

Procesamiento de Imágenes Microscópicas de *Entamoeba histolytica* mediante Tres Técnicas de Mejora Adaptativa y Composición en Falso Color

D. Y. Pérez-Juárez¹, A. Anzueto-Ríos^{1*}, R. Santiago-Godoy¹,
J. Pacheco-Yépez², A. A. Reséndiz-Albor², I. M. Arciniega-Martínez²

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria en Ingeniería y Tecnologías Avanzadas (UPIITA), Academia de Biónica, Laboratorio de Biomecánica, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

²Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

*Autor de correspondencia: aanzueto@ipn.mx

Referencia de este artículo [1].

RESUMEN

En este trabajo se presenta el desarrollo de un programa de procesamiento digital de imágenes orientado al análisis de micrografías de *Entamoeba histolytica* en cultivo axénico, obtenidas mediante microscopía óptica de campo claro. Las imágenes de partida se adquieren en el modelo RGB y presentan limitaciones inherentes de contraste que dificultan la identificación de estructuras celulares. Se propone una metodología basada en tres técnicas de mejora complementarias: Corrección adaptativa de gamma, enmascaramiento de enfoque (Unsharp Masking) e imagen residual (Image Subtraction). Cada técnica genera una versión procesada que enfatiza características distintas; las tres imágenes resultantes se integran como canales RGB independientes para componer una representación en falso color. Esta codificación cromática hace visualmente evidentes las diferencias morfológicas de los trofozoitos —membrana plasmática, vacuolas, núcleo y pseudópodos— constituyendo una herramienta de apoyo para el análisis morfométrico y cuantitativo en estudios parasitológicos.

Palabras clave: *procesamiento digital de imágenes, falso color, imagen residual, corrección de gamma adaptativa, enmascaramiento de enfoque, microscopía óptica, Entamoeba histolytica, trofozoitos, análisis morfométrico.*

ABSTRACT

This paper presents the development of a digital image processing program aimed at the analysis of bright-field optical micrographs of *Entamoeba histolytica* axenic cultures. The RGB color model source images exhibit inherent contrast limitations that hinder the delineation of cellular structures. A methodology based on three complementary enhancement techniques is proposed: Adaptive gamma correction, Unsharp Masking, and Image Subtraction. Each technique produces a processed version emphasizing distinct features; the three resulting images are integrated as independent RGB channels to compose a false-color representation. This chromatic encoding makes morphological differences in trophozoites visually evident, providing a flexible support tool for morphometric and quantitative analysis in parasitological studies.

Keywords: *digital image processing, false color, image subtraction, adaptive gamma correction, unsharp masking, optical microscopy, Entamoeba histolytica, trophozoites, morphometric analysis.*

Introducción

Contexto de la adquisición de imágenes

La amebiasis, causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*, es un problema de salud pública a nivel mundial, con una estimación de 50 millones de casos sintomáticos y aproximadamente 100,000 muertes anuales, posicionándose como la segunda causa de muerte por enfermedades parasitarias a nivel global [1,2]. El estudio de la morfología de los trofozoitos de *E. histolytica* mediante microscopía óptica es importante tanto para el diagnóstico como para la investigación de mecanismos patogénicos y la evaluación de compuestos con actividad amebicida [3,4]. En particular, el análisis basado en observación microscópica permite identificar alteraciones estructurales —

vacuolización, condensación nuclear, pérdida de la continuidad de la membrana plasmática y lisis celular— que constituyen indicadores relevantes de la eficacia de agentes terapéuticos [3,4,5].

Las imágenes adquiridas mediante microscopía óptica de campo claro se obtienen en RGB, y al convertirla en escala de grises cada píxel codifica únicamente un valor de intensidad luminosa. Las diferencias de densidad óptica entre la membrana plasmática, el citoplasma, las vacuolas y el núcleo de los trofozoitos se manifiestan como variaciones sutiles de intensidad difícilmente apreciables para el observador humano [6]. Estudios previos han documentado que agentes como el riluzol inducen pérdida de la continuidad de la membrana plasmática, aparición de vacuolas pleomórficas y alteraciones nucleares en trofozoitos de *E. histolytica* [5], alteraciones que requieren alta discriminación visual para su documentación. Estas observaciones enfatizan la necesidad de herramientas de procesamiento de imagen que potencien la visualización de estas características en micrografías de campo claro convencionales.

Técnicas de procesamiento individual

Las imágenes monocromáticas presentan de manera nativa limitaciones que pueden ser solventadas por diferentes técnicas que mejoran selectivamente atributos visuales [6]. Para este trabajo se han seleccionado tres técnicas complementarias, cada una orientada a realzar un aspecto diferente de la información contenida en las imágenes: Corrección adaptativa de gamma, enmascaramiento de enfoque (*Unsharp Masking*) e Imagen residual (Image Subtraction).

Composición de la imagen en falso color

Las técnicas de falso color han sido ampliamente empleadas en astronomía, teledetección, geología y diagnóstico médico para hacer perceptibles variaciones sutiles indetectables en representaciones monocromáticas [6,10]. En el ámbito de la microscopía biológica, la asignación de colores a imágenes de fluorescencia o a canales espectrales distintos ha demostrado ser una estrategia eficaz para la visualización simultánea de múltiples estructuras celulares [10,11]. En este trabajo, las tres imágenes resultantes de los procesamientos descritos se asignan como canales independientes R, G y B para componer una representación única de falso color que codifica cromáticamente la información complementaria de cada técnica de mejora.

Metodología

El sistema propuesto se implementa en Python utilizando las bibliotecas scikit-image y NumPy. El pipeline está organizado en cuatro etapas secuenciales: (1) preprocesamiento, (2) mejora paralela mediante tres técnicas, (3) composición en falso color y (4) visualización. Los parámetros generales del sistema se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Parámetros del pipeline de procesamiento.

Etapa	Técnica / función	Parámetro	Valor utilizado
Preprocesamiento	<i>Filtro gaussiano</i> (<i>filters.gaussian</i>)	σ (sigma)	2
Preprocesamiento	Inversión tonal	—	$I_{inv} = 1 - I_{norm}$
Mejora 1	Gamma adaptativa	γ	Véase Cuadro 2
Mejora 2	<i>Unsharp Masking</i> (<i>unsharp_mask</i>)	radius / amount	2 / 0.5
Mejora 3	Imagen residual	—	$I_{resta} = I_{inv} - I_{unsharp}$
Composición	Falso color RGB	Canales R, G, B	Véase Cuadro 3

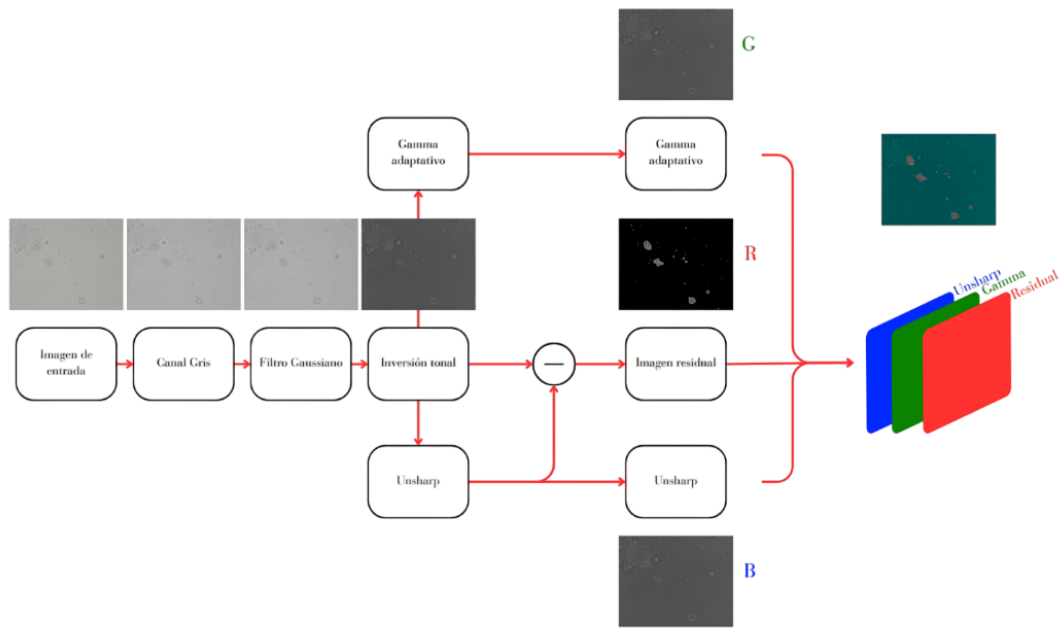


Figura 1. Diagrama del algoritmo propuesto para la identificación de *Entamoeba histolytica* en microscopía óptica de campo claro

Preprocesamiento: suavizado gaussiano e inversión tonal

Las micrografías de campo claro se adquieren inicialmente en escala de grises como imágenes en color que se convierten a escala de grises, o directamente como imágenes monocromáticas. El primer paso consiste en la supresión de gránulos de fondo mediante la convolución de la imagen con un filtro gaussiano isótropo, cuyo núcleo bidimensional está definido por:

$$G\sigma(x, y) = 1 / (2\pi\sigma^2) \cdot \exp[-(x^2 + y^2) / (2\sigma^2)] \quad (1)$$

donde $\sigma = 2$ píxeles es la desviación estándar que controla el alcance del suavizado y (x, y) son las coordenadas relativas al centro del núcleo. La imagen suavizada se obtiene mediante la convolución:

$$I_{suav}(x, y) = I(x, y) * G\sigma(x, y) \quad (2)$$

donde el operador $*$ denota convolución discreta. La convolución con el núcleo gaussiano se implementa mediante funciones optimizadas de la librería scikit-image. A continuación, se aplica una inversión tonal de la imagen suavizada normalizada al intervalo $[0, 1]$, con el fin de transformar el esquema de contraste propio de las micrografías de campo claro —trofozoitos oscuros sobre fondo claro— en uno donde los trofozoitos resulten más luminosos y, por tanto, más susceptibles a la mejora por realce de intensidades:

$$I_{inv}(x, y) = 1.0 - I_{suav,norm}(x, y) \quad (3)$$

Mejora 1: Corrección adaptativa de gamma

La corrección de gamma es una transformación puntual no lineal que modifica la distribución tonal de la imagen. Aplicada sobre la imagen invertida normalizada, la transformación tiene la forma:

$$I_{gamma}(x, y) = 255 \cdot [I_{inv}(x, y) / 255]^\gamma \quad (4)$$

donde γ es el parámetro que controla la curvatura de la transformación. Valores de $\gamma < 1$ expanden el rango dinámico en las regiones oscuras (aclarando la imagen), mientras que $\gamma > 1$ los comprime (oscureciendo la imagen). El valor de γ se selecciona automáticamente a partir de la clasificación de la imagen según su media global μ_g :

$$\mu_g = (1 / M \cdot N) \cdot \sum_x \sum_y I_{inv}(x, y) \quad (5)$$

donde $M \times N$ son las dimensiones de la imagen. Con base en μg se determina la clase de iluminación y el valor de γ correspondiente, como se indica en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de iluminación y valor de γ asignado automáticamente.

Clase	Condición (μg)	Subclase	γ asignado
OSCURA	$\mu g < 85$	Muy oscura ($\mu g < 60$)	0.5
OSCURA	$\mu g < 85$	Oscura moderada ($60 \leq \mu g < 85$)	0.6
BALANCEADA	$85 \leq \mu g \leq 170$	—	1.0 (sin cambio)
CLARA	$\mu g > 170$	Clara moderada ($170 < \mu g \leq 195$)	1.3
CLARA	$\mu g > 170$	Muy clara ($\mu g > 195$)	1.4

Mejora 2: Enmascaramiento de enfoque (Unsharp Masking)

El enmascaramiento de enfoque opera en dos etapas. Primero, se genera una versión suavizada de la imagen invertida aplicando un filtro gaussiano con radio $r = 2$ píxeles:

$$I_{blur}(x, y) = I_{inv}(x, y) * G_r(x, y) \tag{6}$$

A continuación, se calcula la máscara de detalle como la diferencia entre la imagen original y la versión suavizada:

$$M(x, y) = I_{inv}(x, y) - I_{blur}(x, y) \tag{7}$$

Finalmente, la imagen realzada se obtiene sumando la máscara ponderada por el factor de cantidad $\alpha = 0.5$:

$$I_{unsharp}(x, y) = I_{inv}(x, y) + \alpha \cdot M(x, y) \tag{8}$$

El resultado es una imagen con bordes y transiciones más nítidos, lo que facilita la delineación de contornos celulares y la detección de estructuras internas cuyas fronteras presentan transiciones suaves de intensidad. En el caso de los trofozoitos de *E. histolytica*, este procesamiento contribuye a la definición de la membrana plasmática, los seudópodos y las inclusiones citoplásmicas.

Mejora 3: Imagen residual

Se calcula adicionalmente una imagen de diferencia que captura el residuo entre la imagen invertida original y la imagen con enmascaramiento de enfoque. Esta diferencia preserva las componentes de baja frecuencia que el Unsharp Masking atenúa y elimina los bordes de alta frecuencia que este método enfatiza:

$$I_{resta}(x, y) = I_{inv}(x, y) - I_{unsharp}(x, y) \tag{9}$$

Esta imagen contiene principalmente información de variaciones tonales suaves y de texturas de media frecuencia, complementando la información de bordes aportada por *I_{unsharp}*.

Composición en falso color

Las tres imágenes procesadas se asignan como canales independientes del espacio de color RGB para formar la imagen de salida en falso color *IFC*:

$$IFC(x, y) = [I_{resta}, I_{gamma}, I_{unsharp}] \tag{10}$$

La asignación de cada imagen a su canal correspondiente, así como la información morfológica que cada canal codifica, se detalla en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Asignación de canales en la imagen de falso color.

Canal	Imagen asignada	Técnica de origen	Información codificada
R (Rojo)	<i>I_{resta}</i>	Diferencia Unsharp – Inv.	Residuos texturales y bordes de alta frecuencia

Canal	Imagen asignada	Técnica de origen	Información codificada
G (Verde)	I_gamma	Corrección gamma adaptativa	Distribución tonal global ajustada
B (Azul)	I_unsharp	Unsharp Masking	Bordes y detalles estructurales finos

Las regiones donde los tres procesamientos producen respuestas similares se visualizan en tonos cercanos al verde, indicando zonas de comportamiento homogéneo (típicamente el fondo de la imagen). Las regiones con respuestas diferenciales —es decir, las estructuras biológicas de los trofozoitos— se manifiestan con tonalidades cromáticas distintivas. Dado que la capacidad del sistema visual humano para discriminar variaciones cromáticas es sustancialmente superior a su capacidad para distinguir diferencias sutiles de intensidad en una escala monocromática [6], la composición en falso color mejora significativamente la identificación visual de los trofozoitos y sus subestructuras internas.

Resultados

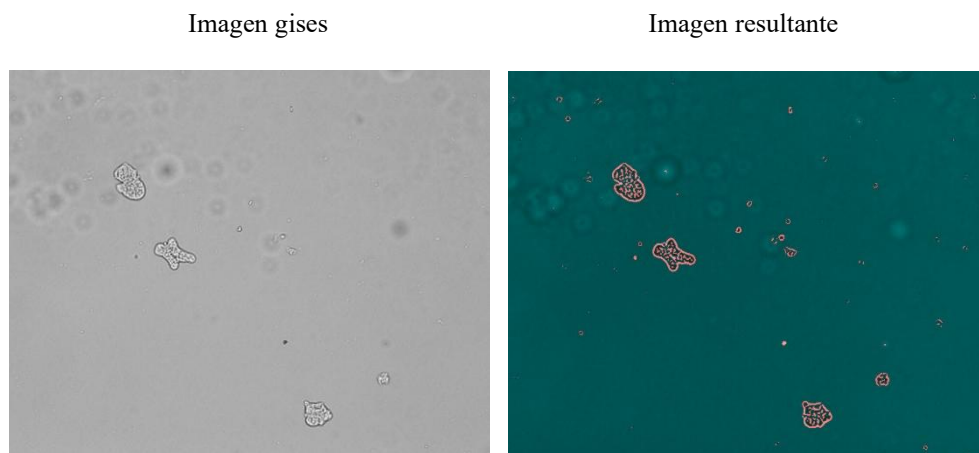


Figura 2. Micrografía original (escala de grises) vs. Imagen resultante en falso color

Imagen invertida

Gamma adaptativo

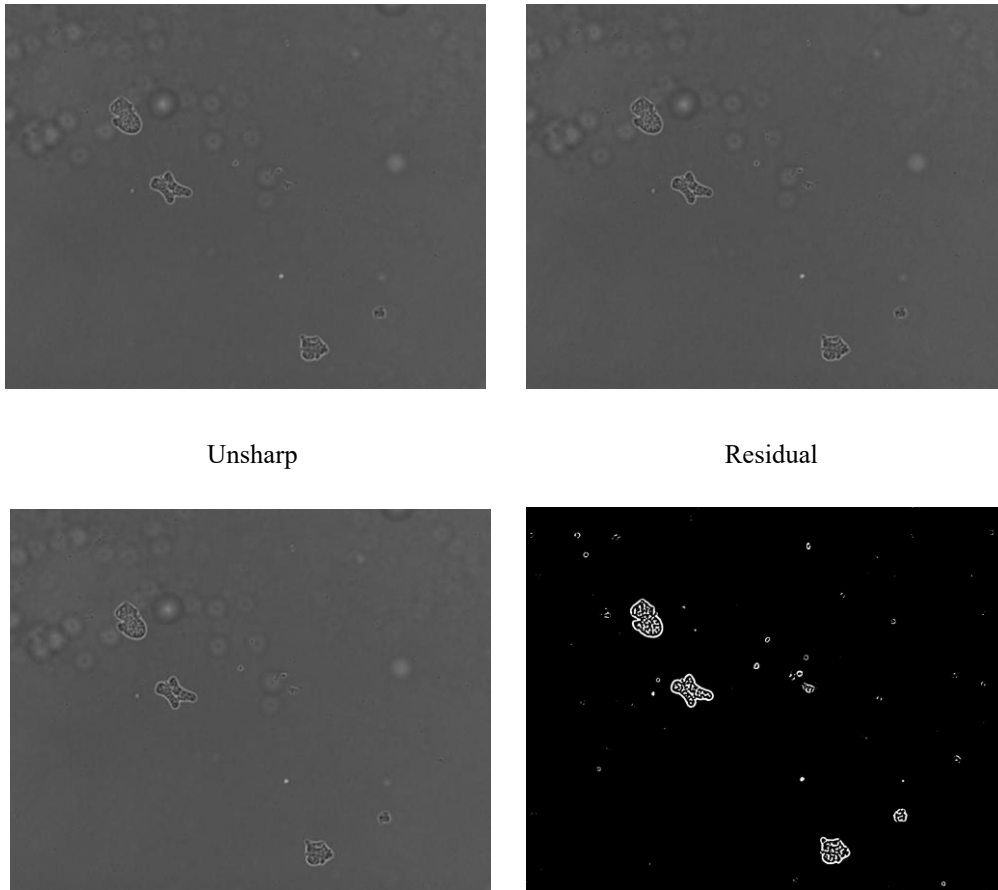


Figura 3. Panel comparativo de la inversión y las tres mejoras utilizadas: gamma adaptativo, unsharp masking e imagen residual.

Los resultados preliminares muestran que la composición en falso color *IFC* permite distinguir visualmente los trofozoitos del fondo y resaltar sus estructuras internas. En la imagen compuesta, la membrana plasmática, las vacuolas y el núcleo adquieren tonalidades cromáticas diferenciadas respecto al medio extracelular, facilitando su identificación con respecto a la micrografía monocromática original. La imagen de diferencia *Iresta* aporta en el canal R variaciones de media frecuencia correspondientes a la textura citoplasmática; el canal G codifica la distribución tonal global ajustada por *Igamma*; y el canal B captura mediante *Iunsharp* los bordes y detalles estructurales finos.

Discusión

La estrategia de composición multicanal propuesta aprovecha la complementariedad de las respuestas de la corrección de gamma adaptativa y el Unsharp Masking. La inversión tonal previa —ecuación (3)— resulta apropiada para las imágenes de microscopía de campo claro, donde los trofozoitos aparecen como objetos oscuros sobre un fondo claro, invirtiendo esta relación para favorecer la respuesta de los algoritmos de realce. La selección automática de γ según el Cuadro 2 elimina la necesidad de ajuste manual, adaptando el procesamiento a las condiciones específicas de iluminación de cada micrografía.

La imagen de diferencia *Iresta* —ecuación (9)— actúa como un filtro pasa-bajas relativo, preservando las variaciones lentas de intensidad que el Unsharp Masking atenúa. Al asignarla al canal R, se obtiene una representación en la que las zonas de transición suave (citoplasma, interior de vacuolas) adquieren tonalidades rojizas que contrastan con las regiones de borde enfatizadas en azul por el canal B. Esta separación cromática de componentes frecuenciales facilita la interpretación visual y puede servir como entrada a algoritmos de segmentación basados en características de color.

Dado que *E. histolytica* es la segunda causa de muerte por enfermedades parasitarias a nivel mundial [1,2] y que la detección de alteraciones morfológicas como las inducidas por el riluzol [5] constituye un indicador clave de la eficacia de compuestos terapéuticos, contar con herramientas de procesamiento de imagen accesibles y parametrizables representa una contribución práctica para los grupos de investigación en parasitología. La herramienta propuesta es compatible con micrografías de campo claro convencional, sin requerir equipamiento especializado de fluorescencia.

Conclusiones

Se ha presentado un sistema de procesamiento de imágenes microscópicas de *Entamoeba histolytica* que integra tres técnicas complementarias de mejora —corrección adaptativa de gamma, Unsharp Masking e imagen residual— en una representación única de falso color mediante composición RGB [ecuaciones (1)–(10)]. Las principales conclusiones son:

1. La inversión tonal previa [ecuación (3)] adapta el esquema de contraste de las micrografías de campo claro al requerido por los algoritmos de realce, sin pérdida de información estructural.
2. La selección automática de γ según la clasificación de iluminación [Cuadro 2] elimina la necesidad de ajuste manual, adecuándose a las variaciones inherentes de las condiciones de adquisición microscópica.
3. La composición RGB [ecuación (10)] integra distintas representaciones —realce de bordes, componentes residuales y corrección de intensidades— generando una diferenciación cromática que permite identificar estructuras como membrana plasmática, citoplasma, vacuolas y núcleo de los trofozoitos.
4. El pipeline parametrizable constituye una herramienta de apoyo para estudios de evaluación de agentes amebicidas que requieren detectar alteraciones morfológicas sutiles en micrografías de campo claro, sirviendo además como etapa preparatoria para algoritmos de segmentación y clasificación automatizada.

Referencias

- [1] Shirley, D.A.T., Farr, L., Watanabe, K. y Moonah, S. (2018). A review of the global burden, new diagnostics, and current therapeutics for amebiasis. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(7), ofy161.
- [2] Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torber, J., Noe, J., Friedman, S., Sapber, K., Kim, P., Ober, A.J. y Campos, L. (2018). *Entamoeba histolytica*: Updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 4601420.
- [3] Pacheco, J., Shibayama, M., Campos, R., Beck, D.L., Houpt, E., Petri, W.A. Jr. y Tsutsumi, V. (2004). In vitro and in vivo interaction of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis. *Parasitology International*, 53(1), 35–47.
- [4] Guzmán-Téllez, P., Martínez-Castillo, M., Flores-Huerta, N., Rosales-Morgan, G., Pacheco-Yépez, J., de la Garza, M., Serrano-Luna, J. y Shibayama, M. (2020). Lectins as virulence factors in *Entamoeba histolytica* and free-living amoebae. *Future Microbiology*. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0275>
- [5] Velásquez-Torres, M., Trujillo-Ferrara, J.G., Godínez-Victoria, M., Jarillo-Luna, R.A., Tsutsumi, V., Sánchez-Monroy, V., Posadas-Mondragón, A., Cuevas-Hernández, R.I., Santiago-Cruz, J.A. y Pacheco-Yépez, J. (2023). Riluzole, a derivative of benzothiazole as a potential anti-amoebic agent against *Entamoeba histolytica*. *Pharmaceuticals*, 16(6), 896.
- [6] Gonzalez, R.C. y Woods, R.E. (2018). *Digital Image Processing*, 4a ed. Pearson Education, Nueva York.
- [7] Zuiderveld, K. (1994). Contrast limited adaptive histogram equalization. En: P.S. Heckbert (Ed.), *Graphics Gems IV*. Academic Press, San Diego, pp. 474–485.
- [8] Pizer, S.M., Amburn, E.P., Austin, J.D., Cromartie, R., Geselowitz, A., Greer, T., ter Haar Romeny, B., Zimmerman, J.B. y Zuiderveld, K. (1987). Adaptive histogram equalization and its variations. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 39(3), 355–368.
- [9] Cakir, S., Toker, K.S. y Alsaran, A. (2018). Contrast enhancement of microscopy images using image phase information. *IEEE Access*, 6, 3839–3850.
- [10] Glaser, A.K., Reder, N.P., Chen, Y. et al. (2020). FalseColor-Python: A rapid intensity-leveling and digital-staining package for fluorescence-based slide-free digital pathology. *PLOS ONE*, 15(10), e0233198.
- [11] Castleman, K.R. (1998). Color image processing for microscopy. *The Biological Bulletin*, 194(2), 100–107.

Referencias

[1] Ing. Daniela Yolitz Pérez-Juárez

(mayo - junio, 2026) *Procesamiento de imágenes microscópicas de Entamoeba histolytica mediante tres técnicas de mejora adaptativa y composición en falso color. Boletín UPIITA, año 19, (108) 2026* [liga del artículo]