo**

Puede ocurrir que sea necesario reajustar la iluminación Köhler tras cambiar el objetivo.



## Cuidados y limpieza

Si desea información sobre el mantenimiento y los cuidados necesarios para el microscopio de investigación convencional de Leica consulte los manuales correspondientes.

A continuación se incluyen instrucciones e información adicional referentes a los componentes del sistema confocal TCS SP2.

### Selección de la ubicación

Nunca coloque el sistema en una corriente de aire. El TCS SP2 no debe colocarse nunca cerca de elevadores, aparatos de climatización u otras entradas o salidas. Por ello, es importante planificar con precisión el lugar de ubicación.

Proteja el microscopio del polvo y la grasa.

Cuando el sistema no está siendo utilizado, cúbralo siempre con una lámina de plástico (incluida en el suministro) o con una tela de algodón. El sistema debe utilizarse en un entorno lo más libre posible de polvo y grasa. Si no se encuentra ningún objetivo en el revólver, cubra siempre las aberturas vacías con las tapas de protección.

Utilice los productos químicos agresivos con gran precaución.

Extreme las precauciones cuando en su trabajo utilice ácidos, productos alcalinos u otros productos químicos agresivos. Mantenga siempre alejadas estas sustancias de los componentes ópticos y mecánicos del sistema.

### Limpieza del sistema óptico

El sistema óptico del microscopio debe estar siempre limpio. En ningún caso toque los componente ópticos con los dedos o un objeto manchado de polvo o grasa.

Elimine el polvo con un pincel fino y seco. En el caso de que esto no sea suficiente, utilice un paño humedecido con agua destilada. Las manchas resistentes pueden eliminarse de las superficies de cristal con alcohol puro, cloroformo o nafta.

En el caso de que una lente del objetivo se contamine por aceite de inmersión impuro o por una muestra, póngase en contacto con el representante de Leica más cercano. Éste le dará instrucciones sobre el uso de determinados disolventes para la limpieza. Déjese aconsejar en la elección del disolvente apropiado, ya que algunos de ellos pueden aflojar el pegamento con el que se sujeta la lente.



*Nunca abra el objetivo para limpiarlo.*

Limpie el aceite de las lentes de inmersión directamente después de su utilización. Elimine el aceite de inmersión en primer lugar con un paño limpio. Tras retirar la mayor parte del aceite, coloque un paño fino apropiado para lentes sobre la cara de inmersión de la lente. Vierta una gota del disolvente recomendado y limpie la superficie de la lente suavemente con el paño. Repita este proceso hasta que la lente esté totalmente limpia. Utilice cada vez un paño para lentes nuevo y limpio.

### Limpieza de la superficie del microscopio

Utilice un paño de algodón o de cuero (humedecido con nafta o alcohol), para limpiar la superficie de la carcasa del microscopio o del scanner (piezas pintadas).



*Nunca utilice acetona, xileno ni disolventes de nitrógeno ya que atacan a la pintura.*

Todos los componentes y sistemas de LEICA están fabricados cuidadosamente y con los métodos de producción más modernos. En el caso de que, a pesar de ello, tenga problemas con el aparato, no intente arreglarlo personalmente; póngase en contacto con su representante de Leica.



*Antes de cambiar la ubicación del sistema confocal debe limpiarse éste a fondo. Esto se refiere en especial a sistemas que se encuentran en laboratorios de investigación biológica y médica.*

*Esto es necesario para evitar una posible contaminación y, de esta forma, evitar la propagación y el peligro que esto pueda conllevar para las personas. Al hacerlo, no limpie sólo las superficies, sino preste atención especial a los ventiladores y dispositivos de refrigeración ya que en ellos se almacena polvo con mayor frecuencia.*

## El Leica Confocal Software: Visión general

### Inicio del software

Requisitos para el inicio del software

El software LCS dispone de un sistema de protección que garantiza que cada licencia de software adquirida no se utiliza en dos ordenadores de forma simultánea. Este sistema permite también liberar la utilización de paquetes de aplicaciones adquiridos de forma adicional. El sistema de protección consiste en un enchufe de software (denominado dongle), que se conecta al puerto paralelo del ordenador. Esto no afecta a la funcionalidad de este puerto (por ejemplo, para la conexión de una impresora). Si desea utilizar otro ordenador con una segunda instalación, el enchufe de protección se conecta al puerto paralelo de este segundo ordenador.



*Tan pronto como extrae el enchufe del ordenador del sistema confocal, deja de poder utilizarse el software. Esto significa que el sistema confocal no puede seguir utilizándose.*

El software LCS puede iniciarse en dos modos, el modo de hardware y el de simulación. En el primero, el software se conecta con todos los componentes del hardware y los inicializa. Por este motivo, al iniciar en modo de hardware, debe arrancar en primer lugar el hardware y, tras aprox. 20 segundos, iniciar el software.

En el modo de simulación, el software funciona totalmente sin hardware. Este modo de servicio se recomienda en instalaciones en un segundo ordenador y es apropiado, por ejemplo, para cursos o para realizar análisis de bloques de datos previamente capturados que no se realicen en línea.

### Procedimiento para el inicio del software

Seleccione **Start|Programs|Leica Confocal Software..** Se abre la pantalla de inicio del Leica Confocal Software. En esta ventana puede seleccionarse entre tres perfiles.

#### Company

Mediante esta opción se arranca el software con la configuración ajustada de fábrica. Esto significa que la configuración y la posición de las barras de tareas están definidas de forma fija. Esta configuración no puede modificarse.

#### Personal

Con esta opción se utiliza un perfil de configuración específico del usuario. A su vez, el nombre de usuario depende de la cuenta con la que se ha iniciado la sesión en el sistema operativo. Cuando un usuario inicia el software por primera vez y aún no se ha definido un perfil de configuración personal, se utiliza de forma automática la configuración estándar de fábrica como perfil personal.

#### Last Exit

Con esta opción se inicia con el último perfil de configuración utilizado.

#### Avanzado:

Si dispone de más de un perfil de configuración, puede cargarlos todos durante el inicio, pulsando con el puntero del ratón la tecla de pantalla con los tres puntos negros (se encuentra en el borde inferior derecho de las opciones de perfil). Esta tecla también permite retroceder del perfil de configuración personal actual al perfil estándar de fábrica.

Tras pulsar la tecla de pantalla Start, el Leica Confocal Software se inicia con el perfil de configuración correspondiente.



*El software también se inicia por sí mismo, tras un periodo de tiempo determinado de utilización del perfil de configuración seleccionado.*

**El concepto experimental del software**

El Leica Confocal Software permite agrupar los datos de imagen o los resultados de los pasos del procesamiento de imágenes. Cada grupo se denomina "Experiment" y se almacena en un formato de datos especial (\*.lei). De esta forma pueden archivar datos de imagen experimentales originales junto con los datos de la representación de la imagen. Si desea más detalles, consulte el capítulo "Organización de datos por grupos de experimentos"

**Principio de la estructura de la interfaz de usuario**

El aspecto de la interfaz gráfica del usuario (en lo sucesivo denominada GUI, **Graphical User Interface**) depende en gran medida del perfil de configuración utilizado. No obstante, la GUI dispone de una serie de elementos estándar.

Los elementos estándar de los que dispone son los siguientes:

**La barra de menús**

En ella se encuentran las categorías File, View, Macro, Tools, Window y Help. Dentro de estas categorías puede encontrar comandos e información para la visualización general, la configuración y la adaptación al usuario. No contiene funciones para el control directo de las funciones de barrido. Éstas se encuentran en el menú TCS (**View→Menu→TCS-Menu**). La barra de menús no puede configurarse.

**El visor (TCS\_Viewer)**

En él se muestran los datos de la imagen, las condiciones experimentales y los datos del usuario. Esta ventana puede configurarse (vea el capítulo "Modificación de la interfaz de usuario y definición de la configuración específica del usuario"). El visor no muestra sólo los bloques de datos de la imagen confocal, sino también datos experimentales como la configuración del sistema. Para abrir un visor para un nuevo experimento pulse **File → New**.

**Menú TCS (TCS\_Menu)**

El menú TCS contiene las teclas de pantalla para cada función del aparato. Se subdivide en diferentes pasos de trabajo. Según las herramientas del software puede variar el número de pasos de trabajo. El lote estándar consta de captura de datos (Acquire), visualización de datos (View), reconstrucción de superficies (3 D), funciones de medición (Quantify), funciones de edición de imagen y análisis (Process) y de funciones de documentación (Annotate). En el caso de que el menú TCS no aparezca en el perfil de configuración actual, puede activarlo y desactivarlo pulsando **View → Menu → TCS Menu**.

**Zona de las teclas de pantalla (Toolbar)**

En esta zona pueden insertarse teclas (botones de función) y ajustarlas de forma específica para el usuario. La ventaja de la zona de la tecla de pantalla es, en especial, el hecho de que pueda activarse y desactivarse junto con todas las teclas de pantalla que contiene. Para ello, siga los siguientes pasos: **View → Menu → Container**.

**Visor para documentos (Experiment Overview)**

Presenta los experimentos capturados y su contenido en un diagrama de árbol. Para abrir el visor pulse **View → Experiment Overview**.

**Barra de estado (Statusbar)**

La barra de estado se encuentra en el borde inferior de la interfaz de usuario del Leica Confocal Software. En ella aparecen:

- La evolución durante la carga de datos de la imagen (barra de progreso)
- La versión del software
- El nombre de la configuración de la máquina (tipo de sistema).

Si desea más detalles acerca de cada función, consulte el capítulo "Las funciones del software LCS".

## Abertura y almacenamiento de bloques de datos

### Formatos de archivo legibles

El Leica Confocal Software permite abrir y visualizar los formatos de archivo siguientes:

#### Experimentos (\*.lei):

Se trata de un formato de datos binario específico de Leica. Este formato está previsto para datos procedentes de experimentos completos.

#### Archivos TIFF (\*.tif):

Se trata de archivos de imagen de Leica en formato TIFF sencillo y múltiple. Permite leer archivos de imagen en formatos TCS utilizados anteriormente y archivos externos en formato RGB-TIFF.

#### Anotación (\*.ano):

En este caso, también se trata de un formato de datos binario específico de Leica. En él se almacenan páginas de presentación (Annotations). Los elementos que contienen las páginas de presentación, como imágenes, texto y gráficos, se guardan como objetos individuales.

Al leer los archivos, no sólo se cargan los datos de la imagen sino también la configuración experimental.

### Adopción automática de parámetros de captura

El Leica Confocal Software permite adoptar la configuración del software almacenada con experimentos o imágenes individuales para un experimento nuevo. De esta forma, puede realizarse la captura de diferentes experimentos con la misma configuración. Para realizar la adopción, active el visor del bloque de datos cuya configuración desea adoptar. A continuación, pulse la tecla de pantalla "Apply" (en el perfil de configuración de fábrica se encuentra en la zona de las tecla de pantalla [Toolbar]).



*Si la tecla de pantalla "Apply" no se encuentra en ninguna de las ventanas abiertas, puede cargar dicha tecla en cualquier ventana mediante **Tools→Customize**. En el cuadro de diálogo que aparece, seleccione el registro "Commands", categoría: File. Haga clic con el botón izquierdo del ratón sobre la tecla "Apply", mantenga el botón pulsado y arrastre la tecla hasta la ventana que desee. Suelte el botón del ratón para insertar la tecla en la posición actual.*

### Almacenamiento de imágenes

Las imágenes individuales y los experimentos pueden almacenarse en los formatos de datos descritos en el apartado "Formatos de archivo legibles".

Para guardar las imágenes y los experimentos pulse **File → Save**. La primera vez que se guarda un experimento se utiliza de forma automática la función "Save as" que exige la introducción de un nombre de archivo. Junto a la definición del nombre de archivo apropiado también puede seleccionarse aquí el formato del archivo. Los experimentos sólo pueden guardarse en el formato específico de Leica \*.lei. Al guardar experimentos, también puede almacenar posibles imágenes individuales en formato \*.tif o \*.raw.



*Si ya ha guardado previamente el experimento o la imagen, cada vez que vuelve a guardarlo se sobrescriben los datos anteriores. Si no desea esto, y desea guardar los datos nuevos con otro nombre, seleccione **File → Save as**.*

### Organización de datos por grupos de experimentos

El concepto del Leica Confocal Software permite distribuir las imágenes individuales, las series de imágenes y los resultados de los pasos de la edición de imágenes en un grupo (un experimento). Si desea una visión general de los experimentos cargados, consulte el visor de experimentos (Experiment Overview). En el caso de que éste se encuentre cerrada, ábrala con **View →**

**Experiment Overview**. Mediante **File → New** y **File → New(Template)** se abre un experimento nuevo. Del mismo modo, los archivos previamente almacenados que abre se administran como experimentos independientes.

Confección de experimentos

Tras definir un nuevo experimento con **File→New** o **File→New(Template)**, en lo sucesivo puede rellenarlo con datos.



*Las imágenes capturadas con la función de barrido continuo (Continuous scan) se sobrescriben de forma automática la siguiente vez que se inicia un barrido. Si desea mantener una toma aislada de forma permanente como parte de un experimento, seleccione la función de barrido único.*

Forman parte de un experimento los datos capturados con las funciones "barrido único" o "barrido en serie". Si realiza funciones de edición de imágenes en un bloque de datos, puede almacenar también los resultados como parte del experimento. Para ello, seleccione mediante un doble clic la imagen individual o la serie en el visor del experimento. A continuación, realice las funciones de edición de imágenes (p. ej., proyección de valor máximo o imagen topológica). Marque la zona del visor (Viewer) que desea conservar como parte del experimento. A través del botón derecho del ratón (menú contextual) seleccione **Send to→Experiment**. La opción **Selection (raw)** crea una copia de los datos brutos del objeto seleccionado como componente independiente nuevo del experimento. La opción **Selection (snapshot)** crea una imagen RGB (no datos tridimensionales, sólo fotos) del objeto seleccionado como nuevo componente del experimento.

### Teclas de aceleración

Para acelerar funciones de software de frecuente utilización se han definido combinaciones de teclas especiales:

Combinación de teclas	Función
F1	Abre la ayuda en línea.
ALT + F8	Abre el cuadro de diálogo Macros para iniciar, editar y borrar macros.
ALT + F9	Abre un cuadro de diálogo que contiene macros previamente definidas que pueden iniciarse desde dicho cuadro.
ALT + F10	Inicia la ayuda en línea del lenguaje de macros LCS.
ALT + F11 (opcional)	Inicia el entorno de desarrollo VBA (opcional).
CTRL + I	Esta opción permite instalar posteriormente licencias de software.
CTRL + J	Abre el cuadro de diálogo Objective para definir y seleccionar los objetivos del microscopio.
CTRL + L	Abre el cuadro de diálogo Legend Info para la introducción de datos específicos del usuario que pueden almacenarse y mostrarse para la documentación de capturas de imagen.
CTRL + M	Permite la selección del microscopio Leica utilizado.
CTRL + N	Abre un experimento nuevo.
CTRL + O	Abre el cuadro de diálogo Open para abrir un archivo existente.
CTRL + P	Abre el cuadro de diálogo Printer Selection.
CTRL + S	Guarda el experimento activo.

CTRL + T	
----------	--

## Funciones de menú

A través de la barra de menús, el usuario dispone de las funciones siguientes:

### Menú File

**New:**

Esta opción abre un experimento nuevo en un visor nuevo. Para la visualización del visor se utiliza el valor por defecto (vea el capítulo "Valores por defecto y plantillas").

**New (Template):**

Esta opción abre un experimento nuevo en un visor nuevo. El tipo de visualización del visor puede seleccionarse entre un juego de plantillas.

**Open:**

Esta opción abre un experimento previamente almacenado o un bloque de datos independiente (datos de imagen o anotación). Para la visualización del visor se utiliza el valor por defecto (vea el capítulo "Valores por defecto y plantillas").

**Open (Template):**

Esta opción abre un experimento previamente almacenado, un bloque de datos independiente o archivos de documentación o de presentación. El tipo de visualización del visor puede seleccionarse entre un juego de plantillas.

**Close:**

Esta opción cierra el experimento activo actual. Éste no se ha almacenado previamente de forma automática.



*El sistema no pregunta si desea guardar el experimento antes de cerrarlo.*

**Close all:**

Esta opción cierra todos los experimentos. Éste no se ha almacenado previamente de forma automática.



*El sistema no pregunta si desea guardar el experimento antes de cerrarlo.*

**Save:**

Guarda el experimento actual.

**Save as:**

Guarda el experimento actual con otro nombre.

**Save all:**

Guarda todos los experimentos y las páginas de presentación.



*Si queda alguno de los experimentos o las páginas de presentación sin guardar con la opción "Save", el sistema espera que se introduzca un nombre de archivo y un lugar de almacenamiento en un cuadro de diálogo para el experimento en cuestión.*

**Recent files:**

Abre uno de los últimos archivos abiertos.

**Print:**

Abre un cuadro de diálogo para imprimir el contenido de la ventana activa actual.

**Exit:**

Abandona el programa.

**Menú View****Menus:**

Esta opción permite activar o desactivar el menú TCS y la zona de tecla de pantalla (Toolbar).

**Statusbar:**

Esta opción conecta y desconecta la visualización de la línea de estado del borde inferior de la interfaz de usuario del software LCS.

**Experiment Overview:**

Esta opción abre una ventana en la que se visualizan los experimentos y sus componentes (registros, gráficos, etc.) en forma de árbol. Mediante un doble clic en el componente deseado del experimento dentro de esta ventana, se abre un visor para ello en primer plano.

**Hardware Legend:**

Esta opción activa y desactiva la vista de las leyendas del hardware.

**Menú Macro****Macros:**

Según el software instalado, esta opción permite editar macros directamente, o bien sólo señalarlas e iniciarlas.



*Sólo si se ha instalado el entorno de desarrollo integrado VBA (IDE) es posible editar y modificar macros.*

**Run Macros:**

Abre un cuadro de diálogo que contiene macros previamente definidas. Desde dicho cuadro pueden iniciarse las macros.

**Macro Interface Help:**

Inicia la ayuda en línea del lenguaje de macros LCS.

**Record a New Macro:**

Inicia el grabador de macros para registrar una macro de forma automática (si desea más detalles consulte la documentación adjuntada con el entorno para el desarrollo de macros opcional).

**Pause Recording:**

Interrumpe el registro automático de una macro.

**Stop Recording:**

Detiene el registro automático de una macro.



**Visual Basic Editor (optional):**

Inicia el software para el desarrollo de macros y programas sobre la base de Visual Basic for Applications (VBA). Aquí pueden editarse y modificarse macros e incluso desarrollar programas completos.

**Menú Tools****Legend Info:**

Esta opción abre el cuadro de diálogo para la introducción de datos específicos del usuario. Estos datos (p. ej., nombre de la empresa, nombre de la muestra, etc.) se guardan junto con el bloque de datos y pueden mostrarse en la leyenda junto a las imágenes capturadas.

**Objective:**

Esta opción abre el cuadro de diálogo para la definición de los objetivos utilizados. Los objetivos utilizados pueden copiarse de la lista disponible en el cuadro de diálogo por el método "Drag and Drop" (arrastrar y soltar) para que el software los reconozca.



*Es importante la correcta especificación del objetivo ya que algunas magnitudes calculadas dependen de la adaptación automática del diafragma de detección (p. ej., las dimensiones del campo de barrido).*

**Microscope:**

Esta opción permite la selección del microscopio Leica utilizado. Esta selección afecta al modo en que se controla el microscopio (p. ej., el revólver portaobjetivos motorizado).

**Stains:**

Esta opción permite introducir de forma manual los valores para las curvas de tinción.

**Settings:**

Esta opción permite la selección de la configuración del hardware que debe adoptar el sistema al abrir un bloque de datos previamente almacenado.

**License:**

Esta opción permite instalar posteriormente licencias. Habitualmente, una licencia se instala posteriormente cuando se agrega un nuevo paquete de programas adquirido de forma opcional.

**Menú Window****New Window:**

Esta opción abre un nuevo visor dentro del mismo experimento. Esto permite, por ejemplo, abrir el mismo bloque de datos con diferentes visualizaciones al mismo tiempo (p. ej., visualización topográfica + de recubrimiento).

**Menú Help****Contents:**

Abre el índice de contenido de la ayuda en línea.

**Search:**

Inicia la búsqueda de texto completo dentro de la ayuda en línea.

**Index:**

Abre el índice de palabras clave de la ayuda en línea.

**Tutorials:**

Abre un guía que acompaña al usuario paso a paso a lo largo de los procesos seleccionados.

**Set Language:**

Aquí puede seleccionarse el idioma de la ayuda en línea.

## Formatos de archivo LCS

Formatos de datos específicos de usuario y dependientes del aparato

El software LCS dispone de los siguientes formatos de archivo para datos específicos del usuario:

	Directorio: Leica	Directorio: User
Valores del instrumento (Instrument Parameter Settings)	*.IPS	*.IPS
Macros	Company.mac	User.mac
Plantillas para la consola de mando	*.pbo	*.pbo
Perfiles de usuario	CompanyProfile.pro	PersonalProfile.pro LastExitProfile.pro LastRecent.lst
Plantillas	*.prt	*.prt
Datos de calibración	Machine.lhw	
Tablas de asignación de colores	*.lut	
Perfil específico del usuario tal como se definió en la última utilización		*.lst

Los diferentes formatos de archivo contienen:

### \*.IPS

En este formato se guardan los parámetros del instrumento. Entre ellos se encuentran la configuración de hardware como la intensidad de las líneas láser individuales, el número de canales utilizados de forma simultánea, el tipo de distribuidor de haz principal utilizado, la posición y anchura de banda de los diafragmas de fotómetro espectral, así como la sensibilidad de los detectores. Existen incluso lotes estándar de parámetros del instrumento definidos de fábrica y no modificables que permiten una configuración del hardware muy rápida. Al mismo tiempo, cada usuario puede guardar parámetros del instrumento en su propio directorio. Esto permite guardar los parámetros típicos de su ámbito de aplicación y disponerlos de forma que pueda reproducirlos para otros experimentos.

### \*.mac

En este formato se guardan las macros. Éstas contienen códigos de programa VBA (**V**isual **B**asic para **A**plicaciones). Leica dispone los objetos de programa individuales para el control del sistema confocal en un modelo de objeto. Si desea más detalles sobre el desarrollo de macros para el control del sistema confocal, consulte el capítulo "El lenguaje de macros del LCS".

Con el software se incluyen algunas macros predefinidas de fábrica que pueden aplicarse tal cual o modificarse antes de su utilización. Las macros creadas por el usuario o modificadas se guardan en su directorio específico.

### \*.pbo

En este formato se guardan plantillas para la asignación de comandos de la consola de mando. Con estas plantillas se definen los parámetros de barrido que se controlan a través de cada botón giratorio. También aquí existen valores por defecto que se han encontrado útiles para la mayoría de las aplicaciones estándar. Las plantillas definidas por el usuario se guardan en directorios específicos de éste.

### \*.pro

En este formato se guardan perfiles específicos de la interfaz del usuario. Entre ellos se encuentra, la posición en que se encuentra cada tecla en cada barra de herramientas. Al mismo tiempo, es posible definir nuevas barras de tareas e insertar o separar barras previamente definidas. En un perfil también se define la posición de las barras de tareas (integrada o móvil). De esta forma, cada usuario puede configurar su propia interfaz. Los responsables del sistema pueden, por ejemplo, utilizar esta herramienta para configurar diferentes interfaces de usuario para los distintos niveles de conocimiento (principiante, avanzado, experto).

### \*.lst

En el directorio del usuario, junto con los perfiles específicos de éste, se guarda también el perfil de la última utilización, así como una lista con los cuatro últimos bloques de datos utilizados por dicho usuario.

**\*.prt**

En este formato se guardan plantillas para el visor "Viewer". Esto permite definir de forma específica la apariencia y el tipo de la información visualizada. Si desea una explicación de todas las opciones de configuración, consulte el capítulo "Visor Viewer".

**\*.lhw**

En este formato se guardan los datos de calibración y la configuración del hardware del sistema confocal. Este archivo sólo puede editarlo el personal de atención al cliente certificado por Leica Microsystems Heidelberg.



*Las modificaciones de este archivo pueden provocar graves daños en el sistema confocal que, en algunos casos, pueden resultar irreparables. En los casos en que pueda demostrarse que un daño está provocado por la modificación de este archivo por parte del usuario la consecuencia es la pérdida de la garantía para todo el sistema.*

**\*.lut**

En este formato se guardan las tablas de asignación de colores. Con ellas se asigna un color a los valores de intensidad medidos mediante los detectores. Junto con la visualización pura del color, pueden utilizarse tablas en las que se eliminan determinados ámbitos de intensidad. Si desea más detalles, consulte el capítulo "Selección de tablas de asignación de color".

**Formatos de datos fijos específicos de Leica**

El Leica Confocal Software permite abrir y visualizar los formatos de archivo siguientes:

**Datos brutos (\*.raw)**

El formato RAW guarda datos como matriz lineal bidimensional en formato INTEL. El índice de columnas de la matriz contiene la dimensión de detección más rápida (en la mayoría de los casos, el eje x) y el índice de filas contiene la dimensión más lenta (en la mayoría de los casos, el eje y). En una exposición de 8 bits, cada magnitud de medición se guarda como un byte independiente. En exposiciones de 12 bits se utilizan 2 bytes y, según el formato INTEL (little endian) el primero de ellos contiene los bits como valores más altos. Para cada canal se guarda cada corte óptico en un archivo separado con la extensión .raw. La convención para el nombre es: *Nombre del experimento\_Nombre del bloque de datos\_Número de canal\_Dimensión z\_Número de corte óptico.raw*

**Experimentos (\*.lei):**

Se trata de un formato de datos binario específico de Leica. Este formato está previsto para datos procedentes de experimentos completos.

En este formato de archivo se guarda una descripción de archivos que remite a una serie de archivos de imágenes en formato TIFF o RAW.

**Archivos TIFF (\*.tif):**

Se trata de archivos de imagen de Leica en formato TIFF sencillo y múltiple. Permite leer archivos de imagen en formatos TCS utilizados anteriormente y archivos externos en formato RGB-TIFF.

**Anotación (\*.ano):**

En este caso, también se trata de un formato de datos binario específico de Leica. En él se almacenan páginas de presentación (Annotations). Los elementos que contienen las páginas de presentación, como imágenes, texto y gráficos, se guardan como objetos individuales.



Para las magnitudes de medición, se guarda en el archivo LEI correspondiente si se trata de un valor de intensidad o de altura.

2 <sup>7</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>1</sup>	2 <sup>0</sup>	2 <sup>15</sup>	2 <sup>14</sup>	2 <sup>13</sup>	2 <sup>12</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>8</sup>
Byte de valor bajo de acuerdo con el formato INTEL								Byte de valor alto de acuerdo con el formato INTEL							

Representación de un número de 12 bits en formato INTEL

## Especificaciones del formato de archivo "Lei" (versión beta 2.000)

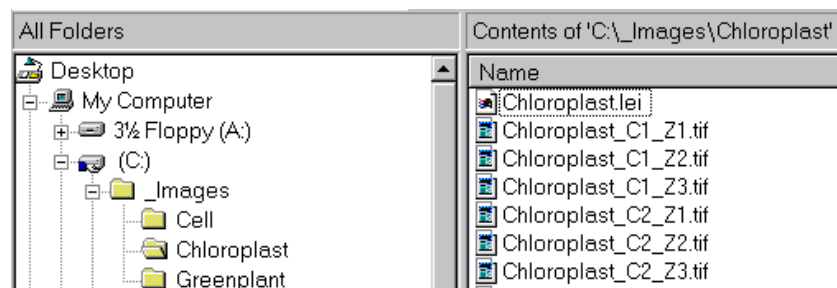
Tan pronto como se guarda un archivo en el software LCS se crea, en primer lugar, un subdirectorio del directorio actual.

En dicho subdirectorio se almacena:

1. Un archivo descriptivo cuya estructura se describe a continuación. Permite al software LCS interpretar los datos de un experimento.

2. Los archivos de imagen; la asignación de nombre de estos sigue la lógica siguiente:

NOMBRE\_número de canal\_índice de dimensión. Así, por ejemplo, Chloroplast\_C1\_Z1 indica que el nombre del bloque de datos asignado por el usuario es "Chloroplast", que la imagen corresponde al primer corte óptico de un lote de datos tridimensional (Z1), y que los datos se han capturado en el primer canal de detección (C1).



Ejemplo del almacenamiento de un experimento en formato "Lei"

### Estructura del archivo descriptivo

El archivo descriptivo sólo lo lee el software LCS.

Consta de una recopilación de diferentes tablas y posee la siguiente estructura

#### Tabla de encabezamiento

Byte	Significado	Valores posibles
0 ... 3	Asignación de bytes	0x49494949 Intel LSB 0x4D4D4D4D Motorola MSB
4 ... 7	Identificación para formato "Lei" de Leica	0x016033F0
8 ... 11	Número de versión	actual: =x20000000
12 ... 15	Dirección de la tabla de directorios <b>A</b>	cada dirección posible en el ámbito de la longitud global del archivo

Tabla de directorios A

Dirección	Significado	Tipo de datos de la entrada
Dirección de <b>A</b> = A	Número de entradas en esta tabla	DWORD
A+4	Índice de las primeras entradas (reproduce un bloque de memoria lógico, por ejemplo, parámetros de captura ("parámetros de hardware") o parámetros de imagen ("dimensiones"))	DWORD
A+8	Dirección <b>A1</b> de la 1ª entrada	DWORD
A+12	Índice de las primeras entradas (reproduce un bloque de memoria lógico, por ejemplo, parámetros de captura ("parámetros de hardware") o parámetros de imagen ("dimensiones"))	DWORD
A+14	Dirección <b>A2</b> de la 2ª entrada	DWORD
...	...	...

La longitud de la tabla de directorios depende de cuantas imágenes y datos de imágenes deben guardarse en un experimento (parámetros de captura, número de canales, número de cortes ópticos, etc.). Cada entrada de la tabla se corresponde con un bloque de memoria lógico.

Tabla de bloques Xn

Dirección	Significado	Tipo de datos
A1 ó A2 ó A3.....A <sub>i</sub>	Cifra de prueba	DWORD
A <sub>i</sub> + 4 bytes	Descripción del contenido de la tabla de bloques (no se utiliza por el momento)	DWORD
A <sub>i</sub> + 8 bytes	Versión de la entrada	DWORD
A <sub>i</sub> + 12 bytes	Magnitud de la entrada	DWORD
A <sub>i</sub> + 16 bytes	Inicio de la entrada	El tipo de datos depende del tipo de entrada.

**Están disponibles los siguientes bloques de memoria lógicos:**

const DWORD	ID_SERIES	=	10;
const DWORD	ID_IMAGES	=	15;
const DWORD	ID_DIMDESCR	=	20;
const DWORD	ID_FILTERSET	=	30;
const DWORD	ID_TIMEINFO	=	40;
const DWORD	ID_SCANNERSET	=	50;
const DWORD	ID_EXPERIMENT	=	60;
const DWORD	ID_LUTDESC	=	70;

Para el tipo de datos DWORD se ha definido una posición de memoria de 32 bits.

**Bloque de memoria ID\_SERIES**

Este bloque de datos contiene información sobre el tamaño de la serie de datos completa recogida en un experimento. Este bloque de datos aparece siempre precisamente una sola vez y se estructura de la forma siguiente:

Tamaño [bytes]	Tipo de datos	Símbolo	Descripción
4	int		Número de versión interno
4	int	nSE	Número de series de imágenes
4	int	nIm	Longitud de un nombre de archivo en wchar
4	int	nExt	Longitud de una extensión de archivos de imágenes en bytes
nExt	wchar		Extensión del archivo de imagen

**Bloque de memoria ID\_IMAGES**

Este bloque contiene los nombres de todos los archivos de imagen pertenecientes a una serie. y se estructura de la forma siguiente:

	4	int	nFiles	Número de imágenes individuales de una serie
	4	int		Ancho de la imagen individual
	4	int		Longitud de la imagen individual
	4	int		Bits / punto de datos (resolución de la exposición)
	4	int		Puntos de datos / píxel (resolución de la visualización)
Para los $n$ archivos de imágenes siguientes				
	$nIm * 2$	wchar		Nombre de la imagen siguiente

**Bloque de memoria ID\_DIMDESCR**

Este bloque contiene la descripción de una imagen en un espacio de  $n$  dimensiones.

	Tamaño [bytes]	Tipo de datos	Símbolo	Descripción
	4	int		Número de versión interna de la descripción VOXEL
	4	int		Tipo de Voxel, p. ej., RGB o GRAY (vea la tabla siguiente de tipos de VOXEL)
	4	DWORD		Tamaño de bytes de un píxel Típico: (1 ó 2) o (3 ó 6 para RGB)
	4	DWORD		Resolución de los datos de barrido (8, 12 ó 16 bits)
	4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres, length in wchar (wchar = <b>w</b> ide <b>c</b> haracter) formato de caracteres de texto que, a diferencia del formato ASCII (1 byte) utiliza una codificación de 2 bytes en los caracteres.
	$nTC * 2$	wchar		Valor máximo de la magnitud de medición (valor de intensidad o de longitud de una distancia) para un voxel.
	4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en wchar
	$nTC * 2$	wchar		Valor mínimo de la magnitud de medición (valor de intensidad o de longitud de una distancia) para un voxel.
	4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en wchar
	$nTC * 2$	wchar		Identificación de la magnitud de medición ("I" para intensidad, "Z" para valor de longitud)
	4	int		Número de versión interno
	4	int	nDims	Dimensión de la imagen, por ejemplo, x_y_ch_z = 4
Para las $n$ dimensiones siguientes				
	4	DWORD		Número de identificación (ID) de la dimensión (vea la lista siguiente, "Números de identificación (ID) para dimensiones de imagen")
	4	DWORD		Tamaño de la dimensión (p. ej., 512 píxeles)
	4	DWORD		Distancia entre sub-dimensiones (p. ej., distancia en bytes entre las series de imágenes de dos canales consecutivos)
	4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en wchar
	$nTC * 2$	wchar		Longitud física con unidad de longitud, p. ej., 10 $\mu m$
	4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en wchar
	$nTC * 2$	wchar		Posición inicial física con unidad de longitud, p. ej., 10 $\mu m$
	4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en bytes
	nTC	wchar		Nombre de la serie de imágenes
	4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en bytes
	nTC	wchar		Descripción de la serie de imágenes

**Números de identificación (ID) para dimensiones de imagen**

Son posibles los siguientes números de identificación:

ID (decimal)	Significado
0	Indefinido
120	x
121	y
122	z
116	t para dimensión temporal
6815843	Número de canal
6357100	Longitud de onda
7602290	Rotación
7798904	x-wide para la platina xy motorizada
7798905	y-wide para la platina xy motorizada
7798906	z-wide para la platina z motorizada
4259957	user1 (no especificado)
4325493	user2 (no especificado)
4391029	user3 (no especificado)
6357095	Valor intermedio, p. ej., de un histograma
6422631	Valor intermedio1, p. ej., de un histograma
6488167	Valor intermedio2, p. ej., de un histograma
6553703	Valor intermedio3, p. ej., de un histograma
7864398	x lógico (no valor de posición físico sino lógico)
7929934	y lógico (no valor de posición físico sino lógico)
7995470	z lógico (no valor de posición físico sino lógico)
7602254	t lógico (no valor de posición físico sino lógico)
7077966	valor de longitud de onda lógico (no valor físico sino lógico)
7471182	valor de rotación lógico (no valor físico sino lógico)
5767246	valor x-wide lógico (no valor físico sino lógico)
5832782	valor y-wide lógico (no valor físico sino lógico)
5898318	valor z-wide lógico (no valor físico sino lógico)

**Bloque de memoria ID\_FILTERSET**

Este bloque de memoria describe la configuración del hardware como, por ejemplo, el diámetro de pinhole o el filtro seleccionados. El bloque de memoria comienza con un encabezamiento SAFEARRAY, que describe la cantidad y el tamaño de las entradas. Si desea una descripción completa de la estructura de SAFEARRAY, vea el apéndice 1.

De la estructura de SAFEARRAY se utilizan en la actualidad sólo tres entradas:

**1. sa.cDims:**

debe ser = 1. En la actualidad se utilizan sólo campos de datos de una dimensión (matrices).

**2. sa.cbElements:**

Tamaño del elemento en bytes

**3. sa.rgsabound[0].cElements:**

indica el número de elementos que contiene la estructura.

Tamaño [bytes]	Tipo de datos	Símbolo	Descripción
24	SAFEARRAY	sa	Tipo Microsoft, vea el apéndice 1
para todos los elementos que contiene la estructura = sa.rgsabound[0].cElements			



128	wchar		Identificador para el contenido de la entrada
64	wchar		Nombre de una descripción breve, p. ej., una marca descriptiva tiff (tiff-tag)
64	wchar		Cadena de caracteres (aquí consta el contenido de la cadena de caracteres)
16	VARIANT		Contiene el tipo y el valor de datos (con excepción del tipo de datos "string" (cadena de caracteres) que se describe en el campo anterior)
4	DWORD		Posición de memoria separada para valores de datos
4	DWORD		No utilizado
4	DWORD		Identificador (ID) del bloque de memoria (sólo para uso interno)
4	DWORD		Valor de prueba

**Bloque de memoria ID\_TIMEINFO**

Este bloque de memoria contiene marcadores temporales para series de imágenes capturadas con un modo de barrido dependiente del tiempo.

Tamaño [bytes]	Tipo de datos	Símbolo	Descripción	
4	int	nDims	Indica el número de dimensiones que abarca la descripción del marcador temporal	
4	int		Indica qué dimensiones disponen de un marcador temporal	
Para las $n$ dimensiones siguientes				
4	DWORD		Identificador (ID) de la dimensión (vea la descripción del bloque de memoria D_DIMDESCR)	
4	DWORD		Tamaño de la dimensión (número de elementos, p. ej., 512 píxeles)	
4	DWORD		Distancia entre las entradas de dimensión independientes	
4	int	nTS	Número del marcador temporal	
Para los $n$ marcadores temporales siguientes = nTS				
64	wchar		Marcador temporal como cadena de caracteres (tipo de datos "string")	
4	int	nTM	Número de marcas temporales por marcador temporal	
Para las $m$ marcas temporales siguientes = nTM				
	4	int	nC	Número de dimensiones por descripción de marcador temporal
loop nC				
	4	int		Coordenadas de esta dimensión
	64	wchar		Marca temporal como cadena de caracteres (tipo de datos wchar)

**Ejemplo:**

Imagen con las dimensiones y las magnitudes de dimensión siguientes:

x	y	ch	z
512	512	3	10

La descripción de una marca temporal es, por ejemplo, 512\_512\_3\_10. Esta descripción se adapta



con exactitud a la descripción de la imagen. Una descripción del marcador temporal 1024\_1024\_3\_10 para el ejemplo anterior significa que la imagen original tenía una dimensión xy de 1024\*1024 y se ha reducido mediante el software (downsampling). En estos casos, la marca temporal debe calcularse de nuevo de acuerdo con esto.

Una marca temporal puede definirse en cualquier momento durante el proceso de captura de datos (Scan) de n dimensiones. Una coordenada de una marca temporal de 0\_0\_2\_7 significa que la marca temporal se ha establecido al inicio de un bloque de datos (0\_0\_c\_#) en el segundo canal (0\_0\_2\_#) para el séptimo corte óptico (0\_0\_2\_7).

### Bloque de memoria ID\_SCANNERSET

Este bloque de memoria contiene parámetros del aparato que se ajustan en el momento de la captura de la imagen.

Si desea más detalles sobre la estructura de SAFEARRAY, consulte la descripción del bloque de memoria ID\_FILTERSET.

Tamaño [bytes]	Tipo de datos	Símbolo	Descripción
24	SAFEARRAY	sa	Tipo Microsoft, vea el apéndice
para todos los elementos que contiene la estructura = sa.rgsabound[0].cElements			
128	wchar		Identificador para el contenido de esta entrada
64	wchar		Nombre para una descripción breve, p. ej., en la marca descriptiva tiff (tiff-description-tag)
64	wchar		Cadena de caracteres (aquí consta el contenido de la cadena de caracteres)
20	VARIANT		Contiene el tipo y el valor de datos (con excepción del tipo de datos "string" (cadena de caracteres) que se describe en el campo anterior)
4	DWORD		Posición de memoria separada para valores de datos
4	DWORD		No utilizado
4	DWORD		Identificador (ID) del bloque de memoria (sólo para uso interno)
4	DWORD		Valor de prueba

### Bloque de memoria ID\_EXPERIMENT

Descripción del formato de almacenamiento utilizado (p. ej., "\*.lei file with PC-Tiff images")

Tamaño [bytes]	Tipo de datos	Símbolo	Descripción
4	int		Número de versión interno
4	int		Número de imágenes del grupo de datos del experimento
4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en wchar
nTC * 2	wchar		Breve descripción del formato
4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en wchar
nTC * 2	wchar		Extensión del archivo principal
4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en wchar
nTC * 2	wchar		Identificador del formato de la imagen individual (p. ej., PC-TIFF)
4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en wchar
nTC * 2	wchar		Extensión para el formato de la imagen individual (p. ej., tif / raw)

**Bloque de memoria ID\_LUTDESC**

Descripción de las tablas de asignación de colores (LUT's)

Tamaño [bytes]	Tipo de datos	Símbolo	Descripción
4	int	nLU	Número de canales
4	DWORD		Identificador (ID) de la dimensión, cuya visualización se colorea.
Para los canales siguientes hasta = nLU			
4	int		Número de versión interno
1	bool		bool IsInverted
4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en bytes
nTC	wchar		Descripción de la tabla de asignación de colores (LUT)
4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en bytes
nTC	wchar		Nombre de archivo de la tabla de asignación de colores (en el caso de que exista)
4	int	nTC	Longitud de las siguientes cadenas de caracteres en bytes
nTC	wchar		Nombre de la propia tabla de asignación de colores
4	int		Campo para uso interno
4	int		Dimensión de la tabla de asignación de colores

**SAFEARRAY Data Type**

```
typedef struct FARSTRUCT tagSAFEARRAY {
    unsigned short cDims;           // Count of dimensions in this array
    unsigned short fFeatures;       // DON'T CARE
    unsigned long cbElements;       // Size of an element of the array.
                                    // Does not include size of
                                    // pointed-to data.
    unsigned long cLocks;           // DON'T CARE
    void HUGE* pvData;             // Pointer to the data.
    SAFEARRAYBOUND rgsabound[1];   // One bound for each dimension.
} SAFEARRAY;
```



*El formato de archivos "LEI", específico de Leica, utiliza sólo campos de datos de una dimensión (matrices)*

**SAFEARRAYBOUND Structure**

Represents the bounds of one dimension of the array. The lower bound of the dimension is represented by `lLbound`, and `cElements` represents the number of elements in the dimension. The structure is defined as follows:

```
typedef struct tagSAFEARRAYBOUND {
    unsigned long cElements;        // num of elements
    long lLbound;                  // DON'T CARE
} SAFEARRAYBOUND;
```

**VARIANT and VARIANTARG**

```
typedef struct FARSTRUCT tagVARIANT VARIANT;

typedef struct tagVARIANT {
    VARTYPE vt;
    unsigned short wReserved1;
    unsigned short wReserved2;
    unsigned short wReserved3;
    union {
        unsigned char    bVal;           // VT_UI1.
        short            iVal;           // VT_I2.
        long             lVal;           // VT_I4.
        float            fltVal;         // VT_R4.
        double           dblVal;         // VT_R8.
        VARIANT_BOOL     boolVal;        // VT_BOOL.
        SCODE             scode;          // VT_ERROR.
        CY               cyVal;          // VT_CY.
        DATE             date;           // VT_DATE.
        BSTR             bstrVal;        // VT_BSTR.
        IUnknown          FAR* punkVal;   // VT_UNKNOWN.
        IDispatch         FAR* pdispVal; // VT_DISPATCH.
        SAFEARRAY         FAR* parray;    // VT_ARRAY|.
        unsigned char    FAR* pbVal;     // VT_BYREF|VT_UI1.
        short            FAR* piVal;     // VT_BYREF|VT_I2.
        long             FAR* plVal;     // VT_BYREF|VT_I4.
        float            FAR* pfltVal;   // VT_BYREF|VT_R4.
        double           FAR* pdblVal;   // VT_BYREF|VT_R8.
        VARIANT_BOOL     FAR* pboolVal; // VT_BYREF|VT_BOOL.
        SCODE             FAR* pscode;    // VT_BYREF|VT_ERROR.
        CY               FAR* pcyVal;    // VT_BYREF|VT_CY.
        DATE             FAR* pdate;     // VT_BYREF|VT_DATE.
        BSTR             FAR* pbstrVal;  // VT_BYREF|VT_BSTR.
        IUnknown FAR*    FAR* ppunkVal;  // VT_BYREF|VT_UNKNOWN.
        IDispatch FAR*    FAR* pdispVal; // VT_BYREF|VT_DISPATCH.
        SAFEARRAY FAR*    FAR* parray;   // VT_ARRAY|.
        VARIANT          FAR* pvarVal;   // VT_BYREF|VT_VARIANT.
        void             FAR* byref;     // Generic ByRef.
    };
};
```



*En archivos con formato "LEI" nunca se utilizan punteros como parámetros.*

**VARTYPE**

```
typedef unsigned short VARTYPE;
enum VARENUM{
    VT_EMPTY    = 0,           // Not specified.
    VT_NULL     = 1,           // Null.
    VT_I2       = 2,           // 2-byte signed int.
    VT_I4       = 3,           // 4-byte signed int.
    VT_R4       = 4,           // 4-byte real.
    VT_R8       = 5,           // 8-byte real.
    VT_CY       = 6,           // Currency.
    VT_DATE     = 7,           // Date.
    VT_BSTR     = 8,           // Binary string.
    VT_DISPATCH = 9,           // IDispatch
    VT_ERROR    = 10,          // Scodes.
    VT_BOOL     = 11,          // Boolean; True=-1, False=0.
    VT_VARIANT  = 12,          // VARIANT FAR*.
    VT_UNKNOWN  = 13,          // IUnknown FAR*.
    VT_UI1      = 17,          // Unsigned char.

    // Other constants that are not valid in VARIANTS omitted here.
};

VT_RESERVED    = (int) 0x8000
```

```
// By reference, a pointer to the data is passed.
VT_BYREF      = (int) 0x4000
VT_ARRAY      = (int) 0x2000    // A safe array of the data is passed.
```

El valor vt determina la interpretación de los datos del experimento de la forma siguiente:

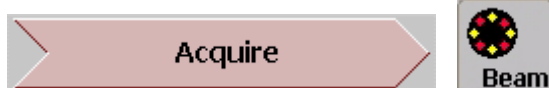
Valor	Descripción
VT_EMPTY	No se ha introducido ningún valor.
VT_UI1	Se ha guardado un carácter de 1 byte sin nombre en <i>bVal</i> .
VT_I2	Se ha guardado un valor entero (Integer) de 2 bytes en <i>iVal</i> .
VT_I4	Se ha guardado un valor entero (Integer) de 4 bytes en <i>iVal</i> .
VT_R4	Se ha guardado un valor de índice de planeo IEEE (real value) de 4 bytes en <i>fltVal</i> .
VT_R8	Se ha guardado un valor de índice de planeo IEEE (real value) de 8 bytes en <i>dblVal</i> .
VT_CY	Se ha introducido un valor con coma fija. Este valor consta de 15 espacios antes de la coma y de 4 espacios tras ella. El valor se ha almacenado en <i>cyVal</i> .
VT_BSTR	Excepción para archivos en formato Lei: Se ha guardado una cadena de caracteres en la variable TCHAR.
VT_NULL	Se ha introducido un valor cero móvil. El cero móvil no es un indicador CERO. Este valor se precisa para una lógica de 3 estados como, p. ej., en el lenguaje de consulta del banco de datos SQL.
VT_ERROR	Se ha introducido un error SCODE. El tipo de error se especifica en <i>scodee</i> .
VT_BOOL	Se ha introducido una magnitud booleana (cierto / falso). El valor 0xFFFF (todos los bits=1) quiere decir "cierto", el valor 0 (todos los bits=0) quiere decir "falso".
VT_DATE	Se ha introducido un valor que corresponde a una fecha. Una fecha se almacena como número de formato de precisión doble. Todos los datos se almacenan como días diferentes al 01 de enero de 1900. La entrada "25", por ejemplo, corresponde a la fecha 25.01.1900.

## Procedimiento y ejercicios sobre procesos seleccionados

### Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen

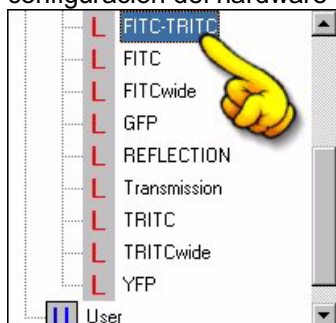
#### 1<sup>er</sup> paso

Haga clic en el símbolo de flecha "**Acquire**" y abra el cuadro de diálogo "Beam Path Setting" con la tecla "Beam".



#### 2<sup>o</sup> paso

En este cuadro de diálogo, haga doble clic en el campo de la lista situado en la parte superior derecha, sobre un **lote de parámetros de captura (IPS)** para cargar la configuración del hardware importante.

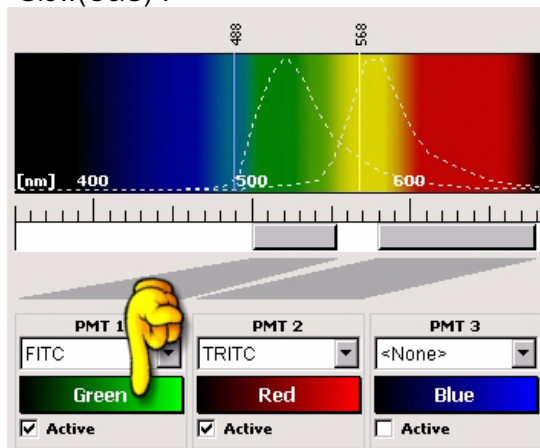


#### ¿Qué es un lote de parámetros de captura?

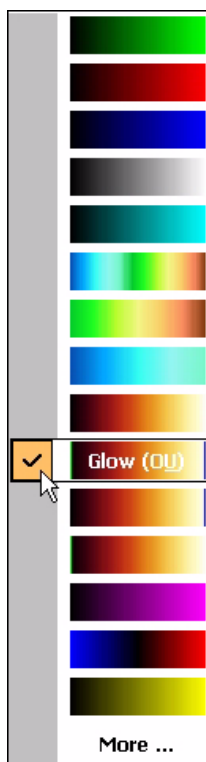
Un lote de parámetros de captura (IPS: Instrument Parameter Setting) es un archivo en el que se guarda la configuración del hardware específica para una determinada técnica de captura. "FITC-TRITC", por ejemplo, designa la configuración para la captura mediante dos canales con ambas tinturas FITC y TRITC. Un lote de parámetros de captura permite guardar la configuración del hardware optimizada en un archivo y cargarla de nuevo simplemente con un doble clic. Los lotes de parámetros de captura marcados con "L" están predefinidos por Leica y no pueden modificarse. Los lotes editables definidos por el usuario se almacenan en el árbol de directorios bajo "U". & vea el capítulo "Creación de lotes de parámetros de captura (IPS) definidos por el usuario" (página 73)

#### 3<sup>er</sup> paso

Agregue cada **canal de detección "PMT"** activo a la tabla de asignación de colores "Glow(O&U)".



\*Haga clic en el símbolo de la tabla de asignación de colores



► Haga clic en "Glow (OU)".



#### Nota sobre la calidad de imagen

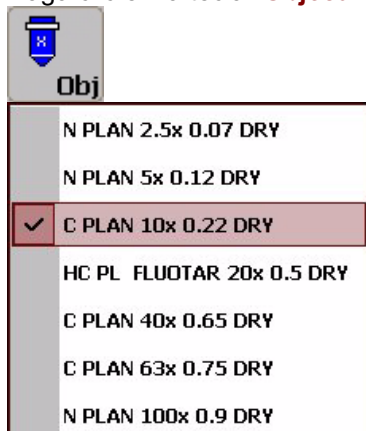
La tabla de asignación de colores "Glow (O&U)" visualiza el valor máximo azul y el valor mínimo verde. Por ello, está especialmente indicada para la optimización de la calidad de imagen. En el paso 12 se describe la optimización de la gama de intensidad de una exposición para su visualización en el monitor con ayuda de esta tabla de asignación de colores.

#### 4º paso

Antes de comenzar con la optimización de la calidad de imagen, compruebe la configuración estándar de los parámetros de captura mencionados a continuación en los pasos 5 hasta 9; estos parámetros no pueden modificarse durante la captura de la imagen.

#### 5º paso

Haga clic en la tecla "**Objective**" y seleccione en la lista un objetivo para el microscopio.



En el caso de que la lista no contenga ninguna entrada, debe asignar los objetivos a las tomas del revólver portaobjetivos.

► Para ello lea la descripción de ayuda de la tecla "Objective": pulse en primer lugar la

tecla "Help" y, a continuación, haga clic en "Objective".



#### Nota sobre la calidad de imagen

La apertura numérica del objetivo del microscopio determina la resolución de la imagen, es decir, la distancia mínima entre dos puntos de un objeto para que aún puedan percibirse como puntos separados. Los objetivos de gran ampliación también tienen un mayor poder resolutivo.

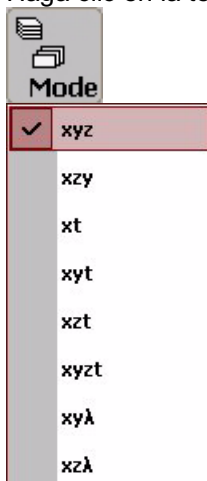
La expansión del haz (tecla "Beam Expander") permite adaptar de forma óptima el diámetro del haz a la lente del objetivo utilizado.



La configuración estándar "Beam Exp 6" resulta óptima en la mayoría de los casos. Si se utiliza un láser de poca potencia y un objetivo de alta resolución puede mejorarse aún más la iluminación de la lente del objetivo mediante una expansión del haz reducida.

#### 6º paso

Haga clic en la tecla "**Mode**" y seleccione un modo de barrido.

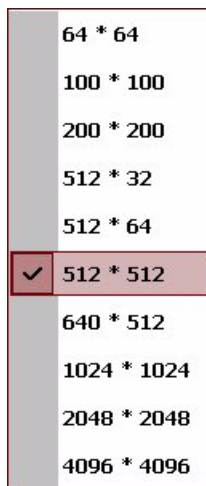


Mediante el modo de barrido se determina la dimensionalidad de la captura de la imagen. Puede elegir entre las series de imágenes espaciales "xyz, xzy", las series de imágenes temporales "xt, xyt, xzt, xyzt" y las series de imágenes espectrales "xyλ, xzλ".

#### 7º paso

Haga clic en la tecla "**Format**" y seleccione un formato de barrido.



**Nota sobre la calidad de imagen**

El formato de barrido determina el número de puntos en los que el scanner explora el preparado y, de esta forma, el número de píxeles de la imagen. Cuanto mayor sea el formato de barrido para un campo de barrido determinado, menor será la distancia entre puntos de exploración y mejor la resolución de la imagen.

**8º paso**

Haga clic en la tecla "**Speed**" y seleccione una velocidad de barrido.



La velocidad de barrido define el número de líneas de la imagen por segundo que explora el scanner.

**Nota sobre la calidad de imagen**

La velocidad de barrido afecta a la calidad de la imagen. Cuanto menor es la velocidad de barrido para un formato determinado, mejor es la relación señal / ruido de la imagen.

Para duplicar la velocidad de barrido, active el barrido bidireccional mediante la tecla "Scan".



Con el barrido bidireccional no sólo se utiliza el recorrido de ida del scanner para la captación, sino también el de retorno.

**9º paso**

Haga clic en la tecla "**Bit**" y seleccione una profundidad de bit.



Con 8 bits pueden capturarse 256 valores de intensidad diferentes y con 12 bits, 4096.

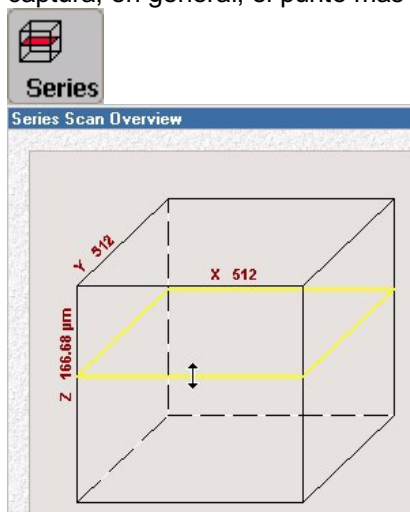
**10º paso**

Pulse la tecla "**Continuous**" para iniciar la captura de la imagen con barrido continuo y optimizar la calidad de la imagen durante la captura.

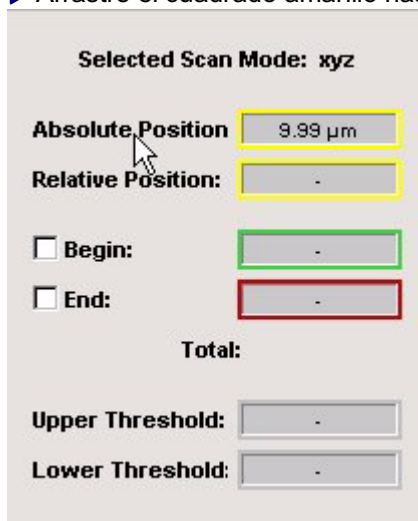


**11º paso**

Haga clic en la tecla "**Series**" y seleccione un plano focal (posición Z) apropiado para la captura, en general, el punto más claro del preparado.



► Arrastre el cuadrado amarillo hasta la posición Z deseada, **o bien**,



► Haga doble clic en "Absolute Position" e introduzca un valor.

**Nota para la localización del plano focal**

En el caso de que tenga dificultades para localizar el plano focal, puede ser debido a que la amplificación de señal de los detectores no está ajustada de forma correcta.



► Haga clic en la tecla "Signal" y ajuste el valor "Gain" del canal de detección activo al número máximo de voltios.

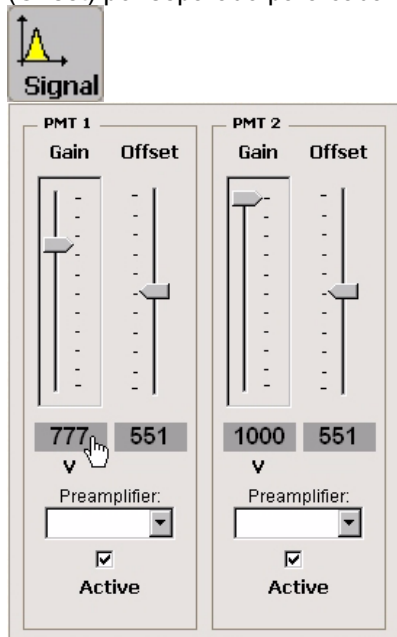
En muchos parámetros de captura el ajuste es más rápido y cómodo a través de la consola de mando que mediante las teclas.

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros de captura con la consola de mando"

(página 79)

**12º paso**

Haga clic en la tecla "**Signal**" y ajuste la amplificación de señal (Gain) y el valor umbral (Offset) por separado para cada detector (PMT) utilizado.



- ▶ Desplace el botón deslizable o haga doble clic en el número e indique un valor.
- ▶ Ajuste el valor "Gain" de forma que los puntos más claros de la imagen (estructura) se vean en azul.
- ▶ Ajuste el valor "Offset" de forma que los puntos más oscuros de la imagen (fondo) se vean en verde. Grosso modo, la mitad del fondo debe verse de color verde.

**Nota sobre la calidad de imagen**

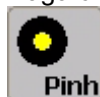
La adaptación de los parámetros de detección para el preparado garantiza que se asigna una gama óptima de valores digitales al ámbito de intensidad de la captura de la imagen y se visualiza de forma óptima.

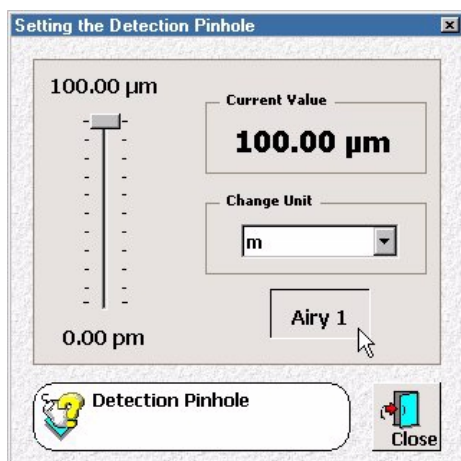
En muchos parámetros de captura el ajuste es más rápido y cómodo a través de la consola de mando que mediante las teclas.

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros de captura con la consola de mando" (página 79)

**13º paso**

Haga clic en la tecla "**Pinhole**" y ajuste el diafragma de detección para una unidad Airy.



**Nota sobre la calidad de imagen**

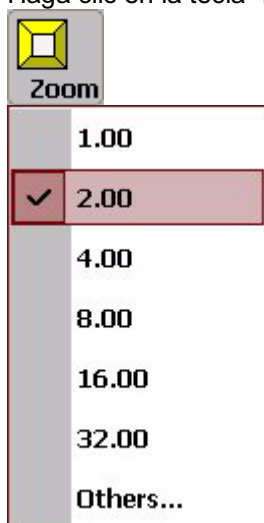
El diafragma de detección es decisivo para la resolución de la imagen. La configuración de éste para una unidad Airy garantiza que el grosor de un corte es el mínimo lo que permite alcanzar la máxima resolución en la dimensión z de la imagen.

En muchos parámetros de captura el ajuste es más rápido y cómodo a través de la consola de mando que mediante las teclas.

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros de captura con la consola de mando" (página 79)

**14º paso**

Haga clic en la tecla "**Electronic Zoom**" para ampliar el campo de captura.

**Nota sobre la calidad de imagen**

El zoom electrónico permite mejorar la resolución de la imagen. Si se selecciona, por ejemplo, el factor de ampliación 2.00, sólo se explora una cuarta parte del campo de barrido máximo. En un formato de barrido determinado, la distancia entre puntos de captura disminuye y mejora la resolución.

En muchos parámetros de captura el ajuste es más rápido y cómodo a través de la consola de mando que mediante las teclas.

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros de captura con la consola de mando" (página 79)

15º paso

Haga clic en la tecla "**Continuous**", para finalizar la captura de imagen con barrido continuo.



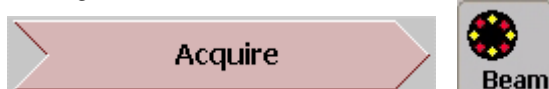
1

Ahora están ajustados todos los parámetros de captura y puede continuar con la exposición de imágenes individuales o de series de imágenes.

## Creación de lotes parámetros de captura (IPS) definidos por el usuario

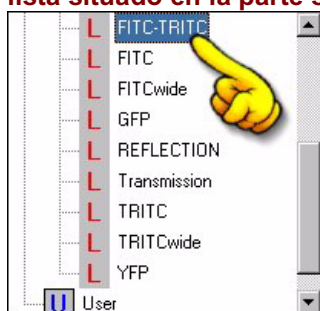
### 1<sup>er</sup> paso

Haga clic en el símbolo de flecha "**Acquire**" y abra el cuadro de diálogo "Beam Path Setting" con la tecla "Beam".



### 2<sup>o</sup> paso

En este cuadro de diálogo se fusionan los lotes de parámetros de captura del **campo de lista situado en la parte superior derecha**.

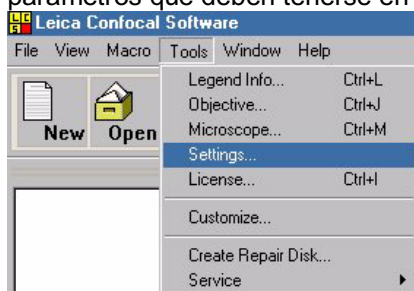


#### ¿Qué es un lote de parámetros de captura?

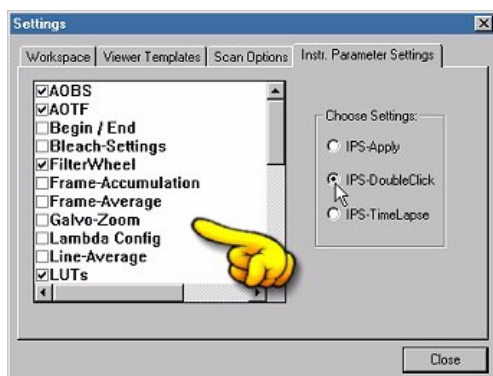
Un lote de parámetros de captura (IPS: Instrument Parameter Setting) es un archivo en el que se guarda la configuración del hardware específica para una determinada técnica de captura. "FITC-TRITC", por ejemplo, designa la configuración para la captura mediante dos canales con ambas tinturas FITC y TRITC. Un lote de parámetros de captura permite guardar la configuración del hardware optimizada en un archivo y cargarla de nuevo de forma automática con un doble clic. Los lotes de parámetros de captura marcados con "L" están predefinidos por Leica y no pueden modificarse. Los lotes editables definidos por el usuario se almacenan en el árbol de directorios bajo "U".

### 3<sup>er</sup> paso

Seleccione "**Tools\ Settings\ Instr. Parameter Settings**" y defina en primer lugar los parámetros que deben tenerse en cuenta al cargar el lote de parámetros de captura.



► Seleccione "Tools\ Settings\ Instr. Parameter Settings".



► El campo de lista contiene ya algunos parámetros estándar seleccionados que sólo deben modificarse de forma consciente. Seleccione la opción "IPS-DoubleClick" y marque los parámetros de captura adicionales que desee.

#### 4º paso

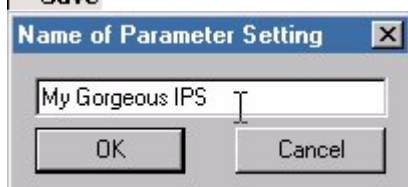
Para adaptar los parámetros de captura al preparado actual durante la captura de la imagen, inicie una captura con barrido continuo mediante la tecla "**Continuous**".



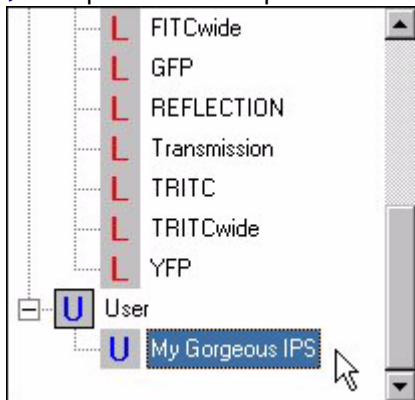
& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

#### 5º paso

En el cuadro de diálogo "Beam Path Setting" haga clic en la tecla de pantalla "**Save**" para guardar la configuración de parámetros modificada como lote de parámetros de captura.



► Indique un nombre para el nuevo lote de parámetros de captura y haga clic en OK.



El lote de parámetros de captura definido aparece en el campo de lista bajo "U". Cada vez que haga doble clic en "My Gorgeous IPS", se cargan todos los parámetros de hardware guardados bajo este lote de parámetros de captura.

**¿Dónde se guardan los lotes de parámetros de captura?**

Los lotes de parámetros de captura definidos por el usuario se almacenan en el directorio del usuario actual de Windows NT. Como configuración estándar, el directorio se encuentra bajo D:\users\... Por ello, sólo tiene acceso a un lote de parámetros de captura el usuario que lo ha creado. Si varias personas han de acceder a un lote de parámetros definido por el usuario, su creador o el administrador deben liberar su acceso para otros usuarios.

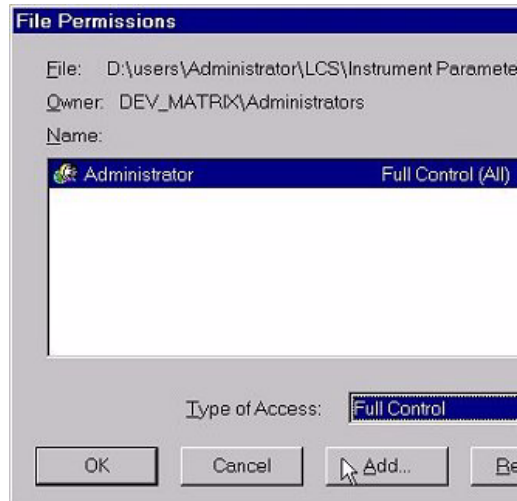
**6º paso**

Puede permitir a otros usuarios **acceso** a sus lotes de parámetros de captura.

► En Windows Explorer, abra el directorio en el que están guardados los lotes de parámetros de captura. En la configuración estándar, por ejemplo, para un usuario que ha iniciado la sesión como administrador, el directorio se encuentra en D:\users\Administrator\Lcs\Instrument Parameter Settings\...

► Marque el lote de parámetros de captura, abra el menú contextual con el botón derecho del ratón y seleccione "Properties".

► En este cuadro de diálogo, haga clic en el registro "Security" y, a continuación, en "Permissions".



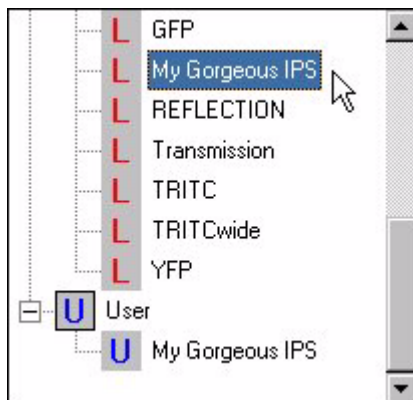
► En el cuadro de diálogo "File Permissions" haga clic en la tecla de pantalla "Add..", para seleccionar los usuarios a los que desea autorizar el acceso.



- ▶ En el campo "Names" seleccione los usuarios deseados, por ejemplo "Everyone", y haga clic en "Add".
- ▶ En el campo de lista "Type of Access" adjudique al nuevo usuario el estado "Full Access" y cierre este cuadro de diálogo con "OK".
- ▶ Copie el archivo del lote de parámetros de captura en Windows Explorer en el directorio C:\Program files\ Leica\ Lcs\ Instrument Parameter Settings\...



*Importante: Utilice para ello la opción "Copiar" y no "Cortar".*

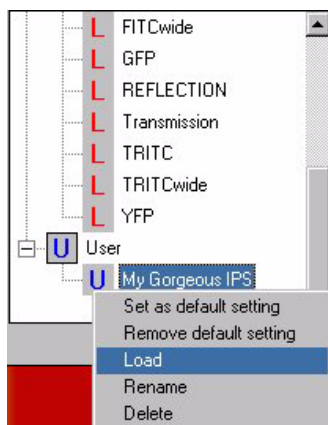


La siguiente vez que abra el cuadro de diálogo "Beam Path Setting", el lote de parámetros de captura aparece bajo "L" y, de esta forma, es accesible para todos los usuarios.

## 7º paso

Existen también opciones adicionales si marca el **lote de parámetros de captura nuevo** y abre el menú contextual con el botón derecho del ratón.

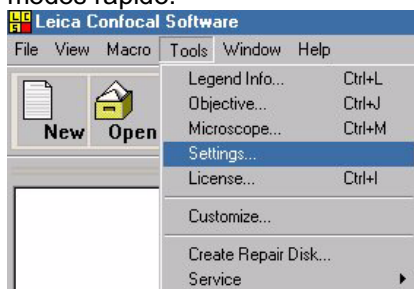




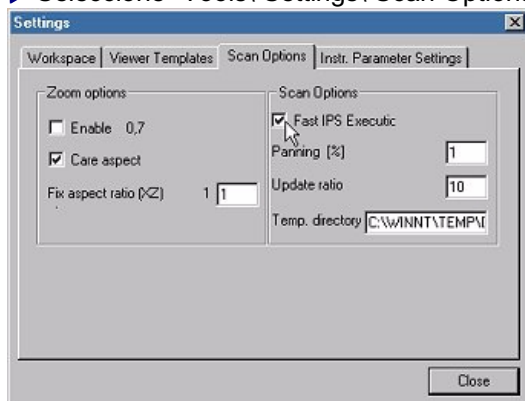
- ▶ Seleccione "Set as default setting" cuando desee que el lote de parámetros se cargue de forma estándar al abrir el software.
- ▶ Seleccione "Remove default setting" para deshacer la configuración como lote de parámetros estándar.
- ▶ Seleccione "Load" para cargar el lote de parámetros.
- ▶ Seleccione "Rename" para introducir un nombre nuevo para el lote de parámetros.
- ▶ Seleccione "Delete" para borrar el lote de parámetros.

## 8º paso

Si la **velocidad** con que se carga el lote de parámetros es muy lenta, puede activar un modo rápido.



- ▶ Seleccione "Tools\ Settings\ Scan Options".



- ▶ Para activar el modo rápido, haga clic en la casilla de verificación "Fast IPS Execution".



### Nota

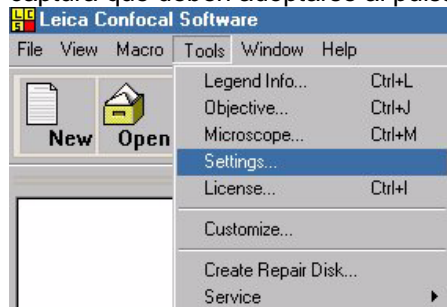
Cuando abre lotes de parámetros de captura que no han sido creados con la versión del Leica Confocal Software que utiliza en la actualidad, en algunos casos no es posible utilizar el modo rápido. En este caso, aparece un mensaje de error y debe reiniciar el sistema.

## 9º paso

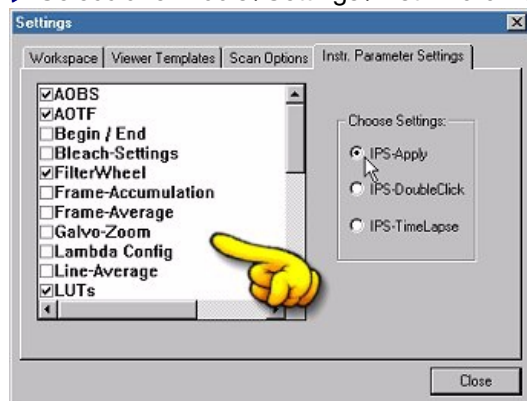
Si desea utilizar la configuración de parámetros de captura de un experimento existente para una nueva captura de imagen, abra el experimento y haga clic en la tecla **"Apply"**.



► Seleccione "Tools\ Settings\ Instr. Parameter Settings" y defina los parámetros de captura que deben adoptarse al pulsar la tecla "Apply".



► Seleccione "Tools\ Settings\ Instr. Parameter Settings".



► El campo de lista contiene ya algunos parámetros estándar seleccionados que sólo deben modificarse de forma consciente. Seleccione la opción "IPS-Apply" y marque los parámetros de captura adicionales que desee.

## Ajuste de los parámetros de captura con la consola de mando

### 1<sup>er</sup> paso

En muchos parámetros de captura el ajuste es más rápido y cómodo a través de la **consola de mando** que mediante las teclas.



Es posible asignar parámetros de captura diferentes a los siete botones giratorios de la consola de mando y controlar dichos parámetros desde la consola.



#### Nota

La línea de estado de la consola de mando aparece en el borde inferior de la interfaz de usuario. Si no es así, seleccione "View\ Status Bars\ Control Panel Status Bar".

### 2º paso

Cargue una **asignación predefinida** para los botones giratorios de la consola de mando.



► Las tres pequeñas teclas de pantalla para la configuración de la consola de mando se encuentran en el borde derecho de la línea de estado de la ésta.



► Haga clic en la tecla central.

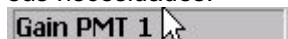


► Seleccione una asignación predefinida, por ejemplo, "Standard".

► En la línea de estado se muestran, en siete campos, los parámetros de captura asignados a la consola de mando. La disposición de estos campos se corresponde con la de los botones giratorios de la consola.

### 3<sup>er</sup> paso

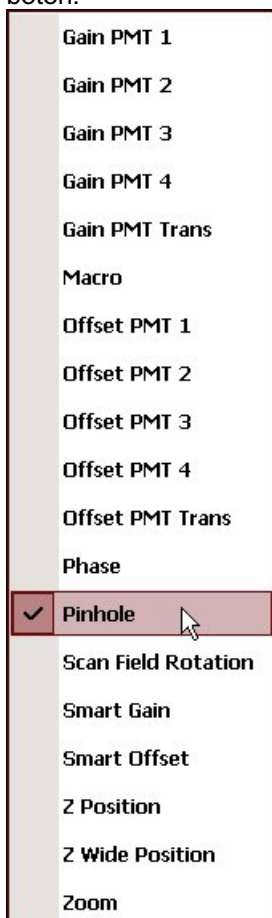
El usuario puede modificar la **asignación** de los botones giratorios de la consola según sus necesidades.



► En la línea de estado de la consola, haga clic en el campo (botón giratorio) al que desea asignar un parámetro de captura diferente.

► En el campo de lista, seleccione el parámetro de captura que desea asignar a este

botón.



► Seleccione "Gain PMT 1.." u "Offset PMT 1..." si desea ajustar la amplificación de señal y el valor umbral para el detector correspondiente. Corresponde a esta tecla del software:



► Seleccione "Phase" para corregir un posible desplazamiento de fases mientras trabaja con el barrido bidireccional. Corresponde a esta tecla del software:



► Seleccione "Pinhole" si desea ajustar el diámetro del diafragma de detección. Corresponde a esta tecla del software:



► Seleccione "Scan Field Rotation" si desea ajustar la rotación del campo de barrido. Corresponde a esta tecla del software:



► Seleccione "Z Position" y "Z Wide Position" si desea ajustar el plano focal (posición Z). Corresponde a estas teclas del software:



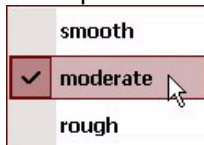
- Seleccione "Zoom", si desea ajustar el factor de ampliación del zoom electrónico. Corresponde a esta tecla del software:



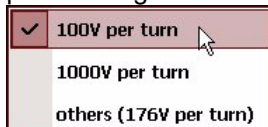
- Mediante "Smart Gain" y "Smart Offset" ajuste la amplificación de señal y el valor umbral del canal de detección previamente seleccionado en el visor Viewer.
- Mediante "Macro" guarde la opción ejecutada como macro.

#### 4º paso

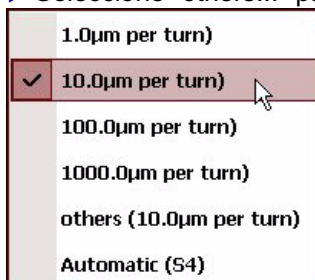
La **sensibilidad de reacción** de los botones giratorios puede modificarse. Para ello, haga clic en la línea de estado de la consola de mando con el botón derecho del ratón en un parámetro de captura.



- En los parámetros de captura "Phase", "Pinhole", "Scan Field Rotation" y "Zoom" es posible elegir entre tres grados de sensibilidad.



- En los parámetros de captura "Gain", "Offset", "Smart Gain" y "Smart Offset" puede modificarse el número de voltios por giro del botón.
- Seleccione "others..." para introducir un valor definido por el usuario.



- En los parámetros de captura "Z Position" y "Z Wide Position" puede modificarse el número de micrómetros por giro del botón.
- Seleccione "others..." para introducir un valor definido por el usuario.
- En el parámetro de captura "Z Wide Position" existe también la configuración estándar "Automatic".



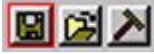
#### Configuración estándar "Automatic" para "Z Wide Position"

En la configuración estándar "Automatic" la sensibilidad del botón giratorio se ajusta de forma automática en función del factor de ampliación del objetivo utilizado:

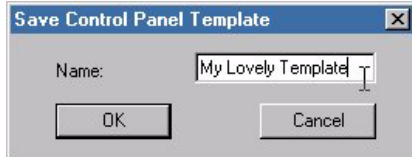
- En objetivos con una ampliación  $m < 10$  se utiliza la configuración SC = 150 µm por giro.
- En objetivos con una ampliación  $10 < m < 20$  se utiliza la configuración S3 = 15 µm por giro.
- En objetivos con una ampliación  $20 < m < 30$  se utiliza la configuración S2 = 7 µm por giro.
- En objetivos con una ampliación  $30 < m < 60$  se utiliza la configuración S1 = 1 µm por giro.
- En objetivos con una ampliación  $m > 60$  se utiliza la configuración S0 = 0,5 µm por giro.

## 5º paso

Guarde la **nueva distribución** como asignación definida por el usuario.



► Haga clic en la tecla de pantalla del lado izquierdo.



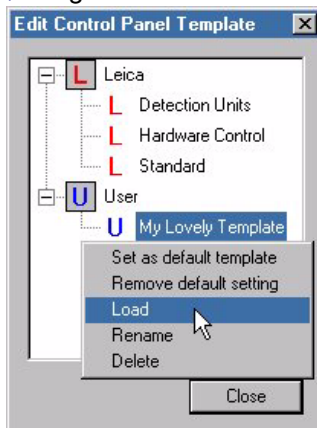
► Introduzca un nombre para la asignación y haga clic en OK.

## 6º paso

Existen también opciones adicionales si marca la **asignación recién definida** y abre el menú contextual con el botón derecho del ratón.



► Haga clic en la tecla de pantalla del lado derecho.



La nueva asignación de la consola de mando aparece en el campo de lista bajo "U". Siempre que haga doble clic en "My Lovely Template" se carga la asignación correspondiente.

► Seleccione "Set as default template" si desea que la asignación se cargue de forma estándar al abrir el software.

► Seleccione "Remove default setting" para que la configuración deje de ser la asignación estándar.

► Seleccione "Load" para cargar la asignación.

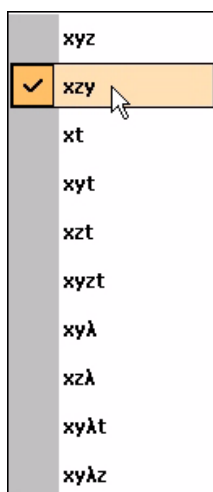
► Seleccione "Rename" para introducir un nombre nuevo para la asignación.

► Seleccione "Delete" para borrar la asignación.

## Captura de series de imágenes espaciales

### 1<sup>er</sup> paso

Haga clic en el símbolo de flecha "**Acquire**" y, a continuación, en la tecla "Mode" y seleccione el modo de barrido "xyz" o "xzy".



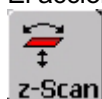
► Seleccione el modo de barrido "xyz" si desea capturar un lote de imágenes individuales horizontales (ortogonal al eje óptico).

► Seleccione el modo de barrido "xzy" si desea capturar un lote de imágenes individuales verticales (paralelas al eje óptico).



#### ¿Qué modos de barrido se muestran?

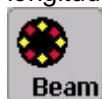
El número de modos de barrido disponibles depende del tipo de accionador Z utilizado. El accionador Z se ajusta mediante la tecla "z-Scan".

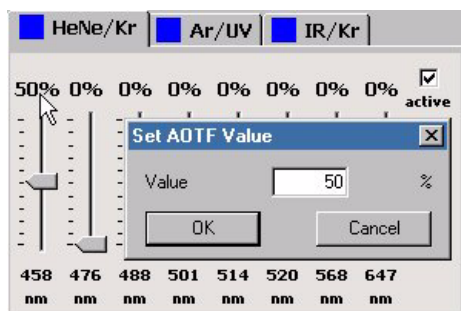


Cuando se utiliza la platina Z accionada mediante galvanómetro todos los modos de barrido están disponibles. En el campo de lista debe ajustarse la selección "z-Galvo". Cuando se utiliza la platina Z accionada mediante motor eléctrico (o, en los microscopios inversos, cuando se utiliza el revólver portaobjetivos), sólo están disponibles los modos "xyz", "xt", "xyt", "xyzt", "xyλ", "xyλt" y "xyλz". En el campo de lista debe ajustarse la selección "z-Wide".

### 2º paso

Mediante la tecla "**Beam**" abra el cuadro de diálogo "Beam Path Setting", seleccione las longitudes de onda de excitación y ajuste la intensidad de la línea de láser.





► Desplace el botón deslizable o haga doble clic en el número e indique un valor para la intensidad del láser.



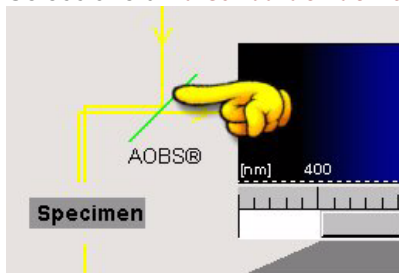
#### Nota

Con un lote de parámetros de captura predefinido pueden activarse los parámetros mediante un clic. Para ello lea el capítulo "Creación de parámetros de captura (IPS) definidos por el usuario".

& vea el capítulo "Creación de lotes de parámetros de captura (IPS) definidos por el usuario" (página 73)

### 3<sup>er</sup> paso

Seleccione un **distribuidor de haz de excitación** apropiado.



Si el sistema dispone de un distribuidor de haz acústico-óptico (AOBS) éste optimiza automáticamente la trayectoria de rayos para la longitud de onda seleccionada.

Si no es el caso, haga doble clic en la línea verde y seleccione un distribuidor de haz:

► Seleccione filtro dicroico RSP 500 para la captura de FITC y GFP con una longitud de onda de excitación de 488 nm y un ancho de banda de detección desde 500 hasta 600 nm.

► Seleccione filtro dicroico RSP 465 para la captura de CFP con una longitud de onda de excitación de 458 nm y un ancho de banda de detección desde 465 hasta 525 nm.

► Seleccione un filtro dicroico doble DD 488 / 543 para la captura de FITC y TRITC o GFP y DsRED con una longitud de onda de excitación de 488 y 543 nm un ancho de banda de detección desde 500 hasta 530 nm, o bien, desde 555 hasta 700 nm.

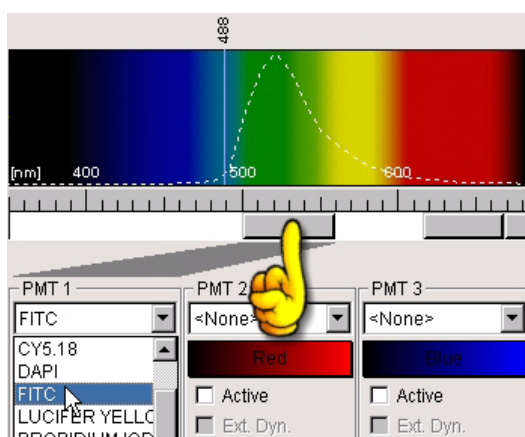
► Seleccione el filtro dicroico triple TD 488 / 543 / 633 para capturas de FITC, TRITC y CY5 con una longitud de onda de 488, 543 y 633 nm y un ancho de banda de detección desde 500 hasta 535 nm, desde 555 hasta 620 nm, o bien, desde 650 hasta 750 nm.

► Seleccione un distribuidor neutral RT 30/70 para la captura de reflexiones.

### 4<sup>o</sup> paso

Seleccione uno o varios **canales de detección "PMT"** y ajuste la tintura fluorescente utilizada y el ancho de banda de detección.



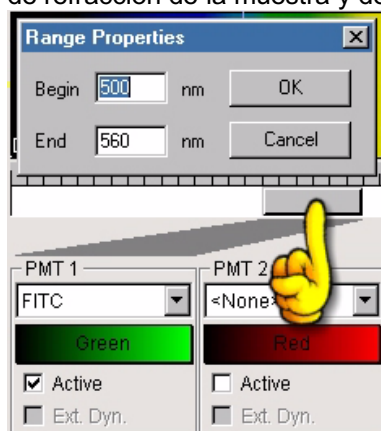


- Haga clic en el campo de lista de un canal de detección y seleccione una tintura fluorescente. La curva de emisión de la tintura fluorescente se fusiona con el espectro.
- Coloque el botón deslizante bajo la curva de emisión.

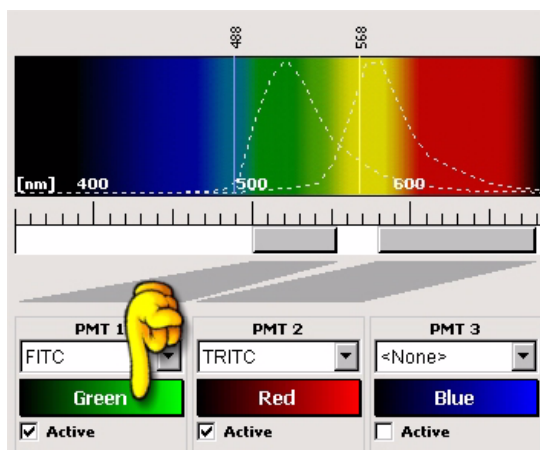


#### Nota sobre la colocación de la banda de detección

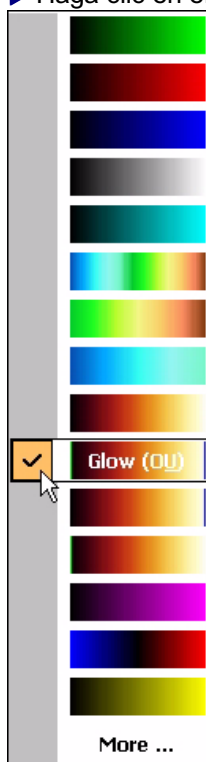
En las capturas de fluorescencia observe que la banda de detección no esté colocada bajo la línea del láser, ya que en ese caso se captura también la luz reflejada. La distancia de la banda de detección a la línea del láser debe alcanzar al menos 5 nm en la gama espectral azul (línea de excitación 488 nm), 10 nm en la gama espectral verde (línea de excitación 543 nm) y 15 nm en la gama espectral roja (excitación 633 nm). Si utiliza el AOBs puede reducir aún más la distancia a la línea del láser, ya que este distribuidor de haz de excitación limita la luz reflejada mucho mejor que los distribuidores convencionales. No obstante, el requisito para ello es que el coeficiente de refracción de la muestra y del medio entre el cubre-objetos y el objetivo sea óptimo.



- Haga doble clic en el botón deslizante del canal de detección seleccionado.
- En el cuadro de diálogo "Range Properties" indique una longitud de onda para el inicio y otra para el final de la banda de detección.



► Haga clic en el símbolo de la tabla de asignación de colores



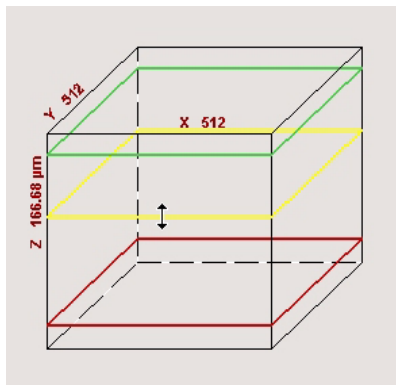
► Haga clic en la tabla de asignación de colores. En la primera captura de imagen se recomienda trabajar con la tabla de asignación de colores "Glow(OU)".

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

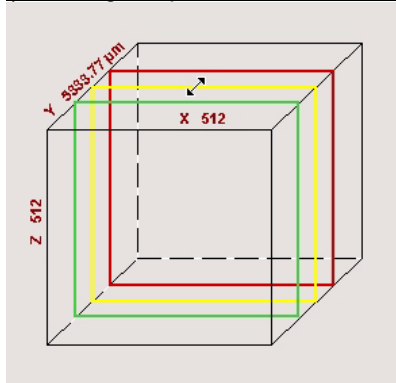
#### 5º paso

Mediante la tecla "**Series**" abra el cuadro de diálogo "Series Scan Overview" y defina el punto inicial y el punto final de la serie de imágenes espaciales.





Modo de barrido xyz  
(mantenga el puntero del ratón sobre la imagen)



Modo de barrido xzy

► Para definir el punto inicial, arrastre el cuadrado amarillo hasta la posición Z deseada (en modo de barrido xyz) o la posición Y (en modo de barrido xzy) y haga clic en la casilla de verificación "Begin".

► Para definir el punto final, arrastre el cuadrado amarillo hasta la posición Z deseada (en modo de barrido xyz) o la posición Y (en modo de barrido xzy) y haga clic en la casilla de verificación "End".

O bien,

**Selected Scan Mode: xzy**

**Absolute Position:**

**Relative Position:**

☒ **Begin:**

☒ **End:**

**Total: 1999.35 µm**

**Upper Threshold:**

**Lower Threshold:**

► Haga doble clic en "Absolute Position", introduzca un valor y haga clic en la casilla de verificación "Begin".

► Haga doble clic en "Absolute Position", introduzca un valor y haga clic en la casilla de verificación "End".

En muchos parámetros de captura el ajuste es más rápido y cómodo a través de la consola de mando que mediante las teclas.

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros de captura con la consola de mando" (página 79)

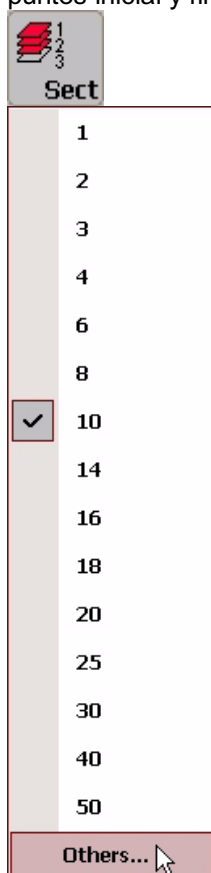


### Posicionamiento relativo de Z

Cuando se utiliza el accionador de Z mediante motor eléctrico y se ajusta la opción "z-Wide" mediante la tecla "z-Scan", puede ajustarse una posición relativa de Z. Ésta se calcula en relación al valor umbral superior "Upper Threshold" que debe ajustarse en el trípode del microscopio. La posibilidad de posicionamiento relativo de Z sólo está disponible en los trípodes de microscopio de tipo DM RXA, DM RXA2, DM IRE2 y DM LFSA (así como en los antiguos trípodes IRBE con la versión de EPROM 2.40). Los dos valores umbral "Upper Threshold" y "Lower Threshold" se muestran en el cuadro de diálogo "Series Overview".

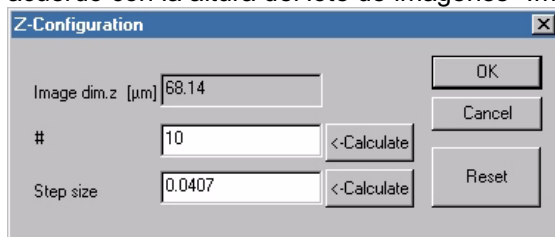
### 6º paso

Haga clic en la tecla "**Sections**" y defina el número de capturas de imagen entre los puntos inicial y final.



► Seleccione un valor predefinido en "Others".

Si selecciona "Others", el cuadro de diálogo "**Z/Y-Configuration**" ofrece la posibilidad de calcular el número de exposiciones "#" o el incremento del paso "Step size" de acuerdo con la altura del lote de imágenes "Image dim.z".



► Si modifica el número de exposiciones y hace clic en "Calculate" junto a "#", se

calcula el incremento del paso con la prioridad de no modificar la altura del lote de imágenes.

► Si modifica el número de exposiciones y hace clic en "Calculate" junto a "Step size", se calcula el incremento del paso con la prioridad de no modificar el número de exposiciones.

► Si modifica el incremento del paso y hace clic en "Calculate" junto a "Step size", se calcula el número de exposiciones con la prioridad de no modificar la altura del lote de imágenes.

► Si modifica el incremento del paso y hace clic en "Calculate" junto a "#", se calcula el número de exposiciones con la prioridad de no modificar el incremento del paso.

## 7º paso

Para optimizar la calidad de la imagen durante la captura, inicie una captura continua mediante la tecla "**Continuous**".



► Defina el plano focal (posición Z), los detectores y el pinhole de detección. Para ello, lea los pasos 7 hasta 15 en el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65).

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

## 8º paso

Mediante la tecla "**Series**" inicie la serie de imágenes espacial.



► Para mejorar la relación señal / ruido haga clic en la tecla "Average". Defina la frecuencia con que debe repetirse la captura de una imagen. En cada caso se muestra el valor medio.



► Para mejorar la relación señal / ruido haga clic en la tecla "Line Average". Defina la frecuencia con que debe repetirse la captura de una línea. En cada caso se muestra el valor medio.



► Haga clic en la tecla "Gallery", para ir mostrando durante la captura de la imagen las exposiciones individuales en el visor Viewer.



### Atención

En la captura de grandes bloques de datos, el uso de la función "Gallery" puede reducir el rendimiento de captura.

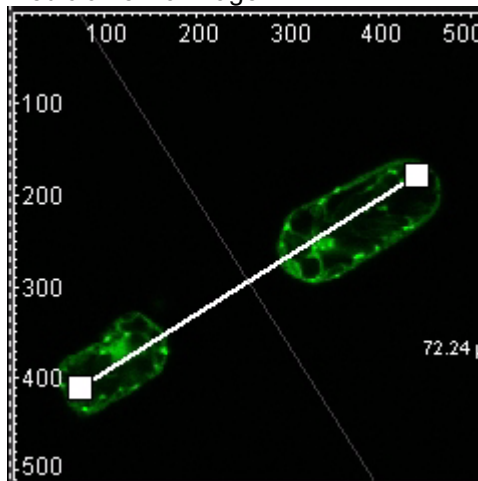
## 9º paso

Para una interpretación estadística de la serie de imágenes espacial, haga clic en el

símbolo de flecha "**Quantify**" y, a continuación, en la tecla "Profile".



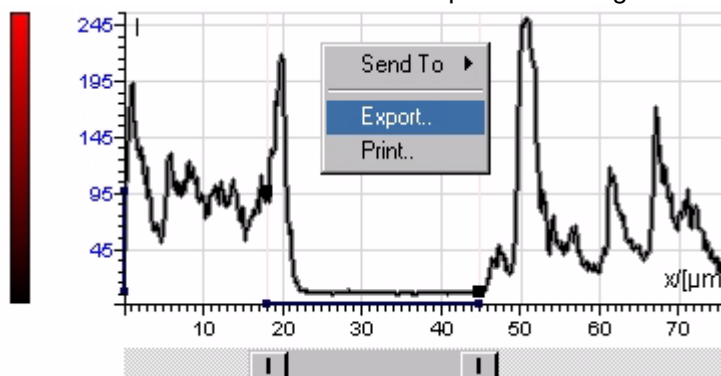
Al pulsar esta tecla se abre el cuadro de diálogo "Profile" y se fusiona un trayecto de medición en la imagen.



► El posicionamiento de este trayecto puede modificarse según las necesidades.

#### 10º paso

El cuadro de diálogo "Profile" en el que se muestra el **gráfico de interpretación** junto con diferentes valores estadísticos dispone de los siguientes comandos.



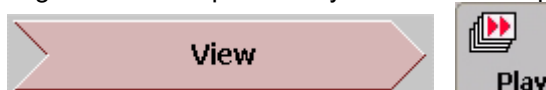
► Coloque el puntero del ratón sobre el diagrama y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.

► Seleccione "Export" para exportar los datos de interpretación como archivo de texto ASCII.

► Seleccione "Send to" y "Document" para crear una captura de pantalla del gráfico de interpretación como archivo nuevo en el experimento activo.

► Seleccione "Print" para imprimir el gráfico de interpretación.

► Haga clic en el símbolo de flecha "View" y la tecla "Play" para reproducir la serie de imágenes espacial como una secuencia de película. De forma simultánea se muestran el gráfico de interpretación y los datos correspondientes de cada imagen individual.

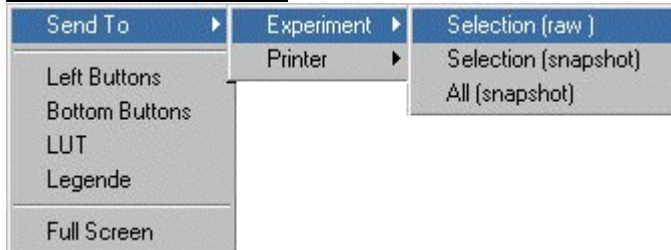


#### 11º paso

Puede crear una **imagen de un canal de detección** o una imagen de superposición de varios canales de detección como nuevo bloque de datos en el experimento activo.

► Haga clic en la imagen del canal de detección deseado o de la imagen de superposición.

► Coloque el puntero del ratón sobre el visor Viewer y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.

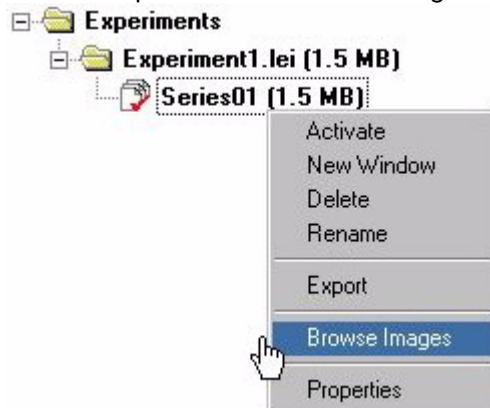


► Seleccione "Selection (raw)" para crear los datos de imagen del encuadre marcado como nuevo archivo.

► Seleccione "Selection (snapshot)" para crear una captura de pantalla del encuadre marcado como nuevo archivo.

► Seleccione "All (snapshot)" para crear una captura de pantalla de la imagen completa como nuevo archivo.

Los archivos almacenados se encuentran en el visor "Experiment Overview" en el que el usuario dispone de los comandos siguientes:



► Marque un archivo y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.

► Seleccione "Activate" para mostrar los datos de imagen del archivo en el visor Viewer.

► Seleccione "New Window" para abrir la captura actual en un segundo visor. Así, por ejemplo, puede mostrar la misma imagen con otra tabla de asignación de colores.

► Seleccione "Delete" para borrar el archivo.

► Seleccione "Rename" para introducir un nombre nuevo para el archivo.

► Seleccione "Export" para exportar una exposición en formato de archivo \*.avi.

► Seleccione "Browse Images" para mostrar todas las exposiciones de un experimento como miniaturas en la interfaz de usuario.

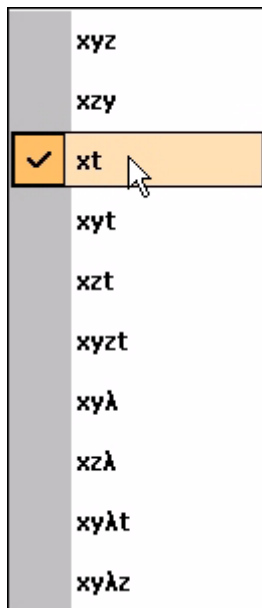
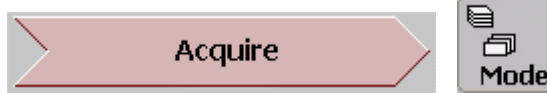
► Seleccione "Properties" para introducir una descripción breve de la exposición en un cuadro de diálogo.

► Si desea desplazar archivos de un experimento a otro, arrastre y suelte (drag and drop) el archivo con el botón izquierdo del ratón presionado hasta el directorio del experimento deseado.

## Captura de series de imágenes temporales

### 1<sup>er</sup> paso

Haga clic en el símbolo de flecha "**Acquire**" y, a continuación, en la tecla "Mode" y seleccione el modo de barrido "xt", "xyt", "xzt" o "xyzt".



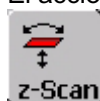
- ▶ Seleccione el modo de barrido "xt" cuando desee capturar una línea en intervalos de tiempo regulares.
- ▶ Seleccione el modo de barrido "xyt" si desea capturar imágenes individuales horizontales (ortogonales al eje óptico) en intervalos de tiempo regulares.
- ▶ Seleccione el modo de barrido "xzt" si desea capturar imágenes individuales verticales (paralelas al eje óptico) en intervalos de tiempo regulares.
- ▶ Seleccione el modo de barrido "xyzt" si desea capturar un lote de imágenes individuales horizontales (ortogonales al eje óptico) en intervalos de tiempo regulares.

La selección de uno de estos modos de barrido activa automáticamente la tecla "Time", necesaria para la captura de una serie de imágenes temporal:



### ¿Qué modos de barrido se muestran?

El número de modos de barrido disponibles depende del tipo de accionador Z utilizado. El accionador Z se ajusta mediante la tecla "z-Scan".



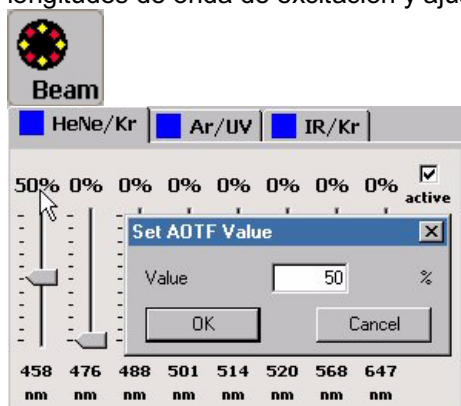




Cuando se utiliza la platina Z accionada mediante galvanómetro todos los modos de barrido están disponibles. En el campo de lista debe ajustarse la selección "z-Galvo". Cuando se utiliza la platina Z accionada mediante motor eléctrico (o, en los microscopios inversos, cuando se utiliza el revólver paraobjetivos), solo están disponibles los modos "xyz, xt, xyt, xyzt,  $xy\lambda$ ,  $xy\lambda t$  y  $xy\lambda z$ ". En el campo de lista debe ajustarse la selección "z-Wide".

## 2º paso

Mediante la tecla "**Beam**" abra el cuadro de diálogo "Beam Path Setting", seleccione las longitudes de onda de excitación y ajuste la intensidad de la línea de láser.



► Desplace el botón deslizable o haga doble clic en el número e indique un valor para la intensidad del láser.



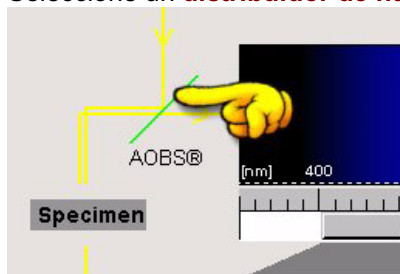
### Nota

Con un lote de parámetros de captura predefinido pueden activarse los parámetros mediante un clic. Para ello lea el capítulo "Creación de parámetros de captura (IPS) definidos por el usuario".

& vea el capítulo "Creación de lotes de parámetros de captura (IPS) definidos por el usuario" (página 73)

## 3º paso

Seleccione un **distribuidor de haz de excitación** apropiado.



Si el sistema dispone de un distribuidor de haz acústico-óptico (AOBS) éste optimiza automáticamente la trayectoria de rayos para la longitud de onda seleccionada.

Si no es el caso, haga doble clic en la línea verde y seleccione un distribuidor de haz:

► Seleccione filtro dicróico RSP 500 para la captura de FITC y GFP con una longitud de onda de excitación de 488 nm y un ancho de banda de detección desde 500 hasta 600 nm.

► Seleccione filtro dicróico RSP 465 para la captura de CFP con una longitud de onda de excitación de 458 nm y un ancho de banda de detección desde 465 hasta 525 nm.

► Seleccione un filtro dicróico doble DD 488 / 543 para la captura de FITC y TRITC o

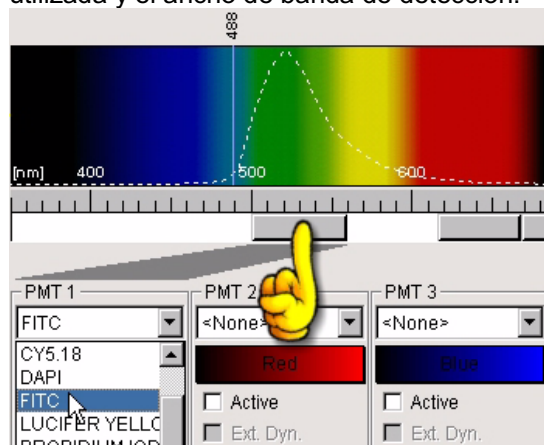
GFP y DsRED con una longitud de onda de excitación de 488 y 543 nm un ancho de banda de detección desde 500 hasta 530 nm, o bien, desde 555 hasta 700 nm.

► Seleccione el filtro dicróico triple TD 488 / 543 / 633 para capturas de FITC, TRITC y CY5 con una longitud de onda de 488, 543 y 633 nm y un ancho de banda de detección desde 500 hasta 535 nm, desde 555 hasta 620 nm, o bien, desde 650 hasta 750 nm.

► Seleccione un distribuidor neutral RT 30/70 para la captura de reflexiones.

#### 4º paso

Seleccione uno o varios **canales de detección "PMT"** y ajuste la tintura fluorescente utilizada y el ancho de banda de detección.



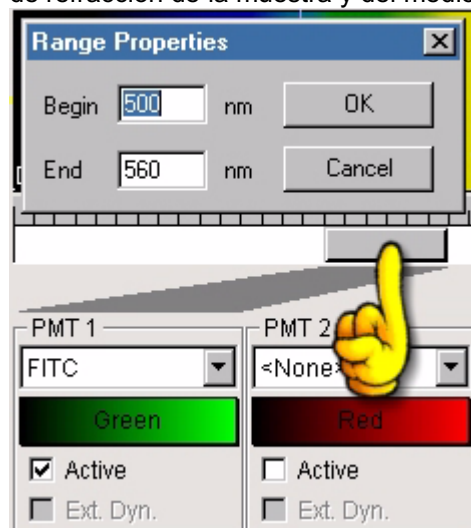
► Haga clic en el campo de lista de un canal de detección y seleccione una tintura fluorescente. La curva de emisión de la tintura fluorescente se fusiona con el espectro.

► Coloque el botón deslizante bajo la curva de emisión.



#### Nota sobre la posición de la banda de detección

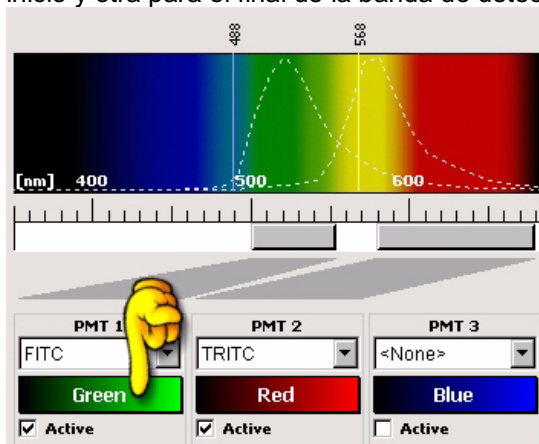
En las capturas de fluorescencia observe que la banda de detección no esté colocada bajo la línea del láser, ya que en ese caso se captura también la luz reflejada. La distancia de la banda de detección a la línea del láser debe alcanzar al menos 5 nm en la gama espectral azul (línea de excitación 488 nm), 10 nm en la gama espectral verde (línea de excitación 543 nm) y 15 nm en la gama espectral roja (excitación 633 nm). Si utiliza el AOBS puede reducir aún más la distancia a la línea del láser, ya que este distribuidor de haz de excitación limita la luz reflejada mucho mejor que los distribuidores convencionales. No obstante, el requisito para ello es que el coeficiente de refracción de la muestra y del medio entre el cubre-objetos y el objetivo sea óptimo.



► Haga doble clic en el botón deslizante del canal de detección seleccionado.

► En el cuadro de diálogo "Range Properties" indique una longitud de onda para el

inicio y otra para el final de la banda de detección.



► Haga clic en el símbolo de la tabla de asignación de colores



► Haga clic en la tabla de asignación de colores. En la primera captura de imagen se recomienda trabajar con la tabla de asignación de colores "Glow(OU)".

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

## 5º paso

Haga clic en la tecla "**Time**" y ajuste todos los parámetros necesarios para la serie de imágenes temporal.



Los parámetros ajustables son diferentes para los distintos modos de barrido de una serie.



### Funcionamiento del cuadro de diálogo "Time Configuration"

Cada parámetro puede calcularse en función de los otros parámetros. Haga clic en el parámetro que desea calcular. El campo de entrada correspondiente aparece en gris. Introduzca los valores para los otros parámetros. Haga clic en "Apply" para calcular el parámetro. Haga clic en "Reset" para mostrar los últimos datos almacenados.

Si se selecciona el modo de barrido "xt", deben ajustarse los parámetros siguientes:

► En el campo "Lines" introduzca el número de exposiciones por línea.

☒ **Maximize (default)**

► Desactive la casilla de verificación "Maximize" para ajustar en el campo "Lines per page" el número de líneas que deben capturarse antes de transmitir los datos al ordenador. Como configuración estándar, se ejecuta una captura de forma constante hasta que la memoria del cabezal de barrido no puede recoger más datos.

► En el campo "Complete Time" introduzca el tiempo total de la captura de la imagen.

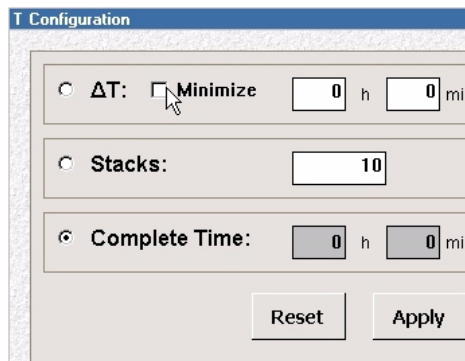
Si se selecciona el modo de barrido "xyt" o "xzt", deben ajustarse los parámetros siguientes:

► En el campo "Frames" introduzca el número de exposiciones de la imagen individual.

► En el campo "ΔT" defina el intervalo de tiempo entre las exposiciones de dos imágenes individuales. Si está seleccionada la casilla de verificación "Minimize" se ajusta el intervalo mínimo, es decir, el tiempo para la captura de una imagen individual (dependiente de parámetros de barrido como el formato y la velocidad) más un intervalo de pausa necesario para el posicionamiento del espejo de barrido.

► En el campo "Complete Time" introduzca el tiempo total de la captura de la imagen.

Si se selecciona el modo de barrido "xyzt", deben ajustarse los parámetros siguientes:



- ▶ En el campo "Stacks" introduzca el número de exposiciones del lote de imágenes.
- ▶ En el campo "ΔT" defina el intervalo de tiempo entre las exposiciones de dos lotes de imágenes. Si está seleccionada la casilla de verificación "Minimize" se ajusta el intervalo mínimo, es decir, el tiempo para la captura de un lote de imágenes (dependiente de parámetros de barrido como el formato y la velocidad) más un intervalo de pausa necesario para el posicionamiento del espejo de barrido.
- ▶ En el campo "Complete Time" introduzca el tiempo total de la captura de la imagen.

#### 6º paso

Para optimizar la calidad de la imagen durante la captura, inicie una captura continua mediante la tecla **"Continuous"**.

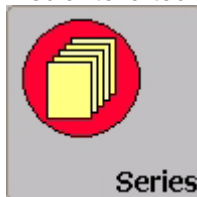


- ▶ Defina el plano focal (posición Z), los detectores y el pinhole de detección. Para ello, lea los pasos 7 hasta 15 en el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen".

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

#### 7º paso

Mediante la tecla **"Series"** inicie la serie de imágenes temporal.



- ▶ Para mejorar la relación señal / ruido haga clic en la tecla "Average". Defina la frecuencia con que debe repetirse la captura de una imagen. En cada caso se muestra el valor medio.



- ▶ Para mejorar la relación señal / ruido haga clic en la tecla "Line Average". Defina la frecuencia con que debe repetirse la captura de una línea. En cada caso se muestra el valor medio.



#### 8º paso

Para una interpretación estadística de la serie de imágenes temporal, haga clic en el

símbolo de flecha "**Quantify**" y, a continuación, en la tecla "Histogram".

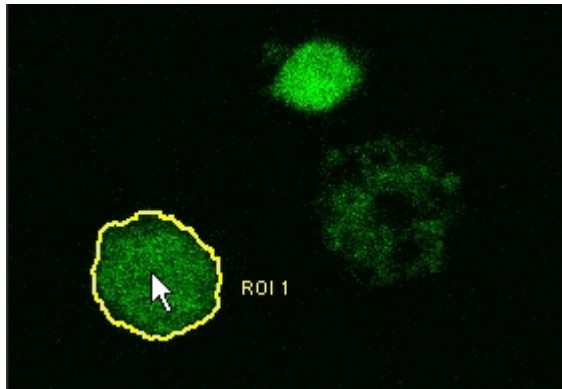


Al pulsar esta tecla se abre el cuadro de diálogo "Histogram" y se activan automáticamente las teclas de la zona de interés (ROI) que precisará en los pasos siguientes:



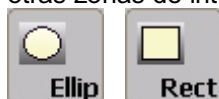
### 9º paso

Para marcar una zona de interés (ROI) en la imagen, haga clic, por ejemplo, en la tecla "**Wizard**" y en la tecla "Polygon".



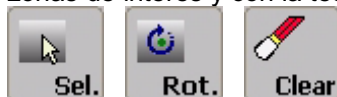
► Haga doble clic en la estructura de la imagen que debe interpretar. Los contornos de la estructura se marcan automáticamente como zona de interés.

► Seleccione otras formas geométricas con las teclas "Ellipse" o "Rectangle" y marque otras zonas de interés en la imagen.



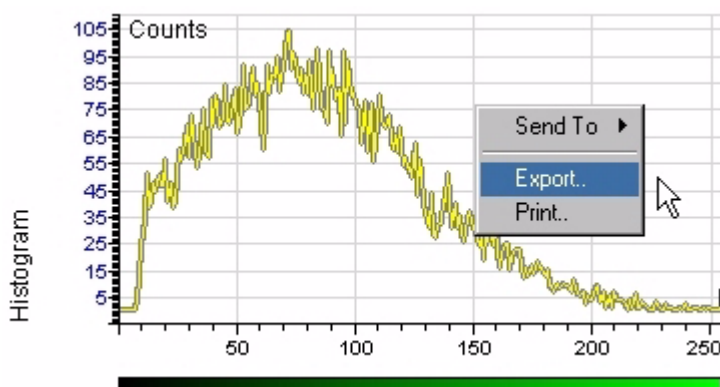
► Desactive la tecla "Wizard" si desea marcar a mano la zona de interés en la imagen.

► Mediante las teclas "Select" y "Rotate" puede mover, girar y variar el tamaño de las zonas de interés y con la tecla "Clear" puede borrar todas las zonas de interés.



### 10º paso

El cuadro de diálogo "Histogram" en el que se muestra el **gráfico de interpretación** junto con diferentes valores estadísticos dispone de los siguientes comandos.



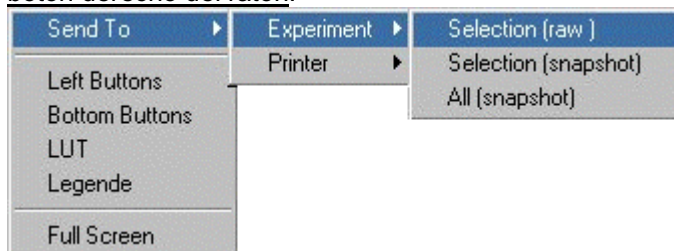
- Coloque el puntero del ratón sobre el diagrama y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.
- Seleccione "Export" para exportar los datos de interpretación como archivo de texto ASCII.
- Seleccione "Send to" y "Document" para crear una captura de pantalla del gráfico de interpretación como archivo nuevo en el experimento activo.
- Seleccione "Print" para imprimir el gráfico de interpretación.
- Haga clic en el símbolo de flecha "View" y la tecla "Play" para poner en marcha la serie de imágenes temporal como un secuencia de película. De forma simultánea se muestran el gráfico de interpretación y los datos correspondientes de cada imagen individual.



### 11º paso

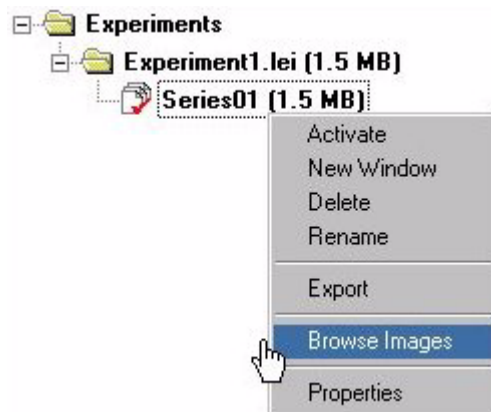
Puede crear una **imagen de un canal de detección** o una imagen de superposición de varios canales de detección como nuevo bloque de datos en el experimento activo.

- Haga clic en la imagen del canal de detección deseado o de la imagen de superposición.
- Coloque el puntero del ratón sobre el visor Viewer y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.



- Seleccione "Selection (raw)" para crear los datos de imagen del encuadre marcado como nuevo archivo.
- Seleccione "Selection (snapshot)" para crear una captura de pantalla del encuadre marcado como nuevo archivo.
- Seleccione "All (snapshot)" para crear una captura de pantalla de la imagen completa como nuevo archivo.

Los archivos almacenados se encuentran en el visor "Experiment Overview" en el que el usuario dispone de los comandos siguientes:



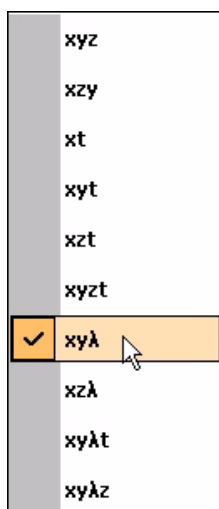
- ▶ Marque un archivo y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.
- ▶ Seleccione "Activate" para mostrar los datos de imagen del archivo en el visor Viewer.
- ▶ Seleccione "New Window" para abrir la captura actual en un segundo visor. Así, por ejemplo, puede mostrar la misma imagen con otra tabla de asignación de colores.
- ▶ Seleccione "Delete" para borrar el archivo.
- ▶ Seleccione "Rename" para introducir un nombre nuevo para el archivo.
- ▶ Seleccione "Export" para exportar una exposición en formato de archivo \*.avi.
- ▶ Seleccione "Browse Images" para mostrar todas las exposiciones de un experimento como miniaturas en la interfaz de usuario.
- ▶ Seleccione "Properties" para introducir una descripción breve de la exposición en un cuadro de diálogo.
- ▶ Si desea desplazar archivos de un experimento a otro, arrastre y suelte (drag and drop) el archivo con el botón izquierdo del ratón presionado hasta el directorio del experimento deseado.



## Captura de series Lambda (series de imágenes espectrales)

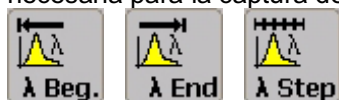
### 1<sup>er</sup> paso

Haga clic en el símbolo de flecha "**Acquire**" y, a continuación, en la tecla "Mode" y seleccione el modo de barrido " $xy\lambda$ ", " $xz\lambda$ ", " $xy\lambda t$ " o " $xy\lambda z$ ".



- ▶ Seleccione el modo de barrido " $xy\lambda$ " si desea capturar imágenes individuales horizontales (ortogonales al eje óptico), cada una de ellas con una longitud de onda determinada.
- ▶ Seleccione el modo de barrido " $xz\lambda$ " si desea capturar imágenes individuales verticales (paralelas al eje óptico), cada una de ellas con una longitud de onda determinada.
- ▶ Seleccione el modo de barrido " $xy\lambda t$ " si desea capturar series de imágenes temporales, es decir imágenes individuales horizontales (ortogonales al eje óptico), cada una de ellas con una longitud de onda determinada y repetidas en intervalos de tiempo definidos.
- ▶ Seleccione el modo de barrido " $xy\lambda z$ " si desea capturar series de imágenes espaciales, es decir un lote de imágenes individuales horizontales (ortogonales al eje óptico), cada una de ellas con una longitud de onda determinada.

La selección de uno de estos modos de barrido activa automáticamente las teclas necesaria para la captura de una serie Lambda:



### ¿Qué modos de barrido se muestran?

El número de modos de barrido disponibles depende del tipo de accionador Z utilizado. El accionador Z se ajusta mediante la tecla "z-Scan".



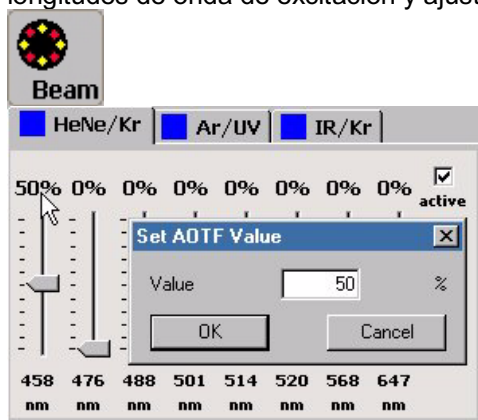


Cuando se utiliza la platina Z accionada mediante galvanómetro todos los modos de barrido están disponibles. En el campo de lista debe ajustarse la selección "z-Galvo". Cuando se utiliza la platina Z accionada mediante motor eléctrico (o, en los microscopios inversos, cuando se utiliza el revólver portaobjetivos), sólo están disponibles los modos "xyz, xt, xyt, xyzt,  $xy\lambda$ ,  $xy\lambda t$  y  $xy\lambda z$ ". En el campo de lista debe ajustarse la selección "z-Wide".

**Los modos de barrido para la captura de una serie Lambda están disponibles únicamente cuando está activo un solo canal de detección.**

## 2º paso

Mediante la tecla "**Beam**" abra el cuadro de diálogo "Beam Path Setting", seleccione las longitudes de onda de excitación y ajuste la intensidad de la línea de láser.



► Desplace el botón deslizante o haga doble clic en el número e indique un valor para la intensidad del láser.



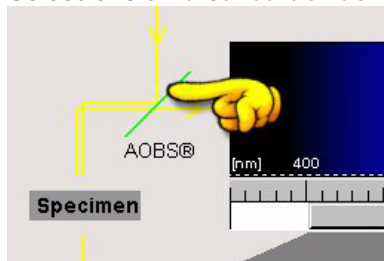
### Nota

Con un lote de parámetros de captura predefinido pueden activarse los parámetros mediante un clic. Para ello lea el capítulo "Creación de parámetros de captura (IPS) definidos por el usuario".

& vea el capítulo "Creación de lotes de parámetros de captura (IPS) definidos por el usuario" (página 73)

## 3º paso

Seleccione un **distribuidor de haz de excitación** apropiado.



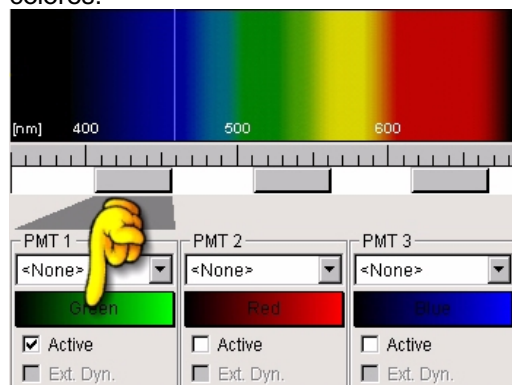
Si el sistema dispone de un distribuidor de haz acústico-óptico (AOBS) éste optimiza automáticamente la trayectoria de rayos para la longitud de onda seleccionada.

Si no es así, haga doble clic en la línea verde y seleccione el filtro neutral "RT 30/70" que está especialmente indicado para series Lambda.

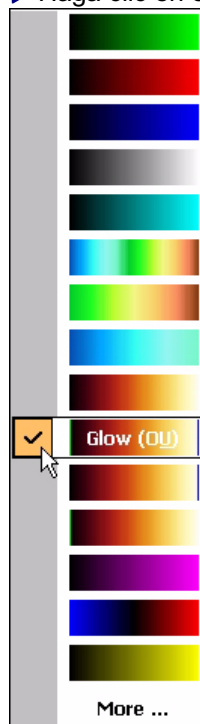
## 4º paso

Seleccione un **canal de detección "PMT"** y asígnele una tabla de asignación de

colores.



► Haga clic en el símbolo de la tabla de asignación de colores

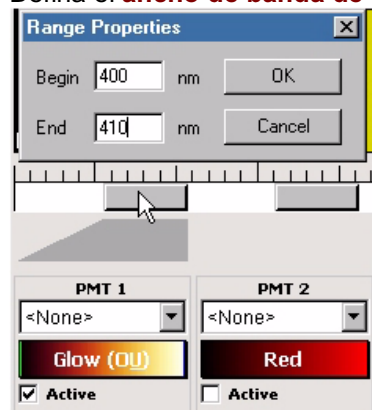


► Haga clic en la tabla de asignación de colores. En la primera captura de imagen se recomienda trabajar con la tabla de asignación de colores "Glow(OU)".

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

### 5º paso

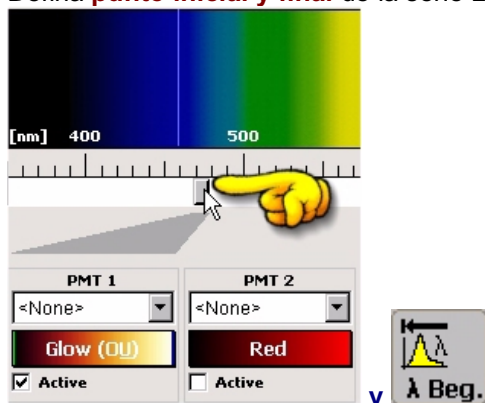
Defina el **ancho de banda de detección** para el canal de detección utilizado.



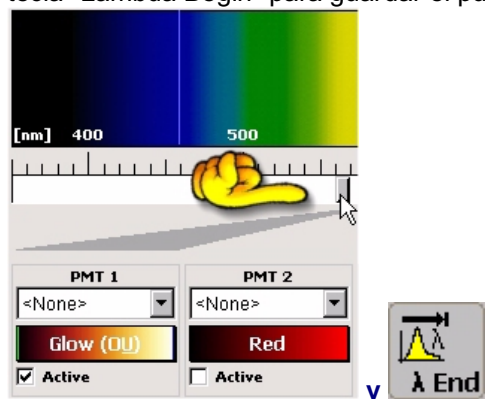
- ▶ Haga doble clic en el botón deslizante del canal de detección seleccionado.
- ▶ En el cuadro de diálogo "Range Properties" indique una longitud de onda para el inicio y otra para el final de la banda de detección. El ancho de banda de detección mínimo posible es de 5 nm.

**6º paso**

Defina **punto inicial y final** de la serie Lambda.



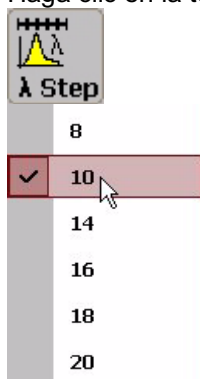
- ▶ Desplace el botón deslizante hasta la posición del espectro deseada y haga clic en la tecla "Lambda Begin" para guardar el punto inicial.



- ▶ Desplace el botón deslizante hasta la posición del espectro deseada y haga clic en la tecla "Lambda End" para guardar el punto final.

**7º paso**

Haga clic en la tecla "**Lambda Steps**" y defina el número de capturas de imagen.



En el trayecto entre los puntos inicial y final de la serie de imágenes se captura el número configurado de exposiciones en pasos regulares.

**8º paso**

Para optimizar la calidad de la imagen durante la captura, inicie una captura continua

mediante la tecla "**Continuous**".



► Defina el plano focal (posición Z), los detectores y el pinhole de detección para diferentes posiciones en el espectro. Para ello, lea los pasos 7 hasta 15 en el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen".

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

► Si se seleccionan los modos de barrido " $xy\lambda t$ " o " $xy\lambda z$ " deben ajustarse otros parámetros para la serie de imágenes temporal o para la serie de imágenes espacial. Para ello lea los capítulos "Captura de series de imágenes espaciales" y "Captura de series de imágenes temporales".



& vea los capítulos "Captura de series de imágenes espaciales" (página 83) y "Captura de series de imágenes temporales" (página 92)

## 9º paso

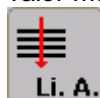
Mediante la tecla "**Series**" inicie la serie Lambda.



► Para mejorar la relación señal / ruido haga clic en la tecla "Average". Defina la frecuencia con que debe repetirse la captura de una imagen. En cada caso se muestra el valor medio.



► Para mejorar la relación señal / ruido haga clic en la tecla "Line Average". Defina la frecuencia con que debe repetirse la captura de una línea. En cada caso se muestra el valor medio.



► Haga clic en la tecla "Gallery", para ir mostrando durante la captura de la imagen las exposiciones individuales en el visor Viewer.



### Atención

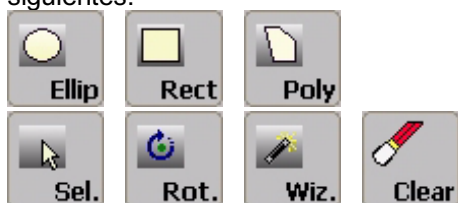
En la captura de grandes bloques de datos, el uso de la función "Gallery" puede reducir el rendimiento de captura.

## 10º paso

Para una interpretación estadística de la serie Lambda, haga clic en el símbolo de flecha "**Quantify**" y, a continuación, en la tecla "Pr.(z)".

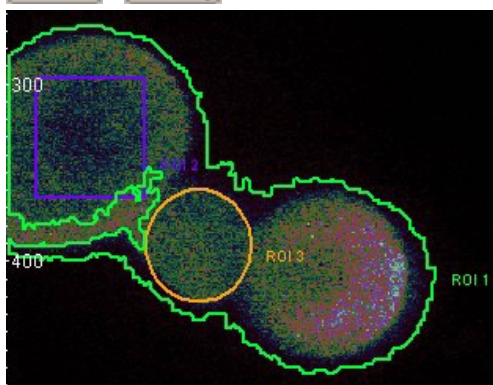
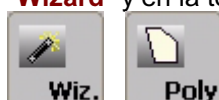


Al pulsar esta tecla se abre el cuadro de diálogo "Profile through Stack" y se activan automáticamente las teclas de la zona de interés (ROI) que precisará en los pasos siguientes:



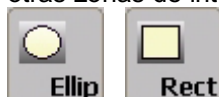
### 11º paso

Para marcar una zona de interés (ROI) en la imagen, haga clic, por ejemplo, en la tecla "Wizard" y en la tecla "Polygon".



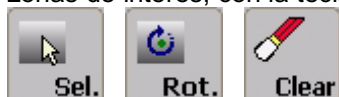
► Haga doble clic en la estructura de la imagen que debe interpretar. Los contornos de la estructura se marcan automáticamente como zona de interés.

► Seleccione otras formas geométricas con las teclas "Ellipse" o "Rectangle" y marque otras zonas de interés en la imagen.



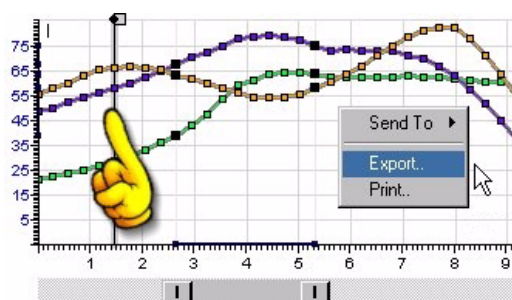
► Desactive la tecla "Wizard" si desea marcar a mano la zona de interés en la imagen.

► Mediante las teclas "Select" y "Rotate" puede mover, girar y variar el tamaño de las zonas de interés, con la tecla "Clear" puede borrar todas las zonas de interés.

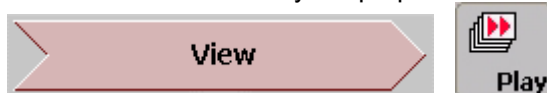


### 12º paso

El cuadro de diálogo "Profile through Stack" en el que se muestra el **gráfico de interpretación** junto con diferentes valores estadísticos dispone de los siguientes comandos.



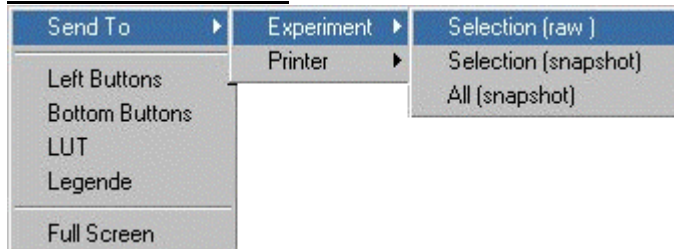
- ▶ Coloque el puntero del ratón sobre el diagrama y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.
- ▶ Seleccione "Export" para exportar los datos de interpretación como archivo de texto ASCII.
- ▶ Seleccione "Send to" y "Document" para crear una captura de pantalla del gráfico de interpretación como archivo nuevo en el experimento activo.
- ▶ Seleccione "Print" para imprimir el gráfico de interpretación.
- ▶ Haga clic en el símbolo de flecha "View" y la tecla "Play" para poner en marcha la serie Lambda como un secuencia de película. De forma simultánea se muestran el gráfico de interpretación y los datos correspondientes de cada imagen individual, mediante una línea de ayuda perpendicular.



## 13º paso

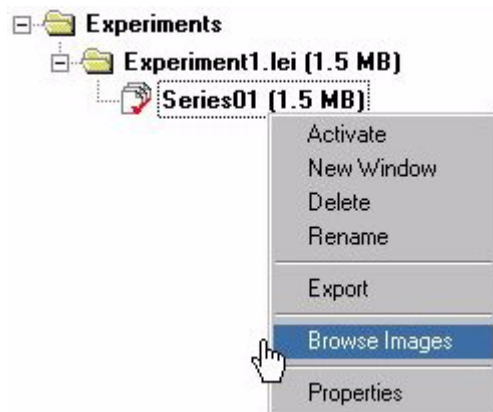
Puede crear una **imagen de un canal de detección** o una imagen de superposición de varios canales de detección como nuevo bloque de datos en el experimento activo.

- ▶ Haga clic en la imagen del canal de detección deseado o de la imagen de superposición.
- ▶ Coloque el puntero del ratón sobre el visor Viewer y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.



- ▶ Seleccione "Selection (raw)" para crear los datos de imagen del encuadre marcado como nuevo archivo.
- ▶ Seleccione "Selection (snapshot)" para crear una captura de pantalla del encuadre marcado como nuevo archivo.
- ▶ Seleccione "All (snapshot)" para crear una captura de pantalla de la imagen completa como nuevo archivo.

Los archivos almacenados se encuentran en el visor "Experiment Overview" en el que el usuario dispone de los comandos siguientes:



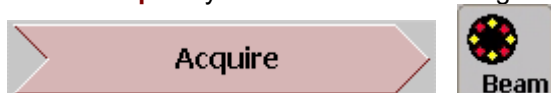
- ▶ Marque un archivo y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.
- ▶ Seleccione "Activate" para mostrar los datos de imagen del archivo en el visor Viewer.
- ▶ Seleccione "New Window" para abrir la captura actual en un segundo visor. Así, por ejemplo, puede mostrar la misma imagen con otra tabla de asignación de colores.
- ▶ Seleccione "Delete" para borrar el archivo.
- ▶ Seleccione "Rename" para introducir un nombre nuevo para el archivo.
- ▶ Seleccione "Export" para exportar una exposición en formato de archivo \*.avi.
- ▶ Seleccione "Browse Images" para mostrar todas las exposiciones de un experimento como miniaturas en la interfaz de usuario.
- ▶ Seleccione "Properties" para introducir una descripción breve de la exposición en un cuadro de diálogo.
- ▶ Si desea desplazar archivos de un experimento a otro, arrastre y suelte (drag and drop) el archivo con el botón izquierdo del ratón presionado hasta el directorio del experimento deseado.



## Captura de series de imágenes secuenciales

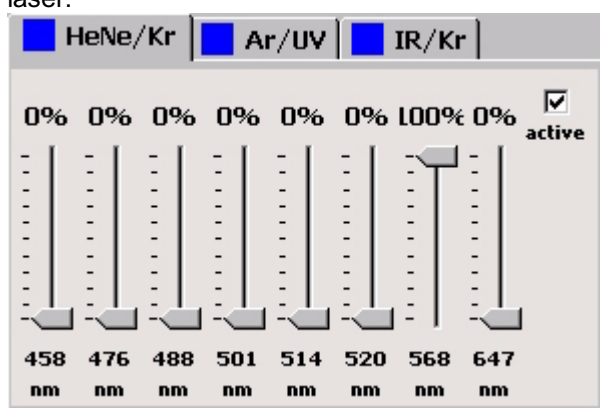
### 1<sup>er</sup> paso

En primer lugar se ajustan los parámetros de captura para el primer método de captura y se guardan como lote de parámetros de captura. Para ello, haga clic en el símbolo de flecha "**Acquire**" y abra el cuadro de diálogo "Beam Path Setting" con la tecla "Beam".



### 2º paso

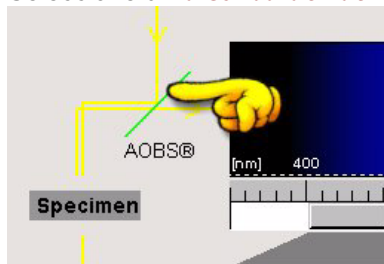
Seleccione la **longitud de onda de excitación** y ajuste la intensidad de la línea de láser.



► Desplace el botón deslizable o haga doble clic en el número e indique un valor para la intensidad del láser.

### 3º paso

Seleccione un **distribuidor de haz de excitación** apropiado.



Si el sistema dispone de un distribuidor de haz acústico-óptico (AOBS) éste optimiza automáticamente la trayectoria de rayos para la longitud de onda seleccionada.

Si no es el caso, haga doble clic en la línea verde y seleccione un distribuidor de haz:

► Seleccione filtro dicróico RSP 500 para la captura de FITC y GFP con una longitud de onda de excitación de 488 nm y un ancho de banda de detección desde 500 hasta 600 nm.

► Seleccione filtro dicróico RSP 465 para la captura de CFP con una longitud de onda de excitación de 458 nm y un ancho de banda de detección desde 465 hasta 525 nm.

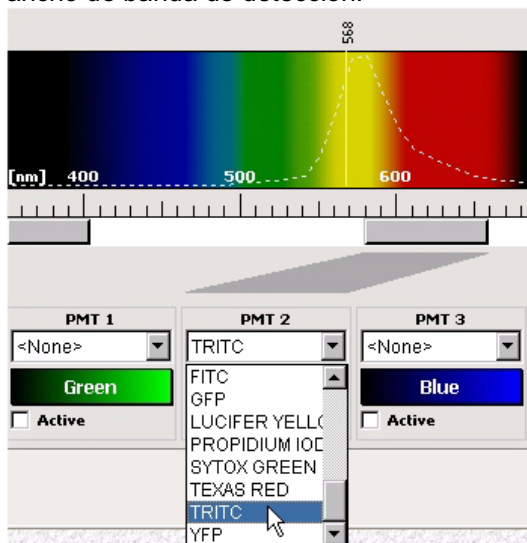
► Seleccione un filtro dicróico doble DD 488 / 543 para la captura de FITC y TRITC o GFP y DsRED con una longitud de onda de excitación de 488 y 543 nm un ancho de banda de detección desde 500 hasta 530 nm, o bien, desde 555 hasta 700 nm.

► Seleccione el filtro dicróico triple TD 488 / 543 / 633 para capturas de FITC, TRITC y CY5 con una longitud de onda de 488, 543 y 633 nm y un ancho de banda de detección desde 500 hasta 535 nm, desde 555 hasta 620 nm, o bien, desde 650 hasta 750 nm.

► Seleccione un distribuidor neutral RT 30/70 para la captura de reflexiones.

## 4º paso

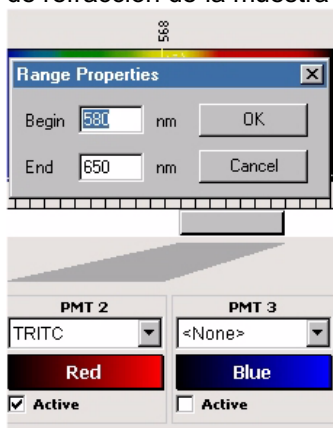
Seleccione un **canal de detección "PMT"** y ajuste la tintura fluorescente utilizada y el ancho de banda de detección.



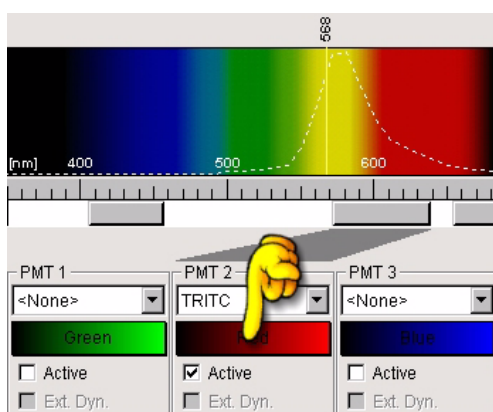
- Haga clic en el campo de lista de un canal de detección, por ejemplo, "PMT2" y seleccione una tintura fluorescente, por ejemplo "TRITC". La curva de emisión de la tintura fluorescente se fusiona con el espectro.
- Coloque el botón deslizante bajo la curva de emisión.

**Nota sobre la posición de la banda de detección**

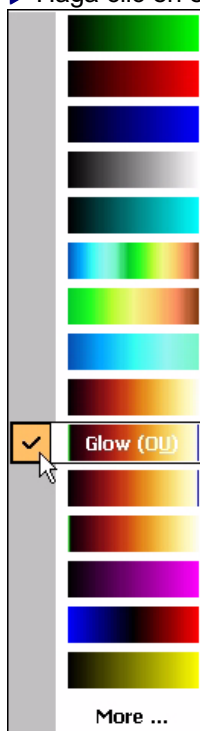
En las capturas de fluorescencia observe que la banda de detección no esté colocada bajo la línea del láser, ya que en ese caso se captura también la luz reflejada. La distancia de la banda de detección a la línea del láser debe alcanzar al menos 5 nm en la gama espectral azul (línea de excitación 488 nm), 10 nm en la gama espectral verde (línea de excitación 543 nm) y 15 nm en la gama espectral roja (excitación 633 nm). Si utiliza el AOBs puede reducir aún más la distancia a la línea del láser, ya que este distribuidor de haz de excitación limita la luz reflejada mucho mejor que los distribuidores convencionales. No obstante, el requisito para ello es que el coeficiente de refracción de la muestra y del medio entre el cubre-objetos y el objetivo sea óptimo.



- Haga doble clic en el botón deslizante del canal de detección seleccionado.
- En el cuadro de diálogo "Range Properties" indique una longitud de onda para el inicio y otra para el final de la banda de detección.



► Haga clic en el símbolo de la tabla de asignación de colores



► Haga clic en la tabla de asignación de colores. En la primera captura de imagen se recomienda trabajar con la tabla de asignación de colores "Glow(OU)".

& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

#### 5º paso

Para optimizar la calidad de la imagen durante la captura, inicie una captura continua mediante la tecla "**Continuous**".

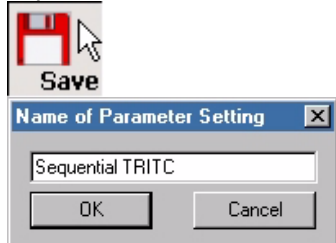


► Defina el plano focal (posición Z), los detectores y el pinhole de detección. Para ello, lea los pasos 7 hasta 15 en el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen".

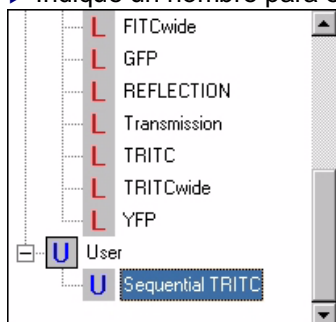
& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

#### 6º paso

En el cuadro de diálogo "Beam Path Setting" haga clic en la tecla de pantalla "**Save**" para guardar la configuración del primer método de captura como lote de parámetros de captura.



► Indique un nombre para el lote de parámetros de captura y haga clic en OK.

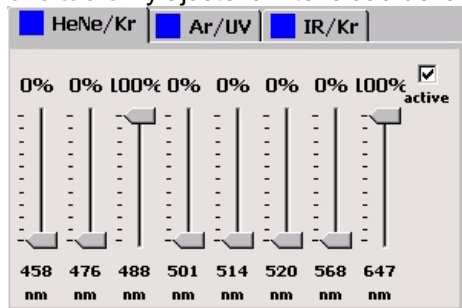


El lote de parámetros de captura definido aparece en el campo de lista bajo "U".

& vea el capítulo "Creación de lotes de parámetros de captura (IPS) definidos por el usuario" (página 73)

### 7º paso

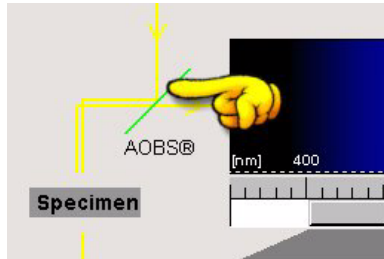
A continuación se ajustan los parámetros para el segundo método de captura y se guardan como lote de parámetros de captura. Seleccione la **longitud de onda de excitación** y ajuste la intensidad de la línea de láser.



► Desplace el botón deslizante o haga doble clic en el número e indique un valor para la intensidad del láser.

### 8º paso

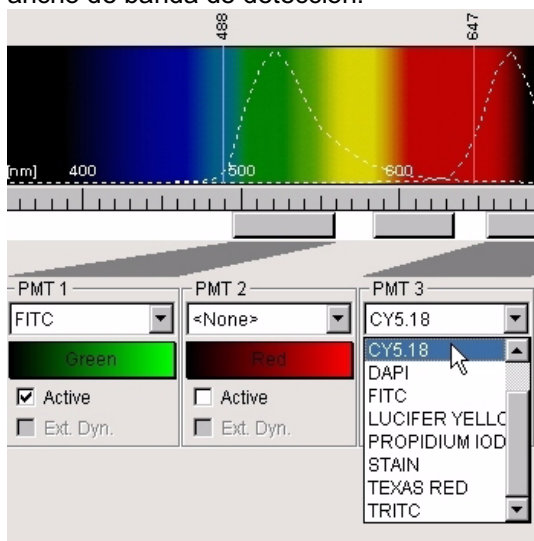
Seleccione un **distribuidor de haz de excitación** apropiado.



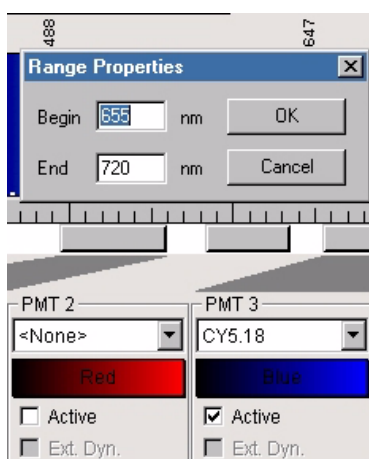
► Si desea una descripción detallada de los haces de excitación disponibles, consulte el paso 3.

### 9º paso

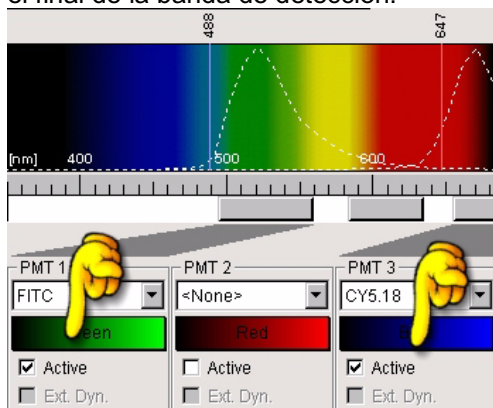
Seleccione un **canal de detección "PMT"** y ajuste la tintura fluorescente utilizada y el ancho de banda de detección.



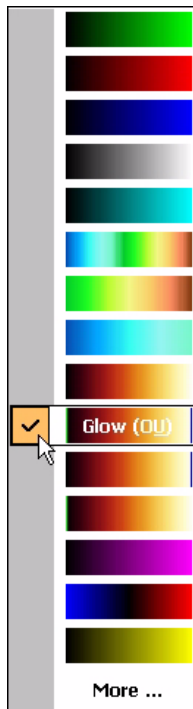
- Haga clic en los campos de lista de los canales de detección, por ejemplo, "PMT1" y "PMT3" y seleccione en cada caso una tintura fluorescente, por ejemplo "FITC" y "CY5". Las curvas de emisión de las tinturas fluorescentes se fusionan con el espectro.
- Coloque el botón deslizante bajo cada curva de emisión.



- Haga doble clic en el botón deslizante del canal de detección seleccionado.
- En el cuadro de diálogo "Range Properties" indique un valor para el inicio y otro para el final de la banda de detección.



- Haga clic en cada caso en el símbolo de la tabla de asignación de colores



► Haga clic en la tabla de asignación de colores y en "OK".  
En la primera captura de imagen se recomienda trabajar con la tabla de asignación de colores "Glow(O&U)".

#### 10º paso

Para optimizar la calidad de la imagen durante la captura, inicie una captura continua mediante la tecla "**Continuous**".

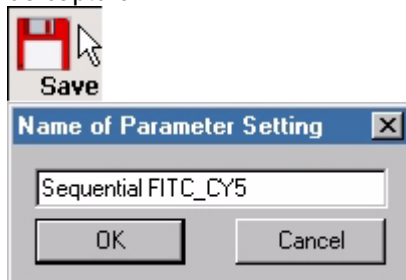


► Defina el plano focal (posición Z), los detectores y el pinhole de detección. Para ello, lea los pasos 7 hasta 15 del capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen".

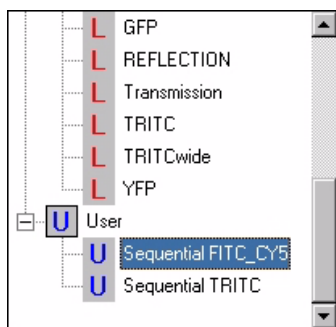
& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

#### 11º paso

En el cuadro de diálogo "Beam Path Setting" haga clic en la tecla de pantalla "**Save**" para guardar la configuración del segundo método de captura como lote de parámetros de captura.



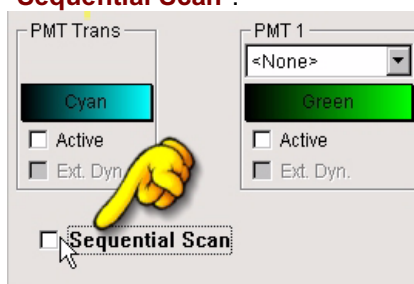
► Indique un nombre para el lote de parámetros de captura y haga clic en OK.



El lote de parámetros de captura definido aparece en el campo de lista bajo "U".

### 12º paso

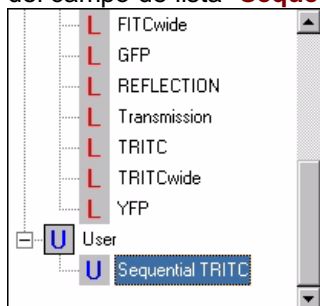
En la parte inferior izquierda del cuadro de diálogo "Beam Path Setting" haga clic en **"Sequential Scan"**.



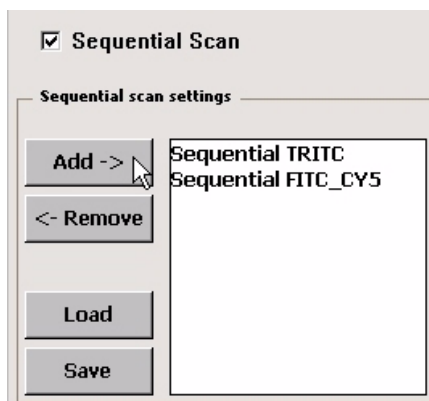
Se abren los elementos de pantalla necesarios para una captura de imagen secuencial.

### 13º paso

En el cuadro de diálogo "Beam Path Setting" copie el lote de parámetros de captura del campo de lista **"Sequential scan settings"**.



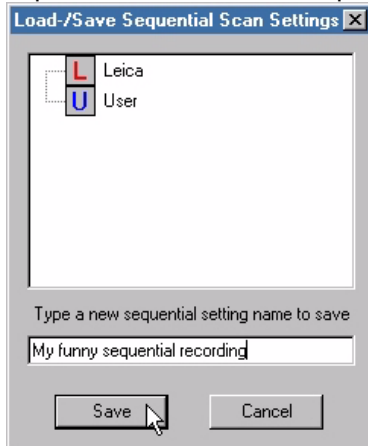
► Marque el lote de parámetros de captura del campo de lista situado en la parte superior derecha.



► A continuación, haga clic en la tecla de pantalla "Add" situada en la parte inferior izquierda del cuadro de diálogo.

O bien,

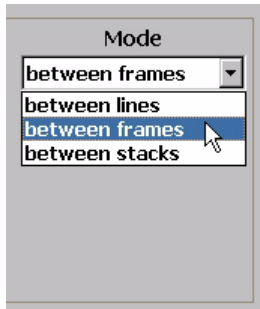
- ▶ Arrastre y suelte (drag and drop) el lote de parámetros de captura desplazándolo con el botón izquierdo del ratón apretado hasta el cuadro de lista "Sequential scan settings".
- ▶ Haga clic en la tecla de pantalla "Remove" para borrar de nuevo el lote de parámetros de captura.
- ▶ Haga clic en la tecla de pantalla "Save" para guardar los lotes de parámetros de captura como método de captura secuencial.



- ▶ Mediante la tecla de pantalla "Load" puede cargarse de nuevo este método más adelante.

#### 14º paso

Para definir cuando se pasa de un método secuencial a otro, seleccione uno de los tres modos secuenciales del **cuadro de lista "Mode"**.

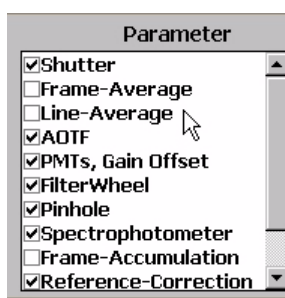


- ▶ Seleccione "between lines" si desea que se cambie el método tras la captura de una línea.
- ▶ Seleccione "between frames" si desea que se cambie el método tras la captura de una imagen individual.
- ▶ Seleccione "between stacks" si desea que se cambie el método tras la captura de un lote de imágenes.

#### 15º paso

En el **campo de lista "Parameter"** compruebe los parámetros que deben utilizarse para las capturas con todos los métodos secuenciales.





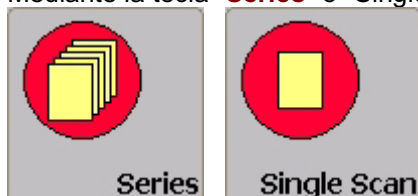
► Haga clic en las casillas de verificación de los parámetros deseados.

### 16º paso

A continuación ajuste todos los parámetros restantes que se diferencian según el tipo de captura (serie de imágenes espacial, serie de imágenes temporal o serie de imágenes espectral).

### 17º paso

Mediante la tecla "**Series**" o "Single Scan" inicie la captura de imágenes secuencial.



► Si ha seleccionado el modo secuencial "between lines", puede iniciar el barrido continuo con la tecla "Continuous". El modo de barrido continuo tiene la ventaja de que permite modificar muchos parámetros de captura durante la captura de la imagen.



► Haga clic en la tecla "Gallery", para ir mostrando durante la captura de la imagen las exposiciones individuales en el visor Viewer.

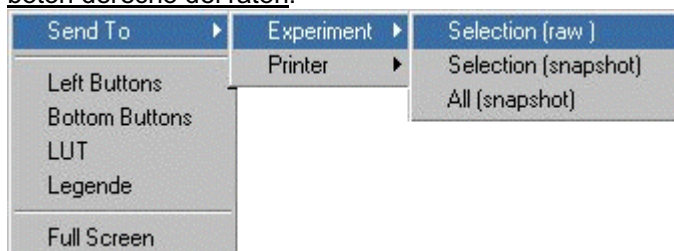


### 18º paso

Puede crear una **imagen de un canal de detección** o una imagen de superposición de varios canales de detección como nuevo bloque de datos en el experimento activo.

► Haga clic en la imagen del canal de detección deseado o de la imagen de superposición.

► Coloque el puntero del ratón sobre el visor Viewer y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.



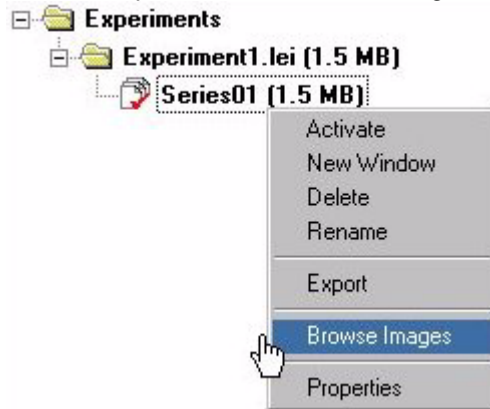
► Seleccione "Selection (raw)" para crear los datos de imagen del encuadre marcado como nuevo archivo.

► Seleccione "Selection (snapshot)" para crear una captura de pantalla del encuadre

marcado como nuevo archivo.

► Seleccione "All (snapshot)" para crear una captura de pantalla de la imagen completa como nuevo archivo.

Los archivos almacenados se encuentran en el visor "Experiment Overview" en el que el usuario dispone de los comandos siguientes:



- Marque un archivo y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.
- Seleccione "Activate" para mostrar los datos de imagen del archivo en el visor Viewer.
- Seleccione "New Window" para abrir la captura actual en un segundo visor. Así, por ejemplo, puede mostrar la misma imagen con otra tabla de asignación de colores.
- Seleccione "Delete" para borrar el archivo.
- Seleccione "Rename" para introducir un nombre nuevo para el archivo.
- Seleccione "Export" para exportar una exposición en formato de archivo \*.avi.
- Seleccione "Browse Images" para mostrar todas las exposiciones de un experimento como miniaturas en la interfaz de usuario.
- Seleccione "Properties" para introducir una descripción breve de la exposición en un cuadro de diálogo.
- Si desea desplazar archivos de un experimento a otro, arrastre y suelte (drag and drop) el archivo con el botón izquierdo del ratón presionado hasta el directorio del experimento deseado.

## Capturas de imágenes de zonas de interés (ROI Scan)

### 1<sup>er</sup> paso

En primer lugar se optimizan todos los parámetros para la captura de la imagen completa. Para poder hacer esto durante la captura de la imagen, inicie ésta mediante la tecla "**Continuous**" en modo continuo.



► Defina el plano focal (posición Z), los detectores y el pinhole de detección. Para ello, lea los pasos 7 hasta 15 del capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen".

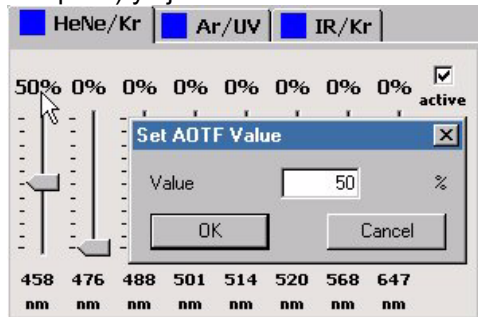
& vea el capítulo "Ajuste de los parámetros para la primera captura de imagen" (página 65)

### 2<sup>o</sup> paso

Haga clic en el símbolo de flecha "**Acquire**" y abra el cuadro de diálogo "Beam Path Setting" con la tecla "Beam".



► Seleccione la longitud de onda de excitación para el fondo de la imagen (imagen completa) y ajuste la intensidad de la línea de láser.



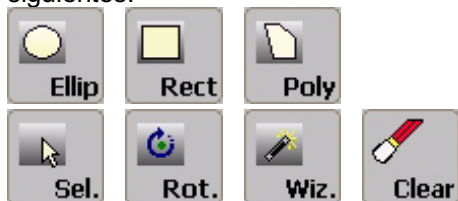
► Desplace el botón deslizante o haga doble clic en el número e indique un valor para la intensidad del láser. Si el fondo debe ser negro, ajuste todas las longitudes de onda de excitación a 0 %.

### 3<sup>er</sup> paso

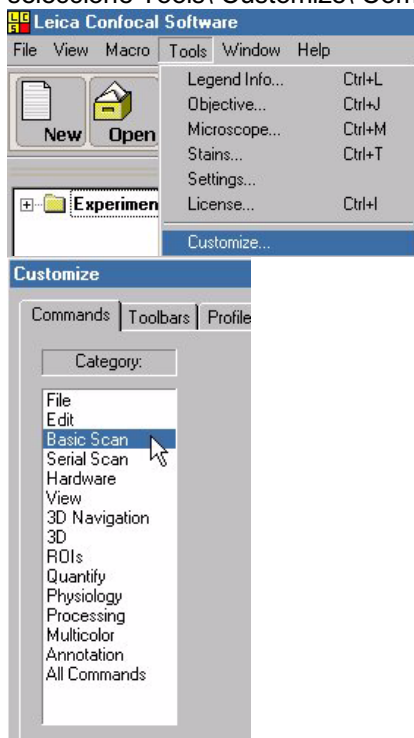
Haga clic en la tecla "**ROI**" para guardar la configuración del láser para el fondo de la imagen.



Al pulsar esta tecla se activan automáticamente las teclas que precisará en los pasos siguientes:



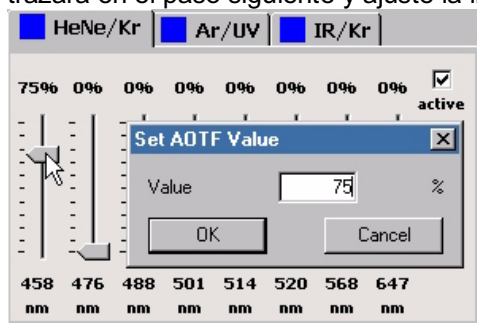
► Si la tecla "ROI" no se encuentra en la interfaz de usuario bajo la categoría "Acquire", seleccione Tools\ Customize\ Commands\ Category Basic Scan.



► Haga clic en la tecla "ROI" y arrástrela con el botón izquierdo del ratón presionado hasta la interfaz de usuario.

#### 4º paso

Seleccione la **longitud de onda de excitación** para la zona de interés (ROI) que se trazará en el paso siguiente y ajuste la intensidad de la línea del láser.



► Desplace el botón deslizante o haga doble clic en el número e indique un valor para la intensidad del láser.



#### Nota

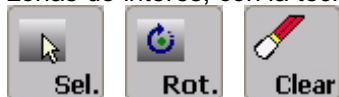
Puede utilizar varias líneas de láser para la excitación de una zona de interés (ROI). No obstante, sólo puede ajustarse un valor de intensidad por línea de láser, y éste se utiliza para todas las zonas de interés.

#### 5º paso

Para trazar la primera zona de interés en la imagen global haga clic en el símbolo de flecha **"Quantify"** y, a continuación, por ejemplo, en la tecla "Wizard" y la tecla "Polygon".

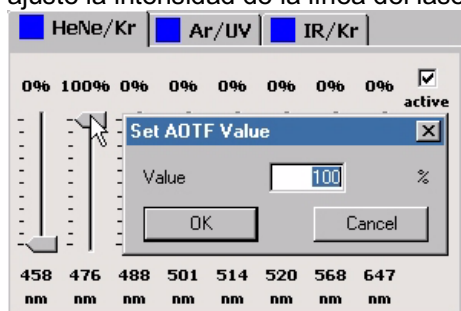


- Haga doble clic en una estructura de la imagen que deba definirse como zona de interés. Los contornos de la estructura se marcan automáticamente como zona de interés.
- Mediante las teclas "Select" y "Rotate" puede mover, girar y variar el tamaño de las zonas de interés, con la tecla "Clear" puede borrar todas las zonas de interés.



## 6º paso

Seleccione la **longitud de onda de excitación** para una segunda zona de interés y ajuste la intensidad de la línea del láser.



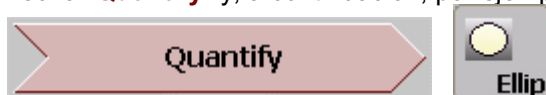
- Desplace el botón deslizante o haga doble clic en el número e indique un valor para la intensidad del láser.

**i** **Nota**

Puede utilizar varias líneas de láser para la excitación de una zona de interés (ROI). No obstante, sólo puede ajustarse un valor de intensidad por línea de láser, y éste se utiliza para todas las zonas de interés.

## 7º paso

Para trazar la segunda zona de interés en la imagen global haga clic en el símbolo de flecha "**Quantify**" y, a continuación, por ejemplo, en la tecla "Ellipse".



- Desactive la tecla "Wizard" si desea marcar a mano la zona de interés en la imagen.
- Mediante las teclas "Select" y "Rotate" puede mover, girar y variar el tamaño de las zonas de interés y con la tecla "Clear" puede borrar todas las zonas de interés.



## 8º paso

Repita el procedimiento descrito en los pasos 4 hasta 7 para cada zona de interés adicional que desee definir.

## 9º paso

A continuación, haga clic en la tecla "**Configuration**" para ver un resumen de las zonas de interés definidas y las líneas de láser asignadas.



- Aquí puede modificar de nuevo, en caso necesario, la asignación de la línea láser y las zonas de interés.

## 10º paso

Mediante la tecla "**Series**" inicie la serie de imágenes.



► Para mejorar la relación señal / ruido haga clic en la tecla "Average". Defina la frecuencia con que debe repetirse la captura de una imagen. En cada caso se muestra el valor medio.



► Para mejorar la relación señal / ruido haga clic en la tecla "Line Average". Defina la frecuencia con que debe repetirse la captura de una línea. En cada caso se muestra el valor medio.



► Haga clic en la tecla "Gallery", para ir mostrando durante la captura de la imagen las exposiciones individuales en el visor Viewer.

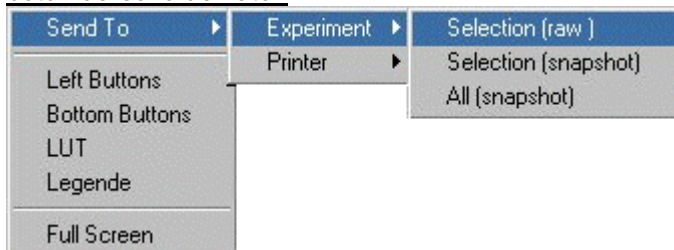


## 11º paso

Puede crear una **imagen de un canal de detección** o una imagen de superposición de varios canales de detección como nuevo bloque de datos en el experimento activo.

► Haga clic en la imagen del canal de detección deseado o de la imagen de superposición.

► Coloque el puntero del ratón sobre el visor Viewer y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.

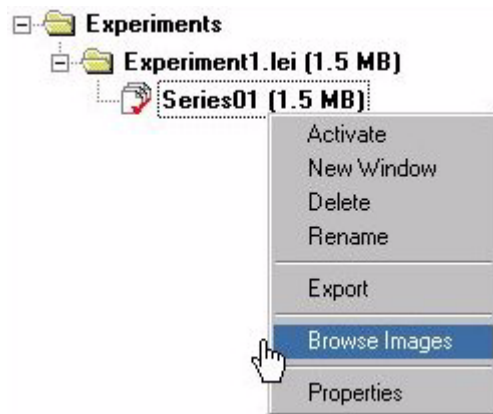


► Seleccione "Selection (raw)" para crear los datos de imagen del encuadre marcado como nuevo archivo.

► Seleccione "Selection (snapshot)" para crear una captura de pantalla del encuadre marcado como nuevo archivo.

► Seleccione "All (snapshot)" para crear una captura de pantalla de la imagen completa como nuevo archivo.

Los archivos almacenados se encuentran en el visor "Experiment Overview" en el que el usuario dispone de los comandos siguientes:



- ▶ Marque un archivo y abra el menú contextual con el botón derecho del ratón.
- ▶ Seleccione "Activate" para mostrar los datos de imagen del archivo en el visor Viewer.
- ▶ Seleccione "New Window" para abrir la captura actual en un segundo visor. Así, por ejemplo, puede mostrar la misma imagen con otra tabla de asignación de colores.
- ▶ Seleccione "Delete" para borrar el archivo.
- ▶ Seleccione "Rename" para introducir un nombre nuevo para el archivo.
- ▶ Seleccione "Export" para exportar una exposición en formato de archivo \*.avi.
- ▶ Seleccione "Browse Images" para mostrar todas las exposiciones de un experimento como miniaturas en la interfaz de usuario.
- ▶ Seleccione "Properties" para introducir una descripción breve de la exposición en un cuadro de diálogo.
- ▶ Si desea desplazar archivos de un experimento a otro, arrastre y suelte (drag and drop) el archivo con el botón izquierdo del ratón presionado hasta el directorio del experimento deseado.

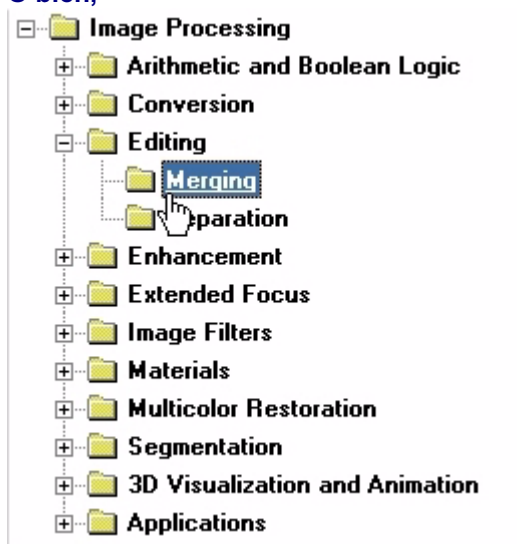
## Enlace de imágenes individuales o series de imágenes

### 1<sup>er</sup> paso

Haga clic en el símbolo de flecha "**Process**" y, a continuación, en el botón "Editing" y el botón "Merging".



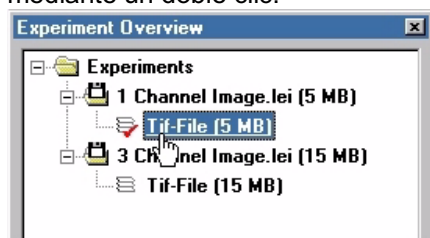
O bien,



► En la ventana de navegación, seleccione en la parte inferior izquierda de la interfaz de usuario: "Image Processing\ Editing\ Merging".

### 2º paso

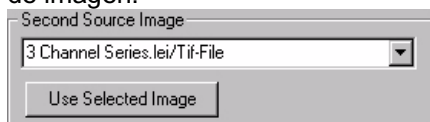
En el visor "**Experiment Overview**" seleccione el primer bloque de datos de imagen mediante un doble clic:



► El bloque de datos de imagen activo tiene una marca de selección roja.

### 3<sup>er</sup> paso

En el campo de lista "**Second Source Image**" seleccione el segundo bloque de datos de imagen.





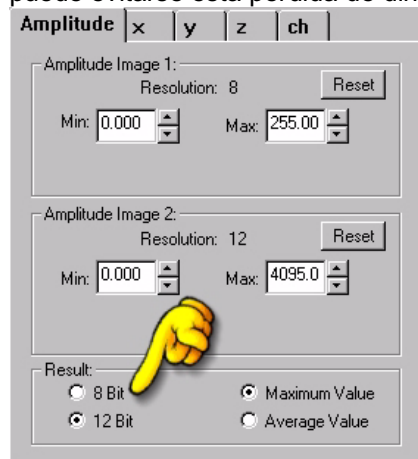
## 4º paso

► Al hacer clic en la tecla de pantalla "Use Selected Image" se utiliza el bloque de datos de imagen seleccionado en el visor "Experiment Overview".

En el registro "**Amplitude**" compruebe la profundidad de bit de ambos bloques de datos de imagen que desea enlazar.

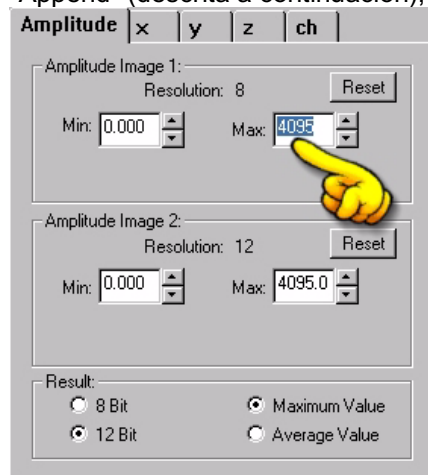
**Imágenes negras resultantes del enlace**

Cuando se enlazan bloques de datos de imagen con diferentes profundidades de bit (8 bit o 12 bit) las imágenes pueden oscurecerse o tornarse negras debido al cálculo de la media de las diferentes resoluciones. Si se normaliza una resolución de bit conjunta, puede evitarse esta pérdida de dinámica.



► En el campo "Result", seleccione la profundidad de bit que debe tener el nuevo bloque de datos de imagen: "8Bit" o "12 Bit".

► Al cargar las imágenes, seleccione en el campo "Result" "Maximum Value" o "Average Value" si debe representarse el valor máximo o el promedio de ambos bloques de datos en la imagen resultante. Si simplemente une las imágenes con la función "Append" (descrita a continuación), esta selección es irrelevante.

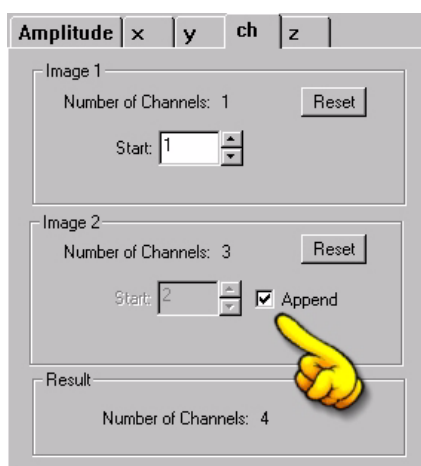


► Corrija de forma manual en el campo de entrada la profundidad de bits del bloque de datos de imagen, que debe adaptarse a la profundidad de los bloques de datos restantes.

**Enlace de los canales de detección de dos bloques de datos de imagen**

## 1º paso

Si desea unir los **canales de detección** de dos bloques de datos de imagen en un nuevo bloque de datos, simplemente seleccione en el registro "ch" la casilla de verificación "Append".

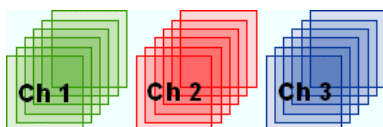


► Tras el canal de detección del primer bloque de datos ("Image 1") se introducen los canales de detección del segundo lote ("Image 2"):



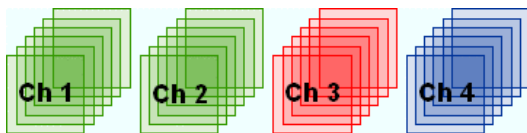
Lote de datos de imagen 1 ("Image 1")

+



Lote de datos de imagen 2 ("Image 2")

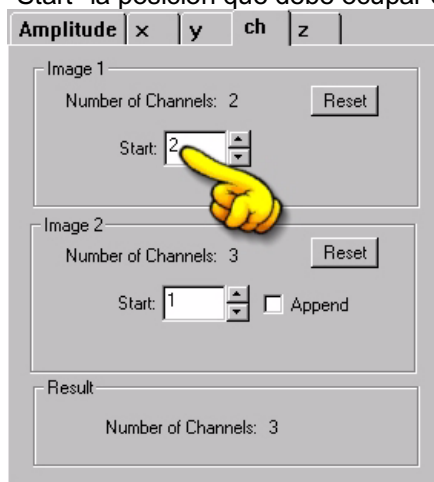
=



Nuevo bloque de datos de imagen

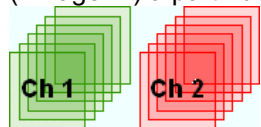
## 2º paso

Si desea cargar los **canales de detección** de dos bloques de datos de imagen en un bloque de datos de imagen nuevo, defina en el registro "ch" en el campo de entrada "Start" la posición que debe ocupar cada bloque de datos en la imagen resultante.



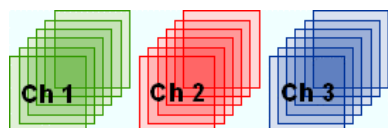
► Los canales de detección del primer bloque de datos de imagen ("Image 1") se

introducen en el nuevo bloque a partir de la segunda posición, y los del segundo bloque ("Image 2") a partir de la primera posición:



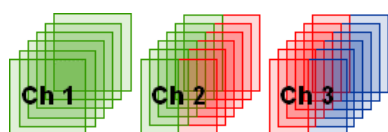
Lote de datos de imagen 1 ("Image 1")

+



Lote de datos de imagen 2 ("Image 2")

=

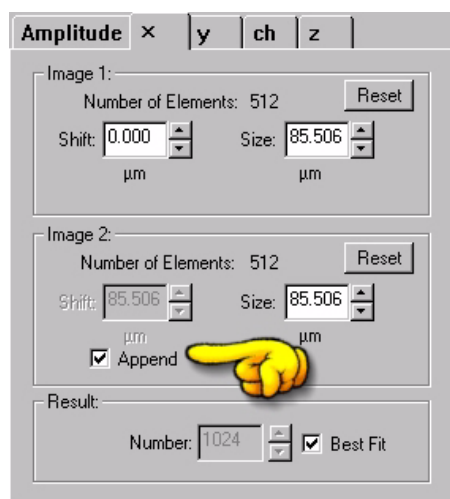
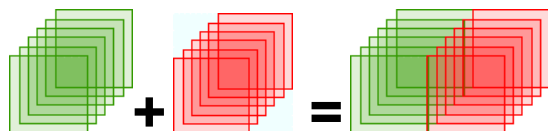


Nuevo bloque de datos de imagen

## Enlace de dos imágenes individuales o series de imágenes

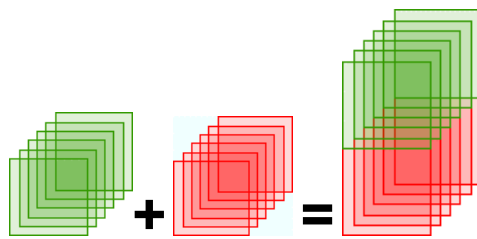
### 1<sup>er</sup> paso

Si desea unir dos imágenes individuales o series de imágenes de forma horizontal, simplemente seleccione en el **registro "x"** la casilla de verificación "Append".



### 2<sup>o</sup> paso

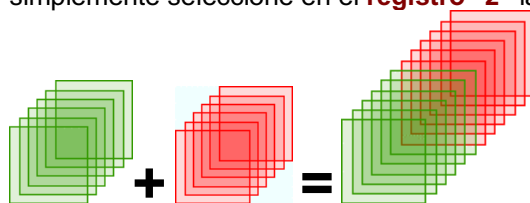
Si desea unir dos imágenes individuales o series de imágenes de forma vertical, simplemente seleccione en el **registro "y"** la casilla de verificación "Append".



Amplitude	x	y	ch	z
Image 1:				
Number of Elements: 512 <span>Reset</span>				
Shift: 0.000 <span>µm</span>		Size: 85.506 <span>µm</span>		
Image 2:				
Number of Elements: 512 <span>Reset</span>				
Shift: 85.506 <span>µm</span>		Size: 85.506 <span>µm</span>		
<input checked="" type="checkbox"/> Append				
Result:				
Number: 1024		<input checked="" type="checkbox"/> Best Fit		

3<sup>er</sup> paso

Si desea combinar en una serie dos imágenes individuales o series de imágenes, simplemente seleccione en el **registro "z"** la casilla de verificación "Append".

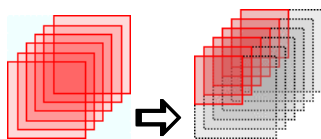


Amplitude	x	y	z	ch
Image 1:				
Number of Elements: 40 <span>Reset</span>				
Shift: 0.000 <span>µm</span>		Size: 28.954 <span>µm</span>		
Image 2:				
Number of Elements: 20 <span>Reset</span>				
Shift: 28.954 <span>µm</span>		Size: 14.477 <span>µm</span>		
<input checked="" type="checkbox"/> Append				
Result:				
Number: 60		<input checked="" type="checkbox"/> Best Fit		

## Reducción de imágenes e integración en una segunda serie de imágenes

1<sup>er</sup> paso

Corrija las dimensiones del bloque de datos de imagen que desea reducir en el **registro "x"** y en el registro "y".



Amplitude x y ch z

Image 1:  
Number of Elements: 512   
Shift: 0.000    
Size: 85,506

Image 2:  
Number of Elements: 512   
Shift: 0.000    
Size:    
☐ Append

Result:  
Number: 512  ☒ Best Fit

► En el campo Size introduzca el nuevo valor para el ancho de la imagen.

Amplitude x y ch z

Image 1:  
Number of Elements: 512   
Shift: 0.000    
Size: 85,506

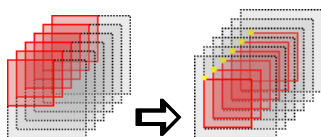
Image 2:  
Number of Elements: 512   
Shift: 0.000    
Size:    
☐ Append

Result:  
Number: 512  ☒ Best Fit

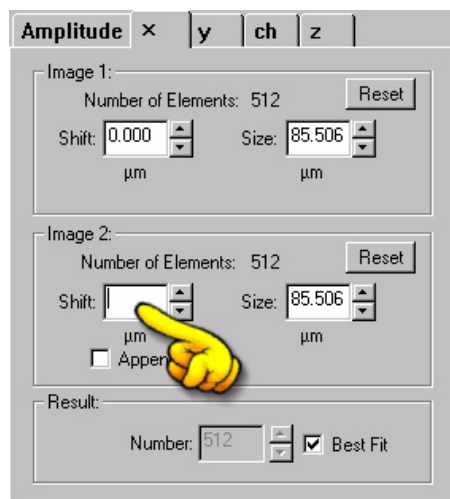
► En el campo Size introduzca el nuevo valor para la longitud de la imagen.

## 2º paso

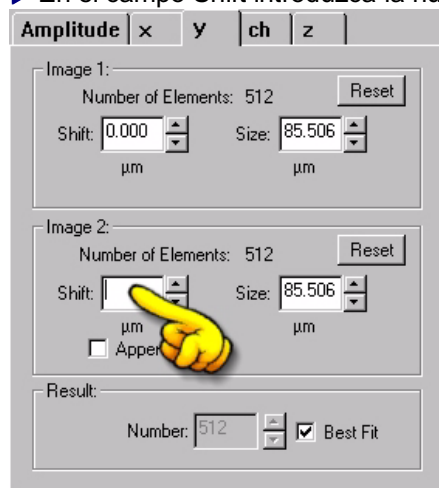
Defina la posición que debe tener la imagen reducida en la imagen resultante en el **registro "x"** y en el registro "y".



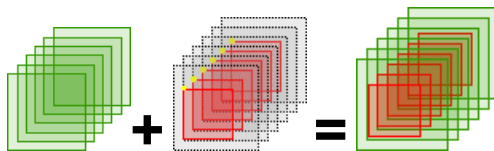
El punto de referencia es la esquina superior izquierda de la imagen.



► En el campo Shift introduzca la nueva coordenada x del punto de referencia.



► En el campo Shift introduzca la nueva coordenada y del punto de referencia.



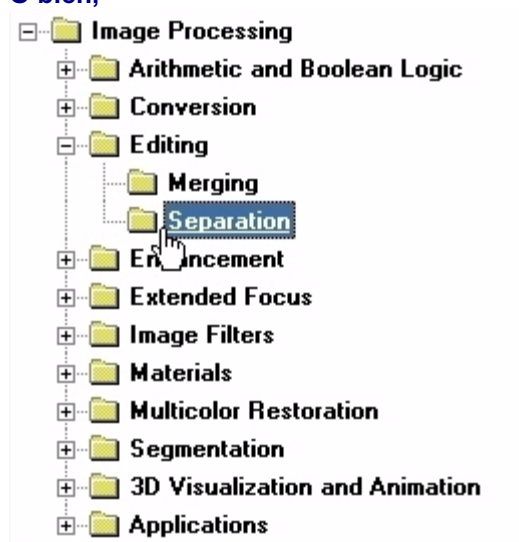
## Separación de imágenes individuales o series de imágenes

### 1<sup>er</sup> paso

Haga clic en el símbolo de flecha "**Process**" y, a continuación, en el botón "Editing" y el botón "Separation".



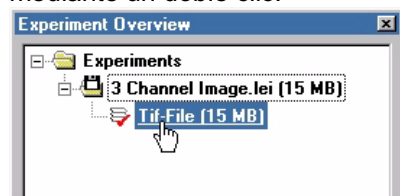
O bien,



► En la ventana de navegación, seleccione en la parte inferior izquierda de la interfaz de usuario: "Image Processing\ Editing\ Separation".

### 2º paso

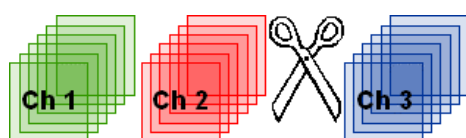
En el visor "**Experiment Overview**" seleccione el bloque de datos de imagen deseado mediante un doble clic:



► El bloque de datos de imagen activo tiene una marca de selección roja.

### 3<sup>er</sup> paso

Si desea cortar todas las imágenes de un **canal de detección** de un bloque de datos de imagen, active en el registro "ch" la casilla de verificación del canal deseado y desactive el resto.



Dimension Selection

ch ☒ ch.1  
☒ ch.2  
☐ ch.3

R

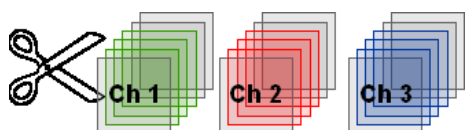
x Start x: 1 End x: 512 Step x: 1  
0.00 m 85.34  $\mu$ m 167.00 nm

z Start z: 1 End z: 20 Step z: 1  
0.00 m 13.75  $\mu$ m 723.85 nm

y Start y: 1 End y: 512 Step y: 1  
0.00 m 85.34  $\mu$ m 167.00 nm

#### 4º paso

Si desea cortar **imágenes individuales** de una serie de imágenes, seleccione las imágenes correspondientes en los campos de entrada "Start z" y "End z".



Dimension Selection

ch ☒ ch.1  
☒ ch.2  
☒ ch.3

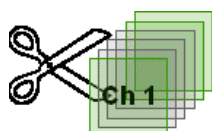
R

z Start z: 2 End z: 4 Step z: 1  
723.85 nm 2.17  $\mu$ m 723.85 nm

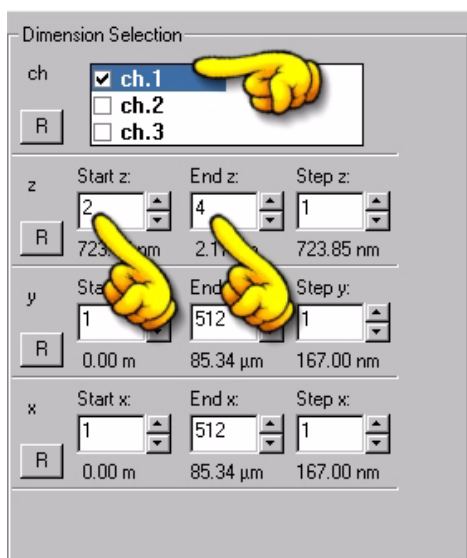
y Start y: 1 End y: 512 Step y: 1  
0.00 m 85.34  $\mu$ m 167.00 nm

x Start x: 1 End x: 512 Step x: 1  
0.00 m 85.34  $\mu$ m 167.00 nm

► En todos los canales de detección se corta desde la imagen 2 hasta la imagen 4.



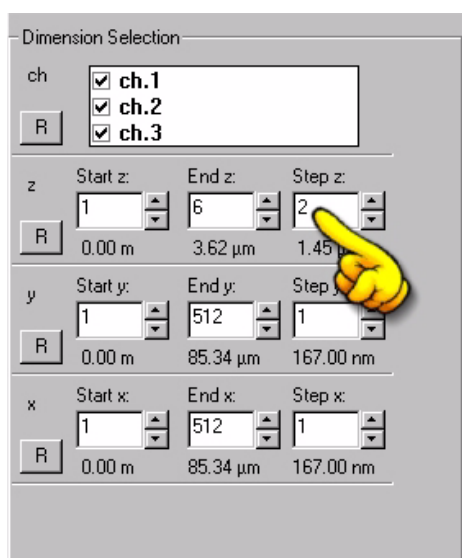
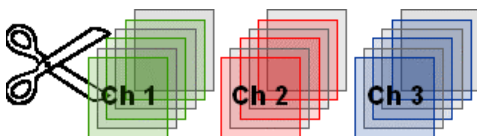




► En el canal de detección 1 se corta desde la imagen 2 hasta la imagen 4.

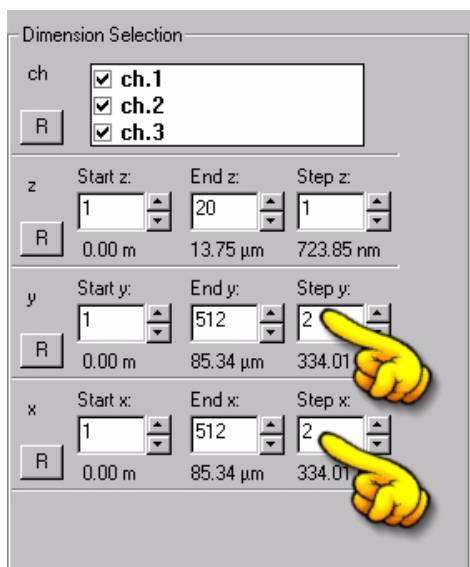
### 5º paso

Si, por ejemplo, desea cortar **una imagen de cada dos** en todos los canales de detección de un bloque de datos de imágenes, introduzca el valor "2" en el campo de entrada "Step z".



### 6º paso

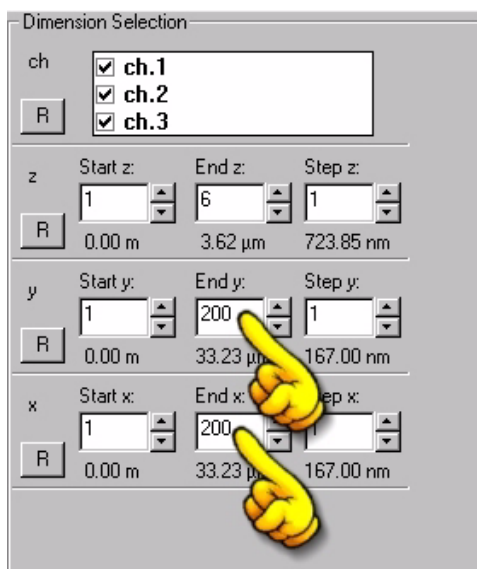
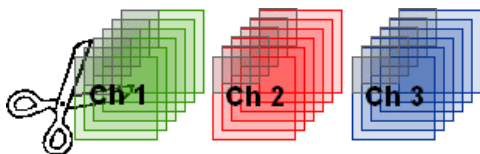
Si, por ejemplo, desea reducir el **formato** de una imagen, introduzca, por ejemplo, el valor "2" en los campos de entrada "Step x" y "Step y".



► Se corta un píxel de cada dos de la imagen. El formato de la imagen resultante se reduce a 256 x 256.

### 7º paso

Si desea cortar un **encuadre** de una imagen, defina el largo y el ancho en los campos de entrada "Start x" y "End x" y "Start y" y "End y".



## Generalidades

### Introducción a la ayuda del Leica Confocal Software

El usuario dispone de los siguientes elementos de ayuda:

#### Ayuda breve

Si coloca el puntero del ratón durante cierto tiempo sobre una tecla del Leica Confocal Software aparece una explicación breve de la función de dicha tecla de pantalla. La explicación breve (help banner) desaparece automáticamente al mover el puntero del ratón.

#### Ayuda sensible al contexto

Si desea utilizar la función de ayuda sensible al contexto, haga clic en la tecla Help:



Toda la interfaz de usuario se congela y junto al puntero del ratón aparece un signo de interrogación. Si, a continuación, hace clic en una tecla, en lugar de las funciones que generalmente se activan al pulsar las teclas de pantalla, aparece una explicación de la tecla pulsada. Si la tecla Help no se encuentra en la interfaz de usuario:

▶	Seleccione la opción Customize en el menú Tools. Aquí se encuentran todas las teclas ordenadas por categorías.
▶	En la categoría File, se encuentra la tecla Help.
▶	Haga clic con el botón izquierdo del ratón en la tecla, manténgalo presionado y arrastre la tecla hasta la ventana deseada.

#### Contenido de la ayuda en línea (Contents)

Si selecciona la opción Contents del menú Help se muestra el índice de contenido de la ayuda en línea. Aquí puede seleccionar las funciones para las que desea solicitar ayuda.

#### Búsqueda mediante términos clave (Index)

Si selecciona la opción Index del menú Help se muestra un índice con términos clave. Seleccione uno de ellos. Para pasar a las páginas con el contenido deseado haga doble clic con el botón del ratón o pulse la tecla Display.

#### Búsqueda de texto completo mediante términos de búsqueda con vínculos lógicos (Search)

Si selecciona la opción Search del menú Help se inicia el programa integrado de búsqueda de texto completo. En la ventana de entrada puede introducir un término de búsqueda. Si hace clic en los tres triángulos situados a la derecha de la ventana de entrada, se muestran los operadores lógicos. Seleccione el operador correspondiente. Tras el operador, introduzca el segundo término de búsqueda que desea vincular al primero:

Ejemplos	Resultados
Diafragma AND corte	Esta sentencia busca los temas de ayuda en los que aparecen ambas palabras, "diagrama" y "corte".
Diafragma OR corte	Esta sentencia busca los temas de ayuda en los que aparece la palabra "diagrama" o la palabra "corte".
Diafragma NEAR corte	Esta sentencia busca los temas de ayuda en los que la palabra "diagrama" y la palabra "corte" aparecen en un radio de búsqueda determinado. Al mismo tiempo, también se buscan términos con una grafía similar.
Diafragma NOT corte	Esta sentencia busca los temas de ayuda en los que aparece la palabra "diagrama" y no la palabra "corte".

**Señal de lectura (Favorites)**

Si en el cuadro de diálogo de la ayuda en línea selecciona el registro Favorites, puede incluir en una lista el tema de ayuda mostrado en dicho momento. Al introducirlos en esta lista, el acceso a estos temas es muy rápido.

**Apertura de la ayuda sensible al contexto****Función**

Mediante la tecla Help se activa la función de ayuda sensible al contexto de la ayuda en línea, que permite ver notas cortas sobre las diferentes teclas y funciones del Leica Confocal Software.

▶	Haga clic en la tecla Help.
▶	Junto al puntero del ratón aparece un signo de interrogación. En este momento y de forma transitoria, todas las teclas quedan sin función.
▶	Haga clic con el puntero en la tecla sobre la cual desea obtener información adicional.
▶	Se abre la ayuda en línea con la descripción de las teclas correspondientes.

En la ayuda en línea puede buscar los temas o las teclas que desee mediante un índice de palabras clave y una función de búsqueda. Las descripciones individuales pueden imprimirse.

También puede abrir la ayuda en línea mediante un clic en las opciones Contents, Search o Index del menú Help.

## Funciones de captura de datos

### Ajuste de la trayectoria de rayos



#### Función

Mediante la tecla Beam se abre el cuadro de diálogo Beam Path Setting en el que puede disponer la trayectoria de rayos y los detectores con las correspondientes tablas de asignación de colores para la captura de imágenes.

#### Selección de las longitudes de onda de excitación

Por encima del espectro del cuadro de diálogo se encuentran los campos en los que pueden ajustarse las longitudes de onda de excitación mediante un filtro AOTF:

▶	Haga clic en la casilla de verificación situada junto a la denominación del láser para activar éste.
▶	Para ajustar la potencia de la línea del láser desplace la corredera de la escala correspondiente hasta el valor deseado, o bien,
▶	Haga doble clic en el valor porcentual de la potencia del láser. Se abre otro cuadro de diálogo en el que puede introducirse el valor exacto.
▶	La línea del láser activa aparece como una línea sobre el espectro.

#### Carga y almacenamiento del ajuste de parámetros

También por encima del espectro se encuentra un campo de lista en el que pueden cargarse y guardarse los ajustes de los parámetros. Existen ajustes de parámetros predefinidos para las combinaciones más importantes de tinturas fluorescentes. Estos ajustes marcados con una **L** (Leica) pueden cargarse pero no modificarse.

También puede guardar el ajuste de parámetros utilizado para una captura de imagen específica como configuración definida por el usuario y volver a cargarla en cualquier otro momento con un simple clic:

▶	Haga clic en la tecla de pantalla Save.
▶	Se abre un cuadro de diálogo en el que puede introducir el nombre de la configuración actual.
▶	Ésta se almacena en el campo de lista bajo User y se marca con una <b>U</b> (User).

Puede seleccionar los parámetros que deben guardarse con la opción Save:

▶	Seleccione la opción Settings en el menú Tools.
▶	En el cuadro de diálogo Settings haga clic en el registro Instrument Parameters.
▶	Para seleccionar el parámetro haga clic en la casilla de verificación correspondiente. Mediante las teclas de pantalla Select all y Deselect all puede seleccionar o deseleccionar todos los parámetros.

Si hace clic en una de estas configuraciones predefinidas o definidas por el usuario y, a continuación, pulsa el botón derecho del ratón, aparece un menú contextual con las opciones siguientes:

Opción	Función
Set as default setting	La configuración se carga como configuración estándar al arrancar el programa.
Remove default setting	La configuración deja de ser la configuración estándar.

Load	Se carga la configuración.
Rename (sólo con <b>U</b> )	Permite cambiar el nombre de la configuración.
Delete (sólo con <b>U</b> )	Se borra la configuración.

### Selección del distribuidor de haz de excitación

El distribuidor de haz de excitación dirige la luz de excitación del láser sobre el preparado y separa éste de la fluorescencia de vuelta y la luz de excitación reflejada.

Si el sistema confocal está provisto de un distribuidor de haz acústico-óptico AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter), éste se ajusta automáticamente en la selección de una o varias líneas de láser de forma que transmita la máxima fluorescencia y reduzca al mínimo la luz reflejada.

& vea Ajuste del distribuidor de haz acústico-óptico (AOBS) (página 139)

Si el sistema confocal dispone de un distribuidor de haz de excitación convencional, debe seleccionarse un filtro apropiado para cada aplicación. A la izquierda del espectro se encuentra el símbolo (línea inclinada verde) del distribuidor de haz de excitación. Haga clic en el símbolo y seleccione el distribuidor de haz deseado:

▶	Los filtros neutrales, como por ejemplo el filtro RT 30/70, se utilizan en las aplicaciones de reflexión para dirigir la luz de excitación sobre la muestra y la luz reflejada al orificio de detección.
▶	Los filtros dicróicos, por ejemplo el filtro de paso corto de reflexión RSP 510, se utilizan en aplicaciones de fluorescencia, para detectar la fluorescencia de una determinada gama de longitud de onda y separarla de la luz de excitación.
▶	Los filtros dicróicos dobles se utilizan para las capturas de imagen en las cuales el preparado se marca con dos tinturas fluorescentes y se excita con dos longitudes de onda de excitación. Con el filtro dicróico doble DD 488/ 568, por ejemplo, se separa la luz de excitación con una longitud de onda de 488 nm y de 568 nm de la luz de detección. Según la configuración del sistema, puede seleccionarse un filtro dicróico doble de los tipos DD 488/ 543 y DD 458/ 514.
▶	Los filtros dicróicos triples se utilizan para las capturas de imagen en las cuales el preparado se marca con tres tinturas fluorescentes y se excita con tres longitudes de onda de excitación. Con el filtro dicróico triple TD 488/ 568/ 633, por ejemplo, se separa la luz de excitación con una longitud de onda de 488 nm, 568 nm y de 633 nm de la luz de detección. Según la configuración del sistema, puede seleccionarse un filtro dicróico triple de los tipos TD 488/ 568/ 647 y TD 488/ 543/ 633.

### Ajuste de detectores y tablas de asignación de colores (LUT)

En el cuadro de diálogo, por debajo del espectro, se encuentran los campos de los cuatro detectores PMT 1 hasta 4 así como el detector de subiluminación PMT Trans. Realice los ajustes siguientes:

▶	Para activar los detectores deseados, haga clic en la casilla de verificación Active situada debajo del símbolo de cada tabla de asignación de colores. Una sombra cúbica conecta el detector activado con la corredera correspondiente de la escala del espectro.
▶	Para definir la gama de longitud de onda en la que debe detectarse, desplace ambos extremos de la corredera hasta la posición deseada de la escala, o bien,
▶	Haga doble clic en la corredera. Se abre otro cuadro de diálogo en el que puede introducirse el valor exacto para los puntos inicial y final de la gama de longitud de onda.
▶	Para aplicaciones de fluorescencia se definen campos de lista con las tinturas fluorescentes más frecuentes para cada detector. Seleccione la tintura fluorescente deseada para incluir su curva de emisión en el espectro.
▶	Para seleccionar la tabla de asignación de colores, haga clic en el símbolo correspondiente.

& vea Selección de tablas de asignación de colores (página 194)

## Ajuste del distribuidor de haz acústico-óptico (AOBS) (opcional)



En esta página se encuentran los temas siguientes

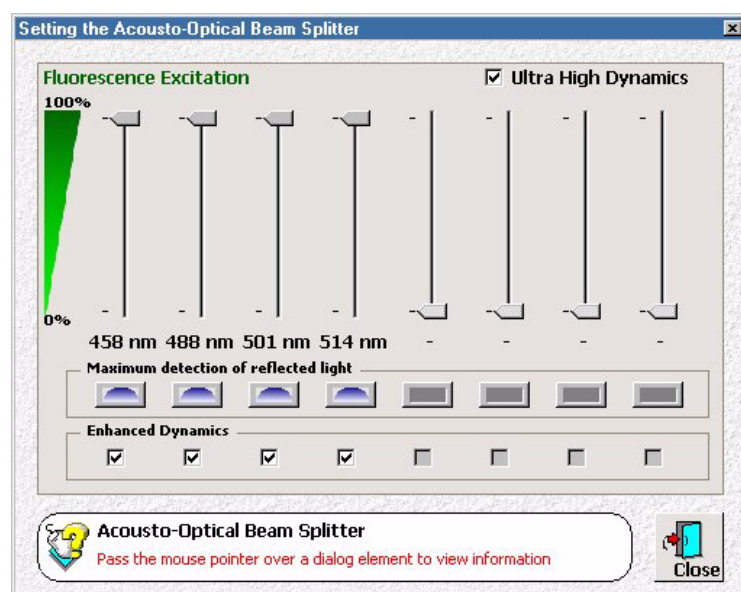
- ▼ Funcionamiento del distribuidor de haz acústico-óptico
- ▼ Empleo del distribuidor AOBS en las capturas de fluorescencia
- ▼ Empleo del distribuidor AOBS en las capturas mixtas de reflexión / fluorescencia

### Función

El distribuidor de haz acústico-óptico (en inglés: AOBS: Acousto-Optical Beam Splitter) dirige la luz de excitación del láser sobre el preparado y separa la fluorescencia que vuelve del preparado y la luz de excitación reflejada. En los microscopios confocales de Leica, el AOBS sustituye y optimiza los filtros de excitación convencionales, como por ejemplo, los filtros dicróicos dobles y triples.

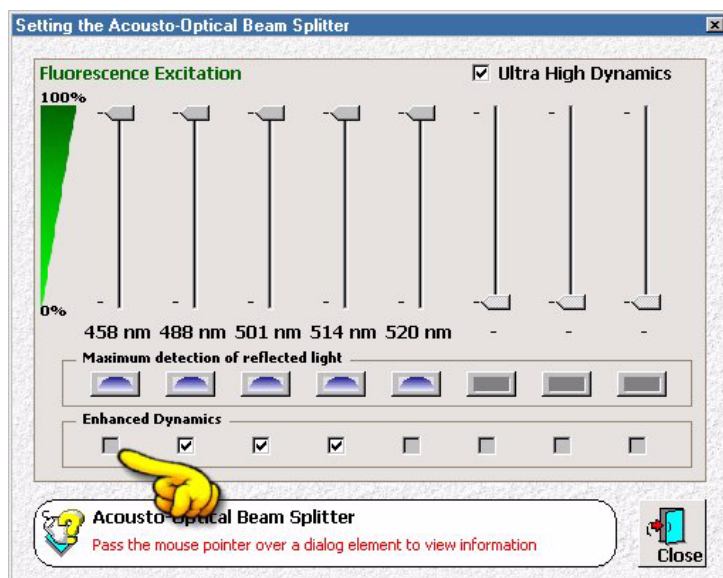
El AOBS es un cristal óptico transparente sobre el que se coloca un campo de onda de ultrasonido. La luz que atraviesa el cristal óptico se difracta en función de su longitud de onda y de la longitud de onda del campo de onda de ultrasonido. La modulación de la amplitud de ultrasonido permite seleccionar, no sólo una línea de láser, sino también la cantidad de luz, así como ajustar la relación entre luz de excitación y luz de detección del divisor de rayos para la línea del láser seleccionada. Mediante el AOBS pueden utilizarse simultáneamente hasta 8 longitudes de onda de excitación.

### Empleo del distribuidor AOBS en las capturas de fluorescencia



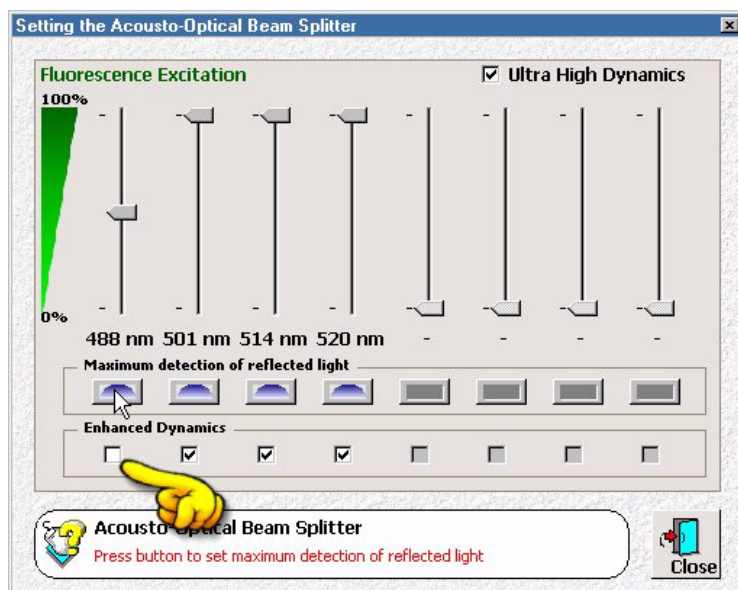
►	La configuración estándar está concebida para las capturas de fluorescencia con hasta 4 longitudes de onda de excitación. Tan pronto como activa una línea de láser en el cuadro de diálogo Beam Path Setting con el botón deslizante, el AOBS se ajusta automáticamente de forma que la luz de excitación se dirija al máximo sobre el preparado. Para la fluorescencia el AOBS es transparente, independientemente del botón deslizante. El botón deslizante del cuadro de diálogo AOBS se encuentra sobre el 100%. & vea Ajuste de la trayectoria de rayos (página 137)
►	Como configuración estándar, ambas casillas de verificación, Enhanced Dynamics y Ultra-High Dynamics, están activadas. Con este ajuste dinámico doble se garantiza que la luz de reflexión, que dirige la trayectoria de rayos en dirección contraria, se retire del eje óptico y, de esta forma, no se detecte.





- ▶ Si se utilizan más de 4 longitudes de onda de excitación, no puede aplicarse la configuración dinámica doble para todas las líneas de láser. En este caso, se desactiva de forma automática la dinámica mejorada (casilla de verificación Enhanced Dynamics) para la línea de láser de onda más corta. Con cada longitud de onda adicional se desactiva la dinámica mejorada para una nueva línea de láser.

### Empleo del distribuidor AOBS en las capturas mixtas de fluorescencia / reflexión



- ▶ Si desea capturar también luz de reflexión, en general, basta con modificar la proporción de luz de reflexión mediante el botón deslizante.
- ▶ Si esto no es suficiente, haga clic en la tecla de pantalla Maximum detection of reflected light. El botón deslizante correspondiente se desplaza de forma automática hasta el 50% y la dinámica mejorada (casilla de verificación Enhanced Dynamics) se desactiva.
- ▶ En capturas de luz de reflexión puras puede incrementarse hasta un máximo la proporción de luz de reflexión para todas las líneas de láser desactivando la casilla de verificación Ultra-High Dynamics.



## Selección del objetivo



### Función

Mediante la tecla Objective se abre una lista de objetivos en la que puede seleccionarse el objetivo apropiado para la captura de imagen. En esta lista sólo aparecen los objetivos previamente asignados a una de las siete tomas roscadas del revólver portaobjetivos. Esta asignación puede realizarse de la forma siguiente:

▶	Seleccione la opción Objective en el menú Tools. Se abre un cuadro de diálogo con una amplia lista de objetivos y las tomas roscadas (ranuras) del revólver representadas de forma simbólica.
▶	Busque en esta lista el objetivo utilizado y haga clic en él. Mantenga pulsado el botón izquierdo del ratón y arrastre el objetivo hasta el símbolo de la ranura en la que desea enroscar el objetivo.
▶	La asignación se guarda en el software y el objetivo aparece en la lista de selección que se abre al pulsar la tecla Objective.
▶	Repita este procedimiento con todos los objetivos que ha colocado en el revólver.

Mediante las teclas de pantalla Add, Remove y Edit puede introducir o borrar nuevos objetivos en este cuadro de diálogo, así como editar los nombres de los objetivos.



*En los microscopios de tipo DM RXA, DM RXE DM IRBE y DM IRBE2 el revólver portaobjetivos se controla desde el software de forma que, al seleccionar un objetivo mediante la tecla o el cuadro de diálogo Objective, éste se coloca de forma automática en la trayectoria de rayos. En el resto de microscopios no sólo debe ajustarse el objetivo en el software, sino que también debe colocarse en la trayectoria de los rayos de forma manual.*

### Información adicional

Al seleccionar el objetivo adecuado para un uso determinado, además de la clase de corrección del objetivo (acromático, apocromático, objetivo de fluorita y objetivo plano) son decisivos, sobre todo, el factor de ampliación y la apertura numérica. La apertura numérica determina el poder resolutivo de un objetivo y se calcula a partir del ángulo de apertura del compás de vara tomado por el objetivo y el coeficiente de refracción del medio entre la lente del objetivo y el preparado:  $NA = n \cdot \sin \alpha$

Los objetivos de gran ampliación tienen, en general, una apertura numérica mayor, pero también lentes de entrada menores, por lo que sólo pueden captar la luz de un campo de barrido relativamente pequeño. Los objetivos con una apertura mayor ofrecen mayor resolución, pero tienen el inconveniente de permitir una reducida distancia de trabajo libre. La tabla siguiente muestra esta relación:

Objetivo	Resolución (xy)	Resolución Aire (z)	Resolución Agua (z)	Resolución Aceite (z)	Tamaño de campo de barrido (xy)
HC PL FLUOTAR 5x 0.15	1301	19410	25879	29559	3000
HC PL FLUOTAR 10x 0.30	651	4768	6407	7335	1500
N PLAN 20x 0.40	488	2630	3566	4093	750
N PLAN 50x 0.75	260	649	948	1108	300
PL APO 100x 1.40	139	319	209	236	150
Valores en nm para longitud de onda de $\lambda$ 488 nm					Valores en $\mu$ m

**Aplicaciones típicas**

Los objetivos secos se utilizan, en general, en la ciencia de los materiales para el análisis de estructuras superficiales. Para la captura de imágenes de estructuras en capas en las que las capas de material tienen diferentes coeficientes de refracción los objetivos más indicados son los de inmersión. En preparados biológicos, la utilización de un objetivo de inmersión en aceite o de inmersión en agua depende del preparado y su medio de inclusión. La mejor resolución se consigue cuando el coeficiente de refracción del medio de inclusión o el preparado y el medio del objetivo se ajustan entre sí.

**Manejo del módulo del trípode del microscopio mediante el software****Esta página contiene los temas siguientes**



- ▼ Funcionamiento de la tecla Microscope Control
- ▼ Ajuste del módulo del trípode del microscopio DM IRE2
- ▼ Ajuste del módulo del trípode del microscopio DM RXA2

**Funcionamiento de la tecla Microscope Control**

Esta función sólo está disponible en los trípodes de microscopio automáticos DM RXA2 y DM IRE2. Permite ajustar varios módulos del trípode de microscopio DM RXA2 ó DM IRE2 desde el Leica Confocal Software con un clic en modo de visualización o en modo de barrido. En el modo de visualización el preparado se observa a través del ocular y en modo de barrido se captura con el procedimiento de barrido con láser. Los módulos que se controlan simultáneamente desde el software son el tubo con las salidas luminosas, el bloque de filtro de fluorescencia, y la óptica de tubo.

**Ajuste del módulo del trípode del microscopio DM IRE2**

▶	Si desea ajustar el trípode del microscopio para la observación del preparado a través de los oculares, haga clic en la tecla Microscope Control y seleccione la opción Visual.
▶	Si desea ajustar el trípode del microscopio para la captura de una imagen en el procedimiento de barrido con láser, haga clic en la tecla Microscope Control y seleccione la opción Scan.

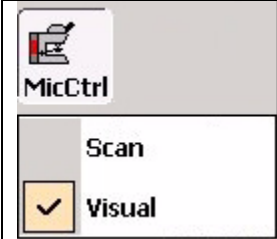
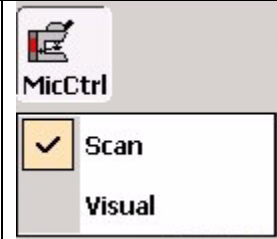
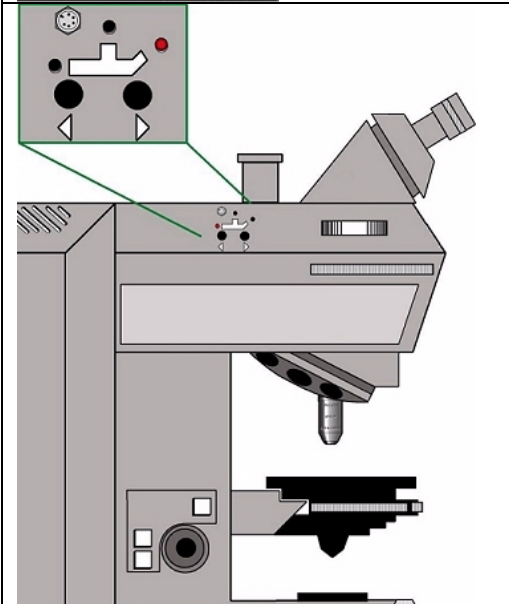
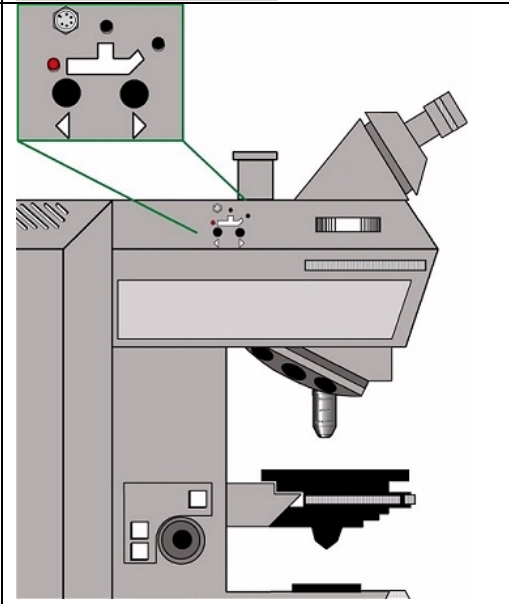
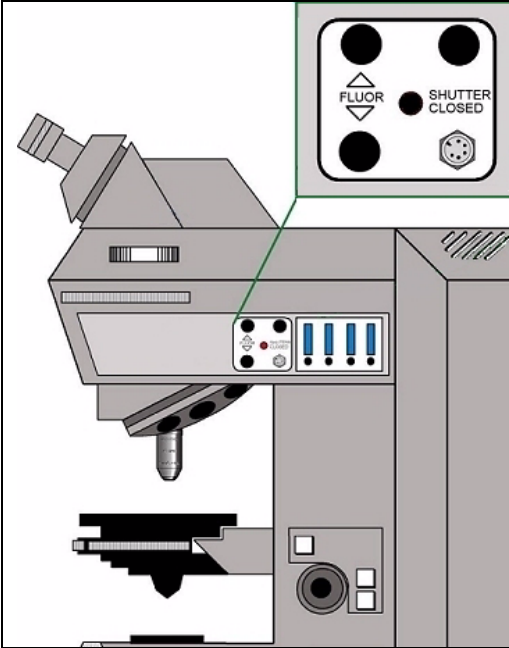
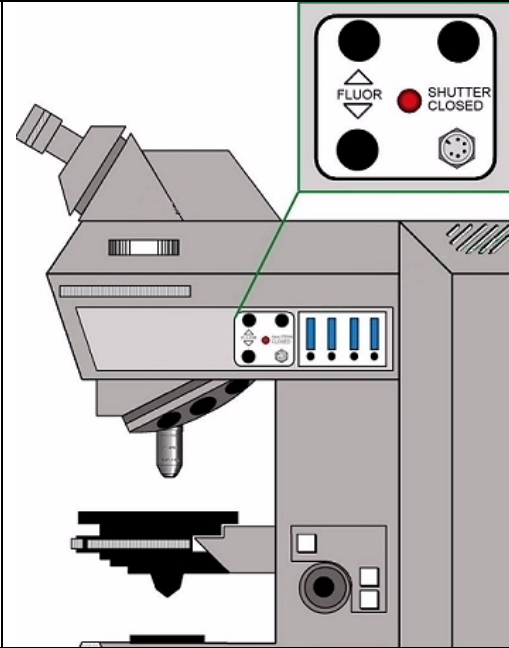
 Panel de control frontal del trípode de microscopio DM IRE2	 Panel de control frontal del trípode de microscopio DM IRE2
<ul style="list-style-type: none"><li>▶ La luz se dirige hacia la salida frontal (hacia los oculares). El diodo VIS se ilumina.</li><li>▶ Se abre la tapa oscura (obturador): el diodo Shutter Closed está apagado.</li><li>▶ Se selecciona el último filtro cúbico del módulo de fluorescencia guardado. La configuración del módulo de fluorescencia se almacena al pasar de modo de visualización a modo de barrido.</li><li>▶ Se selecciona la óptica de tubo 1x. El diodo MAG 1x se ilumina.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▶ La luz se dirige hacia la salida luminosa lateral. El diodo SIDE se ilumina.</li><li>▶ Se cierra la tapa oscura (obturador). El diodo Shutter Closed está encendido.</li><li>▶ El módulo de fluorescencia se ajusta en la posición 4 (Scan). En la pantalla aparece: — —.</li><li>▶ Se selecciona la óptica de tubo 1x. El diodo MAG 1x se ilumina. En los sistemas de microscopios ultravioletas se selecciona la óptica UV. El diodo MAG UV se ilumina.</li></ul>



Al activarse el trípode de microscopio no se encuentra ni en modo de visualización ni en modo de barrido. El haz de luz se dirige hacia la salida frontal y, al mismo tiempo, se cierra la tapa oscura por motivos de seguridad. Para salir de este "estado indefinido", seleccione, por ejemplo, el modo de visualización con la opción Visual.

**Ajuste del módulo del trípode del microscopio DM RXA2**

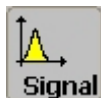
▶	Si desea ajustar el trípode del microscopio para la observación del preparado a través de los oculares, haga clic en la tecla Microscope Control y seleccione la opción Visual.
▶	Si desea ajustar el trípode del microscopio para la captura de una imagen en el procedimiento de barrido con láser, haga clic en la tecla Microscope Control y seleccione la opción Scan.

	
	
<p>▶ La luz se dirige hacia la salida frontal (hacia los oculares). El diodo VIS se ilumina.</p>	<p>▶ La luz se dirige hacia la salida luminosa trasera. El diodo REAR se ilumina.</p>
	
<p>▶ Se abre la tapa oscura (obturador): el diodo Shutter Closed está apagado.</p>	<p>▶ Se cierra la tapa oscura (obturador). El diodo Shutter Closed está encendido.</p>
<p>▶ Se selecciona el último filtro cúbico del módulo de fluorescencia seleccionado. La configuración del módulo de fluorescencia se almacena al pasar de modo de visualización a modo de barrido.</p>	<p>▶ El módulo de fluorescencia se ajusta en la posición 8 (Scan). En la pantalla aparece: — —.</p>
<p>▶ Se selecciona la óptica de tubo 1x. El diodo MAG 1x se ilumina.</p>	<p>▶ Se selecciona la óptica de tubo 1x. El diodo MAG 1x se ilumina. En los sistemas de microscopios ultravioletas se selecciona la óptica UV. El diodo MAG UV se ilumina.</p>



*Al activarse el trípode de microscopio no se encuentra ni en modo de visualización ni en modo de barrido. El haz de luz se dirige hacia la salida frontal y, al mismo tiempo, se cierra la tapa oscura por motivos de seguridad. Para salir de este "estado indefinido", seleccione, por ejemplo, el modo de visualización con la opción Visual.*

## Ajuste de los detectores



### Función

Mediante la tecla Signal se abre el cuadro de diálogo en el que pueden ajustarse los detectores de forma que toda la gama de valores de las intensidades detectadas se asignan a una tabla de asignación de colores y se representan en la imagen. Con este fin puede ajustarse un valor Gain y un valor Offset para cada detector. El valor Gain permite modificar el refuerzo de la señal detectada y, de esta forma, también la luminosidad y el contraste de la imagen. El valor Offset permite determinar el valor umbral. Sólo se detectan y muestran en la imagen las señales que están por encima de este valor umbral.

Existen dos posibilidades para ajustar los valores Gain y Offset:

▶	Con el puntero del ratón, desplace la corredera sobre la escala. El valor correspondiente aparece debajo de cada escala.
▶	Haga doble clic en la cifra que aparece debajo de la escala. Se abre otro cuadro de diálogo en el que puede introducirse el valor exacto.

Para optimizar los valores Gain y Offset, las tablas de asignación de colores más apropiados son *Glow Over*, *Glow Under* y *Glow Over and Under*.

& vea Selección de tablas de asignación de colores (página 194)

También puede ajustar los valores Gain y Offset de los detectores mediante los botones giratorios correspondientes de la consola de mando.

& vea Control de funciones a través de la consola de mando (página 254)



*Un detector sólo está activo cuando se marca su casilla de verificación Active en el cuadro de diálogo Signal o Beam Path Setting.*

## Zoom electrónico



### Función

En la microscopía confocal la ampliación de una imagen se determina por una parte mediante el objetivo y por la otra mediante el zoom electrónico. El objetivo genera una imagen intermedia cuya ampliación depende del factor de ampliación del objetivo. El zoom electrónico permite una ampliación adicional. Con el factor de zoom 1 se explora el tamaño de barrido máximo con un determinado número de puntos. Si se ajusta el factor 2, con el mismo número de puntos en el campo de barrido se explora la mitad de la longitud lateral del campo máximo de barrido (1/4 del campo de barrido original). También se obtiene una gran ampliación y, de esta forma, también una mejor resolución de la imagen, ya que se explora un campo de menor tamaño con la misma frecuencia, lo que proporciona una mayor densidad de información.

En el cuadro de diálogo que se abre con la tecla Zoom puede seleccionarse uno de los factores de zoom predeterminados. Si hace clic en la tecla de pantalla Others puede ajustar otros factores de zoom de dos formas diferentes:

▶	Con el puntero del ratón, desplace la corredera de la escala. El valor correspondiente aparece en el centro del cuadro de diálogo.
▶	Haga doble clic en la cifra en negrita que aparece en el centro del cuadro de diálogo. Se abre otro cuadro de diálogo en el que puede introducirse el valor exacto.

También puede ajustar el factor de zoom mediante el botón giratorio de la consola de mando.

& vea Control de funciones a través de la consola de mando (página 254)

### Información adicional

Es posible ajustar factores de zoom entre 1 y 32. No obstante, el zoom electrónico no permite una ampliación ilimitada. El límite se alcanza con la distancia óptica más pequeña aún resoluble determinada mediante el poder resolutivo del objetivo. Esta distancia óptica aún resoluble se visualiza, de acuerdo con el teorema de Nyquist, sin pérdida de información cuando se explora con 2 ó 3 puntos de trama. Si se sobrepasa la frecuencia de exploración debido a un factor de zoom relativamente alto y un formato de barrido determinado, no tiene sentido una ampliación mayor ya que no pueden apreciarse más detalles ópticos (ampliación vacía).

& vea Selección del formato de barrido (página 149)

& vea Selección del objetivo (página 141)



*En los preparados sensibles al blanqueo es aconsejable no trabajar mucho con el zoom electrónico. Dado que con los factores de zoom alto se captura un encuadre del preparado con una frecuencia de exploración relativamente alta, el preparado se somete a un fuerte acción de la luz. Esto puede provocar la destrucción fotoquímica del preparado (blanqueo óptico).*

### Factores óptimos para el zoom

La tabla siguiente muestra los factores de zoom (marcados en rojo) con los que el preparado se explora sin pérdida de información, en función de un tamaño de barrido determinado por el objetivo y

con un formato de barrido seleccionado:

Objetivo			Formato de barrido	Factor de zoom	Tamaño de campo de barrido (µm)	Frecuencia de exploración (nm)	Resolución/ Frecuencia de exploración
Ampliación	Apertura numérica	Resolución con $\lambda$ 488 nm					
20	0,6	325	1024 x 1024	1 2 4 <b>6</b>	750 375 187 125	732 366 183 122	0,4 0,8 1,8 <b>2,7</b>
			512 x 512	1 2 4 8 <b>10</b>	750 375 187 94 75	1465 732 365 183 146	0,2 0,4 0,9 1,8 <b>2,2</b>
			200 x 200	1 2 4 8 16 <b>32</b>	750 375 187 94 47 23	3750 1875 935 470 235 115	0,1 0,2 0,3 0,7 1,4 <b>2,8</b>
40	1,25	156	1024 x 1024	1 2 4 <b>6</b>	375 187 94 62	366 183 92 60	0,4 0,8 1,7 <b>2,6</b>
			512 x 512	1 2 4 8 <b>10</b>	375 187 94 47 37	732 365 183 92 72	0,2 0,4 0,8 1,7 <b>2,2</b>
			200 x 200	1 2 4 8 16 <b>32</b>	375 187 94 47 23 12	1875 935 470 235 115 60	0,1 0,2 0,3 0,7 1,3 <b>2,6</b>
100	1,4	139	1024 x 1024	1 2 <b>3</b>	150 75 50	146 73 49	0,9 1,9 <b>2,8</b>
			512 x 512	1 2 4 <b>6</b>	150 75 37 25	293 146 72 49	0,5 0,9 1,9 <b>2,8</b>
			200 x 200	1 2 4 8 <b>12</b>	150 75 37 18 12	750 375 185 90 60	0,2 0,4 0,7 1,5 <b>2,3</b>



Los tamaños de campo de barrido indicados sólo son válidos para los trípodes de microscopio DM Rxx y DM IRxx. Para la serie de microscopios DM LFxx estos tamaños se multiplican por el factor 0,8. El Leica Confocal Software dispone de tres funciones de zoom diferentes: el zoom electrónico, el zoom tridimensional y el zoom gráfico.

- & vea Zoom de vista tridimensional (página 211)
- & vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Display (página 184)

## Exposición ampliada de un detalle de la imagen



### Función

La función Zoom In permite la captura ampliada de cualquier encuadre cuadrado de un preparado.

▶	Haga clic en la tecla Zoom In. Al mismo tiempo se activa automáticamente la tecla Rectangle.
&	vea Definición de zona de interés (ROI) con forma de rectángulo (página 244)
▶	Para determinar el encuadre que desea ampliar, trace una zona de interés (Region of interest o ROI) rectangular en la imagen con la tecla Rectangle.
&	vea Marcado y desplazamiento de una zona de interés (ROI) (página 245)
▶	La tecla Select permite desplazar el encuadre sobre la imagen.
▶	Inicie la toma de imagen con la tecla Continuous Scan, Series Scan o Single Scan.



*El software adapta automáticamente el encuadre rectangular seleccionado a la forma cuadrangular que el scanner puede explorar. La línea discontinua muestra el detalle real de la imagen.*

### Información adicional

La ampliación de un detalle de una imagen proporciona información adicional sólo si la distancia de los puntos de la trama es mayor que la mitad del poder resolutivo óptico. A su vez, el poder resolutivo depende del objetivo utilizado, del formato de barrido ajustado y de la longitud de onda luminosa utilizada (ampliación vacía).

### Aplicaciones típicas

Todas las aplicaciones relacionadas con la resolución óptica de estructuras muy pequeñas y que pueden prescindir de una visión de conjunto. Para la captura de este tipo de preparados debe utilizarse también un objetivo con el poder resolutivo óptico suficiente para la captura de la imagen.

## Ajuste del diafragma de detección



### Función

Al hacer clic en la tecla Pinhole se abre un cuadro de diálogo en el que puede ajustar el diámetro de la abertura y el diafragma de detección (pinhole de detección). En el cuadro de lista situado en la parte superior derecha del cuadro de diálogo seleccione la unidad en la que debe mostrarse el diámetro. Puede elegir entre  $\mu\text{m}$ , unidades Airy o valores digitales. El valor para el diámetro del diafragma puede introducirse de dos maneras diferentes:

▶	Con el puntero del ratón, desplace la corredera de la escala situada en la parte izquierda del cuadro de diálogo. El valor correspondiente aparece en el centro del cuadro de diálogo.
▶	Haga doble clic en la cifra en negrita que aparece en el centro del cuadro de diálogo. Se abre otro cuadro de diálogo en el que puede introducirse el valor exacto.



El orificio de la abertura del diafragma de detección debe ajustarse siempre al objetivo utilizado en cada momento. Si hace clic en la tecla de pantalla Airy 1 el diafragma de detección se ajusta automáticamente en función del objetivo utilizado en el valor óptimo de 1 unidad Airy.

Junto con la apertura numérica del objetivo y la longitud de onda de la luz, el diafragma de detección determina el grosor del corte óptico.

### Información adicional

El diámetro del diafragma está ajustado de forma óptima cuando coincide con el diámetro de la arandela Airy. Se denomina arandela Airy el círculo interior claro de la imagen de difracción de una fuente luminosa con forma de punto. El diámetro de esta arandela, a su vez, depende de varios parámetros y, para los sistemas confocales de Leica, se describe de la forma siguiente:

$$d_{\text{Airy}} = \frac{1,22 \cdot \lambda}{NA} \cdot M \cdot 3,5$$

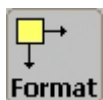
Para calcular el diámetro de la arandela Airy se necesita la longitud de onda de excitación  $\lambda$  (si existen varias longitudes de onda, debe utilizarse el valor promedio), la apertura numérica NA y el factor de ampliación M del objetivo. El factor 3,6 se utiliza para la ampliación de componentes ópticos adicionales del microscopio confocal de Leica.

Si el diafragma se ajusta sobre la arandela Airy se elimina la luz del exterior del plano focal y la relación señal / ruido es alta. Bajo estas condiciones pueden capturarse cortes ópticos de grosor mínimo. Cuanto mayor es la abertura del diafragma, más cantidad de luz alcanza al detector. La imagen es más clara. Pero también se muestran fragmentos de estructuras que están fuera del plano focal lo que desenfoca la imagen de forma paulatina.

Una ampliación del diámetro del diafragma por encima de una unidad Airy sólo es aconsejable cuando desean detectarse señales muy débiles.

En la exposición de preparados de las ciencias de los materiales se refleja, en general, suficiente luz como para cerrar por completo la abertura de detección (es decir, puede ajustarse en el diámetro mínimo).

## Selección del formato de barrido



### Función

Al hacer clic en la tecla Format se abre un cuadro de diálogo con una selección de los diferentes formatos de barrido. Con el formato de barrido se selecciona también la trama utilizada para la captura de la imagen. Se entiende por trama el número de puntos en que se explora el preparado en las tres direcciones espaciales. Junto con la apertura numérica del objetivo y la longitud de onda de excitación, el formato de barrido determina, además del zoom electrónico, la resolución espacial de los datos capturados.

### Información adicional

En la selección del formato de barrido debe tenerse en cuenta la relación entre la trama y la resolución de la imagen generada. De acuerdo con el teorema de Nyquist (o teorema de muestreo), sólo es posible reproducir la trama de una estructura sin pérdida de información cuando la distancia óptica más pequeña aún resoluble se explora con entre 2 y 3 puntos de la trama. Esta distancia aún resoluble denominada **resolución lateral** depende de la apertura numérica del objetivo y de la longitud de onda de la luz de excitación utilizada:

$$\text{Laterale Auflösung} = \frac{0,4 \cdot \lambda}{NA}$$

El ejemplo siguiente muestra esta relación: Se ha seleccionado, por ejemplo, el objetivo PL APO

100x con una apertura numérica NA = 1,4 y una longitud de onda de  $\lambda = 488$  nm. A partir de esto se calcula la distancia óptica más pequeña aún resoluble:

$$\frac{0,4 \cdot 488}{1,4} = \text{ca. } 140 \text{ nm}$$

De acuerdo con la regla empírica citada, la distancia de los puntos de la trama necesaria para la exposición sin pérdida de información es de:

$$\frac{140 \text{ nm}}{3} = \text{ca. } 47 \text{ nm}$$

Si ha seleccionado el formato de barrido 1024x1024, con un objetivo PL APO 100x, cuyo máximo tamaño de campo de barrido es de 150  $\mu\text{m}$ , el resultado es la siguiente distancia de los puntos de la trama:

$$\frac{150 \mu\text{m}}{1024} = \text{ca. } 146 \text{ nm}$$

Para alcanzar la distancia necesaria de 47 nm existen dos posibilidades: puede incrementarse el formato de barrido (p. ej. a 2048x2048) o reducir el tamaño del campo de barrido con ayuda del zoom electrónico (Zoom=2).

La distancia de la trama actual se muestra en la leyenda Hardware. Este valor se designa tamaño Voxel y vuelve a calcularse tan pronto se cambia el zoom electrónico o el objetivo.

& vea Zoom electrónico (página 146)

& vea Selección del objetivo (página 141)



*Se habla de supermuestreo cuando se sobrepasa la frecuencia de exploración de entre 2 y 3 puntos. En este caso se representa la estructura completa, pero no se adquiere información adicional. El inconveniente del supermuestreo es el prolongado tiempo de exploración y, en los preparados sensibles al blanqueo, el riesgo de destrucción del objeto de estudio. Se habla de submuestreo cuando no se alcanza la frecuencia de exploración de entre 2 y 3 puntos. En este caso, existe el riesgo de no explorar toda la información necesaria. Puede ocurrir que la imagen muestre estructuras que no existen en el preparado. Este efecto se denomina solapamiento espectral.*

## Selección del modo de barrido



### Función

Si hace clic en la tecla Mode se abre un cuadro de diálogo con una lista de los modos de barrido disponibles. El modo de barrido determina los planos ópticos en los que se explora el preparado. En principio, es posible realizar capturas de cortes horizontales xy o verticales xz. Para generar una imagen tridimensional del preparado se disponen los cortes ópticos en la tercera dimensión espacial de forma que se captura un lote de imágenes individuales. Existe la posibilidad adicional de realizar la captura de la imagen en función del tiempo o de la longitud de onda:

Modo	Función
xyz	Se forma un lote de imágenes a partir de los cortes xy colocados en la dirección z.
xzy	Se forma un lote de imágenes a partir de los cortes xz colocados en la dirección y.
xt	Una línea se captura varias veces seguidas.

xyt	Un corte xy se captura varias veces seguidas.
xzt	Un corte xz se captura varias veces seguidas.
xyzt	Se captura un lote de imágenes a partir de los cortes xy colocados en la dirección z varias veces.
xyλ	Un corte xy se captura con diferentes longitudes de onda.
xzλ	Un corte xz se captura con diferentes longitudes de onda.

Todos los modos de barrido (excepto xt) constan de al menos tres dimensiones. El aparato ignora la tercera dimensión y las otras posibles cuando realiza capturas en un solo plano óptico (xy o xz) con la función de barrido continuo o de barrido único.



*Los modos de barrido xzy y xzt sólo se muestran en la lista si se ha seleccionado previamente el punto de selección Galvo con la tecla Z-Scan. De la misma forma, los modos de selección para una serie Lambda xyλ y xzλ aparecen únicamente si en el cuadro de diálogo Beam Path Setting se ha activado **un** solo detector.*

& vea Ajuste de la trayectoria de rayos (página 137)

## Selección de la velocidad de barrido



### Función

Al hacer clic en la tecla Speed se abre un cuadro de diálogo en el que puede ajustar cuatro velocidades de barrido diferentes.

Velocidad	
200	Líneas por segundo
400	Líneas por segundo
800	Líneas por segundo
1000	Líneas por segundo

En combinación con el barrido bidireccional puede incrementarse la velocidad de la captura de datos.

& vea Selección del barrido unidireccional y bidireccional (página 168)

### Información adicional

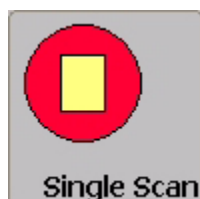
Cuanto mayor es la velocidad de barrido ajustada, más corto es el intervalo programado del punto láser. En este caso, también debe tenerse en cuenta el formato de barrido y el número de puntos de exploración en cada línea. Cuanto mayor es el formato de barrido a la misma velocidad, menor es el intervalo programado del punto láser sobre un punto de exploración.

Cuanto más tiempo permanezca el punto de luz del haz de láser sobre cada punto individual del preparado mayor luz percibe el detector. Una velocidad de barrido menor permite mejorar la relación señal / ruido. El inconveniente de una velocidad de barrido baja radica en que, debido a una acción de la luz relativamente larga, el preparado se somete a un blanqueado fotoquímico y, como resultado, puede quedar inutilizable. Esto es especialmente importante en las aplicaciones de fluorescencia.



Con los niveles de velocidad 800 ó 1000, es posible que, debido a cuestiones técnicas del aparato, no sea posible explorar el campo de barrido máximo. El sistema pasa automáticamente al factor de zoom 2 ó 4 respectivamente.

## Inicio del barrido único



### Función

Mediante la tecla Single Scan se captura una sola imagen de un solo plano óptico del preparado.

Antes de capturar una imagen con la función de barrido único, ajuste todos los parámetros necesarios con la función de barrido continuo de forma que obtenga una calidad de imagen óptima.

& vea Inicio de barrido continuo (página 152)

### Aplicaciones típicas

La función de barrido único está concebida para la captura de preparados sensibles al blanqueo. Con estos preparados utilice esta función, no sólo para la captura de imágenes, sino también en lugar de la función de barrido continuo para ajustar los parámetros de barrido. Cuando utiliza el zoom en el campo de barrido, también es más apropiada la función de barrido único para comprobar el encuadre de la imagen.

## Inicio del barrido continuo



### Función

Mediante la tecla Continuous Scan se capturan imágenes del preparado de forma ininterrumpida y siempre desde un solo plano óptico. En este caso no pueden crearse series de imágenes ya que la última imagen creada sustituye siempre a la anterior.

Pulse de nuevo la tecla para finalizar el barrido continuo.

### Información adicional

El aparato trabaja de forma automática con los últimos parámetros de barrido ajustados. Algunos de esos parámetros pueden modificarse **durante** la captura de la imagen. Otros deben ajustarse **antes** del inicio de la captura:

Antes de la captura de la imagen	Durante la captura de la imagen
Selección del objetivo	Ajuste de la trayectoria de rayos
Selección del formato de barrido	Ajuste del diafragma de detección
Selección del modo de barrido	Ajuste del zoom electrónico

Selección de la velocidad de barrido	Ajuste de los detectores
Selección del barrido unidireccional o bidireccional	Ajuste de la fase

Las teclas de las funciones que no pueden ajustarse durante la captura de la imagen con la función de barrido continuo se desactivan y aparecen con fondo gris.

### Aplicaciones típicas

La función de barrido continuo permite optimizar la calidad de la imagen en la primera captura del preparado. Mientras se explora el preparado de forma continua, puede ajustar los parámetros de barrido citados y comprobar el resultado directamente sobre la imagen.



*En los preparados sensibles al blanqueo es aconsejable no trabajar mucho con el barrido continuo. La acción continua de la luz del láser puede destruir el preparado fotoquímicamente (blanqueado óptico) y hacer que resulte inutilizable.*

## Cuadro de diálogo Series Scan Overview



### Función

En este cuadro de diálogo puede definir los puntos inicial y final de una serie de imágenes y seguir la captura de los cortes individuales. La zona de barrido tridimensional se representa gráficamente sobre un cubo. En esta representación gráfica, un cuadrado amarillo simboliza la posición z o y actual, uno verde simboliza el punto inicial y uno rojo el punto final. Los valores de posición correspondientes se muestran a la derecha junto a la representación gráfica. Defina los puntos inicial y final de la forma siguiente.

▶	Con la flecha del ratón desplace el cuadrado amarillo hasta el plano en el que debe iniciarse la serie de imágenes.
▶	Haga clic en la casilla blanca para el punto inicial (Begin). Se inserta el valor de posición correspondiente y se guarda.
▶	Con la flecha del ratón desplace el cuadrado amarillo hasta el plano en el que debe finalizar la serie de imágenes.
▶	Haga clic en la casilla blanca para el punto final (End). Se inserta el valor de posición correspondiente y se guarda.
▶	Se calcula la altura total del lote de imágenes entre los puntos inicial y final y se muestra (Total).

A continuación, haga clic en la tecla Series Scan. El cuadro de diálogo permanece abierto y permite el seguimiento de la captura de la serie de imágenes.



*Los puntos inicial y final también pueden definirse con la consola de mando y con las teclas individuales Begin y End.*

- & vea Definición del punto inicial de una serie espacial (página 154)
- & vea Definición del punto final de una serie espacial (página 155)

**Información adicional**

En el cuadro de diálogo Series Scan Overview aparecen también los parámetros siguientes que deben ajustarse para la captura de una serie de imágenes:

▶	Modo de barrido (línea superior derecha, junto a la representación gráfica)
▶	Formato de barrido (números rojos en los bordes superiores del cubo)
▶	Número de cortes ópticos (líneas parciales entre los puntos inicial y final)

El número rojo en el borde vertical del cubo se refiere al máximo recorrido de desplazamiento del accionador z, que no puede modificarse.

- & vea Selección del modo de barrido (página 150)
- & vea Selección de formato de barrido (página 149)
- & vea Determinación del número de cortes espaciales (página 156)

**Definición del punto inicial de una serie espacial****Función**

Mediante la tecla Begin se define el punto inicial de una serie de imágenes espacial. En primer lugar, ajuste la posición z o la posición y con exactitud en el cuadro de diálogo Series Scan Overview o mediante la consola de mando con el botón giratorio correspondiente. A continuación, haga clic en la tecla Begin. El valor de posición para el punto inicial se guarda. Del mismo modo se ajusta también el punto final.

- & vea Cuadro de diálogo Series Scan Overview (página 153)
- & vea Control de funciones a través de la consola de mando (página 254)

**Definición del punto inicial de una serie Lambda****Función**

En una serie Lambda se captura, desde un único plano óptico, un lote de imágenes individuales que se detecta, en cada caso, con una longitud de onda determinada. Mediante la tecla Lambda Scan Begin se define la longitud de onda en la que debe iniciar la captura de imágenes.



*La tecla Lambda Scan Begin no se activa hasta que se haya seleccionado mediante la tecla Mode un modo de barrido con la longitud de onda de la dimensión.*

& vea Selección del modo de barrido (página 150)

▶	Abra el cuadro de diálogo Beam Path Setting con la tecla Beam.
▶	Para activar un detector, haga clic en la casilla de verificación correspondiente. Una sombra cúbica conecta el detector activado con la corredera correspondiente de la escala del espectro.
▶	Haga doble clic en la corredera. Se abre el cuadro de diálogo Range Properties en el que puede ajustarse el ancho de banda de detección.
▶	Desplace la corredera de la escala del espectro hasta la posición inicial deseada. El extremo izquierdo de la corredera identifica la longitud de onda en la que debe iniciarse la captura de imágenes.
▶	Haga clic en la tecla Lambda Scan Begin para guardar el valor.

Del mismo modo se determina el punto final de una serie Lambda. También debe determinarse el número de incrementos de longitud de onda.

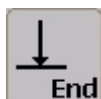
& vea Definición del punto final de una serie Lambda (página 156)

& vea Determinación del número de incrementos de longitud de onda (página 157)

### Aplicaciones típicas

Con una serie Lambda puede determinar el máximo de emisión de una tintura fluorescente. Esto es importante debido a que el desplazamiento de Stokes de la curva de emisión de una tintura fluorescente depende del preparado utilizado. De esta forma puede ajustarse con precisión el campo de detección para una aplicación específica.

## Definición del punto final de una serie espacial



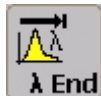
### Función

Mediante la tecla End se define el punto final de una serie de imágenes espacial. En primer lugar, ajuste la posición z o la posición y con exactitud en el cuadro de diálogo Series Scan Overview o mediante la consola de mando con el botón giratorio correspondiente. A continuación, haga clic en la tecla End. El valor de posición para el punto final se guarda. Del mismo modo se ajusta también el punto inicial.

& vea Cuadro de diálogo Series Scan Overview (página 153)

& vea Control de funciones a través de la consola de mando (página 254)

## Definición del punto final de una serie Lambda



### Función

En una serie Lambda se captura, desde un único plano óptico, un lote de imágenes individuales que se detecta, en cada caso, con una longitud de onda determinada. Mediante la tecla Lambda Scan End se define la longitud de onda en la que debe finalizar la captura de imágenes.



*La tecla Lambda Scan End no se activa hasta que se haya seleccionado mediante la tecla Mode un modo de barrido con la longitud de onda de la dimensión.*

& vea Selección del modo de barrido (página 150)

▶	Abra el cuadro de diálogo Beam Path Setting con la tecla Beam.
▶	Para activar un detector, haga clic en la casilla de verificación correspondiente. Una sombra cúbica conecta el detector activado con la corredera correspondiente de la escala del espectro.
▶	Haga doble clic en la corredera. Se abre el cuadro de diálogo Range Properties en el que puede ajustarse el ancho de banda de detección.
▶	Desplace la corredera de la escala del espectro hasta la posición final deseada. El extremo derecho de la corredera identifica la longitud de onda en la que debe finalizar la captura de imágenes.
▶	Haga clic en la tecla Lambda Scan End para guardar el valor.

Del mismo modo se determina el punto inicial de una serie Lambda. También debe determinarse el número de incrementos de longitud de onda.

& vea Definición del punto inicial de una serie Lambda (página 154)

& vea Determinación del número de incrementos de longitud de onda (página 157)

### Aplicaciones típicas

Con una serie Lambda puede determinar el máximo de emisión de una tintura fluorescente. Esto es importante debido a que el desplazamiento de Stokes de la curva de emisión de una tintura fluorescente depende del preparado utilizado. De esta forma puede ajustarse con precisión el campo de detección para una aplicación específica.

## Determinación del número de cortes espaciales



### Función

Al hacer clic en la tecla Sections se abre un cuadro de diálogo en el que puede seleccionar el número de cortes xy horizontales o de cortes xz verticales para la captura de una serie de imágenes. Si desea un número de cortes que no conste en la lista, haga clic en el punto de selección Others. Aparece el cuadro de diálogo Z/Y-Configuration con los datos siguientes:

Parámetro	Descripción
Image Dim. z/y (μm)	Altura del lote de imágenes completo entre los puntos inicial y final de la serie de imágenes
# Sections	Número de cortes configurado



Step Size ( $\mu\text{m}$ )	Incremento del paso, es decir, distancia entre dos cortes
-----------------------------	---

En este cuadro de diálogo puede introducirse un valor para el número de cortes y el incremento del paso. La altura del lote de imágenes no puede modificarse ya que este parámetro está determinado por los puntos inicial y final de la serie. El incremento del paso debe ser múltiplo del incremento mínimo del accionador z, por lo que sólo son posibles ciertas combinaciones de valores cuando se adapta la altura del lote de imágenes o el número de cortes. Según la tecla de pantalla Calculate en la que haga clic, uno de ambos parámetros no se modifica.

Si desea calcular el número de cortes con la prioridad de modificar lo menos posible la altura del lote de imágenes:

▶	Introduzca el incremento de paso deseado en el campo Step Size.
▶	A continuación, haga clic en la tecla de pantalla Calculate junto al campo Step Size.

Si desea calcular el número de cortes con la prioridad de modificar lo menos posible el número de cortes:

▶	Introduzca el incremento de paso deseado en el campo Step Size.
▶	Haga clic en la tecla de pantalla Calculate junto al campo # Sections.

Si desea calcular el incremento de paso con la prioridad de modificar lo menos posible la altura del lote de imágenes:

▶	Introduzca el número de cortes deseado (sólo números enteros) en el campo # Sections.
▶	Haga clic en la tecla de pantalla Calculate junto al campo # Sections.

Si desea calcular el incremento de paso con la prioridad de modificar lo menos posible el número de cortes:

▶	Introduzca el número de cortes deseado (sólo números enteros) en el campo # Sections.
▶	A continuación, haga clic en la tecla de pantalla Calculate junto al campo Step Size.

Al hacer clic en la tecla Reset aparecen los últimos valores guardados.

- & vea Inicio del barrido de series (página 161)
- & vea Cuadro de diálogo Series Scan Overview (página 153)

## Determinación del número de incrementos de longitud de onda



### Función

En una serie Lambda se captura, desde un único plano óptico, un lote de imágenes individuales que se detecta, en cada caso, con una longitud de onda determinada. La captura de una imagen se produce a lo largo de una gama de longitudes de onda limitada por los puntos inicial y final de la serie. Mediante la tecla Lambda Steps se define el número de capturas que pueden realizarse dentro de esta gama.



*La tecla Lambda Steps no se activa hasta que se haya seleccionado mediante la tecla*

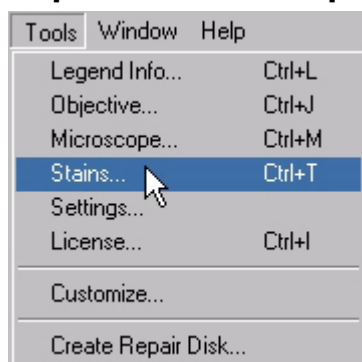
*Mode un modo de barrido con la dimensión de longitud de onda.*

- & vea Selección del modo de barrido (página 149)
- & vea Definición del punto inicial de una serie Lambda (página 154)
- & vea Definición del punto final de una serie Lambda (página 156)

### Aplicaciones típicas

Con una serie Lambda puede determinar el máximo de emisión de una tintura fluorescente. Esto es importante debido a que el desplazamiento de Stokes de la curva de emisión de una tintura fluorescente depende del preparado utilizado. De esta forma puede ajustarse con precisión el campo de detección para una aplicación específica.

## Importación de espectros de tinturas

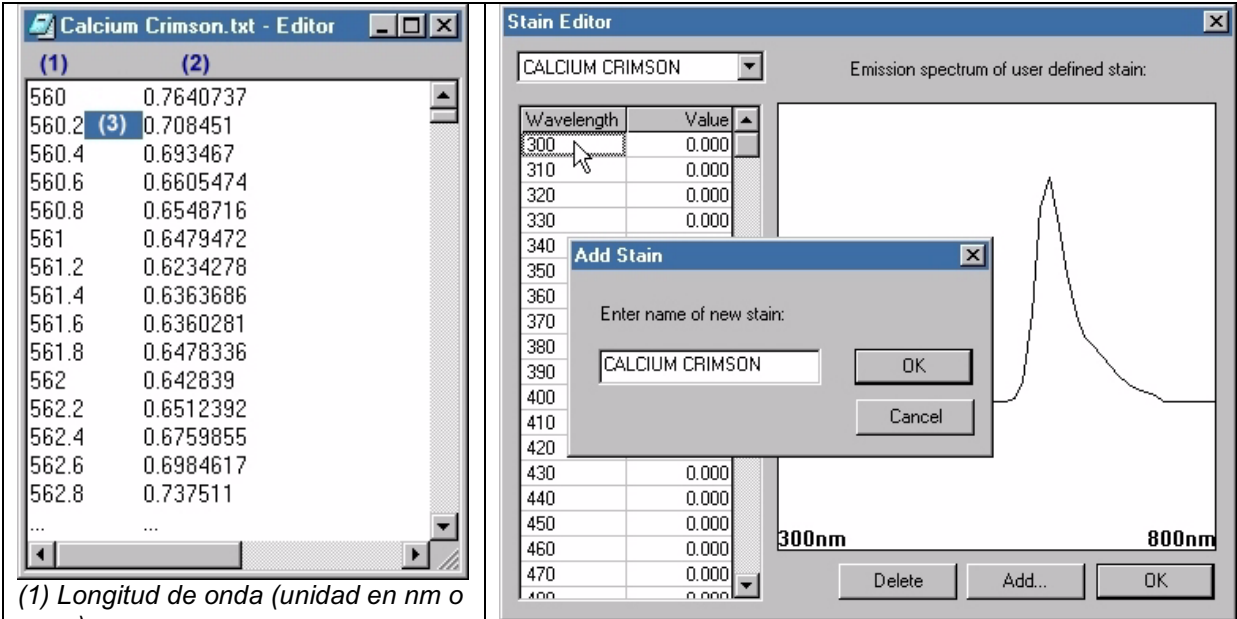


### Esta página contiene los temas siguientes

- ▼ Importación de espectros de tinturas de un archivo de texto
- ▼ Determinación de espectros de tintura con LCS e importación con Excel

Los espectros de emisión de las tinturas fluorescentes más habituales están disponibles en el Leica Confocal Software (LCS). No obstante, el usuario sólo puede leerlos, no editarlos. El editor de tinturas permite importar, guardar y editar los datos de cualquier espectro de tintura fluorescente en un archivo de texto externo, por ejemplo un archivo ASCII o uno Excel.

## Importación de espectros de tinturas de un archivo de texto



(1) Longitud de onda (unidad en nm o en m)

(2) Altura de la señal fluorescente

(3) Puntos de tabulador como separadores

Datos del espectro de emisión de Calcium Crimson

Cuadro de diálogo Stain Editor

▶	Introduzca los datos del espectro de tintura que desea importar en un editor de textos.
▶	Al hacerlo, coloque siempre los valores de la longitud de onda en la <u>columna de la izquierda</u> (1) y los valores de emisión en la <u>columna de la derecha</u> (2) separados mediante <u>tabuladores</u> (3).
▶	Marque ambas columnas y cópielas con las teclas Ctrl y C del teclado en el portapapeles.
▶	Seleccione Tools/ Stains para abrir el cuadro de diálogo Stain Editor en el Leica Confocal Software.
▶	Haga clic en la tecla de pantalla Add, introduzca el nombre de la tintura fluorescente y haga clic en OK.
▶	En el cuadro de diálogo Stain Editor haga clic en la primera celda de la columna, que lleva el título Wavelength.
▶	Pegue los datos copiados en el portapapeles en el editor de tinturas con las teclas Strg y V del teclado.

En el editor, los datos del espectro de emisión se incluyen en una gama de valores entre 0 y 1 y se muestran en incrementos de 10 nm. Las curvas de emisión son necesarias para el ajuste de el ancho de banda de detección en el cuadro de diálogo Beam Path Setting. La siguiente vez que abra el cuadro de diálogo Beam Path Setting puede seleccionar la curva de emisión de la nueva tintura fluorescente y mostrarla en el espectro. Los datos de las curvas de emisión también se utilizan para corregir los datos de diafonía entre los canales de detección.

& vea Ajuste de la trayectoria de rayos (página 137)

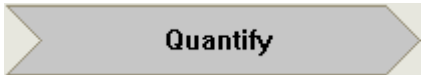


& vea Paso de trabajo Process / Carpeta Dye Finder (página **Error! Bookmark not defined.**)



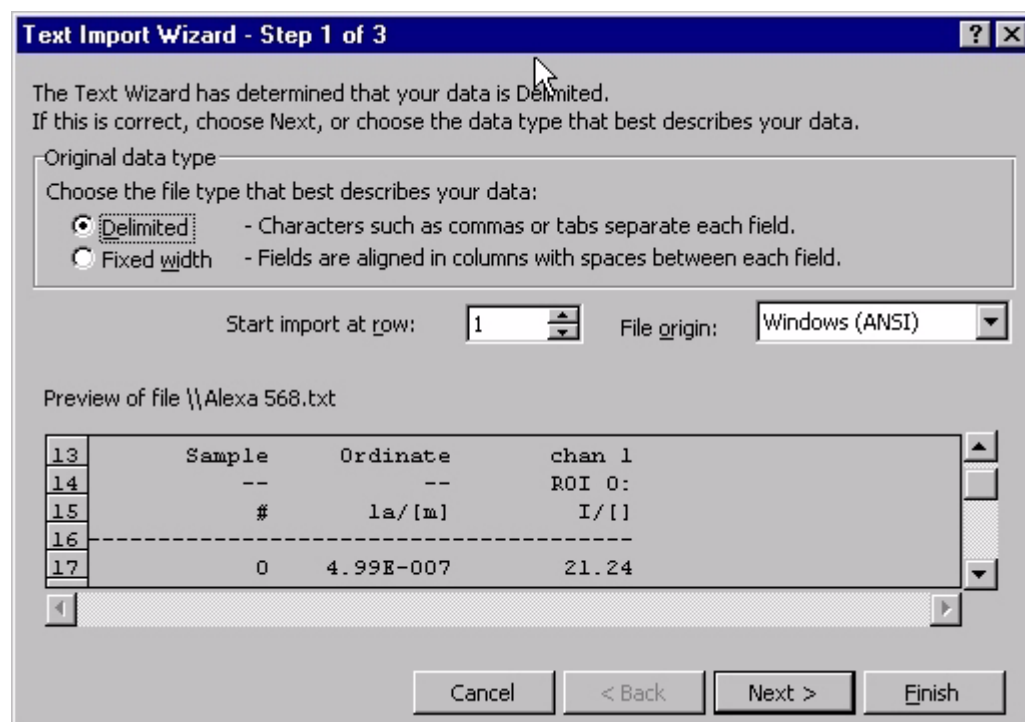
Los datos sólo se importan correctamente al editor de tinturas si se selecciona el punto como carácter decimal. Este ajuste se realiza en Windows/ Panel de control

*Configuración regional.***Determinación de espectros de tintura con LCS e importación con Excel**

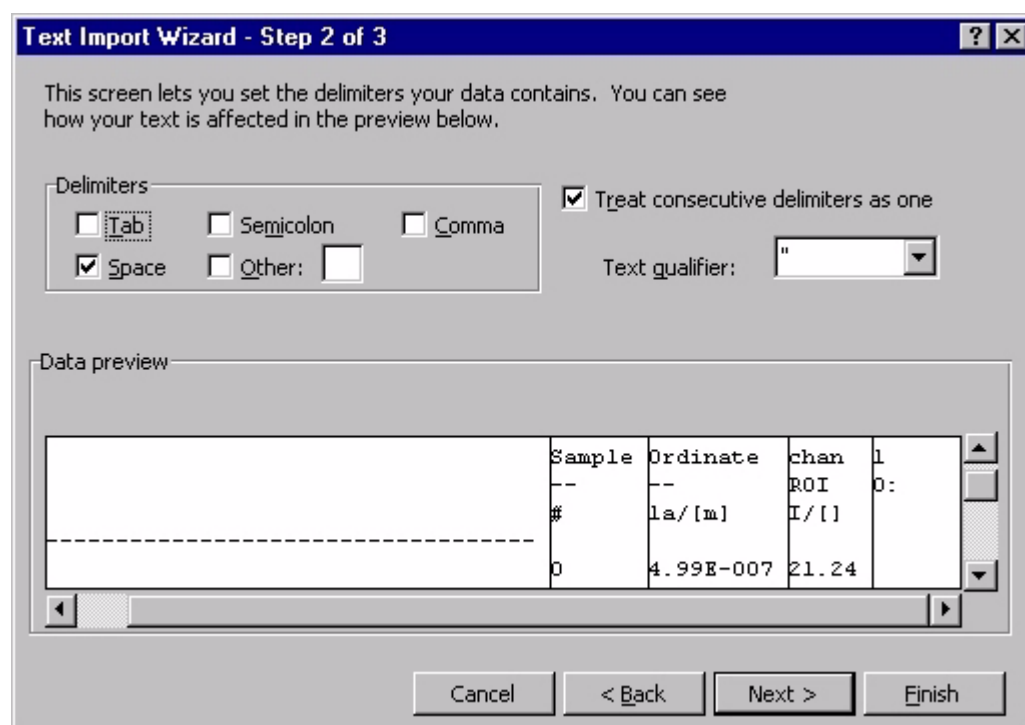
El Leica Confocal Software permite determinar el espectro de emisión de una tintura fluorescente capturando la serie Lambda de un preparado en el que se ha utilizado dicha tintura. En la ayuda en línea (Help/ Tutorials/ Recording lambda series) se ofrece una descripción detallada de la creación de series Lambda. Después de crear un serie Lambda, proceda como se indica a continuación:

▶	Haga clic en el símbolo de flecha Quantify y, a continuación, en la tecla Profile Z. Se abre el cuadro de diálogo Profile through Stack.
	 
▶	Haga clic en una de las teclas ROI, por ejemplo la tecla Rectangle, y trace una zona de interés en la imagen del visor Viewer. En el cuadro de diálogo aparece un diagrama con la representación gráfica de un espectro de fluorescencia.
	
▶	Coloque el puntero del ratón sobre el diagrama y abra el menú contextual con el <u>botón derecho del ratón</u> .
▶	En el menú contextual, seleccione Export para exportar los datos de interpretación como archivo de texto ASCII.

En Microsoft Excel puede introducir los datos del espectro de emisión en el formato de columnas necesario.



▶	En Microsoft Excel, abra el archivo de texto (ASCII o ANSI) con los datos del espectro de emisión. Automáticamente se abre la guía Text Import Wizard.
▶	En el campo Original Data Type haga clic en la opción Delimited y, a continuación, en la tecla de pantalla Next.



- ▶ Seleccione en el campo el carácter de separación utilizado entre los datos. En este caso se utiliza el separador Space.
- ▶ En la visualización previa puede comprobar si los datos están separados correctamente.
- ▶ A continuación haga clic en Finish para abrir los datos en Excel.
- ▶ Marque ambas columnas y cópielas de la forma indicada en el editor de tinturas del Leica Confocal Software.

## Inicio del barrido de series



### Función

La tecla Series Scan permite crear una serie de imágenes. Al hacerlo se crea un bloque de datos de imagen de varias dimensiones del preparado. Las dimensiones disponibles para la captura de una serie de imágenes son, además de las direcciones espaciales (x, y, z), las dimensiones tiempo (t) y longitud de onda ( $\lambda$ ). Esto permite la captura de un lote de imágenes espacial tridimensional a partir de cortes xy o xz en función del tiempo o de la longitud de onda.



*Antes de la captura de una serie de imágenes, ajuste todos los parámetros necesarios mediante la función de barrido continuo (tecla Continuous Scan) de forma que obtenga una calidad de imagen óptima.*

& vea Inicio de barrido continuo (página 152)

Para la captura de una serie de imágenes espacial debe realizar los ajustes siguientes:

▶	Selecione el modo de barrido con la tecla Mode. & vea Selección del modo de barrido (página 150)
▶	Selecione el formato de barrido con la tecla Format. & vea Selección de formato de barrido (página 149)
▶	Ajuste la posición z o la posición y deseada en el cuadro de diálogo Series Scan Overview o con el botón giratorio correspondiente de la consola de mando. & vea Cuadro de diálogo Series Scan Overview (página 153) & vea Control de funciones a través de la consola de mando (página 254)
▶	Guarde el punto inicial de la serie de imágenes con la tecla Begin o a través del cuadro de diálogo Series Scan Overview. & vea Definición del punto inicial de una serie espacial (página 154)
▶	Ajuste la posición z o la posición y deseada en el cuadro de diálogo Series Scan Overview o con el botón giratorio correspondiente de la consola de mando. & vea Cuadro de diálogo Series Scan Overview (página 153) & vea Control de funciones a través de la consola de mando (página 254)
▶	Guarde el punto final de la serie de imágenes con la tecla End o a través del cuadro de diálogo Series Scan Overview. & vea Definición del punto final de una serie espacial (página 155)
▶	Selecione el número de cortes espaciales con la tecla Sections. & vea Determinación del número de cortes espaciales (página 156)

Tras realizar estos ajustes, haga clic en la tecla Series Scan.

En el cuadro de diálogo Series Scan Overview puede realizar el seguimiento de la captura del lote de imágenes.

Para la captura de una serie temporal debe realizar los ajustes siguientes:

▶	Selecione un modo de barrido con dimensión temporal con la tecla Mode. & vea Selección del modo de barrido (página 150)
▶	Selecione el formato de barrido con la tecla Format. & vea Selección de formato de barrido (página 149)
▶	Ajuste la posición z o la posición y deseada en el cuadro de diálogo Series Scan Overview o con el botón giratorio correspondiente de la consola de mando. & vea Cuadro de diálogo Series Scan Overview (página 153) & vea Control de funciones a través de la consola de mando (página 254)
▶	Ajuste el número de capturas, el intervalo de pausa entre capturas y el tiempo de edición total. & vea Ajuste de la serie temporal (página 178)

Para la captura de una serie Lambda debe realizar los ajustes siguientes:

▶	Selecione un modo de barrido con la dimensión de longitud de onda con la tecla Mode. & vea Selección del modo de barrido (página 150)
▶	Selecione el formato de barrido con la tecla Format. & vea Selección de formato de barrido (página 149)
▶	Determine la longitud de onda en la que debe iniciar la serie Lambda. & vea Definición del punto inicial de una serie Lambda (página 154)
▶	Determine la longitud de onda en la que debe finalizar la serie Lambda. & vea Definición del punto final de una serie Lambda (página 156)
▶	Selecione el número de capturas que desea realizar entre los puntos inicial y final de la serie Lambda. & vea Determinación del número de incrementos de longitud de onda (página 157)

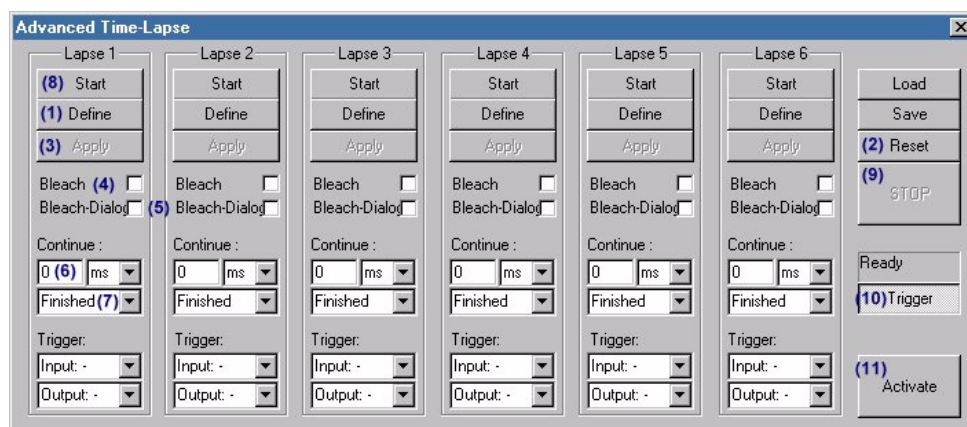
Tras realizar estos ajustes, haga clic en la tecla Series Scan.

## Configuración de secuencias de captura




### Función

Esta función permite combinar en una secuencia de captura hasta seis intervalos de captura con diferentes configuraciones de hardware y su orden. Al hacer clic en la tecla Time Lapse se abre el siguiente cuadro de diálogo:



### Configuración de la secuencia de captura




▶	En el cuadro de diálogo Beam Path Setting y con las teclas del paso de trabajo Acquire (por ejemplo, Pinhole, Series Scan Overview) ajuste todos los parámetros de hardware necesarios para el primer intervalo de captura (Lapse 1). & vea Ajuste de la trayectoria de rayos (página 137)
▶	Haga clic en la tecla de pantalla Define (1) para guardar esta configuración del hardware para el intervalo de captura. Se guardan automáticamente los ajustes de todas las funciones de barrido.  <i>En el cuadro de diálogo Settings puede modificar los parámetros de hardware que se guardan con Define. Para ello seleccione el menú Tools, Option Settings, Register Instrument Parameter Settings. Haga clic en el campo Choose Settings en IPS Time Lapse.</i>
▶	Repita este procedimiento con diferentes configuraciones para cada nuevo intervalo de captura (Lapse 2...8). Con Reset (2) puede deshacer las configuraciones.
▶	Al hacer clic en Apply (3) se adopta la configuración definida para el intervalo de captura como configuración actual para el hardware. <b>No</b> debe pulsarse esta tecla de pantalla: al iniciarse la secuencia de captura, la configuración se adopta de forma automática. Esta función permite comprobar de nuevo cada configuración. & vea Adopción de los parámetros de captura de un experimento (página 171)
▶	Si es necesario blanquear el preparado antes del inicio del intervalo de captura, marque la casilla de verificación Bleach (4). Se utiliza la muestra de blanqueo definida en el cuadro de diálogo. Esta muestra se utiliza para todos los intervalos de captura. Marque la casilla de verificación Bleach Dialog (5) para abrir el cuadro de diálogo Bleach y volver a definir la muestra de blanqueo. & vea Definición de un experimento de blanqueado (página 166)
▶	En el primer cuadro de lista, ajuste un tiempo de pausa en Continue (6) entre la elaboración del intervalo de captura actual y el siguiente.
▶	En el segundo campo de lista, seleccione el intervalo de captura (Lapse 1...8) en Continue (7) que debe realizarse tras la elaboración del intervalo actual. Si selecciona Finished, finaliza la

	secuencia de captura con el intervalo actual.
▶	Haga clic en la tecla de pantalla Start <b>(8)</b> para iniciar la secuencia de captura. Con Stop <b>(9)</b> puede interrumpir la secuencia de captura.



**Activación de capturas de imágenes mediante señales externas (precisa hardware especial)**

▶	Si el intervalo de captura debe iniciarse mediante una señal externa, haga clic en la tecla de pantalla Trigger (10). En el cuadro de diálogo ampliado pueden realizarse los ajustes siguientes para la señal de activación:
---	--

<b>Campo de lista</b>	<b>Función</b>
<b>Input</b>	<p>Aquí se selecciona el canal para la señal de activación entrante. Si selecciona un canal de activación, el intervalo de captura se inicia con la entrada de una señal TTL a través del canal seleccionado:</p> <p>&amp; vea Conector de señales de la electrónica de activación (página 167)</p> <p><b>Input 1:</b> Pin 4 del conector de la electrónica de activación  <b>Input 2:</b> Pin 12 del conector de la electrónica de activación  <b>Input 3:</b> Pin 5 del conector de la electrónica de activación  <b>Input 4:</b> Pin 13 del conector de la electrónica de activación  <b>Input –:</b> Para el inicio del intervalo de captura no se espera la entrada de una señal de activación.</p>  <p><i>Para poder utilizar la entrada de activación debe conectarse masa (0V) al pin 8 del conector.</i></p>
<b>Output</b>	<p>Aquí se selecciona el canal para la señal de activación saliente. Si selecciona un canal de activación, al iniciar un intervalo de captura se envía una señal de activación TTL a través del canal seleccionado:</p> <p>&amp; vea Conector de señales de la electrónica de activación (página 167)</p> <p><b>Output 1</b>  Pin 7 del conector de la electrónica de activación. Se trata de una señal lineal que se utiliza para la duración de la captura real de datos en un "1" lógico.</p>  <p><i>La señal lineal duplica su frecuencia cuando se pasa de captura unidireccional a bidireccional.</i></p> <p><b>Output 2</b>  Pin 15 del conector de la electrónica de activación. Se trata de una señal libre que se utiliza para activar aparatos externos en función de resultados definidos.</p> <p><b>Output –:</b> No se emite ninguna señal de activación.</p>  <p><i>Para poder utilizar la salida de activación debe conectarse una tensión de +5 V al pin 11 y masa (0V) al pin 8 del conector de la electrónica de activación.</i></p>



Todas las entradas están desacopladas mediante un acoplador óptico. La corriente máxima con que puede cargarse este acoplador es de 2 mA. La duración de impulso mínima de la señal de activación entrante es de 100 mseg.



Si el intervalo de captura se inicia mediante la entrada de una señal de activación, se interrumpen otras capturas que estén en marcha en dicho momento. Sólo es posible iniciar un intervalo de captura mediante una señal de activación si se ha pulsado la tecla de pantalla **Activate (11)** o **Start**.

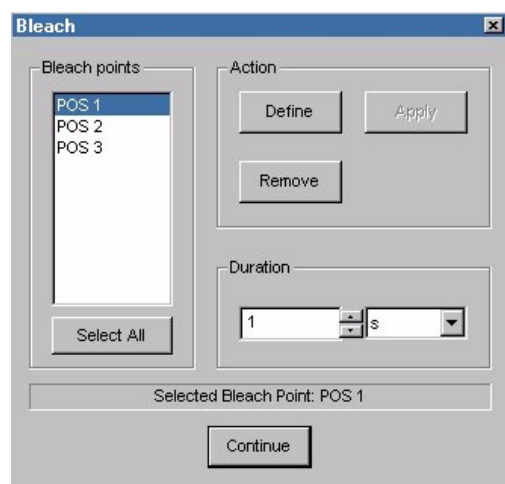
## Definición de un experimento de blanqueado



### Función

Este cuadro de diálogo permite definir y guardar puntos de blanqueo, así como una duración específica para cada punto. Esta función sólo puede utilizarse en combinación con una secuencia de captura.

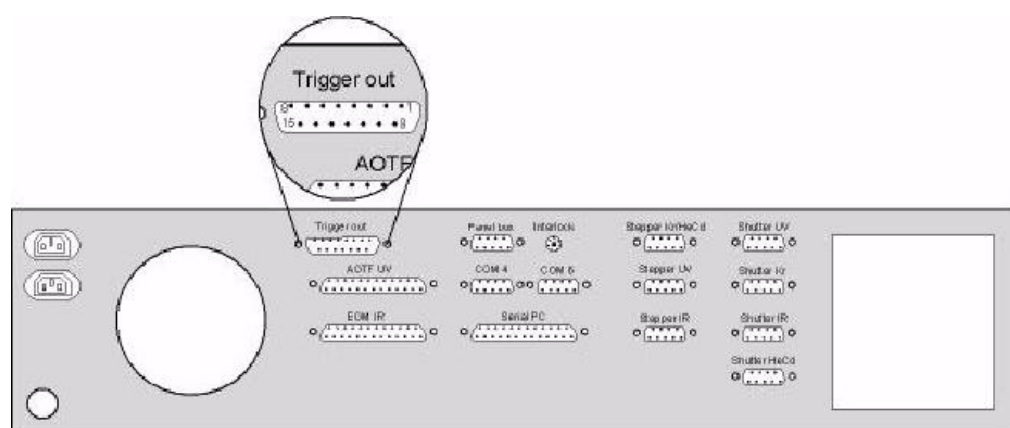
& vea Configuración de secuencia de captura (página 163)



►	Mantenga el puntero del ratón sobre la imagen del visor Viewer cuando se abre el cuadro de diálogo Bleach. El símbolo del puntero cambia a una cruz.
►	Para seleccionar los puntos de blanqueo en la imagen haga clic en las posiciones correspondientes. Los puntos de blanqueo se introducen en el campo de lista Bleach Points con la denominación POS 1..n. Mediante la tecla de pantalla Remove puede eliminar los puntos de blanqueo.

►	Para definir la duración de blanqueado para cada punto, marque la entrada correspondiente en el cuadro de diálogo y seleccione un intervalo de tiempo en el campo Duration. Si desea ajustar una duración única para todos los puntos, haga clic en la tecla de pantalla Select All y defina la duración de blanqueado.
►	Haga clic en la tecla de pantalla Define. De esta forma se guarda automáticamente junto a la duración de blanqueado, la intensidad del láser y la altura z del punto seleccionado. La intensidad del láser puede modificarse en el cuadro de diálogo Beam Path Setting. & vea Ajuste de la trayectoria de rayos (página 137)
►	Si hace clic en Apply se adopta la configuración definida para la muestra de blanqueo como configuración actual del hardware.
►	Haga clic en OK o en Continue (si el cuadro de diálogo se ha abierto desde la pantalla Time Lapse).

**El conector de señales de la electrónica de activación se encuentra en el lado posterior de la fuente de alimentación**



#### Asignación del conector de señales de la electrónica de activación

Señal	Conector de señales
Input 1	Pin 4 del conector de la electrónica de activación.
Input 2	Pin 12 del conector de la electrónica de activación.
Input 3	Pin 5 del conector de la electrónica de activación.
Input 4	Pin 13 del conector de la electrónica de activación.
Output 1	Pin 7 del conector de la electrónica de activación. Se trata de una señal lineal. A diferencia de la señal Output 3 (pin 6), sólo se utiliza para la duración de la captura real de datos en un "1" lógico. Esta señal también está disponible fuera de la aplicación de la función Time Lapse. & vea Configuración de secuencias de captura (página 163)
Output 2	Pin 15 del conector de la electrónica de activación. Se trata de una señal libre que puede utilizarse dentro de la función Time Lapse para activar aparatos externos en función de resultados definidos. & vea Configuración de secuencias de captura (página 163)
Output 3	Pin 6 del conector de la electrónica de activación. Se trata de una señal lineal (line-clock). La señal tiene un costado ascendente al inicio de cada línea. Durante todo el tiempo que el rayo de exploración se encuentra en una línea, la señal permanece en un "1" lógico. Esta señal también está disponible fuera de la aplicación de la función Time Lapse.
Output 4	Pin 14 del conector de la electrónica de activación. Se trata de una señal marco (frame-clock). La señal tiene un costado ascendente al inicio de cada marco. Durante todo el tiempo que se precisa un marco para la captura, la señal permanece en un "1" lógico.

	Esta señal también está disponible fuera de la aplicación de la función Time Lapse.
GND	Pin 8 del conector de la electrónica de activación para el aprovechamiento de señales de activación entrantes y salientes (masa)
+ 5 V CC	Pin 11 del conector de la electrónica de activación para el aprovechamiento de señales de activación salientes



*La señal lineal duplica su frecuencia cuando se pasa de captura unidireccional a bidireccional.*

Para un aprovechamiento más cómodo de las funciones de activación, existe un panel de control que se describe con detalle en el apéndice (vea página ).

## Selección del barrido unidireccional o bidireccional



### Función

Al hacer clic en la tecla Unidirectional/ Bidirectional Scan se activa el barrido bidireccional. Si no se pulsa la tecla, se ajusta de forma automática el barrido unidireccional.

En el barrido unidireccional se explora cada línea de izquierda a derecha. Mientras el rayo láser se dirige hacia el punto inicial de la línea siguiente no se captura ningún dato. En el barrido bidireccional se explora la primera línea de izquierda a derecha y la segunda de derecha a izquierda. También se utiliza el recorrido de vuelta del rayo láser para la captura de datos. Por ello la velocidad del barrido puede incrementarse en el barrido bidireccional.

Si está activado el barrido bidireccional, puede duplicarse la velocidad de barrido con la tecla Speed:

Unidireccional	Bidireccional	
200	No disponible en la actualidad	Líneas por segundo
400	800	Líneas por segundo
800	1600	Líneas por segundo
1000	2000	Líneas por segundo

& vea Selección de velocidad de barrido (página 151)

Para ajustar con precisión píxel a píxel los trayectos de ida y vuelta puede configurarse la fase entre ambos recorridos. Utilice para ello la tecla Phase.

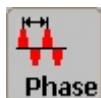
& vea Ajuste de la fase (página 169)



*Con los niveles de velocidad 800 ó 1000, es posible que, debido a cuestiones técnicas del aparato, no sea posible explorar el campo de barrido máximo. El sistema pasa automáticamente al factor de zoom 2 ó 4 respectivamente.*

& vea Zoom electrónico (página 146)

## Ajuste de la fase



### Función

En la captura de imágenes bidireccional puede producirse un desplazamiento de fases entre los trayectos de ida y vuelta. Mediante la tecla Phase abra el cuadro de diálogo en el que puede corregir este desplazamiento:

- ▶ Con el puntero del ratón, desplace la corredera de la escala hasta que desaparezca el desplazamiento de píxeles en la imagen.

También puede ajustar la fase mediante el botón giratorio de la consola de mando.

& vea Control de funciones a través de la consola de mando (página 254)

### Información adicional

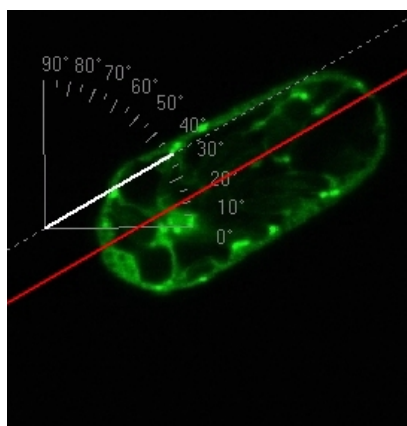
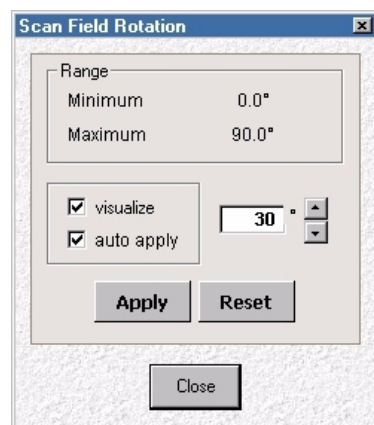
Para cada factor de zoom se ha realizado en fábrica una nivelación de fases y se han ajustado los valores correspondientes. Debido a la relación con la temperatura de los sistemas mecánico y electrónico, durante el servicio pueden producirse ligeras desviaciones de los valores estándar configurados, que se ajustan con esta función.

## Giro del campo de barrido



### Función

La función Scan Field Rotation permite girar el campo de barrido. Al hacerlo no se gira ni el preparado ni la dirección de captación, sino la imagen intermedia microscópica.



- ▶ En el campo de diálogo Scan Field Rotation seleccione un ángulo de giro entre 0 y 90°. La posición de origen (0 grados) se orienta en función de una posición de referencia definida en el cabezal de barrido. Al conectar el aparato se avanza automáticamente hasta dicha posición.

▶	Haga clic en la tecla de pantalla Apply para aplicar el ángulo de giro configurado a la imagen actual. Con Reset vuelve al último valor ajustado. Si se selecciona Auto Apply, se actualiza automáticamente la nueva configuración en la imagen.
▶	Haga clic en la casilla de verificación Visualize para fusionar el ángulo de giro en la imagen. Es posible modificar el ángulo directamente sobre la imagen, colocando la línea blanca con el puntero del ratón en una nueva posición.

**Posicionamiento Y**

Si está ajustado el modo de barrido xzy, xzt o  $xz\lambda$ , al seleccionar la casilla de visualización Visualize, se fusiona también el plano y como una línea roja en la imagen. En el cuadro de diálogo Series Scan Overview es posible modificar la posición y, así como comprobar el posicionamiento con ayuda de la línea roja sobre la imagen.

- & vea Selección del modo de barrido (página 150)
- & vea Cuadro de diálogo Series Scan Overview (página 153)

**Aplicaciones típicas**

Esta función permite orientar hacia el observador las texturas de superficies o estructuras biológicas alargadas.

## Adopción de parámetros de captura de un experimento



### Función

Mediante la tecla Apply puede adoptar la configuración de hardware utilizada para un experimento existente y aplicarla a la captura de un nuevo experimento. Esto permite volver a ajustar los parámetros de barrido configurados para una aplicación en otras capturas de imágenes mediante un sencillo clic:

▶	Active el bloque de datos de imagen cuya configuración desea adoptar.
▶	Haga clic en la tecla Apply.

## Captura de imágenes de una línea en una determinación de la media



### Función

Mediante la tecla Line Average se inicia una determinación de la media. En dicho proceso se explora cada línea varias veces. A partir de los valores de intensidad medidos repetidamente en una línea se calcula la media aritmética y se representa en la imagen resultante. Sólo después de haber determinado la media el número de veces configurado se explora la siguiente línea del preparado. El procedimiento empleado transmite un valor medio continuo. Esto significa que, tras la primera captura de una línea, se calcula la media entre cada nueva captura y la línea anterior y se representa en la imagen resultante (media dinámica).

Al hacer clic en la tecla Line Average se abre un cuadro de diálogo en el que puede ajustar la frecuencia con que debe explorarse una línea. Puede seleccionar entre 1 y 8 repeticiones del proceso de barrido.

Con una función paralela es posible capturar también imágenes completas en una determinación de la media.

& vea Captura de imágenes en una determinación de la media (página 172)

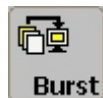
### Aplicaciones típicas

Esta función se utiliza especialmente para la captura de muestras vivas.



*Con los preparados sensibles al blanqueo no se recomienda utilizar la captura de imágenes mediante determinación de la media. La repetición de las capturas y la acción de la luz que conllevan puede provocar la destrucción del preparado.*

## Captura de imágenes en una transmisión a ráfagas



### Función

En la captura de imágenes en las que el ordenador debe procesar grandes cantidades de datos puede producirse un retardo del procedimiento de barrido. La causa es que cada imagen capturada se representa en la pantalla antes de que el scanner explore la siguiente imagen. La función de ráfagas permite acoplar el procedimiento de barrido del láser y la actualización de los datos de la imagen en la pantalla. Con este objetivo se retarda la transmisión de datos de la imagen de la memoria de programa a la pantalla, pero no el procedimiento de barrido. Mediante un clic en la tecla Burst puede seleccionar los modos de servicio con diferentes demoras:

Modo de servicio	Descripción
No Burst	Los datos de imagen se capturan y simultáneamente se representan en la pantalla de forma continua.
Frame Burst	Sólo después de la captura de una imagen individual se representan los datos de la imagen en la pantalla.
Complete Burst	Sólo después de la captura de una serie de imágenes se representan los datos de la imagen en la pantalla.
Automatic	El software ajusta automáticamente el modo de servicio óptimo para una aplicación específica.
Free Ratio Burst	Sólo una imagen de cada x capturadas se representa en la pantalla.

### Ajuste del modo Free Ratio Burst

▶	En el menú Tools seleccione la opción Settings y, a continuación, Register Scan Options.
▶	Introduzca un número en el campo Update Ratio. Si, por ejemplo, introduce el número 3, sólo se representa en la pantalla una imagen de cada tres capturadas.



Los parámetros siguientes pueden incrementar la cantidad de datos que deben procesarse de modo que se produce un retardo en la representación en la pantalla: formato de barrido, velocidad de barrido, barrido bidireccional, número de canales de detección activos, cálculo de una imagen superpuesta y tamaño del visor Viewer.

## Captura de imágenes en una determinación de la media



### Función

Mediante la tecla Average se inicia una determinación de la media para la captura de imagen. En dicho procedimiento se realizan varias exploraciones de cada imagen, es decir, cada corte xy o xz. A partir de los valores de intensidad medidos repetidamente se calcula la media aritmética y se representa en la imagen resultante. El procedimiento empleado transmite un valor medio continuo. Esto significa que, tras la captura de la primera imagen, se calcula la media entre cada nueva imagen capturada y la imagen representada anteriormente y se representa en la imagen resultante (media



dinámica).

Al hacer clic en la tecla Average se abre un cuadro de diálogo en el que puede ajustar la frecuencia con que debe explorarse un corte. Puede seleccionar entre 1 y 64 repeticiones del proceso de barrido.

#### Aplicaciones típicas

La captura de imágenes en una determinación de la media es especialmente eficaz para la eliminación de ruidos. En la microscopía de fluorescencia, con los preparados de escasa fluorescencia, el detector recibe poca luz. El escaso número de fotones produce imágenes difuminadas. En estos casos, es posible mejorar la relación señal / ruido mediante repetidas capturas y determinaciones de la media de la imagen.



*Con los preparados sensibles al blanqueo no se recomienda utilizar la captura de imágenes mediante determinación de la media. La repetición de las capturas y la acción de la luz que conllevan puede provocar la destrucción del preparado.*

## Captura de imágenes en el procedimiento de acumulación



#### Función

Mediante la tecla Accumulation se utiliza un procedimiento de acumulación para la captura de imágenes. En dicho procedimiento se realizan varias exploraciones de cada imagen, es decir, cada corte xy o xz. Los valores de intensidad medidos varias veces se añaden para cada punto de exploración y la suma se representa en la imagen resultante.

Al hacer clic en la tecla Accumulation se abre un cuadro de diálogo en el que se puede ajustar la frecuencia con que debe explorarse un corte. Puede seleccionar entre 1 y 16 repeticiones del proceso de barrido.

#### Aplicaciones típicas

El procedimiento de acumulación permite la mejora de la calidad de la imagen en capturas en las que sólo pueden detectarse señales débiles de fluorescencia.

## Captura de imágenes con una resolución digital de 8 ó 12 bits



#### Función

Esta función permite leer los valores de intensidad analógicos medidos con el detector como señal de 8 ó 12 bits mediante un convertidor analógico-digital.

#### Información adicional

En la digitalización de la señal de intensidad analógica con una resolución digital de 8 bits pueden representarse 256 valores de intensidad diferentes. Teniendo en cuenta las oscilaciones estáticas naturales de las gamas de valores de intensidad naturales de muestras de fluorescencia, en la mayoría de los casos es suficiente una digitalización con 8 bits para la captura de una imagen sin pérdida de información. Para muestras con mayor dinámica de intensidad (p. ej. en muestras con

zonas de escasa intensidad y zonas de fuerte intensidad) se recomienda la captura de imagen con una digitalización de 12 bits. Ésta permite una resolución de hasta 4.096 valores de intensidad diferentes. Al utilizarla, se duplica la cantidad de datos que deben guardarse.

### Aplicaciones típicas

En la captura de imágenes de preparados con alta dinámica de intensidad (la mayoría, muestras de material con alta reflectividad en la superficie cuando al mismo tiempo aparecen zonas muy oscuras).

## Ajuste de la rueda de lente ultravioleta (opcional)



### Función

Esta función reduce el esfuerzo de enfoque necesario para cada objetivo entre luz de activación visible y ultravioleta a un valor por debajo del poder resolutivo óptico. Para lograrlo se coloca automáticamente una lente correctora apropiada en la trayectoria de los rayos para cada objetivo apto para el uso con luz de activación ultravioleta. Para la utilización de esta función de corrección, proceda como se indica a continuación:

▶	Pulse la tecla Objetivo (en general, en el paso de trabajo Acquire). & vea Selección del objetivo (página 141)
▶	Seleccione un objetivo apto para luz ultravioleta en la lista (está marcado).

En este caso, la óptica correctora para el objetivo seleccionado se coloca automáticamente en la trayectoria de los rayos.



*La aparición de un desplazamiento del foco entre la luz visible y la ultravioleta obedece a causas físicas y no está provocado por el aparato.*

### Restricción

A fin de lograr una corrección automática de la aberración cromática entre la luz visible y la ultravioleta producida por causas físicas, no es suficiente con girar el objetivo manualmente hasta la trayectoria de los rayos.

## Selección de la línea de láser para el fondo de la imagen (ROI Scan)



### Función

Esta función se precisa para la captura de zonas de interés (ROI Scan). Con este procedimiento se captura el fondo de la imagen con una longitud de onda de excitación diferente a la de la zona de interés seleccionada (Regions of Interest). Mediante la tecla ROI se guarda la configuración del láser para el fondo de la imagen antes de definir la longitud de onda de excitación separada para cada zona de interés mediante la tecla Configuration.



*Si desea más información sobre este tema, consulte el capítulo „Procedimiento y ejercicios sobre procesos seleccionados*  
*, página 65*

## Selección de líneas de láser para cada zona de interés (ROI Scan)



### Función

Esta función se precisa para la captura de zonas de interés (ROI Scan). Con este procedimiento se captura el fondo de la imagen con una longitud de onda de excitación diferente a la de la zona de interés seleccionada (Regions of Interest). Mediante la tecla Configuration se abre un cuadro de diálogo en el que puede asignar diferentes líneas de láser a cada zona de interés.



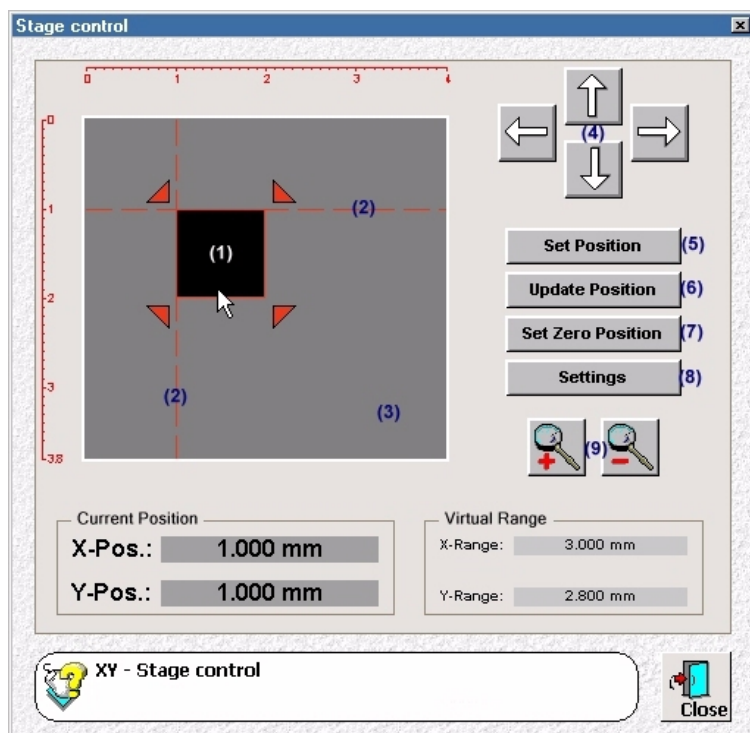
*Si desea más información sobre este tema, consulte el capítulo „Procedimiento y ejercicios sobre procesos seleccionados*  
*, página 65*

## Control de la platina XY



### Función de los elementos del cuadro de diálogo

En el cuadro de diálogo XY-Stage Control se encuentran los elementos siguientes que permiten el control de la platina XY de la marca Märzhäuser:



El tamaño del símbolo del campo de barrido (1) del cuadro de diálogo varía de acuerdo con los parámetros que también determinan el tamaño físico del campo de barrido. Estos parámetros son la ampliación del objetivo, la extensión del rayo, el formato de barrido y el zoom electrónico. El punto de intersección de las líneas guía (2) de la esquina superior izquierda del campo de barrido sirve como punto de referencia para el posicionamiento de la platina. Las coordenadas de dicho punto de referencia se muestran en el campo Current Position.

### Posición de la platina XY

Es posible posicionar la platina XY con la tecla de pantalla Set Position (5), con el puntero del ratón, con las teclas de flecha del cuadro de diálogo (4), con las teclas de flecha del teclado o con la palanca de mando.

#### Posicionamiento mediante la tecla de pantalla

- ▶ Haga clic en la tecla de pantalla Set Position (5). Se abre un cuadro de diálogo en el que puede introducir exactamente las coordenadas x e y del punto de referencia con diferentes lugares para la coma decimal.

#### Posicionamiento mediante el puntero del ratón

- ▶ Haga clic en el campo de barrido del cuadro de diálogo, mantenga pulsado el botón izquierdo del ratón y arrastre el campo hasta la posición deseada. Al soltar el botón izquierdo del ratón se mueve la platina.
- ▶ Para asegurarse de que la platina no se desplazará hasta que haya alcanzado la posición deseada, puede ajustar el tiempo de demora entre el momento en que suelta el botón del ratón y el movimiento de la platina. Haga clic en la tecla de pantalla Settings (8) y ajuste el tiempo de espera en Register Delay.

#### Posicionamiento mediante las teclas de flecha

- ▶ Accione las cuatro teclas de flecha del cuadro de diálogo (4) o las del teclado.



*Al colocar la platina con las teclas de flecha del teclado, el campo de barrido se desplaza con exactitud sobre la longitud lateral del campo, de forma que el preparado, que es mayor que el*

	<i>campo de barrido, puede explorarse de forma continua.</i>
►	Para asegurarse de que la platina no se desplazará hasta que haya alcanzado la posición deseada, puede ajustar el tiempo de demora entre el accionamiento de las teclas y el movimiento de la platina. Haga clic en la tecla de pantalla Settings (8) y ajuste el tiempo de espera en Register Delay.

**Posicionamiento mediante la palanca de mando**

►	Al desplazar la platina con la palanca de mando no se actualizan las coordenadas del campo Current Position. Haga clic en la tecla de pantalla Update Position (6) para insertar la posición actual.
---	--

**Ajuste de la velocidad de posicionamiento**

Es posible ajustar la velocidad con la que se desplaza la platina y el tiempo disponible para ello.

►	Haga clic en la tecla de pantalla Settings (8) y defina la velocidad de posicionamiento mínima y la máxima en Register Speed desplazando el botón deslizante o introduciendo los valores correspondientes en el campo de entrada.
►	En el campo de entrada Positioning Time defina el tiempo de posicionamiento, es decir, el tiempo en el que la platina debe alcanzar su posición. Tenga presente que una velocidad alta requiere un tiempo de posicionamiento corto y una velocidad baja un tiempo largo.

**Ajuste del punto cero**

►	Haga clic en la tecla de pantalla Set Zero Position (7), para definir la posición actual de la platina (punto de corte de las líneas guía del cuadro de diálogo) como punto cero. Este valor también puede modificarse en la leyenda Hardware.
---	--

**Modificación de la unidad de medida de la zona del procedimiento**

Las unidades de medida de los bordes laterales de la zona de desplazamiento de la platina (3) varían de acuerdo con la unidad seleccionada. Puede seleccionar nanómetros (nm), micrómetros (µm), milímetros (mm), centímetros (cm) o metros (m).

►	Haga clic en la tecla de pantalla Settings (8) y seleccione la unidad de medida en Register Unit.
---	---

**Ampliación de la visualización de la zona del procedimiento**

Para colocar la platina con precisión en la gama micrométrica puede ampliarse la visualización del campo de barrido y la zona del procedimiento en el cuadro de diálogo.

►	Haga clic en las teclas de pantalla + y – (9) y amplíe o reduzca la visualización de la zona de desplazamiento.
---	---



*La posición de la platina XY también puede guardarse con un lote de parámetros de captura. De esta forma, también puede utilizarse la platina XY para secuencias de captura.*

& vea Configuración de secuencias de captura (página 163)

## Selección del accionador Z



### Función

Mediante la tecla Z-Scan seleccione el accionador para el movimiento del preparado en la dirección Z.



▶	Seleccione Z-Galvo si desea utilizar la platina de enfoque de precisión accionada por galvanómetro para el posicionamiento Z. Con esta platina Z pueden crearse capturas de imágenes de cortes horizontales XY y de cortes verticales XZ. Puede utilizarse tanto con trípodes de microscopios verticales como inversos.
▶	Seleccione Z-Wide si desea utilizar la platina Z accionada mediante motor eléctrico (con trípodes de microscopios verticales) o el revólver portaobjetivos (con trípodes inversos) para el posicionamiento Z. Esta selección sólo permite capturas de imágenes de cortes horizontales XY (vea la tabla más adelante).

### Modos de barrido disponibles dependientes del accionador Z

Si selecciona la opción Z-Wide no pueden seleccionarse todos los modos de barrido. Al hacer clic en la tecla Scan Mode, las entradas correspondientes ya no se encuentran en la lista.

& vea Selección del modo de barrido (página 150)

Accionador	Modos de barrido									
Z-Galvo	xyz	xzy	xt	xyt	xzt	xyzt	xyλ	xzλ	xyλt	xyλz
Z-Wide	xyz	—	xt	xyt	—	xyzt	xyλ	—	xyλt	xyλz

## Ajuste de la serie temporal



### Función

Mediante la tecla Time se abre el cuadro de diálogo Time Configuration, en el que puede ajustarse la captura de una serie temporal. Los parámetros que pueden ajustarse en este cuadro de diálogo dependen del modo de barrido seleccionado. Puede capturarse muchas veces consecutivas una línea (xt), un corte horizontal (xyt), un corte vertical (xzt) o un lote de cortes horizontales (xyzt), interrumpido por un intervalo de tiempo determinado.



*La tecla Time no se activa hasta que se haya seleccionado mediante la tecla Mode un modo de barrido con la dimensión temporal.*

& vea Selección del modo de barrido (página 150)

Para una serie temporal en modo de barrido xt se muestran los parámetros siguientes en el cuadro de diálogo.

$\Delta T$	Tiempo de captura para una línea ( <i>el usuario no puede ajustarlo</i> )
Lines	Número de capturas de la línea
Lines per page	Número de líneas por página de la memoria
Pages	Número de páginas de la memoria ( <i>se calcula de forma automática</i> )
Maximize	Captura del mayor número posible de líneas por cada página de la memoria
Complete Time	Tiempo de captura global, es decir, producto de $\Delta T$ y el número de capturas

Mediante la tecla de pantalla Calculate puede calcular el número de páginas de la memoria necesarias para un número determinado de líneas por página.

Para una serie temporal en modo de barrido xyt o xzt se muestran los parámetros siguientes en el cuadro de diálogo:

$\Delta T$	Tiempo de captura para un corte xy o zx más el intervalo de pausa
Minimize	Se utiliza el intervalo más pequeño posible ( $\Delta T$ ).
Frames	Número de capturas del corte xy o xz
Complete Time	Tiempo de captura global, es decir, producto de $\Delta T$ y el número de capturas

Para una serie temporal en modo de barrido xyzt se muestran los parámetros siguientes en el cuadro de diálogo:

$\Delta T$	Tiempo de captura para un lote de cortes xy más el intervalo de pausa
Minimize	Se utiliza el intervalo más pequeño posible ( $\Delta T$ ).
Stacks	Número de capturas del lote de imágenes
Complete Time	Tiempo de captura global, es decir, producto de $\Delta T$ y el número de capturas

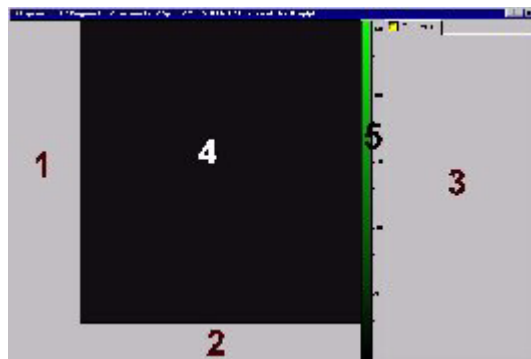
Cada parámetro puede calcularse en función de los otros parámetros. Durante la introducción de valores, tenga presente el especial funcionamiento de este cuadro de diálogo. El campo de entrada en el que hace clic se desactiva:

▶	Haga clic en el parámetro que desea calcular. El campo de entrada correspondiente aparece en gris.
▶	Introduzca los valores para los otros parámetros.
▶	Haga clic en Apply para calcular el parámetro. Mediante un clic en Reset se muestran los últimos valores almacenados.

Tras realizar estos ajustes, haga clic en la tecla Series Scan.

## Funciones de la visualización de datos

### Visor Viewer



En la configuración estándar, el visor Viewer consta de tres campos básicos. En el centro se encuentra el cuadro de imagen (4) en el que se muestran las imágenes capturadas. A la izquierda, debajo de este cuadro, pueden disponerse los teclados (1) y (2) y a la derecha, la leyenda Experiment (3). Pueden seleccionarse otras configuraciones estándar del visor y guardar las configuraciones definidas por el usuario como plantillas.

& vea Almacenamiento del visor Viewer como plantilla (página 255)

#### Teclados (1) y (2)

Como configuración estándar, en el teclado situado a la izquierda del cuadro de imagen, se encuentran las teclas para la visualización y en el situado en la parte inferior, las teclas que permiten hojear a través de las imágenes individuales de una serie. Es posible mover ambos teclados dentro del visor Viewer o desplazarlos a una ventana separada. Para ello, haga clic con el puntero del ratón en el borde doble del teclado y arrástrelo con el botón del ratón pulsado hasta el lugar deseado.

#### Cuadro de imagen (4)

Si coloca el puntero del ratón en cualquier lugar del cuadro de imagen y hace clic con el botón derecho del ratón, se abre un menú contextual en el que aparecen las siguientes opciones:

Opción	Función		
Send to	► Experiment	► Selection (raw)	Los datos brutos de un encuadre marcado en el cuadro de imagen se copian al experimento actual como una imagen nueva. Esta nueva imagen puede editarse.
		► Selection (snapshot)	La captura de pantalla de un encuadre marcado en el cuadro de imagen se carga en el experimento actual como una imagen nueva. Esta nueva imagen no puede editarse.
		► All (snapshot)	La captura de pantalla de todo el cuadro de imagen actual se carga en el experimento actual como una imagen nueva. Esta nueva imagen no puede editarse.
	► Printer	► Selection	Se imprime el encuadre marcado en el cuadro de imagen.
		► All	Se imprime todo el cuadro de imagen actual.
Left buttons	Se muestra u oculta el teclado situado a la izquierda del cuadro.		
Bottom buttons	Se muestra u oculta el teclado situado debajo del cuadro.		
LUT	Se muestran u ocultan las tablas de asignación de colores de la imagen actual.		
Legend	Se muestra u oculta la leyenda Experiment.		
Full	El visor Viewer aumenta hasta el tamaño de la pantalla.		



screen	
Viewer Options	Se abre el cuadro de diálogo Viewer Options.

Las **tablas de asignación de colores (5)** aparecen como barras de colores a la derecha del cuadro de imagen. Si mantiene el puntero del ratón sobre cada barra de colores aparecen los puntos de selección en la parte superior e inferior de la barra. Mediante estos puntos se puede limitar la tabla de asignación de colores a una gama de intensidad determinada y cargar una segunda tabla. Esto permite incrementar gráficamente el contraste de la imagen.

▶	Arrastre el punto de selección superior hacia abajo o el inferior hacia arriba.
▶	Haga doble clic en la zona superior o inferior del punto de selección correspondiente.
▶	Se abre el cuadro de diálogo Select LUT's en el que puede seleccionar una segunda tabla de asignación de colores.
▶	La gama de valores de intensidad superior e inferior se representa en los colores de cada segunda tabla de asignación de colores.

& vea Selección de tablas de asignación de colores (LUT) (página 194)

### Leyenda Experiment (3)

En la leyenda Experiment se registran diferentes parámetros de una captura de imagen. Puede determinar qué parámetros se muestran mediante un clic en el lugar deseado de la leyenda. Se abre una lista con todas las entradas disponibles. Seleccione en ella la entrada deseada. Si mantiene el puntero del ratón sobre el punto deseado de la leyenda Experiment y hace clic con el botón derecho del ratón, aparece un menú contextual con las opciones siguientes:

Opción	Función	
Experiment	▶ Edit	En el cuadro de diálogo Edit Legend puede introducirse un nombre para la leyenda (Title), definirse el número de entradas (Number of legend entries) o borrarse todas las entradas (Clear all entries).
	▶ Activate	La leyenda Experiment aparece en el visor Viewer.
	▶ Remove	Se borra la leyenda Experiment actual.
Add Experiment tab	Se crea una nueva leyenda Experiment en el visor Viewer.	

### Leyenda Hardware

En la leyenda Hardware se registra la configuración del hardware de una captura de imagen. Para abrir esta leyenda, seleccione la opción Hardware Legend en el menú View. Para seleccionar las entradas que se mostrarán en la leyenda, haga clic en la tecla de pantalla Edit. Se abre el cuadro de diálogo Edit Legend Entries.

▶	En el campo de lista Available Entries se incluyen todas las entradas disponibles. Seleccione las entradas que deben aparecer en la leyenda. Haga clic en la tecla de pantalla Add para incluirla en el campo de lista Show entries.
▶	En el campo de lista Show entries se encuentran las entradas que se muestran en la leyenda. Mediante la tecla de pantalla Remove puede eliminar las entradas de la leyenda.
▶	Mediante las teclas de pantalla Move up y Move down puede desplazarse una o varias entradas de la lista hacia arriba o hacia abajo.
▶	Mediante las teclas de pantalla Edit grid color y Edit background color puede modificarse el color del marco y del fondo de la leyenda.

La leyenda Hardware se coloca de forma automática en el borde derecho de la interfaz de usuario. También puede modificar el tamaño y la posición de la leyenda:

▶	Para modificar la anchura de la leyenda arrastre el borde con el puntero del ratón hasta la posición deseada.
▶	Para modificar la posición de la leyenda, haga doble clic en el borde de la leyenda o haga

	clic una vez en el símbolo ▲ . La leyenda se desprende como ventana de la interfaz de usuario. A continuación, arrastre la leyenda con el botón izquierdo del ratón pulsado hasta el lugar deseado.
--	---



*Si se amplía la leyenda por encima de la anchura total de la interfaz de usuario, sólo es posible colocarla de nuevo en el lugar original en el borde si, en primer lugar, reduce su altura y la desplaza a continuación hasta el borde.*

### Opción New Window

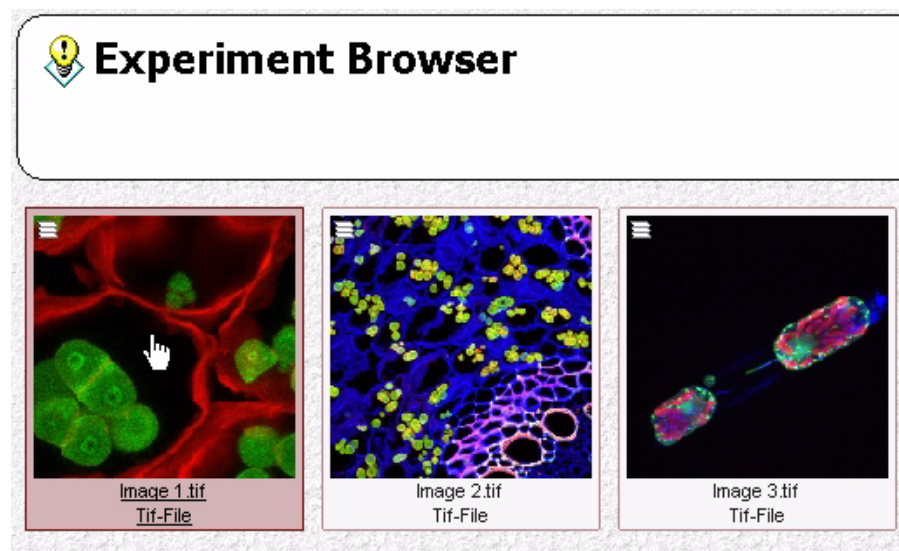
Si hace clic en la opción New Window del menú Window, puede abrir otro visor que muestra la misma imagen que el visor abierto. Mediante esta opción no se crea un nuevo experimento, sino que se abre una segunda vista con los datos de imagen actuales. La ventaja de esta opción es que permite diferentes visualizaciones simultáneas de los mismos datos de imagen. Para diferenciarla, esta copia del visor actual recibe un número progresivo tras la extensión del archivo.

## Visualización de capturas como miniaturas en el navegador del experimento



### Función

El navegador del experimento permite mostrar todas las capturas de un experimento como miniaturas. Esto ofrece una visión general de las imágenes disponibles y un acceso rápido a cada captura.



▶	Seleccione un experimento en el visor Experiment Overview.
▶	Haga clic en la tecla Browse, para abrir el navegador del experimento. Todas las capturas del experimento se muestran como miniaturas. Las series de imágenes se representan como proyección de valor máximo.
▶	Haga clic en una miniatura para abrir el bloque de datos de la imagen completa en el visor Viewer.
▶	Haga clic de nuevo en la tecla Browse para cerrar el navegador del experimento.

## Cuadro de diálogo Viewer Options

### Cuadro de diálogo Viewer Options, icono para función tridimensional

#### Función

Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View.

El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar todos los iconos.

En el registro del símbolo de imagen tridimensional puede ajustarse la configuración de las funciones siguientes:



- & vea Giro de vista tridimensional (página 210)
- & vea Desplazamiento de vista tridimensional (página 211)
- & vea Zoom de vista tridimensional (página 211)

En el **registro Navigation** se muestran los valores numéricos de las acciones realizadas mediante las teclas Rotate, Move y Zoom (y el puntero del ratón).

En el **campo Rotation** puede inclinar los tres ejes de una vista tridimensional en las tres direcciones espaciales mediante la modificación del grado angular. La vista tridimensional gira en torno a un punto fijo que se encuentra en el centro de la imagen. Para comprender la función de giro, es preferible modificar sólo el ángulo de un eje, mientras los otros dos se ajustan a 0:

Rotation	Función
X desde 0° hasta 45°	La vista tridimensional gira 45° en torno al punto en la dirección del eje z negativo.
Y desde 0° hasta 45°	La vista tridimensional gira 45° en torno al punto en la dirección del eje x negativo.
Z desde 0° hasta 45°	La vista tridimensional gira 45° en torno al punto en la dirección del eje y negativo.

En el **campo Translation** puede desplazar una vista tridimensional hacia la derecha o la izquierda, hacia arriba o abajo, así como ampliarlo o reducirlo mediante la modificación de los valores de las coordenadas. Si introduce valores decimales, utilice el punto como separador decimal.

Translation	Función
X	Con valores positivos, la vista tridimensional se desplaza hacia la derecha, y con valores negativos hacia la izquierda.
Y	Con valores positivos, la vista tridimensional se amplía, y con valores negativos se reduce.
Z	Con valores positivos, la vista tridimensional se desplaza hacia arriba, y con valores negativos hacia abajo.

En el **campo Predefined** puede representar la imagen con una vista desde arriba o una vista lateral mediante un clic en las teclas de pantalla Top view y Side view.

En el **registro Display** puede hacer clic en uno de los comandos de la lista para insertar o eliminar el elemento de diseño correspondiente de la vista tridimensional en el visor Viewer:

Graphic Elements	Función
Show LUT	Muestra la tabla de asignación de colores seleccionada (color look-up table) en el eje z.
Show scale	Muestra la escala de medición.
Show bounding box	Muestra el bloque que limita el volumen de medición.
Show axes	Muestra los ejes de coordenadas.
Show data during 3D motion	Muestra los datos de la imagen mientras se gira, desplaza, aumenta o reduce la vista tridimensional.

## Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Display

### Función

Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View.

El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar todos los iconos.

En los registros del icono Display pueden realizarse ajustes opcionales para las funciones siguientes:



& vea Inicio y finalización de películas (página 200)

En el **registro Settings** puede ampliarse o reducirse la imagen representada en el visor Viewer mediante el zoom gráfico:

n-1	La imagen se reduce representando n píxeles como 1 sólo en la imagen resultante.
Automatic	La imagen aparece en el formato original.
1-n	La imagen se amplía representando 1 píxel como n píxeles en la imagen resultante.



*El Leica Confocal Software dispone de tres funciones de zoom diferentes: el zoom gráfico, el zoom tridimensional y el zoom electrónico.*

- & vea Zoom de vista tridimensional (página 211)
- & vea Zoom electrónico (página 146)

En el mismo registro, haga clic en un punto de selección para insertar o eliminar el elemento de diseño correspondiente en el visor Viewer:

Coordinates	Se inserta la posición z de la imagen actual.
Scale	Se muestra una regla con la indicación de la longitud.
Grid	Se coloca una cuadrícula sobre la imagen actual.

La longitud de la regla y la anchura de la cuadrícula se calculan se función del objetivo, del zoom electrónico y del ensanchamiento del haz.

En el **registro Movie** puede determinarse la velocidad con la que debe desarrollarse la secuencia de filmación de una serie de imágenes. Puede seleccionar un valor entre 6 imágenes individuales por minuto y 25 por segundo:

▶	Con el puntero del ratón, desplace la corredera de la escala hasta el valor deseado.
▶	Selecione el modo Ping-Pong Modus si desea que la secuencia de filmación se desarrolle desde la primera imagen hasta la última y, a continuación, en orden contrario hasta la primera imagen. Si no selecciona este modo, la secuencia de filmación comienza de nuevo siempre con la primera imagen.

## Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Charts


### Función

Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View.

El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar todos los iconos.

En el registro del icono Charts pueden realizarse ajustes opcionales para las funciones siguientes:

	& vea Medición de un perfil a lo largo de una distancia (página 239)
	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (página 237)
	& vea Medición de superficies y volúmenes (página 268)

	& vea Mediciones de rugosidad a lo largo de un trayecto (página 256)
---	--

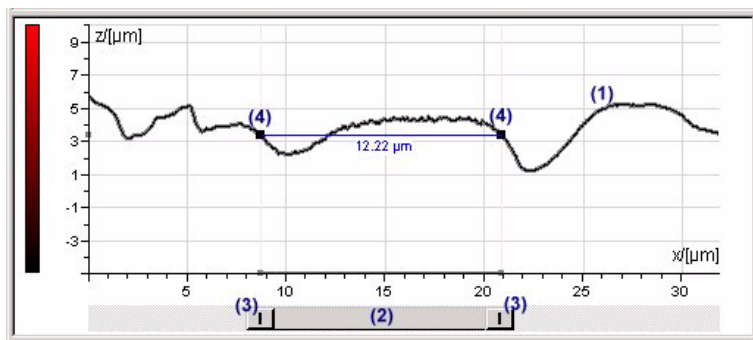
Las opciones del **registro Charts** sólo pueden seleccionarse cuando se ha activado una función de cuantificación con una de estas teclas.

### Activación de la medición de dos puntos

►	En el <b>campo Measurement</b> haga clic en 2 Point, para activar la medición de dos puntos.
---	--

Cada una de las teclas mencionadas abre un visor en el que aparece una curva de medición y valores estáticos.

Si se selecciona la medición de dos puntos, se inserta en el visor, por debajo de la curva de medición (1), una corredera (2) con dos puntos de medición (3). La posición de ambos puntos en la curva del perfil se simboliza mediante pequeños cuadrados negros (4). De esta forma puede ajustarse el campo que se desea evaluar dentro de la curva con mayor precisión. Al mismo tiempo, la estadística que se inserta debajo de la curva de medición se amplía en las siguientes unidades de medición: posición de los puntos de medición, distancia de los puntos, unidades de medición en los puntos, diferencia de los tamaños medidos en los puntos.



### Modificación de la posición y la longitud de la corredera de medición

►	Para cambiar la posición, se coloca el puntero del ratón en el centro de la corredera, se pulsa el botón izquierdo del ratón y se arrastra con este botón pulsado hasta la posición deseada.
►	Para modificar la longitud de la corredera, se coloca el puntero del ratón en uno de los extremos, se pulsa el botón izquierdo y, con el botón pulsado, se amplía o se reduce.

### Modificación del escalado de la curva de medición

En la configuración estándar, el software adapta automáticamente el escalado de las curvas de medición a la gama de intensidad existente en cada captura de imagen. No obstante, esta modificación también puede realizarse de forma manual:

►	Elimine la marca de la casilla de verificación Auto para desactivar el escalado automático.
►	A continuación puede definir por separado para cada curva (cada canal de detección) los valores límite superior e inferior de la gama de valores.
►	Compruebe el resultado de la modificación del escalado directamente en el visor.

### Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Multicolor

& vea el capítulo "Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Multicolor", página 277

## Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Online Measure

### Estructura del visor Experiment Overview

Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View. El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar todos los iconos.

En el registro del icono Online Measure pueden realizarse ajustes opcionales para las funciones siguientes:



La corredera de esta función permite ajustar el número de cortes ópticos para los que se representan gráficamente los valores de una medición en línea. En función de los gráficos de la medición en línea puede reconocerse una tendencia de un experimento.



*Los datos de la tendencia se registran sólo de forma temporal y no pueden almacenarse. Sin embargo, los datos guardados de forma temporal pueden exportarse o copiarse a una página de presentación mediante el menú contextual (botón derecho del ratón).*

- & vea Exportación de datos de cuantificación (página 242)
- & vea Copia de gráficos de cuantificación a la página de presentación (página 241)

### Aplicaciones típicas

Interpretación cuantitativa de bloques de datos.

## Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Projections

### Función

Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View.

El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar todos los iconos.

En los registros del icono Projections pueden realizarse ajustes opcionales para las funciones siguientes:





- & vea Proyección de valor máximo de un lote de imágenes con eje de proyección invariable (página 205)
- & vea Proyección de valor medio de un lote de imágenes con eje de proyección invariable (página 206)
- & vea Proyección transparente de un lote de imágenes con eje de proyección invariable (página 207)
- & vea Creación de una proyección SFP de un lote de imágenes (página 208)

En el **registro Projections** existen diferentes opciones disponibles para la creación de una proyección. Seleccione si se representa la máxima intensidad, la media aritmética o una media ponderada de las intensidades en la proyección. Modifique el factor de ponderación para la proyección transparente. Ajuste un valor umbral o un factor de escalado para las intensidades que deben representarse.

Type	Función
Maximum projection	De cada columna de puntos explorada, se representa en la proyección el punto con máxima intensidad como representante de todos los valores de la columna.
Average projection	De cada columna de puntos explorada, se representa en la proyección la media aritmética de las intensidades medidas en la columna.
Transparent projection	De cada columna de puntos explorada, se representa en la proyección una media ponderada de las intensidades medidas en la columna.

Transparent factor	Función (sólo activo para la proyección transparente)
Desplace la corredera sobre la escala.	Cuanto más alto es el factor de transparencia $\alpha$ ( $0 < \alpha < 1$ ), con mayor fuerza influyen los valores de intensidad de los niveles inferiores del lote de imágenes en la proyección.

Threshold	Función (sólo activo para proyección de valor medio y transparente)
Desplace la corredera sobre la escala.	Las intensidades que están por debajo del valor umbral definido, no se utilizan para el cálculo de la proyección.

Scaling	Función (sólo activo para proyección de valor medio y transparente)
Rescale to maximum	Los valores de intensidad medidos se normalizan de acuerdo con los valores máximos posibles.

En el **registro SFP** existen opciones disponibles para la creación de una proyección SFP.

- & vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

Campo	Función
Light Direction	Introduzca una coordenada x y una y para el ángulo de la proyección SFP. Este ángulo simboliza el ángulo de incidencia del rayo láser sobre el preparado. Haga clic en la tecla de pantalla Apply, para crear la proyección con el nuevo ángulo.
Absorption	Modifique el coeficiente de absorción $\alpha$ mediante la corredera. Cuanto mayor es la velocidad de barrido ajustada, menores son los valores calculados en la proyección. Si el coeficiente se ajusta con un valor bajo, muchos píxeles de la proyección alcanzan el valor máximo, de forma que las estructuras son cada vez más difíciles de diferenciar.
Threshold	Defina un valor umbral con la corredera. Los valores de intensidad que están por debajo de este valor no se tienen en cuenta para la creación de la proyección.
Rescale to maximum	Los valores de intensidad de la imagen se normalizan de acuerdo con los valores máximos posibles. De este modo se garantiza que los valores grises calculados de la proyección permanecen dentro de la gama de valores, por ejemplo, entre 0 y 255



	para 8 bits. Esto permite aclarar las imágenes oscuras.
--	---

## Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Overlay

### Estructura del visor Experiment Overview

Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View.

El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar todos los iconos.

En el registro del icono Overlay pueden realizarse ajustes opcionales para las funciones siguientes:



& vea Representación de imagen superpuesta (página 197)

En el **registro Overlay** puede seleccionar entre tres modos para la creación de una imagen de superposición a partir de los datos brutos y sus tablas de asignación de colores correspondientes:

Color Merging	Función
True Color (add RGBs)	Se calcula la media de los valores de color del píxel de las imágenes originales y se representan en la imagen superpuesta.
True Color (add RGBs) with dynamic adjustment	Se calcula la media de los valores de color del píxel de las imágenes originales, se normalizan en función de los valores máximos posibles y se representan en la imagen superpuesta.
Fast (bitwise "OR" RGB)	Los valores de color del píxel de las imágenes originales se mezclan mediante un proceso informático rápido bit a bit y se representan en la imagen superpuesta. & vea Enlaces booleanos (página 302)

Coloring	Función
Only Red/ Green/ Blue	Para la creación de la imagen superpuesta se utilizan siempre las tablas de asignación de colores roja, verde y azul, independientemente de las tablas actuales de las imágenes originales.

## Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Scan Progress

### Función

Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View.

El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar

todos los iconos.

En el registro del icono Scan Progress pueden realizarse ajustes opcionales para las funciones siguientes:



& vea Selección del modo de barrido (página 150)

En el **registro Scan Progress** se muestra el modo de barrido actual. Asimismo, también puede comprobarse el estado de una captura de imagen mediante una indicación de recorrido.

## Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Surface View

### Función

Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View.

El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar todos los iconos.

En el registro del icono Surface View pueden realizarse ajustes opcionales para las funciones siguientes:



& vea Creación de vista tridimensional (página 209)

En el **registro Visualization** puede seleccionarse si la vista tridimensional se realiza como imagen plana (Surface), como cuadrícula de alambre (Wireframe) o como isolíneas (Isolines) y determinarse la perspectiva con la que se representa dicha vista:

Render Mode	Función
Surface	Los espacios intermedios entre puntos de la imagen se rellenan con superficies.
Wireframe	Todos los puntos de la imagen se unen mediante líneas y los espacios intermedios quedan libres.
Isolines	Los puntos de la imagen que corresponden a valores con la misma intensidad se encierran dentro de una curva.

Projection Type	Función
Perspective	La vista tridimensional se representa en perspectiva central.
Parallel	La vista tridimensional se representa en perspectiva caballera.

En el **campo Stretch height (factor)** puede variar el factor de escalado en la dirección z y, de esta forma, estirar o reducir la altura de la vista tridimensional.

En el **campo Downsample rate** puede reducirse la densidad de información de la vista tridimensional para acelerar el procesamiento de la imagen. Con una densidad de puntos de 1:1 se representan todos los valores de intensidad medidos en la imagen. Con una densidad de puntos de 1:2 sólo se representa uno de cada dos valores de intensidad en la imagen.

En el **campo Isoline interval** defina la distancia en  $\mu\text{m}$  de separación de las isolíneas. Esto permite limitar el número de isolíneas en la vista tridimensional.

En el **campo Isoline detail level** determine, mediante la indicación de un valor límite, que sólo las isolíneas que tengan una longitud determinada se representen en la vista tridimensional. De esta forma, sólo se representan las isolíneas correspondientes a un valor de intensidad que aparezca con una frecuencia determinada.

## Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Surface Measure

### Función

Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View.

El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar todos los iconos.

En el registro del icono Surface Measure pueden realizarse ajustes opcionales para las funciones siguientes:



& vea Mediciones de rugosidad a lo largo de un trayecto (página 256)

En el **campo Levelling** existen opciones para colocar curvas de medición de un perfil de rugosidad que presentan una tendencia, en una capa horizontal mediante una función de adaptación. Para ello se adapta una función de interpolación lineal (Polynom) a la curva.

& vea Paso de trabajo Process / Carpeta Materials (página 264)

& vea Función de adaptación para la corrección de tendencias (página 300)

None	No se aplica ninguna función de adaptación a la curva de medición.
Automatic linear	La curva de medición se coloca en una capa horizontal mediante una función de adaptación lineal.
Interactive level	La capa de la curva de medición se corrige mediante la función de adaptación lineal de forma que la distancia entre ambos puntos de medición está sobre el plano horizontal.
Freeze	La curva de medición colocada en una nueva posición se cierra de forma que la ubicación de los puntos pueda volver a modificarse sin que se adapte la curva de forma interactiva.

En el **campo Multipoint Measurement** es posible guardar dos puntos de medición, así como el desnivel entre ambos.

►	Haga clic en la tecla de pantalla Remember, para guardar los valores. Mediante la tecla de
---	--

	pantalla Clear vuelven a borrarse.
--	------------------------------------

## Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Surface Calculation

### Función

Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View.

El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar todos los iconos.

En el registro del icono Surface Calculation pueden realizarse ajustes opcionales para las funciones siguientes:



& vea Creación de imagen topográfica (página 208)

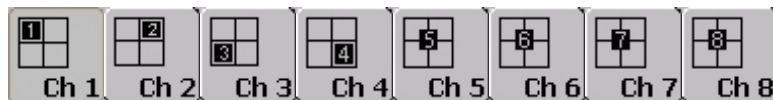
El **registro Topography** ofrece diferentes opciones para la creación de una imagen topográfica. Seleccione si se interpreta como altura en la imagen topográfica la intensidad máxima o los puntos principales de la superficie de intensidades. Determine el tipo de visualización de la altura en la imagen topográfica y ajuste un valor umbral para las intensidades que se van a representar.

Surface Reconstruction	Función
Search maximum intensity	De cada columna de puntos explorada, se representa en la imagen topográfica el punto con máxima intensidad como representante de todos los valores de la columna.
Calculate center of mass of intensities	De cada columna de puntos explorada, se representa en la imagen topográfica el punto principal de la superficie limitado por la curva de valores de intensidad medidos.

Topography Processing	Función
Invert height	La columna de puntos explorados se barre en dirección contraria. De esta forma se invierte la información de la altura. Se representa un negativo de la imagen topográfica.
Level	La capa horizontal de una captura se corrige mediante una función de interpolación lineal (Polynom). & vea Paso de trabajo Process / Carpeta Materials (página 264)

Threshold	Función
Desplace la corredera sobre la escala o introduzca un valor numérico.	Las intensidades que están por debajo del valor umbral definido, no se tienen en cuenta para el cálculo de la imagen topográfica.

## Visualización de los canales de detección

**Visualización de los canales de detección 1-8****Función**

Con un clic en la tecla Channel 1-8 se insertan en el visor Viewer los datos de imagen capturados en los canales de detección 1-8. El usuario puede asignar al canal de detección una de las muchas tablas de asignación de colores. Esto es posible tanto en la imagen resultante como durante la captura de la imagen. Para ello, abra el cuadro de diálogo Select Look-up Tables. Existen dos posibilidades para abrir este cuadro de diálogo.

▶	Haga clic en la tecla Select Look-up Tables.
▶	Mantenga el puntero del ratón sobre el lugar deseado del visor Viewer. Haga clic con el botón derecho del ratón. Aparece un menú contextual en el que debe hacer clic en LUT. En el visor se insertan las barras de color de los canales de detección activos. Haga doble clic en la barra de color correspondiente.

& vea Selección de tablas de asignación de colores (LUT) (página 194)



*Este método de coordinación de tablas de asignación de colores afecta sólo a la imagen actual. Tan pronto como se inicia un nuevo barrido, se utilizan las tablas de asignación de colores definidas en el cuadro de diálogo Beam Path Setting.*

& vea Ajuste de la trayectoria de rayos (página 137)

## Zoom de las imágenes del visor Viewer



### Función

Al hacer clic en la tecla Display se abre un cuadro de lista en el que puede ajustar el zoom gráfico. De esta forma se amplía o reduce la imagen del visor Viewer:

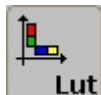
n-1	La imagen se reduce representando n píxeles como 1 sólo en la imagen resultante.
Automatic	La imagen aparece en el formato original.
1-n	La imagen se amplía representando 1 píxel como n píxeles en la imagen resultante.



*El Leica Confocal Software dispone de tres funciones de zoom diferentes: el zoom gráfico, el zoom tridimensional y el zoom electrónico.*

- & vea Zoom de vista tridimensionale (página 211)
- & vea Zoom electrónico (página 146)

## Selección de tablas de asignación de colores (LUT)



### Función

Mediante la tecla Look-up Tables se abre un cuadro de diálogo en el que puede asignar una tabla de asignación de colores a cada canal de detección. La configuración de las tablas de asignación de colores puede realizarse tanto en la imagen resultante como durante la captura de la imagen:

▶	En el campo Select Channel, haga clic en el canal de detección al que desea asignar una nueva tabla de asignación de colores.
▶	En el campo Select LUT seleccione la tabla deseada.
▶	Haga clic en la tecla de pantalla Apply, para comprobar el resultado en el visor Viewer.

También puede abrir el cuadro de diálogo Select LUT's a través del visor Viewer.

▶	Mantenga el puntero del ratón sobre el lugar deseado del cuadro de imagen del visor Viewer. Haga clic con el botón derecho del ratón. Aparece un menú contextual en el que debe hacer clic en LUT.
▶	En el visor se insertan las barras de color de los canales de detección activos en el lado derecho, junto al cuadro de la imagen. Haga doble clic en una de las barras de colores.

### Carga de una segunda tabla de asignación de colores

Si mantiene el puntero del ratón sobre cada barra de colores aparecen los puntos de selección en la parte superior e inferior de la barra. Mediante estos puntos se puede limitar la tabla de asignación de colores a una gama de intensidad determinada y cargar una segunda tabla.

▶	Arrastre el punto de selección superior hacia abajo o el inferior hacia arriba.
▶	Haga doble clic en la zona superior o inferior del punto de selección correspondiente.
▶	Se abre el cuadro de diálogo Select LUT's en el que puede seleccionar una segunda tabla de

	asignación de colores.
►	La gama de valores de intensidad superior e inferior se representa en los colores de cada segunda tabla de asignación de colores.



*Este método de coordinación de tablas de asignación de colores afecta sólo a la imagen actual. Tan pronto como se inicia un nuevo barrido, se utilizan las tablas de asignación de colores definidas en el cuadro de diálogo Beam Path Setting.*

& vea Ajuste de la trayectoria de rayos (página 137)

### Aplicaciones típicas

En principio, la selección de una tabla de asignación de colores apropiada para una aplicación determinada es decisión del usuario. No obstante, la experiencia muestra que algunas tablas son especialmente apropiadas para determinadas aplicaciones:

Tabla de asignación de colores	Aplicación
Green	Se utiliza generalmente para la captura de preparados marcados con FITC, Cy2, DTAF y tinturas fluorescentes similares que emiten en una gama espectral verde.
Red	Se utiliza generalmente para la captura de preparados marcados con TRITC, Texas Red, Cy3, Rodamin y tinturas fluorescentes similares que emiten en una gama espectral roja.
Blue	Se utiliza generalmente para la captura de preparados marcados con tinturas fluorescentes ultravioleta como DAPI o Hoechst o tinturas similares que emiten en una gama espectral azul.
Gray	Se utiliza generalmente para la visualización de capturas de transmisión.
P. Color 1	Está especialmente indicada para la visualización de imágenes en 12 bits.
P. Color 2, 3, 4, 5, 6	Se utilizan generalmente para la captura de preparados marcados con tinturas fluorescentes sensibles al pH o a los iones, así como para la visualización de series temporales.
Geo ( <u>L</u> and), Geo ( <u>S</u> ea), Geo ( <u>L</u> and & <u>S</u> ea), R & B	Son recomendables para la creación de imágenes topográficas, es decir, para la ilustración de estructuras superficiales. En especial, Geo Land & Sea es apropiada para la visualización de cavidades o escalones.
Glow, Glow ( <u>O</u> ver), Glow ( <u>U</u> nder), Glow ( <u>O</u> ver & <u>U</u> nder)	Se recomiendan para la optimización del contraste de la imagen (Offset y Gain de los detectores). Glow Over resalta las intensidades en el marco superior de la tabla en azul, Glow Under representa las intensidades del borde inferior en verde. Glow Over and Under en una combinación de estas dos tablas.
<u>C</u> yan, <u>M</u> agenta, <u>Y</u> ellow	Se recomiendan para la impresión de una imagen. Los colores denominados <b>CMY(K)</b> se utilizan para la salida de color en los sistemas de impresión. Los colores RGB, así como las otras tablas de asignación de colores utilizadas aquí, se utilizan para la representación de colores en la pantalla. Se trata de dos sistemas de color diferentes por lo que pueden producirse importantes diferencias entre los colores de la visualización CMY(K) y la del monitor.

Todas las tablas de asignación de colores también están disponibles con una evolución del color inversa, es decir, las intensidades altas se representan en oscuro y las bajas en claro.

## Representación de imágenes individuales



### Función

Al hacer clic en la tecla Single se representa un canal de detección o varios en una sola imagen en el visor Viewer. En función de las teclas activadas de forma simultánea, son posibles los siguientes modos de visualización:

Combinación de teclas	Visualización
Single + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Sólo se representa un canal de detección, en una serie de imágenes, la primera imagen del canal de detección seleccionado.
Single + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan para un canal de detección seleccionado.
Single + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	A partir de todos los canales de detección seleccionados se crea una sola imagen superpuesta, en una serie se utiliza en cada caso la primera imagen.
Single + Gallery + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	De acuerdo con el número de imágenes individuales de una serie se crean imágenes superpuestas de todos los canales de detección seleccionados.



*Las teclas Single y Tiled no pueden estar activas de forma simultánea ya que activan dos funciones que se excluyen entre sí.*

## Representación de imágenes múltiples



### Función

Al hacer clic en la tecla Tiled se visualizan los canales de detección por separado en el visor Viewer. En función de las teclas activadas de forma simultánea, son posibles los siguientes modos de visualización:

Combinación de teclas	Visualización
Tiled + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Se representan por separado todos los canales de detección seleccionados, en una serie, se utiliza en cada caso la primera imagen.
Tiled + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan por separado para todos los canales de detección seleccionados.
Tiled + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todos los canales de detección seleccionados se representan por separado y, también juntos en una imagen superpuesta. En una serie de imágenes se utiliza en cada caso la primera imagen.
Tiled + Gallery + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan por separado para todos los canales de detección seleccionados y, también, juntos en una imagen superpuesta.





*Las teclas Single y Tiled no pueden pulsarse de forma simultánea ya que activan dos funciones que se excluyen entre sí.*

## Representación de imágenes en serie



### Función

Al hacer clic en la tecla Gallery se visualizan todas las imágenes individuales de una serie en el visor Viewer. En función de las teclas activadas de forma simultánea, son posibles los siguientes modos de visualización:

Combinación de teclas	Visualización
Gallery + Single + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan para un canal de detección seleccionado.
Gallery + Single + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	De acuerdo con el número de imágenes individuales de una serie se crean imágenes superpuestas de todos los canales de detección seleccionados.
Gallery + Tiled + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan por separado para todos los canales de detección seleccionados.
Gallery + Tiled + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan por separado para todos los canales de detección seleccionados y, también, juntos en una imagen superpuesta.

## Representación de imagen superpuesta



### Función

Al hacer clic en la tecla Overlay se representan todos los canales de detección seleccionados juntos en una imagen superpuesta en el visor Viewer. A diferencia de la tecla Overlay rgb, los canales de detección se representan siempre con las tablas de asignación de colores configuradas actualmente. Para ello se calcula la media de los valores de color de los píxeles. En función de las teclas activadas de forma simultánea, son posibles los siguientes modos de visualización:

Combinación de teclas	Visualización
Overlay + Single + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	A partir de todos los canales de detección seleccionados se crea una sola imagen superpuesta, en una serie se utiliza en cada caso la primera imagen.
Overlay + Single + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	De acuerdo con el número de imágenes individuales de una serie se crean imágenes superpuestas de todos los canales de detección seleccionados.
Overlay + Tiled + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todos los canales de detección seleccionados se representan por separado y, también, juntos en una imagen superpuesta; en una serie, se utiliza en cada caso la primera imagen.
Overlay + Tiled + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan por separado para todos los canales de detección seleccionados y, también, juntos en una imagen superpuesta.

En el cuadro de diálogo Viewer Options puede elegir entre tres modos diferentes de combinación de

color para la creación de una imagen superpuesta:

▶	Seleccione la opción Viewer Options en el menú View.
▶	Haga clic en el icono Overlay.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Overlay (página 189)

## Representación de imagen superpuesta en RGB



### Función

Al hacer clic en la tecla Overlay rgb se representan en el visor Viewer todos los canales de detección seleccionados juntos en una imagen superpuesta. A diferencia de la tecla Overlay, los canales de detección se representan siempre con las tablas de asignación de colores roja, verde y azul (rgb). En función de las teclas activadas de forma simultánea, son posibles los siguientes modos de visualización:

& vea Representación de imagen superpuesta (página 197)

Combinación de teclas	Visualización
Overlay rgb + Single + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	A partir de todos los canales de detección seleccionados se crea una sola imagen superpuesta, en una serie se utiliza en cada caso la primera imagen.
Overlay rgb + Single + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	De acuerdo con el número de imágenes individuales de una serie se crean imágenes superpuestas de todos los canales de detección seleccionados.
Overlay rgb + Tiled + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todos los canales de detección seleccionados se representan por separado y, también, juntos en una imagen superpuesta; en una serie, se utiliza en cada caso la primera imagen.
Overlay rgb + Tiled + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan por separado para todos los canales de detección seleccionados y, también, juntos en una imagen superpuesta.

En el cuadro de diálogo Viewer Options puede elegir entre tres modos diferentes de combinación de color para la creación de una imagen superpuesta:

▶	Seleccione la opción Viewer Options en el menú View.
▶	Haga clic en el icono Overlay.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Overlay (página 189)

## Visualización de series de imágenes

### Representación de la primera imagen de una serie



#### Función

Las imágenes individuales capturadas en una serie de imágenes pueden reproducirse como secuencia de filmación. Haga clic en la tecla First para saltar hasta la primera imagen de la serie.



*Si está pulsada la tecla Gallery, las teclas First y Last, Next y Previous y Play/Stop aparecen en gris y no pueden accionarse. Mediante la tecla Gallery se funden todas las imágenes individuales de una serie y no pueden reproducirse como secuencia de filmación.*

### Representación de la siguiente imagen de una serie



#### Función

Las imágenes individuales capturadas en una serie de imágenes pueden reproducirse como secuencia de filmación. Haga clic en la tecla Next para visualizar la siguiente imagen de la serie.



*Si está pulsada la tecla Gallery, las teclas Next y Previous, First y Last y Play/Stop aparecen en gris y no pueden accionarse. Mediante la tecla Gallery se funden todas las imágenes individuales de una serie y no pueden reproducirse como secuencia de filmación.*

### Representación de la imagen previa de una serie



#### Función

Las imágenes individuales capturadas en una serie de imágenes pueden reproducirse como secuencia de filmación. Haga clic en la tecla Previous para visualizar la imagen previa de la serie.



*Si está pulsada la tecla Gallery, las teclas Next y Previous, First y Last y Play/Stop aparecen en gris y no pueden accionarse. Mediante la tecla Gallery se funden todas las*

*imágenes individuales de una serie y no pueden reproducirse como secuencia de filmación.*

## Representación de la última imagen de una serie



### Función

Las imágenes individuales capturadas en una serie de imágenes pueden reproducirse como secuencia de filmación. Haga clic en la tecla Last para saltar hasta la última imagen de la serie.



*Si está pulsada la tecla Gallery, las teclas First y Last, Next y Previous y Play/Stop aparecen en gris y no pueden accionarse. Mediante la tecla Gallery se funden todas las imágenes individuales de una serie y no pueden reproducirse como secuencia de filmación.*

## Representación de la imagen deseada de una serie



### Función

Al hacer clic en la tecla Selection se abre un cuadro de diálogo en el que puede seleccionar la imagen deseada de una serie y mostrarla en el visor Viewer. Bajo la escala aparece el número de la imagen individual de la serie, desde 1 hasta n y en un campo de entrada, el número de la imagen representada actualmente.

▶	Con el puntero del ratón, desplace la corredera de la escala. La imagen correspondiente se muestra de forma inmediata.
▶	Introduzca el número de la imagen deseada en el campo de entrada y haga clic en Apply.

## Inicio y finalización de películas



### Función

Las imágenes individuales capturadas en una serie de imágenes pueden reproducirse como secuencia de filmación. Mediante la tecla Play/Stop se inicia y finaliza esta película. La velocidad de la película, es decir, el número de imágenes individuales por unidad de tiempo es variable y puede ajustarse en el cuadro de diálogo Viewer Options:

▶	Seleccione la opción Viewer Options en el menú View.
▶	haga clic en el icono Display y, a continuación, en el registro Movie.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Display (página 184)



*Si está pulsada la tecla Gallery, las teclas Play/Stop, First y Last y Next y Previous aparecen en gris y no pueden accionarse. Mediante la tecla Gallery se funden todas las imágenes individuales de una serie y no pueden reproducirse como secuencia de filmación.*

## Representación de imágenes en serie



### Función

Al hacer clic en la tecla Gallery se visualizan todas las imágenes individuales de una serie en el visor Viewer. En función de las teclas activadas de forma simultánea, son posibles los siguientes modos de visualización:

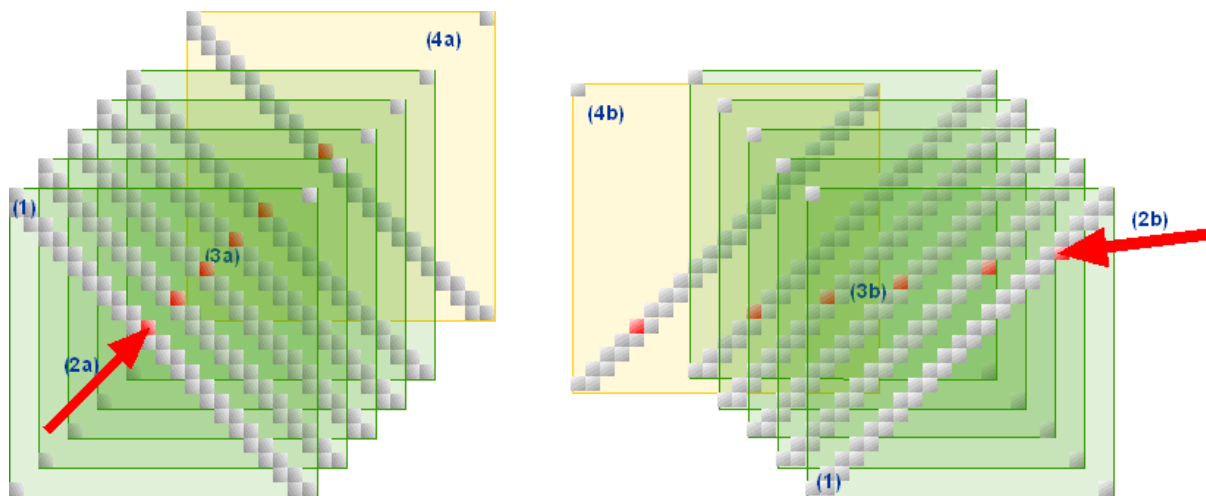
Combinación de teclas	Visualización
Gallery + Single + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan para un canal de detección seleccionado.
Gallery + Single + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	De acuerdo con el número de imágenes individuales de una serie se crean imágenes superpuestas de todos los canales de detección seleccionados.
Gallery + Tiled + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan por separado para todos los canales de detección seleccionados.
Gallery + Tiled + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Todas las imágenes individuales de una serie se representan por separado para todos los canales de detección seleccionados y, también, juntos en una imagen superpuesta.

## Proyecciones

### Principio y tipos de las proyecciones

Para la captura de preparados biológicos se crea una serie de imágenes. Cada imagen individual se captura en un plano determinado del preparado. El resultado es un bloque de datos tridimensional que reconstruye el volumen de todo el preparado. Cada corte óptico, es decir, cada imagen individual, muestra la información de un solo plano del preparado. Las estructuras que se extienden por todo el preparado, se recogen de forma parcial en las diferentes imágenes. Para hacer visibles estas estructuras de forma global se precisan las proyecciones. Con los algoritmos de las proyecciones es posible seleccionar los fragmentos de información relevantes repartidos en varias imágenes individuales y hacerla visible en una sola imagen de dos dimensiones. De esta forma pueden reconstruirse estructuras contiguas.

En este sentido, la base para la aplicación de una proyección es una serie de imágenes. Ésta puede formarse de cortes xy horizontales o cortes xz verticales. Para comprender el funcionamiento de una proyección es interesante representarse la serie de imágenes como un lote de imágenes individuales colocadas una sobre la otra. Cada imagen consta, a su vez, de puntos de exploración del láser individuales. Cada punto de exploración o Voxel (1), es decir, los valores de intensidad medidos en cada imagen, están colocados uno sobre otro. Al crearse una proyección, se analizan los puntos de exploración que se encuentran uno sobre otro a lo largo del eje de proyección (2a, 2b), a través de todos los cortes ópticos. A partir de cada una de estas columnas de puntos de exploración (3a, 3b) se representa en una proyección (4a, 4b) el valor de intensidad que satisface el criterio de selección, o bien un valor como representante de todos los valores de la columna.



(2a) Proyección con eje invariable

(2b) Proyección con eje variable

#### Proyecciones con eje variable o invariable

El tipo de eje de proyección distingue entre los dos grupos principales de tipos de proyección disponibles con el Leica Confocal Software. Existen proyecciones sobre un eje invariable y proyecciones sobre eje variable. En el primer caso se trata de proyecciones ortogonales. El eje de proyección es siempre el eje óptico colocado de forma perpendicular al lote de imágenes (eje z en cortes horizontales xy y eje y en cortes verticales xz). A diferencia de éste, en el segundo tipo, el eje de proyección puede seleccionarse libremente. En ambos grupos están disponibles los mismos tres tipos de proyección (con excepción de la proyección SFP).

### Tipos de proyección

Tipo de proyección	Eje de proyección invariable	Eje de proyección variable
Proyección de valor máximo	Max.	Max
Proyección de valor medio	Avg.	Avg.
Proyección transparente	Trans.	Trans.
Proyección SFP	-----	SFP

Los tipos de proyección pueden activarse mediante la tecla correspondiente, o bien en el cuadro de diálogo Image Tool. Si la función se activa mediante la tecla, la proyección es sólo una visualización de pantalla temporal. Si se activa en el cuadro de diálogo, la proyección se crea como archivo nuevo en el experimento actual:

▶	Las proyecciones con eje invariable se encuentran en el cuadro de diálogo Image Tool/ tecla de pantalla 3D/ icono Orthogonal Projection.
▶	Las proyecciones con eje variable se encuentran en el cuadro de diálogo Image Tool/ tecla de pantalla 3D/ icono Projections and Animations.
▶	La proyección SFP se encuentra en el cuadro de diálogo Image Tool/ tecla de pantalla 3D/ icono SFP.

### Proyección de valor máximo

En la proyección de valor máximo se parte de la premisa de que los valores de intensidad máximos son información relevante para la reconstrucción de una estructura. Por ello, en esta proyección se busca el punto de exploración con el valor máximo de cada columna y se representa en la proyección bidimensional como representante de toda la columna:

$$I_p = \text{Max}(V_n)$$

donde  $I_p$  es el píxel de la proyección y  $V_n$  el voxel analizado.

### Proyección de valor medio

En la proyección de valor medio, todos los valores de intensidad influyen en la proyección en igual medida. Por ello, en esta proyección se calcula la media aritmética de todos los valores de intensidad de cada columna y se representa en la proyección bidimensional como representante de toda la columna:

$$I_p = \frac{\sum_{n=0}^{N-1} V_n}{N}$$

donde  $I_p$  es el píxel de la proyección,  $V_n$  es el voxel analizado y  $N$  el número total de voxel.

### Proyección transparente

En la proyección transparente también influyen todos los valores de intensidad en la proyección. A diferencia de la proyección de valor medio, los valores de intensidad de las distintas imágenes individuales se valoran de forma diferente. Los valores de las imágenes inferiores del lote tienen menor influencia que los de las imágenes superiores. Por ello, en esta proyección se calcula la media ponderada de todos los valores de intensidad de cada columna y se representa en la proyección bidimensional como representante de toda la columna:

$$I_0 = V_0$$

$$I_1 = (T_n \times \alpha) \times I_0 + V_1$$

$$I_2 = (T_n \times \alpha) \times I_1 + V_2$$

...

$$I_n = (T_n \times \alpha) \times I_{n-1} + V_n$$

donde  $I_n$  es el píxel de la proyección,  $T_n = 1 - (V_n / V_{\max})$  es la normalización,  $\alpha$  el factor de transparencia variable,  $I_{n-1}$  el valor del voxel calculado previamente y  $V_n$  el voxel analizado en la actualidad.

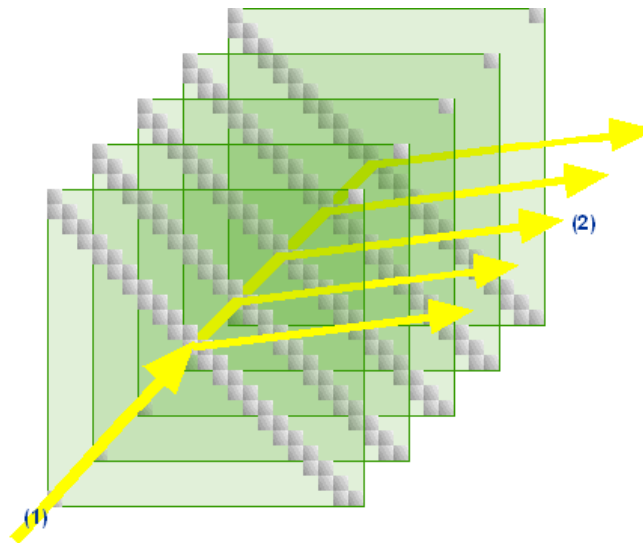
El cálculo de la proyección comienza en la imagen más baja del lote y finaliza con la imagen superior. La graduación de los valores de intensidad se compone de dos factores.

El primero,  $T_n$ , es el resultado de la relación entre cada valor de intensidad medido y la máxima intensidad posible (normalización). Este factor garantiza que no se sobrepasa la zona de valores grises de una imagen, por ejemplo, entre 0 y 255 con 8 bits.

El segundo factor de transparencia (ajustable por el usuario)  $\alpha$  ( $0 < \alpha < 1$ ) determina la graduación del valor de intensidad medido previamente. Cuanto más alto es el factor de transparencia, con mayor fuerza influyen los valores de intensidad de los niveles inferiores del lote de imágenes en la proyección.

### Proyección SFP (proceso de fluorescencia simulado), simulación matemática de un proceso de fluorescencia

Con este tipo de proyección se simula mediante operaciones de cálculo el proceso utilizado en microscopía de fluorescencia de absorción de luz de láser y emisión de luz fluorescente en un preparado. Este proceso consta de dos pasos de cálculo.



En el primero, se simula el rayo láser (1) cada vez más débil que atraviesa la muestra. Se parte de una fuente luminosa lateral que cae sobre el voxel del lote de imágenes. El debilitamiento del haz al atravesar el lote de imágenes se contempla mediante la fórmula siguiente:

$$I_{n+1} = I_n \left( 1 - \alpha \cdot \frac{V_n}{V_{\max}} \right)$$

donde  $I_{n+1}$  es la intensidad remanente de la luz tras la absorción del voxel número  $n$ ,  $I_n$  es la intensidad de la luz en el voxel número  $n$ ,  $\alpha$  el coeficiente de absorción del haz de láser en la muestra,  $V_n$  la intensidad en el voxel y  $V_{\max}$  la intensidad máxima de voxel. El cociente  $V_n / V_{\max}$  corresponde a la normalización.

Para cada voxel se calcula la intensidad de iluminación  $V I_n = I_n \times V_n$  a partir de las intensidades recogidas  $I_n$  y se almacena de forma temporal en una tabla ( $I_n$  = intensidad de la luz que entra en el voxel  $n$ ,  $V_n$  = intensidad del voxel  $n$ ). El cálculo se realiza en un solo paso para todo el lote de



imágenes, es decir, para todos los voxel en la dirección del haz entrante. De este cálculo resulta una tabla con las intensidades de iluminación.

En el segundo paso se calcula la fluorescencia emitida (2) a partir de las intensidades de iluminación calculadas. La intensidad del píxel en la proyección como representación del voxel en la dirección de la mirada del observador se calcula mediante una fórmula recursiva:

$$I_{n+1} = I_n \left(1 - \alpha \cdot \frac{V_n}{V_{\max}}\right) + V_{In}$$

donde  $\alpha$  es el coeficiente de absorción de la luz fluorescente de la muestra y  $V_{In}$  es la intensidad de iluminación del voxel número  $n$  calculada en el primer paso.

## Proyección de valor máximo de un lote de imágenes con eje de proyección invariable



### Función

Mediante la tecla Fix. Max. inicie una proyección de valor máximo. El eje de proyección en esta función es siempre el eje ortogonal (eje  $z$  en cortes horizontales  $xy$  y eje  $y$  en cortes verticales  $xz$ ).

La base para la aplicación de una proyección es un lote de imágenes, es decir, una serie de cortes horizontales  $xy$  o verticales  $xz$ . Al crearse una proyección, se analizan los puntos de exploración de la imagen individual que se encuentran uno sobre otro a lo largo del eje de proyección, a través de todos los cortes ópticos. De cada columna de puntos explorada, se representa en la proyección bidimensional el valor de intensidad máximo como representante de todos los valores de la columna.

& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

►	Haga clic en la tecla Fix. Max. Se crea una proyección de valor máximo del lote de imágenes actual y se representa en el visor Viewer.
►	Puede volver a la imagen original en cualquier momento mediante un clic en la tecla Original.

En el cuadro de diálogo Viewer Options también puede ajustarse un valor umbral (threshold) y variar la gama de valores de intensidad de la imagen a escala (scaling).

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Projections (página 186)



*Una proyección de valor máximo puede activarse mediante la tecla Fix. Max., o bien, en el paso de trabajo Process / Carpeta Extended Focus. Si la función se activa mediante la tecla, la proyección es sólo una visualización de pantalla temporal.*

& vea Paso de trabajo Process / Carpeta Extended Focus (página 226)

& vea Creación de un experimento (página 253)



*Observe la diferencia entre una proyección de valor máximo y una imagen topográfica*

creada a partir de la máxima intensidad. En la primera se asigna directamente un valor de color a la máxima de intensidad. En el segundo caso, en primer lugar se asigna la posición z real de cada punto de exploración a la máxima de intensidad y, a continuación, se codifica mediante color.

& vea Creación de imagen topográfica (página 208)

### Proyección de valor máximo de un lote de imágenes con eje de proyección variable

(opcional, vea el capítulo Paquete de programas opcionales, tridimensional, página 281 y siguientes)

### Proyección de valor medio de un lote de imágenes con eje de proyección invariable



#### Función

Mediante la tecla Fix. Avg. inicie una proyección de valor medio. El eje de proyección en esta función es siempre el eje ortogonal (eje z en cortes horizontales xy y eje y en cortes verticales xz).

La base para la aplicación de una proyección es un lote de imágenes, es decir, una serie de cortes horizontales xy o verticales xz. Al crearse una proyección, se analizan los puntos de exploración de la imagen individual que se encuentran uno sobre otro a lo largo del eje de proyección, a través de todos los cortes ópticos. A partir de cada columna de puntos de exploración se calcula la media aritmética de todos los valores de intensidad y se representa en una proyección bidimensional como representante de toda la columna.

& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

▶	Haga clic en la tecla Fix. Avg. Se crea una proyección de valor medio del lote de imágenes actual y se representa en el visor Viewer.
▶	Puede volver a la imagen original en cualquier momento mediante un clic en la tecla Original.

En el cuadro de diálogo Viewer Options también puede ajustarse un valor umbral (threshold) y variar la gama de valores de intensidad de la imagen a escala (scaling).

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Projections (página 186)



*Una proyección de valor medio puede activarse mediante la tecla Fix. Avg., o bien, en el paso de trabajo Process / Carpeta Extended Focus. Si la función se activa mediante la tecla, la proyección es sólo una visualización de pantalla temporal.*

- & vea Paso de trabajo Process / Carpeta Extended Focus (página 226)
- & vea Creación de un experimento (página 253)

## Proyección de valor medio de un lote de imágenes con eje de proyección variable

(opcional, vea el capítulo Paquete de programas opcionales, tridimensional, página 281 y siguientes)

## Proyección transparente de un lote de imágenes con eje de proyección invariable



### Función

Mediante la tecla Fix. Trans. inicie una proyección transparente. El eje de proyección en esta función es siempre el eje ortogonal (eje z en cortes horizontales xy y eje y en cortes verticales xz).

La base para la aplicación de una proyección es un lote de imágenes, es decir, una serie de cortes horizontales xy o verticales xz. Al crearse una proyección, se analizan los puntos de exploración de la imagen individual que se encuentran uno sobre otro a lo largo del eje de proyección, a través de todos los cortes ópticos. A partir de cada columna de puntos de exploración se calcula la media ponderada de todos los valores de intensidad y se representa en una proyección bidimensional como representante de toda la columna.

- & vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

El usuario puede variar la graduación de los puntos de exploración para el cálculo del valor medio mediante el ajuste del factor correspondiente (transparent factor) en el cuadro de diálogo Viewer Options. También puede ajustarse un valor umbral (threshold) y variar la gama de valores de intensidad de la imagen a escala (scaling).

- & vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Projections (página 186)

▶	Haga clic en la tecla Fix. Trans. Se crea una proyección transparente del lote de imágenes actual y se representa en el visor Viewer.
▶	Puede volver a la imagen original en cualquier momento mediante un clic en la tecla Original.



*Una proyección transparente puede activarse mediante la tecla Fix. Trans., o bien, en el paso de trabajo Process / Carpeta Extended Focus. Si la función se activa mediante*

*la tecla, la proyección es sólo una visualización de pantalla temporal.*

- & vea Paso de trabajo Process / Carpeta Extended Focus (página 226)
- & vea Creación de un experimento (página 253)

## Proyección transparente de un lote de imágenes con eje de proyección variable

(opcional, vea el capítulo Paquete de programas opcionales, tridimensional, página 281 y siguientes)

## Creación de una proyección SFP de un lote de imágenes

(opcional, vea el capítulo Paquete de programas opcionales, tridimensional, página 281 y siguientes)

## Creación de imagen topográfica



### Función

Mediante la función Topography puede seleccionar determinados datos de intensidad de un lote de imágenes, es decir, una serie de cortes xy o xz y transmitirlos a una imagen topográfica bidimensional. En este proceso se analizan los puntos de exploración (voxel) colocados uno sobre otro a lo largo del eje z a través de todos los cortes ópticos. De cada columna de puntos explorada, se representa en la imagen topográfica sólo el valor de intensidad que satisface el criterio de selección como representante de todos los valores de la columna.

Puede seleccionar las intensidades medidas según el máximo de intensidad (maximum intensity) o según el centro de gravedad de la superficie (center of mass). Si precisa representar los máximos de intensidad en la imagen topográfica, sólo se selecciona el punto de exploración en el que se ha medido la intensidad máxima. Al transmitir el centro de gravedad de la superficie, se calcula un valor medio de todos los puntos de exploración situados uno sobre otro (el centro de gravedad de la superficie limitado por la curva de los valores de intensidad medidos).

Al máximo de intensidad o al centro de gravedad de la superficie se le asigna la posición z real del punto de exploración correspondiente y, a continuación, se codifica mediante color. Debido a esta asignación, la imagen topográfica constituye **la estructura superficial real** del preparado. En la configuración estándar aparecen claras las estructuras más superficiales y oscuras las más profundas.

La configuración del criterio de selección de la imagen topográfica puede ajustarse en el cuadro de diálogo Viewer Options:

▶	Seleccione la opción Viewer Options en el menú View.
▶	Haga clic en el icono Surface Calculation para insertar el registro Topography.

- & vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Surface Calculation (página 192)

En un segundo paso puede representar la imagen topográfica en un gráfico tridimensional con la función de vista tridimensional.

- & vea Creación de vista tridimensional (página 209)

### Aplicaciones típicas

La visualización de los datos de imagen en una imagen topográfica es especialmente interesante en los análisis técnicos de materiales. Para la aplicación de funciones de cuantificación, la función de

imágenes topográficas es imprescindible.

## Representación de imágenes originales



### Función

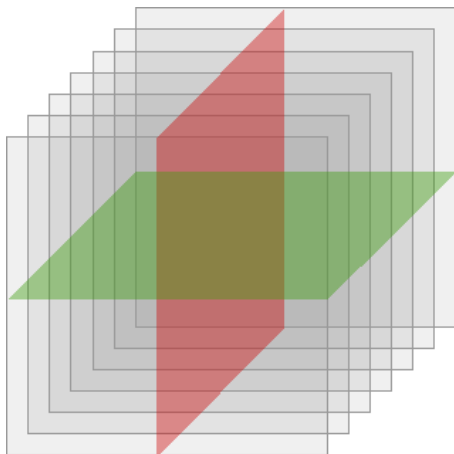
Haga clic en la tecla Original para anular una proyección o una imagen topográfica. En el visor Viewer aparecen de nuevo los datos brutos de la imagen capturados.

## Creación de una vista de corte de un lote de imágenes

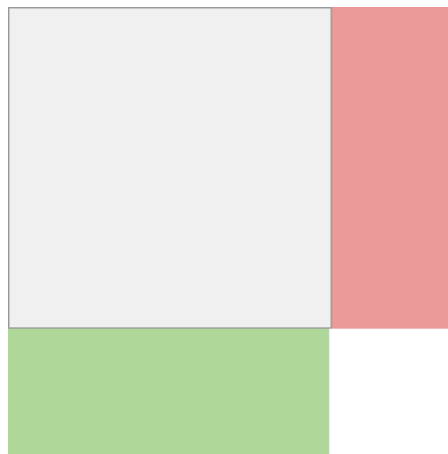


### Función

Al hacer clic en la tecla Sectioning se crean dos vistas de corte del bloque de datos de imagen activo y se insertan en los bordes derecho e inferior de éste. Esta función puede aplicarse a un solo canal de detección.



Vista de corte de un lote de imágenes



Visualización de la vista de corte en el visor Viewer

## Creación de vistas tridimensionales

### Creación de vista tridimensional



### Función

Mediante la tecla 3D View puede representar en tres dimensiones un bloque de datos bidimensional. En una serie de imágenes se utiliza siempre el bloque de datos de la serie insertada en el momento en el visor Viewer. Puede visualizar en la vista tridimensional un corte xy o xz individual a partir de los datos brutos, o bien, una imagen resultante, como por ejemplo una imagen topográfica o una proyección. En función del tamaño representado o calculado en la imagen original, en el eje z de la vista tridimensional se utilizan valores de intensidad o de altura.



*La visualización espacial de la intensidad en una vista tridimensional conduce a pensar que se representa la topografía del preparado. No obstante, tenga presente que sólo puede visualizar **la estructura superficial real** de un preparado si previamente ha creado una imagen topográfica.*

& vea Creación de imagen topográfica (página 208)

La vista tridimensional puede crearse en tres modos de visualización, como imagen plana (Surface), como cuadrícula de alambre (Wireframe) o como imagen con isolíneas (Isolines). Ajuste uno de estos modos de visualización en el cuadro de diálogo Viewer Options:

▶	Seleccione la opción Viewer Options en el menú View.
▶	Haga clic en el icono Surface View y, a continuación, en el registro.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Surface View (página 190)



*Para cada canal de detección se crea una vista tridimensional independiente. Por esto no es posible crear una sola vista tridimensional a partir de una imagen superpuesta (tecla Overlay).*

## Giro de vista tridimensional



### Función

Mediante la tecla Rotate puede girar la vista tridimensional en las tres direcciones espaciales. Observe que la vista tridimensional gira en torno a un punto fijo que se encuentra en el centro de la imagen.

▶	Mantenga el puntero del ratón sobre el lugar deseado de la vista tridimensional.
▶	Haga clic con el botón izquierdo del ratón y manténgalo pulsado.
▶	Mueva el puntero del ratón en la dirección en la que desea girar la vista tridimensional.



*Durante el giro de la vista tridimensional, la resolución de la imagen disminuye ligeramente para acelerar el trabajo con esta función. Al soltar el botón izquierdo del ratón, la imagen vuelve a mostrar la resolución ajustada previamente.*

Como alternativa a este método manual de giro de la vista tridimensional, el cuadro de diálogo Viewer Options ofrece la posibilidad de indicar un ángulo de giro para los tres ejes espaciales:

▶	Seleccione la opción Viewer Options en el menú View.
---	--

▶	Haga clic en el icono 3D y, a continuación, en el registro Navigation.
▶	En el campo Rotation puede introducir el ángulo de giro para los tres ejes.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono 3D (página 183)

## Desplazamiento de vista tridimensional



### Función

Mediante la tecla Move puede desplazar la vista tridimensional:

▶	Mantenga el puntero del ratón sobre el lugar deseado de la vista tridimensional.
▶	Haga clic con el botón izquierdo del ratón y manténgalo pulsado.
▶	Mueva el puntero del ratón en la dirección en la que desea desplazar la vista tridimensional.



*Durante el desplazamiento de la vista tridimensional, la resolución de la imagen disminuye ligeramente para acelerar el trabajo con esta función. Al soltar el botón izquierdo del ratón, la imagen vuelve a mostrar la resolución ajustada previamente.*

Como alternativa a este método manual de desplazamiento de la vista tridimensional, el cuadro de diálogo Viewer Options ofrece la posibilidad de indicar las coordenadas para el posicionamiento de la imagen:

▶	Seleccione la opción Viewer Options en el menú View.
▶	Haga clic en el icono 3D y, a continuación, en el registro Navigation.
▶	En el campo Translation puede modificar las coordenadas para el eje x y el eje z.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono 3D (página 183)

## Zoom de vista tridimensional



### Función

Mediante la tecla Zoom puede ampliar o reducir de forma continua y proporcional la vista tridimensional. En este proceso, se trata simplemente de una variación a escala de la imagen creada, por lo que no puede mejorarse la resolución con esta función de zoom.

Para ampliar la vista tridimensional	Haga clic en un lugar deseado del cuadro de imagen del visor Viewer y, con el botón izquierdo del ratón pulsado, arrastre el puntero <b>hasta el borde inferior</b> .
Para reducir la vista tridimensional	Haga clic en un lugar deseado del cuadro de imagen del visor Viewer y, con el botón izquierdo del ratón pulsado, arrastre el puntero <b>hasta el borde superior</b> .



*Mientras actúa el zoom de la vista tridimensional, la resolución de la imagen disminuye ligeramente para acelerar el trabajo con esta función. Al soltar el botón izquierdo del ratón, la imagen vuelve a mostrar la resolución ajustada previamente.*

Como alternativa a este método manual de zoom de la vista tridimensional, el cuadro de diálogo Viewer Options ofrece la posibilidad de modificar el zoom mediante la introducción de valores numéricos:

▶	Seleccione la opción Viewer Options en el menú View.
▶	Haga clic en el icono 3D.
▶	En el registro Navigation puede modificar el zoom modificando el valor y del campo Translation.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono 3D (página 183)



*El Leica Confocal Software dispone de tres funciones de zoom diferentes: el zoom tridimensional, el zoom electrónico y el zoom gráfico.*

& vea Zoom electrónico (página 146)

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Display (página 184)

## Visualización de la correlación de los canales de detección

Vea Paquetes de software opcional / Multicolor (página 270 y siguientes)

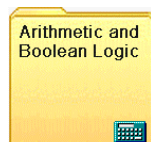


## Proceso de datos

### Proyecciones tridimensionales y animaciones de series de imágenes

(opcional, vea el capítulo Paquete de programas opcionales, 3D, página 281 y siguientes)

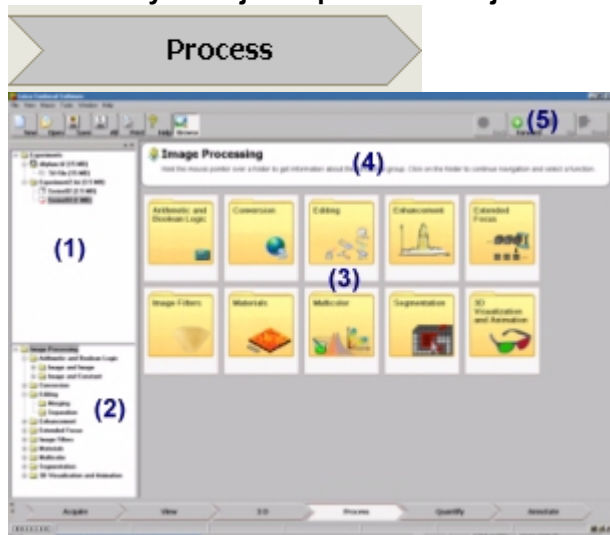
### Operaciones aritméticas y booleanas



En el presente capítulo se describen los temas siguientes

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process
- ▼ Navegación: Arithmetic and Boolean Logic\ Image and Image
- ▼ Navegación: Arithmetic and Boolean Logic\ Image and Constant

#### Estructura y manejo del paso de trabajo Process



Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

▶	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
▶	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
▶	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



▶	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
▶	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic en la tecla Back.
▶	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.
▶	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
▶	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej., Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:



▶	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
▶	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el experimento activo.

Navegación: Arithmetic and Boolean Logic\ Image and Image

### Operaciones aritméticas y lógicas con dos bloques de datos de imágenes



*El requisito para la realización de operaciones aritméticas es que ambos bloques de datos tengan las mismas dimensiones o una relación 1/n. Las mismas dimensiones quiere decir que dos imágenes deben tener el mismo formato en x e y, y dos lotes de imágenes también el mismo número de imágenes individuales (z). La relación 1/n se da cuando, por ejemplo, se compensa 1 imagen individual con cada (n) imagen del lote de imágenes.*

**Recuadro Boolean Logic**

& vea Enlaces booleanos (página 302)

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el primer bloque de datos de imagen mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	En el campo Second Source Image, seleccione el segundo bloque de datos para la operación de cálculo.
▶	Seleccione el operador AND, para enlazar las visualizaciones binarias de los píxeles de las imágenes seleccionadas con el operador lógico AND. Esto es, el píxel de la imagen resultante tiene valor 1 si ambos píxeles tienen valor 1, de lo contrario recibe valor 0.
	Mediante este operador booleano se obtienen interesantes resultados cuando se enlaza una imagen con una máscara binaria. Donde coinciden el píxel de la imagen y el de la máscara con valor 1, se muestra el píxel en la imagen resultante. Es decir, los campos definidos por la máscara se eliminan de la imagen.
▶	Seleccione el operador OR, para enlazar las visualización binarias de los píxeles de las imágenes seleccionadas con el operador lógico OR. Esto es, el píxel de la imagen resultante tiene valor 1 si al menos uno de los dos píxeles tienen valor 1, de lo contrario recibe valor 0.
	Este operador booleano ofrece interesantes resultados: 1. Cuando se enlazan dos máscaras binarias. La imagen resultante es una combinación de ambas máscaras. 2. Cuando se enlaza una imagen con una máscara binaria. La imagen resultante es una imagen en la que se inserta la máscara. 3. Cuando se enlazan dos imágenes entre sí. A diferencia de la imagen superpuesta, en ésta se superponen los valores de intensidad puros. NO se produce una adición de color RGB. & vea Representación de imagen superpuesta (página 197)
▶	Seleccione el operador XOR, para enlazar las visualización binarias de los píxeles de las imágenes seleccionadas con el operador lógico XOR. Esto es, el píxel de la imagen resultante tiene valor 1 si ambos píxeles tienen valor diferente, de lo contrario recibe valor 0.
	Mediante este operador booleano se obtienen interesantes resultados cuando se crean dos máscaras binarias de imágenes y se enlazan entre sí. El lugar en que los píxeles de ambas imágenes son diferentes, se muestra el píxel en la imagen resultante.

**Recuadro Arithmetic with World Coordinates****Recuadro Arithmetic with Pixel Values**

Cuando selecciona Arithmetic with World Coordinates se utilizan coordenadas mundiales, por ejemplo, la posición z, el tiempo o la longitud de onda para las operaciones aritméticas. Si ha seleccionado Arithmetic with Pixel Values, se utilizan los valores grises normalizados del intervalo entre 0 y 255 para 8 bits, o bien, entre 0 y 4095 para 12 bits.

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el primer bloque de datos de imagen mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	En el campo Second Source Image, seleccione el segundo bloque de datos para la operación de cálculo.
▶	Seleccione Addition para sumar los valores de intensidad de las imágenes seleccionadas según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{Píxel (First Source Image)} + \text{Píxel (Second Source Image)}$ .
▶	Seleccione Subtraction para sustraer los valores de intensidad de las imágenes seleccionadas según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{Píxel (First Source Image)} - \text{Píxel (Second Source Image)}$ .
▶	Seleccione Multiplication para multiplicar los valores de intensidad de las imágenes seleccionadas según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{Píxel (First Source Image)} \times \text{Píxel (Second Source Image)}$ .
▶	Seleccione Division para dividir los valores de intensidad de las imágenes seleccionadas según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{Píxel (First Source Image)} / \text{Píxel (Second Source Image)}$ .
▶	Seleccione Min para utilizar en la imagen resultante siempre el valor mínimo para cada píxel de

	las imágenes seleccionadas según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{MIN (Píxel (First Source Image) x Píxel (Second Source Image))}$ .
▶	Seleccione Max para utilizar en la imagen resultante siempre el valor máximo para cada píxel de las imágenes seleccionadas según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{MAX (Píxel (First Source Image) x Píxel (Second Source Image))}$ .
▶	Seleccione Average para utilizar en la imagen resultante siempre el valor medio para cada píxel de las imágenes seleccionadas según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = 1/2 \times (\text{Píxel (First Source Image)} + \text{Píxel (Second Source Image)})$ .
▶	Si selecciona la opción 12 Bit Output en el campo Output, cada píxel se codifica con 12 bits en la imagen resultante, es decir, el almacenamiento de los valores resultantes se realiza en una gama de valores [0..4095].
▶	Haga clic en la casilla de selección Absolute Value si desea utilizar las cantidades de los datos resultantes. De esta forma, los resultados negativos se convierten en positivos.

**Sólo para Arithmetic with Pixel Values**

▶	Haga clic en la casilla de selección Cut at Maximum para excluir los valores que tras el cálculo quedan fuera de la gama de valores. Los valores por debajo de 0 se convierten en 0. Todos los valores por encima de 255 en imágenes de 8 bits o de 4095 en imágenes de 12 bits se convierten en los valores 255 ó 4095 respectivamente.
▶	Haga clic en la casilla de selección Rescale para normalizar los valores de intensidad de la imagen con los valores máximos posibles. Se determinan los valores de los extremos. Al valor mínimo se le asigna 0. Al valor máximo se le asigna, en las imágenes de 8 bits, el valor 255 y, en las imágenes de 12 bits, el valor 4095. Esto garantiza que los valores de píxel calculados de la imagen resultante permanecen dentro de cada gama de valores.

**Navegación: Arithmetic and Boolean Logic\ Image and Constant****Operaciones aritméticas y lógicas con un bloque de datos de imagen y una constante**

*El requisito para la realización de operaciones aritméticas es que ambos bloques de datos tengan las mismas dimensiones o una relación 1/n. Las mismas dimensiones quiere decir que dos imágenes deben tener el mismo formato en x e y, y dos lotes de imágenes también el mismo número de imágenes individuales (z). La relación 1/n se da cuando, por ejemplo, se compensa 1 imagen individual con cada (n) imagen del lote de imágenes.*

**Recuadro Boolean Logic**

& vea Enlaces booleanos (página 302)

▶	En el campo Constant, introduzca un valor para la constante. En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	Seleccione el operador AND, para enlazar las visualizaciones binarias de los píxeles de la constante y de la imagen con el operador lógico AND. Esto es, el píxel de la imagen resultante tiene valor 1 si ambos píxeles tienen valor 1, de lo contrario recibe valor 0.
▶	Seleccione el operador OR, para enlazar las visualizaciones binarias de los píxeles de la constante y de la imagen con el operador lógico OR. Esto es, el píxel de la imagen resultante tiene valor 1 si al menos uno de los dos píxeles tienen valor 1, de lo contrario recibe valor 0.
▶	Seleccione el operador XOR, para enlazar las visualizaciones binarias de los píxeles de la constante y de la imagen con el operador lógico XOR. Esto es, el píxel de la imagen resultante tiene valor 1 si ambos píxeles tienen valor diferente, de lo contrario recibe valor 0.

**Recuadro Arithmetic with World Coordinates****Recuadro Arithmetic with Pixel Values**

Cuando selecciona Arithmetic with World Coordinates se utilizan coordenadas mundiales, por ejemplo, la posición z, el tiempo o la longitud de onda para las operaciones aritméticas. Si ha seleccionado Arithmetic with Pixel Values, se utilizan los valores grises normalizados del intervalo entre 0 y 255 para 8 bits, o bien, entre 0 y 4095 para 12 bits.

▶	En el campo Constant, introduzca un valor para la constante. En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	En el campo Constant, introduzca un valor para la constante. El bloque de datos de imagen pasa a ser automáticamente el bloque activo en el visor Viewer.
▶	Seleccione Addition para sumar la constante, píxel a píxel, a los valores de intensidad de la imagen seleccionada según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{Píxel (Source Image)} + \text{Constante}$ .
▶	Seleccione Subtraction para sustraer la constante, píxel a píxel, de los valores de intensidad de la imagen seleccionada según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{Píxel (Source Image)} - \text{Constante}$ .
▶	Seleccione Multiplication para multiplicar la constante, píxel a píxel, por los valores de intensidad de la imagen seleccionada según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{Píxel (Source Image)} \times \text{Constante}$ .
▶	Seleccione Division para dividir la constante, píxel a píxel, entre los valores de intensidad de la imagen seleccionada según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{Píxel (Source Image)} / \text{Constante}$ .
▶	Seleccione Min para utilizar en la imagen resultante el valor mínimo de la imagen seleccionada y la constante según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{MIN (Píxel (Source Image); constante)}$ .
▶	Seleccione Max para utilizar en la imagen resultante el valor máximo de la imagen seleccionada y la constante según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = \text{MAX (Píxel (Source Image); constante)}$ .
▶	Seleccione Average para utilizar en la imagen resultante el valor medio de la imagen seleccionada y la constante según la fórmula: $\text{Píxel (imagen resultante)} = 1/2 \times (\text{Píxel (Source Image)} + \text{constante})$ .
▶	Si selecciona la opción 12 Bit Output en el campo Output, cada píxel se codifica con 12 bits en la imagen resultante, es decir, el almacenamiento de los valores resultantes se realiza en una gama de valores [0..4095].
▶	Haga clic en la casilla de selección Absolute Value si desea utilizar las cantidades de los datos resultantes. De esta forma, los resultados negativos se convierten en positivos.

**Sólo para Arithmetic with Pixel Values**

▶	Haga clic en la casilla de selección Cut at Maximum para excluir los valores que tras el cálculo quedan fuera de la gama de valores. Los valores por debajo de 0 se convierten en 0. Todos los valores por encima de 255 en imágenes de 8 bits o de 4095 en imágenes de 12 bits se convierten en los valores 255 ó 4095 respectivamente.
▶	Haga clic en la casilla de selección Rescale para normalizar los valores de intensidad de la imagen con los valores máximos posibles. Se determinan los valores de los extremos. Al valor mínimo se le asigna 0. Al valor máximo se le asigna, en las imágenes de 8 bits, el valor 255 y, en las imágenes de 12 bits, el valor 4095. Esto garantiza que los valores de píxel calculados de la imagen resultante permanecen dentro de cada gama de valores.

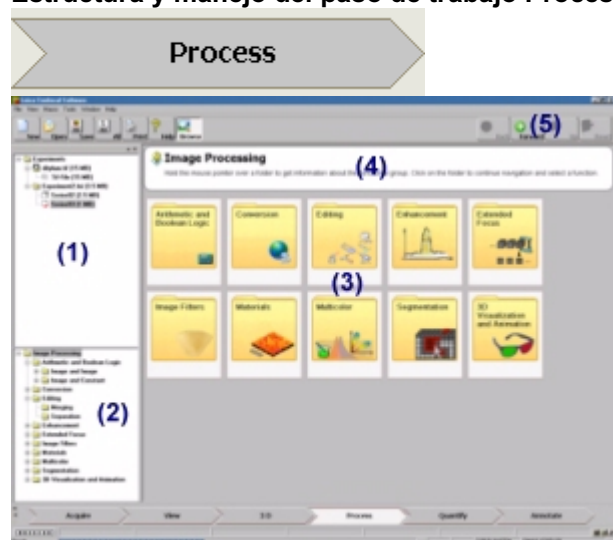
## Conversión de la resolución en bits de las imágenes



En el presente capítulo se describen los temas siguientes

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process
- ▼ Navegación: Conversion\ Bit Depth Conversion

### Estructura y manejo del paso de trabajo Process



Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

▶	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
▶	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
▶	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



▶	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
▶	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic en la tecla Back.
▶	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.

▶	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
▶	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej., Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:



▶	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
▶	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el experimento activo.

### Navegación: Bit Depth Conversion

#### Conversión de imágenes de profundidad de 8 bits a 12 bits y viceversa

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un doble clic en el archivo.
▶	En el campo Source se muestra la profundidad en bits de la imagen seleccionada.
▶	En el campo New Resolution seleccione la profundidad a la que desea convertir el bloque de datos de la imagen.

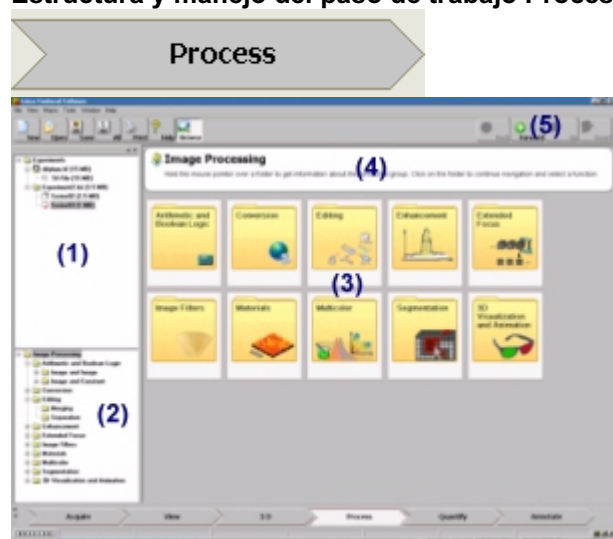
## Unión y separación de cortes de imágenes, imágenes y series de imágenes



En el presente capítulo se describen los temas siguientes

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process
- ▼ Navegación: Editing\ Merging
- ▼ Navegación: Editing\ Separation

### Estructura y manejo del paso de trabajo Process





Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

▶	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
▶	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
▶	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



▶	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
▶	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic en la tecla Back.
▶	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.
▶	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
▶	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej., Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:



▶	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
▶	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el experimento activo.

### Navegación: Editing\ Merging


**Unión de varias imágenes o varios bloques de datos para formar una imagen o un bloque de datos nuevo**

### Registro Amplitude


**Adaptación de resoluciones de bits diferentes y otras configuraciones para el cálculo de la imagen resultante**


▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el primer bloque de datos de imagen mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	En el campo Second Source Image, seleccione el segundo bloque de datos para la operación de cálculo.
▶	En el campo Amplitude Image 1/2 Min. ajuste el valor de intensidad mínimo. En los bloques de datos con valores grises este valor es "0". En los bloques de datos con coordenadas mundiales



	aparece aquí el mínimo real. El mínimo puede ajustarse para permitir que los bloques de datos con escalas diferentes se adapten entre sí.
	Si se une un bloque de datos con un intervalo pequeño de valores de intensidad a un bloque de datos con un campo de valores mayor, el primero se visualiza más oscuro que el segundo. Mediante la adaptación del mínimo de ambos bloques, éstos se escalan de forma que sus valores de intensidad aparecen a partes iguales en la imagen unida.
▶	En el campo Amplitude Image 1/2 Max. ajuste el valor de intensidad máximo. En los bloques de datos con valores grises, este valor es "255" con datos de 8 bits, o bien "4095" con datos de 12 bits. En los bloques de datos con coordenadas mundiales aparece aquí el máximo real. El máximo puede ajustarse para permitir que los bloques de datos con escalas diferentes se adapten entre sí.
	Si se une un bloque de datos con un intervalo pequeño de valores de intensidad a un bloque de datos con un campo de valores mayor, el primero se visualiza más oscuro que el segundo. Mediante la adaptación del máximo de ambos bloques, éstos se escalan de forma que sus valores de intensidad aparecen a partes iguales en la imagen unida.
▶	En el campo Result se define la resolución de la imagen unida. La resolución de 8 bits puede visualizarse con 256 grados de intensidad diferentes. La resolución de 12 bits puede visualizarse con 4096 grados de intensidad diferentes.
▶	Si se ha seleccionado la opción Maximum Value en el campo Result, se utiliza el píxel más claro de las dos imágenes que van a unirse para el cálculo del píxel correspondiente en la imagen unida.
▶	Si se ha seleccionado la opción Average en el campo Result, se utiliza la media aritmética de las dos imágenes que van a unirse para el cálculo del píxel correspondiente en la imagen unida.
	 <p><i>Si se utilizan dos imágenes muy diferentes mediante el procedimiento de valor medio para una imagen de unión, el fondo negro de la imagen provoca una reducción de la luminosidad.</i></p>

**Registro x, y, z, t, la****Definición de la disposición espacial de las imágenes de salida en la imagen resultante ANTES de la unión**

▶	Para los campos Image 1 e Image 2 introduzca en el campo de entrada Shift la posición ( x / y / z / t / λ ) de la imagen de salida en la imagen de unión. En general, este valor es "0". Un valor > 0 tiene sentido si, por ejemplo, se desea visualizar una reducción de una de las imágenes de salida en una posición determinada de la otra. Esta función también tiene sentido en las series de imágenes laterales como las utilizadas, por ejemplo, en trazados biológicos. & vea Ejemplo del desplazamiento de una imagen (página <b>Error! Bookmark not defined.</b> )
▶	Para los campos Image 1 e Image 2 introduzca en el campo de entrada Size el tamaño de las dimensiones ( x / y / z / t / λ ) de la imagen de salida en la imagen de unión.
▶	Si selecciona la casilla de selección Append el segundo bloque de datos se coloca junto al primero. La dirección de colocación depende de si se ha seleccionado la casilla de selección del registro x, y o z. La selección simultánea de esta función en los diferentes registros para x, y y z, desplaza la segunda imagen de salida en una dimensión o en varias.
▶	En el campo Result puede indicar a partir de qué píxel finaliza la imagen de unión.
	 <p><i>El motivo de esta definición es: Para la determinación de las dimensiones de la imagen de unión se utilizan longitudes absolutas. Si los dos bloques de datos que se desea unir tienen la misma longitud pero un número de píxeles diferente (debido a un formato de barrido distinto), debe decidirse si se utilizará el número de píxeles o la longitud total resultante para la imagen de</i></p>

	unión.
►	Si selecciona la opción Best Fit en el campo Result, el software utiliza el procedimiento siguiente para el cálculo de la imagen resultante: Para ambas imágenes se calcula la anchura correspondiente a un solo píxel: $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ . Si la diferencia de este tamaño entre ambas imágenes es menor que un factor 2, en este proceso se utiliza la resolución de imagen mayor (es decir, el menor valor $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ ) para la imagen resultante. Si la desviación de la resolución entre las imágenes de salida es mayor que un factor 2, se utiliza la resolución más pequeña (es decir, el valor $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ mayor) para el cálculo de la imagen resultante. El número de píxeles de la imagen resultante (Element Number) dividido entre la longitud total tiene como resultado la resolución de la imagen.
	 <p><i>El motivo de esta definición es: Para la determinación de las dimensiones de la imagen de unión se utilizan longitudes absolutas. Si los dos bloques de datos que se desea unir tienen la misma longitud pero un número de píxeles diferente (debido a un formato de barrido distinto), debe decidirse si se utilizará el número de píxeles o la longitud total resultante para la imagen de unión.</i></p>

& vea Selección de formato de barrido (página 149)

### Registro ch

#### Definición de la unión de imágenes con diferente número de canales de detección

►	Si desea unir dos imágenes o bloques de datos con diferente número de canales de detección, en el campo Image 1 defina a partir de qué número de canal de la imagen de unión deben insertarse los canales de la imagen de salida 1.
►	Si desea unir dos imágenes o bloques de datos con diferente número de canales de detección, en el campo Image 2 defina a partir de qué número de canal de la imagen de unión deben insertarse los canales de la imagen de salida 2.
►	Si selecciona la casilla de selección, ambas imágenes de salida se distribuyen entre los distintos canales de la imagen de unión.

**Navegación: Editing\ Separation****Borrado de imágenes o cortes de imágenes de un bloque de datos**

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
---	--

**Campo Dimension Selection**

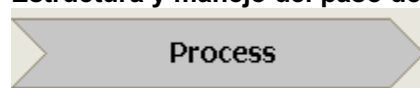
▶	En el campo de entrada ch se visualizan los canales de detección de la imagen o de la serie de imágenes. Seleccione los canales de detección en los que debe borrarse el detalle de la imagen o la imagen individual.
▶	En el campo de entrada y se indica el número de píxeles de y dependientes del formato de barrido. En los campos de entrada Start y y End y introduzca el número de píxeles que deben borrarse. Mediante la tecla de pantalla R (Reset) puede deshacerse esta introducción.
▶	En el campo de entrada x se indica el número de píxeles de x dependientes del formato de barrido. En los campos de entrada Start x y End x introduzca el número de píxeles que deben borrarse. Mediante la tecla de pantalla R (Reset) puede deshacerse esta introducción.
▶	En el campo de entrada z se indica el número de imágenes individuales de la serie de imágenes. En los campos de entrada Start z y End z introduzca el número de imágenes que deben borrarse. Mediante la tecla de pantalla R (Reset) puede deshacerse esta introducción.
▶	En el campo de entrada z / y / x puede introducirse un intervalo dentro de una dimensión. Si, por ejemplo, introduce un 2 en el campo de entrada Step z, siempre se corta una imagen de cada 2.

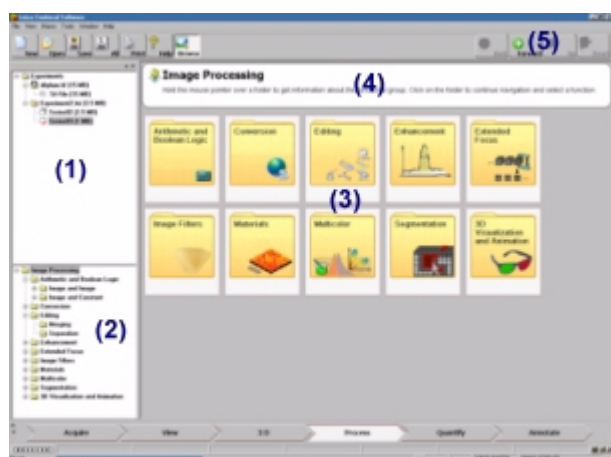
**Ejemplos**

▶	Si desea cortar todas las imágenes de un canal de detección de una serie de imágenes, en el campo de entrada ch haga clic en el canal que debe borrarse sin modificar los valores de los campos de entrada de las otras dimensiones.
▶	Si desea cortar imágenes individuales de forma completa de una serie de imágenes, en los campos de entrada Start z y End z introduzca los números correspondientes sin modificar los valores de los campos de entrada de las otras dimensiones.
▶	Si desea cortar un detalle en todas las imágenes de una serie, en los campos de entrada Start x, End x Start y y End y defina el tamaño de dicho detalle sin modificar los valores de los campos de entrada de las otras dimensiones.

**Ajuste de la luminosidad, el contraste y la corrección Gamma****En el presente capítulo se describen los temas siguientes**

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process
- ▼ Navegación: Enhancement\ Contrast and Brightness
- ▼ Navegación: Enhancement\ Gamma Correction

**Estructura y manejo del paso de trabajo Process**



Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

►	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
►	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
►	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



►	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
►	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic en la tecla Back.
►	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.
►	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
►	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej., Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:



►	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
►	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el

	experimento activo.
--	---------------------

**Navegación: Enhancement\ Brightness and Contrast****Ajuste de la luminosidad y el contraste**

Si modifica la luminosidad de la imagen se aclaran en la misma medida los puntos claros, los oscuros y los valores medios de luminosidad de la imagen. A través del contraste se modifica la relación entre los puntos claros y oscuros de la imagen.

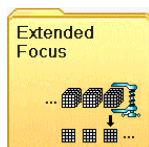
▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	Para imágenes de varios canales seleccione la casilla Lock Channels para realizar simultáneamente todas las modificaciones en todos los canales y con el mismo alcance.
▶	Para imágenes que no aprovechan todo el margen dinámico seleccione la casilla Linear Model. Si está seleccionada, existe una relación lineal entre la luminosidad de la imagen de salida y la de la imagen resultante. Si desea averiguar si una imagen aprovecha todo el margen dinámico disponible, cree un histograma de la imagen. En el caso de que el histograma no alcance toda la gama de intensidad (vea valores mínimo y máximo), el margen dinámico no se aprovecha por completo. & vea Cálculo de un histograma (página 236) En el caso de que tenga imágenes en las que desee destacar más los valores medios de luminosidad, seleccione el modelo no lineal (no seleccione la casilla Linear Model).
▶	En el campo Channel Adjustment modifique la luminosidad de la imagen resultante con el botón deslizante Brightness. Si este botón está colocado exactamente en el centro, la luminosidad de la imagen de salida es igual que la de la imagen resultante. Si se desplaza desde el centro hacia la derecha, la imagen resultante es más clara que la de salida. Si se desplaza desde el centro hacia la izquierda, la imagen resultante es más oscura que la de salida.
▶	En el campo Channel Adjustment modifique el contraste de la imagen resultante con el botón deslizante Contrast. Si este botón está colocado exactamente en el centro, el contraste de la imagen de salida es igual que el de la imagen resultante. Si se desplaza desde el centro hacia la derecha, la imagen resultante tiene más contraste que la de salida. Si se desplaza desde el centro hacia la izquierda, la imagen resultante tiene menos contraste que la de salida.

**Navegación: Enhancement\ Gamma Correction****Ajuste de los valores medios de luminosidad (corrección Gamma)**

Mediante la corrección Gamma, la implementación del contraste de la imagen de salida afecta de forma no lineal en el contraste de la imagen resultante. La corrección Gamma afecta sólo a los valores medios de luminosidad de una imagen, mientras las zonas muy claras o muy oscuras no varían.

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	Para imágenes de varios canales seleccione la casilla Lock Channels para realizar simultáneamente todas las modificaciones en todos los canales y con el mismo alcance.
▶	En el campo Channel Adjustment modifique los valores medios de luminosidad de la imagen resultante con el botón deslizante. Si este botón está colocado exactamente en el centro, la luminosidad de la imagen de salida es igual que la de la imagen resultante. Si se desplaza desde el centro hacia la derecha, los valores medios de luminosidad se aclaran. Si se desplaza desde el centro hacia la izquierda, los valores medios de luminosidad se oscurecen.

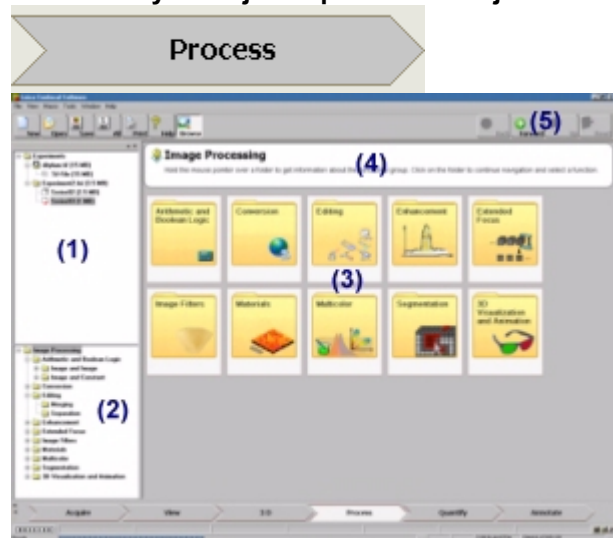
## Ampliación del enfoque mediante proyecciones de lotes de imágenes en una imagen individual



En el presente capítulo se describen los temas siguientes

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process
- ▼ Navegación: Extended Focus\ Average Projection, Maximum Projection, Transparent Projection

### Estructura y manejo del paso de trabajo Process



Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

▶	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
▶	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
▶	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



▶	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
▶	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic

	en la tecla Back.
▶	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.
▶	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
▶	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej., Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:



▶	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
▶	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el experimento activo.

### Navegación: Extended Focus\ Average Projection, Maximum Projection, Transparent Projection

**Creación de una proyección a lo largo del eje ortogonal (eje z en cortes horizontales xy y eje y en cortes verticales xz)**

& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	Seleccione uno de los tres tipos de proyección: proyección de valor medio (Average Projection), proyección de valor máximo (Maximum Projection) o proyección transparente (Transparent Projection).

### Registro Options

▶	En el campo Projection Direction determine sobre qué dimensión se realiza la proyección. Seleccione [z] en series espaciales, [t] en series temporales o [ $\lambda$ ] en series lambda, para crear la proyección de todas las imágenes de un canal de detección, por ejemplo, desde la imagen 1 hasta la 10 del canal de detección 1. Seleccione [ch], para crear una proyección de una imagen determinada en todos los canales de detección, por ejemplo, de la imagen 1 del canal 1 y la imagen 1 del canal 2.
▶	Haga clic en Rescale en el campo Options para normalizar los valores de intensidad de la imagen con los valores máximos posibles durante la creación de la proyección. De este modo se garantiza que los valores grises calculados de la proyección permanecen dentro de la gama de valores, por ejemplo, entre 0 y 255 para 8 bits. Esto permite aclarar las imágenes oscuras.
▶	Si hace clic en Invert en el campo Options se refleja el eje de proyección. El cálculo de la proyección se realiza en dirección contraria. Se trata de una función especialmente interesante para los microscopios inversos, para equilibrar el cálculo de la proyección con la trayectoria de rayos inversa del láser.
▶	Mueva la corredera del campo Threshold para definir un valor umbral. Los valores de intensidad que están por debajo de este valor no se tienen en cuenta para la creación de la proyección.

### Registro Factor (sólo en la proyección transparente)

& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

▶	El registro Factor sólo aparece cuando se ha seleccionado la proyección transparente. Mediante la corredera puede variar el factor de transparencia $\alpha$ . Cuanto más alto es, con mayor fuerza influyen los valores de intensidad de los niveles inferiores del lote de imágenes en la proyección.
---	---





*Los tres tipos de proyección también pueden activarse mediante las teclas correspondientes (Fix Max / Fix Avg / Fix Trans). Si la función se activa mediante la tecla, la proyección es sólo una visualización de pantalla temporal y puede eliminarla mediante la tecla Original.*

- & vea Proyección de valor máximo de un lote de imágenes con eje de proyección invariable (página 205)
- & vea Proyección de valor medio de un lote de imágenes con eje de proyección invariable (página 206)
- & vea Proyección transparente de un lote de imágenes con eje de proyección invariable (página 207)

## Filtro lineal y filtro morfológico

(opcional, vea el capítulo Paquete de programas opcionales, 3D, página 281 y siguientes, o bien, Materiales, página 256)

## Nivelado y filtrado de capturas superficiales

(opcional, vea el capítulo Paquete de programas opcionales, Materiales, página 256 y siguientes)

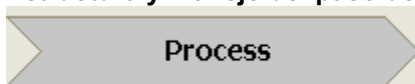
## Identificación y separación de señales fluorescentes superpuestas



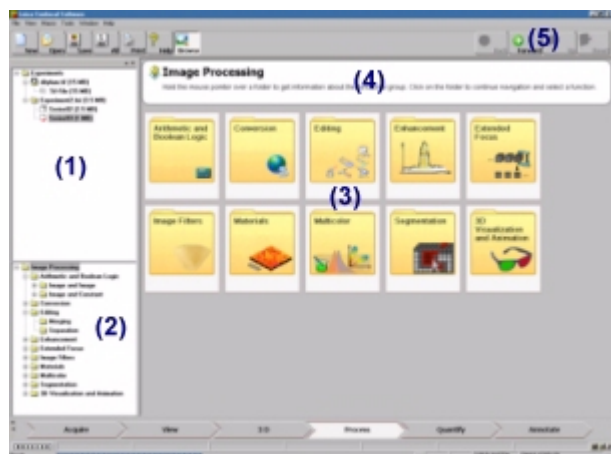
En esta página se encuentran los temas siguientes

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process
- ▼ ¿Para qué sirven las herramientas de la reconstrucción en colores (Dye Finder)?
- ▼ Principio de la separación de tinturas adaptable (Adaptive Dye Separation)
- ▼ Navegación: Dye Finder\ Adaptive Dye Separation (Strong) / (Weak)
- ▼ Navegación: Dye Finder\ Manual Dye Separation
- ▼ Principio de la separación de tinturas espectral (Spectral Dye Separation)
- ▼ Navegación: Dye Finder\ Spectral Dye Separation
- ▼ Navegación: Dye Finder\ Dimensionality Reduction

### Estructura y manejo del paso de trabajo Process







Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

▶	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
▶	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
▶	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



▶	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
▶	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic en la tecla Back.
▶	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.
▶	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
▶	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej. Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:

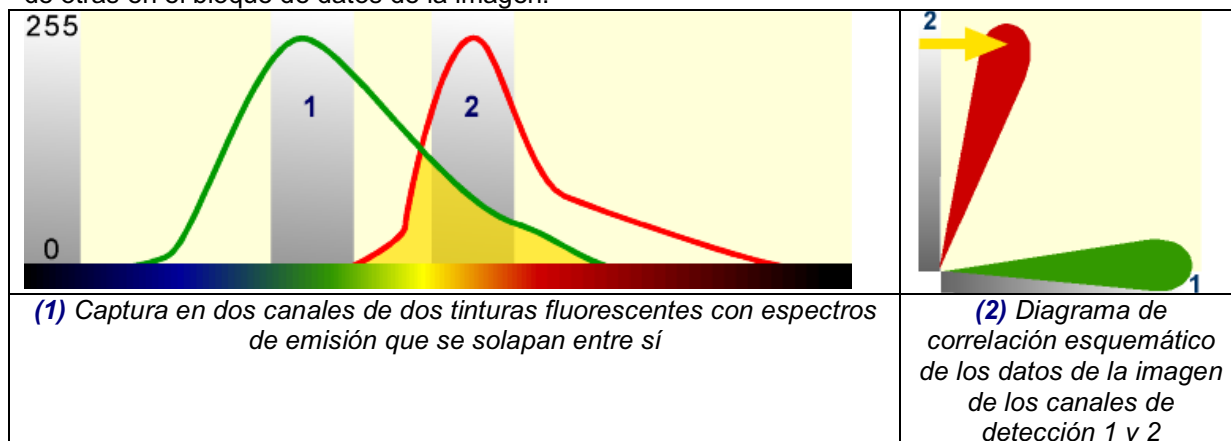


▶	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
▶	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el experimento activo.

### ¿Para qué sirven las herramientas de la reconstrucción en colores (Dye Finder)?

Muchas de las tinturas fluorescentes utilizadas en la microscopía fluorescente emiten fluorescencia en gamas de longitud de onda muy próximas entre sí, de forma que los espectros de emisión de las señales se solapan entre sí. Si se marcan preparados con estas tinturas y se detectan simultáneamente, puede producirse un solapamiento de las señales fluorescentes. Como consecuencia de esta denominada diafonía óptica varias señales fluorescentes se recogen en un

solo canal de detección. Tras la captura de la imagen, estas señales no pueden diferenciarse unas de otras en el bloque de datos de la imagen.



La ilustración (1) muestra el problema de la diafonía. Para una captura de imagen en dos canales de detección se utilizan dos tinturas fluorescentes cuyos espectros de emisión se solapan. Mientras en el canal 1 sólo se detecta la emisión de la tintura fluorescente verde, en el canal 2 se solapan las señales fluorescentes de las tinturas roja y verde. Como consecuencia, no es posible descifrar con claridad si los datos de la imagen recogidos en el canal 2 proceden de la señal fluorescente verde o roja.

La diafonía de las señales fluorescentes también puede apreciarse en un diagrama de correlación. Los diagramas de correlación ilustran la distribución conjunta de dos variables, en la ilustración (2) estas variables son las señales fluorescentes en los canales de detección 1 y 2. La nube de puntos de la tintura fluorescente roja se inclina en la dirección de la diagonal de superficie del diagrama ya que en el canal 2 también se ha recogido una parte determinada de la tintura de fluorescencia verde. El Leica Confocal Software ofrece un diagrama de correlación de este tipo con el denominado citofluorograma para una primera interpretación del bloque de datos de la imagen. El citofluorograma permite visualizar la distribución conjunta de bloques de datos de imágenes con hasta tres canales de detección (tinturas fluorescentes).

& vea Multicolor / Bidimensional Creación de citofluorograma (página 270)

Las funciones de la reconstrucción en colores (Dye Finder) permiten separar señales fluorescentes solapadas tras la captura de la imagen con ayuda de diferentes procesos matemáticos:

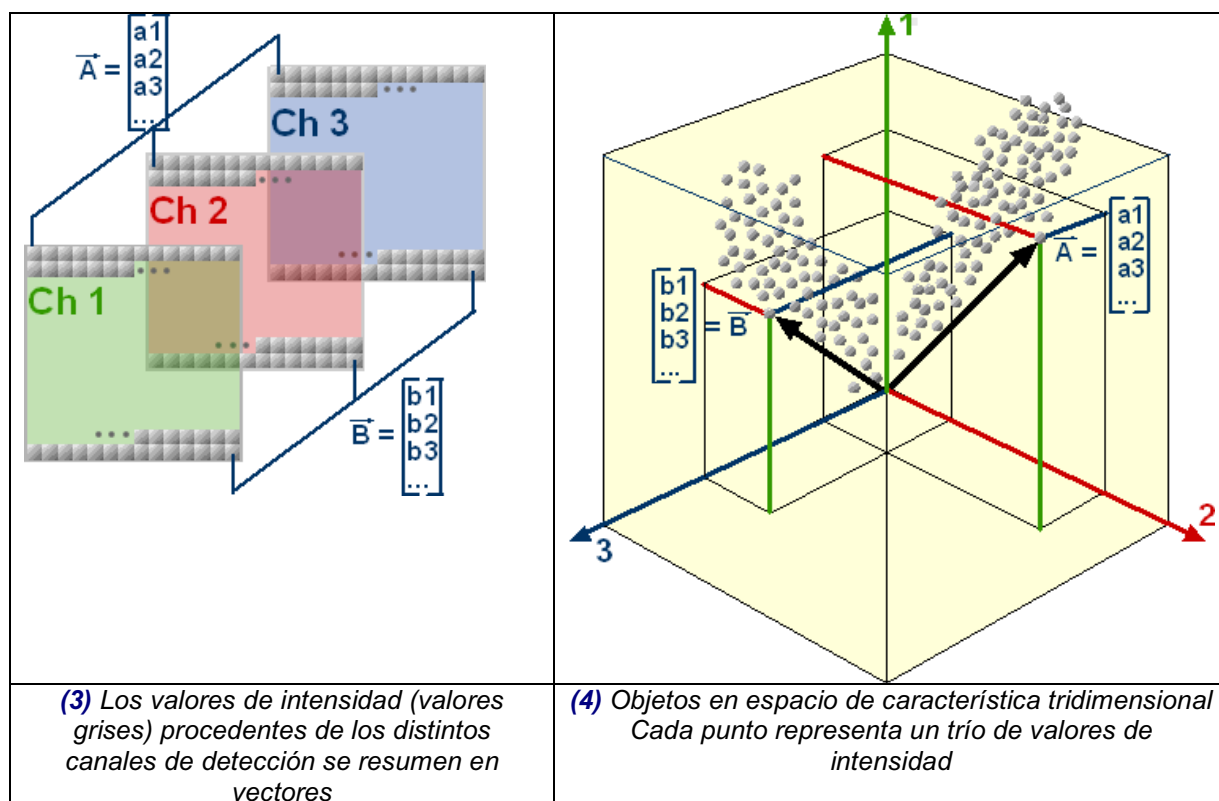
Función	Descripción
Adaptive Dye Separation	El algoritmo de la separación de tinturas adaptable utiliza un análisis de conglomerados para la identificación y separación de señales fluorescentes. No se precisan <u>datos de referencia</u> de las tinturas fluorescentes utilizadas para la creación del bloque de datos de la imagen. Esta función puede aplicarse a series de imágenes espaciales, temporales y series Lambda.
Spectral Dye Separation	El algoritmo de la separación de tinturas espectral realiza una descomposición de valores singulares píxel a píxel. Se precisan los <u>datos de referencia</u> de los espectros de emisión de las tinturas fluorescentes utilizadas para la creación del bloque de datos de la imagen. Esta función sólo se aplica a series Lambda.
Dimensionality Reduction	El algoritmo de la reducción de dimensionalidad se basa en un análisis de componentes principales. Mediante esta función pueden reducirse series Lambda de varias dimensiones a un menor número de dimensiones, es decir, imágenes individuales. Esta función sólo se aplica a series Lambda.
Manual Dye Separation	Esta función permite la introducción manual de factores (coeficientes de matriz) para reducir o incrementar la información de la señal en cada canal de detección.

### Principio de la separación de tinturas adaptable (Adaptive Dye Separation)

Mediante el algoritmo de la separación de tinturas adaptable pueden identificarse y separarse señales fluorescentes en un bloque de datos sin conocer las tinturas utilizadas. Esto es posible

gracias al denominado análisis de conglomerados. Un análisis de conglomerados es un proceso matemático para la distribución de objetos en grupos homogéneos (Cluster). La distribución en grupos se realiza mediante una variable, es decir, una característica que describe a todos los objetos analizados. Un grupo es homogéneo cuando sus objetos son bastante parecidos en relación a la variable (la característica).

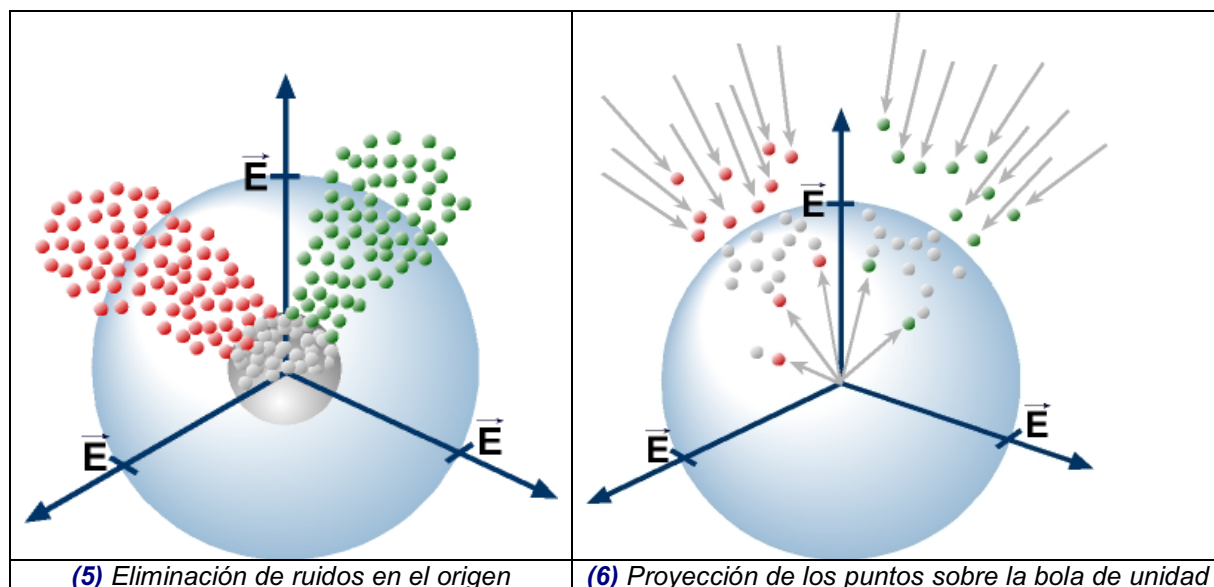
Este método de clasificación matemático se aplica al problema de las señales fluorescentes que se solapan. Los objetos que se desea clasificar son los valores de intensidad (valores grises del píxel) capturados en diferentes canales de detección (gamas de longitud de onda). Si se representan todas las combinaciones de estos valores de intensidad en el denominado espacio de característica, existe la posibilidad de clasificarlos en grupos, es decir, asignarlos a una tinte fluorescente. Como variable de característica se utiliza la altura del valor de intensidad en cada canal de detección.



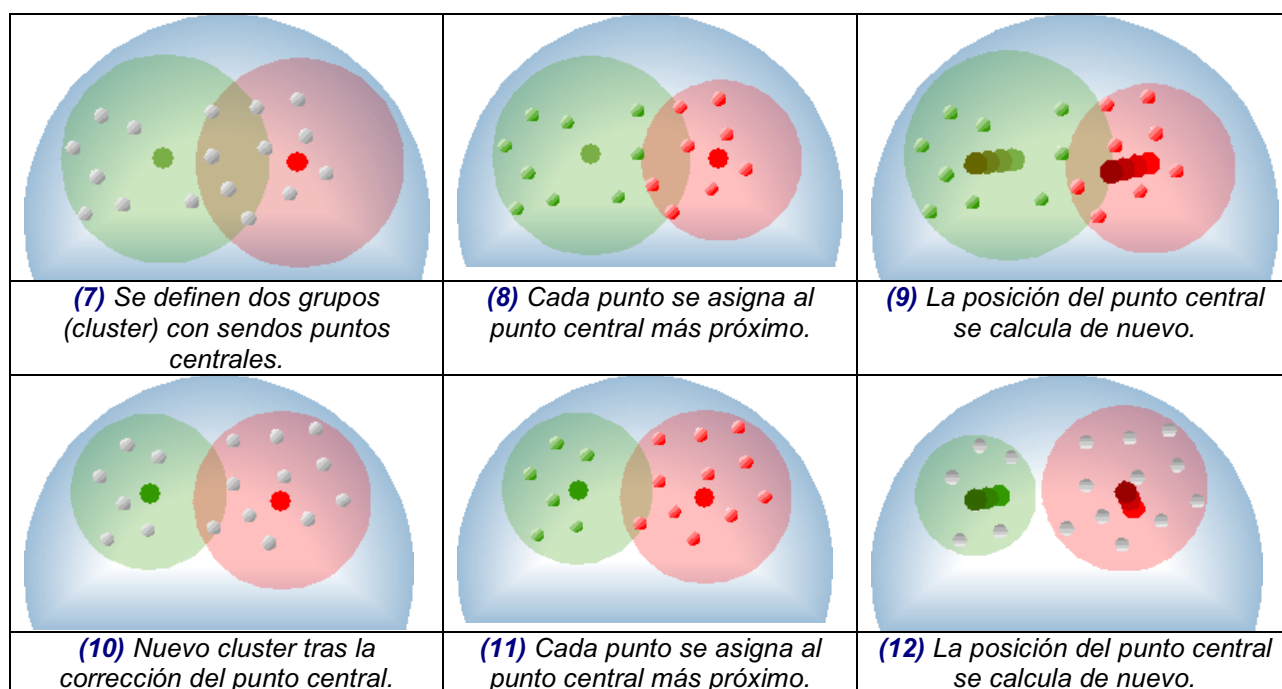
Para la aplicación de análisis de conglomerados se representan las combinaciones de valores de intensidad como puntos en el espacio de característica (4). A diferencia del espacio "espacial" con sus tres ejes espaciales, el espacio de característica es un espacio geométrico cuyas dimensiones se crean a partir de variables. En el caso de los bloques de datos de imágenes analizados en la microscopía de fluorescencia, los ejes del espacio de característica son los valores de intensidad medidos en los diferentes canales de detección (gamas de longitud de onda) (3). Cada punto del espacio de característica se caracteriza mediante un vector.

#### Pasos individuales del análisis de conglomerados

Los dos primeros pasos del análisis de conglomerados permiten la reducción de la cantidad de datos y, de esta forma, la aceleración del cálculo. En el primer paso se eliminan aquellos puntos que se encuentran muy cerca del origen del espacio de característica (5). Estos datos que se encuentran en la gama de valores inferiores son ruidos, que no aportan ninguna información sobre el preparado y por ello pueden eliminarse. El segundo paso consiste en proyectar los puntos diseminados por el espacio de característica sobre la bola de unidad, una bola con radio 1 (6).



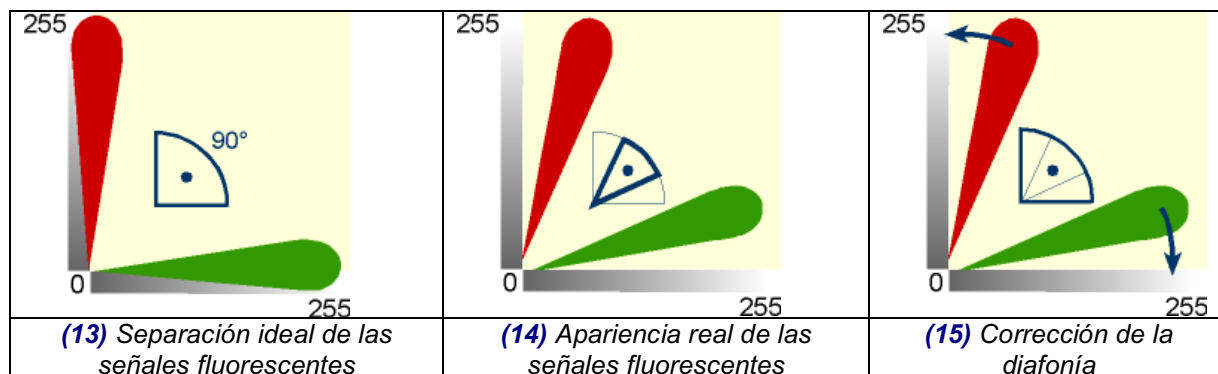
A continuación se lleva a cabo el análisis de conglomerados real. El objetivo de este análisis es distinguir tantos grupos de puntos en el espacio de característica como tinturas fluorescentes se han utilizado en la creación del bloque de datos de la imagen. La medida con la que se determina el parecido o la diferencia entre los puntos es la distancia euclídea (la suma de los cuadrados de las distancias) de los puntos a los puntos medios calculados. Con esta medida se buscan grupos de puntos en los cuales la distancia de cada punto con el centro de su grupo es menor que al centro de los otros grupos:



En primer lugar se decide un número determinado de cluster con punto central (7). Este se indica en la interfaz de usuario antes del cálculo. A continuación, cada punto del espacio de característica se asigna al punto central más próximo (8). Para cada cluster se calcula un nuevo punto central (9). Todos los puntos se asignan de nuevo al punto central más cercano (11) y se calcula el punto central del nuevo cluster (12). Este proceso se repite constantemente hasta que los grupos dejan de variar.

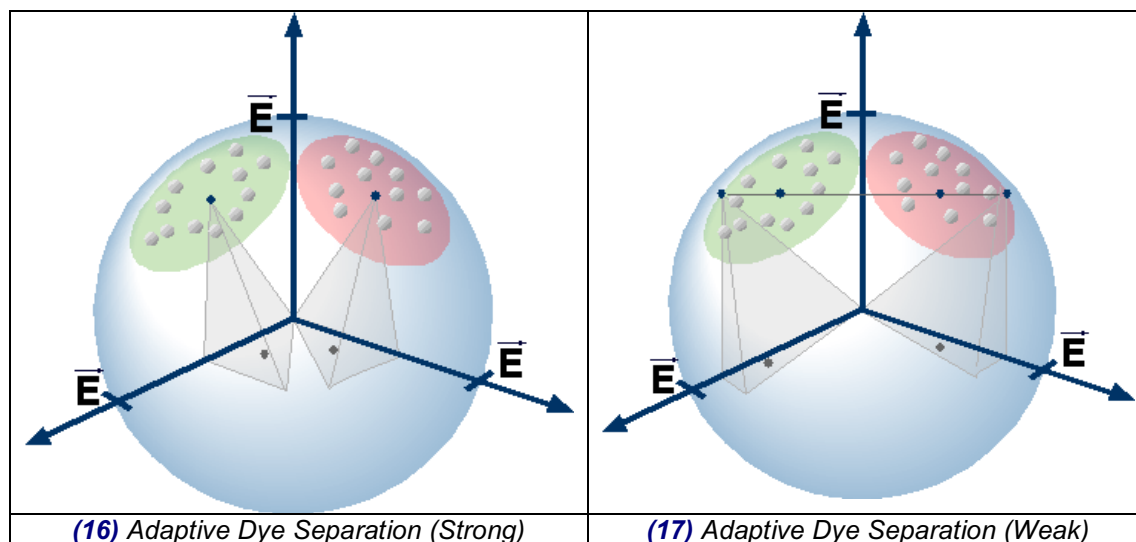
### Corrección de la diafonía

Una vez aisladas las tinturas fluorescentes en grupos separados de puntos del espacio de característica mediante el análisis de conglomerados se procede a corregir la diafonía de las señales fluorescentes. En el espacio de características, la superposición se percibe en el ángulo de la nube de puntos con los ejes de dicho espacio.



Desde el punto de vista matemático, las nubes de puntos de dos variables totalmente independientes, es decir, no correlativas del espacio de características se encuentran en ángulo recto de  $90^\circ$  entre sí **(13)**. No obstante, los bloques de datos de imagen con señales fluorescentes superpuestas tienen nubes de puntos que, debido a los datos de imagen correlativos oscilan en la dirección de las diagonales espaciales. Cuanto más agudo sea el ángulo de las nubes de puntos, mayor es la correlación entre las señales fluorescentes **(14)**. Así pues, para separar las señales fluorescentes superpuestas, las nubes de puntos deben volver a situarse matemáticamente en ángulo recto.

Para ello es preciso determinar un punto de referencia para cada cluster cuya ubicación se encuentra en el espacio del ángulo de referencia.



El ángulo resultante de las rectas correspondientes vuelve a añadirse al cómputo o a sustraerse de cada punto de la nube de puntos original. Esto se lleva a cabo mediante una operación matricial. Esto corresponde a una proyección en el plano del espacio de características. El resultado es que las líneas / nubes de puntos apropiadas vuelven a "enderezarse" o, dicho de otro modo, se separan una de otra. Puede visualizar esto mediante el citofluorograma.

**Navegación: Dye Finder\ Adaptive Dye Separation (Strong)**

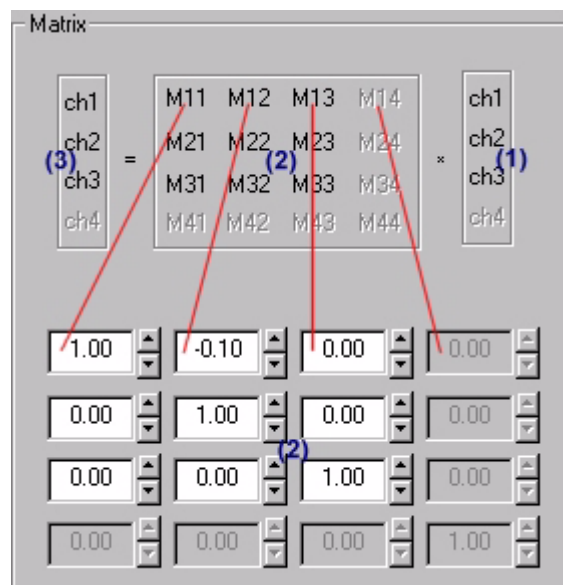
**Navegación: Dye Finder\ Adaptive Dye Separation (Weak)**

► En el visor Experiment Overview seleccione mediante un doble clic en el archivo el bloque de datos de imagen que

	desea editar con la separación de tinturas adaptable. El bloque de datos puede tratarse de una serie espacial, temporal o una serie Lambda.
►	En el campo Fluorescent Dyes corrija en caso necesario el número de tinturas fluorescentes utilizadas para la creación del bloque de datos. El software introduce automáticamente en este campo como valor el número de canales de detección.
►	

### Navegación: Dye Finder\ Manual Dye Separation

Esta función permite reducir la información de señales no deseada de un bloque de datos con hasta cuatro canales de detección mediante una multiplicación matricial.

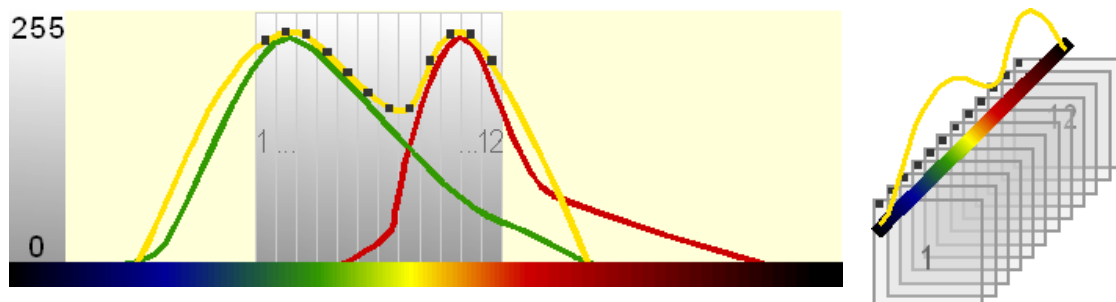


En el cuadro de diálogo se representa dicha multiplicación. Los valores de píxel de los hasta 4 canales posibles de la imagen original que desea editar (1) operan entre sí con ayuda de los factores M11 hasta M44 (2). Los números clave de los factores se refieren a los canales. El factor M12, por ejemplo, representa la proporción de información de señal que debe tener el canal 2 de la imagen original (1) en el canal 1 de la imagen resultante (3). Los factores M11, M22, M33 y M44 corresponden al mismo canal de la imagen original y la resultante, por lo que se les asigna el valor 1.

►	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
►	Mediante la modificación del factor M se reduce o incrementa la información de la señal en el canal de la imagen resultante. Si, por ejemplo, se desea eliminar en el canal 1 la diafonía del canal 2 en este canal, introduzca en el campo M12 un <u>número negativo entre 0 y 1</u> . Si introduce números positivos entre 0 y 1 en el campo M12, aumenta la información de la señal en el canal 1.

### Principio de la separación de tinturas espectral (Spectral Dye Separation)

Mediante el algoritmo de la separación de tinturas espectral pueden identificarse y separarse señales fluorescentes en un bloque de datos con ayuda de los datos de referencia de los espectros de emisión. Esto es posible gracias a la denominada descomposición de valores singulares.





**(18) Captura de una serie Lambda mediante 12 imágenes individuales**

Este procedimiento se basa en la premisa de que cada píxel de un bloque de datos se compone de una superposición lineal de espectros de emisiones de las tinturas fluorescentes utilizadas para la captura de la imagen. La ilustración **(18)** muestra la señal fluorescente amarilla de una serie Lambda generada mediante la superposición de los espectros de emisión de las tinturas fluorescentes roja y verde. Mediante los datos de referencia de los espectros de emisión de ambas tinturas pueden calcularse los coeficientes que describen la proporción de cada tintura en cada banda de detección. A su vez, este coeficiente permite calcular dos bloques de datos separados a partir de la señal fluorescente amarilla en los que sólo se encuentra la parte de una tintura.

**Navegación: Dye Finder\ Spectral Dye Separation**

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo. Esta opción sólo permite editar series Lambda.
▶	En el campo Dye Selection seleccione las tinturas fluorescentes utilizadas para la captura del bloque de datos que desea editar; para ello seleccione una casilla de verificación y una tintura en el campo de lista.



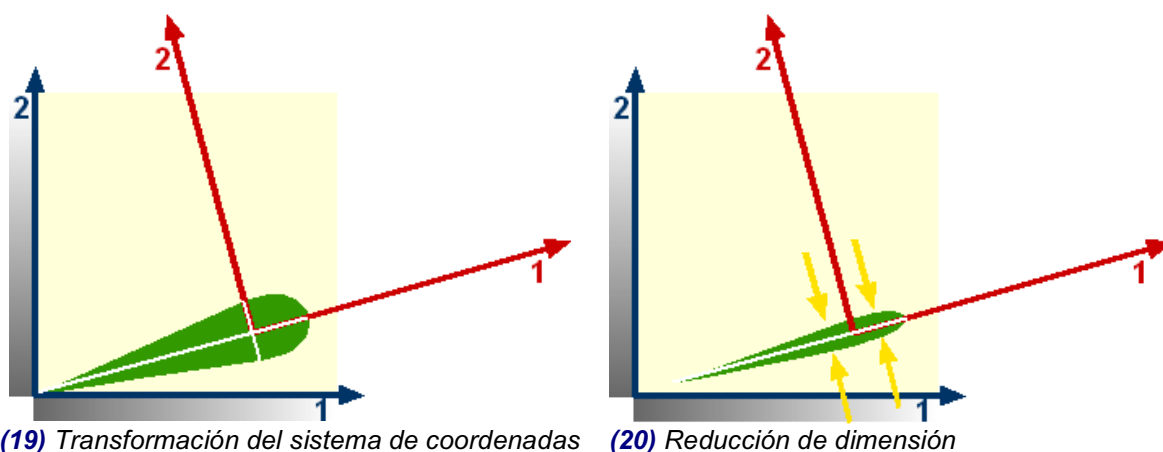
*Si no dispone de los datos de referencia de las tinturas fluorescentes que busca, o si desea utilizar sus propios datos de referencia, puede importarlos con ayuda del editor de tinturas.*

**Principio de la reducción de dimensión**

Las series Lambda son imágenes de un solo plano óptico capturadas a lo largo de una gama de longitudes de onda determinada con una determinada longitud de onda. En este proceso se recoge en las imágenes individuales información redundante sobre el preparado. Mediante el algoritmo de la reducción de dimensión puede eliminar la información redundante de las series Lambda. Asimismo, los datos de imagen de la serie Lambda recogidos en un solo canal de detección se separan en función de la tintura fluorescente y se representan en canales de detección independientes.

El procedimiento utilizado se basa en el denominado análisis de componentes principales. El principio de este análisis de componentes principales consiste en transformar datos correlativos en no correlativos. Para ello se realiza una transformación del sistema de coordenadas. El objetivo de esta transformación es encontrar los denominados componentes principales (ejes principales) de las nubes de puntos en el espacio de características de varias dimensiones mediante el desplazamiento del punto cero y el giro del sistema de coordenadas. Al observar series Lambda en el espacio de características, cada gama de longitudes de onda en la que se ha capturado una imagen representa una dimensión.

& vea Principio de la separación de tinturas adaptable (página 230)



En primer lugar se coloca el origen del sistema de coordenadas en el punto central de cada nube de puntos. En el segundo paso, el sistema de coordenadas gira de forma que la primera coordenada apunte en la dirección de la varianza más grande de la nube de puntos. La segunda coordenada (y todas las otras en un espacio de características de varias dimensiones), que debe ser ortogonal a la primera, se selecciona de forma que describa la mayor parte posible de la varianza restante (19). En el nuevo sistema de coordenadas, la mayor parte de la varianza se encuentra en la dirección del eje x y una parte pequeña, en la dirección del eje y.

Para lograr la reducción de dimensión, se desprecian los componentes principales con una varianza relativamente pequeña (20). Al hacerlo, no se pierde información importante ya que éstas sólo contienen ruido o datos redundantes. Para finalizar, los datos de la imagen de las nubes de puntos comprimidas se representan en canales de detección independientes.

#### Navegación: Dye Finder\ Dimensionality Reduction

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo. Esta opción sólo permite editar series Lambda.
▶	En el campo Number of Dimensions introduzca el número de tinturas fluorescentes utilizadas para la creación del bloque de datos de la imagen.

## Segmentación de estructuras de imagen

(opcional, vea el capítulo Paquete de programas opcionales, 3D (página 281 y siguientes)

## Funciones de medida y análisis

### Cálculo de un histograma



#### Función

La función Histogram permite medir la frecuencia de una magnitud de medida, representarla en una curva y calcular diferentes valores estadísticos. El histograma se mide a partir del bloque de datos seleccionado en el visor Viewer. Este bloque de datos puede tratarse de una serie espacial, temporal o una serie Lambda. Los valores estadísticos se calculan en función del tamaño de la tercera dimensión: altura (z) para las series espaciales, tiempo (t) para las temporales o longitud de onda ( $\lambda$ ) para las series Lambda.

▶	Haga clic en la tecla Histogram.
▶	Se abre un visor en el que aparecen la curva de medida de cada canal de detección y los valores estadísticos.



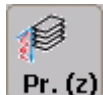
Parámetro	Significado	Fórmula
# Pixel	Número total de píxeles incluidos en el cálculo del histograma. Corresponde al formato de barrido ajustado.	
Mean	La media aritmética	$\mu(I) = \frac{1}{N_{\text{Pixel}}} \sum_i I_i$
Maximum	Valor máximo	$\text{Max}(I)$
Minimum	Valor mínimo	$\text{Min}(I)$
Variance	Varianza	$\text{VAR}(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2$
Average Deviation	Desviación media	$\text{DISP}(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i  I_i - \mu(I) $
Standard Deviation	Desviación estándar	$s(I) = \sqrt{\text{VAR}(I)} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2}$
Mean Energy	Energía media de la imagen	$I^2_{\text{mean}} = \frac{1}{N_{\text{Pixel}}} \sum_i I_i^2$
Root Mean Square (RMS)	Media cuadrática	$\text{RMS} = \sqrt{\frac{1}{N_{\text{Pixel}}} \sum_i I_i^2}$
Skewness	Asimetría	$\text{Skew}(I) = \frac{1}{N} \sum_i \left[ \frac{I_i - \mu(I)}{\sqrt{\text{VAR}(I)}} \right]^3$

Algunos de los parámetros se indican en notación exponencial científica, p. ej., píxel = 3,28e+005 = 327680 (corresponde al formato de barrido 640 x 512).



Los valores máximo y mínimo de intensidad permiten un ajuste óptimo de los valores Gain y Offset de los detectores.

## Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI)



### Función

Mediante la función Profile (z) se mide una magnitud de medida dentro de la zona de interés, se representa en una curva y se calculan diferentes datos estadísticos. El perfil se mide a partir del bloque de datos seleccionado en el visor Viewer. Este bloque de datos puede tratarse de una serie espacial, temporal o una serie Lambda. Los valores estadísticos se calculan en función del tamaño de la tercera dimensión: altura (z) para las series espaciales, tiempo (t) para las temporales o longitud de onda ( $\lambda$ ) para las series Lambda.

- ▶ Haga clic en la tecla Profile (z) y trace la zona de interés (ROI) en la imagen. Las teclas con las que se define la zona de interés se activan junto con la tecla Profile (z).
  - & vea Definición de zona de interés (ROI) con forma de elipse (página 242)
  - & vea Definición de zona de interés (ROI) con forma de polígono
  - & vea Definición de zona de interés (ROI) con forma de rectángulo

&	vea Definición automática de una zona de interés (ROI)
&	vea Marcado y desplazamiento de una zona de interés (ROI)
&	vea Borrado de una zona de interés (ROI)
►	Se abre automáticamente un visor en el que aparecen la curva de medida de cada canal de detección y los valores estadísticos.

Parámetro	Significado	Fórmula
# Pixel(ROI)	Número de píxeles dentro de la zona de interés seleccionada	
Area	Contenido de superficie de la zona de interés	$A = \int_0^A d_A A$
Length	Altura del lote de imágenes (serie espacial) Tiempo de captura (serie temporal) Anchura de banda (serie Lambda)	$L = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$
Mean Amplitude	Media aritmética	$\mu(I) = \frac{1}{N_{\text{Pixel}}} \sum_{\text{Pixel}} I_i$
Maximum Amplitude	Valor máximo	$\text{Max} (I)$
Position Maximum Amplitude	Posición del valor máximo	$\text{Arg Max } I(z), (t), (\lambda)$
Minimum Amplitude	Valor mínimo	$\text{Min} (I)$
Position Minimum Amplitude	Posición del valor mínimo	$\text{Arg Min } I(z), (t), (\lambda)$
Average Deviation	Desviación media	$\text{DISP}(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i  I_i - \mu(I) $
Standard Deviation	Desviación estándar	$s(I) = \sqrt{\text{VAR}(I)} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2}$
Variance	Varianza	$\text{VAR}(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2$

Los 4 valores de medición siguientes sólo aparecen cuando en el cuadro de diálogo Viewer Options está seleccionada la función de medición de dos puntos.

►	Selecione el menú View, la opción Experiment Overview, el icono Charts.
&	vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Charts (página 185)
►	En el campo Measurement puede activar o desactivar la medición de dos puntos mediante la selección de 2 Point u Off.

$I(\mu\text{m}); I(s); I(\text{nm})$	Intensidad medida en el punto de medida 1 (z, t, $\lambda$ )	$I(z_1); I(t_1); I(\lambda_1)$
$I(z); I(t); I(\lambda)$	Intensidad medida en el punto de medida 2 (z, t, $\lambda$ )	$I(z_2); I(t_2); I(\lambda_2)$
dI, dz	Diferencia de los valores entre los puntos de medida 1 y 2	$ I(z_1) - I(z_2) ;  I(t_1) - I(t_2) ,  I(\lambda_1) - I(\lambda_2) $
d(z), (t), ( $\lambda$ )	Altura (z), tiempo de captura (t), anchura de banda ( $\lambda$ ) entre los puntos de medida 1 y 2	$ z_1 - z_2 ;  t_1 - t_2 ,  \lambda_1 - \lambda_2 $

### Aplicaciones típicas

Esta función puede utilizarse para determinar los valores extremos de intensidad dentro de un lote de imágenes. A su vez, éstas permiten una configuración óptima de los detectores. Por este motivo, con esta función puede determinarse el máximo de emisión de una serie Lambda. Mediante la adaptación de la anchura y la posición del diafragma, puede capturarse más luz de emisión procedente de la muestra que con filtros ópticos convencionales. En las series temporales, esta función permite

determinar el momento de mayor actividad de fluorescencia.



*Esta función de cuantificación sólo se aplica cuando está desconectado, es decir, sólo está disponible para bloques de datos previamente capturados.*

## Medición de un perfil a lo largo de una distancia



### Función

La función Profile permite medir una magnitud de medida a lo largo de una distancia, representarla en una curva y calcular diferentes valores estadísticos. El perfil se mide a partir del bloque de datos seleccionado en el visor Viewer. Este bloque de datos puede tratarse de una serie espacial, temporal o una serie Lambda. Los valores estadísticos se calculan en función del tamaño de la tercera dimensión: altura (z) para las series espaciales, tiempo (t) para las temporales o longitud de onda ( $\lambda$ ) para las series Lambda.

▶	Haga clic en la tecla Profile. El trayecto de medición se inserta en el visor Viewer como una línea blanca en la imagen. La longitud y la posición del trayecto de medición pueden modificarse haciendo clic en el trayecto y arrastrando los puntos de selección hasta la posición deseada con el botón izquierdo del ratón pulsado.
▶	Se abre automáticamente un visor en el que aparecen la curva de medida de cada canal de detección y los valores estadísticos.

Parámetro	Significado	Fórmula
Length	Longitud del trayecto de medición	$L = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$
Mean Amplitude	Media aritmética de la magnitud de medida	$\mu(I) = \frac{1}{N_{\text{Pixel}}} \sum_{\text{Pixel}} I_i$
Maximum Amplitude	Valor máximo de la magnitud de medida	Max ( I )
Minimum Amplitude	Valor mínimo de la magnitud de medida	Min ( I )
Average Deviation	Desviación estadística media de los valores respecto al valor medio de la magnitud de medida	$\text{DISP}(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i  I_i - \mu(I) $
Standard Deviation	Desviación estándar de los valores de la magnitud de medida	$s(I) = \sqrt{\text{VAR}(I)} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2}$
Variance	Varianza de la magnitud de medida	$\text{VAR}(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2$

**Los 4 valores de medición siguientes sólo aparecen cuando en el cuadro de diálogo Viewer Options está seleccionada la función de medición de dos puntos.**

▶	Selecione el menú View, la opción Experiment Overview, el icono Charts.
---	---

	& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Charts (página 185)
►	En el campo Measurement puede activar o desactivar la medición de dos puntos mediante la selección de 2 Point u Off.

Parámetro	Significado	Fórmula
$I(\mu\text{m}); I(\text{s}); I(\text{nm})$	Valor medido en el punto de medida 1 ( $z, t, \lambda$ )	$I(z_1); I(t_1); I(\lambda_1)$
$I(\mu\text{m}); I(\text{s}); I(\text{nm})$	Valor medido en el punto de medida 2 ( $z, t, \lambda$ )	$I(z_2); I(t_2); I(\lambda_2)$
$dI, dz$	Diferencia de los valores entre los puntos de medida 1 y 2	$ I(z_1) - I(z_2) ;  I(t_1) - I(t_2) ,  I(\lambda_1) - I(\lambda_2) $
$d(z), (t), (\lambda)$	Altura ( $z$ ), tiempo de captura ( $t$ ), anchura de banda ( $\lambda$ ) entre los puntos de medida 1 y 2	$ z_1 - z_2 ;  t_1 - t_2 ,  \lambda_1 - \lambda_2 $



*Esta función de cuantificación sólo se aplica cuando está desconectado, es decir, sólo está disponible para bloques de datos previamente capturados.*

## Medición de superficies y volúmenes

(opcional, vea el capítulo Paquete de programas opcionales, Materiales, página 256 y siguientes)


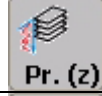


## Copia de gráficos de cuantificación a la página de presentación



### Función

Mediante la función Snap Quantification Data se copian los datos calculados mediante las funciones de cuantificación a la página de presentación. Los valores calculados de las funciones de cuantificación siguientes que también muestran un gráfico de interpretación pueden copiarse a una página de presentación:

& vea Creación de una página de presentación (página 248)


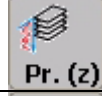
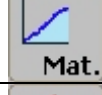

	& vea Medición de un perfil a lo largo de una distancia (página 239)
	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) (página 237)
	& vea Medición de superficies y volúmenes (página 268)
	& vea Mediciones de rugosidad a lo largo de un trayecto (página 256)

## Impresión de gráficos de cuantificación



### Función

Mediante la función Print Quantification Data se envían los datos calculados mediante las funciones de cuantificación a la impresora estándar. Los valores calculados de las funciones de cuantificación siguientes que también muestran un gráfico de interpretación pueden imprimirse:

	& vea Medición de un perfil a lo largo de una distancia (página 239)
	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) (página 237)
	& vea Medición de superficies y volúmenes (página 268)
	& vea Mediciones de rugosidad a lo largo de un trayecto (página 256)

Esta función también se encuentra en el menú contextual dentro del visor de las funciones de cuantificación:

▶	Mantenga el puntero del ratón sobre el visor abierto desde una función de cuantificación.
▶	Haga clic con el botón derecho del ratón y seleccione el punto de menú Print.

## Exportación de datos de cuantificación



### Función

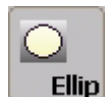
Mediante la función Export Quantification Data se exportan los datos calculados mediante las funciones de cuantificación como datos ASCII. Esto permite, por ejemplo, leer y editar los datos en Excel. Los valores calculados de las funciones de cuantificación siguientes que también muestran un gráfico de interpretación pueden exportarse:

	& vea Medición de un perfil a lo largo de una distancia (página 239)
	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) (página 237)
	& vea Medición de superficies y volúmenes (página 268)
	& vea Mediciones de rugosidad a lo largo de un trayecto (página 256)

Esta función también se encuentra en el menú contextual dentro del visor de las funciones de cuantificación:

▶	Mantenga el puntero del ratón sobre el visor abierto desde una función de cuantificación.
▶	Haga clic con el botón derecho del ratón y seleccione el punto de menú Export.

## Definición de una zona de interés (ROI) con forma de elipse



### Función

Mediante la tecla Ellipse puede definirse una zona de interés (Region of Interest o ROI) elíptica en la imagen:

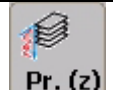

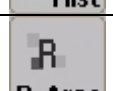
▶	Haga clic en la tecla Ellipse.
▶	Pulse el botón izquierdo del ratón sobre la posición de la imagen donde debe encontrarse un extremo de la zona de interés.
▶	Arrastre el cursor con el botón izquierdo del ratón pulsado diametralmente hasta el otro extremo para definir el segundo punto de la zona de interés.

- & vea Marcado y desplazamiento de una zona de interés (ROI) (página 245)
- & vea Desplazamiento y giro de una zona de interés (ROI) (página 246)

& vea Borrado de una zona de interés (ROI) (página 246)

### Restricciones

La definición de una zona de interés en una imagen es necesaria para las funciones de cuantificación. Por esto, la tecla Ellipse no se activa hasta que el usuario haya activado previamente una función de cuantificación con una de las teclas siguientes:

 Pr. (z)	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) (página 237)
 Hist	& vea Cálculo de un histograma (página 236)
 R-Area	& vea Medición de rugosidad dentro de una zona de interés (ROI) (página 257)

## Definición de una zona de interés (ROI) con forma de polígono



### Función

Mediante la tecla Polygon puede definirse una zona de interés (Region of Interest o ROI) poligonal libre en la imagen:

▶	Haga clic en la tecla Polygon.
▶	Pulse el botón izquierdo del ratón sobre la posición de la imagen donde debe encontrarse un extremo de la zona de interés.
▶	Para definir otros puntos del polígono, suelte el botón del ratón, desplace el cursor hasta la siguiente esquina del polígono y haga un nuevo clic con el botón izquierdo del ratón. Repita esta operación para cada esquina del polígono.
▶	Si desea trazar el polígono a mano mantenga pulsado el botón izquierdo del ratón mientras dibuja la zona de interés en la imagen.
▶	Puede cerrar el polígono con un doble clic.

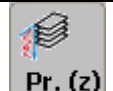

& vea Marcado y desplazamiento de una zona de interés (ROI) (página 245)

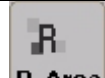
& vea Desplazamiento y giro de una zona de interés (ROI) (página 246)

& vea Borrado de una zona de interés (ROI) (página 246)

### Restricciones

La definición de una zona de interés en una imagen es necesaria para las funciones de cuantificación. Por esto, la tecla Polygon no se activa hasta que el usuario haya activado previamente una función de cuantificación con una de las teclas siguientes:

 Pr. (z)	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) (página 237)
 Hist	& vea Cálculo de un histograma (página 236)

	& vea Medición de rugosidad dentro de una zona de interés (ROI) (página 257)
---	--

## Definición de una zona de interés (ROI) con forma de rectángulo



### Función

Mediante la tecla Rectangle puede definirse una zona de interés (Region of Interest o ROI) rectangular en la imagen:

▶	Haga clic en la tecla Rectangle.
▶	Pulse el botón izquierdo del ratón sobre la posición de la imagen donde debe encontrarse un extremo de la zona de interés.
▶	Arrastre el cursor con el botón izquierdo del ratón pulsado diametralmente hasta el otro extremo para definir el segundo punto de la zona de interés.

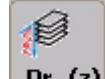
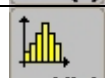
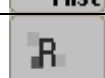
& vea Marcado y desplazamiento de una zona de interés (ROI) (página 245)

& vea Desplazamiento y giro de una zona de interés (ROI) (página 246)

& vea Borrado de una zona de interés (ROI) (página 246)

### Restricciones

La definición de una zona de interés en una imagen es necesaria para las funciones de cuantificación. Por esto, la tecla Rectangle no se activa hasta que el usuario haya activado previamente una función de cuantificación con una de las teclas siguientes:

	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) (página 237)
	& vea Cálculo de un histograma (página 236)
	& vea Medición de rugosidad dentro de una zona de interés (ROI) (página 257)

## Definición automática de una zona de interés (ROI)



### Función

Mediante la tecla Wizard el ordenador define automáticamente cualquier estructura de la imagen como zona de interés (Region of Interest o ROI) en la imagen. En función de la otra tecla pulsada se crea una zona de interpretación con forma elíptica, rectangular, poligonal alrededor de la estructura.

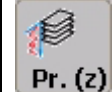


▶	Haga clic en la tecla Ellipse, Rectangle o Polygon y, a continuación, en la tecla Wizard.
▶	Haga doble clic con el botón izquierdo del ratón sobre la estructura de la imagen que desee marcar como zona de interés.
▶	La estructura se marca automáticamente como zona de interés elíptica, rectangular o poligonal.



- & vea Definición de zona de interés (ROI) con forma de elipse (página 242)
- & vea Definición de zona de interés (ROI) con forma de polígono
- & vea Definición de zona de interés (ROI) con forma de rectángulo
- & vea Borrado de una zona de interés (ROI) página

### Restricciones

La definición de una zona de interés en una imagen es necesaria para las funciones de cuantificación. Por esto, la tecla Wizard no se activa hasta que el usuario haya activado previamente una función de cuantificación con una de las teclas siguientes:

	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) (página 237)
	& vea Cálculo de un histograma (página 236)
	& vea Medición de rugosidad dentro de una zona de interés (ROI) (página 257)

## Marcado y desplazamiento de una zona de interés (ROI)



### Función

Mediante la tecla Select ROI puede marcarse y desplazarse una zona de interés (Region of Interest o ROI):

▶	Haga clic en la tecla Select ROI y, a continuación en la zona de interés que desea desplazar.
▶	Mueva el puntero del ratón hasta el interior de la zona de interés.
▶	Tan pronto el puntero del ratón se convierte en una flecha doble entrecruzada, pulse el botón izquierdo del ratón y manténgalo pulsado.
▶	De esta forma desplace la zona de interés.

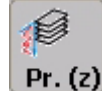

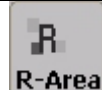
Puede modificar el tamaño de una zona de interés ya trazada:

▶	Mantenga el puntero del ratón sobre el borde lateral de la zona de interés marcada hasta que vea una flecha doble. Pulse el botón izquierdo del ratón para tirar de la zona de interés en una dirección.
▶	Si coloca el puntero con exactitud en una esquina de la zona de interés marcada, puede realizar la ampliación en dos direcciones simultáneamente.

- & vea Desplazamiento y giro de una zona de interés (ROI) (página 246)
- & vea Borrado de una zona de interés (ROI) (página 246)

### Restricciones

La definición de una zona de interés en una imagen es necesaria para las funciones de cuantificación. Por esto, la tecla Select ROI no se activa hasta que el usuario haya activado previamente una función de cuantificación con una de las teclas siguientes:

 Pr. (z)	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) (página 237)
 Hist	& vea Cálculo de un histograma (página 236)
 R-Area	& vea Medición de rugosidad dentro de una zona de interés (ROI) (página 257)

## Desplazamiento y giro de una zona de interés (ROI)



### Función

Mediante la tecla Rotate ROI puede desplazarse y girarse una zona de interés (Region of Interest o ROI):

▶	Haga clic en la tecla Rotate ROI y, a continuación, en la zona de interés que desea girar.
▶	Coloque el puntero del ratón con exactitud en una esquina de la zona de interés marcada.
▶	Tan pronto el puntero del ratón se convierte en una flecha doble, pulse el botón izquierdo del ratón y manténgalo pulsado.
▶	De esta forma gire la zona de interés. La zona de interés gira en torno a su centro.

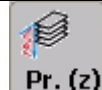
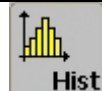
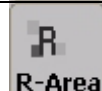
Puede modificar el tamaño de una zona de interés ya trazada:

▶	Mantenga el puntero del ratón sobre el borde lateral de la zona de interés marcada hasta que vea una flecha doble. Pulse el botón izquierdo del ratón para tirar de la zona de interés en una dirección.
---	--

& vea Borrado de una zona de interés (ROI) (página 246)

### Restricciones

La definición de una zona de interés en una imagen es necesaria para las funciones de cuantificación. Por esto, la tecla Rotate ROI no se activa hasta que el usuario haya activado previamente una función de cuantificación con una de las teclas siguientes:

 Pr. (z)	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) (página 237)
 Hist	& vea Cálculo de un histograma (página 236)
 R-Area	& vea Medición de rugosidad dentro de una zona de interés (ROI) (página 257)

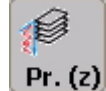
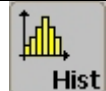
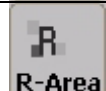
## Borrado de una zona de interés (ROI)

**Función**

Mediante la tecla Clear pueden borrarse todas las zonas de interés definidas (ROI) al mismo tiempo. Si desea borrar una sola zona de interés, haga clic en la tecla Select ROI, a continuación en la zona de interés de la imagen y elimínela con la tecla de borrado del teclado.

**Restricciones**

La definición de una zona de interés en una imagen es necesaria para las funciones de cuantificación. Por esto, la tecla Clear no se activa hasta que el usuario haya activado previamente una función de cuantificación con una de las teclas siguientes:

	& vea Medición de un perfil dentro de una zona de interés (ROI) (página 237)
	& vea Cálculo de un histograma (página 236)
	& vea Medición de rugosidad dentro de una zona de interés (ROI) (página 257)

## Documentación de datos

### Creación de página de presentación



#### Función

Mediante la tecla Annotation se abre una ventana en la que puede editar las imágenes capturadas para utilizarlas en presentaciones. Si ha abierto la página de presentación, también se encuentran activas las teclas Snap, Line, Rectangle y Text. Estas teclas permiten copiar la imagen cargada en el visor Viewer a la página de presentación, destacar zonas determinadas de la imagen copiada con líneas y rectángulos e introducir un rótulo de la imagen en un campo de texto.

- & vea Trazado de líneas (página 249)
- & vea Trazado de rectángulos (página 249)
- & vea Inserción de un campo de texto en la página de presentación (página 250)

Si mantiene el puntero del ratón sobre la página de presentación y hace clic con el botón derecho del ratón, aparece un menú contextual con las opciones siguientes:

Opción	Función
Line	Se introduce una línea con el formato configurado previamente en la página de presentación.
Rectangle	Se introduce un rectángulo con el formato configurado previamente en la página de presentación.
Text	Se introduce un campo de texto con el tipo de letra configurado previamente en la página de presentación.
Zoom	Permite elegir entre representaciones de magnitudes y página de presentación.
Grid	Se inserta una cuadrícula de líneas que no pueden pulsarse en la página de presentación.

Los comandos Line, Rectangle y Text no sólo están en el menú contextual sino que también pueden activarse mediante las teclas correspondientes.

Las páginas de presentación reciben la extensión \*.ano.

### Copia de imágenes a la página de presentación



#### Función

Al hacer clic en la tecla Snap se copia la imagen cargada en el visor Viewer a la página de presentación. Si marca la imagen copiada y hace clic con el botón derecho del ratón, aparece un menú contextual con las opciones siguientes:

Opción	Función
Original size	La imagen se visualiza en el tamaño original.
Fit to page	La imagen se amplía hasta el tamaño de la página de presentación.
Bring to front	La imagen se presenta en primer plano.
Send to back	La imagen se presenta en segundo plano.
Delete	La imagen se borra.

Para cambiar el tamaño de la imagen, arrastre uno de los puntos de selección de la imagen con el

puntero del ratón. Para desplazar la imagen sin modificar el tamaño, márkela y desplázela con el botón izquierdo del ratón pulsado.



*La tecla Snap sólo puede accionarse si se ha abierto previamente una página de presentación mediante la tecla Annotation y, a continuación, se ha hecho clic en el visor Viewer.*

## Trazado de líneas en la página de presentación



### Función

Trace una línea en la página de presentación mediante la tecla Line. En la página de presentación, haga clic en el lugar donde desea que comience la línea. Mantenga pulsado el botón izquierdo del ratón y arrastre el puntero hacia un lado hasta el punto en el que la línea deba finalizar. Si marca la línea y hace clic con el botón derecho del ratón, aparece un menú contextual con las opciones siguientes:

Opción	Función
Style	En un cuadro de diálogo puede ajustar el tipo, el grosor y la longitud de la línea.
Color	En un cuadro de diálogo puede seleccionar un color para la línea.
Bring to front	La línea se presenta en primer plano.
Send to back	La línea se presenta en segundo plano.
Delete	La línea se borra.

Puede cambiar la longitud de la línea arrastrando con el puntero del ratón uno de sus puntos de selección. Para desplazar la línea sin modificar el tamaño, haga clic en el punto de selección central y desplázela con el botón izquierdo del ratón pulsado.



*La tecla Line sólo puede accionarse si se ha abierto previamente una página de presentación mediante la tecla Annotation.*

## Trazado de un rectángulo en la página de presentación



### Función

Trace un rectángulo en la página de presentación mediante la tecla Rectangle. En la página de presentación, haga clic en el lugar donde desea colocar una esquina del rectángulo. Mantenga pulsado el botón izquierdo del ratón y arrastre el puntero hacia un lado para determinar el tamaño del rectángulo. Si marca el cuadrado y hace clic con el botón derecho del ratón, aparece un menú contextual con las opciones siguientes:

Opción	Función
--------	---------

Style	En un cuadro de diálogo puede ajustar el tipo, el grosor de la línea y otras opciones.
Color	En un cuadro de diálogo puede seleccionar un color para el rectángulo.
Bring to front	El rectángulo se presenta en primer plano.
Sent to back	El rectángulo se presenta en segundo plano.
Delete	El rectángulo se borra.

Para cambiar el tamaño del rectángulo, arrastre uno de los puntos de selección del rectángulo con el puntero del ratón. Para desplazar el rectángulo sin modificar el tamaño, haga clic en el centro del rectángulo y desplácelo con el botón izquierdo del ratón pulsado.



*La tecla Rectangle sólo puede accionarse si se ha abierto previamente una página de presentación mediante la tecla Annotation.*

## Inserción de un campo de texto en la página de presentación



### Función

Inserte un campo de texto en la página de presentación mediante la tecla Text. En la página de presentación, haga clic en el lugar donde desea colocar el campo de texto. Mantenga pulsado el botón izquierdo del ratón y arrastre el puntero hacia un lado para determinar el tamaño del campo de texto. Si marca el campo de texto y hace clic con el botón derecho del ratón, aparece un menú contextual con las opciones siguientes:

Opción	Función
Font	En un cuadro de diálogo puede seleccionar diferentes tipos de letra y otras opciones de formato.
Transparent	El fondo se transluce a través del texto.
Bring to front	El texto se presenta en primer plano.
Send to back	El texto se presenta en segundo plano.
Delete	El texto se borra.

Para cambiar el tamaño del campo de texto, arrastre uno de sus puntos de selección con el puntero del ratón. Para desplazar el campo de texto sin modificar el tamaño, haga clic en el centro y desplácelo con el botón izquierdo del ratón pulsado.



*La tecla Text sólo puede accionarse si se ha abierto previamente una página de presentación mediante la tecla Annotation.*

## Impresión



### Función

Puede activar la opción de impresión mediante la tecla Print o a través del cuadro de diálogo Printer Selection. Para abrir este cuadro de diálogo seleccione la opción Print del menú File. Puede imprimirse la imagen cargada en el visor Viewer o una página de presentación.

Cuando activa la impresión mediante la tecla Print la imagen cargada en el visor o la página de presentación se imprimen con la impresora predefinida y con la configuración de página predefinida. Estas configuraciones estándar pueden modificarse en el cuadro de diálogo Printer Selection. Para ello puede utilizar las siguientes teclas de pantalla de dicho cuadro diálogo:

Tecla de pantalla	Función
Printer setup	Abre un cuadro de diálogo en el que puede modificar la impresora y la configuración de impresión.
Print	Se imprime la imagen o la página de presentación.
Background color	Abre un cuadro de diálogo en el que puede seleccionar un color de fondo para la página.
Center on page	La imagen se coloca en el centro de la página.
Fit to page	El tamaño de la imagen se ajusta al tamaño de la zona de impresión.
Aspect ratio	El número de página de la imagen se mantiene a pesar de las modificaciones de altura y anchura.

En el campo Image puede modificar la altura (Size Y) y la anchura (Size X) de la imagen y definir un margen hacia arriba (Offset Y) y uno hacia la izquierda (Offset X). El tamaño de la imagen y los márgenes no pueden modificarse cuando se pulsa la tecla de pantalla Fit to page. Si pulsa la tecla de pantalla Center on Page no pueden modificarse los márgenes.

En la vista preliminar obtenida mediante el campo Print Preview puede comprobar el resultado de las modificaciones introducidas. En el campo Page se indica la altura y la anchura de la zona de impresión (que no es idéntica al formato del papel). En las dos líneas inferiores del cuadro de diálogo se muestran la impresora instalada actualmente y el formato de papel ajustado.



*Al salir del cuadro de diálogo Printer Selection con la tecla OK, se guardan todas las configuraciones en el visor activo Viewer. Esto permite guardar una configuración de impresión diferente y una configuración de página para distintas imágenes. No obstante, estas configuraciones se pierden al salir del Leica Confocal Software.*

## Tratamiento de datos

### Apertura de archivos



#### Función

En el Leica Confocal Software puede abrir archivos de diferentes formatos mediante la tecla Open.

Formato de archivo	Descripción
Experimento (*.lei)	Un formato de archivo binario específico de Leica. Al leer los experimentos, no sólo se cargan los datos de la imagen sino también la configuración experimental.
Página de presentación (*.ano)	Un formato de archivo binario específico de Leica. Los elementos que contienen las páginas de presentación, como imágenes, texto y gráficos, se guardan como objetos individuales.
Archivos Tiff (*.tif)	Se trata de archivos de imagen de Leica en formato TIFF sencillo y múltiple. Permite leer archivos externos en formato RGB-TIFF.

- & vea Creación de experimentos (página 253)
- & vea Creación de página de presentación (página 248)

### Almacenamiento de archivos



#### Función

Cuando hace clic en la tecla Save se guardan los datos en el experimento actual (\*.lei) o en la página de presentación actual (\*.ano).

Cuando guarda por primera vez un experimento o una página de presentación mediante la tecla Save, aparece en primer lugar el cuadro de diálogo Save As.



*Con frecuencia se sobrescriben de forma inadvertida datos originales mediante la función Save. Para evitarlo, utilice la función Save As para guardar con otro nombre un experimento previamente guardado.*

- & vea Almacenamiento de archivos como (página 252)

### Almacenamiento de archivos como



#### Función



Mediante la tecla Save As puede guardar un experimento (\*.lei) o una página de presentación (\*.ano) con un determinado nombre de archivo y en un determinado formato.

Al guardar un experimento se crea una carpeta con el nombre del experimento en el nivel del archivo. En el submenú de dicha carpeta se encuentra el archivo descriptivo (\*.lei) del experimento junto con los archivos de imágenes individuales. El archivo descriptivo tiene un formato binario específico de Leica. En este archivo se registran las configuraciones de los parámetros y la información de color guardada en forma de tabla de asignación de colores de todas las imágenes que pertenecen a este experimento.

Los archivos de imagen de un experimento pueden guardarse en formato *tif* o en formato *raw*. En el formato estándar *tif* se guardan de nuevo la configuración experimental y la información de color de una imagen. En el formato *raw* sólo se guardan los datos de la imagen.

### Aplicaciones típicas

La ventaja del formato *raw* es el escaso tamaño del archivo que, no obstante, sólo es eficiente en capturas de imagen de tamaño relativamente pequeño. Si, por ejemplo, captura una serie de imágenes con gran cantidad de imágenes individuales pero con un formato de barrido pequeño, puede guardar y abrir la serie en formato *raw* con mayor rapidez que en formato *tif*.

## Guardar todos los archivos



### Función

Mediante la tecla Save All puede guardar varios experimentos (\*.lei) y páginas de presentación (\*.ano) uno tras otro con un determinado nombre de archivo y en un determinado formato.

Al guardar un experimento se crea una carpeta con el nombre del experimento en el nivel del archivo. En el submenú de dicha carpeta se encuentra el archivo descriptivo (\*.lei) del experimento junto con los archivos de imágenes individuales. El archivo descriptivo tiene un formato binario específico de Leica. En este archivo se registran las configuraciones de los parámetros y la información de color guardada en forma de tabla de asignación de colores de todas las imágenes que pertenecen a este experimento.

Los archivos de imagen de un experimento pueden guardarse en formato *tif* o en formato *raw*. En el formato estándar *tif* se guardan de nuevo la configuración experimental y la información de color de una imagen. En el formato *raw* sólo se guardan los datos de la imagen.

### Aplicaciones típicas

La ventaja del formato *raw* es el escaso tamaño del archivo que, no obstante, sólo es eficiente en capturas de imagen de tamaño relativamente pequeño. Si, por ejemplo, captura una serie de imágenes con gran cantidad de imágenes individuales pero con un formato de barrido pequeño, puede guardar y abrir la serie en formato *raw* con mayor rapidez que en formato *tif*.

## Creación de experimentos



### Función

Al hacer clic en la tecla New Experiment se abre un nuevo visor Viewer y, de esta forma, se crea un nuevo experimento. Un experimento es un archivo que puede constar de varias imágenes individuales o series de imágenes. Esto permite reunir en un experimento varias imágenes capturadas con diferentes parámetros de barrido o imágenes resultantes de la edición imágenes. Los experimentos (\*.lei) tienen un formato de archivo específico de Leica.

## Adaptaciones específicas del usuario

### Control de funciones a través de la consola de mando

#### Función

Durante una captura de imagen, con frecuencia es preciso ajustar de nuevo diversos parámetros. Para ello, la consola de mando permite controlar funciones de forma rápida y directa. El usuario puede asignar a los botones giratorios de la consola una serie de funciones:

- |   |  |
|---|--|
| ▶ | En el menú View, seleccione la opción Status Bars y, a continuación, Panel Status Bar. |
|---|--|

La barra de estado para la consola de mando aparece en el extremo inferior de la interfaz de usuario del Leica Confocal Software. De izquierda a derecha, la barra de estado consta de un símbolo para la consola de mando, los siete campos que representan los botones giratorios de la consola y tres teclas de pantalla.

- |   |  |
|---|--|
| ▶ | Haga clic en uno de los campos que están distribuidos como los botones giratorios de la consola.                           |
| ▶ | Se abre una lista en la que puede seleccionar la función deseada. El nombre de la función asignada se muestra en el campo. |

La sensibilidad de reacción de los botones giratorios puede modificarse.

- |   |  |
|---|--|
| ▶ | Haga clic en la línea de estado de la consola de mando <u>con el botón derecho del ratón</u> en un parámetro de captura.                               |
| ▶ | En los parámetros de captura Phase, Pinhole, Scan Field Rotation y Zoom es posible elegir entre tres grados de sensibilidad, Smooth, Moderate y Rough. |
| ▶ | En los parámetros de captura Gain, Offset, Smart Gain y Smart Offset puede modificarse el número de voltios por giro del botón.                        |
| ▶ | En los parámetros de captura Z Position y Z Wide Position puede modificarse el número de micrómetros por giro del botón.                               |



*Si desea más información sobre este tema, consulte la ayuda en línea independiente: Tutorials (Ejercicios para el manejo del Leica Confocal Software).*

Una vez asignada una función a cada botón giratorio, puede guardar esta configuración como plantilla.

- |   |   |
|---|---|
| ▶ | Haga clic en la tecla de pantalla de la izquierda de las tres que se encuentran en el lado derecho de la barra de estado. |
| ▶ | Se abre un cuadro de diálogo en el que puede introducir un nombre para la configuración y guardarlo.                      |
| ▶ | Haga clic en la tecla de pantalla central para seleccionar una configuración y cargarla.                                  |

Junto a estas configuraciones definidas por el usuario, puede acceder también a otras configuraciones predefinidas:

- |   |   |
|---|---|
| ▶ | Haga clic en la tecla de pantalla de la derecha de las tres que se encuentran en el lado derecho de la barra de estado. |
| ▶ | Se abre un cuadro de diálogo en el que aparece una lista de todas las configuraciones de la                             |

	consola de mando.
--	-------------------

Las configuraciones predefinidas marcadas con una **L** (Leica) pueden cargarse, pero no pueden modificarse. Las configuraciones definidas por el usuario se crean en el campo de lista bajo User y se marcan con una **U** (User). Si hace clic en una de estas configuraciones y, a continuación, pulsa el botón derecho del ratón, aparece un menú contextual con las opciones siguientes:

Opción	Función
Set as default template	La configuración se carga como configuración estándar al iniciar el software.
Remove default setting	La configuración deja de ser la configuración estándar.
Load	Se carga la configuración.
Rename (sólo con <b>U</b> )	Puede cambiarse el nombre de la configuración.
Delete (sólo con <b>U</b> )	La configuración se borra.

## Almacenamiento del visor Viewer como plantilla



### Función

Mediante la tecla Template puede guardarse un diseño del visor Viewer como plantilla. Los elementos del visor Viewer que pueden introducirse o eliminarse son los teclados, las barras de colores de las tablas de asignación de colores y la leyenda Experiment.

& vea Visor Viewer (página 180)

Al hacer clic en la tecla Template se abre un cuadro de diálogo en el que puede introducir un nombre para la plantilla. Esta configuración del visor Viewer se guarda y se carga siempre que se abre un archivo o se crea un nuevo experimento.

### Información adicional

En el menú Tools, haga clic en Options para poder acceder a las plantillas predefinidas y las definidas por el usuario en el registro Viewer Template. En el campo de lista Leica Templates existen las siguientes plantillas predefinidas:

Viewer Template	Diseño
Viewer (Pure)	El visor sólo contiene el cuadro de imagen.
Viewer (LUT)	El visor contiene el cuadro de imagen y las barras de color de las tablas de asignación de colores.
Viewer (Standard)	El visor contiene los teclados, el cuadro de imagen, las barras de color de las tablas de asignación de colores y la leyenda Experiment.

En el cuadro de lista Personal Templates se encuentran las plantillas definidas por el usuario. Mediante las teclas de pantalla Add Active Viewer y Remove Template puede guardar una nueva plantilla o borrar una existente.

En el menú Tools haga clic en Options para definir en el registro Workspace si debe abrirse algún visor Viewer al iniciar el Leica Confocal Software y, en caso afirmativo, cuántos deben abrirse.

## Paquete de programas opcionales

### Materials (opcional)



*Este paquete de programas opcionales no consta entre los componentes del paquete de programas básico. Si lo desea, puede adquirirlo en su proveedor de Leica o en un distribuidor autorizado.*

### Mediciones de rugosidad a lo largo de un trayecto



#### Función

La función Roughness Profile permite medir valores de altura, distancia y ángulos de una superficie a lo largo de un trayecto y representarlos en una curva. El perfil de altura se mide a partir del bloque de datos seleccionado en el visor Viewer. Este bloque de datos debe ser una serie espacial.

El requisito previo para la creación de un perfil de altura es una imagen topográfica. Por esto, la tecla Roughness Profile no se activa hasta que el usuario haya creado previamente una imagen topográfica del bloque de datos mediante la tecla Topography. Sólo puede cuantificarse un canal de detección.

& vea Creación de imagen topográfica (página 208)

►	Haga clic en la tecla Roughness Profile. El trayecto de medición se inserta en el visor Viewer como una línea blanca en la imagen. La longitud y la posición del trayecto de medición pueden modificarse haciendo clic en el trayecto y arrastrando los puntos de selección hasta la posición deseada con el botón izquierdo del ratón pulsado.
►	Se abre automáticamente un visor en el que aparecen la curva de medida de cada canal de detección y los valores estadísticos.

Parámetro	Significado	Fórmula
Evaluation length: I(P)	Longitud de un trayecto de medición según la norma DIN EN ISO 4287	$L = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$
Max. Peak: Pp	Altura de la punta más alta del perfil (referente a la altura media) según la norma DIN EN ISO 4287	Max (Pp)
Min. Valley: Pv	Profundidad del valle más grande del perfil (referente a la altura media) según la norma DIN EN ISO 4287	Min (Pv)
Deviation: Pa	Media aritmética de la ordenada del perfil dentro del trayecto de medición (altura media) según la norma DIN EN ISO 4287	$P_a = \frac{1}{l} \int_0^l  Z(x)  dx$ <p style="text-align: right;">con</p> $Z(x) = Z_i - \bar{Z}$

RMS: Pq	Media cuadrática de la ordenada del perfil dentro del trayecto de medición según la norma DIN EN ISO 4287	$P_q = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l  Z^2(x)  dx}$ con $Z(x) = Z_i - \bar{Z}$
---------	---	---

Los 4 valores de medición siguientes sólo aparecen cuando en el cuadro de diálogo Viewer Options está seleccionada la función de medición de dos puntos.

▶	Selecione el menú View, la opción Experiment Overview, el icono Charts. & vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Charts (página 185)
▶	En el campo Measurement puede activar o desactivar la medición de dos puntos mediante la selección de 2 Point u Off.

Parámetro	Significado	Fórmula
h (posición del punto de medición izquierdo de la corredera)	Altura del perfil en la posición del punto de medición izquierdo de la corredera	$h_1 (l_1)$
h (posición del punto de medición derecho de la corredera)	Altura del perfil en la posición del punto de medición derecho de la corredera	$h_2 (l_2)$
Step Height dh	Desnivel del perfil entre los puntos de medición izquierdo y derecho de la corredera	$ h_2 - h_1 $
dx	Distancia entre los extremos izquierdo y derecho de la corredera	$ l_2 - l_1 $
alpha	Ángulo entre la línea de enlace entre los puntos de medición izquierdo y derecho y la horizontal	$\arctan\left(\frac{dh}{dx}\right)$

#### Almacenamiento de valores de medición

El programa puede guardar los valores de las posiciones de ambos puntos de medición, así como el desnivel entre ambos puntos.

▶	Selecione el menú View, la opción Experiment Overview, el icono Surface Measure. & vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Surface Measure (página 191)
▶	En el campo Multipoint Measurement haga clic en la tecla de pantalla Remember, para guardar los valores. Mediante la tecla de pantalla Clear vuelven a borrarse.



*Esta función de cuantificación sólo se aplica cuando está desconectado, es decir, sólo está disponible para bloques de datos previamente capturados.*

#### Medición de rugosidad dentro de una zona de interés (ROI)



##### Función

La función Roughness Area permite medir valores de altura, distancia y ángulos de una superficie dentro de una zona de interés. El perfil se mide a partir del bloque de datos seleccionado en el visor Viewer. Este bloque de datos debe ser una serie espacial.

El requisito previo para la creación de un perfil de altura es una imagen topográfica. Por esto, la tecla Roughness Area no se activa hasta que el usuario haya creado previamente una imagen topográfica del bloque de datos mediante la tecla Topography:

& vea Creación de imagen topográfica (página 208)

▶	Haga clic en la tecla Roughness Area y trace la zona de interés (ROI) en la imagen. Las teclas con las que se define la zona de interés se activan junto con la tecla Roughness Area.
&	vea Definición de zona de interés (ROI) con forma de elipse (página 242)
&	vea Definición de zona de interés (ROI) con forma de polígono
&	vea Definición de zona de interés (ROI) con forma de rectángulo
&	vea Definición automática de una zona de interés (ROI)
&	vea Marcado y desplazamiento de una zona de interés (ROI)
&	vea Borrado de una zona de interés (ROI)
▶	Se abre automáticamente un visor en el que aparecen los valores estadísticos.

Parámetro	Significado	Fórmula
# Pixel	Número de píxeles dentro de la zona de interés seleccionada	
Area	Contenido de la superficie	$A = \int_0^A d_A A$
Avg. Height	Altura media de la ordenada del perfil	$H = \frac{1}{A} \int_0^A Z(x, y) dA$
Pa	Media aritmética de la ordenada del perfil dentro del trayecto de medición (altura media) según la norma DIN EN ISO 4287	$P_a = \frac{1}{A} \int_0^A  Z(x, y)  dA$ con $Z(x, y) = Z_i - \bar{Z}$
RMS (Pq)	Media cuadrática de la ordenada del perfil dentro del trayecto de medición según la norma DIN EN ISO 4287	$P_q = \sqrt{\frac{1}{A} \int_0^A Z^2(x, y) dA}$ con $Z(x, y) = Z_i - \bar{Z}$
Min Valley (Pv)	Altura mínima de la ordenada del perfil (referente a la altura media)	Min (Pv)
Max Peak (Pp)	Altura máxima de la ordenada del perfil (referente a la altura media)	Max (Pp)



*Esta función de cuantificación sólo se aplica cuando está desconectado, es decir, sólo está disponible para bloques de datos previamente capturados.*

## Filtro lineal y filtro morfológico (opcional)

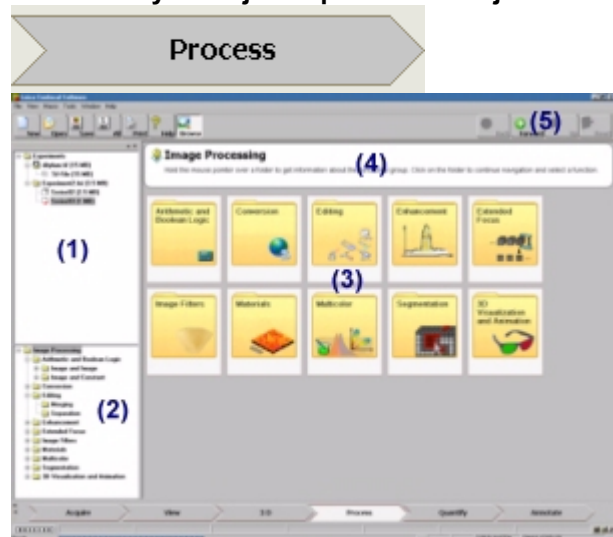


**En el presente capítulo se describen los temas siguientes**

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process

- ▼ ¿Qué son filtros lineares?
- ▼ Navegación: Image Filters\ Linear Filters
- ▼ ¿Qué son filtros morfológicos?
- ▼ Navegación: Image Filters\ Morphological Filters

### Estructura y manejo del paso de trabajo Process



Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

►	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
►	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
►	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



►	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
►	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic en la tecla Back.
►	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.
►	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
►	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej., Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:





▶	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
▶	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el experimento activo.

### ¿Qué son filtros lineales?

Los filtros se utilizan para mejorar la calidad de una imagen. En general, esto implica la eliminación de puntos no deseados de la imagen (píxel). Con la función de filtro disponible en el programa, un filtro de paso bajo, se reduce en la imagen el ruido estático que puede estar producido, por ejemplo, por el detector.

El principio de un filtro consiste en compensar el valor de cada píxel de una imagen con los valores de los píxeles más próximos. El núcleo del filtro (Kernel) describe el número y la graduación de los píxeles más próximos que influyen en el cálculo del nuevo punto de la imagen. El núcleo del filtro utilizado puede describirse con el triángulo de Pascal:

Tamaño de núcleo	Triángulo de Pascal	Normalización
Kernel Size 3	<pre>       1  1      1 2 1     1 3 3 1           </pre>	1/2 1/4 1/8
Kernel Size 5	<pre>       1  4  6  4  1      1 5 10 10 5 1     1 6 15 20 15 6 1           </pre>	1/16 1/32 1/64
Kernel Size 7	<pre>       1  7  21  35  35  21  7  1      1 8 28 56 70 56 28 8 1           </pre>	1/128 1/256
...	...	...

Si selecciona, por ejemplo, el tamaño de núcleo 5 (Kernel Size 5) se utilizan 5 píxeles de la imagen original para el cálculo de cada píxel de la imagen filtrada. El píxel central del núcleo del filtro es siempre el punto de la imagen que se desea calcular. En este proceso, los valores grises de los 5 píxeles se multiplican, de acuerdo con el esquema de graduación 1-4-6-4-1, por los factores 1/16, 4/16, 6/16, 4/16, 1/16 y se suman uno a otro para alcanzar el valor final. En la siguiente representación esquemática, esto implica para el cálculo del píxel C, que los valores grises de los píxeles A, B y D, E influyen en el cálculo del píxel C' filtrado. El cálculo de C' se realiza de la forma siguiente:  $16 \times 1/16 + 4 \times 4/16 + 8 \times 6/16 + 32 \times 4/16 + 8 \times 1/16 = 1 + 1 + 3 + 8 + 0,5 = 13,5$

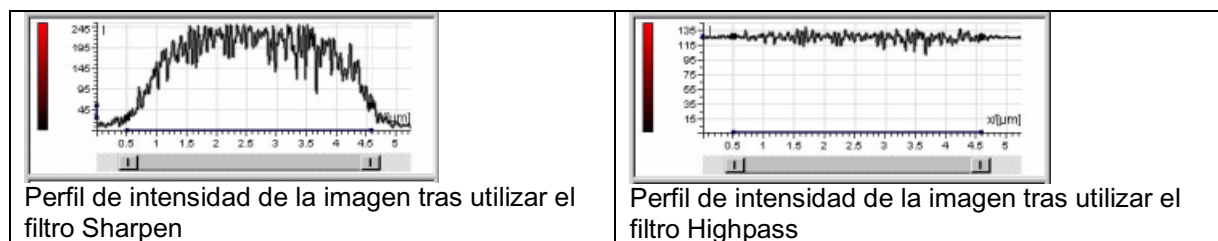
	A	B	C	D	E
Valores grises de los píxeles A-E en la imagen original	16	4	8	32	8
Factores del tamaño de núcleo 5	1/16	4/16	6/16	4/16	1/16
Valor gris de C' en la imagen filtrada			13,5		

Un cálculo de este tipo se realiza para cada píxel de la imagen original. En el borde de la imagen destaca la máscara del filtro sobre la imagen. Para este píxel se utiliza el valor 0.

### Efecto del filtro lineal







►	Si selecciona el filtro Blur se aplica a la imagen el filtro de paso bajo descrito anteriormente. Este tipo filtra las frecuencias altas y las elimina de la imagen. Esto es, se suavizan las fuertes transiciones entre los valores de intensidad bajos y los altos. Este filtro permite eliminar los ruidos de una imagen.
►	Si selecciona el filtro Sharpen se utiliza el filtro de paso bajo en la imagen y, a continuación, se suman los valores de la imagen filtrada con filtro de paso alto a los valores de la imagen original. Este tipo filtra las frecuencias bajas y las elimina de la imagen. Esto es, se intensifican las fuertes transiciones entre los valores de intensidad bajos y los altos.
►	Si selecciona el filtro Highpass se utiliza el filtro de paso bajo en la imagen y, a continuación, se sustraen los valores de la imagen original de los valores de la imagen filtrada con el filtro de paso bajo. El resultado corresponde a una imagen tratada con un filtro de paso alto. Este tipo de filtro sólo representa las fuertes transiciones entre los valores de intensidad altos y los bajos.

### Navegación: Image Filters\ Linear Filters

#### Aplicación de filtro lineal (de paso bajo y de paso alto) en imágenes

►	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
►	Seleccione uno de los tres tipos de filtro: alisado (Blur), contraste (Sharpen), filtro de paso alto (Highpass).
►	En el campo Kernel Size seleccione un valor para el tamaño del núcleo. El valor introducido en el campo Kernel Size como Cut-off Wavelength es el tamaño del filtro medido en píxeles. Este valor se calcula sobre la base de los parámetros de barrido utilizados para cada imagen (ampliación del objetivo, longitud de onda de la luz de excitación, formato de barrido, factor de zoom electrónico ...).
►	En el campo Filter Directions ajuste la dimensionalidad del filtro. Seleccione los ejes espaciales sobre los que debe aplicarse el filtro de forma secuencial. Aquí se utilizan filtros unidimensionales, es decir, el filtro se calcula cada vez sobre un solo eje. El valor introducido en el campo Filter Directions como Cut-off Wavelength es el tamaño del filtro medido en nanómetros. Con un valor de, por ejemplo, 160 nm se filtran todas las longitudes de onda más pequeñas de 160 nm.

#### Sharp Factor (sólo con el tipo de filtro Sharpen)

►	Mediante la corredera del campo Sharp Factor puede variarse el efecto del filtro Sharp. Si se ajusta el valor 0 para este factor, el filtro no está activo.
---	---

#### Recuadro Blur (Gallery), Sharpen (Gallery), Highpass (Gallery)

►	Haga clic en el recuadro Blur (Gallery), Sharpen (Gallery) o Highpass (Gallery) para ver una galería de vistas preliminares del bloque de datos de imagen seleccionado. Cada vista preliminar se calcula con un tamaño de núcleo diferente (y un factor de contraste diferente). Haga clic en un recuadro para ver un cuadro de diálogo con la configuración correspondiente.
---	---

#### ¿Qué son filtros morfológicos?

Los filtros morfológicos permiten modificar la forma de las estructuras interrelacionadas de la imagen y separarlas del fondo con ayuda de operadores matemáticos. En general, estos operadores se aplican a imágenes binarias. Estas imágenes tienen píxeles que sólo pueden tener el valor 1 ó 0. En el Leica Confocal Software puede crear imágenes binarias con las funciones de segmentación. Pero con estos operadores también es posible editar imágenes de valores grises, es decir, imágenes con una gama de valores de, por ejemplo, 256 (8 bits) valores de gris / de intensidad diferentes.

& vea Paso de trabajo Process / Carpeta Segmentation (página 295)

El principio consiste en desplazar una máscara (también denominada elemento estructural) píxel a píxel sobre la imagen. El píxel que se desea analizar es siempre el punto central de la máscara. En el Leica Confocal Software, la máscara tiene la forma de un cuadrado, una cruz o un círculo. La forma y el tamaño de la máscara determinan cuántos píxeles próximos y cuáles de ellos participan en el filtro. Con ayuda de un determinado criterio se distingue qué píxel se define como estructura y cuál como fondo en la imagen resultante. En las imágenes binarias, este criterio es el enlace lógico AND u OR, y en las imágenes de valores grises, es la altura del valor de gris o de intensidad.

& vea Enlaces booleanos (página 302)

La forma de la máscara influye en las estructuras que se resaltan en la imagen resultante. Si, por ejemplo, se selecciona la máscara con forma esférica, se acentúan formas redondas. No obstante, la relación de proximidad con la que cada píxel se codifica como estructura o como fondo depende de los operadores morfológicos.

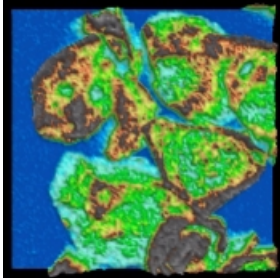
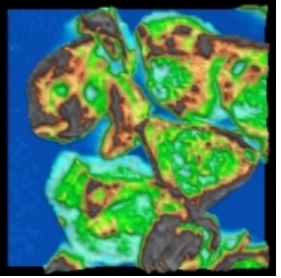
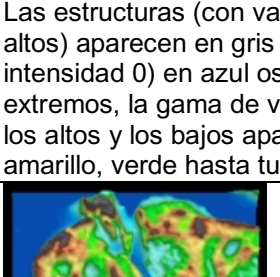
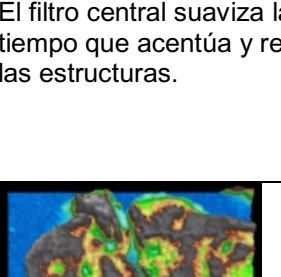


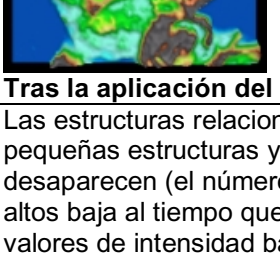

Existen dos tipos básicos de operadores: la erosión (Erosion) y la dilatación (Dilation), así como combinaciones de ellos:

Operador	Descripción
Erosión (Erosion)	En las <u>imágenes binarias</u> , el píxel analizado recibe el valor 1 en la imagen resultante si <u>todos</u> los píxeles próximos (determinado por la forma y el tamaño de la máscara) están codificados en la imagen original binaria con un 1. En las <u>imágenes con valores grises</u> , se introduce en la imagen resultante el valor gris mínimo del píxel próximo en lugar del valor del píxel analizado.
Dilatación (Dilation)	En las <u>imágenes binarias</u> , el píxel analizado recibe el valor 1 en la imagen resultante si al menos <u>uno</u> de los píxeles próximos (determinado por la forma y el tamaño de la máscara) están codificados en la imagen de valor umbral binaria con un 1. En las <u>imágenes con valores grises</u> , se introduce en la imagen resultante el valor de intensidad máximo del píxel próximo en lugar del valor del píxel analizado.

Combinación de operadores	Descripción
Abrir (Open)	Abrir es una combinación de operadores. En primer lugar se realiza un erosión y, a continuación, una dilatación.
Cerrar (Close)	Cerrar es una combinación de operadores. En primer lugar se realiza un dilatación y, a continuación, una erosión.
Top Hat	Top Hat edita la imagen con la combinación de operadores Abrir y sustrae la imagen resultante de la original.
Bottom Hat	Bottom Hat edita la imagen con la combinación de operadores Cerrar y sustrae la imagen original de la resultante.

Filtro	Descripción
Central	El filtro central pertenece al grupo de los filtros de rango no lineal. Con este filtro, los valores de intensidad de los píxeles próximos (determinados por la forma y el tamaño de la máscara) se clasifican según su tamaño. En la imagen resultante del filtrado central, en lugar del píxel analizado se introduce el valor de intensidad que se encuentra en el centro en este rango.

### Efecto de los operadores morfológicos

 <p><b>Imagen original</b></p> <p>Las estructuras (con valores de intensidad muy altos) aparecen en gris y el fondo (valor de intensidad 0) en azul oscuro. Entre ambos extremos, la gama de valores de intensidad entre los altos y los bajos aparece desde marrón, amarillo, verde hasta turquesa.</p>	 <p><b>Tras la aplicación del filtro Median</b></p> <p>El filtro central suaviza la imagen total al tiempo que acentúa y remarca el contorno de las estructuras.</p>
 <p><b>Tras la aplicación del operador Erosion</b></p> <p>Las estructuras relacionadas se reducen y las pequeñas estructuras y las conexiones entre ellas desaparecen (el número de valores de intensidad altos baja al tiempo que aumenta el número de valores de intensidad bajos).</p>	 <p><b>Tras la aplicación del operador Dilation</b></p> <p>Las estructuras relacionadas crecen y los espacios intermedios interiores de una estructura o entre estructuras se rellenan (incrementa el número de valores de intensidad altos y se reduce el número de valores de intensidad bajos).</p>
 <p><b>Tras la aplicación del operador Open (Erosion + Dilation)</b></p> <p>Las estructuras relacionadas se reducen y los espacios intermedios aumentan (baja el número de valores de intensidad altos al tiempo que aumenta el número de valores de intensidad bajos).</p>	 <p><b>Tras la aplicación del operador Close (Dilation + Erosion)</b></p> <p>Las estructuras relacionadas crecen y los espacios intermedios no varían (aumenta el número de valores de intensidad altos al tiempo que el número de valores de intensidad bajos no varía).</p>
 <p><b>Tras la aplicación del operador Top Hat</b></p> <p>Se extraen los valores de intensidad altos.</p>	 <p><b>Tras la aplicación del operador Bottom Hat</b></p> <p>Se extraen los valores de intensidad bajos.</p>

**Navegación: Image Filters\ Morphological Filters****Aplicación de un filtro morfológico a imágenes**

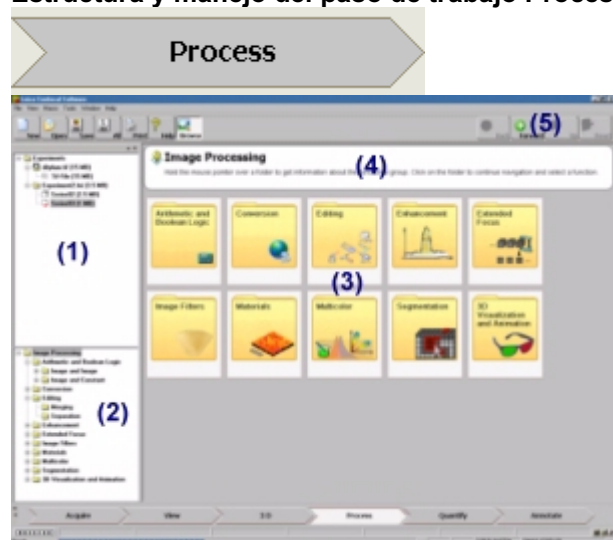
▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	Seleccione uno de los siete tipos de filtro: filtro central (Median), Erosión (Erosion), Dilatación (Dilation), Abrir (Open), Cerrar (Close), y Top hat y Bottom hat.
▶	En el campo Mask, seleccione la máscara del filtro: cuadrado (Cube), cruz (Cross) o círculo (Sphere). La forma del elemento estructural influye en las estructuras de la imagen realizadas por el filtro. Por ejemplo, los círculos acentúan las estructuras redondas en la imagen resultante.
▶	En los campos Size X, Size Y y Size Z introduzca el tamaño de la máscara en píxeles. El tamaño de la máscara determina el número de píxeles próximos que se incluyen en la máscara del filtro.
▶	En el campo Repetition determine la frecuencia con que debe aplicarse el filtro.

**Recuadros con el nombre (Gallery)**

▶	Haga clic en uno de los recuadros que llevan (Gallery) en el nombre para ver una galería de vistas preliminares del bloque de datos de imagen seleccionado. Cada vista preliminar se calcula con un elemento estructural y un tamaño de máscara diferentes. Haga clic en un recuadro para ver un cuadro de diálogo con la configuración correspondiente.
---	--

**Nivelado y filtrado de capturas superficiales****En el presente capítulo se describen los temas siguientes**

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process
- ▼ Navegación: Materials\ Leveling
- ▼ ¿Qué son filtros lineares?
- ▼ Navegación: Materials\ Roughness Filter
- ▼ Navegación: Materials\ Waviness Filter

**Estructura y manejo del paso de trabajo Process**

Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz

de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

▶	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
▶	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
▶	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



▶	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
▶	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic en la tecla Back.
▶	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.
▶	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
▶	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej., Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:



▶	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
▶	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el experimento activo.

### Navegación: Materials\ Leveling

#### Adaptación de una función de interpolación a un bloque de datos para la corrección de tendencias (p. ej., error en la captura del bloque de datos)

El objetivo de este procedimiento es colocar en posición horizontal el desarrollo de una intensidad que muestra una tendencia curva. Para ello, en primer lugar se adapta una función de interpolación (Polynom) al desarrollo de la intensidad. A continuación se calcula la distancia de la función de interpolación óptima hasta una meseta de intensidad horizontal. Para ello, las diferencias de intensidad que aparecen se suman píxel a píxel al bloque de datos original. De esta forma se compensa la tendencia.

& vea Función de adaptación para la corrección de tendencias (página 300)

La función objetivo que se desea optimizar mediante la determinación del coeficiente de la función de adaptación es la siguiente:

$$\int \|I - f(\Omega)\| d\Omega = \min$$

►	Seleccione uno de los cuatro tipos de función de adaptación: Leveling (Linear), Leveling (Bilinear), Leveling (Quadratic), Leveling (Cubic).
---	--

Fitting Interpolation Function	Fórmula
Linear	$f(x) = a + bx + cy$
Bilinear	$f(x) = a + bx + cx + dxy$
Quadratic	$f(x) = a + bx + cx + dxy + fx^2$
Cubic	$f(x) = a + bx + cx + dxy + fx^2 + gxy^2 + hx^3 + iy^3$

►	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
►	Seleccione el incremento de paso en el campo Sample Step Width. El incremento de paso permite ajustar el número de puntos de apoyo para el polinomio. Cuanto menor es el incremento de paso mayor es la precisión y el tiempo empleado en el cálculo de la función de adaptación.
►	Si el bloque de datos tiene ruidos, es recomendable eliminar las señales de ruido de intensidad débil mediante el ajuste de un valor umbral en el campo Threshold. Todos los valores de intensidad menores que el valor umbral no se utilizan para el cálculo. Esto evita que se utilicen las señales de ruido por error como puntos de apoyo para la función de adaptación.



**¿Qué son filtros lineales?**

Los filtros se utilizan para mejorar la calidad de una imagen. En general, esto implica la eliminación de puntos no deseados de la imagen (píxel). Con la función de filtro disponible en el programa, un filtro de paso bajo, se reduce en la imagen el ruido estático que puede estar producido, por ejemplo, por el detector.

El principio de un filtro consiste en compensar el valor de cada píxel de una imagen con los valores de los píxeles más próximos. El núcleo del filtro (Kernel) describe el número y la graduación de los píxeles más próximos que influyen en el cálculo del nuevo punto de la imagen. El núcleo del filtro utilizado puede describirse con el triángulo de Pascal:

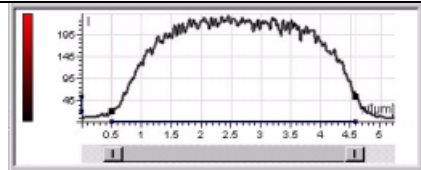
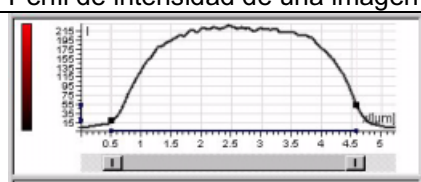
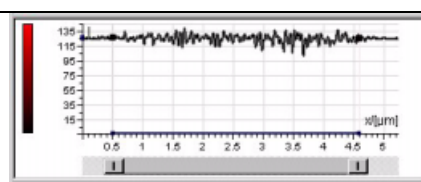
Tamaño de núcleo	Triángulo de Pascal	Normalización
Kernel Size 3	<pre>       1 1     1 2 1   1 3 3 1 </pre>	1/2 1/4 1/8
Kernel Size 5	<pre>       1 4 6 4 1     1 5 10 10 5 1   1 6 15 20 15 6 1 1 7 21 35 35 21 7 1 </pre>	1/16 1/32 1/64 1/128
Kernel Size 9	<pre> 1 8 28 56 70 56 28 8 1 </pre>	1/256
...	...	...

Si selecciona, por ejemplo, el tamaño de núcleo 5 (Kernel Size 5) se utilizan 5 píxeles de la imagen original para el cálculo de cada píxel de la imagen filtrada. El píxel central del núcleo del filtro es siempre el punto de la imagen que se desea calcular. En este proceso, los valores grises de los 5 píxeles se multiplican, de acuerdo con el esquema de graduación 1-4-6-4-1, por los factores 1/16, 4/16, 6/16, 4/16, 1/16 y se suman uno a otro para alcanzar el valor final. En la siguiente representación esquemática, esto implica para el cálculo del píxel C, que los valores grises de los píxeles A, B y D, E influyen en el cálculo del píxel C' filtrado. El cálculo de C' se realiza de la forma siguiente:  $16 \times 1/16 + 4 \times 4/16 + 8 \times 6/16 + 32 \times 4/16 + 8 \times 1/16 = 1 + 1 + 3 + 8 + 0,5 = 13,5$

	A	B	C	D	E
Valores grises de los píxeles A-E en la imagen original	16	4	8	32	8
Factores del tamaño de núcleo 5	1/16	4/16	6/16	4/16	1/16
Valor gris de C' en la imagen filtrada			13,5		

Un cálculo de este tipo se realiza para cada píxel de la imagen original. En el borde de la imagen destaca la máscara del filtro sobre la imagen. Para este píxel se utiliza el valor 0.

**Efecto del filtro lineal**

 <p>Perfil de intensidad de una imagen sin filtrar</p>	
 <p>Perfil de intensidad de la imagen tras utilizar el filtro Waviness</p>	 <p>Perfil de intensidad de la imagen tras utilizar el filtro Roughness</p>

- Si selecciona el filtro Waviness se aplica a la imagen el filtro de paso bajo descrito anteriormente. Este tipo filtra las frecuencias altas y las elimina de la imagen. Esto es, se suavizan las fuertes transiciones entre los valores de intensidad bajos y los altos. Este filtro

	permite eliminar los ruidos de una imagen.
▶	Si selecciona el filtro Roughness se utiliza el filtro de paso bajo en la imagen y, a continuación, se sustraen los valores de la imagen original de los valores de la imagen filtrada con el filtro de paso bajo. El resultado corresponde a una imagen tratada con un filtro de paso alto. Este tipo de filtro sólo representa las fuertes transiciones entre los valores de intensidad altos y los bajos.

#### Navegación: Materials\ Roughness Filter

##### Aplicación de un filtro de paso alto a imágenes

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	En el campo Kernel Size seleccione un valor para el tamaño del núcleo. El valor introducido en el campo Kernel Size como Cut-off Wavelength es el tamaño del filtro medido en píxeles. Este valor se calcula sobre la base de los parámetros de barrido utilizados para cada imagen (ampliación del objetivo, longitud de onda de la luz de excitación, formato de barrido, factor de zoom electrónico ...).
▶	En el campo Filter Directions ajuste la dimensionalidad del filtro. Seleccione los ejes espaciales sobre los que debe aplicarse el filtro de forma secuencial. Aquí se utilizan filtros unidimensionales, es decir, el filtro se calcula cada vez sobre un solo eje. El valor introducido en el campo Filter Directions como Cut-off Wavelength es el tamaño del filtro medido en nanómetros. Con un valor de, por ejemplo, 160 nm se filtran todas las longitudes de onda más pequeñas de 160 nm.

#### Navegación: Materials\ Waviness Filter

##### Aplicación de un filtro de paso bajo a imágenes

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	En el campo Kernel Size seleccione un valor para el tamaño del núcleo. El valor introducido en el campo Kernel Size como Cut-off Wavelength es el tamaño del filtro medido en píxeles. Este valor se calcula sobre la base de los parámetros de barrido utilizados para cada imagen (ampliación del objetivo, longitud de onda de la luz de excitación, formato de barrido, factor de zoom electrónico ...).
▶	En el campo Filter Directions ajuste la dimensionalidad del filtro. Seleccione los ejes espaciales sobre los que debe aplicarse el filtro de forma secuencial. Aquí se utilizan filtros unidimensionales, es decir, el filtro se calcula cada vez sobre un solo eje. El valor introducido en el campo Filter Directions como Cut-off Wavelength es el tamaño del filtro medido en nanómetros. Con un valor de, por ejemplo, 160 nm se filtran todas las longitudes de onda más pequeñas de 160 nm.

## Medición de superficies y volúmenes



### Función

La función Materials permite calcular las superficies y volúmenes de un bloque de datos espacial tridimensional.

Si hace clic en la tecla Materials se abre automáticamente un visor en el que se muestran una curva de medida y el tamaño del volumen acumulado en función de la posición. Volumen acumulado quiere decir que, para cada posición z, se determina el valor del volumen que queda por debajo del bloque de datos.

El requisito previo para el cálculo de superficies y volúmenes es una imagen topográfica. Por esto, la tecla Materials no se activa hasta que el usuario haya creado previamente una imagen topográfica del bloque de datos mediante la tecla Topography: Sólo puede cuantificarse un canal de detección.



& vea Creación de imagen topográfica (página 208)

Parámetro	Significado
Scanned Area A	Este valor representa la proyección horizontal de la superficie de un corte xy.
Surface Area A'	Este valor representa la superficie real de un corte xy. La superficie real está en relación con la proyección horizontal al menos de igual tamaño y, en general, incluso mayor.
Ratio A'/A	Este valor representa la relación de la superficie con la base. Cuanto mayor es, más se introduce la superficie bidimensional en el espacio tridimensional.

**Los 4 valores de medición siguientes sólo aparecen cuando en el cuadro de diálogo Viewer Options está seleccionada la función de medición de dos puntos.**

▶	Seleccione el menú View, la opción Experiment Overview, el icono Charts. & vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Charts (página 185)
▶	En el campo Measurement puede activar o desactivar la medición de dos puntos mediante la selección de 2 Point u Off.

V(z<=valor de posición superior)	Este valor representa el volumen que queda por debajo del valor de posición <u>superior</u> de la corredera de medición (extremo derecho de la corredera).
V(z<=valor de posición inferior)	Este valor representa el volumen que queda por debajo del valor de posición <u>inferior</u> de la corredera de medición (extremo derecho de la corredera).
dV	Volumen entre ambos valores de posición de la corredera
dz	Distancia entre ambos valores de posición de la corredera



*Esta función de cuantificación sólo se aplica cuando está desconectado, es decir, sólo está disponible para bloques de datos previamente capturados.*

## Multicolor (opcional)



*Este paquete de programas opcionales no consta entre los componentes del paquete de programas básico. Si lo desea, puede adquirirlo en su proveedor de Leica o en un distribuidor autorizado.*

### Multicolor / Creación de citofluorograma bidimensional

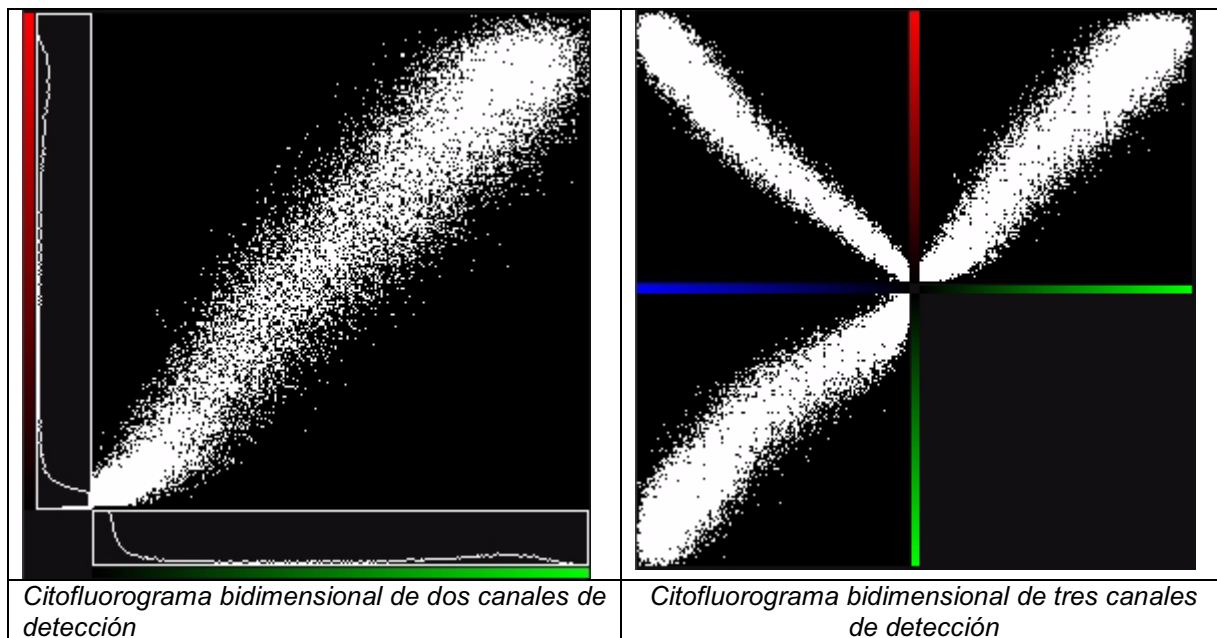


#### Esta página contiene los temas siguientes










- ▼ Creación de un citofluorograma bidimensional de un bloque de datos de imagen
- ▼ Instancias e interpretación del citofluorograma

#### Creación de un citofluorograma bidimensional de un bloque de datos de imagen

Mediante esta función se crea un citofluorograma bidimensional. Un citofluorograma bidimensional es un diagrama de puntos en el que se visualiza la distribución conjunta de los valores de intensidad de dos canales de detección. Cada punto de la nube del citofluorograma representa un par de valores de intensidad procedentes de ambos canales de detección. En él pueden visualizarse los datos de imagen de hasta tres canales de detección.



- ▶ Haga clic en la tecla CF2D para crear un citofluorograma bidimensional del bloque de datos de imagen del visor Viewer activo. Si hace clic en dos canales de detección, se representan todos los pares de valores de intensidad existentes en una nube de puntos bidimensional. Si tiene tres canales de detección activos, se representan los pares de valores de intensidad de cada dos canales en tres nubes de puntos bidimensionales. Si sólo está seleccionado un canal, la distribución de los valores de intensidad se representa en un gráfico de barras.

	   
▶	<p>Haga clic en la tecla Gallery para incluir todas las imágenes de una serie en la creación del citofluorograma.</p> 
▶	<p>Haga clic en la tecla Single para utilizar la imagen individual mostrada en el visor Viewer actual para la creación del citofluorograma. Mediante las teclas Next, Previous o Play puede desplazarse por la serie de imágenes y los citofluorogramas correspondientes.</p>    

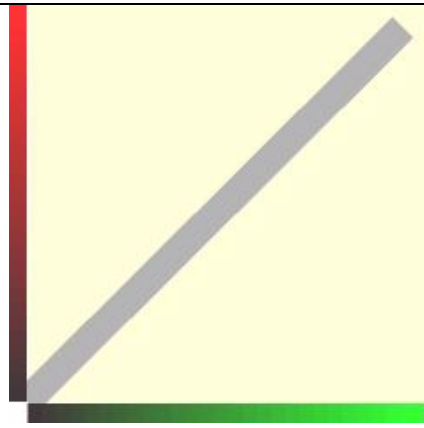
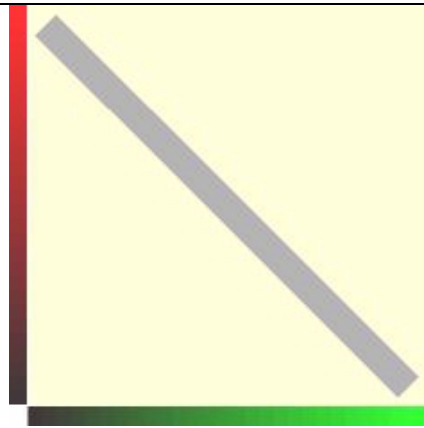
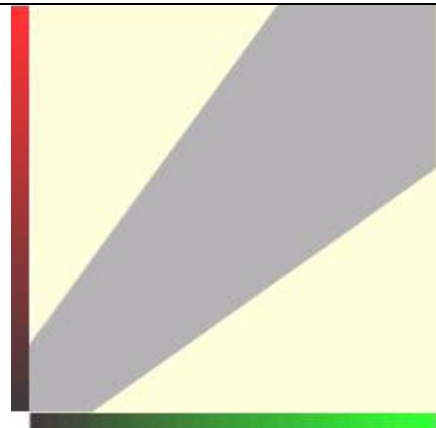
También puede representar los datos de imagen de 3 canales de detección como citofluorograma tridimensional.

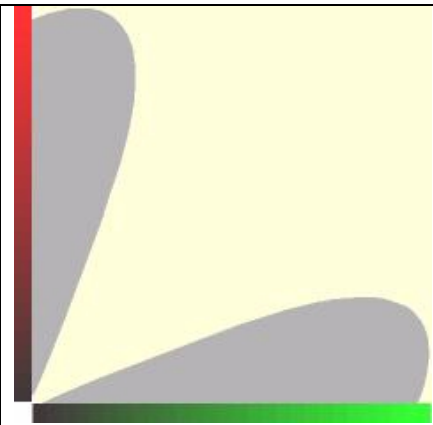
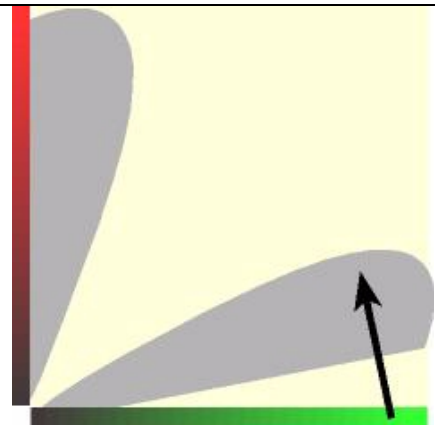
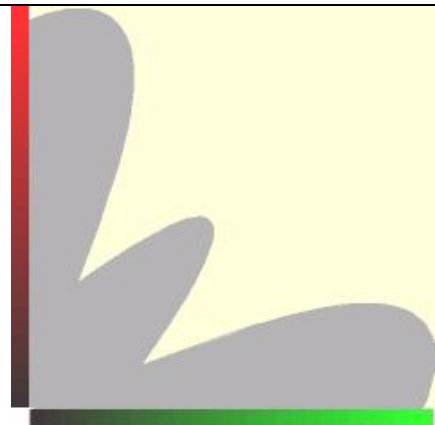
& vea Multicolor / Creación de un citofluorograma tridimensional (página 273)

En el cuadro de diálogo Viewer Options existen varias opciones para el citofluorograma. Entre otras, puede limitar la gama de valores de intensidad, variar la codificación de color e insertar o eliminar elementos de visualización del citofluorograma.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Multicolor (página 277)

### Representación esquemática de instancias posibles del citofluorograma

		
<p>(a) <i>La correlación de los datos de imagen en los canales de detección verde y rojo es positiva.</i></p>	<p>(b) <i>La correlación de los datos de imagen en los canales de detección verde y rojo es negativa.</i></p>	<p>(c) <i>Datos con correlación positiva y ruidos en los canales de detección verde y rojo.</i></p>

		
(d) <i>Los datos de la imagen y los ruidos de los canales de detección verde y rojo no dependen unos de otros.</i>	(e) <i>Diafonía óptica del canal de detección verde en el rojo</i>	(f) <i>Datos de imagen y ruidos independientes y correlativos en los canales de detección rojo y verde</i>

►	El diagrama (a) muestra una nube cuyos puntos se acumulan sobre una recta en la diagonal superficial del citofluorograma. La correlación de los datos de imagen de ambos canales de detección es muy alta y positiva. Existe una relación entre los valores de intensidad en los canales verde y rojo, ya que el incremento en el canal verde corresponde a un incremento idéntico en el canal rojo. Esta instancia del citofluorograma aparece en la colocación de tinturas fluorescentes.
►	El diagrama (b) muestra una nube cuyos puntos se acumulan sobre una recta en la diagonal superficial del citofluorograma. La correlación de los datos de imagen de ambos canales de detección es muy alta y negativa. Existe una relación entre los valores de intensidad en los canales verde y rojo, ya que el incremento en el canal verde corresponde a una reducción de igual nivel en el canal rojo.
►	El diagrama (c) muestra una nube cuyos puntos se distribuyen sobre una superficie ancha. Sólo una parte relativamente pequeña de los puntos, en concreto los que se encuentran en el centro de la nube, están colocados sobre las diagonales. Sólo para esta parte puede suponerse una relación directa entre los valores de intensidad de ambos canales. La amplia dispersión de la nube de puntos apunta a la existencia de ruidos en el bloque de datos de la imagen.
►	El diagrama (d) muestra dos nubes separadas cuyos puntos están distribuidos en cada caso sobre una amplia superficie. No puede determinarse una correlación de los datos de la imagen de ambos canales de detección ya que el incremento en un canal corresponde siempre sólo a un pequeño incremento en el otro canal. Cada canal de detección presenta información independiente sobre el objeto.
►	El diagrama (e) muestra dos nubes separadas cuyos puntos están distribuidos en cada caso sobre una amplia superficie. La nube de puntos del canal verde se inclina en la dirección de las diagonales espaciales. Esta instancia del citofluorograma apunta a una diafonía óptica del canal verde en el rojo.
►	El diagrama (f) muestra, por un lado, dos nubes de puntos independientes y, por otro lado, una nube cuyos puntos se concentran sobre una recta en la diagonal superficial del citofluorograma. En ambos canales de detección existen datos correlativos y también información independiente sobre el objeto.

Con ayuda de una máscara binaria puede seleccionarse una parte de los pares de valores de intensidad del citofluorograma y localizarlos en las imágenes originales. Para ello, lea la descripción de la tecla Mask.

& vea Multicolor / Visualización de colocación en la imagen original (página 274)

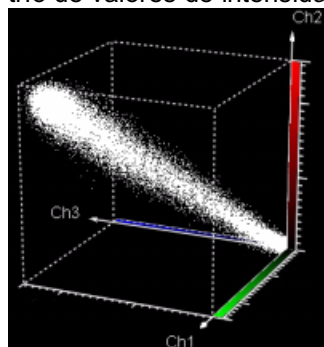
También pueden calcularse y visualizarse diferentes datos geométricos y densitométricos para la imagen original y para los datos de imagen seleccionados en el citofluorograma.


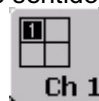
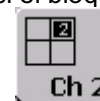
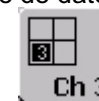



& vea Multicolor / Visualización de estadísticas (página 276)

## Multicolor / Creación de citofluorograma tridimensional



Mediante esta función puede crear un citofluorograma tridimensional. Un citofluorograma tridimensional es un diagrama de puntos en el que se visualiza la distribución conjunta de los valores de intensidad de tres canales de detección. Cada punto de la nube del citofluorograma representa un trío de valores de intensidad procedentes de tres canales.



▶	<p>Haga clic en la tecla CF3D para crear un citofluorograma bidimensional del bloque de datos activo de imagen. La visualización de datos de la imagen con el citofluorograma tridimensional sólo tiene sentido si el bloque de datos se ha capturado en tres canales de detección.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">     </div>
▶	<p>Mediante las teclas Rotate, Move y Zoom puede girar y desplazar el citofluorograma, así como ampliarlo o reducirlo.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">    </div> <p>&amp; vea Giro de vista tridimensional (página 210)  &amp; vea Desplazamiento de vista tridimensional (página 211)  &amp; vea Zoom de vista tridimensional (página 211)</p>

Si desea más información sobre las posibles instancias del citofluorograma, consulte la descripción del citofluorograma bidimensional.

& vea Multicolor / Creación de un citofluorograma bidimensional (página 270)

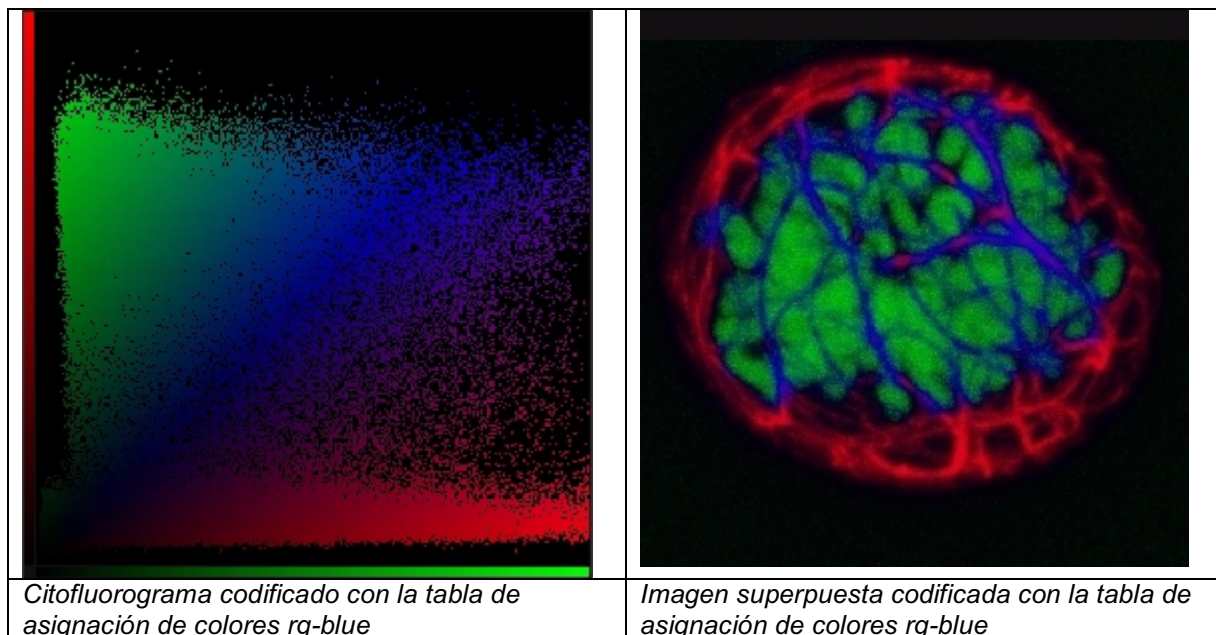
En el cuadro de diálogo Viewer Options existen varias opciones para el citofluorograma. Entre otras, puede limitar la gama de valores de intensidad, variar la codificación de color e insertar o eliminar elementos de visualización del citofluorograma.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Multicolor (página 277)

## Multicolor / Visualización de imagen superpuesta

**Función**

Al accionar esta tecla se crea una imagen superpuesta procedente de todos los canales de detección activos. A diferencia de la imagen superpuesta convencional, con esta dispone de la posibilidad de utilizar tablas de asignación de colores especialmente diseñadas para el citofluorograma que resaltan o difuminan los puntos de las diagonales espaciales del citofluorograma con un color especial. Con ayuda de la imagen superpuesta pueden visualizarse las zonas de la imagen original en las que aparecen colocalizaciones de tinturas fluorescentes.



Las tablas de asignación de colores se encuentran en el cuadro de diálogo Viewer Options, icono Multicolor, registro Color, punto de selección Binary with custom colors.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Multicolor (página 277)

## Multicolor / Localización de pares de valores del citofluorograma en la imagen original





Al accionar la tecla Mask se crea una máscara binaria de los datos del citofluorograma. Esta función permite seleccionar determinados pares de valores de intensidad del citofluorograma y localizarlos en la imagen original.

## Marcado y localización de pares de valores de intensidad en el citofluorograma y en la imagen original

▶	Haga clic en la tecla CF2D para crear un citofluorograma bidimensional del bloque de datos de imagen.
---	---

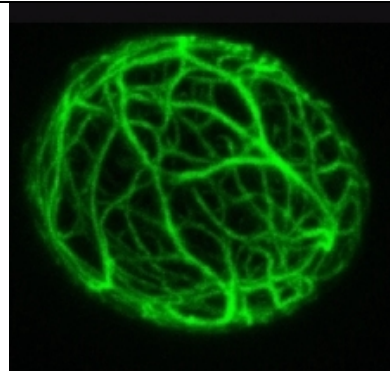
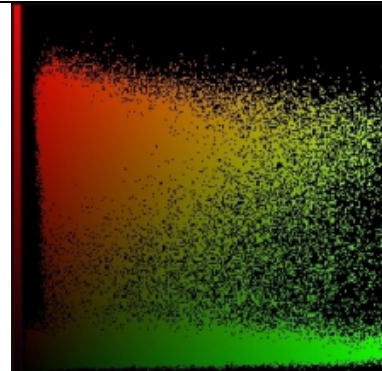
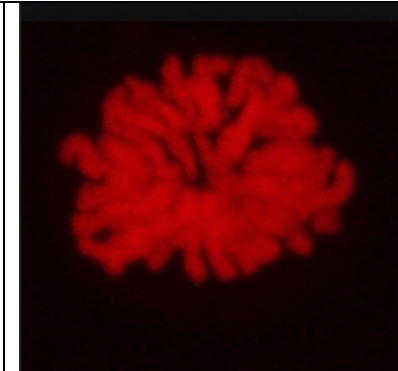
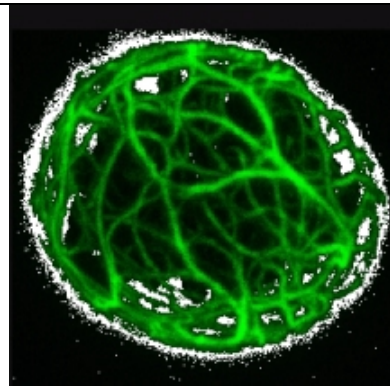
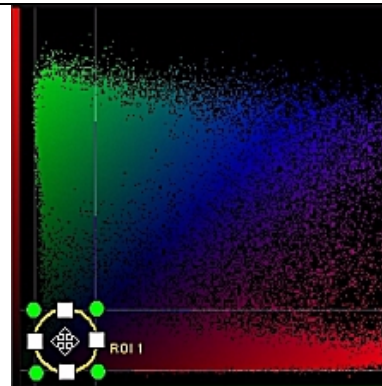
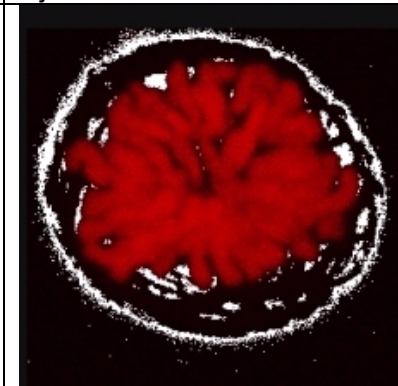


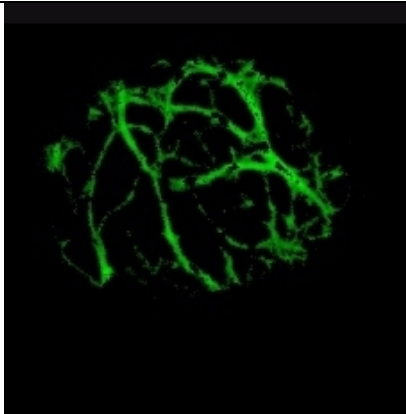
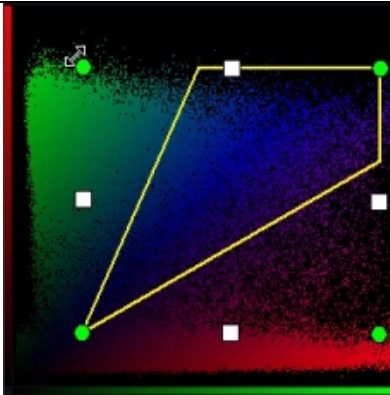
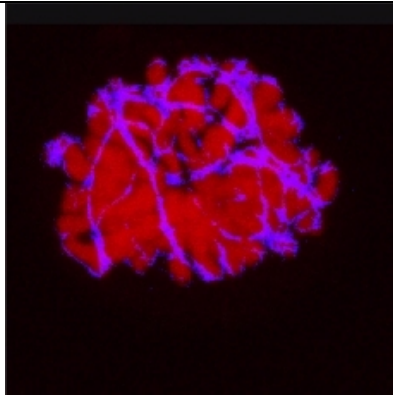
	
▶	Haga clic en la tecla Mask para crear una máscara binaria del citofluorograma. Al mismo tiempo se activan las teclas con las que puede trazarse una zona de interés (ROI).
▶	Haga clic en el símbolo de flecha Quantify y en una de las teclas ROI, por ejemplo la tecla Ellipse o Polygon, y trace una zona de interés en el citofluorograma. <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; background-color: #ccc;">Quantify</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; background-color: #ccc;">Ellip</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; background-color: #ccc;">Poly</div> </div>
	 <p><i>La selección de datos del citofluorograma sólo es posible si están activos dos canales de detección. Si están activos tres canales, no es posible pulsar las teclas ROI.</i></p>
▶	Las combinaciones de valores de intensidad dentro de la zona de interés del citofluorograma se destacan de forma cromática en las imágenes originales.

### Ejemplos

Los datos de imagen enmascarados pueden diferenciarse cromáticamente en la imagen original, así como representarse aislados o superpuestos con la imagen original. Puede ajustar la configuración apropiada en el cuadro de diálogo Viewer Options, icono Multicolor, registro Mask.

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Multicolor (página 277)

		
(1a) Datos de la imagen en el canal verde	(1) Citofluorograma bidimensional de ambos canales	(1b) Datos de la imagen en el canal rojo
		
(2a) Los datos de la imagen	(2) Citofluorograma bidimensional	(2b) Los datos de la imagen

seleccionados en el citofluorograma se resaltan en blanco en la imagen original (punto de selección: Image covered by mask)	con pares de valores de intensidad seleccionados	seleccionados en el citofluorograma se resaltan en blanco en la imagen original (punto de selección: Image covered by mask)
		
(3a) Sólo los datos de la imagen seleccionada en el citofluorograma se visualizan en la codificación cromática del canal (punto de selección: Masked image only)	(3) Citofluorograma bidimensional con pares de valores de intensidad seleccionados	(3b) Los datos de la imagen seleccionados en el citofluorograma se resaltan en azul en la imagen original (punto de selección: Image covered by blue mask)

## Multicolor / Visualización de estadística



### Función

Al accionar esta tecla se utilizan datos estadísticos para el cálculo de la geometría y la densitometría de los datos de imagen seleccionados del citofluorograma y de la imagen original y se visualizan en un visor. Si define zonas de interés en la imagen original con las teclas ROI también se calcula la estadística para esta zona.



Debe crearse una máscara binaria del citofluorograma con la tecla Mask para poder calcular y visualizar la estadística.

& Multicolor / Localización de pares de valores del citofluorograma en la imagen original (página 274)

Geometric Analysis	Significado	Fórmula para la imagen	Fórmula para la zona de interés
# Pixels	Número de píxeles en la imagen o dentro de una zona de interés (ROI)	$\#P = N_x \cdot N_y$	$\#P = \sum_{x \in ROI} 1$
# Pixels, mask	Número de píxeles en la zona enmascarada	$\#P_m = \sum_{x \in Mask} 1$	$\#P_m = \sum_{x \in (Mask \cap ROI)} 1$
Area [ $\mu m^2$ ]	Superficie del campo de barrido	$A = l_x \cdot l_y$	$A = \text{voxel size} \cdot \#P$



Area, mask [μm <sup>2</sup> ]	Superficie de la zona enmascarada	$A_m = A \cdot \frac{\#P_m}{\#P}$	$A_m = A \cdot \frac{\#P_m}{\#P}$
Mask area rate	Parte proporcional de la zona enmascarada en la superficie total	$\frac{A_m}{A}$	$\frac{A_m}{A}$

Densitometric Analysis	Significado	Fórmula para la imagen	Fórmula para la zona de interés
Intensity sum	Suma de intensidades	$I_{sum} = \sum_{\vec{x}} I(\vec{x})$ con $\vec{x} \in \text{Image}$	$I_{sum} = \sum_{\vec{x}} I(\vec{x})$ con $\vec{x} \in (\text{Image} \cap \text{ROI})$
Intensity sum, mask	Suma de las intensidades de la zona enmascarada	$I_{sum,mask} = \sum_{\vec{x} \in (\text{Image} \cap \text{mask})} I(\vec{x})$	$I_{sum,mask} = \sum_{\vec{x} \in (\text{Image} \cap \text{mask} \cap \text{ROI})} I(\vec{x})$
Mean intensity	Media aritmética de las intensidades	$i = \frac{I_{sum}}{\#P}$	$i = \frac{I_{sum}}{\#P}$
Mean intensity, mask	Media aritmética de las intensidades desde la zona enmascarada	$i_m = \frac{I_{sum,mask}}{\#P_m}$	$i_m = \frac{I_{sum,mask}}{\#P_m}$
Mask intensity rate	Parte porcentual de las intensidades en las zonas enmascaradas de la suma de las intensidades	$\frac{i_m}{i}$	$\frac{i_m}{i}$

## Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Multicolor


En el presente capítulo se describen los temas siguientes





- ▼ Estructura del visor Experiment Overview
- ▼ Opciones para la gama de valores del citofluorograma
- ▼ Opciones para las tablas de asignación de colores del citofluorograma
- ▼ Opciones para la máscara binaria del citofluorograma
- ▼ Opciones para la visualización del citofluorograma

### Estructura del visor Experiment Overview

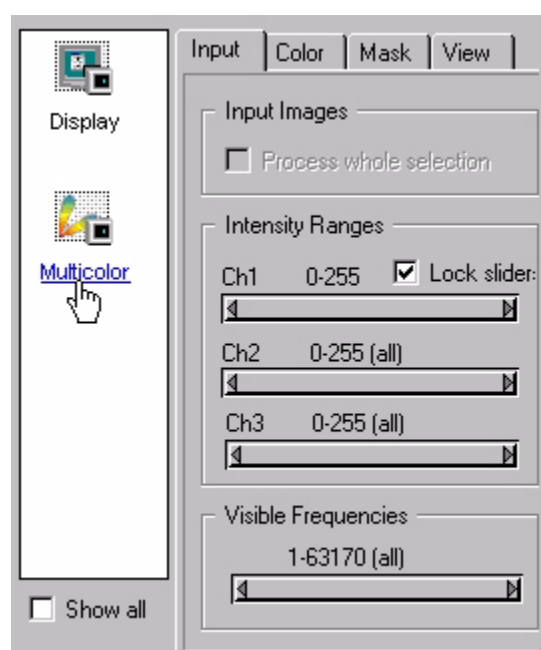
Para abrir el cuadro de diálogo Viewer Options seleccione la opción Experiment Overview en el menú View. El visor Experiment Overview se introduce en el lado izquierdo de la interfaz de usuario. En la parte superior del visor aparecen las imágenes capturadas en un árbol de directorios. En la parte inferior se encuentra el cuadro de diálogo Viewer Options. En este cuadro de diálogo puede introducir la configuración básica de diferentes funciones del software. A la izquierda aparecen las funciones del icono correspondiente y a la derecha su registro. Al abrir el cuadro de diálogo aparecen los iconos de las funciones con las que trabaja en ese momento. Haga clic en la opción Show all, para mostrar todos los iconos.

En los registros del icono Multicolor pueden realizarse ajustes opcionales para las funciones siguientes:

	& vea Multicolor / Creación de un citofluorograma bidimensional (página 270)
---	--

	& vea Multicolor / Creación de un citofluorograma tridimensional (página 273)
	& vea Multicolor / Localización de pares de valores del citofluorograma en la imagen original (página 274)
	& vea Multicolor / Visualización de imagen superpuesta (página 273)
	& vea Multicolor / Visualización de estadística (página 276)

### Opciones para la gama de valores del citofluorograma

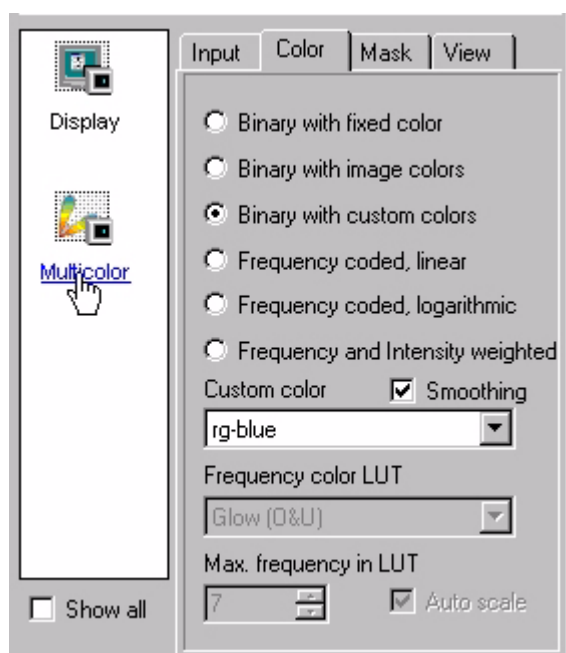


### Registro Input


▶	Desplace el botón deslizante del campo Intensity Ranges para modificar la gama de valores de intensidad representado en el citofluorograma de forma independiente para cada canal de detección.
▶	Selecione la casilla de verificación Lock sliders para bloquear los canales de detección entre sí. De esta forma puede modificar la gama de valores del citofluorograma de forma simultánea para todos los canales.
▶	Desplace el botón deslizante del campo Visible Frequencies para modificar los pares de valores de intensidad representados en el citofluorograma en función de su frecuencia.

### Opciones para las tablas de asignación de colores del citofluorograma

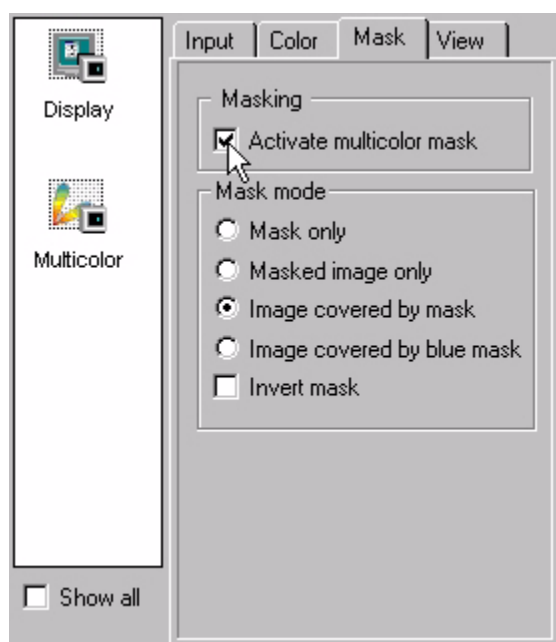
Para la codificación cromática del citofluorograma pueden seleccionarse dos categorías principales de tablas de asignación de colores. Las binarias (Binary with ...) visualizan la existencia de una combinación de valores de intensidad. Tan pronto como se dispone de una combinación de valores se muestra un punto en el citofluorograma. Cada punto se representa con la misma luminosidad. Las tablas de asignación de colores con codificación de frecuencia (Frequency coded ...) visualizan la frecuencia de los pares de valores de intensidad. La luminosidad del punto del citofluorograma representa la frecuencia. Cuanto más claro es el punto del citofluorograma más frecuente es la combinación de valores que representa.



### Registro Color

▶	Si selecciona Binary with fixed color se representan todos los puntos del citofluorograma en blanco.
▶	Si selecciona Binary with image colors la nube de puntos se codifica con las tablas de asignación de colores de los canales de detección. Los puntos que se encuentran sobre las diagonales de la superficie o del espacio se representan en una mezcla de colores de la tabla de asignación de colores.
▶	Si selecciona Binary with custom colors, puede seleccionar una serie de tablas de asignación de colores especiales que codifican los puntos de estas diagonales con colores que destacan o que no destacan.
	 <p>Con un citofluorograma de tres canales de detección se selecciona automáticamente la tabla de asignación de colores 2x2x2 gray-red. Las tablas restantes de la tabla de lista Custom color no están disponibles en este caso.</p>
▶	Si selecciona Frequency coded, linear, puede seleccionar en el campo de lista Frequency color LUT una de las tablas de asignación de colores que también están disponibles para la codificación cromática de los datos de imagen en los canales de detección. La codificación cromática de la frecuencia es lineal.
▶	Si selecciona Frequency coded, logarithmic, puede seleccionar en el campo de lista Frequency color LUT una de las tablas de asignación de colores que también están disponibles para la codificación cromática de los datos de imagen en los canales de detección. La codificación cromática de la frecuencia es logarítmica.
▶	Si selecciona Frequency and Intensity weighted, se visualizan de forma simultánea la frecuencia y la intensidad con una tabla de asignación de colores especial.
▶	Si desactiva la casilla de verificación Auto scale, puede introducir un valor para la frecuencia máxima que se visualiza con una tabla de asignación de colores con codificación de frecuencia en el citofluorograma.

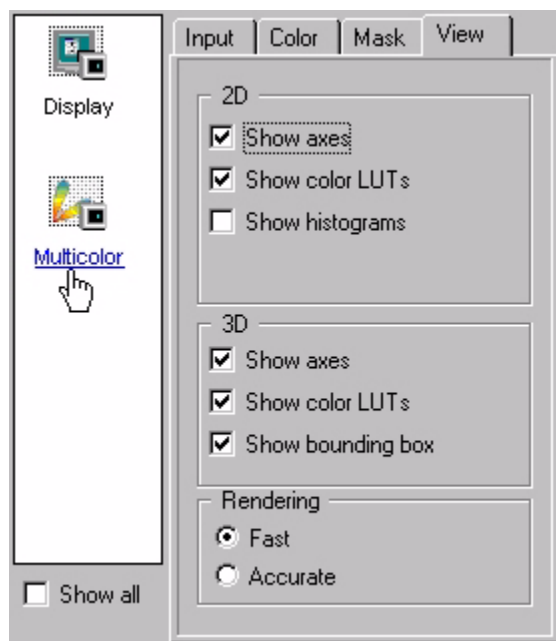
### Opciones para la máscara binaria del citofluorograma



### Registro Mask

▶	Haga clic en la casilla de verificación Activate multicolor mask para crear una máscara binaria del citofluorograma. Esto es lo mismo que activar la tecla Mask.
▶	Si selecciona Mask only, sólo se visualizan los datos de las imágenes originales enmascarados en el citofluorograma (con una zona de interés). Los datos de imagen enmascarados se representan en blanco.
▶	Si selecciona Masked image, sólo se visualizan los datos de las imágenes originales enmascarados en el citofluorograma (con una zona de interés). La codificación cromática depende de la tabla de asignación de colores de cada canal de detección.
▶	Si selecciona Image covered by mask, se visualizan las imágenes originales junto con los datos de imagen enmascarados en el citofluorograma. Los datos de imagen enmascarados se representan en blanco.
▶	Si selecciona Image covered by blue mask, se visualizan las imágenes originales junto con los datos de imagen enmascarados en el citofluorograma. Los datos de imagen enmascarados se representan en azul.
▶	Si selecciona Invert mask, se invierte la codificación cromática de los datos enmascarados y la imagen original.

### Opciones para la visualización del citofluorograma



### Registro View

▶	Cuando hace clic en la casilla de verificación Show Axes se visualizan los dos o tres ejes espaciales del citofluorograma.
▶	Cuando hace clic en la casilla de verificación Show Color LUTs se visualizan las tablas de asignación de colores de los canales de detección en los ejes del citofluorograma.
▶	Cuando hace clic en la casilla de verificación Show Histograms se visualiza una curva de histograma en cada eje del citofluorograma bidimensional.
▶	Cuando hace clic en la casilla de verificación Show Bounding Box se visualiza el cubo del citofluorograma.
▶	En el campo Rendering seleccione la opción Fast para acelerar el cálculo del citofluorograma con grandes cantidades de datos. Esto es recomendable, por ejemplo, si está activada la tecla Gallery con lo que todas las imágenes individuales de una serie incluyen en el citofluorograma.

## 3D (opcional)



*Este paquete de programas opcionales no consta entre los componentes del paquete de programas básico. Si lo desea, puede adquirirlo en su proveedor de Leica o en un distribuidor autorizado.*

## Proyecciones tridimensionales y animaciones de series de imágenes

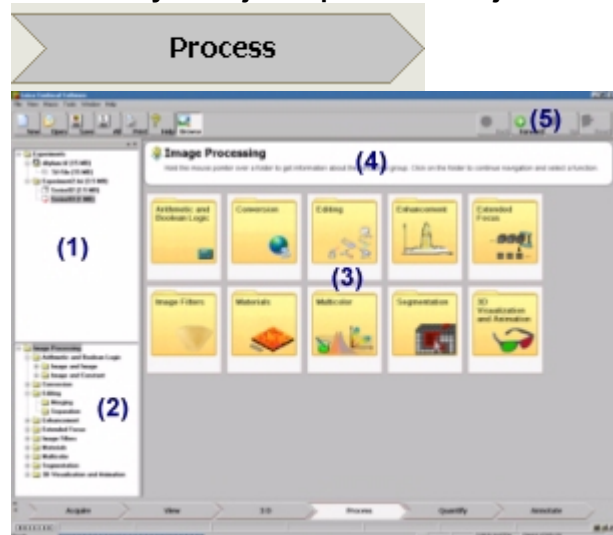


**En el presente capítulo se describen los temas siguientes**

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process
- ▼ Navegación: 3D Visualization and Animation\ Projections

- ▼ Navegación: 3D Visualization and Animation\ Projections with Animation
- ▼ Navegación: 3D Visualization and Animation\ Stereo
- ▼ Navegación: 3D Visualization and Animation\ Stereo with Animation

### Estructura y manejo del paso de trabajo Process



Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

►	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
►	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
►	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



►	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
►	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic en la tecla Back.
►	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.
►	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
►	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej., Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:



▶	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
▶	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el experimento activo.

### Navegación: 3D Visualization and Animation\ Projections Proyecciones a lo largo de un eje de colocación libre

& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	Seleccione uno de los cuatro tipos de proyección: proyección de valor medio (Average Projection), proyección de valor máximo (Maximum Projection), proyección transparente (Transparent Projection) o proyección SFP (SFP Projection, SFP Shadow Projection).

#### Registro Options

▶	Haga clic en Rescale en el campo Options para normalizar los valores de intensidad de la imagen con los valores máximos posibles durante la creación de la proyección. De este modo se garantiza que los valores grises calculados de la proyección permanecen dentro de la gama de valores, por ejemplo, entre 0 y 255 para 8 bits. Esto permite aclarar las imágenes oscuras.
▶	Si hace clic en Invert en el registro Options se refleja el eje de proyección. El cálculo de la proyección se realiza en dirección contraria. Se trata de una función especialmente interesante para los microscopios inversos, para equilibrar el cálculo de la proyección con la trayectoria de rayos inversa del láser.
▶	Mueva la corredera del campo Threshold para definir un valor umbral. Los valores de intensidad que están por debajo de este valor no se tienen en cuenta para la creación de la proyección.

#### Registro Rotation

▶	En el campo Viewing Direction, configure el eje de proyección deseado introduciendo los valores para Z, Y y X. Mediante estos tres valores, gire el lote de imágenes hasta una posición determinada y defina el ángulo desde el que se realiza la proyección.
	<p>En este caso, el eje de proyección es la dirección de la mirada del observador sobre el lote de imágenes girado. El esquema adjunto muestra la dirección de rotación de cada plano cuando los valores de Z, Y y X son positivos. Con valores negativos, la dirección de rotación es exactamente al contrario.</p>
▶	En el campo Depth Factor introduzca un valor para modificar a escala el eje z de las proyecciones.

#### Registro Factor (sólo en la proyección transparente)

& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

▶	El registro Factor sólo aparece cuando se ha seleccionado la proyección transparente. Mediante
---	--

	la corredera puede variar el factor de transparencia $\alpha$ . Cuanto más alto es, con mayor fuerza influyen los valores de intensidad de los niveles inferiores del lote de imágenes en la proyección.
▶	Haga clic en el recuadro Transparency Gallery para ver una galería de vistas preliminares del bloque de datos de imagen seleccionado. Cada vista preliminar se calcula con un factor de transparencia diferente. Haga clic en un recuadro para ver un cuadro de diálogo con la configuración correspondiente.

**Registro Light (sólo en la proyección SFP)**


& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

▶	El registro Light sólo aparece cuando se ha seleccionado la proyección SFP. En el campo Light Direction defina el ángulo de proyección para el primer paso de cálculo de la proyección SFP. Este ángulo simboliza el ángulo de incidencia del rayo láser sobre el preparado. Introduzca una coordenada para x y una para y.
▶	Desplace la corredera del campo Absorption para variar los coeficientes de absorción $\alpha$ . Cuanto mayor es la velocidad de barrido ajustada, menores son los valores calculados en la proyección. Si el coeficiente se ajusta con un valor bajo, muchos píxeles de la proyección alcanzan el valor máximo, de forma que las estructuras son cada vez más difíciles de diferenciar.
▶	Cuando hace clic en Calc. Shadow, en el campo Options del registro Options, se calcula y visualiza una sombra para la proyección SFP.
▶	Haga clic en el recuadro SFP Light Gallery para ver una galería de vistas preliminares del bloque de datos de imagen seleccionado. Cada vista preliminar se calcula con un ángulo de proyección diferente. Haga clic en un recuadro para ver un cuadro de diálogo con la configuración correspondiente.
▶	Haga clic en el recuadro SFP Absorption Gallery para ver una galería de vistas preliminares del bloque de datos de imagen seleccionado. Cada vista preliminar se calcula con un coeficiente de absorción diferente. Haga clic en un recuadro para ver un cuadro de diálogo con la configuración correspondiente.

**Navegación: 3D Visualization and Animation\ Projections and Animation**  
**Reproducción de proyecciones como animación mediante rotación tridimensional**

& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

**Registro Animation**

▶	Para realizar la configuración para la animación mediante rotación haga clic en la casilla de verificación Animation. Se activan los campos correspondientes.
▶	En el campo Rotation seleccione el tipo de animación: rotación completa ó 360° (Full turn), media rotación ó 180° (half turn), un cuarto de rotación ó 90° (quarter turn) u otro ángulo.
▶	En el campo Frames, introduzca el número de proyecciones que deben crearse para la animación. El número de proyecciones y el tipo de animación determinan las distancias a las que se crean las proyecciones. En una media rotación (ángulo de 180°) y un número de, por ejemplo, 10 imágenes se crea una imagen cada 20° (no 18°), ya que para 10 capturas sólo hay 9 pasos.
	 <p><i>Para el giro completo, existe otro cálculo (ángulo de 360°). Para evitar que la primera proyección y la última se capturen sobre el mismo ángulo (360° = 0°), la función cuenta con una captura que no crea ninguna proyección. Por ello, con un número de 10 imágenes, por ejemplo, la distancia entre las proyecciones es de 36° (no 40°), ya que se calculan 11 capturas (es decir, 10 pasos). Sin embargo, sólo se crean 10 proyecciones.</i></p>



▶	Modifique la inclinación del eje de rotación en el campo Rotation Axis.
▶	Para iniciar la animación mediante rotación, haga clic en la tecla Movie. & vea Inicio y finalización de películas (página 200)



*Los tres tipos de proyección también pueden activarse mediante las teclas correspondientes (3D Proj / 3D Max / 3D Avg / 3D Trans). Si la función se activa mediante la tecla, la proyección es sólo una visualización de pantalla temporal y puede eliminarla mediante la tecla Original.*

- & vea Proyección de valor máximo de un lote de imágenes con eje de proyección variable (página 206)
- & vea Proyección mínima de un lote de imágenes con eje de proyección variable (página 292)
- & vea Proyección transparente de un lote de imágenes con eje de proyección variable (página 208)

#### Navegación: 3D Visualization and Animation\ Stereo

#### Navegación: 3D Visualization and Animation\ Stereo with Animation

#### Creación de estereogramas rojos-verdes (imagen anaglifa)

#### Campo Stereo View Options

▶	En el campo de lista Eye Angle determine el ángulo desde el que deben realizarse los dos estereogramas. Si introduce, por ejemplo, el valor 30 cada estereograma se captura con un ángulo de 15°, uno a la derecha y el otro a la izquierda del eje de proyección configurado en el registro Rotation.
▶	Los estereogramas sólo pueden crearse a partir de un canal de detección. Si dispone de una serie de imágenes capturada en varios canales de detección, seleccione el bloque de datos deseado en el campo de lista Detection Channel.
▶	Para visualizar ambos estereogramas de una imagen en el visor Viewer, deben estar pulsadas las teclas Channel 1, Channel 2, Single y Overlay. & vea Visualización de los canales de detección 1 (página 193) & vea Visualización de los canales de detección 2 (página <b>Error! Bookmark not defined.</b> ) & vea Visualización de imagen individual (página 196) & vea Representación de imagen superpuesta (página 197)

#### Información adicional

Las imágenes anaglifa crean una impresión de profundidad espacial si se contemplan con lentes para tres dimensiones (lentes estereográficas rojo-verde). El efecto espacial de la imagen anaglifa es posible debido a que el hombre utiliza dos ojos para la visión. Debido a la distancia interocular aproximada de 6,5 cm el cerebro recibe dos imágenes desde dos perspectivas diferentes. Los objetos situados a diferentes distancias se perciben desde distintos ángulos. El cerebro humano traduce esta diferencia de ángulo como una medida de la distancia. La diferencia entre las imágenes similares creadas por ambos ojos, se entiende en el cerebro como una imagen con profundidad espacial. Estas imágenes diferentes también pueden simularse colocando imágenes ligeramente diferentes delante de cada ojo.

En las imágenes anaglifa se encuentra toda la información estereoscópica de una sola imagen. La información de la imagen izquierda y derecha se codifica mediante colores. Por ello es necesario utilizar lentes con filtros de color diferentes para cada ojo, que separen la información de la imagen para cada ojo. El filtro rojo sólo permite el paso libre de luz roja, mientras absorbe por completo la luz verde. Por el contrario, el filtro verde absorbe la luz roja. Cada ojo reconoce una imagen y ambas se fusionan en el cerebro en una imagen espacial.

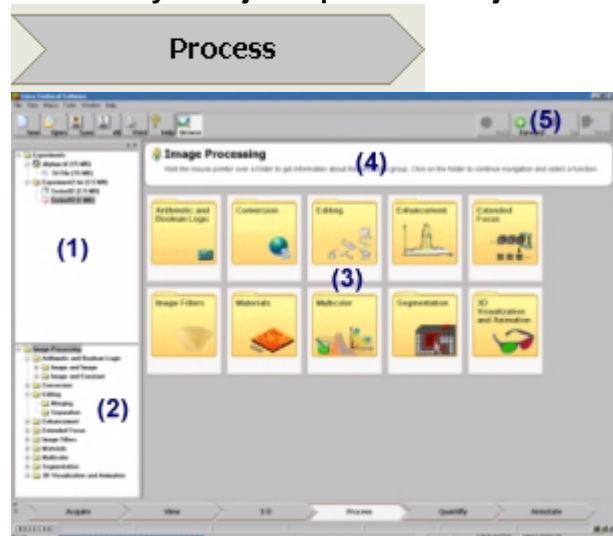
## Filtro lineal y filtro morfológico



En el presente capítulo se describen los temas siguientes

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process
- ▼ ¿Qué son filtros lineares?
- ▼ Navegación: Image Filters\ Linear Filters
- ▼ ¿Qué son filtros morfológicos?
- ▼ Navegación: Image Filters\ Morphological Filters

### Estructura y manejo del paso de trabajo Process



Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

▶	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
▶	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
▶	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



▶	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
▶	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic

	en la tecla Back.
▶	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.
▶	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
▶	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej., Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:



▶	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
▶	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el experimento activo.

### ¿Qué son filtros lineares?

Los filtros se utilizan para mejorar la calidad de una imagen. En general, esto implica la eliminación de puntos no deseados de la imagen (píxel). Con la función de filtro disponible en el programa, un filtro de paso bajo, se reduce en la imagen el ruido estático que puede estar producido, por ejemplo, por el detector.

El principio de un filtro consiste en compensar el valor de cada píxel de una imagen con los valores de los píxeles más próximos. El núcleo del filtro (Kernel) describe el número y la graduación de los píxeles más próximos que influyen en el cálculo del nuevo punto de la imagen. El núcleo del filtro utilizado puede describirse con el triángulo de Pascal:

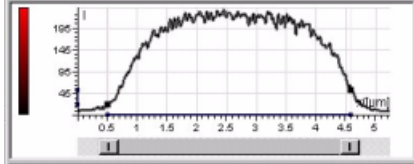
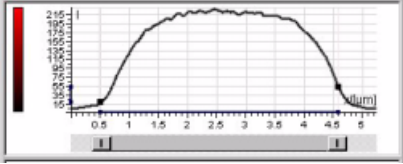
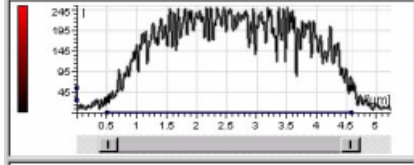
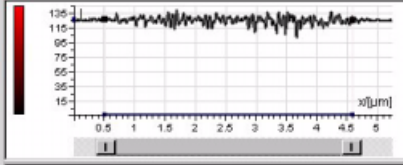
Tamaño de núcleo	Triángulo de Pascal	Normalización
Kernel Size 3	1 1	1/2
	1 2 1	1/4
Kernel Size 5	1 3 3 1	1/8
	1 4 6 4 1	1/16
Kernel Size 7	1 5 10 10 5 1	1/32
	1 6 15 20 15 6 1	1/64
Kernel Size 9	1 7 21 35 35 21 7 1	1/128
...	1 8 28 56 70 56 28 8 1	1/256
	...	...

Si selecciona, por ejemplo, el tamaño de núcleo 5 (Kernel Size 5) se utilizan 5 píxeles de la imagen original para el cálculo de cada píxel de la imagen filtrada. El píxel central del núcleo del filtro es siempre el punto de la imagen que se desea calcular. En este proceso, los valores grises de los 5 píxeles se multiplican, de acuerdo con el esquema de graduación 1-4-6-4-1, por los factores 1/16, 4/16, 6/16, 4/16, 1/16 y se suman uno a otro para alcanzar el valor final. En la siguiente representación esquemática, esto implica para el cálculo del píxel C, que los valores grises de los píxeles A, B y D, E influyen en el cálculo del píxel C' filtrado. El cálculo de C' se realiza de la forma siguiente:  $16 \times 1/16 + 4 \times 4/16 + 8 \times 6/16 + 32 \times 4/16 + 8 \times 1/16 = 1 + 1 + 3 + 8 + 0,5 = 13,5$

	A	B	C	D	E
Valores grises de los píxeles A-E en la imagen original	16	4	8	32	8
Factores del tamaño de núcleo 5	1/16	4/16	6/16	4/16	1/16
Valor gris de C' en la imagen filtrada			13,5		

Un cálculo de este tipo se realiza para cada píxel de la imagen original. En el borde de la imagen destaca la máscara del filtro sobre la imagen. Para este píxel se utiliza el valor 0.

**Efecto del filtro lineal**

 <p>Perfil de intensidad de una imagen sin filtrar</p>	 <p>Perfil de intensidad de la imagen tras utilizar el filtro Blur</p>
 <p>Perfil de intensidad de la imagen tras utilizar el filtro Sharpen</p>	 <p>Perfil de intensidad de la imagen tras utilizar el filtro Highpass</p>

▶	Si selecciona el filtro Blur se aplica a la imagen el filtro de paso bajo descrito anteriormente. Este tipo filtra las frecuencias altas y las elimina de la imagen. Esto es, se suavizan las fuertes transiciones entre los valores de intensidad bajos y los altos. Este filtro permite eliminar los ruidos de una imagen.
▶	Si selecciona el filtro Sharpen se utiliza el filtro de paso bajo en la imagen y, a continuación, se suman los valores de la imagen filtrada con filtro de paso alto a los valores de la imagen original. Este tipo filtra las frecuencias bajas y las elimina de la imagen. Esto es, se intensifican las fuertes transiciones entre los valores de intensidad bajos y los altos.
▶	Si selecciona el filtro Highpass se utiliza el filtro de paso bajo en la imagen y, a continuación, se sustraen los valores de la imagen original de los valores de la imagen filtrada con el filtro de paso bajo. El resultado corresponde a una imagen tratada con un filtro de paso alto. Este tipo de filtro sólo representa las fuertes transiciones entre los valores de intensidad altos y los bajos.

**Navegación: Image Filters\ Linear Filters****Aplicación de filtro lineal (de paso bajo y de paso alto) en imágenes**

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	Seleccione uno de los tres tipos de filtro: alisado (Blur), contraste (Sharpen), filtro de paso alto (Highpass).
▶	En el campo Kernel Size seleccione un valor para el tamaño del núcleo. El valor introducido en el campo Kernel Size como Cut-off Wavelength es el tamaño del filtro medido en píxeles. Este valor se calcula sobre la base de los parámetros de barrido utilizados para cada imagen (ampliación del objetivo, longitud de onda de la luz de excitación, formato de barrido, factor de zoom electrónico ...).
▶	En el campo Filter Directions ajuste la dimensionalidad del filtro. Seleccione los ejes espaciales sobre los que debe aplicarse el filtro de forma secuencial. Aquí se utilizan filtros unidimensionales, es decir, el filtro se calcula cada vez sobre un solo eje. El valor introducido en el campo Filter Directions como Cut-off Wavelength es el tamaño del filtro medido en nanómetros. Con un valor de, por ejemplo, 160 nm se filtran todas las longitudes de onda más pequeñas de 160 nm.

**Sharp Factor (sólo con el tipo de filtro Sharpen)**

▶	Mediante la corredera del campo Sharp Factor puede variarse el efecto del filtro Sharp. Si se ajusta el valor 0 para este factor, el filtro no está activo.
---	---

**Recuadro Blur (Gallery), Sharpen (Gallery), Highpass (Gallery)**

▶	Haga clic en el recuadro Blur (Gallery), Sharpen (Gallery) o Highpass (Gallery) para ver una galería de vistas preliminares del bloque de datos de imagen seleccionado. Cada vista preliminar se calcula con un tamaño de núcleo diferente (y un factor de contraste diferente). Haga clic en un recuadro para ver un cuadro de diálogo con la configuración correspondiente.
---	---

**¿Qué son filtros morfológicos?**

Los filtros morfológicos permiten modificar la forma de las estructuras interrelacionadas de la imagen y separarlas del fondo con ayuda de operadores matemáticos. En general, estos operadores se aplican a imágenes binarias. Estas imágenes tienen píxeles que sólo pueden tener el valor 1 ó 0. En el Leica Confocal Software puede crear imágenes binarias con las funciones de segmentación. Pero con estos operadores también es posible editar imágenes de valores grises, es decir, imágenes con una gama de valores de, por ejemplo, 256 (8 bits) valores de gris / de intensidad diferentes.

& vea Paso de trabajo Process / Carpeta Segmentation (página 295)

El principio consiste en desplazar una máscara (también denominada elemento estructural) píxel a píxel sobre la imagen. El píxel que se desea analizar es siempre el punto central de la máscara. En el Leica Confocal Software, la máscara tiene la forma de un cuadrado, una cruz o un círculo. La forma y el tamaño de la máscara determinan cuántos píxeles próximos y cuáles de ellos participan en el filtro. Con ayuda de un determinado criterio se distingue qué píxel se define como estructura y cuál como fondo en la imagen resultante. En las imágenes binarias, este criterio es el enlace lógico AND u OR, y en las imágenes de valores grises, es la altura del valor de gris o de intensidad.

& vea Enlaces booleanos (página 302)

La forma de la máscara influye en las estructuras que se resaltan en la imagen resultante. Si, por ejemplo, se selecciona la máscara con forma esférica, se acentúan formas redondas. No obstante, la relación de proximidad con la que cada píxel se codifica como estructura o como fondo depende de los operadores morfológicos.

Existen dos tipos básicos de operadores: la erosión (Erosion) y la dilatación (Dilation), así como combinaciones de ellos:

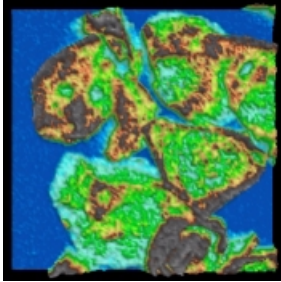
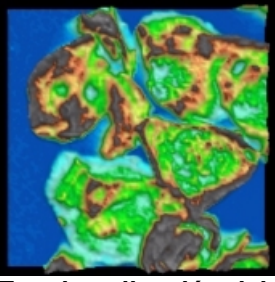
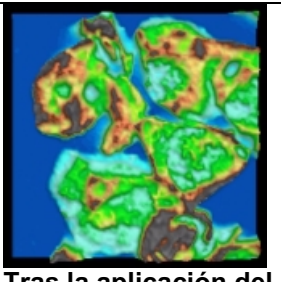
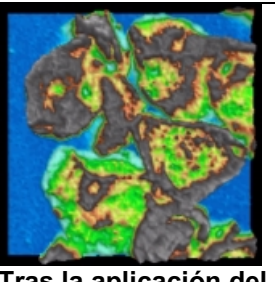
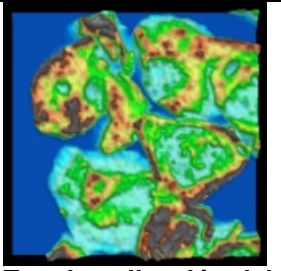
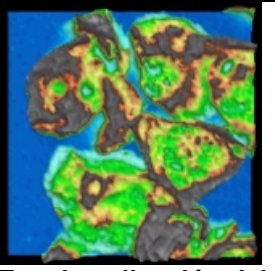
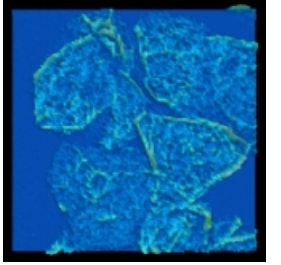
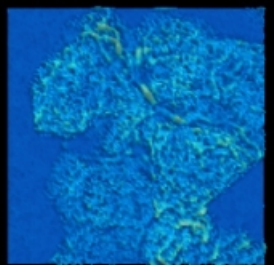
Operador	Descripción
Erosión (Erosion)	En las <u>imágenes binarias</u> , el píxel analizado recibe el valor 1 en la imagen resultante si <u>todos</u> los píxeles próximos (determinado por la forma y el tamaño de la máscara) están codificados en la imagen original binaria con un 1. En las <u>imágenes con valores grises</u> , se introduce en la imagen resultante el valor gris mínimo del píxel próximo en lugar del valor del píxel analizado.
Dilatación (Dilation)	En las <u>imágenes binarias</u> , el píxel analizado recibe el valor 1 en la imagen resultante si al menos <u>uno</u> de los píxeles próximos (determinado por la forma y el tamaño de la máscara) están codificados en la imagen de valor umbral binaria con un 1. En las <u>imágenes con valores grises</u> , se introduce en la imagen resultante el valor de intensidad máximo del píxel próximo en lugar del valor del píxel analizado.

Combinación de operadores	Descripción
Abrir (Open)	Abrir es una combinación de operadores. En primer lugar se realiza un erosión y, a continuación, una dilatación.
Cerrar (Close)	Cerrar es una combinación de operadores. En primer lugar se realiza un dilatación y, a continuación, una erosión.
Top Hat	Top Hat edita la imagen con la combinación de operadores Abrir y sustrae la imagen resultante de la original.
Bottom Hat	Bottom Hat edita la imagen con la combinación de operadores Cerrar y sustrae la imagen original de la resultante.

Filtro	Descripción
Central	El filtro central pertenece al grupo de los filtros de rango no lineal. Con este filtro, los valores de intensidad de los píxeles próximos (determinados por la forma y el tamaño de la máscara) se clasifican según su tamaño. En la imagen resultante del filtrado central, en lugar del píxel analizado se introduce el valor de intensidad que se encuentra en el centro en este rango.



**Efecto de los operadores morfológicos**

			
<b>Imagen original</b> Las estructuras (con valores de intensidad muy altos) aparecen en gris y el fondo (valor de intensidad 0) en azul oscuro. Entre ambos extremos, la gama de valores de intensidad entre los altos y los bajos aparece desde marrón, amarillo, verde hasta turquesa.		<b>Tras la aplicación del filtro Median</b> El filtro central suaviza la imagen total al tiempo que acentúa y remarca el contorno de las estructuras.	
			
<b>Tras la aplicación del operador Erosion</b> Las estructuras relacionadas se reducen y las pequeñas estructuras y las conexiones entre ellas desaparecen (el número de valores de intensidad altos baja al tiempo que aumenta el número de valores de intensidad bajos).		<b>Tras la aplicación del operador Dilation</b> Las estructuras relacionadas crecen y los espacios intermedios interiores de una estructura o entre estructuras se rellenan (incrementa el número de valores de intensidad altos y se reduce el número de valores de intensidad bajos).	
			
<b>Tras la aplicación del operador Open (Erosion + Dilation)</b> Las estructuras relacionadas se reducen y los espacios intermedios aumentan (baja el número de valores de intensidad altos al tiempo que aumenta el número de valores de intensidad bajos).		<b>Tras la aplicación del operador Close (Dilation + Erosion)</b> Las estructuras relacionadas crecen y los espacios intermedios no varían (aumenta el número de valores de intensidad altos al tiempo que el número de valores de intensidad bajos no varía).	
			

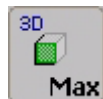
Tras la aplicación del operador Top Hat	Tras la aplicación del operador Bottom Hat
Se extraen los valores de intensidad altos.	Se extraen los valores de intensidad bajos.

**Navegación: Image Filters\ Morphological Filters****Aplicación de un filtro morfológico a imágenes**

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	Seleccione uno de los siete tipos de filtro: filtro central (Median), Erosión (Erosion), Dilatación (Dilation), Abrir (Open), Cerrar (Close), y Top hat y Bottom hat.
▶	En el campo Mask, seleccione la máscara del filtro: cuadrado (Cube), cruz (Cross) o círculo (Sphere). La forma del elemento estructural influye en las estructuras de la imagen realizadas por el filtro. Por ejemplo, los círculos acentúan las estructuras redondas en la imagen resultante.
▶	En los campos Size X, Size Y y Size Z introduzca el tamaño de la máscara en píxeles. El tamaño de la máscara determina el número de píxeles próximos que se incluyen en la máscara del filtro.
▶	En el campo Repetition determine la frecuencia con que debe aplicarse el filtro.

**Recuadros con el nombre (Gallery)**

▶	Haga clic en uno de los recuadros que llevan (Gallery) en el nombre para ver una galería de vistas preliminares del bloque de datos de imagen seleccionado. Cada vista preliminar se calcula con un elemento estructural y un tamaño de máscara diferentes. Haga clic en un recuadro para ver un cuadro de diálogo con la configuración correspondiente.
---	--

**Proyección de valor máximo de un lote de imágenes con eje de proyección variable****Función**

Mediante la tecla 3D Max. se inicia una proyección de valor máximo. El eje de proyección puede variarse libremente.

La base para la aplicación de una proyección es un lote de imágenes, es decir, una serie de cortes horizontales xy o verticales xz. Al crearse una proyección, se analizan los puntos de exploración de la imagen individual que se encuentran uno sobre otro a lo largo del eje de proyección, a través de todos los cortes ópticos. De cada columna de puntos explorada, se representa en la proyección bidimensional el valor de intensidad máximo como representante de todos los valores de la columna.

& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

▶	Haga clic en la tecla 3D Max. Se crea una proyección de valor máximo del lote de imágenes actual y se visualiza en el visor Viewer.
▶	Es posible modificar el eje de proyección haciendo clic en la imagen del visor Viewer y manteniendo pulsado el botón izquierdo del ratón.
▶	Aparecen líneas de ayuda que delimitan el lote de imágenes representado esquemáticamente. A continuación, gire el lote de imágenes hasta la posición deseada desplazando el puntero del ratón con el botón izquierdo presionado.
▶	Al soltar el botón del ratón, se calcula la nueva proyección de valor máximo y se visualiza. En este caso, el eje de proyección es la dirección de la mirada del usuario sobre el lote de imágenes desplazado.
▶	Mediante la tecla Zoom puede ampliar o reducir la proyección. & vea Zoom de vista tridimensional (página 211)
▶	Puede volver a la imagen original en cualquier momento mediante un clic en la tecla Original.

En el cuadro de diálogo Viewer Options también puede ajustarse un valor umbral (threshold) y variar la gama de valores de intensidad de la imagen a escala (scaling).

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Projections (página 186)



*Una proyección de valor máximo puede activarse mediante la tecla 3D Max. o bien en el paso de trabajo Process / Carpeta 3D Visualization and Animation. Si la función se activa mediante la tecla, la proyección es sólo una visualización de pantalla temporal.*

& vea Paso de trabajo Process / Carpeta 3D Visualization and Animation (página 281)

& vea Creación de un experimento (página 253)



*Observe la diferencia entre una proyección de valor máximo y una imagen topográfica creada a partir de la máxima intensidad. En la primera se asigna directamente un valor de color a la máxima de intensidad. En el segundo caso, en primer lugar se asigna la posición z real de cada punto de exploración a la máxima de intensidad y, a continuación, se codifica mediante color.*

& vea Creación de imagen topográfica (página 208)

## Proyección de valor medio de un lote de imágenes con eje de proyección variable



### Función

Mediante la tecla 3D Avg. se inicia una proyección de valor medio. El eje de proyección puede variarse libremente.

La base para la aplicación de una proyección es un lote de imágenes, es decir, una serie de cortes horizontales xy o verticales xz. Al crearse una proyección, se analizan los puntos de exploración de la imagen individual que se encuentran uno sobre otro a lo largo del eje de proyección, a través de todos los cortes ópticos. A partir de cada columna de puntos de exploración se calcula la media aritmética de todos los valores de intensidad y se representa en una proyección bidimensional como representante de toda la columna.

& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

▶	Haga clic en la tecla 3D Avg. Se crea una proyección de valor medio del lote de imágenes actual y se visualiza en el visor Viewer.
▶	Es posible modificar el eje de proyección haciendo clic en la imagen del visor Viewer y manteniendo pulsado el botón izquierdo del ratón.
▶	Aparecen líneas de ayuda que delimitan el lote de imágenes representado esquemáticamente. A continuación, gire el lote de imágenes hasta la posición deseada desplazando el puntero del



	ratón con el botón izquierdo presionado.
▶	Al soltar el botón del ratón, se calcula la nueva proyección de valor medio y se visualiza. En este caso, el eje de proyección es la dirección de la mirada del usuario sobre el lote de imágenes desplazado.
▶	Mediante la tecla Zoom puede ampliar o reducir la proyección. & vea Zoom de vista tridimensional (página 211)
▶	Puede volver a la imagen original en cualquier momento mediante un clic en la tecla Original.

En el cuadro de diálogo Viewer Options también puede ajustarse un valor umbral (threshold) y variar la gama de valores de intensidad de la imagen a escala (scaling).

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Projections (página 186)



*Una proyección de valor medio puede activarse mediante la tecla 3D Avg. o bien en el paso de trabajo Process / Carpeta 3D Visualization and Animation. Si la función se activa mediante la tecla, la proyección es sólo una visualización de pantalla temporal.*

& vea Paso de trabajo Process / Carpeta 3D Visualization and Animation (página 281)

& vea Creación de un experimento (página 253)

## Proyección transparente de un lote de imágenes con eje de proyección variable



### Función

Mediante la tecla 3D Trans. se inicia una proyección transparente. El eje de proyección puede variarse libremente.

La base para la aplicación de una proyección es un lote de imágenes, es decir, una serie de cortes horizontales xy o verticales xz. Al crearse una proyección, se analizan los puntos de exploración de la imagen individual que se encuentran uno sobre otro a lo largo del eje de proyección, a través de todos los cortes ópticos. A partir de cada columna de puntos de exploración se calcula la media ponderada de todos los valores de intensidad y se representa en una proyección bidimensional como representante de toda la columna.

& vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

El usuario puede variar la graduación de los puntos de exploración para el cálculo del valor medio mediante el ajuste del factor correspondiente (transparent factor) en el cuadro de diálogo Viewer Options. También puede ajustarse un valor umbral (threshold) y variar la gama de valores de intensidad de la imagen a escala (scaling).

& vea Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Projections (página 186)

▶	Haga clic en la tecla 3D Trans. Se crea una proyección transparente del lote de imágenes actual y se visualiza en el visor Viewer.
▶	Es posible modificar el eje de proyección haciendo clic en la imagen del visor Viewer y manteniendo pulsado el botón izquierdo del ratón.
▶	Aparecen líneas de ayuda que delimitan el lote de imágenes representado esquemáticamente.

	A continuación, gire el lote de imágenes hasta la posición deseada desplazando el puntero del ratón con el botón izquierdo presionado.
▶	Al soltar el botón del ratón, se calcula la nueva proyección transparente y se visualiza. En este caso, el eje de proyección es la dirección de la mirada del usuario sobre el lote de imágenes desplazado.
▶	Mediante la tecla Zoom puede ampliar o reducir la proyección. & vea Zoom de vista tridimensional (página 211)
▶	Puede volver a la imagen original en cualquier momento mediante un clic en la tecla Original.



*Una proyección transparente puede activarse mediante la tecla 3D Trans. o bien en el paso de trabajo Process / Carpeta 3D Visualization and Animation. Si la función se activa mediante la tecla, la proyección es sólo una visualización de pantalla temporal.*

- & vea Paso de trabajo Process / Tecla de pantalla 3D Visualization and Animation (página 281)
- & vea Creación de un experimento (página 253)

## Creación de una proyección SFP de un lote de imágenes



### Función

Mediante la tecla SFP se inicia una proyección SFP, la simulación matemática de un proceso de fluorescencia. La base para la aplicación de una proyección es un lote de imágenes, es decir, una serie de cortes horizontales xy o verticales xz. Al crearse una proyección, se analizan los puntos de exploración de la imagen individual que se encuentran uno sobre otro a lo largo del eje de proyección, a través de todos los cortes ópticos. En el primero, se simula el rayo láser cada vez más débil que atraviesa la muestra. En el segundo paso se calcula la fluorescencia simulada para cada voxel a partir de las intensidades de iluminación determinadas.

- & vea Principio y tipos de las proyecciones (página 202)

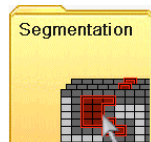
▶	Haga clic en la tecla SFP. Se crea una proyección SFP del lote de imágenes actual y se representa en el visor Viewer.
▶	Es posible modificar el eje de proyección haciendo clic en la imagen del visor Viewer y manteniendo pulsado el botón izquierdo del ratón.
▶	Aparecen líneas de ayuda que delimitan el lote de imágenes representado esquemáticamente. A continuación, gire el lote de imágenes hasta la posición deseada desplazando el puntero del ratón con el botón izquierdo presionado.
▶	Al soltar el botón del ratón, se calcula la nueva proyección SFP y se visualiza. En este caso, el eje de proyección es la dirección de la mirada del usuario sobre el lote de imágenes desplazado.
▶	Puede volver a la imagen original en cualquier momento mediante un clic en la tecla Original.



*Una proyección SFP puede activarse mediante la tecla SFP o bien en el paso de trabajo Process / Carpeta 3D Visualization and Animation. Si la función se activa mediante la tecla, la proyección es sólo una visualización de pantalla temporal.*

- & vea Paso de trabajo Process / Carpeta 3D Visualization and Animation (página 281)
- & vea Creación de un experimento (página 253)

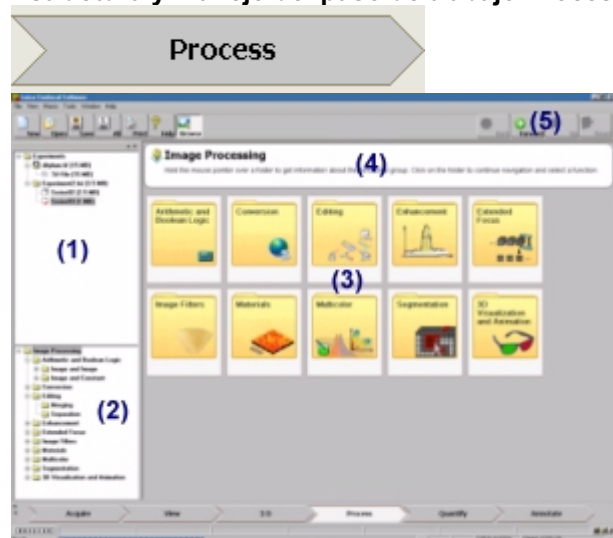
## Segmentación de estructuras de imagen



En el presente capítulo se describen los temas siguientes

- ▼ Estructura y manejo del paso de trabajo Process
- ▼ ¿A qué denominamos segmentación en el tratamiento de imágenes?
- ▼ Navegación: Segmentation\ Thresholding
- ▼ Navegación: Segmentation\ Seeding (Threshold)
- ▼ Navegación: Segmentation\ Seeding (Single Channel)
- ▼ Navegación: Segmentation\ Seeding (Cross-Channel)

### Estructura y manejo del paso de trabajo Process



Al hacer clic en el símbolo de flecha Process cambia por completo la estructura habitual de la interfaz de usuario. Todas las teclas de función de los otros campos de teclas de pantalla / pasos de trabajo desaparecen. En el lado izquierdo aparece el visor Experiment Overview (1) con el experimento abierto. Debajo de él se encuentra la ventana de navegación (2) con el árbol de directorios de todas las funciones disponibles en este paso de trabajo. En el centro de la interfaz de usuario aparecen 10 recuadros grandes (3) que abarcan los 10 grupos de funciones. Por encima de estos recuadros se encuentra un campo de ayuda (4) en el que puede insertarse una corta descripción de uno de los grupos de funciones si se mantiene el puntero del ratón sobre el recuadro correspondiente.

▶	Haga clic en el recuadro que contiene el grupo de funciones deseado. En cada nivel de navegación puede insertar una descripción de los grupos de funciones en el campo de ayuda manteniendo el puntero del ratón en el recuadro correspondiente.
▶	En cada nivel de navegación subsiguiente seleccione un recuadro hasta que se encuentre en el nivel inferior de la función deseada con el correspondiente cuadro de diálogo.
▶	En la ventana de navegación puede seleccionar directamente una función mediante un clic en la carpeta deseada.

En la barra de menús situada en la parte superior derecha se encuentran las siguientes teclas (5):



▶	Haga clic en la tecla Back para acceder al último nivel de navegación visualizado.
▶	Haga clic en la tecla Forward para visualizar el nivel que había seleccionado antes de hacer clic en la tecla Back.
▶	Haga clic en la tecla Up para acceder a los niveles jerárquicamente superiores.
▶	Haga clic en la tecla Reset para volver a ajustar las variables modificadas con la última configuración.
▶	Para salir del paso de proceso Process, haga clic en el símbolo de flecha de otro paso de trabajo (p. ej., Acquire).

En el extremo inferior de cada cuadro de diálogo se encuentran las siguientes teclas de pantalla:



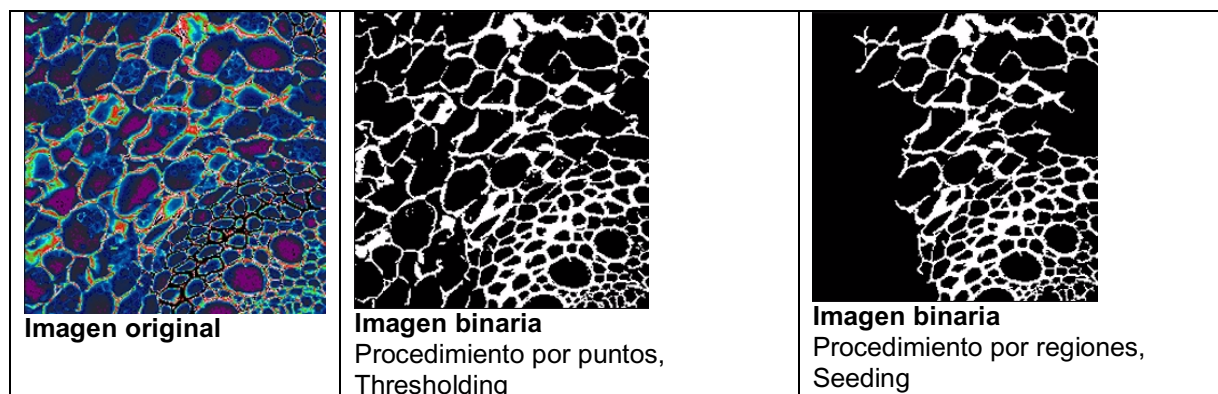
▶	Haga clic en la tecla de pantalla Preview para llevar a cabo la función seleccionada y visualizar la imagen resultante en la ventana de visualización previa.
▶	Haga clic en la tecla Apply para aplicar la función seleccionada al bloque de datos de imágenes activo, visualizar la imagen resultante en el visor Viewer y crear un nuevo archivo en el experimento activo.

### ¿A qué denominamos segmentación en el tratamiento de imágenes?

Numerosas aplicaciones de la microscopía confocal precisan la extracción de las estructuras de una imagen y permitir su utilización como un todo, por ejemplo, para análisis cuantitativos. Para separar la información relevante de la irrelevante, se aplica el proceso de segmentación. En el tratamiento de imágenes se entiende por segmentación, por un lado la separación del fondo de la estructura y, por otro lado, la subdivisión de una imagen en las estructuras relacionadas. Existen procesos de segmentación por puntos y por regiones.

Los procedimientos por puntos contemplan el valor de intensidad de un píxel aislado. En este procedimiento se recoge la distribución de los valores de intensidad de una imagen en un histograma e intenta encontrar en él un valor umbral. En el Leica Confocal Software, este proceso se realiza mediante la función "Thresholding" (función umbral). Puede ajustarse un valor umbral inferior y uno superior. Para todos los píxeles cuyo valor de intensidad está dentro de la gama de los valores umbral definidos se utiliza el valor 1 en la imagen resultante y para el resto de píxeles, el valor binario 0. El resultado es una imagen binaria con la información estructura frente a fondo. Todos los píxeles codificados como estructura se representan con el valor de gris máximo 255 (con profundidad de 8 bits), y los codificados como fondo, con el valor 0.

Al contrario del procedimiento por puntos, el procedimiento de segmentación por regiones considera el contenido, que está formado por estructuras relacionadas. Para el tratamiento de imágenes, esto significa que cada píxel debe analizarse junto con los píxeles próximos a él. Para la identificación de un píxel como estructura o como fondo es decisivo, no la consideración del valor de intensidad de un píxel aislado, sino el valor de intensidad en el contexto de los valores de los píxeles próximos. En el Leica Confocal Software, este proceso se realiza mediante las funciones "Seeding" (funciones de crecimiento de gama). Partiendo de un píxel inicial (también denominado "píxel semilla") se analiza la relación de los valores de intensidad de éste con los píxeles próximos. Con ayuda de un criterio, por ejemplo, que el valor de intensidad de un píxel próximo no se desvíe más del 75% del valor del píxel inicial, se determina los píxeles que se consideran estructura en la imagen resultante (valor binario 1) y los que se consideran fondo (valor binario 0).



### Navegación: Segmentation\ Thresholding

#### Segmentación por puntos mediante valor umbral

Puede definirse un valor umbral inferior y uno superior. Para cada píxel se analiza si su valor de intensidad se encuentra dentro o fuera de esta gama de valores umbral. Este método de segmentación es interesante, en especial, cuando las estructuras de la imagen no están en contacto entre sí y se separan del fondo de forma clara.

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	En el <u>registro Lower</u> , en el campo Channels determine el valor umbral inferior para cada canal de detección mediante la introducción de un valor entre 0 y 255 (para profundidad de 8 bits) o mediante la colocación del botón deslizante en el lugar deseado. Los valores de intensidad que se encuentran por debajo de este valor de intensidad reciben el valor 0 en la imagen binaria resultante.
▶	En el <u>registro Upper</u> , en el campo Channels determine el valor umbral superior para cada canal de detección mediante la introducción de un valor entre 0 y 255 (para profundidad de 8 bits) o mediante la colocación del botón deslizante en el lugar deseado. Los valores de intensidad que se encuentran por encima de este valor de intensidad reciben el valor 0 en la imagen binaria resultante.
▶	En el campo Options haga clic en Lock Channels si desea definir el mismo valor umbral para todos los canales de detección.
▶	Haga clic en la tecla de pantalla Suggest si desea que el software calcule un valor umbral inferior apropiado. Para el cálculo del valor umbral se utiliza el algoritmo seleccionado en el registro Estimation (vea a continuación).

### Registro Estimation

#### Entropy Maximisation: Cálculo de la entropía máxima

La base de este algoritmo es la premisa de que existe una relación entre la verosimilitud de un suceso y su contenido informativo. De acuerdo con esto, los sucesos frecuentes (generalmente el fondo) tienen un bajo valor informativo y los sucesos menos frecuentes (generalmente la estructura) un alto valor. Los valores de intensidad existentes en la imagen se subdividen en dos cantidades y se analizan según el valor de intensidad para el que es mayor la entropía de la verosimilitud de su aparición. El valor umbral óptimo es aquél para el que la suma de las entropías de ambas cantidades es la mayor o, dicho de otro modo, el contenido informativo es menor.

#### Within Group Variance Minimisation: Cálculo del valor mínimo de la varianza de grupo

La base de este algoritmo es la premisa de que en una imagen pueden encontrarse dos distribuciones normales de valores de intensidad bajos por un lado y altos por otro, que corresponden a la estructura y al fondo. Para cada valor umbral posible se analizan los valores de intensidad de la imagen y se calculan dos curvas de distribución normal. El valor umbral se coloca entre ambas curvas.

### Navegación: Segmentation\ Seeding (Threshold)

#### Segmentación por regiones mediante valor umbral

El usuario puede definir un valor umbral inferior y uno superior. Partiendo de un píxel de inicio que puede seleccionarse, se analizan los valores de intensidad de todos los píxeles próximos para determinar si se encuentran dentro o fuera de esta gama de valores umbrales. Cuando no se encuentra ningún otro píxel próximo que se halle dentro de la gama, finaliza la operación.

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	En el campo Lower Threshold determine el valor umbral inferior y en el campo Upper Threshold el valor superior mediante la introducción de un valor entre 0 y 255 (para profundidad de 8 bits) o mediante la colocación del botón deslizante en el lugar deseado. Los valores de intensidad que se encuentran por debajo o por encima de esta gama de valores umbral reciben el valor 0 en la imagen binaria resultante.
▶	En el campo Position seleccione en el campo de lista Channels el canal de detección cuyos datos desea segmentar. Si ha seleccionado la opción All, la segmentación se realiza por separado para cada canal de detección.
▶	Si el bloque de datos de imagen es una serie temporal o una serie Lambda, seleccione en el campo de lista situado a la derecha la cuarta dimensión, es decir un punto temporal o una longitud de onda determinados.
▶	Coloque la cruz reticular en la imagen para la definición del píxel de inicio. Para ello, introduzca en el campo Position un valor para cada coordenada: x y y z. O bien, arrastre la cruz reticular de la imagen con el botón izquierdo del ratón pulsado hasta la posición deseada.

#### Navegación: Segmentation\ Seeding (Single Channel)

##### Segmentación por regiones en un canal

El usuario puede definir una desviación adicional (porcentual) del valor de intensidad de un píxel de inicio que puede seleccionarse. Partiendo de este píxel inicial, se analizan los valores de intensidad de todos los píxeles próximos para determinar si se desvían del primero más de, por ejemplo, un 75%. Cuando no se encuentra ningún otro píxel próximo que se halle dentro de la gama permitida, finaliza la operación. Esta operación se realiza para cada canal de detección por separado.

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	En el campo Threshold defina la desviación porcentual permitida mediante la introducción de un valor o mediante la colocación del botón deslizante en la ubicación deseada. Los valores de intensidad que se desvían más del porcentaje definido reciben el valor 0 en la imagen binaria resultante.
▶	En el campo Position seleccione en el campo de lista Channels el canal de detección cuyos datos desea segmentar. Si ha seleccionado la opción All, la segmentación se realiza por separado para cada canal de detección.
▶	Si el bloque de datos de imagen es una serie temporal o una serie Lambda, seleccione en el campo de lista situado a la derecha la cuarta dimensión, es decir un punto temporal o una longitud de onda determinados.
▶	Coloque la cruz reticular en la imagen para la definición del píxel de inicio. Para ello, introduzca en el campo Position un valor para cada coordenada: x y y z. O bien, arrastre la cruz reticular de la imagen con el botón izquierdo del ratón pulsado hasta la posición deseada.

#### Navegación: Segmentation\ Seeding (Cross-Channel)

##### Segmentación por regiones en todos los canales

El usuario puede definir una desviación adicional (porcentual) del valor de intensidad de un píxel de inicio que puede seleccionarse. Partiendo de este píxel inicial, se analizan los valores de intensidad de todos los píxeles próximos para determinar si se desvían del primero más de, por ejemplo, un 75%. Cuando no se encuentra ningún otro píxel próximo que se halle dentro de la gama permitida, finaliza la operación. Al contrario de la función anterior "Seeding (Single Channel)", en este caso la operación se realiza de forma simultánea en todos los canales de detección.

▶	En el visor Experiment Overview, seleccione el bloque de datos de imagen que desea editar mediante un <u>doble clic</u> en el archivo.
▶	En el campo Threshold defina la desviación porcentual permitida mediante la introducción de un



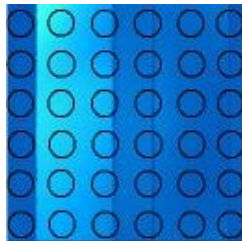
	valor o mediante la colocación del botón deslizante en la ubicación deseada. Los valores de intensidad que se desvían más del porcentaje definido reciben el valor 0 en la imagen binaria resultante.
▶	En el campo Position, en el campo de lista Channels está definida la opción All. Si el bloque de datos de imagen es una serie temporal o una serie Lambda, seleccione en el campo de lista situado a la derecha la cuarta dimensión, es decir un punto temporal o una longitud de onda determinados.
▶	Coloque la cruz reticular en la imagen para la definición del píxel de inicio. Para ello, introduzca en el campo Position un valor para cada coordenada: x y y z. O bien, arrastre la cruz reticular de la imagen con el botón izquierdo del ratón pulsado hasta la posición deseada.

## Apéndice

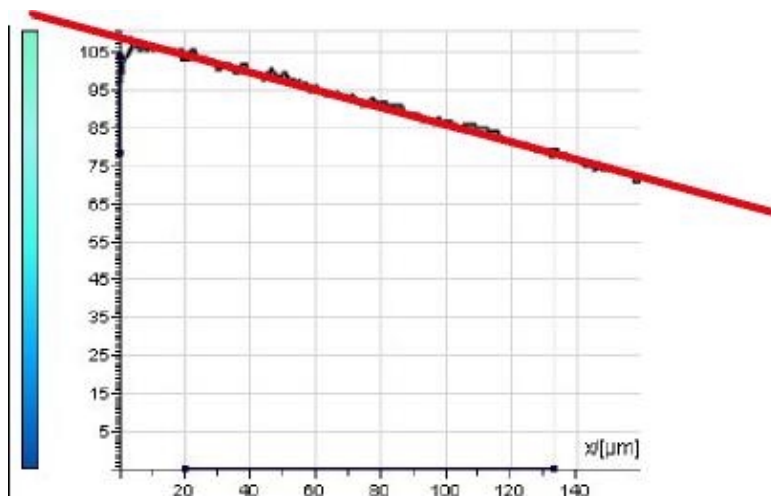
### Función de adaptación para la corrección de tendencias

& vea Paso de trabajo Process / Carpetas Materials (página 264)

1. Elección del incremento del paso, es decir, de la distancia de los puntos de apoyo

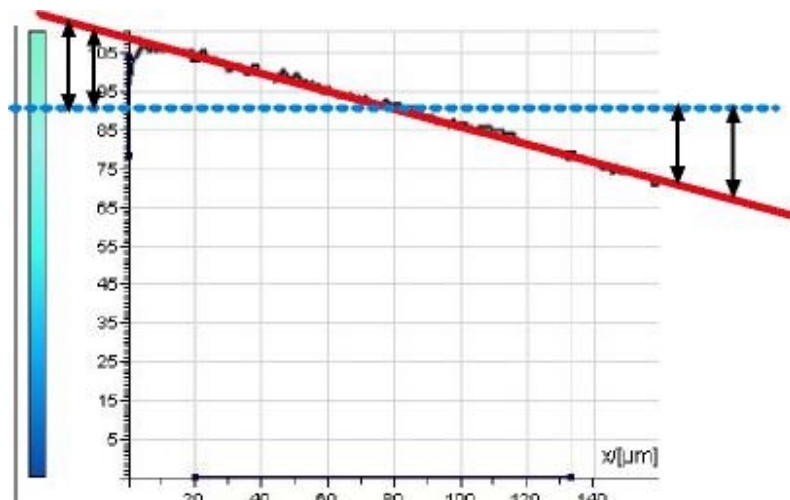


2. Selección del carácter de la función de interpolación que se desea adaptar



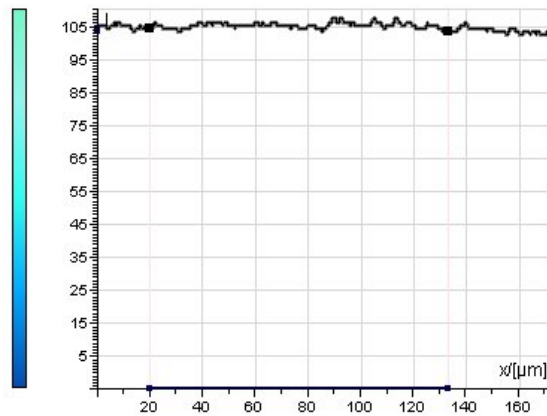
3. Cálculo de la función de interpolación  $f(x) = a + bx + cy$

4. Adición de las diferencias de intensidad para compensación de la tendencia



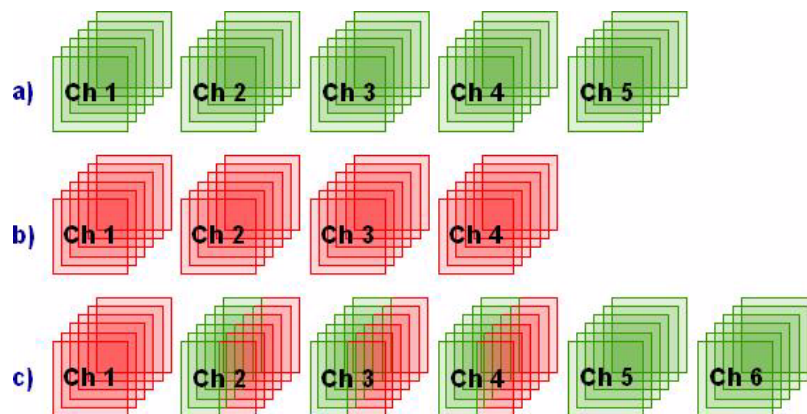


antes de la compensación



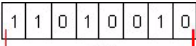
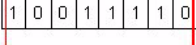
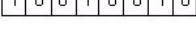
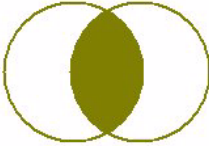
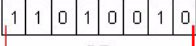
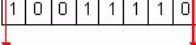
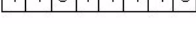

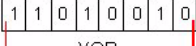
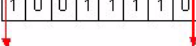
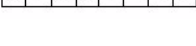

tras la compensación

### Ejemplo de la unificación de imágenes con diferente número de canal (Merging)



- a.) Primera imagen inicial (configuración: Start=2)
- b.) Segunda imagen inicial (configuración: Start=1)
- c.) Imagen unificada

## Funcionamiento de los enlaces booleanos

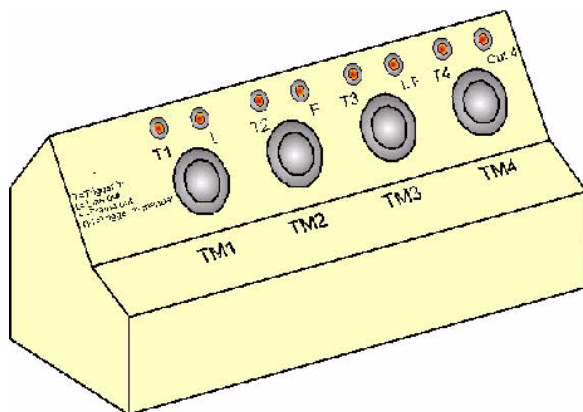
AND	<p>Escriba un 1 cuando el píxel 1 Y el píxel 2 tengan el valor 1; de lo contrario escriba un 0.</p>	<p>a.) </p> <p>b.) </p> <p>c.) </p> <p>a.) Representación binaria del píxel 1 b.) Representación binaria del píxel 2 c.) Representación binaria del píxel resultante</p>	 <p>AND representa la cantidad de intersección de dos imágenes.</p>
OR	<p>Escriba un 1 cuando el píxel 1 O el píxel 2 tengan el valor 1; de lo contrario escriba un 0.</p>	<p>a.) </p> <p>b.) </p> <p>c.) </p> <p>a.) Representación binaria del píxel 1 b.) Representación binaria del píxel 2 c.) Representación binaria del píxel resultante</p>	 <p>OR representa la cantidad de unión de dos imágenes.</p>
XOR	<p>Escriba un 1 cuando el píxel 1 y el píxel 2 sean diferentes; de lo contrario escriba un 0.</p>	<p>a.) </p> <p>b.) </p> <p>c.) </p> <p>a.) Representación binaria del píxel 1 b.) Representación binaria del píxel 2 c.) Representación binaria del píxel resultante</p>	 <p>XOR representa la cantidad de unión sin intersección de dos imágenes.</p>

## Panel de control opcional de activación

### Descripción del funcionamiento

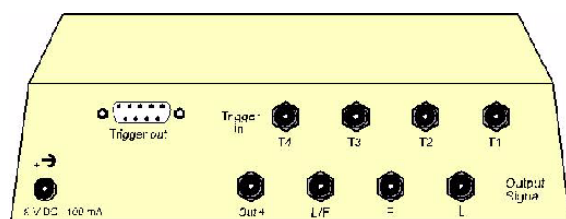
El panel de control opcional de activación permite el control de las señales de activación entrantes y salientes. Por ello, pueden dispararse manualmente señales de activación para el control de secuencias de captura.

Puede solicitar el panel de control con el número de artículo 156108330 a su distribuidor habitual de Leica.



Lado frontal del panel de activación

Elemento	Función
T1	Luz piloto; indica si se ha disparado manualmente una señal de activación en el canal 1 ó si ha entrado una señal de activación interna a través del conector T1 (lado trasero de la consola).
T2	Luz piloto; indica si se ha disparado manualmente una señal de activación en el canal 2 ó si ha entrado una señal de activación interna a través del conector T2 (lado trasero de la consola).
T3	Luz piloto; indica si se ha disparado manualmente una señal de activación en el canal 3 ó si ha entrado una señal de activación interna a través del conector T3 (lado trasero de la consola).
T4	Luz piloto; indica si se ha disparado manualmente una señal de activación en el canal 4 ó si ha entrado una señal de activación interna a través del conector T4 (lado trasero de la consola).
Out4	Luz piloto; se ilumina cuando se emite hacia el exterior una señal de activación a través del canal 4 (señal TTL estándar)
L	Luz piloto; indica la señal lineal. Esta luz se ilumina durante todo el tiempo que se están capturando datos con una exploración lineal.
F	Luz piloto; indica la señal de marco. Esta luz se ilumina durante todo el tiempo que se están capturando imágenes individuales (Frame).
L/F	Enlace lógico Y entre la señal lineal L y la señal de marco F
TM1	Palpador; al accionarlo se genera una señal de activación en el canal 1. Dicha señal puede capturarse y editarse en el sistema confocal.
TM2	Palpador; al accionarlo se genera una señal de activación en el canal 2. Dicha señal puede capturarse y editarse en el sistema confocal.
TM3	Palpador; al accionarlo se genera una señal de activación en el canal 3. Dicha señal puede capturarse y editarse en el sistema confocal.
TM4	Palpador; al accionarlo se genera una señal de activación en el canal 4. Dicha señal puede capturarse y editarse en el sistema confocal.



Lado trasero del panel de activación

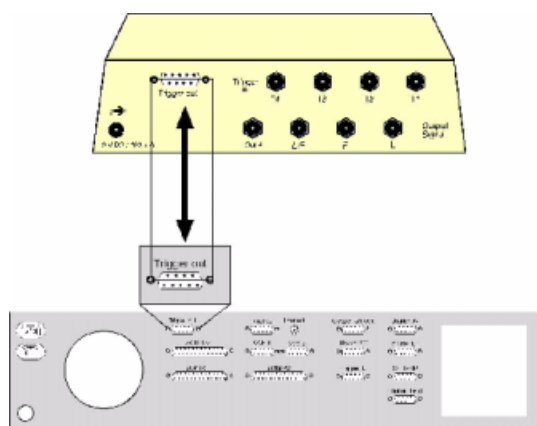
Elemento	Función
Trigger out	Zócalo de conexión para la conexión con el zócalo Trigger-out situado en el lado trasero de la fuente de alimentación.
9V DC / 100 mA	Alimentación eléctrica del panel de control de activación

T1	Conexión para señales de activación entrantes (5 V, 100 mseg, 2,2 kOhm)
T2	Conexión para señales de activación entrantes (5 V, 100 mseg, 2,2 kOhm)
T3	Conexión para señales de activación entrantes (5 V, 100 mseg, 2,2 kOhm)
T4	Conexión para señales de activación entrantes (5 V, 100 mseg, 2,2 kOhm)
Out4	Conexión por la que se emite una señal de activación generada en el sistema confocal (estándar TTL).
L	Señal lineal. Esta señal está en un "1" lógico durante todo el tiempo que se están capturando datos en una exploración lineal.
F	Señal de marco. Esta señal está en un "1" lógico durante todo el tiempo que se están capturando datos en una imagen individual (Frame).
L/F	Enlace lógico Y entre la señal lineal L y la señal de marco F

## Instalación

El panel de control de activación se conecta al sistema confocal como se indica a continuación:

1. El cable plano incluido se conecta al zócalo de conexión "Trigger out" del lado posterior del panel y al zócalo de conexión del lado posterior de la fuente de alimentación.



2. El panel de control de activación debe conectarse con la fuente de alimentación eléctrica incluida y ésta debe conectarse a una toma de 230 V CA.

## Aplicación

Mediante un cable BNC pueden transmitirse señales de activación externa (zócalos de conexión "T1"- "T4") a través del panel de control de activación hasta el sistema confocal.

Las señales salientes de activación pueden transmitirse a través del zócalo de conexión "Out4" a aparatos externos.

Para la comprobación puede utilizar los palpadores "TM1" - "TM4".

## Glosario

<b>Aberración cromática</b>	<i>Distorsión óptica provocada por la diferente refracción sobre una lente de rayos de luz de longitudes de onda diferentes. Debido a esto, los rayos de luz cuya longitud de onda es corta tienen una distancia focal más larga que los que tienen longitud de onda corta.</i>
<b>Aberración de esfericidad</b>	<i>Distorsión óptica provocada por la diferente distancia al eje óptico de rayos de luz paralelos al eje con longitudes de onda iguales. Los rayos de luz que atraviesan las zonas exteriores de la lente tiene una distancia focal más corta que los que atraviesan el centro de la lente (eje óptico).</i>
<b>Acromático</b>	<i>Clase de corrección de un objetivo. Con objetivos de este tipo, se corrige la aberración cromática para dos longitudes de onda. Por lo general, con estos objetivos se corrige hasta una longitud de onda por debajo de 500 nm y por encima de 600 nm. Al mismo tiempo se satisface la condición sinusoidal para una longitud de onda. La deformación del campo de imagen no se corrige.</i>
<b>Ampliación vacía</b>	<i>Aumento sin aportación de información nueva. Se habla de ampliación vacía cuando se visualizan distancias que son más pequeñas que el poder resolutivo óptico. Los aumentos con una escala mayor que la de la ampliación vacía no proporcionan ninguna información nueva, al contrario, sólo empeoran la nitidez de enfoque y el contraste.</i>
<b>Arandela Airy</b>	<i>Se denomina arandela Airy al círculo interior claro (rodeado por anillos de difracción claros y oscuros intercalados) de la imagen de difracción de una fuente luminosa con forma de punto. Las arandelas de difracción de dos puntos situados juntos se solapan total o parcialmente y, de este modo, limitan el poder resolutivo espacial.</i>
<b>AOTF Acousto-Optical Tunable Filter</b>	<i>El filtro ajustable acústico-óptico es un cristal óptico transparente que permite el ajuste continuo de la intensidad y la longitud de onda de la luz emitida. En el cristal se crea un campo de ultrasonido cuya longitud de onda puede ajustarse según las necesidades. La luz emitida de forma perpendicular al campo de ultrasonido se difracta como una red.</i>
<b>Apertura numérica</b>	<i>Apertura es el seno del ángulo de abertura con el que incide la luz en la lente frontal del objetivo de un microscopio; Símbolo NA. La apertura influye sobre la intensidad luminosa y sobre el poder resolutivo de una óptica. Entre el preparado y el objetivo pueden encontrarse diferentes medios (p. ej., el medio de inmersión del preparado) por lo que, en general, la apertura numérica (<math>NA = n \cdot \sin \alpha</math>) se utiliza como unidad de medida para la intensidad luminosa y el poder resolutivo.</i>
<b>Apocromático</b>	<i>Clase de corrección de un objetivo. Con este tipo de objetivos se corrige la aberración cromática para tres longitudes de onda (en general, 450 nm, 550 nm y 650 nm) y se satisface la condición sinusoidal de al menos dos colores. La deformación del campo de imagen no se corrige.</i>
<b>Blanqueo óptico</b>	<i>Destrucción de tinturas fluorescentes, denominadas fluorocromos, debido a una iluminación intensiva. En la microscopía fluorescente, los fluorocromos se excitan con luz láser hasta un alto estado de energía, el estado singulete. Si las moléculas excitadas vuelven a caer a su estado de base se emite una señal de fluorescencia. Debido a que la intensidad de la excitación es demasiado alta, las moléculas de tintura pueden cambiar de estado singulete a estado triplete debido a un entrecruzamiento. Debido a la larga duración de los estados triplete (fosforescencia) estas moléculas excitadas pueden reaccionar químicamente con oxígeno en estado triplete y se pierden para excitaciones de fluorescencia posteriores</i>
<b>Coeficiente de refracción</b>	<i>Factor por el que la velocidad de la luz es menor en un medio óptico que en el vacío.</i>
<b>Confocalidad</b>	<i>Así como con el concepto óptico de un microscopio convencional se detectan del mismo modo los componentes nítidos y los desenfocados de la imagen, mediante el principio confocal se eliminan las estructuras que quedan fuera del plano focal del objetivo del microscopio. Para ello se colocan diafragmas</i>

	<i>en lugares ópticamente conjugados de la trayectoria de los rayos. Funcionan como fuentes de luz puntuales (diafragma de excitación) y como detector puntual (diafragma de detección). El diámetro del diafragma de detección determina la longitud de onda y la apertura numérica del objetivo utilizado, así como la extensión axial de un corte óptico (resolución óptica).</i>
<b>Deformación del campo de imagen</b>	<i>La superficie curvada sobre la que se reproduce con nitidez una imagen microscópica se denomina deformación del campo de imagen. Está provocada por la forma convexa de la lente y se percibe como error debido a la escasa distancia focal de los objetivos de los microscopios. El objeto no se reproduce con nitidez simultáneamente en el centro y en la periferia. Los objetivos que tienen una corrección de la deformación del campo de imagen se denominan objetivos planos (plano = campo de imagen llano).</i>
<b>Desplazamiento de Stokes</b>	<i>El desplazamiento de Stokes es uno de los términos principales de la microscopía de fluorescencia. Si se excitan moléculas fluorescentes con una luz de una determinada longitud de onda, éstas emiten otra luz con una longitud de onda mayor. Esta diferencia entre luz de excitación y luz fluorescente se denomina desplazamiento de Stokes. Sin este desplazamiento no sería posible la separación de la intensa luz de excitación de la débil señal fluorescente en un microscopio de fluorescencia.</i>
<b>Distancia de trabajo</b>	<i>Distancia de la lente frontal de un objetivo al foco. Para la distancia de trabajo libre se indica la distancia entre la lente frontal del objetivo y el cubre-objetos o la muestra descubierta. En la mayoría de los casos, los objetivos con gran distancia de trabajo poseen una baja apertura numérica y, por el contrario, los que tienen gran apertura, disponen de una pequeña distancia. Si se desea un objetivo de gran apertura con gran distancia de trabajo, debe ampliarse el diámetro de la lente del objetivo. Con frecuencia se trata de ópticas con baja corrección, ya que lograr la extrema precisión en la fabricación de una lente de gran diámetro sólo es posible con gran esfuerzo.</i>
<b>Filtro de paso corto</b>	<i>Los filtros de paso corto son filtros de interferencia que transmiten luz de onda corta y reflejan la de onda larga. Este tipo de filtro se caracteriza por la especificación del límite de la longitud de onda en el que el filtro pasa de transmisión a reflexión (50% umbral).</i>
<b>Filtro de paso largo</b>	<i>Los filtros de paso largo son filtros de interferencia que reflejan la luz de onda corta y son transparentes para la de onda larga. Este tipo de filtro se caracteriza por la especificación del límite de la longitud de onda en el que el filtro pasa de reflexión a transmisión (50% umbral).</i>
<b>Filtro dicroico</b>	<i>Los filtros dicroicos son filtros de interferencia con un ángulo de incidencia de la luz de 45°. La transmisividad o la reflectividad de estos filtros depende de una determinada longitud de onda de la luz. Con un filtro de paso corto <b>RSP 510</b> (reflection <b>short pass</b>), por ejemplo, se refleja la luz de excitación por debajo de 510 nm y se transmite por encima de este valor. Los valores de transmisión se encuentran generalmente entre el 80% y el 90%, y los valores de reflexión entre el 90% y el 95%.</i>
<b>Filtro dicroico doble</b>	<i>Los filtros dicroicos dobles son filtros de interferencia con un ángulo de incidencia de la luz de 45°. La transmisividad o la reflectividad de estos filtros dobles depende de dos determinadas longitudes de onda de la luz. Con un filtro <b>Dicroico doble</b> DD 488/568, por ejemplo, se refleja la luz de excitación a 488 nm y 568 nm y se transmite por encima de estos valores. Los valores de transmisión son generalmente del 80%, y los valores de reflexión se encuentran entre el 90% y el 95%.</i>
<b>Filtro dicroico triple</b>	<i>Los filtros dicroicos triples son filtros de interferencia con un ángulo de incidencia de la luz de 45°. La transmisividad o la reflectividad de estos filtros triples depende de tres determinadas longitudes de onda de la luz. Con un filtro <b>dicroico triple</b> TD 488/568/647, por ejemplo, se refleja la luz de excitación a 488 nm, 568 nm y 633 nm y se transmite por encima de estos valores. Los valores de transmisión son generalmente del 80%, y los valores de reflexión se encuentran entre el 90% y el 95%.</i>
<b>Filtro, digital, por fases</b>	<i>Un filtro digital consta de un procedimiento de cálculo que permite la modificación de los datos de la imagen. Mediante los filtros se intenta</i>



	<i>siempre eliminar los componentes perturbadores de la imagen. Un filtro por fases garantiza que, las magnitudes cuantificables de la imagen permanezcan inalteradas, por lo que es un requisito para los métodos de medición estandarizados (p. ej., caracterización de superficies según la normativa ISO).</i>
<b>Filtro neutral</b>	<i>Los filtros neutrales son placas de cristal parcialmente cubiertas de espejo. Permiten la distribución de la trayectoria de la luz independientemente de la longitud de onda. La luz que incide se refleja parcialmente y se transmite parcialmente. En general, los filtros neutrales se colocan en un ángulo menor de 45° en la trayectoria de los rayos. La característica de un filtro neutral hace referencia a la reflectividad y la transmisividad. Con un filtro neutral <b>RT 30/70</b>, por ejemplo, se <b>refleja</b> un 30% de la luz de excitación y se <b>transmite</b> un 70%.</i>
<b>Microscopía de fluorescencia</b>	<i>Procedimiento de contraste óptico para la representación de estructuras fluorescentes. Las muestras autofluorescentes disponen de una denominada fluorescencia primaria. No precisan la adición de sustancias fluorescentes adicionales. Por el contrario, a las sustancias con fluorescencia secundaria debe agregárseles las tinturas apropiadas, los denominados fluorocromos. Las tinturas específicas permiten la localización precisa de los elementos estructurales teñidos de un objeto. La microscopía de fluorescencia dispone del potencial para análisis morfológicos y de la posibilidad de realizar análisis dinámicos en el plano molecular.</i>
<b>Marco</b>	<i>Un marco corresponde a la captura de un corte óptico individual. Si se captura un corte óptico individual, por ejemplo, 4 veces (para calcular la media de los datos y eliminar los ruidos), se crean 4 marcos para este corte óptico.</i>
<b>Objetivo de inmersión</b>	<i>Objetivo de microscopio diseñado para la utilización con medios de inmersión. Si no se utiliza un medio de inmersión o se utiliza uno erróneo con un objetivo de inmersión determinado, pueden producirse pérdidas de resolución y empeoramientos de la corrección.</i>
<b>Objetivo plano</b>	<i>Clase de corrección de un objetivo. Con objetivos de este tipo, se corrige la deformación del campo de imagen. La eliminación de este error precisa lentes con fuertes concavidades y gran grosor central. En función del tipo de aberración cromática corregida adicionalmente se distingue entre planacromático, planapocromático y objetivo de fluorita plano.</i>
<b>Objetivo seco</b>	<i>Objetivo microscópico que se utiliza sin medios de inmersión. Entre la lente del objetivo y el preparado sólo hay aire.</i>
<b>Objetivos de fluorita</b>	<i>Clase de corrección de un objetivo. Los objetivos de fluorita son semi-apocromáticos, es decir, objetivos con un grado de corrección intermedio entre acromático y apocromático.</i>
<b>Píxel</b>	<i>Palabra creada a partir de la palabras inglesas <u>picture</u> y <u>element</u>. Un píxel es el elemento gráfico más pequeño, indivisible en un sistema de dos dimensiones. En esta documentación se denomina píxel tanto a los puntos de exploración del preparado como a los puntos de la imagen.</i>
<b>ROI</b>	<i>Esta abreviatura significa "Region of Interest". Una zona de interés abarca una zona en la que deben realizarse trabajos de restitución. Asimismo, una zona de interés también puede identificar la zona de una muestra que debe explorarse (ROI-Scan).</i>
<b>Relación señal / ruido</b>	<i>Relación entre las señales detectadas en el preparado y las señales no deseadas provocadas accidentalmente por diferentes componentes ópticos y electrónicos y recogidas por el detector.</i>
<b>Solapamiento espectral</b>	<i>Distorsión óptica provocada porque la frecuencia de exploración es muy baja en relación a la frecuencia de una señal.</i>
<b>Visualización por fases</b>	<i>El principio de la visualización por fases, tal como lo aplica Leica, es un método alternativo optimizado a la visualización radiométrica. El campo de aplicación principal es la medición de la concentración de iones en la fisiología. A diferencia del procedimiento radiométrico, la visualización por fases extrae más información sobre la muestra. Por este motivo, este procedimiento permite la adaptación de la visualización de datos fisiológicos</i>

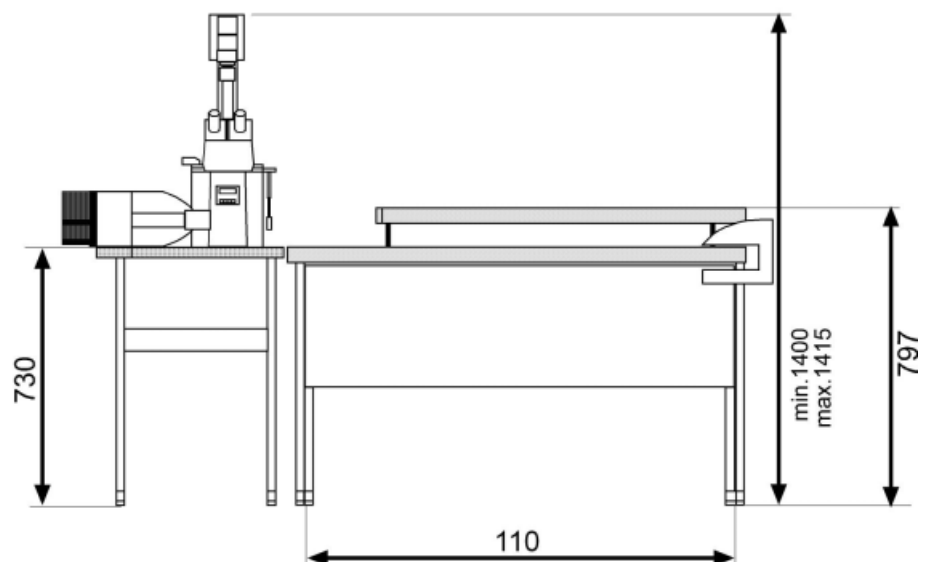
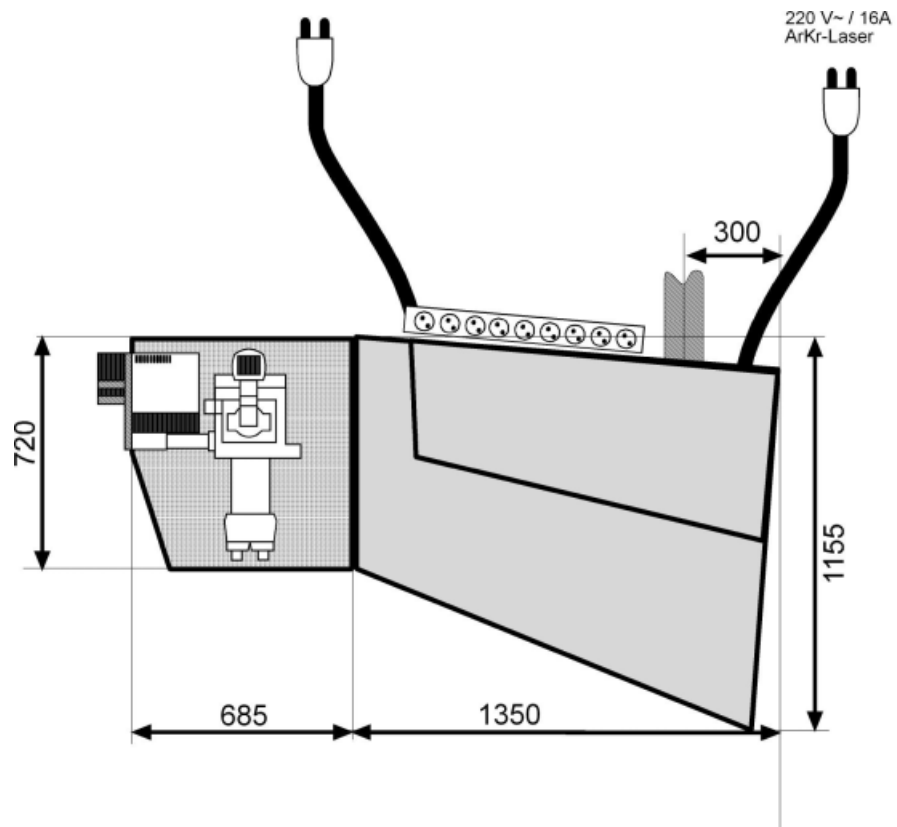
	<i>a la dinámica del ojo humano. Si desea información detallada sobre el principio de visualización por fases, consulte directamente con Leica Microsystems Heidelberg GmbH.</i>
<b>Voxel</b>	<i>Palabra creada a partir de la palabras inglesas <u>v</u>olume y <u>pixe</u>l. Un voxel es el elemento volumétrico más pequeño, indivisible en un sistema de tres dimensiones. En esta documentación se denomina voxel tanto a los elementos volumétricos del preparado como a los puntos de la imagen tridimensionales.</i>



## Especificaciones

## Peso y dimensiones del TCS SP2 de Leica

**Trípode inverso:**



*Peso y dimensiones del sistema confocal TCS SP2 de Leica (todas las medidas en mm)*

## Declaración de conformidad



### EC Declaration of Conformity

**Manufacturer:** Leica Microsystems Heidelberg GmbH

**Address:** Am Friedensplatz 3  
Germany, 68165 Mannheim

**Product:** **TCS SP2 Confocal Laser Scanning Microscope**  
**Option: AOBS, RS**

*We declare that the product described herein complies with the following European Directives:*

*89/336/EEC Directive on Electromagnetic compatibility*  
*73/23/EEC Directive on Low-voltage equipment*

*The product conforms to the standards:*

*EN 61326-1: 1997 + EN 61326/A1: 1998*  
*EMC requirements for Class A electrical equipment for measurement, control and laboratory use*

*EN 61000-3-2: 2000*  
*Electromagnetic compatibility (EMC)*  
*Part 3-2: Limits – Limits for harmonic current emissions*

*EN 61000-3-3: 1995*  
*Electromagnetic compatibility (EMC)*  
*Part 3: Limits – Section 3: Limitation of voltage fluctuations and flicker in low-voltage supply systems for equipment with rated current  $\leq 16A$*

*EN 61010-1: 1993 + A2:1995*  
*Safety requirements for electrical equipment for measurement, control and laboratory use; Part 1: General requirements*

*EN 60825-1: 1994 + A11: 1996 + A2: 2001*  
*Safety of laser products*  
*Part 1: Equipment classification, requirements and user's guide*

Manager Research & Development

Mannheim, Germany  
January 01, 2002

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Rafael Storz".  
Dr. Rafael Storz

# Índice

- \*.ano, 199, 253, 254
- \*.lei, 253, 254
- \*.tif, 253, 254
- 12 bits, 174, 214, 219
- 2D, 272
- 2-Point, 186
- 8 bits, 174, 214, 219
- Aberración, 307
- Accionador Z, 179
- Accumulation, 174
- Acousto-Optical Beam Splitter, 139
- Acousto-Optical Tunable Filter, 307
- Acromático, 141, 307
- Acumulación, 174
- Addition, 214
- Adición de imágenes, 214
- Adopción de parámetros de captura de un experimento, 172
- Advertencias legales, 11
- Ajuste de fotomultiplicador, 145
- Ajuste de la fase, 170
- Ajuste de la serie temporal, 179
- Ajuste de parámetros de barrido, 152
- Alisado, 261, 288
- Almacenamiento, 253, 254
- Almacenamiento de archivos, 253
- Almacenamiento de puntos de medición, 258
- Almacenamiento del visor Viewer como plantilla, 257
- Altura, 258, 259
- Ampliación, 146, 184, 195, 212
- Ampliación vacía, 307
- Amplitude, 220
- Análisis de componentes principales, 229
- Análisis de conglomerados, 229
- AND, 214, 304
- Ángulo de giro, 170
- Animación, 284
- Animación mediante rotación, 283
- Annotation, 249, 250
- Anulación, 210
- AOBS, 139
- AOTF, 137, 307
- Apertura, 261, 288, 307
- Apertura de archivos, 253
- Apertura de la ayuda sensible al contexto, 136
- Apertura numérica, 141
- Apocromático, 141, 307
- Apply, 172
- Arandela Airy, 148, 307
- Aritmética, 214
- Aritmética con constante, 214
- Arranque del sistema operativo, 29
- Asimetría, 237
- Average, 173
- Ayuda, 136
- Ayuda a través de Internet, 10
- Barrido bidireccional, 169
- Barrido espectral, 154, 158
- Barrido Lambda, 154
- Barrido unidireccional, 169

- Begin, 153, 154
- Bidimensional, 272
- Bidireccional, 169, 170
- Binarización, 297
- Blanqueado, 307
- Blanqueo, 152
- Blur, 261, 288
- Booleano, 214
- Borrado de una zona de interés, 248
- Bottom Hat, 260, 288
- Browse, 183
- Burst mode, 173
- Cálculos, 214, 237
- Cálculos estáticos, 237, 278
- Campo de barrido, 170
- Campo de texto, 251
- Canal de detección, 194
- Captura de imagen, 174
- Captura de imágenes de una línea en una determinación de la media, 172
- Captura de imágenes en una determinación de la media, 173
- Captura de imágenes simultánea o secuencial, 137
- Capturas ampliadas, 148
- Capturas de reflexión, 139
- Carga y almacenamiento del ajuste de parámetros, 137
- Center of mass, 209
- Center of mass of intensities, 209
- Central, 260, 288
- Centro de gravedad de la superficie, 209
- Channel, 194
- Cierre, 261, 288
- Citofluorograma, 272, 275, 276, 278
- Clear, 248
- Close, 260, 288
- Coeficiente de absorción, 203, 284, 296
- Coeficiente de refracción, 307
- Colocalización, 272, 276
- Color Look-Up Table, 181
- Combinación de colores, 198, 199
- Configuración, 176
- Configuración básica, 184
- Configuración de usuario, 34
- Configuración del software, 172, 181
- Confocalidad, 307
- Consola de mando, 256
- Contenido de la superficie, 259
- Continuous Scan, 152
- Contraste, 145, 224
- Conversión, 219
- Coordenadas mundiales, 214, 220
- Copia, 249
- Copia de gráficos de cuantificación, 242
- Copia de imágenes a la página de presentación, 249
- Corrección de tendencias, 266
- Corrección Gamma, 224
- Corredora de medición, 186
- Correlación, 272
- Corrimiento, 170
- Corte xy, 157
- Corte xz, 157
- Cortes, 157
- Cortes xy, 150, 227
- Cortes xz, 150, 227

- Creación de campo de texto, 251
- Creación de experimentos, 253, 254
- Creación de imagen topográfica, 193, 209
- Creación de vista tridimensional, 191, 210
- Crecimiento de gama, 297
- Cross-Channel, 297
- Crosstalk, 229, 272
- Crosstalk Correction, 229
- Cuadrícula, 185
- Cuadrícula de alambre, 210
- Cuadro de diálogo, 6
- Cuadro de diálogo Beam Path Setting, 137, 154, 157
- Cuadro de diálogo Edit Legend, 181
- Cuadro de diálogo Objective, 141
- Cuadro de diálogo Options, 257
- Cuadro de diálogo Printer Selection, 252
- Cuadro de diálogo Select LUT, 195
- Cuadro de diálogo Series Scan Overview, 153
- Cuadro de diálogo Time Configuration, 179
- Cuadro de diálogo Viewer Options, 184, 185, 186, 188, 190, 191, 193
- Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Charts, 186
- Cuadro de diálogo Viewer Options, icono de función tridimensional, 184
- Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Display, 185
- Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Overlay, 190
- Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Projections, 188
- Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Surface Calculation, 193
- Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Surface View, 191
- Cuadro de diálogo Viewer Options, icono Scan Progress, 191
- Cuadro de diálogo Z Configuration, 157
- Cuantificación, 186, 240, 242, 243, 258, 259
- Cuidado del ICM 1000, 45
- Curva Gamma, 224
- Cytofluorogram, 272, 275, 276, 278
- Datos ASCII, 243
- Definición automática de una zona de interés, 245
- Definición del punto final de una serie Lambda, 157
- Definición del punto inicial de una serie Lambda, 154
- Deformación del campo de imagen, 307
- Densitometric analysis, 278
- Deplazamiento, 184, 212, 220
- Descomposición de valor singular, 229
- Desenfocado, 148
- Desplazamiento, 170, 220
- Desplazamiento de fase, 170
- Desplazamiento de Stokes, 307
- Desplazamiento de una imagen en la imagen resultante, 220
- Desplazamiento de una zona de interés, 246, 247
- Desplazamiento de vista tridimensional, 212
- Desviación estándar, 237, 238, 240
- Desviación media, 237, 240
- Detalle de imagen, 148, 220
- Detección, 194
- Detectores, 137
- Determinación de la media, 173
- Determinación del número de incrementos de longitud de onda, 158

- Diafonía, 229, 272
- Diafonía óptica, 229
- Diafragma, 148
- Diafragma de detección, 148
- Diagrama de puntos, 272, 275
- Difracción, 148
- Digitalización, 174, 219
- Dilatación, 260, 288
- Dilation, 260, 288
- Display, 184
- Distancia de trabajo, 141, 307
- Distribuidor de haz, 139
- Distribuidor de haz acústico-óptico, 139
- División, 214
- División de imágenes, 214
- Dye Finder, 229
- Edición de imagen, 214, 219, 220, 224, 227, 261, 284, 288
- Edit Legend Entries, 181
- Eje de proyección invariable, 203, 206, 207, 208, 227
- Eje de proyección variable, 203, 284, 293, 295, 296
- Ejes de coordenadas, 184
- El Leica Confocal Software, 47
- Elipse, 243
- End, 153
- Energía media de la imagen, 237
- Enfoque, 148, 261, 288
- Enhancement, 224
- Enlaces booleanos, 214, 261, 288, 304
- Erosion, 260, 288
- Escala de la curva de medición, 186
- Espectro, 159
- Espectro de emisión, 159
- Estadística, 278
- Estereograma, 283
- Estructura, 261, 288, 297
- Estructura superficial, 209
- Experiment, 172, 254
- Export, 243
- Exportación de datos de cuantificación, 243
- Extended Focus, 227
- Extracción, 261, 288, 297
- Factor de transparencia, 188, 203, 208, 283, 296
- Factores óptimos para el zoom, 146
- Fase, 170
- Film, 200
- Filtro, 261, 288
- Filtro central, 260, 288
- Filtro de paso alto, 261, 266, 288
- Filtro de paso bajo, 261, 266, 288
- Filtro de paso corto, 307
- Filtro de paso largo, 307
- Filtro dicróico, 137, 307
- Filtro dicróico doble, 137, 307
- Filtro dicróico triple, 137, 307
- Filtro lineal, 261, 266, 288
- Filtro morfológico, 260, 288
- Filtro neutral, 137, 307
- First, 200
- Fluorescent Dye, 159
- Fondo, 175, 261, 288, 297
- Formación de imágenes confocales, 8
- Formato, 149

- Formato de archivo, 253
- Formato de barrido, 149
- Formato de datos, 253
- Formatos de archivo LCS, 54
- Full screen, 181
- Función de transmisión de contraste, 224
- Gallery, 198, 202
- Geometric analysis, 278
- Giro, 211
- Giro de una zona de interés, 247
- Giro de vista tridimensional, 211
- Giro del campo de barrido, 170
- Glosario, 307
- Grosor de corte óptico, 148
- Help, 136
- Highpass, 261, 266, 288
- Histograma, 237
- Iluminación Köhler, 43
- Image Filters, 261, 288
- Imagen con isolíneas, 210
- Imagen de valor umbral, 297
- Imagen individual, 197
- Imagen múltiple, 197
- Imagen original, 210
- Imagen plana, 210
- Imagen previa de una serie, 200
- Imagen topográfica, 193, 209
- Imágenes binarias, 260, 288, 297
- Imágenes de valores grises, 214, 261, 288, 297
- Imágenes en serie, 198, 202
- Import, 159
- Importación, 159
- Impresión, 242, 252
- Impresión de gráficos de cuantificación, 242
- Incremento del paso, 157
- Indicación de recorrido, 191
- Indicaciones de seguridad, 13
- Indicador de posición z, 185
- Indicador de regla, 185
- Información sobre la imagen, 297
- Inicio del barrido de series, 162
- Inicio y finalización de películas, 201
- Inserción de un campo de texto en la página de presentación, 251
- Intensidad máxima, 209
- Isolines, 210
- Lambda Step, 158
- Leveling, 193, 266
- Leyenda, 6, 181
- Leyenda Experiment, 181
- Leyenda Hardware, 181
- Line, 250
- Line averaging, 172
- Línea, 250
- Longitud de onda, 158
- Longitud del trayecto de medición, 240
- Longitudes de onda de excitación, 139, 175, 176
- Look-Up Table, 181, 195
- Lote de datos de imagen de varias dimensiones, 162, 283
- Lote de datos de imagen tridimensional, 162, 227, 283
- Lote de imágenes, 157, 162, 203, 209, 227
- Luminosidad, 145, 224
- LUT, 181, 195

- Marcado de una zona de interés, 246
- Máscara binaria, 276, 278
- Mask, 276
- Materials, 266
- Matriz, 229
- Maximum Intensity, 209
- Media, 173
- Media aritmética, 237, 238, 240, 258, 259
- Media cuadrática, 237, 258, 259
- Media dinámica, 173
- Medición de dos puntos, 186, 238, 258, 270
- Medición de rugosidad, 258, 259
- Medición de superficies, 270
- Medición de un perfil a lo largo de una distancia, 240, 258
- Medición de volúmenes, 270
- Medida, 240
- Menú, 6
- Menú contextual, 6
- Merging, 220
- Microscopía de fluorescencia, 307
- Miniatura de una imagen, 183
- Modo, 150
- Modo de barrido, 150, 191
- Modo Ping-Pong, 185
- Morfología, 261, 288
- Movimiento Z, 179
- Multicolor, 229
- Multiplicación, 214
- Multiplicación de imágenes, 214
- Navegación, 184
- Navegador del experimento, 183
- New Experiment, 254
- New Window, 181
- Next, 200
- Nivelado, 266
- Nube de puntos, 272, 275
- Nuevo experimento, 254
- Número de cortes espaciales, 153, 157
- Objective, 141
- Objetivo, 141
- Objetivo de fluorita, 141, 307
- Objetivo de inmersión, 141, 307
- Objetivo plano, 141, 307
- Objetivo seco, 141, 307
- Ondulación, 266
- Opción, 6
- Opción New Window, 254
- Open, 253, 260, 288
- Operadores booleanos, 214, 261, 288, 304
- Operadores morfológicos, 260, 288
- OR, 214, 304
- Overlay, 190, 198, 199, 276
- Página de presentación, 242, 249, 250, 251
- Paso de trabajo Process, 214, 219, 220, 224, 227, 261, 266, 284, 288, 297
- Perfil, 240
- Pinhole, 148
- Pinhole de detección, 148
- Píxel, 307
- Pixel semilla, 297
- Plano focal, 148
- Plantilla, 257
- Platina, 176
- Platina de enfoque de precisión, 179
- Platina XY, 176



- Platina Z, 179
- Poder resolutivo, 141
- Polygon, 244
- Posición z/y, 153, 154, 156
- Posicionamiento Y, 170
- Presentación, 249, 250, 251
- Previous, 200
- Primera imagen de una serie, 200
- Print, 242
- Procedimiento de acumulación, 174
- Procesamiento de grandes cantidades de datos, 173
- Procesamiento de lotes de datos, 173
- Proceso de fluorescencia simulado (SFP), 283, 296
- Process, 214, 219, 220, 224, 227, 261, 266, 284, 288, 297
- Profile, 240
- Profundidad en bits, 219
- Promedio, 173
- Proyección, 203, 227, 283, 296
- Proyección de un lote de imágenes, 203, 227, 283, 296
- Proyección de valor máximo, 188, 203, 206, 209, 227, 283, 294
- Proyección de valor medio, 188, 203, 207, 227, 283, 295
- Proyección SFP, 188, 203, 283, 296
- Proyección transparente, 188, 203, 208, 227, 284, 296
- Proyecciones ortogonales, 206, 207, 208, 227
- Puesta en servicio, 35
- Punta de perfil, 258, 259
- Punto final, 153
- Punto final de una serie espacial, 153, 156
- Punto inicial, 153
- Punto inicial de una serie espacial, 153, 154
- Ranura, 141
- Raw Data, 253, 254
- Reconstrucción en colores, 229
- Rectangle, 245, 250
- Rectángulo, 250
- Reducción, 184, 195, 213
- Referencia de software: Todas las funciones del software, 51
- Region of Interest, 243, 244, 245, 307
- Registro, 6
- Relación señal / ruido, 307
- Representación de imagen superpuesta, 190, 198, 199, 276
- Representación de imágenes en serie, 198, 202
- Representación de imágenes originales, 210
- Representación de la imagen deseada de una serie, 201
- Representación de la imagen previa de una serie, 200
- Representación de la última imagen de una serie, 201
- Representación de una imagen de una serie, 201
- Resolución, 149, 219
- Resolución de imagen, 174, 219
- Resolución en bits, 219
- Revólver portaobjetivos, 141
- ROI, 148, 175, 176, 238, 243, 244, 245, 246, 247, 248
- ROI Scan, 175, 176
- Rotación, 170, 184, 211, 283
- Rotate, 247
- Roughness, 266

- Rugosidad, 266
- Save, 253
- Save All, 254
- Save As, 254
- Scan Field Rotation, 170
- Sections, 157
- Secuencia de filmación, 200, 201
- Seeding, 297
- Segmentación, 297
- Segmentation, 297
- Selección de imagen, 201
- Selección de la velocidad de barrido, 151
- Selección de las longitudes de onda de excitación, 137
- Selección de tablas de asignación de colores (LUT), 195
- Selección del barrido unidireccional o bidireccional, 169
- Selección del distribuidor de haz de excitación, 137
- Selección del formato de barrido, 149
- Selección del modo de barrido, 150
- Selección del objetivo, 141
- Select, 246
- Selection, 181, 201
- Separación de imágenes, 220
- Separation, 220
- Serie, 153, 154, 157, 162, 198, 200, 201, 202, 209
- Serie de imágenes, 153, 154, 157, 162, 198, 200, 201, 202
- Serie de imágenes espacial, 157, 162, 227
- Serie espectral, 154, 158
- Serie Lambda, 154, 157, 158, 162
- Serie temporal, 162, 179
- Series Scan, 162
- Sharpen, 261, 288
- Siguiente imagen de una serie, 200
- Símbolo de flecha Process, 214, 219, 220, 224, 261, 266, 284, 288, 297
- Single Channel, 297
- Single Scan, 152
- Snap, 249
- Solapamiento espectral, 149, 307
- Speed, 151
- Stain, 159
- Step Size, 157
- Stereo, 283
- Submuestreo, 149
- Suma de intensidades, 174
- Supermuestreo, 149
- Supresión de ruidos, 173
- Surface, 211
- Sustracción, 214
- Sustracción de imágenes, 214
- Tablas de asignación de colores, 181, 194, 195
- Tecla, 6
- Tecla 3D View, 211
- Tecla Annotation, 249
- Tecla Apply, 172
- Tecla Back, 214, 219, 220, 224, 227, 261, 266, 284, 288, 297
- Tecla Begin, 154
- Tecla First, 200
- Tecla Format, 149
- Tecla Forward, 214, 219, 220, 224, 227, 261, 266, 284, 288, 297
- Tecla Gallery, 198, 202

- Tecla Help, 136
- Tecla Lambda Scan, 154
- Tecla Lambda Steps, 158
- Tecla Last, 201
- Tecla Line, 250
- Tecla Look-up Table, 195
- Tecla Materials, 270
- Tecla Mode, 150
- Tecla Move, 212
- Tecla New Experiment, 254
- Tecla Next, 200
- Tecla Objective, 141
- Tecla Open, 253
- Tecla Overlay, 198
- Tecla Overlay rgb, 199
- Tecla Phase, 170
- Tecla Pinhole, 148
- Tecla Play/Stop, 201
- Tecla Previous, 200
- Tecla Profile, 240
- Tecla Profile (z), 238
- Tecla Rectangle, 250
- Tecla Reset, 214, 219, 220, 224, 227, 261, 266, 284, 288, 297
- Tecla Rotate, 211
- Tecla Save, 253
- Tecla Save All, 254
- Tecla Save As, 254
- Tecla Scan Field Rotation, 170
- Tecla Sections, 157
- Tecla Selection, 201
- Tecla Series, 153
- Tecla Series Scan, 162
- Tecla Snap, 249
- Tecla Speed, 151
- Tecla Template, 257
- Tecla Text, 251
- Tecla Tiled, 197
- Tecla Time, 179
- Tecla Topography, 209
- Tecla Unidirectional/ Bidirectional Scan, 169
- Tecla Up, 214, 219, 220, 224, 227, 261, 266, 284, 288, 297
- Tecla Zoom, 212
- Tecla Zoom In, 148
- Template, 257
- Teorema de muestreo, 149
- Teorema de Nyquist, 149
- Términos y modos de escritura, 6
- Text, 251
- Threshold, 297
- Thresholding, 297
- Thumbnail Image, 183
- Tiled, 197
- Time, 179
- Tintura, 159
- Tintura fluorescente, 159
- Top Hat, 260, 288
- Topography, 193, 209
- Trama, 149
- Translation, 184
- Trazado de líneas, 250
- Trazado de líneas en la página de presentación, 250
- Trazado de un rectángulo, 250
- Trazado de un rectángulo en la página de

- presentación, 250
- Tridimensional, 184, 275
- Última imagen de una serie, 201
- Unidireccional, 169
- Unión de imágenes, 220
- Utilización de este manual, 5
- Valle de perfil, 258, 259
- Valor Gain, 145
- Valor máximo, 237, 238, 240
- Valor máximo de posición, 238
- Valor mínimo, 237, 238, 240
- Valor mínimo de posición, 238
- Valor Offset, 145
- Valor umbral, 297
- Valores de luminosidad, 224
- Valores de píxel, 214, 220
- Valores medios de luminosidad, 224
- Varianza, 237, 238, 240
- Velocidad de barrido, 151
- Viewer, 181
- Viewer Options, 184
- Visor, 6
- Visor Experiment Overview, 254
- Visor Viewer, 181, 195
- Visualización espacial, 211
- Visualización por fases, 307
- Visualización tridimensional, 210, 284
- Voxel, 203, 307
- Waviness, 266
- Wireframe, 211
- Wizard, 245
- XOR, 214, 304
- Y-Selection, 170
- Z-Galvo, 179
- Zona de interés, 238, 259
- Zona de interés como elipse, 243
- Zona de interés como polígono, 244
- Zona de interés como rectángulo, 245
- Zonas de interés, 175, 176
- Zoom, 146, 213
- Zoom de pantalla, 185
- Zoom de vista tridimensional, 212
- Zoom electrónico, 146
- Zoom gráfico, 185, 195
- Z-Wide, 179